

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

**OKSİDATİF STRESLE UYARILAN  
DORSAL KÖK GANGLİYON HÜCRELERİNDE  
KALSİYUM SİNYALİ VE APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜ  
ÜZERİNDE SELENYUMUN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Abdülhadi Cihangir UĞUZ**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim  
Birimi tarafından 1881-D-09 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

**Tez No:**

**2011-İSPARTA**

## KABUL ve ONAY SAYFASI

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

Tez Savunma Tarihi: 06/01/2011

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



Üye :Prof. Dr. Halis KÖYLÜ  
Süleyman Demirel Üniversitesi



Üye :Prof. Dr. Mehmet Zülkif AKDAĞ  
Dicle Üniversitesi



Üye :Doç. Dr. Ahmet KOYU  
Süleyman Demirel Üniversitesi



Üye :Doç. Dr. Mustafa EMRE  
Çukurova Üniversitesi



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

Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Serpil DEMİRCİ

## ÖNSÖZ

Aslında teşekkür etmem gereken ama isimlerini bu bir sayfada zikretmem mümkün olmayacak, bir tez kitapçığı kadar insan var. Bu yüzden hayatımda köşe taşı olarak öne çıkan insanların isimlerini yazmaya öncelik verdim.

Yaşama vesile olan muhterem anneme ve babama,

Bilgisiyle bilimsel hayatımı, tecrübesiyle yaşam tarzımı daha da anlamlı kılan değerli danışmanım Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU Hocamıza,

Evin en küçüğü olduğumdan olsa gerek, ablalarım ve ağabeylerime, neşeli bir hayat yaşamama vesile olan çalışma arkadaşlarıma ve üzerimde emeği olan tüm insanlara

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

Saygılarımla

Abdülhadi Cihangir UĞUZ

## İÇİNDEKİLER

<b>KABUL ve ONAY SAYFASI</b> .....	<b>i</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>ii</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>v</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>GRAFİKLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİ</b> .....	<b>2</b>
2.1. Kalsiyum (Ca <sup>+2</sup> ).....	2
2.1.1. Hücre İçerisine Ca <sup>+2</sup> Giriş Kanalları .....	3
2.1.1.1. Voltaja Duyarlı Ca <sup>+2</sup> Kanalları.....	3
2.1.1.2. Reseptöre Duyarlı Ca <sup>+2</sup> Kanalları .....	4
2.1.1.3. Mekanik Olarak Aktive Olan Ca <sup>+2</sup> Kanalları.....	4
2.1.1.4. Depolanmış Ca <sup>+2</sup> Miktarına Duyarlı Ca <sup>+2</sup> Kanalları.....	4
2.1.2. Kalsiyum Salınımı .....	5
2.1.2.1. Hücre İçi Depolardan Ca <sup>+2</sup> Salınımı .....	5
2.1.2.1.1. RyRs Aracılı .....	6
2.1.2.1.2. Sfingolipit Aracılı .....	6
2.1.3. Hücre içi Ca <sup>+2</sup> Salınım Habercileri.....	6
2.1.3.1. Inositol-1,4,5-trifosfat .....	6
2.1.3.2. cADPR ve NAADP .....	7
2.2. Transient Reseptor Potential (TRP) Üst Ailesi.....	8
2.3. Oksidatif Stres .....	10
2.3.1. Serbest Radikaller.....	10
2.3.1.1. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri .....	17
2.3.2. Antioksidanlar .....	18
2.3.2.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	19
2.3.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar .....	20
2.3.2.3. Antioksidanların Etki Mekanizmaları.....	21

2.4. Selenyum (Se).....	21
2.5. Apoptotik Süreç .....	23
2.6. Arka Kök Gangliyon Hücreleri.....	24
2.7. Floresan ve Floresan Yayan Maddeler .....	26
2.7.1. Floresan İşleminin Döngüsü.....	28
2.7.2. Fura-2-AM'in Moleküler Yapısı .....	29
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>30</b>
3.1. Gereç .....	30
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler .....	30
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30
3.2. Yöntem .....	32
3.2.1. Sıçan Arka Kök Gangliyon (DRG) Hücreleri İzolasyonu.....	32
3.2.1.1. Arka Kök Gangliyon (AKG) Hücrelerinin İzolasyonu.....	33
3.2.2. Hücre Canlılığı (MTT Analizi) .....	34
3.2.3. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü .....	35
3.2.3.1. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizleri.....	35
3.2.4. Hücre İçi Ca <sup>+2</sup> Salınımının Ölçülmesi .....	36
3.2.5. Lipit Peroksidasyon Analizi .....	37
3.2.6. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi .....	37
3.2.7. Protein Tayini .....	37
3.2.8. Etik Kurul İzni.....	38
3.2.9. İstatistiksel Analiz .....	38
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>39</b>
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>49</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>56</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>57</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>58</b>
<b>EK-1.....</b>	<b>66</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>67</b>

## KISALTMALAR

<b>ADP</b>	Adenozin di-fosfat
<b>ADPR</b>	Adenozin di-fosfat riboz
<b>AKG</b>	Arka Kök Gangliyon
<b>cADPR</b>	Siklik ADPR
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Kalsiyum İyonu
<b>[Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub></b>	Hücre içi Kalsiyum İyonu
<b>CCK</b>	Kolesistokinin
<b>Cu</b>	Bakır
<b>DAG</b>	Diaçilgliserol
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DRG</b>	Dorsal Root Ganglion
<b>DTNB</b>	5,5'-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid)
<b>ET</b>	Endotelin
<b>ER</b>	Endoplazmik Retikulum
<b>FBS</b>	Fötal Buzağı Serumu (Fetal Bovine Serum)
<b>GSH</b>	Glutasyon
<b>GSH-Px</b>	Glutasyon peroksidaz
<b>GSSG</b>	Okside Glutasyon
<b>GTP</b>	Guanozin trifosfat
<b>GTPaz</b>	Guanozin trifosfataz
<b>HNA</b>	4-hidroksinoneal
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus / İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen Peroksit
<b>InsP<sub>3</sub></b>	Inositol trifosfat
<b>InsP<sub>4</sub></b>	Inositol tetrakisfosfat
<b>KAT</b>	Katalaz
<b>LPO</b>	Lipid peroksidasyonu
<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>MTT</b>	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid]
<b>Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub></b>	Sodyum Selenit
<b>NADP</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NAADP</b>	Nikotinik asit adenin dinükleotid fosfat
<b>NADPH</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NCX</b>	Na <sup>+</sup> -Ca <sup>+2</sup> değiş tokuş pompası
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-aspartate
<b>O<sub>2</sub></b>	Moleküler oksijen
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Singlet Oksijen
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Süperoksit Radikali
<b>·OH</b>	Hidroksil Radikali
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfotidilinositol difosfat
<b>PKA</b>	Protein Kinaz A
<b>PKC</b>	Protein Kinaz C

<b>PLC</b>	Fosfolipaz C
<b>PM</b>	Plazma membranı
<b>PMCA</b>	Plazma membran Kalsiyum ATPaz pompası
<b>PMNL</b>	Polymorf nükleer lokosit
<b>PUFA</b>	Çoklu doymamış yağ asitleri (Poly unsaturated fatty acids)
<b>RyRs</b>	Ryanodine Reseptörü
<b>ROCCs</b>	Reseptöre Duyarlı Kalsiyum Kanalları
<b>ROT</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>Se</b>	Selenyum
<b>SelN</b>	Selenoprotein N
<b>SERCA</b>	Sarko Endoplazmik Retikulum Kalsiyum ATPaz
<b>SMOCs</b>	Second Messenger Operated Channels (İkincil Haberci Aracılı Kanallar)
<b>SOCCs</b>	Store-operated calcium channels
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>S-1-P</b>	Sfingozin-1-fosfat
<b>SPC</b>	Sfingosifosforilkolin
<b>SR</b>	Sarkoplazmik Retikulum
<b>TBARS</b>	Tiyobarbitürik asit
<b>TRP</b>	Transient receptor potential
<b>TRPC</b>	Transient receptor potential phospholipase C
<b>TRPM</b>	Transient receptor potential melastatin
<b>TRPV</b>	Transient receptor potential vanilloid
<b>VOC</b>	Voltage Operated Channels (Voltaja Duyarlı Kanallar)
<b>5-HT</b>	5-hydroxytryptamine
<b>Zn</b>	Çinko

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> Hücre içi $Ca^{+2}$ sinyali oluşum mekanizması.....	8
<b>Şekil 2.</b> Nöronal hastalıklarda (örneğin epilepsi), oksidatif stresin indüklediği moleküler yolda selenyumun rolü.....	10
<b>Şekil 3.</b> Serbest radikallere maruz kalan hücre.....	13
<b>Şekil 4.</b> Serbest radikallerin oluşumu ve bu ürünlerle aktive edilen enzimlerle DNA hasarı sonucu $NAD^{+}$ den ADPR sentezlenmesi.....	16
<b>Şekil 5.</b> Selenyumun metabolizması.....	22
<b>Şekil 6.</b> Apoptoza giden bir hücrenin hücre zarı modellenmesi.....	24
<b>Şekil 7.</b> Spektroflorometrenin çalışma prensibi.....	26
<b>Şekil 8.</b> Fura-2-AM'nin floresan spektrumu.....	27
<b>Şekil 9.</b> Fura-2-AM'nin moleküler yapısı.....	29



## GRAFİKLER DİZİNİ

<b>Grafik 1.</b> Arka kök gangliyon hücre gruplarında lipid peroksidasyon düzeyleri .....	40
<b>Grafik 2.</b> Arka kök gangliyon hücre gruplarında GSH düzeyleri .....	41
<b>Grafik 3.</b> Arka kök gangliyon hücre gruplarında GSH-Px aktivitesi düzeyleri.....	41
<b>Grafik 4.</b> AKG hücrelerinde oksidatif stresin temsilcisi hidrojen peroksitin (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) hücre canlılığı üzerine toksit etkisini önlemede selenyum (Se) etkileri. ....	42
<b>Grafik 5.</b> AKG hücrelerinde selenyum (Se)'un hücre canlılığı üzerine terapötik etkisinin belirlenmesi. ....	43
<b>Grafik 6.</b> Kontrol grubunda sitozole Ca <sup>+2</sup> salınışının zaman akım grafiği. ....	43
<b>Grafik 7.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubunda sitozole Ca <sup>+2</sup> salınışının zaman akım grafiği. ....	44
<b>Grafik 8.</b> ADPR grubunda sitozole Ca <sup>+2</sup> salınışının zaman akım grafiği. ....	44
<b>Grafik 9.</b> Selenyum grubunda sitozole Ca <sup>+2</sup> salınışının zaman akım grafiği.....	45
<b>Grafik 10.</b> Selenyum + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> grubunda sitozole Ca <sup>+2</sup> salınışının zaman akım grafiği. ....	45
<b>Grafik 11.</b> Selenyum + ADPR grubunda sitozole Ca <sup>+2</sup> salınışının zaman akım grafiği. ....	46
<b>Grafik 12.</b> Arka kök gangliyon hücrelerinin tüm gruplarındaki sitozole Ca <sup>+2</sup> salınışının zaman akım grafiği .....	46
<b>Grafik 13.</b> Arka kök gangliyon hücrelerinin tüm gruplarındaki sitozole Ca <sup>+2</sup> salınışının zaman akım grafiğinin altında kalan alanlara göre değerlendirilmesi.....	47
<b>Grafik 14.</b> Arka kök gangliyon hücrelerinin gruplara göre apoptotik düzeylerinin değerlendirilmesi.....	48

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> ROT, simgeleri ve elektron yapıları.....	13
<b>Tablo 2.</b> GSH-Px aktivitesinin tayin edilmesi deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar.....	36
<b>Tablo 3.</b> AKG hücrelerinde lipit peroksidasyon (LP), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeyleri üzerinde hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), ADP-riboz (ADPR) ve selenyum (Se) etkileri.....	39

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> Laboratuvarımızda izole edilen AKG hücrelerinin stereomikroskop görüntüsü.....	32
<b>Resim 2.</b> AKG hücrelerinin anatomik görüntüsü .....	32

## 1. GİRİŞ

İnsan vücudu yaklaşık olarak 100 trilyon hücreden meydana gelmiştir. Bu hücrelerin canlılıklarını devam ettirebilmeleri için içinde buldukları ortamın kimyasal ve fiziksel koşullarının optimum düzeyde olmasının yanı sıra birbirleriyle etkileşimleri de önemli rol almaktadır. Hücresel birçok faaliyetin yerine getirilmesinde iyonlar temel olarak görev almaktadır. Bu iyonlardan  $Ca^{+2}$  iyonu hücreler arası haberleşmenin yanı sıra, transkripsiyon, hücre zarı potansiyelinin oluşumu ve devam ettirilmesi, kasların kasılması, fizyolojik hücre ölümü (apoptozis) vb. birçok hücresel mekanizmada anahtar rol oynamaktadır. Hücre dışarısındaki  $Ca^{+2}$  iyon konsantrasyonu hücre içine oranla yaklaşık olarak 20.000 misli daha fazladır (Berridge et al., 2003).

Normal şartlar altında fizyolojik yaşantıları devam eden hücreler, az miktarda da olsa ROT ürünleri oluşturabilmekte ve oluşan ROT ürünleri ile tamponlama mekanizmaları arasındaki denge korunduğu sürece hücre hayatını devam ettirebilmektedir. Bu denge tamponlama sistemleri aleyhine bozulduğunda ise oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkmakta ve hücre ölümüne kadar gitmektedir.  $Ca^{+2}$  iyonunun hücre içi miktarındaki değişimler de oksidatif stresi tetiklemektedir (Nazıroğlu 2007).

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

AKG hücreleri vücutta ağrının oluşum mekanizmasından sorumlu hücrelerdir. AKG hücrelerinin zarlarında oluşabilecek oksidatif hasara bağlı değişiklikler bu hücrelerin harabiyetine ve sinir hücreleri arasındaki iletim bozukluklarına neden olabilmektedir (Fischer et al., 2010).

Bu tez çalışmasında oksidatif stresin AKG hücrelerindeki  $[Ca^{+2}]_i$  salınımı, antioksidan sistem parametreleri ve bunlarla birlikte oluşabilecek muhtemel apoptozise karşı selenyumun koruyucu etkisini araştırmayı hedefledik.

## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. Kalsiyum ( $\text{Ca}^{+2}$ )

Hayatın ilk basamağı olan fertilizasyondan başlayarak gen transkripsiyonu, kas kasılması, hormon salınımı, hafıza, öğrenme, hücrelerin farklılaşması, gelişmesi, nekroz ve apoptozla tanımlanabilecek hücre ölümü gibi birçok olaydan sorumlu olan bir hücre içi ikincil haberci olan kalsiyumun evrenselliği, birçok hücrel reaksiyonda üstlendiği görevden kaynaklanmaktadır. İstirahat halindeki bir hücrede hücre içi  $\text{Ca}^{+2}$  ( $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ) konsantrasyonu yaklaşık olarak 100 nM civarındadır. Depolarizasyon, hormon aktivasyonu vb. olaylar hücredeki  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  artış mekanizmalarını tetikler ve konsantrasyonu 1–3  $\mu\text{M}$  seviyesine yükselebilir. Bu yükselmenin tüm fizyolojik olayları kontrol edebilmesinin sırrı hızı, genliği ve yer ve zamanla (spatio-temporal) ilgili modelinden kaynaklanmaktadır. Hücre içi  $\text{Ca}^{+2}$  sinyali de hücre içi konsantrasyonunun ( $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ) geçici bir şekilde artışından oluşur.

$\text{Ca}^{+2}$ 'un sinyal üretime yönelik fonksiyonu sitozolik miktarının artması ile doğru orantılıdır (Berridge 1993, Berridge et al., 1998, Petersen et al., 1994, Berridge et al., 2000a). Bu artış nükleustan sızma yolu ile olabileceği gibi sadece mitokondriden tek başına da olabilir (Montero et al., 2000). Hücre içerisindeki kalsiyum konsantrasyonu, eş zamanlı birçok ters yönlü etkileşim neticesinde artabilmekte veya azabilmektedir. Bu olayları artmaya ya da azaltmaya yönelik olarak açma-kapama (on-off) şeklinde özetlemek de mümkündür.  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonu artış mekanizmaları hücre dışından hücre içerisine yönelik, hücre zarına yerleşik vaziyetteki iyon kanalları ile endoplazmik retikulum (ER) ve sarkoplazmik retikulum (SR) yüzeyindeki iyon kanalları vasıtası ile olmaktadır (Berridge et al., 2000b). Buna zıt olarak  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonu da hücre zarında ve ER/SR deki istihdam edilen  $\text{Ca}^{+2}$ ATPaz'lar, yoğunluk farklılığından kaynaklanan ve enerji harcanması ile neticelenen bir takım değiş-tokuş mekanizmaları ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ ) tarafından sağlanır.  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  seviyesinin düzenlenmesinde mitokondri önemli rol oynar. Mitokondri  $\text{Ca}^{+2}$ 'a karşı düşük affinite göstermesine karşılık, çok fazla oranda depolama kapasitesine sahiptir. Bu özelliği sayesinde  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  miktarını azaltmada dolayısı ile de hücrel cevap (azaltarak) oluşumunda etkin rol oynamaktadır.

Bunlarla birlikte hücre dışı ortamda bulunan kalsiyum da sinyal mekanizmasında önemli rol oynamaktadır (kemiklerde çökeltme, oturma gibi).

### **2.1.1. Hücre İçerisine $Ca^{+2}$ Giriş Kanalları**

Hücre içerisine  $Ca^{+2}$ 'un girişi büyük bir elektrokimyasal konsantrasyon farklılığının olması durumunda gerçekleşir (Berridge et al., 2003). Hücreler bu dış kaynağı farklı özellikteki kanallar vasıtasıyla kullanırlar. Hücreler  $Ca^{+2}$  'un hücre içerisine girmesine neden olabilecek aktivasyon mekanizmalarına göre gruplandırılmış farklı tipte kanallardan faydalanırlar. Bu kanallar;

1. Voltaja duyarlı  $Ca^{+2}$  kanalları (Voltage operated  $Ca^{2+}$  channels / VOCCs)
2. Reseptöre duyarlı  $Ca^{+2}$  kanalları (Receptor operated  $Ca^{2+}$  channels / ROCCs)
3. Mekanik olarak aktive olan  $Ca^{+2}$  kanalları (Mechanically activated  $Ca^{2+}$  channels)
4. Depolanmış  $Ca^{+2}$  miktarına duyarlı  $Ca^{+2}$  kanalları (Store operated  $Ca^{2+}$  channels / SOCCs) başlıkları altında sınıflandırılabilirler.

#### **2.1.1.1. Voltaja Duyarlı $Ca^{+2}$ Kanalları**

Kas ve sinir hücreleri gibi plazma membranının depolarizasyonu sonucu aktive olabilen, uyarılabilen hücre tiplerinde bulunurlar.

Memeli hücrelerindeki voltaja duyarlı  $Ca^{+2}$  kanalları beş tane alt birimden ( $\alpha_1, \alpha_2, \beta, \gamma, \delta$ ) oluşmuştur. Bu alt tiplerden sadece bir tanesi ( $\alpha_1$ )  $Ca^{+2}$  kanalı olarak görev almakta diğer alt tipler ise kanalın açılıp kapanmasının düzenlenmesinde hizmet etmektedirler.

### **2.1.1.2. Reseptöre Duyarlı Ca<sup>+2</sup> Kanalları**

Bu tip Ca<sup>+2</sup> kanalları yapı ve fonksiyonu itibariyle farklılık arz eden ve salgı hücreleri ve sinir sonlarında sıkça rastlanan bir dizi kanaldan oluşmuşlardır. En iyi bilinen ROCCs'ler nikotinic asetilkolin ve N-methyl-D-aspartate reseptörlerini içerirler. ROCCs'ler hücre yüzeyinde bulunan özel alana, agonistin bağlanması ile aktive olurlar. Farklı tipteki ROCCs'ler çok geniş bir agonist yelpazesi içerisinde çeşitlilik gösterirler.(Örn: ATP, Serotonin, glutamat ve asetilkolin.)

### **2.1.1.3. Mekanik Olarak Aktive Olan Ca<sup>+2</sup> Kanalları**

Birçok hücre tipinde bulunabilirler ve hücre deformasyonuna cevap verilmesinde görev alırlar.

Bu tip kanallar stres ve şekil değişikliği durumunda bilgi iletilmesinde görev alırlar. En iyi örnek trakea'daki epitelyum hücreleri veya kulak zarındaki koklear hücreler verilebilir (Boitano et al., 1992).

Örn: Akciğerlerden müköz veya partiküllerin temizlenmesinde görevlendirilmişlerdir (Bootman et al., 2001).

### **2.1.1.4. Depolanmış Ca<sup>+2</sup> Miktarına Duyarlı Ca<sup>+2</sup> Kanalları**

Hücre içi Ca<sup>+2</sup> depolarının boşalmasına cevap olarak aktive olabilecekleri gibi farmakolojik bir ajan veya fizyolojik olarak Ca<sup>+2</sup>'u hareketlendirecek haberciler tarafından aktive olurlar.

Bu kanalların bulunduğu hücre içerisindeki depolarının nasıl doldurulduğu henüz aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmalar iki tezin belirgin olarak öne çıktığını göstermektedir. Bunlar;

1-Hücre zarın (PM)'daki Ca<sup>+2</sup> giriş kapıları ve ER deki Ca<sup>+2</sup> (Berridge 1995, Berridge et al., 2000b).

2-Salınım kapılarının birbiriyle birlikte uyumlu bir şekilde çalışmaları ya da Ca<sup>+2</sup> depolarının patlatılmasıyla sentezi mümkün olabilen yayılabilme özelliğinde,

kalsiyum giriş faktörü habercisi ve bunun neticesinde PM'daki  $Ca^{+2}$  kanallarının aktivasyonunun gözlemlenmesi ile oluştuğu varsayılmaktadır (Trepakova et al., 2000).  $Ca^{+2}$  depolarının patlatılmasından kaynaklanan  $Ca^{+2}$  girişi artmasının birçok hücre tipinde görülmesinden dolayı SOCCs'ler PM'deki en yaygın  $Ca^{+2}$  kanal alt tipi olabilirler (Bootman et al., 2001). Bu kanalların elektrofizyolojik olarak deneyleri de yapılmış ve hücre tipine göre farklılıklar arz edildiği görülmüştür. Bu da her bir hücre tipinin farklı tipte SOCCs kanalına sahip olduğunu belirtmiştir. Günümüzde SOCCs'lerin en iyi örneği *Drosophila* türlerinde görev yapan *transient receptor potential* olarak adlandırılan homolog yapıdaki proteinlerdir (Boulay et al., 1999, Katz and Minke 2009, Minke 2006).

