

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

**OKSİDATİF STRESLE AKTİVE EDİLEN TRPM2 KATYON
KANALLARININ İNAKTİVASYONUNDA MELATONİNİN
ETKİSİNİN PATCH-CLAMP SİSTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Ömer ÇELİK
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi tarafından 1882-D-09 proje numarası ile desteklenmiştir
Tez. No: 69**

ISPARTA - 2011

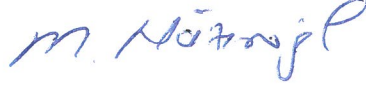
KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

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

Tez Savunma Tarihi: 20/10/2011

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



Üye : Prof. Dr. Halis KÖYLÜ
Süleyman Demirel Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Ahmet KOYU
Süleyman Demirel Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Derviş ÖZÇELİK
İstanbul Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. A. Cihangir UĞUZ
Süleyman Demirel Üniversitesi



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



Prof. Dr. Fehmi ÖZGÜNER
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Haklarını asla ödeyemeyeceğim, sonsuz anlayış ve sevgileri için anne ve babama,

Lisansüstü eğitimim boyunca, bilgi ve deneyimleriyle daima yoluma ışık tutan, akademik ve günlük hayatta başta ben olmak üzere, tüm öğrencilerine verdiği destekle, onlara devamlı yanlarında olduğunu hissettiren ve paha biçilemez tavsiyeleriyle geleceğe daima ümitle bakmamı sağlayan değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU hocamıza,

Onlardan ayrı kaldığım zamanlarda bir yanımın hep eksik olduğunu hissettiğim değerli kardeşlerime,

Zor zamanlarımda desteğini hissettiren, hem arkadaşım hem de hocam dediğim, Sayın Yrd. Doç. Dr. Abdülhadi Cihangir UĞUZ hocamıza ve Biyofizik Anabilim Dalında görev yapan tüm arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde emeği geçen ve üzerimde toz tanesi kadar dahi hakkı bulunan herkese,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla...

Ömer ÇELİK

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
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	5
2.2.1.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM) Kanalları	8
2.2.1.1.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin 2 (TRPM2) Katyon Kanalları	9
2.3. Yama-Menteşe (Patch-clamp) Yöntemi	11
2.3.1. Hücre Üzerinde (On-cell, Cell-attached)	12
2.3.2. Tüm Hücre (Whole-cell).....	13
2.3.3. İçi-Dışarıda (Inside-out)	13
2.3.4. Dışı-Dışarıda (Outside-out)	14
2.4. Yama-Menteşe Setini Oluşturan Temel Malzemeler	14
2.5. Serbest Radikaller.....	17
2.6. Antioksidanlar	19
2.6.1. Melatonin.....	20
2.6.1.1. Melatonin Sentezi.....	21
2.6.1.1.1. Melatonin Sentezinin Kontrolü	22
2.6.1.2. Melatoninin Etki Mekanizması ve İnaktivasyonu.....	23
2.6.1.3. Melatoninin Antioksidan Etkisi	24
2.7. Transfeksiyon	25
2.8. Hücre Canlılığı Testi (MTT)	26
2.9. Apoptozis.....	26

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Gereç	28
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler	28
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	29
3.2. Yöntem	30
3.2.1. Hücre Kültürü	30
3.2.2. Transfeksiyon	31
3.2.3. Yama-menteşe (Patch-clamp) Deneyleri.....	32
3.2.3.1. Solüsyonların Hazırlanması	32
3.2.3.2. Gruplar Oluşturulması.....	33
3.2.4. Kalsiyum Sinyali	36
3.2.5. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi.....	36
4. BULGULAR.....	38
4.1. Hücre Canlılığı (MTT) Testi ile H ₂ O ₂ 'nin Chinese Hamster Ovary (CHO) Hücreleri Üzerine Toksik Dozunun Belirlenmesi	38
4.2. Yama Mentеше (Patch-Clamp) ve Akım Yoğunluğu Kayıtlarının Değerlendirilmesi	39
4.2.1. Grup 1 (Ekstraselüler 300µM MEL) Tüm Hücre Kayıtlarının Değerlendirilmesi	39
4.2.2. Grup 2 (Ekstraselüler 1mM MEL) Tüm Hücre Kayıtlarının Değerlendirilmesi	43
4.2.3. Grup 3 (İntraselüler 200 µM MEL) Tüm Hücre Kayıtlarının Değerlendirilmesi	47
4.3. Kalsiyum Sinyali Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	50
4.3.1. 2-APB Uygulanmış ve Hidrojen Peroksit ile Aktive Edilmiş Hücrelerde Kalsiyum Sinyali	50
4.4. H ₂ O ₂ ile İnkübe Edilen CHO Hücrelerinde Farklı Dozlarda Melatoninin Apoptotik süreç Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	51
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
ÖZET.....	59
ABSTRACT.....	60
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ.....	72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AANAT	: Aril alkilamin N-asetil transferaz
ACA	: Antranilik asit
ADPR	: Adenozin di-fosfat riboz
AFMK	: N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxynuramine
AKG	: Arka kök gangliyon
cADPR	: Siklik ADPR
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
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTNB	: 5,5'-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid)
ER	: Endoplazmik Retikulum
FBS	: Fötal Buzağı Serumu (Fetal Bovine Serum)
GSH	: Glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
HIOMT	: Hidroksi indol-O-metil transferaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
InsP₃	: Inositol 1,4,5 trifosfat
KAT	: Katalaz
LPO	: Lipid peroksidasyon
MEL	: Melatonin
MTT	: [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid]
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NAT	: N-asetil transferaz
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
PTP	: Permability transition pore
ROO·	: Peroksil
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
Se	: Selenyum
SCN	: Supra kiazmatik nükleus
SOD	: Süperoksit dismutaz
SR	: Sarkoplazmik Retikulum
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. Hücre zarı: Akıcı mozaik zar modeli.....	4
Şekil 2. TRP Kanallarının homomultimerik ve heteromultimerik yapısı.....	6
Şekil 3. TRP Kanallarının hücre zarındaki yerleşimi ve geçirgenliği.	7
Şekil 4. TRP kanal üst ailesi	8
Şekil 5. TRPM ailesi şematik gösterimi.	9
Şekil 6. TRPM2 ailesi şematik gösterim	10
Şekil 7. Yama-menteşe (Patch-clamp) metodu.....	12
Şekil 8. Yama-menteşe konfigürasyonları.....	14
Şekil 9. N-asetil-5 metoksitriptamin (Melatonin)'in kimyasal yapısı.	21
Şekil 10. Melatonin sentezi.....	22
Şekil 11. Melatonin sentezinin kontrolü.	23
Şekil 12. Melatoninin antioksidan fonksiyonu	25
Şekil 13. CHO hücreleri üzerine oksidatif stresin temsilcisi olan hidrojen peroksidin (H_2O_2) toksik doz ve süresinin hücre canlılığı (MTT) testi ile belirlenmesi.	38
Şekil 14. 300 μ M melatonin ile inkübe edilmiş fakat H_2O_2 ile uyarılmamış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.	39
Şekil 15. 300 μ M melatonin ile inkübe edilmeden, H_2O_2 ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.	40
Şekil 16. 300 μ M melatonin ile inkübe edilmeden, H_2O_2 ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kayıtlarında akım-voltaj ilişkisi.	40
Şekil 17. 300 μ M melatonin ile inkübe edilmiş ve H_2O_2 ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.	41
Şekil 18. 300 μ M melatonin ile inkübe edilmiş ve H_2O_2 ile uyarılmış CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kayıtlarında akım-voltaj ilişkisi.	41
Şekil 19. Grup1, CHO hücrelerinden tüm-hücre yöntemiyle kaydedilen TRPM2 kanal aktivitesinin akım yoğunluğu grafiği. (ortalama \pm santdart sapma).....	42
Şekil 20. 1 mM melatonin ile inkübe edilmiş fakat H_2O_2 ile uyarılmamış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.	43

Şekil 21. 1 mM melatonin ile inkübe edilmeden, H ₂ O ₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.	44
Şekil 22. 1 mM melatonin ile inkübe edilmeden, H ₂ O ₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kayıtlarında akım-voltaj ilişkisi.	44
Şekil 23. 1 mM melatonin ile inkübe edilmiş ve H ₂ O ₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.	45
Şekil 24. 1 mM melatonin ile inkübe edilmiş ve H ₂ O ₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kayıtlarında akım-voltaj ilişkisi.	45
Şekil 25. Grup 2, CHO hücrelerinden tüm-hücre yöntemiyle kaydedilen TRPM2 kanal aktivitesinin akım yoğunluğu grafiği.	46
Şekil 26. Pipet içi 200 µM melatonin uygulanmış fakat H ₂ O ₂ ile uyarılmamış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.	47
Şekil 27. Pipet içi 200 µM melatonin uygulanmadan, H ₂ O ₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.	47
Şekil 28. Pipet içi 200 µM melatonin uygulanmadan H ₂ O ₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.	48
Şekil 29. Pipet içi 200 µM melatonin uygulanmış ve H ₂ O ₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.	48
Şekil 30. Grup 3, CHO hücrelerinden tüm-hücre yöntemiyle kaydedilen TRPM2 kanal aktivitesinin akım yoğunluğu grafiği.	49
Şekil 31. Farklı dozlarda melatonin ile inkübe edilen CHO hücrelerinde sitozole Ca ⁺² salınımının akım-zaman grafiği.	50
Şekil 32. Farklı dozlarda melatonin ile inkübe edilen CHO hücrelerinde sitozole Ca ⁺² salınımının akım-zaman grafiğinin altında kalan alanlara göre değerlendirilmesi.	50
Şekil 33. 2 saat boyunca farklı dozlarda melatonin ve ardından 5 saat boyunca 1 mM H ₂ O ₂ ile inkübe edilmiş CHO hücrelerinde melatoninin apoptotik süreç üzerine etkisi.	51

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Patch-clamp (Yama-menteşe) seti genel görünüm.....	15
Resim 2. Hücre Kültürü (Laminar akım kabini).....	31
Resim 3. Yama-menteşe oluşturulmuş hücrenin mikroskopik görünümü.....	36

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Normal ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü	32
Tablo 2. NMDG'li ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü.....	32
Tablo 3. Hücre içi tampon çözelti hazırlama protokolü	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 fonksiyonların 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 2011, 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 hücre 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). Antioksidanlar enzimatik ve non-enzimatik olmak

üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Pineal bezden salgılanan melatonin hormonu, non-enzimatik antioksidanlar arasında önemli bir yer tutmaktadır. Melatonin, ışıklı ortama nazaran karanlıkta daha fazla salgılanmaktadır ve eksikliğinde önemli hastalıklar meydana gelmektedir. Bazı araştırmalarda melatoninin E vitamininden daha kuvvetli bir antioksidan olduğu ortaya konmuştur (Pieri et al., 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.

Melatonin hormonu antioksidan 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, melatoninin oksidatif stresle aktive edilmiş TRPM2 katyon kanal akımları, Ca^{+2} sinyali ve apoptozis değerleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre Zarının Yapısı ve Biyofiziksel Özellikleri

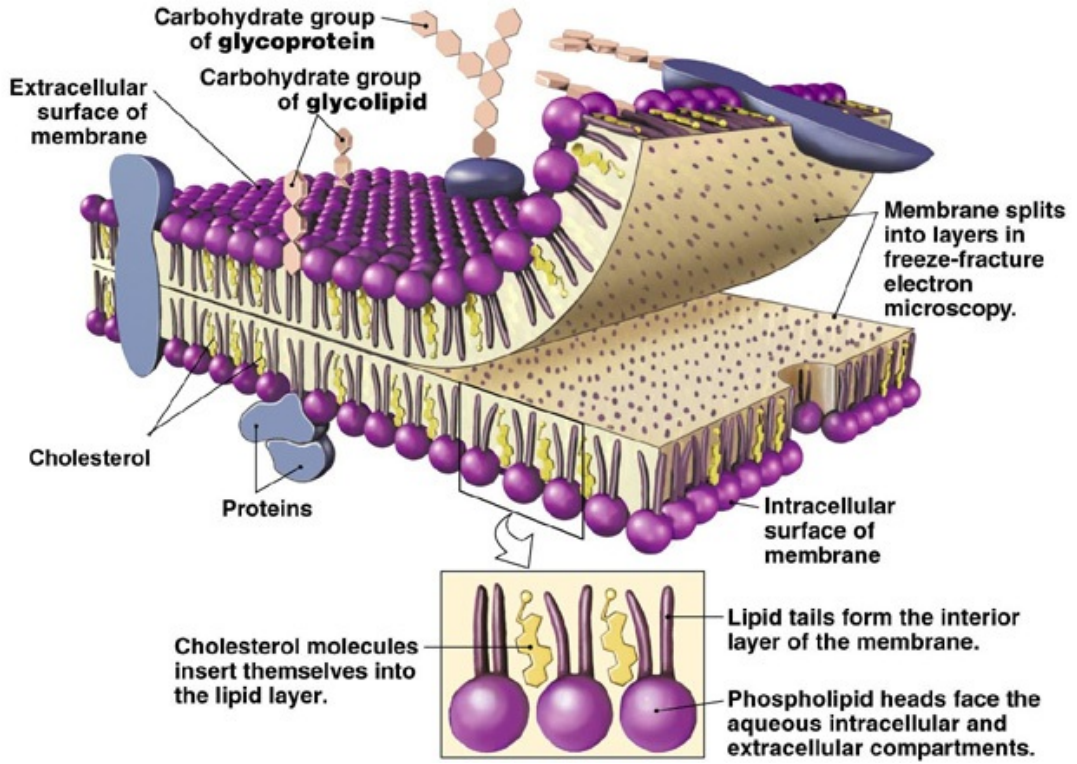
Bir canlının yapısal ve işlevsel olarak tüm özelliklerini taşıyan en küçük yapı birimi olarak tanımlanan hücreyi, bulunduğu dış ortamdan ayırarak yaşamsal faaliyetlerini devam ettirmesini sağlayan en önemli bileşeni hücre zarıdır (Şekil 1). Plazma zarı olarak da bilinen bu zar; hücreyi dış ortamdan ayıran, 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).

Zarın ortasındaki lipit tabaka; suda çözünme özelliğine sahip olan üre, glikoz ve iyonları geçirmezken yağda çözünebilir oksijen, karbondioksit ve alkol gibi maddelere karşı geçirgenlik özelliği göstermektedir. Hücre zarının önemli bileşenlerinden biri de kolesteroldür. Kolesterol, yüksek oranda yağda çözünme özelliği gösterdiğinden dolayı lipit çift tabaka içerisinde erimiş halde bulunmaktadır.

Kolesterol sadece hücre zarının akışkanlığını belirlemez. Bunun yanında hücre içi ve hücre dışı ortamda bulunan ve suda çözünebilen maddelere karşı hücre zarının geçirgenliğini de belirlemektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Hücre zarı: Akıcı mozaik zar modeli (Cummings 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 iyonlara 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).

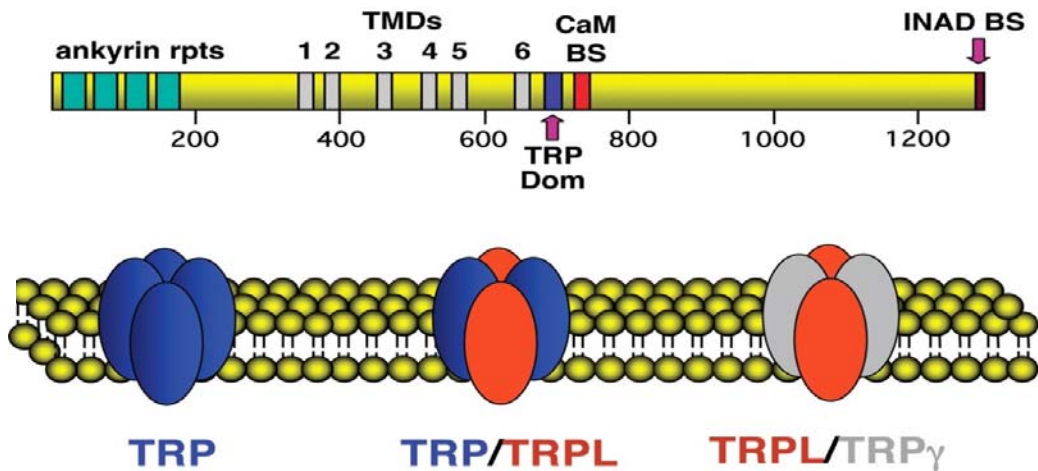
2.2.1. Transient Reseptör Potansiyel (TRP) Kanal Ailesi

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).

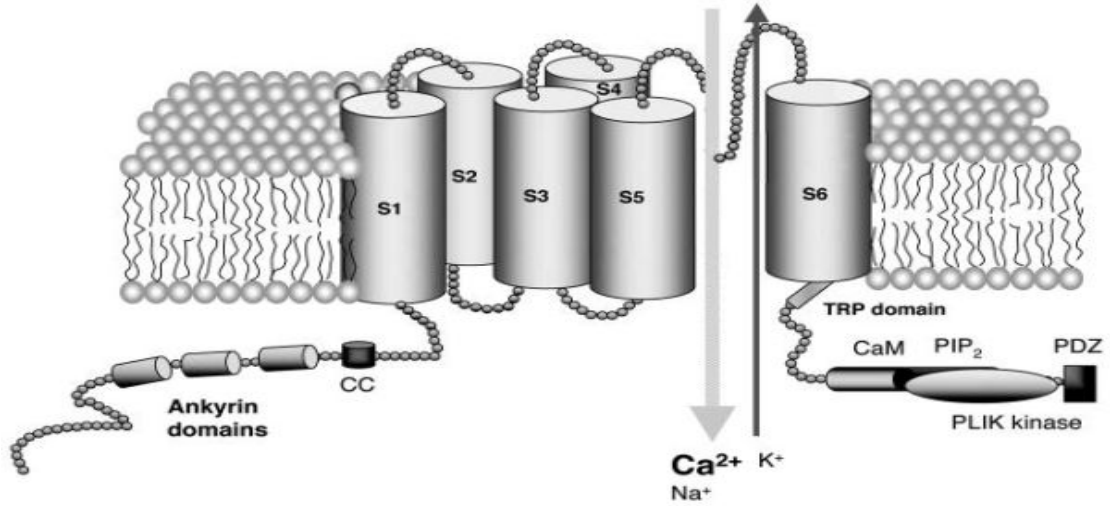
Kuantum pikleri fotoreseptör hücrelerinin ışık uyarısına karşı oluşturduğu temel cevaptır. Kuantum pikleri; fotoreseptör hücreleri tarafından yakalanan tekli fotona karşı, birçok kanalın aynı anda aktive olmasıyla meydana gelmektedir. Kanalların aktivasyonu ile öncelikle sinyal transdüksiyonu oluşumu gerçekleşmektedir. 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 2).



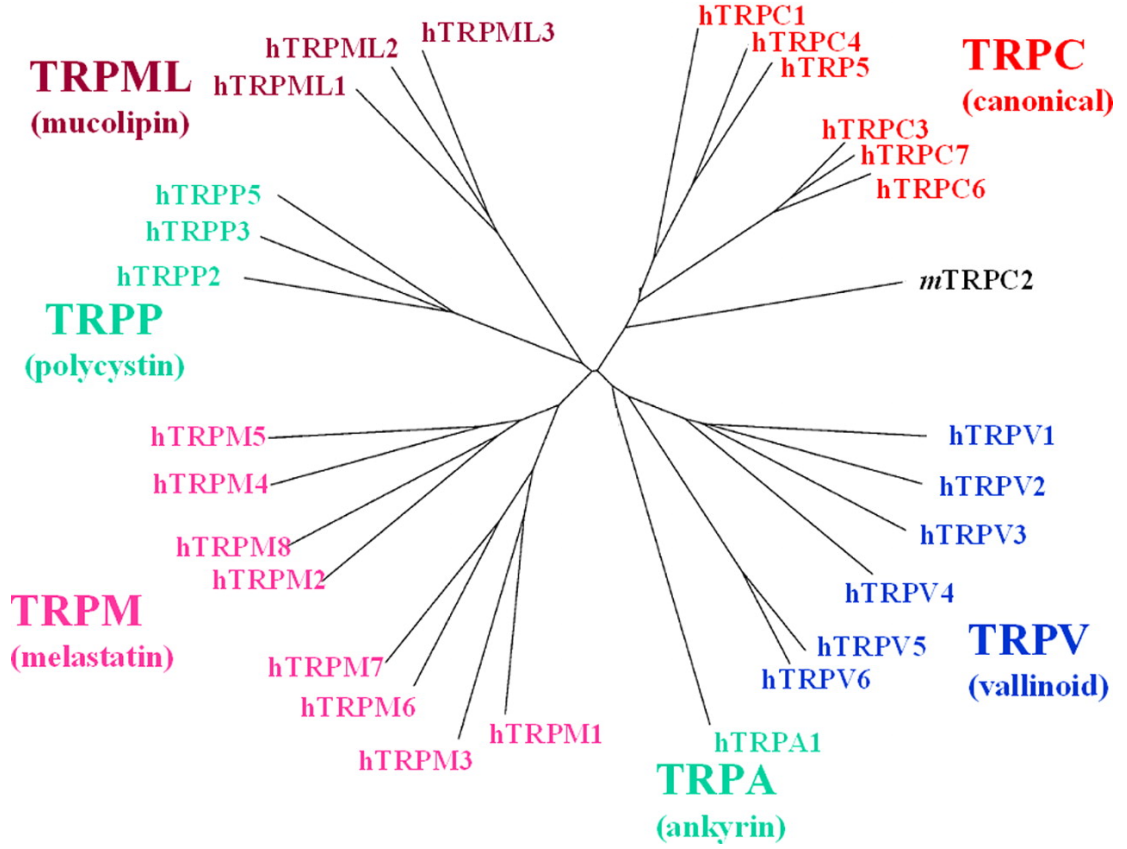
Şekil 2. TRP Kanallarının homomultimerik ve heteromultimerik yapısı (Montell 2005b)

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 2011). 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 3).



Şekil 3. TRP Kanallarının hücre zarındaki yerleşimi ve geçirgenliği.

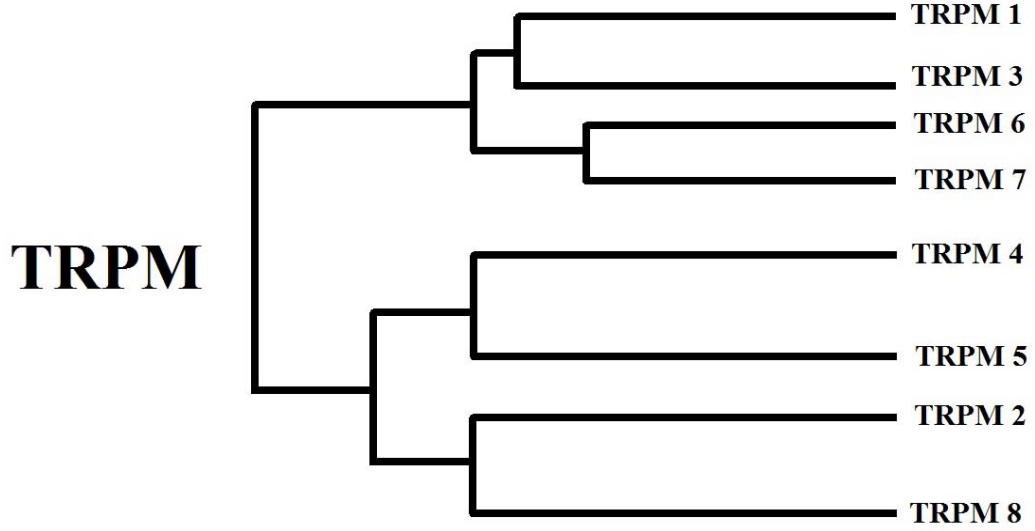
TRP kanalları insan ve fareler gibi omurgalılar dışında sinek ve solucan gibi hayvanlarda da bulunmaktadır (Heiner et al., 2003b). TRP kanalları sekans sınıflandırmasına göre yedi alt aileden oluşmaktadır. Bu alt ailelerden altı tanesi; canonical veya klasik tip olarak adlandırılan (C), vanilloid reseptör (V), melastatin (M), ankrin (A), mukolipin (ML) ve polisistin (P) memelilerde bulunurken sadece omurgasızlarda bulunan ve TRP bölgesi içermeyen TRPN, memelilerde bulunmamaktadır (Şekil 4). Yukarıda sayılanlardan *Drosophila* TRP proteinine homolojik 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 4. 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).



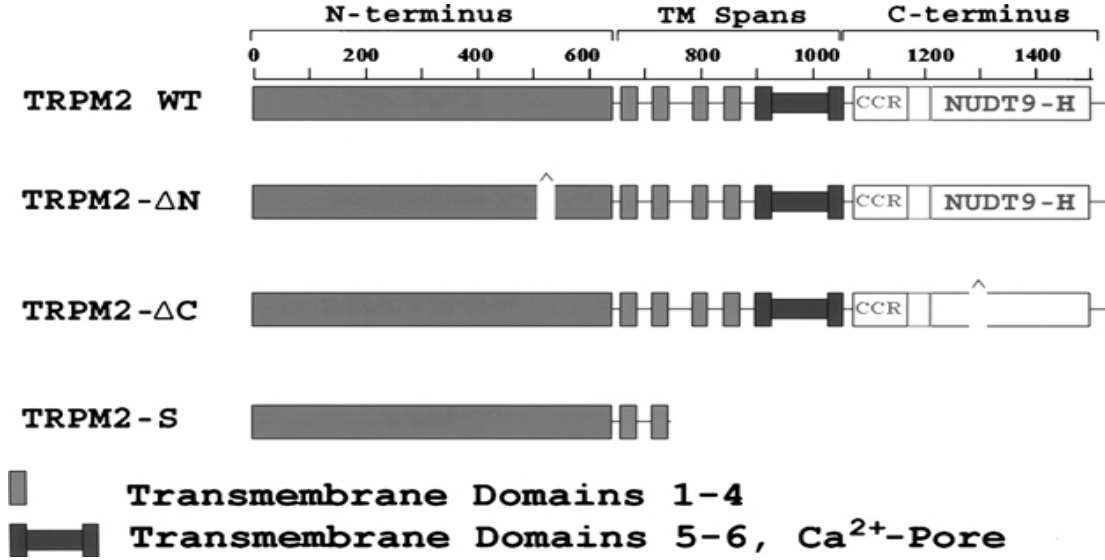
Şekil 5. TRPM ailesi şematik gösterimi.

Bu ailenin 4 ana grupta incelenen TRPM1, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM6, TRPM7 ve TRPM8 olmak üzere şekil 5’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 2011). 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). TRPM2 kanallarının şekil 6'da gösterildiği gibi 4 alt tipi bulunmaktadır.



Şekil 6. TRPM2 ailesi şematik gösterim (Miller 2006)

Hücre içi serbest Ca⁺² düzeyi (80-100 nM) hücre dışına kıyasla 20,000 misli daha azdır (Clapham, 2003). Metabolizma sonucu üretilen H₂O₂ 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ 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

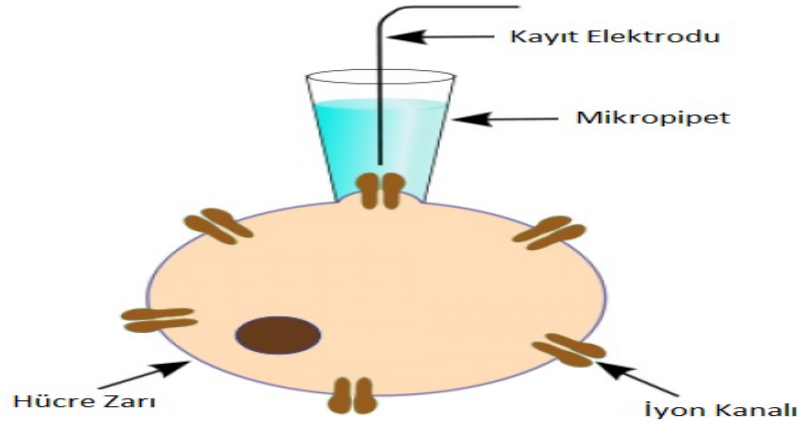
araştırılması hücre içi Ca^{+2} artışı ile ilgili başta iltihabi, kanser ve kalp hastalıklarının oluşum nedenin bilinmesi açısından çok önemlidir (Minke 2006, Lange et al., 2008, Sumoza-Toledo and Penner 2011).

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 blokörü 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 7). Pipet ucu ile hücre zarı parçası arasında oluşan mühür (seal)

boyunca ilk etepta 50 MΩ'luk bir direnç meydana gelmektedir. Pipete uygulanan negatif basınç (emme) sayesinde bu direnç 1-10 GΩ'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 7. Yama-menteşe (Patch-clamp) metodu.

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 8). 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)

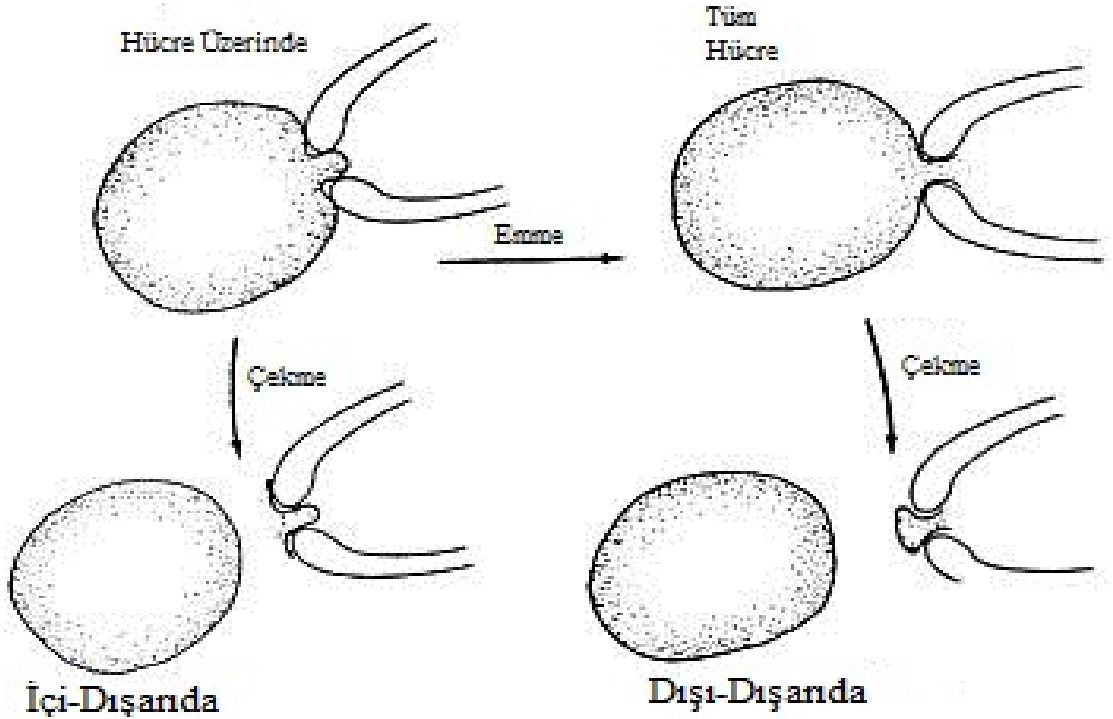
Mikropipet ile hücre üzerinde (cell-attached, on-cell) konfigürasyonu oluşturulduktan sonra pipete hafif bir emme uygulanır. Sonunda; mikropipetin, hücre zarını tuttuğu bölgeden plazma membranını yırtmasıyla oluşturulur (Cai et al., 1998, Molleman 2003). Mikropipet içerisine, intraselüler tampon çözeltisi 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).

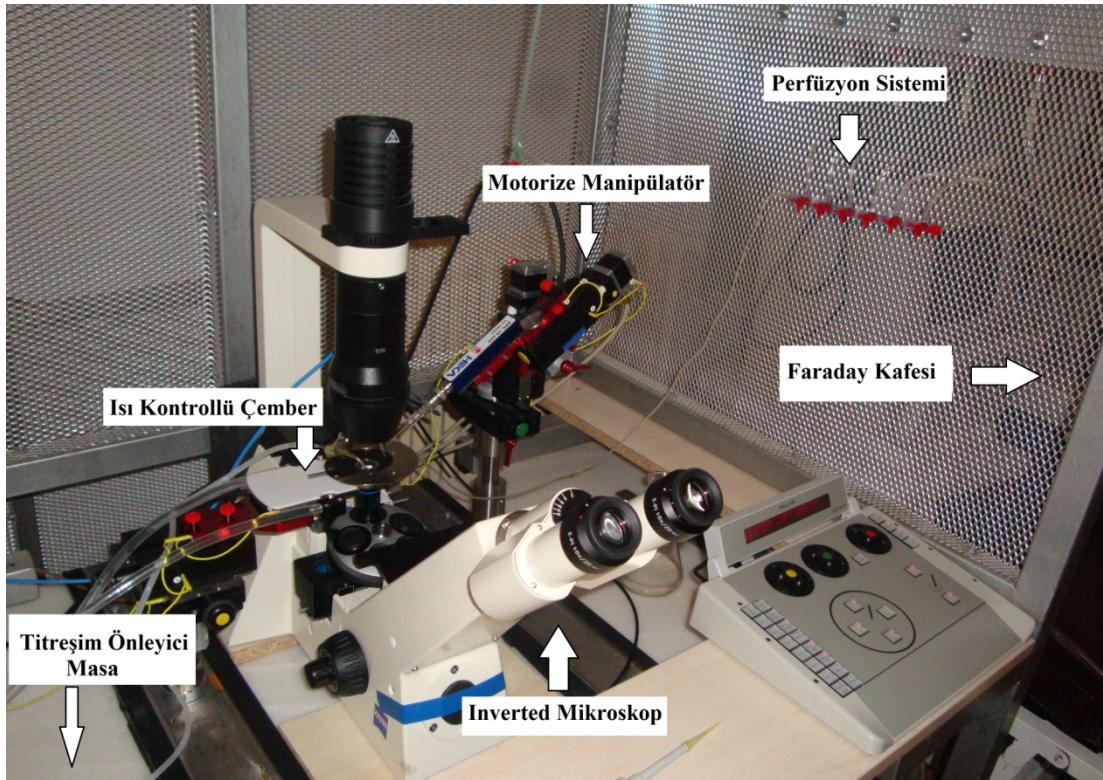


Şekil 8. Yama-menteşe konfigürasyonları.

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 (İnverted mikroskop, Motorize manipülâtör, 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 mikromanipülâtör 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 konuşturulmuştur. Bu haznelere ince hortumlar vasıtasıyla çembere bağlanmış durumdadır (Molleman 2003). Haznelere çember seviyesinden daha yüksekte olması nedeniyle yer çekimi etkisiyle çembere doğru doğal bir sıvı akışı sağlanmaktadır. Sıvının akış hızı, haznelere hortumlara bağlandığı noktalara yerleştirilen musluklar sayesinde kolayca kontrol edilebilmektedir. Çembere gönderilen sıvı, yüksek basınç nedeniyle hücrelere ve taşma nedeniyle objektiflere zarar verebilir. Bu nedenle gönderilen sıvının diğer taraftan aynı hızla tahliye edilmesi gerekmektedir (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. Mikromanipülör: 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 mikromanipülörler 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 orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Atom çekirdeğinin çevresindeki, elektronların bulunduğu boşluğa da orbital denir. Her bir orbitalde spinleri birbirine zıt olan iki elektron bulunur. Bu elektronlara eşlenmiş 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).

Serbest radikaller vücutta 3 yolla meydana gelir:

1. Kovalent bağların homolitik kırılması: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır ise, her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron bulunur. Sonuç olarak, iki adet reaktivite düzeyi yüksek serbest radikal oluşur (Gutteridge 1995).

2. Normal bir molekülden bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Askorbik asit,

glutasyon (GSH) ve tokoferoller gibi hücresele antioksidanlar radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur (Chapple 1997, Valko et al., 2007).

3. Normal bir moleküle bir elektronun eklenmesi yoluyla: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. O₂'in tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin (O₂⁻·) oluşumuna neden olur (Knight 2000).

Bu tepkimelerden herhangi biri oluştuğunda, radikal olmayan türler radikal haline gelir (Quinlan and Gutteridge 1988). Serbest radikaller ile radikal olmayanların tepkimeleri sonucu, tepkimeye giren moleküller sıra ile serbest radikallere dönüşür ve hasar zincirini ilerleterek yayarlar (Chapple 1997, Seifried et al., 2004, Valko et al., 2007).

Oksijen (O₂) ve nitrojen molekülleri serbest radikal kaynaklarıdır. O₂'in kısmi indirgenmesinden, ROT olan hidroksil (·OH) radikali ve O₂⁻· oluşmaktadır. Ayrıca singlet oksijen (¹O₂) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) molekülleri, radikal olmayan ROT olarak ifade edilirler (Winterbourn 1995). Oksijen kaynaklı olmayan diğer serbest radikaller ise nitrik oksit (NO·), peroksinitrit (ONOO⁻·), LPO sırasında oluşan peroksil (ROO·) ve karaciğerdeki karbon tetraklorür (CCl₄) metabolizması sırasında oluşan triklorometil (CCl₃·) radikalidir (Seifried et al., 2004, Lam et al., 2008).

Organizmada oluşan serbest radikallerin en önemlileri ve büyük kısmı O₂ kaynaklı radikallerdir (Juranek and Bezek 2005). O₂'in toksik etkisi yoktur, ancak aerobik hücre metabolizması sırasında serbest oksijen radikallerine dönüşür (Mason et al., 1990). O₂'in kısmi indirgenmesinden, ROT arasında yer alan ·OH ve O₂⁻· oluşmaktadır. Ayrıca ¹O₂ ve H₂O₂ molekülleri radikal olmayan reaktif oksijen türevleridir (Russell et al., 1989).

2.6. Antioksidanlar

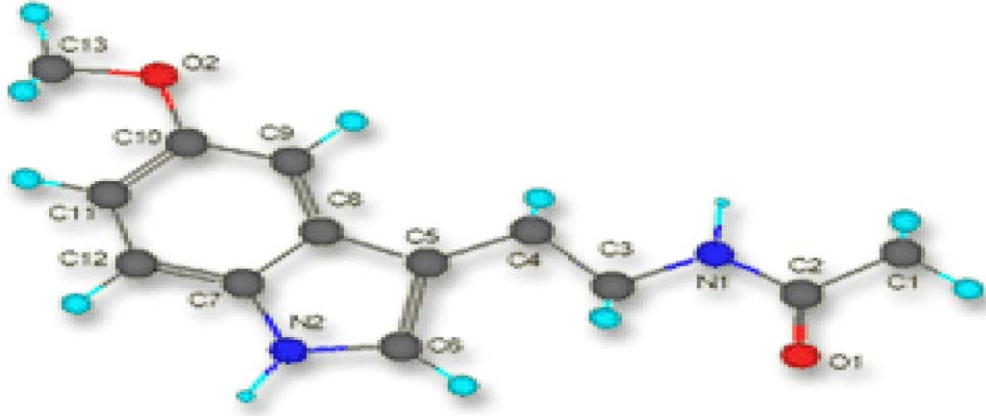
Serbest radikal reaksiyonları nötrofil, makrofaj gibi immün sistem hücrelerinin savunma mekanizması için gerekli olsa da serbest radikallerin fazla üretimi, doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (Knight 2000). ROT'un

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. Melatonin

Melatonin (MEL) ilk kez 1958 yılında kurbağa ve balıkların melanositlerinde bulunan bir renk pigmenti olarak tanımlanmış (Lerner et al., 1958) ancak daha sonra 1993 yılında melatoninin bütün memeli hayvanlarda bulunan ve pineal bezden salınan ve canlıların biyolojik ritmini düzenleyen bir hormon olduğu gösterilmiştir. Hatta 1996 yılından sonra da omurgasızlar ve protozoalar da dahil olmak üzere birçok canlının yapısında varlığı ispatlanmıştır (Lee Kavanau 2006). Melatoninin kimyasal yapısı şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. N-asetil-5 metoksitriptamin (Melatonin)'in kimyasal yapısı.

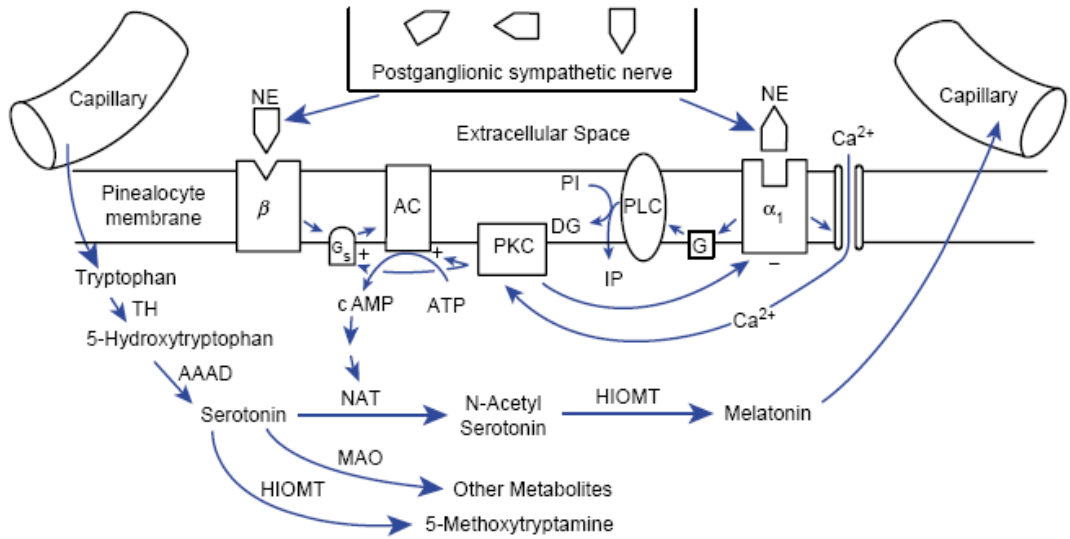
Pineal bez (epifiz bezi), insanlarda üçüncü ventrikülün arkasında yer alır. Total vücut ağırlığına göre oldukça küçük olan bu bez (insanlarda 50-150 mg), böbrekten sonra vücudun en çok kan akımına sahip ikinci organıdır. Bezin yapısı, bez hücrelerinin çoğunu oluşturan ve gerek indolaminleri (çoğunluğu melatonin) gerekse peptidleri (arjinin, v.b) üreten pinealositler ve nöroglia hücreleri olmak üzere iki hücre türünden oluşur. Pineal bez, memelilerde fotik informasyonları nöroendokrin sinyallere dönüştürür. Retinadan algılanan görsel bilgiler, hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeği ve sempatik sinir sistemi yoluyla, pineal beze yansıtılır (Macchi and Bruce 2004). Fotik impulslar taşıyan sempatik efferent lifler pineal beze ulaştığında, özellikle karanlıkta, norepinefrinin pinealosit membranında beta-adrenerjik reseptöre bağlanması ile bir seri reaksiyon başlar. Membranda adenil siklaz aktivitesi ve dolayısıyla cAMP yapımı stimüle olur; cAMP de melatonin ve diğer indolaminlerin biyosentezini katalizleyen enzimleri aktive eder (Guyton and Hall 2006).

2.6.1.1. Melatonin Sentezi

Melatonin diğer adıyla N-asetil-5-metoksitriptamin ilk kez sığır pineal ekstrelerinde melanin granüllerini agrege etme ve kurbağa derisinin rengini açma yeteneği fark edilerek tanımlanmıştır (Lerner et al., 1958). Melatonin biyosentezi, kandan beze difüze olan triptofanın, pineal bezde triptofan hidroksilaz enzimi ile hidroksillenmesiyle başlar. Böylece meydana gelen 5-hidroksi triptofan, L-aromatik aminoasit dekarboksilaz enzimi ile karboksil grubunu kaybeder ve neticede serotonin (5-hidroksi triptamin) meydana gelir (Şekil 10). Pineal bez, serotonin konsantrasyonu

açısından vücutta en zengin organdır. Serotonin asetilasyonu, N-asetil transferaz aracılığı ile gerçekleşir. Burada Asetil CoA, asetil donörü olarak rol oynar. Meydana gelen N-asetil serotonin, metil donörü olarak S-adenozilmetionin'in kullandığı ve hidroksi indol-O-metil transferaz'ın katalizlediği son basamakta N-asetil 5-metoksitriptamin; melatonin'e dönüşür ve böylece melatonin biyosentezi tamamlanır (Reiter 1980, Macchi and Bruce 2004).

Bu mekanizmada hız kısıtlayıcı enzim aril-alkilamin-N-asetil transferaz (AANAT) olarak adlandırılan enzimdir (Şekil 10). Bu enzim, beta ve alfa-1 adrenerjik reseptörler üzerinden etki gösteren epinefrinin nokturnal sempatik salımına yol açar. Bu enzimin negatif feedback mekanizmaları ile düzenlenmesinde ise cAMP, ICER, MAP kinaz fosfataz 1 gibi birçok enzim ve proteinin rol aldığı bilinmektedir (Hardeland et al., 2006).

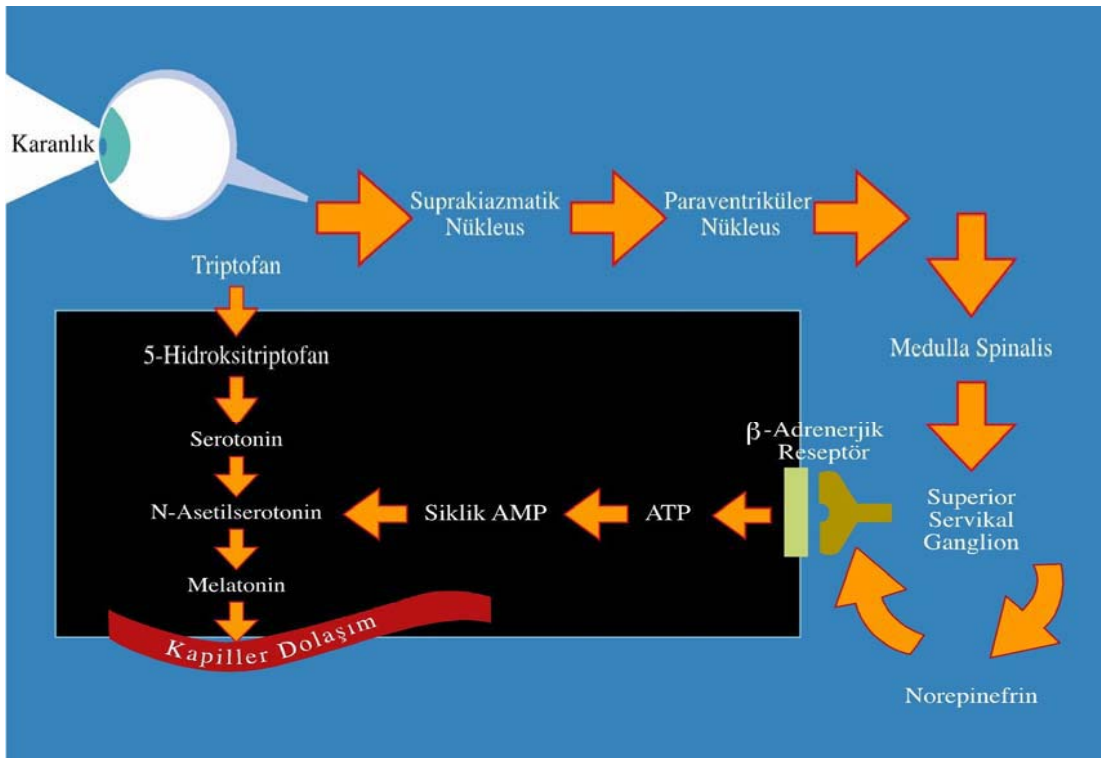


Şekil 10. Melatonin sentezi (Hardeland et al., 2006)

2.6.1.1.1. Melatonin Sentezinin Kontrolü

Melatonin salgısı, canlı türlerine göre farklılık gösteren sirkadiyen bir ritme sahiptir. Bu farklılık, hormonun gece pikinin meydana geldiği saatler ve süreleri ile ilgilidir. Serum melatonin konsantrasyonu, geceleri gündüze göre 3-10 kat daha yüksektir. Melatonin salgısının sirkadiyen ritmi endojen kökenlidir, bu da uyarıların suprakiazmatik çekirdekten çıktığını yansıtır (Reiter 1980). Melatonin sentezi ve salgılanması karanlıkta uyarılırken, ışık ile baskılanmaktadır. Gün ışığının bulunduğu

saatlerde, retinadaki fotoreseptör hücreleri hiperpolarizedir; bu da norepinefrin salınmasını baskılar. Karanlıkla birlikte polarize olan fotoreseptör hücreler norepinefrin salgırlar. Norepinefrin hem triptofanın dolaşımından beze girişini artırmakta, hem de pinealosit membranındaki beta-1 reseptörleri aracılığıyla membrandaki adenil siklazı aktive ederek, hücre içi siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyelerini yükseltmektedir. cAMP etkisiyle, melatonin sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan N-asetil transferaz aktivitesi yükselmekte, böylece melatonin sentez ve salgılanması başlamaktadır (Şekil 11). Melatonin sentez ve salımı arttıkça hormon, pasif difüzyonla dolaşıma geçmektedir (Reiter 1980, 1991, 1995).



Şekil 11. Melatonin sentezinin kontrolü (Reiter 1991).

2.6.1.2. Melatoninin Etki Mekanizması ve İnaktivasyonu

Pineal bezden dolaşıma verilen melatonin lipofilik özelliğinden dolayı direkt olarak veya spesifik reseptörler aracılığıyla hedef hücrelere ulaşır (Reiter 1991). İnsan beyninin çeşitli bölgelerinde, bağırsaklarda, overlerde, kan damarlarında ve karaciğerde, melatonin reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. Farmakolojik ve kinetik gruplara ait zara bağlı iki melatonin bağlanma yeri tanımlanmıştır:

1-MT1 (yüksek afinite (pikomolar)) yerleri

2-MT2 (düşük afinite (nanomolar)) yerleri (Reppert et al., 1996, Von Gall et al., 2002).

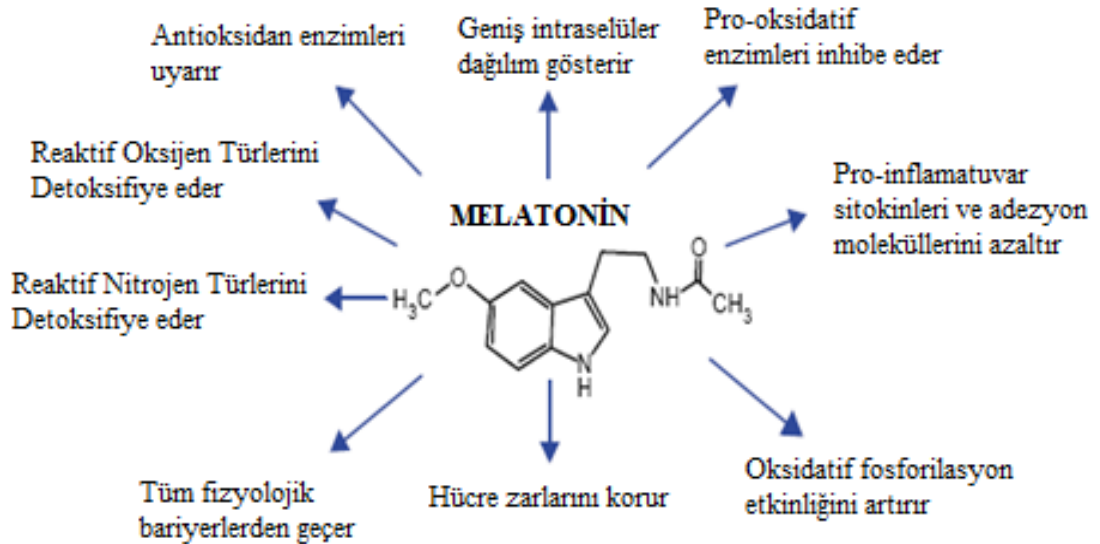
MT1 reseptörlerinin aktivasyonu hedef hücrelerde adenilat siklaz aktivitesinin baskılanmasına neden olur (Yang et al., 2011). MT1 reseptörü aracılığı ile termoregülasyonda, arterial vazokonstriksiyonda, kanser hücrelerinin proliferasyonunda, üreme ve metabolik fonksiyonlarda rol alır. MT2 reseptörü aracılığıyla ise, supra kiazmatik nükleus (SCN)'daki nöronal termoregülasyonda, retina dopamin salgısının inhibisyonunda, vazodilatasyonun indüklenmesinde, arterial yatakta lökosit rulo formasyonunun oluşumunun engellenmesinde ve immun cevabın artırılmasında rol oynadığı bilinmektedir (Turek and Gillette 2004). Lipofilik özelliği nedeniyle hücrenin tüm fraksiyonlarına kolaylıkla girebilen melatoninin, sitozolik ve nükleer bağlanma yerleri de tanımlanmıştır (Reiter 1995). Örneğin; sitozolik kalmodulin'e bağlanarak adenilat siklaz, fosfodiesteraz gibi hedef enzimlerle olduğu kadar yapısal proteinlerle de etkileşerek doğrudan kalsiyum geçişi üzerinde de etki gösterebilir (Benites-King and Anton-Jay 1993). Melatoninin inaktivasyonu, başlıca karaciğerde gerçekleşir. İndol halkasının altıncı konumundan hidroksile olan melatonin, daha sonra sülfat ve glukronik asitle konjuge edilerek idrarla atılır. Melatoninin idrardaki başlıca metaboliti 6-sülfatoksi melatonin olup, plazma melatonin düzeyinin iyi bir göstergesidir. Diğer önemli metaboliti ise; N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) molekülüdür (Brezezinski 1997).

2.6.1.3. Melatoninin Antioksidan Etkisi

Melatonin beyindeki pineal bezden ışık ritmine bağlı olarak salgılanmakta olup, kanser gibi hastalıklarda serbest radikaller inhibisyonu yolu ile kuvvetli antioksidan özelliğe sahip olduğuna dair son 10 yıl içerisinde bildirimlerin arttığı gözlenmektedir (Reiter 1991, Reiter et al., 1997).

Başta kalp hastalıkları ve kanser olmak üzere birçok dejeneratif hastalıkların etiolojisinden serbest radikal hasarı sorumlu tutulmaktadır. Antioksidan moleküller bu hasarı önlemektedirler. Melatoninin de antioksidan etkisi in vivo ve in vitro çalışmalarla gösterilmiştir (Jacob et al., 2002, Marshall et al., 1996). Melatonin yapısında bulunan pirol halkası nedeniyle $\cdot\text{OH}$ ve $\text{O}_2\cdot^-$ radikallerini yakalamada yüksek bir kapasiteye sahiptir. Melatoninin antioksidan etkileri şekil 12'de

gösterilmiştir. Toksik hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek, bütün hücre kompartmanlarındaki biyomolekülleri, serbest radikal oluşumuna karşı bölgesel olarak yerinde korur (Poza et al., 1994). Çok reaktif olan hidroksil radikallerinin yıkıcı etkilerine karşı primer nonenzimatik savunma mekanizmasını oluşturur ve yapılan araştırmalarda organizmayı oksidatif hasara karşı korumada melatonin bilinen diğer antioksidanlardan (mannitol, glutatyon, E vitamini, askorbik asit gibi) daha etkili görülmüştür (Reiter et al., 1997). Askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini) ve glutatyon (GSH) gibi antioksidanlardan farklı olarak, melatonin peroksit radikalini yakalayarak, yayılmakta olan lipid peroksidasyonunu sonlandırmaktadır. Melatoninin bu etkilerinin diğer antioksidanlardan daha güçlü olduğu, in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilmiştir (Marshall et al., 1996). Melatonin direkt antioksidan etkilerinin yanı sıra, dolaylı olarak da antioksidan sisteme katkıda bulunur. Sıçanlarda karaciğer, böbrek ve beyin dokusu glutatyon peroksidaz aktivitesinin, melatonin uygulandıktan sonra arttığı gözlenmiştir. Pinealektomi yapılan sıçanların karaciğer, akciğer ve beyin dokusu glutatyon peroksidaz aktivitesinde anlamlı düşüşler saptanmıştır (Reiter et al., 1997, Martín et al., 2000).



Şekil 12. Melatoninin antioksidan fonksiyonu

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.

2.8. Hücre Canlılığı Testi (MTT)

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid] analizi ilk olarak Mosmann tarafından kullanıma girmiştir (Mosmann 1983). MTT yöntemi, hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyon frajil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrojenaz aktivitesine bağımlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor çözünmeyen formazan kristallerine dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır (Shcharbin et al., 2010). Reaksiyon ürünü uygun karışımda çözüldükten sonra spektrofotometrik yöntemle ölçülür (Bank et al., 1991). Hücrelerin MTT boyasını indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır (Abe and Matsuki 2000). Hücre canlılığı ve üremesini ölçen bu yöntemin, diğer sitotoksik test yöntemlerine göre daha hassas ve tekrarlanabilir olması, uygulamasının kolay ve hızlı olması, radyoaktif izotop kullanmaya gerek olmaması avantaj olarak kabul edilir (Hayon et al., 2003, Hatok et al., 2009).

2.9. Apoptozis

Apoptozis esasen fizyolojik bir süreçtir. Embriyonik gelişim safhalarında çeşitli doku ve organların oluşumu sırasında o dokuyu veya organı oluşturacak hücrelerin moleküler temelleri olan bir uyarıyla yaşamsal faaliyetlerine son vermelerine, yani programlanmış hücre ölümüne verilen isimdir (Roy and Hajnóczky 2008). Apoptozisde bir hücrenin erimesi (melt-down) kendi içerisinde oluşan bir durumdur. Bütünlüğü bozulmamış, sağlam bir hücre zarı içerisindeki interior bileşenler ve yapısal elementlerin parçalanmasıyla hücre erimesi süreci başlatılır. Apoptotik hücre membranları çoğunlukla fosfolipit içeren bilayer yapılarını hemen

kaybetmezler. Bu korumalı birim, bazı yangısal cevaplara sebep olabilecek hücre bileşenlerinin salınmasının önüne geçer. Bu son safhada bütün geri kalan atıklar ve son ürünlerin etrafları bilayer zar ile kaplanır. Minik boyutlarda paketçikler haline dönüştürülen apoptotik artıklar fagositoz ve yutma yeteneğine sahip komşu hücreler tarafından toplanır ve sindirilir. Bu nedenle apoptozis diğer hücreler için zararsız bir süreç halini alır (Uğuz et al., 2009). Bu aynı zamanda daimi bir homeostazisin devam ettirilmesi için gereklidir. Özellikle, embriyonik gelişim ve erken büyüme sürecinde görevini tamamlamış hücrelerin bertaraf edilmesinde önemli bir rolü vardır. Aynı zamanda yetişkin hayvanlarda bu süreç, onarılması olanaksız hücrelerin yok edilmesi için de işletilmektedir. Bunun yanı sıra apoptotik süreç kanser gibi birçok hastalığın oluşmasına da yol açmaktadır (Pacher et al 2001). Yapısı değişmiş tümör hücreleri kendi apoptotik süreçlerini engellemekte ve hücrenin kontrolsüz bir biçimde faaliyetini sürdürmesine izin vermektedir. Ya da bunun tersine bazı nöronal hücrelerin aşırı apoptotik faaliyet göstermesi bunama (demans) ile sonuçlanabilmektedir (Roy and Hajnóczky 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

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

Yükselteç: HEKA, EPC-10 (Almanya)

Mikromanuplasyon: 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 flasksı: Cell Star, Greiner bio-one (Almanya)

Kültür petri kabı: TPP Techno Plastic Products (İsviçre)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Melatonin, Sigma (Almanya)

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

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

Fetal Bovine Serum, Merck (Almanya)

Hidrojen Peroksit (H_2O_2), 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 ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), Merck (Almanya)

Magnesium Chloride ($MgCl_2 \cdot 6 H_2O$), Merck (Almanya)

Folin-Ciocalteu's Phenol, Merck (Almanya)

Potassium Tartarat, Merck (Almanya)

Sodium Carbonate (Na_2CO_3), Merck (Almanya)

Fura-2-AM, Invitrogen (ABD)

DMSO (Dimethyl sulfoxide) 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)

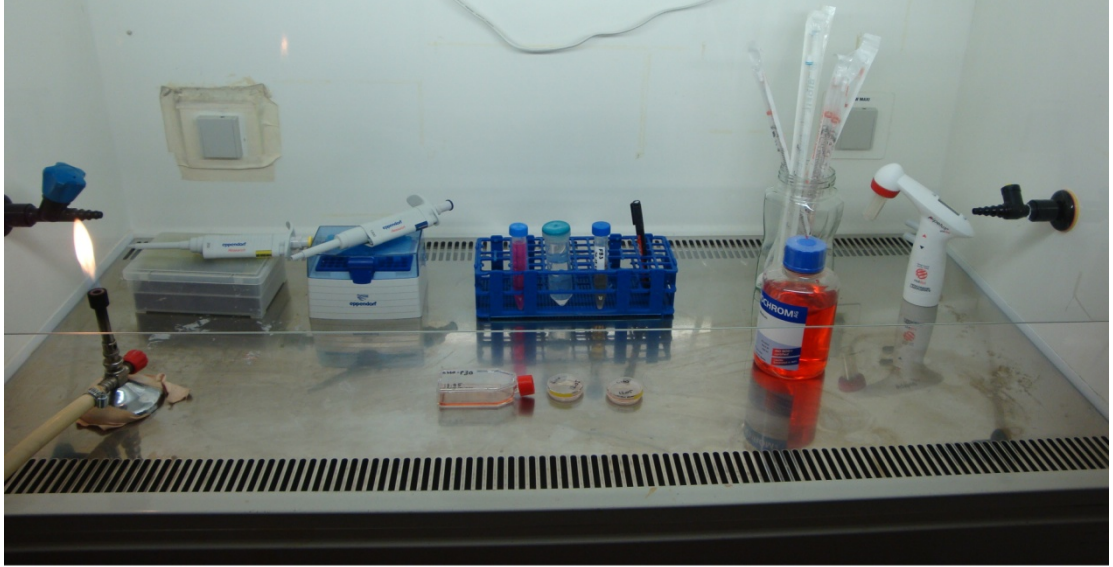
3.2. Yöntem

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 medyumunu 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 1800 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-mentеше deneyleri için deney başlangıcından 5 saat öncesinde 1 mM H₂O₂ ve 2 saat öncesinde 300 µM ve 1 mM melatonin ile hücreler inkübe edildi.



Resim 2. Hücre Kültürü (Laminar akım kabini).

3.2.3. Yama-menteşe (Patch-clamp) Deneyleleri

3.2.3.1. Solüsyonların Hazırlanması

Yama-menteşe deneylelerinde kullandığımız tampon çözeltiler, aşağıdaki tablolarda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır (Tablo 1, Tablo 2 ve Tablo 3). Çözücü olarak tüm çözeltilerde ultra distile su kullanıldı. Çözeltilerin osmaolaritesi 310 mosmol/l olacak şekilde ayarlandı (Nazıroğlu 2011).

Tablo 1. 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 2. 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 3. Hücre içi tampon çözelti hazırlama protokolü

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

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

Melatoninin çözünebilir formunun hazırlanması ve uygulanışı:

Öncelikle melatoninin, dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürüldükten sonra, normal ekstraselüler tamponla sulandırılarak depo solüsyon elde edildi. Yukarıda bahsedildiği gibi, elde edilen stok solüsyondan alınarak hücrelerin içinde bulunduğu medyuma melatoninin son konsantrasyonu 300 µM (Grup 1) ve 1 mM (Grup 2) olacak şekilde yama-menteşe deneyler başlamadan 2 saat önce ilave edildi. Melatoninin intraselüler 200 µM (Grup 3) uygulamaları için çözücü olarak intraselüler tampon çözelti kullanıldı (Reiter et al., 1997).

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).

3.2.3.2. Gruplar Oluşturulması

Yama menteşe deneyleri için aşağıda belirtildiği şekilde 3 ana grup oluşturuldu. Her grup içerisinde de kontrol grubu olarak sadece melatonin ile 2 saat boyunca inkübe edilmiş (A), sadece 1 mM H₂O₂ ile 5 saat boyunca inkübe edilmiş (B) ve 5 saat boyunca H₂O₂ + 2 saat boyunca melatonin ile inkübe edilmiş (C) grupları oluşturuldu.

Grup1: Ekstraselüler 300 µM Melatonin

- A: Sadece MEL uygulandı.
- B: Sadece H₂O₂ uygulandı.
- C: MEL + H₂O₂ uygulandı.

Grup 2: Ekstraselüler 1 mM Melatonin

- A: Sadece MEL uygulandı.
- B: Sadece H₂O₂ uygulandı.
- C: MEL + H₂O₂ uygulandı.

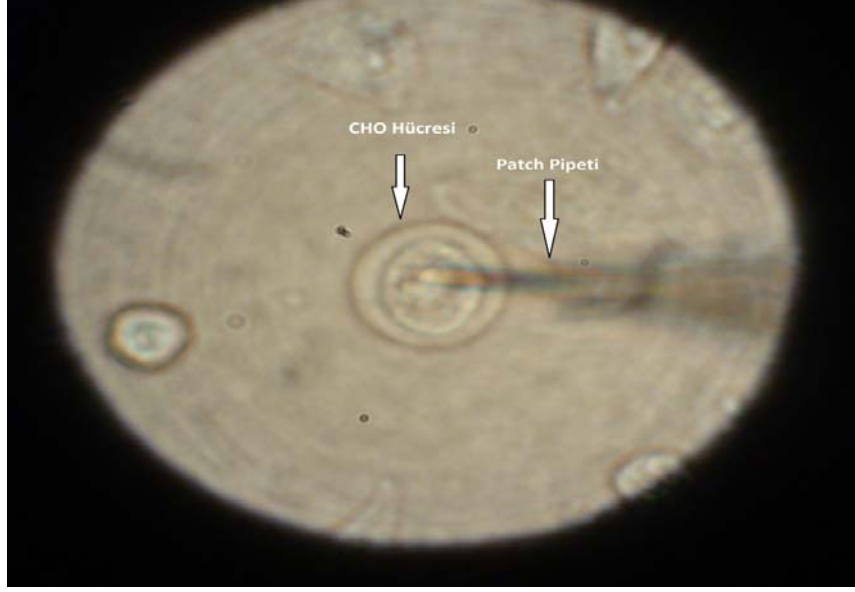
Grup 3: İntraselüler 200 µM Melatonin

- A: Sadece MEL uygulandı.
- B: Sadece H₂O₂ uygulandı.
- C: MEL + H₂O₂ uygulandı.

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 (~ 2-10 MΩ) uca sahip mikropipetler elde etmek için pipet yapıcı (puller) (Sutter Instrument, Novato, ABD) kullanıldı (Hille 1992).

Grup 1 ve 2 çalışmalarında mikropipetin içerisine normal intraselüler tampon çözeltisi dolduruldu. Grup 3 çalışmalarında ise pipet içerisine melatoninli (200µM) intraselüler tampon çözeltisi dolduruldu. 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. İnverted 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 GΩ) 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 2011). Peristaltik pompa (Ismatec, İsviçre) ile çemberdeki sıvı bir yandan tahliye edilirken aynı hızda diğer taraftan da perfüzyon sistemi ile 10 mM H₂O₂ çemberde bulunan hücreler üzerine (A hariç) 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 ulaşınca kadar beklendi. Beklenen plato oluştuğunda; kanalları inaktive ettiğine dair bildirimler olan 50 µM konsantrasyonundaki 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), H₂O₂'nin gönderilmesine benzer şekilde çembere gönderildi (Togashi et al., 2008, Nazıroğlu et al., 2011a, 2011b). Son olarak hücrelerimizin canlılığından emin olmak üzere NMDG'li ekstraselüler tampon çözelti çembere gönderilerek kayda devam edildi. Canlılığı devam eden hücrelere tekrar sırasıyla H₂O₂, 2-APB ve NMDG uygulamaları yapılarak kayıt sonlandırıldı (Nazıroğlu et al., 2011a).



Resim 3. Yama-menteşe oluşturulmuş hücrenin mikroskopik görünümü.

3.2.4. Kalsiyum Sinyali

Hücre içi Ca^{+2} salınım miktarının ölçümü için CHO hücreleri 37 °C de 45 dakika boyunca 4 μ M 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 2×10^6 / mL olacak şekilde Na^+ - HEPES [(mM cinsinden); NaCl, 140; KCl, 4,7; $CaCl_2$, 1,2; $MgCl_2$, 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).

3.2.5. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi

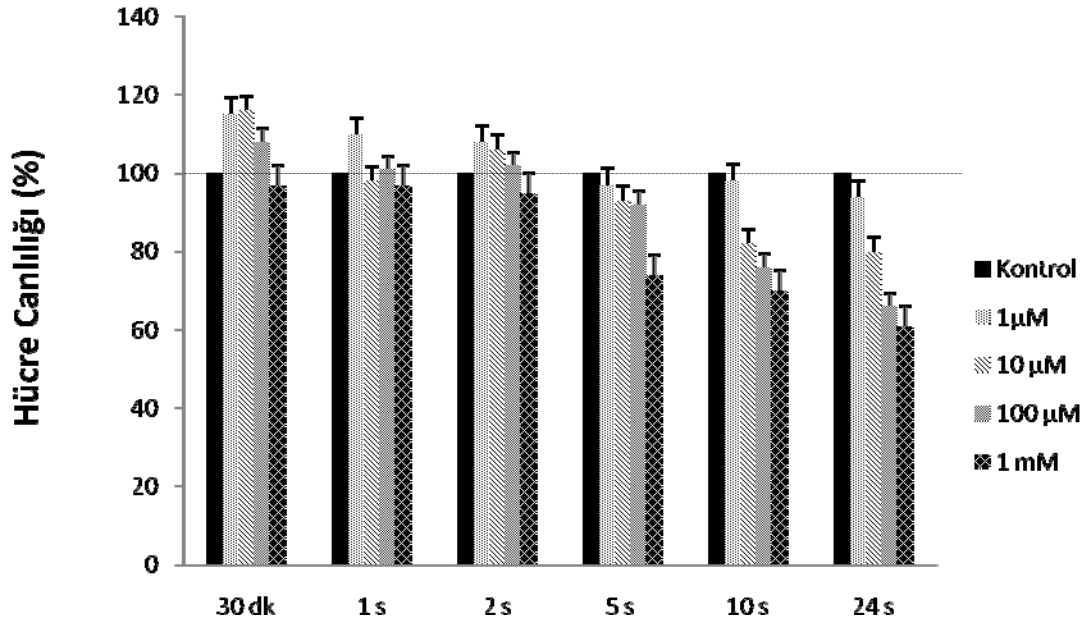
Her bir endorf tüpü içerisinde 10^6 hücre olacak şekilde hücreler konuldu. Her bir endorf tüpüne 15 mikrolitre MTT kimyasalı ilave edildi. MTT kimyasalı ilavesinden sonra bütün endorflar 5-10 defa yavaşça çalkalanıp, 37 °C'de

çalkalamalı su banyosunda 90 dakika boyunca yavaşça çalkalamaya bırakıldı. Çalkalama sonrasında bütün ependorflar 500 g de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Her bir ependorfa 400'er mikrolitre dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edildi. Pelet DMSO içerisinde resuspense edildi, sonra her bir küvete 250 mikrolitre bu örnekten konuldu. Spektrofotometrede 490 nm ve 650 nm dalga boylarında okunup bu iki dalga boyunda okunan değerler birbirinden çıkarıldı (Abs490 nm – Abs650 nm) (Uğuz et al., 2009).

4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı (MTT) Testi ile H₂O₂'nin Chinese Hamster Ovary (CHO) Hücreleri Üzerine Toksik Dozunun Belirlenmesi

H₂O₂'nin CHO hücrelerinde öldürücü dozu hakkında yeterince bilgi mevcut değildir. Bu nedenle, öncelikle H₂O₂'nin öldürücü dozu CHO hücrelerinde 4 farklı doz (1 µM, 10 µM, 100 µM ve 1 mM) ve 6 farklı sürede (30 dk, 1, 2, 5, 10 ve 24 saat) ile inkübe edildi. Bu hücrelerden hücre canlılığı testi (MTT) ile elde edilen bulgular Şekil 13'de gösterilmiştir.

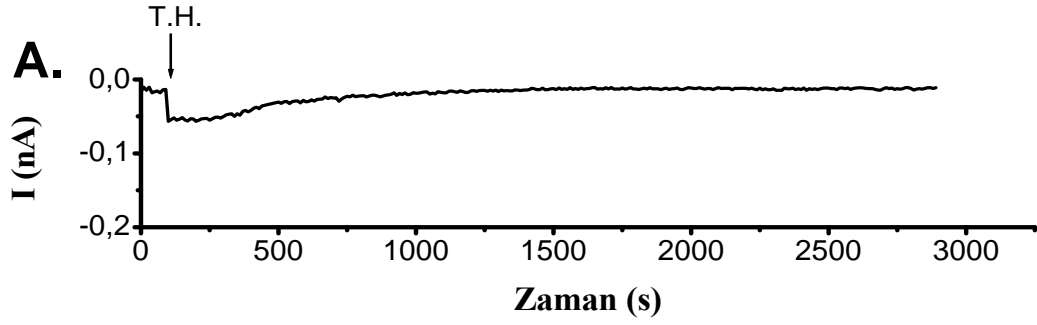


Şekil 13. CHO hücreleri üzerine oksidatif stresin temsilcisi olan hidrojen peroksitin (H₂O₂) toksik doz ve süresinin hücre canlılığı (MTT) testi ile belirlenmesi.

Her bir zaman grubu (30 dk, 1 s, 2 s, 5 s, 10 s ve 24 s) için eşit süre bekletilen ve hiç H₂O₂ uygulanmayan hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. Her bir zaman dilimi için kontrol grubu hücrelerin canlılık oranları %100 kabul edildi. Farklı dozlarda (1 µM, 10 µM, 100 µM ve 1 mM) H₂O₂ ile inkübe edilen diğer gruptaki hücrelerin canlılık oranları kontrol grubuna kıyas edilerek belirlendi. Böylece H₂O₂'nin CHO hücreleri için toksik etkisinin 1 mM dozda ve 5 saat inkübasyon sonrasında başladığı tespit edildi. CHO hücreleri, patch-clamp uygulamaları öncesinde 5 saat boyunca 1mM H₂O₂ ile inkübe edildi.

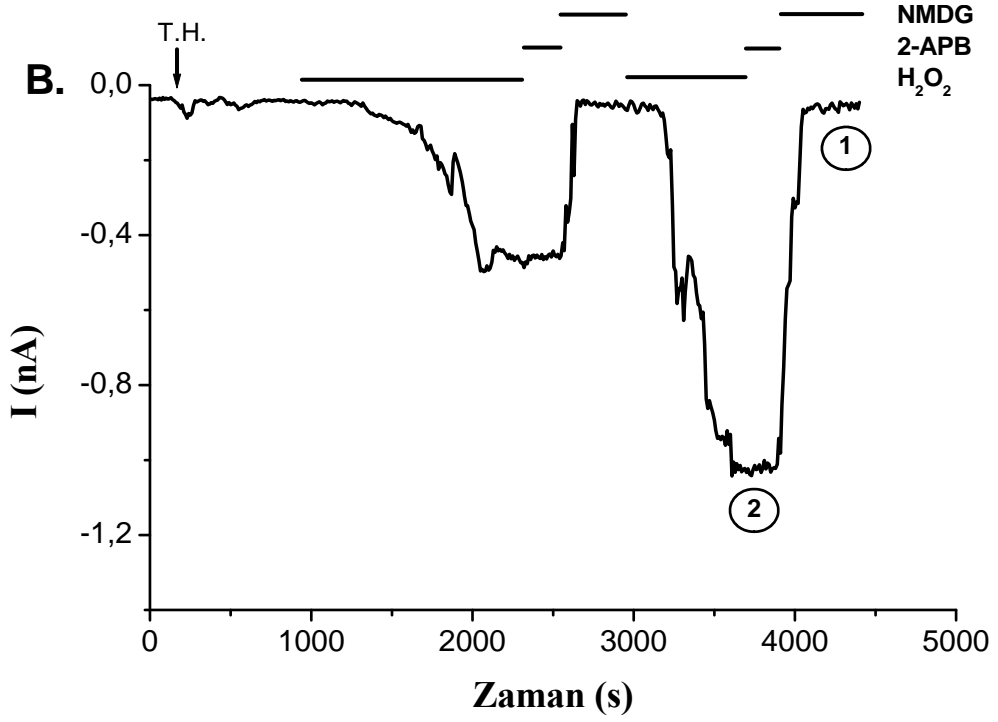
4.2. Yama Mentеше (Patch-Clamp) ve Akım Yoğunluğu Kayıtlarının Değerlendirilmesi

4.2.1. Grup 1 (Ekstraselüler 300µM MEL) Tüm Hücre Kayıtlarının Değerlendirilmesi

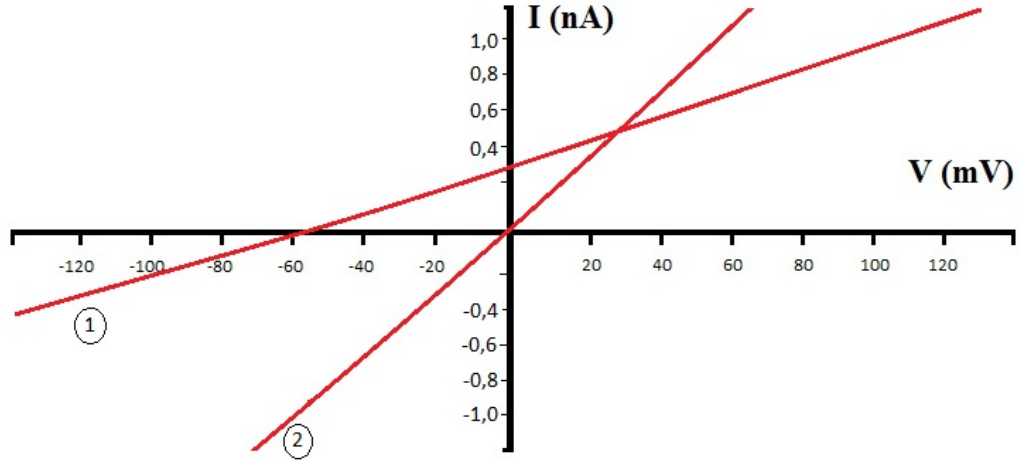


Şekil 14. 300 µM melatonin ile inkübe edilmiş fakat H₂O₂ ile uyarılmamış transfekte CHO hücrelerinden yama-mentеше yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.

5 saatlik 1 mM H₂O₂ uyarımına tabi tutulmadan kayıt öncesinde sadece 300 µM melatonin ile 2 saat boyunca inkübe edilen transfekte CHO hücrelerinden tüm hücre konfigürasyonunda alınan kontrol kayıtlarına ait akım-zaman grafiği Şekil 14’de gösterilmiştir. Tüm hücre konfigürasyonu oluşturulduktan sonra hücreler H₂O₂ ile uyarılmadı. Bu nedenle TRPM2 kanal aktivasyonu oluşmadığı gözlemlendi.



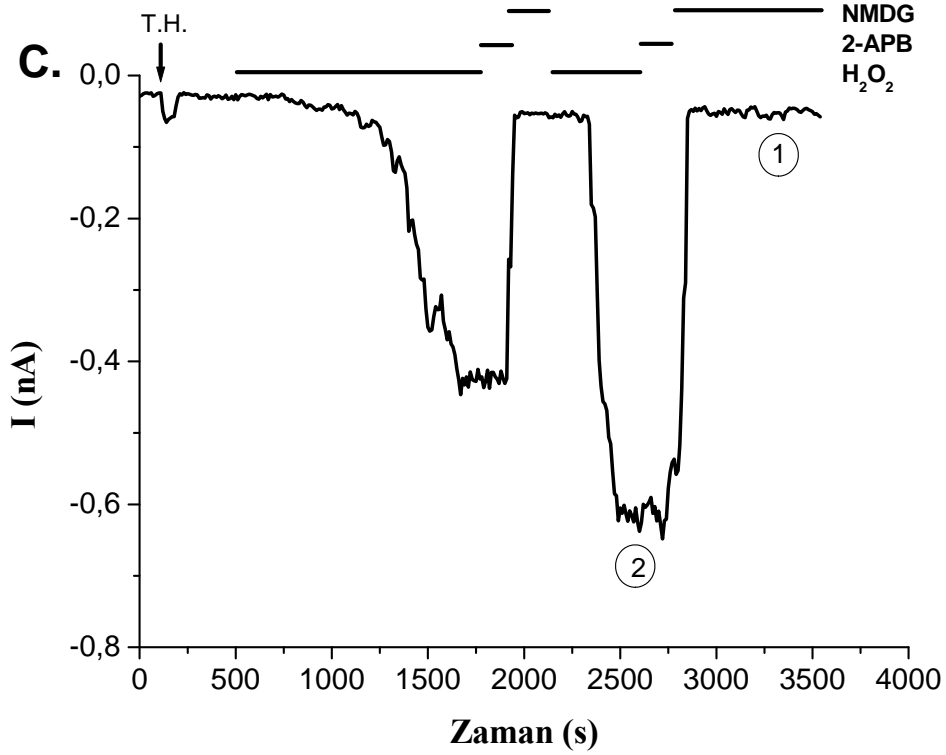
Şekil 15. 300 μ M melatonin ile inkübe edilmeden, H_2O_2 ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-mentşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.



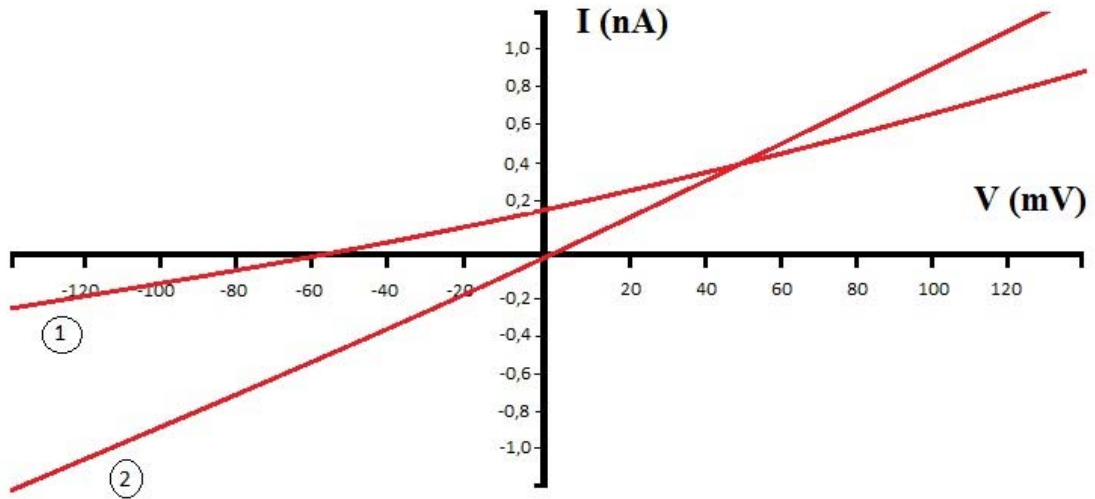
Şekil 16. 300 μ M melatonin ile inkübe edilmeden, H_2O_2 ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-mentşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kayıtlarında akım-voltaj ilişkisi.

Kayıt öncesinde sadece 5 saatlik 1 mM H_2O_2 uyarımına tabi tutulan (B) transfekte CHO hücrelerinden tüm hücre konfigürasyonunda alınan kayıtlara ait akım-zaman ve akım-voltaj (I-V) grafikleri Şekil 15 ve Şekil 16'da gösterilmiştir.

Tüm hücre konfigürasyonu oluşturulduktan sonra hücreler 10 mM H₂O₂ ile uyarıldı. H₂O₂ uyarımına bağlı olarak -0,9 nA lik bir akım oluştuğu gözlemlendi.

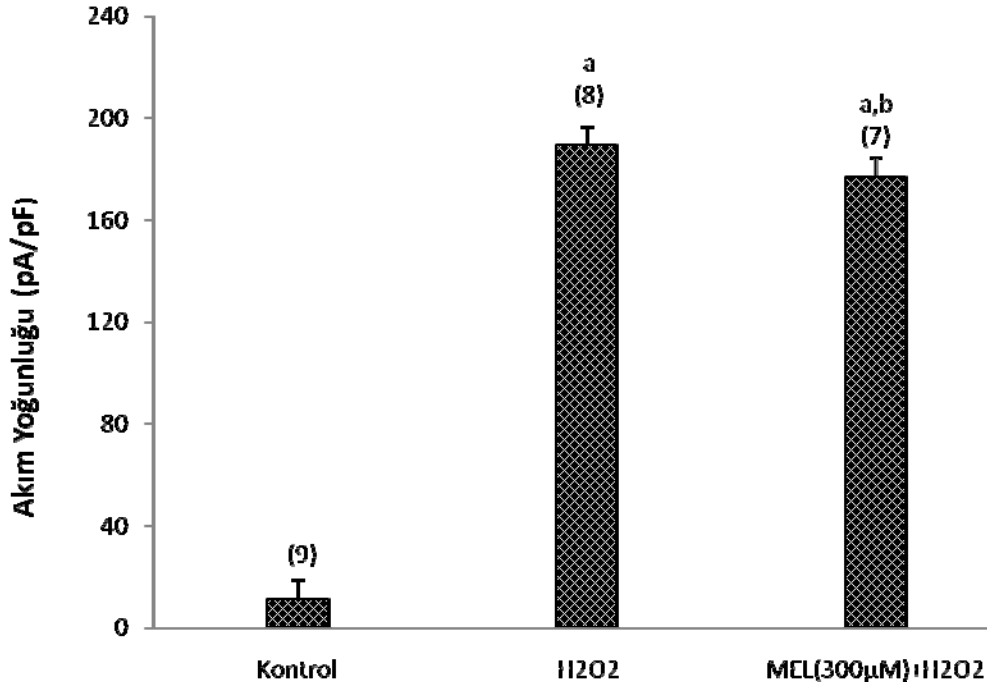


Şekil 17. 300 µM melatonin ile inkübe edilmiş ve H₂O₂ ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-mentеше yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.



Şekil 18. 300 µM melatonin ile inkübe edilmiş ve H₂O₂ ile uyarılmış CHO hücrelerinden yama-mentеше yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kayıtlarında akım-voltaj ilişkisi.

Kayıt öncesinde 5 saatlik 1 mM H₂O₂ uyarımına + 2 saat boyunca 300 µM melatonin inkübasyonuna tabi tutulan (C) transfekte CHO hücrelerinden tüm hücre konfigürasyonunda alınan kayıtlara ait akım-zaman ve I-V grafikleri Şekil 17 ve Şekil 18’de gösterilmiştir. Tüm hücre konfigürasyonu oluşturulduktan sonra hücreler 10 mM H₂O₂ ile uyarıldı. H₂O₂ uyarımına bağlı olarak -0,77 nA lik bir akım oluştuğu gözlemlendi.



^ap<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla.

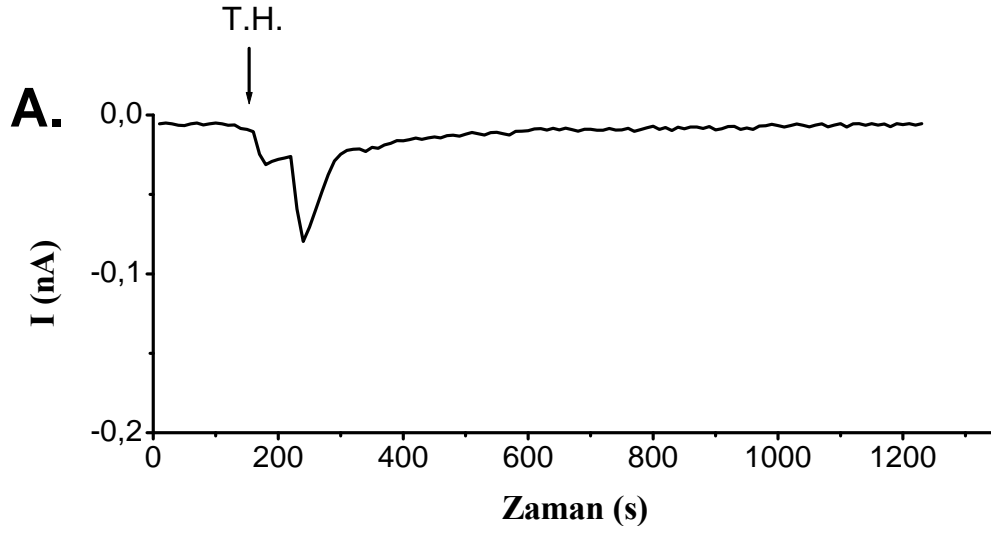
^bp<0.05 ve H₂O₂ grubuna kıyasla.

Şekil 19. Grup1, CHO hücrelerinden tüm-hücre yöntemiyle kaydedilen TRPM2 kanal aktivitesinin akım yoğunluğu grafiği. (ortalama±santdart sapma)

300 µM melatoninle inkübe edilen CHO hücrelerinden elde edilen kontrol, H₂O₂ ve H₂O₂ + melatonin sonuçları şekil 14, şekil 15, şekil 17 ve şekil 19 da gösterilmiştir. Melatonin değişik dozlarıyla yapılan çalışmalarda 300 µM melatonin düşük dozunun faydalı etkileri değişik hücre sistemlerinde rapor edilmiştir. Bu nedenle bu dozun öncelikle TRPM2 kanalları üzerindeki etkisi araştırıldı. Melatoninle inkübe edilmeyen (Şekil 15 ve Şekil 16) CHO hücreleri hidrojen peroksitle uyarıldığında -0,9 nA luk bir akım gösterirken melatoninle inkübe edilenlerin ise (Şekil 17 ve Şekil 18) -0.77 nA civarında açıldıkları gözlemlendi. Bu

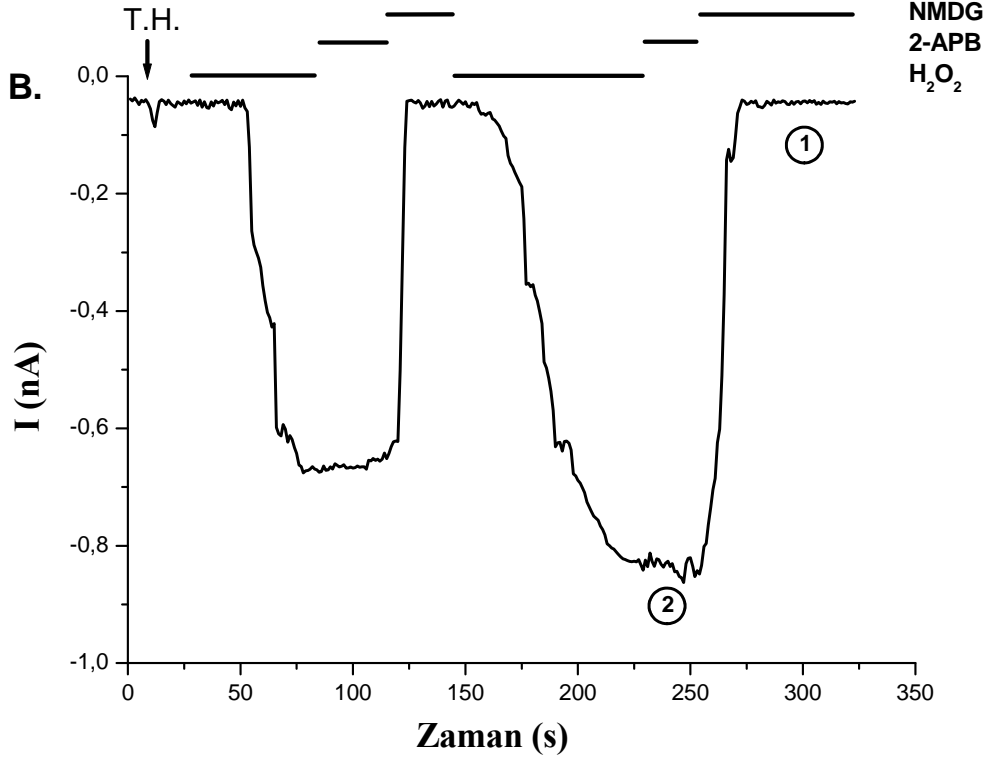
sonuçlara göre 300 µM melatoninin oksidatif stresin neden olduğu sitozole Ca⁺² akışı üzerinde önemli düzeyde (p<0.05) koruyucu etkisinin olduğu belirlendi (Şekil 19).

4.2.2. Grup 2 (Ekstraselüler 1mM MEL) Tüm Hücre Kayıtlarının Değerlendirilmesi

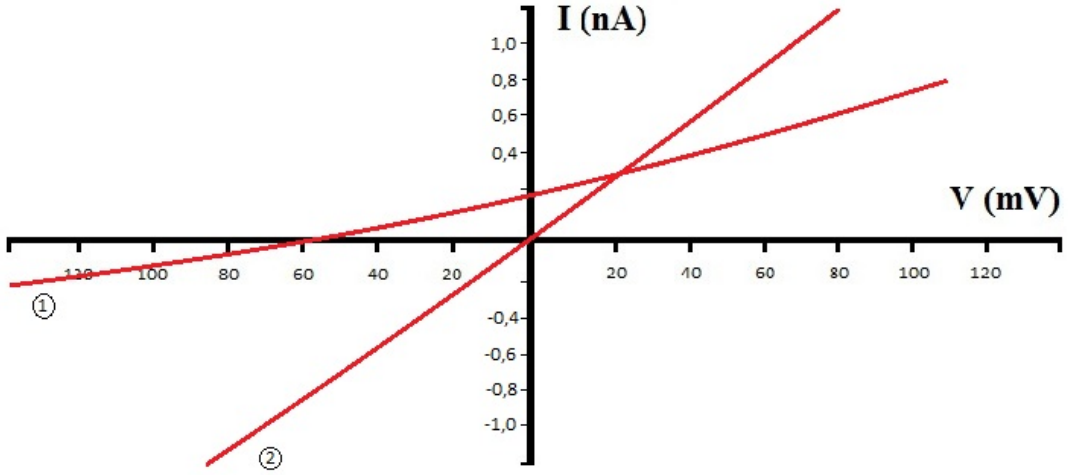


Şekil 20. 1 mM melatonin ile inkübe edilmiş fakat H₂O₂ ile uyarılmamış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.

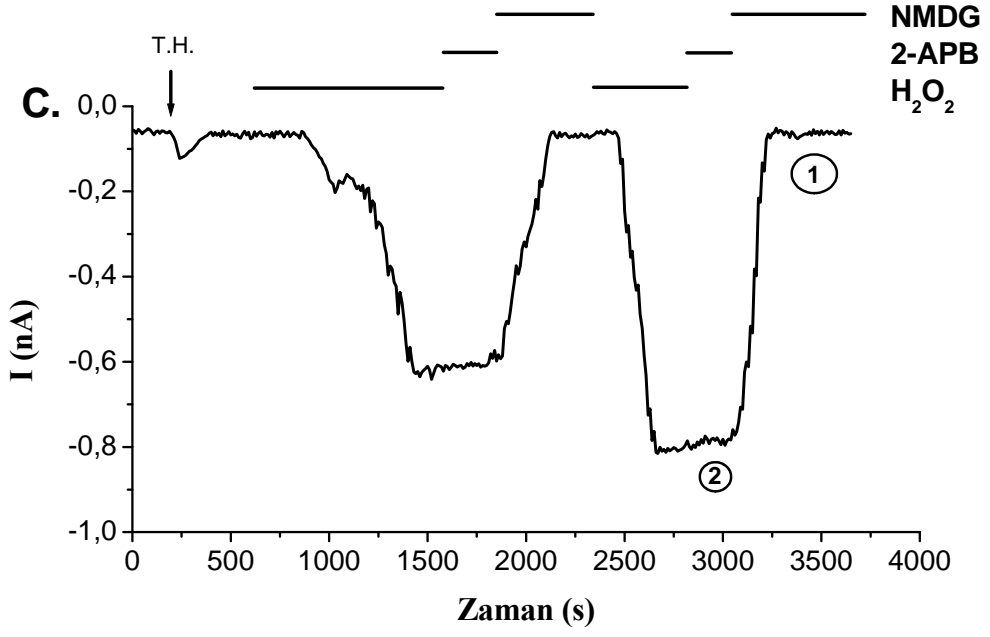
5 saatlik 1 mM H₂O₂ uyarımına tabi tutulmadan kayıt öncesinde sadece 1 mM melatonin ile 2 saat boyunca inkübe edilen transfekte CHO hücrelerinden tüm hücre konfigürasyonunda alınan kontrol kayıtlarına ait akım-zaman grafiği şekil 20'de gösterilmiştir. Tüm hücre konfigürasyonu oluşturulduktan sonra hücreler H₂O₂ ile uyarılmadı. Bu nedenle TRPM2 kanal aktivasyonu oluşmadığı gözlemlendi.



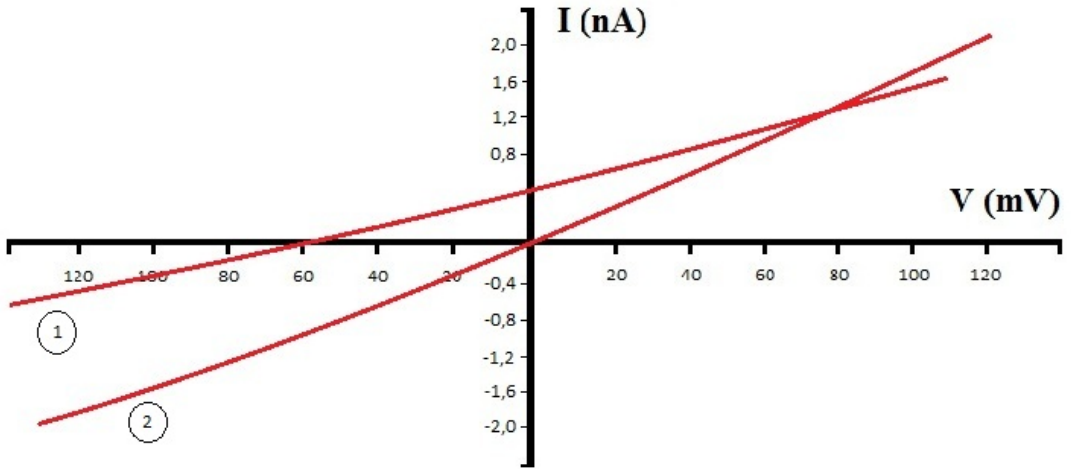
Şekil 21. 1 mM melatonin ile inkübe edilmeden, H_2O_2 ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-mentşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.



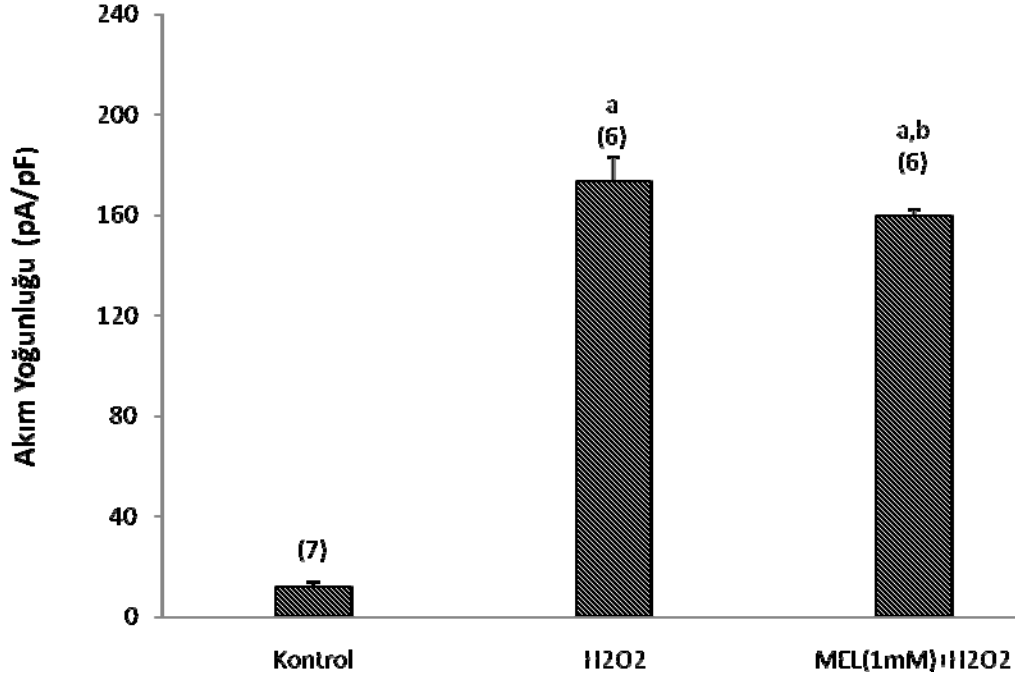
Şekil 22. 1 mM melatonin ile inkübe edilmeden, H_2O_2 ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-mentşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kayıtlarında akım-voltaj ilişkisi.



Şekil 23. 1 mM melatonin ile inkübe edilmiş ve H_2O_2 ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.



Şekil 24. 1 mM melatonin ile inkübe edilmiş ve H_2O_2 ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kayıtlarında akım-voltaj ilişkisi.



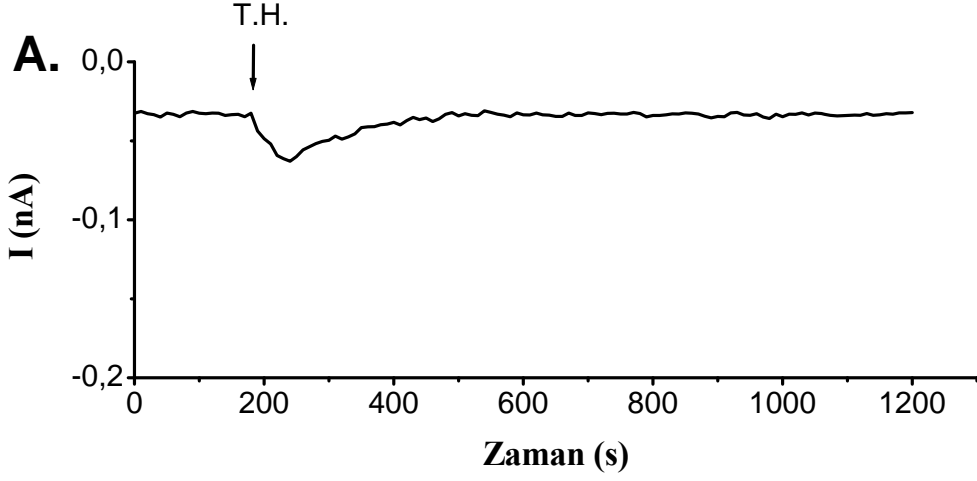
^ap<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla.

^bp<0.05 ve H₂O₂ grubuna kıyasla.

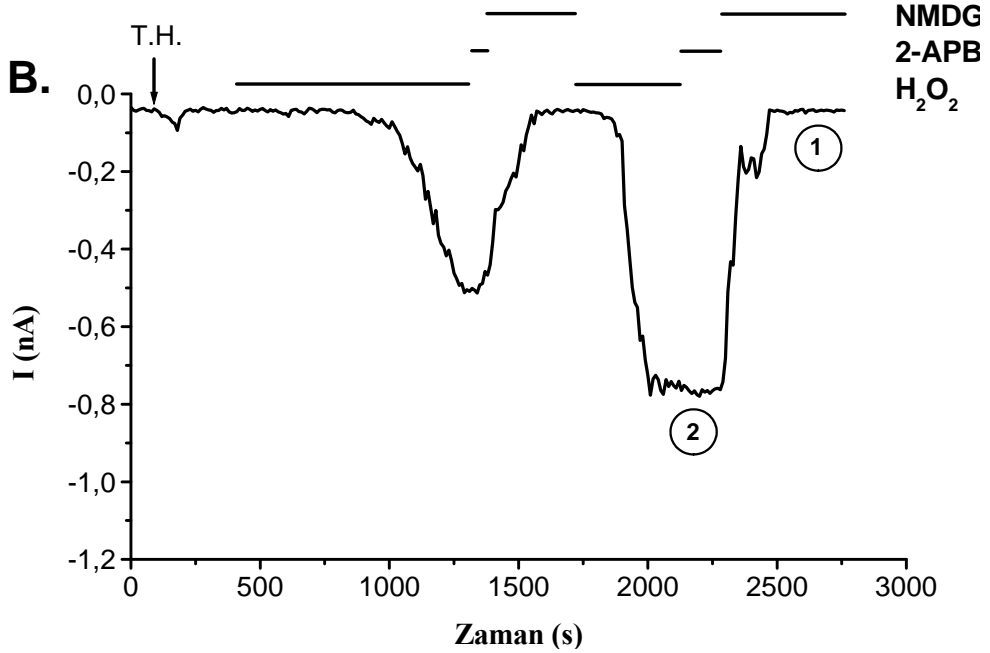
Şekil 25. Grup 2, CHO hücrelerinden tüm-hücre yöntemiyle kaydedilen TRPM2 kanal aktivitesinin akım yoğunluğu grafiği

Hidrojen peroksit ve 300 µM melatonin düşük dozuyla inkübe edilen hücrelerin TRPM2 kanalları, sadece hidrojen peroksitle inkübe edilenlere kıyasla daha az açılmalarına rağmen, oksidatif stresin neden olduğu TRPM2 akımlarını tamamen önlenemedi. Bu nedenle, daha yüksek bir doz olan fakat hücreler için toksik olmayan 1 mM dozuyla CHO hücreleri inkübe edildiler. Sadece 1 mM melatonin ile inkübe edilen hücrelerden elde edilen tüm hücre kaydı şekil 20’de gösterilmiştir. Melatoninle inkübe edilmeyen fakat hidrojen peroksitle aktive edilen gruptan alınan kayıt örneği şekil 21’de gösterilirken, 1 mM melatoninle inkübe edildikten sonra, hidrojen peroksitle uyarılan hücrelerden alınan kayıtlar şekil 23’de gösterilmiştir. Bu gruplar için *N-metil D-glucamine* (NMDG) ile hidrojen peroksit arasında I-V ilişkileri ise şekil 22 ve şekil 24’de gösterilmiştir. 300 µM melatonin dozuyla inkübasyona benzer şekilde 1 mM melatonin de sadece hidrojen peroksit grubuna kıyasla önemli düzeyde (p<0.05) koruyucu bir etki gösterdi (Şekil 25).

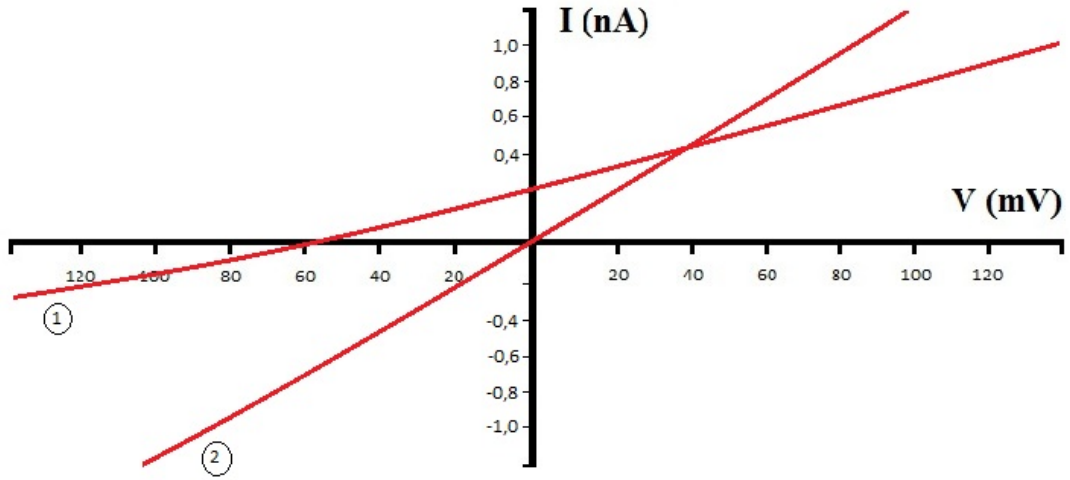
4.2.3. Grup 3 (İntraselüler 200 μ M MEL) Tüm Hücre Kayıtlarının Değerlendirilmesi



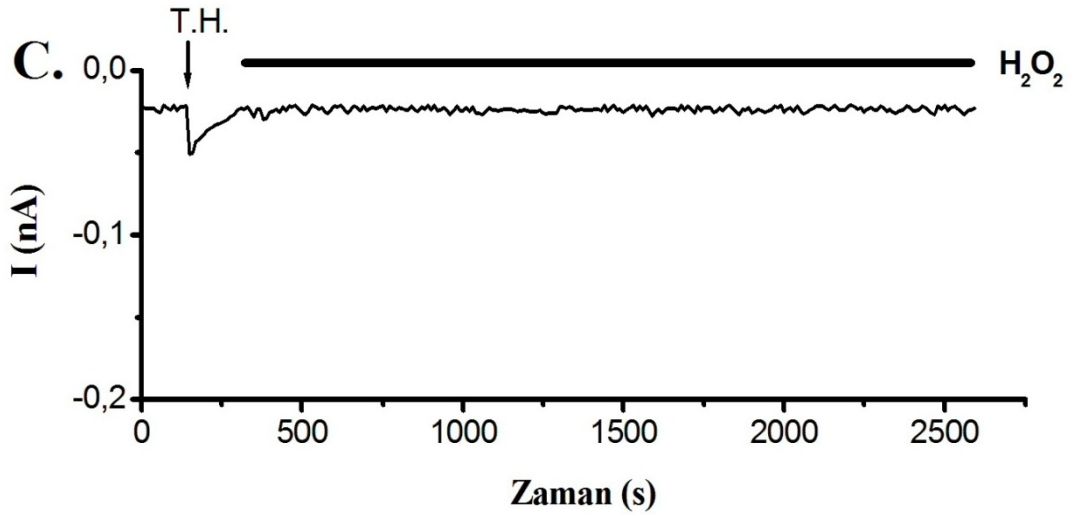
Şekil 26. Pipet içi 200 μ M melatonin uygulanmış fakat H_2O_2 ile uyarılmamış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.



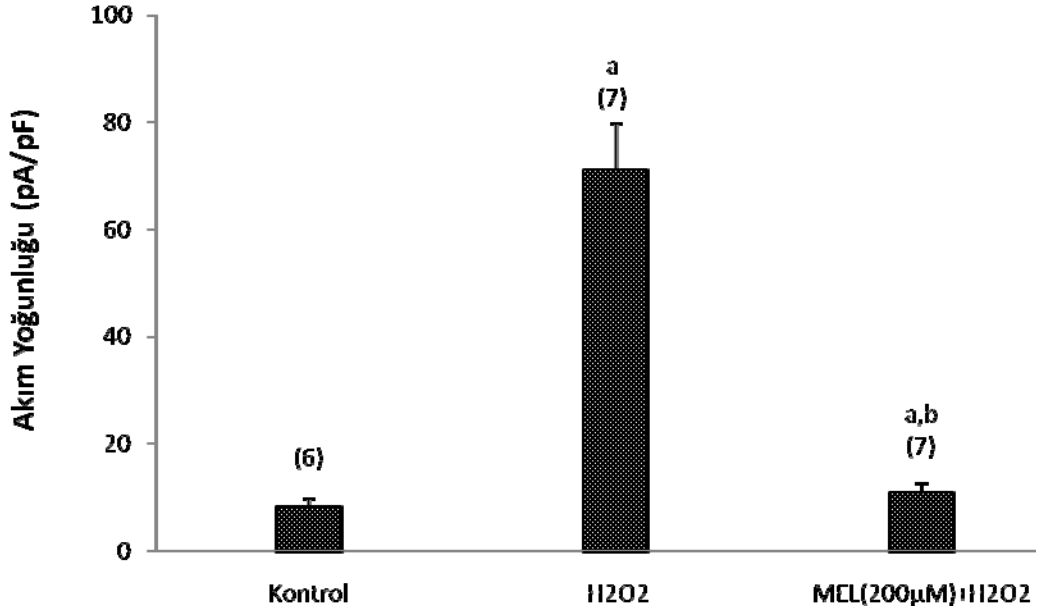
Şekil 27. Pipet içi 200 μ M melatonin uygulanmadan, H_2O_2 ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.



Şekil 28. Pipet içi 200 μM melatonin uygulanmadan H_2O_2 ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.



Şekil 29. Pipet içi 200 μM melatonin uygulanmış ve H_2O_2 ile uyarılmış transfekte CHO hücrelerinden yama-menteşe yöntemiyle TRPM2 kanallarından alınan tüm hücre (whole-cell) kaydı.



^ap<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla.

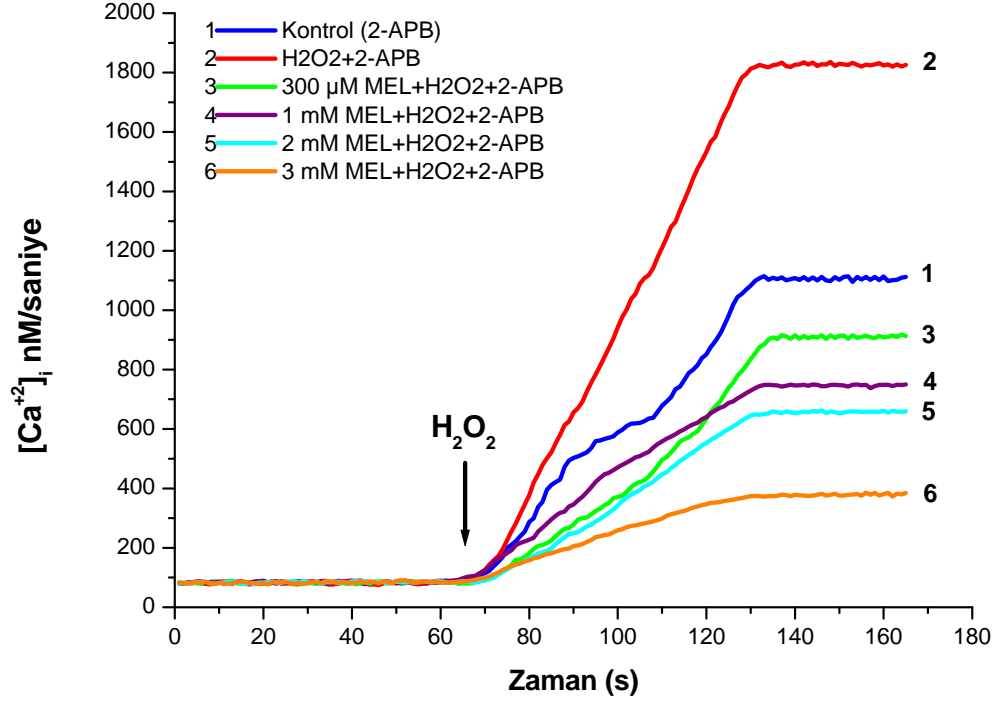
^bp<0.005 ve H₂O₂ grubuna kıyasla.

Şekil 30. Grup 3, CHO hücrelerinden tüm-hücre yöntemiyle kaydedilen TRPM2 kanal aktivitesinin akım yoğunluğu grafiği.

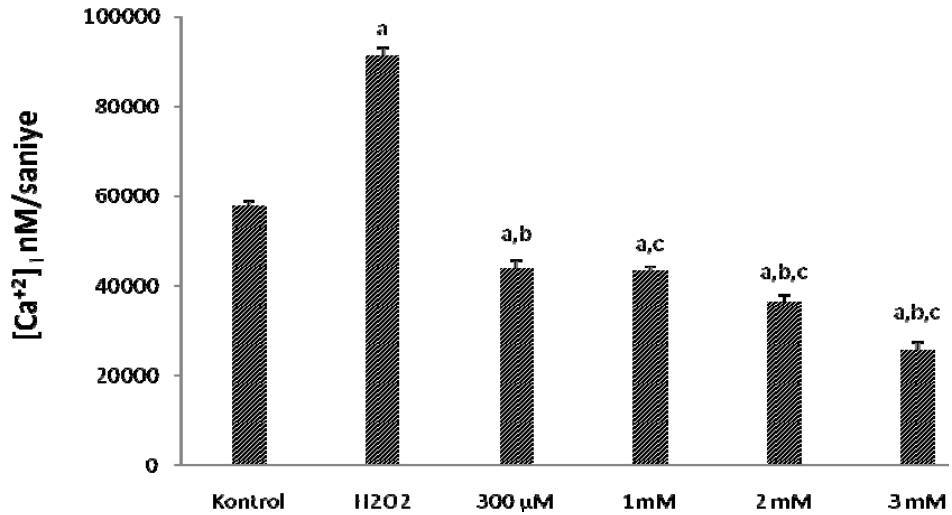
Hem 300 µM hem de 1 mM melatonin inkübasyonu oksidatif stresle uyarılan CHO hücrelerindeki TRPM2 kanal akımlarını önemli düzeyde önlemesine rağmen, tamamen bloke edemedi. Bu nedenle, hücre (pipet) içi melatoninin TRPM2 akımları üzerindeki etkilerini araştırılması amaçlandı. Bu amaçla, pipet içerisinde 200 µM melatonin uygulanan transfekte CHO hücrelerinden, hidrojen peroksitle uyarılarak tüm-hücre yöntemiyle TRPM2 kanal aktivitesinin akım kayıtları alındı. Pipet içerisinde melatonin varlığında, TRPM2 akımları tamamen bloke edildiler (Şekil 26, Şekil 27, Şekil 28, Şekil 29 ve Şekil 30).

4.3. Kalsiyum Sinyali Sonuçlarının Değerlendirilmesi

4.3.1. 2-APB Uygulanmış ve Hidrojen Peroksit ile Aktive Edilmiş Hücrelerde Kalsiyum Sinyali



Şekil 31. Farklı dozlarda melatonin ile inkübe edilen CHO hücrelerinde sitozole Ca^{+2} salınımının akım-zaman grafiği.



^ap<0.001 Kontrol grubuna kıyasla

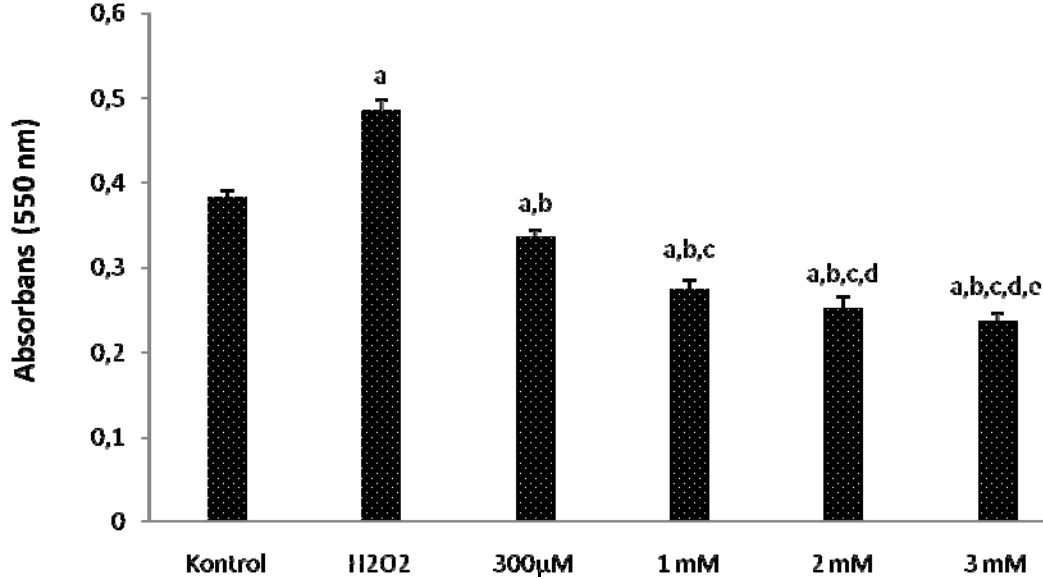
^bp<0.01 Kontrol grubuna kıyasla

^cp<0.001 H₂O₂ grubuna kıyasla

Şekil 32. Farklı dozlarda melatonin ile inkübe edilen CHO hücrelerinde sitozole Ca^{+2} salınımının akım-zaman grafiğinin altında kalan alanlara göre değerlendirilmesi.

Kalsiyum sinyali analizleri sırasında, H₂O₂ ile uyarım öncesinde hücreler öncelikle 2-APB (50 µM) ile muamele edildi. Nörotransmitter madde ortamda bulunmadığı için kimyasal kapıların aktivasyonu da mevcut değildi. Bu nedenle daha ziyade voltaja duyarlı Ca⁺² kanalları vardı. Böylece, melatoninin voltaja duyarlı Ca⁺² kanallarını düzenleyerek sitozole Ca⁺² akışını düzenleyip düzenleyemeyeceği sorusunun cevabı araştırıldı. Şekil 31 ve şekil 32’de gösterildiği gibi H₂O₂ grubundaki hücrelerde sitozole Ca⁺² akışı kontrol ve melatonin uygulanan gruplara göre (p<0.001) istatistiksel olarak farklı olduğu gözlemlendi. Farklı dozlarda (300 µM, 1 mM, 2 mM ve 3 mM) melatonin ile inkübe edilen hücrelerde ise kontrol ve H₂O₂ gruplarına göre sitozole kalsiyum salınışının önemli derecede (p<0.05 ve p<0.001) azaldığı tespit edildi. Bu sonuçlara göre de sitozole Ca⁺² akışı üzerinde melatoninin voltaja duyarlı Ca⁺² kanalları yoluyla da düzenleyici etkisinin olduğu ve 2-APB’nin TRPM2 katyon kanallarının blokajında etkin olmadığı gözlemlendi.

4.4. H₂O₂ ile İnkübe Edilen CHO Hücrelerinde Farklı Dozlarda Melatoninin Apoptotik süreç Üzerine Etkisinin Belirlenmesi



^a p<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla

^b p<0.001 ve H₂O₂ grubuna kıyasla

^c p<0.001 ve 300 µM grubuna kıyasla

^d p<0.001 ve 1 mM grubuna kıyasla

^e p<0.001 ve 2 mM grubuna kıyasla

Şekil 33. 2 saat boyunca farklı dozlarda melatonin ve ardından 5 saat boyunca 1 mM H₂O₂ ile inkübe edilmiş CHO hücrelerinde melatoninin apoptotik süreç üzerine etkisi.

Kontrol grubuna kıyasla, H₂O₂ grubunda apoptozis düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde (p<0.001) arttığı belirlendi. Bununla birlikte, 300 µM, 1 mM, 2 mM ve 3 mM melatonin gruplarının apoptozis düzeylerinin H₂O₂ grubuna kıyasla önemli düzeyde (p<0.001) azaldığı gözlemlendi. Bu apoptozis sonuçlarına göre, melatoninin apoptozisin önlenilmesi üzerinde olumlu etkisinin olduğu ve doz artışıyla etkisinin arttığı belirlendi (Şekil 33).

5. TARTIŞMA

TRP kanalları ilk olarak *Drosophila* türü sirke sineklerinin göz hücrelerinde bulunmuştur (Nishida et al., 1993). Sonraları devam eden genetik araştırmalar neticesinde günümüzde 6 alt tipinin varlığı ispatlanmıştır. TRPM2 kanalları ağırlıklı olarak beyinde varlığı ispatlanmasına rağmen, aynı zamanda kemik iliği, dalak, kalp, lökosit, karaciğer ve akciğeri kapsayan diğer birçok doku ve organda saptanabilir (Nazıroğlu 2011). Biz, oksidatif stresle aktive olmasından dolayı bu tez çalışmasında TRPM2 katyon kanalları ile ilgilenmekteyiz. Oksidatif stres ve onun ürünleri olan ROT, NAD den 3 yolla ADPR üretime neden olmaktadır (Nazıroğlu et al, 2007). TRPM2 kanallarının moleküler yapısına bakıldığı zaman kanalın diğer çoğu kanal gibi 6 segmentten meydana geldiği ve katyon girişlerinin 5 ve 6. segmentler arasında gerçekleştiği gözlenmektedir. Ayrıca kanalın bir C (Nudiks boks) ve bir de N ucu bulunmaktadır (Şekil 3). Nudiks boks kısmında ADPR pirofosfataz enzimi mevcut olup kanalın açılmasından bu enzimin aktivasyonu sorumludur. Yani anahtarı kanalın içerisindedir. ADPR pirofosfataz enzimi ise hem ADPR hem de oksidatif stresle aktive olabilmektedir (Hara et al., 2002, Wehage et al 2002).

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

Bu tez çalışmasında hidrojen peroksitle uyarılan TRPM2 katyon kanallarının doğrudan aktive olduğu gözlemlendi. Bu nedenle, araştırma sonuçlarına göre oksidatif stres ürünlerinden hidrojen peroksidin TRPM2 katyon kanallarını aktive ettiği

bildiren araştırma sonuçlarıyla uyum göstermektedir (Hara et al., 2002, Wehage et al., 2002, Nazıroğlu and Lückhoff, 2008a, 2008b).

Pineal bezden salınan melatoninin bütün memeli hayvanlarda bulunduğu ve canlıların biyolojik ritmini düzenleyen bir hormon olduğu gösterilmiştir. Antioksidan özelliği 1993 yılında ortaya çıkarılan melatonin, lipofilik özelliğinden dolayı organizmada çok geniş alanda antioksidan etki gösterebilmektedir (Tan et al., 1993). Melatonin, kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçebilir, hücrelerin çekirdekleri dahil tüm organellerine ulaşabilir. Bu özellik, dejeneratif ya da proliferatif değişikliklere neden olan hastalıklara karşı makro moleküllerin ve özellikle DNA'nın oksidatif hasardan korunmasında melatonine bir üstünlük kazandırmaktadır. Ancak bu antioksidan etkiler, melatoninin gece ulaştığı doruk değerlerin çok üstündeki değerlerde görülür. Melatoninin bu bağlamda başka bir üstünlüğü, diğer bazı antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve uzun süre (5 yıl) kullanımda bile toksik etkisinin görülmemesidir (Jacob et al., 2002). Son yıllarda melatoninin doğrudan serbest radikalleri temizleme özelliğinin yanı sıra, ekzojen melatonin verilmesinin, önemli bir antioksidan enzim olan GSH-Px aktivitesini de artırdığı gösterilmiştir (Reiter et al., 1997).

Melatoninin değişik Ca^{+2} kanalları üzerinde olumlu etkileri rapor edilmiştir (de Faria Poloni et al, 2011). Bu konuda, Ayar ve arkadaşları, melatoninin arka kök gangliyon hücresi nöronal hücrelerde voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları üzerinde düzenleyici etkisinin olduğunu rapor etmişlerdir (Ayar et al., 2001). Buna rağmen insan ve sıçanlara ait enterositlerde yapılan bir çalışmada, artan dozlarda (0,1-100 nM) uygulanan melatoninin $[Ca^{+2}]_i$ seviyesini çok hızlı bir şekilde artırabileceği ve kısa bir sürede $[Ca^{+2}]_i$ nin bazal seviyeye indiği de rapor edilmiştir (Sjöblom et al., 2003). Yakın zamanlarda tavuk hücre serilerinde yapılan çalışmalarda melatonin voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları üzerinde düzenleyici etkisiyle hücre içi Ca^{+2} düzeyini düzenlediği gözlemlenmiştir (Harrison and Zatz 1989, Mei et al., 2001, Wronka et al., 2008). Yaptığımız literatür taramalarında, melatonin TRP kanalları aktivasyon ve inhibisyon mekanizmaları üzerinde yapılmış çalışmalara rastlamadık. Bu tez çalışmasında; hidrojen peroksit ile aktive edilen TRPM2 katyon kanal akımları üzerine farklı dozlarda melatonin uygulamalarının etkileri yama-menteşe yöntemi kullanılarak araştırıldı. Hücreler öncelikle 1 mM H_2O_2 uygulaması ile aktive

edilirken hücre dışı (300 μ M ve 1 mM) ve içinden (200 μ M) melatonin uygulamaları ile TRPM2 kanal akımları üzerine etkileri araştırıldı.

Elde ettiğimiz bulgulara göre 300 μ M ve 1 mM melatonin ile 2 saat boyunca inkübe edilen hücrelerdeki TRPM2 kanal akımları kontrol ve hidrojen peroksit gruplarına göre ($p < 0.05$) istatistiksel anlamda anlamlı bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla beraber, hücre içi melatonin uygulandığında ise TRPM2 akımlarının tamamen bloke olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlarımız, melatonin hücre zarından geçişinin hücre içi ve dışı uygulanmasına bağlı olarak farklılık arz ettiğini ve hücre içerisinde melatonin yeterli düzeye ulaşırsa TRPM2 kanalları üzerinde koruyucu etkisinin olduğunu gözlemledik.

Ca^{+2} , canlıda homeostazisi sağlayan sıvı kompartmanlarda farklı dağılım göstermektedir. Örneğin ekstraselüler sıvıdaki konsantrasyonu 1,2 mM iken sitoplazma ve çekirdekte 100 nM, endoplazmik retikulum ve sarkoplazmik retikulumdaki konsantrasyonu ise 100-1000 μ M arasındadır (Parekh 2011). Hücreler arası sıvıdan ve hücre içi depolardan ritmik ve kontrollü bir şekilde sitozole Ca^{+2} salınımının; fertilizasyon, ekzositoz, hormon salınımı, gen transkripsiyonu gibi faaliyetlerin yürütülmesinde çok önemli işlevleri vardır (Hajnoczky et al., 2003). Ancak bu salınım kontrolden çıkmaya başladığı zaman hücre için ölüm gibi telafisi mümkün olmayan sonuçlar doğurmaktadır. Hücre içi ikincil haberci sisteminin en önemli elemanlarından biri olan Ca^{+2} hücresel birçok hayati fonksiyonun yerine getirilmesinde önemli bir rol üstlense de, hücre içi Ca^{+2} miktarındaki artış, ya apoptozis ve poliferasyon mekanizmalarının bozularak hücrelerin birer tümör hücresine dönüşmesine ya da hücrede nekrotik veya apoptotik ölümün başlamasına sebep olabilmektedir (Hajnoczky et al., 2003). Hücre içine kalsiyum giriş yollarından biri olan TRPM2 katyon kanalları, oksidatif stres nedeniyle aktive olabilmektedir. TRPM2 kanallarının geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz bir şekilde hasara uğraması; hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ seviyesinin düzensiz ve çok hızlı bir şekilde artmasına sebep olmaktadır (Miller and Zhang 2011, Nazıroğlu 2011). Mitokondriler, sadece ATP ve endojen ROT'un ana kaynağı değil, aynı zamanda hücre içi kalsiyum sinyalinin gelişiminde de çok önemli bir role sahiptir. Mitokondri çift katlı bir zar ile sitoplazmadan ayrılmış durumdadır. Hücrede olması gerektiğinden fazla ROT oluşmuş ve bunlar antioksidan mekanizmalar tarafından bertaraf edilememişse,

bozulan TRPM2 katyon kanalları vasıtasıyla dışarıdan ve hücre içi kalsiyum depolarından sitoplazmaya Ca^{+2} akışı meydana gelmektedir. Bu durumda; bir yandan hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ miktarı artarken diğer yandan da mitokondri zarları hasar görmeye başlar. Mitokondrinin iç zarının iyon geçirgenliği çok zayıf olmasına rağmen artan hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonu, mitokondri iç zarı üzerinde bulunan kanallardan içeriye Ca^{+2} girmesine sebep olabilmektedir. Böylece; hücrede $[Ca^{+2}]_i$ nin aşırı miktarda artması hücrenin enerji üretim merkezi olan mitokondri matriksinde de Ca^{+2} konsantrasyonunun artmasına sebep olmaktadır. Bunun bir sonucu olarak mitokondrideki enerji üretim mekanizmalarını hasara uğramakta ve aşırı miktarda ROT meydana gelmektedir (Pacher et al., 2001). Mitokondride aşırı miktarda üretilen ROT, mitokondrinin iç ve dış membranlarına zarar vermektedir. Mitokondrinin dış ve iç zarını birbiriyle temas halinde bulunduğu bölgede 'Permability Transition Pore' (PTP) adı verilen ve etkinliği Bcl-2 ailesine ait proteinler tarafından düzenlenen bir multi protein bulunmaktadır. PTP aynı zamanda bazı moleküllerin geçişini sağlayan bir kanal görevi görmektedir. Mitokondri matriksinde oluşan ROT, PTP'nin hasara uğramasına sebep olarak; başta sitokrom-c ve apoptozis indükleyici faktör (AİF) olmak üzere birçok pro-apoptotik (Smac/DIABLO, OMI/HtrA2, pro-kaspazlar) molekülün sitoplazmaya dağılmasına sebep olmaktadır (Petrosillo et al., 2009). Böylece apoptozis mekanizması başlatılarak hücre hızlı bir biçimde programlı ölüme gidebilmektedir (Roy and Hajnóczky 2008).

Melatoninin hücre sel oksidatif strese karşı en etkin antioksidanlardan biri olduğu Pieri ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (Pieri et al., 1994). Tarafımızdan yapılan literatür taramalarında TRPM2 kanallarının aktivasyon veya inaktivasyon mekanizmaları üzerine melatoninin etkisinin olup olmadığına dair bir bildirim rastlanmamıştır. Fakat, yukarıda bahsedildiği gibi, TRPM2 ve voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının oksidatif strese bağlı bozulmaları, sitozole Ca^{+2} akışını aşırı artırmakta ve mitokondrial depolarizasyon, complex I, II ve III inhibisyonları ile apoptozu tetiklediği iyi bilinmektedir (Nazıroğlu, 2007a, de Faria Poloni et al., 2011). Bu tez çalışmasında, melatoninin apoptozis üzerinde önemli düzeyde koruyucu etkisinin olduğu gözlemlendi. Bu sonucumuz, melatonin hücre içersine Ca^{+2} akışını hem TRPM2 hem de voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları vasıtasıyla

düzenleyerek, mitokondrinin depolarizasyonunu ve complex I ve III üzerinden apoptozu önlediği bildirimlerini doğrulamaktadır (Martín et al., 2000, Petrosillo et al., 2009).

TRPM2 kanallarının NAD^+ ve ADPR tarafından direkt olarak aktive edildiği gösterilmiştir. Fizyolojik ve birçok patolojik durumda hücrede üretilen ve oksidatif stresin en önemli göstergesi olan H_2O_2 'in TRPM2 kanallarının aktivasyonunu direkt mi yoksa indirekt mi gerçekleştirdiğine dair farklı bildirimler bulunmaktadır. Ancak Nazıroğlu ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışma ile hücre içi organellerden bağımsız, izole zar parçasından elde edilen içi-dışarıda kayıtlar; H_2O_2 'in kanal aktivasyonu üzerine direkt etkisi olduğunu göstermiştir (Nazıroğlu 2011). Bizim çalışmamızda, transfekte CHO hücrelerinden aldığımız tüm hücre kayıtlarda TRPM2 kanallarının aktive olduğu gözlemlenmiştir. Tüm hücre konfigürasyonu her ne kadar hücre organellerinden bağımsız bir kayıt yöntemi olmasa da yaptığımız çalışmada elde edilen TRPM2 kanal akımlarının H_2O_2 ile direkt aktivasyon sonucu oluştuğu sonucuna varılmıştır. Oksidatif stresle aktive olduğu ispatlanan TRPM2 kanalları üzerine melatoninin etkisinin araştırıldığı bildirimler literatürde henüz mevcut değildir. Oksidatif stresle aktive edilen TRPM2 kanallarının inaktivasyonunu sağlamak amacıyla 2-APB ($50\mu\text{M}$), flufenamik asit ($100\mu\text{M}$) ve antranilik asidin ($25\mu\text{M}$) kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Bunlardan en etkin olanının 2-APB olduğu görüşü yaygın olsa da buna zıt raporlar da yayınlanmıştır (Braun et al., 2003). Bizim çalışmamızda; H_2O_2 ile aktive edilen TRPM2 kanal akımları 2-APB ($50\mu\text{M}$) ile bloke edilmeye çalışılmıştır. Ancak TRPM2 kanal inaktivasyonunun 2-APB tarafından gerçekleştirilemediği gözlemlenmiştir. Elimizdeki veriler ışığında, yaptığımız yama menteşe deneyleri ve kalsiyum sinyali analizleri bize ekstraselüler melatoninin dozu arttıkça oksidatif stresi azaltarak sitozole kalsiyum salınımını azalttığını göstermiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

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

Çevremizde gerek çevre kirliliği (ekzoslardan çıkan gazlar, fabrika bacaları, sigara içimi vb) ve gerekse psikolojik stres vücutta serbest oksijen radikallerinin oluşumunu aşırı derecede artırmaktadır. Günümüzdeki çoğu hastalığın etiyolojisinde serbest oksijen radikallerinin aşırı üretiminin katkısı büyüktür. Çalışma sonuçlarında serbest radikal ürünleri vasıtasıyla oluşan hidrojen peroksite TRPM2 ve voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarını aktive ederek sitozolde aşırı artırması gözlenilmesi, serbest oksijen radikallerine bağlı nörolojik ve diğer hastalıkların etiyolojisine katkı sağlamıştır.

Günümüzde Ca^{+2} kanal blokörleri hipertansiyon ve nörolojik hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Fakat mevcut Ca^{+2} kanal blokörlerinin çoğu hiçbir zaman için %50-70 lere varan tedavi oranını sağlayamamaktadır. Bunun nedenlerinden bir tanesi, mevcut Ca^{+2} blokörlerinin veya kimyasalların TRPM2 kanallarını doğrudan bloke edememesidir. Bu nedenle, bu doktora tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre TRPM2 ve voltaja duyarlı Ca^{+2} kanal aktivasyonlarının düzenlenmesi istenilen hastalara melatonin uygulamalarının faydalı olabileceği sonucu çıkarılmıştır. Fakat bu konunun hastalarda yapılan klinik çalışmalarla da test edilmesi gerekmektedir.

ÖZET

Oksidatif Stresle Aktive Edilen TRPM2 Katyon Kanallarının İnaktivasyonunda Melatoninin Etkisinin Patch-clamp Sistemi ile Araştırılması

Transient Reseptör Potansiyel Melastatin Kanalları 2 (TRPM2) hücredeki oksidatif stresin indikatörlerinden biri olan H₂O₂ tarafından aktive edilebilen, seçici olmayan ve Ca²⁺ a geçirgen katyon kanalıdır. Yapılan son çalışmalarda TRPM2 kanallarının aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) tarafından hızlı ve geri dönüşümlü bir şekilde kapatılabileceği gösterilmiştir. Melatonin pineal bezden salgılanan ve çok yüksek miktarda antioksidan özelliğe sahip bir nörohormondur. Bu çalışmamızda melatoninin transfekte CHO hücrelerinde tüm hücre akımları ve H₂O₂ ile aktive edilmiş TRPM2 kanalı Ca²⁺ akımları üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Yama-mentşe tekniğinin tüm hücre konfigürasyonu kullanılarak H₂O₂ ile indüklenmiş TRPM2 kanal kayıtları elde edilmiştir. Kanal akımlarının, hem ekstraselüler (300 µM ve 1 mM) hem de intraselüler (200 µM) olarak uygulanan melatonin tarafından inhibe edildiği gözlemlenmiştir. Sitozole Ca²⁺ akışı Fura-2 kullanılarak ölçüldü. Kontrol gruplarında sitozolik serbest Ca²⁺ miktarının H₂O₂ grubuna göre daha düşük düzeyde olduğu tespit edildi. İntraselüler melatonin (200 µM) uygulaması ile H₂O₂'nin sebep olduğu TRPM2 kanal akımlarının engellendiği tespit edilirken kanalların bloke edilmesinde 2-APB nin etkisiz olduğu tespit edildi. Ayrıca melatoninin apoptozisi de doza bağımlı olarak inhibe ettiği gözlemlendi.

Sonuç olarak; intraselüler melatoninin transfekte CHO hücrelerinde TRPM2 kanal kalsiyum akımları ve apoptozis üzerine düzenleyici etkisinin olduğu gözlemlendi. Bizim bulgularımız; melatoninin azlığı sebebiyle sitozole Ca²⁺ girişinin arttığını ve bunun oksidatif strese bağlı hastalıkların ortak bir özelliği olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Melatonin, Oksidatif stres, Ca²⁺ sinyali, TRPM2 kanal antagonisti, Apoptozis.

ABSTRACT

Role of Melatonin on the Inactivation of TRPM2 Cation Channels Activated by Oxidative Stress

Transient Receptor Potential Melastatin-Like 2 (TRPM2) is a non-selective Ca^{2+} permeable cation channel and is known to be activated by H_2O_2 which is one of the most important indicators of intracellular oxidative stress. Recent reports exhibited that TRPM2 currents may be blocked by aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) in a manner rapid and reversible. Melatonin is a neurohormone and has a very high antioxidant effect, which released from pineal gland. In this study we investigated effects of melatonin on whole cell currents and Ca^{2+} influx arising from TRPM2 channels activated by H_2O_2 in transfected Chinese Hamster Ovary Cells (CHO).

In whole-cell patch clamp experiments, TRPM2 currents in the cells were consistently induced by H_2O_2 . However, the current were inhibited by both extracellular (0.3 mM and 1 mM for 2 hours incubation) and intracellular (0.2 mM) melatonin. Cytosolic Ca^{2+} release was measured by Fura- 2 and the cytosolic free Ca^{2+} content of the cells were higher in H_2O_2 groups than in control. When intracellular melatonin is introduced by pipette TRPM2 channel currents were not activated by H_2O_2 although H_2O_2 -induced Ca^{2+} gates and release were not blocked by the 2-APB. Melatonin inhibited also apoptosis dose dependent.

In conclusion, we observed the modulator role of intracellular melatonin on Ca^{2+} influx and apoptosis through a TRPM2 channel in transfected CHO cells. Since cytosolic melatonin depletion due to Ca^{2+} influx is a common feature of oxidative stress-induced diseases, our findings are relevant to the etiology of pathology in oxidative stress-induced diseases.

Key words: Melatonin; Oxidative stress; Ca^{2+} signaling; TRPM2 channel antagonist; Apoptosis.

KAYNAKLAR

- Abe K, Matsuki N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci Res.* 2000;38(4):325-9.
- Abe K, Puertollano R. Role of TRP Channels in the Regulation of the Endosomal Pathway. *Physiology (Bethesda)*. 2011;26(1):14-22.
- Ayar A, Martin DJ, Ozcan M, Kelestimur H. Melatonin inhibits high voltage activated calcium currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neurosci Lett.* 2001;313(1-2):73-7.
- Bank U, Reinhold D, Ansorge S. [Measurement of cellular activity with the MTT test. Optimization of the method]. *Allerg Immunol (Leipz)*. 1991;37(3-4):119-23.
- 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.
- Benites-King G, Anton-Jay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effect. *Experientia* 1993; 49: 635-641
- 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.
- Brezezinski A. Melatonin in humans. *N English J Med* 1997; 336: 186-195
- 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).

- 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
- 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.
- de Faria Poloni J, Feltes BC, Bonatto D. Melatonin as a central molecule connecting neural development and calcium signaling. *Funct Integr Genomics.* 2011;11(3):383-8.
- 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, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kelsell 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, Maitl 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. *Textbook of Medical Physiology*. 11th Ed., Philadelphia: Saunders, 2006.
- Hajnoczky G, Davies E, Madesh M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304(3):445-54.
- 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;97:1634–1658.
- 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.
- Hardeland R, Pandi-Perumal SK, Cardinali DP. Molecules in focus: Melatonin. *Intern J Biochem Cell Biol* 2006; 38; 313-316
- 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.
- Harrison NL, Zatz M. Voltage-dependent calcium channels regulate melatonin output from cultured chick pineal cells. *J Neurosci*. 1989;9(7):2462-7.
- Harteneck C, Frenzel H, Kraft R. N-(p-aminocinnamoyl)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.

Hatok J, Babusikova E, Matakova T, Mistuna D, Dobrota D, Racay P. In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. *Clin Exp Med.* 2009; 9(1):1-7.

Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O, Nathan I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003;44(11):1957-62.

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. *Ionic Channels of Excitable Membranes.* 2nd Ed., Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 1992.

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.

Jacob S, Poeggeler B, Weishaupt JH, Sirén A-L, Hardeland R, Bähr M, et al. Melatonin as a candidate compound for neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis(ALS): High tolerability of daily oral melatonin administration in ALS patients. *J Pineal Res* 2002; 33: 186-187

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.

- Khan AU, Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(26):12365-7.
- 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.
- 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.
- Lee Kavanau J. Biological time-keeping mechanisms: a need for broader perspectives? *Med Hypotheses*. 2006;67(6):1358-62.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, in the pineal gland factor that lighthens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2587 2592
- 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.
- Macchi MM, Bruce JN. Human physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinol* 2004; 25: 177-195
- Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vivo. *Free Radical Biol Med* 1996; 21: 307-315

- Martín M, Macías M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, et al. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res.* 2000;28(4):242-8.
- 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.
- Mei YA, Lee PP, Wei H, Zhang ZH, Pang SF. Melatonin and its analogs potentiate the nifedipine-sensitive high-voltage-activated calcium current in the chick embryonic heart cells. *J Pineal Res.* 2001;30(1):13-21.
- 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
- 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;2001(90):re1.
- Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE.* 2005a; 22;2005a;(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, 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 Aug;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. 239-256.
- 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. TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochem Res.* 2011;36(3):355-66.

- 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; 27:144-151.
- 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.
- 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.
- Petrosillo G, Moro N, Ruggiero FM, Paradies G. Melatonin inhibits cardiolipin peroxidation in mitochondria and prevents the mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(7):969-74.
- Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxyradical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci*. 1994;55(15):PL271-6.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci*. 1994;55: PL455-PL460

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.

Reiter RJ, Carneiro RG, Oh S. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res*. 1997; 29: 363-372.

Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol*. 1991;79:C153-C158

Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev*. 1980;1: 109-131

Reiter RJ. The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. *Neurochem Int*. 1995; 27(6): 453-60

Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mahle CD; Kolakowski LF. Cloning of melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett*. 1996; 386: 219-224

Roy SS, Hajnóczky G. Calcium, mitochondria and apoptosis studied by fluorescence measurements. *Methods*. 2008;46(3):213-23.

Russell RC, Roth AC, Kucan JO, Zook EG. Reperfusion injury and oxygen free radicals: a review. *J Reconstr Microsurg*. 1989;5(1):79-84.

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):3143S-3163S.

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.
- Sjöblom M, Säfsten B, Flemström G. Melatonin-induced calcium signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;284(6):G1034-44.
- Sumoza-Toledo A, Penner R. TRPM2: A Multifunctional Ion Channel for Calcium Signaling. *J Physiol*. 2011;589(Pt 7):1515-1525.
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J*. 1993; 1: 57-60
- 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.
- Turek FW, Gillette MU, Melatonin, sleep and circadian rhythms: rationale for development specific melatonin agonists. *Sleep Medicine*. 2004; 5: 523-532
- 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 Aug 1;582(Pt 3):939-44.
- Von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res*. 2002; 309(1): 151-62

- 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.
- 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.
- Wronka M, Maleszewska M, Stepińska U, Markowska M. Diurnal differences in melatonin effect on intracellular Ca²⁺ concentration in chicken spleen leukocytes in vitro. *J Pineal Res.* 2008;44:134-140
- 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.
- Yang XF, Miao Y, Ping Y, Wu HJ, Yang XL, Wang Z. Melatonin inhibits tetraethylammonium-sensitive potassium channels of rod ON type bipolar cells via MT2 receptors in rat retina. *Neuroscience.* 2011;173:19-29.
- 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

Arş. Gör. Ömer ÇELİK

Kişisel Bilgiler:

Doğum Tarihi : 16.07.1983

Doğum Yeri : Ağrı

Yabancı Dil : İngilizce

Yazışma Adresi : 2. Etap TOKİ Evleri B:1 Blok D:18 PK: TR-32260
Çünür / Isparta

Telefon No : 0 537 599 29 89

Elektronik Posta : omercelik.vm@gmail.com

Öğrenim Durumu:

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

Doktora Tezi ve Danışmanı:

“Oksidatif Stresle Aktive Edilen TRPM2 Katyon Kanallarının İnaktivasyonunda Melatoninin Etkisinin Patch-clamp Sistemi ile Araştırılması”

Danışman : Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU