

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE GADOLİNYUM VE
GADOLİNYUM ŞELATLARININ HÜCRE İÇİ
KALSİYUM ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

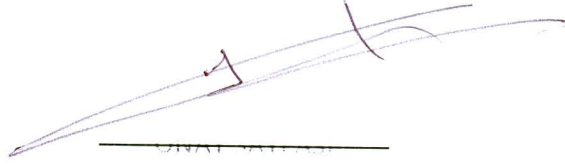
Murat BAYKARA

2012

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR
Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

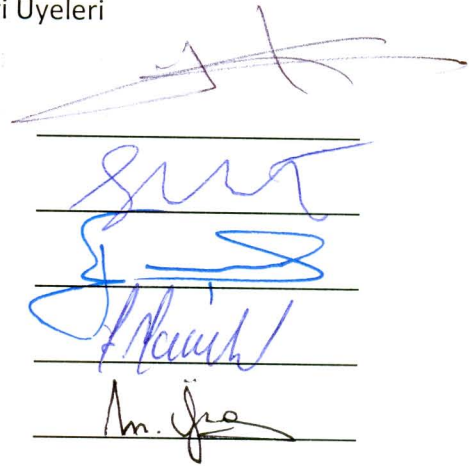
Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Prof. Dr. Selim KUTLU

Prof. Dr. Engin ŞAHNA

Doç. Dr. Süleyman SANDAL

Doç. Dr. Mete ÖZCAN



TEŞEKKÜR

Bir süre ara verdiğim doktora eğitimime yeniden başlamama vesile olan ve değerli katkılarını, desteğini esirgemeyerek tezimin hazırlanmasında hem fikren hem de fiilen her türlü yardımı yapan danışmanım Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR'a şükranlarımı sunarım.

Yine bu tez çalışması sürecinde büyük bir özveri ile çaba göstererek bilimsel yardımlarını esirgemeyen Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mete ÖZCAN'a da hassaten teşekkür ediyorum. Ayrıca Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Selim KUTLU ve Araştırma Görevlisi Sayın Dr. Emine KAÇAR'a da tezimin hazırlanmasına katkıda buldukları için teşekkür ederim.

Yeri gelmişken; doktora eğitimime başlamama vesile olan ve bu eğitimde bana katkı sağlayan Fizyoloji Anabilim Dalı Emekli Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Abdalbaki TÜRKOĞLU ile Sayın Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŐ hocalarıma da teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Gadolinyum ve Şelatları	5
3.2. Gadolinyum ve Nefrojenik Sistemik Fibrozis	6
3.3. Sinirlerde İstirahat Membran Potansiyeli	7
3.3.1. Membran İyon Kanalları	7
3.3.1.1. Klor Kanalları	7
3.3.1.2. Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları (VKPK)	7
3.3.1.3. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları (VKSK)	8
3.3.1.4. Proton Kapılı İyon Kanalları (PKİK)	8
3.3.1.5. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları (VKKK)	10
3.3.1.5.1. Kalsiyum Kanal Alt Birimleri	10
3.3.1.5.2. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarının Sınıflandırılması	12
3.3.1.5.3. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanal Tipleri	15
3.3.1.5.3.1. L-Tipi Kalsiyum Kanalları	15
3.3.1.5.3.2. N, P/Q ve R-Tipi Kalsiyum Kanalları	16
3.3.1.5.3.3. T-Tipi Kalsiyum Kanalları	17
3.4. Hücre İçi Kalsiyum Konsantrasyonunun Düzenlenmesi	18
3.4.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali	19
3.4.1.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyalinin Önemi	19
3.4.2. Hücre İçi Kalsiyum Sinyalinin Oluşumu	20
3.4.2.1. Hücre Dışından Sitoplâzmaya Kalsiyum Girişi Sağlayan Kanal Tipleri	20
3.4.2.1.1. Voltaj Bağımlı Ca^{+2} Kanalları	20
3.4.2.1.2. Ligand Bağımlı Ca^{+2} Kanalları	21
3.4.2.1.3. Depo Boşalması ile Aktive olan Ca^{+2} Kanalları	21
3.4.2.2. Hücre İçi Kalsiyum Depolarından Kalsiyum Çıkışını Sağlayan Yapılar	22
3.4.2.2.1. Ryanodin Reseptörleri	22
3.4.2.2.2. İnositol 1,4,5-trisfosfat Reseptörleri	23
3.5. Gadolinyumun Kalsiyum Kanallarıyla Etkileşimi	24
3.6. Dorsal Kök Gangliyonu Nöronlarının Özellikleri	26
3.7. Trigeminal Gangliyon Nöronlarının Özellikleri	27
3.8. GT1-7 Nöronlarının Özellikleri	28
3.9. Amaç (Hipotez)	30
4. GEREÇ VE YÖNTEM	32
4.1. Kullanılan Alet-Cihazlar	32
4.2. Hücre Kültürleri İçin Genel Prensipler	33
4.3. Dorsal Kök Gangliyonu Hücre Kültürü Protokolü	35
4.4. Trigeminal Gangliyon Hücre Kültürü Protokolü	37
4.5. GT1-7 Hücre Serisi Protokolü	40
4.6. Gadolinyum ve Şelatlarının Standart Koşullar Altında Uygulanılması	41
4.7. Hücre İçi Kalsiyum Görüntüleme Tekniği ve Görüntü Analizleri	42
4.8. İstatistiksel Metot	45

5. BULGULAR	46
5.1. Hücre İçi Floresan Kalsiyum Görüntüleme Bulguları	46
5.2. Gadolinyum ve Gadolinyum'lu Manyetik Rezonans Kontrast Ajan'ların Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinin Hücre İçi Kalsiyum Düzeyi Üzerine Etkileri	49
5.3. Gadolinyum ve Gadolinyum'lu Manyetik Rezonans Kontrast Ajan'ların Trigeminal Gangliyon Hücrelerinin Hücre İçi Kalsiyum Düzeyi Üzerine Etkileri	54
5.4. Gadolinyum ve Gadolinyum'lu Manyetik Rezonans Kontrast Ajan'ların Kültüre GT1-7 Hücrelerinin Hücre İçi Kalsiyum Düzeyi Üzerine Etkileri	59
6. TARTIŞMA	64
7. KAYNAKLAR	71
8. EK	81
9. ÖZGEÇMİŞ	82

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarının Tarihsel Gelişimi.	14
Tablo 2.1.	Gd ⁺³ ve GMKA'ların Sıçan DKG Nöronlarındaki Etkilerinin Özetlenmesi.	50
Tablo 2.2.	Gd ⁺³ ve GMKA'ların Sıçan DKG Nöron Kültürlerinde Hücre İçi Bazal Kalsiyum Düzeylerine Etkisi.	50
Tablo 3.1.	Gd ⁺³ ve GMKA'ların Sıçan TG Nöronlarında Etkilerinin Özetlenmesi.	55
Tablo 3.2.	Gd ⁺³ ve GMKA'ların Sıçan TG Nöron Kültürlerinde Hücre İçi Bazal Kalsiyum Düzeylerine Etkisi.	55
Tablo 4.1.	Gd ⁺³ ve GMKA'ların Sıçan GT1-7 Nöronlarında Etkilerinin Özetlenmesi.	60
Tablo 4.2.	Gd ⁺³ ve GMKA'ların Sıçan GT1-7 Nöron Kültürlerinde Hücre İçi Bazal Kalsiyum Düzeylerine Etkisi.	60

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Fura-2-AM İle Yüklenmiş DKG Hücrelerinin Mikroskop Altındaki Görünümleri.	37
Şekil 2.	Fura-2-AM İle Yüklenmiş TG Hücrelerinin Mikroskop Altındaki Görünümleri.	39
Şekil 3.	Fura-2-AM İle Yüklenmiş GT1-7 Hücrelerinin Mikroskop Altındaki Görünümleri.	41
Şekil 4.	Floresan Kalsiyum Görüntüleme Sisteminin Fotoğrafik Görünümü.	44
Şekil 5.	Örnek Olarak Gadodiamid'in Fura-2-AM İle Yüklenmiş Sıçan DKG hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisinin Gösterilmesi.	48
Şekil 6.1.	Gadolinium'un Sıçan DKG Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.	51
Şekil 6.2.	Gadodiamid'in Sıçan DKG Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.	52
Şekil 6.3.	Meglumin Gadoterat'ın Sıçan DKG Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.	53
Şekil 7.1.	Gadolinium'un Sıçan TG Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.	56
Şekil 7.2.	Gadodiamid'in Sıçan TG Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.	57
Şekil 7.3.	Meglumin Gadoterat'ın Sıçan TG Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.	58
Şekil 8.1.	Gadolinium'un Sıçan GT1-7 Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.	61
Şekil 8.2.	Gadodiamid'in Sıçan GT1-7 Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.	62
Şekil 8.3.	Meglumin Gadoterat'ın Sıçan GT1-7 Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

[Ca⁺²]_{ER}	Endoplazmik Retikulum Ca ²⁺ Konsantrasyonu
[Ca⁺²]_i	Hücre İçi Kalsiyum Konsantrasyonu
ACh	Asetilkolin
ATP	Adenozin trifosfat
Ca⁺²	Kalsiyum İyonu
DAG	Diaçilgliserol
DKG	Dorsal kök gangliyon hücreleri
ER	Endoplazmik Retikulum
Fura-2-AM	Fura-2-asetoksimetil ester
Gd⁺³	Gadolinium İyonu
GDP	Guanozin difosfat
GMRKA	Gadolinium'lu MR Kontrast Ajanları
GPKR	G Proteini Kenetli Reseptör
GT1-7	Ffare nöroblastom kültürü hücreleri
IP₃	İnositol 1,4,5-trisfosfat
IP₃R	İnositol 1,4,5-trisfosfat Reseptörü
La⁺³	Lanthanum İyonu
Mg⁺²	Magnezyum İyonu
PIP₂	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfat
PKC	Protein Kinaz C
PLC	Fosfolipaz C
PMKA	Plazma Membranı Ca ⁺² ATPaz
RyR	Ryanodin Reseptörü
SR	Sarkoplazmik Retikulum
TG	Trigeminal gangliyon hücreleri
TP	Guanozin trifosfat
TRP	Transient Reseptör Potansiyeli

1. ÖZET

Gadolinium (Gd^{+3}) canlılarda eser miktarlarda bulunan, metabolik rolü bilinmeyen ve kalsiyum kanallarını inhibe ettiği gösterilmiş nadir bir toprak metalidir. Organik ligand moleküllerinin Gd^{+3} etrafında bir kompleks oluşturduğu bir şelasyon süreci ile Gadolinium'lu MR Kontrast Ajanları (GMRKA) oluşturulur. GMRKA'ların metabolik koşullarda gadolinium iyonlarını serbestleyerek ayrıştığı hipotezi nedeniyle farklı sinir doku hücre kültürlerinde serbest gadolinium ve GMRKA'ların hücre içi kalsiyumu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Çalışmada sıçan dorsal kök gangliyon (DKG) ve trigeminal gangliyon (TG) hücreleri ile GT1-7 (ölümsüz GnRH nöronları) hücreleri kullanıldı. Hücre içi kalsiyum sinyalleri DKG ile TG hücrelerinde KCl^+ ve GT1-7 hücrelerinde melatonin ile non-spesifik depolarizasyonla hücreler uyarılmaya çalışıldı ve indüklenen kalsiyum sinyalleri üzerine gadolinium ve GMRKA'ların etkileri incelendi. GMRKA'lar ve moleküler gadolinium 0,1 mmol/kg ortam konsantrasyonu oluşturulacak şekilde aynı pH ve sıcaklık değerlerinde hazırlanılarak kalsiyuma duyarlı floresan boya Fura-2-AM ile boyanmış hücre kültürlerine uygulanarak değerlendirme yapıldı.

Sıçan DKG ve TG nöron kültürlerinde hücre dışına uygulanan Gd^{+3} ve gadodiamid hücre içi bazal kalsiyum düzeylerinde Gd^{+3} daha fazla olmak üzere anlamlı azalma meydana getirirken meglumin gadoterat anlamlı bir etki

göstermedi. Gd^{+3} 'nin etkisi geri dönüşümsüz iken gadodiamid ile geri dönüşüm tama yakın idi. GT1-7 hücre kültürlerinde Gd^{+3} ve gadodiamid DKG ve TG'lerdekine benzer etki gösterirken meglumin gadoterat da Gd^{+3} ve gadodiamid ile karşılaştırılmayacak derecede hafif formda olmakla birlikte gadodiamid benzeri etki göstermiştir.

Sonuç olarak, bazı gadolinyum şelatlarının gadolinyumu fizyolojik şartlarda serbestleyip hücre içi kalsiyum düzeylerini değiştirerek dokulardaki muhtemel toksik etkilerinin oluşmasına sebep olabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Gadolinyum, Gadolinyum'lu MR Kontrast Ajanları, Kalsiyum, Dorsal Kök Gangliyon, Trigeminal Gangliyon, GT1-7 hücreleri.

2. ABSTRACT

AN INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF THE GADOLINIUM AND GADOLINIUM CHELATES ON THE INTRACELLULAR CALCIUM IN THE DIFFERENT CELL CULTURES

Gadolinium (Gd^{3+}) is a rare earth metal that occurs in only trace amounts biologically and is not known to have a metabolic role but shown to inhibit calcium channels. Gd-based MR contrast agents (GBMCA) are manufactured by a chelating process, in which organic ligand molecules form a stable complex around Gd^{3+} . Aim of this study is to investigate the probably effect of free gadolinium and GBMCA in neuron cell lines on the intracellular Ca^{2+} because these agents can dissociate and result in release of toxic Gd^{3+} ions in metabolic conditions.

Dorsal root ganglia (DRG), trigeminal ganglia (TG) and GT1-7 (immortalized GnRH neurons) cells were studied for responses to agents and nonspecific depolarization by high KCl^+ and melatonin, respectively, by monitoring changes in $[Ca^{2+}]_i$ with a microscopic digital image analysis system in Fura-2-AM loaded neurons.

GBMCA and molecular gadolinium were prepared at 0.1 mmol/kg doses at the same pH and temperature values and administrated to the cell lines that loaded to calcium-sensitive fluorescent dye Fura-2-AM.

Application of Gd^{3+} and gadodiamid on the rat DRG and TG neurons caused significant decreases in the basal intracellular calcium levels whereas gadoterat meglumine did not have a significant impact. Gd^{3+} was more effective than gadodiamide. While returned effect was almost complete with gadodiamid, Gd^{3+} has irreversible effect. GT1-7 cell lines showed the same responses as Gd^{3+} and meglumine gadoterat in DRG and TG. The degree of effect of meglumine gadoterat is neglectable compared to Gd^{3+} and gadodiamid although it showed gadodiamid-like effects.

In conclusion, some of the gadolinium chelates may release gadolinium in physiological conditions and cause toxic effects by changing the levels of intracellular calcium levels.

Keywords: Gadolinium, Gd-based MR contrast agents, calcium, dorsal root ganglia, trigeminal ganglia, GT1-7 cells

3. GİRİŞ

3.1. Gadolinyum ve Şelatları

Gadolinyum (Gd^{+3}) canlılarda yalnızca eser miktarlarda bulunan ve metabolik rolü bilinmeyen nadir bir toprak metalidir. Doğal ancak manyetik olmayan bu "lanthanide" elemanı yüksek paramanyetik ve uzun relaksasyon süresi gibi özellikleri nedeniyle şelatlanarak görüntüleme kontrast oluşturucu ajan (Gadolinyum'lu Manyetik Rezonans Kontrast Ajanı (GMRKA)) olarak kullanılmaktadır. GMRKA'lar 1988'den beri insanlara uygulanmaktadır (1, 2).

GMRKA, organik ligand moleküllerinin Gd^{+3} etrafında stabil olduğu varsayılan bir kompleks oluşturduğu bir şelasyon süreci ile üretilmektedir. Serbest Gd^{+3} çok zehirli olduğundan bu ligandlar yüksek çözünürlük ve stabilite sağlayarak nontoksik bir kompleks oluştururlar (1).

GMRKA komplekslerinin vücuttan geçişleri sırasında ayrışmaya uğrarlar ve Gd^{+3} , ligand ve kompleks arasında bir denge bulunur (1).

Bu denge GMRKA'ların termodinamik stabilite sabitlerine bağlıdır. Uluslararası yaygın klinik kullanımı olan birçok farklı GMRKA'ların stabilite sabitlerinde çok büyük farklılıklar vardır (1, 3, 4).

Nefrojenik Sistemik Fibrozis (NSF) rapor edilen GMRKA sıklığı bu şelatların stabilite sabitleriyle görece olarak paraleldir (1).

Dünya piyasalarında yaygın olarak bulunan ve çalışmada kullanılan bazı GMRKA'lar aşağıdadır:

- Gadobenate Dimeglumine (MultiHance®)
- Gadodiamide (Omniscan™)
- Gadopentetate Dimeglumine (Magnevist®)
- Gadoteridol (ProHance®)
- Gadoversetamide (OptiMARK™)
- Meglumin Gadoterat (Dotarem®)

3.2. Gadolinyum ve Nefrojenik Sistemik Fibrozis

2000 yılında, 15 hemodializ hastasında morfea ve skleroderma'dan farklı ve skleromiksödem benzeri yeni bir cilt durumu bildirildi (1, 5). İlk olarak 1997 yılında tanımlanan bu özgün deri hastalığı 2001'de (6) nefrojenik fibrozan dermopati olarak adlandırıldı. Bunun bir sistemik bozukluk olduğunu gösteren sonraki çalışmalar nefrojenik sistemik fibrozis olarak yeniden isimlendirilmesine yol açtı (1, 7-10).

Bu hastalığın etiyolojisi ve patogenezi eksik olarak anlaşılmıştır. NSF ile GMRKA'yı ilişkilendiren ilk makale 2006'da yayınlandı ve elektron mikroskobu/enerji dağıtıcı X-ışını spektroskopisi (SEM/EDS) kullanılarak NSF deri lezyonlarında Gd^{+3} tespit edildi (1, 11, 12).

Stabilite sabitlerine ve transmetalasyon kinetiğine bağlı olarak GMRKA'lar toksik Gd^{+3} iyonlarının salınmasıyla sonuçlanan ayrılmaya uğrayabilirler. Bu Gd^{+3}

iyonları dolaşan fibrositlerin toplanması için bir hedef veya tetikleyici rol oynayabilir ve fibrozise yol açan bazı büyüme faktörleri ve/veya sitokinlerin salınımına yol açabilir. Yine enflamatuar odaklardaki makrofajlar tarafından fagosite edilen GMRKA'nın serbest Gd^{+3} salınımına sebep olabileceği düşünülmüştür (1).

3.3. Sinirlerde İstirahat Membran Potansiyeli

Canlı hücrelerin hepsinde membranın iki tarafı arasında bir elektriksel potansiyel bulunur. İstirahat membran potansiyeli (İMP) denilen bu potansiyel kas veya sinir hücresi tipine göre 60-100 milivolt (mV) arasında değişir. İMP'nin sebebi hücre içi sıvı ile hücre dışı sıvıda iyonların farklı yoğunluklardaki dağılışıdır (13).

3.3.1. Membran İyon Kanalları

3.3.1.1. Klor Kanalları

Klor kanalları birçok hücrenin plazma membranında mevcuttur. Hücre hacminin düzenlenmesi, transepitelyal taşıma, salgı hücrelerinden sıvı salınması ve membran potansiyelinin stabilizasyonunda önemli rolleri vardır. Klor kanalları hücre dışı ligandlar, hücre içi kalsiyum, siklik Adenozin Mono Fosfat (sAMP), G protein, hücre şişmesi, mekanik gerilim ve transmembran (TM) voltaj etkisi ile aktive edilebilir (14, 15).

3.3.1.2. Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları (VKPK)

Potasyum duyarlı kanallar iyon kanallarının en geniş ve en çok çeşit içeren grubudur (16). VKPK'ler bilginin taşınması ve işlenmesi süreçlerinde gereklidir. Presinaptik sonlanmalarda nörotransmitter salıverilmesinin düzenlenmesi, membran dinlenme potansiyelinin oluşturulması ve nöronlarda repolarizasyonu sağlayarak aksiyon potansiyeli'nin (AP) sonlandırılması gibi birçok fonksiyonu vardır (17). Ayrıca potasyum kanalları sıvı homeostazisini, sinir dokularında sinyalleşmeyi, kas kasılmasını da düzenler. Bu düzenlemeler hücre zarından potasyum iyonlarının difüzyonunu sağlayan içi su dolu kanalların açılıp kapanmasıyla başarılır (18).

3.3.1.3. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları (VKSK)

VKSK'ler uyarılabilir hücrelerde AP'nin oluşması ve yayılması için gerekli bir TM proteindir (19). VKSK farmakolojik olarak tetrodotoksin'e (TTX) duyarlı ve TTX'e dirençli Na⁺ kanalları olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Kanalın TTX'e duyarlı veya dirençli olmasını belirleyen α alt birimleridir (20).

3.3.1.4. Proton Kapılı İyon Kanalları (PKİK)

Proton Kapılı İyon Kanalları (PKİK)/Asit Duyarlı İyon Kanalları (ADİK) mekanosensör dejenere/epitel Na⁺ kanal ailesine ait kanallardır (21). Bu kanallar hücre dışı pH seviyesindeki değişikliklere (pH=7,4 ile 4) cevaben açılıp kapanırlar

(22). ADİK hücre dışı asidozis tarafından aktive edilen voltaj-bağımsız katyonlara geçirgen iyon kanallarıdır (23). Asit duyarlı iyon akımları ilk kez duyuşal nöronlardan rapor edilmiştir (24). 4 ADİK geni en az 6 ADİK alt birimini (ADİK 1a, 1b, 2a, 2b, 3 ve 4) kodlar (25).

ADİK alt birimleri merkezi ve periferik nöronlarda eksprese edilir. H⁺-kapılı akımların özellikleri bu hücrelerde eksprese edilen ADİK alt birimleri tarafından belirlenir. ADİK1a, ADİK2a ve ADİK2b özellikle serebral korteks, hipokampus, amigdala, olfaktor bulbus ve serebellum olmak üzere beynin birçok bölgesinde eksprese edilir (26). ADİK3 miyelinsiz küçük çaplı peptiderjik nosiseptörler ve büyük çaplı mekonoreseptörlerin yanı sıra duyuşal sinir terminallerinde ve serbest sinir uçlarında da bulunmaktadır (26).

ADİK'ler hücre dışı protonlar tarafından aktive edildikleri için hücre dışı asidozis dahil bir çok biyolojik olayda rol alır. ADİK'ler inflamasyonda asidozisin indüklediği ağrıya aracılık eder (27). İnflamasyon, enfeksiyon, nöbet, iskemi ve inme gibi durumlarda asidozis de gelişmektedir (23). Hücre dışı asidozis ADİK1a'yı aktive ederek nöronal hasar ve nöronal ölümü indükler. Farelerde ADİK1a aktivasyonun farmakolojik olarak önlenmesi veya Asic1 geninin mutasyonunun serebral iskemiye bağlı nöronal ölümü belirgin bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (28).

Proton kanallarının klasik inhibitörleri inorganik maddeler olan çok değerlikli katyonlardır. Zn⁺² voltaj kapılı proton kanallarının en güçlü inhibitörüdür (29). İnhibitör olarak etki eden iki değerlikli metal katyonların etkinlik sıralaması Zn⁺²≈Cu⁺²>Ni⁺²>Cd⁺²>Co⁺²>Mn⁺²>Ba⁺², Ca⁺², Mg⁺²≈0

şeklindedir. İki değerlikli bu metallerin yanında La^{+3} , Gd^{+3} ve Al^{+3} gibi metallerde inhibisyon yaparlar (30).

3.3.1.5. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları (VKKK)

Kalsiyum birçok hücrel fonksiyonun düzenlenmesinde önemli rolleri olan bir iyondur. Kas kasılmasının başlatılması, sinir sonlanmalarından nörotransmitterlerin ve sekretuar hücrelerden hormonların salıverilmesinin tetiklenmesi, hücre döngüsü ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve hücre ölümü gibi birçok olayda görev alır. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu hücre dışından oldukça düşüktür. Ca^{+2} 'nin hücre içinde kısa süreli artışı birçok hücrede 2. haberci reseptör çiftini aktive eder. Ca^{+2} 'nin hücre içindeki bu artışı voltaj veya ligand kapılı kalsiyum kanallarının vasıtasıyla hücre dışından Ca^{+2} girişi ya da hücre içi depolardan (inozitol 1,4,5 trifosfat (IP_3) ve ryanodin reseptörü/kalsiyum (RyR) salıverilme kanalı) Ca^{+2} salıverilmesi ile olur (31).

3.3.1.5.1. Kalsiyum Kanal Alt Birimleri

Kalsiyum kanalları çeşitli genler tarafından kodlanan biyokimyasal olarak 4 veya 5 farklı alt birimden oluşmuş kompleks proteinlerdir (32). Bunlar; α_1 , $\alpha_2\delta$, β ve γ alt birimleridir. 190-250 kDa ağırlığındaki α_1 alt birimi en büyük alt birimdir ve voltaj saptayıcılığı ve Ca^{+2} 'a geçirgen gözenekleriyle Ca^{+2} akışının kontrolünü yapar. Sodyum kanallarının α_1 alt birimlerinde olduğu gibi Voltaj kapılı kalsiyum kanalı (VKKK) da 4 homolog bölge ve her bölgede 6 TM segment (S1-S6) içerir. S4

segmenti voltaj algılayıcı olarak görev yapar. S5 ve S6 TM segmentler arasındaki por halkası iyon iletkenliği ve seçiciliğini belirler (33). β alt birimi tüm yüksek voltajla aktive olan (YVA) kanalların $\alpha 1$ alt birimi ile birlikte eksprese olan hücre içi yardımcı bir alt birimdir. Düşük voltajla aktive olan (DVA) kanalların $\alpha 1$ alt birimi ile β alt biriminin birlikte ekspresyonu henüz gösterilememiştir (34). Bugüne kadar farklı genler tarafından kodlanan 4 β alt birimi izoformu ($\beta 1$ - $\beta 4$) tanımlanmıştır (35). 125,0 kDa ağırlığındaki $\alpha 2\delta$ alt birimi Ellis ve ark. (36) tarafından klonlanmıştır. Günümüzde 3 yeni $\alpha 2\delta$ alt birimi daha ($\alpha 2\delta$ -2, 3, 4) klonlanmıştır (37). γ alt birimi bir integral membran proteindir. İlk olarak, 25,1 kDa ağırlığında 222 aminoasit içeren γ -1 alt birimi tavşan iskelet kasından pürifiye edilmiştir (38). Chu ve ark. (39) γ alt birim ailesini sıçan, fare ve insanda analiz etmiştir. Sıçan dokularında 3 yeni geni de içeren 8 γ alt biriminin ekspresyonu tanımlanmıştır ve bu genlerin örnekleri insan ve farelerde de tanımlanmıştır. Hücre içi bir β alt birim ve disülfid bağlı $\alpha 2\delta$ alt birim kompleksi kalsiyum kanallarının çoğu tipinin bileşenlerini oluşturur. γ alt birimi iskelet kası kalsiyum kanallarında bulunur ve γ alt birimine benzeyen alt birimler beyin ve kalpte eksprese edilmiştir. Bu yardımcı alt birimler kanal komplekslerinin özelliklerini düzenlemesine rağmen farmakolojik ve elektrofizyolojik olarak kalsiyum kanal çeşitliliği birincil olarak çeşitli $\alpha 1$ alt birimlerin varlığında artar (40).

3.3.1.5.2. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarının Sınıflandırılması

VKKK'nın ilk sınıflaması farmakolojik ve elektrofizyolojik özellikler temel alınarak yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda bazı kalsiyum kanalları, aktivasyon için sadece küçük bir depolarizasyona ihtiyaç duyarlarken diğer bir kısmının ise göreceli olarak daha yüksek depolarizasyonla açıldığı görülmüştür (41). Bu kriterler baz alınarak kalsiyum kanalları YVA kalsiyum kanalları ve DVA kalsiyum kanalları olarak iki gruba ayrılmıştır.

VKKK'nın ikinci sınıflandırılması 1980'lerde yapılmıştır. Klonlama çalışmalarında kalsiyum kanallarının temel $\alpha 1$ alt birimi ve bir kaç yardımcı β , $\alpha 2\delta$, ve γ alt birimlerinden oluştuğu gösterilmiştir. $\alpha 1$ alt birimi kanalın temel elektrofizyolojik ve farmakolojik özelliklerden sorumludur. L-tipi kalsiyum kanallarında çeşitli $\alpha 1$ alt birimleri tanımlanmıştır. İlk olarak iskelet kaslarından $\alpha 1$ alt birimi pürifiye edilmiş (42), klonlanmış ve $\alpha 1S$ olarak adlandırılmıştır (43). Daha sonra kalpte ($\alpha 1C$ -a) (44) ve düz kasta ($\alpha 1C$ -b) (45) $\alpha 1$ alt birimi klonlanmıştır. Bunları takiben L-tipi kanalların alt ailesini temsil eden diğer iki üye $\alpha 1D$ (46) ve $\alpha 1F$ (47) tanımlanmıştır.

Kalsiyum kanallarının 3 nöronal-tipini temsil eden 3 $\alpha 1$ alt birimi klonlanmıştır. P/Q-tipi kanallar $\alpha 1A$ alt birimi (48), N-tipi kanallar ise $\alpha 1B$ alt birimi (49) ile eşleşmiştir. $\alpha 1E$ alt birimi (50) başlangıçta DVA T-tipi kanallara ait olduğu düşünülmüş fakat daha sonra yapılan çalışmalar R-tipi kanalın özelliklerini taşıdığını göstermiştir. Şu ana kadar $\alpha 1G$ (51), $\alpha 1H$ (52), ve $\alpha 1I$ (53) olmak üzere DVA T-tipi kanallarının 3 üyesi tanımlanmıştır.

Kalsiyum kanallarının $\alpha 1$ alt birimlerinin sayısının gün geçtikçe artması sistematik bir sınıflandırmanın gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Bu düşünceyle uyumlu olarak $\alpha 1$ alt birimleri $Ca_v x.y$ şemasına göre isimlendirilmiştir (54). Ca_v voltajla aktive olan kalsiyum kanallarını, x sayısı kanal alt ailesini (L-tipi, N-tipi ve T-tip) ve y sayısı ise alt ailelerin üyelerini simgeler (Tablo 1).

Tablo 1. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarının Sınıflaması

Aktivasyon Özelliği	Biyofiziksel veya Farmakolojik Tanımlama	α_1 Alt Birimine Göre Sınıflama	Yapısal Sınıflama
Yüksek Voltajla Aktive Olan Kanallar (YVA)	L-Tipi	α_{1S}	Ca _v 1.1
		α_{1C}	Ca _v 1.2
		α_{1D}	Ca _v 1.3
		α_{1F}	Ca _v 1.4
	P/Q-Tipi	α_{1A}	Ca _v 2.1
		α_{1B}	Ca _v 2.2
			Ca _v 2.3
	T-Tipi	α_{1G}	Ca _v 3.1
		α_{1H}	Ca _v 3.2
		α_{1I}	Ca _v 3.3

Ertel EA ve ark. (Neuron 2000; 25: 533-535)'dan değiştirilerek alınmıştır.

3.3.1.5.3. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanal Tipleri

3.3.1.5.3.1. L-Tipi Kalsiyum Kanalları

YVA kalsiyum kanal grubudur. Nöronlarda olduğu kadar iskelet, düz ve kalp kaslarında da bol miktarda bulunurlar. Dorsal kök gangliyon (DKG) hücrelerinde ilk keşfedilen Ca^{+2} kanalıdır. İletkenliği oldukça yüksektir (25 pS) (55). YVA olan kalsiyum kanallarının inaktivasyon göstermedikleri kabul edilir. Büyük (large) iletkenlikleri ve uzun süreli (long lasting) akım vermelerinden dolayı bu kanallara L-tipi kalsiyum kanalları adı verilmiştir (56). Farmakolojik olarak tüm L-tipi kanalların karakteristik bir özelliği ya inhibitör (nifedipin, nisoldipin, isradipin) ya da aktivatör (Bay K 8644) olarak etki eden 1,4-dihidropiridin grubuna ait ilaçlara duyarlı olmasıdır (57).

L-tipi kanal ailesinin şu ana kadar tespit edilmiş olan 4 alt üyesi ($Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$, $Ca_v1.4$) vardır. Dihidropiridin (DHP), fenilalkilaminler (FAA) ve benzodiazepinler gibi ilaçların büyük çoğunluğu organik kanal blokörleridir. Erken deneysel gözlemler iskelet kası kanallarında bu 3 ilaç grubunun $\alpha 1$ alt biriminin tekrarlayan IV. ve ek olarak III ve I. TM bölgesine bağlandığını göstermiştir (58). Çeşitli çalışmalarda DHP'nin yüksek bir affinite ile bağlanabilmesi ve/veya kalsiyum akımının yüksek bir affinite ile DHP tarafından inhibe edilebilmesi için β , $\alpha 2\delta$ ve γ alt birimlerinin birlikte eksprese olması gerektiğini göstermiştir (59).

Verapamil, gallopamil veya devapamil gibi FAA'lar da L-tipi akımları bloke eder (60) ve allosterik etkileşim ile DHP'lerin bağlanmasını etkiler. Ek olarak

diltiazem gibi benzodiazepinler de allosterik etkileşim ile DHP'lerin bağlanmasını etkiler (61).

3.3.1.5.3.2. N, P/Q ve R-Tipi Kalsiyum Kanalları

1980'lerde nöronlarda yapılan çalışmalar DHP'lere duyarlı olmayan yeni bir kalsiyum kanalını ortaya çıkarmıştır (62). Bu kanallar nöronlarda tespit edildiği için N-tipi kalsiyum kanalları olarak adlandırılmıştır. Daha sonra nöronal non-L-tipi kalsiyum kanalları örümcek ve yılandan izole edilen peptit toksinlerine duyarlılığına göre alt birimlere (N, P/Q, R) ayrılmıştır. ω -conotoxin GVIA'ya duyarlı olan kanallar N-tipi kalsiyum kanalları olarak kalmıştır. ω -Aga IVA toksinine duyarlı kanallar ise P/Q-tipi kalsiyum kanalları olarak adlandırılmıştır (P harfi purkinje hücrelerinden gelir). Bu iki toksine dirençli kanallar ise R-tipi kalsiyum kanalları olarak adlandırılmıştır (R, resistant).

N-tipi, P/Q-tipi ve R-tipi kalsiyum akımları aktive olmaları için güçlü depolarizasyonlara ihtiyaç duyarlar. Bu tip kalsiyum akımları göreceli olarak L-tipi kalsiyum kanal antagonistleri tarafından etkilenmezler fakat spesifik yılan ve örümcek polipeptit toksinleri tarafından bloklanır. Bunlar primer olarak nöronlarda eksprese edilir ve çoğu hızlı sinapslarda nörotransmisyonu başlatır ve hücre gövdesi ve dentritlere kalsiyum girişine aracılık eder (63).

3.3.1.5.3.3. T-Tipi kalsiyum kanalları

DVA kalsiyum kanal grubudur. Hızlıca voltaj bağımlı inaktivasyon gösterirler. İletkenliklerinin küçük (tiny) ve geçici (transient) akım vermelerinden dolayı bu tür kanallar T-tipi kalsiyum kanalları olarak adlandırılmıştır (56)

T-tipi kalsiyum kanalları sinir sistemi, kalp, böbrek, düz kas ve pek çok endokrin organ dahil olmak üzere vücudun bir çok bölgesinden eksprese edilmiştir. Beyindeki T-tipi kalsiyum kanalları tekrarlayan düşük eşikli ateşlemeler (64) ve ağrı ile ilişkilidir (65). Kalpte T-tipi kalsiyum kanalları sinoatriyal düğümde eksprese edilir ve sinoatriyal düğümde çıkan uyarılara katkıda bulunur (66), fakat kalp kasılmasına bir etkisi yoktur. T-tipi kalsiyum kanallarının farklı L-tipi kalsiyum kanalları ile birlikte mikro dolaşımın düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu gösteren çeşitli arter ve venlerde ekspresyonu gösterilmiştir (67). T-tipi kalsiyum kanallarının bronş, ileum, kolon, mesane ve uterus düz kaslarında da eksprese edildiği gösterilmiştir. T-tipi kalsiyum kanallarının aldosteron, renin, atrial natriüretik peptit (ANP) ve insülin gibi hormonların salıverilmesinde katkısının olduğu tespit edilmiştir (68, 69). Bütün bunlar göz önünde bulundurulduğunda T-tipi kalsiyum kanalları kalp krizi, aritmi ve hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıklar ve epilepsi ve ağrı gibi nöronal hastalıkların tedavisinde yeni tedavi edici ajanlara katkıda bulunabilirler.

Kalsiyum kanal blokörleri (L-tipi kalsiyum kanallarını bloke eder) fenilalkil aminler (verapamil), benzodiazepinler (diltiazem) ve dihidropiridinler (nifedipin) olmak üzere 3 büyük gruba ayrılırlar. Bu ilaçlar T ve L-tipi kanalların her ikisinde

de etki gösteren bazı dihidropiridin bileşikleri hariç tutulduğunda tedavi edici dozlarda T-tipi kanallarını inhibe etmezler. Flunarizine ve sennarizin gibi düşük seçicilikteki kalsiyum kanal blokörlerinin T-tipi kanallarını inhibe ettiği rapor edilmiştir (70).

T-tipi kanalları bloke eden birçok bileşik vardır fakat bunların çoğu diğer iyon kanal ve taşıyıcılarını da inhibe eder. Günümüze kadar spesifik bir inhibitör bulunamamıştır (70). Kurtoxin akrep zehirinden elde edilen T-tipi kanalları inhibe eden bir peptittir. Fakat bu peptit aynı zamanda diğer kalsiyum kanallarını da inhibe eder (71).

3.4. Hücre İçi Kalsiyum Konsantrasyonunun Düzenlenmesi

Hücre içi serbest Ca^{+2} çok önemli bir biyolojik sinyaldir. Hücrede, eksitabilite, ekzositozis, motilite, apoptozis, gen transkripsiyonu, hücre farklılaşması gibi çok önemli biyolojik olayları kontrol eder (72). Genel olarak, Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun ($[Ca^{+2}]_i$) muhafazası için iki Ca^{+2} kaynağı mevcuttur. Birincisi, hücre dışından plazma membranı aracılığıyla hücre içine Ca^{+2} girişidir. Örneğin, voltaj-kapılı Ca^{+2} kanalları (VKKK) yoluyla hücre içine Ca^{+2} girişi sağlanabilir. Diğer Ca^{+2} kaynağı agonist bağımlı ve voltajdan bağımsız hücre içi depolardır. Hücre içi organellerin membranlarında fonksiyonel olarak iki ayrı Ca^{+2} kanalı mevcuttur: inositol 1,4,5 triphosphate reseptörü (InsP3R) ve ryanodine reseptörü (RyR) (72, 73).

3.4.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali

3.4.1.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyalinin Önemi

Canlılarda gerçekleşen pek çok önemli olayda Ca^{+2} iyonları belirleyici rol oynamaktadır. Bu olaylar arasında hareket, kalp atışı, beynin bilgiyi işleyip hafızayı oluşturması, yumurtanın döllenme sonucu aktivasyonu, pankreatik hücrelerde salgılama, yaraların iyileşmesi, sillerin hareket frekansının koordinasyonu, karaciğer hücrelerinin davranışlarının düzenlenmesi ve apoptoz sayılabilir. Ca^{+2} , hem hücre içi süreçlerde hem de hücreler arası etkileşimde önemli görevlere sahiptir (74).

Hücre içi Ca^{+2} sinyali, $[Ca^{+2}]_i$ geçici bir şekilde artışından oluşur. Ca^{+2} , bu sinyal oluşturma özelliğinden dolayı, hücre için bir ikincil habercidir. Ca^{+2} , sinyali sadece bağlanma özellikleri veya basitçe ortamdaki varlığı ile taşıyamaz. Bu yüzden sinyal, enformasyon teknolojisindeki akım ve voltajın kullanımına benzer uzamsal ve zamansal formlarla iletilir (74).

Ca^{+2} 'un bu şekilde çeşitli formlara sokulabilmesi, Ca^{+2} sinyalinde görev alan elemanların dinamikleri ile ilişkilidir. Bu elemanların aktiviteleri sonucu Ca^{+2} , hücrede birbirinden farklı pek çok sinyali, örneğin hormon bağlanması veya mekanik uyarıyı, doğru şekilde iletebilmektedir. Ca^{+2} sinyali, bu özelliğinden dolayı çok büyük bir çeşitlilik barındırmaktadır. Bu çeşitliliğin incelenip açıklanması, Ca^{+2} 'un ikincil haberci olarak değerlendirilmesinde temel öneme

sahiptir ve bunun yöntemi de Ca^{+2} sinyalini düzenleyen elemanların incelenip bunların özelliklerinin ortaya konulmasıdır (74).

3.4.2. Hücre İçi Kalsiyum Sinyalinin Oluşumu

Ca^{+2} 'un hücre içinde sinyal molekülü görevi görebilmesinin sebebi, $[Ca^{+2}]_i$ 'nin, hem hücre dışı ortama, hem de hücre içinde Ca^{+2} depolayan yapılara göre çok düşük olmasıdır. Öyle ki hücre dışındaki Ca^{+2} 'u yaklaşık olarak 10^{-3} M, Ca^{+2} depolarında, örneğin endoplazmik retikulumda (ER) 5×10^{-4} M civarlarında iken, $[Ca^{+2}]_i$ bu değerlerden binlerce kez daha düşük olan 10^{-7} M seviyelerindedir. Bu yüzden, hem hücre içi ile dışı arasında, hem de ER ile sitoplâzma arasında, çok yüksek bir Ca^{+2} derişim farkı vardır. Bu fark, Ca^{+2} için çok büyük bir itici kuvvet oluşmasına sebep olur. Hem hücre zarı, hem de ER zarından Ca^{+2} geçişi, bu itici kuvvetin etkisi ile protein yapıdaki kanallardan olur. Bu kanallar, çoğunlukla kapalı durumda olup; voltaj, mekanik uyarı ya da ligand bağlanması ile aktive olur ve Ca^{+2} geçirgenliği sağlarlar (75).

3.4.2.1. Hücre Dışından Sitoplâzmaya Kalsiyum Girişi Sağlayan Kanal Tipleri

3.4.2.1.1. Voltaj Bağımlı Ca^{+2} Kanalları

Bu kanallar, membran depolarizasyonu sonucu aktive olur. Bu aktivasyon kanalları Ca^{+2} 'a geçirgen hale getirir. Bu sayede hücre zarındaki elektriksel olaylar, hücre içindeki fizyolojik olaylarla çiftlenir. Bu kanallar, evrimsel olarak

voltaj bağımlı sodyum ve potasyum kanalları ile ilişkilidir ve 10 farklı voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalı alt tipi bilinmektedir (63).

3.4.2.1.2. Ligand Bağımlı Ca^{+2} Kanalları

Bu kanallar, hücre dışından gelen ligandların bağlanması ile aktive olur ve Ca^{+2} 'a geçirgen hale gelirler. Bu yüzden bu kanallar aynı zamanda birer reseptördür. Bu kanallara P2X pürinerjik reseptörleri veya nikotinik asetilkolin (ACh) reseptörleri örnek verilebilir. Bu kanalların bazıları, Ca^{+2} dışındaki katyonlara da geçirgendirler, bu kanallar seçici olmayan katyon kanalları olarak adlandırılırlar (76, 77).

3.4.2.1.3. Depo Boşalması ile Aktive olan Ca^{+2} Kanalları

Bu kanalların aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, hücre içi Ca^{+2} depoları, Ca^{+2} sinyali sonucu, ya da daha farklı şekillerde boşaldığı zaman, bu kanallar hücre dışından sitoplâzmaya Ca^{+2} girişine sebep olurlar. Bu Ca^{+2} girişi, kapasitatif Ca^{+2} girişi (KKG) olarak da adlandırılır. Bu kanallara örnek olarak, transient reseptör potansiyeli (TRP) kanallarının bazıları gösterilebilir. Bu kanallar, depo boşalması ile aktive olup hem Ca^{+2} sinyalini, hem de hücre içi Ca^{+2} homeostazını düzenlerler. Bu kanalların bir diğer özeliği de lanthanum (La^{+3}) gibi üç değerlikli katyonlarla inhibe olmalarıdır (78).

3.4.2.2. Hücre İçi Kalsiyum Depolarından Kalsiyum Çıkışını Sağlayan Yapılar

3.4.2.2.1. Ryanodin Reseptörleri

Kas hücrelerindeki ER'nin modifiye olmuş şekline sarkoplazmik retikulum (SR) ismi verilmektedir (75). SR'dan Ca^{+2} salınımını sağlayan kanal ise, Ryanodin reseptörüdür. RyR'lerin aktivasyonu öncelikle voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarından hücre içine giren Ca^{+2} tarafından olmakta, bu reseptörler Ca^{+2} ile zaman içerisinde önce aktive, ardından inhibe olmakta, aktif halde iken Ca^{+2} kanalı özelliği göstermektedirler. İnhibisyon durumu [Ca^{+2}] biraz daha arttırıldığı zaman aşıldığı için adaptasyon olarak adlandırılmaktadır (79). Reseptörlerin Ca^{+2} ile aktivasyonu, Ca^{+2} etkili Ca^{+2} salımı olarak (KEKS) adlandırılmaktadır. Bu mekanizma, kas kasılmasını sağlayan temel unsurlardan biridir. RyR'ler, bu etkinin daha belirgin görülebilmesi için kas hücrelerinde t-tübülleri çevresinde kümelenmişlerdir. Reseptörleri Ca^{+2} dışında kafein de aktive etmekte, Ryanodin ise reseptörlere yüksek afinite ile bağlanıp, reseptörleri düşük geçirgenlikli bir duruma getirmektedir (18). Bunun dışında adenzintrifosfat (ATP), magnezyum (Mg^{+2}) ve protein-protein ilişkileri de bu reseptörün düzenlenmesinde görev almaktadır. Bu reseptörün memelilerde üç alt tipi bulunmaktadır ve kas hücreleri dışında özellikle sinir hücrelerinde de Ca^{+2} sinyalinde görev almaktadırlar (80).

3.4.2.2. İnositol 1,4,5-trisfosfat Reseptörleri

Hücre içi sinyal iletiminde en yaygın ikincil habercilerden biri olan inositol 1,4,5-trisfosfat (IP₃) etkisi ile aktive olup kanal özellikleri ile ER'den Ca⁺² salınımına yol açan reseptörler, inositol 1,4,5-trisfosfat reseptörü (IP₃R) olarak adlandırılmaktadır. Reseptörlerin protein yapısı, RyR'ler ile belirgin şekilde benzerlik taşımaktadır. IP₃R'ler, IP₃, ve RyR'ler gibi Ca⁺² ile aktive olmakta, yine RyR benzeri şekilde, fakat özellikle yüksek derişimdeki Ca⁺² ile inaktif hale gelmektedir (81). Reseptörün IP₃'e adaptasyon gösterdiğine dair de bulgular vardır (82). Reseptörün ayrıca ATP, fosforilasyon ve FKBP12 ve kalmodülin gibi proteinler ile de etkileştiği ve bu proteinlerin reseptör fonksiyonunu düzenlediği bilinmektedir (81).

Uyarılabilir olmayan hücrelerde, Ca⁺² sinyalini oluşturan temel mekanizma, IP₃ etkili Ca⁺² salınımıdır. Bu salınımı sağlayan IP₃ molekülü, hücre zarında bulunan fosfaditil inositol 4,5-bifosfatın (PIP₂), fosfolipaz C (PLC) tarafından IP₃ ve diaçilgliserole (DAG) parçalanması ile oluşur. Başka bir sinyal molekülü olan DAG, hücrede önemli fonksiyonları olan protein kinaz C'yi (PKC) ve bazı TRP kanallarını aktive ederken, IP₃, IP₃R'lerden Ca⁺² salınımına yol açar (75).

IP₃ oluşumunu sağlayan PLC'nin çeşitli alt tipleri arasında en önemlilerden birisi PLC-β'dir. Bu protein, G protein kenetli reseptörlerin (GPKR), dış ortamdan gelen ligandlarla etkileşmesi sonucu aktive olur. Çeşitli G proteini alt tiplerinden biri olan G_q proteinleri ile kenet oluşturan reseptörler, ligandlar aracılığıyla uyarıldığında, heterotrimerik yapıda olan, Gα ve Gβγ alt ünitelerinden oluşan G_q

proteinlerinde, uyarılmamış durumda guanozindifosfat (GDP) bağılı olan $G\alpha$ alt ünitesinde, GDP/guanozintrifosfat (GTP) değiş tokuşu yaşanır. Aktive olan $G\alpha$, PLC- β 'yı aktive ederek IP_3 oluşumunu sağlamış olur. Bu süreçte GTP'nin GDP'ye hidrolizi, $G\alpha$ 'nın tekrar $G\beta\gamma$ ile bir araya gelmesine yol açar, bu sayede sinyal bir sonraki döngüye dek sonlanmış olur (75).

Aynı fonksiyona sahip, fakat farklı uyarılarla aktive olan başka PLC alt tipleri de vardır. Bunlar, PLC- γ , PLC- δ ve PLC- ϵ proteinleridir. Bunlar arasında fonksiyonu en iyi açıklığa kavuşturulan PLC- γ , reseptör tirozin kinazların dış ortamdan gelen uyarılarla aktivasyonu sonucu aktive olmaktadır, PLC- δ 'nın G_h kenetli reseptör aktivasyonu ve KKG ile aktive olduğu düşünülmektedir. PLC- ϵ 'un ise, G_{12} ve G_s kenetli reseptörleri de içeren, birden fazla sinyal yolağını kullandığına dair bulgular vardır (83).

3.5. Gadoliniumun Kalsiyum Kanallarıyla Etkileşimi

Gadolinium'un etkilerini, Ca^{+2} bağlayan veya kalsiyum iyonlarının doğrudan etkilerini oluşturan zar proteinlerini etkileyerek Ca^{+2} bağımlı mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiği tanımlanmıştır. Gadolinium, inhibitör etkisi en güçlü olan lanthanide iyonudur (84).

Kalsiyum bağlayıcı alanlara olan yüksek afinitelerinin bir sonucu olarak, lanthanide'ler 'supercalcium' olarak da adlandırılmaktadırlar (85).

Gadoliniumun nöroblastom hüçlerinde kalsiyum kanallarını inhibe ettiği gösterilmiştir. Lanthanide katyon Gd^{+3} 'in voltaj bağımlı kalsiyum akımları

üzerindeki etkisi nöroblastoma x gliom (NG108-15) hücreleri üzerinde bir tüm hücre klemp tekniği kullanılarak incelenmiştir. Gd^{+3} kalsiyum akımların amplitüdünü azaltmıştır. Gd^{+3} tarafından üretilen inhibisyon miktarı; konsantrasyona bağımlı olarak, yaklaşık 0,5 ile 5 μM arasında olup yaklaşık 10-20 μM 'da maksimuma ulaşılmıştır. Total kalsiyum akımının bir kısmı Gd^{+3} yaptığı blokaja direnç göstermiştir. Aynı çalışmada kullanılan deneysel koşullarda, kalsiyum akımları, biri Gd^{+3} tarafından seçici olarak blokajlanan, kalsiyum kanallarını üç ayrı alt tipinin aktivitesini yansıtan, en az üç ayrı bileşenden oluştuğu bildirilmiştir (86).

Gadolinium, kalsiyumla yarışarak onu sarkoplazmik retikulumdaki yerinden edebilir (87). Gd^{+3} , nöronlarda voltaj duyarlı Ca^{+2} akımını azaltmaktadır (88). Daha ayrıntılı çalışmalar gadoliniumun voltaj kapılı nöroblastom hücrelerinde N-tipi (86), hipofiz hücrelerinde T-tipi ve L-tipi Ca^{+2} kanalları blokladığını ortaya çıkarmıştır (89). Gd^{+3} 'nın SR Ca-ATPaz üzerindeki Ca^{+2} bağlayıcı alana bağlanması nedeniyle oluşan inhibitör etkisi de tariflenmiştir (90, 91).

Bir çalışmada, gadoliniumun ryanodine reseptörü (RyR1) üzerindeki bağlanma alanlarına geri dönüşlü ve konsantrasyona bağımlı bir şekilde bağlandığı izlenimi de bildirilmiştir (85).

Gadolinium'un 10 μM miktarının yüksek voltajlı kalsiyum akımını tamamen durdurduğu gösterilmiştir (92).

Ancak hücre hareketlerinin değerlendirildiği bir çalışmada da ortaya konulduğu gibi kalsiyum akımını durdurması diğer Ca^{+2} kanal inhibitörleriyle

karşılaştırıldığında hareket kabiliyetli hücrelerin dokular arası geçişini fazla etkilemeyerek belirgin farklılık arz etmektedir (93).

3.6. Dorsal Kök Gangliyonu Nöronlarının Özellikleri

DKG nöronları somatosensöriyal bilgiyi AP olarak merkezi sinir sistemine (MSS) taşır. Bu nöronların iki ana tipi vardır: Birincisi; düşük yoğunluklu, hasar oluşturmayan ve normalde ağrı vermeyen uyarılara cevap veren non-nosiseptif nöronlar, ikincisi; yüksek yoğunluklu, hasar oluşturucu ve normalde ağrı verici stimulusa karşı cevap oluşturan nosiseptif nöronlardır (94). Hücresel elektrofizyoloji çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılan DKG, duyuusal nöronların elektrofizyolojik ve farmakolojik olarak incelenmesinde iyi bir model oluşturmuştur.

DKG nöronları, iletim hızına göre C ($\leq 0,8$ m/sn), A δ (1,5-6,5 m/sn) ve A α/β ($>6,5$ m/sn) şeklinde sınıflandırılmaktadır (94). DKG nöronları ile ilgili yapılan çalışmalar farklı DKG nöronlarının farklı Na⁺ (95), K⁺ (96) ve Ca⁺² kanal akımlarına sahip olduğunu göstermektedir (97).

DKG nöronlarının diğer bir sınıflandırması ise çap boyutu açısından yapılmaktadır. DKG nöronları çaplarına göre büyük (>50 μ m çap), orta (30-50 μ m çap) ve küçük (<30 μ m çap) olmak üzere üç alt sınıfa ayrılır (98). DKG nöronlarında iyon akımlarının biyofiziksel özelliklerinin ve iyon kanal alt birimlerinin dağılımının hücre çapıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (99). Na⁺ kanallarıyla ilgili ağrı ve analjezi çalışmalarında küçük çaplı DKG nöronları

kullanılmaktadır. Bunun nedeni, büyük ve orta çapa sahip DKG nöronlarına kıyasla küçük çaplı nöronlarda daha fazla sayıda ve farklı tipte VKSK'nın eksprese olmasıdır (99). Ca^{+2} kanalları ile ilgili yapılan çalışmalarda da kanal alt birimi ve kanal yoğunluğunun DKG hücre çapıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bazı Ca^{+2} kanal alt birimleri küçük veya orta çaplı nöronlarda daha yoğun şekilde eksprese olurken bazı alt birimler ise büyük çaplı nöronlarda eksprese olmaktadır. Örneğin α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} , α_{1D} , α_{1E} , α_{1I} ve α_{1S} alt birimleri tüm DKG nöronlarında eksprese olurken, α_{1A} , α_{1D} , α_{1E} , α_{1I} ve α_{1S} 'nin küçük çaplı DKG nöronlarında daha yoğun bir şekilde eksprese olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında büyük çaplı DKG nöronlarına göre α_1 ve $\alpha_2\delta$ alt birimleri küçük ve orta çaplı nöronlarda daha yoğun şekilde eksprese olmaktadır (100).

3.7. Trigeminal Gangliyon Nöronlarının Özellikleri

DKG nöron hücreleri gibi trigeminal gangliyon (TG) nöronları da primer duyuşal nöronlar olup, nöronların somatosensoryal iletim zincirinin ilk halkasını teşkil ederler (101).

Ağrının hücreşel ve moleküller mekanizmasının anlaşılması için yapılan çalışmalarda neonatal ve embriyonik sıçanlardan izole edilen duyuşal nöronların primer ve kalıcı kültürleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (102). Kültüre edilmiş TG ve DKG duyuşal nöronları ile yapılan çalışmalarda, bu nöronların in vivo duyuşal nöronlarla benzer özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur (103).

TG nöronları somatosensöriyal bilgiyi DKG nöronları gibi AP olarak MSS'ye taşır. Hücrel elektrofizyoloji çalışmalarında DKG gibi kullanılan TG, model olarak duysal nöronların elektrofizyolojik ve farmakolojik olarak incelenmesinde kullanılmıştır (94, 104).

Memeli TG nöronlarda yapılan intrasellüler kayıtlar üç tür aksiyon potansiyelinin var olduğunu göstermiştir (105):

- 1) Çoğunluğu TTX ile tamamen bloke edilen hızlı akımlar
- 2) Cd^{+2} ve TTX'a dirençli tepeli akımlar ve
- 3) TTX dirençli ve Cd^{+2} duyarlı yavaş yavaş azalan aksiyon potansiyelleri.

Voltaaj bağımlı TTX dirençli ve TTX duyarlı sodyum kanalları, amiloride-duyarlı T-tipi, DHP-duyarlı L-tipi ve ω -konotoksin duyarlı N-tipi kalsiyum akımları TG nöronlarında da tanımlanmıştır. Yine proton-kapılı sodyum kanallarının üç alt tipi ile TTX dirençli sodyum kanalları da gösterilmiştir (105).

3.8. GT1-7 Nöronlarının Özellikleri

GT1-7 hücreleri, olgun hipotalamik GnRH nöronlarının özelliklerine sahiptir. GnRH nöronlarının sayıca az olmaları, beyinde yaygın olarak bulunmaları ve çok sayıda afferent sinyaller almaları sebebiyle in vivo çalışma zorluğu mevcuttur. Nöropeptidlerin etkisinin in vitro olarak çalışılması amacıyla GT1-7 hücreleri kullanılmıştır. GT1-7 hücreleri, GnRH nöronlarının özelliklerine sahip olduklarından spontan elektriksel aktivite, nöropeptid ekspresyonu ve nörosekresyon mekanizmalarının anlaşılması için uygun bir modeldir (106).

GT1-7 hücrelerinin transient reseptör potansiyeli üst ailesine ait kalsiyuma geçirgen katyon kanalları (TRPC) kapsadıkları gösterilmiştir. GT1-7 hücrelerinde en fazla eksprese edilen TRPC4 dır (107).

Çalışmalar, GT1-7 hücrelerinde GnRH pulsatil salgılanmasının ekzositotik salınmasına ve genetik transkripsiyon olaylarına bağlı olduğunu göstermiştir. GT1-7 hücreleri, kastre kemiricilerden elde edilen primer kültürlerdekine benzer interpulse aralıklı ve episodik tarzda GnRH salgılar (108). Pulsatil GnRH salınması GT1-7 hücrelerinin intrinsik bir özelliğidir (109). Kalsiyum GT1-7 hücrelerinde ekzositotik pulse aktivitesinin başlaması ve devamı için kritik bir öneme sahiptir (110). Kalsiyum kanallarının farmakolojik vasıtalarla bloklanması veya kalsiyumun uzaklaştırılması bu hücrelerde GnRH salınmasını engellemektedir (110-112). $[Ca^{+2}]_i$ GT1-7 hücrelerinde durağan halden yüksek ossilatör biçime kayar ve bu durum sıklıkla ekzositotik olaylar ile ilişkilidir (113). Ayrıca, GT1-7 hücrelerinin L-tipi voltaj kapılı Ca^{+2} kanal blokeri nimodipine ile muamelesi, sekretorik pulse aktivite frekansını azaltır (109). Kalsiyumun hücre içi cevabı başlatması çoğu zaman kalsiyuma bağlanan proteinlere ve daha sonra transkripsiyonel sistemin diğer regülatör unsurları ile ilişkisine bağlıdır. Bu proteinler arasında kalretinin, kalsineurin ve kalmodulin başlıcalarıdır (114).

Son zamanlarda, GT1-7 hücrelerinde hücrenin hem sitoplazma hem de nükleusundaki unsurlar ile ilişkiye girmeye muktedir yeni bir kalsiyum bağlayan protein belirlenmiştir. DREAM (downstream regulatory element antagonist

modulator) adlı protein kalsiyuma yüksek affiniteyle bağlı dört EF-hands kapsar (115, 116).

GT1-7 hücrelerinin melatonin reseptörü içerdini gösteren çalışmaların (117-119) varlığına karşılık, reseptörlerin belirlenemediği çalışmalar (120) da mevcuttur. Melatonin GT1-7 hücrelerinde hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunda artışa yol açtığı gösterilmiştir (121). Bu dolaylı olarak GT1-7 hücrelerinin melatonin reseptörü kapsadığına bir delil olarak kabul edilebilir. Sonuç olarak melatoninin GT1-7 hücreleri üzerindeki etkisi hücre içi Ca^{+2} düzeyini artırır.

3.9. Amaç (Hipotez)

GMRKA'ların metabolik koşullar altında gadolinyum iyonlarını serbest bırakarak ayrıştığı ve bu iyonların NSF'ye sebep olduğu hipotezi mevcuttur. GMRKA'ların sayı ve oran olarak büyük çoğunlukla sinir sistemi patolojilerinin tanınması ve değerlendirilmesinde kullanıldığı da bir gerçektir. Dolayısıyla sinir sistemi hücreleriyle yoğun temas ve etkinlik oluşmaktadır. Buna dayanarak farklı sinir doku hücre kültürlerinde gadolinyumun ve gadolinyum şelatlarının hücre işlevlerinin yürütülmesinde etkin olan hücre içi kalsiyumu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla Floresan Kalsiyum Görüntüleme kullanılarak henüz yapılamamış in vivo değerlendirmeye en yakın olabilecek yöntemle araştırılmasını öngörüldü.

Hipotezimiz, gadolinyum Şelatlarının in vivo metabolik koşullarda Gd^{+3} iyonlarını serbest bırakarak ayrıştığı varsayımıyla bu iyonların hücre içi kalsiyum oranlarını değiştirerek fizyopatolojik süreçleri etkilediği Őüphesidir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Elektrofizyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deneysel çalışmalara yerel Etik Kurul onayı (2011/04-70) alındıktan sonra başlandı.

Çalışmada dorsal kök gangliyon, trigeminal gangliyon hücre kültürleri ile GnRH nöron (GT1-7, immortalized GnRH neurons) hücre serisi kullanıldı.

Çalışmada kullanılan sıçan dorsal kök gangliyon ve trigeminal gangliyon sinir hücreleri laboratuvarında daha önce (122-124) tanımlanan yöntemlerle hazırlanarak kullanıldı. GT1-7 ise laboratuvarımızda kullanılmak üzere Dr. Pamela L. Mellon (University of California, San Diego) tarafından gönderilen hediye olarak gönderildi (fare nöroblastom hücre serisi) (106).

4.1. Kullanılan Alet-Cihazlar

- Titreşim Önleyici elektrofizyolojik masa (Intracel, İngiltere)
- Hassas terazi (Chyo JL-180, Japonya)
- pH Metre (Thermo Orion, Beverly, ABD)
- Ozmometre (Gonotec, Berlin, Almanya)
- Diseksiyon Mikroskobu (Olympus, Japonya)
- Karbondioksitli inkübatör (Heraus, Almanya)

- Sabit Hava Akımlı Güvenlik Kabini (Laminar Flow, Türkiye)
- Floresan Ataşmanlı Inverted Mikroskop, (Nikon TE2000 S, Japonya)
- Perfüzyon Ünitesi (Warner Instruments, ABD)

4.2. Hücre Kültürleri İçin Genel Prensipler

Hücre kültürü yapılması ve saklanması sırasında oluşabilecek kontaminasyonlara karşı gerekli önlemler alındı. Bu amaçla kullanılan tüm cerrahi malzemeler, cam saklama kapları, pipetler ve pipet uçları otoklav (Nüve, Ankara, Türkiye) yardımıyla sterilize edildi. Otoklavdan alınan malzemeler laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisine konulmadan önce % 70'lik alkolle tekrar temizlendi ve laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisine yerleştirildi. Steril halde temin edilen plastik malzemeler ise kullanılmadan önce % 70'lik alkol sprey üzerlerine sıkıldıktan sonra diğer cam malzemelerin yanına laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisine yerleştirildi. Laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisindeki ultraviyole ışık kaynağı, kabinde hücre kültürü yapılmadığı zaman aralıklarında açık olarak bırakıldı. Cerrahi malzemeler her kullanımdan önce, cam malzemeler ise her hücre kültürü yapılmadan önce sterilize edildi. Hücre kültürünün koyulacağı inkübatörün nemi, gaz düzeyi, sıcaklığı ve temizliğine özen gösterildi.

Hazırlanan tüm solüsyonların pH'sı ve osmolaritesi pH metre ve ozmometre kullanılarak ölçüldü. Solüsyonların ve cam saklama kaplarının üzerine

sırasıyla malzemenin ismi, hazırlandığı tarih ve hazırlayan kişinin isminin baş harfleri yazılarak işaretlendi.

Lameller kültür hazırlanmadan bir gün önce % 70'lik etanolden çıkartılarak laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisinde steril bir kurutma kağıdı üzerinde kurutuldu. Daha sonra 100 µl poly-L-ornitine (Sigma; 25 mg/ml stok solüsyon) 10 ml distile su ilave edildi ve bu sıvı 50 mm çapındaki steril bir petri kutusuna boşaltıldı. Kuruyan lameller alevden hızla geçirilerek bu poly-L-ornitin içeren sıvıya konuldu ve bir gece 37°C'de % 95 hava, % 5 karbondioksit içeren nemli bir inkübatörde bekletildi. Ertesi gün lameller inkübatörden alındı ve laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisinde bir forsepsle tek tek tutularak ard arda yerleştirilmiş 3 petri kutusunun içerisindeki steril distile suya daldırılarak yıkandı ve kurutma kağıdı üzerine konuldu. Kuruyan lameller her petri kutusuna bir tane lamel gelecek şekilde 12 adet 35 mm çapında steril petri kutusuna yerleştirildi. Hücrelerin yaşının ve vasatın değiştirilme günlerinin belirlenmesi için kültür tablası üzerine kültürün hazırlanış tarihi yazıldı. 100 µl laminin (5 µg/ml) her bir lamel üzerine ilave edilerek kültür tablası inkübatöre kaldırıldı. Aynı gün kültür vasatı da hazırlanarak yaklaşık 40 ml kültür medyumunu ve 10 ml fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuzlu suda (PBS) steril bir plastik tüp içerisinde ısınması amacıyla inkübatöre yerleştirildi. Diseksiyon mikroskobu ve diseksiyon cerrahi seti dezenfekte edilerek laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisine alındı.

Hücreler izole edilip önceden hücre dışı geliştirme matriksi, poli-D-lizin ve laminin kaplanmış 12 mm çapındaki cam lamellere (BD BioCoat, ABD) ekildikten sonra 37°C'de % 5 karbondioksit içeren nemli bir inkübatörde (Heraus, Almanya)

inkübasyona bırakıldı. Bu hücreler, en az 4-6 saat inkübe edilerek lamel üzerine iyice yapışması sağlandıktan sonra kalsiyum görüntüleme deneylerinde kullanıldı.

Hücre kültürü için Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (FÜDAM) sağlanan yavru sıçanlar “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (125) prensipleri doğrultusunda kullanıldı.

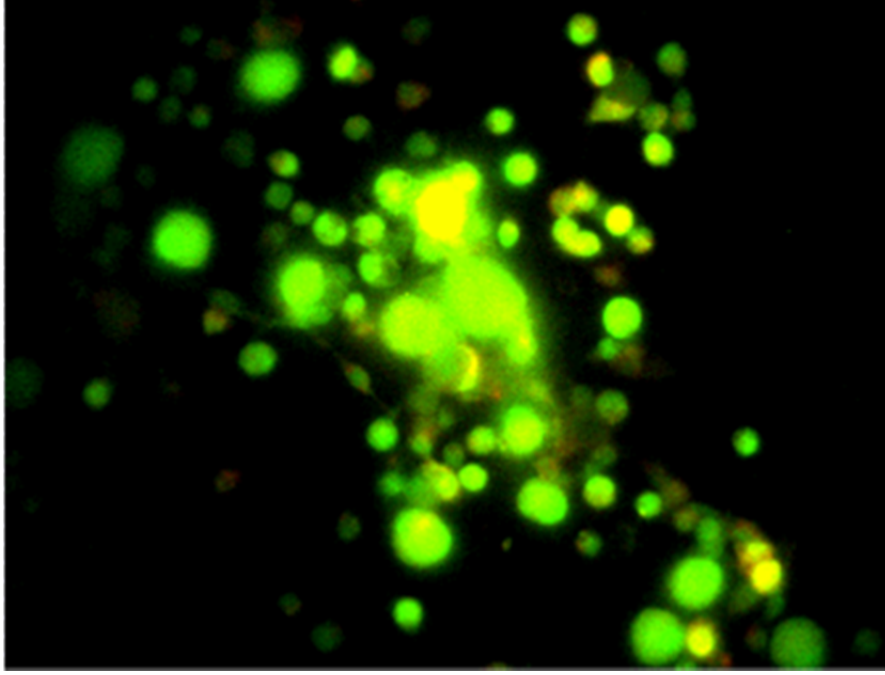
4.3. Dorsal Kök Gangliyonu Hücre Kültürü Protokolü

Temin edilen iki günlük Wistar cinsi sıçanlar dekapite edilerek, geniş bir petri kutusuna yerleştirildi. Küçük bir makasla vertebral kolon ayrıldı, daha sonra kaudal uçtan başlayarak boyuna kadar spinal kolonun içi yaylı bir küçük makasla açıldı. Bu izole spinal kolon petri kutularına yerleştirilmiş PBS ile 3 defa yıkandı. Daha sonra diseksiyon mikroskobu altında forsepslerle bütün DKG'ları hassas bir şekilde izole edilerek küçük bir petri kutusu içerisindeki kültür vasatına konuldu.

Bütün DKG gövdeleri çıkarılarak petri kutusunda toplandıktan sonra, petri kutusu hassas yuvarlak hareketlerle sallandı ve bütün gangliyonların bir araya toplanması sağlandıktan sonra kültür medyumu bir Pastör pipeti ile çekildi. Ardından 900 µl ılık (37°C'de inkübe edilmiş) kültür vasatı ve 100 µl kollagenaz (% 0,125, Sigma) ilave edilerek hafifçe çalkalandı ve 13 dakika süreyle inkübatörde tutuldu. Bu süre sonunda hücre, solüsyon, enzim karışımı inkübatörden alınarak hızla üç defa PBS ile yıkandı. Daha sonra 900 µl PBS ve 100 µl tripsin (% 0,25, Sigma) ilave edilerek hafifçe çalkalandı ve 6 dakika süreyle inkübe edildikten sonra 15 ml'lik steril plastik tüpe aktarıldı ve yaklaşık 4 ml ılık

kültür vasatı ilave edildi, gangliyonlar tüpün dibine çöktürüldükten sonra kültür vasatı Pastör pipeti ile uzaklaştırıldı ve bu işlem 3 defa tekrarlandı. Daha sonra 100 µl DNAz (Sigma) ve 900 µl kültür medyumunu ilave edilerek ucu daraltılmış steril bir Pastör pipetine hızla çekip boşaltarak gangliyonlar mekanik olarak tek hücrelere ayrıştırıldı. Bu çekip boşaltma işlemi 3-6-9 defa kademeli olarak yapıldı. Her bir kademede üstte kalan süspansiyon alınarak diğer gangliyonlara mekanik ayrıştırma işlemi devam edildi. Şayet gangliyon topağı tam olarak dokuz çekip boşaltmadan sonra hala ayrılmadıysa bu işleme 14 defaya kadar devam edildi. Hücre kültür vasatı süspansiyonu, kültür vasatı ilave edilerek 2,4 ml'ye tamamlandı. Daha sonra inkübasyon için daha önceden lamininle kaplanan lamellerin bulunduğu küçük petri kutuları inkübatörden alındı. Lamellerin laminin ile inkübasyon zamanı en az 3-4 saat olduğu için dekapitasyon işlemine başlamadan yaklaşık olarak en az 2 saat önce laminin ekim işlemi tamamlandı. Laminin içeren sıvının büyük bir kısmı lamellerden uzaklaştırıldıktan sonra hücre süspansiyonu bulunan solüsyona 240 µl sinir büyütme faktörü (NGF, 2.5 S, Sigma) eklendi ve her lamele 150 µl hücre içeren bu solüsyon ekildi ve yaklaşık 4-6 saat süreyle inkübatörde bekletildi. Bu sinir hücreleri laminin-polyornithin ile yüzeyi kaplı cam lameller üzerine ekilerek 37°C derecede, % 5 karbondioksit içeren nemli inkübatörde kullanılıncaya kadar (maksimum 2-3 hafta) inkübe edildi. Yaklaşık 6 saat sonra DKG hücreleri (Şekil 1) floresan kalsiyum görüntüleme deneylerinde kullanılmaya başlandı.

Sinir hücre kültür medyumunu; F14, ısıyla inaktive edilmiş % 10'luk at serumu, sinir büyütme faktörü, penisilin+streptomisin içermektedir.



Şekil 1. Fura-2-AM ile Yüklendiş DKG Hücrelerinin Mikroskop Altındaki Görünümleri.

4.4. Trigeminal Gangliyon Hücre Kültürü Protokolü

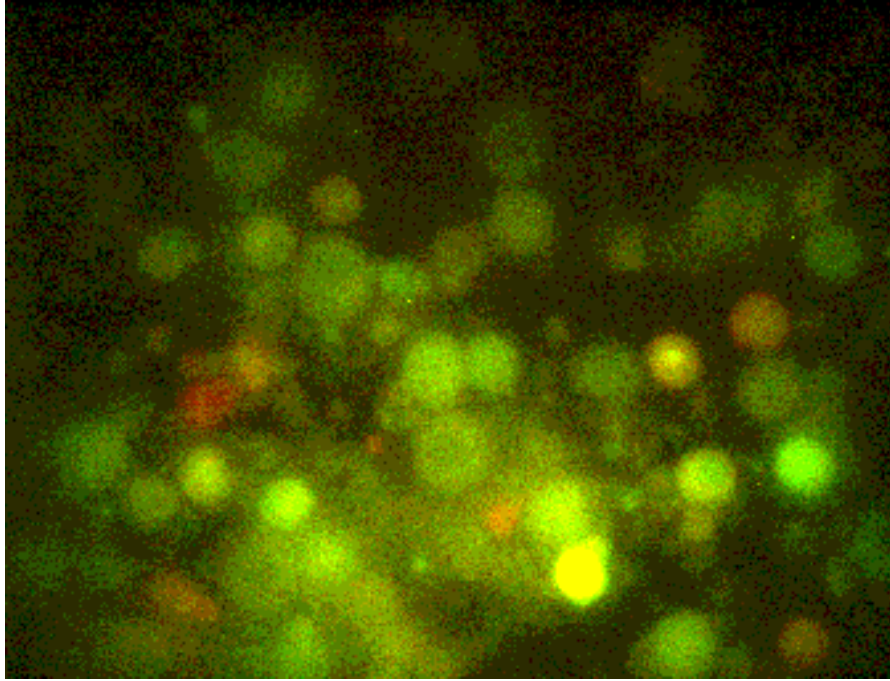
Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edilen iki günlük Wistar cinsi sıçanlar dekapite edilerek başları bir petri kutusuna yerleştirildi. Küçük bir makasla MSS etrafındaki bağ doku kaldırılarak beyin ortaya çıkarıldı. Pontin fleksuralardan geçen enine bir kesi yapılarak her iki hemisfer ve orta beyin dışarı diseke edildi. Ardından, arka beyin dâhil üst servikal spinal kord diseke edilerek bağ doku ve meninkslerden arındırıldı. Her iki taraftaki TG ve uzantılarına zarar vermemeye dikkat edildi. Daha sonra diseksiyon mikroskobu

altında makas ve forsepslerle her iki TG hassas bir şekilde uzantılarından kesilip izole edilerek küçük bir petri kutusu içerisindeki kültür vasatına konuldu.

TG gövdeleri çıkarılarak petri kutusuna konulduktan sonra, petri kutusu hassas yuvarlak hareketlerle sallandı ve gangliyonların bir araya toplanması sağlandı. Sonra kültür medyumu bir Pastör pipeti ile çekildi. Ardından 900 µl ılık (37°C'de inkübe edilmiş) kültür vasatı ve 100 µl kollagenaz (% 0,125) ilave edilerek hafifçe çalkalandı ve 13 dakika süreyle inkübatörde tutuldu. Bu süre sonunda hücre, solüsyon, enzim karışımı inkübatörden alınarak hızla üç defa PBS ile yıkandı. Daha sonra 800 µl PBS ve 200 µl tripsin (% 0,5) ilave edilerek hafifçe çalkalandı ve 6 dakika süreyle inkübe edildikten sonra 15 ml'lik steril plastik tüpe aktarıldı ve yaklaşık 4 ml ılık kültür vasatı ilave edildi, gangliyonlar tüpün dibine çöktürüldükten sonra kültür vasatı Pastör pipeti ile uzaklaştırıldı ve bu işlem 3 defa tekrarlandı. Daha sonra 100 µl DNaz ve 900 µl kültür medyumu ilave edilerek ucu daraltılmış steril bir Pastör pipetine hızla çekip boşaltarak gangliyonlar mekanik olarak tek hücrelere ayrıştırıldı. Bu çekip boşaltma işlemi 3-6-9 defa kademeli olarak yapıldı. Her bir kademede üstte kalan süspansiyon alınarak gangliyonlara mekanik ayrıştırma işlemi devam edildi. Şayet gangliyon topağı tam olarak 9 çekip boşaltmadan sonra ayrılmadıysa bu işleme 14 defaya kadar devam edildi. Hücre kültür vasatı süspansiyonu, kültür vasatı ilave edilerek 2,4 ml'ye tamamlandı. Daha sonra inkübasyon için daha önceden lamininle kaplanan lamellerin bulunduğu küçük petri kutuları inkübatörden alındı. Lamellerin laminin ile inkübasyon zamanı en az 3-4 saat olduğu için dekapitasyon işlemine başlamadan yaklaşık olarak en az 2 saat önce laminin ekim işlemi

tamamlandı. Laminin içeren sıvının büyük bir kısmı lamellerden uzaklaştırıldıktan sonra hücre süspansiyonu bulunan solüsyona 240 µl sinir büyütme faktörü (NGF) eklendi ve her lamele 150 µl hücre içeren bu solüsyon ekildi ve yaklaşık 4-6 saat süreyle inkübatörde bekletildi. Bu sinir hücreleri laminin-polyornithin ile yüzeyi kaplı cam lameller üzerine ekilerek 37°C derecede, % 5 karbondioksit içeren nemli inkübatörde kullanılıncaya kadar (maksimum 2-3 hafta) inkübe edildi. Yaklaşık 6 saat sonra TG hücreleri (Şekil 2) floresan kalsiyum görüntüleme deneylerinde kullanılmaya başlandı.

Sinir hücre kültür medyumunu; F14, ısıyla inaktive edilmiş % 10'luk at serumu, sinir büyütme faktörü, penisilin+streptomisin içermektedir.

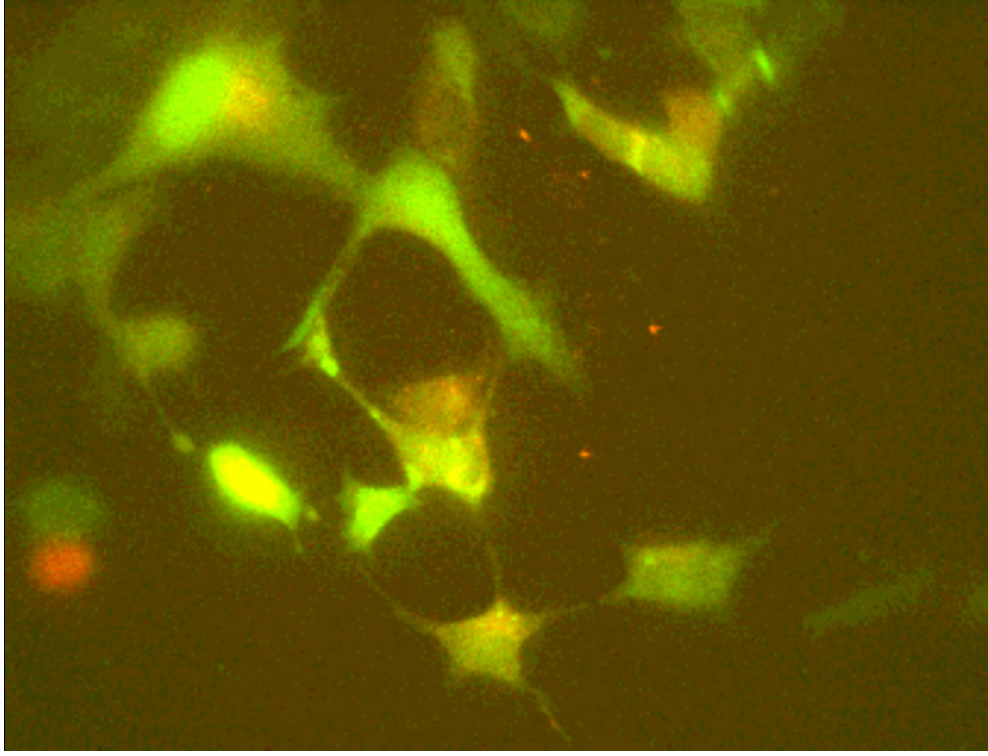


Şekil 2. Fura-2-AM ile Yüklendi TG Hücrelerinin Mikroskop Altındaki Görünümleri.

4.5. GT1-7 Hücre Serisi Protokolü

Hediye hücre serisi süspansiyonu, kültür vasatı ilave edilerek 2,4 ml'ye tamamlandı. İnkübasyon için daha önceden lamininle kaplanan lamellerin bulunduğu küçük petri kutuları inkübatörden alınarak laminin içeren sıvının büyük bir kısmı lamellerden uzaklaştırıldıktan sonra hücre süspansiyonu bulunan solüsyona 240 µl sinir büyütme faktörü (NGF) eklendi ve her lamele 150 µl hücre içeren bu solüsyon ekildi ve yaklaşık 4-6 saat süreyle inkübatörde bekletildi. GT1-7 hücreleri laminin-polyornithin ile yüzeyi kaplı cam lameller üzerine ekilerek 37°C derecede, % 5 karbondioksit içeren nemli inkübatörde kullanılıncaya kadar (maksimum 2-3 hafta) inkübe edildi. Yaklaşık 6 saat sonra GT1-7 hücreleri (Şekil 3) floresan kalsiyum görüntüleme deneylerinde kullanılmaya başlandı.

Sinir hücre kültür medyumu; F14, ısıyla inaktive edilmiş % 10'luk at serumu, sinir büyütme faktörü, penisilin+streptomisin içermektedir.



Şekil 3. Fura-2-AM ile Yüklendiş GT1-7 Hücrelerinin Mikroskop Altındaki Görünümleri.

4.6. Gadolinyum ve Şelatlarının Standart Koşullar Altında Uygulanılması

Çalışmada gadolinyum (Gadolinium ICP/DCP standard solution 10,006 $\mu\text{g/mL Gd}^{+3}$ in 2 % HNO_3 , 100 ml PN: 356220, Fluka, Taufkirchen, Germany) ile dünya piyasalarında yaygın olarak bulunan GMRKA'lardan; Gadodiamid (Gd-DTPA-BMA) (Omniscan™ 0.5 mmol/ml, Amersham Health, Cork, Ireland) ve Meglumin Gadoterat (Gd-DOTA) (Dotarem® 0.5 mmol/mL, Guerbet, Aulnay-sous-Bois, France) temin edilerek kullanıldı.

GMRKA'lar ve gadolinyum, GMRKA'ların tavsiye edilen kullanım dozu olan 0,1 mmol/kg olduğundan vücut dağılım hacmi \approx hücre dışı sıvı hacmi \approx 200 ml/kg kabul edilerek 5 mmol/1000 ml (5 milimolar) uygulama ortam konsantrasyonu oluşturulacak şekilde hazırlanılarak aynı pH ve oda sıcaklık değerlerinde hücre kültürlerine uygulandı. Aşağıda tariflenen yöntemle değerlendirme yapıldı.

4.7. Hücre İçi Kalsiyum Görüntüleme Tekniği ve Görüntü Analizleri

Kültüre hücreler en az 4-6 saat inkübe edildikten ve lamel üzerine iyice yapışması sağlandıktan sonra bir saat süreyle 1 μ M Fura-2-AM içeren NaCl esaslı hücre dışı kayıt solüsyonunda (135 mM NaCl, 5,9 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 11,5 mM glikoz, 11,6 mM HEPES) inkübe edilerek floresan boya hücrelere yüklendi. Bu esnada pH NaOH kullanılarak 7,4'e ozmolarite ise sukroz kullanılarak 310-320 mOSm'a ayarlandı. Ardından hücreler taze hücre dışı kayıt solüsyonu ile 20 dakika süresince yıkanarak hücre dışındaki Fura-2-AM uzaklaştırıldı ve hücre içi kalsiyuma duyarlı boyanın de-esterifikasyonu sağlandı.

Kalsiyum duyarlı floresan boya ile yüklenen hücreleri içeren lameller kayıt sistemine aktararak floresan ataşmanlı ters mikroskoba (Eclipse TE2000-S mikroskop, CFI S Fluor 40XH N.A.: 1.3 objektif; Nikon, Tokyo, Japan) bağlantılı perfüzyon sistemine (Warner Instruments, ABD) yerleştirildi (Şekil 4). Mikro inkübasyon-perfüzyon sistemi aracılığıyla NaCl-esaslı hücre dışı solüsyonu ile kayıt çemberi ince silikon hortum ile bağlantılı, açma kapaması bilgisayar kontrollü, akım hızı yerçekimine göre ayarlanan ilaç uygulama/perfüzyon sistemi

(Warner Instruments, ABD) aracılığı ile (1ml/dakika) sürekli perfüze edildi ve gerektiğinde mikroskop altında göz ile değerlendirildi. Hücreler floresan ışık kaynağı ve filtre sürücü aracılığı ile 340 - 380 nm UV dalga boyunda uyarılarak (uyarı 340-380 nm, emisyon 510 nm) görüntüler yüksek hızlı soğutmalı dijital CCD kamera (Orca-285, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) ve veri kazanım ve analiz modülü Simple PCI C-Imaging (Hamamatsu Co., Sewickley, PA, USA) aracılığı ile kayıt ve analiz edildi (Şekil 4). Hücre içi kalsiyum sinyalleri uyarılarak, DKG ile TG hücrelerinde KCl ve GT1-7 hücrelerinde melatonin ile uyarı standart kabul edilerek Gd^{+3} ve GMRKA'ların etkileri pik değerleri olarak saptandı. DKG ile TG hücrelerinde KCl ve GT1-7 hücrelerinde melatonin ile non-spesifik depolarizasyonla hücreler uyarılmaya çalışıldı ve indüklenen kalsiyum sinyalleri üzerine Gd^{+3} ve GMRKA'ların etkileri incelendi. Bütün deneyler oda ısısında ($\approx 22^{\circ}C$) ve karanlık ortamda gerçekleştirildi. Deneysel işlemler hücrelerin floresan işaretleyici ile yüklenmesinden maksimum bir saat içerisinde gerçekleştirildi. Floresan boyanın ışığa maruz kalarak ağarmasını sınırlandırmak için optimum pozlama zamanı (exposure time) belirlendi ve bilgisayar kontrollü filtre sürücüsü perde (shutter) donanımı aracılığı ile görüntü alınmadığı zamanlarda ışık maruziyeti önlendi. Fura-2 floresansı bir Xenon ışık kaynağından (LS-Sutter Instr, ABD) gönderilen UV ışınının hızlı bir otomatize filtre sürücüsüne (Lambda-2, Sutter Instr, ABD) yerleştirilen fura-2 filtre seti 340 ve 380 nm filtrelerden (Chroma, ABD) gönderilerek sağlandı. Veriler aritmetik ortalama ve standard hata ($AO \pm SH$) olarak kaydedildi. Tüm ajanlar ile görüntü kayıt hızı ön

denemelerle belirlendi. Deneyler yapılırken her bir ajan için en az üç farklı kültüre ait lamellerden kayıt alındı.

Floresan oranı analizleri off-line olarak, cevap veren hücrelerde “ilgi alanı” seçimleri yapılarak Simple PCI yazılım programı aracılığıyla gerçekleştirildi. $[Ca^{+2}]_i$ hesaplanmasında 510 nm’de emisyon gerçekleştirilerek 340 nm eksitasyonda elde edilen floresan yoğunluğunun 380 nm eksitasyonla elde edilen floresan yoğunluğuna oranlanması (dual uyarı: 340 nm/380 nm; emisyon: 510 nm) esas alındı.



Şekil 4. Floresan Kalsiyum Görüntüleme Sisteminin Fotoğrafik Görünümü.

ilaç uygulama/mikroinkübasyon sistemi, CCD kamera, ters mikroskop, filtre sürücüsü, kontrol ünitesi ve kayıtların işlendiği bilgisayar sistemi.

4.8 İstatistiksel Metot

Bütün değerler; aritmetik ortalama, standard hata ($AO \pm SH$) olarak ifadelendi. İstatistiksel analizler ve grafikler sırasıyla; SPSS 15.0 ve Sigma Plot 10.0 programları kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirmede bağımsız gruplarda, iki grubun karşılaştırması için Student's t testi, üçlü grupların karşılaştırması için ise varyans analizi (Tukey HSD) kullanıldı. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

Çalışmamızda Ca^{+2} kanal blokörü etkilerine sahip olan Gd^{+3} ve in vivo Gd^{+3} kullanım imkânı sağlayan GMRKA'ların floresan kalsiyum görüntüleme yöntemi ile in vitro olarak hücre içi kalsiyum üzerine etkileri incelendiğinde:

5.1. Hücre İçi Floresan Kalsiyum Görüntüleme Bulguları

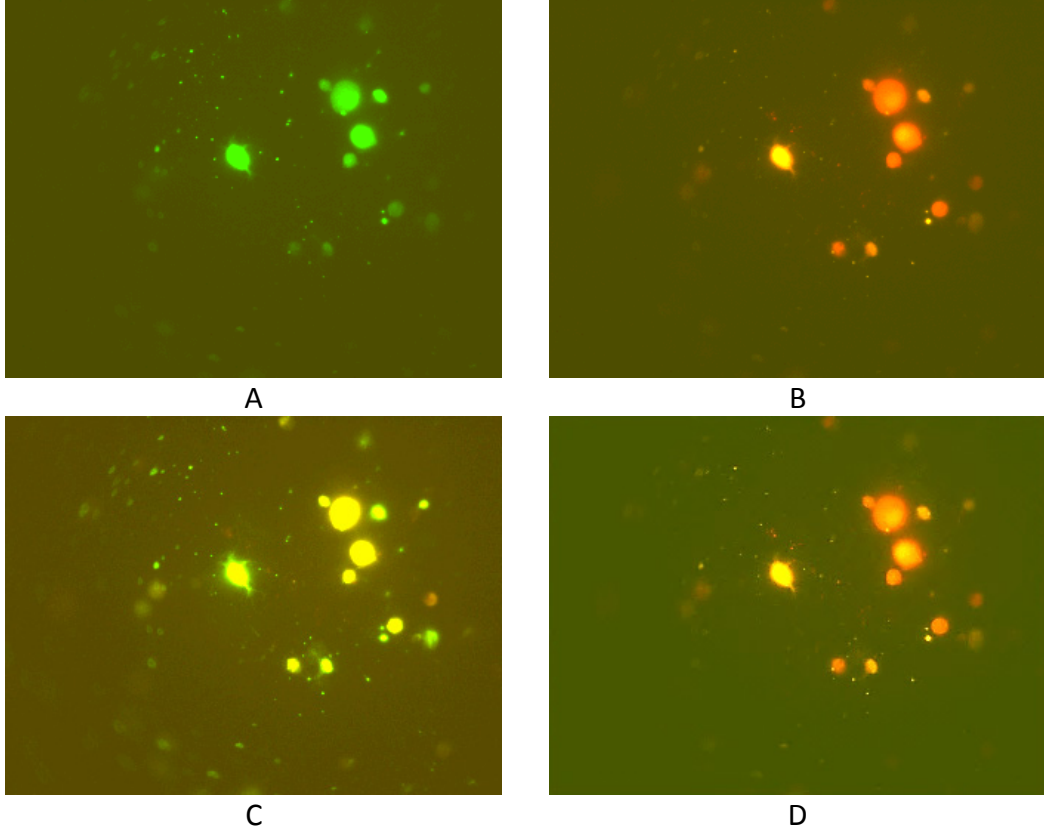
Çalışmanın gerçekleştirildiği deneysel şartlarda kalsiyuma duyarlı olan Fura-2-AM ile yüklenmiş DKG nöronlarından yaklaşık 45-60 dakika stabil floresan sinyalleri kaydedilebilmektedir. Kültüre edilmiş sinir hücreleri standart olarak yüksek K^{+} (30 mM) ile uyarılmaya cevaben hücre içi serbest kalsiyum düzeylerinde artış meydana getirir.

Çalışmanın gerçekleştirildiği deneysel şartlarda kalsiyuma duyarlı olan Fura-2-AM ile yüklenmiş TG nöronlarından yaklaşık 45-60 dakika stabil floresan sinyalleri kaydedilebilmektedir. Kültüre edilmiş sinir hücreleri standart olarak yüksek K^{+} (30 mM) ile uyarılmaya cevaben hücre içi serbest kalsiyum düzeylerinde artış meydana getirir.

Çalışmanın gerçekleştirildiği deneysel şartlarda kalsiyuma duyarlı olan Fura-2-AM ile yüklenmiş kültüre GT1-7 hücrelerinden yaklaşık 45-60 dakika stabil floresan sinyalleri kaydedilebilmektedir. Kültüre edilmiş sinir hücreleri standart

olarak yüksek melatonin (100 mM) ile uyarılmaya cevaben hücre içi serbest kalsiyum düzeylerinde artış meydana getirir. Laboratuvarımızdaki önceki deneyimlerimiz GT1-7 hücrelerinin melatonin etkisine tek seferlik cevap verdiği şeklindedir (121).

Çalışmada oransal floresan kalsiyum görüntüleme yöntemi kullanılarak kültüre edilmiş hücrelerin hücre içi serbest kalsiyum düzeyinde meydana gelen değişiklikler incelendi. Çalışmalar sırasında hem Gd^{+3} hem de GMRKA'ların DKG ile TG hücrelerinde K^+ 'ya ve GT1-7 hücrelerinde ise melatonin'e karşıt olarak hücre içi serbest kalsiyum düzeylerinde azalma meydana getirmesinden dolayı DKG ile TG hücrelerinde yüksek K^+ ön ve son uygulaması ve GT1-7 hücrelerinde ise melatonine tek yanıt oluşumu nedeni ile melatoninle sadece ön uygulama yapılarak (aynı sayıdaki farklı hücrelerin önceki sinyal düzeyleriyle karşılaştırarak) ajanların hücre içi serbest kalsiyum üzerine direk etkileri incelendi (Şekil 5).



Şekil 5. Örnek Olarak Gadodiamid'in Fura-2-AM İle Yüklenmiş Sıçan DKG Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisinin Gösterilmesi.

Tipik bir deney uygulamasına ait kayıt örneklerinde denenen ajanın (gadodiamid) uygulanmasının meydana getirdiği floresan oranı değişikliğini gösteren A) bazal B) KCl C) ajan+KCl D) KCl (kontrol, geri dönüşüm) uygulanması süreçlerinin fotografik görüntü kayıtları izlenmektedir.

5.2. Gadolinyum ve Gadolinyum'lu Manyetik Rezonans Kontrast Ajan'ların Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinin Hücre İçi Kalsiyum Düzeyi Üzerine Etkileri

Kalsiyuma duyarlı floresan boya Fura-2-AM ile boyanmış izole sıçan DKG nöron kültürlerinde hücre dışına uygulanan Gd^{+3} ve GMRKA'larının hücre içi serbest kalsiyum düzeyleri üzerine etkisi Tablo 2.1'de özetlenmiştir. Hücre dışına uygulanan Gd^{+3} (% $82,2 \pm 5,8$; $p < 0,001$) ve Gadodiamid (% $83,4 \pm 5,5$; $p < 0,001$) hücre içi bazal kalsiyum düzeylerinde Gd^{+3} daha fazla olmak üzere anlamlı azalma meydana getirirken Meglumin Gadoterat (% $98,7 \pm 3,4$; $p < 0,058$) anlamlı bir etki göstermedi. Son kontrol değerlendirmede Gd^{+3} geri dönüşümsüz (% $89,6 \pm 4,2$) olarak etki gösterirken Gadodiamid ile geri dönüşüm tama yakın idi (% $98,6 \pm 3,6$). Meglumin Gadoterat ise (% $99,3 \pm 2,3$) anlamlı bir etki göstermedi (Tablo 2.2 ve Şekil 6.1, 6.2, 6.3).

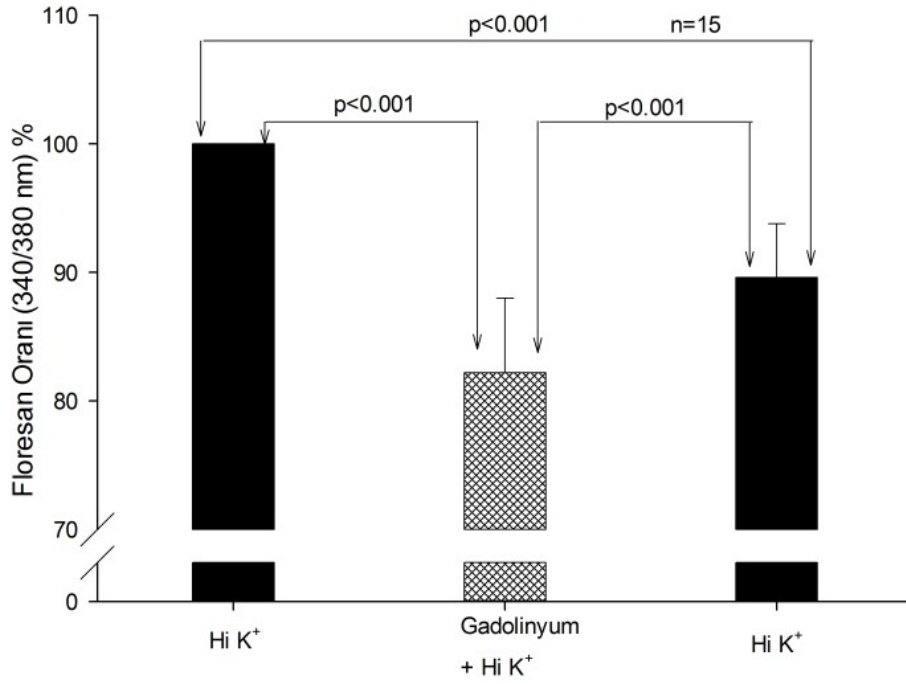
Tablo 2.1. Gd⁺³ ve GMRKA'ların Sıçan DKG Nöronlarındaki Etkilerinin Özetlenmesi.

	Cevap veren n (%)	Cevap vermeyen n (%)	Toplam n (%)
Gadolinium	15 (30)	35 (70)	50 (100)
Gadodiamid	57 (48)	62 (52)	119 (100)
Meglumin Gadoterat	25 (34)	49 (66)	74 (100)

Tablo 2.2. Gd⁺³ ve GMRKA'ların Sıçan DKG Nöron Kültürlerinde Hücre İçi Bazal Kalsiyum Düzeylerine Etkisi.

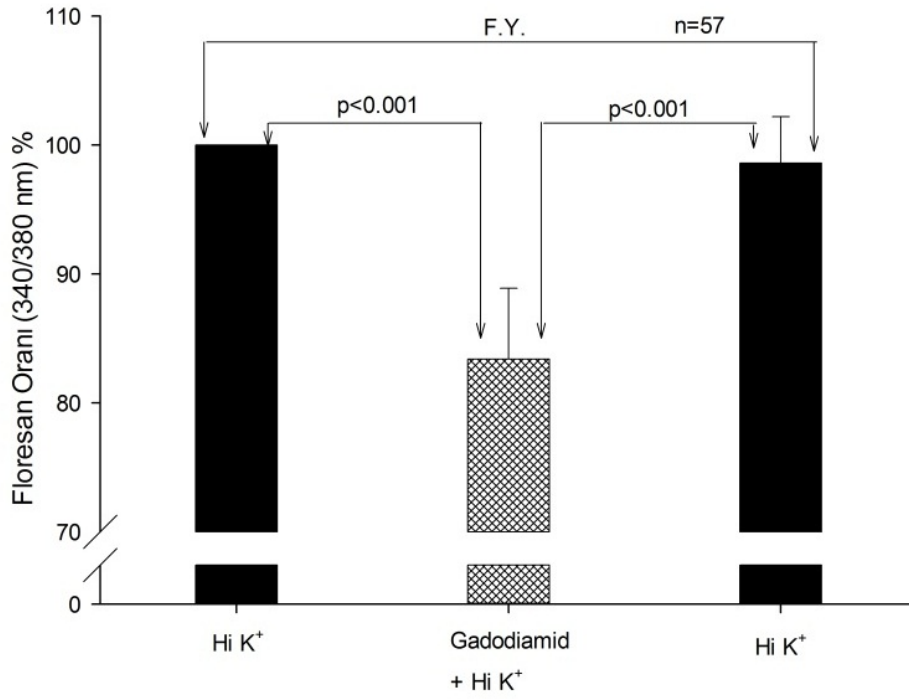
Ajan	Floresan Oranı (340/380 nM)				p	N
	Bazal KCl	Ajan + KCl	Kontrol KCl	Bazal/Ajan		
Gadolinium	100,0 ± 0,0	82,2 ± 5,8	89,6 ± 4,2	<0,001	<0,001	15
Gadodiamid	100,0 ± 0,0	83,4 ± 5,5	98,6 ± 3,6	<0,001	<0,001	57
Meglumin Gadoterat	100,0 ± 0,0	98,7 ± 3,4	99,3 ± 2,3	F.Y. (0,058)	F.Y. (0,282)	25

F.Y.: Fark Yok



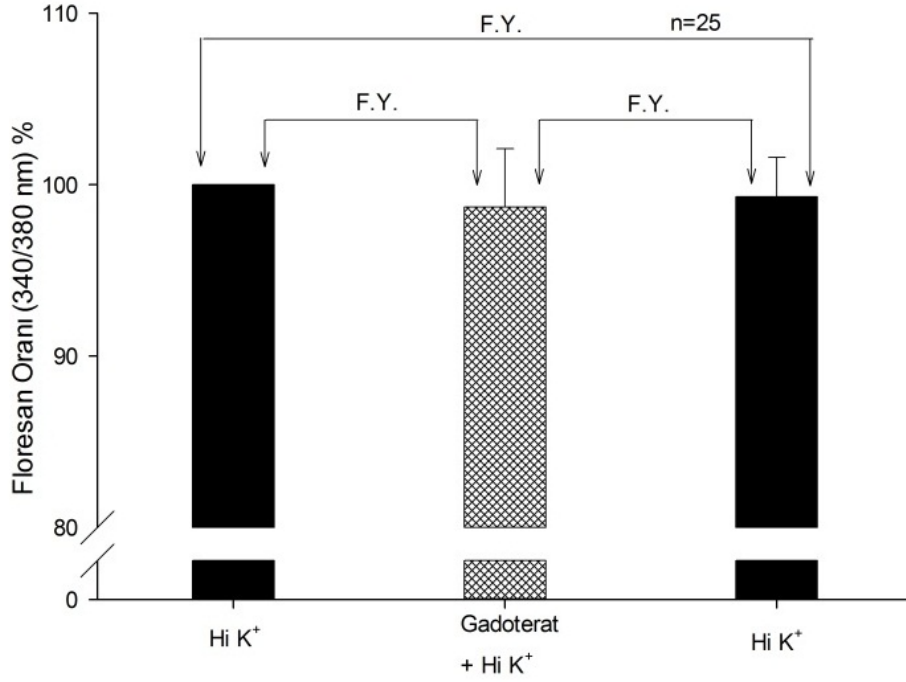
Şekil 6.1. Gadolinyum'un Sıçan DKG Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.

Grafik Fura-2-AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde gadolinyum uygulamasının meydana getirdiği floresan oranı değişikliğini gösteren deney uygulamasına ait ortalama verilerden elde edilmiştir. $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri, gadolinyum uygulamasından önce (bazal), gadolinyum uygulaması ve gadolinyum uygulamasını takiben tekrar (kontrol) şeklinde, floresan oranında meydana gelen değişikliklerin pik değerleri olarak belirlendi. Hata çubukları SH'yı göstermektedir.



Şekil 6.2. Gadodiamid'in Sıçan DKG Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.

Grafik Fura-2-AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde gadodiamid uygulamasının meydana getirdiği floresan oranı değişikliğini gösteren deney uygulamasına ait ortalama verilerden elde edilmiştir. $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri, gadodiamid uygulamasından önce (bazal), gadodiamid uygulaması ve gadodiamid uygulamasını takiben tekrar (kontrol) şeklinde, floresan oranında meydana gelen değişikliklerin pik değerleri olarak belirlendi. Hata çubukları SH'yı göstermektedir.



Şekil 6.3. Meglumin Gadoterat'ın Sıçan DKG Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.

Grafik Fura-2-AM ile yüklenmiş DKG sinir hücrelerinde meglumin gadoterat uygulamasının meydana getirdiği floresan oranı değişikliğini gösteren deney uygulamasına ait ortalama verilerden elde edilmiştir. $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri, meglumin gadoterat uygulamasından önce (bazal), meglumin gadoterat uygulaması ve meglumin gadoterat uygulamasını takiben tekrar (kontrol) şeklinde, floresan oranında meydana gelen değişikliklerin pik değerleri olarak belirlendi. Hata çubukları SH'yı göstermektedir.

5.3. Gadolinyum ve Gadolinyum'lu Manyetik Rezonans Kontrast Ajan'ların Trigeminal Gangliyon Hücrelerinin Hücre İçi Kalsiyum Düzeyi Üzerine Etkileri

Kalsiyuma duyarlı floresan boya Fura-2-AM ile boyanmış izole sıçan TG nöron kültürlerinde hücre dışına uygulanan Gd^{+3} ve GMRKA dozlarının hücre içi serbest kalsiyum düzeyleri üzerine etkisi Tablo 3.1'de özetlenmiştir. Hücre dışına uygulanan Gd^{+3} (% 86,6±4,1; p<0,001) ve Gadodiamid (% 94,2±4,6; p<0,01) hücre içi bazal kalsiyum düzeylerinde Gd^{+3} daha fazla olmak üzere anlamlı azalma meydana getirirken Meglumin Gadoterat (% 99,4±1,1; p<0,057) anlamlı bir etki göstermedi. Son kontrol değerlendirmede Gd^{+3} geri dönüşümsüz (% 88,9±4,9) olarak etki gösterirken Gadodiamid ile geri dönüşüm tama yakın idi (% 98,4±3,9). Meglumin Gadoterat ise (% 99,8±1,2) anlamlı bir etki göstermedi (Tablo 3.2 ve Şekil 7.1, 7.2, 7.3).

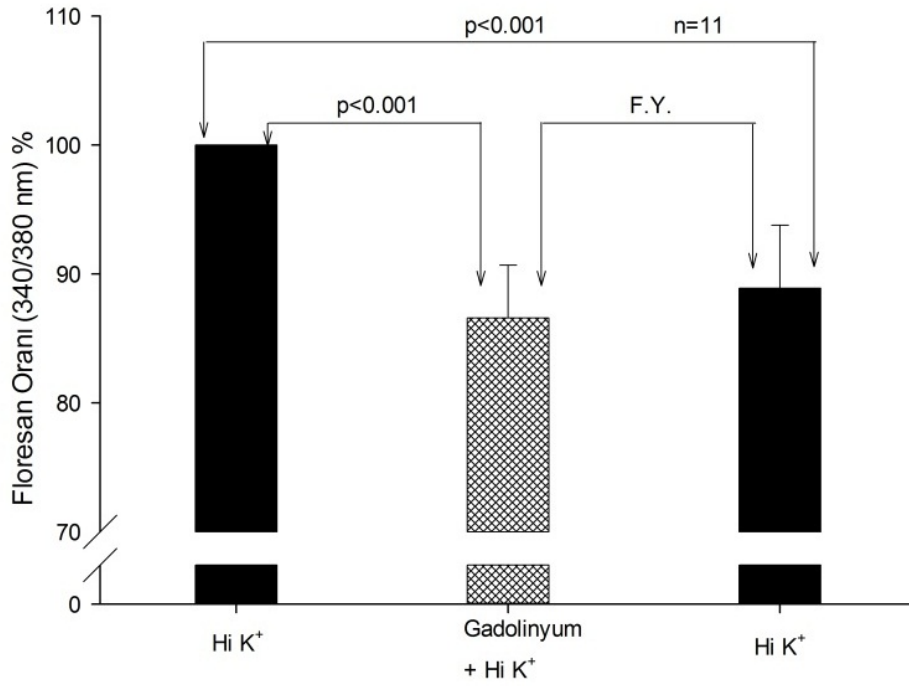
Tablo 3.1.1. Gd⁺³ ve GMRKA'ların Sıçan TG Nöronlarındaki Etkilerinin Özetlenmesi.

	Cevap veren n (%)	Cevap vermeyen n (%)	Toplam n (%)
Gadolinium	11 (39)	17 (61)	28 (100)
Gadodiamid	14 (42)	19 (58)	33 (100)
Meglumin Gadoterat	19 (43)	25 (57)	44 (100)

Tablo 3.2. Gd⁺³ ve GMRKA'ların Sıçan TG Nöron Kültürlerinde Hücre İçi Bazal Kalsiyum Düzeylerine Etkisi.

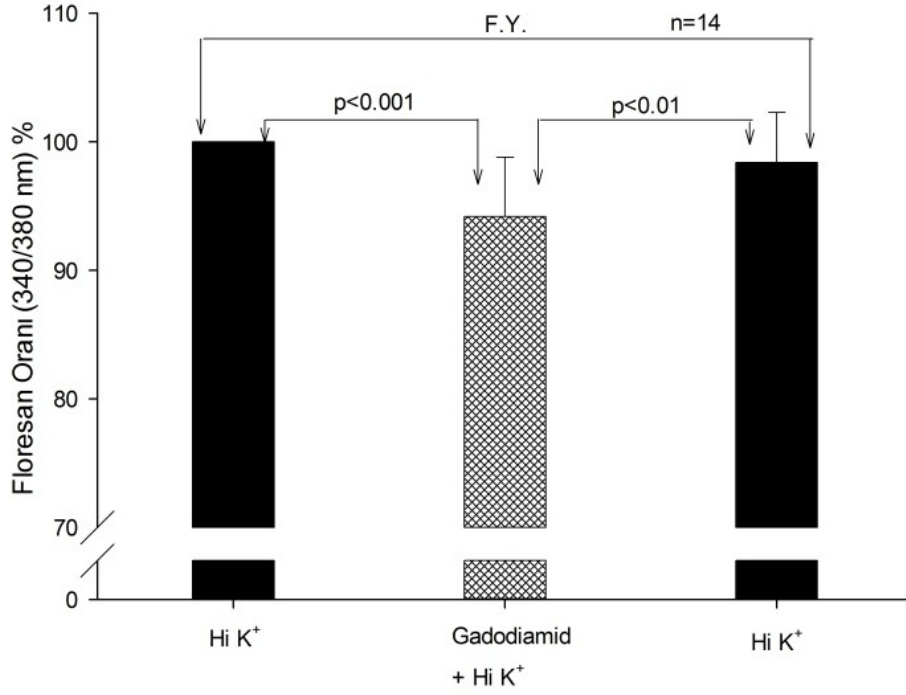
Ajan	Floresan Oranı (340/380 nM)				p	N
	Bazal KCl	Ajan + KCl	Kontrol KCl	Bazal/Ajan		
Gadolinium	100,0 ± 0,0	86,6 ± 4,1	88,9 ± 4,9	<0,001	F.Y. (0,159)	<0,001 11
Gadodiamid	100,0 ± 0,0	94,2 ± 4,6	98,4 ± 3,9	<0,001	<0,01 (0,004)	F.Y. (0,235) 14
Meglumin Gadoterat	100,0 ± 0,0	99,4 ± 1,1	99,8 ± 1,2	F.Y. (0,057)	F.Y. (0,198)	F.Y. (0,516) 19

F.Y.: Fark Yok



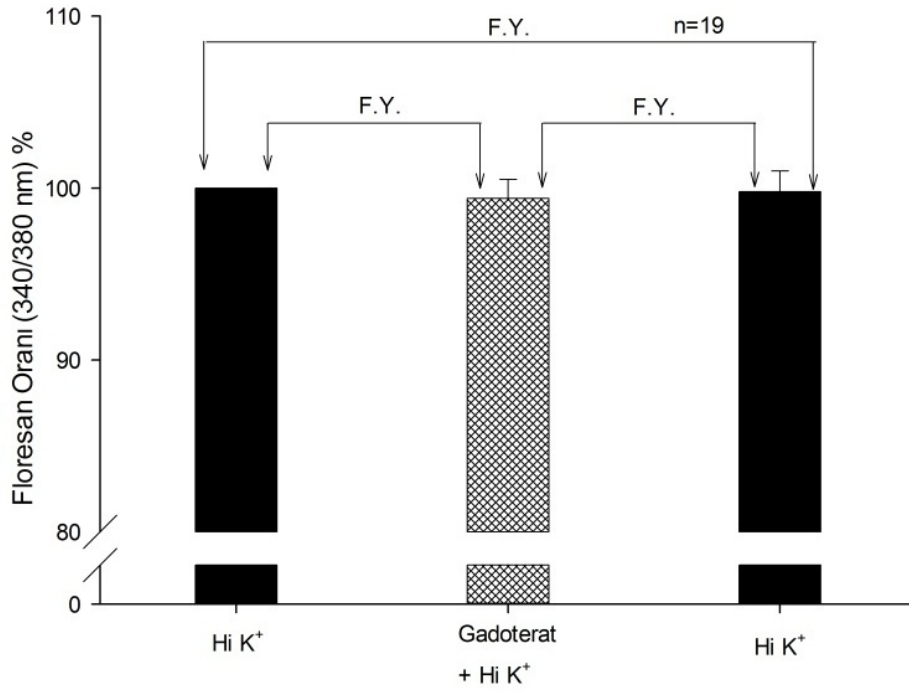
Şekil 7.1. Gadolinyum'un Sıçan TG Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.

Grafik Fura-2-AM ile yüklenmiş TG sinir hücrelerinde gadolinyum uygulamasının meydana getirdiği floresan oranı değişikliğini gösteren deney uygulamasına ait ortalama verilerden elde edilmiştir. $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri, gadolinyum uygulamasından önce (bazal), gadolinyum uygulaması ve gadolinyum uygulamasını takiben tekrar (kontrol) şeklinde, floresan oranında meydana gelen değişikliklerin pik değerleri olarak belirlendi. Hata çubukları SH'yı göstermektedir.



Şekil 7.2. Gadodiamid'in Sıçan TG Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.

Grafik Fura-2-AM ile yüklenmiş TG sinir hücrelerinde gadodiamid uygulamasının meydana getirdiği floresan oranı değişikliğini gösteren deney uygulamasına ait ortalama verilerden elde edilmiştir. $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri, gadodiamid uygulamasından önce (bazal), gadodiamid uygulaması ve gadodiamid uygulamasını takiben tekrar (kontrol) şeklinde, floresan oranında meydana gelen değişikliklerin pik değerleri olarak belirlendi. Hata çubukları SH'yı göstermektedir.



Şekil 7.3. Meglumin Gadoterat'ın Sıçan TG Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.

Grafik Fura-2-AM ile yüklenmiş TG sinir hücrelerinde meglumin gadoterat uygulamasının meydana getirdiği floresan oranı değişikliğini gösteren deney uygulamasına ait ortalama verilerden elde edilmiştir. $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri, meglumin gadoterat uygulamasından önce (bazal), meglumin gadoterat uygulaması ve meglumin gadoterat uygulamasını takiben tekrar (kontrol) şeklinde, floresan oranında meydana gelen değişikliklerin pik değerleri olarak belirlendi. Hata çubukları SH'yı göstermektedir.

5.4. Gadolinyum ve Gadolinyum'lu Manyetik Rezonans Kontrast Ajan'ların Kültüre GT1-7 Hücrelerinin Hücre İçi Kalsiyum Düzeyi Üzerine Etkileri

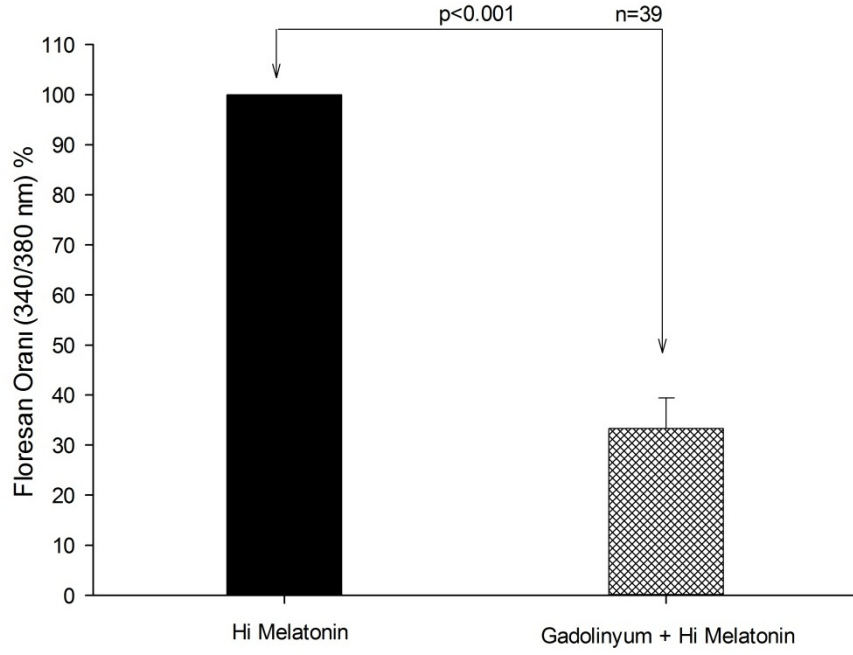
Kalsiyuma duyarlı floresan boya Fura-2-AM ile boyanmış izole sıçan GT1-7 nöron kültürlerinde hücre dışına uygulanan Gd^{+3} ve GMRKA dozlarının hücre içi serbest kalsiyum düzeyleri üzerine etkisi Tablo 4.1'de özetlenmiştir. Hücre dışına uygulanan Gd^{+3} (% $33,3 \pm 6,1$; $p < 0,001$) ve Gadodiamid (% $55,2 \pm 5,1$; $p < 0,001$) hücre içi bazal kalsiyum düzeylerinde Gd^{+3} daha fazla olmak üzere anlamlı azalma meydana getirirken Meglumin Gadoterat'ın (% $97,4 \pm 2,4$; $p < 0,001$) etkisi anlamlı ancak diğerleriyle karşılaştırılmayacak kadar hafifti (Tablo 4.2 ve Şekil 8.1, 8.2, 8.3).

Tablo 4.1. Gd⁺³ ve GMRKA'ların Sıçan GT1-7 Nöronlarındaki Etkilerinin Özetlenmesi.

	Cevap veren n (%)	Cevap vermeyen n (%)	Toplam n (%)
Gadolinium	39 (43)	51 (57)	90 (100)
Gadodiamid	43 (41)	62 (59)	105 (100)
Meglumin Gadoterat	23 (34)	45 (66)	68 (100)

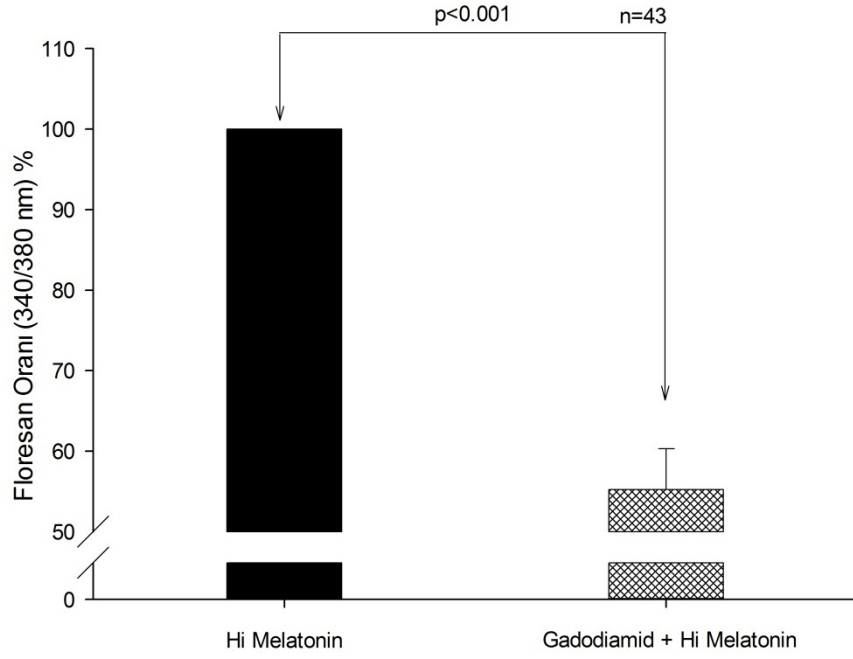
Tablo 4.2. Gd⁺³ ve GMRKA'ların Sıçan GT1-7 Nöron Kültürlerinde Hücre İçi Bazal Kalsiyum Düzeylerine Etkisi.

Ajan	Floresan Oranı (340/380 nM)		p	N
	Bazal Melatonin	Ajan + Melatonin		
Gadolinium	100,0 ± 0,0	33,3 ± 6,1	<0,001	39
Gadodiamid	100,0 ± 0,0	55,2 ± 5,1	<0,001	43
Meglumin Gadoterat	100,0 ± 0,0	97,4 ± 2,4	<0,001	23



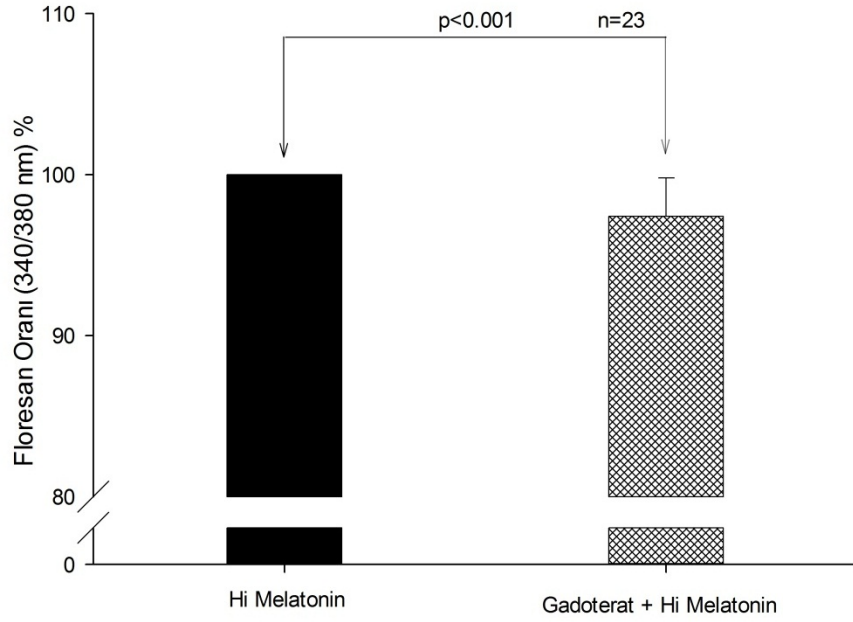
Şekil 8.1. Gadolinyum'un Sıçan GT1-7 Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.

Grafik Fura-2-AM ile yüklenmiş GT1-7 sinir hücrelerinde gadolinyum uygulamasının meydana getirdiği floresan oranı değişikliğini gösteren deney uygulamasına ait ortalama verilerden elde edilmiştir. $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri, gadolinyum uygulamasından önce (bazal) ve gadolinyum uygulamasını takiben floresan oranında meydana gelen değişikliklerin pik değerleri olarak belirlendi. Hata çubuğu SH'yı göstermektedir.



Şekil 8.2. Gadodiamid'in Sıçan GT1-7 Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.

Grafik Fura-2-AM ile yüklenmiş GT1-7 sinir hücrelerinde gadodiamid uygulamasının meydana getirdiği floresan oranı değişikliğini gösteren deney uygulamasına ait ortalama verilerden elde edilmiştir. $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri, gadodiamid uygulamasından önce (bazal) ve gadodiamid uygulamasını takiben floresan oranında meydana gelen değişikliklerin pik değerleri olarak belirlendi. Hata çubuğu SH'yı göstermektedir.



Şekil 8.3. Meglumin Gadoterat'ın Sıçan GT1-7 Hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Düzeylerine Etkisi.

Grafik Fura-2-AM ile yüklenmiş GT1-7 sinir hücrelerinde meglumin gadoterat uygulamasının meydana getirdiği floresan oranı değişikliğini gösteren deney uygulamasına ait ortalama verilerden elde edilmiştir. $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri, meglumin gadoterat uygulamasından önce (bazal) ve meglumin gadoterat uygulamasını takiben floresan oranında meydana gelen değişikliklerin pik değerleri olarak belirlendi. Hata çubuğu SH'yı göstermektedir.

6. TARTIŞMA

Gadoliniumun nöroblastom hücrelerinde kalsiyum kanallarını inhibe ettiği gösterilmiştir. GMRKA'lar stabilite sabitlerine ve transmetalasyon kinetiğine bağlı olarak toksik Gd^{+3} iyonlarının farklı oranlarda salınmasıyla sonuçlanan in vivo ayrılmaya uğrayabilirler. Bu tez çalışmasında serbest Gd^{+3} iyonlarının oluşumunun hücre içi kalsiyumu üzerine etkileri farklı hücrelerde araştırıldı.

Kalsiyum iyonu üremeden apoptoza kadar birçok hücrel fonksiyonun kontrolünden sorumlu ikinci haberci moleküldür (126).

Hücre dışından içine Ca^{+2} girişi yada hücre içi depolardan salınımıyla sitozolik serbest Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişim kalsiyum bağlayıcı proteinlerin (CaBP) aktivasyonuna ve buna bağlı olarak spesifik protein kinazların fosforilasyonuna neden olur (127).

Ca^{+2} bağımlı sinyal iletim sistemi kas kasılması, sekresyon ya da enzim aktivasyonu gibi fonksiyonlar için önemli bir mekanizmadır (128).

Bu sinyalin birçok büyüme faktörü ile mitojeni DNA transkripsiyonu düzeyinde aktive etmesiyle hücre farklılaşması sağlanır (127).

CaBP'ler hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki ($[Ca^{+2}]_i$) değişime bağlı olarak enzim, kanal ve yapısal proteinlerin aktivitelerini düzenler (129).

En önemli görevi değişen sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu kontrol etmek olmasına rağmen, CaBP'lerin tüm fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir.

CaBP'ler hücrede Ca^{+2} taşınımı ve tamponlanmasında rol oynar, ayrıca iyon kanallarının aktivitesini düzenleyerek Ca^{+2} girişinin kontrolünü sağlarlar ve eksiklikleri birçok patolojik duruma yol açar (130).

Hücre göçü, embriyogenez, bağışıklık (savunma mekanizmaları), yara iyileşmesi ve tümör metastazı oluşumu gibi çok sayıda fizyolojik ve patofizyolojik süreçte önemli bir rol oynar (93).

Periferik kandaki Dolaşan Fibrosit'lerin (DF) inflamasyon patofizyolojisinde ve deri lezyonlarının iyileşmesinde ayrıca doku fibrozisini gelişiminde özgün bir rol oynadığı ve dolayısıyla NSF patofizyolojisinde de DF'nin periferik kandan enflamasyon alanına göçünün neden olduğu düşünülmektedir (131, 132).

Hücre göçü, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi (133, 134), hücre-matriks bağlantılarının oluşumu ve salınımı (135), membran geri dönüşümü (136) ve iyon taşıyıcılarının ve kanallarının aktivasyonunun (137) karmaşık bir etkileşimine bağlıdır. Tüm bu süreçler optimal hücre göçü için gereklidir. Çeşitli çalışmalar göstermiştir ki, $[Ca^{+2}]_i$ hücre göçü için gerekli farklı mekanizmaların önemli bir koordinatörüdür (93, 138).

$[Ca^{+2}]_i$ yükselmesi, kortikal aktomyozin ağının kasılmasını sağlayan (139) integrinlerin bağlı buldukları hücre dışı ligandlardan ayrılmalarına yol açar (140) ve de Ca^{+2} duyarlı K^+ kanallarını aktive eder (93, 141).

Yine, Gadodiamid ile indüklenen myofibroblastların α -düz kas aktin fenotipine değişimi saptanmıştır (131, 142).

Uyarılabilir olmayan hücre tiplerinde yapılan çalışmalar Ca^{+2} 'un plazma zarından en az üç ana taşıma yolu olduğunu ortaya çıkarmıştır (143). Bir adet

Ca^{+2} kanalları yolu ile Ca^{+2} içeriye alım yolu (örneğin mekanosensitif veya depo kontrollü kanallar) ve iki adet Ca^{+2} dışarıya atım yolu Plazma Membranı Ca^{+2} ATPaz (PMKA) ve $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ değiştirici. Ca^{+2} içeriye akım yolu Gd^{+3} ile bloke olabilir (93, 144).

Çözünür Gd^{+3} şelatları sağlıklı insanlarda 1-5 saat içerisinde pasif glomerüler filtrasyonla değişmeden atılır. Böbrek yetmezlikli olgularda klirens azalır ve olan eliminasyon yarı ömrü 30 saati açabilir (1).

Toksik sonuç oluşumunda, herhangi bir GMRKA'nın toplam dozundansa salınan Gd^{+3} miktarının daha belirleyici olduğunu net bir şekilde gösterilmiştir (1, 145).

Böbrek yetmezliğinde yükselmiş olan metabolik profil Gd^{+3} iyonlarının disosiyasyonundaki dengeyi kaydırabilir (1).

GMRKA kullanımının takiben gelişen NSF hastalarının deri biyopsilerin de gadolinyum varlığı birçok çalışmada gösterilmiştir (1, 12, 146). Çeşitli alışmalarda GMRKA kullanımından 3 ay sonra bile pek çok dokuda Gd^{+3} saptanmıştır (131, 147).

Ancak bu çalışmalarda kullanılan teknik şelatlı ve serbest Gd^{+3} net ayrımını yapamamaktadır (131).

GMRKA'nın stabilitesini tarifleyen ve bazen kafa karıştırıcı olabilen iki kavram (termodinamik stabilite ve kinetik stabilite) mevcuttur (131, 148).

Gd^{+3} , şelatlandığında Metal [M], ligand [L] ve kompleks [ML] arasında termodinamik bir denge vardır: $\{ [M] + [L] \rightleftharpoons [ML] \}$ (1) }

Gd^{+3} komplekslerinin stabilitesi $\log K_{therm}$ terimiyle ifade edilmektedir. K_{therm} termodinamik stabilite sabitidir ve $\{ K_{therm} = [ML] / ([M] \times [L]) (2) \}$ şeklinde tanımlanır. Çeşitli ajanları karşılaştırmada daha uygun bir yöntem olarak ligandların protonasyon sabitleri de dikkate alındığında fizyolojik pH'da dengede oldukları varsayılarak pH 7,4'deki termodinamik stabilite sabiti ($\log K_{cond}$) tanımlanmıştır (131, 149).

En bariz termodinamik stabilite sabiti şu olarak tanımlanır:

$$\{ K_{cond} = (K_{therm} \times [L]) / L_T (3) \}$$

Formüldeki L_T kompleks halde olmayan ligandın total konsantrasyonudur. $\{L + [HL] + [H_2L] + \dots\}$ formülündeki $[HL]$, $[H_2L]$ serbest ligand türlerinin proton nakledilmiş formlarıdır. Termodinamik stabilite sabiti ligandının gadolinyuma olan afinitesini yansıttığından yüksek termodinamik stabilite sabiti, termodinamik dengeye ulaşmak için yeterli zaman verildiğinde daha stabil kompleks ve daha az serbest gadolinyum iyonu ve serbest ligand durumudur. Gd^{+3} komplekslerinin termodinamik stabiliteleri esasen Gd^{+3} iyonları ile poliaza-karboksilat şelatların donör grupları arasındaki elektrostatik etkileşimden kaynaklanmaktadır (131).

GMRKA'ların termodinamik stabilitesini etkileyen üç ana yapısal faktör tarif edilmiştir (131, 150):

- Poliaza-karboksilat iskeletinin esası, makrosiklik poliamino karboksilatlar
- Metal ve ligandın çeşitli donör atomları arasındaki kompleks tarafından şekillendirilen beş organlı halkaların (N-Gd-N ve N-Gd-O) sayısı,

- Şelat halkasının kavitesinin boyutu ve de ligandın preorganizasyon, rijidite ve konformasyonu ile alakalı makrosiklik etki.

Bu yapısal yönlerin termodinamik stabilite açısından iyonik açık zincirli kompleksler ile makrosiklik iyonik kompleksler arasında gözlemlenen farkı da açıklayan önemli sonuçları vardır (151, 152).

Suda ölçülen yüksek termodinamik stabilite sabitleri in vivo stabilite için ne gerekli ne de yeterli koşullara sahiptir (153).

GMRKA'ların ayrışma (disosiyasyon) oranları pH 7,4'de düşüktür ve bu kompleksler asidik solüsyonlarda çok daha hızlı ayrışmalar (150).

Ancak, literatürde farklı değerler de bildirilmiştir (4, 154-156).

Meglumin Gadoterat, makrosiklik şelatlar içerisinde kinetik stabilitesi en yüksek ajandır ve kinetik stabilite 37°C'de 25°C'den daha hızlıdır (131).

GMRKA'ların stabilitesi 37°C'deki insan serumunda karşılaştırıldığında makrosiklik moleküller en stabil iken non-iyonik lineer komplekslerin düşük stabilite sergilediği gösterilmiştir. Gadodiamid formülasyonundaki fazla serbest ligand Gd^{+3} salınımını 2-3 gün için geciktirmekte fakat bu moleküllerin disosiyasyon oranlarını değiştirmemektedir (131, 157).

Bütün açık zincirli şelatların makrosiklik poliamino karboksilatlardan kinetik olarak daha az stabil olduklarını gösterilmiştir. Açık zincirli komplekslerinin düşük kinetik stabilite, bu komplekslerin konformosyonel hareketliliklerine bağlı oluşan hızlı çözümleri neden olarak açıklanmıştır (158).

Makrosiklik komplekslerin kinetik ataleti muhtemelen sıkı paket formlarından ve yüksek konformosyonel rijiditelerinden kaynaklanmaktadır (153, 159).

Bu diğler moleküller ile karşılaştırıldığında en düşük termodinamik ve kinetik stabiliteye sahip Gadodiamid ile ilişkili NSF olgularındaki yüksek insidans ile tutarlıdır (131, 149, 160, 161).

Çalışmamızda gadolinyum iyonunun farklı hücre kültürlerinde benzer şekilde hücre içi kalsiyum miktarını düşürdüğü ve akımı bloke ettiği gözlemlendi. Gadodiamid'in de gadolinyum benzeri etki göstererek yapısındaki gadolinyumu serbestlediğini ancak yüksek şelat aktivitesi ve/veya sayısı nedeniyle ortamdan hızla topladığını düşündüren geri dönüş etkisi saptandı. Meglumine Gadoterat'ın ise çok çok hafif formda gadolinyumu serbestlediği ve hücre içi kalsiyuma etkiyi belirgin değıştirmediğı bulundu.

Gadolinyum ve GMRKA'lardan etkilenim miktar olarak sırasıyla, GT1-7 (bariz), TG ve DRG hücrelerinde gözlemlendi. Bu durum GT1-7 hücrelerinin daha hassas olduğunu ve hücre tipleriyle etkilenim arasında farklılıklar bulunduğunu göstermektedir.

SONUÇ

Gadolinyumun DKG, TG ve GT1—7 hücrelerinde hücre içi kalsiyum miktarını geri dönüşümsüz olarak azalttığı ve bazı gadolinyum şelatlarının gadolinyumu fizyolojik şartlarda serbestleyip hücre içi kalsiyum düzeylerini değıştirerek dokulardaki muhtemel toksik etkilerinin oluşmasına sebep

olabileceği kanısına varılmıştır. Bu etki sonucu gelişen fizyopatolojik süreçlerin ne olduğu ve olası terapötik yaklaşımların ne olacağı bu tezin amacını aşmakta olup ayrıntılı ileri çalışmalarla değerlendirilmelidir.

Halen, çeşitli GMRKA'ları birbirleri ile ve aynı GMRKA'yı farklı fizyolojik şartlarda in vivo karşılaştırarak yapı-koşul-aktivite ilişkilerinin varlığını aydınlatacak ek çalışmalar gereklidir.

7. KAYNAKLAR

1. Abraham JL, Thakral C, Skov L, Rossen K, Marckmann P. Dermal inorganic gadolinium concentrations: evidence for in vivo transmetallation and long-term persistence in nephrogenic systemic fibrosis. *Br J Dermatol* 2008; 158: 273-280.
2. Runge VM. Gd-DTPA: an i.v. contrast agent for clinical MRI. *Int J Rad Appl Instrum B* 1988; 15: 37-44.
3. Tweedle MF, Eaton SM, Eckelman WC, et al. Comparative chemical structure and pharmacokinetics of MRI contrast agents. *Invest Radiol* 1988; 23: S236-239.
4. Wedeking P, Kumar K, Tweedle MF. Dissociation of gadolinium chelates in mice: relationship to chemical characteristics. *Magn Reson Imaging* 1992; 10: 641-648.
5. Cowper SE, Robin HS, Steinberg SM, et al. Scleromyxoedema-like cutaneous disease in renal-dialysis patients. *Lancet* 2000; 356: 1000-1001.
6. Cowper SE, Su LD, Bhawan J, Robin HS, LeBoit PE. Nephrogenic fibrosing dermopathy. *Am J Dermatopathol* 2001; 23: 383-393.
7. Grobner T. Gadolinium – a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 1104-1108.
8. Levine JM, Taylor RA, Elman LB, et al. Involvement of skeletal muscle in dialysis-associated systemic fibrosis (nephrogenic fibrosing dermopathy). *Muscle Nerve* 2004; 30: 569-577.
9. Ting WW, Stone MS, Madison KC, Kurtz K. Nephrogenic fibrosing dermopathy with systemic involvement. *Arch Dermatol* 2003; 139: 903-906.
10. LeBoit PE. What nephrogenic fibrosing dermopathy might be. *Arch Dermatol* 2003; 139: 928-930.
11. High WA, Ayers RA, Chandler J, Zito G, Cowper SE. Gadolinium is detectable within the tissue of patients with nephrogenic systemic fibrosis. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56: 21-26.
12. Boyd AS, Zic JA, Abraham JL. Gadolinium deposition in nephrogenic fibrosing dermopathy. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56: 27-30.
13. Silbernagl S, Despopulos A. *Renkli Fizyoloji Atlası*. İstanbul: Arkadaş Tıp Kitapları, 1989.
14. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 1995; 269: 847-850.
15. Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebek AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 2002; 82: 503-568.
16. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 473-508.

17. Rudy B. Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 1988; 25: 729-749.
18. Hille B. *Ion Channels of excitable membranes*. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2001.
19. Isom LL, De Jongh KS, Patton DE, et al. Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 1992; 256: 839-842.
20. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, et al. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; 28: 365-368.
21. Kellenberger S, Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* 2002; 82: 735-767.
22. Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, et al. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem* 1997; 272: 20975-20978.
23. Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. *Trends Neurosci* 2006; 29: 578-586.
24. Krishtal O. The ASICs: signaling molecules? Modulators? *Trends Neurosci* 2003; 26: 477-483.
25. Akopian AN, Chen CC, Ding Y, Cesare P, Wood JN. A new member of the acid-sensing ion channel family. *Neuroreport* 2000; 11: 2217-2222.
26. Evans CJ, Peto GC, al-Lehyani S, Darko JB. The use of associated particle timing based on the D + D reaction for elemental analysis of bulk samples such as the human body. *Appl Radiat Isot* 1997; 48: 257-266.
27. Sutherland SP, Benson CJ, Adelman JP, McCleskey EW. Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 711-716.
28. Diochot S, Salinas M, Baron A, Escoubas P, Lazdunski M. Peptides inhibitors of acid-sensing ion channels. *Toxicon* 2007; 49: 271-284.
29. Mahaut-Smith MP, Schlichter LC. Ca²⁺-activated K⁺ channels in human B lymphocytes and rat thymocytes. *J Physiol* 1989; 415: 69-83.
30. DeCoursey TE, Cherny VV. Temperature dependence of voltage-gated H⁺ currents in human neutrophils, rat alveolar epithelial cells, and mammalian phagocytes. *J Gen Physiol* 1998; 112: 503-522.
31. Ashcroft FM. *Ion Channels And Disease*. 1st ed. San Diego: Academic Press, 2000.
32. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 521-555.
33. Glauner KS, Mannuzzu LM, Gandhi CS, Isacoff EY. Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature* 1999; 402: 813-817.
34. Lacinova L, Klugbauer N, Hofmann F. Low voltage activated calcium channels: from genes to function. *Gen Physiol Biophys* 2000; 19: 121-136.
35. Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999; 139: 33-87.

36. Ellis SB, Williams ME, Ways NR, et al. Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* 1988; 241: 1661-1664.
37. Hobom M, Dai S, Marais E, et al. Neuronal distribution and functional characterization of the calcium channel alpha2delta-2 subunit. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 1217-1226.
38. Bosse E, Regulla S, Biel M, et al. The cDNA and deduced amino acid sequence of the gamma subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett* 1990; 267: 153-156.
39. Chu PJ, Robertson HM, Best PM. Calcium channel gamma subunits provide insights into the evolution of this gene family. *Gene* 2001; 280: 37-48.
40. Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu Rev Neurosci* 1994; 17: 399-418.
41. Hagiwara S. Ca-dependent action potential. *Membranes* 1975; 3: 359-381.
42. Curtis BM, Catterall WA. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 1984; 23: 2113-2118.
43. Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, et al. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 1987; 328: 313-318.
44. Mikami A, Imoto K, Tanabe T, et al. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 1989; 340: 230-233.
45. Biel M, Ruth P, Bosse E, et al. Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett* 1990; 269: 409-412.
46. Seino S, Chen L, Seino M, et al. Cloning of the alpha 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 584-588.
47. Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, et al. Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 1998; 19: 264-267.
48. Starr TV, Prystay W, Snutch TP. Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 5621-5625.
49. Dubel SJ, Starr TV, Hell J, et al. Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 5058-5062.
50. Niidome T, Kim MS, Friedrich T, Mori Y. Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain. *FEBS Lett* 1992; 308: 7-13.
51. Perez-Reyes E. Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 1998; 30: 313-318.
52. Cribbs LL, Lee JH, Yang J, et al. Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res* 1998; 83: 103-109.
53. Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, et al. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 1999; 19: 1912-1921.

54. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 2000; 25: 533-535.
55. Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J Physiol* 1987; 394: 149-172.
56. Pehlivan F. *Biyofizik. 2. Baskı. Ankara: Feryal Matbaası, 2004.*
57. Lacinova L. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 2005; 24 Suppl 1: 1-78.
58. Kuniyasu A, Itagaki K, Shibano T, et al. Photochemical identification of transmembrane segment IVS6 as the binding region of semotiadil, a new modulator for the L-type voltage-dependent Ca²⁺ channel. *J Biol Chem* 1998; 273: 4635-4641.
59. Suh-Kim H, Wei X, Klos A, Pa et al. Reconstitution of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. Functional interaction among alpha 1, beta, gamma and alpha 2 delta subunits. *Receptors Channels* 1996; 4: 217-225.
60. Hescheler J, Pelzer D, Trube G, Trautwein W. Does the organic calcium channel blocker D600 act from inside or outside on the cardiac cell membrane? *Pflugers Arch* 1982; 393: 287-291.
61. Glossmann H. New therapeutic uses of calcium channel blockers. Introduction. *J Neural Transm* 1990; Suppl 31: 1-3.
62. Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 1985; 316: 440-443.
63. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 411-425.
64. Kim D, Song I, Keum S, et al. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca²⁺ channels. *Neuron* 2001; 31: 35-45.
65. Dogrul A, Gardell LR, Ossipov MH, et al. Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain* 2003; 105: 159-168.
66. Ono K, Iijima T. Pathophysiological significance of T-type Ca²⁺ channels: properties and functional roles of T-type Ca²⁺ channels in cardiac pacemaking. *J Pharmacol Sci* 2005; 99: 197-204.
67. Hayashi K, Wakino S, Homma K, Sugano N, Saruta T. Pathophysiological significance of T-type Ca²⁺ channels: role of T-type Ca²⁺ channels in renal microcirculation. *J Pharmacol Sci* 2005; 99: 221-217.
68. Schrier AD, Wang H, Talley EM, Perez-Reyes E, Barrett PQ. Alpha1h T-type Ca²⁺ channel is the predominant subtype expressed in bovine and rat zona glomerulosa. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C265-272.
69. Bhattacharjee A, Whitehurst RM Jr, Zhang M, Wang L, Li M. T-type calcium channels facilitate insulin secretion by enhancing general excitability in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *Endocrinology* 1997; 138: 3735-3740.

70. Heady TN, Gomora JC, Macdonald TL, Perez-Reyes E. Molecular pharmacology of T-type Ca²⁺ channels. *Jpn J Pharmacol* 2001; 85: 339-350.
71. Sidach SS, Mintz IM. Kurtoxin, a gating modifier of neuronal high- and low-threshold Ca channels. *J Neurosci* 2002; 22: 2023-2034.
72. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 2007; 131: 1047-1058.
73. Ma J, Pan Z. Retrograde activation of store-operated calcium channel. *Cell Calcium* 2003; 33: 375-384.
74. Falcke M. Reading the patterns in living cells-the physics of Ca²⁺ signaling. *Advances in Physics* 2004; 53: 255-440.
75. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.
76. McKay BE, Placzek AN, Dani JA. Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 2007; 74: 1120-1133.
77. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002; 82: 1013-1067.
78. Putney JW Jr, Broad LM, Braun FJ, Lievremont JP, Bird GS. (). Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci* 2001; 114: 2223-2229.
79. Keizer J, Levine L. Ryanodine receptor adaptation and Ca²⁺(-)-induced Ca²⁺ release-dependent Ca²⁺ oscillations. *Biophys J* Dec 1996; 71: 3477-3487.
80. Laver DR. Regulation of ryanodine receptors from skeletal and cardiac muscle during rest and excitation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 1107-1113.
81. Patel S, Joseph SK, Thomas AP. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 1999; 25: 247-264.
82. Dufour JF, Arias IM, Turner TJ. Inositol 1,4,5-trisphosphate and calcium regulate the calcium channel function of the hepatic inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 2675-2681.
83. Evellin S, Nolte J, Tysack K, et al. Stimulation of phospholipase C-epsilon by the M3 muscarinic acetylcholine receptor mediated by cyclic AMP and the GTPase Rap2B. *J Biol Chem* 2002; 277: 16805-16813.
84. Hambly TBD, Dos Remedios CG. Responses of skeletal muscle fibres to lanthanide ions. Dependence of the twitch response on ionic radii. *Experientia* 1977; 33: 1042-1044.
85. Sárközi S, Szegedi C, Lukács B, Ronjat M, Jóna I. Effect of gadolinium on the ryanodine receptor/sarcoplasmic reticulum calcium release channel of skeletal muscle. *FEBS J* 2005; 272: 464-471.
86. Docherty RJ. Gadolinium selectively blocks a component of calcium current in rodent neuroblastoma x glioma hybrid (NG108-15) cells. *J Physiol* 1988; 398: 33-47.
87. Chevallier J, Butow RA. Calcium binding to the sarcoplasmic reticulum of the rabbit skeletal muscle. *Biochemistry* 1971; 10: 2733-2737.
88. Docherty RJ. Gadolinium specifically blocks a component of voltage sensitive calcium current in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J Physiol* 1988; 381: 69P.

89. Biagi BA, Enyeart JJ. Gadolinium blocks low and high-threshold calcium currents in pituitary cells. *Am J Physiol* 1990; 259: C515–520.
90. Gotoh H, Takahashi A. Mechanical stimuli induce intracellular calcium response in a subpopulation of cultured rat sensory neurons. *Neuroscience* 1999; 92: 1323-1329.
91. Jona I, Martonosi A. The effects of membrane potential and lanthanides on the conformation of the Ca²⁺-transport ATPase in sarcoplasmic reticulum. *Biochem J* 1986; 234: 363–371.
92. Le Guennec JY, Lacampagne A, Garnier D. Orthophosphate salts induce calcium current recovery from blockade by gadolinium in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Exp Physiol* 1996; 81: 577-585.
93. Dreval V, Dieterich P, Stock C, Schwab A. The role of Ca²⁺ transport across the plasma membrane for cell migration. *Cell Physiol Biochem* 2005; 16: 119-126.
94. Fang X, McMullan S, Lawson SN, Djouhri L. Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat in vivo. *J Physiol* 2005; 565: 927-943.
95. Fang X, Djouhri L, Black JA, et al. The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na(v)1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. *J Neurosci* 2002; 22: 7425-7433.
96. Buchthal F, Folkow B. Interaction between acetylcholine and adenosine triphosphate in normal, curarised and denervated muscle. *Acta Physiol Scand* 1948; 15: 150-160.
97. Buchthal F, Engbaek L. On the neuromuscular transmission in normal and myasthenic subjects. *Acta Psychiatr Neurol* 1948; 23: 3-11.
98. Harper AA, Lawson SN. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurons. *J Physiol* 1985; 359: 31-46.
99. Emmelin N, Feldberg W. Systemic effects of adenosine triphosphate. *Br J Pharmacol Chemother* 1948; 3: 273-284.
100. Kuperman AS, Okamoto M, Beyer AM, Volpert WA. Procaine action: Antagonism by adenosine triphosphate and other nucleotides. *Science* 1964; 144: 1222-1223.
101. Vyklicky L, Knotkova-Urbancova H. Can sensory neurones in culture serve as a model of nociception? *Physiol Res* 1996; 45: 1-9.
102. Ayar A, Scott RH. The actions of ryanodine on Ca²⁺-activated conductances in rat cultured DKG neurones; evidence for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 359: 81-91.
103. Ozcan M, Ayar A, Canpolat S, Kutlu S. Antinociceptive efficacy of levetiracetam in a mice model for painful diabetic neuropathy. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008; 52: 926-930.
104. Gover TD, Moreira TH, Kao JP, Weinreich D. Calcium homeostasis in trigeminal ganglion cell bodies. *Cell Calcium* 2007; 41: 389-396.
105. Kim HC, Chung MK. Voltage-dependent sodium and calcium currents in acutely isolated adult rat trigeminal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* 1999; 81: 1123-1134.

106. Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, et al. Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 1990; 5: 1–10.
107. Dalmazzoa S, Antoniotta S, Arianoa P, Gilardinoa A, Lovisoloa D. Expression and localisation of TRPC channels in immortalised GnRH neurons. *Brain Research* 2008; 1230: 27-36.
108. Masotto C, Negro-Vilar A. Gonadectomy influences the inhibitory effect of the endogenous opiate system on pulsatile gonadotropin secretion. *Endocrinology* 1988; 123: 747–752.
109. Vazquez-Martinez R, Shorte SL, Boockfor FR, Frawley LS. Synchronized exocytotic bursts from gonadotropin-releasing hormone-expressing cells: dual control by intrinsic cellular pulsatility and gap junctional communication. *Endocrinology* 2001; 142: 2095–2101.
110. Spergel DJ, Catt KJ, Rojas E. Immortalized GnRH neurons Express large-conductance calcium-activated potassium channels. *Neuroendocrinology* 1996; 63: 101–111.
111. Martiez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI. Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses: intrinsic properties of the GT1-1 GnRH neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 1852–1855.
112. Martiez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI. Signaling pathways involved in GnRH secretion in GT1 cells. *Neuroendocrinology* 1995; 61: 310–317.
113. Nunez L, Villalobos C, Boockfor FR, Frawley LS. The relationship between pulsatile secretion and calcium dynamics in single, living gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2000; 141: 2012–2017.
114. Ikura M, Osawa M, Ames JB. The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. *Bioessays* 2002; 24: 625–636.
115. Carrion AM, Link WA, Ledo F, Mellstrom B, Naranjo JR. DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature* 1999; 398: 80–84.
116. Craig TA, Benson LM, Venyaminov SY, et al. The metal-binding properties of DREAM: evidence for calcium-mediated changes in DREAM structure. *J Biol Chem* 2002; 277: 10955–10966.
117. Roy D, Angelini NL, Fujieda H, Brown GM, Belsham DD. Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1–7 GnRH-secreting neurons by melatonin. *Endocrinology* 2001; 142: 4711–4720.
118. Roy D, Belsham DD. Melatonin receptor activation regulates GnRH gene expression and secretion in GT1-7Gn-RH neurons. *Signal transduction mechanisms. J Biol Chem* 2002; 277: 251–258.
119. Gillespie JM, Chan BP, Roy D, Cai F, Belsham DD. Expression of circadian rhythm genes in gonadotropin-releasing hormone-secreting GT1-7 neurons. *Endocrinology* 2003; 144: 5285–5292.
120. Ishii H, Sato S., Yin C, Sakuma Y, Kato M. Cetrorelix, a gonadotropin-releasing hormone antagonist, induces the expression of melatonin receptor 1a in the gonadotropin-releasing hormone neuronal cell line GT1–7. *Neuroendocrinology* 2009; 90: 251–259.
121. Kelestimur H, Ozcan M, Kacar E, et al. Melatonin elicits protein kinase C-mediated calcium response in immortalized GT1-7 GnRH neurons. *Brain Res* 2011; 1435: 24-28.

122. Ozcan M, Ayar A. Modulation of action potential and calcium signaling by levetiracetam in rat sensory neurons. *J Recept Signal Transduct Res* 2012; 32: 156-162.
123. Ozcan M, Ayar A, Alcin E, Ozcan S, Kutlu S. Effects of levobupivacaine and bupivacaine on intracellular calcium signaling in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Recept Signal Transduct Res* 2010; 30: 115-120.
124. Ozcan M, Alcin E, Kuzgun KT, Keleştimur H, Ayar A. Investigation of the calcium signaling in subpopulation of rat sensory neurones: relationships between capsaicin sensitivity, nonspecific depolarisation and cell size. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; 30: 544-552.
125. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. Washington: The National Academies Press, 2011.
126. Bouschet T, Henley JM. Calcium as an extracellular signalling molecule: perspectives on the Calcium Sensing Receptor in the brain. *C R Biol* 2005; 328: 691-700.
127. Munaron L, Antoniotti S, Fiorio Pla A, Lovisolo D. Blocking Ca⁺² entry: a way to control cell proliferation. *Curr Med Chem* 2004; 11: 1533-1543.
128. Nussey SS, Whitehead SA. *Endocrinology, An Integrated Approach*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd, 2001.
129. Haeseleer F, Palczewski K. Calmodulin and Ca⁺²-binding proteins (CaBPs): variations on a theme. *Adv Exp Med Biol* 2002; 514: 303-317.
130. Bastianelli E. Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *Cerebellum* 2003; 2: 242-262.
131. Idée JM, Port M, Medina C, et al. Possible involvement of gadolinium chelates in the pathophysiology of nephrogenic systemic fibrosis: a critical review. *Toxicology* 2008; 248: 77-88.
132. Bucala R. Fibrocytes: discovery of a circulating connective tissue cell progenitor. In: R Bucala (Editor) *Fibrocytes. New Insights into Tissue Repair and Systemic Fibrosis*. Hackensack: World Scientific 2007: 1–18.
133. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996; 84: 359-369.
134. Mitchison TJ, Cramer LP. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 1996; 84: 371-379.
135. Webb DJ, Parsons JT, Horwitz AF. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat Cell Biol* 2002; 4: E97-100.
136. Aguado-Velasco C, Bretscher MS. Circulation of the plasma membrane in Dictyostelium. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 4419-4427.
137. Schwab A. Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F739-747.
138. Mandeville JT, Maxfield FR. Effects of buffering intracellular free calcium on neutrophil migration through three-dimensional matrices. *J Cell Physiol* 1997; 171: 168-178.

139. Eddy RJ, Pierini LM, Matsumura F, Maxfield FR. Ca²⁺-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration. *J Cell Sci* 2000; 113: 1287-1298.
140. Lawson MA, Maxfield FR. Ca²⁺- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* 1995; 377: 75-79.
141. Schwab A, Wojnowski L, Gabriel K, Oberleithner H. Oscillating activity of a Ca²⁺-sensitive K⁺ channel. A prerequisite for migration of transformed Madin-Darby canine kidney focus cells. *J Clin Invest* 1994; 93: 1631-1636.
142. Edward M, Quinn JA, Mukherjee S, et al. Gadodiamide contrast agent 'activates' fibroblasts: a possible cause of nephrogenic systemic fibrosis. *J Pathol* 2008; 214: 584-593.
143. Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 1115-1122.
144. Lee J, Ishihara A, Oxford G, Johnson B, Jacobson K. Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature* 1999; 400: 382-386.
145. Cacheris WP, Quay SC, Rocklage SM. The relationship between thermodynamics and the toxicity of gadolinium complexes. *Magn Reson Imaging* 1990; 8: 467-481.
146. High WA, Ayers RA, Cowper SE. Gadolinium is quantifiable within the tissue of patients with nephrogenic systemic fibrosis. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56: 710-712.
147. Sausseureau E, Lacroix C, Cattaneo A, Mahieu L, Gouille JP. Hair and fingernail gadolinium ICP-MS contents in an overdose case associated with nephrogenic systemic fibrosis. *Forensic Sci Int* 2008; 176: 54-57.
148. Brücher E, Sherry, AD. Stability and toxicity of contrast agents. In: AE Merbach, E Toth (Editors). *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 2001: 243-279.
149. Idée JM, Port M, Raynal I, et al. Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review. *Fundam Clin Pharmacol* 2006; 20: 563-576.
150. Brücher E. Kinetic stability of gadolinium (III) chelates used as MRI contrast agents. *Topics in Current Chemistry* vol. 221. Berlin: Springer-Verlag, 2002.
151. Toth E, Brücher E, Lazar I, Toth I. Kinetics of formation and dissociation of lanthanide(III)-DOTA complexes. *Inorg Chem* 1994; 33: 4070-4076.
152. Toth E, Kiraly R, Platzek J, Raduchel B, Brücher E. Equilibrium and kinetic studies on complexes of 10-[2,3-dihydroxy-(1-hydroxymethyl)-propyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetate. *Inorg Acta* 1996; 249: 191-199.
153. Tweedle MF, Hagan JJ, Kumar K, Mantha S, Chang CA. Reaction of gadolinium chelates with endogenously available ions. *Magn Reson Imaging* 1991; 9: 409-415.
154. Kumar K, Chang C, Tweedle A. Equilibrium and kinetic studies of lanthanide complexes of macrocyclic polyamino carboxylates. *Inorg Chem* 1993; 32: 587-593.

155. Tweedle MF. Physicochemical properties of gadoteridol and other magnetic resonance contrast agents. *Invest Radiol* 1992; 27: S2–6.
156. Pulukkody KP, Norman TJ, Parker D, Royle L, Broan CJ. Synthesis of charged and uncharged complexes of gadolinium and yttrium with cyclic polyazaphosphinic acid ligands for in vivo applications. *J Chem Soc Perkin Trans* 1993; 2: 605–620.
157. Frenzel T. Stability of gadolinium-based contrast agents in human serum. *Eur Radiol* 2008; 18: 162.
158. Kumar K. Macrocyclic polyamino carboxylate complexes of Gd³⁺ (III) as magnetic resonance imaging contrast agents. *J Alloys Comp* 1997; 249: 163–172.
159. Meyer D, Schaefer M, Bonnemain B. Gd-DOTA, a potential MRI contrast agent. Current status of physicochemical knowledge. *Invest Radiol* 1988; 23: S232-235.
160. Kanal E, Broome DR, Martin DR, Thomsen HS. Response to the FDA's May 23, 2007, nephrogenic systemic fibrosis update. *Radiology* 2008; 246: 11-14.
161. Thomsen HS. Nephrogenic systemic fibrosis: a serious late adverse reaction to gadodiamide. *Eur Radiol* 2006; 16: 2619-2621.

8. EK





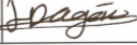

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU
ELAZIĞ

ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR NO	ÖZÜ
24.03.2011	2011/04	70	Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

KARAR

“ Farklı Hücre Kültürlerinde Gadolinium ve Gadolinium Şelatlarının Hücre İçi Kalsiyum Üzerine Etkisinin Araştırılması ” başlıklı araştırmada 20 adet Wistar Albino rat kullanacağı ve hayvanlar üzerinde yapılacak girişimlerde hayvan kullanım etiği ilkelerine uyulacağı beyan edilmiştir. Bu çerçevede anılan çalışmanın etik yönden uygun bulunduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

GÖREVİ	ADI SOYADI	BÖLÜMÜ	İMZA
Başkan	Prof. Dr. İbrahim H. ÖZERCAN	Tıp Fakültesi Patoloji A.D.	
Raportör	Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU	Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji A.D.	<i>Bulunmadı</i>
Üye	Prof. Dr. Ramazan BAL	Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D.	
Üye	Doç. Dr. Abdullah ÖZEN	Veteriner Fakültesi Deontoloji A.D.	
Üye	Doç. Dr. Cihan GÜNAY	Veteriner Hekim	
Üye	Tahsin AVCI	Sivil üye	
Üye	Hıdır DOĞAN	Sivil üye	

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Murat Baykara

Doğum Yeri ve Tarihi : Elazığ / 1969

Eğitimi :

Elazığ 27 Mayıs İlkokulu'ndan 1980'de mezun oldu.

Elazığ Atatürk Ortaokulu'ndan 1983'te mezun oldu.

Elazığ Lisesi'nden 1986'da mezun oldu.

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden "Tıp Doktoru" olarak 1992'de mezun oldu.

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyodiagnostik Anabilim Dalından "Radyodiagnostik Uzmanı" ünvanını 2003'te aldı.

Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi İktisadi ve İdari Programlar Bölümü Sağlık Kurumları İşletmeciliği Bölümü'nden 2007'de mezun oldu.

Fırat Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimine 1996'da başladı, 1998'de radyoloji uzmanlık eğitimi için ara verdi. 2008'de tekrar döndü.

Çalıştığı Kurumlar :

Elazığ Vali Muharrem Göktayoğlu Sağlık Ocağı'nda Doktor olarak görev yaptı (1992-1998).

Askerlik görevini Şırnak ili İdil ilçesinde Jandarma Komando yedek subay olarak yaptı (1994-1995).

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyodiagnostik Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalıştı (1998-2003).

Elazığ Eğitim ve Araştırma Hastanesinde çalışmaktadır (2003-Halen).

Üyesi Olduğu Meslek Kuruluşları :

Elazığ Tabipler Odası (1992-Halen)

Türk Radyoloji Derneği (1998-Halen)

Türk Manyetik Rezonans Derneği (2008-Halen)

European Society of Radiology (2009-Halen)