## 2.1.2. Kalsiyum Salınımı

### 2.1.2.1. Hücre İçi Depolardan $Ca^{+2}$ Salınımı

Herhangi bir zamanda intrasellüler kalsiyum miktarı artış mekanizmaları olarak bilinen ve sitoplazmaya  $Ca^{+2}$  girişini temin eden reaksiyonlar, bufferlar, pompalar ve değiş-tokuşcular ile  $Ca^{+2}$ 'un sitoplazmadan uzaklaşmasına yardımcı olan olayların denge halinde olması sonucu gerçekleşir. Hücre içerisinden kalsiyum salınımı birçok çeşit, habercil ile aktive olan kanallar vasıtası ile ve mitokondrial geçirgenliğin arttığı durumlarda gerçekleşir. Hücre içerisinde  $Ca^{+2}$  salınımı genellikle ER'den -ama bunun kas dokusundaki karşılığı olan SR'den de olabilir-kendisi aracılığı ile ya da;

- a) Ins (1,4,5)  $P_3$
- b) siklik ADP ribose (cADPR)
- c) nikotinic asid adenin dinükleotid fosfat (NAADP) ve
- d) sphingosine-1-phosphate (SIP) gibi hücre içi depoların üzerine yerleştirilmiş  $Ca^{+2}$  salınım kanallarını uyarması sonucu gerçekleşir (Bootman et al., 2002).



### **2.1.2.1.1. RyRs Aracılı**

Hücre zarında bulunan reseptöre has birçok hormon ve büyüme faktörü ile fosfolipaz C (PLC)'nin aktive olmasına neden olur. PLC'de fosfatidilinositol 4,5-bifosfat'ın hidrolizini katalize ederek hücre içi haberci olan inositol 1,4,5-trifosfat (InsP<sub>3</sub>) ve diaçilgliserolun oluşmasına neden olur. InsP<sub>3</sub> sitoplazma içerisinde çok hareketli bir durumdadır ve ER/SR üzerindeki özel reseptör bölgelerine karşılaştığı yerde bağlanır. Bu bağlanma olayı InsP<sub>3</sub>Rs'nin konformasyonunda değişikliğe neden olur. Bu da ER/SR içerisindeki yüksek konsantrasyonda depolanmış Ca<sup>+2</sup>'un sitoplazma içerisine salınmasına neden olur (moleküler ağırlığı ~1200 kDa).

### **2.1.2.1.2. Sfingolipit Aracılı**

Sfingozilfosforilkolin (SPC) ve sfingozin-1-foshat (S-1-P) gibi endoplazmik retikulum daki Ca<sup>+2</sup> salınım kanallarını aktive eden bir sfingolipit türevi proteindir. Kalp kası, pankreas ve karaciğer gibi farklı dokularda bulunabilen, InsP<sub>3</sub>Rs veya RyRs den daha düşük molekül ağırlığına sahiptirler (~20 kDa) (Betto et al., 1997).

## **2.1.3. Hücre içi Ca<sup>+2</sup> Salınım Habercileri**

### **2.1.3.1. Inositol-1,4,5-trifosfat**

Hormon veya büyüme faktörlerinden herhangi birisi hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlandığında PIP<sub>2</sub>'den PLC vasıtası ile InsP<sub>3</sub> sentezlenir (Berridge et al., 2000a). PLC hem diaçilgliserol hem de InsP<sub>3</sub> düzeylerinde yükselmelere neden olur ve bu yükselmeye protein kinaz C'nin aktive olmasına neden olur. InsP<sub>3</sub> hücre zarında üretilmesiyle birlikte yayılabilme özelliği yüksek olan bir maddedir. Bu özelliği ile hücre sitoplazmasından hızla geçebilir. Bununla birlikte InsP<sub>3</sub> molekülü saniyeler içerisinde bitebilecek bir ömre sahiptir. Bu yüzden bir fosfat grubunun eklenmesi veya kendinden ayrılması ile birlikte Ca<sup>+2</sup> salınım potansiyeli sonlandırılır. G proteini ile birleştirilmiş (PLCβ), tirozin-kinaz ile birleştirilmiş (PLCγ) veya Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonundaki artma ile (PLCδ), Ras (PLCε) aktivasyonu ile de olabilmektedir. Sperm hücreleri tarafından yumurta hücresi içerisine enjekte

edilen, yeni keşfedilen (PLC $\zeta$ ) PLC zeta habercisi de fertilizasyon süreci boyunca memeli yumurta hücrelerinde gereklidir (Saunders et al., 2002). Bir fosfat grubunun eklenmesiyle bir başka hücre içi haberci olan 1,3,4,5-tetrakisphosphate (InsP<sub>4</sub>) oluşturulur. Hücre fizyolojisinde bunun görevi tam olarak bilinmemektedir. InsP<sub>4</sub>'ın GTPaz aktiveli Ca<sup>+2</sup> salınımında rol aldığı bilinmektedir (Cullen 1998).

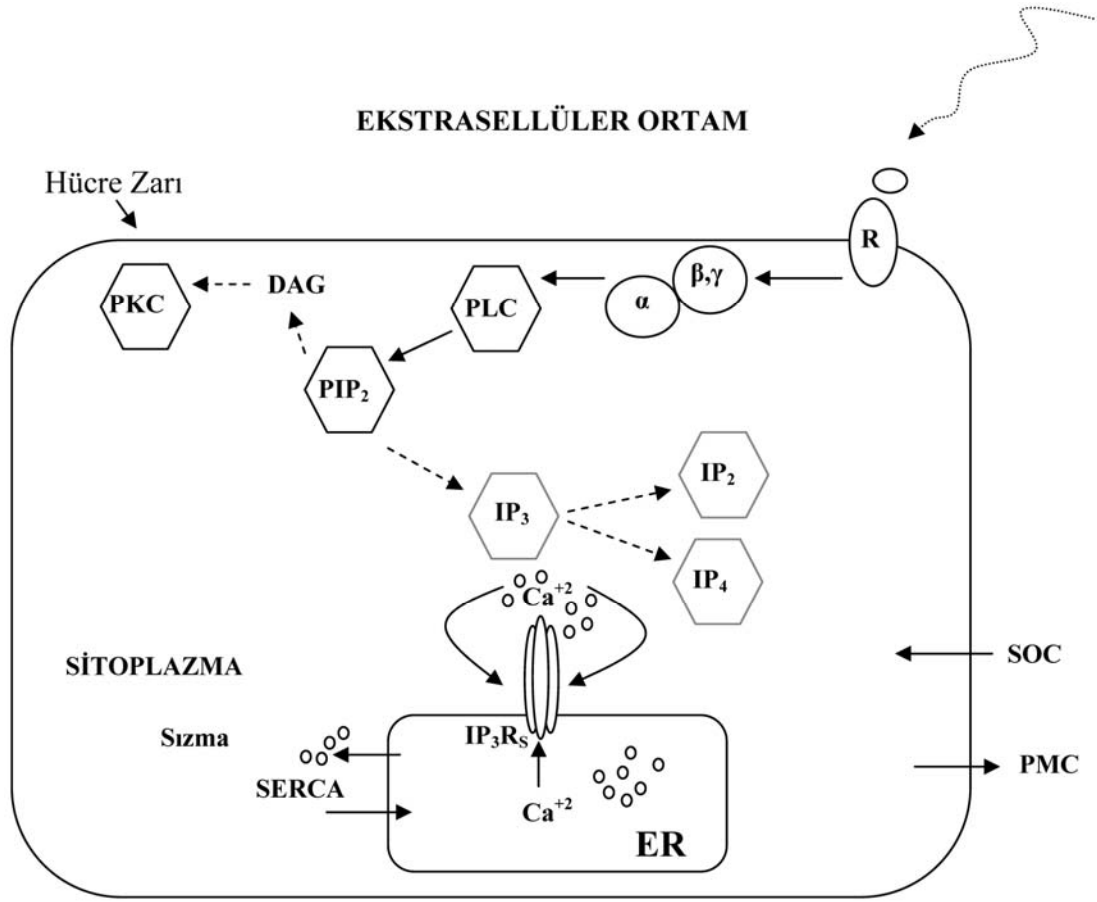
### 2.1.3.2. cADPR ve NAADP

Bu iki molekül aynı enzimatik yolak tarafından üretilmelerine rağmen, farklı mekanizmalarla hücre hücre içi Ca<sup>+2</sup> salınımına neden olmaktadır (Lee 1998).

Cyclic ADP ribose (cADPR) RyRs aracılığı ile Ca<sup>+2</sup> salınımına neden olmaktadır. cADPR'nin bu etkisi NAD<sup>+</sup> türlerinin denizkestanesi yumurtaları üzerinde Ca<sup>+2</sup> salınım metabolizmasına etkisinin araştırıldığı dönemlerde bulunmuştur. cADPR  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> den ADP-ribozil siklaz tarafından sentezlenmektedir (Lee 1999). Memeli hücreleri ADP ribozil siklazın hem sentez hem de hidrolizinde görev alan CD-38 maddesini içerirler. CD-38 bileşiği de  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> dan cADPR sentezlenmesini veya NADP'den NAADP sentezlenmesini sağlar. Ancak bu olay ekstrasellüler olarak gerçekleşmektedir. CD-38 bileşiği hem hücre yüzeyinde hem de hücre içi zarlarda yerleştirilmiş olarak bulunur. CD-38 proteinin cADPR'yi hücre içerisine taşıdığı varsayılmaktadır (Zocchi et al., 1999). NAADP de cADPR gibi  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> den oluşturulur (Lee 1999).

Hücre içi depolara Ca<sup>+2</sup>'nin alınması, başka bir deyişle sitozolden Ca<sup>+2</sup>'nin uzaklaştırılması üç yolla gerçekleşir (Wojda et al., 2008):

1. Endoplazmik retikulum membranındaki Ca-ATPaz enzimi
2. Hücre membranındaki Ca-ATPaz
3. Na<sup>+</sup> / Ca<sup>+2</sup> değişimi ile olmaktadır.



Şekil 1. Hücre içi  $Ca^{+2}$  sinyali oluşum mekanizması.

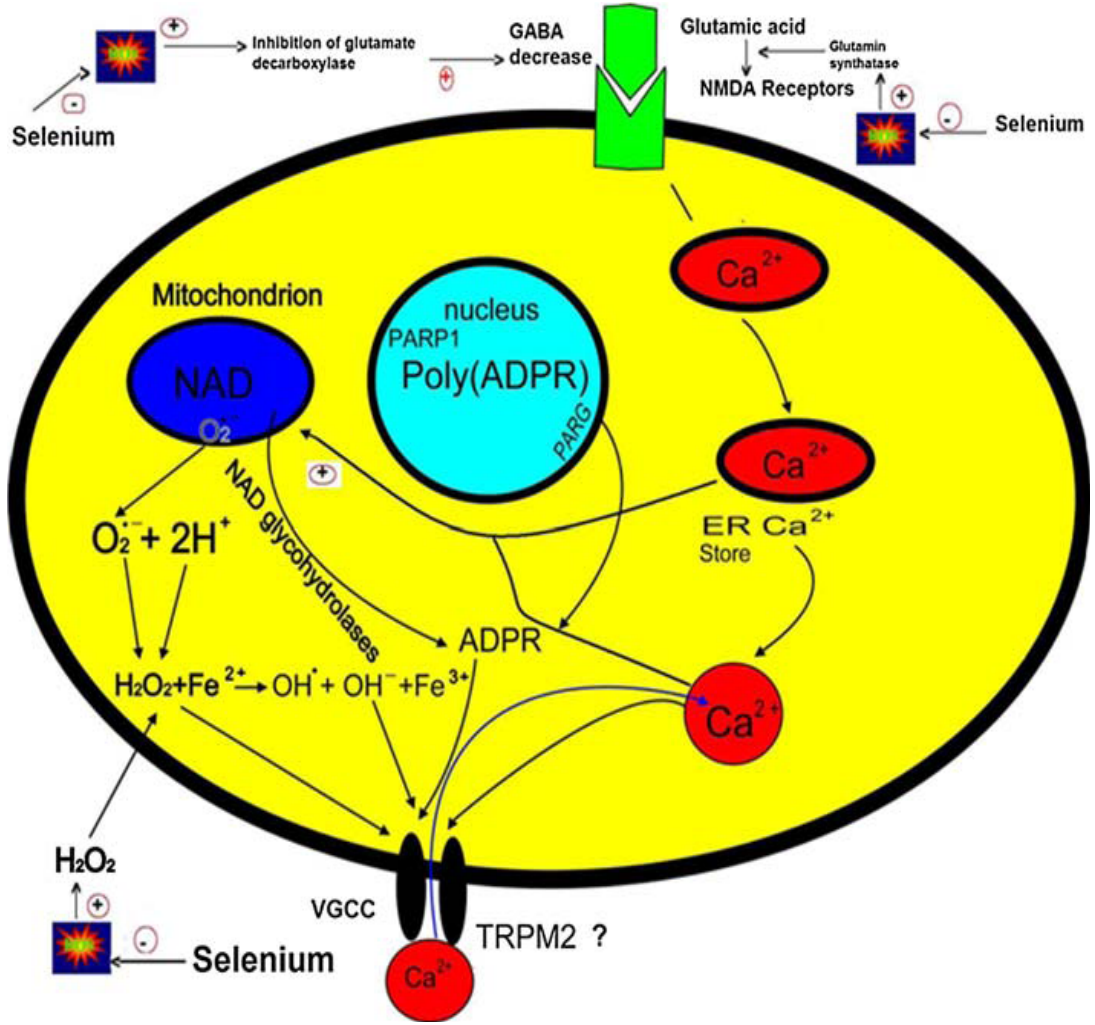
## 2.2. Transient Reseptor Potential (TRP) Üst Ailesi

“*Transient Receptor Potential (TRP)*” katyon kanalları üst ailesi voltaja duyarlı  $Ca^{+2}$ ’a geçirgen katyon kanallarının geniş bir yelpazesıyla uzlaştırılmaktadır. 28 adet memeliye ait TRP kanalları yedi alt birime ayrılmıştır. Bunlar;

TRP *conancial* (TRPC) yedi alt birimden, TRP *vanilloid* (TRPV) altı alt birimden, TRP *melastatin* (TRPM) sekiz alt birimden, TRP *polycystein* (TRPP) üç alt birimden, TRP *mucolipin* (TRPML) üç alt birimden ve TRP *ankyrin* (TRPA) bir alt birimden oluşmaktadır. Tüm bu TRP katyon kanalları henüz tam olarak karakterize edilememesine rağmen, birçok hastalık onların varlığında ortaya çıktığından bu tip iyon kanallarına olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Kanal gözeneginin 5. ve 6. segmentleri arasında bulunan bir iletken iyon etrafında homo veya heterotetromerik düzenlemelerle TRP kanalları voltaja duyarlı  $K^{+}$  kanallarına benzer basit bir yapıya

sahiptir (Clapham 2003) transmembran segmentlerinden dördüncüsü ise pozitif yüklü olmama özelliği ile diğerlerinden ayırır. TRPV N ucu ve TRPV tekrarlı bağlayıcı, çoklu *ankyrin* içerir. TRPC ve TRPM kanallarına ait 6. segmentin C ucu kısmı “TRP alanı” içerir. TRPM2 kanallarında iyon akışı 5. ve 6. segmentler arasında gerçekleşmektedir. Ayrıca, TRPM2 ve TRPC kanallarının N ucu ADPR pirofosfataz (ADPR’yi, riboz 5- fosfat ve adenzin monosfosfata parçalar ve kanal açılır) enzim aktivasyonu içermektedir. ADPR pirofosfataz aktivasyonu TRPV kanallarında gözlemlenmemiştir. Çok yönlü Protein Kinaz A (PKA) ve Protein Kinaz C (PKC) varsayılan fosforilasyon alan fonksiyonları tanımlanmış ve kısmen test edilmiştir. (Watanabe et al., 2008).

TRP kanalları ya direkt olarak hücre zarındaki  $Ca^{+2}$  giriş kanalları gibi davranmakta ya da  $Ca^{+2}$  giriş kanallarının modülasyonu için itici güç olan zar potansiyelini değiştiren sitozolik serbest  $Ca^{+2}$  kanallarında değişime yardımcı olmaktadır. Tanımlanabilmiş tüm işlevsel TRP kanalları (TRPM4 ve TRPM5 kanalları dışında)  $Ca^{+2}$  için geçirgendirler. Bu durum sadece monovalan katyonlar için geçerli değil, aynı zamanda  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonları içinde geçerli olmaktadır. Memeli hücreleri TRP ailesinden iki tanesi, TRPV5 ve TRPV6,  $Ca^{+2}$ ’a çok geçirgendir. TRPM6 ve TRPM7  $Mg^{+2}$ ’a çok geçirgen, TRPV1, TRPML1 ve TRPP3 kanalları da  $H^{+}$  iyonlarına çok geçirgendir (Nilius 2007).



**Şekil 2.** Nöronal hastalıklarda (örneğin epilepsi), oksidatif stresin indüklediği moleküler yolakta selenyumun rolü (Nazıroğlu 2009a). (ADPR: ADP-riboz, TRPM2: transient reseptör potansiyel melastatin 2, PARP-1: poli (ADPR) polimeraz-1, PARG: poli (ADPR) glikoh

### 2.3. Oksidatif Stres

#### 2.3.1. Serbest Radikaller

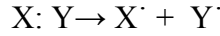
Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron taşıyan, fizyolojik ve patolojik birçok süreçte üretilen oldukça aktif moleküllerdir. Kararsız bir yapıya sahip olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle çabucak reaksiyona girerler ve son yörüngelerinde bulunan elektronlarını diğer moleküllerle paylaşırlar. En dış orbitalinde paylaşılmamış elektron bulunması, o serbest radikalın reaktivitesinin çok fazla olduğunu belirtir

(Knight 2000). İnsan vücudundaki tüm hücrelere kolaylıkla girebilen ve hücreler tarafından en çok kullanılma özelliğine sahip olan oksijen molekülü (O<sub>2</sub>), kimyasal yapısı gereği radikal olmaya çok uygundur. Bu yüzden serbest radikal denilince aslında serbest oksijen radikalleri ifade edilmektedir. Genel olarak reaktif oksijen türleri (ROT) olarak bilinen bu moleküller normal şartlar altında organizmada sürekli olarak oluşmaktadır (Seifried et al., 2007).

İnsan vücudunda serbest radikaller 3 yolla meydana gelir:

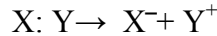
1. Kovalent bağların homolitik kırılması:

Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklıklar moleküllerdeki kimyasal bağların kırılmasına neden olurlar. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır ise de, her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron bulunur. Sonuç olarak, yüksek oranda reaktiviteye sahip iki adet serbest radikal oluşur.



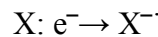
2. Normal bir molekülden bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi:

Radikal özelliği olmayan bir molekülden elektron kaybı esnasında halen daha dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa, bu molekülün radikal formu oluşur. Askorbik asit, GSH ve tokoferoller gibi hücresele antioksidanlar radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.



3. Normal bir moleküle bir elektronun eklenmesi yoluyla:

Radikal özelliği olmayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. O<sub>2</sub>'in tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksid'in (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) oluşumuna neden olur.



Radikal olmayan türler, bu tepkimelerden herhangi biri oluştuğunda, radikal haline gelir. Serbest radikaller ile radikal olmayanların tepkimeleri sonucu,

tepkimeye giren moleküller sırayla serbest radikallere dönüşür ve hasar zincirini ilerleterek yayarlar (Sapolsky 2000, Seifried et al., 2004).

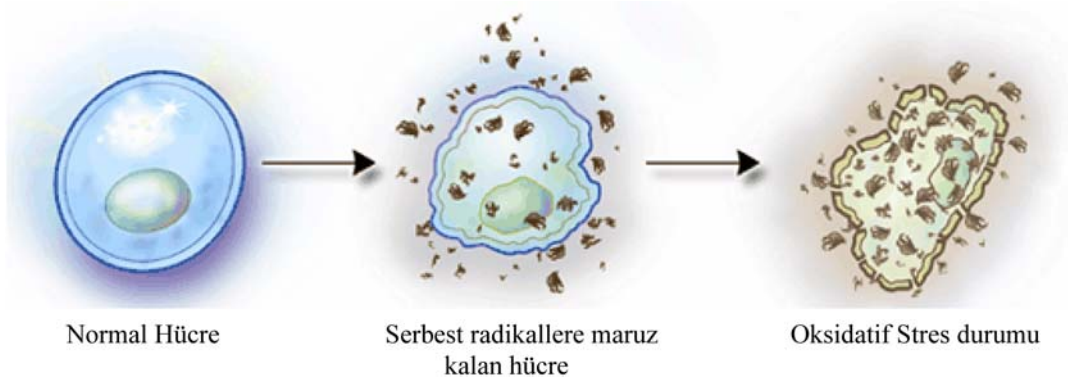
Nitrojen ( $N_2$ ) ve Oksijen ( $O_2$ ) molekülleri serbest radikal kaynaklarıdır.  $O_2$ 'in kısmi indirgenmesinden, ROT olan hidroksil ( $\cdot OH$ ) radikali ve  $O_2^{\cdot -}$  oluşmaktadır. Ayrıca singlet oksijen ( $^1O_2$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) molekülleri, radikal olmayan ROT olarak ifade edilirler.

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Endojen kaynaklı etmenler organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile oluşurlar. Oksijen, nitrik oksit, aktive nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı, araşidonik asit metabolizması başlıca endojen kaynaklardır. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında; diyet faktörleri, stres, çevresel faktörler (hava kirliliği), ilaçlar, ksenobiyotikler, zararlı ışınlar (x-ray, U.V. vs.) yer alır (Sonntag 2006, Çete ve ark., 2005, Valko et al., 2004, Akyol ve ark., 2001).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (Irmak ve ark., 2001). Oksijen, iki elektronu eşleşmemiş bir şekilde elektron dağılımına sahiptir. Bu yüzden bazen oksijen biradikal olarak değerlendirilir. (Del Rio et al., 2005). Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Biradikal oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Organizmada geçiş metallerini ( $Fe^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla, moleküler oksijene tek elektronların transferi ile oksidasyon reaksiyonları meydana gelir. Moleküler oksijen, radikal oluşunun bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri oluşturma eğilimindedir. Reaktif oksijen türleri normal oksijen metabolizması sırasında oluşan süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot -}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), ve hidroksil radikalidir ( $OH$ ). Reaktif oksijen türlerinin oluşum basamaklarında öncelikle tek elektron transferi ile moleküler oksijen,  $O_2^{\cdot -}$  ye dönüşür.  $O_2^{\cdot -}$  ye iki elektron eklenmesi ile  $H_2O_2$  oluşur.  $H_2O_2$ , univalan redüksiyonu

ile diğ er bir protonun eklenmesi sonucu suya ve OH<sup>-</sup>'ne dönüşür. OH<sup>-</sup>'i de univalan redüksiyon ile suya dönüşür (Hoffer 1954).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum özetle, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermektedir (Derin ve ark., 2001).



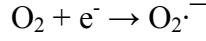
**Şekil 3.** Serbest radikallere maruz kalan hücre

**Tablo 1.** ROT, simgeleri ve elektron yapıları

<u>Reaktif Oksijen Türleri</u>	<u>Simgesi</u>	<u>Elektron Yapısı</u>
Süperoksit Radikali	$O_2^{\cdot-}$	$\left[ \cdot \ddot{O} : \ddot{O} \right]^{-}$
Hidroksil radikali	$\cdot OH$	$\cdot \ddot{O} : H$
Singlet oksijen radikali	$^1O_2$	$\cdot \ddot{O} : \ddot{O} \cdot$
Hidrojen peroksit	$H_2O_2$	$H : \ddot{O} : \ddot{O} : H$

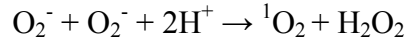
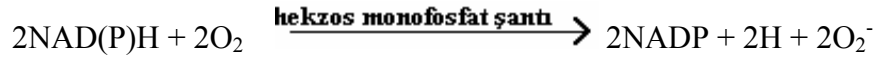
*Süperoksit radikali* ( $O_2^{\cdot-}$ ):  $O_2$ 'in indirgenmesi ile oluşan süperoksit radikalinin en önemli kaynağı, mitokondriyal elektron transport zinciridir.



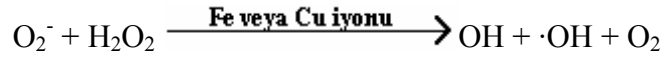


$O_2^{\cdot-}$ 'in yarılanma ömrü hücrelerin farklı yerlerinde bulunan süperoksit dismutaz (SOD) enziminin varlığına bağlıdır. Ayrıca, indirgeyici moleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken  $O_2^{\cdot-}$  oluşur.

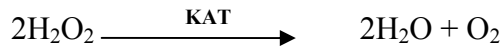
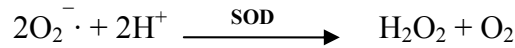
$O_2^{\cdot-}$ 'in dokulardaki en önemli kaynağı, polimorfonükleer lökosit (PMNL) fonksiyonları sırasında üretilenleridir. Daha az miktarda olmakla birlikte eozinofil ve lenfositler de antibakteriyel bir ajan olarak  $O_2^{\cdot-}$  üretirler. PMNL'lerde  $O_2^{\cdot-}$  üretimi membran bağlı azalmış NAD(P)H-oksidadaz şantı (veya heksoz monofosfat şantı) yolu ile gerçekleşir (Knight et al., 2000, Leusen et al., 1996).



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



$O_2^{\cdot-}$ 'in dokulardan uzaklaştırılması,  $H_2O_2$ 'in spontan dismutasyonu yolu ile olur. Bu reaksiyon SOD enzimi tarafından da katalizlenir.  $H_2O_2$ , ikinci bir enzimle [katalaz (KAT)] uzaklaştırılır (Knight et al., 2000, Leusen et al., 1996, Juranek and Bezek 2005)



*Hidroksil radikali* ( $\cdot OH$ ), bilinen en reaktif radikaldir. Bu radikal, DNA sarmallarında kırılmaya sebep olur ve gen mutasyonlarına neden olarak malign transformasyonlara veya hücre ölümlerine yol açar.  $\cdot OH$  aynı zamanda lipid peroksidasyonunu (LPO) da stimüle etmek yoluyla doku yıkımında rol oynamaktadır.

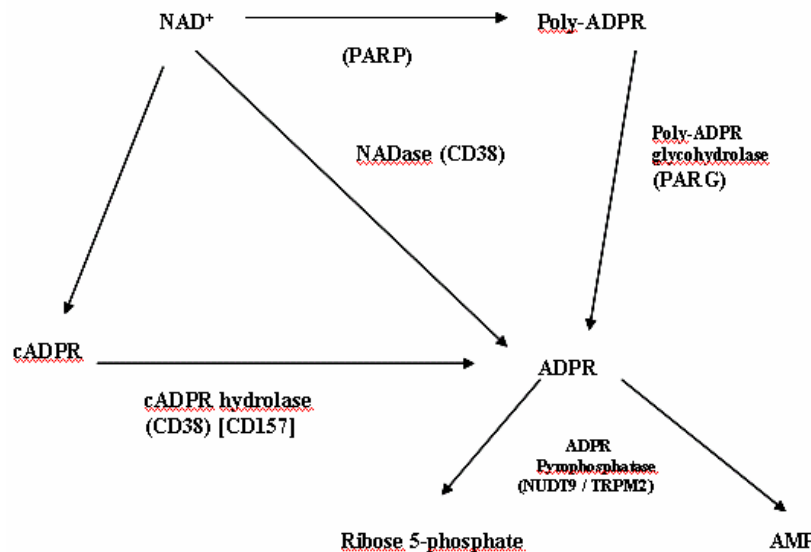
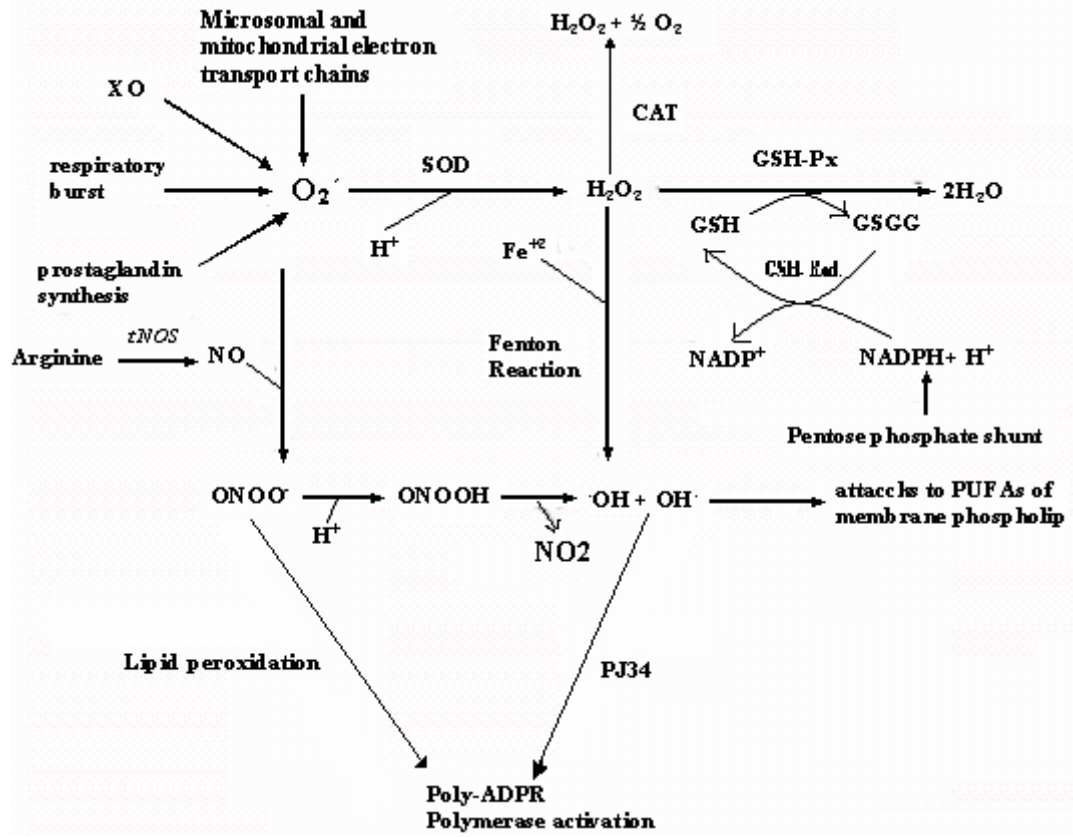
LPO olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonu,  $\cdot OH$  radikalinin sebep olduğu en önemli hasardır.  $\cdot OH$  radikalinin başlıca hedefi yağ asitleridir. Zar

lipitlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozabilmekte ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilmektedir (Knight et al., 2000, Sharpe et al., 2003, Liochev and Fridovich 2002).

*Singlet oksijen radikali* ( $^1O_2$ ), eşleşmemiş elektron taşımadığından gerçek bir radikal değildir.  $O_2$ 'in yüksek enerji ile uyarılmış formu olup biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları sırasında, dış yörüngesindeki bir elektronun enerjisinin değişmesi ve stabilitenin bozulmasıyla oluşur.  $O_2$ 'in kinetik olarak uyarılan bu formu, membran lipitleri ile oldukça yüksek reaktivite gösterir ve hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitleriyle (PUFA) reaksiyona girmesiyle, lipid peroksiditlerin oluşumuna yol açabilmektedir (Knight et al., 2000).

*Hidrojen peroksit radikali* ( $H_2O_2$ ), enzimatik olarak  $O_2$ 'in iki elektron alarak indirgenmesiyle ya da  $O_2^{\cdot-}$  radikallerinin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyonu sonucu oluşur. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz, reaktif bir tür değildir. Güçsüz bir oksidan olmasına rağmen hücre membranlarından kolayca diffüze olabildiği için ve ayrıca geçiş metalleriyle Fenton reaksiyonuna girdiği için hasar oluşturmada yüksek potansiyele sahiptir. Esasen  $H_2O_2$ 'in oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  gibi metal iyonlarının varlığında  $\cdot OH$  radikalinin öncülü olarak davranmasıdır.  $H_2O_2$ , özellikle proteinlerdeki HEM grubunda bulunan  $Fe^{+2}$  ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif formlarını oluşturur. Bu formdaki demir molekülleri çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında LPO gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Ayrıca bu radikal birtakım intrasellüler olayları da tetikler. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan  $H_2O_2$ 'in derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan KAT ve peroksidaz enzimleri yerine getirir (Gutteridge et al., 1990, Imlay et al., 1988, Winterbourn 1995).

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



Şekil 4. Serbest radikallerin oluşumu ve bu ürünlerle aktive edilen enzimlerle DNA hasarı sonucu  $NAD^+$ 'den ADPR sentezlenmesi (Nazıroğlu 2007a).

Malignite, diabetes mellitus (DM), ateroskleroz ve nörodejeneratif hastalık gibi birçok patolojik olayla ilişkili olan serbest radikallerin en zararlı biyolojik etkisi; hücre membranı yağ asitlerine ve lipoproteinlere saldırması ve LPO olarak bilinen

bir reaksiyon zincirini başlatarak, membran proteinlerine hasar verip yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olmaktadır (Gutteridge 1995).

### **2.3.1.1. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri**

Vücudumuzda serbest radikaller ve antioksidan savunma mekanizması normal şartlarda denge halindedir. Antioksidan savunma mekanizması ve serbest radikaller arasındaki denge oksidanlar lehine bozulduğunda serbest radikaller; membran lipitleri, protein, karbonhidrat ve DNA gibi biyomoleküller ile etkileşerek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olmaktadır (Halliwell et al.,1992, Gutteridge and Halliwell 2000).

1) Membran Lipitleri Üzerine Etkileri: Hücre zarı, içerdiği PUFA nedeniyle oksidatif hasara oldukça duyarlıdır. Yağ asidi zincirinden, serbest radikallerin etkisi ile hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidi zincirinin de radikal özelliği kazanmasına neden olur. LPO, PUFA'nın radikaller ile oksidasyonu sonucu başlar, zincir reaksiyonları şeklinde devam eder ve sonucunda MDA, 4-hidroksinoneal (HNA), alkoller, etan ve pentan oluşur. LPO sonucu membran bütünlüğü bozulması ile membran proteinleri, reseptörleri ve ayrıca bunlara bağlanan enzimler inaktive olurlar.

İkiden daha fazla çift bağ içeren linolenik ve araşidonik asit gibi doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sırasında, tiyobarbütirik asit reaksiyonu sonucu ölçülebilen MDA oluşmaktadır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik veya kantitatif bir belirleyicisi değildir, fakat LPO'nun derecesiyle iyi korelasyon göstermektedir. Yağ asitlerinin peroksidasyonunda oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da iyon geçirgenliğinin, enzim aktivitesinin ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerinin değişimiyle sonuçlanır. MDA bu özelliği nedeniyle DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri üzerinde genotoksik ve karsinojen etkilidir. (Gutteridge 1995, Morrow et al., 1999).

2) Proteinler Üzerine Etkileri: Proteinler serbest radikallerin etkilerine karşı, lipitlere göre daha az hassastırlar ve etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit

miktarına bağlıdır. Böylece enzimlerin, nörotransmitter maddelerin ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarını bozabilir, immün sistemi uyarabilecek antijenik değişikliklere de yol açabilirler (Gutteridge 1995, Morrow et al., 1999, Leutner et al., 2001).

3) Karbonhidratlar Üzerine Etkileri: Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler otooksidasyona uğrayarak,  $O_2^{\cdot-}$  ve  $H_2O_2$  radikallerini meydana getirirler.

4) DNA Üzerine Etkileri: DNA üzerinde serbest radikaller, nükleik asit-baz modifikasyonlarına, nokta mutasyonlara, DNA çift sarmalının açılmasına, depürinasyona, çapraz bağlanmalara neden olabilir. Bu etkilerin bir veya birden fazlasının meydana gelmesi, kromozomal mutasyonlar ve sitotoksosite ile sonuçlanır.  $\cdot OH$  radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek değişikliklere yol açar; pürin ve pirimidin bazlarında mutasyonlara neden olur.  $^1O_2$ 'in, DNA hasarına yol açan  $\cdot OH$ ,  $H_2O_2$  ve  $O_2^{\cdot-}$ 'in geçiş metalleriyle reaksiyonu sonucu oluştuğu gösterilmiştir (Wallace 2002, Valko et al., 2006, Mason et al., 1990).

### 2.3.2. Antioksidanlar

Nötrofil ve makrofaj gibi immün sistem hücrelerinin savunma mekanizması için serbest radikal reaksiyonları gerekli olsa da serbest radikallerin fazla üretimi, doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (Nazıroğlu 2009b). Dolayısı ile serbest radikallerin tetiklediği oksidatif hasara karşı savunma mekanizmaları harekete geçer.

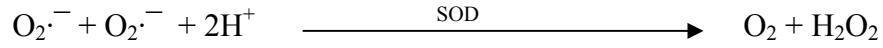
Antioksidan süreçte rol oynayan maddelere 'antioksidanlar' denir (Blokina et al., 2003). Enzimatik antioksidanlar SOD, KAT ve GSH-Px enzimleridir. SOD'ın yapısında bakır, çinko ve manganez, GSH-Px'da ise selenyum maddesi bulunduğu için bu enzimler metalloenzim olarak da adlandırılırlar (Nazıroğlu 2009b). Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda gerçekleşen enzimatik olmayan antioksidan savunmadan ise E ve C vitaminleri, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilirubin,  $\beta$ -karoten sorumludurlar. SOD, GSH-Px ve KAT enzimlerinden ayrı olarak E ve C vitaminleri de hücre içi antioksidan özelliğe sahiptirler. Her ikisi de hücre membranlarındaki LPO zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlardır. Hücre içi

ortamın aksine hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır (Liochev and Fridovich 2002, Blokhina et al. 2003).

### 2.3.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Başlıca antioksidan enzimler: SOD, KAT ve GSH-Px' dir (Nazıroğlu 2009b).

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



Üç farklı SOD izoenzimi tanımlanmıştır:

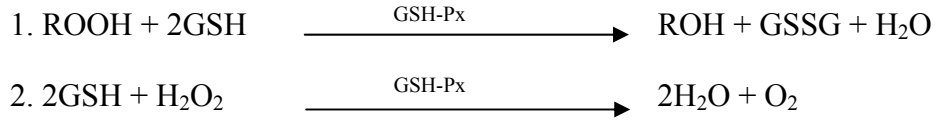
1. *Çinko-Bakır (Cu-Zn) SOD*: Bakır (Cu) ve çinko (Zn) atomları arasındaki köprü histaminle sağlanır. Cu atomları enzimatik aktiviteden sorumluyken, Zn atomları enzimin stabilitesinden sorumludur. Cu-Zn SOD'nin antioksidan savunmada ilk sırada yer aldığı düşünülmektedir.

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

3. *Ekstraselüler SOD (EC-SOD)*: EC-SOD, ekstraselüler bölümlere salgılanabilir ve hücre yüzeyindeki heparin sülfat proteoglikanlara bağlanabilir, Cu-Zn SOD gibi kofaktör olarak Zn ve Cu kullanır. EC-SOD'un  $ONOO^{\cdot-}$  aktivitesini önlediği düşünülmektedir (Leutner et al., 2001).

Yüksek  $O_2$  kullanımı olan dokularda SOD aktivitesi, özellikle eritrositlerde fazladır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynamaktadır. Bu nedenle SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de SOD fazla miktarda bulunmaktadır (Leutner et al., 2001).

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): GSH-Px, glutasyon yolunun ilk enzimidir, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Enzim aktivitesi, pentoz fosfat yolunda üretilen NAD(P)H'a bağımlıdır (Wallace 2002).



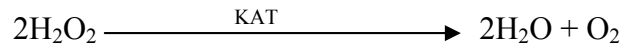
GSH-Px, üç peptidli glutasyonu kendi oksidize formuna (GSSG) indirgerken; sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından katalizlenen reaksiyon sonucu oluşan  $\text{H}_2\text{O}_2$  radikalini, yüksek spesifite göstererek ortadan kaldıracak özelliğine sahiptir (Valko et al., 2005).

Selenyum bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere farklı substratlar kullanan iki tip GSH-Px vardır. Selenyumdan bağımsız formu organik  $\text{H}_2\text{O}_2$  moleküllerini kullanıp, yüksek bir aktivite gösterebilir. Selenyuma bağımlı olan formu ise sitoplazmada bulunur ve kapasitesi daha düşüktür (Valko et al., 2006).

Endoplazmik retikulumdan salınan  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in dekompozisyonunun primer sorumlusu olan GSH-Px aktivitesindeki azalma,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in artmasına ve hücrede şiddetli bir hasara yol açmaktadır (Wallace 2002).

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

**Katalaz (KAT):** İçeriğinde  $\text{Fe}^{+3}$  bulunduran dört hem grubuna ayrılmış, glikoprotein yapısında, bir hemoproteindir. SOD tarafından katalizlenen reaksiyon sonucu oluşan  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in, peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalanmasında rol alır (Leutner et al., 2001, Peskin et al., 1997).



### 2.3.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

**1. Glutasyon (GSH):** GSH, sistein içeren bir tripeptit yapısında olup in vivo sentezlenebilen ve ince bağırsaktan emilebilen endojen ve ekzojen bir antioksidandır. Peroksidazlar için substrat görevi görebilen GSH, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde de orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir (Blokina et al., 2003).

GSH'un yaklaşık %90'ı sitozolde, %10'u mitokondride ve çok az bir kısmı da endoplazmik retikulumda bulunur. GSH oksidasyonu, apoptozis sürecinin erken dönemdeki belirtisidir ve metabolik sinyal görevi görebilir (Greenwald 1990).

GSH, DNA sentezi ve hasarlı parçalarının onarılmasında etkindir; aminoasit transportu, peroksit metabolizması, iskelet-kas bütünlüğü ve birçok enzim aktivitesinin düzenlenmesinden sorumludur ve eksikliği hücre ölümüne yol açar (Macmillan-Crow 2001).

### **2.3.2.3. Antioksidanların Etki Mekanizmaları**

Antioksidanlar dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

1. Süpürücü etki (Temizleme Etkisi) (Scavenging): ROT'ni etkileyerek onları tutma veya daha zayıf bir moleküle çevirme işlemidir. Antioksidan enzimler bu şekilde etki gösterir.
2. Bastırıcı etki (Baskılama Etkisi) (Quencher): Vitaminler, flavonoidler ve trimetazidin, radikallere bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya onları inaktif forma dönüştüren bir etkiye sahiptir.
3. Onarıcı etki (Onarma Etkisi) (Repair): Bu grupta DNA tamir enzimleri, metiyonin sülfoksit redüktaz sayılabilir.
4. Zincir kırıcı etki (Zincir Koparma Etkisi) (Chain breaking): Serbest radikalleri kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye denir. Hemoglobin, seruloplazmin, E vitamini ve mineraller bu tip etki göstermektedir (Klouche et al., 2004).

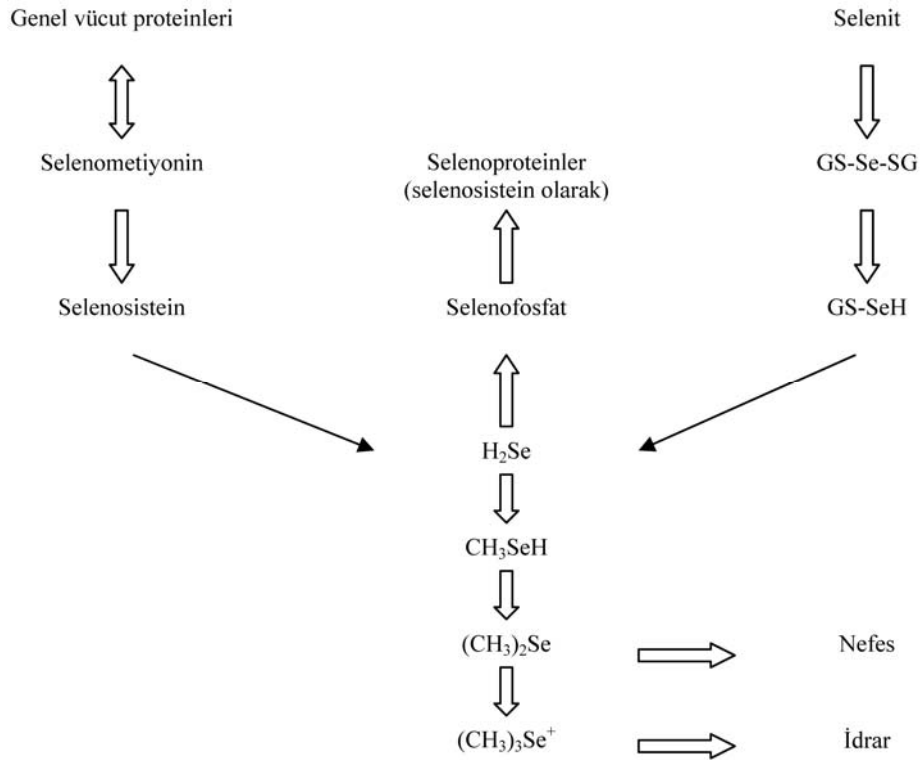
### **2.4. Selenyum (Se)**

Selenyum, ilk kez 1817'de kimyacı Berzelius tarafından keşfedilmiştir (Papp et al., 2007). Birçok enzimin kofaktörüdür ve temel olarak antioksidan fonksiyonuyla bilinen esansiyel bir eser elementtir (Kane et al., 2007). Diyet, selenyumun en büyük kaynağıdır ve alınan miktar, yiyeceklerdeki konsantrasyona ve tüketilen yiyecek



miktarına bağlıdır (Knegtering et al., 2005, Melkersson 2006). Başlıca karaciğer, kas, böbrek ve plazmada bulunmaktadır (Kramer et al., 2007).

Selenyum, doğal olarak organik (selenometiyonin, selenosistein) ve inorganik (selenit, selenat, selenid) formlarda bulunur (Akkuş 1995). Selenit ve selenat in vivo olarak selenosisteine çevrilir (Dolder et al., 2008). Selenometiyonin, barsaktan absorpsiyonunda metiyonin ile yarışır, metiyonin içeren vücut proteinlerine katılır ve depolanır. Transsülfürasyon ile selenosisteine çevrilebilir (Kramer et al., 2007). Tüm bu selenobileşikleri hidrojen selenide katabolize edilebilir ve dimetil selenid olarak solunum yoluyla veya trimetilselenonyum iyonu olarak idrarla atılır (Akkuş 1995). Selenyum metabolizması Şekil 5 de gösterilmiştir (Onat ve ark., 2002)



**Şekil 5.** Selenyumun metabolizması. H<sub>2</sub>Se: hidrojen selenid, CH<sub>3</sub>SeH: metil selenid, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Se: dimetil selenid, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Se<sup>+</sup>: trimetilselenonyum iyonu, GS-Se-GS: selenodiglutatyon, GS-SeH: glutatyon selenid

Selenyum, insan organizmasında bir dizi biyolojik fonksiyonda rol oynamaktadır. Biyolojik etkilerini, yapısında selenosistein aminoasidi bulunan selenoproteinler yoluyla göstermektedir. Selenosistein biyolojik pH da anyonik halde bulunur ve bu özelliği, elektron alışverişi yoluyla biyolojik redoks reaksiyonlarının

gerçekleşmesini sağlar. Selenoproteinlerin enzimatik redoks aktiviteleriyle birlikte yapısal ve transport fonksiyonları da vardır (Kane et al., 2007).

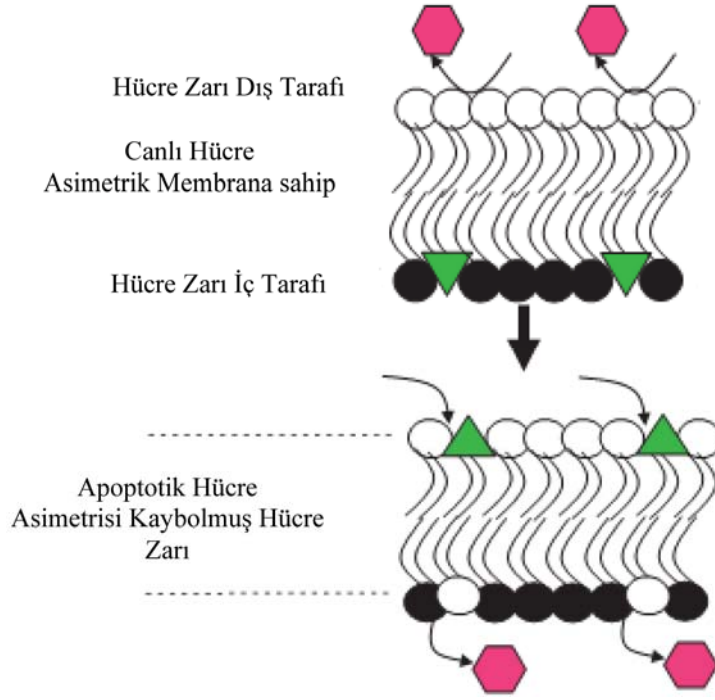
Selenyum, selenosistein halinde GSH-Px, iyodotironin deiyodinaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerinin yapısında bulunur. GSH-Px, E vitamini ile sinerjik çalışan antioksidan bir enzimdir. İndirgenmiş GSH ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve lipit hidroperoksitlerin yol açtığı oksidatif hasarı azaltmada ve önlemede rol oynar. Hücre büyümesinin ve tümör supresör protein p53'ün düzenlenmesinde etkilidir (Lipton et al., 1993). Selenyumun, eser düzeylerde normal büyüme ve gelişme için gerekli olduğu, ılımlı düzeylerde depolanabileceği ve homeostatik fonksiyonların sürdürülmesinde gerekli olduğu, yüksek düzeylerde olması halinde ise toksik etkilerle sonuçlanabileceği bildirilmiştir (Erden ve Bor 1984). Selenyum yetersizliği, selenyum içeren enzimlerin suboptimal işlevleri sonucunda azalmış antioksidan savunma, redoks regülasyonu ve enerji üretimi ile ilişkilidir (Erden 1987).

## 2.5. Apoptotik Süreç

Uzun süren internal ve eksternal kontrol ve ikinci bir kontrol safhasından sonra hücrenin kendi-kendini imha sürecine girmesine izin verilir. 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 ürünler bilayer zar ile etrafları kaplanır. Minik boyutlarda paketçikler haline dönüşen apoptotik artıklar fagositoz ve yutma yeteneğine sahip komşu hücreler tarafından toplanır ve sindirilir. Bu nedenle apoptoz diğer hücreler için zararsız bir süreç halini alır. Bu aynı zamanda daimi bir homeostazisin devam ettirilmesi için gereklidir.

Apoptoz esasen fizyolojik bir süreçtir. 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. 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.



**Şekil 6.** Apoptoza giden bir hücrenin hücre zarı modellemesi. (Biocolor, APOPercentage apoptoz kitinden)

## 2.6. Arka Kök Gangliyon Hücreleri

Arka kök gangliyonlarını meydana getiren ünipolar yada psödounipolar nöronlar, nöral krest hücrelerinden köken alırlar. Başlangıçta spinal gangliyonlardaki nöronların aksonları bipolarıdır, fakat hemen sonra her iki uzantı birleşerek T-biçimli hücrelere dönüşürler. Spinal gangliyon hücrelerinin her iki uzantısı aksonların yapısal özelliklerine sahip olmasına rağmen periferik uzantı sinyali akan kısmı olup dendrit olarak fonksiyon görmektedir. Spinal gangliyon hücrelerinin periferik uzantıları, spinal sinirler içerisinde ilerleyerek somatik ve visseral yapılarda duyu sonlanmalar yaparlar. Santral uzantıları ise, spinal sinirlerin dorsal köklerini oluşturarak medulla spinalise girer.

Anatomi ve nörolojide arka kök gangliyonu, arka kök de yerleştirilmiş ve içerisinde afferent spinal sinir hücrelerinin gövde kısımlarını içeren bir düğümçük / yumrucuktur.

Arka kök gangliyon nöronları iki önemli fonksiyonuyla belirginleşmektedir. Bunlar;

1-Uyarının iletimi,

2-Şifrelendirilmiş uyarıların merkezi sinir sistemine aktarılması.

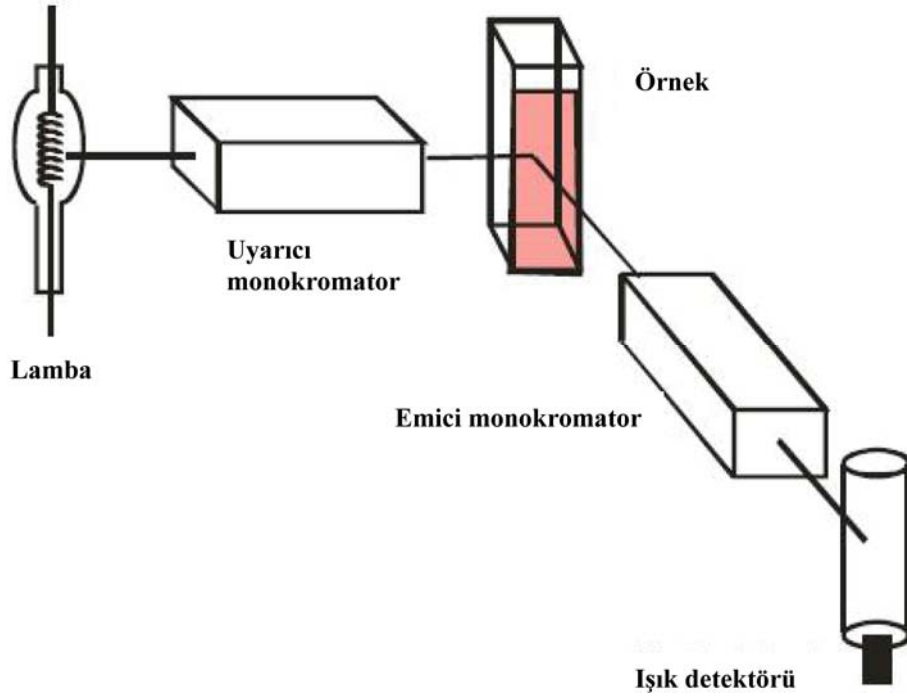
Arka kök gangliyon hücrelerinin aksonları afferent olarak bilinirler. Periferal sinir sisteminde, afferent sinirler merkezi sinir sistemi ve omuriliğe bilgi getirirler. Deri, kas ve uzuvlarımızın birleşme noktalarından veya vücudumuzun farklı noktalarından his iletimini sağlayan duyuşal nöronlar, arka kök gangliyon hücrelerinde kümelenmiştir. Bu hücreler pseudo-unipolar hücrelerdir (çatallanmış, ikiye ayrılmış akson ve merkezinden veya periferal bölgelerden dallanmalar yapmıştır).

Somatosensör iletimler sinir sistemine arka kök gangliyon hücreleri ile vücuda girmeleri nedeni ile arka kök ganglion hücreleri ayrı bir önem arz etmektedir. Her bir arka kök gangliyon nöron hücresi, morfolojik yapısı ve moleküler özelliğinden dolayı farklı tipteki uyarılara seçici özellikte cevap verirler. Arka kök gangliyon hücreleri somatik his sisteminde sensör reseptörüdürler. Hücre gövdesi bir gangliyon içerisinde omurilik siniri boyunca uzanır bir vaziyette yerleştirilmiştir. Akson iki dallanma yapar. Bunlardan bir tanesi perifere doğru diğeri merkezi sinir sistemine doğru çıkıntı yapar.

Arka kök gangliyon hücrelerinin perifere doğru yaptığı uzantılar iki çeşittir. Bunlardan bir tanesi kapsülendirilmiş olanıdır ki, bu tipteki hücreler dokunma, termal ve ağrı hislerinden sorumludur. Termal his ve ağrı hislerinden sorumlu olan arka kök gangliyon hücrelerinin aksonları hem küçük çapa sahip hem de myelin kılıfına sahip değildirler veyahut da çok ince bir myelin kılıfına sahiptirler. Bu çeşit sinir hücreleri uyarıları çok yavaş iletirler.

## 2.7. Floresan ve Floresan Yayan Maddeler

Floresan terimi kısaca; uyarılmış bir sistemden, temel haldeki bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışık demektir. Floresan soğuk cisimlerde moleküler fotonun yutulmasının daha uzun bir dalga boyunda diğer bir fotonun yayılmasını tetiklemesiyle gerçekleşen ışık verme (ışılma) olayıdır. Yutulan ve yayılan fotonlar arasındaki enerji farkı moleküler titreşimler ya da ısı olarak ortaya çıkar. Floresanın en dikkat çekici örnekleri bir cismin ışık spektrumundaki ultraviyole bölgede kalan radyasyonu emdiği zaman oluşur, bu olay görülemez, fakat yayılan ışık görülebilir alanlar arasındadır. Bu olay ilk defa 1852 yılında George Gabriel Stokes tarafından tanımlanmıştır. Floresan adını bu olayın sıklıkla gözlemlendiği, kalsiyum floridden oluşan "florid" adlı mineralden alır. Floresan ışımayı ölçebilen cihazlara florometre ya da florimetre adı verilmektedir. Floresan ışığı üretebilme yeteneğine sahip moleküller florofor olarak adlandırılırlar.

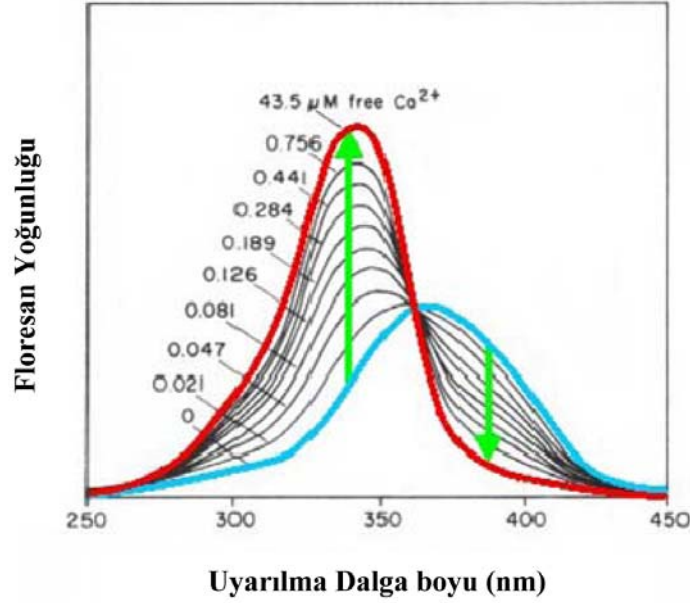


Şekil 7. Spektroflorometrenin çalışma prensibi.

Genel olarak, cisimler incelendiğinde iki temel durum karşımıza çıkar; taban durum seviyesi (düşük enerji seviyesi) ve uyarılmış enerji seviyesi (yüksek enerji seviyesi).

Tipik bir deneyde, bir örnek tarafından yayılan farklı dalga boylarındaki floresan ışığı monokromator tarafından ölçülmektedir, uyarıcı dalga boyu sabit bir değer olarak alınır. Bu olay yayılma spektrumu olarak adlandırılır.

Uyarılma spektrumu ise bunun tam tersidir, yayılan ışık sabit bir dalga boyu olarak alınır ve uyarılma ışığı monokromator ile birçok farklı dalga boyundaki ışıkla taranır.



Şekil 8. Fura-2-AM'nin floresan spektrumu.

Günümüzde yaygın kullanılan floresan boyalarına örnek olarak Fura-2-AM, Fluo-3, Fluo-4, Alexa Fluor ve fluorescein verilebilir. Bu boyaların nasıl farklı renklerde ışığı yansıtması aşağıda özetlenmiştir. Bazı moleküller ışık enerjisini emerek uyarılma yeteneğine sahiptirler, uyarılan bir molekül daha yüksek bir enerji seviyesine çıkar ve bu durum uyarılma durumu olarak adlandırılır. Temel enerji seviyesindeki bir florofor, diğer moleküllere nazaran düşük enerji durumunda, sabit bir konfigürasyona sahip ve floresan ışık yaymayan bir durumdadır. Dış kaynaklı olarak bir ışık bir florofor molekülüne çarptığı zaman, florofor molekülü ışık enerjisini emer. Eğer emilen enerji yeterli seviyede ise florofor molekülü yüksek enerji seviyesine ulaşır, bu duruma uyarılmış durum denilir. Bu olayda uyarılma olarak bilinir. Dışarıdan gelen ışığın dalga boyuna ve enerjisine bağlı olarak bir floroforun erişebileceği çok farklı uyarılmış durumu ya da enerji seviyesi vardır. Florofor molekülünün yüksek enerji düzeylerinde sabit kalmamasından dolayı,

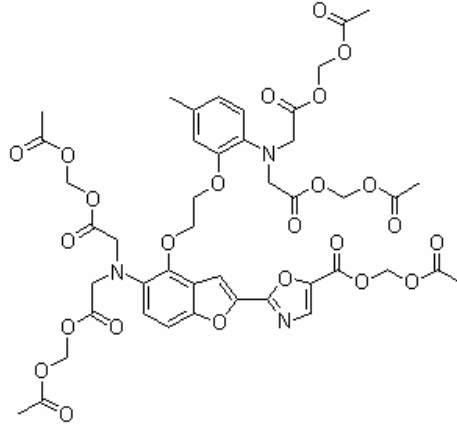
nihayetinde yarı sabit olacağı, daha düşük enerji seviyesine düşecektir. Bir floroformun uyarılmış durumda kalan süresine uyarılma ömrü denilir ve  $10^{-15}$  -  $10^{-9}$  saniye gibi çok kısa bir zaman zarfında sonlanır. Sonra, floroform molekülü yarı-sabit uyarılmış durumundan temel haline geri döner ve fazla enerji salınır ve ışık olarak yayılır. Yayılan bu ışık düşük enerji taşımaktadır ve bu yüzden emilen ışıktan daha uzun dalga boyuna sahiptir. Bu da yayılan ışığın renginin, emilen ışığın renginden farklı olduğunu ifade etmektedir.

### **2.7.1. Floresan İşleminin Döngüsü**

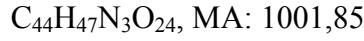
- 1-Bir floroformun ışık enerjisini emerek uyarılması,
- 2-Geçici bir yaşam sürecinde bir miktar enerji kaybetmesi,
- 3-Taban durum seviyesine geri dönmesi işlemleriyle özetlenebilir.

Bir floroform molekülü, teorik olarak, tekrarlayan şekillerde süresiz olarak floresan işlemlerine maruz kalabilir. Bu gerçekte çok kullanışlı bir olaydır, çünkü bu olay bir floroform molekülünün birçok defa sinyal üretebilmesi anlamını taşımaktadır. Görünebilir ışığın dalga boyları 400 nm ile 700 nm'dir. Kısa dalga boyuna sahip ışık dalgaları yüksek enerji ve yüksek frekansa sahiptirler. Uzun dalga boyuna sahip ışık dalgaları düşük enerji ve düşük frekansa sahiptirler. Daha öncede belirttiğimiz üzere, uyarılmış bir floroform emdiğinden daha düşük enerjiye sahip ışık yayar. Bu yüzden her zaman emilen ve yayılan ışık arasında farklılık vardır. Bir floresan boyası belirli bir aralıktaki dalga boylarındaki ışığı absorbe eder ve her bir boya kendine has karakteristik uyarılma alanına sahiptir.

### 2.7.2. Fura–2-AM'in Moleküler Yapısı



Şekil 9. Fura–2-AM'nin moleküler yapısı



Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya birliğince (IUPAC) Acetoxymethyl 2-[5-[bis[(acetoxymethoxy-oxo- methyl)methyl]amino]-4-[2-[2-[bis[(acetoxymethoxy-oxo- methyl)methyl]amino]-5-methyl-phenoxy]ethoxy]benzofuran- 2-yl]oxazole-5-carboxylate adı ile adlandırılmıştır. Yapısında 44 adet karbon, 47 adet hidrojen, üç adet azot, 24 adet oksijen bağına sahiptir. Moleküler ağırlığı 1001,85'dir.

Fura–2-acetoxymethyl ester (Fura–2-AM), hücre zarından geçebilen kalsiyum iyonuna bağlanma özelliğindeki belirleyici bir ajandır. Hücre içi kalsiyum iyon konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanılır. İçerisinde hücreler bulunan solusyona ilave edildiğinde hücre zarından geçer ve hücrel esterazlar sayesinde asetoksimetil grubundan ayrılırlar. Ayrılan asetoksimetil grubu bir pentakarboksilat olan Fura-2'yi yeniden oluşturur. 340 ve 380 nm dalga boylarında uyarılma ve 505 nm dalga boyunda yayılma yapar.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

Soğutmalı santrifüj: Kubota (Japonya)

Laminar Flow 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)

Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)

pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)

Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)

Floresan spektrofotometre:(Cary Eclipse, Varian Firması, Avustralya)

CO<sub>2</sub> inkubator: (Heal Force, Smart Cell, Japonya)

Olympus Stereo Mikroskop SZ61: (Japonya)

##### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tris, Merck (Almanya)

Sodium Chloride, Merck (Almanya)

Fetal Bovine Serum, Merck (Almanya)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Solusyonu

EDTA, Merck (Almanya)

EGTA, Merck (Almanya)

Triton X-100, Sigma (Almanya)

Metanol, Merck (Almanya)

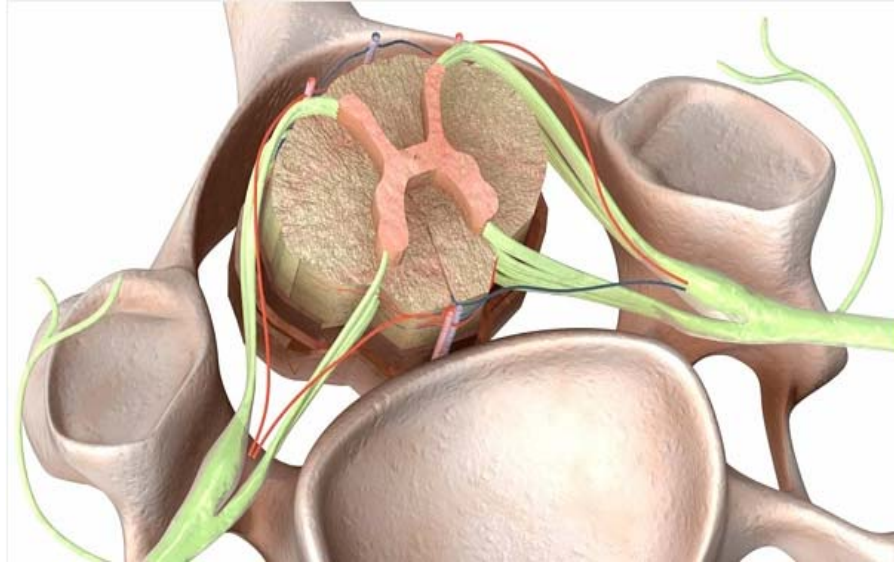
Hydrochloric Acid, Merck (Almanya)  
Colleganase-Type4 4188/47M9961, 100 mg, Worthington (ABD)  
Bakır Sülfat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), Merck (Almanya)  
Folin-Ciocalteu's Phenol, Merck (Almanya)  
Potassium Tartarat, Merck (Almanya)  
Sodium Carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Merck (Almanya)  
Fura-2-AM, Invitrogen (ABD)  
DMSO ( Dimethyl sulphoxide) Hybri-Max, Sigma (Almanya)  
CHPO (Cumene hydroperoxide), Merck (Almanya)  
5,5'-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid) (DTNB), Sigma (Almanya)  
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Biochrom (Almanya)  
Sodyum hidroksit (NaOH), Riedel-de Hæn (Almanya)  
TCA (trichloroaceticacid), Merck (Almanya)  
APOPercentage Apoptoz Kiti, Biocolor (İngiltere)  
Sodyum Selenit, Sigma( Almanya)  
Hidrojen Peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Sigma (Almanya)

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Sıçan Arka Kök Gangliyon (DRG) Hücreleri İzolasyonu



**Resim 1.** Laboratuvarımızda izole edilen AKG hücrelerinin stereomikroskop görüntüsü.



**Resim 2.** AKG hücrelerinin anatomik görüntüsü

### 3.2.1.1. Arka Kök Gangliyon (AKG) Hücrelerinin İzolasyonu

AKG Hücreleri 2-3 haftalık ratların inhalasyon anestezisi işleminden sonra dekapitasyon işlemini takiben hiç vakit kaybedilmeden sırt omurları bir bütün halinde çıkarıldı. Sırt omurları kas dokusundan olabildiğince ayrıldı ve ventral olarak özel olarak silikon maddesi ile kaplanmış yerine hareket etmeyecek şekilde yerleştirildi. Hücrelerin canlılığını kaybetmemesi için bir miktar DMEM medyumunu (%89 Dulbecco's Modified Eagle Medium, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin antibiyotik kombinasyonu) konuldu. Bu işlemden sonra omurlar median hatlarının üzerinden olacak şekilde eşit iki parçaya ayrılmaya çalışıldı. Spinal kord ve üzerindeki zar stereo mikroskop altında özenle yerleştirildiği alandan dış kısma alındı, bu sırada spinal kord ile sinir gruplarının bağlantısı koparılmamaya özen gösterildi. Her iki vertebra arasına özenle yerleştirilmiş olan hücre yumakları ince uçlu pensler vasıtasıyla yerlerinden alınarak içerisinde antibiyotikli medyum bulunan steril petri kaplarına konuldu. Tüm hücre yumakları alındıktan sonra içerisinde antibiyotikli medyum bulunan petri kutusu stereo mikroskop altına alınarak hücre yumaklarının gangliyon uzantılarından ayrıldı ve bir saat süresince inkübatörde (37 °C ve %5 CO<sub>2</sub>) kollejenazlı solüsyon (% 2,5) içerisinde bekletildi. Bir saat sonrasında mekanik parçalama işlemine geçildi ve sırası ile ilk önce 1 ml hacimli (farklı genişliklerdeki uçlarla) pipet uçları ile daha sonra 200 µl hacimli pipet uçları ile ve en sonunda da steril insülin iğnelerinden geçirilerek mekanik parçalanma işlemi tamamlandı. Bu işlemler tamamlandıktan sonra hücreler medyumlarından ayrılmak üzere santrifüj işlemine tabi tutuldu ve sonrasında Na<sup>+</sup> / HEPES tamponu ile homojen hale getirilerek floresan boyar maddesi Fura-2-AM maddesi ilave edilerek bir saat süresince 37 °C de çalkalamalı su banyosuna konuldu.

**1. Grup (Kontrol Grubu):** Arka kök gangliyon hücreleri önceden hazırlanmış DMEM hücre kültürü ortamında inkübe edildiler ve medyuma hiçbir şey ilave edilmedi.

**2. Grup (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Grubu):** Arka kök gangliyon hücreleri 1 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 2 saat boyunca DMEM hücre kültürü (37 °C ve %5 CO<sub>2</sub>) ortamında inkübe edildiler.

**3. Grup (ADPR Grubu):** Önceden hazırlanmış DMEM hücre kültürü ortamında inkübe edilen arka kök ganglion hücreleri spektroflorete cihazındaki haznesine yerleştirildikten bir dakika sonra **0,8 mM** ADPR ile uyarıldılar (Pantaler and Lückhoff 2009).

**4. Grup (Selenyum Grubu):** Önceden hazırlanmış DMEM hücre kültürü ortamında selenyumun terapötik dozu olarak bulduğumuz 200 nM ile 30 saat boyunca inkübe edildiler. Selenyumun hücre dışından içerisine geçişi 24 saatten sonra tamamlandığından 30 saat tercih edilmiştir (Whanger 2001).

**5. Grup (Selenyum+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Grubu):** Daha önceden hazırlanmış DMEM hücre kültürü ortamında Selenyumun terapötik dozu olarak bulduğumuz 200 nM ile 30 saat boyunca inkübe edilen hücrelere 30 saat sonrasında 1 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 2 saat inkübe edildiler.

**6. Grup (Selenyum+ADPR Grubu):** Daha önceden hazırlanmış DMEM hücre kültürü ortamında Selenyumun terapötik dozu olarak bulduğumuz 200 nM ile 30 saat boyunca inkübe edilen hücreler kalsiyum sinyali için spektroflorete cihazındaki haznesine yerleştirildikten sonra **0,8 mM** ADPR ile uyarıldılar (Pantaler and Lückhoff 2009).

### **3.2.2. Hücre Canlılığı (MTT Analizi)**

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, Ying et al., 2000). Reaksiyon ürünü uygun karışımda çözüldükten sonra spektrofotometrik yöntemle ölçülür (Bank et al., 1991). Hücrelerin MTT 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).

### **3.2.3. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü**

#### **3.2.3.1. İndirgenmiş Glutatyon (GSH) ve Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizleri**

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

1- %10 trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu

2- Tris tamponu (0,4M pH:8,9): 48,46 gram tris-hydroxymethyl-aminomethan'ın son hacim bir litre olacak şekilde çözündürülür ve pH hidroklorik asit (HCl) ile pH: 8,9 olacak şekilde ayarlanır.

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

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk (Lawrence and Burk 1976) tarafından bildirilen yöntemle göre spektrofotometre ile belirlendi.

Kullanılan Solüsyonlar:

1- Tris (1) HCl tampon solüsyonu (50 mM) pH:7,6

2- GSH solüsyonu

3- CHPO (cumene-hydroperoxide) solüsyonu

4- %10 TCA solüsyonu

5- Tris (2) tampon 0,4 M pH: 8,9

## 6- DTNB solüsyonu

**Tablo 2.** GSH-Px aktivitesinin tayin edilmesi deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar.

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

Oda ısısında 5 dakika beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

### 3.2.4. Hücre İçi Ca<sup>+2</sup> Salınışının Ölçülmesi

Hücre içi Ca<sup>+2</sup> salınış miktarının ölçümü için arka kök gangliyon hücreleri 37 °C de 45 dakika boyunca 4µM Fura-2-AM floresan boyası ile boyandı (Bejarano and Terron 2007). Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücreler manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2x10<sup>6</sup> olacak şekilde Na<sup>+</sup>-HEPES [(mM cinsinden) NaCl, 140; KCl, 4,7; CaCl<sub>2</sub>, 1,2; MgCl<sub>2</sub>, 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<sup>+2</sup> iyon düzeyi değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile daha önceki makalemizde (Uğuz ve ark. 2009) belirtildiği şekilde kaydedildi ve Grynkiewicz ve ark. metoduna göre hesaplandı (Grynkiewicz et al., 1985).

### 3.2.5. Lipit Peroksidasyon Analizi

AKG hücrelerinde lipit peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve arkadaşlarının (Placer et al., 1966) bildirdikleri yöntemle göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) yapıldı.

Deneyin yapılışı: Tüm AKG hücre grupları 1/9 (2.25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör, 20 dakika süresince 100 °C'lik su banyosunda tutuldu. Daha sonra çeşme suyu altında soğutuldu. 2500 devirde 5 dk santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1cm ışık geçişine sahip küvette 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise yine aynı oranlarda hazırlanmış 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı. Değerler mikromol/gram protein olarak belirlendi. Sonuçlar nanomol/ gram protein olarak verildi.

### 3.2.6. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi

Her bir ependorf tüpü içerisinde  $10^6$  hücre olacak şekilde hücreler konuldu. Her bir ependorfa 15 mikrolitre MTT kimyasalı ilave edildi. MTT kimyasalı ilavesinden sonra bütün ependorflar 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 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: x) (Uğuz ve ark., 2009).

### 3.2.7. Protein Tayini

Çalışmamızda yapılan protein tayini deneyleri tüm örneklerde Lowry ve arkadaşlarının (Lowry et al., 1951) tanımladığı yöntemle göre yapıldı.



### **3.2.8. Etik Kurul İzni**

Çalışma protokolü Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul (HADYEK) tarafından 07.07.2009 tarihinde uygun bulunmuştur (Protokol No: 16-02).

### **3.2.9. İstatistiksel Analiz**

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

## 4. BULGULAR

### 1. Arka Kök gangliyon hücrelerinde Lipit Peroksidasyonu Düzeyleri

Lipit peroksidasyon sonuçları Grafik 1 ve Tablo 3’de gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, lipit peroksidasyon düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p<0.001) ve ADPR (p<0.05) gruplarında önemli düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte 200 nM selenyum inkübasyonu lipit peroksidasyon düzeylerini azalttığı gözlenmiştir. Diğer bir ifadeyle, lipit peroksidasyon düzeyleri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna kıyasla selenyum ve selenyum+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gruplarında (p<0.001) önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, lipit peroksidasyon düzeyleri ADPR grubuna kıyasla, ADPR+Se grubunda önemli düzeyde (p<0.001) azaldığı gözlenmiştir.

**Tablo 3.** AKG hücrelerinde lipit peroksidasyon (LP), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeyleri üzerinde hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ADP-riboz (ADPR) ve selenyum (Se) etkileri. (n=8, ortalama değer±standart sapma).

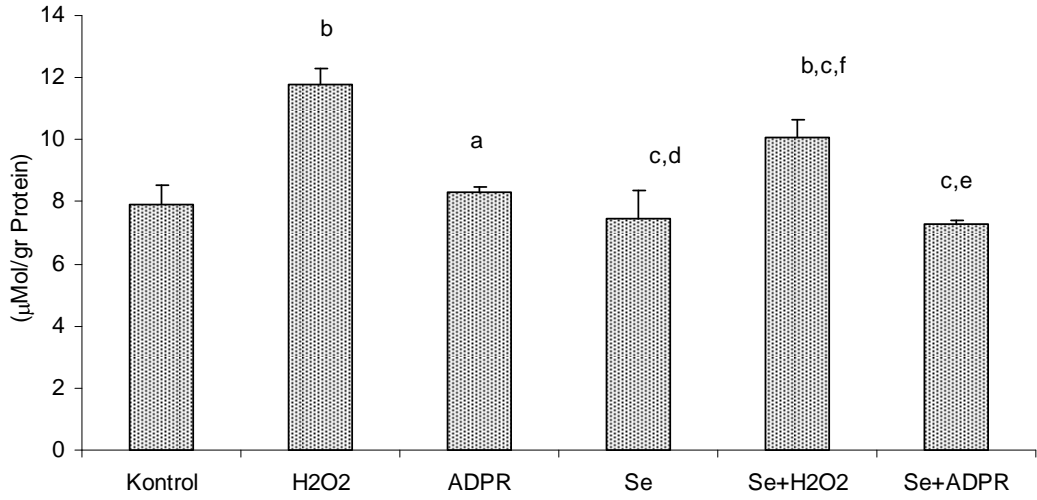
Değerler	LP (µMol/gr protein)	GSH (µMol /gr protein)	GSH-Px (IU/gr protein)
Kontrol	7.91 ± 0.63	15.50 ± 0.76	3.54 ± 0.36
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	11.76 ± 0.54 <sup>b</sup>	9.37 ± 0.31 <sup>b</sup>	1.48 ± 0.15 <sup>b</sup>
ADPR	8.33 ± 0.17 <sup>a</sup>	17.30 ± 0.58 <sup>a,c</sup>	3.10 ± 0.16 <sup>a,c</sup>
Se	7.45 ± 0.94 <sup>c,d</sup>	13.70 ± 0.27 <sup>a,c,e</sup>	3.91 ± 0.26 <sup>a,c</sup>
Se+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10.09 ± 0.57 <sup>b,c,f</sup>	10.70 ± 0.38 <sup>b,c,f</sup>	2.20 ± 0.20 <sup>b,c,f</sup>
Se+ADPR	7.27 ± 0.14 <sup>c,e</sup>	15.60 ± 1.39 <sup>b,c,f</sup>	2.32 ± 0.23 <sup>b,c,f</sup>

<sup>a</sup>p<0.05 ve <sup>b</sup>p<0.001 kontrol grubuna kıyasla.

<sup>c</sup>p<0.001 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna kıyasla.

<sup>d</sup>p<0.05 ve <sup>e</sup>p<0.001 ADPR grubuna kıyasla.

<sup>f</sup>p<0.001 Se grubuna kıyasla.



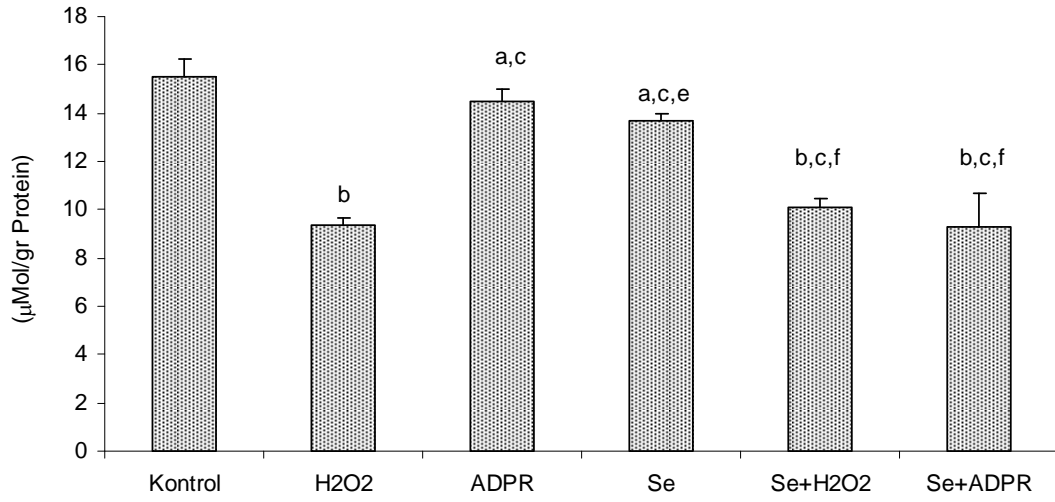
<sup>a</sup>p<0.05 ve <sup>b</sup>p<0.001 kontrol grubuna kıyasla.  
<sup>c</sup>p<0.001 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna kıyasla.  
<sup>d</sup>p<0.05 ve <sup>e</sup>p<0.001 ADPR grubuna kıyasla.  
<sup>f</sup>p<0.001 Se grubuna kıyasla.

**Grafik 1.** Arka kök gangliyon hücre gruplarında lipit peroksidasyon düzeyleri (Ortalama±Standart sapma ve n=8).

## 2. Arka Kök gangliyon hücrelerinde GSH ve GSH-Px Aktivitesi Düzeyleri

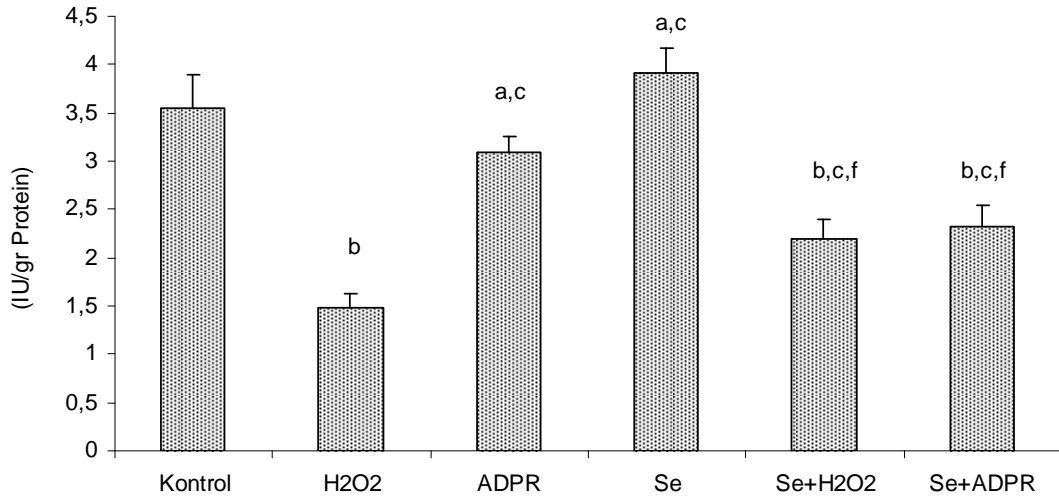
GSH ve GSH-Px aktivitesi değerlerinin sonuçları Tablo 3, Grafik 2 ve 3'de gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, GSH düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p<0.001) azaldığı ve ADPR (p<0.05) grubunda ise önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir. GSH düzeylerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna kıyasla selenyum ve selenyum+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gruplarında (p<0.001) önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, GSH düzeyleri ADPR (p<0.001) ve selenyum (p<0.001) gruplarına kıyasla, ADPR+Se grubunda önemli düzeyde azaldığı gözlenmiştir.

GSH-Px aktivitelerinin kontrol grubuna kıyasla, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p<0.001) ve ADPR (p<0.05) gruplarında önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir. GSH-Px aktivitelerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna kıyasla selenyum ve selenyum+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gruplarında (p<0.001) önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, GSH-Px aktivitelerinin ADPR grubuna ve selenyum kıyasla, ADPR+Se grubunda önemli düzeyde (p<0.001) azaldığı gözlenmiştir.



<sup>a</sup>p<0.05 ve <sup>b</sup>p<0.001 kontrol grubuna kıyasla.  
<sup>c</sup>p<0.001 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna kıyasla.  
<sup>d</sup>p<0.05 ve <sup>e</sup>p<0.001 ADPR grubuna kıyasla.  
<sup>f</sup>p<0.001 Se grubuna kıyasla.

**Grafik 2.** Arka kök gangliyon hücre gruplarında GSH düzeyleri (Ortalama±Standart sapma ve n=8).

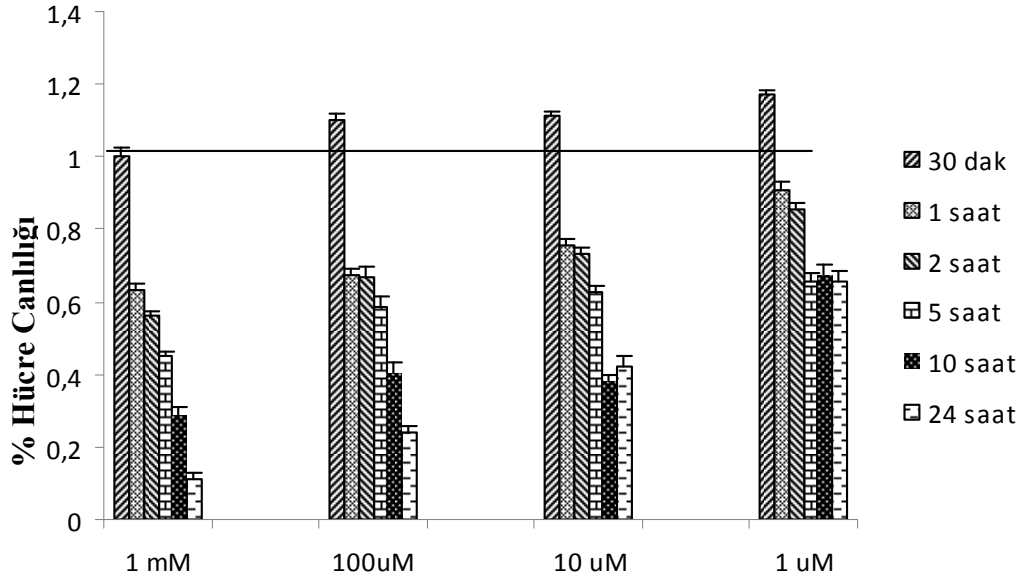


<sup>a</sup>p<0.05 ve <sup>b</sup>p<0.001 Kontrol grubuna kıyasla  
<sup>c</sup>p<0.001 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna kıyasla  
<sup>d</sup>p<0.05 ve <sup>e</sup>p<0.001 ADPR grubuna kıyasla  
<sup>f</sup>p<0.001 Se grubuna kıyasla

**Grafik 3.** Arka kök gangliyon hücre gruplarında GSH-Px aktivitesi düzeyleri (Ortalama±Standart sapma ve n=8).

#### 4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin Hücre Canlılığı Üzerine Toksik Dozunun Belirlenmesi

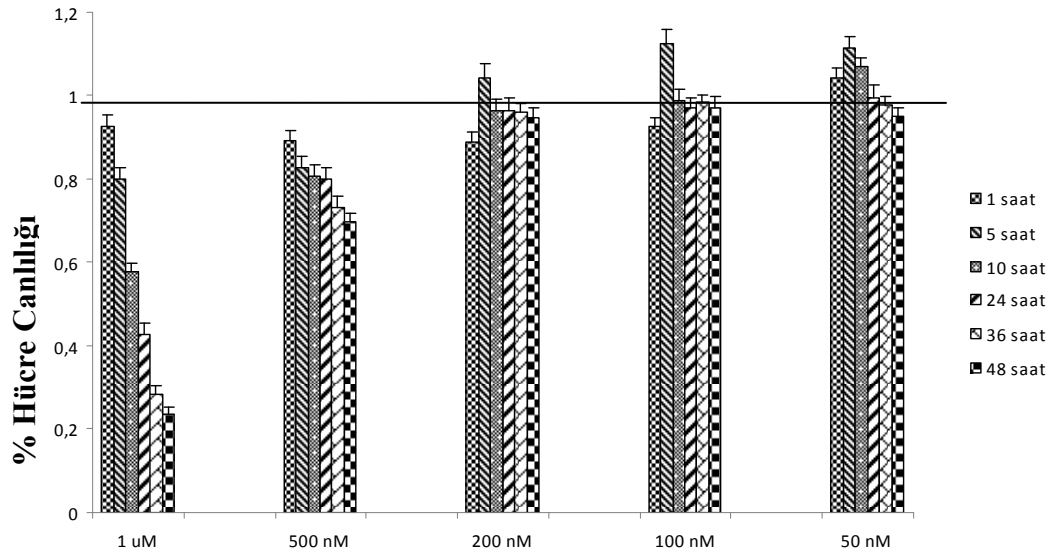
Arka kök gangliyon hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hücre canlılığı üzerine etkisi Grafik 4'te gösterilmiştir. Hücreler artan konsantrasyonlarda (1 µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 6 farklı zamanda (30 dakika, 1, 2, 5, 10, 24 saat) inkübe edildi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin tolere edilebilir toksik etkisinin 1 µM dozda ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübasyonundan 2 saat sonra başladığı tespit edildi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin toksik dozu AKG hücre kültür ortamında 1 µM'da 2 saat olarak belirlendi.



**Grafik 4.** AKG hücrelerinde oksidatif stresin temsilcisi hidrojen peroksitin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tolere edilebilir toksik dozunun ve süresinin belirlenmesi.

#### 5. Selenyum'un Hücre Canlılığı Üzerine Terapötik ve Toksik Dozunun Tayin Edilmesi

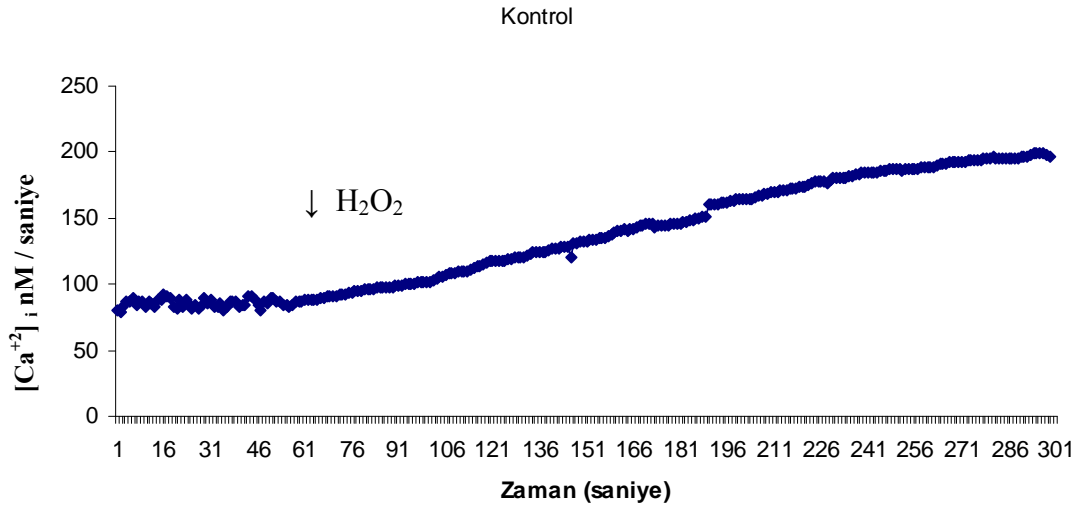
Arka kök gangliyon hücrelerinde Se'nin hücre canlılığı üzerine etkisi Grafik 5'te gösterilmiştir. AKG hücreleri, 5 farklı dozda (50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1 µM) selenyum ile 6 farklı zamanda (1, 5, 10, 24, 36, 48 ve 72 saat) inkübe edilerek selenyumun terapötik ve toksik dozu belirlendi. Selenyumun yüksek tedavi edici dozunu 200 nM da 30 saat olarak belirlendi.



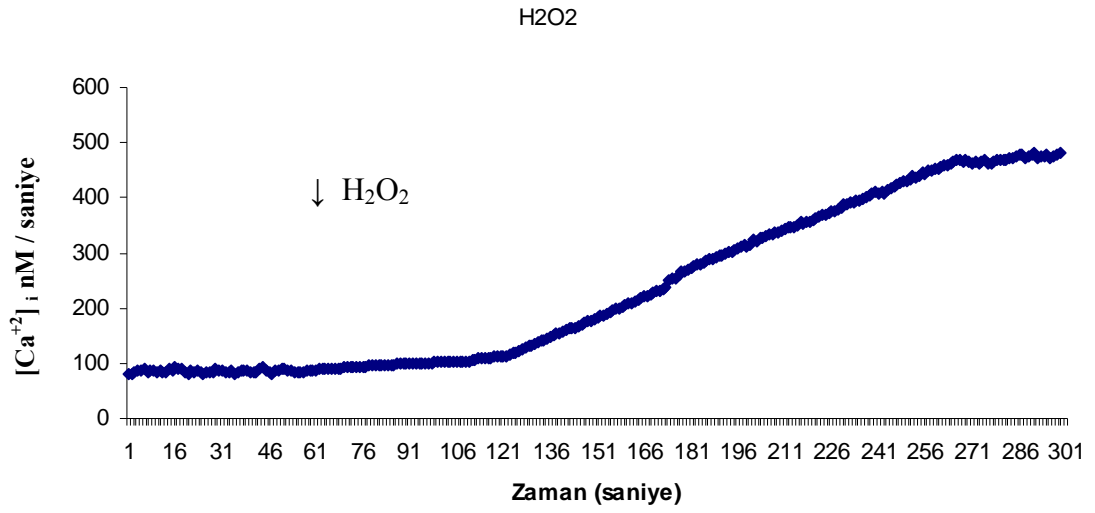
**Grafik 5.** AKG hücrelerinde selenyum (Se)'un hücre canlılığı üzerine terapötik etkisinin belirlenmesi. (n=8, ortalama değer±standart sapma).

## 6. Arka Kök Gangliyon Hücrelerinde Kalsiyum İyonu $[Ca^{+2}]_i$ Salınımı Düzeyleri

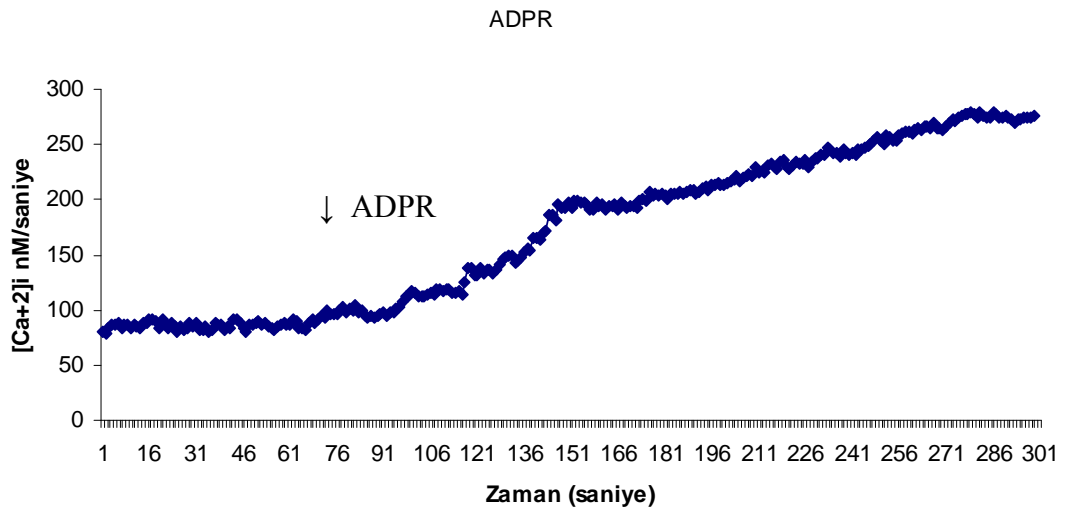
Sitozole  $[Ca^{+2}]_i$  salınımının zaman akım grafikleri gruplara spesifik ve ayrıca tüm gruplar birlikte olarak aşağıda gösterildi.



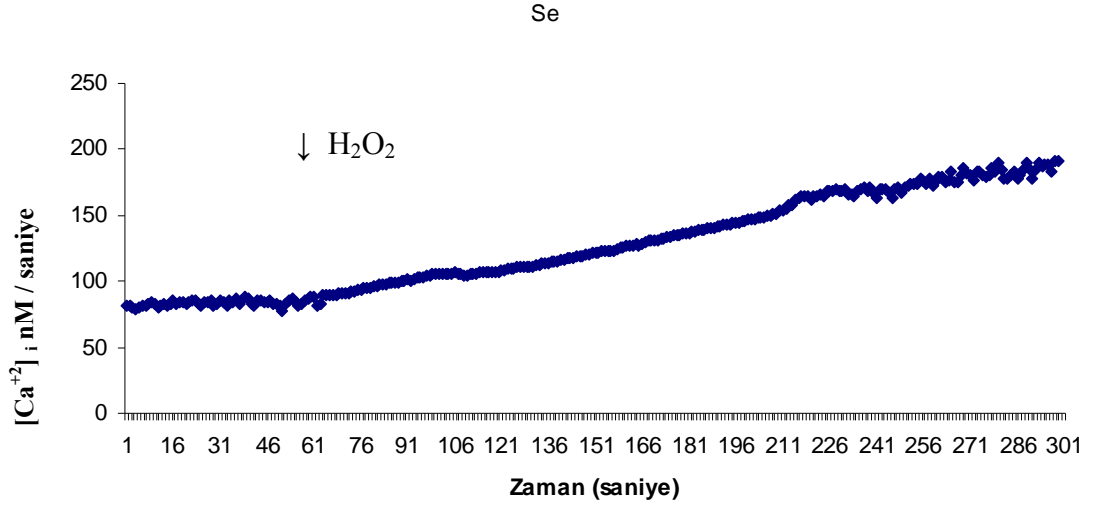
**Grafik 6.** Kontrol grubunda sitozole  $Ca^{+2}$  salınımının zaman akım grafiği.



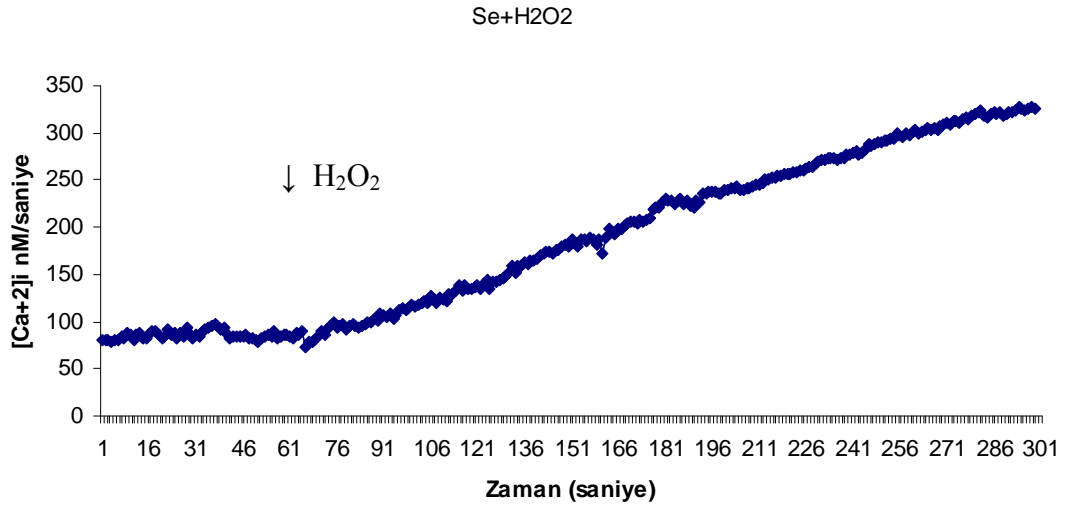
**Grafik 7.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda sitozole Ca<sup>+2</sup> salınışının zaman akım grafiği.



**Grafik 8.** ADPR grubunda sitozole Ca<sup>+2</sup> salınışının zaman akım grafiği.

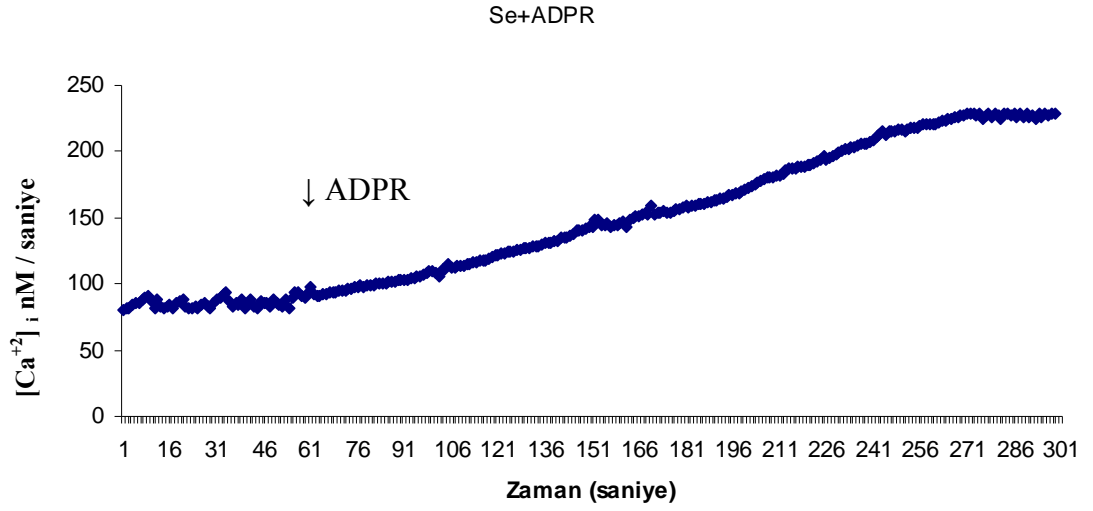


**Grafik 9.** Selenyum grubunda sitozole Ca<sup>+2</sup> salınışının zaman akım grafiği.

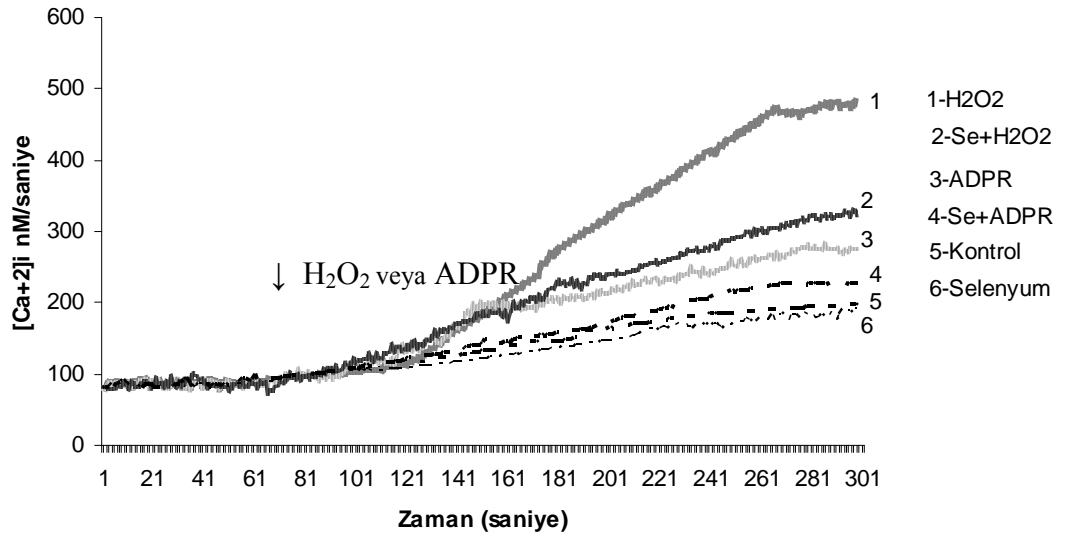


**Grafik 10.** Selenyum + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda sitozole Ca<sup>+2</sup> salınışının zaman akım grafiği.

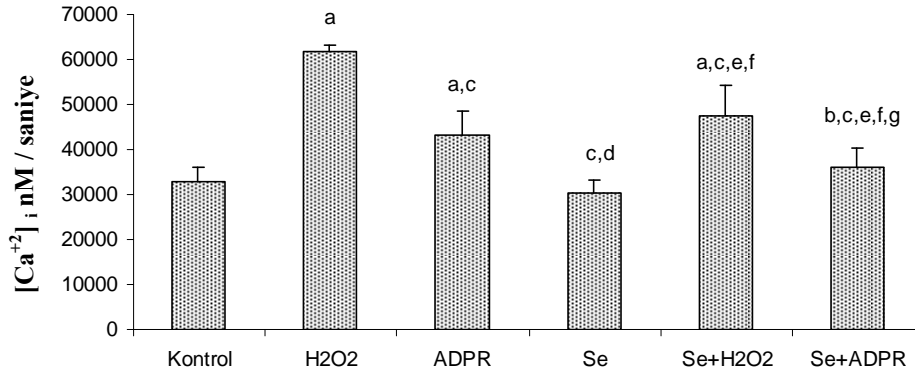




**Grafik 11.** Selenyum + ADPR grubunda sitozole Ca<sup>+2</sup> salınışının zaman akım grafiği.



**Grafik 12.** Arka kök gangliyon hücrelerinin tüm gruplarındaki sitozole Ca<sup>+2</sup> salınışının zaman akım grafiği



- <sup>a</sup> p<0.001 ve <sup>b</sup> p<0.05 Kontrol grubuna kıyasla  
<sup>c</sup> p<0.001 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna kıyasla  
<sup>d</sup> p<0.01 ve <sup>e</sup> p<0.05 ADPR grubuna kıyasla  
<sup>f</sup> p<0.001 Selenyum grubuna kıyasla  
<sup>g</sup> p<0.001 Se+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna kıyasla

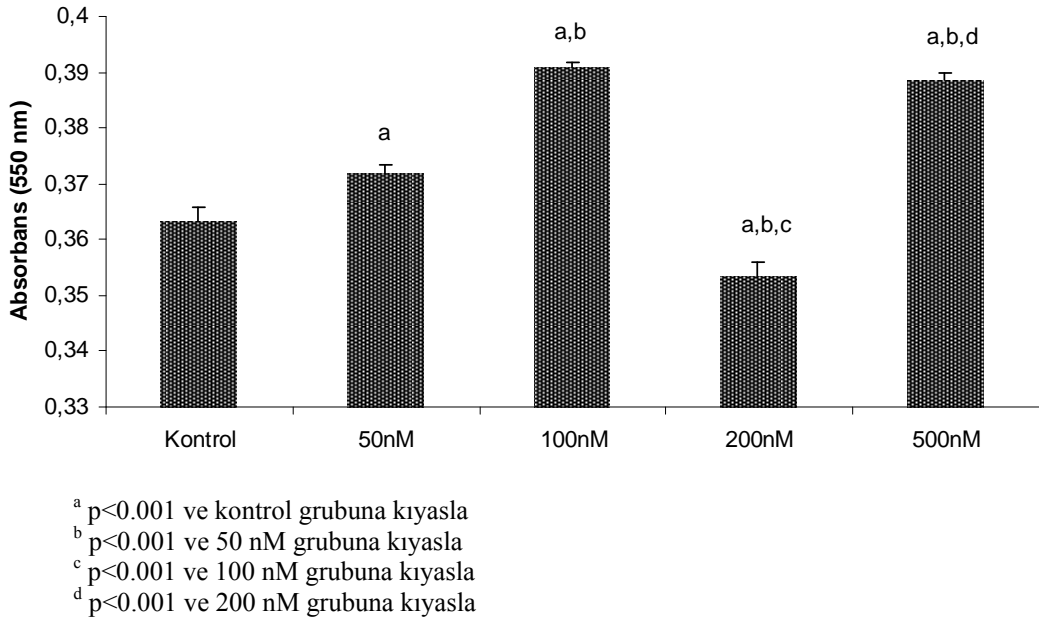
**Grafik 13.** Arka kök gangliyon hücrelerinin tüm gruplarındaki sitozole Ca<sup>2+</sup> salınımının zaman akım grafiğinin altında kalan alanlara göre değerlendirilmesi.

AKG hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve ADPR'nin neden olduğu sitozole [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> salınımı üzerindeki etkileri Grafik 13 de gösterilmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda, kontrol, ADPR, selenyum, Se+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve Se+ADPR gruplarına göre sitozole [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> akışı salınımı belirgin düzeyde yüksek saptandı. ADPR ile uyarılan AKG hücrelerindeki [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> salınımı kontrol grubuna kıyasla daha fazla olduğu ancak selenyum ile 30 saat boyunca inkübe edilen hücrelerin ADPR grubuna kıyasla [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> salınımının daha düşük olduğu belirlendi. Selenyum ile 30 saat inkübe edilen AKG hücrelerinde ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nin neden olduğu [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> salınımının önemli düzeyde azaldığı saptandı.

## 7. Apoptotik Sürecin Değerlendirilmesi

Arka kök gangliyon hücreleri dört farklı dozda (50nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM) Selenyum ile 30 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra MTT testi ile arka kök gangliyon hücrelerinde toksik doz olarak belirlediğimiz 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 30 dakika maruz bıraktık ve APOPercentage apoptoz kiti (Biocolor, Belfast, UK) prosedürüne göre elde ettiğimiz süpernatantı spektrofotometre cihazında 550 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar grupların absorbans değerlerine göre grafik olarak ifade edildi. Kitin çalışma prensibini kısaca özetlemek gerekirse, sadece apoptoz sürecine giden hücreler tarafından oluşturulacak olan renk değişimi prensibine dayanmaktadır. Apoptotik süreci başlamamış hücrelerin hücre zarından boya geçemez, apoptotik süreci başlamış, diğer bir ifade ile hücre zarı asimetrisi

bozulmuş hücrelerin zarından boya rahatlıkla geçebilmektedir. Böylece kit içerisindeki boya apoptoz süreci başlatılan hücre grubunun bireylerinin sitoplazmaları içerisinde birikir ve biriken bu boya yine kitin içerisinde hazır olan boya salar madde ile inkübasyon ortamına geçmesi sağlandı. Hücrelere ilk önce apoptotik ajan ilave edildi. Daha sonra kitin içerisinde bulunan özel boya ile boyanırlar, yeterli inkübasyon sürecinden sonra yine kitin içerisinde bulunan boya salıcı madde ilavesinden sonra hücreler yıkandı, taze mediumları ile homojenize edildi ve süpernatant spektrofotometre cihazında 550 nm değerinde okundu.



**Grafik 14.** Arka kök gangliyon hücrelerinin gruplara göre apoptotik düzeylerinin değerlendirilmesi.

Apoptozis test sonuçları Grafik 14’de gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, absorban düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla, 50 nM selenyum (p<0.001), 100 nM selenyum (p<0.001), ve 500nM selenyum (p<0.001) gruplarında istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu ancak 200 nM selenyum (p<0.001) grubunun ise önemli düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir. Diğer bir ifadeyle, apoptozis sürecinde absorban düzeyleri 200 nM selenyumunda diğer tüm gruplara kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde (p<0.001) azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar yaptığımız MTT testi sonuçları ile de uyuşmakta ve selenyum için arka kök gangliyon hücrelerinde apoptozise karşı koruyucu etkisinin 200 nM olarak uygulanması sonucu elde edilmektedir.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, AKG hücrelerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve ADPR vererek oluşturduğumuz oksidatif stres modelinde, selenyumun lipit peroksidasyon, GSH, GSH-Px, sitozole Ca<sup>+2</sup> salınımı ve hücre canlılığı üzerine etkilerini araştırmak, alınan sonuçlarla da selenyumun AKG hücrelerindeki etki mekanizmasının aydınlatılarak, selenyumun farklı dozlarda verilmesinin fayda veya zararlarının araştırılması amaçlandı. Çalışmamız, selenyumun oksidatif stres üzerindeki etkilerini AKG hücre ortamında değerlendiren ilk çalışmadır. Tez çalışmamızda selenyum ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamaları hücre canlılığı testi olan MTT yöntemi sonucunda bulunan doz ve sürelerde yapıldı.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, serbest radikallerin endojen kaynağıdır ve hücresele düzeyde oksidatif strese neden olur (Knight 2000). GSH-Px enziminin yapısına ko-faktör olarak selenyum girmektedir. GSH-Px enziminin sentezlenmesinde GSH substrat olarak kullanılmaktadır (Nazıroğlu 2009b). Şayet serbest radikal üretimi ile doğru orantılı GSH-Px enzim tüketimi artarsa, GSH düzeyleri de azalmaktadır. Selenyum verilen deney hayvanlarında ve insanlarda GSH ve GSH-Px aktivitesi düzeylerinin arttığı gözlenmiştir (Whanger 2001, Uğuz ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verilen grupta; kontrol, Se ve Se+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gruplarıyla karşılaştırıldığında, lipit peroksidasyon ürünüde anlamlı artma, GSH düzeyinde anlamlı artış belirlendi. Yine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe edilen grupta, Se ve Se+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gruplarıyla karşılaştırıldığında, GSH-Px aktivitesi düzeyinde anlamlı artış belirlendi. Oksidatif stres sonuçları, daha önce AKG hücreleri dışındaki diğer hücrelerde yapılan çalışmalarla uyumlu olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin, endojen antioksidan savunma sisteminin koruma kapasitesine zarar vererek oksidatif stresi arttırdığını (Uğuz ve ark., 2009, Nazıroğlu 2009b) ve oluşan reaktif oksijen türlerinin hücre zarı ve lipoproteinlerindeki çoklu yağ asitleri ile etkileşime girip, lipit peroksidasyon sürecini başlattığını gösterdi (Seifried et al., 2007). Oluşan oksidatif strese bağlı aşırı serbest radikal üretimi başta voltaja duyarlı kalsiyum kanalları olmak üzere birçok kanalı uyarak sitozole kalsiyum akışını daha da uyarmaktadır (Chakraborti et al., 1999). Bunun sonucunda, mitokondrinin daha fazla depolarize olması sonucu serbest radikallerin üretimi daha da artmaktadır. Bu olay apoptozise kadar gitmektedir (Crompton 2004). Çalışmamızda, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verilen grupta, sitozole kalsiyum iyonu [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> salınımı kontrol, Se ve Se+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gruplarına

göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu durum, yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin apoptozis yollarını tetiklediğini ve bu apoptotik yollarda selenyumun antioksidan rolüyle koruyucu rol oynadığını düşündürdü (Koistinaho et al., 1990, Yuan et al., 2005, Yuan et al., 2006). Benzer şekilde, Koistinaho ve ark. (1990) AKG hücrelerinin selenyum ile inkübe edilmesiyle lipit peroksidasyon azaltılması ile yaşlanmayı durdurmada katkısının olabileceğini rapor etmişlerdir.

Hücrede oksidatif stresin neden olduğu DNA hasarı sonucu 3 değişik yolla ADPR sentezlendiği bilinmektedir (Nazıroğlu, 2007b). ADPR, TRPM2 kanallarını açarak sitozole Ca<sup>+2</sup> akışını artırmakta ve mitokondrinin depolarizasyon artışı ve mitokondrial porların açılması ile serbest radikaller daha çok üretilmekte (Perraud et al., 2001), ADPR sentezi artmakta, TRPM2 katyon kanalları daha da açılmaktadır (Nazıroğlu, 2010). Bu olaylar hücreleri apoptozise kadar götürmektedir. Bu tez çalışmasında ADPR ve TRPM2 kanal aktivasyonu mekanizmalarına katkıda bulunmak amacı ile AKG nöronal hücreleri ADPR ile uyarıldılar. Kontrol grubuna kıyasla ADPR grubunda lipit peroksidasyon düzeylerinin arttığı, GSH-Px aktivitesi düzeylerinin azaldığı gözlemlendi. Bu sonuçlarımız ADPR ile aktive edilen TRPM2 kanallarını ve oksidatif stres artışı sonuçlarını desteklemektedir (Hara et al., 2002a, Hara et al., 2002b, Wehage et al., 2002). ADPR grubuna kıyasla Se+ADPR grubunda lipit peroksidasyon düzeyleri önemli düzeyde azaldığı gözlenirken, GSH ve GSH-Px aktivitesi düzeyleri daha da azalmıştır. Bu sonuçlarımız AKG hücrelerinde selenyumun antioksidan özelliği ile serbest radikallerinin üretimini azalttığı fakat TRPM2 kanal inhibisyonları üzerinde etkisi olmadığı sonucunu doğurmuştur. Bu sonucumuz grubumuzun yakın zamanda yaptığı çalışma (Nazıroğlu ve ark., 2010a) patch-clamp sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

Duyusal nöronların bozukluklarına bağlı hastalıklarda altta yatan patofizyolojik mekanizmalar halen tam olarak bilinmemektedir (Vincent et al., 2010). Aşırı serbest radikal üretimi ve oksidatif stresin duyusal nöronlardan AKG nöronal hücre patofizyolojisinde rol oynayabileceğini gösteren artan sayıda kanıt vardır (Fischer and Glass 2010, Vincent et al., 2010). Yapılan in vivo çalışmalarla serbest radikallerin eksitotoksikite oluşumuna direkt olarak katıldığı gösterilmiş ve serbest radikallerin eksitotoksik mekanizmalarına katıldığı nörolojik hastalıklarda antioksidanların faydalı olabileceği belirtilmiştir (Nazıroğlu 2010).

Mitokondrial disfonksiyon ve oksidatif stres AKG deki nöropatinin hem nedeni hem de sonucudur (Vincent et al., 2009). Selenyum ise disfonksiyonların düzeltilmesinde önemli rol oynamaktadır. Vincent ve arkadaşları (2010), oksidatif stresin diyabetik AKG nöron ve aksonlarında mitokondriyal anormallikler ve mitokondriyal yayılmalarda önemli rolünün olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada PC12 nöronal hücrelerinde değişik selenyum bileşiklerinin apoptotik yolları baskıladığı bildirilmiştir. AKG hücreleri ve oksidatif stres üzerine yapılan çalışmalarda tutarsızlıklar mevcuttur. Bu tutarsızlığın nedeni kullanılan metotların farklılığı ve beyin dokusunda antioksidan enzim aktivitelerinin diğer organlara göre düşük olması nedeniyle oksidatif strese olan yanıtın net olarak gösterilememesi olabilir.

Bilindiği gibi nöron hücrelerinin [örneğin primer duyu nöronları ve arka kök gangliyon (AKG) hücreleri] patofizyolojileri, başta ağrı oluşumu mekanizmaları olmak üzere birçok patofizyolojik konuda büyük öneme sahiptir. Hücre içerisinde  $Ca^{+2}$  iyonunun aşırı artışı hücreleri ya çalışamaz hale getirmekte veya ölüme kadar götürmektedir. Bu yollardaki meydana gelen patofizyolojik olaylarda  $Ca^{+2}$  sinyali ve oksidatif stresin önemini iyi bilinmesine rağmen AKG hücrelerinde selenyumun koruyucu rolü ve patofizyolojik mekanizmaları halen bilinmemektedir.

Selenyum, insan organizmasında bir dizi biyolojik fonksiyonda rol oynayan bir eser elementtir. Önemli fonksiyonlarından biri antioksidan özelliğidir. Sinir sistemi fonksiyonlarının devamında selenyumun önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Selenyum, hücre içi sinyal mekanizmasında da önemli rol almaktadır (McKenzie et al., 2002). Örneğin GSH-Px enziminin yapısında ko-faktör olarak görev alır. Selenyumun antioksidan özelliği, kullanılan hücre ve bu hücre tipine has tayin edilmiş doz miktarı ile belirlenbilir. Doz aşımı durumlarında selenyum ciddi bir toksik ajandır (Ganther 1999). Selenyum ve bileşikleri genel olarak düşük dozlarda antioksidan özelliğini göstermektedir (McKenzie et al., 2002, Uğuz ve ark., 2009). Yapılan bir çalışmada PC12 nöronal hücrelerde değişik selenyum bileşiklerinin apoptotik yolları baskıladığı bildirilmiştir. Nazıroğlu ve arkadaşları (2009a) yaptıkları çalışmada pentilentetrazol ile oluşturulan epileptik ratlarda beyin mikrozomal GSH-Px ve plazma zarı  $Ca^{+2}$ -ATPaz (PMCA) aktivitelerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulmuşlar ve selenyum verilmesi ile bu enzim

düzeylerinin arttığını gözlemlemişlerdir. Fizyolojik seviyelerde sodyum selenitin nöronal hücre kültüründe eksitotoksik hücre hasarına karşı koruyucu olduğu ve hatta primer hasarı azalttığı gösterilmiştir (Savaşkan ve ark., 2002).

Nöropatik ağrı ve diyabetik polinöropati olarak adlandırılan ve periferal sinir sistemindeki en yaygın bozukluk olarak bilinen bu rahatsızlıklar, artmış bir şekilde bulunan hücre zarı  $Ca^{+2}$  kanal anormallikleri ve fonksiyonları ile ilişkilendirilmiştir (Fernyhough and Calcutt 2010). Hücre zarında bulunan kanallardaki fonksiyon bozuklukları da hücre içerisindeki  $Ca^{+2}$  seviyelerinin hızlı değişimi ve sonucunda da hücrenin uyarılabilme sıklığının değişimini doğurmaktadır (Gover et al., 2009). Primer eferent nöronların uçlarında ve sinir hücrelerinin gövdelerinde bulunan T tipi  $Ca^{+2}$  kanallarının aktivitelerinin farklı kimyasal ajanlarla azaltılmasının birçok sinir hücresi hasarında oluşan nöropatik ağrının azaltılmasında etkin olduğu bildirilmiştir (Flatters and Bennett 2004). Hücre içerisine giren  $Ca^{+2}$ , içerisinde glutamat gibi nörotransmitter maddeler bulunan depoların içerisindeki bu moleküllerin sinapslara boşaltılmasına neden olur. Ağrının şiddetinin azaltılmasında  $Ca^{+2}$  'un hücre içerisine giriş yollarını bloke etmekte günümüzde ciddi olarak hedeflenen bir yaklaşım olmuştur (Schroeder et al., 1991). Schroeder ve arkadaşları opiatların presinaptik uçlardaki  $Ca^{+2}$ ,un hücre içerisine girişini G proteini aracılığı bloke ederek ağrı algısının azaldığını bildirmişlerdir.  $Ca^{+2}$  homeostazisinde anormallikler hücre içerisindeki  $Ca^{+2}$  miktarının artmasına neden olmakta ve bu anormal artış da uyarılabilir hücrelerde anormal ağrının hissedilmesine neden olmaktadır (Fernyhough and Calcutt 2010). HIV' de oluşan nöropatik ağrının tedavisinde kullanılan antiretroviral ajanlar periferal veya merkezi sinir uçlarına bu ajanların ulaştırılabilmesi ile artmış  $[Ca^{+2}]_i$  seviyesini azaltmada kullanılması hedeflenmektedir (Joseph et al., 2004) . Tezimin hedeflerinden bir tanesi de  $[Ca^{+2}]_i$  seviyeleri ile oksidatif stres deneyleri sonucu elde edilen bulguları harmanlamak ve ağrının oluşum mekanizmasında temel rol alan AKG hücrelerinde bu verileri apoptotik deneylerle kontrol etmektir. Oksidatif stresle inkübe edilen ve daha sonrasında tekrar oksidatif stres ile uyarılan AKG hücrelerinde hücre içi depolardan sitozole salınan  $Ca^{+2}$  miktarı ve bunun sonucunda oksidatif stres göstergesi olan lipid peroksidasyonu düzeyleri artmıştır. Fakat antioksidan bir element olan selenyumun ilavesi hem oksidatif stres ve hem de bunun sonucunda oluşabilecek apoptotik

yolağın tetiklenmesi sürecini azaltmıştır. Elde ettiğimiz verileri destekleyen bir başka araştırmada da selenoprotein N (SelN)'nin iskelet kası hücrelerinde oksidatif stresi ve  $Ca^{+2}$  homeostazisini düzenlenmesinde önemli rol aldığını gözlemlemiştir (Arbogast et al., 2009). Başka bir çalışmada, SelN maddesinden yoksun insan iskelet istirahat halindeki kas hücrelerinde artmış seviyede  $[Ca^{+2}]_i$  konsantrasyonu belirlenmiştir (Moghadaszadeh et al., 2007). Selenyum bileşiği olan SelN miktarı açısından yetersiz kalan hücrelerin  $H_2O_2$  ile tetiklenmiş oksidatif stres modellerinde, bariz bir şekilde apoptoza sürüklendiği başka bir çalışmada belirlenmiştir (Arbogast et al., 2009). Bu çalışmalarda selenyum ve bileşiklerinin  $[Ca^{+2}]_i$  düzeylerinin düzenlenmesindeki önemini ve bulgularımızı desteklemektedir (Arbogast et al., 2009). Bu bulgulara ilaveten RyRs reseptörünün nitrozilasyonunun kısıtlanması ile de SelN elementinin sarkoplazmik retikulumdan sitozole fazla miktarda  $Ca^{+2}$  salınımının önleneyeceği bildirilmiştir. SelN'nin eksikliğinde  $Ca^{+2}$  sızıntısının arttığı ve bunun da oksidatif stresi arttığı belirlenmiştir (Klee and Means 2002).

Çalışmamızın sonucunda; Se+ $H_2O_2$  verilen grupta,  $H_2O_2$  verilen gruba göre lipid peroksidasyon düzeyi anlamlı düzeyde düşük, GSH ve GSH-Px aktivitesi düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Yine Se+ $H_2O_2$  grubunda  $H_2O_2$  grubuna göre, sitozole  $[Ca^{+2}]_i$  salınımı belirgin düzeyde düşük bulundu. Çalışmamıza göre selenyumun sitozole  $[Ca^{+2}]_i$  salınımını azaltıcı etkisi, apoptozise karşı koruyucu etkisinin olduğunu destekleyebilir. Bu bulgulara göre selenyumun; AKG hücrelerine bağlı nöronal hastalıkların patofizyolojisinde suçlanan serbest radikal artışını ve  $Ca^{+2}$  artışını düzenleyerek tedavide faydalı olabilir. Nöronal hücrelerde, oksidatif stresin indüklediği moleküler yolda selenyumun rolü Şekil 2'de gösterilmiştir (Nazıroğlu 2009a).

Sağlıklı hücreler daimi olarak düşük düzeylerde ROT üretmekte ve bu ürünler birçok farklı sistem ile tamponlanmaktadır. ROT ile tamponlama sistemi arasındaki dengenin bozulması genetik hasar, yaşlanma, birçok çeşit hastalık ve hücre ölümünün kaynaklarından birisi olarak bilinen oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (Arbogast and Ferreira 2010). Oksidatif stres ve ROT üretiminin artışı birçok nöronal hastalığın etiolojisinde rol oynamaktadır (Halliwell 2006). Bu hastalıklar arasında şok, serobrovasküler bozukluklar, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları sayılabilir. Selenyumun ROT'un neden olduğu hücre içi tahribatı



önlemede önemli rolü var olduğu gibi hücre büyümesi, yaşamı, sitotoksitenin önlenilmesi, genetik faktörlerin ve enzimlerin düzenlenmesi yollarında da önemli rollere sahiptir (Lee et al., 1998). Thioredoksin reduktaz ve thioredoksin birlikte bir redoks sistemi oluştururlar ve gen transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi, DNA sentezi için gerekli olan deksoribonükleotidlerin sentezlenmesinin ayarlanmasında önemli rollere sahiptirler. Selenyum mitokondride protein thiol gruplarında değişikliklere neden olarak sitokrom C serbestlenmesini ve bunun sonucunda da mitokondriyal zar potansiyelinin kaybolmasına neden olarak serbest radikal üretimini baskırlar. Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada PC12 nöronal hücrelerde değişik selenyum bileşiklerinin apoptotik yolları baskıladığı bildirilmiştir. (Nishina ve et al., 2008). Diğer bir çalışmada (Yeo and Kang 2007) travmatik beyin zedelenmesinde selenyumun apoptotik yolları bloke ederek fayda sağladığı bildirilmiştir. Yeo et al. (2007) yaptıkları bir çalışmada spinal kord zedelenmesinde selenyumun koruyucu rolünün apoptotik yolları önleyerek gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir. Bu tez çalışmasında oksidatif stresin neden olduğu apoptozisi önlemede ve hücre canlılığını devam ettirmede 30'ar saat ve 50, 100, 200 ve 500 nM selenyumun koruyucu etkileri araştırıldı. Apoptotik hücre ölümü ve hücre canlılığı test sonuçlarında 200 nM selenyumun 50, 100 ve 500 nM selenyum inkubasyonlarına önemli düzeyde koruyucu etkisinin olduğu gözlemlendi. Bizim bilgilerimize göre, AKG hücrelerinde selenyum inkübasyonu ile apoptotik düzeyinin araştırıldığı çalışma henüz mevcut değildir. Bu sonucumuz, diğer nöronal hücrelerde selenyumun koruyucu rolünün araştırıldığı çalışma sonuçlarıncada doğrulandı (Yeo and Kang, 2007, Jee et al., 2008). AKG hücrelerinin maruz kaldığı ve hücre canlılığı testi ile bulduğumuz 1 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dozunun da diğer makaleler ile örtüştüğü ve 1 µM dozun toksik etki oluşturduğu bilgisi desteklenmektedir.

Sonuç olarak, AKG hücrelerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vererek oluşturduğumuz oksidatif stres modelinde, selenyumun oksidatif stresten koruyucu etkilerinin olduğu, hücre apoptozisini baskıladığı, sitozolde Ca<sup>+2</sup> salınışını düzenlediği bulundu. Ayrıca, ADPR'nin neden olduğu oksidatif stres ve hücre içi Ca<sup>+2</sup> serbestlenişi bozukluklarını da selenyumun düzelttiği gözlemlendi. Çalışmamız, selenyumun nöroprotektif etkisini desteklemektedir. Antioksidan olan selenyumun AKG nöronal hücrelerine bağlı hastalıkların tedavisinde faydalı olabileceği gözlemlenmiştir. Ağrının

moleküler ve hücresel mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Temelinde oksidatif stres, hiperglisemi ve genetik nedenlerden kaynaklanan ve yeteri kadar desteklenemeyen nörotrofik faktörler yer almaktadır (Ferryhough et al., 1999). Bu etkinliğin duysal nöron bozukluğuna bağlı ağrı ve nöronal hastalıkların tedavisinde insanlarda yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

## ÖZET

### Oksidatif Stresle Uyarılan Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinde Kalsiyum Sinyali ve Apoptotik Hücre Ölümü Üzerinde Selenyumun Etkisinin Araştırılması

AKG nöronları nöropatik ağrı ve diyabetik polinöropati olarak adlandırılan ve periferel sinir sistemindeki en yaygın bozukluklarda önemli role sahiptir.  $Ca^{+2}$  hücre içi ikincil haberci sisteminin önemli bir parçası olup fizyolojik birçok fonksiyonun yerine getirilmesinde önemli bir rol üstlenmektedir.  $[Ca^{+2}]_i$  miktarındaki artış, apoptozis ve serbest radikal düzeylerini de artırmaktadır. Fakat bu konu AKG hücrelerinde yeterince bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı, selenyumun AKG hücrelerinde, lipid peroksidasyonu, GSH, GSH-Px aktivitesi, sitozolik  $Ca^{+2}$  salınımı, hücre canlılığı ve apoptozis üzerine etkilerini incelemektir.

AKG hücreleri kontrol,  $H_2O_2$ , ADPR, Se, Se+ $H_2O_2$ , Se+ADPR olmak üzere altı gruba ayrıldı.  $H_2O_2$  toksik ve selenyumun terapötik dozlarının ve bu dozların süreleri hücre canlılığını değerlendirmede kullanılan MTT analizine göre belirlendi. Hücreler 1  $\mu M$   $H_2O_2$  ile 2 saat ve 200 nM selenyum ile 30 saat inkübe edildi. Ardından hücreler  $[Ca^{+2}]_i$  salınımının değerlendirilmesi için spektrofotometre cihazına götürüldüklerinde (gruplarına göre) 100  $\mu M$   $H_2O_2$  veya 0.8 mM ADPR ile uyarıldılar.

Lipid peroksidasyon düzeyi; kontrol, Se, Se+ADPR, Se+ $H_2O_2$ , gruplarında  $H_2O_2$  grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı ( $p < 0,001$ ). GSH-Px aktivitesi; Se ve Se+ADPR gruplarında  $H_2O_2$  grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ( $p < 0,01$ ). GSH seviyesi; kontrol, Se, ADPR, Se+ $H_2O_2$ , Se+ADPR gruplarında  $H_2O_2$  grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ( $p < 0,05$ ). Sitolik  $Ca^{+2}$  salınımı,  $H_2O_2$  grubunda kontrol, Se, Se+ $H_2O_2$ , Se+ADPR gruplarına göre anlamlı olarak yüksek saptandı ( $p < 0,001$ ). Sitolik  $Ca^{+2}$  salınımı, Se+ $H_2O_2$  grubunda kontrol, Se ve Se+ADPR gruplarına göre anlamlı olarak yüksek saptandı ( $p < 0,05$ ).

Sonuç olarak, bu çalışma 200 nM selenyumun AKG hücrelerinde oksidatif stres,  $[Ca^{+2}]_i$  salınımı ve apoptozis üzerine koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:**  $[Ca^{+2}]_i$  salınımı, selenyum, oksidatif stres, arka kök gangliyon hücreleri

## ABSTRACT

### **Investigation of Effects of Selenium on $\text{Ca}^{2+}$ Signaling and Apoptotic Cell Death in Oxidative Stress-Induced Dorsal Root Ganglion Neurons**

DRG sensory neurons have a key role in peripheral nerve diseases such as neuropathic pain and diabetic neuropathy.  $\text{Ca}^{2+}$  is well known for its role as crucial second messenger in modulating many cellular physiological functions,  $\text{Ca}^{2+}$  overload is detrimental to cellular function and may present as an important cause of cellular ROS generation and apoptosis. But this topic has not been well known in DRG sensory neurons.

The unbalanced cellular mechanism between ROS production and antioxidant system is called as oxidative stress. The aim of this study is to investigate the effects of selenium on lipid peroxidation, GSH, GSH-Px activity, cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  release, cell viability and apoptosis in DRG neurons.

DRG cells were divided into six groups namely control,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ADPR, Se, Se+ $\text{H}_2\text{O}_2$ , Se+ADPR. The doses and times of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , selenium were determined by MTT assay which is used to evaluate cell viability. Cells were incubated with 1  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 2 hours and 200 nM Se for 30 hours. Then, cells were stimulated with 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  or 0.8 mM ADPR (depending on their groups) for evaluating the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  release.

Lipid peroxidation levels were significantly lower in the control, Se, ADPR, Se+ $\text{H}_2\text{O}_2$ , Se+ADPR groups than in the  $\text{H}_2\text{O}_2$  group ( $p < 0,001$ ). GSH-Px activities were significantly higher in the Se and ADPR groups than in the  $\text{H}_2\text{O}_2$  group ( $p < 0,01$ ). GSH levels were significantly higher in the control, Se, ADPR, Se+ $\text{H}_2\text{O}_2$ , Se+ADPR groups than in the  $\text{H}_2\text{O}_2$  group ( $p < 0,05$ ). Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  release was significantly higher in the  $\text{H}_2\text{O}_2$  group than in the control, Se, ADPR, Se+ $\text{H}_2\text{O}_2$ , Se+ADPR groups ( $p < 0,001$ ). Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  release was significantly lower in the Se+ $\text{H}_2\text{O}_2$  group than in the  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $p < 0,05$ ).

In conclusion, the present study demonstrates that 200 nM selenium induced protective effects on oxidative stress,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  release and apoptosis in DRG cells.

**Keywords:**  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  release, selenium, oxidative stress, dorsal root ganglion neurons

## 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; 38:325-9.
- Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. baskı, Konya: Mimoza yayımları, 1995:1-132.
- Arbogast S, Beuvin M, Fraysse B, Zhou H, Muntoni F, Ferreiro A. Oxidative stress in SEPN1-related myopathy: from pathophysiology to treatment. *Ann Neurol*. 2009 Jun;65(6):677-86.
- Arbogast S, Ferreiro A. Selenoproteins and protection against oxidative stress: selenoprotein N as a novel player at the crossroads of redox signaling and calcium homeostasis. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Apr 1;12(7):893-904.
- Bank U, Reinhold D, Ansorge S. Measurement of cellular activity with the MTT test. Optimization of the method. *Allerg. Immunol. (Leipz)* 1991; 37:119-23.
- Bejarano I, Terrón MP. Hydrogen peroxide increases the phagocytic function of human neutrophils by calcium mobilisation. *Mol Cell Biochem*. 2007; 296(1-2):77-84.
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium--a life and death signal. *Nature*. 1998 Oct 15;395(6703):645-8.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul;4(7):517-29. Review.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. (2000a) Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science*. Mar 3;287(5458):1604-5.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. (2000b) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Oct;1(1):11-21. Review.
- Berridge MJ. Capacitative calcium entry. *Biochem J*. 1995 Nov 15;312 ( Pt 1):1-11. Review.
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 1993 Jan 28;361(6410):315-25. Review.
- Betto R, Teresi A, Turcato F, Salviati G, Sabbadini RA, Krown K, Glembotski CC, Kindman LA, Dettbarn C, Pereon Y, Yasui K, Palade PT. Sphingosylphosphocholine modulates the ryanodine receptor/calcium-release channel of cardiac sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochem J*. 1997 Feb 15;322(Pt 1):327-33.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 2003;91:179-94.
- Boitano S, Dirksen ER, Sanderson MJ. Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science*. 1992 Oct 9;258(5080):292-5.

Bootman MD, Berridge MJ, Roderick HL. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol*. 2002 Aug 20;12(16):R563-5.

Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P. Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol*. 2001 Feb;12(1):3-10. Review.

Boulay G, Brown DM, Qin N, Jiang M, Dietrich A, Zhu MX, Chen Z, Birnbaumer M, Mikoshiba K, Birnbaumer L. Modulation of Ca(2+) entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca<sup>2+</sup> entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 21;96(26):14955-60.

Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Nov;291(5):C1082-8.

Çete S, Arslan F, Yaşar A. Aloe Vera ve Nerium Olfander'in Bazı Mikroorganizmalara Karşı Antiyomikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması ve bu Bitkilerin Siklosporinli Karaciğer Dokusundaki Ksantin Oksidaz Enzim Aktivitesine Etkilerinin İncelenmesi. *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*. 2005; 18(3):375-80.

Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S, Chakraborti S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal* 1999-11:77-85.

Clapham DE. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003; 426: 517-524.

Crompton M. Mitochondria and aging: a role for the permeability transition? *Aging Cell* 2004-3:3-6.

Cullen PJ. Bridging the GAP in inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate signalling. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Dec 8;1436(1-2):35-47. Review.

Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15(4):316-28.

Derin D, Yazıcı A, Erkoç Ş. Şizofrenik Bozukluğu Olan Hastalarda Serbest Radikal Metabolizması ve Nonenzimatik Antioksidan Savunma Sistemi Elemanlarının İncelenmesi. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 2001;11:174-82.

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

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

Erden M. Changes of hexose monophosphate pathway and methemoglobin reductase enzyme activity after radiation guinea pigs. *Comp Biochem Physiol*. 1987; 86:629-633.

Fernyhough P, Calcutt NA. Abnormal calcium homeostasis in peripheral neuropathies. *Cell Calcium*. 2010 Feb;47(2):130-9. Epub 2009 Dec 24.

Fernyhough P, Gallagher A, Averill SA, Priestley JV, Hounsom L, Patel J, Tomlinson DR. Aberrant neurofilament phosphorylation in sensory neurons of rats with diabetic neuropathy. *Diabetes*. 1999 Apr;48(4):881-9.

Fischer LR, Glass JD. Oxidative stress induced by loss of Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1) or superoxide-generating herbicides causes axonal degeneration in mouse DRG cultures. *Acta Neuropathol*. 2010 Feb;119(2):249-59.

Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain*. 2004 May;109(1-2):150-61.

Ganther HE. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*. 1999 Sep;20(9):1657-66.

Gover TD, Moreira TH, Weinreich D. Role of calcium in regulating primary sensory neuronal excitability. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(194):563-87.

Greenwald RA. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. *Free Radic Biol Med* 1990;8(2):201-9.

Grynkiewicz C, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260:3440-50.

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;41:1819-28.

Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006; 97:1634–1658.

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 (1999) Free radicals, other reactive species and disease. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) *Free radicals in biology and medicine*, 3rd Ed. Oxford University Press, New York, pp 639–645.

Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, et al. (2002a). LTRPC2 Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 9: 163-73.

Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y. 2002. LTRPC2 Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 9: 163-73.

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.

Hoffer A, Osmond H, Smythies J. Schizophrenia: a new approach. *J Ment Sci* 1954; 100: 29-35.

Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 1988;240(4852):640-2.

Irmak MK, Koltuksuz U, Kutlu NO, et al. The effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in comparison with tocopherol in rat kidneys. *Urol Res* 2001; 29: 190-3.

Joseph EK, Chen X, Khasar SG, Levine JD. Novel mechanism of enhanced nociception in a model of AIDS therapy-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *Pain.* 2004 Jan;107(1-2):147-58.

Juránek 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.

Kane J, Canas F, Kramer M, Ford L, Gassmann-Mayer C, Lim P, et al. Treatment of schizophrenia with paliperidone extended-release tablets: a 6-week placebo-controlled trial. *Schizophr. Res.* 2007; 90, 147–61.

Katz B, Minke B. Drosophila photoreceptors and signaling mechanisms. *Front Cell Neurosci.* 2009;3:2. Epub 2009 Jun 11.

Klee CB, Means AR. Keeping up with calcium: conference on calcium-binding proteins and calcium function in health and disease. *EMBO Rep.* 2002 Sep;3(9):823-7.

Kleinová M, Hewitt M, Brezová V, Madden JC, Cronin MT, Valko M. Antioxidant properties of carotenoids: QSAR prediction of their redox potentials. *Gen Physiol Biophys* 2007;26(2):97-103.

Klouche K, Morena M, Canaud B, Descomps B, Beraud JJ, Cristol JP. Mechanism of in vitro heme-induced LDL oxidation: effects of antioxidants. *Eur J Clin Invest* 2004;34(9):619-25.

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

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

Koistinaho J, Alho H, Hervonen A. Effect of vitamin E and selenium supplement on the aging peripheral neurons of the male Sprague-Dawley rat. *Mech Ageing Dev.* 1990 Jan;51(1):63-72.



- Kovacic P, Somanathan R Unifying mechanism for eye toxicity: electron transfer, reactive oxygen species, antioxidant benefits, cell signaling and cell membranes. *Cell Membr Free Radic Res* 2008;256–69.
- Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71(4):952-8.
- Lee HC. A unified mechanism of enzymatic synthesis of two calcium messengers: cyclic ADP-ribose and NAADP. *Biol Chem*. 1999 Jul-Aug;380(7-8):785-93. Review.
- Lee HC. Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol Rev*. 1997 Oct;77(4):1133-64. Review. AND Lee HC. Calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. A decade of exploration. *Cell Biochem Biophys*. 1998;28(1):1-17. Review.
- Leusen JH, Verhoeven AJ, Roos D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the phox family. *Front Biosci* 1996;1:72-90.
- 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.
- Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox Rep* 2002;7(1):55-7.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, et al. A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*. 1993; 364:626-32.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
- Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res* 2001;34(4):325-36.
- Mason RP, Stolze K, Flitter WD. Free radical reactions with DNA and its nucleotides. *Basic Life Sci* 1990;52:119-25.
- McKenzie RC, Arthur JR, Beckett GJ. Selenium and the regulation of cell signaling, growth, and survival: molecular and mechanistic aspects. *Antioxid Redox Signal*. 2002 Apr;4(2):339-51.
- Melkersson KI. Prolactin elevation of the antipsychotic risperidone is predominantly related to its 9-hydroxy metabolite. *Hum Psychopharmacol* 2006; 21:529–32.
- Minke B. TRP channels and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cell Calcium*. 2006 Sep;40(3):261-75. Epub 2006 Jun 27. Review.
- Moghadaszadeh B, Aracena-Parks P, Ronan M, Gasmi H, Agrawal PB, Hamilton S and Beggs A SEPNI-related myopathy: a defect in redox regulation. In 12<sup>th</sup> International Congress of the World Muscle Society, Giardini Naxos-Taormina, Italy, 17-20 October 2007. *Neuromusc Disord* 17:899.

- Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibáñez I, Albillos A, García AG, García-Sancho J, Alvarez J. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol.* 2000 Feb;2(2):57-61.
- Morrow JD, Chen Y, Brame CJ, Yang J, Sanchez SC, Xu J, Zacker WE 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; 65:55-63.
- Naziroğlu M, Kutluhan S, Uğuz AC, Celik O, Bal R, Butterworth PJ. Topiramate and vitamin e modulate the electroencephalographic records, brain microsomal and blood antioxidant redox system in pentylentetrazol-induced seizure of rats. *J Membr Biol.* 2009a Jun;229(3):131-40.
- Naziroğlu M, Kucukayaz M, Celik O, Sozbir E, Ozgul C. Effects of selenium on TRPM2 cation channels activated by hydrogen peroxide and ADP-ribose. *Cell Memb Free Rad Res.* 2010a Jun:19.
- Naziroğlu M, Lückhoff A. 2008. Effects of antioxidants on calcium influx through TRPM2 channels in transfected cells activated by hydrogen peroxide. *J Neurological Sci* 270:152-158.
- Naziroğlu M. 2007a. Molecular Mechanisms of Vitamin E on Intracellular Signaling Pathways in Brain. In *Reactive Oxygen Species and Diseases*. 1st Ed.; Laszlo Goth, Research Signpost Press: Kerala, India. pp 239-256.
- Naziroglu M. 2007b. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res* 32:1990-2001.
- Naziroğlu M. Role of Selenium on Calcium Signaling and Oxidative Stress-induced Molecular Pathways in Epilepsy. *Neurochem Res.* 2009b Jun 10.
- Naziroğlu M. TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochem Res* 2010b [Epub ahead of print].
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. 2007. Transient Receptor Potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87:165–217.
- Nishina A, Sekiguchi A, He Y, Koketsu M, Furukawa S. Ebselen, a redox regulator containing a selenium atom, induces neurofilament M expression in cultured rat pheochromocytoma PC12 cells via activation of mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci Res.* 2008 Feb 15;86(3):720-5.
- Pantaler E, Lückhoff A. Inhibitors of TRP channels reveal stimulus dependent differential activation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx pathways in human neutrophil granulocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2009 Dec;380(6):497-507.
- Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(7):775-806.

Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM. (2001). ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 411: 595-599.

Peskin AV. Cu, Zn-superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: a review. *Biosci Rep* 1997;17(1):85-9.

Petersen OH, Petersen CC, Kasai H. Calcium and hormone action. *Annu Rev Physiol.* 1994;56:297-319. Review.

Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation(malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem.* 1966 Aug;16(2):359-64.

Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 2000;57:925-35.

Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development.* 2002 Aug;129(15):3533-44.

Savaskan NE, Bräuer AU, Kühbacher M, Eyüpoglu IY, Kyriakopoulos A, Ninnemann O, Behne D, Nitsch R. Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity. *FASEB J.* 2003 Jan;17(1):112-4. Epub 2002 Nov 1.

Schroeder JE, Fischbach PS, Zheng D, McCleskey EW. Activation of mu opioid receptors inhibits transient high- and low-threshold Ca<sup>2+</sup> currents, but spares a sustained current. *Neuron.* 1991 Jan;6(1):13-20.

Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25(1):192-205.

Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 2007;18(9):567-79.

Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report. *J Nutr* 2004;134(11):3143-63.

Sharpe MA, Robb SJ, Clark JB. Nitric oxide and Fenton/Haber-Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations. *J Neurochem* 2003;87(2):386-94.

Shcharbin D, Pedziwiatr E, Blasiak J, Bryszewska M. How to study dendriplexes II: Transfection and cytotoxicity. *J Control Release.* 2010; 141(2):110-27.

Sonntag VC. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair. Springer- Verlag Berlin Heidelberg New York, 2006.

Trepakova ES, Csutora P, Hunton DL, Marchase RB, Cohen RA, Bolotina VM. Calcium influx factor directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000 Aug 25;275(34):26158-63.

- Uğuz AC, Naziroğlu 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.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004;266(1-2):37-56.
- 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.
- Vincent AM, Edwards JL, McLean LL, Hong Y, Cerri F, Lopez I, Quattrini A, Feldman EL. Mitochondrial biogenesis and fission in axons in cell culture and animal models of diabetic neuropathy. *Acta Neuropathol*. 2010 Oct;120(4):477-89.
- Vincent AM, Hinder LM, Pop-Busui R, Feldman EL. Hyperlipidemia: a new therapeutic target for diabetic neuropathy. *J Peripher Nerv Syst*. 2009 Dec;14(4):257-67.
- Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. 2008. TRP Channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Therap* 118:337-351.
- Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jüngling E, Zitt C, Luckhoff A. (2002). 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* 277: 23150-23156.
- Whanger PD. Selenium and the brain: A review. *Nutr Neurosci*. 2001;4(2):81-97.
- Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* 1995;82-83:969-74.
- Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life* 2008; 60(9):575-90.
- Yeo JE, Kang SK. Selenium effectively inhibits ROS-mediated apoptotic neural precursor cell death in vitro and in vivo in traumatic brain injury. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Dec;1772(11-12):1199-210.
- Ying HS, Gottron FJ, Choi DW. Assessment of cell viability in primary neuronal cultures. *Current Protocols in Neuroscience* 2000; 7(18):1-17.
- Yuan H, Lan T, Lin J. Modulation of nano-selenium on tetrodotoxin-sensitive voltage-gated sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2005;5:4846-9.
- Yuan H, Lin J, Lan T. Effects of nano red elemental selenium on sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*.2006;1:896-9.
- Zocchi E, Usai C, Guida L, Franco L, Bruzzone S, Passalacqua M, De Flora A. Ligand-induced internalization of CD38 results in intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization: role of NAD<sup>+</sup> transport across cell membranes. *FASEB J*. 1999 Feb;13(2):273-83.

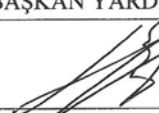
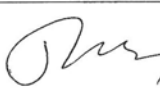

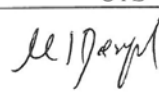
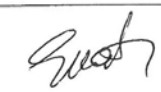
## EK-1

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİV. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI		
TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
07.07.2009	16	02

SDÜ. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 07 Temmuz 2009 tarihinde Saat 16:00'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır,

S.D.Ü. Tıp Fak. Biyofizik A.D. Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU yürütücüsü olduğu, Arş. Gör. A. Cihangir UĞUZ'un yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı "Oksidatif Stresle Uyarılan Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinde Kalsiyum Sinyali ve Hücre Ölümü (Apoptosis) Üzerinde Selenyumun Etkisinin Araştırılması" konulu çalışma;

Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından uygun görülmüştür

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU BAŞKAN	Yrd.Doç.Dr.Efkan UZ BAŞKAN YARDIMCISI	Prof.Dr.Fatih GÜLTEKİN ÜYE
(KATILMADI)		
Doç. Dr.Sema BİRCAN ÜYE	Yrd.Doç. Dr.Bilge ÇADIR ÜYE	Yrd.Doç.Dr.Vedat Ali YÜREKLİ ÜYE
	(KATILMADI)	
Vet.Hekim İsmail UZ ÜYE	Eczacı Mustafa Serhan DERYAL ÜYE	Vet.Hekim İshak Suat ÖVEY ÜYE
(KATILMADI)		

## ÖZGEÇMİŞ

**Arş. Gör. Abdülhadi Cihangir UĞUZ**

### **Kişisel Bilgiler:**

**Doğum Tarihi:** 23.07.1982  
**Doğum Yeri:** İzmir  
**Yabancı Dil:** İngilizce  
**Yazışma Adresi:** 1.Etap TOKİ Evleri B:6 Blok D:24 PK: TR-32260  
Çünür / Isparta  
**Telefon No:** 0 533 625 03 55  
**Elektronik Posta:** cihangiruguz@yahoo.com

### **Öğrenim Durumu:**

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

### **Doktora Tezi ve Danışmanı:**

“Oksidatif Stresle Uyarılan Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinde Kalsiyum Sinyali ve Apoptotik Hücre Ölümü Üzerinde Selenyumun Etkisinin Araştırılması”

**Danışman:** Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU