

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL FİBROMİYALJİ MODELİNDE SELENYUMUN
KALSIYUM SİNYALİ, APOPTOZİS VE OKSİDATİF STRES
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Esra YÜKSEL

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

1. Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN

2. Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mustafa NAZİROĞLU

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Kordinasyon
Birimi tarafından 4562-TU2-16 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA – 2017

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın oluşturulmasında ve yürütülmesinde her türlü desteği gösteren ve deneyimlerini esirgemeyen, eğitimime büyük katkıda bulunan 1. danışman hocam Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN'e ve 2. danışman hocam Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na;

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan, mesleği öğrenmemizde bizlere destek olan İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. M. Cem KOÇKAR başta olmak üzere değerli hocalarım, Prof. Dr. Altuğ ŞENOL, Doç. Dr. Murat KOÇER, Yrd. Doç. Dr. E. Güçhan ALANOĞLU'na;

Uzmanlık eğitimim süresince beraber çalıştığımız asistan arkadaşlarıma, tüm Biyofizik A.D çalışanlarına,

Çalışma süresince verdikleri destekten dolayı Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve çalışanlarına,

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, her konuda destek olan, bu zorlu dönemimde gösterdiği özveri ve anlayışı ile bana güç veren sevgili eşim Dr. Murat Yüksel'e, fedakarlıkların en büyüğünü gösteren canım yavrularım Murat Kaan, Tunahan ve Tuana 'ma, beni yetiştiren, sevgi, sabır ile bugünlere gelmemi sağlayan, her türlü kahrımı çeken anneme, babama ve abilerime ithaf ediyorum.

Dr. Esra YÜKSEL

2017- ISPARTA

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
GRAFİKLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Fibromiyalji Sendromu	4
2.1.1. Tanım	4
2.1.2. Tarihçe	4
2.1.3. Epidemiyoloji	5
2.1.4. Etiyopatogenez	5
2.1.4.1. Genetik Faktörler	5
2.1.4.2. İmmünolojik Mekanizmalar	5
2.1.4.3. Çevresel ve Psikolojik Faktörler	6
2.1.4.4. Santral Mekanizmalar	6
2.1.4.4.1. Nöroendokrin Bozukluklar	6
2.1.4.4.2. Uyku Bozuklukları	7
2.1.4.4.3. Santral Sensitizasyon	8
2.1.4.5. Periferik Teoriler	8
2.1.4.5.1. Kas ve İlişkili Bozukluklar	8
2.1.4.5.2. Otonomik Disfonksiyon	9
2.1.5. Klinik Özellikler	9
2.1.5.1. Ağrı	9
2.1.5.2. Tutukluk	9
2.1.5.3. Yumuşak Dokularda ve Eklemlerde Subjektif Şişlik	10
2.1.5.4. Yorgunluk ve Halsizlik	10
2.1.5.5. Sabah Yorgunluğu	10

2.1.5.6. Uyku Bozukluğu	10
2.1.5.7. Pareteziler	10
2.1.5.8. Psikolojik Bulgular.....	11
2.1.5.9. Diğer Bulgular.....	11
2.1.6. Laboratuvar ve Görüntüleme Yöntemleri.....	11
2.1.7. Tedavi	11
2.1.7.1. Nonfarmakolojik Tedavi	12
2.1.7.1.1. Hasta Eğitimi	12
2.1.7.1.2. Bilişsel - Davranışsal Tedavi.....	12
2.1.7.1.3. Düzenli Yaşam Sağlanması.....	12
2.1.7.1.4. Egzersiz	13
2.1.7.1.5. Fizik Tedavi Yöntemleri.....	13
2.1.7.2. Farmakolojik Tedavi	13
2.1.7.2.1. Antidepresanlar.....	13
2.1.7.2.1.1. Trisiklik Antidepresanlar (TSA).....	13
2.1.7.2.1.2. Selektif Serotonin Geri Alım İnhibitörleri	14
2.1.7.2.1.3. Serotonin ve Norepinefrin Geri Alım İnhibitörleri	14
2.1.7.2.1.4. Monoamin Oksidaz İnhibitörleri	14
2.1.7.2.2. Antikonvülzanlar	15
2.1.7.2.3. Non Steroid Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİİ).....	15
2.1.7.2.4. Sedatif ve Hipnotikler.....	15
2.1.7.2.5. Opiyatlar	16
2.1.7.2.6. Diğer İlaçlar.....	16
2.2. Selenyum (Se)	16
2.3. Apoptozis	18
2.4. Oksidatif Stres	20
2.4.1. Serbest Radikaller	20
2.4.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$).....	21
2.4.1.2. Hidrojen Peroksit	22
2.4.1.3. Hidroksil Radikali	23
2.4.1.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri	23
2.4.1.2.1. Membran Lipidleri Üzerinde Etkileri.....	24
2.4.1.2.2. Proteinler Üzerinde Etkileri.....	24

2.4.1.2.3. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri	24
2.4.1.2.4. Karbonhidratlar Üzerinde Etkileri	25
2.4.2. Antioksidanlar.....	25
2.4.2.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	26
2.4.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	27
2.5. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali	27
2.5.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi	27
2.5.2. Hücre içi Kalsiyum Sinyalinin Oluşumu	27
2.6. Transient Receptör Potansiyel (TRP) Kanalları	29
2.6.1. Transient Receptör Potansiyel Melastatin (TRPM) Kanalları	30
2.6.1.1. Transient Receptör Potansiyel Melastatin 2 (TRPM2) Kanalları	31
2.6.1.2. Transiyent Receptör Potansiyel Vanilloid 1 (TRPV1) Kanalları	33
3. MATERİYAL VE METOD	36
3.2. Deney Hayvanları.....	36
3.2. Deney Grupları	36
3.2.1. Kontrol Grubu (n=10).....	37
3.2.2. Kontrol + Selenyum Grubu (n=10).....	37
3.2.3. Fibromiyalji Grubu (n=10)	37
3.2.4. Fibromiyalji + Selenyum Grubu (n=10)	37
3.3. HCI ile Fibromiyalji Oluşturulması	38
3.4. Ratların Sakrifikasyonu ve Örneklerin Alınması	39
3.4.1. Sıçan Arka Kök Gangliyon (AKG) Hücreleri İzolasyonu.....	40
3.5. Labaratuvar.....	42
3.5.1. Elde Edilen Taze Kan ve Doku Örneklerinde	42
3.5.1.1. Lipit Peroksidasyon Analizi	43
3.5.1.2. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü (İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizleri)	43
3.5.2. Antioksidan Vitamin Analizleri.....	44
3.5.3. Yama-Menteşe (Patch-Clamp) Deneyleri.....	45
3.5.3.1. Solüsyonların Hazırlanması	45
3.5.4. Hücre İçi Kalsiyum Ölçülmesi	46
3.5.5. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Üretimi Tayini.....	46

3.5.6. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi.....	47
3.5.7. Apoptozis ve Kaspaz Testleri	47
3.5.8. Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Tayini	48
3.6. İstatistiksel Yöntemler	48
4. BULGULAR	49
4.1. Se Tedavisinin Hot Plate Testi ile Pençe Çekme Eşiği Üzerindeki Etkisi	49
4.2. Se Tedavisinin Von Frey Testi ile Pençe Çekme Eşiği Üzerindeki Etkisi.....	50
4.3. Sıçanların Arka Kök Ganglion (AKG) ve Siyatik Sinirdeki (SyS) TRPV1 Kanallarından Kalsiyum İyon Geçişi	51
4.4. Sıçanların AKG ve SyS'deki TRPM2 Kanallarından Kalsiyum İyon Geçişi .	54
4.5. FM Oluşturulan Sıçanların TRPV1 ve TRPM2 Kanallarındaki Akım Yoğunluğu	56
4.6. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPV1 Kanalı Aracılığıyla Apoptozis ve Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	58
4.7. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPM2 Kanalı Aracılığıyla Apoptozis ve Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	60
4.8. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPV1 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktiviteleri	61
4.9. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPM2 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktiviteleri	62
4.10. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPV1 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi Üzerindeki Etkisi	64
4.11. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPM2 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi Üzerindeki Etkisi	65
4.12. FM Modeli Sıçanlarda Selenyumun (Se) İndirgenmiş glutatyon (GSH), Lipid Peroksidasyonu (MDA), Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px), Retinol, α -Tokoferol ve β -Karoten Değerleri Üzerine Etkisi	67
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇ	73
ÖZET.....	74
SUMMARY	75
KAYNAKLAR	76

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACA	: Anthralik asit
ACR	: Amerikan Romatoloji Derneği
ADP	: Adenozin di-fosfat
ADPR	: Adenozin di-fosfat Ribozu
AKG	: Arka kök ganglion
ANA	: Antinükleer antikor
Ca⁺²	: Kalsiyum iyonu
CAPS	: Kapsaisin
CapZ	: Kapsazepin
CCl₃·	: Triklormetil
CCl₄	: Karbontetraklorür
Cl	: Klor
cm	: Santimetre
COMT	: Katekol-O-metiltransferans
CRH	: Kortikotropin salgılayıcı hormon
DAG	: Diaçilgliserol
Dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EEG	: Elektroensefalografi
EMG	: Elektromiyografi
Fe^{+2/+3}	: Demir İyonu
FM	: Fibromiyalji
gr	: Gram
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
HHa	: Hipotalamo-hipofizier-adrenal
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HLA	: Human lökosit antijen
IGF-1	: İnsülin büyüme faktörü-1

IP3	: İnositol 1,4,5-trisfosfat
K	: Potasyum
KAT	: Katalaz
Kg/cm2	: Kilogram/santimetrekare
KOH	: Potasyum Hidroksit
MDA	: Lipid Peroksidaz
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
mg/kg	: Miligram/Kilogram
Mg+2	: Magnezyum
MHz	: Megahertz
mIU/mL	: miliinternasyonelünite/mililitre
ml	: mililitre
mM	: Milimolar
MR	: Manyetik Rezonans
MTT	: Hücre Canlılığı
mW/Cm2	: Miliwatt/santimetrekare
Na	: Sodyum
NAD+	: Okside nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid
ng/mL	: Nanogram/mililitre
nm	: Nanometre
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NSAİİ	: Non Steroid Antiinflamatuvar İlaçlar
O₂	: Oksijen
O₂⁻	: Süperoksid
OH	: Hidroksil İyonu
PIP2	: Fosfoinositoldifosfat
PKC	: Protein Kinaz
PMA	: Phorbol-12-myristat-13-acetat
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri

Se	: Selenyum
sn	: Saniye
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SyS	: Siyatik Sinir
TBARS	: Tiyobarbitürik Asit
TENS	: Transkutan Elektriksel Uyarımı
TGF-B	: Transforming Growth Faktörü
TNF	: Tumor Nekroz Faktör
TRP	: Transient reseptör potansiyel
TRPV1	: Transiyent reseptör potansiyel vanilloid 1
TRPM2	: Transiyent reseptör potansiyel melastatin 2
TSA	: Trisiklik Antidepresan
2- APB	: 2-aminoethoxydiphenyl borat

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. GSH-Px aktivitesinin tayin edilmesi deneyinin analiz şeması.....	44
Tablo 2. Normal ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü	45
Tablo 3. NMDG’li ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü.....	45
Tablo 4. Hücre içi tampon çözelti hazırlama protokolü	46
Tablo 5. FM Modeli Sıçanlarda Selenyumun (Se) İndirgenmiş glutatyon (GSH), Lipid Peroksidasyonu (MDA), Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px), Retinol, α -Tokoferol ve β -Karoten Değerleri Üzerine Etkisi.	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Se metabolizması.....	17
Şekil 2. AKG nöronlarındaki kapsaisin (CAPS) stimülasyonu ile başlatılan hücre içi serbest Ca^{+2} salınımı üzerine Se etkilerinin zamanla değişimi	53
Şekil 3. SyS'deki kapsaisin (CAPS) stimülasyonu ile başlatılan hücre içi serbest Ca^{+2} salınımı üzerine Se etkilerinin zamanla değişimi.....	53
Şekil 4. AKG nöronlarındaki kümen hidroperoksid (CPx) stimülasyonu ile başlatılan hücre içi serbest Ca^{+2} salınımı üzerine Se etkilerinin zamanla değişimi ...	55
Şekil 5. SyS'deki kümen hidroperoksid (CPx) stimülasyonu ile başlatılan hücre içi serbest Ca^{+2} salınımı üzerine Se etkilerinin zamanla değişimi	56

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Hot Plate testi	38
Resim 2. Von Frey testi	39
Resim 3. Von Frey filamanları	39
Resim 4. Kan alınarak gerçekleştirilen.....	41
Resim 5. Sırt omurları sakrifikasyon	41
Resim 6. Omurların 2 eşit parçaya ayrılması.....	41
Resim 7. Mikroskop altında ganglionların toplanması.....	42
Resim 8. Siyatik sinir.....	42

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Se Tedavisinin Hot Plate Testi ile Pençe Çekme Eşiği Üzerindeki Etkisi	50
Grafik 2. Se Tedavisinin Von Frey Testi ile Pençe Çekme Eşiği Üzerindeki Etkisi	51
Grafik 3. Sıçanların AKG ve SyS'deki TRPV1 Kanallarından Kalsiyum İyon Geçişi	52
Grafik 4. Sıçanların AKG ve SyS'deki TRPV1 Kanallarından Kalsiyum İyon Geçişi	55
Grafik 5a. FM Oluşturulan Sıçanların TRPV1 Kanallarındaki Akım Yoğunluğu ...	57
Grafik 5b. FM Oluşturulan Sıçanların TRPM2 Kanallarındaki Akım Yoğunluğu ..	58
Grafik 6. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPV1 Kanalı Aracılığıyla Apoptozis ve Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	59
Grafik 7. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPM2 Kanalı Aracılığıyla Apoptozis ve Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	61
Grafik 8. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPV1 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktiviteleri	62
Grafik 9. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPM2 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktiviteleri	63
Grafik 10. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPV1 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi Üzerindeki Etkisi.....	65
Grafik 11. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPM2 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi Üzerindeki Etkisi.....	66

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ağrı, hastayı hekime yönlendiren en sık yakınmalardan biridir. Kronik ağrı, yaşam kalitesini olumsuz etkilemesi ve fonksiyon kaybına neden olması nedeniyle önem teşkil etmektedir.

Fibromiyalji (FM), yaygın vücut ağrıları, azalmış ağrı eşiği, belirli anatomik bölgelerde hassasiyet, uyku bozuklukları, yorgunluk ve sıklıkla psikolojik sıkıntı ile karakterize eklemlerde şekil bozukluğuna neden olmayan, eklem dışı romatizmal bir hastalıktır (1). Yıllık prevalansı %2-8 arasında değişir, 40-60 yaş arasında ve kadınlarda daha sık görülür (2). Ağrı, sertlik, hassas dokuda şişlik, dokularda aşırı hassasiyet ve kas spazmları ya da nodülleri FM ile ilgili belirtilen en önemli semptomlardır. Karakteristik ağrı, hastanın belirttiği bölgelerde geniş bir alana etki eden ve yayılan bir durum olarak tanımlanmaktadır. Bu belirtilere noktasal olarak hissedilebilen sertlikler eşlik etmektedir. Şişlik durumu ise özellikle artiküler doku, periartiküler doku ve yumuşak dokularda rapor edilmiştir. Hastanın kendi kendine algıladığı hassas noktalar, FM'nin teşhisinde çok önemlidir ve sık sık kas spazmları ve fibrozitin görüldüğü noktalar. Hassas noktalar özellikle boyun ve omuz etrafı, göğsün üst kısmı ve gluteal kasların arka orta kadranda kümelenmektedir (3).

Hastalığın özel bir laboratuvar bulgusu yoktur (4). Klinik olarak belirgin patoloji olmamasına rağmen, kaslarda, tendonlarda ve eklemlerde yaygın ağrı, hassasiyet ve sertlik mevcuttur. Bu yaygın ağrı, yorgunluk, uyku kalitesinde azalma, baş ağrısı, anksiyete, depresyon ve egzersiz intoleransı ile birlikte olabilir.

FM'nin etiyolojisi ve patofizyolojik mekanizmalarında periferik ve santral teoriler öne sürülmüş olmakla birlikte henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (5). Kas oksijenizasyon değişiklikleri, psikolojik, biyokimyasal, hormonal ve immünolojik faktörlerin etkili olduğu ileri sürülmektedir (6). FM'li hastalarda ağrıya karşı duyarlılığın artması son zamanlarda daha çok santral sinir sistemindeki değişikliklere ve santral sensitizasyona bağlanmaktadır. Normalde ağrı yapmayacak uyarıların FM'li hastalarda ağrı oluşturduğu gösterilmiştir (7).

Yapılan çalışmalarda FM'li hastalarda selenyum (Se) seviyesinin ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin düşük olduğu saptanmıştır (8). Ayrıca sitozole Ca^{+2}

giriş artışının ağrı semptomlarında rol oynadığı iyi bilinmektedir. Ayrıca tedavide voltaja duyarlı kanalları bloke eden pregabalin gibi kimyasallar kullanılmaktadır (9). Ancak FM'li hastaların tedavisinde, Se kullanımının FM semptomlarını düzelttiğine dair yol gösterecek randomize kontrollü bir çalışma yoktur. Bu nedenle genellikle tedavisinde antidepresanlar kullanılmaktadır.

Bazı çalışmalarda oksidatif stresin FM'de arttığı belirtilmiştir (10). Ayrıca hastalarda mevcut olan kronik ağrıda düşük pH ile aktive olan transiyent reseptör potansiyel vanilloid 1 (TRPV1)'in katkısını araştıran hayvan çalışmaları da vardır. Sıçan Arka Kök Ganglionlarında (AKG) artmış bulunan TRPV1 ekspresyonunun hiperaljezide rol aldığı düşünülmektedir (11). Yine yakın zamanda yapılan çalışmalarda hipokampal bozuklukların da FM'de önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (12).

Yakın zamanda yapılan insan nötrofil çalışmasında TRPV1 kanalları üzerinde Se'nin olumlu bloke edici etkisinin gözlemlendiği belirtilmiştir (13). Benzer etkinin FM'li sıçan sinir hücrelerinde de gözlenebileceğini ve bu konunun araştırılmasının uygun olabileceğini düşünmekteyiz.

FM hastalarında ve etiyopatogenezinde ise apoptozise ait veriler yetersizdir. FM noninflamatuvar bir hastalık olmakla birlikte değişik çalışmalarda immün sistemin de değişik parametreleri ile etkilendiği, bazı sitokin düzeylerinin ve T hücre aktivasyon belirteçlerinin hastalıkta normal, düşük veya yüksek bulunabildiği belirtilmiştir. Bu bağlamda apoptozis parametrelerinin değerlendirilmesinin de etiyopatogeneze katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.

Günümüzde FM yaygınlığı nedeniyle oldukça önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Çalışmamızın sonuçları, FM patogenezinde oksidatif stresin, kalsiyum sinyali ve apoptozisin rolünün ve Se'nin etkilerinin aydınlatılmasına katkı sağlayarak yeni tedavi stratejileri geliştirilmesine yardımcı olabilecektir.

Bu bağlamda çalışmamızın amacı FM'li sıçanlarda oksidatif stres, Ca^{+2} sinyali ve apoptozis belirteçlerinin değerlendirilmesi ve çalışmalarda FM hastalarında düşük olduğunu belirtilen Se'un etkisinin araştırılmasıdır. Yine çalışmamızda oksidatif stresle aktiflenen transiyent reseptör potansiyel melastatin 2 (TRPM2) ve TRPV1'in inhibisyonunda Se'nin bloke edici etkisinin de araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fibromiyalji Sendromu

2.1.1. Tanım

FM klinikte en sık rastlanılan kronik ağrı sendromlarından birisidir. FM; yaygın vücut ağrıları (hiperaljezi ve/veya allodini) ve belirli anatomik bölgelerde hassasiyet (hassas noktalar) ile karakterize, yorgunluk, tutukluluk, uyku bozukluğunun eşlik ettiği etyopatogenezi belli olmayan bir yumuşak doku romatizmasıdır (14).

FM'de klinik tabloyu oluşturan çok çeşitli bulgu ve belirtiler vardır. Sabah sertliği, baş ağrısı, baş dönmesi, irritabl bağırsak ve mesane sendromu, karın ve göğüs ağrıları, çene ağrısı, Raynaud fenomeni, sikka semptomları, retiküler deri renk değişikliği, huzursuz bacak sendromu, hipermobilité sendromu, deri duyarlılığı, dismenore, ellerde subjektif şişlik hissi, paresteziler gibi bulgu ve yakınmalara FM tanılı hastalarda sıklıkla karşılaşılır (1,15).

2.1.2. Tarihçe

FM ilk defa 1843 yılında Froriep tarafından, hastaların kaslarında basmakla ağrılı bölgelerin varlığı şeklinde tanımlanmıştır. 1904 yılında ise İngiliz nörolog Sir William Gowers tarafından fibrozit terimi FM'i tanımlamak için kullanılmıştır (16). 1976'da Kahler Hench inflamasyon olmadığını "fibrozit" yerine "fibromiyalji" terimi kullanılmasını önermişlerdir (17). Wolfe'un önderliğinde 1990 yılında Amerikan Romatoloji Derneği (ACR) tarafından FM tanı kriterleri yayınlanmıştır (4). Bu ölçütlere göre FM, 4 kg/cm² büyüklüğündeki bir basıncın bu ölçütlerde yer alan 18 hassas noktanın en az 11 tanesinde ağrı oluşturduğu bir rahatsızlık olarak tanımlanmıştır. ACR tarafından 2010 yılında yeni tanı kriterleri belirlenmiştir ve hassas nokta sayısı kriter olarak alınmamış, semptom şiddeti ve yaygın vücut ağrısı dikkate alınmıştır (18). Son olarak ACR 2013 alternatif tanı kriterleri yayınlanmış, 28 hassas noktadan en az 17 tanesinde ağrı ve semptom etki anketi skoru en az 21 olması şartları aranmıştır (19).

2.1.3. Epidemiyoloji

FM yaygın olarak karşılaşılan bir klinik durumdur. Tüm etnik gruplarda, her yaşta görülebilmekle beraber en sık 35-50 yaş grubunda izlenir. Kadınlarda erkeklere göre 10 kat daha fazla görülmektedir (20). Prevelansı % 2-8 arasındadır ve prevelans yaşla artmaktadır. En sık doğurganlık çağındaki kadınlarda görülmektedir (21). Eğitim ve sosyo-ekonomik düzeyi düşük olanlarda FM'nin daha sık olduğu bildirilmiştir (22).

2.1.4. Etiyopatogenez

FM'de etiyoloji ve patofizyolojik mekanizmalar tam olarak belirlenememiştir. FM'nin oluşmasına katkıda bulunan birçok mekanizma olduğu düşünülmektedir. Bazı biyokimyasal, nörohormonal, santral sinir sistemi, immünolojik, psikolojik, çevresel ve genetik faktörlere ait hastalıkta rol oynayabileceği düşünülen kanıtlar bulunmuştur (23-24).

2.1.4.1. Genetik Faktörler

FM'de güçlü ailesel yatkınlık mevcuttur. Normal bireylere göre birinci derece akrabasında FM olan bireylerde FM görülme sıklığı 8 kat artmıştır (25). Ailesel yatkınlığı belirlemeye yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Serotonin reseptörü, serotonin taşıyıcı, katekol-O-metiltransferaz (COMT) ve dopamin D4 reseptör genleri insan stres cevabında kritik rol oynayan bileşiklerdir ve bu genlerde yüksek oranda polimorfizm bulunmuştur (26). Human lökosit antijen (HLA) bölgesinde FM için muhtemel gen varlığı tesbit edilmiştir (27).

2.1.4.2. İmmünolojik Mekanizmalar

Son yıllarda etiyopatogenezde immünolojik faktörlerin rol aldığını düşünülmektedir. FM hastalarından yapılan ön kol deri biyopsilerinde, dermoepidermal bileşkede IgG depolanması saptanmıştır (1). Ayrıca hastalarda saptanan antinükleer antikor (ANA) ve Raynaud fenomeni pozitifliği de etyopatogenezde immünolojik faktörlerin yer aldığını destekler niteliktedir (28). Lyme

hastalığı, Coxakie, Parvovirus ve HIV enfeksiyonlarını takiben FM gelişebileceğini bildiren yayınlar vardır (29). FM’de aktif enfeksiyonun doğrudan etkisinden ziyade enfeksiyonun immün veya inflamatuvar bir süreci tetikleyebileceği düşünülmektedir (1).

2.1.4.3. Çevresel ve Psikolojik Faktörler

Psikososyal stres faktörleri, mekanik ve fiziksel travmalar gibi çevresel faktörler FM etyopatogenezinde yer almaktadırlar. Akut hastalık, fiziksel yaralanma, ameliyat, trafik kazaları en sık tespit edilen fiziksel travmalardır. Psikososyal etkenlerden sıklıkla rastlananlar ise kronik stres, duygusal travma ve duygusal, fiziksel veya cinsel istismardır (30). Kadın cinsiyet, kronik strese neden olan olaylar ağrı ve diğer somatik semptomların gelişiminde tetikleyicidir. Ayrıca uyku bozukluğu ve egzersiz yapmamanın da ağırlı semptomlara yol açtığı gösterilmiştir (31). FM hastalarında normal bireylere göre anksiyete, depresyon gibi psikiyatrik bozukluklara daha sık rastlanmaktadır (32).

2.1.4.4. Santral Mekanizmalar

Genetik ve nöroendokrin sistemlerdeki fonksiyon bozukluklarının önemli rolü olduğu düşünülse de, yakın geçmişte yapılmış olan araştırmalar santral ağrı mekanizmalarının ve santral sensitizasyonun etyopatogeneizde önemli faktörler olduğunu düşündürmektedir.

2.1.4.4.1. Nöroendokrin Bozukluklar

Etyopatogeneizde suçlanan nöroendokrin patolojiler ile ilgili çeşitli sonuçlar mevcuttur. Bazı çalışmalarında FM patogenezinde hipotalamo-hipofizier-adrenal (HHA) aksın fonksiyon bozukluklarının rol oynayabileceğini ileri sürülmüştür. Normal bireylere göre 24 saatlik üriner serbest kortizol düzeyleri ve kortikotropin salgılayıcı hormona (CRH) olan kortizol cevabı FM hastalarında daha düşük bulunmuştur (33). Hassas nokta sayıları ile kortizol seviyeleri arasında da hastalarda korelasyon bildirilmiştir (34).

Ağrının algılanmasını etkileyen ve duygudurum düzenlenmesinde görev yapan bir nörotransmitter olan serotonin FM hastalarında düşük bulunmuş ve azalmış serotonin miktarına bağlı depresif duygudurum, nonREM uykusunda azalma, somatik semptomlar ve ağrı duyusunda artış saptanmıştır (35). Ayrıca hastaların beyin omurilik sıvısında serotonin prekürsörleri olan 5-hidroksitriptofan ve 5-hidroksiindolasetik asit seviyeleri düşük bulunmuştur (36). Ağrının algılanmasını kolaylaştıran Substans P, FM hastalarının serebrospinal sıvısında artmış olarak bulunmuştur (37).

FM'nin kadınlarda daha fazla görülmesi etyopatogeneizde seks hormonlarının rolünün olabileceğini akla getirmiştir. Ancak normal bireylere kıyasla FM hastalarında gonadal hormonların serum düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (38). FM'nin etyopatogeneizinde büyüme hormonu direncinin olabileceği düşünülmüştür. Hastalarda normal ya da düşük insülin büyüme faktörü-1 (IGF-1) düzeylerinde serum büyüme hormonu seviyesi yüksek saptanmıştır (39). Normal bireylerle yapılan karşılaştırmada uyku sırasında FM hastalarında prolaktin ve büyüme hormonu seviyesinde düşüş saptanmıştır (40).

FM hastalarında gece plazma melatonin düzeyleri sağlıklı bireylere oranla daha yüksek bulunmuştur (41). Stres nedenli hipotalamik bozukluklara artmış duyarlılığın bir göstergesinin melatonin seviyelerindeki artışın neden olabileceği düşünülmektedir.

2.1.4.4.2. Uyku Bozuklukları

Uyku bozukluğu FM'de %70-99 arasında görülmektedir (38). Hastalar genellikle dinlendirmeyen uykudan söz etmektedirler. FM hastalarında delta dalga uykusunda uykunun en derin fazında anormallik vardır. Elektroensefalografi (EEG)'de NREM döneminde delta dalgalarına alfa intrüzyonu ve azalmış delta dalgaları ve alfa dalgalarında artış rapor edilmiştir (39). Rahatlatmayan uykuya alfa dalgaları neden olmaktadır (40). Bu EEG bulgusu FM'ye özgü değildir. FM hastalarında uyku apnesi de bildirilmiştir (41).

2.1.4.4.3. Santral Sensitizasyon

Santral sensitizasyon terimi, bir çok faktörle stimölasyon sonucu santral sinir sisteminde genel bir aşırı reaktiviteyi ifade etmektedir (42). Primer aferent lifler tarafından uyarılan artmış uyarı ve spontan sinir aktivitesi cevabının bir sonucu olarak santral sensitizasyon oluşur (43). Bir çalışmada deneysel ağırlı uyarılar FM hastalarında kontrol grubuna göre artmış yansıyan ağrıya sebep olmuş ve tekrarlı ağırlı elektriksel kas uyarımları FM grubunda kontrol grubuna göre daha fazla ağrı oluşturduğu gözlemlenmiştir (44). Yine başka bir çalışmada FM hastalarında normal bireylere göre ağrı toleransında azalma ve dizestezi saptanmıştır (45).

Tekrarlı doku hasarı veya inflamasyona bağlı ağırlı uyarılar, arka boynuz nöronlarındaki C liflerinin artmış uyarı cevabına ve nöronal duyarlılıkta artışa neden olur. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri bu yolla uyarılır. NMDA reseptörlerinin uyarımı da allodini ve hiperaleji gibi semptomlara neden olabilir (46).

FM hastalarının sadece ağırlı veya ağrısız taktıl uyarılar sırasında değil istirahatte de fonksiyonel manyetik rezonans (MR) görüntülemeye ağrı ile ilişkili alanlarda artmış beyin aktivitesi olduğu gösterilmiştir (47). Kısacası ağırlı uyarılara karşı FM hastalarının eşikleri düşüktür (48).

2.1.4.5. Periferik Teoriler

2.1.4.5.1. Kas ve İlişkili Bozukluklar

FM’de kas ağrısı ve tutukluluk yaygın görüldüğü için kas dokusunda değişiklikler üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda kas metabolizmasında ve histopatolojisinde kontrollere göre anlamlı fark saptanmamıştır. Kas biyopsilerinde en çarpıcı bulgu lokal anoksidir. FM hastalarında dinamik ve izometrik kas gücü normal bireylerle benzer, ancak postural kaslarda gevşeme güçlüğü ve performansta azalma saptanmıştır (49).

2.1.4.5.2. Otonomik Disfonksiyon

FM’de otonom sinir sistemi hiperaktivitesi ve yetersiz sempatik cevap mevcuttur (50). Soğuk basınç testleri, egzersiz, tilt table, hipoglisemi sonrası vazokonstrüksiyon ve ortostatik hipotansiyon gibi otonomik disfonksiyon bulguları gözlenmiştir (50). FM hastalarının sempatik deri yanıtının değerlendirildiği çalışmada amplitüdlerde farklılık olmadığı, latensta gecikme olduğunu ve derin nefes sırasında kalp hızında değişkenlik saptamışlardır (51).

FM ile birlikte görülebilen Sikka sendromu, Raynaud fenomeni, anksiyete ve huzursuz barsak sendromu ve düşük kan basıncı, baş dönmesi, baygınlık gibi durumlar otonom disfonksiyon ile ilişkili olabilir (51). Yine FM’de görülen şişlik hissinin, ağrıdan kaynaklanıyor olabileceği gibi, otonomik disfonksiyon sonucunda da ortaya çıkabileceği düşünülmektedir (51).

2.1.5. Klinik Özellikler

2.1.5.1. Ağrı

FM’de kas-iskelet ağrıları en sık rastlanan belirtilerdendir ve hastaların sağlık kuruluşuna başvurmasının en sık nedenidir. Ağrı, sıklıkla boyun ve omuzdan başlamasına rağmen daha sonra yaygın hale gelmektedir (52). Kronik, yaygın ve simetrik karakterdir. Ağrının yaygınlığı, vücudun solunda ve sağında, alt ve üst vücut yarısında ve aksiyel iskelette ağrı olmasıdır. Hastalar genellikle ağrının sınırlarını net ayırt edemezler. Kronik olması ise 3 aydan uzun süredir devam etmesini ifade etmektedir. Ağrının tipi genellikle yanıcı, yakıcı, zonklayıcı olarak ifade edilir (53). Ağrı gün boyu değişiklik gösterir. Ağrı; soğuk, nem, stres, fiziksel çevre, travma, aşırı yorgunluk gibi faktörlerle artar (54).

2.1.5.2. Tutukluluk

Ağrıyla birlikte olabilen diğer önemli bir yakınma da istirahatteki yaygın sertliktir. Sabahları daha belirgin olup tüm gün sürebilmekte, yalnız ellerde değil tüm

vücutta hissedilir ve fonksiyonel kaybına neden olmaz. Tutukluluk inaktivite sonrası daha belirgindir. FM’de sıklığı %75-85 arasındadır (55).

2.1.5.3. Yumuşak Dokularda ve Eklemlerde Subjektif Şişlik

FM’de sıklığı %50 civarındadır. Fizik muayene ile fark edilmez ve nörolojik semptom saptanmaz (56). Sıklıkla şişlik hissi ekstremitelerdedir.

2.1.5.4. Yorgunluk ve Halsizlik

FM’de en sık rastlanan semptomlardan olup sıklığı %75-90 oranındadır. Orta ve ciddi düzeyde görülebilmektedir (4). Sabah kalkınca ve günün ilerleyen saatlerinde en fazla olup genellikle gün boyu sürer. Hastalar çoğu zaman çok uyumalarına rağmen dinlenemediklerinden yakınrlar. Basit fiziksel aktivitelerde bile yorgunluk ve halsizlik şikayetleri artar (57). Fizik muayenede kas güçsüzlüğü saptanmaz (58). Unutkanlığa, iş veriminde azalmaya ve konsantrasyon güçlüğüne sebep olabilir.

2.1.5.5. Sabah Yorgunluğu

FM hastalarında mevsim dönümlerinde daha belirgin olan sabah yorgunluğu olabilir. Uyku kalitesinin önemli bir göstergesidir. Hastalar sabah yataktan kalkmakta zorlandıklarını ve dayak yemişçesine kalktıklarını ifade ederler (57).

2.1.5.6. Uyku Bozukluğu

FM hastalarında çeşitli uyku bozuklukları görülebilmektedir ve sıklığı %75 civarındadır. Özellikle gece sık uyanma ve uykuya dalmada güçlük şeklinde kendini gösterir. Uykuları hafiftir. Uyku bozukluğu olan hastaların %75-90’ında sabah yorgunluğu görülür (59).

2.1.5.7. Pareteziler

Ciltte karıncalanma, iğnelenme ya da yanma hissi şeklinde kendini gösteren paretezik şikayetlerden FM hastaları yakınabilirler. Şikayetler daha çok gövde ve üst

ekstremitededir, ancak segmental dağılım göstermemektedir. Sıklığı ise %40-60 civarındadır (60).

2.1.5.8. Psikolojik Bulgular

FM hastalarında sıklığı %30-40 olup, bunlar depresyon, anksiyete, stres ve somatizasyon bozukluğunu içerir. Diğer romatolojik hastalıklardaki psikolojik problemlerle benzerlik göstermektedir (61).

2.1.5.9. Diğer Bulgular

FM hastalarında baş ağrısı (migren ya da migren dışı) %28-58 arasında görülebilir (62). Premenstrüel sendrom ve dismenore de %40-50 oranında sık görülen belirtilerdendir (20). Kabızlık, ishal, distansiyon, karın ağrısı gibi belirtiler ile seyreden irritabl barsak sendromu da görülebilir. Yine dizüri ve sık miksiyon ile seyreden kadın üretral sendromu hastaların %12'sin de mevcuttur (29). Sikka semptomları, Raynaud fenomeni, huzursuz bacak sendromu, temporomandibular eklem disfonksiyonu gibi çeşitli semptomlar olabilir.

2.1.6. Laboratuvar ve Görüntüleme Yöntemleri

FM'de spesifik bir laboratuvar bulgusu yoktur. Rutin laboratuvar testleri ve serolojik testler normaldir. Ayrıca direkt grafileri, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans gibi görüntülemeleri de normaldir. Radyolojik araştırmalar ve laboratuvar ayırıcı tanı açısından yardımcı olmaktadır. Hastalarda inflamatuvar veya metabolik miyopati düşünülmekçe biyopsiye gerek yoktur (35).

2.1.7. Tedavi

Hastalıkta etyopatogeneze tam olarak aydınlatılamadığı için tedavi hastaya yöneliktir. Ağrı, fonksiyon ve psikososyal durumun geniş değerlendirilmesi gerekir. FM'nin tedavisi zor ve multidisiplinerdir. Tedavinin amacı ise; ağrı kontrolünü sağlamak, yorgunluk ve halsizliği düzeltmek, uykunun düzenlenmesi ve depresyon

gibi duygu durum bozukluklarının düzeltilmesidir (63). Günümüzdeki tedavi yöntemlerini nonfarmakolojik ve farmakolojik olarak incelemek mümkündür.

2.1.7.1. Nonfarmakolojik Tedavi

2.1.7.1.1. Hasta Eğitimi

Diğer hastalıkların tedavisinde olduğu gibi FM tedavisinde de hasta eğitimi oldukça önem taşımaktadır. Hastaya hastalığının ne olduğu anlatılmalı ve öncelikle hastanın güveni kazanılmalıdır. Hastanın tedaviye aktif katılımının önemi vurgulanmalıdır. Hastalığın kozmetik bir problem yaratmayacağının belirtilmesi hastaların iş birliğini kolaylaştırmaktadır (64).

2.1.7.1.2. Bilişsel - Davranışsal Tedavi

Bilişsel - davranışsal tedavi de amaç hastadaki olumsuz düşünceleri gidermek ya da daha olumlu hale çevirmek ve kronik ağrıyla baş etme alışkanlığı kazandırmaktır. Hastanın aktivitesini arttırarak egzersize teşvik etmek gibi davranış aktivasyon teknikleri, aktivite hızını düzenleme, ağrıyla başedebilme yeteneğini geliştirme, uyku hijyeni sağlama ve progresif kas relaksasyonu gibi gevşeme tekniklerini öğreterek davranışsal teknikler uygulanmaya çalışılmaktadır (65). FM hastalarında bilişsel - davranışsal tedavide en çok etkinlik fonksiyonel durum üzerinde saptanmıştır (66).

2.1.7.1.3. Düzenli Yaşam Sağlanması

Hastalara düzenli bir yaşam ve düzenli bir uyku alışkanlığı sağlanması önerilmelidir. Ayrıca alkol, sigara ve kafein alımından uzak durma önerilmelidir. Önemli olan uykunun süresi değildir, kalitesidir (3).

2.1.7.1.4. Egzersiz

FM hastaları genelde ağrı ve yorgunluk nedeniyle hareketlerini kısıtlamakta ve sedanter yaşam sürmektedirler (56). Hastaların kas kondüsyonları düşüktür ve düşük kondüsyona bağlı da kaslarda mikrotravmalardan etkilenme riski artar. Bu nedenle, egzersiz tedavisi bu kişilerin tedavilerinde mutlaka yer almalıdır. Egzersiz ile stresin azaltılması, bozulmuş postürün düzeltilmesi, dayanıklılığın artırılması ve kardiyovasküler dayanıklılık restorasyonu sağlanmaktadır (66). Bir derlemede 12 haftalık orta yoğunluklu aerobik egzersiz ile genel iyilik ve fiziksel aktivitenin arttığı ancak ağrıyı ve hassas nokta sayısını etkilemediği gösterilmiştir (67). Günümüzde diğer tedaviler ile birlikte kombine egzersiz önerilmektedir ve egzersiz programının bireye özgü, düşük yoğunlukta ve uzun süreli olması tedavi başarısı için önemlidir.

2.1.7.1.5. Fizik Tedavi Yöntemleri

Fizik tedavi yöntemleri sıklıkla ağrının giderilmesine yönelik kullanılmaktadır. Bu amaçla Transkutan Elektriksel Uyarımı (TENS), ultrason, lazer, diğer alçak frekanslı akımlar, buz masajı, lokal sıcak uygulamaları ve manipulasyonlar kullanılmaktadır (15). Sıcak, soğuk ve elektroterapi yöntemleri ağrıyı modifiye eder, hastaların egzersize uyumunu arttırmaktadırlar (68).

2.1.7.2. Farmakolojik Tedavi

2.1.7.2.1. Antidepresanlar

2.1.7.2.1.1. Trisiklik Antidepresanlar (TSA)

Amitriptilin veya siklobenzapirinin FM’de ağrı, uyku bozukluğu ve yorgunluk üzerine etkilidir (69). TSA’lar geri alım blokajı yaparak seratonin ve norepinefrin konsantrasyonlarını artırır ve ayrıca glutamaterjik nörotransmisyonu bloke ederek analjezi sağlarlar. Amitriptilin, gece yatarken 10-50 mg tek doz önerilir. 10 mg amitriptilin gibi düşük dozlarda tedaviye başlanır. Doz artışı 2 haftalık aralarla 5 mg olacak şekilde yapılır. Eğer başarı sağlanırsa birkaç ay boyunca tedaviye devam edilir.

Başarısızsa 4-6 hafta sonra tedavi kesilir. Amitriptilinin ağrı, uyku bozukluğu, duyarlı nokta skoru açısından plasebo ve nonsteroid antiinflatuvar ilaçlara (NSAİİ) göre belirgin şekilde üstün olduğu gösterilmiştir (70). Siklobenzaprin, 10-40 mg dozlarda verildiğinde ağrı, yorgunluk, uyku bozukluğu ve hassas nokta sayısında olumlu etkiye sahiptir ve EMG’de kas spazmını azalttığı gösterilmiştir (15).

2.1.7.2.1.2. Selektif Serotonin Geri Alım İnhibitörleri

TSA’lara benzer şekilde serotonin ve norepinefrin geri alımını inhibe ederler. Ancak TSA’lara kıyasla ağrı, uyku ve yorgunluğa etki büyüklükleri daha zayıftır. Fluoksetinin etkinliğinin incelendiği bir çalışmada; ağrı, yorgunluk ve depresyon skorlarında iyileşme sağlandığı saptanmıştır (71). Paroksetin ve sitalopram ile yapılan çalışmalarda da plaseboya göre Fibromiyalji Etki Anketi total skorunda anlamlı azalma saptanmıştır (72).

2.1.7.2.1.3. Serotonin ve Norepinefrin Geri Alım İnhibitörleri

TSA’lardan daha iyi tolere edilirler (69). Duloksetin ve milnacipran FM’de kullanım için FDA onayı almışlardır. Tedavide birinci seçenek ilaç olarak önerilmektedirler (73). Duloksetin günde iki kez 60 mg ile ağrı, hassas nokta ve fonksiyonda düzelme sağladığı görülmüştür (74). Milnasipran için çalışmalarda 100-200 mg dozlarda ağrı ve fonksiyonellik düzeylerinde anlamlı gelişme sağlanmış, bu gelişmelerin antidepresan etkisinden bağımsız olduğu görülmüştür (75).

2.1.7.2.1.4. Monoamin Oksidaz İnhibitörleri

Diğer antidepresanlardan farklı olarak, nörondan salınımdan sonra yıkımlarını bloke ederek monoamin düzeylerini arttıırırlar. Moklobemid kronik yorgunluk sendromunun tedavisinde, pirlindol ise uyku, ağrı, yorgunluk ve duygudurum üzerine yararlı etkiler göstermiştir.

2.1.7.2.2. Antikonvülzanlar

FM tedavisinde kullanılan antikonvülzanlar pregabalin ve gabapentindir. Her iki ilacın da analjezik etkisinin voltaj bağımlı kalsiyum kanallarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Pregabalin ve gabapentin nöronlara kalsiyum geçişini değiştirir ve ağrının işlenmesinde rolü olduğu bilinen glutamat ve substans P gibi birçok nörotransmitterin sinapstan salınımının azalmasına neden olur. Böylece, nöronal hipereksitabilitiyi azaltır ve analjezik etki gösterir (76). Pregabalinin FM’de önerilen dozu 300-450 mg/gündür. Çalışmalarda plaseboya göre pregabalinin ağrıyı azalttığı, uykuyu kalitesini artırdığı, yaşam kalitesi ile depresyon ve anksiyetede kısmen düzelmeyi sağladığı ve yorgunluk üzerine çok etkili olmadığı görülmüştür (77). Gabapentin de anormal hipersensitiviteyi (allodini ve hiperaleji) azaltmada etkili bulunmuştur. Bir çalışmada; 1200-2400 mg/gün gabapentinin FM’li hastalarda ağrı tedavisinde güvenli, etkin ve Kısa Ağrı Anketi ortalama ağrı şiddeti skorunda anlamlı düzeyde düzelme olduğu saptanmıştır. Uyku problemlerinde ve fibromiyalji etki anketi total skorunda belirgin düzelme olurken, ortalama hassas nokta ağrı eşik değerinde değişiklik olmamıştır (78).

2.1.7.2.3. Non Steroid Antiinflatuvar İlaçlar (NSAİİ)

FM’de kullanımı sınırlıdır. Uzun dönem ağrı tedavisinde ümit verici değildirler. Bir çalışmada ibuprofenin plasebo ile karşılaştırıldığında ağrıyı azaltmada üstün olmadığı gösterilmiştir (79).

2.1.7.2.4. Sedatif ve Hipnotikler

Benzodiazepin olmayan zopiklon ve zolpidem gibi hipnotiklerin FM’de kullanımına ilişkin çalışmalar mevcuttur. Bu ajanlar uykuda ve yorgunlukta düzelme sağlarlar, fakat ağrı veya fonksiyonda değişiklik saptanmamıştır (39). Uyku problemi olan hastalarda zolpidem gece 10 mg verilmesi yararlı olabilir. Eşlik eden anksiyete ve ajitasyon var ise tedaviye alprazolam (0.5-1 mg/gün, yatmadan önce) gibi sedatifler eklenebilir. Melatonin kullanımının uykuyu iyileştirdiği ve hassas nokta sayısını azalttığı gösterilmiştir (kadın üretral sendrom). Huzursuz bacak sendromu veya gece

myoklonusu olan FM hastaları, gece 0.5 mg klonazepam gibi düşük benzodiyazepin dozlarına iyi yanıt verebilirler (3).

2.1.7.2.5. Opiyatlar

Tramadolün plasebo karşılaştırmalı ve asetaminofenle birlikte kullanıldığı çalışmalarda, ağrıda ve günlük aktivitelerde anlamlı iyileşmeye yol açtığı görülmüştür (80).

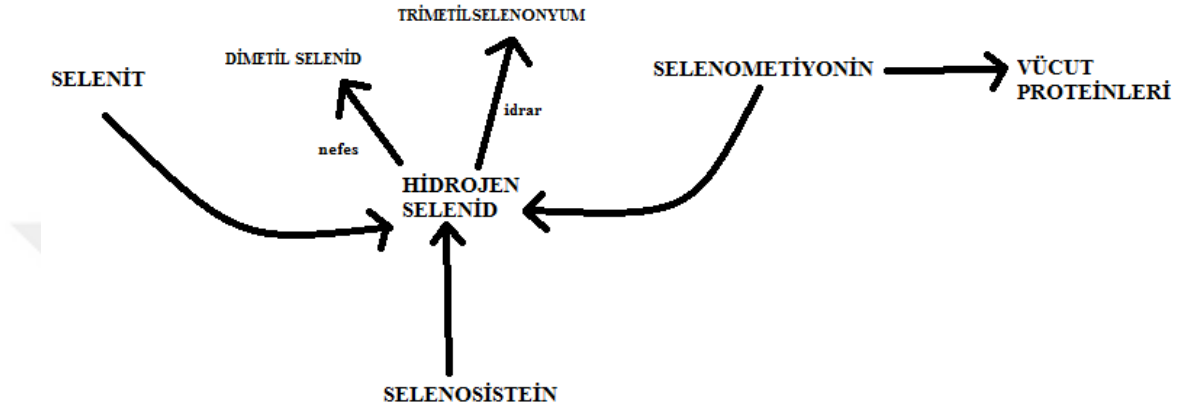
2.1.7.2.6. Diğer İlaçlar

Dopamin agonisti olan pramipeksol ile FM hastalarında yapılan bir çalışmada; ağrı, yorgunluk ve fonksiyonda plasebo ile karşılaştırıldığında anlamlı iyileşme görülmüştür (81). Yine 5-HT₃ reseptör antagonisti olan tropisetronun FM’de kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır ve serotonin seviyesi düşük olan FM’li olgularda etkili bulunmuştur. 5-10 mg doz aralığında ağrı üzerinde anlamlı etki elde etmiş, 15 mg’da ise etkisiz kalmıştır (82). S-adenozil-methionin bir metil donörü olup antidepresan özellikleri de vardır ve FM’li hastalarda plasebodan etkili bulunduğunu gösteren çalışmalar vardır (83). Gamma aminobütirik asit prekürsörü olan gamma hidroksibütirat uygulanan bir çalışmada; hassas nokta sayısı, ağrı ve yorgunluk değerlendirmelerinde düzelme saptanmıştır (3). Yapılan bir başka çalışmada, düşük doz büyüme hormonu uygulaması FM hastalarında ağrı şiddetinin azaltılması ve yaşam kalitesinin artırılmasında etkili bulunmuştur (84).

2.2. Selenyum (Se)

Selenyum (Se), ilk kez 1817’de İsveçli kimyacı Berzelius tarafından keşfedilmiştir (85). Se, insanların sağlıklı gelişimi, biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonların devamı için gerekli olup tiroid metabolizması, bağışıklık ve üreme sisteminde rol oynamaktadır (86). Birçok enzimin kofaktörüdür ve temel olarak antioksidan fonksiyonuyla bilinen esansiyel bir eser elementtir (87).

Se, organik (selenometiyonin, selenosistein) ve inorganik (selenit, selenat) formlarda bulunur (88). Selenit ve selenat in vivo olarak selenosisteine çevrilir (89). Selenometiyonin, metiyonin içeren vücut proteinlerine katılır ve depolanır. Transsülfürasyon ile selenosisteine çevrilebilir (90). Tüm seleno bileşikleri hidrojen selenide katabolize edilebilir ve dimetil selenid olarak solunum ile ya da trimetilselenonyum iyonu şeklinde idrarla atılır (89).



Şekil 1. Se metabolizması

Se'nin günlük alınması gereken miktarı 55 µg'dır (91). Diyet, Se'nin major kaynağıdır ve alınan miktar, yiyeceklerdeki konsantrasyona ve tüketilen yiyecek miktarına bağlı olarak değişir (92). Başlıca karaciğerde, kasta, plazmada ve böbrekte bulunmaktadır (90). İnsan beyninin farklı bölgelerinde değişik Se konsantrasyonları bildirilmiştir (93).

Se biyolojik etkilerini, yapısında selenosistein aminoasidi bulunan selenoproteinler yoluyla göstermektedir (94). Selenosistein biyolojik pH da anyoniktir ve elektron alışverişi ile biyolojik redoks reaksiyonlarının gerçekleşmesini sağlar. Selenoproteinlerin yapısal ve transport fonksiyonları da mevcuttur (87). Se, selenosistein halinde GSH-Px, iyodotironin deiyodinaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerinin bileşenidir. GSH-Px antioksidan bir enzimdir, indirgenmiş Glutatyon (GSH) ile Hidrojen Peroksit (H₂O₂) ve lipid hidroperoksitlerin yol açtığı oksidatif hasarı azaltmada ve önlemede rol oynar. İnflamatuvar cevabın regülasyonunda da rol alır (95). İyodotironin deiyodinaz, tiroit hormon metabolizmasında tetraiyodin tiroksini, triiyodin tiroksine çevirir (96). Antioksidan sistemin major komponentinden biri olan tiyoredoksin redüktaz; hücre ölümü, DNA hasarı ve doku atrofisine neden

olan peroksit ve hidroperoksitlerin azaltılmasından sorumludur (90). Ayrıca lipoik asit ve C vitamininin geri dönüşümünü sağlar, K3 vitamininin metabolizmasını düzenler ve hücre büyümesinin, tümör supresör protein p53'ün düzenlenmesinde etkilidir (97).

Se; eser düzeylerde normal büyüme ve gelişme için, homeostatik fonksiyonların sürdürülmesinde gerekli olduğu, ılımlı düzeylerde depolanabileceği yüksek düzeylerin toksik olabileceği bildirilmiştir (98).

Se eksikliğinde dokularda lipid peroksidasyonunun arttığı, bu artışın hücre membranının bütünlüğünü ve sonuçta hücre işlevini olumsuz etkilediği belirtilmiştir (99). Ayrıca Se eksikliği; azalmış antioksidan savunma, redoks regülasyonu ve enerji üretimi ile ilişkilidir (100). Se eksikliğinin artmış kanser ve enfeksiyon riskiyle, erkek infertilitesiyle, immünite ve tiroid fonksiyonlarında azalmayla ilişkisi gösterilmiştir (101). Hipertansiyon, Diabetes Mellitus, kronik karaciğer hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, epilepsi, Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığında düşük serum Se düzeyleri bildirilmiştir. Ayrıca, endemik bir kardiyomiyopati olan Keshan hastalığı ile endemik bir osteoartropati olan Kashin-Beck hastalığı ve ağır büyüme geriliği, mental retardasyon ve hipotiroidizm ile karakterize olan miksödematöz kretenizm gibi nadir hastalıklarda da düşük Se düzeyleri bildirilmiştir (91).

2.3. Apoptozis

Her hücre doğar, çoğalır, farklılaşır ve ölür. Programlı hücre yoğunlaştırma ile karakterize noninflamatuvar hücre ölümüne apoptozis denir. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile eş anlamda kullanılmaktadır (102). Apoptozis aslında fizyolojik bir süreçtir. Moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Hücrelerin genetik olarak belleklerindeki intihar programının çeşitli sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi olaylarla aktive olması apoptozisi başlatmaktadır (103).

Apoptozisi etkileyen uyarıların bazıları; büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, hücre içi kalsiyum miktarının artması, TGF-B (Transforming Growth Factor) ve Fas/FasL sisteminin aktive olması, p53'ün aktive olması, enfeksiyonlar ve glukokortikoidler, Tümör nekroz faktör (TNF) gibi sitokinlerdir. Ayrıca apoptozis mekanizması, hücre tipine ve uyarana göre farklılıklar göstermektedir.

Apoptozis morfolojik olarak özgündür ve ana morfolojik olay, nükleusun kondensasyonu ve parçalara ayrılmasıdır. Apoptoziste kromatin süperkondens hale gelerek nükleus zarı altında kresentik görünüm oluşturur. Kromatindeki değişikliklerin başlamasının hemen öncesinde sitozolik Ca^{+2} düzeyinde önemli bir artış olmaktadır. Floresan boyamada DNA boncuklanmalar şeklinde görülür, bunun nedeni DNA'nın Ca^{+2} duyarlı endonükleaz ile internükleozomal bölgelerden 180-200 baz çiftine ayrılmasıdır (104). İmmün elektroforez yapıldığında ise 'ladder patern' olarak isimlendirilen ip merdiven şeklinde görünüm oluşur (105).

Apoptoziste yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılmanın onarımı yapılırken, hücre apoptozisteki bu onarımı yapamaz. Apoptoziste hücreler birleşme noktalarından ayrılır ve özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder. Hücre belirgin şekilde büzülür, birkaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybeder. Hücresel büzüşmenin nedeni, Sodyum (Na), Potasyum (K), Klor (Cl) taşıyıcı sisteminin durması ve hücre içi ile dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır (106).

Apoptotik uyarım alan hücre çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Apoptotik hücreler ışık mikroskopunda incelendiğinde, hücrelerin etrafında açık bir halo görülmektedir. Apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepcikler oluşur (107). Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır (108). Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılmada transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır.

Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir. Apoptotik hücrelerin tanınması ve sağlam hücrelerden ayrılması plazma membranındaki değişikliklerle olur. Hücre zarında iç yüzeyden dışarıya aminofosfolipid transferaz ile fosfatidilserin translokasyonu olur. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidil serin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (109).

Özellikle embriyonik gelişim ve erken büyüme sürecinde, görevini tamamlamış hücrelerin yok edilmesinde apoptozisin önemli rolü vardır. Bu aynı zamanda homeostazisin devam ettirilmesi için de gereklidir. Bunun yanı sıra

apoptotik süreç kanser gibi birçok hastalığın oluşmasına yol açmaktadır. Yapısı değişmiş tümör hücreleri kendi apoptotik süreçlerini engellemekte ve hücrenin kontrolsüz bir biçimde faaliyetini sürdürmesine izin vermektedir. Ya da bunun tersine bazı nöronal hücrelerin aşırı apoptotik faaliyet göstermesi bunama (demans) ile sonuçlanabilmektedir (110).

2.4. Oksidatif Stres

2.4.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller; kısa ömürlü, molekül ağırlığı düşük ve negatif yüklü elektron sayısının, pozitif yüklü proton sayısına eşit olmadığı moleküllerdir (111). Ayrıca dış yörüngelerinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron taşırlar, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte üretilebilirler. Oldukça kararsız olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle reaksiyona girebilir ve son yörünge elektronlarını paylaşabilirler. Her tip kimyasal ve biyokimyasal tepkime, atomların dış yörüngelerindeki elektronları sayesinde gerçekleşir. Son yörüngelerindeki paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini artırır, dolayısıyla serbest radikallerin kimyasal aktifliği yüksektir (112).

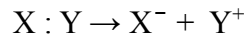
Oksijen (O_2) bütün hücrelere rahatlıkla giren ve en çok kullanıma özelliğine sahip olan moleküldür. Radikal olmaya çok uygun olduğu için serbest radikal denince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel bir anlatımla Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ifade edilmektedir. ROT ve serbest radikaller organizmada fizyolojik şartlar altında sürekli oluşmaktadır. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler (113).

Serbest radikaller, endojen ve ekzojen kaynaklı nedenlere bağlı olarak oluşurlar. Fizyolojik olarak endojen kaynaklı indirgenme-yükseltgenme (redoks) tepkimelerinde; mitokondriyal, endoplazmik ve nükleer elektron iletim sistemlerinde (Sitokrom P-450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi metabolik olaylar sırasında üretilir. Ayrıca bu moleküller hücre içerisinde ultraviyole ışınları, x ışınları gibi radyant enerjinin Emilimi, hava kirliliği, sigara dumanı, ilaç kullanımı

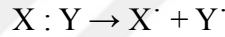
(parasetamol, nitrofurantoin gibi) gibi çevresel faktörlerin etkisiyle eksojen kaynaklı olarak da oluşabilirler (114).

Serbest radikaller insan vücudunda 3 yolla meydana gelir:

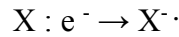
1. Normal molekülden bir elektronun kaybı ya da molekülün heterolitik bölünmesi ile oluşur. Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış yörüngede paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır (114).



2. Kovalent bağ taşıyan molekülün homolitik kırılması sonucu oluşurlar. Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı atomlar üzerinde kalır ise, her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron bulunur. Sonuç olarak, iki adet reaktivite düzeyi yüksek serbest radikal oluşur (115).



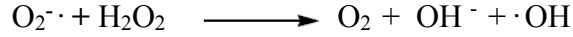
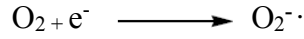
3. Normal bir moleküle bir elektronun eklenmesi yoluyla oluşurlar. Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış yörüngede paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. O₂'in tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin (O₂^{-·}) oluşumuna neden olur (112).



Radikal olmayan türler bu tepkimelerden herhangi biri ile radikal haline gelir. Serbest radikaller ile radikal olmayanların tepkimeleri sonucu, tepkimeye giren moleküller sıra ile serbest radikallere dönüşür ve hasar zincirini ilerleterek yayarlar (113).

2.4.1.1. Süperoksit Radikali (O₂^{-·})

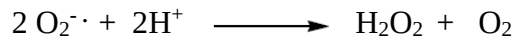
Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile aerobik organizmalarda süperoksit radikali oluşur (116).



Süperoksit radikali, mitokondriyal elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotidin (NADH) okside nikotinamid adenin dinükleotide (NAD⁺) okside olması sonucu üretilir. Genel olarak anyon şeklinde olmasına rağmen, ortamın pH sına bağlı olarak protonlanarak katyon haline dönüşebilir. Bu durumda perhidroksi radikali adını alır. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte, kendisi direkt olarak zarar vermez. Önemli olan, H₂O₂ kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit, nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptozis, inflamasyon ve vasküler fonksiyonların regülasyonu gibi yararlı etkilere sahiptir. Azalmış süperoksit düzeyleri, bakteriyel enfeksiyonlara artmış bir yatkınlığa neden olabilir. Artmış süperoksit düzeyleri ise süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile H₂O₂ ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Böylece hücrel süperoksit düzeyleri kontrol altındadır (117).

2.4.1.2. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik / nonenzimatik dismutasyonu sonucu oluşur (118).

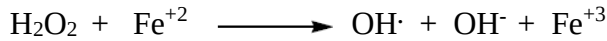


Hidrojen peroksit aslında bir radikal değildir. Ancak üretildiği bölgede kalan süperoksitin aksine membranları geçen, sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinir. Bu nedenle süperoksitin ulaşamadığı membranla korunan yapılara ulaşabilir. Burada süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (Haber-Weiss reaksiyonu). H₂O₂ başka bir şekilde de serbest Fe²⁺ ile reaksiyona girerse demir okside olurken hidroksil radikali oluşur (Fenton reaksiyonu). Bu formdaki reaktif demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Belirtilen potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H₂O₂'nin derhal ortamdan

uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi, hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz (KAT) ve peroksidaz enzimleri yerine getirirler (118).

2.4.1.3. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali, Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da oluşmaktadır.



Hidroksil radikali, bilinen en reaktif radikaldır. Nükleik asitler, aminoasitler, organik asitler, fosfolipidler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin çoğuyla reaksiyona girebilir (117). DNA ile tepkimesi sonucu baz modifikasyonları ve delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir; ileri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur. Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar yapı değişimine neden olup proteinler proteolitik yıkıma götürülür. Hücre zarı su içermediğinden, hidroksil radikalının hedefi yağ asitleridir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp yine hücre ölümüne neden olabilir (118).

2.4.1.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların yıkım hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılmaktadır. Oksidatif denge sağlandığı sürece, serbest radikallerden organizma etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da yıkım hızında bir düşme dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres olarak tanımlanan bu durum, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuç olarak doku hasarına yol açmaktadır (119).

2.4.1.2.1. Membran Lipidleri Üzerinde Etkileri

Biyomembranlar ve hücre içi organeller membran fosfolipidlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı nedeniyle oksidatif strese duyarlıdırlar (112). Serbest radikaller, hücre komponentleri ile etkileşebilmeleri için hücre membranını geçmek zorundadır. Serbest radikallerin etkisi ile yağ asidi zincirinden, hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidi zincirinin de radikal özelliği kazanmasına neden olur. Zincir reaksiyonları şeklinde devam eder ve sonucunda malondialdehit, 4-hidroksinoneal, alkoller, etan ve pentan oluşur. Lipid peroksidasyonu sonucu membran bütünlüğü bozulması ile membran proteinleri, reseptörleri ve ayrıca bunlara bağlanan enzimler inaktive olurlar. Malondialdehit DNA'nın yapısında yer alan nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajen, genotoksik ve karsinojen etkiler gösterir. Lipid peroksidasyonu ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (115).

2.4.1.2.2. Proteinler Üzerinde Etkileri

Hücrenin protein yapıları, serbest radikallerin özellikle duyarlı aminoasitlerle doğrudan etkileşimiyle hasara uğramaktadır. Metionin, sistein gibi terminal sülfidril grubu bulunduran aminoasitler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik aminoasitler oksidasyona en fazla maruz kalan moleküllerdir. Serbest radikallerin etkilerine karşı proteinler, lipidlere göre daha az hassastırlar ve etkilenme dereceleri aminoasit içeriklerine bağlıdır. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir (120). Proteinlerde aminoasitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu ve agregasyonu veya çapraz bağlanmaları gibi yapısal değişiklikler meydana gelmektedir. Ayrıca serbest radikaller, protein yapısındaki enzimlerin aktivitelerini değiştirir, membran taşıyıcı proteinlerini ve reseptör etkileşimlerini bozarlar ve immün sistemi uyaranabilecek antijenik değişikliklere de yol açabilirler (121).

2.4.1.2.3. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri

Farklı mekanizmalar ile serbest radikallerin, DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması

gibi lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir(118). Nükleotidin yapısı içinde yer alan pürin ve pirimidin bazıları oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişir, mutasyonlar ve sitotoksisite ortaya çıkmaktadır (120).

2.4.1.2.4. Karbonhidratlar Üzerinde Etkileri

Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler otooksidasyona uğrayarak, O_2^- ve H_2O_2 radikallerini meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonu, çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (115).

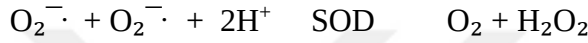
2.4.2. Antioksidanlar

İmmün sistem hücrelerinin savunma mekanizması için serbest radikal reaksiyonları gereklidir, ancak serbest radikallerin fazla üretimi, doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Dolayısı ile serbest radikallerin tetiklediği oksidatif hasara karşı savunma mekanizmaları harekete geçer (112). Antioksidan savunma; hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunun önlenmesi veya geciktirilebilmesidir. Bu süreçte rol oynayan maddelere antioksidanlar denir (122). Oksidanları antioksidanlar farklı mekanizmalar ile etkisizleştirirler. Oksidanları zayıf bir molekül şeklinde, bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde, onarma şeklinde ya da oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olabilir (117).

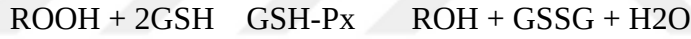
Enzimatik antioksidanlar SOD, KAT ve GSH-Px enzimleridir. SOD'ın yapısında bakır, çinko ve manganez, GSH-Px'da ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar. Hücre dışı ortamda gerçekleşen enzimatik olmayan antioksidan savunmadan ise E ve C vitamini, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilürübin, β -karoten sorumludur. Hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır (123).

2.4.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz (SOD): $O_2^{\cdot-}$ radikalinin H_2O_2 ve O_2 moleküllerine dönüşümünü katalizlemektedir. Metalloprotein olan SOD, hücrelerdeki $O_2^{\cdot-}$ düzeylerini kontrol etmede rol oynar. SOD, bir $O_2^{\cdot-}$ radikalini yükseltgerken, diğer $O_2^{\cdot-}$ radikalini H_2O_2 e indirger (124). Yüksek O_2 kullanımı olan dokularda (eritrositler gibi) SOD aktivitesi fazladır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler öldürülmelerinde de rol oynamaktadır. Bu nedenle SOD granülosit fonksiyonu için oldukça önemlidir. Lenfositlerde de SOD fazla miktarda bulunmaktadır (124).



Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): Glutasyon yolunun ilk enzimidir, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Enzim aktivitesi, pentoz fosfat yolunda üretilen $NAD(P)H$ 'a bağımlıdır (125). GSH-Px, üç peptidli glutasyonu kendi oksidize formuna (GSSG) oksidize ederken; sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından üretilmiş olan H_2O_2 radikalini, yüksek spesifite göstererek ortadan kaldırabilir (126).



Selenyum bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere iki tip GSH-Px vardır. Selenyumdan bağımsız formu organik H_2O_2 moleküllerini kullanıp, yüksek bir aktivite gösterebilir. Selenyuma bağımlı olan formu ise sitoplazmada bulunur ve kapasitesi daha düşüktür (127).

Fagositik hücrelerde majör peroksit uzaklaştırıcı görevi yapan GSH-Px diğer antioksidanlarla birlikte, oksidatif patlama sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Endoplazmik retikulumdan salınan H_2O_2 'in dekompozisyonunun primer sorumlusu olan GSH-Px aktivitesindeki azalma, H_2O_2 'in artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açmaktadır (127).

Katalaz (KAT): İçeriğinde Fe^{+3} bulunduran dört hem grubuna ayrılmış, glikoprotein yapısında, bir hemoproteindir. SOD'ın oluşturduğu H_2O_2 in, peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalanmasında rol almaktadır (124).

2.4.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar; C Vitamini (Askorbik Asit), E Vitamini, A Vitamini, Karotenoidler, α -Lipoik Asit, Ubikinonlar (Redükte Koenzim Q), Ürik Asit, Bilirubin, Albümin, Transferrin, GSH, Seruloplazmindir.

İndirgenmiş Glutatyon (GSH): Sistein içeren bir tripeptit olup invivo sentezlenebilen ve ince bağırsaktan emilebilen endojen ve eksojen bir antioksidandır. Peroksidazlar için substrat görevi görebilir ve antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde de orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir (122). GSH, DNA sentezi ve hasarlı parçalarının onarılmasında etkindir; aminoasit transportu, peroksit metabolizması, iskelet-kas bütünlüğü ve birçok enzim aktivitesinin düzenlenmesinden sorumludur. Eksikliği hücre ölümüne yol açar (124).

2.5. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali

2.5.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi

Hücrelerin işlevleri hücrel iyon değişimleri ile tetiklenmektedir. Ca^{+2} , hücre içi süreçlerde ve hücreler arası etkileşimde önemli rollere sahiptir. Canlılarda gerçekleşen birçok önemli olayda Ca^{+2} belirleyici rol oynamaktadır. Damar düz kasının kasılması / gevşemesi, hücre bölünmesi, hücrel motilite, hormon sekresyonu, metabolizma, sinir sisteminin işleyişi, yumurtanın döllenme sonucu aktivasyonu, protein döngüsü, gen ekspresyonu, yaraların iyileşmesi, karaciğer hücrelerinin davranışlarının düzenlenmesi, apoptozis gibi birçok fizyolojik olayı kontrol eden bir iyonudur (128). Birçok fonksiyonu kontrol etmesi hücre içerisindeki kalsiyumun düzenli olarak ayarlanmasına bağlıdır. Normal nöronal fonksiyonlarda önemli rol oynar (130). Plastisite ve sinaptik transmisyon gibi önemli nöronal olayları düzenler (129).

2.5.2. Hücre içi Kalsiyum Sinyalinin Oluşumu

Endotel kaynaklı maddelerin sentezi veya salınımında Ca^{+2} iyonunun gerekliliği kısmen aydınlığa kavuşturulmuştur. Son yıllarda patch-clamp ve

mikrospektrofluorometrik araştırma teknikleri ile flüoresan ışığına duyarlı çeşitli boyalar hücre içerisindeki iyonik akımları ve hücre içi serbest iyon seviyelerinin ölçülmesini mümkün hale getirmiştir (131). $[Ca^{+2}]_i$, hem hücre dışı ortama, hem de hücre içinde Ca^{+2} depolayan yapılara göre çok düşüktür. Bu fark, Ca^{+2} için çok büyük bir sürdürücü kuvvet oluşmasına sebep olur. Bu nedenle Ca^{+2} 'un hücre içinde sinyal molekülü görevi yapabilir ve bu özelliğinden dolayı hücre için bir ikincil habercidir (130).

Hem hücre zarı, hem de endoplazmik retikulum zarından Ca^{+2} geçişi, bu sürdürücü 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 (132)

Hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} girişi sağlayan kanal tipleri şunlardır:

A-Voltaj Bağımlı Ca^{+2} kanalları: Membran depolarizasyonu sonucu aktive olurlar. Bu aktivasyon, kanalları Ca^{+2} 'a geçirgen hale getirir. Bu sayede hücre zarındaki elektriksel olaylar, hücre içindeki fizyolojik olaylarla ilişkilendirir (133).

B- Ligand Bağımlı Ca^{+2} kanalları: Hücre dışından gelen ligandların bağlanması ile aktive olur ve Ca^{+2} 'a geçirgen hale gelirler. Bu kanallar aynı zamanda birer reseptör görevi görürler. Bu kanallara nikotinik asetilkolin reseptörleri örnek verilebilir (134).

C- Kalsiyumun sızarak hücreye girdiği kanallar: Bu kanalların aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Hücre içi Ca^{+2} depoları, Ca^{+2} sinyali sonucu ya da daha farklı şekillerde boşaldığında, bu kanallar hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} girişine sebep olurlar.

D- Na –Ca değiş tokuşu

Hücre içi Ca^{+2} depolarından Ca^{+2} çıkışını sağlayan yapılar şunlardır:

Ryanodin ve inositol 1,4,5-trifosfat reseptörleri: Endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınımı inositol 1,4,5-trisfosfat (IP3) reseptörü ve ryanodin reseptörü üzerinden olur. Hücre membranında bulunan reseptörlere agonistlerin bağlanması ile fosfolipaz C aktive olur. Fosfolipaz C'nin aktive olması, bünyesinde barındırdığı alfa, beta ve gama alt birimlerini aktive eder. Aktive olmuş fosfolipaz C, membran fosfolipidlerinde fosfoinositoldifosfatı (PIP2) aktive eder. PIP2'nin aktive olması

diacylglycerol (DAG) ve IP3 aktivasyonu ile neticelenir. DAG hücre zarında protein kinaz C formunda kalır, IP3 de sarkoendoplazmik retikuluma gider ve kalsiyum depolarından sitozole kalsiyum akışına neden olur. IP3 reseptörü ile hücre içi kalsiyum salınımı sağlanmış olur. Ryanodin reseptörleri ise doğrudan voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarından giren Ca^{+2} tarafından aktive edilir (135). Hücre içi serbest Ca^{+2} artışının tetiklediği kalsiyum salınımı, pozitif geri-besleme mekanizması olarak iş görmektedir.

Hücre içi depolara Ca^{+2} 'un alınması üç yolla gerçekleşir:

1. Endoplazmik retikulum membranındaki Ca-ATPaz enzim aktivitesinin artmasıyla Ca^{+2} alımının artması
2. Hücre membranındaki Ca -ATPaz yardımıyla hücre dışına Ca^{+2} atılması
3. Diğer ikisine oranla daha az olmak üzere Na – Ca değiş tokuşu yardımıyla olmaktadır. İstirahat durumunda hücre dışı kalsiyum iyonu, hücre içine oranla 10000-20000 kat daha yüksektir (136).

2.6. Transient Receptör Potansiyel (TRP) Kanalları

Transient receptör potansiyel (TRP) kanalları 1998 yılında drosophila türü sirke sineklerinin gözlerinde bulunan fotoreseptörlerde keşfedilmiştir. Mutasyona uğramış bu kanalların sürekli bir ışığa karşı sürekli yerine geçici gerilim oluşturmasıyla karakterize olduğu ve buna bağlı görsel defekt olduğu saptanmıştır (136). TRP kanalları, memelilerden omurgasızlara kadar organizmaların dokularındaki proteinlerin çeşitli bir grubunu oluşturmaktadır (137). TRP kanalları voltaj bağımlı olmayan, kalsiyum, Na ve K' a geçirgen olan katyon kanallarıdır (138).

TRP katyon kanalları üst ailesi voltaja duyarlı Ca^{+2} 'a geçirgen katyon kanallarının geniş bir yelpazesini içine almaktadır. Devam eden genetik araştırmalar neticesinde günümüzde memelilere ait toplam 28 çeşit TRP kanalları 6 alt aileye gruplandırılmıştır. Bunlar; TRP conancial (TRPC) 7 alt aileden, TRP vanilloid (TRPV) 6 alt aileden, TRP melastatin (TRPM) 8 alt aileden, TRP polycystein (TRPP) 3 alt aileden, TRP mucolipin (TRPML) 3 alt aileden ve TRP ankyrin (TRPA) 1 alt aileden oluşmaktadır. Günümüzde TRP kanallarını nelerin aktive ve bloke ettikleri

kesin olarak bilinmemektedir (139). Ancak, birçok hastalığın bu kanalların aktivasyonu ve inaktivasyonu ile alakalı olduğundan bunlara olan ilgi artmaktadır.

TRP kanalları dokunma, duyma, tat alma, görme, termal hassasiyet gibi duyuların algılanmasında önemli bir role sahiptir (140). Genel olarak N terminal, transmembran bölgesi ve C terminal olmak üzere 3 ana bölgeden oluşur (141). Tekrarlanan ankrin ve coiled-coil olarak adlandırılan yapılar N terminalinde iken, TRP homoloji ve enzimatik Nudiks boks segmentleri C terminalinde bulunmaktadır. C terminalinde enzimatik bir bölge bulunması ve aynı zamanda kanal vazifesi görmesi nedeniyle 'chanzyme' olarak da adlandırılmaktadır. İyonların bir taraftan diğerine geçişi, transmembran bölgesindeki 5. ve 6. segmentler arasından gerçekleşmektedir. Kanal gözeneginin 5. ve 6. segmentleri arasındaki bir iletken iyon etrafında homo veya heterotetromerik düzenlemelerle TRP kanalları voltaj kapılı K^+ kanallarına benzer basit bir yapıya sahiptir (136). Bu durum sadece tek değerliğe sahip katyonlar için geçerli değil, Ca^{+2} ve Magnezyum (Mg^{+2}) içinde geçerlidir.

Ayrıca, TRPM2 ve TRPC kanallarının Nudiks alanları Adenozin di-fosfat Ribozu (ADPR) pirofosfataz enzim aktivasyonu içermektedir ve ADPR, riboz 5- fosfat ve adenozin monosfosfata parçalar ve kanal açılır. ADPR pirofosfataz aktivasyonu TRPV kanallarında yoktur. Buna ilaveten bütün TRP kanalları çok yönlü düzenleyici protein etkileşim alanlarına sahiptir. Çok yönlü protein kinaz A ve protein kinaz C varsayılan fosforilasyon alan fonksiyonları tanımlanmıştır. Birkaç TRP kanallarında da fosfotidilinositide 3 kinaz SH2- tanıma alanları keşfedilmiştir (142).

TRP kanalları ya direkt olarak plazma zarlarındaki Ca^{+2} kanalları gibi davranmakta ya da Ca^{+2} kanallarının modülasyonu için itici güç olan zar potansiyelini değiştiren sitozolik serbest Ca^{+2} kanallarında değişime yardımcı olmaktadır (143). Tüm işlevsel TRP kanalları (TRPM4 ve TRPM5 dışında) Ca^{+2} için geçirgendirler. TRPV5 ve TRPV6, Ca^{+2} 'a çok geçirgendir. TRPM6 ve TRPM7 Mg^{+2} 'a çok geçirgen, TRPV1, TRPML1 ve TRPP3 kanalları da H^+ iyonlarına çok geçirgendirler (144).

2.6.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM) Kanalları

TRPM alt ailesinin 8 üyesi vardır ve bunlar 4 grup içerisinde yer alırlar. Bunlar; TRPM2/TRPM8, TRPM1/TRPM3, TRPM4/TRPM5 ve TRPM6/TRPM7' dir (139).

Bu ailenin ilk keşfedilen üyesi TRPM1 kanallarıdır ve ilk kez melanoma hücrelerinde belirlenmiştir (144). Bu nedenle melanoma kelimesinin baş harfi 'M' ile ifade edilirler. TRPM1 kanallarının yüksek oranda metastatik potansiyele sahip olan melanoma hücrelerindeki ekspresyonunun, nonmetastatik hücrelerdekine göre düşük olduğu tespit edilmiştir (145). Bunun yanında normal dokularda da bulunduğu tespit edilmiştir. TRPM kanalları 6 segmentten oluşan bir transmembran bölgesine, N ve C terminal bölgelerine sahiptirler (139).

TRPM alt ailesinin özellikle oksidatif stresle aktive olan, TRPM2 kanallarının hücre farklılaşması ve canlılığın devam ettirilmesi gibi önemli fonksiyonların yerine getirilmesinde rol oynadıkları bilinmektedir (146).

Hem TRPM6 hem de TRPM7 fonksiyonel C terminali serin/treonin kinaz içerirken, TRPM2 ADPR pirofosfataz faaliyeti gösteren fonksiyonel *NUDT9* homoloji alanı içerir. Ca^{+2} geçirgenliği farklılık gösterir. Buna rağmen TRPM1 kanalı hariç tüm TRPM katyon kanalları bu güne kadar karakterize edilmemişlerdir. TRPM4 ve TRPM5 ısıya duyarlı Ca^{+2} aktif kanallarıdır (144). TRPM2; ADPR, H_2O_2 ve sıcaklıkla aktif hale gelir. TRPM3 kanalları TRPM6 ve TRPM7 kanalları gibi hücre içi Mg^{+2} seviyesi ile düzenlenir. Hücre şişmesi gibi bazı mekaniksel uyarımların TRPM3 kanallarını aktive ettiğine dair düşünülmektedir (147). Yakın zamandaki bir çalışmaya göre; düşük sıcaklıkla ve mentol ile aktive edilen TRPM8 kanallarının hem tekrar vücut sıcaklığına döndüğünde hem de antranilik asit uygulandığında, önemli ölçüde kanalların inaktive olduğu bildirilmiştir (141)

2.6.1.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin 2 (TRPM2) Kanalları

TRPM2, Ca^{+2} için geçirgen nonselektif katyon kanallarıdır (148). TRPM2 geni ilk kez 1998'de klonlanmıştır (149). Bu kanallar önceleri TRPC7 ve LTRPC2 olarak daha sonra ise yapılan filogenetik sınıflandırma sonucunda günümüzde de yaygın kullanılan TRPM2 olarak adlandırılmıştır (140). TRPM2 kanalları başta beyin ve kemik iliği olmak üzere böbrek, bağırsak, karaciğer, akciğer, testis, prostat, pankreas, iskelet kası, lökositler ve AKG gibi birçok doku ve hücrede tespit edilmiştir (150).

TRPM2 kanallarının 4 alt tipi bulunmaktadır ve kanalların moleküler yapısı diğer kanallar gibi 6 segmentten meydana gelip, katyon girişlerinin 5. ve 6. segmentler

arasında gözlenmektedir. Bu kanallar Na ve K'a geçirgen olup kalsiyumun girişinde de çok önemli rol oynarlar (151). TRPM2'nin transmembran bölgesinin yanında intraselüler N ve C terminal uçları bulunmaktadır. TRPM2 katyon kanallarının C terminalindeki Nudiks alanında (NUDT9) bulunan ADPR pirofosfataz enzimiyle, ADPR, riboz-5 fosfat ve AMP ye parçalanıp TRPM2 kanallarının açılmasına sebep olur (148). Yani anahtarı kanalın içerisindedir. TRPM2 kanallarının oksidatif stresle de aktive olabileceği gösterilmiştir (152,153). Bu oksidatif stres ve ADPR ile aktivasyon konuları kesinleşmiş olmasına rağmen bunların birlikte mi yoksa ayrı ayrı mı kanalı aktive ettikleri günümüzde hala tartışılmaktadır. Bir kısım araştırmacılar kanalların hem ADPR ve oksidatif stresle ayrı ayrı aktive olduklarını rapor etmelerine rağmen (148), diğer bir kısım araştırmacılar oksidatif stres ürünlerinin ADPR düzeyini artırdığını ve ADPR kanalı açtığını yani oksidatif stresin kanal aktivasyonunda dolaylı etkisinin olduğunu savunmuşlardır (154).

ADPR üretimi, G proteine bağlı reseptörlere ligand kanal aktivasyonu ile başlatılır. Reseptör aktivasyonu aynı zamanda intrasellüler Ca^{+2} 'un yükselmesi, IP3 tarafından hücre içi organellerden Ca^{+2} 'un serbest bırakılmasına neden olur. ADPR polimerlerinin stimülasyonu sonrası poli (ADPR) polimeraz-1 (PARP-1)'e ve sonrasında poly (ADPR) glikohidrolaz (PARG) tarafından ADPR'ye hidroliz edilir. Bu olay hücreyi apoptozise gidinceye kadar uyarabilir.

Metabolizma sonucu üretilen H_2O_2 hücre içerisine girerek TRPM kanalını aktive etmesiyle hücre içerisine Ca^{+2} 'un girişinin artırdığına inanılmaktadır (155). Sitozolda Ca^{+2} artışı mitokondride depolarizasyon ve porların açılmasını sağlar. Bir kısım araştırmacılara göre ise H_2O_2 hücre içi organellerde (çekirdek, mitokondride v.b) ADP-riboz sentezini artırmakta ve kanalı açmaktadır (154). Ayrıca, hücre kültürü ortamında TRPM2 kanallarının H_2O_2 ile aktive olduğu gözlenmiştir (156). Fakat, zıt sonuçlara sahip çalışmalar da mevcuttur (157). Patch-clamp ile alınan tekli kanal kayıtlarında kanalların ikinci haberciler olmadan da aktive olabildiği gözlemlendi (152).

Hücre içi Ca^{+2} iyonu artışı hücre ölümlerine kadar varan patofizyolojik olayların başlatıcısıdır (158). Nöronların elektriksel olarak aşırı uyarılması "aşırı uyarılma toksisitesi" adı verilen, hücreyi ölüme götüren bir süreci başlatabilir. Bu

durum pek çok nörodejeneratif hastalıkta ve travmalar sonra gözlenen nöron kaybının patofizyolojisinde sorumlu tutulmaktadır. Aşırı uyarılma toksisitesinde hücre ölüm sürecini başlatan hücre içinde yükselen Ca^{+2} seviyesidir.

Günümüzdeki TRPM2 kanalları, Ca^{+2} kanal inhibisyonunda kullanılan ilaçlar ile bloke olmamaktadır (159). Bu nedenle hücre içine Ca^{+2} girişini ayarlayan TRPM2 hücre zarı katyon kanallarını aktive ve inhibe eden mekanizmaların araştırılması hücre içi Ca^{+2} artışı ile ilgili başta iltihabi, kanser ve kalp hastalıklarının oluşum nedeninin bilinmesi açısından oldukça önemlidir (160).

Yapılan çalışmalarda, TRPM2 kanal aktivasyonunun düzenlenmesinde 2-aminoethoxydiphenyl borat (2-APB) ve antranilik asidin önemli rolleri olabileceği düşünülmektedir (161). TRPM8 kanal blokörü olarak bilinen 2-APB'nin inositol 1,4,5-trifosfataz reseptör antagonisti olduğu ve kanal etkinliğini düzenleme etkisini bu şekilde gösterdiği bildirilmiştir (162). Oksidatif hasar oluşturulmuş transfekte CHO hücrelerine kalsiyum girişinin kontrolünde 2-APB'nin önemli bir rolü olduğu savunulmaktadır (141). Antranilik asidin ise etkisini fosfolipaz A2'yi baskılayarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (163).

2.6.1.2. Transiyent Reseptör Potansiyel Vanilloid 1 (TRPV1) Kanalları

TRP vanilloid (TRPV) kanalları kendi arasında 6 alt birime ayrılmakla beraber, daha ziyade TRPV1 kanalları üzerinde çalışmalar yapılmıştır. TRPV1 kanalları memelilerin fizyolojik, patolojik ve hastalık durumlarında rol oynamaktadır. TRPV1 kanalları zararlı birçok uyarımdan sorumlu olabilirler. TRPV1'in tekrar eden aktivasyonu ile ölümcül hücre yaralanmaları, oksidatif stress ve sitozoldeki serbest kalsiyumun artışı olabilir.

Bu kanalların; yüksek sıcaklık ($>42\text{ }^{\circ}\text{C}$), asidik pH, ve kırmızı acı biberde bulunan kapsaisin maddesi ile aktive olduğu ispatlanmıştır (136). Kapsaisin ile oksidatif ürünler arasındaki etkileşimle kapsaisinin etkisinin azalmasından dolayı, oksidatif stres ürünlerinin fazla üretildiği hücresel ortamlarda, kapsaisinle uyarılan TRPV1 kanal akımları, oksidatif ürünlerin az bulunduğu ortamlara kıyasla daha az gözlenmiştir (164). Bunun yanı sıra, hücre içerisinden ve dışından gelen uyarılarla da

aktive olmaktadır. Bu uyarılar arasında inflamasyonu uyarıcı faktörler (örneğin interlökinler) ve kimyasal uyarıcılar yer almaktadır (165).

Son zamanlardaki çalışmalarda, TRPV1 kanallarının yapısında ve aktivasyonunda tiyol ve sülfidril gruplarının önemine değinilmiştir (166). Oksidatif stres ürünleri kinaz enzimleri ve hücre zarı proton yapılarında değişikliklere neden olmaktadır. Bu nedenle, uzun süre oksidatif strese maruz kalındığında tiyol ve sülfidril gruplarının bağlarındaki değişimlerden dolayı, TRPV1 kanallarının duyarlılığının azaldığı, fakat sistein içeren maddeleri inkübe edilen HEK-293 hücre serilerinin TRPV1 kanallarının açılma-kapanma hassasiyetinin düzeldiği saptanmıştır (167).

Sarımsakta bulunan galisin maddesi ve nitrik oksit TRPV1’de kovalent değişikliklere neden olarak ve oksidatif stres oluşturarak ağrı ve hassasiyet (hiperaljezi) oluşumuna neden olmaktadır (167). Ayrıca bu kanalın özellikle nöronlarda ve AKG hücrelerinde inflamatuvar ve ağrı mekanizmaları üzerinde önemli rol aldığı daha sonra yapılan araştırmalarda anlaşılmıştır.

H₂O₂’nin TRPV1 kanallarına hem bağımlı hem de bağımsız ağrıya karşı aşırı hassasiyet oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir (168). H₂O₂ gibi hücre zarını geçebilen oksidanların TRPV1 kanallarını aktive edebildikleri, hücre zarını geçemeyenlerin ise aktive edemedikleri gözlenmiştir (164). Bununla birlikte, H₂O₂ in TRPV1 kanallarını aktive ettiği biyokimyasal yollar hakkında yeterince bilgi yoktur.

Aynı zamanda, bu kanalların protein kinaz A ve protein kinaz C gibi ikinci haberciler ile aktive olduğu da ispatlanmıştır (169,13). Bu protein kinaz C’yi ikinci haberci sistemi olmadan aktive edebilen bazı maddeler bulunmuştur. Bunlardan en fazla bilinen forbo esterlerden phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) maddesidir. Yapılan çalışmalar neticesinde PMA’nın protein kinaz C yoluyla TRPV1 katyon kanallarının açılmasına yardımcı olduğu anlaşılmıştır (170, 171).

Bu kanalların önemi, günümüzde bilinen voltaja duyarlı Ca⁺² kanal blokerlerinin hiçbiri bu kanalları inhibe edememektedir. Bu kanallar bozulacak olursa hücre içi Ca⁺² miktarı patolojik düzeylerde seyredip hücrenin ölümüne yol açabilmektedir. Konuya bu açıdan bakılacak olursa, bu kanallar üzerine yapılan çalışmalar artmaktadır. Çünkü bunların düzenlenmesi veya patolojik durumdan fizyolojik duruma döndürülmesi, ağrı tedavisine büyük katkı sağlayacağı

düşünülmektedir. Bu çalışma, selenyumun TRPV1 üzerine etkisi ve bu yolla hücre içerisine Ca^{+2} girişi üzerine odaklanılacaktır. Ayrıca, FM’de TRPM2 ve TRPV1 kanalları vasıtasıyla hiperaljezi gerçekleştiği düşünülerek konunun bu proje dolayısı ile araştırılması planlanmıştır.



3. MATERYAL VE METOD

3.2. Deney Hayvanları

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ve Biyofizik Anabilim Dallarından Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 4562-TU2-16 proje numarası ile desteklenmiştir.

Planlanan çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan deneyleri Yerel Etik Kurulunun 7 Ocak 2016 tarih ve 01 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Çalışmamızda 12 haftalık 160-200 gram (gr) ağırlığı aralığında, 40 adet Wistar Albino türü dişi rat kullanıldı. Ratlar Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarından temin edildi.

Ratların yaşam ve deney alanı, Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı olarak belirlenmiş ve yürütülmüştür. Her çalışma grubunda ratlar standart mevsimsel ışık (08.00-20.00 arası) ve ısı koşullarında ($+22^{\circ}\text{C} \pm 2$) bulunduruldu. Çevre ortalama ışık şiddeti 4000 lux ve ortamın nem oranı $40\% \pm 10\%$ idi. Ratlara yeteri kadar sınırlama olmaksızın çeşme suyu ve standart rat pellet yemi verildi.

3.2. Deney Grupları

Ratlar;

Grup A: Kontrol Grubu (n=10)

Grup B: Kontrol + Selenyum Grubu (n=10)

Grup C: Fibromiyalji Grubu (n=10)

Grup D: Fibromiyalji + Selenyum Grubu (n=10) olmak üzere 4 gruba ayrıldı ve en fazla 4 hayvan 1 kafeste olacak şekilde konuldu.

3.2.1. Kontrol Grubu (n=10)

Herhangi bir ilaç uygulanmamış sağlıklı sıçanlar kullanıldı. Bu sıçanlara plasebo kas içi iki kez unilateral 0.2 ml SF (NaCl) 5 gün ve sonrasında 14 gün süre ile gün aşırı intraperitoneal 1 ml SF verildi. 19. gün sonunda tüm sıçanlar kesildi.

3.2.2. Kontrol + Selenyum Grubu (n=10)

Herhangi bir ilaç uygulanmamış sağlıklı sıçanlar kullanıldı. Bu sıçanlara plasebo kas içi iki kez unilateral 0.2 ml SF (NaCl) 5 gün ve 14 gün süre ile gün aşırı selenyum (sodyum selenit ve 1.5 mg/kg) intraperitoneal yolla verildi ve 19. gün sonunda tüm sıçanlar kesildi (172).

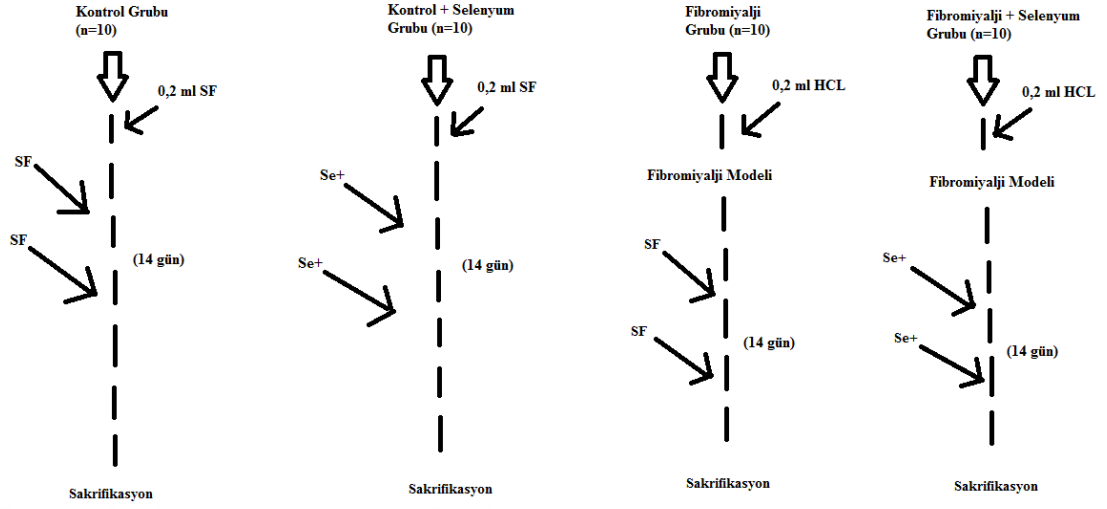
3.2.3. Fibromiyalji Grubu (n=10)

Herhangi bir ilaç uygulanmamış sağlıklı sıçanlar kullanıldı. Fibromiyalji modeli oluşturmak için kas içi iki kez unilateral 0.2 ml hidroklorik asit 5 gün verildi ve daha sonra gün aşırı intraperitoneal 1 ml SF (NaCl) verildi. 19. gün sonunda tüm sıçanlar kesildi.

3.2.4. Fibromiyalji + Selenyum Grubu (n=10)

Herhangi bir ilaç uygulanmamış sağlıklı sıçanlar kullanıldı. Fibromiyalji modeli oluşturmak için kas içi iki kez unilateral 0.2 ml hidroklorik asit verildi ve daha sonra gün aşırı intraperitoneal 1 ml selenyum (sodyum selenit ve 1.5 mg/kg) uygulandı. 19. gün sonunda tüm sıçanlar kesildi.

GRUPLAR

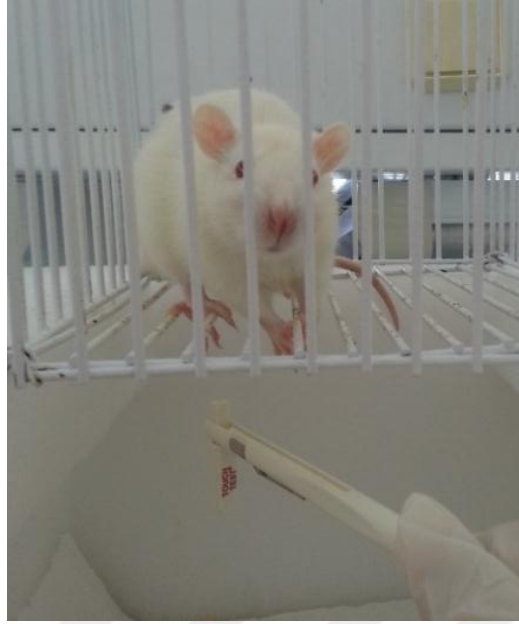


3.3. HCl ile Fibromiyalji Oluşturulması

20 erişkin dişi Wistar albino türü sıçanın gluteus kasına bilateral 0.2 ml hidroklorik asit (HCl) (pH 4,0) olarak enjekte edildi. Günlük olarak mekanik uyarana pençe çekme yanıtı Von Frey filamanları kullanılıp ölçülerek hem de sıcak plaka (55 °C) yöntemi ile test edilip kayıt edildi ve FM (ağrı) oluşumu kabul edildi (173).



Resim 1. Hot Plate testi



Resim 2. Von Frey testi



Resim 3. Von Frey filamanları

3.4. Ratların Sakrifikasyonu ve Örneklerin Alınması

Deney sonunda, tüm hayvanlardan AKG, siyatik sinir (SyS), hipokampus, beyin, gluteus kası, alyuvar ve plazma örnekleri elde edildi. Çoğu analizler (örneğin

patch-clamp, Ca^{+2} sinyali ve apoptozis) canlı hücrelerde dondurulmadan çalışıldı ve her hafta belirli sayıda analiz yapıldı. Bu nedenle hayvanların kesimleri 4 ay içerisinde kısım kısım gerçekleştirildi.

3.4.1. Sıçan Arka Kök Gangliyon (AKG) Hücreleri İzolasyonu

AKG hücreleri, sıçanlardan eter inhalasyon anestezisi işleminden sonra kalpten kan alınarak gerçekleştirilen sakrifikasyon işlemini takiben vakit kaybetmeden sırt omurları bir bütün halinde çıkarıldı. Sırt omurları kas dokusundan mümkün olduğunca ayrıldı ve ventral kısmından, özel olarak silikon maddesi ile kaplanmış yüzeye hareket etmeyecek şekilde yerleştirildi. Hücrelerin canlılığını kaybetmemesi için bir miktar Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besi yeri (%89 DMEM, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin antibiyotik kombinasyonu) konuldu. Bu işlemlerden sonra omurlar orta hatlarının üzerinden olacak şekilde eşit iki parçaya ayrılmaya çalışıldı. Spinal kord ve üzerindeki zar stereo mikroskop altında dikkatlice yerleştirildiği alandan dış kısma alındı ve spinal kord ile sinir grupları arasındaki bağlantı koparılmamaya özen gösterildi. Her iki vertebra arasına dikkatlice yerleştirilmiş olan hücre yumakları ince uçlu pensler ile yerlerinden alınarak içerisinde antibiyotikli medyum bulunan steril petri kaplarına konuldu. Sonra petri kutusu stereo mikroskop altına alınarak hücre yumaklarının gangliyon uzantılarından ayrıldı ve bir saat süresince inkübatörde (37°C ve %5 CO₂) kollejenazlı solüsyon (% 2,5) içerisinde bekletildi. Sonrasında mekanik parçalama işlemine geçildi ve sırası ile ilk önce 1 ml hacimli, farklı genişliklerdeki pipet uçları ile daha sonra 200 µl hacimli pipet uçları ile ve en sonunda da steril insülin iğnelerinden geçirilerek mekanik parçalanma işlemi tamamlandı. Bu işlemlerin ardından gerekli inkübasyonlar yapıldıktan sonra hücreler elektrofizyolojik kayıtlar alınmak üzere patch çemberine konuldu.



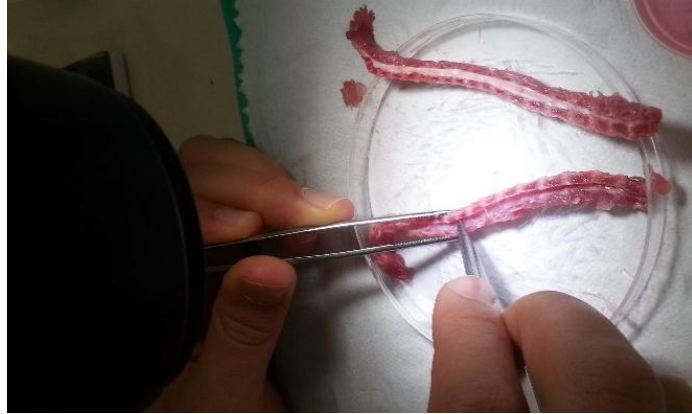
Resim 4. Kan alınarak gerçekleştirilen



Resim 5. Sırt omurları sakrifikasyon



Resim 6. Omurların 2 eşit parçaya ayrılması



Resim 7. Mikroskop altında ganglionların toplanması



Resim 8. Siyatik sinir

3.5. Labaratuvar

3.5.1. Elde Edilen Taze Kan ve Doku Örneklerinde

Lipid peroksidasyon, indirgenmiş glutatyon ve glutatyon peroksidaz analizleri: Kan ve doku örneklerinde lipit peroksidasyon (MDA) analizleri Placer ve ark., (1966) bildirdiklere yöntemle göre spektrofotometrik yöntemle yapıldı. GSH düzeyleri Sedlak and Lindsay'in (1968) ve GSH-Px analizleri Lawrence and Burk (1976) bildirdikleri yöntemlere göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi (174-176).

3.5.1.1. Lipit Peroksidasyon Analizi

Lipit peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve arkadaşlarının bildirdikleri yönteme göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile çok hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV - 1800, Japonya) yapıldı.

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

3.5.1.2. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü (İndirgenmiş Glutatyon (GSH) ve Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizleri)

GSH düzeyleri Sedlak ve Lindsay'in (1968) bildirdikleri yönteme göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi. 0,1 ml hücre homojenatı 0,4 ml TCA (%10 trikloroasetik asit) solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra 20 saniye boyunca vortekslendi ve 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra 0,1 ml süpernatant temiz bir tüp içine alındı. Üzerine 0,9 ml distile su, 2,0 ml Tris tamponu (0,4M pH:8,9)ve 0,1 ml DTNB solüsyonu eklenip, oluşan sarı renk distile suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk (1976) tarafından bildirilen yönteme göre spektrofotometre ile belirlendi (Tablo 1). Tris HCl tampon solusyonu (50 mM, pH:7,6), CHPO (cumene-hydroperoxide) solüsyonu, GSH solüsyonu, % 10 TCA solüsyonu, Tris tampon (0,4 M pH: 8,9), DTNB solüsyonu kullanıldı. Oda ısısında 5 dakika beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

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

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

3.5.2. Antioksidan Vitamin Analizleri

Vitamin A (retinol) ve vitamin E (α -tokoferol) analizleri Desai ve Suziki ve Katoh tarafından belirtilen yöntemlerin modifikasyonu sonucu alınan kan plazmasında incelenmiştir (84,85). 0.3 mililitrelik plazma % 60 oranında sulandırılmış KOH (potasyum hidroksit) ile karıştırılmıştır. Daha sonra örnek 2 mililitre % 1 oranında etanol içeren askorbik asit eklenip 70 °C ’de 30 dakika ısıtılmıştır. Daha sonra ısıtılan örnek buz kalıplarının üzerine konulup, 2 ml distile su ve 1 ml n-heksan eklenip karıştırıldı ve faz ayrışması için 10 dakika dinlenmeye bırakıldı.

N- heksan ekstresinden 0.5 ml bir kısmı alındı ve vitamin A konsantrasyonu 325 nm’de okundu. Daha sonra reaksiyona giren maddeler ilave edilip 535 nm’de spektrofotometre ile okundu. Heksan içinde bulunan all-trans retinol ve α -tokoferolün kalibrasyonu standart solüsyonlar kullanılarak sağlandı.

Kan plazmasında bulunan β -karoten konsantrasyonu ise, Suziki ve Katoh (1990) tarafından geliştirilen method ile incelenmiştir (177). 2 ml heksan ile 0.25 ml kan plazması karıştırılmış 453 nm’deki spektrofotometre yardımıyla okunmuştur.

Kan plazmasında bulunan vitamin C (askorbik asit) konsantrasyonu ise, Jagota ve Dani tarafından geliştirilen method ile incelenmiştir. 760 nm’deki spektrofotometre yardımıyla ölçülmüştür (178).

3.5.3. Yama-Menteşe (Patch-Clamp) Deneyleri

3.5.3.1. Solüsyonların Hazırlanması

Yama-menteşe deneylerinde kullandığımız tampon çözeltiler, aşağıdaki tablolarda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır (Tablo 2, Tablo 3 ve Tablo 4). Çözücü olarak tüm çözeltilerde ultra distile su kullanıldı. Çözeltilerin osmolaritesi 310 mosmol/l olacak şekilde ayarlandı (148).

Tablo 2. Normal ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü

Kimyasal Madde Konsantrasyon (mM)
NaCl 140
MgCl ₂ .6H ₂ O 1,2
CaCl ₂ .2H ₂ O 1,2
KCl 5
Hepes 10
D-Glukoz.H ₂ O 10
pH KOH ile 7,4 e ayarlandı.

Tablo 3. NMDG'li ekstraselüler tampon çözelti hazırlama protokolü

Kimyasal Madde Konsantrasyon (mM)
NMDG 150
MgCl ₂ .6H ₂ O 1,2
CaCl ₂ .2H ₂ O 1,2
Hepes 10
D-Glukoz.H ₂ O 10
pH HCl ile 7,4 e ayarlandı.

Tablo 4. Hücre içi tampon çözelti hazırlama protokolü

Kimyasal Madde Konsantrasyon (mM)
L-Glutamik Asit 145
NaCl 8
MgCl ₂ .6H ₂ O 2
CaCl ₂ .2H ₂ O 0,001
Hepes 10
EGTA 10
pH sezyum hidroksit (CsOH) ile 7,2 ye ayarlandı.

APB'nin çözünebilir formunun hazırlanması ve uygulanışı:

Öncelikle Dimetil Sülfoksit (DMSO) içerisinde çözdürülen 2-APB'nin stok solüsyonu (100 mM) hazırlandı. Hazırlanan solüsyon -33 °C'de dondurucuda saklandı. Yama-menteşe deneyleri öncesinde stok solüsyon son konsantrasyon 50 µM olacak şekilde normal ekstraselüler tampon içerisinde taze olarak çözdürüldü (161).

3.5.4. Hücre İçi Kalsiyum Ölçülmesi

Hücre içi kalsiyum miktarının ölçümü için AKG ve diğer doku hücreleri oda ısısında 45 dakika boyunca 4µM fura-2 AM flüoresan boyası ile boyandı (179). Hücre içi serbest Ca⁺² iyon düzeyi [Ca⁺²]_i değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile kaydedilip ve Grynkiewicz ve arkadaşlarının metoduna (1985) göre hesaplandı (131). AKG ve hipokampus hücreleri izole edildikten sonra hücre kültürüne alındıktan sonra Ca⁺² sinyali çalışmaları yapıldı. Gruplar arası farklılık, hücreler hem TRPM2 kanal blokörü anthralic acid (ACA) (180) hem de TRPV1 kanal blokörü kapsazepinle (CapZ) (0.1 mM) inkübe edildi. Sonrasında, TRPM2 kanal antagonisti hidrojen peroksit (1 mM) ve TRPV1 kanal antagonisti kapsaisin (0.01 mM) uyarım yapıldı.

3.5.5. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Üretimi Tayini

Hipokampus ve AKG sinir hücrelerinde Hücre içi Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretimi Biyofizik Anabilim mevcut tabak okuyucu (Pleate reader, infinite

pro200 marka, Avusturya) ile yapıldı. Rhodamine 123(Rh 123), DHR 123 hücreye kolayca nüfuz edebilen, florasana olmayan yüksüz bir moleküldür. 2'-DHR-123'ün RH123'e oksidasyonu vasıtasıyla H₂O₂ miktarı bu metotla tayin edildi. Bu oksidasyon sırasında yağların oksidasyonu ile oluşmuş hücre içerisinde serbest oksijen radikalleri miktarı ölçülebildi. DHR-123'ün RH123'e oksidasyonu çok yüksek düzeyde florasana yayıcı bir olaydır. Ne kadar çok florasana yayılırsa o kadar serbest oksijen radikali varlığını göstermektedir. RPMI-1640 besi ortamı ile tüm hücreler yıkandıktan sonra 10³ olacak şekilde steril kuyucuklara konuldu. Tüm gruplardaki hipokampal hücrelere hücre kültürü ortamında kontrol hariç 0.1 mM hidrojen peroksit ilave edildikten sonra, 0.02 mM DHR123 ile 25 dakika 37 °C inkübe edildi. Bu süre sonunda, DCFDCF nin yaydığı florasana 488 nm emisyon ve 543 nm eksitasyon (uyarım) dalga boylarında okundu. Aradaki fark, değer olarak belirlendi (181). Değerler, kontrole kıyasla misli artış (fold increase) olarak verildi.

3.5.6. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi

Her bir ependorf tüpü içerisinde 106 hücre olacak şekilde hücreler konuldu. Her bir ependorf tüpüne 15 mikrolitre MTT kimyasalı ilave edildi. MTT kimyasalı ilavesinden sonra bütün ependorflar 5-10 defa yavaşça çalkalanıp, 37 °C'de çalkalamalı su banyosunda 90 dakika boyunca yavaşça çalkalamaya bırakıldı. Çalkalama sonrasında bütün ependorflar 500 g de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Daha sonra her bir ependorfa 400'er mikrolitre DMSO ilave edildi. Pelet DMSO içerisinde resuspense edildi, sonra her bir küvete 250 mikrolitre bu örnekten konuldu. Spektrofotometrede 490 nm ve 650 nm dalga boylarında okunup bu iki dalga boyunda okunan değerler birbirinden çıkarıldı (Abs_{490 nm} – Abs_{650 nm}) (182).

3.5.7. Apoptozis ve Kaspaz Testleri

Hipokampal ve AKG hücrelerinin apoptozis testleri Biocolor, APOPercentage apoptozis kiti ile yapıldı. Sonuçlar Cary Eclipse spektrofotometrede analiz edildi. Kaspaz-3 ve -9 analizleri için kaspaz substratı kullanılarak plate reader de analizler yapıldı.

3.5.8. Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Tayini

Hücreler 0.001 mM JC-1 ile 37 °C de 15 dakika inkübe edildi (181). JC-1 boyası mitokondride depolarizasyon artışına paralel girişi artmaktadır. JC-1 inkübasyon sonrası kırmızıdan yeşile doğru forasan artışı mitokondriyal depolarizasyonu göstermekte ve bu durum plate reader tarafından değişik dalga boylarında hemen beşi sıra cihaz tarafında otomatik olarak belirlenebilmektedir. Yeşil dalga boyları eksitasyon 485 ve emisyon 535 dalga boylarında belirlendi. Kırmızı dalga boyu değişimleri ise 540 nM (Eksitasyon) ile 590 nM (Emisyon) de belirlenecektir. Emisyon oranları (590/535) değer olarak alındı. Tüm grupların hipokampal ve AKG hücreleri mitokondriyal zar depolarizasyon tayini yapıldı. Gruplar arası farklılık var ise, hücreler hem TRPM2 kanal blokörü ACA hem de TRPV1 kanal blokörü kapsazepinle inkübe edildi. Sonrasında, TRPM2 kanal antagonisti hidrojen peroksit (1 mM) ve kapsaisin (0.01 mM) uyarım yapıp hemen mitokondriyal depolarizasyon miktarları belirlendi.

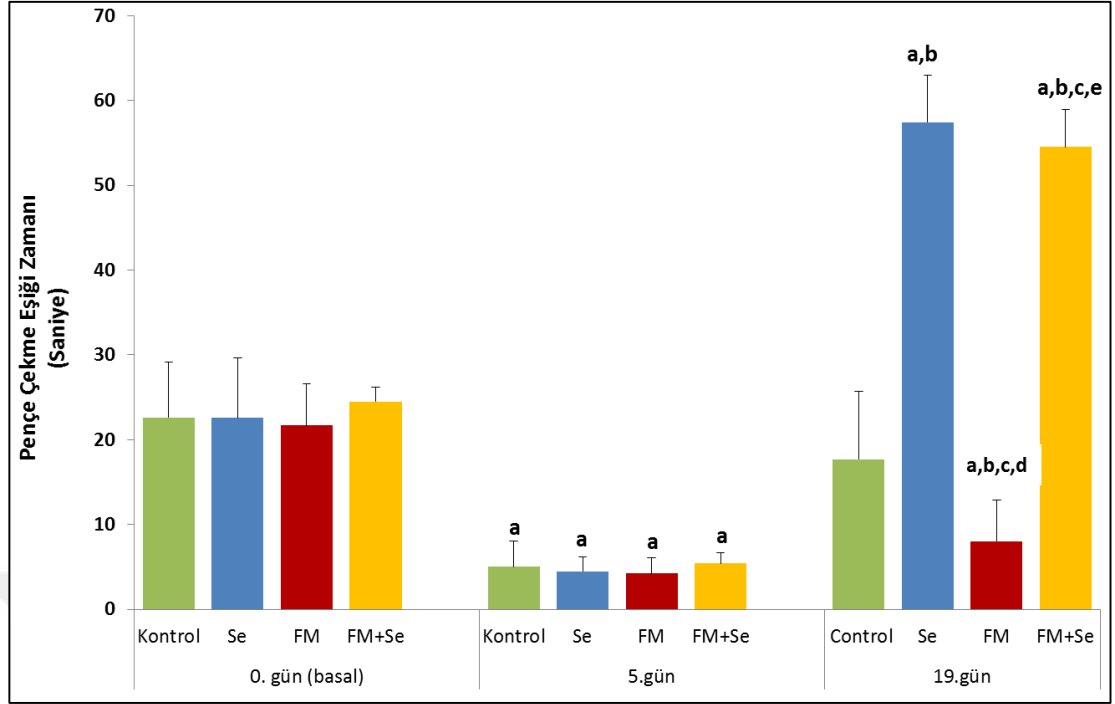
3.6. İstatistiksel Yöntemler

İstatistiksel değerlendirmeler, “SPSS 17.0 for Windows” istatistik paket programı kullanılarak yapılmıştır. Bağımsız farklı iki grubun karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile yapılmış olup, $p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Se Tedavisinin Hot Plate Testi ile Pençe Çekme Eşiği Üzerindeki Etkisi

Çalışmamızda FM modeli oluşturulan ratların asit salinin sol gastroknemius kasına ikinci kez enjeksiyonundan beş gün sonra bilateral mekanik geri çekme eşiğinde belirgin bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu durum analiz edilen tüm periyotlarda 19. güne kadar kademeli olarak azalmaya devam etmiştir. Grafik 1’de hiperaljezi değerlendirmeleri Hot Plate Testi gösterilmiştir. Asit enjekte edilen gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında 5. ve 19. günlerde mekanik aşırı duyarlılığı istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ($p<0,001$). Bununla birlikte yalnızca Se uygulanan grupta ise, enjekte elde edilmiş pençede güçlü bir anti-hipertaljik etki gözlemlenmiştir ($p<0,001$). FM modeli oluşturulmuş sıçanlara Se uygulanan grupta da benzer bir anti-hipertaljik etki gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra Se tedavisinin de tedavi öncesi döneme göre mekanik uyarılara hassasiyette belirgin artışa neden olduğu görülmektedir ($p<0,001$).



Grafik 1. Se Tedavisinin Hot Plate Testi ile Pençe Çekme Eşiği Üzerindeki Etkisi

^a $p \leq 0.001$ basal gruplara kıyasla.

^b $p \leq 0.001$ 5.güne kıyasla.

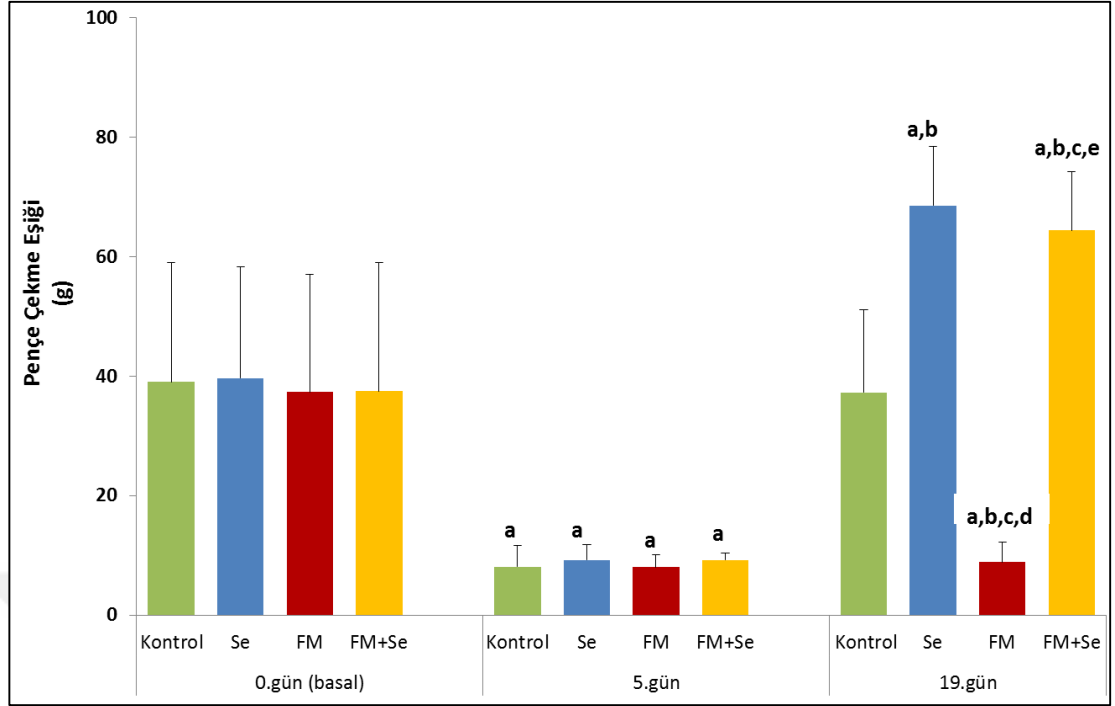
^c $p \leq 0.001$ 19.günde kontrol grubuna kıyasla.

^d $p \leq 0.001$ 19.günde Se grubuna kıyasla.

^e $p \leq 0.001$ 19.günde FM grubuna kıyasla

4.2. Se Tedavisinin Von Frey Testi ile Pençe Çekme Eşiği Üzerindeki Etkisi

Çalışmamızda FM modeli oluşturulan ratların asit salinin sol gastroknemius kasına ikinci kez enjeksiyonundan beş gün sonra bilateral mekanik geri çekme eşiğinde belirgin bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu durum analiz edilen tüm periyotlarda 19. güne kadar kademeli olarak azalmaya devam etmiştir. Grafik 1’de hiperaljezi değerlendirmeleri Von Frey Testi gösterilmiştir. Asit enjekte edilen gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında 5. ve 19. günlerde mekanik aşırı duyarlılığı istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ($p < 0,001$). Bununla birlikte yalnızca Se uygulanan grupta ise, enjekte elde edilmiş pençede güçlü bir anti-hipertaljik etki gözlemlenmiştir ($p < 0,001$). FM modeli oluşturulmuş sıçanlara Se uygulanan grupta da benzer bir anti-hipertaljik etki gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra Se tedavisinin de tedavi öncesi döneme göre mekanik uyarılara hassasiyette belirgin artışa neden olduğu görülmektedir ($p < 0,001$).



Grafik 2. Se Tedavisinin Von Frey Testi ile Pençe Çekme Eşiği Üzerindeki Etkisi

^a $p \leq 0.001$ basal gruplara kıyasla.

^b $p \leq 0.001$ 5.güne kıyasla.

^c $p \leq 0.001$ 19.günde kontrol grubuna kıyasla.

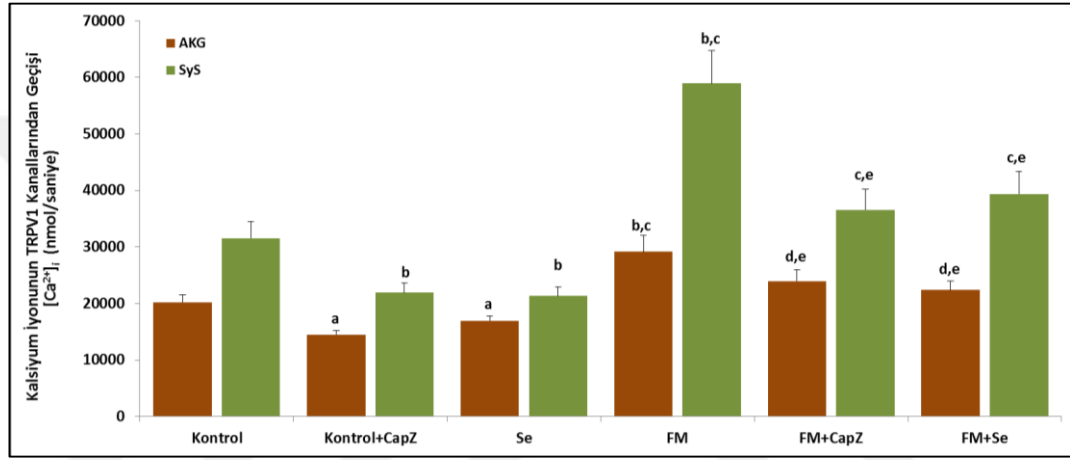
^d $p \leq 0.001$ 19.günde Se grubuna kıyasla.

^e $p \leq 0.001$ 19.günde FM grubuna kıyasla

4.3. Sıçanların Arka Kök Ganglion (AKG) ve Siyatik Sinirdeki (SyS) TRPV1 Kanallarından Kalsiyum İyon Geçişi

Çalışmamızda Kontrol grubu, Kontrol+CapZ grubu, Kontrol+Se grubu, FM grubu, FM+CapZ grubu ve FM+Se grubunun AKG ve SyS'deki TRPV1 kanallarından kalsiyum iyon geçişi üzerine etkisinin sonuçları Grafik 3'de gösterilmektedir. Kontrol+CapZ ve Kontrol+Se gruplarının AKG'deki TRPV1 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişinin Kontrol grubuna kıyasla azaldığı görülmektedir ($p < 0,05$). AKG'deki TRPV1 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişi FM grubunun Kontrol, Kontrol+CapZ ve Kontrol+Se gruplarına kıyasla istatistiksel olarak arttığı görülmüştür ($p < 0,001$ ve $p < 0,001$). Yine AKG'deki hem FM+CapZ grubunun hem de FM+Se grubunun Kontrol+CapZ ve Kontrol+Se gruplarına göre TRPV1 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişinin arttığı görülmektedir ($p < 0,05$). Ayrıca AKG'deki bu iki grubu FM grubu ile kıyasladığımızda TRPV1 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişinin azaldığı görülmektedir ($p < 0,001$).

Kontrol+CapZ ve Kontrol+Se gruplarının SyS'deki TRPV1 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı görülmektedir ($p<0,05$). SyS'deki TRPV1 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişi FM grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak arttığı görülmüştür ($p<0,001$). SyS'deki FM, FM+CapZ ve FM+Se gruplarının Kontrol+CapZ ve Kontrol+Se gruplarına göre TRPV1 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişinin arttığı görülmektedir ($p<0,05$). Ayrıca SyS'deki hem FM+CapZ grubunun hem de FM+Se grubunun FM grubuna göre TRPV1 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişinin arttığı görülmektedir ($p<0,001$).

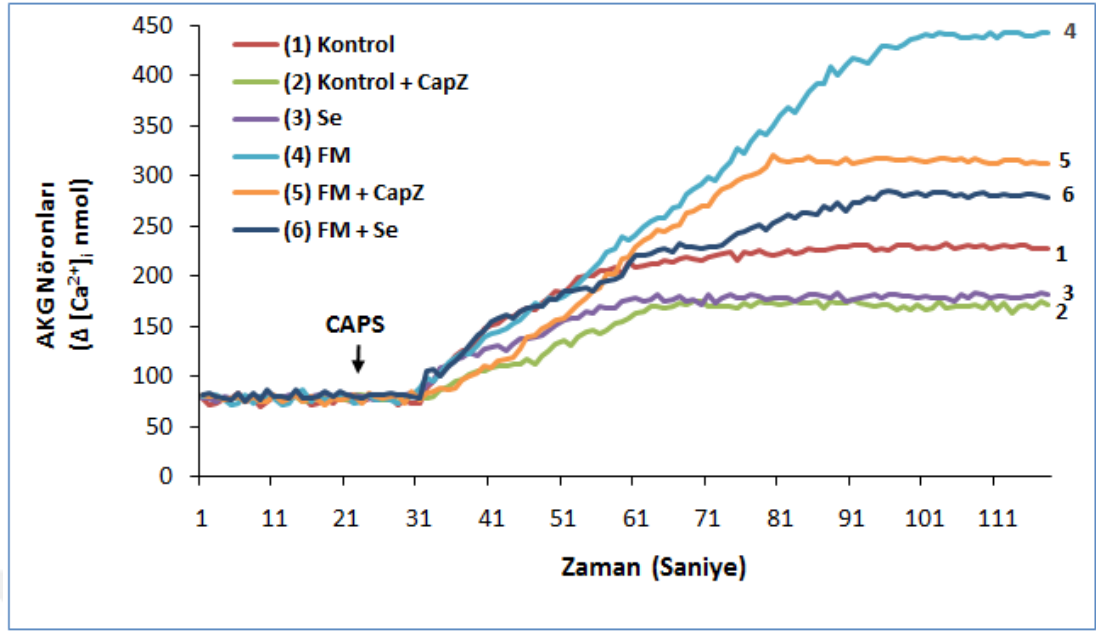


Grafik 3. Sıçanların AKG ve SyS'deki TRPV1 Kanallarından Kalsiyum İyon Geçişi

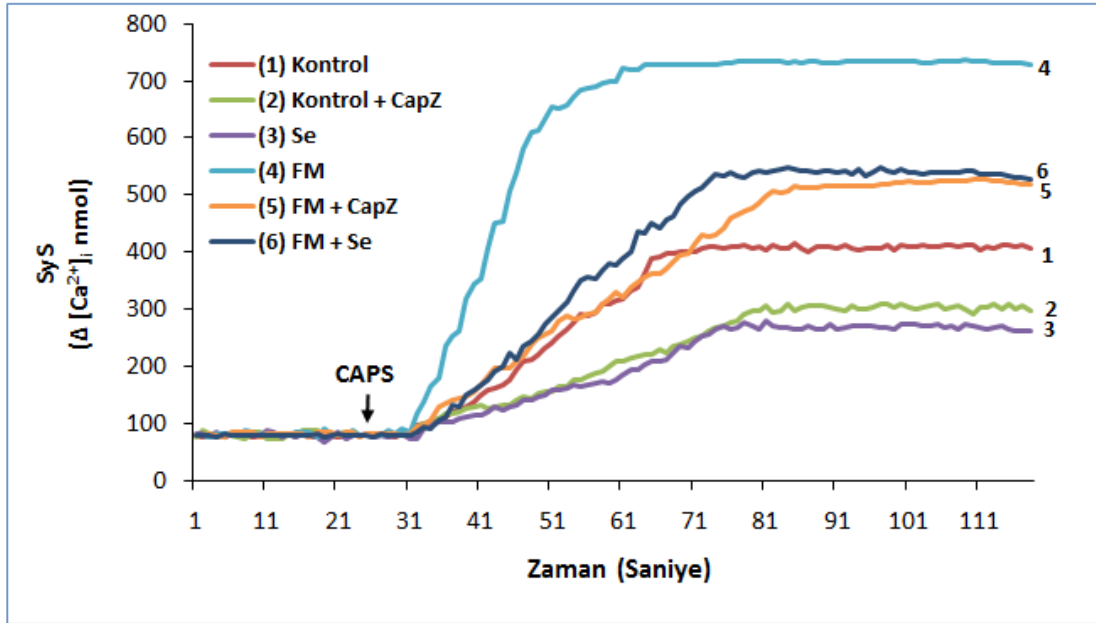
^a $p<0.05$ ve ^b $p<0.001$ Kontrol grubuna kıyasla

^c $p<0.001$ ve ^d $p<0.05$ Kontrol+CapZ and Kontrol+Se gruplarına kıyasla

^e $p<0.001$ FM grubuna kıyasla



Şekil 2. AKG nöronlarındaki kapsaisin (CAPS) stimülasyonu ile başlatılan hücre içi serbest Ca^{+2} salınımı üzerine Se etkilerinin zamanla değişimi

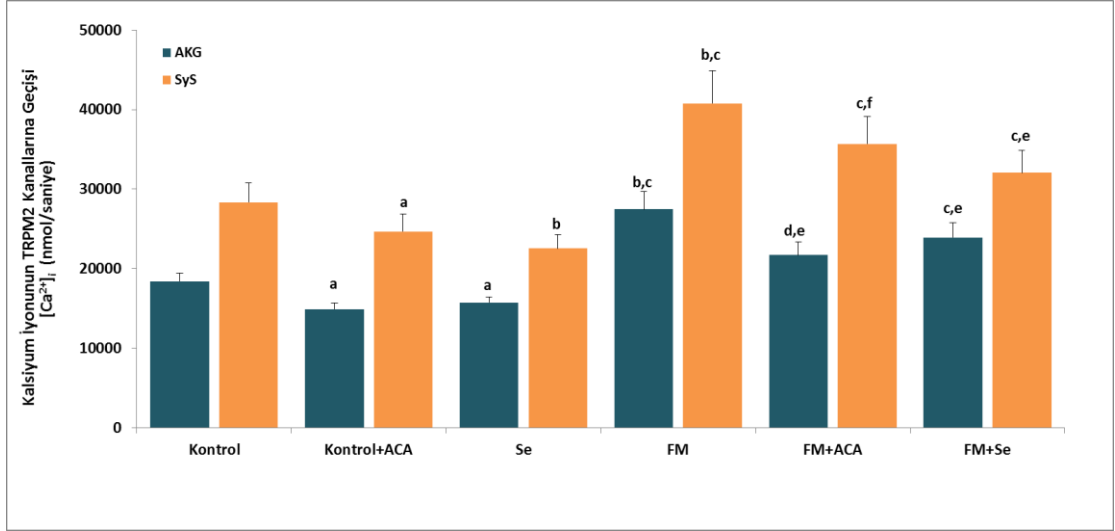


Şekil 3. SyS'deki kapsaisin (CAPS) stimülasyonu ile başlatılan hücre içi serbest Ca^{+2} salınımı üzerine Se etkilerinin zamanla değişimi

4.4. Sıçanların AKG ve SyS'deki TRPM2 Kanallarından Kalsiyum İyon Geçişi

Çalışmamızda Kontrol grubu, Kontrol+ACA grubu, Kontrol+Se grubu, FM grubu, FM+CapZ grubu ve FM+Se grubunun AKG ve SyS'deki TRPM2 kanallarından kalsiyum iyon geçişi üzerine etkisinin sonuçları Grafik 4'de gösterilmektedir. Kontrol+ACA ve Kontrol+Se gruplarının AKG'deki TRPM2 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişinin Kontrol grubuna kıyasla azaldığı görülmektedir ($p<0,05$). AKG'deki TRPM2 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişi FM grubunun Kontrol, Kontrol+ACA ve Kontrol+Se gruplarına kıyasla istatistiksel olarak arttığı görülmüştür ($p<0,001$ ve $p<0,001$). Ayrıca FM+Se grubunun Kontrol+ACA ve Kontrol+Se gruplarına kıyasla istatistiksel olarak arttığı görülmüştür ($p<0,001$). FM+ACA grubunun da Kontrol+ACA ve Kontrol+Se gruplarına kıyasla istatistiksel olarak arttığı görülmüştür ($p<0,05$). Yine AKG'deki hem FM+ACA grubunun hem de FM+Se grubunun FM grubuna göre TRPM2 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişinin azaldığı görülmektedir ($p<0,001$).

Kontrol+ACA ve Kontrol+Se gruplarının SyS'deki TRPM2 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı görülmektedir ($p<0,05$ ve $p<0,001$). SyS'deki TRPM2 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişi FM grubunun Kontrol, Kontrol+ACA ve Kontrol+Se gruplarına kıyasla istatistiksel olarak arttığı görülmüştür ($p<0,001$ ve $p<0,001$). Yine FM+ACA ve FM+Se grubunun Kontrol+ACA ve Kontrol+Se gruplarına kıyasla istatistiksel olarak arttığı görülmüştür ($p<0,001$). Ayrıca Yine SyS'deki hem FM+ACA grubunun hem de FM+Se grubunun FM grubuna göre TRPM2 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişinin azaldığı görülmektedir ($p<0,001$ ve $p<0,001$).

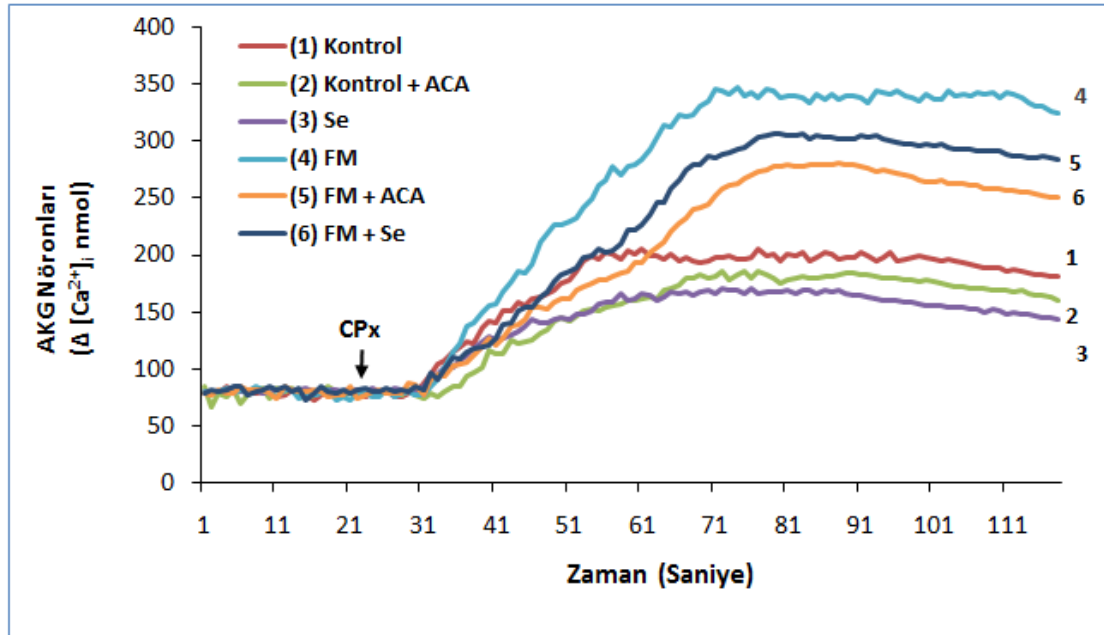


Grafik 4. Sıçanların AKG ve SyS’deki TRPV1 Kanallarından Kalsiyum İyon Geçışı

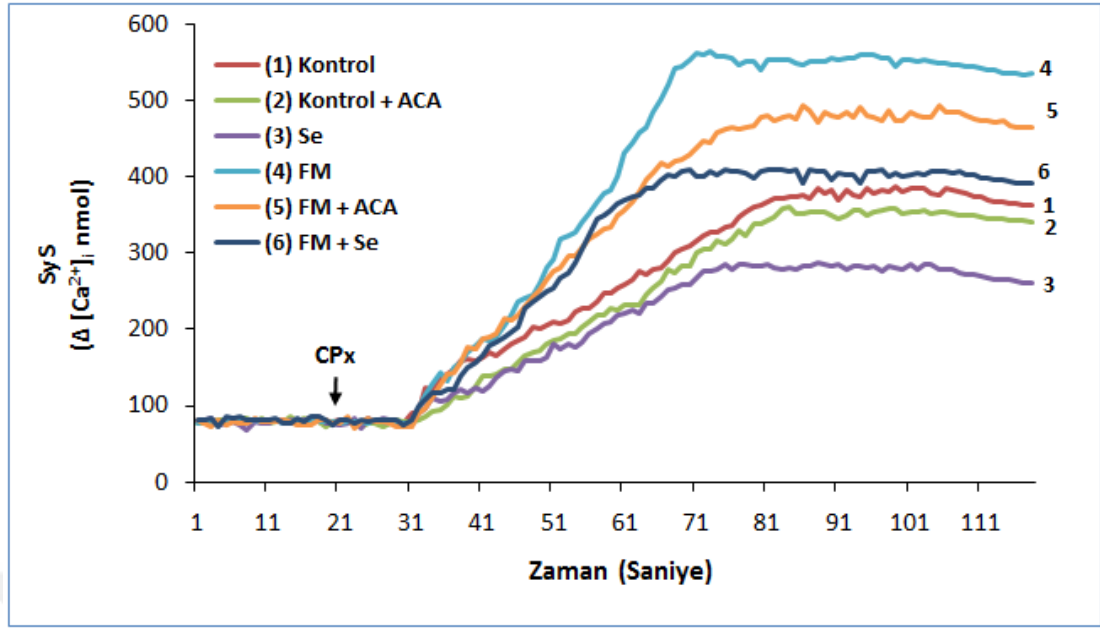
^ap<0.05 ve ^bp<0.001 Kontrol grubuna kıyasla

^cp<0.001 ve ^dp<0.05 Kontrol+ACA ve Se gruplarına kıyasla

^ep<0.001 ve ^fp<0.05 FM grubuna kıyasla



Şekil 4. AKG nöronlarındaki kümen hidroperoksit (CPx) stimülasyonu ile başlatılan hücre içi serbest Ca^{+2} salınımı üzerine Se etkilerinin zamanla değişimi



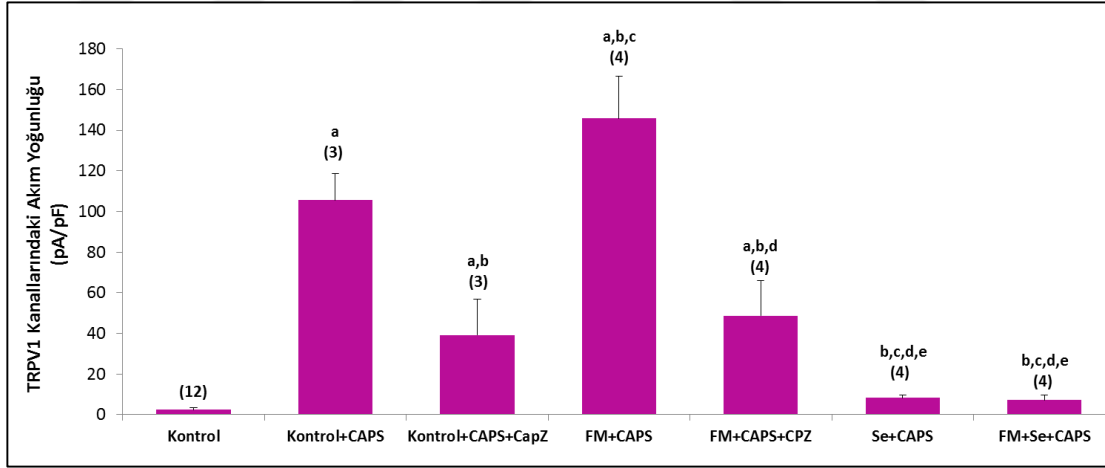
Şekil 5. SyS'deki kümen hidroperoksit (CPx) stimülasyonu ile başlatılan hücre içi serbest Ca^{+2} salınımı üzerine Se etkilerinin zamanla değişimi

4.5. FM Oluşturulan Sıçanların TRPV1 ve TRPM2 Kanallarındaki Akım Yoğunluğu

Çalışmamızda Kontrol grubu, Kontrol+CAPS grubu, Kontrol+CAPS+CapZ grubu, FM+CAPS grubu, FM+CAPS+CapZ grubu, Se+CAPS grubu ve FM+Se+CAPS grubunun TRPV1 kanallarındaki akım yoğunluğu sonuçları Grafik 5a'da gösterilmiştir. Grafiğe göre Kontrol+CAPS, Kontrol+CAPS+CapZ, FM+CAPS ve FM+CAPS+CapZ grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında akım yoğunluklarının arttığı görülmektedir ($p < 0.001$). Yine Kontrol+CAPS+CapZ, FM+CAPS, FM+CAPS+CapZ, Se+CAPS ve FM+Se+CAPS gruplarında Kontrol+CAPS grubu ile kıyaslandığında TRPV1 kanallarındaki akım yoğunluğunun FM+CAPS grubunda istatistiksel olarak artmış iken diğer gruplarda azaldığı görülmektedir ($p < 0.001$). FM+CAPS, Se+CAPS ve FM+Se+CAPS grupları da Kontrol+CAPS+CapZ grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak sadece FM+CAPS grubunda akım yoğunluğunun arttığı izlenmektedir ($p < 0.001$). Ayrıca FM+CAPS+CapZ, Se+CAPS ve FM+Se+CAPS grupları FM+CAPS grubuna kıyasla akım yoğunluğunun azaldığını görmekteyiz ($p < 0.001$). Son olarak da Se+CAPS ve FM+Se+CAPS grupları

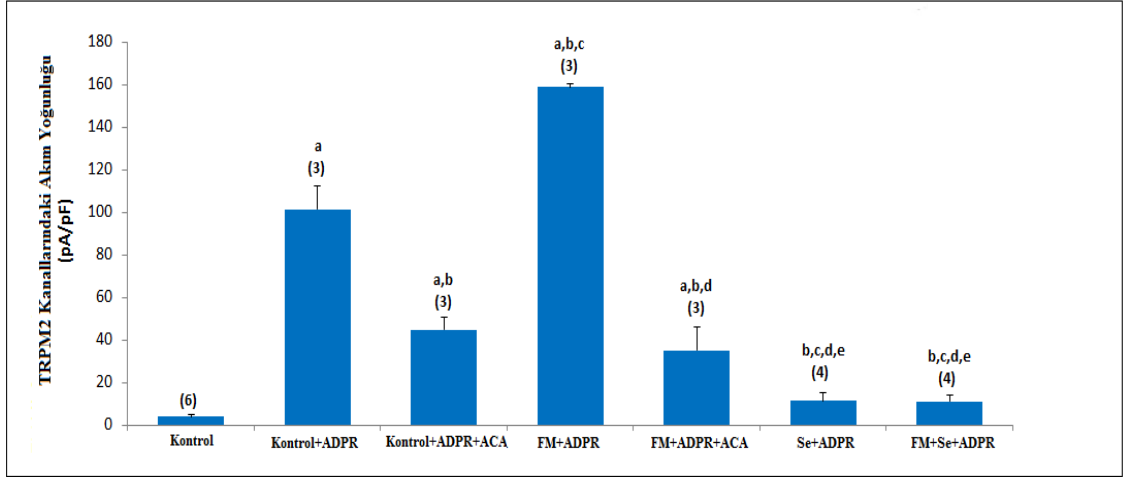
FM+CAPS+CapZ grubu ile kıyaslandığında yine akım yoğunluğunun azaldığını görmekteyiz ($p<0.001$).

TRPM2 kanallarındaki akım yoğunluğu sonuçları Grafik 5b’de gösterilmiştir. Grafiğe göre Kontrol+ADPR, Kontrol+ADPR+ACA, FM+ADPR ve FM+ADPR+ACA grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında akım yoğunluklarının arttığı görülmektedir ($p<0.001$). Yine Kontrol+ADPR+ACA, FM+ADPR, FM+ADPR+ACA, Se+ADPR ve FM+Se+ADPR grupları da Kontrol+ADPR grubu ile kıyaslandığında TRPM2 kanallarındaki akım yoğunluğunun FM+ADPR grubunda istatistiksel olarak artmış iken diğer gruplarda azaldığı görülmektedir ($p<0.001$). FM+ADPR, Se+ADPR ve FM+Se+ADPR grupları da Kontrol+ADPR+ACA grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak sadece FM+ADPR grubunda akım yoğunluğunun arttığı izlenmektedir ($p<0.001$). Ayrıca FM+ADPR+ACA, Se+ADPR ve FM+Se+ADPR grupları FM+ADPR grubuna kıyasla akım yoğunluğunun azaldığını görmekteyiz ($p<0.001$). Son olarak da Se+ADPR ve FM+Se+ADPR grupları FM+ADPR+ACA grubu ile kıyaslandığında yine akım yoğunluğunun azaldığını görmekteyiz ($p<0.001$).



Grafik 5a. FM Oluşturulan Sıçanların TRPV1 Kanallarındaki Akım Yoğunluğu

- ^a $p<0.001$ Kontrol grubuna kıyasla
- ^b $p<0.001$ Kontrol+CAPS grubuna kıyasla
- ^c $p<0.001$ Kontrol+CAPS+CapZ grubuna kıyasla
- ^d $p<0.001$ FM+CAPS grubuna kıyasla
- ^e $p<0.001$ FM+CAPS+CapZ grubuna kıyasla



Grafik 5b. FM Oluşturulan Sıçanların TRPM2 Kanallarındaki Akım Yoğunluğu

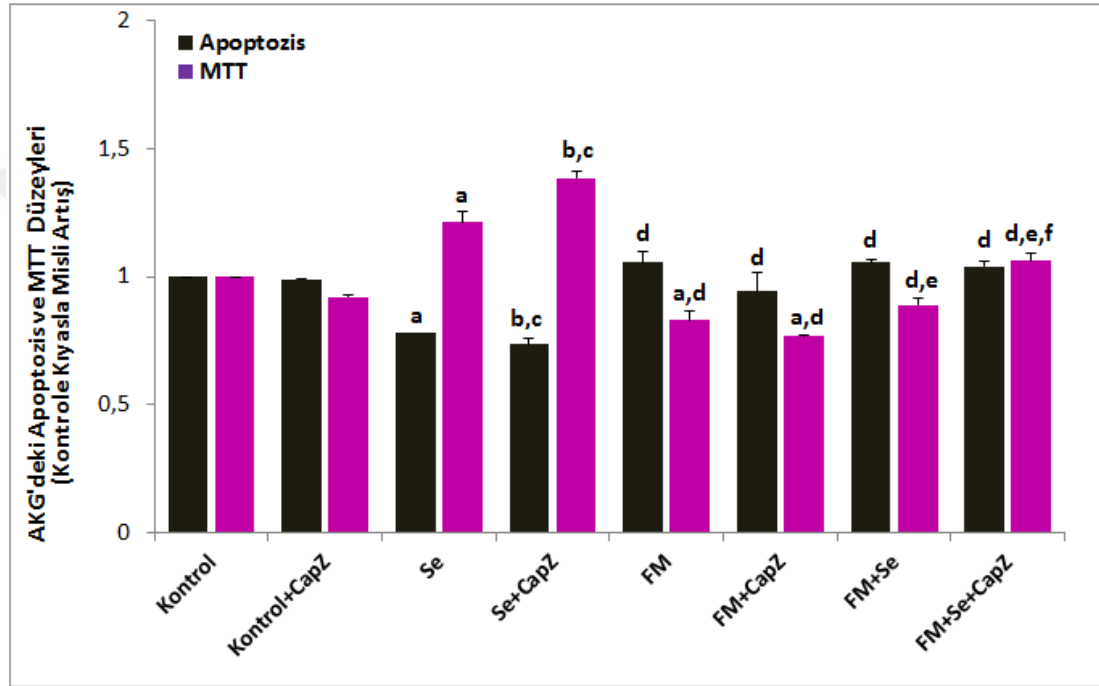
- ^ap<0.001 Kontrol grubuna kıyasla
^bp<0.001 Kontrol+ADPR grubuna kıyasla
^cp<0.001 Kontrol+ADPR+ACA grubuna kıyasla
^dp<0.001 FM+ADPR grubuna kıyasla
^ep<0.001 FM+ADPR+ACA grubuna kıyasla

4.6. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPV1 Kanalı Aracılığıyla Apoptozis ve Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Çalışmamızda Kontrol, Kontrol+CapZ, Se, Se+CapZ, FM, FM+CapZ, FM+Se ve FM+Se+CapZ gruplarının FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPV1 Kanalı Aracılığıyla Apoptozis ve Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi Grafik 6'de tanımlanmıştır. Se grubunun TRPV1 kanalları aracılığıyla apoptozis üzerine etkisi hem Kontrol hem de Kontrol+CapZ gruplarına kıyasla azaldığı izlenmektedir ($p<0.05$). Se+CapZ grubunda apoptozis üzerine etkisi Kontrol, Kontrol+CapZ ve de Se gruplarına kıyasla azaldığı görülmektedir ($p<0.001$ ve $p<0.05$). Ayrıca FM, FM+CapZ, FM+Se ve FM+Se+CapZ gruplarının da TRPV1 kanalları aracılığıyla apoptozis üzerine etkisinin Se ve Se+CapZ gruplarına kıyasla arttığı gözlemlenmiştir ($p<0.001$).

Se grubunun TRPV1 kanalları aracılığıyla hücre canlılığı üzerine etkisi hem Kontrol hem de Kontrol+CapZ grubuna kıyasla arttığı gözlemlenmiştir ($p<0.001$). Se+CapZ grubunda hücre canlılığı üzerine etkisi Kontrol, Kontrol+CapZ ve de Se gruplarına kıyasla arttığı görülmektedir ($p<0.001$ ve $p<0.05$). Hem FM hem de FM+CapZ gruplarının da hücre canlılığı üzerine etkisi Kontrol ve Kontrol+CapZ

grubuna kıyasla azalmıştır ($p<0.001$). Ayrıca FM, FM+CapZ, FM+Se ve FM+Se+CapZ gruplarının TRPV1 kanalları aracılığıyla hücre canlılığı üzerine etkisi hem Se hem de Se+CapZ gruplarına kıyasla belirgin olarak azalmıştır ($p<0.001$). Yine FM+se ve FM+Se+CapZ gruplarının hücre canlılığı üzerine etkisi FM ve FM+CapZ gruplarına kıyasla arttığı yine grafikten gözlemlenmektedir ($p<0.05$). Son olarak FM+Se+CapZ grubunun hücre canlılığı üzerine etkisi FM+Se grubuna kıyasla arttığı istatistiksel olarak izlenmektedir ($p<0.05$).



Grafik 6. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPV1 Kanalı Aracılığıyla Apoptozis ve Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

^a $p<0.05$ and ^b $p<0.001$ Kontrol ve Kontrol+CapZ gruplarına kıyasla.

^c $p<0.05$ Se grubuna kıyasla.

^d $p<0.001$ Se ve Se+CapZ gruplarına kıyasla.

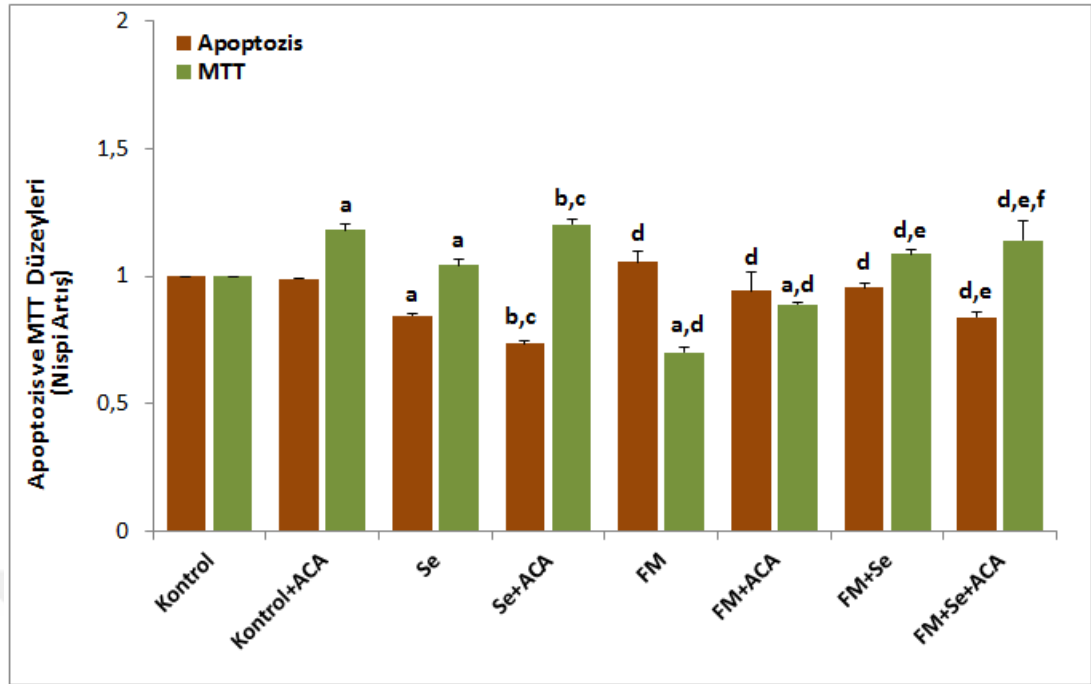
^e $p<0.05$ FM ve FM+CapZ gruplarına kıyasla.

^f $p<0.05$ FM+Se grubuna kıyasla.

4.7. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPM2 Kanalı Aracılığıyla Apoptozis ve Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Çalışmamızda Kontrol, Kontrol+ACA, Se, Se+ACA, FM, FM+ACA, FM+Se ve FM+Se+ACA gruplarının FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPM2 Kanalı Aracılığıyla Apoptozis ve Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi Grafik 7'de tanımlanmıştır. Se grubunun TRPM2 kanalları aracılığıyla apoptozis üzerine etkisi hem Kontrol hem de Kontrol+CapZ gruplarına kıyasla azaldığı izlenmektedir ($p<0.05$). Se+ACA grubunda apoptozis üzerine etkisi Kontrol, Kontrol+ACA ve de Se gruplarına kıyasla azaldığı görülmektedir ($p<0.001$ ve $p<0.05$). Ayrıca FM, FM+ACA, FM+Se ve FM+Se+ACA gruplarının da TRPM2 kanalları aracılığıyla apoptozis üzerine etkisinin Se ve Se+ACA gruplarına kıyasla arttığı gözlemlenmiştir ($p<0.001$). Son olarak FM+Se+ACA grubunun TRPM2 kanalı aracılığıyla apoptozis üzerine etkisi hem FM hem de FM+ACA gruplarına kıyasla azaldığı izlenmektedir ($p<0.05$).

Kontrol+ACA ve Se gruplarının TRPM2 kanalları aracılığıyla hücre canlılığı üzerine etkisini Kontrol grubuna kıyasla arttığını görmekteyiz ($p<0.05$). FM ve FM+ACA gruplarının ise tam tersi olarak Kontrol grubuna kıyasla azaldığını görmekteyiz ($p<0.05$). Se+ACA grubunda hücre canlılığı üzerine etkisi Kontrol, Kontrol+ACA ve de Se gruplarına kıyasla arttığı görülmektedir ($p<0.001$ ve $p<0.05$). Ayrıca FM, FM+ACA, FM+Se ve FM+Se+ACA gruplarının da TRPM2 kanalları aracılığıyla hücre canlılığı üzerine etkisinin Se ve Se+ACA gruplarına kıyasla azaldığı gözlemlenmiştir ($p<0.001$). Hem FM+Se hem de FM+Se+ACA gruplarının kanal aracılığıyla olan hücre canlılığının FM ve FM+ACA gruplarına kıyasla arttığı görülmektedir ($p<0.05$). Son olarak da FM+Se+ACA grubunun TRPM2 kanalı aracılığıyla hücre canlılığı üzerine etkisini FM+Se grubuyla kıyasladığımızda artışın olduğunu görmekteyiz ($p<0.05$).



Grafik 7. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPM2 Kanalı Aracılığıyla Apoptozis ve Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

^ap<0.05 ve ^bp<0.001 Kontrol ve Kontrol+ACA gruplarına kıyasla

^cp<0.05 Se grubuna kıyasla

^dp<0.001 Se ve Se+ACA gruplarına kıyasla

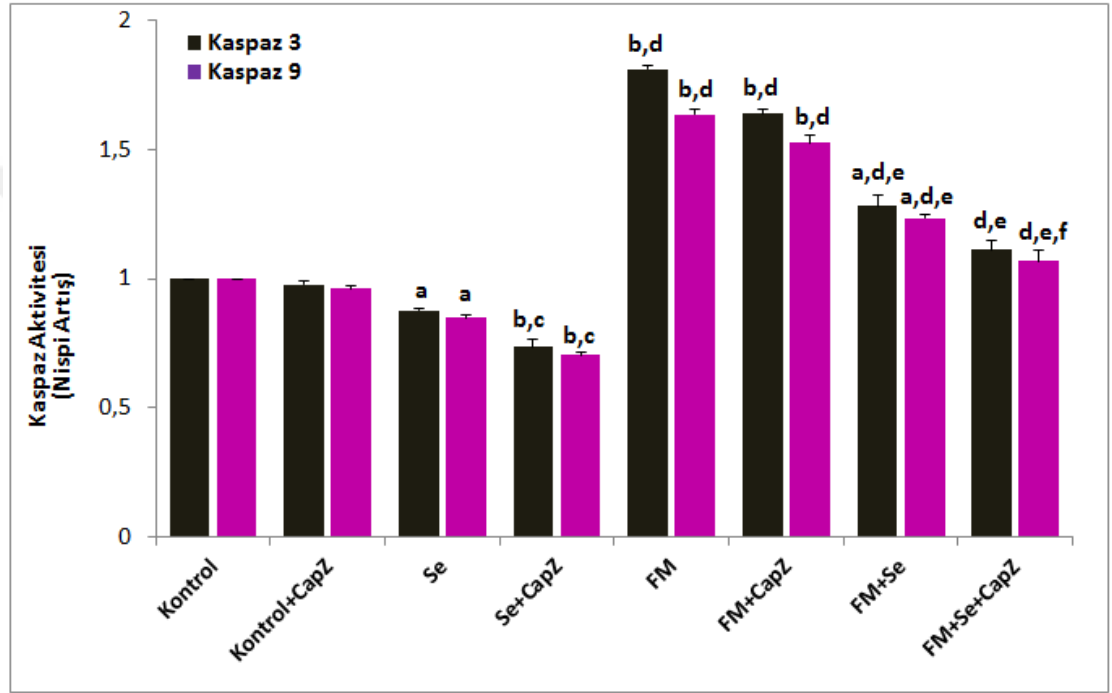
^ep<0.05 FM ve FM+ACA gruplarına kıyasla

^fp<0.05 FM+Se grubuna kıyasla

4.8. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPV1 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktiviteleri

Çalışmamızda Kontrol, Kontrol+CapZ, Se, Se+CapZ, FM, FM+CapZ, FM+Se ve FM+Se+CapZ gruplarının FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPV1 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktiviteleri Grafik 8'da tanımlanmıştır. Se grubunun TRPV1 kanalları aracılığıyla Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 aktiviteleri hem Kontrol hem de Kontrol+CapZ gruplarına kıyasla azaldığı izlenmektedir ($p<0.05$). Se+CapZ grubunun da hem Kontrol ve Kontrol+CapZ gruplarına kıyasla hem de Se grubuna kıyasla Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 aktiviteleri azaldığı izlenmektedir ($p<0.001$ ve $p<0.05$). FM ve FM+CapZ gruplarının ise Kaspaz 3 ve 9 aktiviteleri Kontrol ve Kontrol+CapZ gruplarına kıyasla artmış olup, bunun yanında Se ve Se+CapZ gruplarına kıyasla da artmış olduğu grafikten izlenmektedir

($p<0.001$ ve $p<0.001$). FM+Se grubunun ise Kaspaz 3 ve 9 aktivitelerinin Kontrol ve Kontrol+CapZ gruplarına ayrıca Se ve Se+CapZ gruplarına kıyasla arttığı, FM ve FM+CapZ gruplarına kıyasla da azaldığı görülmektedir ($p<0.05$ ve $p<0.001$ ve $p<0.001$). FM+Se+CapZ grubunun Kaspaz aktivitelerinin de Se ve Se+CapZ gruplarına ve ayrıca FM ve FM+CapZ gruplarına kıyasla azaldığı görülmektedir ($p<0.001$ ve $p<0.001$). Son olarak ise FM+Se+CapZ grubunun Kaspaz 9 aktivitesinin FM+Se grubuyla kıyasladığımızda azaldığını görmekteyiz ($p<0.05$).



Grafik 8. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPV1 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktiviteleri

^a $p<0.05$ ve ^b $p<0.001$ Kontrol ve Kontrol+CapZ gruplarına kıyasla

^c $p<0.05$ Se grubuna kıyasla

^d $p<0.001$ Se ve Se+CapZ gruplarına kıyasla

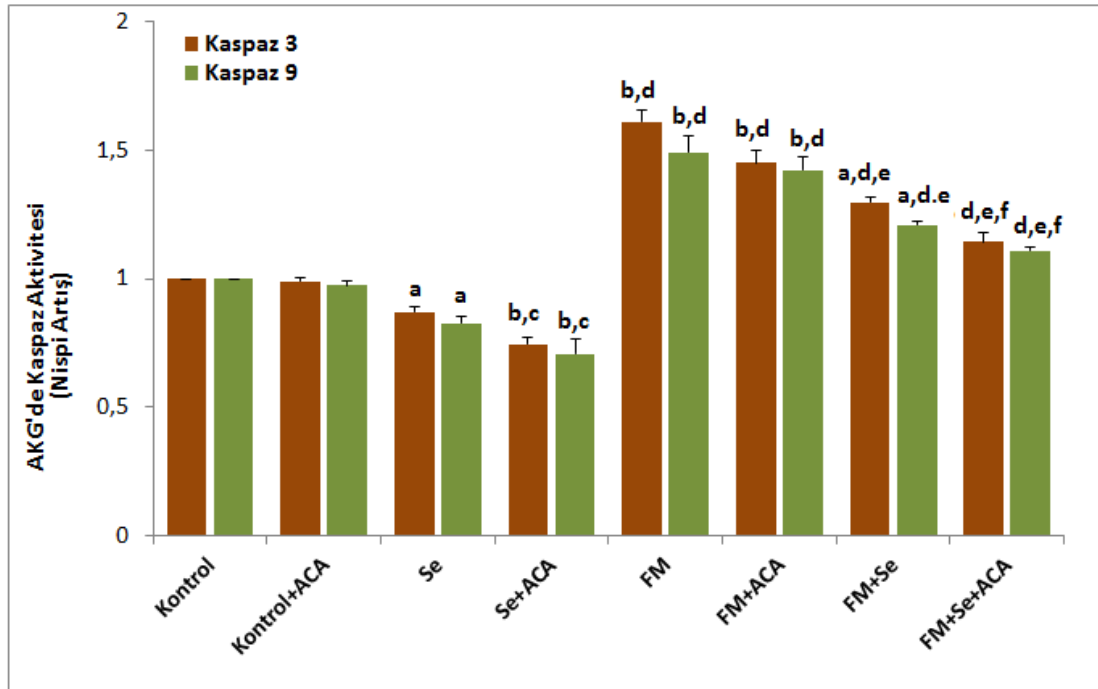
^e $p<0.001$ FM ve FM+CapZ gruplarına kıyasla

^f $p<0.05$ FM+Se grubuna kıyasla

4.9. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPM2 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktiviteleri

Çalışmamızda Kontrol, Kontrol+ACA, Se, Se+ACA, FM, FM+ACA, FM+Se ve FM+Se+ACA gruplarının FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPM2 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktiviteleri Grafik 9'da

tanımlanmıştır. Se grubunun TRPM2 kanalları aracılığıyla Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 aktiviteleri hem Kontrol hem de Kontrol+ACA gruplarına kıyasla azaldığı izlenmektedir ($p<0.05$). Se+ACA grubunun da hem Kontrol ve Kontrol+ACA gruplarına kıyasla hem de Se grubuna kıyasla Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 aktiviteleri azaldığı izlenmektedir ($p<0.001$ ve $p<0.05$). FM ve FM+ACA gruplarının ise Kaspaz 3 ve 9 aktiviteleri Kontrol ve Kontrol+ACA gruplarına kıyasla artmış olup, bunun yanında Se ve Se+ACA gruplarına kıyasla da artmış olduğu grafikten izlenmektedir ($p<0.001$ ve $p<0.001$). FM+Se grubunun ise Kaspaz 3 ve 9 aktivitelerinin Kontrol ve Kontrol+ACA gruplarına ayrıca Se ve Se+ACA gruplarına kıyasla arttığı, FM ve FM+ACA gruplarına kıyasla da azaldığı görülmektedir ($p<0.05$ ve $p<0.001$ ve $p<0.001$). FM+Se+ACA grubunun Kaspaz aktivitelerinin de Se ve Se+ACA gruplarına, FM ve FM+ACA gruplarına ve ayrıca FM+Se grubuna kıyasla azaldığı görülmektedir ($p<0.001$ ve $p<0.001$ ve $p<0.05$).



Grafik 9. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPM2 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktiviteleri

^a $p<0.05$ ve ^b $p<0.001$ Kontrol ve Kontrol+ACA gruplarına kıyasla

^c $p<0.05$ Se grubuna kıyasla

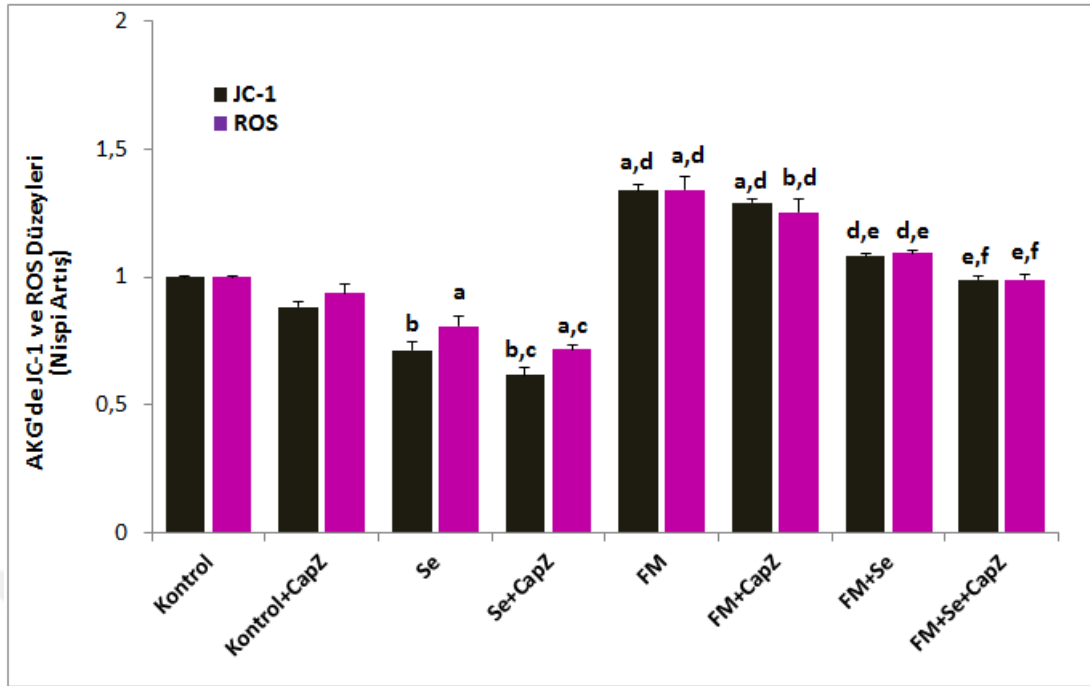
^d $p<0.001$ Se ve Se+ACA gruplarına kıyasla

^e $p<0.001$ FM ve FM+ACA gruplarına kıyasla

^f $p<0.05$ FM+Se grubuna kıyasla

4.10. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPV1 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi Üzerindeki Etkisi

Çalışmamızda Kontrol, Kontrol+CapZ, Se, Se+CapZ, FM, FM+CapZ, FM+Se ve FM+Se+CapZ gruplarının FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPV1 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi Üzerindeki Etkisi Grafik 10'da tanımlanmıştır. Se grubunun TRPV1 kanalı aracılığıyla Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi hem Kontrol hem de Kontrol+CapZ gruplarına kıyasla azaldığı izlenmektedir ($p<0.05$ ve $p<0.001$). Se+CapZ grubunun da hem Kontrol ve Kontrol+CapZ gruplarına kıyasla hem de Se grubuna kıyasla Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretiminin azaldığı izlenmektedir ($p<0.05$ ve $p<0.001$ ve $p<0.05$). FM ve FM+CapZ gruplarının Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi ise Kontrol ve Kontrol+CapZ gruplarına kıyasla artmış olup, bunun yanında Se ve Se+CapZ gruplarına kıyasla da artmış olduğu grafikten izlenmektedir ($p<0.05$ ve $p<0.001$ ve $p<0.001$). FM+Se grubunun ise Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi Se ve Se+CapZ gruplarına kıyasla arttığı, FM ve FM+CapZ gruplarına kıyasla da azaldığı görülmektedir ($p<0.001$ ve $p<0.001$). FM+Se+CapZ grubunun Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi FM ve FM+CapZ gruplarına ve ayrıca FM+Se grubuna kıyasla azaldığı görülmektedir ($p<0.001$ ve $p<0.05$).



Grafik 10. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPV1 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi Üzerindeki Etkisi

^ap<0.05 ve ^bp<0.001 Kontrol ve Kontrol+CapZ gruplarına kıyasla

^cp<0.05 Se grubuna kıyasla

^dp<0.001 Se ve Se+CapZ gruplarına kıyasla

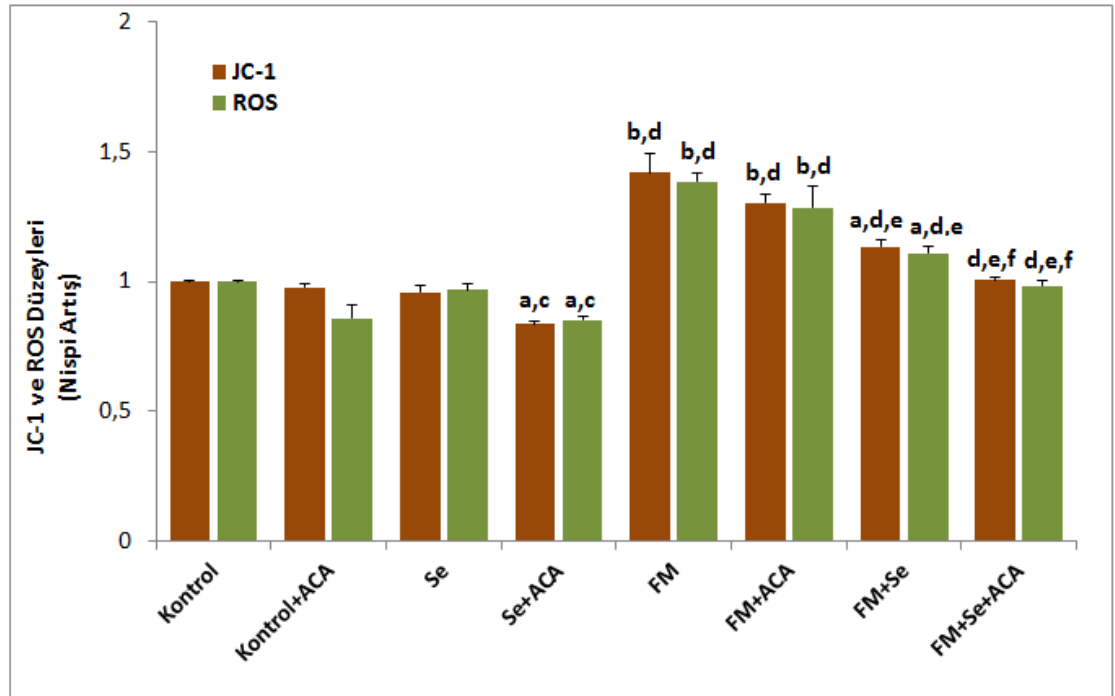
^ep<0.001 FM ve FM+CapZ gruplarına kıyasla

^fp<0.05 FM+Se grubuna kıyasla

4.11. FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPM2 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi Üzerindeki Etkisi

Çalışmamızda Kontrol, Kontrol+ACA, Se, Se+ACA, FM, FM+ACA, FM+Se ve FM+Se+ACA gruplarının FM Oluşturulan Sıçanların AKG'deki TRPM2 Kanalı

Aracılığıyla Selenyumun Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi Üzerindeki Etkisi Grafik 11’da tanımlanmıştır. Se+ACA grubunun da hem Kontrol ve Kontrol+ACA gruplarına kıyasla hem de Se grubuna kıyasla Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretiminin azaldığı izlenmektedir ($p<0.05$ ve $p<0.05$). FM ve FM+ACA gruplarının Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi ise Kontrol ve Kontrol+ACA gruplarına kıyasla artmış olup, bunun yanında Se ve Se+ACA gruplarına kıyasla da artmış olduğu grafikten izlenmektedir ($p<0.001$ ve $p<0.001$). FM+Se grubunun ise Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi Kontrol ve Kontrol+ACA gruplarına ayrıca Se ve Se+ACA gruplarına kıyasla arttığı, FM ve FM+ACA gruplarına kıyasla da azaldığı görülmektedir ($p<0.05$ ve $p<0.001$ ve $p<0.001$). FM+Se+ACA grubunun Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi Se ve Se+ACA gruplarına, FM ve FM+ACA gruplarına ve ayrıca FM+Se grubuna kıyasla azaldığı görülmektedir ($p<0.001$ ve $p<0.001$ ve $p<0.05$).



Grafik 11. FM Oluşturulan Sıçanların AKG’deki TRPM2 Kanalı Aracılığıyla Selenyumun Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu ve Hücre İçi ROS Üretimi Üzerindeki Etkisi

^a $p<0.05$ ve ^b $p<0.001$ Kontrol ve Kontrol+ACA gruplarına kıyasla

^c $p<0.05$ Se grubuna kıyasla

^dp<0.001 Se ve Se+ACA gruplarına kıyasla
^ep<0.001 FM ve FM+ACA gruplarına kıyasla
^fp<0.05 FM+Se grubuna kıyasla

4.12. FM Modeli Sıçanlarda Selenyumun (Se) İndirgenmiş glutatyon (GSH), Lipid Peroksidasyonu (MDA), Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px), Retinol, α -Tokoferol ve β -Karoten Değerleri Üzerine Etkisi

Çalışmamızda Kontrol grubu, Se, FM grubu ve FM+Se grubundaki sıçanların İndirgenmiş Glutatyon (GSH), Lipid Peroksidasyon (MDA), Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) ve antioksidan vitaminler olan Retinol, α -Tokoferol ve β -Karoten değerleri üzerine etkisi Tablo 5'te gösterilmektedir.

FM grubunda AKG, beyin, kas ve SyS'deki GSH seviyesi, GSH-Px aktivitesi ve beyin, kas, plazmadaki a-tokoferol konsantrasyonu önemli ölçüde azaldı ($p \leq 0.05$ ve $p \leq 0.001$). Bununla birlikte, MDA seviyeleri de belirgin olarak artmıştır ($p \leq 0.05$ ve $p \leq 0.001$). Öte yandan Se tedavisinden sonra FM grubunda GSH-Px aktivitesi, GSH düzeyi (DRG, beyin, kas ve SyS'de) ve a-tokoferol konsantrasyonu (beyin, kas ve plazmandaki) arttı ($p \leq 0.05$ ve $p \leq 0.001$). Dört grupta da retinol ve b-karoten konsantrasyonunda bir değişiklik izlenmedi.

Tablo 5. FM Modeli Sıçanlarda Selenyumun (Se) İndirgenmiş glutatyon (GSH), Lipid Peroksidasyonu (MDA), Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px), Retinol, α -Tokoferol ve β -Karoten Değerleri Üzerine Etkisi (ortalama $\pm$ SD).

	Değerler	Kontrol (n=8)	Selenyum (n=8)	FM (n=10)	FM+Se (n=10)
GSH ($\mu\text{mol/g}$ protein)	AKG	11.80 $\pm$ 0.70	12.20 $\pm$ 1.16	10.80 $\pm$ 0.71 ^{a,d}	11.70 $\pm$ 1.04 ^f
	Beyin	16.80 $\pm$ 0.86	18.40 $\pm$ 0.79 ^b	15.60 $\pm$ 0.36 ^{b,e}	17.00 $\pm$ 0.61 ^{d,g}
	Eritrosit	15.70 $\pm$ 0.79	15.50 $\pm$ 0.64	15.40 $\pm$ 0.48	15.50 $\pm$ 0.52
	Kas	13.00 $\pm$ 0.70	15.30 $\pm$ 0.97 ^c	12.00 $\pm$ 0.37 ^{c,e}	13.30 $\pm$ 0.52 ^{e,f}
	SyS	13.40 $\pm$ 1.63	14.20 $\pm$ 0.75 ^a	12.20 $\pm$ 1.15 ^{c,e}	14.00 $\pm$ 0.67 ^g
GSH-Px ($\mu\text{mol/g}$ protein)	AKG	21.51 $\pm$ 1.05	26.59 $\pm$ 1.85 ^b	19.83 $\pm$ 2.87 ^{a,e}	22.91 $\pm$ 2.71 ^{e,f}
	Beyin	23.40 $\pm$ 2.79	24.50 $\pm$ 3.03 ^a	21.60 $\pm$ 2.77 ^{a,e}	23.00 $\pm$ 2.44 ^{d,f}
	Eritrosit	24.27 $\pm$ 2.94	29.05 $\pm$ 1.09 ^c	23.60 $\pm$ 1.87 ^a	28.93 $\pm$ 2.19 ^{c,e,g}
	Kas	18.80 $\pm$ 1.20	20.20 $\pm$ 1.70 ^a	15.70 $\pm$ 1.54 ^{b,e}	17.60 $\pm$ 1.05 ^{e,g}
	SyS	22.59 $\pm$ 1.45	23.76 $\pm$ 1.75 ^a	20.37 $\pm$ 1.08 ^{b,e}	22.49 $\pm$ 1.28 ^{d,f}
MDA ($\mu\text{mol/g}$ protein)	AKG	19.70 $\pm$ 0.85	18.60 $\pm$ 0.98 ^a	21.70 $\pm$ 0.70 ^{a,d}	19.40 $\pm$ 0.76 ^f
	Beyin	20.70 $\pm$ 1.11	19.40 $\pm$ 2.58	24.00 $\pm$ 2.07 ^{a,d}	20.90 $\pm$ 1.14 ^f
	Eritrosit	22.20 $\pm$ 2.74	23.00 $\pm$ 2.16	24.20 $\pm$ 1.46	22.90 $\pm$ 2.04
	Kas	17.10 $\pm$ 1.08	16.80 $\pm$ 1.46	18.80 $\pm$ 0.96 ^{a,d}	22.90 $\pm$ 2.04
	Plazma ($\mu\text{mol/l}$)	2.04 $\pm$ 0.06	1.88 $\pm$ 0.10 ^a	2.48 $\pm$ 0.16 ^{a,e}	2.16 $\pm$ 0.12 ^g
	SyS	21.40 $\pm$ 2.33	18.80 $\pm$ 2.13 ^a	23.60 $\pm$ 2.61 ^{b,e}	20.10 $\pm$ 0.97 ^{d,g}
Retinol ($\mu\text{mol/g}$)	Beyin	2.86 $\pm$ 0.38	2.91 $\pm$ 0.22	2.79 $\pm$ 0.23	2.97 $\pm$ 0.37
	Kas	2.22 $\pm$ 0.26	2.15 $\pm$ 0.19	2.32 $\pm$ 0.17	2.26 $\pm$ 0.19
	Plazma ($\mu\text{mol/l}$)	2.93 $\pm$ 0.17	2.88 $\pm$ 0.27	2.82 $\pm$ 0.19	2.78 $\pm$ 0.23
α-Tokoferol ($\mu\text{mol/g}$)	Beyin	13.60 $\pm$ 0.47	15.40 $\pm$ 0.84 ^c	12.50 $\pm$ 0.58 ^{a,e}	14.30 $\pm$ 0.75 ^{d,g}
	Kas	10.60 $\pm$ 0.93	11.10 $\pm$ 0.45	9.19 $\pm$ 0.61 ^{a,e}	10.30 $\pm$ 0.59 ^f
	Plazma ($\mu\text{mol/l}$)	22.30 $\pm$ 1.14	26.30 $\pm$ 1.09 ^c	22.20 $\pm$ 1.20 ^e	23.70 $\pm$ 1.05 ^c
β-Karoten ($\mu\text{mol/g}$)	Beyin	0.94 $\pm$ 0.10	1.07 $\pm$ 0.10	0.98 $\pm$ 0.12	1.01 $\pm$ 0.15
	Kas	0.79 $\pm$ 0.17	0.81 $\pm$ 0.12	0.85 $\pm$ 0.10	0.88 $\pm$ 0.13

^ap $\leq$ 0.05, ^bp $\leq$ 0.01, ^cp $\leq$ 0.001 kontrol grubuna kıyasla.

^dp $\leq$ 0.05 ve ^ep $\leq$ 0.001 Se grubuna kıyasla.

^fp $\leq$ 0.05 ve ^gp $\leq$ 0.001 FM grubuna kıyasla.

5. TARTIŞMA

Klinikte en sık rastlanan kronik ağrı sendromlarından biri olan FM, ilk defa 1800'lü yılların ortalarında tanımlanmış olup, 1900'lü yılların sonlarında ise FM tanı kriterleri ilk defa sunulmuştur (6). FM'nin etiyopatogenezi tam olarak netlik kazanmasa da ortaya çıkmasında nöroendokrin disfonksiyonlar yanı sıra santral ağrı mekanizmaları ve santral sensitizasyon en önemli faktörler olarak gözükmemesinin yanında genetik faktörler, travma, inflamasyon, mental stres, enfeksiyon gibi faktörler de unutulmamalıdır (183). Ayrıca yapılan bazı araştırmalarda FM'ye neden olabilecek herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmaz iken, bazı çalışmalarda oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonun FM'ye neden olabileceğine yönelik bildirimler mevcuttur (59).

Ca^{+2} iyonu nöronlardaki iletide, ROS üretiminde ve apoptoziste önemli rol oynamaktadır (139). Ca^{+2} iyonu kimyasal kanallar ve voltaj duyarlı kalsiyum kanallarının yanı sıra TRPV1 ve TRPM2 kanallarından da hücre içine geçtiği bilinmektedir. Ayrıca bu TRPV1 ve TRPM2 kanalları oksidatif stresle aktive olmaktadır (184). Oksidatif stres ve onun ürünleri olan ROT, NAD den 3 farklı yol ile ADPR üretimine neden olmaktadır (185). TRPM2 kanallarının moleküler yapısı diğer kanallar gibi 6 segmentten meydana gelmektedir ve katyon girişleri 5 ve 6. segmentler arasında gerçekleşmektedir. Kanalin ayrıca C (Nudiks boks) ve N uçları bulunmaktadır. Nudiks boks kısmında ADPR pirofosfataz enzimi bulunmaktadır ve TRPM2 kanalının açılmasından bu enzimin aktivasyonu sorumludur. ADPR pirofosfataz enzimi ise hem ADPR hem de oksidatif stresle aktive olabilmektedir (155). 2000'den sonraki yapılan çalışmalarda hem ADPR'nin hem de oksidatif stresin birbirlerinden bağımsız olarak TRPM2 kanalını açabildiği belirtilmiştir (152-153). TRPV1 kanalı aktivasyonu ise 2000'li yıllarda ilk kez AKG'da kapsaisin ile sağlandığı belirtilmiştir (186). Daha sonra yapılan çalışmalarda oksidatif stresin de NADPH yolağı ile TRPV1 kanalını aktive ettiği söylenmiştir (164). TRPM2 ve TRPV1 AKG'de çok miktarda bulunmaktadır ve bu nedenle yüksek Ca^{+2} geçişi nöropatik ağrıya ve apoptozise sebep olmaktadır (187). Bazı çalışmalarda yine aşırı Ca^{+2} iyon geçişinin SyS hasarına yol açtığı bildirilmiştir (188). İnflamasyon, mekanik hasar ve

iskemi nedeniyle üretilen ROS, aşır Ca^{+2} geçişi ve apoptozis oluşumu SyS'de ve AKG'de nörodejeneratif hasarlara ve nöropatik ağrılara yol açmaktadır (189,190).

1800'lü yılların başında tanımlanmış ve bulunmuş olan Se, başlarda toksik ve karsinojenik olarak bilinse de çoğu enzimin kofaktörü olmasının yanı sıra temel olarak antioksidan fonksiyonuyla bilinen bir eser elementtir (87). Se antioksidan enzim olan GSH-Px'nin bileşinidir, indirgenmiş GSH ve H_2O_2 ve lipid hidroperoksitlerin yol açtığı oksidatif hasarı azaltmada ve önlemede rol oynar. Ayrıca Se inflamatuvar cevabın regülasyonunda da rol alır (95). Tanguy ve ark. tarafından yaşlı ratlara yüksek doz ve düşük doz Se verilmiş, sitozolik ve mitokondriyal GPx düzeyleri arasındaki farka bakılmış, yüksek doz Se verilen ratların düşük doz verilene göre anlamlı şekilde GPx aktivitesinde artış olduğu izlenmiştir (191).

Bu çalışmanın sonuçları, Se tedavisinin, TRPM2 ve TRPV1 kanallarını bloke ederek AKG ve SyS 'de FM kaynaklı ağrı yoğunluğunu, $[Ca^{+2}]$ i birikimini, mitokondriyal ROS ve apoptozis düzeylerini azalttığını göstermektedir. Bildiğimiz kadarıyla FM patofizyolojik sürecini gösteren, merkezi ve periferik ağrı hastalıklarında AKG ve SyS 'yi içeren ilk kanıttır.

TRPV1; CAPS'i, oksidatif stresi, yüksek sıcaklık ve asidik pH'ı algılayan çok modlu pronosiseptif bir reseptördür. Oksidatif stres ve asidik pH, TRPM2 ve TRPV1'in aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır (192,193). TRPM2 ve TRPV1'in oksidatif stres ve asidik pH ile aktivasyonu $[Ca^{+2}]$ i birikimini arttırmıştır ve bu da nöronal apoptozis ve nöronal iyileşme sinyali gibi bazı fizyolojik ve patolojik süreçlerle yakından ilişkilidir (11,194,195). Bu nedenle, TRPM2 ve TRPV1, NADPH oksidaz gibi farklı hücre içi haberleşme yollarıyla işlev gören nihai oksidatif stres mediatörleri gibi davranabilirler (184). TRPM2 ve TRPV1'in blokajı genellikle hayvan modellerinde anti-nosiseptif etkilere yol açar. Bununla birlikte, hayvan modellerinde asit ve oksidatif stres kaynaklı kronik hiperaljezide TRPM2 ve TRPV1'in rolleri henüz bilinmemektedir. Son yapılan araştırmalar, asit kaynaklı FM'nin oluşumundan sonra hiperaljezinin meydana gelmesinde TRPV1'in rolü olabileceğine dair bazı delilleri ortaya çıkarmıştır (194). Sitozolik antioksidan enzim olan GSH-Px'in bir kofaktörü olan Se, güçlü bir antioksidandır (91,176) ve aynı zamanda çeşitli hücrelerde güçlü süperoksit radikal yok edici ve NADPH oksidaz

bloke edici etkiye sahiptir (194,196). Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, Se tedavisi ile sıçanların AKG ve SyS’inde TRPM2 ve TRPV1’i bloke ederek Ca^{+2} seviyesinde bir düşüş olduğunu gözlemledik (195,197). FM’li sıçanların AKG ve SyS’inde TRPM2 ve TRPV1’in aktivasyonu ile kalsiyum sinyali ve ağrı şiddetine dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, FM’li sıçanların AKG ve SyS’lerindeki TRPM2 ve TRPV1 kanalları ile ağrı şiddetinde ve kalsiyum birikiminde artış olduğunu gözledik. Bununla birlikte, Se tedavisi ile nöronlardaki TRPM2 ve TRPV1’de kalsiyum geçişinin engellendiği ve ağrı şiddetinin azaldığını gözlemledik. Bu çalışmanın ağrı şiddeti ve $[Ca^{+2}]$ yoğunluğu sonuçlarına benzer olarak başka bir çalışmada, ikinci asit enjeksiyonundan 15 dakika önce farelerde CaV3.2 T-tipi Ca^{+2} kanalının bloke edilmesiyle kronik hiperaljezide azalma meydana geldiği bildirilmiştir (198). Buna ek olarak, asit enjekte edilen FM modelinde TRPV1’in aşırı ekspresyonu ile FM benzeri bir ağrı durumunun geliştiği saptanmıştır (11).

TRPM2 ve TRPV1 de dahil katyon kanallarının artan aktivasyonu mitokondriyal permeabilitenin artmasına ve zarlar arasında Ca^{+2} içeriğini bozan aşırı $[Ca^{+2}]$ i yoğunluğuna yol açmaktadır (199). Mitokondrideki işlev bozukluğu üç şeye yol açmaktadır; birincisi endojen mitokondriyal ROS oluşumu, ikincisi kaspaz oluşumu ile apoptozis, üçüncüsü ise PARP1 aktivasyonu ile DNA hasarıdır. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, AKG ve SyS’de mitokondriyal disfonksiyon ve apoptoziste TRPM2 ve TRPV1’in rolü olduğu bildirilmiştir (195, 200). Yapılan bu araştırmalarda, SNI indüksiyonunu takiben AKG ve SyS’ de apoptozis, kaspaz 3, kaspaz 9, PARP, JC-1 ve hücre içi ROS değerleri artmıştır. Bununla birlikte, nöronlarda TRPM2 ve TRPV1’in Se ile bloke edilmesiyle ise değerleri azalmıştır.

Son çalışmalarda, Se’ nin AKG’deki TRPM2 ve TRPV1 kanallarındaki antagonist etkileri ortaya çıkmıştır (91,176,187,195-198,201,202). Ayrıca, AKG’de TRPM2 ve TRPV1 aktivasyonunda NADPH oksidaz ve protein kinaz C moleküler yollarının da rolü olduğu son zamanlarda yapılan bir araştırmada bildirilmiştir (184). Se, TRPM2 ve TRPV1’in antagonisti olmasının yanı sıra çeşitli hücrelerde NADPH oksidazı da inhibe etmektedir (195, 198). Se ile ilgili mevcut verilere dayanarak, TRPM2 ve TRPV1’in potansiyel bir antagonisti olarak Se’nin de bu mekanizma ile işlev görebileceği düşünmekteyiz. Aslında, selenyum tedavisinin, AKG ve SyS’ de FM kaynaklı mitokondriyal ROS miktarında azalmasıyla sonuçlandığını ve FM

kaynaklı apopitozisin Se tedavileri ile tersine döndürdüğünü gözlemledik. Bu nedenle, mevcut sonuçlar Se'nin FM' li sıçanlarda AKG ve SyS' deki FM kaynaklı hücrel oksidatif stresi modüle edebildiğini ortaya koymaktadır. FM'li hastaların, kandaki ROS seviyeleri ve hücrenin antioksidan kapasitesi arasında hassas bir dengeye yol açan mitokondri işlev bozuklukları ve hassas noktaların iskemisinden kaynaklanan oksidatif stres altında oldukları iyice belgelenmiştir (196-198,203). Bu nedenle, bazal seviyenin üzerindeki ROS artışları bu ince dengeyi bozarak ROS ile indüklenen apopitozisi tetiklemektedir. Bu da Se'nin FM'li sıçanların AKG ve SyS' deki ROS, apopitozis, kaspaz 3 ve 9'u nasıl inhibe ettiğini açıklamaktadır.

İnsan vücudu ROS'a karşı kapsamlı savunma mekanizmalarına sahiptir. ROS, GSH-Px ve katalaz gibi enzimler ve GSH ve E vitamini gibi enzimatik olmayan maddeler ile tarafından temizlenmektedir (170). α -Tokoferol, nöronal membrandaki lipid fazındaki ROS'u yok eden temel unsurdur ve oksidize formu GSH'nin antioksidan etkisi ile geri kazanılır. Oksidan ve antioksidan sistem arasındaki dengesizlik, sinir sistemindeki klinik işlev bozukluklarında ortaya çıkan ortak özelliktir. Mitokondriyal ROS'taki artışın ve GSH-Px aktivitesi ve Se seviyesindeki azalmanın, ağrı ve FM'nin etiyolojisinde rol oynadığı çok iyi bilinmektedir (196-198,204-206). GSH-Px'in bir kofaktörü olmasının yanı sıra, Se, lipid hidroperoksitleri ve hidrojen peroksiti ortadan kaldırması bakımından beyin ve nöronlar için önemli bir antioksidan enzimdir (91). Bu çalışmada; AKG, SyS, beyin, kas ve plazmada, α -Tokoferol ve GSH seviyesinin, GSH-Px aktivitesinin azaldığını gözlemledik ancak Se tedavisi ile bazal seviyelere yükseldiğine de şahit olduk. Bu sonuçlar, Se' nin muhtemelen ROS'un ömrünü sınırlandırarak sıçanlarda FM'ye karşı koruma sağladığını ortaya koymaktadır. Beyin ve kaslardaki retinol ve β -karoten konsantrasyonu dört grupta değişkenlik göstermemekle birlikte nöronal hücrelerde antioksidan rolünün olabileceğini düşünmekteyiz. Retinol ve β -karotenin adaptif antioksidan yanıtlarına, GSH-Px aktivitesi, GSH ve α - tokoferol miktarının artışı da eşlik etmiştir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler ilk kez, FM mekanizmalarının AKG ve SyS’de TRPM2 ve TRPV1 kanalları aracılığıyla mitokondriyal ROS, apoptozis artışının rol oynayabileceğini ve bunun da sonuçta ağrı şiddetini arttırdığını düşündürmektedir. Ancak yine çalışmamızda sıçanlara Se eklenmesi sonrasında nöronlardaki TRPM2 ve TRPV1’in bloke edilmesiyle ile deneysel FM’nin ağrı, oksidan ve apoptotik etkilerinin azaltılabildiği görülmüştür. Böylelikle, Se’ nin kullanımı ile FM kaynaklı ağrı, mitokondriyal oksidatif stres ve apoptozisi tedavi etmek için yeni ve etkili bir yaklaşım olduğu kanısındayız. Buna ek olarak, TRPM2 ve TRPV1 kanalları, SNI kaynaklı apoptozis ve ağrının tedavisinde önemli farmakolojik bir hedef olabileceği düşüncesindeyiz.

ÖZET

Deneyisel Fibromiyalji Modelinde Selenyumun Kalsiyum Sinyali, Apoptozis Ve Oksidatif Stres Üzerine Etkileri

Fibromiyalji (FM) klinik uygulamada karşılaşılan en sık görülen kronik ağrı sendromları arasındadır, ancak FM etyolojisinde sınırlı bir bilgi bulunmaktadır. FM düşük selenyum (Se) seviyeleri, Ca^{2+} akışı aşırı yükü, aşırı reaktif oksijen türü (ROS) ve asidik pH ile karakterize ağrıya neden olur. TRPM2 ve TRPV1, ROS ve asit ile aktive edilir, yine de rolleri henüz aydınlatılamamıştır. Bu nedenle, FM sıçan modelinde ve Se'nin terapötik potansiyeline, TRPM2 ve TRPV1'in ağrı, oksidatif stres ve apoptozise olan katkısını araştırdık.

FM modeli oluşturmak için kas içine (gastroknemius) asit salinin enjeksiyonu yapıldı. Sıçanlar kontrol, Se, FM ve FM + Se olmak üzere dört gruba ayrıldı. Se grubuna, FM oluşturulduktan sonra 2 hafta süreyle günde 1.5 mg / kg Se verildi. Se tedavisi siyatik sinir (SyS) ve arka kök gangliyon sinirindeki (AKG) TRPM2 ve TRPV1 akımlarında, ağrı yoğunluğunda, hücre içi Ca^{2+} , ROS'da ve mitokondriyal membran depolarizasyonunda FM kaynaklı artışı azalttı. Ayrıca Se tedavisi, AKG ve SyS'deki FM vasıtasıyla sağlanan hücre canlılığı azalmasını zayıflattı, yine AKG, SyS, beyin, kas ve plazmadaki glutatyon peroksidaz aktivitesi ve glutatyon ve α -tokoferol konsantrasyonunun azaldığı görüldü. Bununla birlikte, lipid peroksidasyon seviyelerinin azaldığı izlendi. Western Blot testinde ise yine Se'un AKG, SyS ve kasta PARP-1, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 ekspresyonunu azalttığı görüldü.

Sonuç olarak, Se tedavisi, AKG ve SyS'de TRPM2 ve TRPV1 yoluyla hiperaljezi, ROS, apoptoz ve hücre içi Ca^{2+} girişiindeki FM kaynaklı artışını azalttığını gözlemledik. Bulgularımızın FM'nin aydınlatılmasında ve tedavisinde önemli bir yere sahip olabileceğinin düşüncesindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz; Hiperaljezi; Arka Kök Ganglion; Oksidatif Stres; TRPM2; TRPV1.

SUMMARY

The Effects of Selenium on Calcium Signaling, Apoptosis and Oxidative Stress in Experimental Fibromyalgia Model

Fibromyalgia (FM) is among the most common chronic pain syndromes encountered in clinical practice; however, there is a limited understanding of FM etiology. FM results in pain characterized by low selenium (Se) levels, Ca^{2+} influx overload, excessive reactive oxygen species (ROS), and acidic pH. TRPM2 and TRPV1 are activated by ROS and acid; nevertheless, their roles have not been elucidated. Therefore, we investigated the contribution of TRPM2 and TRPV1 to pain, oxidative stress, and apoptosis in a rat model of FM and the therapeutic potential of Se.

Injections of acidic saline into the muscle (gastrocnemius) were performed for FM induction. The rats were divided into four groups: control, Se, FM, and FM+Se. The Se groups received 1.5 mg/kg/day Se for 2 weeks after FM induction. Se treatment reduced the FM-induced increase in TRPM2 and TRPV1 currents, pain intensity, intracellular free Ca^{2+} , ROS, and mitochondrial membrane depolarization in the sciatic nerve (SciN) and dorsal root ganglion nerve (DRGN). Furthermore, Se treatment attenuated the FM-induced decrease in cell viability in the DRGN and SciN, glutathione peroxidase activity, and glutathione and α -tocopherol concentration in the DRGN, SciN, brain, muscle, and plasma; however, lipid peroxidation levels were decreased. Western blotting revealed that Se attenuated PARP-1, caspase 3, and caspase 9 expression in the SciN, DRGN, and muscle.

In conclusion, Se treatment decreased the FM-induced increase in hyperalgesia, ROS, apoptosis, and Ca^{2+} entry through TRPM2 and TRPV1 in the SciN and DRGN. Our findings may be relevant to the elucidation and treatment of FM.

Keywords: Apoptosis; Hyperalgesia; Dorsal root ganglion; Oxidative stress; TRPM2; TRPV1.

KAYNAKLAR

1. Cantürk F. Fibromiyalji ve Diğer Eklem Dışı Romatizmal Hastalıklar. Beyazova M, Gökçe-Kutsal Y (Editör). Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon. Güneş Kitabevi Ltd. Şti. Ankara:2000. Cilt 2, 7 (12): 1654-61
2. White LA, Birnbaum HG, Kaltenboeck A, et al. Employees with fibromyalgia medical comorbidity, healthcare costs, and work loss. J Occup Environ Med 2008;50:13-24
3. Goldenberg DL. Pharmacological treatment of fibromyalgia and other chronic musculoskeletal pain. Best Practice & Research Clinical Rheumatology. 2007; 21 (3): 499-511
4. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB. The American College of Rheumatology 1990 criteria for classification of fibromyalgia. Report of the multicenter criteria committee. Arthritis Rheum 1990; 33:160-172
5. Gür A. Fibromiyaljide etiyopatogenez. Türk Fiz Tıp Rehab Derg. 2008;54:4-11
6. Spath M. Current experience with 5-HT₃ receptor antagonist in fibromyalgia. Rheum Dis Clin North Am 2002;28(2):319-28
7. Staud R, Craggs JG, Perlstein WM, et al. Brain Activity Associated With Slow Temporal Summation of C-fiber Evoked Pain in Fibromyalgia Patients and Healthy Controls. Eur J Pain 2008;12:1078-1089
8. Robinson MF, et al. Effect of daily supplements of selenium on patients with muscular complaints in Otago and Canterbury. N Z Med J. 1981 May 13;93(683):289-92
9. Straube S, Derry S, Moore RA, Paine J, McQuay HJ. Pregabalin in fibromyalgia - responder analysis from individual patient data. BMC Musculoskelet Disord 2010; 11: 150
10. Alcocer-Gómez E, et al., Biochim Biophys Acta. 2015;1852:1257-67
11. Lin JG, Hsieh CL, Lin YW. Analgesic Effect of Electroacupuncture in a Mouse Fibromyalgia Model: Roles of TRPV1, TRPV4, and pERK. PLoS One. 2015;10(6):e0128037
12. Martinsen S, et al. Fibromyalgia patients had normal distraction related pain inhibition but cognitive impairment reflected in caudate nucleus and hippocampus during the Stroop Color Word Test. PLoS One. 2014;9(9):e108637
13. Köse SA, Nazıroğlu M. Selenium reduces oxidative stress and calcium entry through TRPV1 channels in the neutrophils of patients with polycystic ovary syndrome. Biol Trace Elem Res. 2014;158:136-142
14. Russell J, Bieber C, Myofasial Pain and Fibromyalgia Sendrom, in Wall and Melzack's textbook of London. 2005
15. Şendur Ö. F. Ağrılı Kas Sendromları. In: Oğuz H, Dursun E, Dursun N (eds.). Tıbbi Rehabilitasyon, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2004, 1221-1238

16. İnanıcı F, Yunus MB. History of fibromyalgia: past to present. *Curr Pain Headache Reports* 2004;8(5):369-378
17. Hench PK. Nonarticular rheumatism, 22nd rheumatism review: review of the American and English literature for the years 1973 and 1974. *Arthritis Rheum* 1976;19(suppl):1081-1089
18. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, Russell AS, Russell IJ, Winfield JB, Yunus MB. The Am College of Rheumatol preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62:600-10
19. Bennett RM1, Friend R, Marcus D, Bernstein C, Han BK, Yachoui R, Deodhar A, Kaell A, Bonafede P, Chino A, Jones KD. Criteria for the diagnosis of fibromyalgia: validation of the modified 2010 preliminary American College of Rheumatology criteria and the development of alternative criteria. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2014;66(9):1364-73
20. Wolfe F, Ross K, Anderson J, Russell IJ. Aspects of fibromyalgia in the general population: sex, pain threshold, and fibromyalgia symptoms. *J Rheumatol*. 1995;22(1):151-6
21. Marcus DA. A Primary Care Guide to Practical Management Dawn A. Marcus, MD Pain Institute, University of Pittsburgh Pittsburgh, Chronic Pain. 2005. PA Human Pres 15-30
22. Gür A, Çevik R, Nas K, Saraç AJ, Özen g. Quality of life in young fibromyalgia patients and effect of depression. *Aplar J Rheumatol*. 2006;9:70-8
23. Ablin J, Neumann L, Buskila D. Pathogenesis of fibromyalgia - a review. *Joint Bone Spine*. 2008;75(3):273-9
24. Buskila D, Sarzi-Puttini P, Ablin JN. The genetics of fibromyalgia syndrome. *Pharmacogenomics*. 2007;8(1):67-74
25. Arnold L M,Hudson J I,Hess E V, et al. Family study of fibromyalgia. *Arthritis Rheum*, 2004 944-52
26. Buskila D. Genetics of chronic pain states. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007;21:535-47
27. Yunus MB, Khan MA, Rawlings KK. Genetic linkage analysis of multicasel families with fibromyalgia syndrome. *J Rheumatol*. 1999; 26 (2): 408-1.
28. Dinerman H, Goldenberg DL, Felson DT. A prospective evaluation of 118 patientswith the fibromyalgia syndrome: prevalence of Raynaud's phenomenon, sicca symptoms, ANA, low complement, and Ig deposition at the dermal-epidermal junction. *J Rheumatol*.1986 Apr; 13 (2): 368-73
29. Bradley LA, Alarcon GS. Fibromyalgia. *Arthritis and Allied Conditions*. 15th edition Williams&Wilkins, 2005; 1869-1910
30. Haviland M G, Morton K R,Oda K, et al. Traumatic experiences, major life stressors, and self-reporting a physician-given fibromyalgia diagnosis. *Psychiatry Res*, 2010; 335-41

31. Glass JM, Lyden A, Petzke F, Clauw D. The effect of brief exercise cessation on pain, fatigue, and mood symptom development in healthy, fit individuals. *J Psychosomatic Res* 2004;57:391-98.
32. Gormsen L. Depression, anxiety, health-related quality of life and pain in patients with chronic fibromyalgia and neuropathic pain. *Eur J Pain*, 2010; 127.
33. Crofford LJ, Demitrack MA. Evidence that abnormalities of central neurohormonal systems are key to understanding fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 1996;22(2):267-84.
34. Gur A, Cevik R, Sarac AJ, Colpan L, Em S. Hypothalamic-pituitary- gonadal axis and cortisol in young women with primary fibromyalgia: the potential roles of depression, fatigue, and sleep disturbance in the occurrence of hypocortisolism. *Ann Rheum Dis*.2004 Nov; 63 (11): 1504-6.
35. Kayhan Ö. Ağrı serisi, Fibromiyalji. Ankara Hekimler Yayın Birliği. 1995.
36. Evengard B, Nilsson CG, Lindh G, Lindquist L, Eneroth P, Fredrikson S, Terenius L, Henriksson KG. Chronic fatigue syndrome differs from fibromyalgia. No evidence for elevated substance P levels in cerebrospinal fluid of patients with chronic fatigue syndrome. *Pain*. 1998;78(2):153-5.
37. Vaeroy H, Helle R, Forre O et al. Elevated CSF levels of substanceP and high incidence of Raynaud phenomenon in patients with fibromyalgia: new features for diagnosis. *Pain*. 1988; 32(1): 21-26.
38. Przekop P, Haviland M G, Morton K R, et al. Correlates of perceived painrelated restrictions among women with fibromyalgia. *Pain Med*, 2010; 1698-706.
39. Moldofsky H, Inhaber NH, Guinta DR, Alvarez-Horine SB. Effects of sodium oxybate on sleep physiology and sleep/wake-related symptoms in patients with fibromyalgia syndrome: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *J Rheumatol* 2010; 37: 2156-66
40. Anch AM, Lue FA, MacLean AW, Moldofsky H. Sleep physiology and psychological aspects of the fibrositis (fibromyalgia) syndrome. *Can J Psychol*. 1991 Jun; 45 (2): 179-84.
41. May KP, West SG, Baker MR, Everett DW. Sleep apnea in male patients with the fibromyalgia syndrome. *Am J Med*. 1993 May; 94 (5): 505-8.
42. Yunus MB, "Towards a model of pathophysiology of fibromyalgia: aberrant central pain mechanisms with peripheral modulation" *Journal of Rheumatology*. 1992; 19 (6): 846-50.
43. R Staud and ML Smitherman, "Peripheral and central sensitization in fibromyalgia: pathogenetic role" *Current Pain and Headache Reports*. 2002; 6 (4): 259-66.
44. Graven-Nielsen T, Sørensen J, Henriksson KG, Bengtsson M, Arendt-Nielsen L. Central Hyperexcitability in Fibromyalgia. *Journal of Musculoskeletal Pain*. 1999;9(1-2):261-71.
45. Henriksson KG. Is Fibromyalgia a Central Pain State? *Journal of Musculoskeletal Pain*. 2010;10(1-2):45-57.

46. Lidbeck J. Central hyperexcitability in chronic musculoskeletal pain: a conceptual breakthrough with multiple clinical implications. *Pain Res Manag.* 2002;7(2):81-92
47. Gracely RH, Petzke F, Wolf JM, Clauw DJ. Functional magnetic resonance imaging evidence of augmented pain processing in fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 2002 May; 46 (5): 1333-43
48. Desmeules JA, Cedraschi C, Rapiti E, Baumgartner E, Finckh A, Cohen P, Dayer P, Vischer TL. Neurophysiologic evidence for a central sensitization in patients with fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 2003 May; 48 (5): 1420-9.
49. Borman P, Celiker R, Haşçelik Z. Muscle performance in fibromyalgia syndrome. *Rheumatol Int.* 1999;19(1-2):27-30.
50. Staud R, Heart rate variability as a biomarker of fibromyalgia syndrome. *Fut Rheumatol*, 2008; 475-483.
51. Ulas UH, Unlu E, Hamamcioglu K, Odabasi Z, Cakci A, Vural O. Dysautonomia in fibromyalgia syndrome: sympathetic skin responses and RR interval analysis. *Rheumatol Int.* 2006;26(5):383-7.
52. Aytür Y, Fibromiyalji Sendromu, in Romatoloji, A. g, Editor. 2012; 762.
53. Yunus MB, Masi AT: Fibromyalgia, Restless Legs Syndrome, Periodic Limb, Movement Disorder and Psychogenic Pain; In arthritis and allied Condition, 12th edition, Lea & Febiger edited by D.J. Mc Carty and WJ. Kopman, 1992; 1383–1405.108-112a.
54. Roizenblatt S, Moldofsky H, Benedito-Silva AA, Tufik S. Alpha sleep characteristics in fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 2001 Jan; 44 (1): 222-30.
55. Yunus M B, Masi AT, Calabro JJ; Primary Fibromyalgia (fibrositis): Clinical study of 50 patients with matched normal controls. *Semin Arthritis Rheum.*1981; 11: 151-171.
56. Goldenberg DL. Fibromyalgia and related syndromes. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weismann MH (eds). *Rheumatology.* 2003; 701-12.
57. Reisine S, Fifield J, Walsh SJ, Feinn R. Do employment and family work affect the health status of women with fibromyalgia? *J Rheumatol.* 2003;30(9):2045-53.
58. Yunus MB, Masi AT, Aldag JC. A controlled study of primary fibromyalgia syndrome: clinical features and association with other functional syndromes. *J Rheumatol.* 1989; 19: 62-71.
59. Simms R.W., Roy, S.H., Hrovat, M., Anderson, J.J., Skrinar, G., LePoole, S.R. (1994) Lack of association between fibromyalgia syndrome and abnormalities in muscle energy metabolism. *Arthritis Rheum*, 37 (6), 794800.
60. Hawley DJ, Wofe F. Effect of light and season on pain and depression in subjects with rheumatic disorders. *Pain.*1994; 59;227-234.

61. Boissevan MD, Mc Cain GA: Toward an integrated understanding of fibromyalgia syndrome, I. Medical and pathophysiological aspects. *Pain* 1991; 45, 227-38.
62. Uğurlu H, Arasıl T. Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyonda Yeni Ufuklar, Fibromyalji. Güneş Kitabevi, 2012.
63. sch S. Fibromyalji. In: Göksoy T, ed. İstanbul. Romatizmal Hastalıkların Tanı ve Tedavisi. 2002; 777-89.
64. Hassett AL, Gevirtz RN. Nonpharmacologic treatment for fibromyalgia: patient education, cognitive-behavioral therapy, relaxation techniques, and complementary and alternative medicine. *Rheum Dis Clin North Am* 2009; 35: 393-407.
65. Williams DA, Clauw DJ. Understanding fibromyalgia: lessons from the broader pain research community. *J Pain* 2009; 10: 777-91.
66. Vierck C.J., A mechanism-based approach to prevention of and therapy for fibromyalgia. *Pain Res Treat*, 2012. 2012; 951354
67. Singh N.A., Clements K.M., Fiatarone M.A., A randomized controlled trial of the effect of exercise on sleep. *Sleep*, 1997; 95-101.
68. Sindel D, Ketenci A. Fibromyalji. Fibromyaljide diğer tedavi yaklaşımları. Gokce Kutsal Y, editor. *Modern Tıp Seminerleri* 2001; 16; 45-56.
69. Howard S Smith, MDI Richard Harris, et al. Fibromyalgia: An Afferent Processing Disorder Leading to a Complex Pain Generalized Syndrome. *Pain Physician* 2011; 14: 217-45.
70. Göksoy T. Fibromiyalji tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Romatizma*. 2006; 21: 361-370
71. Arnold, LM, Hess EV, Hudson JI, et al. A randomized, placebo-controlled, double-blind, flexible-dose study of fluoxetine in the treatment of women with fibromyalgia. *Am J Med* 2002; 112 (3): 191-97.
72. Patkar AA, Masand PS, Krulewicz S et al. A randomized, controlled, trial of controlled release paroxetine in fibromyalgia. *Am J Med* 2007; 120 (5): 448-54.
73. Derry S, Gill D, Phillips T, Moore RA. Milnacipran for neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Mar 14 ;3: CD008244.
74. Sayar K, Aksu G, Ak I, Tosun M. Venlafaxine treatment of fibromyalgia. *Ann Pharmacother*. 2003;37(11):1561-5.
75. Arnold LM, Lu Y, Crofford LJ, Wohlreich M, Detke MJ, Iyengar S, et al. A double-blind, multicenter trial comparing duloxetine with placebo in the treatment of fibromyalgia patients with or without major depressive disorder. *Arthritis Rheum*. 2004;50(9):2974-84.
76. Clauw DJ, Mease P, Palmer RH, Gendreau RM, Wang Y. Milnacipran for the treatment of fibromyalgia in adults: a 15-week, multicenter, randomized, double-

- blind, placebo-controlled, multiple-dose clinical trial. *Clin Ther.* 2008;30(11):1988-2004.
77. Arnold LM, Russell IJ, Diri EW, Duan WR, Young JP, Sharma U, et al. A 14-week, randomized, double-blinded, placebo-controlled monotherapy trial of pregabalin in patients with fibromyalgia. *J Pain.* 2008;9(9):792-805
 78. Wolfe F and Michaud K, "Outcome and predictor relationships in fibromyalgia and rheumatoid arthritis: evidence concerning the continuum versus discrete disorder hypothesis," *Journal of Rheumatology.* 2009; 36 (4): 831-36
 79. Clark S, Tindall E, Bennett RM. A double blind crossover trial of prednisone versus placebo in the treatment of fibrositis. *J Rheumatol.* 1985;12(5):980-3
 80. Biasi G, Manca S, Manganelli S, Marcolongo R. Tramadol in the fibromyalgia syndrome: a controlled clinical trial versus placebo. *Int J Clin Pharmacol Res.* 1998;18(1):13-9.
 81. Arnold LM, Goldenberg DL, Stanford SB, Lalonde JK, Sandhu HS, Keck PE Jr, et al. Gabapentin in the treatment of fibromyalgia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Arthritis Rheum* 2007;56(4):1336-44.
 82. Färber L, Stratz T, Brückle W, Späth M, Pongratz D, Lautenschläger J, et al. Efficacy and tolerability of tropisetron in primary fibromyalgia--a highly selective and competitive 5-HT₃ receptor antagonist. German Fibromyalgia Study Group. *Scand J Rheumatol Suppl.* 2000;113:49-54
 83. Çapacı K, Hepgüler S. Fibromiyalji Sendromu: Tanı ve Tedavi. *Ege Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi* 1999; 5 (1): 73-82.
 84. Cuatrecasas G, Alegre C, Fernandez-Sola J, et al. Growth hormone treatment for sustained pain reduction and improvement in quality of life in severe fibromyalgia. *Pain* 2012. Mar 30.
 85. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(7):775-806.
 86. EDENS F.W. (1996) Organic selenium: From feathers to muscle integrity to drip loss. Five years onward: No more selenite. (In) *Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of Alltech's 12th Annual Symposium*, Nottingham University Press, England, 165-185.
 87. Hardy G, Hardy I. Selenium: the Se-XY nutraceutical. *Nutrition* 2004; 20(6):590-3.
 88. Birringer M, Pilawa S, Flohe L. Trends in selenium biochemistry. *Nat Prod Rep* 2002;693-718.
 89. Nazıroğlu M. Role of Selenium on Calcium Signaling and Oxidative Stress-induced Molecular Pathways in Epilepsy. *Neurochem Res.* 2009; doi: on. 1007/s 11064-009-0015-8.
 90. Patrick L. Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. *Altern Med Rev* 2004; 9(3):239-58.

91. Schweizer U, Bräuer AU, Köhrle J, Nitsch R, Savaskan NE. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res Brain Res Rev* 2004;45(3):164-78.
92. Navarro Alarcon M, Lopez Ga de la Serrana H, Perez-Valero V, Lopez Martinez MC. Selenium concentrations in serum of individuals with liver diseases (cirrhosis or hepatitis): relationship with some nutritional and biochemical markers. *Sci Total Environ* 2002; 291:135-41.
93. Chen J, Berry MJ. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem* 2003; 86:1-12.
94. Van Cauwenbergh RV, Robberecht H, Va Vlaslaer V. Comparison of the serum selenium content of healthy adults living in the Antwerp region (Belgium) with recent literature data. *J Trace Elem Med Biol* 2004; 18:99-112.
95. Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C. Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ* 2008; 400(1-3):115-41.
96. Köhrle J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57(13-14):1853-63.
97. Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J* 2000; 346:1-8.
98. Hamilton SJ. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Sci Total Environ* 2004; 326:1-31.
99. EL-SHARAKY, A.S., NEWAIRY, A.A., BADRELDEEN, M.M., EWEDA, S.M. and SHEWEITA, S.A., 2007. Protective Role of Selenium against Renal Toxicity Induced by Cadmium in Rats. *Toxicology*, 235: 185-193.
100. Thomson CD. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58:391–402.
101. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000; 356: 233–41.
102. Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.
103. Nazıroğlu M, Yüksel M, Köse SA, Özkaya MO. Recent reports of Wi-Fi and mobile phone-induced radiation on oxidative stress and reproductive signaling pathways in females and males. *J Membr Biol*. 2013; 246(12): 869-875.
104. Narula J, Kharbanda S, Khaw BA. Apoptosis and the Heart. *Chest* 1997;112:1358-62.
105. Gavrieli Y, Sherman Y, Sasson SAB. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology* 1992;119: 493-501.
106. Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjänen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer*. 1994; 30(14): 2068-2073.
107. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis. *Pathology Annual* 1982;17:22959.

108. Wyllie AH. What is apoptosis? Histopathology. 1986; 10: 995-8.
109. Cohen JJ. Apoptosis. To be or not to be. Postgraduate Syllabus (AAAA- I) 1998;1:1-19.
110. Özgül C, Arka kök gangliyon hücrelerinde oksidatif stresle aktive edilen TRPM2 kasyon kanallarının inhibisyonunda n-asetil sisteinin etkisinin,patch-clamp sistemi ile araştırılması. SDÜ Tıp Fak. Biyofizik AD. (Danışman Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU), Yüksek Lisans Tezi. , 2013; Tez no: 92
111. Halliwell B. Free radicals and metal ions in health and disease. Proc Nutr Soc. 1987;46(1):13-26
112. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. Ann Clin Lab Sci 2000; 30(2):145-58
113. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. J Nutr Biochem 2007;18(9):567-79
114. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44-84.
115. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. Ann N Y Acad Sci 2000; 899:136-47.
116. Vladimirov YA, Proskurnina EV. Free radicals and cell chemiluminescence. Biochemistry (Mosc) 2009; 74(13):1545-66
117. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2005; 3:30-9
118. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi 2002; 33(2):110-8
119. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres Türk Biyokimya Dergisi 2006; 31(2):51-6.
120. Akkoç H. Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. Dicle Tıp Dergisi, 2008; 35(3):211-5.
121. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. APMIS 2007; 115:81-103.
122. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Ann Bot (Lond) 2003; 9:179-94.
123. Sharpe MA, Robb SJ, Clark JB. Nitric oxide and Fenton/Haber-Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations. J Neurochem 2003;87(2):386-94.
124. Greenwald RA. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. Free Radic Biol Med. 1990; 8(2): 201-9.
125. Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. Contraception. 2002; 65(4): 305-11

126. Leusen JH, Verhoeven AJ, Roos D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the phox family. *Front Biosci.* 1996; 1: 72-90.
127. Bhamre S, Nuzzo RL, Whittin JC, Olshen RA, Cohen HJ. Intracellular reduction of selenite into glutathione peroxidase. Evidence for involvement of NADPH and not glutathione as the reductant. *Mol Cell Biochem.* 2000; 211(1-2): 9-17.
128. Eraç Y, Selli Ç, Tosun M. Kalsiyumun Çok Yönlü İşlevselliğinde TRPC İyon Kanallarının Rolü. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* 2009;28(2):161-83.
129. Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life* 2008; 60(9):575-90
130. Delorenzo RJ, Sun DA, Deshpande LS. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol Ther* 2005; 105(3):229-66.
131. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260(6):3440-50.
132. Alberts B, Johnson A, Lewis J, *Molecular Biology of the Cell: Fourth Edition.* Garland Publishing Inc 2002; 1: 852-862.
133. Catterall WA, Perez-Reyes E, International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57(4): 411-25.
134. McKay BE, Placzek AN, Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol* 2007; 74(8):1120-33.
135. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 1987; 56:395-433.
136. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 2003; 426(6966): 517 – 524.
137. Miller BA. The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. *J Membr Biol.* 2006; 209(1): 31-41.
138. Mobasheri A, Barrett-Jolley R. Transient receptor potential channels: Emerging roles in health and disease. *Vet J.* 2011;187(2):145-6.
139. Nazıroğlu M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res.* 2007;32: 1990-2001.
140. Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE.* 2005; 22;2005;(272):re3.
141. Nazıroğlu M, Özgül C, Çelik Ö, Çiğ B, Sözbir E. Aminoethoxydiphenyl borate and flufenamic acid inhibit Ca²⁺ influx through TRPM2 channels in rat dorsal root ganglion neurons activated by ADP-ribose and rotenone. *J Membr Biol.* 2011;241(2):69-75.

142. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. TRP Channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Therap* 2008; 118: 337-351.
143. Özgül C, Nazıroğlu M. TRPM2 channel protective properties of N-acetylcysteine on cytosolic glutathione depletion dependent oxidative stress and Ca²⁺ influx in rat dorsal root ganglion. *Physiol Behav.* 2012; 106(2): 122-128.
144. Nilius B, Owsianik G. Transient receptor potential channelopathies. *Pflugers Arch.* 2010;460(2):437-50.
145. Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(8):937-46.
146. Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kelsell RE, McNulty S. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res.* 2006;26(3):159-78.
147. Nazıroğlu M, Lückhoff A, Jüngling E. Antagonist effect of flufenamic acid on TRPM2 cation channels activated by hydrogen peroxide. *Cell Biochem Funct.* 2007;25(4):383-7.
148. Nazıroğlu M. TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochem Res.* 2011; 36(3): 355-366
149. Nagamine K, Kudoh J, Minoshima S, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, et al. Molecular cloning of a novel putative Ca²⁺ channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics.* 1998;54(1):124-31.
150. Hecquet CM, Malik AB. Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thromb Haemost.* 2009;101(4):619-25.
151. Nishida M, Hara Y, Inoue R, Mori Y. TRP channels: formation of signal complex and regulation of cellular functions. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 2003;121(4):223-32.
152. Nazıroğlu M, Lückhoff A. A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-ribose in TRPM2 channels: Single channel events. *Neurochem Res* 2008;33:1256-1262.
153. Nazıroğlu M, Lückhoff A. Effects of antioxidants on calcium influx through TRPM2 channels in transfected cells activated by hydrogen peroxide. *Journal of the Neurological Sciences* 2008b;15:270:152-158.
154. Perraud AL, Takanishi CL, Shen B, Kang S, Smith MK, Schmitz C, Knowles HM, Ferraris D, Li W, Zhang J, Stoddard BL, Scharenberg AM. Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem* 2005;280:6138-6148.
155. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, et al. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 2002; 9: 163-173
156. Ishii M, Shimizu S, Hara Y, Hagiwara T, Miyazaki A, Mori Y, et al. Intracellular produced hydroxyl radical mediates H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and cell death in rat beta-cell line RIN-5F. *Cell Calcium.* 2006;39(6):487-94.

157. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell*. 2005;18(1):61-9.
158. Pantaler E, Lückhoff A. Inhibitors of TRP channels reveal stimulus-dependent differential activation of Ca²⁺ influx pathways in human neutrophil granulocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2009;380(6):497-507.
159. Yamamoto S, Wajima T, Hara Y, Nishida M, Mori Y. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(8):958-67.
160. Sumoza-Toledo A, Penner R. TRPM2: A Multifunctional Ion Channel for Calcium Signaling. *J Physiol*. 2011;589(Pt 7):1515-1525.
161. Togashi K, Inada H, Tominaga M. Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Br J Pharmacol*. 2008;153(6):1324-30.
162. Tóth B, Csanády L. Identification of direct and indirect effectors of the transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel. *J Biol Chem*. 2010;285(39):30091-102.
163. Bari MR, Akbar S, Eweida M, Kühn FJ, Gustafsson AJ, Lückhoff A, Islam MS. H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and its inhibition by N-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid in the beta-cells: involvement of TRPM2 channels. *J Cell Mol Med*. 2009;13(9B):3260-7.
164. Susankova K, Tousova K, Vyklicky L, Teisinger J, Vlachova V. Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV1) current. *Mol Pharmacol*. 2006 Jul;70(1):383-394.
165. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997 Oct 23;389(6653):816-24.
166. Nazıroğlu M, Dikici DM, Dursun S. Role of Oxidative Stress and Ca²⁺ Signaling on Molecular Pathways of Neuropathic Pain in Diabetes: Focus on TRP Channels. *Neurochem Res*. 2012c; 37: 2065-2075.
167. Chuang HH, Lin S. Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 24;106(47):20097-102.
168. Keeble JE, Bodkin JV, Liang L, Wodarski R, Davies M, Fernandes ES, Coelho Cde F, Russell F, Graepel R, Muscara MN, Malcangio M, Brain SD. Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms. *Pain*. 2009 Jan;141(1-2):135-42.

169. Nazıroğlu M, Özgül C. Vitamin E modulates oxidative stress and protein kinase C activator (PMA)-induced TRPM2 channel gate in dorsal root ganglion of rats. *J Bioenerg Biomembr*. 2013;45(6):541-9.
170. Nazıroğlu M. Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca(2+) signaling and TRP cation channel activation in nervous system. *J Recept Signal Transduct Res*. 2012 ;32(3):134-41.
171. Nazıroğlu M, Çiğ B, Özgül C. Neuroprotection induced by N-acetylcysteine against cytosolic glutathione depletion-induced Ca²⁺ influx in dorsal rootganglion neurons of mice: Role of TRPV1 channels. *Neuroscience*. 2013; 242: 151-160.
172. Kahya MC, Nazıroğlu M, Çiğ B. Melatonin and selenium reduce plasma cytokine and brain oxidative stress levels in diabetic rats. *Brain Inj*. 2015;29(12):1490-6.
173. Furuta A, Suzuki Y, Honda M, Koike Y, Naruoka T, Asano K, Chancellor M, Egawa S, Yoshimura N. Time-dependent changes in bladder function and plantar sensitivity in a rat model of fibromyalgia syndrome induced by hydrochloric acid injection into the gluteus. *BJU Int*. 2012 Jan;109(2):306-10.
174. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*. 1966; 16(2): 359-64.
175. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968; 25(1): 192-205.
176. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976; 71(4): 952-8.
177. Suzuki J, Katoh N. A simple and cheap method for measuring vitamin A in cattle using only a spectrophotometer. *Jpn J Vet Sci*. 1990; 52: 1282-1284.
178. Jagota SK, Dani HM. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. *Anal Biochem*. 1982; 127: 178-182.
179. Bejarano I, Terrón MP. Hydrogen peroxide increases the phagocytic function of human neutrophils by calcium mobilisation, *Mol Cell Biochem*, 296, 77-84, (2007).
180. Xu SZ, Zeng F, Boulay G, Grimm C, Harteneck C, Beech DJ. (2005). Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *Br J Pharmacol*. 145(4):405-414.
181. Ghazizadeh V, Nazıroğlu M. Electromagnetic radiation (Wi-Fi) and epilepsy induce calcium entry and apoptosis through activation of TRPV1 channel in hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Metab Brain Dis*. 2014 Sep;29(3):787-99.

182. Uğuz AC, Nazıroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, Pariente JA. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol.* 2009 Dec;232(1-3):15-23.
183. İnancı F. Fibromiyalji ve Miyofasial Ağrı Sendromları. *Türkiye Klinikleri Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi* 2005; 10: 11-18.
184. Nazıroğlu, M. Activation of TRPM2 and TRPV1 channels in dorsal root ganglion by nadph oxidase and protein kinase c molecular pathways: a patch clamp study. *J. Mol. Neurosci.* 2017;61, 425–435.
185. Nazıroğlu M. Molecular Mechanisms of vitamin E on intracellular signaling pathways in brain. In *Reactive Oxygen Species and Diseases*. Ed.; Laszlo Goth, Research Signpost Press: Kerala, India. 2007;15, 239-256.
186. Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R., et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000;288, 306–313.
187. Akpınar, H., Nazıroğlu, M., Övey, I. S., Çig, B., and Akpınar, O. The neuroprotective action of dexmedetomidine on apoptosis, calcium entry and oxidative stress in cerebral ischemia-induced rats: contribution of TRPM2 and TRPV1 channels. *Sci. Rep.* 2016;6:371-96.
188. Dolu, N., Sahin, L, Kaplan, D. S, Demir, T, Simsek, H, Sahin, M, and Cengiz, B. The effects of bupivacaine combined with different adjuvants on block onset and duration and on ion channel expressions (SCN9A, TRPM) in sciatic nerve block in rats. *Turk. J. Med. Sci.* 2016;46, 926–935.
189. Fisunov, A., Lozovaya, N., Tsintsadze, T., Chatterjee, S., Nöldner, M., and Krishtal, O. Hyperforin modulates gating of P-type Ca²⁺ current in cerebellar Purkinje neurons. *Pflugers Arch.* 2000; 440, 427–434.
190. Özdemir, Ü. S., Nazıroğlu, M., Senol, N., and Ghazizadeh, V. Hypericum perforatum attenuates spinal cord injury-induced oxidative stress and apoptosis in the dorsal root ganglion of rats: involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Mol. Neurobiol.* 2016; 53, 3540–3551.
191. Tanguy S, Toufektisian M. Dietary selenium intake affects cardiac susceptibility to ischaemia/reperfusion in male senescent rats. *Age and Ageing.* 2003; 32: 273-278.
192. Du J, Xie J, Yue L. (2009) Modulation of TRPM2 by acidic pH and the underlying mechanisms for pH sensitivity. *J Gen Physiol.* 134:471-488.
193. Jordt SE, Tominaga M, Julius D. (2000) Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:8134-8139.
194. Chen WN, Lee CH, Lin SH, Wong CW, Sun WH, Wood JN, Chen CC. (2014) Roles of ASIC3, TRPV1, and NaV1.8 in the transition from acute to chronic pain in a mouse model of fibromyalgia. *Mol Pain.* 10:40.
195. Kahya MC, Nazıroğlu M, Övey İS. (2017) Modulation of diabetes-induced oxidative stress, apoptosis, and Ca(2+) entry through TRPM2 and TRPV1

channels in dorsal root ganglion and hippocampus of diabetic rats by melatonin and selenium. *Mol Neurobiol.* 54:2345-2360.

196. Nazıroğlu M, Akkuş S, Soyupek F, Yalman K, Çelik Ö, Eriş S, Uslusoy GA. (2010) Vitamins C and E treatment combined with exercise modulates oxidative stress markers in blood of patients with fibromyalgia: a controlled clinical pilot study. *Stress* 13:498-505.
197. Akkuş S, Nazıroğlu M, Eriş S, Yalman K, Yilmaz N, Yener M (2009) Levels of lipid peroxidation, nitric oxide, and antioxidant vitamins in plasma of patients with fibromyalgia. *Cell Biochem Funct.* 27:181-185.
198. Sánchez-Domínguez B, Bullón P, Román-Malo L, Marín-Aguilar F, Alcocer-Gómez E, Carrión AM, Sánchez-Alcazar JA, Cordero MD. (2015) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and, inflammation common events in skin of patients with Fibromyalgia. *Mitochondrion* 21:69-75.
199. Pecze L, Jószyk K, Blum W, Petrovics G, Vizler C, Oláh Z, Schwaller B. (2016) Activation of endogenous TRPV1 fails to induce overstimulation-based cytotoxicity in breast and prostate cancer cells but not in pain-sensing neurons. *Biochim Biophys Acta* 1863:2054-2064.
200. Uslusoy F, Nazıroğlu M, Çiğ B. (2017) Inhibition of the TRPM2 and TRPV1 Channels through Hypericum perforatum in sciatic nerve injury-induced rats demonstrates their key role in apoptosis and mitochondrial oxidative stress of sciatic nerve and dorsal root ganglion. *Front Physiol.* 8:335.
201. Nazıroğlu M, Özgül C, Küçükayaz M, Çiğ B, Hebeisen S, Bal R. (2013) Selenium modulates oxidative stress-induced TRPM2 cation channel currents in transfected Chinese hamster ovary cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 112:96-102.
202. Balaban H, Nazıroğlu M, Demirci K, Övey İS. (2017) The Protective Role of selenium on scopolamine-induced memory impairment, oxidative stress, and apoptosis in aged rats: The involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Mol Neurobiol.* 54:2852-2868.
203. Sarıfakıoğlu B, Güzelant AY, Güzel EC, Güzel S, Kızıler AR. (2014) Effects of 12-week combined exercise therapy on oxidative stress in female fibromyalgia patients. *Rheumatol Int.* 34:1361-1367.
204. Reinhard P, Schweinsberg F, Wernet D, Köttler I. (1998) Selenium status in fibromyalgia. *Toxicol Lett.* 96-97:177-180.
205. Sendur OF, Tastaban E, Turan Y, Ulman C. (2008) The relationship between serum trace element levels and clinical parameters in patients with fibromyalgia. *Rheumatol Int.* 28:1117-1121.
206. Yildirim T, Alp R. (2017) The role of oxidative stress in the relation between fibromyalgia and obstructive sleep apnea syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 21:20-29.

