

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

**FARE KOHLEAR ÇEKİRDEKTEKİ BAZI  
NÖRONLARIN ELEKTROFİZYOLOJİK  
ÖZELLİKLERİ VE BU NÖRONLARDAKİ TRPM2  
KATYON KANALI ÜZERİNE ÇALIŞMA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ersen ERASLAN**

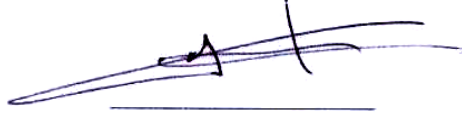
**Elazığ - 2012**

## ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek lisans tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Haluk Keleştimur

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Ramazan BAL



Danışman

Yüksek lisans Sınavı Jüri Üyeleri

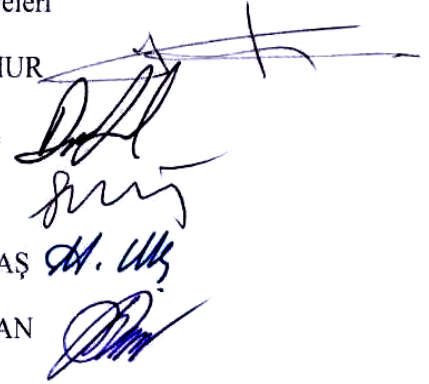
Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Prof. Dr. Ramazan BAL

Prof. Dr. Selim KUTLU

Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞ

Yrd. Doç. Dr. Ebru ÖNALAN



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile büyük katkı sağlayan, tez konumun belirlenmesi, çalışmamın planlanması, gerçekleştirilmesi ve sonuçlandırılmasında bana yol gösteren destekleri esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ramazan BAL'a ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyelerine,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan Ailem'e,

Tezin gerçekleşmesi sırasında emeği geçen arkadaşlarıma ve laboratuvar çalışanlarına,

Deneysel çalışmalarımnda yardımlarını esirgemeyen Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi Personeline,

Bu tezin gerçekleşmesi için destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne en içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
TEŞEKKÜR .....	İ
İÇİNDEKİLER .....	İİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VII
KISALTMA LİSTESİ .....	VIII
1. ÖZET.....	X
2. ABSTRACT .....	XII
3. GİRİŞ .....	1
3.1 İYON KANALLARININ SINIFLANDIRILMASI .....	2
3.1.1 Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları .....	3
3.1.2 Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları .....	4
3.1.3 Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları .....	5
3.1.4 Geçici (Transient) Reseptör Potansiyel Kanalları (TRP).....	8
3.1.4.1 TRPC Kanalları.....	11
3.1.4.2 TRPV Kanalları.....	12
3.1.4.3 TRPM Kanalları .....	13
3.1.4.4 TRPML Kanalları .....	14
3.1.4.5 TRPP Kanalları .....	14
3.1.4.6 TRPA Kanalları.....	15
3.1.4.7 TRPN Kanalları.....	15
3.1.5 TRPM2.....	15
3.2 İŞİTME YOLAKLARI .....	18

3.2.1 Süperiyor Oliver Kompleks .....	19
3.2.2 Lateral Lemniskus .....	20
3.3.3 İnferyor Kolikulus.....	20
3.3.4 Medial Genikulat Cisim .....	20
3.3.5 İşitsel Korteks .....	20
3.2 İŞİTME FİZYOLOJİSİ .....	21
3.3.1 Dış Kulak Yolu Fizyolojisi .....	21
3.3.2 Orta Kulak Fizyolojisi.....	22
3.3.3 İç Kulak Fizyolojisi.....	22
<b>4. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>25</b>
4.1 HAYVAN MATERYALI .....	25
4.2 KESİTLERİN HAZIRLANMASI.....	25
4.3 KULLANILAN TRPM2 AGONİST VE ANTAGONİSTİ .....	26
4.4 ELEKTROFİZYOLOJİ .....	27
4.4.1 Patch-Clamp (Yama-Menteşe) Yöntemi.....	27
4.4.1.1 Hücre üzerinde (Cell attached- On cell).....	28
4.4.1.2 Tüm Hücre Kaydı (Whole-cell recording).....	29
4.4.1.3 Dışı Dışarıda (Outside-out) .....	29
4.4.1.4 İçi dışarıda (Inside-out) .....	29
4.5 İSTATİSTİK.....	32
<b>5. BULGULAR .....</b>	<b>33</b>
<b>6. TARTIŞMA .....</b>	<b>39</b>
6.1 STELLATE VE BUSHY NÖRONLARININAKTİF VE PASİF ZAR ÖZELLİKLERİ .....	39
6.2 TRPM2 KANALININ KARAKTERİZASYONU .....	41

<b>7. KAYNAKÇA .....</b>	<b>44</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>53</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1	Voltaj kapılı sodyum kanalının temel görünüşü.....	2
Şekil 3.2.	Vahşi-tip ve TRP-mutant sineklerden elde edilen elektoretinogram kayıtlar. ....	9
Şekil 3.3	TRP kanallarının filogenetik olarak sınıflandırılması .....	11
Şekil 3.4	TRPM2 katyon kanalının genel yapısı. ....	18
Şekil 3.5	İşitme yolağı .....	19
Şekil 3.6	İşitme sırasında ses iletimi ve kohleada ilerleyen dalga oluşumu. ....	23
Şekil 3.7	Kohleada ses sinyallerinin elektrik sinyallere dönüşümü.....	24
Şekil 4.1	Patch-clamp konfigürasyonları.....	28
Şekil 4.2	Patch-clamp sisteminin genel görünüşü. ....	31
Şekil 4.3	Mikroelektrotların üretiminde kullanılan pipet çekici.....	31
Şekil 5.1	Bushy hücre sine 1mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulaması .....	35
Şekil 5.2	Stellate hücre sine 1mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulaması .....	36
Şekil 5.3	Stellate hücre sine 500 IU/ml katalaz uygulaması .....	37
Şekil 5.4	Bushy hücre sine katalaz 500 IU/ml uygulaması.....	38

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 3.1</b> Kalsiyum kanallarının $\alpha$ birimine göre sınıflandırılması .....	7
<b>Tablo 5.1</b> Stellate hücresinin pasif zar özellikleri .....	33
<b>Tablo 5.2</b> Bushy hücresinin pasif zar özellikleri .....	34



## KISALTMA LİSTESİ

<b>ADPR</b>	: Siklik ADP-riboz
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum
<b>DKG</b>	: Dorsal kök gangliyonu
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>K<sup>+</sup></b>	: Potasyum
<b>K<sub>ATP</sub></b>	: ATP duyarlı potasyum kanalı
<b>K<sub>Ca</sub></b>	: Kalsiyumla aktive olan potasyum kanalı
<b>K<sub>DR</sub></b>	: Gecikmiş düzeltici potasyum akımı
<b>K<sub>IR</sub></b>	: İçeriye doğru düzeltilmiş potasyum akımı
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	: Magnezyum
<b>Na<sup>+</sup></b>	: Sodyum
<b>NUD</b>	: Nudix Hidrolaz
<b>PLC</b>	: Fosfolipaz C
<b>SOK</b>	: Süperiyor oliveri kompleks
<b>TG</b>	: Trigeminal gangliyon
<b>TM</b>	: Trans membran
<b>TRP</b>	: Transient reseptör potansiyel
<b>TRPA</b>	: Transient reseptör potansiyel anykrin
<b>TRPC</b>	: Transient reseptör potansiyel canonical
<b>TRPM</b>	: Transient reseptör potansiyel melastatin
<b>TRPML</b>	: Transient reseptör potansiyel mukolipin

<b>TRPP</b>	: Transient reseptör potansiyel polisistin
<b>TRPV</b>	: Transient reseptör potansiyel vanilloid
<b>TTX</b>	: Tetrodotoksin
<b>VK<del>KK</del></b>	: Voltaj kapılı kalsiyum kanalı
<b>VKPK</b>	: Voltaj kapılı potasyum kanalı
<b>VKSK</b>	: Voltaj kapılı sodyum kanalı

## 1. ÖZET

Kohlear çekirdek nöronları, farklı anatomik ve fiziksel özelliklere sahip nöronları olan, işitsel bilgileri çeşitli yönleriyle ayıklayarak üst merkezlere ileten birimdir. Bu çalışmada 16 günlük Balb C farelerin beyin kesitlerinden ventral kohlear çekirdeğinde bulunan bushy ve stellate nöronlarının aktif ve pasif zar özelliklerini belirlenmesi ve TRPM2 katyon kanalının elektrofizyolojik olarak karakterizasyonu amaçlanmıştır. TRPM2 transient reseptör potansiyel melastatin ailesine ait  $Ca^{+2}$  iyonuna geçirgen bir katyon kanalı olup, oksidatif stres ürünleriyle aktive olurlar.

Stellate nöronu sürekli bir ateşleme desenine sahiptir, pasif zar özellikleri sırasıyla; membran potansiyeli  $-64,5 \pm 3,37$  mV, input direnci  $231 \pm 116$  M $\Omega$ , zaman sabiti  $6,17 \pm 4,1$  ms ve kapasitans  $0,27 \pm 0,14$   $\mu$ F/cm<sup>2</sup> olarak bulunmuştur.

Bushy nöronu tek bir ateşleme desenine sahiptir, pasif zar özellikleri sırasıyla; membran potansiyeli  $-63,6 \pm 5,54$  mV, input direnci  $308 \pm 185$  M $\Omega$ , zaman sabiti  $4,6 \pm 3,3$  ms ve kapasitans  $0,17 \pm 0,05$   $\mu$ F/cm<sup>2</sup> olarak bulunmuştur.

Stellate ve bushy nöronlarına TRPM2 katyon kanal agonisti olan hidrojen peroksit uygulaması sonrasında, bushy nöronunda  $14 \pm 2,06$  mV hiperpolarize edici bir etki gözlenirken stellate nöronunda  $21 \pm 6,35$  mV'luk hiperpolarize edici bir etki gözlenmiştir.

Stellate ve bushy nöronlarına TRPM2 katyon kanal antagonisti olan katalaz uygulaması sonrasında, bushy nöronunda  $4 \pm 1,14$  mV'luk depolarize

edici bir etki, stellate nöronunda ise  $9 \pm 3,4$  mV'luk depolarize edici bir etki gözlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada kohlear çekirdekdeki stellate ve bushy nöronlarının pasif ve aktif zar özellikleri belirlendi. Ancak kullanmış olduğumuz agonist ve antagonistler ile TRPM2 katyon kanalı elektrofizyolojik olarak karakterize edilememiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Bushy, stellate, hidrojen peroksit, katalaz, TRPM2

## 2. ABSTRACT

### A STUDY ON ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF NEURONS IN MOUSE COCHLEAR NUCLEUS AND ON TRPM2 CATION CHANNEL IN THESE NEURONS

Neurons in the cochlear nucleus have distinct anatomical and biophysical specializations and extract various aspects of auditory information which are transmitted to unitin the higher auditory centres. In the present study it was aimed to determine active and passive membrane properties of bushy and stellate neurons inthe ventral cochlear nucleus and to characterize electrophysiological of TRPM2 cation channel in these neurons. TRPM2, melastatin family of transient receptor potential is a non-selective  $\text{Ca}^{+2}$ -permeable cation channel and is known to be activated by oxidative stress product.

Active and passive membrane properties of stellate neurons, fired regular and sustained trains of action potentials in response to depolarizing current. Membrane potential, input resistance, time constant and capacitance membrane were found  $-64,5 \pm 3,37$  mV,  $231 \pm 116$  M $\Omega$ ,  $6,17 \pm 4,1$  ms and  $0,27 \pm 0,14$   $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  respectively.

Active and passive membrane properties of bushy neurons, responded with a single action potential at the onset of depolarizing. Membrane potential, input resistance, and capacitance membrane time constant were found  $-63,6 \pm 5,54$  mV,  $308 \pm 185$  M $\Omega$ ,  $4,6 \pm 3,3$  ms and  $0,17 \pm 0,05$   $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  respectively.

Application of TRPM2 cation channel agonist hydrogen peroxide resulted in hyperpolarization of membrane potential by  $14 \pm 20,6$  mV and  $21 \pm 6,35$  in stellate and bushy neurons respectively.

Application of TRPM2 cation channel antagonist catalase cause the stellate and bushy neurons to depolarize by  $9 \pm 3,4$  mV and  $4 \pm 1,14$  mV respectively.

In conclusion, the passive and active membrane properties of stellate and bushy neurons of cochlear nucleus were demonstrated in the study. However with the given agonist and antagonist TRPM2 ion channel of these neurons could not be characterized.

**Key words:** Bushy, stellate, hydrogen peroxide, catalase, TRPM2

### 3. GİRİŞ

Hücrelerde, hücre membranının temel görevi, hücre dışı ve içi arasında bir bariyer oluşturmaktır. Bu bariyer, iyonların ve moleküllerin hücrenin içine ve dışına hareketinde kontrol görevi görür ve hücre içi ve hücre dışı arasında fiziksel bir temas kurarak hücreler arası iletişime aracılık eder. Hücre membranının temel yapısı esasen iki tabaka fosfolipid molekülünden oluşur. Fosfolipidler amfoterik moleküllerdir; bir ucu hidrofilik, diğer ucu hidrofobik bir alana sahiptir. Birçok hücre membranı 6 - 10 nm kalınlığında olup yağ ve proteinden oluşmaktadır. Fosfolipidler ve proteinlere ek olarak kolesterol ve karbonhidratlarda dokuların konumuna ve görevine göre hücre membranında bulunabilir. Fosfolipid bariyer büyük ölçüde su ve küçük moleküllerin geçmesine izin verir ancak iyonların ve hidrofilik moleküllerin geçmesini engeller ve hücre zarının genel pasif geçirgenlik özelliklerini belirler. Membranda periferik ve integral olmak üzere iki tip fonksiyonel protein içermektedir [1]. İntegral membran protein kanalları, taşıyıcıları, reseptörleri, ekstrasellüler ve intrasellüler ortamlar arasında bilgi ve malzeme akışına arabuluculuk eden enzimlerden oluşmaktadır [2]. Bu taşıyıcılar iyon kanalları gibi biyolojik hücre membranlarında transmembran gözenekleri oluşturan proteinlerdir [3]. İyon kanal ailesi, sinyal iletimiyle ilişkili protein aileleri içinde G-proteinleri ve protein kinazlardan sonra üçüncü en büyük aileyi oluştururlar. İyon kanalları çok farklı uyarılara cevap olarak açılıp kapanırlar.

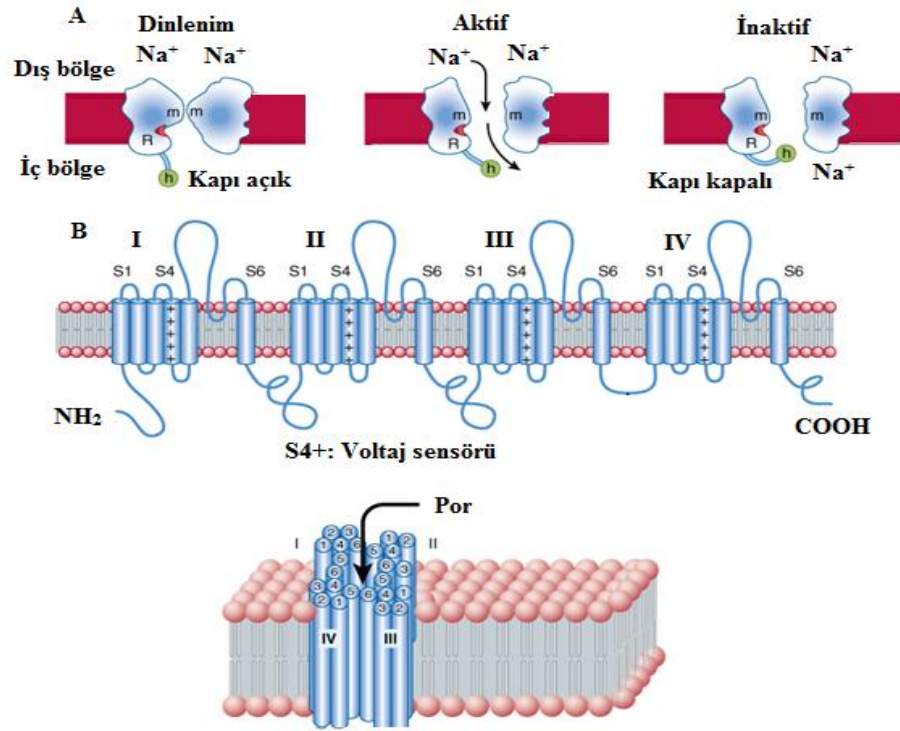
İyon kanal ailesini dört ana gruba ayırmak mümkündür.

1. Belli bir kimyasal molekül varlığında açılan iyon kanalları; bunlara agonist ile (ligand) çalışan kanallar denir.

2. İyon kanalının açılıp kapanması membran potansiyeline bağlı olarak gerçekleşir; bunlara voltaj ile çalışan kanallar denir.
3. İyon kanalı ancak membranın mekanik olarak gerilip/büzüldüğünde açılır; bu gruba mekanik uyarı ile çalışan kanallar denir.
4. Kanalın kapanması belli bir enzim aktivitesi sonucunda kanal proteinin fosforile veya defosforile olması ile kontrol edilir [4].

### 3.1 İyon Kanallarının Sınıflandırılması

İşitme yolağındaki önemli iyon kanalları hakkında kısa bilgi verilecektir.



**Şekil 3.1** Voltaj kapılı sodyum kanalının temel görünüşü, aktivasyon ve inaktivasyon durumu (kaynak 5'den değiştirilerek alınmıştır) [5].



### 3.1.1 Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları

Sodyum ( $\text{Na}^+$ ) kanalları istirahat durumunda kapalı ve inaktif durumdadır ama aksiyon potansiyeli oluşumu ile membran depolarizasyonuna yanıt olarak kanal boyunca aktivasyon-inaktivasyon döngüsü şeklinde değişikliklere uğrar [6]. Konsantrasyon gradyenti, geçici olarak kanalın açılmasına izin verir ve  $\text{Na}^+$  iyonları hücre içine doğru akar. Böylece akım içe doğru geçerek membranı eşik değerine yaklaştırarak aksiyon potansiyelinin oluşmasını sağlar.  $\text{Na}^+$  kanalları, büyük  $\alpha$ -alt ünitesi ile daha küçük yardımcı  $\beta$ -alt birimlerinden oluşur [7]. Voltaj kapılı sodyum kanalları (VKSK)'nın  $\alpha$ -alt birimi dört homolog transmembran bölge içeren 260 kDa ağırlığında bir proteindir [8, 9].  $\alpha$ -alt birimi fonksiyonel bir kanalı üretmek için yeterliken,  $\beta$ -alt birimi ve diğer sitozolik kanal elemanları, kanalın biyofiziksel özelliklerinin belirlenmesinin yanısıra madde taşınımı ve düzenlenmesi ile de kanalın hücre membranına bağlanmasını sağlar [10].  $\beta_1$  ve  $\beta_3$  alt birimleri zayıf,  $\beta_2$  ve  $\beta_4$  ise di-sülfid bir köprü ile  $\alpha$ -alt birimine bağlanır. Bazı kanallar için  $\beta$ -alt birimleri kanalın biyofiziksel özelliklerinin belirlenmesinde ve hücre membranına,  $\alpha$ -alt biriminin yerleşmesinde önemli bir rol oynamaktadır [11].  $\beta$ -alt birimi ile birlikte sitozolik proteinler, hücre iskeletine  $\text{Na}^+$  kanalını tuturmada rol alır [12].  $\text{Na}^+$  kanal alt tiplerinin her biri kendi biyofiziksel özelliklerini sergiler. Alt ünitelerin farklı ekspresyon düzeyleri, kanalın aktivasyon ve inaktivasyonunu, dolayısıyla nöronun uyarılabilirliğini de etkiler [9].  $\text{Na}^+$  kanalının dokuz farklı  $\alpha$  alt ünite izoformu ( $\text{Na}_v1.1$  -  $\text{Na}_v1.9$ ) vardır [7]. Bu alt üniteler ortak bir genel yapıya sahip olmakla birlikte, farklı kinetik ve voltaj bağımlı özellikler gösterir [8, 13]. VKSK'nın  $\alpha$ -alt birimi altı transmembran

(TM) segmentten (S1-S6) oluşup her biri dört homolog bölge ile organize edilmektedir [14, 15].

Farklı  $\alpha$ -alt birim izoformları sinir sistemi, iskelet ve kalp kası gelişimi sırasında ekspresyonu ve yerleşimi farklı olup farklı fizyolojik ve farmakolojik özellikler gösterir. Merkezi sinir sisteminde ( $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$  ve  $Na_v1.6$ ) ve iskelet kasında ( $Na_v1.4$ ) izoformları nanomolar konsantrasyonlarda tetradotoksin (TTX) ile inhibe edilirken,  $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.8$  ve  $Na_v1.9$  izoformları mikromolar konsantrasyonlarda TTX ile inhibe olur. Çünkü etki alanının gözenek bölgesinde sistein yerine aromatik bir kalıntı bulunur [16, 17].

### **3.1.2 Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları**

Potasyum ( $K^+$ ) kanalı, hücrelerde yaygın şekilde bulunan zar proteinlerinin büyük bir ailesidir [18, 19]. Voltaj kapılı potasyum kanalları (VKPK), insanlarda yaklaşık 50 farklı gen tarafından kodlanan tetramerik sinyal proteinleridir [8, 20]. Hem santral hem de periferik nöronlarda VKPK, membran depolarizasyonu sırasında ve aksonal iletimde önemli roller üstlenmektedir [21, 22].

Uyarılabilir hücrelerde VKPK, membran potansiyelinin düzenlenmesinde, aksiyon potansiyelinin oluşumunda ve yayılmasında görev yapar [22, 23]. VKPK aynı zamanda hücre içi kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) düzenlemesine, hücre hacminin kontrolüne, hücrelerin çoğalmasına ve apoptozise neden olurlar [24, 25].

VKPK'nın  $\alpha$  alt üniteleri, polipeptidlerden meydana gelmiştir. Her bir polipeptid, 6 transmembran heliks yapıya sahiptir (S1-S6). S5-S6 bölgeleri arasındaki iki ilave bileşen kanalın gözenek bölgesini oluşturur (16, 17, 18). S4 bölgesi ise pozitif yüklüdür ve voltaj sensörü olarak etki etmektedir. S4 bölgesi

dışarı doğru etki ettiği zaman hücre membranında konformasyonel değişimlere uğrar. S5-S6 ise depolarize duruma gelir ve VKPK'nın kapıları açılarak K<sup>+</sup> iyonları dışarı çıkarlar [22, 26, 27].

Moleküler olarak incelendiğinde  $\alpha_{1-9}$  [28, 29] ve  $\beta_{1-4}$  [30] alt birimleri bulunan VKPK, gecikmiş-doğrultucu K<sup>+</sup> kanalları, içeriye yönelik (K<sub>DR</sub>) K<sup>+</sup> kanalları, hızlı geçici A tipi K<sup>+</sup> kanalları (K<sub>A</sub>) [31, 32], yavaş aktive olan K<sup>+</sup> kanalları, ATP'ye duyarlı K<sup>+</sup> kanalları (K<sub>ATP</sub>) ve Ca<sup>+2</sup> ile aktive olan K<sup>+</sup> kanalları (K<sub>Ca</sub>) şeklinde sınıflandırılmıştır [32, 33].

### 3.1.3 Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları

Kalsiyum kas kasılması için gerekli olan nörotransmitter salınımında ve bir dizi fizyolojik fonksiyonları düzenleyen önemli bir sinyal molekülüdür. Voltaj kapılı kalsiyum kanalı (VKKK) özellikle uyarılabilen hücrelerde hücre içi Ca<sup>+2</sup> girişi için önemli bir görev üstlenmiştir. VKKK membran potansiyelinin depolarizasyonu ile aktive olan TM bir protein grubudur. VKKK, impuls oluşumu, duyuşal işlemler, kas kasılması, hormonların ve nörotransmitterlerin salgılanması, hücre farklılaşması ve gen ekspresyonu gibi çeşitli fizyolojik olaylarda anahtar rol oynar [34, 35].

VKKK'nın moleküler olarak on üyesi vardır ama kabaca iki gruba ayrılır; yüksek voltaj ile aktive olan VKKK ve düşük voltaj ile aktive olan VKKK'dır. Düşük voltaj ile aktive VKKK üç  $\alpha$  üniteden oluşan T-tipi kanallardır (Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2 ve Ca<sub>v</sub>3.3). Diğer yedi VKKK üyesi ise yüksek voltaj ile aktive olan kanallardır. Bunlar L-tipi (Ca<sub>v</sub>1.1, Ca<sub>v</sub> 1.2, Ca<sub>v</sub> 1.3 ve Ca<sub>v</sub> .4), P/Q-tipi (Ca<sub>v</sub>2.1), N-tipi (Ca<sub>v</sub>2.2), ve R-tipi (Ca<sub>v</sub>2.3) kanallardır. Yüksek voltaj ile aktive VKKK'nın

hetero-oligomerik kompleksleri vardır. Kanal açıklığını oluşturan  $\alpha_1$  altbiriminin yanı sıra, yardımcı  $\beta$ ,  $\alpha_2$ - $\delta$ , ve  $\gamma$  alt birimlerinede benzer fonksiyonel kanallar oluşturmak üzere ihtiyaç vardır [36, 37].

**L-tipi:** L-tipi VKKK dört  $\alpha$  alt üniteden ( $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$  ve  $Ca_v1.4$ ) oluşur [38, 39]. Bu kanal, memeli santral nöronlarının dendritlerinde  $Ca^{+2}$  akımı için kritik bir rol oynar [40].

**N-tipi:** N-tipi VKKK striatum, hipokampus, korteks ve serebellumdada yüksek yoğunlukta eksprese edilmektedir [41]. Bunlar presinaptik terminallerden  $Ca^{+2}$  akımına aracılık eder ve nörotransmitter salınımını tetikler [42].

**R-tipi:** R tipi VKKK'nın presinaptik terminallerde eksprese edildiği gösterilmiştir [43].

**P/Q-tipi:** Presinaptik sinir uçlarında ve yüksek miktarlarda sinir sistemi boyunca eksprese edilmektedir [44].

**T-Tipi:** T tipi kanallar moleküler olarak klonlanan VKKK'nın son grubudur ve ilk olarak sinir sisteminde eksprese edilmiştir [38, 45].

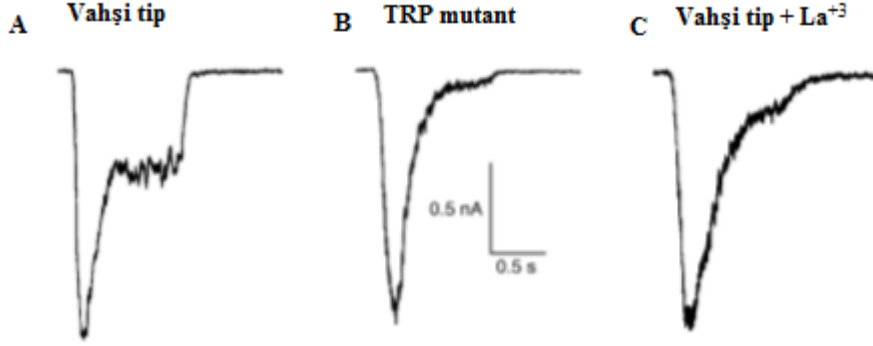
**Tablo 3.1** Kalsiyum kanallarının  $\alpha$  birimine göre sınıflandırılması (kaynak 46'dan değiştirilerek alınmıştır) [46].

<b>Tipi</b>	<b><math>\alpha</math>1 alt ünitesi</b>	<b>Doku Ekspresyonu</b>	<b>Foksiyonu</b>	<b>İlaç/Toksin</b>
<b>L</b>	Ca <sub>v</sub> 1.1 $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1S)	İskelet kası	Uyarılma-kasılma bağlantısı	Nifedipin
<b>L</b>	Ca <sub>v</sub> 1.2 $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1C)	Kalp/düz kas, Nöronlar, Endokrin hücreler	Uyarılma-kasılma bağlantısı Uyarılma-sekresyon bağlantısı	Verapamil
<b>L</b>	Ca <sub>v</sub> 1.3 $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1D)	Sinoatriyal düğüm, AV düğümü	Sinoatriyal kalp hızı kontrolü, AV ileti kalp uyarı nöronları	Diltiazem
<b>L</b>	Ca <sub>v</sub> 1.4 $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1F)	Retina	Uyarılma-kasılma bağlantısı	
<b>P/Q</b>	Ca <sub>v</sub> 2.1 $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1A)	Nöronlar, Endokrin hücreler	Uyarılma-kasılma bağlantısı	$\omega$ -Aga-IVA
<b>N</b>	Ca <sub>v</sub> 2.2 $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1B)	Nöronlar, Endokrin hücreler	Uyarılma-kasılma bağlantısı	$\omega$ -CgTX-GVIA
<b>R</b>	Ca <sub>v</sub> 2.3 $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1E) CaV $\alpha$ 1	Nöronlar, Endokrin hücreler, Kalp/Düz kas	Uyarılma-kasılma bağlantısı Uyarılma-Sekresyon bağlantısı	SNX-482
<b>T</b>	Ca <sub>v</sub> 3.1 $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1G)	Nöronlar, Sinoatriyal düğüm	Ateşleme, Sinoatriyal kalp hızı kontrolü	Kurtoxin, Mibefradil ECN
<b>T</b>	Ca <sub>v</sub> 3.2 $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1H)	Dorsal kök gangliyonu (DKG), Vasküler düz kas ve Kalp kası,		

		Böbrek ve Karaciğer		
<b>T</b>	Ca <sub>v</sub> 3.3α1 (α1I)	Nöronlar		

### 3.1.4Geçici (Transient) Reseptör Potansiyel Kanalları (TRP)

Omurgalılarda ışık, fotoreseptör hücrelerde siklik guanozin mono fosfat-kapılı kanalların kapanmasına ve sonrasında membranın hiperpolarizasyonuna neden olurken, meyve sineği *Drosophila melanogaster*'deki fotoreseptör proteini rodopsinin ışık ile aktivasyonu fosfolipaz C (PLC) stimülasyonuna ve inozitol trifosfat oluşumuna neden olur ki, bu da sürekli bir membran depolarizasyonuna yol açar. Depolarizasyon, biri Ca<sup>+2</sup> diğeri Na<sup>+</sup> ve Ca<sup>+2</sup>,un ikisine birden geçirgen iki farklı kondüktanstan kaynaklanmaktadır [47, 48]. Cosens ve Manning 1969 yılında izole ettikleri spontan mutant *Drosophila melanogaster*'de uzun süre ışık maruziyeti sonrasında sürekli olmayan anormal bir elektoretinogram gözlemişlerdir [48, 49]. Bu nesil A-tipi mutant olarak isimlendirilmiş ve bu fenotipik özellik fotopigment rejenerasyonunda yetmezlik olarak tanımlanmıştır [49]. Ca<sup>+2</sup> seçici yolağa sahip olmayan mutant sinekler aşırı ışık ile kör olmaktadır. Bu mutantlarda ışık maruziyeti sürekli yanıt yerine sadece geçici bir membran depolarizasyonu oluşturmaktadır. Vahşi-tip sineklerin fotoreseptörlerinde ölçülen reseptör potansiyelinin plato fazı mutant sineklerde görülmemektedir. Sonuç olarak bu mutasyon “transient receptor potential, (trp)” olarak isimlendirilmiştir.

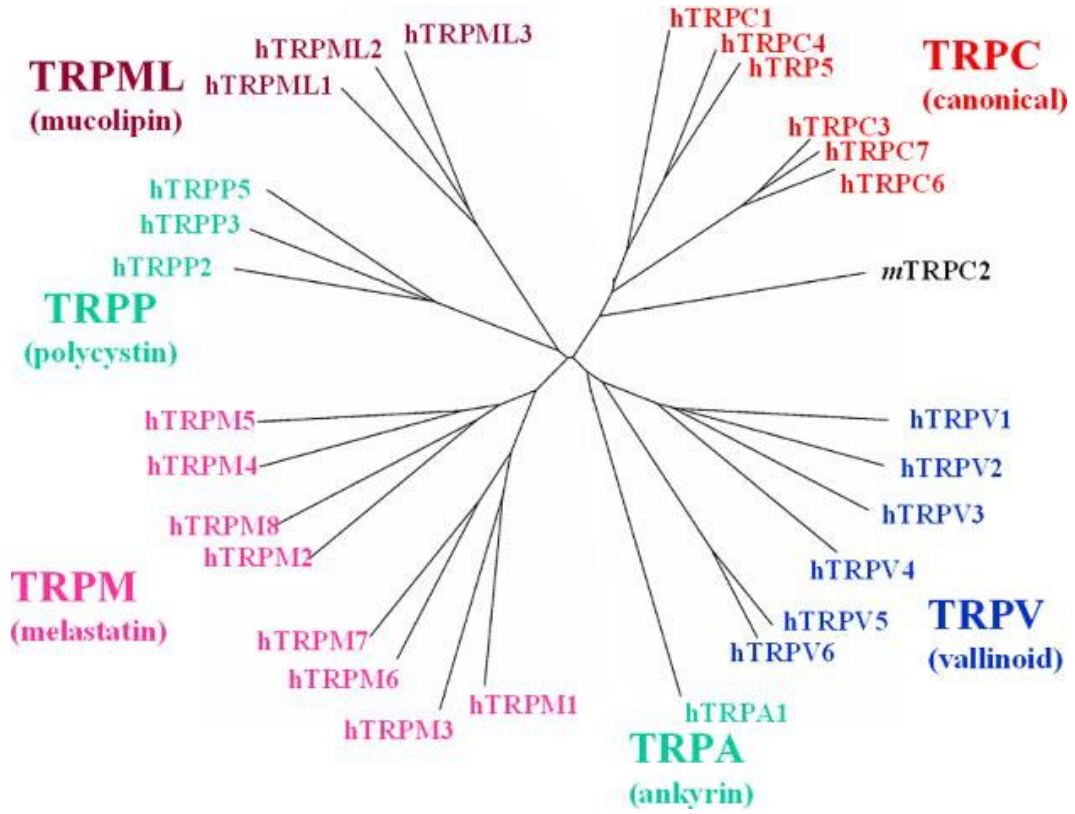


**Şekil 3.2** Vahşi-tip ve TRP-mutant sineklerden elde edilen elektoretinogram kayıtlar **A.** Vahşi-tip sineklerdeki elektoretinogram kayıtları **B.** TRP mutant sineklerden alınan elektoretinogram kayıt **C.** Vahşi tip sineklere  $La^{+3}$  (kalsiyum kanal blokörü) ilavesi sonrasında alınana kayıt (kaynak 50'den değiştirilerek alınmıştır) [50].

*Drosophila*, TRP proteininin fosfoinositol aracılı  $Ca^{+2}$  geçirgen kanal olarak tanımlanması [48] ve memeli homologunun keşfi [51] araştırmacıların TRP kanallarındaki  $Ca^{+2}$  sinyali üzerine olan incelemelerinin artmasına neden olmuştur [52, 53]. Günümüzde memelilerde yaklaşık 30 (*Drosophila melanogaster*'da 13 ve *Caenorhabditis elegans*'da 17) üye içeren TRP kanalları yeni bir katyon kanal ailesini oluşturmaktadır. TRP kanalları, çevresel uyarılardaki değişiklikleri ayırt edebilen evrensel biyolojik sensörlerdir. TRP kanalları sıcak/soğuk, doğal kimyasal bileşikler (mentol, kafur, acı biber), mekanik uyarılar ve lipid tabakasının içeriğindeki değişiklikler gibi birçok uyarı ile açılmaktadırlar. TRP kanalları kan basıncı ve düz kas tonusunun düzenlenmesi, renal  $Ca^{+2}$ /magnezyum

(Mg<sup>2+</sup>) iletiminde, keskin tat ve kokulu bileşiklerin (hardal, sarımsak vb.), mekanik değişikliklerin, ağrının, ısının, sesin, feromonların, ışığın algılanması gibi birçok süreçte rol oynamaktadır [54, 55]. Aminoasit benzerliklerine göre TRP süperailesi 7 alt aileye ayrılmaktadır: TRP klasik ya da canonical (TRPC1-7), TRP melastatin (TRPM1-8), TRP vanilloid reseptör (TRPV1-6), TRP ankyrin zengin protein, (TRPA1), TRP polisistin, TRP mukolipin (TRPML 1-3), TRP NOMPC, no mechanoreceptor potential C [56]. Memelilerde TRPA ailesinden sadece TRPA1 üyesi bulunurken, TRPP ve TRPML ailelerinin her birinin 3 üyesi de memelilerde bulunmaktadır. TRPN ise şimdiye kadar sadece *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* ve *Danio rerio*'de belirlenmiştir. TRP kanallarının temel yapısını, bazı TRPP'ler hariç, membranı 6 kez geçen bölgelerin (TM1-6) oluşturduğu düşünülmektedir. TM 5 ve 6 segmentleri arasındaki hidrofobik halkanın iyon kanalı oluşturan por olduğu ve -NH<sub>2</sub> ve -COOH uçlarının sitoplazmada bulunduğu düşünülmektedir. TRP alt tipleri homoya da heterotetramerik yapılar oluşturarak fonksiyon göstermektedirler [48]. *İn vivo* olarak, fonksiyonel TRP kanal komplekslerinin bir araya gelişi homo/heteromultimerleşme ve yapısal proteinler ile kompleks oluşumlar tarafından yönetilmektedir [48, 56-58].





**Şekil 3.3** TRP kanallarının filogenetik olarak sınıflandırılması Dört farklı model organizma farklı renkte gösterilmiştir: Siyah: İnsan; Kırmızı: Sinek (*Drosophila melanogaster*), Yeşil: Solucan, (*Caenorhabditis elegans*), Mavi: Zebra balık, (*Danio rerio*) (kaynak 59'dan değiştirerek alınmıştır) [59].

### 3.1.4.1 TRPC Kanalları

Memelilerde toplam yedi TRPC proteini (TRPC1-7) belirlenmiştir. TRPC ailesi amino asit dizilerine ve işlevsel benzerliklerine göre 3 alt gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar; TRPC1/4/5, TRPC3/6/7 ve TRPC2'dir [60, 61]. Fare ve sıçanların aksine insanlarda sadece 6 TRPC proteini eksprese edilmiştir, çünkü fare ve sıçanda vomeronazal organda feromon algılayıcı olarak işlev gören TRPC2 geni insan genomunda yoktur [62]. TRPC1 beyin, kalp, düz kas, endotel,

karaciğer, testis, yumurtalık ve tükürük bezleri gibi çeşitli dokularda eksprese edilmektedir [63]. TRPC2 sinir sistemi, vomeronazal organ, gamet ve sperimde bulunmaktadır. Bu kanal feromon algılanmasında önemli bir rol oynar [63]. TRPC3 esas olarak beyin, düz kas, kardiyovasküler sistem ve miyometriyumda eksprese olmaktadır [63, 64]. TRPC4 en çok mide, böbrek ve akciğer mukozası, kardiyovasküler sistem ve düz kasta eksprese olmaktadır [63]. TRPC5 iyon kanalı, sinir sistemi, lökositler, kardiyovasküler sistem ve sinoviyal hücrelerde bulunmaktadır [63]. TRPC6 sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, böbrek, akciğer epiteli, mide düz kası ve trombositlerde eksprese edilmektedir [63]. TRPC7 kalp ve DKG'de bulunmaktadır [63].

#### **3.1.4.2TRPV Kanalları**

Memelilerde altı üyeye sahip TRPV (vanilloid) ailesi 4 alt gruba ayrılmaktadır: TRPV1/TRPV2, TRPV3, TRPV4 ve TRPV5/6. TRPV ailesinin üyeleri tetramerik kompleks olarak işlev göstermektedir. TRPV kanallarının tümü 3-5 NH<sub>2</sub>- ucu ankyrin tekrarlarına sahiptir [65]. TRPV1 DKG'de ve trigeminal gangliyon (TG)'da, spinal ve periferik sinir uçlarında, yaygın olarak bulunmaktadır. TRPV2 DKG ve merkezi sinir sistemi nöronlarında, mide-bağırsak sisteminde, dalak, mast hücreleri ve kas hücrelerinde eksprese edilir. TRPV3, DKG ve TG'de, beyinde, dudak ve testislerde bulunmaktadır. TRPV4, merkezi sinir sistemine ait büyük nöronlarda, kalp, karaciğer, böbrek tübül ve glomerüllerde ayrıca köhleadaki tüy hücrelerinde tanımlanmıştır. TRPV5 yüksek miktarda böbrekte düşük miktarlarda pankreasta, testis, prostat, beyin, plasenta ve

tükürük bezinde eksprese olmaktadır. TRPV6 mide bağırsak sisteminde, pankreas, tükürük bezi, plasenta ve beyinde eksprese edilmektedir [66].

### **3.1.4.3TRPM Kanalları**

TRPM ailesi (melastatin) 8 üyeden oluşmaktadır ve amino asit dizilerinin benzerliklerine göre 4 gruba ayrılmaktadır: TRPM1/3, TRPM2/8, TRPM4/5 ve TRPM6/7 [65]. Melanoma hücrelerinde ekspresyonu azalan TRPM1 proteininin tümör baskılayıcı bir protein olduğu düşünülmektedir [67, 68]. TRPM1 kanalı için bir aktivatör bulunamamıştır. TRPM1 kanalının yapısal olarak aktif bir  $Ca^{+2}$  giriş kanalı olduğuna yönelik bulgular vardır [69]. TRPM2 beyin, kemik iliği, dalak, kalp, karaciğer, akciğer ve bağışıklık hücreleri (nötrofiller, megakaryositlerin, monosit/makrofajlar) gibi farklı hücre tiplerinde, pankreatik- $\beta$  hücrelerinde, endotel hücrelerinde, mikroglia, nöronlar ve kardiyomiyositler de eksprese olmaktadır [70]. TRPM2  $Ca^{+2}$  geçirgen katyon kanalı olduğu ve bu iyon kanalının hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) tarafından indüklendiği bildirilmiştir [70, 71]. TRPM3, TRPM alt familyasının üçüncü üyesidir ve ağırlıklı olarak böbrek ve beyinde eksprese olmaktadır [72]. TRPM4, kalp, pankreas ve plasentada eksprese edilmektedir. TRPM4  $Ca^{+2}$  ve voltaj bağımlı monovalant katyon kanalı olarak işlev görür [73]. TRPM5 iyon kanalı dil, akciğer, testis, sindirim sistemi ve beyinde eksprese olmaktadır [74]. Bu kanal doğrudan hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun artması ile aktif hale gelir. TRPM5  $Ca^{+2}$  geçirgen olmayıp, tek değerlikli katyonlar için seçicidir [68, 75]. TRPM6, böbrek, bağırsak ve az miktarda beyinde eksprese edilmektedir. TRPM6,  $Mg^{+2}$  homeostazında ve böbreklerden  $Mg^{+2}$  alınmasından sorumludur. TRPM7, beyin, böbrek, kalp, karaciğer, dalak ve hematopoetik hücrelerde bulunmaktadır. Aynı zamanda  $Mg^{+2}$

homeostazında rol oynamaktadır [76]. TRPM8'in ilk olarak prostatta belirlenmesiyle birlikte duyu nöronlarında da yüksek düzeylerde ekspresyonu gösterilmiştir. Bu kanal esas olarak duyu nöronlarında ısı algılanmasında ayrıca androjenlerle düzenlenmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir [77].

#### **3.1.4.4 TRPML Kanalları**

TRP proteinlerinin mukolipin alt familyası endolizozomal katyon kanalına sahiptir. Memelilerde üç TRPML proteini bulunmaktadır. Bunlar; TRPML1, TRPML2 ve TRPML3. TRPML1 beyin, böbrek, dalak, karaciğer ve kalp gibi dokularda eksprese edilmektedir. TRPML1 düşük pH'da inhibe olur. TRPML2 ve TRPML3 kanalları tam olarak karakterize edilememişlerdir. TRPML3, tüy hücresinin olgunlaşması ve hücre içi vezikül transportu için önemlidir [78].

#### **3.1.4.5 TRPP Kanalları**

TRPP ailesi yapısal olarak 2 gruba ayrılmaktadır, 1) polikistik böbrek hastalığı benzeri proteinler, 2) polikistik böbrek hastalığı 2 benzeri proteinler [79]. TRPP2, otozomal polikistik böbrek hastalığında mutasyona uğramış gen ürünü olarak keşfedilmiştir. TRPP2, böbrek, kalp, damar düz kas, pankreas, bağırsak, safra yolları ve plasentada dahil olmak üzere birçok dokuda eksprese edilir. Böbrekte, TRPP2 bütün nefron segmentlerinde ifade edilir, ama glomerüllerde tespit edilmemiştir [80, 81]. TRPP2'den yoksun fareler sağ/sol asimetri bozuklukları göstermektedir [82]. TRPP3 kalp, iskelet kası, beyin, dalak, testis, retina ve karaciğerde bulunmaktadır ve böbrek gelişiminde rol alır. TRPP5

testislerde eksprese olur ve burada  $Ca^{+2}$  geçirgen kanal olarak işlev görür, spermatogenezde rol alır [66].

#### **3.1.4.6 TRPA Kanalları**

TRPA ailesinin tek memeli üyesi TRPA1 proteindir. TRPA1 iyon kanalı tüy hücreleri, DKG ve TG nöronlarında ve fibroblastlarda eksprese olmaktadır. Isıya duyarlı, çok yönlü kemosensör olarak ve mekanik duyu; nosisepsiyon; koku yanıtları; bağırsak ve mesanenin soğuğa bağlı kasılmasında rol alır [66].

#### **3.1.4.7 TRPN Kanalları**

Bu aile sadece *C. elegans*, *Drosophilave Danio rerio*'de bulunur. *Drosophila* TRPN1 “no mechanoreceptor potential C, NOMPC” olarak isimlendirilmiştir, bu nedenle bu ailenin ismi TRPN'dir. Mekanik uyarılara duyarlı kanal olarak görev yapar [48].

#### **3.1.5 TRPM2**

TRP kanallarının çoğunda olduğu gibi TRPM2 kanalları voltaj kapılı olmayan katyon kanalıdır ve ikinci haberci olan  $Ca^{+2}$ 'a önemli geçirgenlikleri vardır [83]. En fazla beyinde olmak üzere [71, 84-86] kemik iliği, dalak, kalp, lökosit, karaciğer, akciğer ve pankreas gibi çok sayıda insan dokusunda eksprese edildiği belirlenmiştir [87]. TRPM2 kanalları hem kanal hem de bir enzim gibi görev yapan bir proteindir.

TRPM2 kanalı kromozom 21q22.3 üzerinde lokalizedir [88]. Kanalın yapısı, intrasellüler N ve C uçlarına sahip olan 6 TM alan içermektedir [84, 89]. İnsanlarda 32 ekzon içeren TRPM2 geni yaklaşık 90kb'lık bir alana yerleşmiştir.

İnsanlarda TRPM2 transkripti 6.2 kB büyüklüğünde olup 1503 aminoasitlik (fare ve ratlarda 1507) ve 170 kDa moleküler büyüklüğe sahip bir protein oluşturmaktadır [90].

Aşırı reaktif oksijen üretimine bağlı olarak oluşan oksidatif stres, çekirdek ve mitokondride siklik ADP-riboz (ADPR) oluşumuna neden olarak TRPM2 kanallarının aktivasyonuna neden olur. Bu şekilde  $Ca^{+2}$  girişine ve dolayısıyla apoptoza götüren  $Ca^{+2}$  bağımlı hücrel süreçleri başlatır [71, 91, 92].

TRPM2 kanalları intrasellüler ADPR ile aktive olurlar [83, 87, 93]. ADPR, NUD (nudix hidrolaz) T9 homoloji bölgesine bağlanarak kanalın açılmasına neden olur. NUDT9 homoloji bölgesi TRPM kanalının sitozolik C-terminal ucunda yer alır. Bu nedenle TRPM2 kanalı sadece endojen intrasellüler ligandlar tarafından aktive edilir [94].

$H_2O_2$  oksidatif stres sırasında oluşarak TRPM2 kanallarının aktivasyonuna neden olur. Bu kanallar  $Ca^{+2}$  girişine ve dolayısıyla da  $Ca^{+2}$  bağımlı hücrel süreçleri başlatır [71, 91, 92].  $H_2O_2$ 'nin TRPM2 kanallarını nasıl açtıkları konusunda farklı raporlar bulunmaktadır. Direkt ve indirekt (Nikotinamid adenin dinükleotit ve ADPR'den bağımsız) olmak üzere iki mekanizmadan bahsedilmektedir [71, 91, 95]. Beyindeki ekspresyonu northern blotting ve kantitatif PCR teknikleriyle ortaya konmuştur [71, 84, 96]. TRPM2 kanallarının beyinde ilk olarak mikroglialarda ekspres edildiği gösterilmiştir [86, 97]. In situ hibridizasyon tekniği ile elde edilen ilk veriler TRPM2 kanal proteinlerinin bazı nöronlarda da eksprese edildiğini göstermiştir [86].

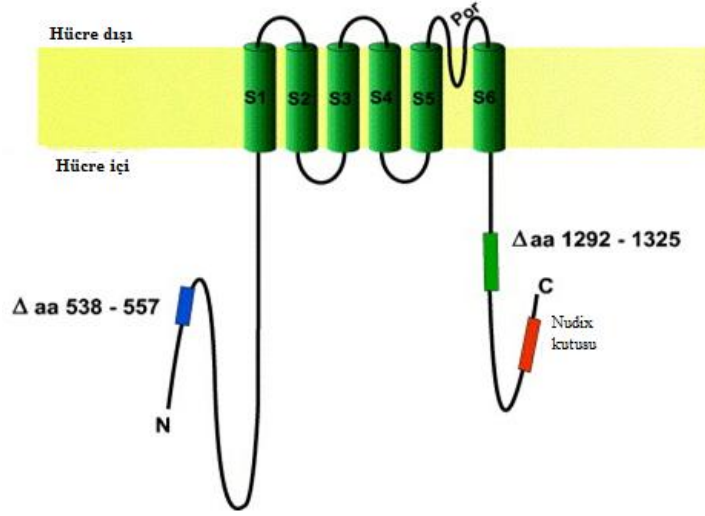
Farmakolojik olarak hem native hem de rekombinant TRPM2 kanalları iki farklı sınıfa ait olan bileşikler tarafından inhibe edilirler. Bunlardan biri

flufenamik asit gibi fenamatlar diğeri ise klotrimazol gibi antifungal ajanlardır [98]. Bu ajanlar tarafından oluşturulan TRPM2 blokajı geriye dönüşümsüzdür [98]. Diğeri bir blokör olan antranilik asit ise aynı zamanda bir fosfolipaz inhibitörüdür [99] dolayısıyla spesifik TRPM2 blokörü olarak adlandırılmaz.

Günümüzde kullanılan klotrimazol ve flufenamik asit gibi blokörler uyarılmayan hücre tiplerinde TRPM2 kanalının farmakolojik karakterizasyonunda başarıyla kullanılmasına karşın, nöronlarda aynı başarı sözü konusu değildir. Çünkü bu farmakolojik ajanlar TRPM2 kanallarının yanı sıra diğeri voltaj ve ligand kapılı iyon kanallarını da kısmen bloke etmektedir [98].

TRPM2 kanallarının aktivitesi ekstrasellüler ortamda  $Ca^{+2}$  varlığına bağlıdır. Bu nedenle ekstrasellüler ortamda bulunan  $Ca^{+2}$ 'un ortamdaki uzaklaştırılması veya baryum iyonu ile yer değiştirilmesi halinde kanal aktivitesi inhibe olur.

Bu kanalın sıcaklığa duyarlı bir kanal proteini olduğunu ve bu nedenle de vücut sıcaklığının artması durumunda bu kanalların  $H_2O_2$ 'e duyarlılığı arttığı bildirilmiştir [100].

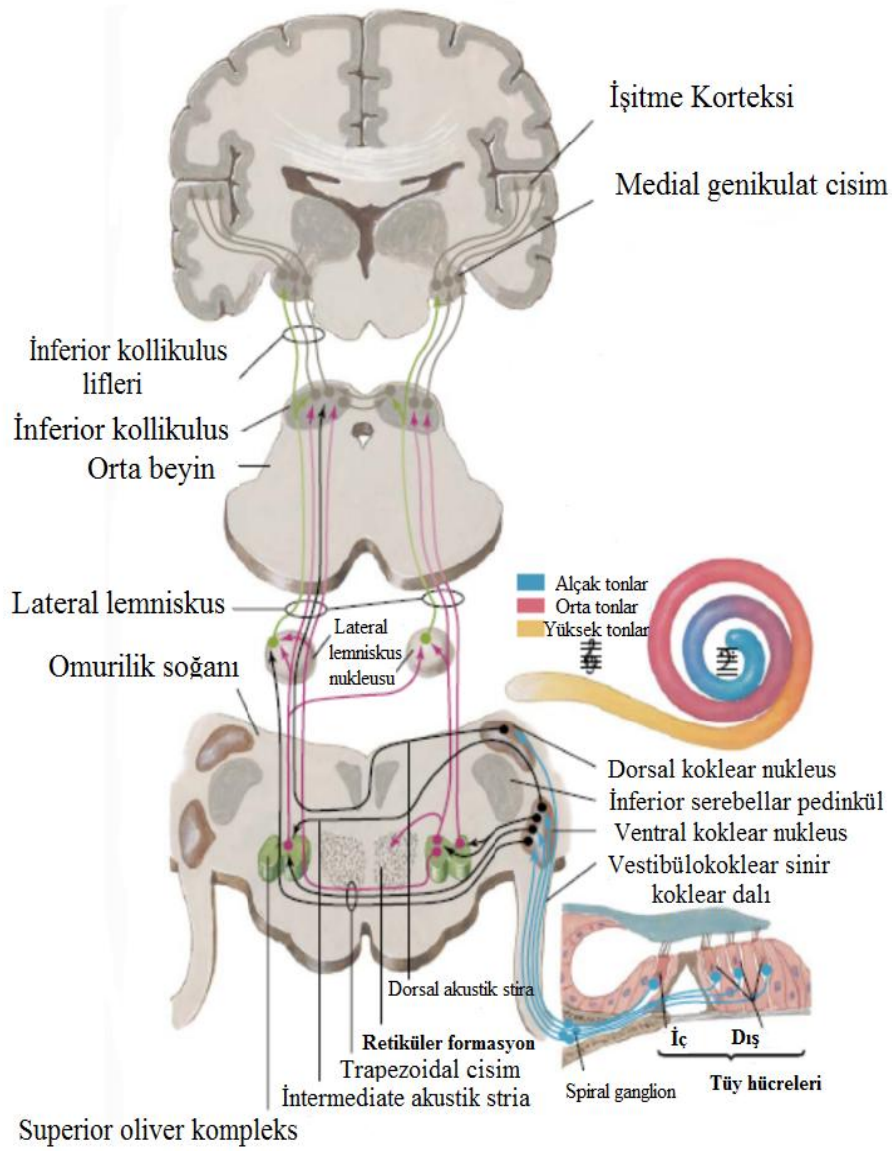


**Şekil 3.4** TRPM2 katyon kanalının genel yapısı (kaynak 101'den değiştirilerek alınmıştır) [101].

### 3.2 İşitmeYolakları

Bütün işitme sinir lifleri ilk olarak kohlear çekirdekte sinaps yaparlar. Kohlear çekirdek dorsal ve ventral olmak üzere iki büyük grubu ayrılır. Ventral kohlear çekirdek, anteroventral ve posteroventral olarak ikiye ayrılır. Kohlear çekirdekte tonotopik dağılım vardır. Kohleanın bazalından gelen yüksek frekanslı lifler, dorsal apeksden gelen düşük frekanslı lifler ile ventral kohlear çekirdeğe girerler. Kohlear çekirdek hücreleri yapılarına göre beş tipe ayrılır; Siferik bushy globüler bushy, multipolar hücreler, ahtapot hücreleri ve granüler hücreler vardır. Bu hücrelerin her birisinin hassas olduğu tek bir frekans vardır, buna karakteristik frekans denir [102]. Akustik sinir ve kohlear çekirdekler arasındaki bağlantı ipsilateral olmasına rağmen daha üstteki bağlantılar bilateraldir. Kohlear çekirdek hücrelerinden çıkan aksonlar üç demet oluşturur; ventral akustik stria, intermediate akustik stria ve dorsal akustik striadır [103].





Şekil 3.5 İşitme yolağı (kaynak 104'den değiştirerek alınmıştır) [104].

### 3.2.1 Süperiyor Oliver Kompleks

Süperiyor oliveri kompleks (SOK) ponsun gri cevherinin hemen arkasında yer alır. Süperiyor oliverin mediyal çekirdeği, süperiyor olivin lateral çekirdeği, trapezoid cismin mediyal çekirdeği ve periyoliver çekirdek olmak üzere birkaç çekirdekten oluşmuştur. SOK, lateral lemniskus ve inferiyor kollikulusa çıkan

liflere gönderirken, inen lifler ise korti organı iç ve dış tüy hücrelerine ulaşır [105].

### **3.2.2 Lateral Lemniskus**

Kohlear çekirdek ve SOK'u inferiyor kollikulusa bağlayan beyin sapının, yan tarafında bulunan yoldur. Ventral, dorsal ve intermediate olmak üzere üç demetten oluşur. Kohleadan çıkan pes frekanslar, dorsal çekirdeğe gelirken, tiz frekanslar ventral çekirdeğe ulaşır [103].

### **3.3.3 Inferiyor Kollikulus**

Mezensefalonda bulunan inferiyor kollikulus iki taraflıdır. Çıkan lifler için belli başlı ara merkez olan inferiyor kollikulus akustik bilgileri hazırlar. Santral, eksternal ve dorsal olmak üzere üç hücre grubundan oluşur. Başlıca projeksiyonu medial genikulat cisimciğidir.

### **3.3.4 Medial Genikulat Cisim**

Anteriyor, medyal ve dorsal olarak üç parçada incelenen medial genikulat cisim, inferiyor kollikulus ile işitsel korteks arasında bir ara merkezdir. Lateral genikulat cismin medyalinde, talamusta yerleşmiştir.

### **3.3.5 İşitsel Korteks**

Primer işitme korteksi ve ilişkili sahalar olmak üzere iki kısımda incelenir. Primer işitme korteksi Brodman'ın 41. ve 42. sahalarıdır. Temporal lobun üst

kısmına yerleşmiş olan, primer işitme korteksi ilişkili sahalarla frontal ve temporal pariyetal bölgelere bağlanır [106].

### **3.2 İşitme Fizyolojisi**

İşitme, aurikulanın topladığı ses enerjisinin, kulağın çeşitli bölgelerinde değişikliklere uğratıldıktan sonra; aksiyon potansiyelleri halinde beyne gönderilip, ses halinde algılanması olayıdır. Dış, orta, iç kulak, merkezi işitme yolları ve işitme merkezi işitme sistemini oluşturur [105]. İşitme organı fonksiyonel olarak iletim aygıtı ve persepsiyon aygıtı olarak iki kısımda incelenir. İletim aygıtı dış ve orta kulaktan, persepsiyon aygıtı iç kulak, kohlear sinir, santral işitme yolları ve işitsel korteksten oluşur [107]. İşitme, ses dalgalarının dış kulak yoluna girmesi ile başlar; buradan orta kulak yolu ile korti organına iletim olur, bu olay hava ortamında olduğundan hava yolu ile iletim denir. Bunun yanında, kafa kemikleri ile de korti organına ses iletimi olur buna ise kemik yolu denir. Normal bir insanda hava yolu ile iletim kemik yolu ile iletimden daha fazladır [105].

#### **3.3.1 Dış Kulak Yolu Fizyolojisi**

Kulak kepçesi, çevredeki sesleri toplar ve yönlendirir, konka megafon görevi yaparak, ses dalgalarını dış kulak yolu girişinde yoğunlaştırır. Bu şekilde ses dalgaları yaklaşık olarak 6 dB kadar şiddetlendirilmektedir. Dış kulak yolu girişi ve yolun kendisi akustik rezonatör olarak görev yapmaktadır. Sesin, atmosferde iletimi ile karşılaştırıldığında yetişkin bir insanda dış kulak yolunda sesin şiddetinin arttığı ve bu artışın 1000-8000 Hz frekanslarında olduğu hesaplanmıştır. En fazla artış, 3500-4000 Hz frekans aralığında olmaktadır. 3500

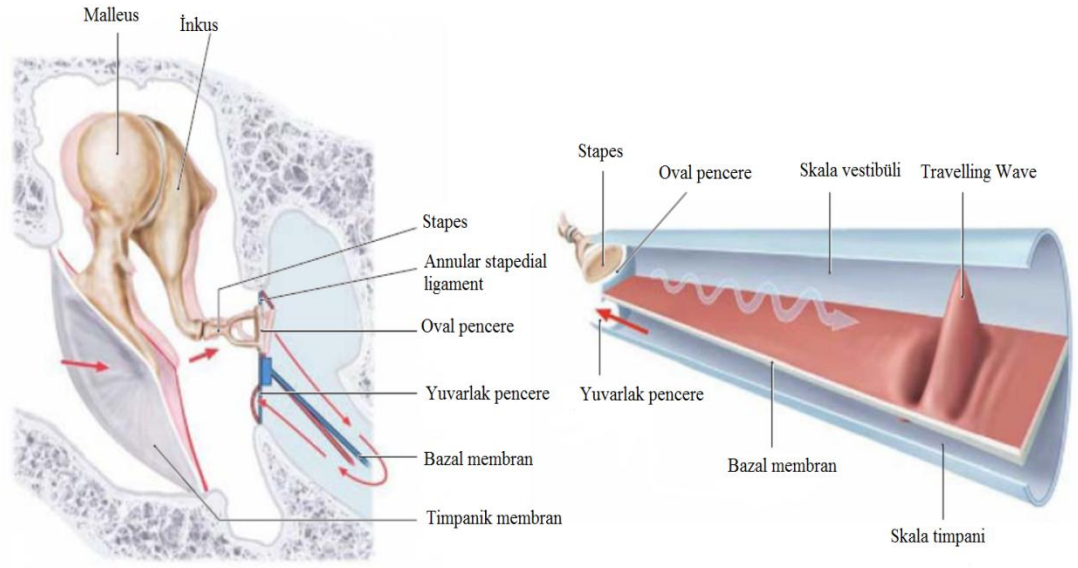
Hz için bu artış 15-20 dB kadardır. Dış kulak yolunun bir diğer görevi de, havayı vücut sıcaklığına getirmektir [105].

### **3.3.2 Orta Kulak Fizyolojisi**

Orta kulak, sesi hava ortamından sıvı ortama iletmektedir. Ses dalgaları ortam değiştirirken hava ile perilenf arasındaki rezistans farkından dolayı yaklaşık olarak 30 dB kayba uğrar. Orta kulağın asıl görevi, iletim yanında bu kaybı da karşılamaktır. Orta kulak; kulak zarının yükseltici etkisi, kemikçik sisteminin yükseltici etkisi, kulak zarı ve stapes yüzeyinin büyüklük farkı gibi mekanizmalarla sesin şiddetini artırır [105].

### **3.3.3 İç Kulak Fizyolojisi**

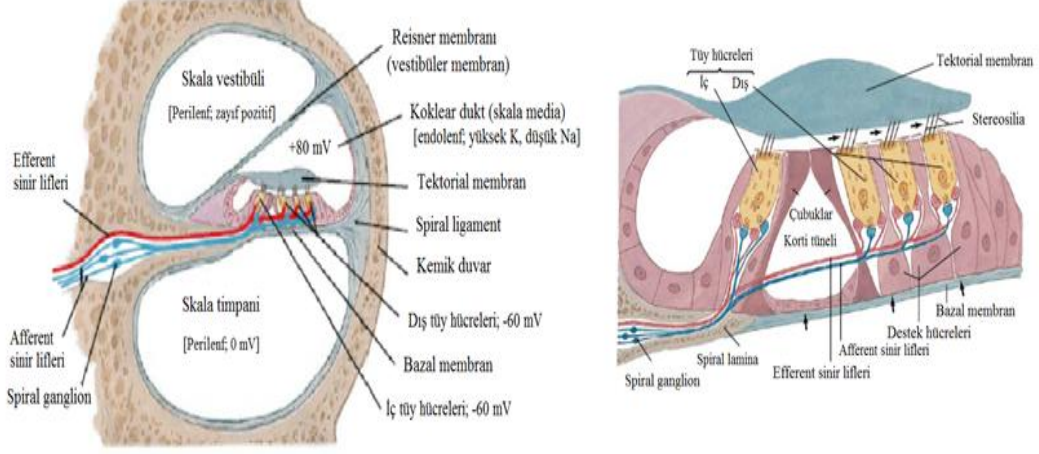
Kemikçik zincire, geçen ses dalgaları iç kulağa oval pencere yolu ile geçer. Zar ve kemikçik zinciri ile oval pencereye gelen enerji, hava yolu ile gelen enerjiden, hem hızlı iletilmesi hemde daha önce bahsedilen mekanizmalarla amplifiye edilmesinden dolayı oval pencerede; hem bir faz farkı meydana gelir, hem de kemikçik zincir ile gelen enerji daha fazladır. Bu faz farkı ile perilenfe gelen ses dalgaları perilenfi hareketlendirir ve baziller membranda titreşimler meydana getirir [105]. Titreşimler bazal turdan, apikal tura kadar uzanır; bu harekete ilerleyen dalga (travelling wave) adı verilmiştir.



**Şekil 3.6** İşitme sırasında ses iletimi ve kohleada ilerleyen dalga (traveling wave) oluşumu (kaynak 108’den değiştirerek alınmıştır) [108].

Baziller membran dalgaları, tüylü hücrelerin sterosilyalarında harekete neden olur ve bu hareketlerde iyon kanallarında açılma ya da kapanmaya neden olurlar. Tüylü hücrelerde negatif elektrik yükü varken, endolenfde +80 mV’luk bir endolenfatik potansiyel vardır. Titrek tüylü hücrelerin yükü farklıdır. İç tüy hücrelerde -45 mV iken, dış tüylü hücrelerde -70 mV’dur. Bu yük farkı nedeni ile hücre içine  $K^+$  iyonu akışı olur, bu da membranda depolarizasyona neden olur. Sonuçta baziller membrandaki mekanik enerji, elektrik enerjisine dönüşür ve afferent sinir liflerine iletilir. Kohlea, frekans ve şiddet olarak çok geniş bir spektral yapıya sahip akustik uyarıları daha küçük bir alana indirger ve buna kohleanın nonlinear özelliği denir. Sinir lifleri ilgili oldukları tüylü hücrelerin özelliklerini aynen yansıtırlar, karakteristik frekans ve nonlinear özellikler sinir lifleri içinde aynen geçerlidir. Bu durum sinir liflerindeki enerjinin korti organında kodlanması olarak tanımlanır. Ses uyarılarının taşıdıkları frekansa göre beyinde

değişik yerlerde sonlanması ile sonuçlanır. Yüksek tonlar işitme merkezinin derinliklerinde sonlanırken, düşük tonlar daha yüzeysel sonlanır [107].



**Şekil 3.7** Kohleada ses sinyallerinin elektrik sinyallere dönüşümü (kaynak 104'den değiştirilerek alınmıştır) [104].

**Amaç:** Bu tez çalışmasında patch-clamp tekniği kullanılarak ventral koklear çekirdekte bulunan bushy ve stellate nöronlarının aktif (ateşleme deseni) ve pasif zar (membran potansiyeli, input direnci, zaman sabiti ve kapasitans) özelliklerinin incelenmesi ve bu nöronlarda bulunan TRPM2 katyon kanalının izolasyonunun yapılması amaçlanmaktadır.

## **4. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **4.1 Hayvan Materyali**

Bu deney çalışmasında kullanılan hayvanlar, 26.08.2010 tarihinde Fırat Üniversitesi hayvan deneyleri etik kurulunun aldığı 98 no'lu karar doğrultusunda rapor edilen işlemlere tabi tutulmuşlardır.

Bu deneysel çalışmada hayvan materyali olarak 30 adet 16-18 günlük genç albino Balb C fareler kullanılmıştır. Bu yaştaki farelerin işitme sistemleri büyük oranda gelişimlerini tamamlamışlardır [109].

### **4.2 Kesitlerin Hazırlanması**

Hayvanlar enteretomi makasıyla dekapitasyon yapıldıktan sonra hayvanın başı, sürekli oksijenlenen yapay beyin omurilik sıvısına (aCSF) daldırıldı. Fiziki olarak hasar oluşturmadan ve özellikle beyin sapından çıkan kranial sinirleri germeden diseksiyon yapılarak tüm beyin, kafatasının dışına alındı. Daha sonra inferiyor kollikulus ile süperiyor kollikulus arasından koronal olarak kesildi. Beyin sapının bulunduğu kısım süperior kollikulus aşağıya gelecek şekilde siyanoakrilat (japon yapıştırıcısı) bir yapıştırıcı ile vibratomun teflon blokuna yapıştırıldıktan sonra bu blok sürekli oksijenlenen aCSF solüsyonunun yer aldığı vibrotomdaki yerine yerleştirilmiştir. Titreşimli vibratom ile kohlear çekirdekten 200 µm kalınlığında kesitleri alındı. Kesit, kayıt yapmak üzere 0.3 ml solüsyon hacmine sahip ve içerisinden sürekli 4-5 ml/dakika hızda taze oksijenlenmiş aCSF

solüsyonunun perfüze edildiği kayıt odacığına transfer edildi. Perfüze edilen aCSF solüsyonunun sıcaklığı 33 °C' de sabit tutuldu [110].

**Fizyolojik aCSF solüsyonu**,130 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.3 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3 mM HEPES, 10 mM glukoz içerir. Bu solüsyon perfüzyon öncesi karbojen gazıyla (95 % O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) oksijenlendirildi ve pH'ı,25-31<sup>0</sup>C' de 7.4'e ayarlandı[110].

**Pipet solüsyonu**,108mM potasyum glukonat, 9 mM HEPES, 9 mM EGTA, 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 14mM fosfokreatinin (tris tuzu), 4 mM ATP (Na tuzu) ve 0.3 mM GTP (tris tuzu) içerir; solüsyonun pH'ı 7.4'te potasyum hidroksit (KOH) ile ayarlandı [111].

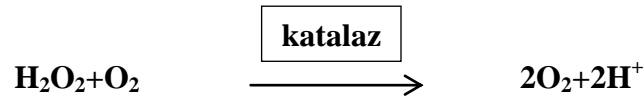
Farmakolojik ajan içeren test solüsyonları kayıt odacığına, boru ve vanalardan oluşan perfüzyon sistemiyle uygulandı.

### **4.3 Kullanılan TRPM2 Agonist ve Antagonisti**

**Hidrojen peroksit:** Hücre proliferasyonu ve gelişimi için önemli bir sinyalleşme molekülü olarak işlev gören H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aynı zamanda bir reaktif oksijen türüdür ve çoğu zaman, oksidatif stres için deneysel model oluşturmak için kullanılmaktadır [112]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nöronlar dahil, hücrelerde üretilen reaktif oksijen türlerinin, kararlı ve serbestçe yayılabilen formudur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in TRPM2'nin aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir [113]. Oksidatif stres sırasında sitoplazmada üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çekirdek ve mitokondri içinde ADP-riboz oluşumunu uyarır. TRPM2 kanalları böylece oksidatif stres kaynaklı hücre içi Ca<sup>+2</sup> girişi ile Ca<sup>+2</sup> bağımlı hücresel süreçleri ortaya çıkartır [114].



**Katalaz:** Reaksiyon katalizleme hızı en yüksek enzimlerden biri olan katalaz dört polipeptit zincirden oluşan bir tetramerdir. Katalaz enzimi eritrosit, karaciğer, böbrek, kemik iliği ve hayvan hücrelerinin özellikle peroksizom organelinde yoğun bir şekilde bulunur. Katalaz, katalitik reaksiyonlar sonucu oluşan reaktif oksijen türlerini (süperoksit ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ve reaktif hidroksil radikali ( $OH^-$ )) detoksifiye eder [115, 116].



#### 4.4 Elektrofizyoloji

##### 4.4.1 Patch-Clamp (Yama-Menteşe) Yöntemi

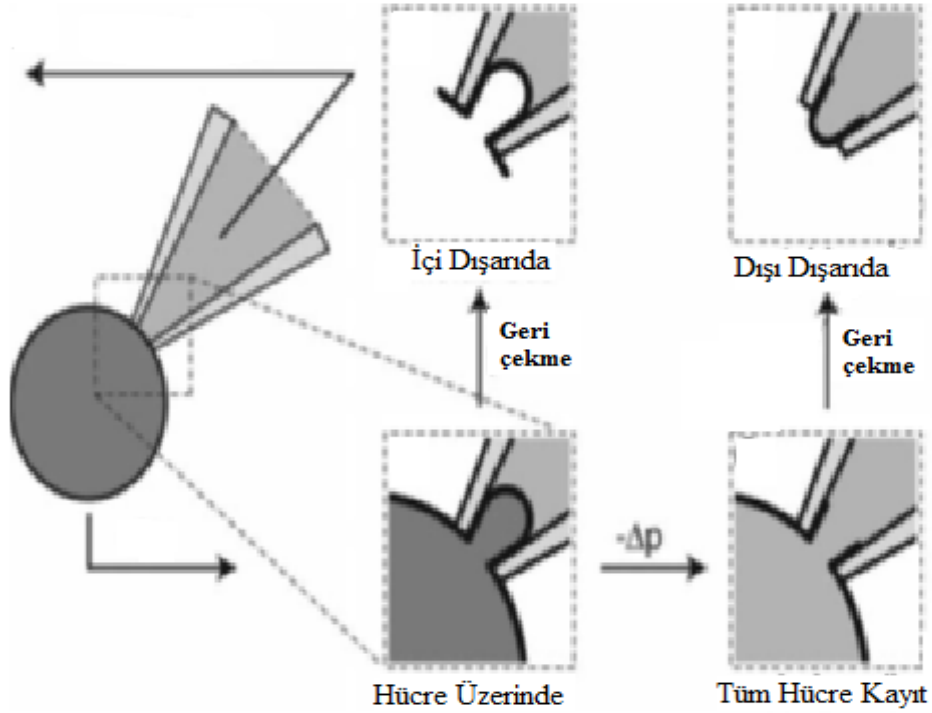
Patch clamp, hücre membranı kanallarından iyon akımlarını incelemek için yaygın bir şekilde kullanılan modern bir elektrofizyolojik tekniktir [117-119].

Patch clamp yöntemi, özel olarak hazırlanmış mikroelettrot ağzının hücre zarı parçasına (patch, yama) sıkıca yapıştırılarak (clamp, menteşe) membran potansiyellerinin sabit bir değere tespit edilmesi ile kanallardan geçen akımların kayıt ve analiz edilmesidir. Pipetin diğer ucundan bir emici pompa ile vakum yaptırılarak hücre zarına sıkıca temas ettirilir. Kaynak yaptırılan bölgede gigaohm düzeyinde elektriksel direnç oluşmaktadır [119-121].

Çalışmanın amacına göre, araştırılması istenilen kimyasala veya nörotransmitter maddenin çeşidine bağlı olarak 4 çeşit patch-clamp konfigürasyonu vardır.

Bunlar;

1. Hücre üzerinde (Cell attached-On cell)
2. Tüm hücre kaydı (Whole-cell recording)
3. Dışı dışarıda (Outside-out)
4. İçi dışarıda (Inside-out) uygulamalarıdır.



Şekil 4.1 Patch-clamp konfigürasyonları (kaynak 122'den değiştirerek alınmıştır) [122].

#### 4.4.1.1 Hücre üzerinde (Cell attached- On cell)

Pipetin (uç kalınlığı 1 $\mu$ m) kayıt alınacak hücre ile teması sağlanır. Pipete az miktarda negatif bir vakum uygulanarak gigaohm düzeyinde bir direnç oluşturulur. Pipet ucundaki hücre membranı, membranın diğer kısımlarından izole edilmiştir fakat hücre içi ortamdan (ikincil haberciler, nörotransmitterler vb.)

etkilenir. Bu uygulama, ikincil haberciler ve voltaj değişiklikleri inceleneceęi zaman tercih edilir [117, 119, 121, 123-125].

#### **4.4.1.2 Tüm Hücre Kaydı (Whole-cell recording)**

Pipetin hücre ile teması sağlandıktan sonra (gigaseal) güçlü bir vakumlama uygulanarak hücre membranı yırtılır. Pipet elektrodu doğrudan hücre sitoplazmasındaki voltaj değişimlerini ölçer. Pipet ucu ile membranın yırtılması sonucunda pipet içerisindeki solüsyon hücre sitoplazmasına, hücre sitoplazmasında pipet içerisine geçer ve denge durumuna gelirler. Bu tip uygulamalar membranda bulunan tüm  $Ca^{+2}$  kanallarının ve hücre içi ikincil habercilerin etkilerinin araştırılmasında kullanılır. Ayrıca hücre içerisine aktivatör veya inaktivatör maddeler kolaylıkla verilerek hücre zarı cevapları kontrol edilir [117, 119, 121, 125-128].

Bu tez çalışmasında tüm hücre kayıt konfigürasyonu kullanılmıştır.

#### **4.4.1.3 Dışı Dışarıda (Outside-out)**

Hücre, tüm hücre kaydı döneminde iken, hücre membranının dışarı koparılması ile kayıt alınması durumudur. Çember hücre dışı solüsyon içerirken, pipet içerisi hücre içi solüsyonla doldurulur. Nörotransmitter maddelerin araştırılmasında ve tek kanal akımlarının kaydı sırasında genellikle bu yöntem kullanılır [117, 119, 121, 125].

#### **4.4.1.4 İçi dışarıda (Inside-out)**

Hücre üzerinde konfigürasyonunda iken, manipülatörün ani titreşim göstermesiyle elde edilir. Pipet ucundaki membran parçasının sitoplazmaya bakan

yüzü dışarda kalır. İçi dışarıda yöntemi  $Ca^{+2}$  gibi intrasellüler faktörler tarafından aktive edilen kanallar ile tek kanal kayıt çalışmalarında kullanılır [117, 119, 121, 125, 127].

**Mikroelektrod Üretimi ve Deney Düzenegi;** Borosilikat cam borulardan (World Precision Instruments, Sarasota, FL. USA) dış çapları 1 mm ve iç çapları 0.58 mm olan mikroelektrodlar üretildi (Brown-Flaming P-97 Sutter Puller). Kayıtlarda kullanılan pipetlerin uç dirençleri 4-8  $M\Omega$  (pipet solüsyonu doldurulduktan sonra) arasında idi. Kesitlerdeki hücreler suya girebilen 630x büyütmeye sahip differansiyel interferans kontrast objektifli upright mikroskop ile (Axioscope FS, Zeiss) görüntülendi. Akım sabitleme (current-clamp) ile iyon akımlarının ölçümü patch-clamp amplifikatörü (200B Amplifier Axon instruments) ile yapıldı. Elektrofizyolojik veriler analog/dijital dönüştürücü ile bilgisayara aktarıldı (Digidata 1200, Axon Instruments, ABD). Uyarı oluşturulması ve veri toplanması (data acquisition) için pClamp yazılımı (Axon Instruments) kullanıldı. Akım kayıtlarının örnekleme 25 10 kHz frekansla yapıldı ve bunlar 5-10 kHz'de filtre edildi.



Şekil 4.2 Patch-clamp sisteminin genel görünüşü.



Şekil 4.3 Mikroelektrodların üretiminde kullanılan pipet çekici (puller).

#### **4.5 İstatistik**

Veriler, SPSS 16.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Grafikler de ise Origin 8.0 grafik programından yararlanıldı. Bushy ve stellate nöronlarının pasif zar özellikleri ile ilgili veriler ortalama  $\pm$  standart sapma (S.s) olarak sunuldu.

## 5. BULGULAR

Bu tez çalışmasında fare kohlear çekirdek nöronlarından bushy ve stellate hücrelerinin pasif ve aktif zar özellikleri elektrofizyolojik olarak çalışılmıştır. Ayrıca bu nöronlarda bulunan TRPM2 katyon kanalının izolasyonu yapılmaya çalışılmıştır. Bushy ve stellate nöronlarına TRPM2 agonisti olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile TRPM2 antagonisti olan katalazın akım-klamp modunda gösterdikleri etkileri belirlenmiştir.

Stellate nöronunda akım uygulaması süresince aksiyon potansiyeli oluşmuştur. Stellate nöronunun dinlenme potansiyeli, input direnci ( $R_{input}$ ), zaman sabiti (Tau) ve kapasitans (C) gibi pasif özellikleri incelenmiştir.

Stellate nöronunun pasif zar özellikleri Tablo 5.1’de verilmiştir.

Tablo 5.1 Stellate hücrelerinin pasif zar özellikleri

Hücre Sayısı	Dinlenme potansiyeli (mV)	İnput direnci ( $\Omega$ )	Zaman Sabiti Tau ( $\tau$ )	Kapasitans (C) $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
1	-67,5 mV	410 $10^6\text{M}\Omega$	8,74 ms	0,2 $10^{-12}$ $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
2	-65,9 mV	106 $10^6\text{M}\Omega$	4,12 ms	0,38 $10^{-12}$ $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
3	-60,3 mV	200 $10^6\text{M}\Omega$	8,84 ms	0,44 $10^{-12}$ $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
4	-67,8 mV	115 $10^6\text{M}\Omega$	2,85 ms	0,24 $10^{-12}$ $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
5	-62 mV	320 $10^6\text{M}\Omega$	13,16 ms	0,41 $10^{-12}$ $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
6	-60,8 mV	160 $10^6\text{M}\Omega$	1,87 ms	0,11 $10^{-12}$ $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
7	-67,5mV	310 $10^6\text{M}\Omega$	3,63 ms	0,11 $10^{-12}$ $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
Ortalama $\pm$ S.s	-64,5 $\pm$ 3,37	231 $\pm$ 116	6,17 $\pm$ 4,1	0,27 $\pm$ 0,14

Bushy nöronunda akım uygulama süresince tek bir aksiyon potansiyeli oluşmuştur. Bushy nöronunun dinlenim potansiyeli, input direnci, zaman sabiti ve kapasitans gibi pasif özellikleri incelenmiştir. Veriler ortalama  $\pm$  S.s olarak verilmiştir.

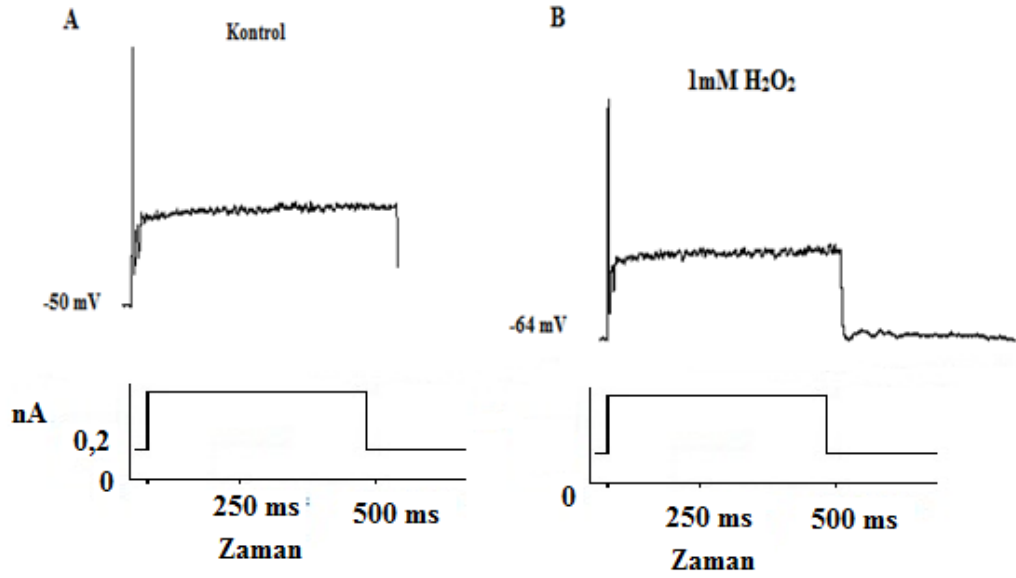
Bushy nöronunun pasif zar özellikleri Tablo 5.2’ de verilmiştir.

**Tablo 5.2** Bushy hücrelerinin pasif zar özellikleri

Hücre Sayısı	Dinlenim potansiyeli (mV)	İnput direnci ( $\Omega$ )	Zaman Sabiti Tau ( $\tau$ )	Kapasitans (C) $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
1	-58,7 mV	130 $10^6 \text{M}\Omega$	2,36 ms	0,18 $10^{-12} \mu\text{F}/\text{cm}^2$
2	-62,2 mV	28 $10^6 \text{M}\Omega$	6,9 ms	0,24 $10^{-12} \mu\text{F}/\text{cm}^2$
3	-60,65 mV	310 $10^6 \text{M}\Omega$	3,63 ms	0,11 $10^{-12} \mu\text{F}/\text{cm}^2$
4	-63,51 mV	616,5 $10^6 \text{M}\Omega$	1,10 ms	0,17 $10^{-12} \mu\text{F}/\text{cm}^2$
5	-73 mV	207,5 $10^6 \text{M}\Omega$	9,23 ms	0,44 $10^{-12} \mu\text{F}/\text{cm}^2$
Ortalama $\pm$ S.s	63,6 $\pm$ 5,54	308 $\pm$ 185	4,6 $\pm$ 3,3	0,17 $\pm$ 0,05



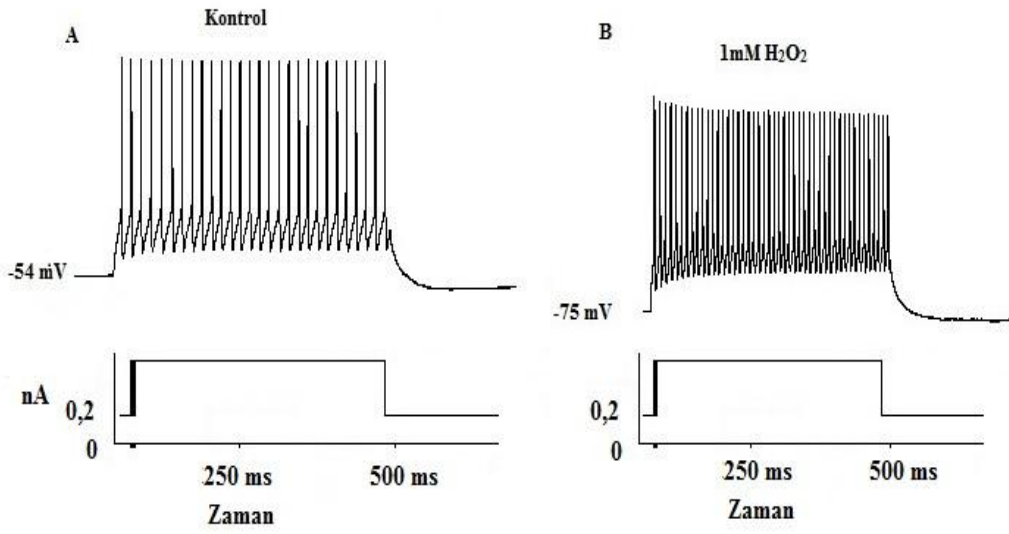
Bushy nöronuna akım-klamp modunda 500 ms süreyle 0,2 nA akım enjeksiyonu yapılarak 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin etkileri incelenmiştir. Yapay beyin omurilik sıvısı (kontrol - aCSF) perfüzyonu sırasında membran dinlenim potansiyeli -50 mV olarak ölçülmüştür. Aynı hücreye 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren aCSF perfüze edildiğinde ise dinlenim potansiyeli -64 mV olarak ölçülmüştür. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bushy nöronunu -14 ± 2,06 mV hiperpolarize etmiştir. 0,2 nA akım enjeksiyonu ile oluşan onset yanıt



karakteri değişmemiştir (Şekil 5.1).

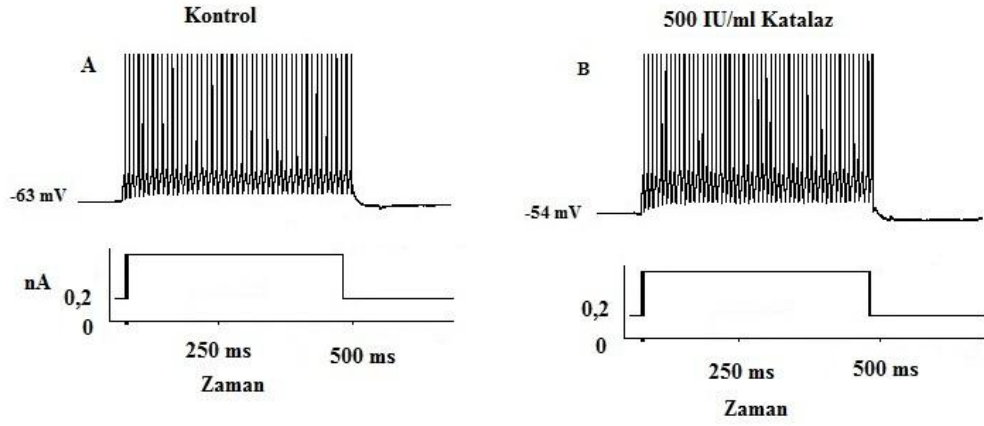
**Şekil 5.1** Bushy hüresine 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının ardından akım-klamp modunda alınan yanıtları **A.** Kontrol aCSF solüsyonu perfüzyonu altında **B.** 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren aCSF perfüzyonu altında alınan kayıt.

Stellate nöronuna tüm hücre akım-klamp modunda 500 ms süreyle 0,2 nA akım enjeksiyonu yapılarak 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin etkileri incelenmiştir. Kontrol aCSF perfüzyonu sırasında membran dinlenim potansiyeli -54 mV olarak ölçülmüştür. Aynı hücreye 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> perfüze edildiğinde dinlenim potansiyeli -75 mV olarak ölçülmüştür. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stellate nöronunu  $-21 \pm 6,35$  mV hiperpolarize etmiştir. Ayrıca 0,2 nA akım enjeksiyonuna karşı oluşan yanıtta incelenmiştir. Membran dinlenim potansiyeli yükseldiği halde stellate hücresinde aksiyon potansiyeli sayısı artmıştır (Şekil 5.2).



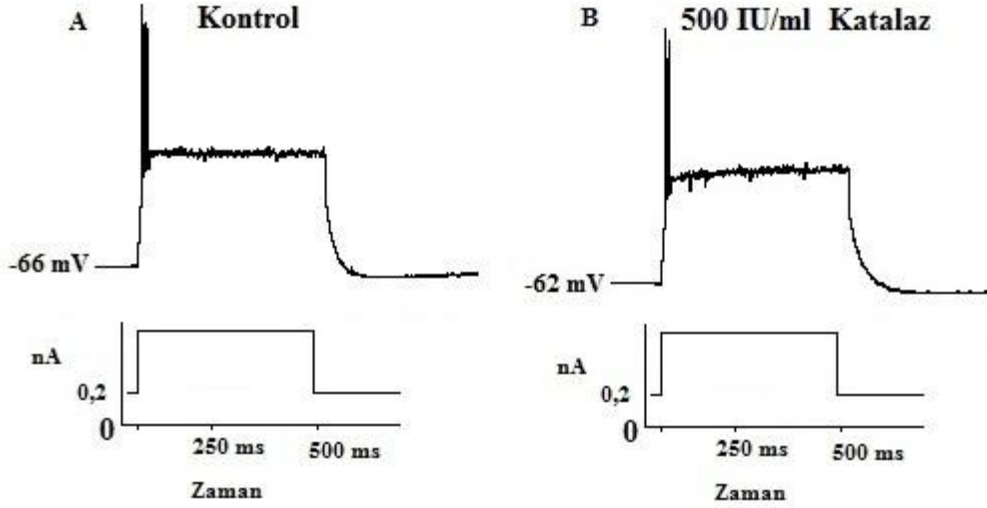
**Şekil 5.2** Stellate hücresinin 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasının ardından akım-klamp modunda alınan yanıtları **A**. Kontrol aCSF solüsyonu perfüzyonu altında **B**. 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren aCSF perfüzyonu altında alınan kayıt.

Stellate nöronuna tüm hücre akım-klamp modunda 500 ms süreyle 0,2 nA akım enjeksiyonu yapılarak katalazın (500 IU/ml) etkileri incelenmiştir. Yapay beyin omurilik sıvısı perfüzyonu sırasında 0,2 nA akım uygulandığında membran dinlenme potansiyeli -63 mV olarak ölçülmüştür. Aynı hücreye katalaz perfüze edildiğinde ise membran potansiyeli -54 mV olarak ölçülmüştür, katalaz stellate nöronunu  $-9 \pm 3,4$  mV kadar depolarize etmiştir.



**Şekil 5.3** Stellate hücresinin 500IU/ml katalaz uygulaması sonrasında akım-klamp modunda yanıtları **A.** Kontrol aCSF solüsyonu perfüzyonu altında **B.** Katalaz (500 IU/ml) perfüzyonu altında alınan kayıt.

Bushy nöronuna tüm hücre akım-klamp modunda 500 ms süreyle 0,2 nA akım enjeksiyonu yapılarak katalazın (500 IU/ml) etkileri incelenmiştir. Yapay beyin omurilik sıvısı perfüzyonu sırasında 0,2 nA akım uygulandığında membran dinlenme potansiyeli -66 mV olarak ölçülmüştür. Aynı hücreye katalaz (500 IU/ml) perfüze edildiğinde ise membran potansiyeli -62 mV olarak ölçülmüştür. Katalaz (500 IU/ml) bushy nöronunu  $4 \pm 1,14$  mV depolarize etmiştir.



**Şekil 5.4** Bushy hücresinin katalaz (500 IU/ml) uygulaması sonrasında akım-klamp modunda yanıtları **A.** Yapay beyin omurilik sıvısı solüsyonu perfüzyonu altında **B.** Katalaz (500 IU/ml) perfüzyonu altında alınan kayıt.

## 6. TARTIŞMA

Bu çalışmada patch-clamp tekniği kullanılarak fare kohlear çekirdeğinde bulunan bushy ve stellate nöronlarının pasif ve aktif zar özellikleri incelenmesi ve bu nöronlardaki TRPM2 katyon kanalının izolasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

### 6.1 Stellate ve bushy nöronlarının aktif ve pasif zar özellikleri

Yapılan bu çalışmada alınan kayıtlarda membran dinlenme potansiyeli stellate ve bushy nöronu için sırasıyla  $-64,5 \pm 3,37$  mV ve  $-63,6 \pm 5,54$  mV olarak bulunmuştur. Bu değerler söz konusu hücreler için rapor edilen değerlere oldukça yakındır. Örneğin Wang ve arkadaşları (2006) bushy nöronu için membran potansiyelini  $-64,3 \pm 0,8$  mV [129], Mc.Ginley (2006) ise  $-64,3 \pm 1,9$  mV [130], Cao ve arkadaşları (2008) ise dinlenme potansiyelini  $-64,5 \pm 4,2$  olarak bulmuşlardır [131]. Bununla birlikte Rich (2010) stellate nöronu için çok daha negatif bir değer olan  $-70$  mV rapor etmiştir [132]. Bu farkın kullanılan hayvan materyalinin daha yaşlı olmasına bağlanabilir. Çünkü Wu ve Oertel (1987) farelerde ventral kohlear çekirdek nöronlarının 17.-18. günlük yaşa kadar hızlı bir gelişim gösterdiğini, daha sonra gelişim devam etse de daha düşük seviyelerde olduğunu ama yine de bir değişimin olduğunu göstermişlerdir [109].

Bu çalışmada aldığımız sonuçlar doğrultusunda input direnci stellate ve bushy nöronu için sırasıyla  $231 \pm 116$  M $\Omega$  ve  $308 \pm 185$  M $\Omega$  olarak bulunmuştur. Elde edilen bu veriler daha önce yapılan çalışmalardan oldukça farklı olduğu görülmektedir. Örneğin bushy nöronu için input direncini Wang ve arkadaşları (2006)  $143,2 \pm 7,7$  M $\Omega$  [129] ve Mc.Ginley (2006)  $66 \pm 21$  M $\Omega$  [130] olarak

rapor etmişler. Benzer şekilde stellate nöronu için input direnci de oldukça farklı rakamlar rapor edilmiştir. Cao (2008) benzer evsftaki hayvan materyali için  $91,2 \pm 11,4 \text{ M}\Omega$  olarak bildirmiştir [131]. Genel olarak literatürde de bu hücreler için çok geniş bir değişkenlik bulunmaktadır. Bu değişkenlik, alınan kayıt kalitesi ile direkt ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Aldığımız kayıtlarda stellate ve bushy nöronu için sırasıyla zaman sabiti değerleri  $6,17 \pm 4,1$  ve  $4,6 \pm 3,3$  ms olarak bulunmuştur. Cao ve arkadaşları (2008)  $8,7 \pm 1,6$  ms olarak bulmuşlardır [131]. Zaman sabiti için bu çalışma ile benzerlik bulunmaktadır. Bushy nöronu için zaman sabiti rapor edilmemiştir. Bu nedenle bushy nöronu için kıyaslama yapılamamaktadır.

Bu çalışmada stellate nöronlarının aksiyon potansiyeli ateşleme desenine bakıldığında stellate hücresinde akım uygulaması süresince sürekli bir aksiyon potansiyeli oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgu literatür ile uyumludur. Oertel (2000), Fujino ve Oertel (2001) ve Cao (2008), Bal ve arkadaşları (2009) da çalışmalarında benzer şekilde stellate nöronunun tonik ateşleme desenine sahip olduğunu göstermiştir [131, 133-135]. Oertel (2000), ve Aldo Rogelis A. (2006) stellate nöronundaki ateşleme deseninin bu şekilde olmasının altında yatan neden olarak yüksek eşikli  $\text{K}^+$  kanal yoğunluğunun bu hücrelerde fazla olması, buna karşın düşük eşikli  $\text{K}^+$  kanalının ise az olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir [133, 136].

Bushy nöronunda akım uygulaması süresince tek bir aksiyon potansiyeli oluşmuştur. Benzer şekilde Mc. Ginley ve arkadaşları (2006) ventral kohlear çekirdekte yaptıkları çalışmada bushy nöronunda tek aksiyon potansiyeli oluştuğunu gözlemlemişlerdir [9, 130, 137]. Bushy nöronunun akım süresince

oluşturduğu tek bir aksiyon potansiyelinin nedeni bushy nöronunda bulunan düşük voltaj ile aktive olan  $K^+$  kanal yoğunluğunun fazla olmasından kaynaklandığı bildirilmektedir [110, 137].

Stellate nöronu bipolar yapıda olmasına rağmen bushy nöronu kısa bir dentritik dallanma gösterir [128]. Nöronlardaki bu farklılık pasif zar özelliklerini büyük ölçüde etkiler. Aynı zamanda nöronların tam bir gelişme sağlamış olması membranda bulunan iyon kanallarının sayısının artmasına bağlı olarak input direncine doğrudan etki eden faktörlerdendir [109]. İnter direnci hücre zarında bulunan iyon kanal yoğunluğu ile de direkt ilişkilidir [137]. Bir nöronun büyüklüğü kapasitansının değişimi üzerinde çok etkilidir. Büyük hücreler yüz ölçümlerinin büyük olması nedeniyle daha yüksek bir kapasitansa sahiptir. İnter direnci ise kapasitansın tam tersine küçük hücrelerde daha yüksektir [138]. Stellate nöronlarının dendritik arborizasyonunun fazla olması, dolayısıyla yüzey alanının fazla olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle stellate nöronlarının zaman sabitinin büyük olması bu ifade ile uyumludur. Bushy nöronlarının zaman sabitinin ise stellate nöronlarına kıyasla küçük olması dendritik arborizasyonunun çok sınırlı olmasına bağlanabilir.

## **6.2 TRPM2 kanalının karakterizasyonu**

Stellate ve bushy nöronlarına TRPM2 katyon kanal agonisti olan  $H_2O_2$  uygulaması sonrasında bushy nöronunda  $14 \pm 20,6$  mV etki gözlenirken stellate nöronunda  $21 \pm 6,35$  mV'luk hiperpolarize edici bir etki gözlenmiştir. Buna karşın, stellate ve bushy nöronlarına TRPM2 katyon kanal antagonisti olan katalaz

uygulamasý sonrasında, bushy nöronunda  $4 \pm 1,14$  mV'luk, stellate nöronunda ise  $9 \pm 3,4$  mV'luk depolarize edici bir etki gözlenmiřtir.

TRPM2 katyon kanalı agonisti olan  $H_2O_2$  bazı nöronlarda oksidatif strese bağlı hücre ölümünü tetiklerken substantia GABAerjik nöronlarında ise ölüme neden olmamaktadır [139].  $H_2O_2$ 'in apoptozu indükleyici etkisi doza bağımlı değişiklik gösterdiği rapor edilmiştir. Aynı zamanda  $H_2O_2$ 'nin bazı nöronlarda düşük konsantrasyonlarda etki oluşturmadığı gözlenmiştir [127]. Buna ek olarak endojen ve eksojen  $H_2O_2$  uygulanması GABAerjik nöronların depolarize olmasını sağlamıştır [139]. Bu bulgu bizim çalışmada elde ettiğimiz bulgu ile çelişmektedir. Bunun nedeni muhtemelen bu hücrelerin sahip olduğu  $K_{ATP}$  kanalları olabilir.  $K_{ATP}$  kanallarının aktivasyonu, hücrenin hiperpolarize olmasına neden olur. Ancak kohlear çekirdekte bulunan bushy ve stellate nöronlarına eksojen  $H_2O_2$  uygulamasý sonrasında depolarize edice bir etki beklenirken aksine bu nöronlarda hiperpolarize edici bir etki gözlenmesi, stellate ve bushy nöronlarında bulunan TRPM2 katyon kanalının tek başına  $H_2O_2$  indüklenmesi ile açılmayacağını veya aktive edilse bile yine oksidatif stres veya  $H_2O_2$  indüklenmesi ile açılan  $K_{ATP}$  akımının, daha baskın olmasından dolayı  $H_2O_2$  aktive olan  $K_{ATP}$ 'nin yine  $H_2O_2$  ile aktive olan TRPM2 kanalının etkisini maskelediği anlamına gelebilir [140].

Diđer bir olasılık ise  $H_2O_2$  uygulamasının her zaman TRPM2 katyon kanalını uyarmamasý da olabilir. Örneęin insan nötrofil granülosit hücrelerinde  $H_2O_2$  TRPM2 kanalını aktive edememektedir [141, 142]. Bu durum TRPM2 için  $H_2O_2$ 'nin her zaman kullanılabilir spesifik bir agonist olmadığını



göstermektedir. Kohlear çekirdek nöronlarından real-time PCR tekniği kullanılarak TRPM2 iyon kanalının varlığı belirtilmiştir.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi metabolize eden (parçalayan-yıkan) enzim olan katalaz kullanılan çalışmalarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> etkisinin ortadan kaldırıldığı rapor edilmiştir [139]. Eksojen veya endojen olarak artırılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> etkileri katalaz tarafından bloklanmaktadır [139]. Bizim çalışmamız gösteriyor ki tek başına katalaz uygulaması (bushy nöronu için  $4 \pm 1,14$  mV, stellate nöronu için  $9 \pm 3,4$  mV) hücreyi depolarize etmektedir. Bunun nedeni hücrenin metabolizması sırasında oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in katalaz tarafından yıkımlanması sonucunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>tarafından aktive edilen K<sub>ATP</sub> inhibe etmesi olabileceği düşünülmektedir[139, 143].

Sonuç olarak bu çalışmada kohlear çekirdekteki stellate ve bushy nöronlarının pasif ve aktif zar özellikleri belirlendi. Ancak kullanmış olduğumuz agonist ve antagonistler ile TRPM2 katyon kanalı elektrofizyolojik olarak karakterize edilememiştir.

## 7. KAYNAKÇA

1. Cooper GM and RE Hausman. The cell: a molecular approach. 4 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2007.
2. Li M, FA Hays, Z Roe-Zurz, et al. Selecting optimum eukaryotic integral membrane proteins for structure determination by rapid expression and solubilization screening. *J Mol Biol* 2009; 385(3): 820-30.
3. Elinder F, J Nilsson, and P Arhem. On the opening of voltage-gated ion channels. *Physiol Behav* 2007; 92(1-2): 1-7.
4. Puralı N. Hücre Elektrofizyoloji ve Görüntülemenin Temelleri. 1 ed. İstanbul: Veri Medikal Yayıncılık, 2008.
5. Katzung BG MS, Trevor AJ,. Basic and Clinical Pharmacology. 10 ed. San Francisco, 2006.
6. Hille B. Ion Channels of Excitable Membranes. Vol. 3. Sinauer Associates, 2001.
7. Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; 26(1): 13-25.
8. Catterall WA, AL Goldin, and SG Waxman. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57(4): 397-409.
9. England S and MJ de Groot. Subtype-selective targeting of voltage-gated sodium channels. *Br J Pharmacol* 2009; 158(6): 1413-25.
10. Isom LL and WA Catterall. Na<sup>+</sup> channel subunits and Ig domains. *Nature* 1996; 383(6598): 307-8.
11. Tseng TT, AM McMahon, VT Johnson, et al. Sodium channel auxiliary subunits. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2007; 12(3-4): 249-62.
12. Lai HC and LY Jan. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(7): 548-62.
13. Dib-Hajj SD, JA Black, and SG Waxman. Voltage-gated sodium channels: therapeutic targets for pain. *Pain Med* 2009; 10(7): 1260-9.
14. Noda M, S Shimizu, T Tanabe, et al. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 1984; 312(5990): 121-7.
15. Duclohier H. Structure-function studies on the voltage-gated sodium channel. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1788(11): 2374-9.
16. Fozzard HA and DA Hanck. Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms. *Physiol Rev* 1996; 76(3): 887-926.

17. Satin J, JW Kyle, M Chen, RB Rogart, and HA Fozzard. The cloned cardiac Na channel alpha-subunit expressed in *Xenopus* oocytes show gating and blocking properties of native channels. *J Membr Biol* 1992; 130(1): 11-22.
18. Zhu S, S Peigneur, B Gao, et al. Molecular diversity and functional evolution of scorpion potassium channel toxins. *Mol Cell Proteomics* 2011; 10(2): M110 002832.
19. Shieh CC, M Coghlan, JP Sullivan, and M Gopalakrishnan. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000; 52(4): 557-94.
20. Dhamija R, DL Renaud, SJ Pittock, et al. Neuronal voltage-gated potassium channel complex autoimmunity in children. *Pediatr Neurol* 2011; 44(4): 275-81.
21. Gutman GA, KG Chandy, S Grissmer, et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57(4): 473-508.
22. Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 2002; 419(6902): 35-42.
23. O'Grady SM and SY Lee. Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(8): 1578-94.
24. Matko J. K<sup>+</sup> channels and T-cell synapses: the molecular background for efficient immunomodulation is shaping up. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24(8): 385-9.
25. Lang F, E Gulbins, I Szabo, et al. Cell volume and the regulation of apoptotic cell death. *J Mol Recognit* 2004; 17(5): 473-80.
26. Choe S. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3(2): 115-21.
27. Lee SY, A Lee, J Chen, and R MacKinnon. Structure of the KvAP voltage-dependent K<sup>+</sup> channel and its dependence on the lipid membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(43): 15441-6.
28. Choe S, A Kreusch, and PJ Pfaffinger. Towards the three-dimensional structure of voltage-gated potassium channels. *Trends Biochem Sci* 1999; 24(9): 345-9.
29. Leung YM. Voltage-gated K<sup>+</sup> channel modulators as neuroprotective agents. *Life Sci* 2010; 86(21-22): 775-80.
30. Gu C and J Barry. Function and mechanism of axonal targeting of voltage-sensitive potassium channels. *Prog Neurobiol* 2011; 94(2): 115-32.
31. Beck H, H Clusmann, T Kral, et al. Potassium currents in acutely isolated human hippocampal dentate granule cells. *J Physiol* 1997; 498 ( Pt 1): 73-85.
32. Kim J and DA Hoffman. Potassium channels: newly found players in synaptic plasticity. *Neuroscientist* 2008; 14(3): 276-86.
33. Coetzee WA, Y Amarillo, J Chiu, et al. Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 868: 233-85.
34. Berridge MJ. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 1997; 499 ( Pt 2): 291-306.

35. Lozovaya N, R Min, V Tsintsadze, and N Burnashev. Dual modulation of CNS voltage-gated calcium channels by cannabinoids: Focus on CB1 receptor-independent effects. *Cell Calcium* 2009; 46(3): 154-62.
36. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 521-55.
37. Catterall WA and AP Few. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 2008; 59(6): 882-901.
38. Liao P, HY Zhang, and TW Soong. Alternative splicing of voltage-gated calcium channels: from molecular biology to disease. *Pflugers Arch* 2009; 458(3): 481-7.
39. Seisenberger C, V Specht, A Welling, et al. Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem* 2000; 275(50): 39193-9.
40. Johnston D, BR Christie, A Frick, et al. Active dendrites, potassium channels and synaptic plasticity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; 358(1432): 667-74.
41. Trimmer JS and KJ Rhodes. Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu Rev Physiol* 2004; 66: 477-519.
42. Takahashi T and A Momiyama. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 1993; 366(6451): 156-8.
43. Yokoyama CT, RE Westenbroek, JW Hell, et al. Biochemical properties and subcellular distribution of the neuronal class E calcium channel alpha 1 subunit. *J Neurosci* 1995; 15(10): 6419-32.
44. Matsushita K, M Wakamori, IJ Rhyu, et al. Bidirectional alterations in cerebellar synaptic transmission of tottering and rolling Ca<sup>2+</sup> channel mutant mice. *J Neurosci* 2002; 22(11): 4388-98.
45. Kim D, D Park, S Choi, et al. Thalamic control of visceral nociception mediated by T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Science* 2003; 302(5642): 117-9.
46. Striessnig J and A Koschak. Exploring the function and pharmacotherapeutic potential of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels with gene knockout models. *Channels (Austin)* 2008; 2(4): 233-51.
47. Maroto R, A Raso, TG Wood, et al. TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 2005; 7(2): 179-85.
48. Nilius B, G Owsianik, T Voets, and JA Peters. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 2007; 87(1): 165-217.
49. Cosens DJ and A Manning. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 1969; 224(5216): 285-7.
50. Montell C. *Drosophila* TRP channels. *Pflugers Arch* 2005; 451(1): 19-28.
51. Zhu X, PB Chu, M Peyton, and L Birnbaumer. Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene. *FEBS Lett* 1995; 373(3): 193-8.

52. Wes PD, J Chevesich, A Jeromin, et al. TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(21): 9652-6.
53. Zhu X, M Jiang, M Peyton, et al. *trp*, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *Cell* 1996; 85(5): 661-71.
54. Voets T, K Talavera, G Owsianik, and B Nilius. Sensing with TRP channels. *Nat Chem Biol* 2005; 1(2): 85-92.
55. Minke B and B Cook. TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev* 2002; 82(2): 429-72.
56. Corey DP. New TRP channels in hearing and mechanosensation. *Neuron* 2003; 39(4): 585-8.
57. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003; 426(6966): 517-24.
58. Delmas P. Polycystins: from mechanosensation to gene regulation. *Cell* 2004; 118(2): 145-8.
59. Nilius B. TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772(8): 805-12.
60. Hofmann T, M Schaefer, G Schultz, and T Gudermann. Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(11): 7461-6.
61. Dietrich A, H Kalwa, and T Gudermann. TRPC channels in vascular cell function. *Thromb Haemost* 2010; 103(2): 262-70.
62. Lucas P, K Ukhanov, T Leinders-Zufall, and F Zufall. A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 2003; 40(3): 551-61.
63. Abramowitz J and L Birnbaumer. Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. *FASEB J* 2009; 23(2): 297-328.
64. Li HS, XZ Xu, and C Montell. Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF. *Neuron* 1999; 24(1): 261-73.
65. Pedersen SF, G Owsianik, and B Nilius. TRP channels: an overview. *Cell Calcium* 2005; 38(3-4): 233-52.
66. Nilius B and G Owsianik. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 2011; 12(3): 218.
67. Duncan LM, J Deeds, J Hunter, et al. Down-regulation of the novel gene *melastatin* correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* 1998; 58(7): 1515-20.
68. Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005; 2005(272): re3.
69. Fleig A and R Penner. The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25(12): 633-9.
70. Takahashi N, D Kozai, R Kobayashi, M Ebert, and Y Mori. Roles of TRPM2 in oxidative stress. *Cell Calcium* 2011; 50(3): 279-87.
71. Hara Y, M Wakamori, M Ishii, et al. LTRPC2 Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 2002; 9(1): 163-73.

72. Hoffmann A, C Grimm, R Kraft, et al. TRPM3 is expressed in sphingosine-responsive myelinating oligodendrocytes. *J Neurochem* 2010; 114(3): 654-65.
73. Nilius B, F Mahieu, J Prenen, et al. The Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *EMBO J* 2006; 25(3): 467-78.
74. Ullrich ND, T Voets, J Prenen, et al. Comparison of functional properties of the Ca<sup>2+</sup>-activated cation channels TRPM4 and TRPM5 from mice. *Cell Calcium* 2005; 37(3): 267-78.
75. Hofmann T, V Chubanov, T Gudermann, and C Montell. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol* 2003; 13(13): 1153-8.
76. Aarts MM and M Tymianski. TRPM7 and ischemic CNS injury. *Neuroscientist* 2005; 11(2): 116-23.
77. Zhang L and GJ Barritt. Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca<sup>2+</sup> channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(22): 8365-73.
78. Cheng X, D Shen, M Samie, and H Xu. Mucolipins: Intracellular TRPML1-3 channels. *FEBS Lett* 2010; 584(10): 2013-21.
79. Moran MM, H Xu, and DE Clapham. TRP ion channels in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2004; 14(3): 362-9.
80. Igarashi P and S Somlo. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(9): 2384-98.
81. Kottgen M. TRPP2 and autosomal dominant polycystic kidney disease. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772(8): 836-50.
82. Hirokawa N, Y Tanaka, Y Okada, and S Takeda. Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* 2006; 125(1): 33-45.
83. Perraud AL, A Fleig, CA Dunn, et al. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 2001; 411(6837): 595-9.
84. Nagamine K, J Kudoh, S Minoshima, et al. Molecular cloning of a novel putative Ca<sup>2+</sup> channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics* 1998; 54(1): 124-31.
85. Smith MA, PS Herson, K Lee, RD Pinnock, and ML Ashford. Hydrogen-peroxide-induced toxicity of rat striatal neurones involves activation of a non-selective cation channel. *J Physiol* 2003; 547(Pt 2): 417-25.
86. Kraft R, C Grimm, K Grosse, et al. Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286(1): C129-37.
87. Inamura K, Y Sano, S Mochizuki, et al. Response to ADP-ribose by activation of TRPM2 in the CRI-G1 insulinoma cell line. *J Membr Biol* 2003; 191(3): 201-7.
88. Perraud AL, C Schmitz, and AM Scharenberg. TRPM2 Ca<sup>2+</sup> permeable cation channels: from gene to biological function. *Cell Calcium* 2003; 33(5-6): 519-31.

89. Xie YF, JF Macdonald, and MF Jackson. TRPM2, calcium and neurodegenerative diseases. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2010; 2(2): 95-103.
90. Sumoza-Toledo A and R Penner. TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling. *J Physiol* 2011; 589(Pt 7): 1515-25.
91. Wehage E, J Eisfeld, I Heiner, et al. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem* 2002; 277(26): 23150-6.
92. Kuhn FJ, I Heiner, and A Luckhoff. TRPM2: a calcium influx pathway regulated by oxidative stress and the novel second messenger ADP-ribose. *Pflugers Arch* 2005; 451(1): 212-9.
93. Sano Y, K Inamura, A Miyake, et al. Immunocyte Ca<sup>2+</sup> influx system mediated by LTRPC2. *Science* 2001; 293(5533): 1327-30.
94. Kuhn FJ and A Luckhoff. Sites of the NUDT9-H domain critical for ADP-ribose activation of the cation channel TRPM2. *J Biol Chem* 2004; 279(45): 46431-7.
95. Kolisek M, A Beck, A Fleig, and R Penner. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell* 2005; 18(1): 61-9.
96. Fonfria E, PR Murdock, FS Cusdin, et al. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res* 2006; 26(3): 159-78.
97. Perraud AL, CL Takanishi, B Shen, et al. Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem* 2005; 280(7): 6138-48.
98. Hill K, CD Benham, S McNulty, and AD Randall. Flufenamic acid is a pH-dependent antagonist of TRPM2 channels. *Neuropharmacology* 2004; 47(3): 450-60.
99. Chen Q, EJ Vazquez, S Moghaddas, CL Hoppel, and EJ Lesnefsky. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 2003; 278(38): 36027-31.
100. Togashi K, Y Hara, T Tominaga, et al. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J* 2006; 25(9): 1804-15.
101. Heiner I, J Eisfeld, and A Luckhoff. Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes. *Cell Calcium* 2003; 33(5-6): 533-40.
102. Arıncı K and A Elhan. *Anatomi*. Ankara: Güneş Kitabevi, 1997
103. Karosi T and I Sziklai. Etiopathogenesis of otosclerosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010; 267(9): 1337-49.
104. Frank H. *Netter JAC, James P. Atlas of Neuroanatomy and Neurophysiology*. A.B.D, 2002.
105. Arıncı K EA. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd.Şti, 1997
106. Akyıldız N. *Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi*. 1998, Bilimsel Tıp Yayınevi: Ankara: .

107. N A. Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi. Vol. Cilt 1. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 1998
108. Michael Schuenke. Head and Neuroanatomy. New York, 2010.
109. Wu SH and D Oertel. Maturation of synapses and electrical properties of cells in the cochlear nuclei. *Hear Res* 1987; 30(1): 99-110.
110. Bal R and D Oertel. Hyperpolarization-activated, mixed-cation current (I<sub>h</sub>) in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *J Neurophysiol* 2000; 84(2): 806-17.
111. Forscher P, GS Oxford, and D Schulz. Noradrenaline modulates calcium channels in avian dorsal root ganglion cells through tight receptor-channel coupling. *J Physiol* 1986; 379: 131-44.
112. Naziroglu M. TRPM2 channel membrane currents in primary rat megakaryocytes were activated by the agonist ADP-ribose but not oxidative stress. *J Membr Biol* 2011; 241(2): 51-7.
113. Kaneko S, S Kawakami, Y Hara, et al. A critical role of TRPM2 in neuronal cell death by hydrogen peroxide. *J Pharmacol Sci* 2006; 101(1): 66-76.
114. Hecquet CM, GU Ahmmed, SM Vogel, and AB Malik. Role of TRPM2 channel in mediating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> entry and endothelial hyperpermeability. *Circ Res* 2008; 102(3): 347-55.
115. Armagan A, S Kutluhan, M Yilmaz, et al. Topiramate and vitamin e modulate antioxidant enzyme activities, nitric oxide and lipid peroxidation levels in pentylenetetrazol-induced nephrotoxicity in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103(2): 166-70.
116. Camello-Almaraz C, PJ Gomez-Pinilla, MJ Pozo, and PJ Camello. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291(5): C1082-8.
117. Nilius B. Pflugers Archiv and the advent of modern electrophysiology. From the first action potential to patch clamp. *Pflugers Arch* 2003; 447(3): 267-71.
118. Arsiero M, HR Luscher, and M Giugliano. Real-time closed-loop electrophysiology: towards new frontiers in in vitro investigations in the neurosciences. *Arch Ital Biol* 2007; 145(3-4): 193-209.
119. Saygın M, Nazıroğlu, M., Çalışkan, S. Patch-Clamp'ın elektrofizyolojik uygulamalarında son gelişmeler. in *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2010.
120. Sigworth FJ. The variance of sodium current fluctuations at the node of Ranvier. *J Physiol* 1980; 307: 97-129.
121. Hamill OP, A Marty, E Neher, B Sakmann, and FJ Sigworth. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981; 391(2): 85-100.
122. Pihl J, J Sinclair, M Karlsson, and O Orwar. Microfluidics for cell-based assays. *Materials Today* 2005; 8(12): 46-51.
123. Sigworth FJ and E Neher. Single Na<sup>+</sup> channel currents observed in cultured rat muscle cells. *Nature* 1980; 287(5781): 447-9.



124. Sakmann B, Neher, E., . Single channel recording. Plenum 1983.
125. Teisseyre A. The "patch-clamp" technique and its application in investigations of the properties of human T lymphocyte potassium channels. *Cell Mol Biol Lett* 2001; 6(1): 93-105.
126. Naziroglu M, A Luckhoff, and E Jungling. Antagonist effect of flufenamic acid on TRPM2 cation channels activated by hydrogen peroxide. *Cell Biochem Funct* 2007; 25(4): 383-7.
127. Naziroglu M and A Luckhoff. A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-Ribose in TRPM2 channels: single channel events. *Neurochem Res* 2008; 33(7): 1256-62.
128. Bal R, G Baydas, and M Naziroglu. Electrophysiological properties of ventral cochlear nucleus neurons of the dog. *Hear Res* 2009; 256(1-2): 93-103.
129. Wang Y and PB Manis. Temporal coding by cochlear nucleus bushy cells in DBA/2J mice with early onset hearing loss. *J Assoc Res Otolaryngol* 2006; 7(4): 412-24.
130. McGinley MJ and D Oertel. Rate thresholds determine the precision of temporal integration in principal cells of the ventral cochlear nucleus. *Hear Res* 2006; 216-217: 52-63.
131. Cao XJ, MJ McGinley, and D Oertel. Connections and synaptic function in the posteroventral cochlear nucleus of deaf jerker mice. *J Comp Neurol* 2008; 510(3): 297-308.
132. Rich AW, R Xie, and PB Manis. Hearing loss alters quantal release at cochlear nucleus stellate cells. *Laryngoscope* 2010; 120(10): 2047-53.
133. Fujino K and D Oertel. Cholinergic modulation of stellate cells in the mammalian ventral cochlear nucleus. *J Neurosci* 2001; 21(18): 7372-83.
134. Oertel D, S Shatadal, and XJ Cao. In the ventral cochlear nucleus Kv1.1 and subunits of HCN1 are colocalized at surfaces of neurons that have low-voltage-activated and hyperpolarization-activated conductances. *Neuroscience* 2008; 154(1): 77-86.
135. Bal R, S Erdogan, G Theophilidis, G Baydas, and M Naziroglu. Assessing the effects of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the cholinergic synapses of the stellate cells of the mouse cochlear nucleus using whole-cell patch-clamp recording. *Neurotoxicology* 2010; 31(1): 113-20.
136. Rodrigues AR and D Oertel. Hyperpolarization-activated currents regulate excitability in stellate cells of the mammalian ventral cochlear nucleus. *J Neurophysiol* 2006; 95(1): 76-87.
137. Bal R and G Baydas. Electrophysiological properties of octopus neurons of the cat cochlear nucleus: an in vitro study. *J Assoc Res Otolaryngol* 2009; 10(2): 281-93.
138. Francis HW and PB Manis. Effects of deafferentation on the electrophysiology of ventral cochlear nucleus neurons. *Hear Res* 2000; 149(1-2): 91-105.

139. Lee CR, P Witkovsky, and ME Rice. Regulation of Substantia Nigra Pars Reticulata GABAergic Neuron Activity by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via Flufenamic Acid-Sensitive Channels and K(ATP) Channels. *Front Syst Neurosci* 2011; 5: 14.
140. Avshalumov MV and ME Rice. Activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> (K(ATP)) channels by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(20): 11729-34.
141. Naziroglu M. TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochem Res* 2011; 36(3): 355-66.
142. Heiner I, J Eisfeld, M Warnstedt, et al. Endogenous ADP-ribose enables calcium-regulated cation currents through TRPM2 channels in neutrophil granulocytes. *Biochem J* 2006; 398(2): 225-32.
143. Chung KK, PS Freestone, and J Lipski. Expression and functional properties of TRPM2 channels in dopaminergic neurons of the substantia nigra of the rat. *J Neurophysiol* 2011; 106(6): 2865-75.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### **KİŞİSEL BİLGİLER**

Ad Soyad :Ersen ERASLAN  
Doğum Yeri ve Tarihi : Elazığ-1985  
Adresi :Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A  
D. Kat:4 Elazığ/Merkez  
e-mail : ersen.eraslan@gmail.com

### **EĞİTİM BİLGİLERİ**

- Lisans –F. Ü. Biyoloji Bölümü 2005 - 2009 - Elazığ
- Yüksek Lisans - F. Ü. -Tıp Fakültesi - Fizyoloji AD 2010 -2012 - Elazığ

### **YABANCI DİL**

- İngilizce (Orta)

### **BİLGİSAYAR**

- Ms – Windows/Office
- Noldus – Ethovision v.6
- Edius v.4
- Spss v.16
- Sigmaplot v.12

### **BİLİMSEL ETKİNLİKLER VE KURSLAR**

- Elazığ Veteriner Araştırma Enstitüsü – Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası – 2011
- Medipol Üniversitesi – Nöron Kültür Kursu – İstanbul – 2011
- Selçuk Üniversitesi - II. Ulusal Hücresel Sinir Bilim Günleri – Konya – 2011
- TÜBİTAK SBAG 110S397'nolu projede araştırmacı ve bursiyer