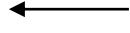


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak.



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**HİPOKSİ VE HİPERKAPNİNİN İNSAN EMBRİYONİK
BÖBREK HÜCRE MEMBRANINDA (HEK293) TRPM2
KANAL AKTİVİTESİNE ETKİSİNİN PATCH CLAMP
TEKNİĞİ VE ENZİMATİK ÖLÇÜMLER İLE
ARAŞTIRILMASI**

DİLEK DÜZGÜN ERGÜN

**DANIŞMAN
PROF. DR. ŞEFİK DURSUN**

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
BİYOFİZİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

DOKTORA TEZİ ONAYI

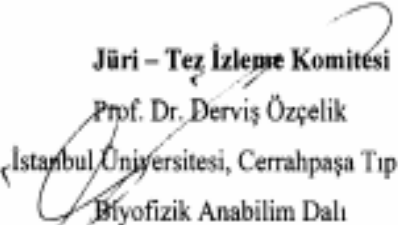
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Biyofizik Programında Doktora öğrencisi Dilek DÜZGÜN ERGÜN tarafından Prof. Dr. Şefik DURSUN'un danışmanlığında hazırlanan "Hipoksi ve Hiperkapninin İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Membranında (HEK293) TRPM2 Kanal Aktivitesine Etkisinin Patch Clamp Tekniği ve Enzimatik Ölçümler ile Araştırılması." başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 02/03/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.


Jüri Başkanı - Danışman

Prof. Dr. Şefik Dursun

Üsküdar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi

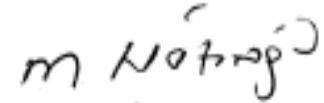
Fizyoterapi Bölümü


Jüri - Tez İzleme Komitesi

Prof. Dr. Derviş Özçelik

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Biyofizik Anabilim Dalı



Jüri - Tez İzleme Komitesi

Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu

Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi

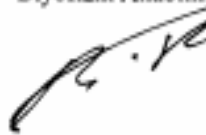
Biyofizik Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Bora Barutçu

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Biyofizik Anabilim Dalı



Jüri

Prof. Dr. Semra Özdemir

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Biyofizik Anabilim Dalı



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

DİLEK DÜZGÜN ERGÜN

İTHAF

Küçük Prensim Oğlum Kemal Utku Ergün'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, bu çalışmayı yapmış olduğum Hücre Kültür ve Patch Clamp Araştırma Laboratuvarları'nı kuran, beni bu konuda çalışmaya teşvik eden, tez çalışmamın her aşamasında bana destek olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Şefik Dursun'a, çalışmalarımnda her zaman destek olan, fikirleri ile ufkumu genişleten çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Derviş Özçelik'e, çalışmama bilimsel katkılarını sunan Sayın Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu'na ve tez çalışmam süresince rahat bir çalışma ortamı sunan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ümit Bora Barutçu'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda katkılarından dolayı İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitü Müdürü Sayın Prof. Dr. Uğur Özbek ve Sayın Dr. Özden Hatırnaz Ng'ye, çalışmalarımna bilgi ve tecrübeleri ile destek olan Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Ömer Çelik'e teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamda desteklerini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan çok mutlu olduğum başta Dr. Nural Pastacı Özsoğacı olmak üzere çok değerli arkadaşlarım Dr. Fatma Ateş Alkan, Araş. Gör. Duygu Tarhan, Dr. Denizhan Karış, Mimar Ali Özsoğacı ve İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı tüm öğretim üyelerine ve personeline teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca yanımda olan en kıymetli varlıklarım sevgili annem Asiye Düzgün ve babam Duran Düzgün ile kardeşlerime, bu zorlu süreçte beni yalnız bırakmayan, her an desteğini hissettiğim çok değerli eşim Uzman Dr. Sefa Ergün'e ve çalışmalarımnda bana varlığı ile güç veren Küçük Prensım Oğlum Kemal Utku Ergün'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: **50309**

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XX
ÖZET	XXİİİ
ABSTRACT.....	XXİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. HÜCRE MEMBRANI VE YAPISI.....	3
2.1.1. Hücre Membranının Biyofiziksel Özellikleri	6
2.1.1.1. Hücre Membranının Kapasitans Özelliği.....	6
2.1.1.2. Hücre Membranının Elektriksel Eşdeğer Devresi.....	7
2.1.1.3. Hücre Membranın Kapı Özelliği - İyon Kanalları	9
2.1.2. TRP Kanal Ailesi	11
2.1.2.1. TRPM Kanalları	14
2.1.2.2. TRPM2 Kanalı ve Özellikleri	16
2.2. ELEKTROBİYOFİZİKSEL TARİHÇE VE HÜCRE KAYIT TÜRLEİ.....	18
2.2.1. İntasellüler Kayıt	19
2.2.2. Voltaj Klamp Yöntemi.....	24
2.2.3. Patch Clamp Yöntemi	26
2.2.4. Patch Clamp Yönteminin Biyofiziksel Prensibi	30
2.2.4.1. Giga seal oluşumu	31
2.2.4.2. Tüm Hücre Kayıt (THK) Yönteminin Üç Temel Adımı	35
2.2.5. Patch Clamp Yönteminde Kullanılan Ekipmanlar.....	41
2.3. OKSİDATİF STRES	46
2.3.1. Serbest Radikaller	46

2.3.2. Serbest Radikallerin Hücre Membranı Üzerine Etkileri	49
2.3.2.1. Malondialdehit	50
2.3.2.2. Laktat Dehidrogenaz	51
2.3.3. Antioksidanlar	53
2.3.3.1. Çinko	56
2.3.3.2. Selenyum	61
2.3.3.1. Glutasyon	64
2.4. HİPOKSİ VE HİPERKAPNİ	65
2.4.1. Hipoksi	65
2.4.1.1. Hipoksinin Hücre Membranı ve Oksidatif Denge Üzerine Etkisi	66
2.4.2. Hiperkapni	68
2.4.2.1. Hiperkapninin Hücre Membranı ve Oksidatif Denge Üzerine Etkisi	69
3. GEREÇ VE YÖNTEM	72
3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	72
3.2. Çalışmada Kullanılan Kitler, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	73
3.3. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar	75
3.3.1. TRPM2 Plazmidinin Çoğaltılmasında (Transformasyon) Kullanılan Solüsyonlar	75
3.3.2. Hücre Kültüründe Örneklerin Hazırlanmasında Kullanılan Solüsyonlar	75
Malondialdehit (MDA) Analizinde Kullanılan Solüsyonlar	76
3.4. Hücre Kültürü Deneyleri	76
3.4.1. Hücrelerin İnkübasyonu, Bakımı ve Gözlenmesi	77
3.4.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılacak Solüsyonların Hazırlanması	79
3.4.2. Hücrelerin Çözdürülmesi	79
3.4.3. Hücrelerin Pasajlanması	81
3.4.4. Hücrelerin Dondurulması	82
3.4.5. Hücre Sayısının ve Canlılığının Belirlenmesi	82
3.5. TRPM2 Plazmidinin Çoğaltılması (Transformasyon)	84
3.5.1. LB ve LB Agar Besiyeri Hazırlanması	84
3.5.2. Kompetan Hücrelere Plazmid Transformasyonu	84
3.5.3. Plazmid İzolasyonu	85
3.6. HEK293 Hücrelerinde TRPM2 Kanal Proteinini Ekspresyonu (Transfeksiyon)	85

3.7. HEK293 Hücrelerine Normoksik, Hipoksik ve Hiperkapnik Gaz Karışımı Uygulanması	87
3.7.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	89
3.7.2. Hücre Kültür Ortamlarının PO ₂ ve PCO ₂ Değerlerinin Analizi	91
3.8. Spektrofotometrik Ölçüm	93
3.8.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması	93
3.8.2. Lipid Peroksidasyon Analizi	94
3.8.2.1. Malondialdehit Ölçümü	94
3.8.2.2. Laktat dehidrogenaz Ölçümü	95
3.9. Patch Clamp Deneyleri	96
3.9.1. Patch Clamp Kayıt Sisteminin Çalışması ve Solüsyonların Hazırlanması	96
3.9.1.1. İntrasellüler ortam solüsyonunun hazırlanması	97
3.9.1.2. Ekstrasellüler ortam solüsyonunun hazırlanması	98
3.9.1.3. N-Metil D-Glikamin (NMDG ⁺) içeren ekstrasellüler ortam solüsyonunun hazırlanması	99
3.9.1.4. 2-Aminoetoksi difenilborat (2-APB) solüsyonunun hazırlanması	99
3.9.1.5. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) solüsyonunun hazırlanması	99
3.9.2. Patch Clamp Deneyleri	100
3.10. İstatistiksel Analiz	104
4. BULGULAR	105
4.1. Hücre Kültür Ortamlarının PO ₂ ve PCO ₂ Değerleri	105
4.2. Lipid Peroksidasyonu Bulguları	108
4.2.1. Malondialdehit (MDA) Değerleri	108
4.2.2. Laktat dehidrogenaz (LDH) Değerleri	116
4.3. Patch Clamp Ölçüm Değerleri	124
4.3.1. Deney Gruplarının Tüm Hücre Kayıtlarının Analizi	124
4.3.2. Hipoksi Gruplarında Tüm Hücre Kayıtlarının Analizi	130
4.3.3. Hiperkapni Gruplarında Tüm Hücre Kayıtlarının Analizi	144
5. TARTIŞMA	159
KAYNAKLAR	172
İNTİHAL RAPORU SONUCU	194
ÖZGEÇMİŞ	195

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Oksidatif stres sonucu meydana gelen serbest radikaller (124, 125).	48
Tablo 2.2: Endojen antioksidanlar (37).	54
Tablo 2.3: Ekzojen antioksidanlar (37).....	55
Tablo 2.4: Hücre membranında bulunan antioksidanlar (37).	56
Tablo 3.1: İntrasellüler ortam solüsyonu.	98
Tablo 3.2: Ekstrasellüler ortam solüsyonu.	98
Tablo 3.3: NMDG ⁺ ’li ekstrasellüler ortam solüsyonu.	99
Tablo 4.1: 30 dk ve 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde PO ₂ ve PCO ₂ değerlerinin (M ± SD) normoksi grubuna göre değişimleri.	106
Tablo 4.2: 30 dk ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde PO ₂ ve PCO ₂ değerlerinin (M ± SD) normoksi grubuna göre değişimleri.	107
Tablo 4.3: 30 dk hipoksik ve 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin (M ± SD), normoksi grubuna göre değişimleri.	109
Tablo 4.4: 60 dk hipoksik ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin (M ± SD), normoksi grubuna göre değişimleri.	110
Tablo 4.5: 30 dk ve 60 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin (M ± SD) değişimleri.	111
Tablo 4.6: 100 µM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin (M ± SD), hipoksi grubuna göre değişimleri.	112
Tablo 4.7: 100 µM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin (M ± SD), hipoksi grubuna göre değişimleri.	113
Tablo 4.8: 100 µM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin (M ± SD), hiperkapni grubuna göre değişimleri.	114
Tablo 4.9: 100 µM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin (M ± SD), hiperkapni grubuna göre değişimleri.	115

Tablo 4.10: 30 dk hipoksik ve 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde LDH değerlerinin ($M \pm SD$), normoksi grubuna göre değişimleri.	117
Tablo 4.11: 60 dk hipoksik ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde LDH değerlerinin ($M \pm SD$), normoksi grubuna göre değişimleri.	118
Tablo 4.12: 30 dk ve 60 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde LDH değerlerinin ($M \pm SD$) değişimleri.	119
Tablo 4.13: 100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde LDH değerlerinin ($M \pm SD$), hipoksi grubuna göre değişimleri.	120
Tablo 4.14: 100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde LDH değerlerinin ($M \pm SD$), hipoksi grubuna göre değişimleri.	121
Tablo 4.15: 100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde LDH değerlerinin ($M \pm SD$), hiperkapni grubuna göre değişimleri.	122
Tablo 4.16: 100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde LDH değerlerinin ($M \pm SD$), hiperkapni grubuna göre değişimleri.	123

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Hücre membranının yapısı (52).	3
Şekil 2.2: Hücre membran lipidlerinin türleri (50).	4
Şekil 2.3: Hücre membran lipidlerinin misel oluşturmaları.	4
Şekil 2.4: İntegral ve periferik proteinler (54).	5
Şekil 2.5: Pasif RC hücre eşdeğer modeli (56).	7
Şekil 2.6: Sızıntı iletken ve batarya içeren devre modeli (56).	8
Şekil 2.7: Uyarılabilir hücrenin eş değeri devre modeli (62).	9
Şekil 2.8: TRP kanallarının yapısı (78).	12
Şekil 2.9: TRP kanallarının yapısı ve alt aileleri (80).	14
Şekil 2.10: TRPM kanallarının yapısı (2).	15
Şekil 2.11: TRPM2 kanalının protein yapısı ve transmembran topolojisi (1).	16
Şekil 2.12: TRPM2 kanalları üzerinde etkili oksidatif stress aracılı aktivasyon, inhibisyon ve düzenleyici ajanlar (2).	17
Şekil 2.13: İntrasellüler kayıt eşdeğer devresi (95).	20
Şekil 2.14: İntrasellüler kayıta hücre membran potansiyeline mikroelettrot direncinin etkisi (95).	21
Şekil 2.15: Hücre-mikroelettrot sistemi (95).	22
Şekil 2.16: İntrasellüler kayıta akım uygulanması (95).	23
Şekil 2.17: İntrasellüler kayıta akım uygulandığında oluşan potansiyel değişimi (95).	24
Şekil 2.18: Giga seal elde edilmesi (56).	27
Şekil 2.19: Patch clamp yönteminde kullanılan kayıt türleri (106).	28
Şekil 2.20: Giga seal oluşumunda mikroelettrot - hücre membran ilişkisi (104).	31
Şekil 2.21: Patch clamp kaydında hücre - mikroelettrot ilişkisi ve elektriksel eşdeğer devresi (100).	32
Şekil 2.22: Patch clamp yönteminde akım - direnç - voltaj ilişkisi (49).	33
Şekil 2.23: Patch clamp yöntemi ve biyofiziksel şeması (111).	35
Şekil 2.24: Patch clamp tekniğinde mikroelettrot banyo solüsyonunda (49).	36
Şekil 2.25: Patch clamp yönteminde mikroelettrot hücre üzerinde (49).	37
Şekil 2.26: Tüm hücre kayıt yöntemi (49).	37
Şekil 2.27: Voltaj kenetlendiğinde standart akım değişimi (56).	38

Şekil 2.28: Tüm hücre kayıt yönteminde üç temel adım ve osiloskopta gözlemlenen yanıtları (112).	40
Şekil 2.29: Patch clamp kayıt sistemi (112).	41
Şekil 2.30a-b: Faraday kafesi (113, 114).	42
Şekil 2.31: Mikroelektrot çekici şeması (95).	44
Şekil 2.32: Basınç kontrol sistemi (95).	45
Şekil 2.33: Doymamış yağ asidinden malondialdehit oluşumu (33).	51
Şekil 2.34: LDH'ın katalizlediği reaksiyon (143).	52
Şekil 2.35: Oksidatif denge (129).	53
Şekil 2.36: Antioksidan mekanizmaya çinkonun katılımı (40).	59
Şekil 2.37: TRPM2 kanalının dış kanal bölgesindeki rezidüler ile çinkonun etkileşimi (154).	60
Şekil 2.38: Çinko içeren proteinler ve metal koordinasyon geometrilerinin temsili değişimi (39).	61
Şekil 2.39: Selenyum metabolizması (159).	63
Şekil 2.40: Epitel hücrelerin hipoksiye yanıtı (130).	67
Şekil 2.41: Hipoksi sonucunda azalan ATP üretiminin hücresel düzeyde etkileri (175).	68
Şekil 2.42: CO ₂ etkisi ile Ca ⁺⁺ kanalının aktivasyonu (181).	70
Şekil 2.43: Hiperkapninin hücresel etkileri (27).	71
Şekil 3.1: HEK293 (CRL - 1573) Hücreleri (185).	76
Şekil 3.2: Laminar akım kabini (ESCO Sentinel Gold Microprocessor Control System, USA).	77
Şekil 3.3: A. CO ₂ İnkübatörü (ESCO Cell Culture CO ₂ Incubator).	78
Şekil 3.4: Otoklav cihazı (Nüve Steam A - OT).	78
Şekil 3.5: Su banyosu (Nüve BM302).	79
Şekil 3.6: Soğutmalı santrifüj (Z326K - Hermle Labortechnik).	80
Şekil 3.7: İnvert mikroskop (Leitz Diavert).	81
Şekil 3.8: Thoma lamı ile hücrelerin sayılması (186, 187).	83
Şekil 3.9: Mini kültür sonrası izole edilen 6 koloninin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.	85
Şekil 3.10: HEK293 hücrelerine TRPM2 transfeksiyonu (188).	86
Şekil 3.11: Transfekte HEK293 hücrelerinin floresan mikroskobunda görüntüsü.	86

Şekil 3.12: Gaz karışımlarının uygulandığı sistemin şematik gösterimi.	87
Şekil 3.13: Gaz karışımlarının uygulandığı sistem.	88
Şekil 3.14: Kan Gazı Cihazı (Radiometer ABL-800).	88
Şekil 3.15: Semi-Micro Osmometre, KNAUER-K7400.	97
Şekil 3.16: pH Metre, Hanna Instruments pH211 Microprocessor.	97
Şekil 3.17: Patch Clamp Kayıt Sistemi.	100
Şekil 3.18: A. Patch Clamp sisteminde hücre mikroelettrot ilişkisi.	100
Şekil 3.19: Mikroelettrot Çekici (Puller)	101
Şekil 3.20: Mikroelettrot ekstrasellüler ortam solüsyonu içindeyken kare dalga oluşumu.	102
Şekil 3.21: Giga seal oluşumu.	102
Şekil 4.1: 30 dk hipoksik ve 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), normoksi grubuna göre değişimleri.	109
Şekil 4.2: 60 dk hipoksik ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), normoksi grubuna göre değişimleri.	110
Şekil 4.3: 30 dk ve 60 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$) değişimleri.	111
Şekil 4.4: 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), hipoksi grubuna göre değişimleri.	112
Şekil 4.5: 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), hipoksi grubuna göre değişimleri.	113
Şekil 4.6: 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), hiperkapni grubuna göre değişimleri.	114
Şekil 4.7: 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), hiperkapni grubuna göre değişimleri.	115
Şekil 4.8: 30 dk hipoksik ve 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde % LDH değerlerinin ($M \pm SD$), normoksi grubuna göre değişimleri.	117
Şekil 4.9: 60 dk hipoksik ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde % LDH değerlerinin ($M \pm SD$), normoksi grubuna göre değişimleri.	118

Şekil 4.10: 30 dk ve 60 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde % LDH değerlerinin ($M \pm SD$) değişimleri.	119
Şekil 4.11: 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde % LDH değerlerinin ($M \pm SD$), hipoksi grubuna göre değişimleri.	120
Şekil 4.12: 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde % LDH değerlerinin ($M \pm SD$), hipoksik grubuna göre değişimleri.	121
Şekil 4.13: 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde % LDH değerlerinin ($M \pm SD$), hiperkapni grubuna göre değişimleri.	122
Şekil 4.14: 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde % LDH değerlerinin ($M \pm SD$), hiperkapni grubuna göre değişimleri.	123
Şekil 4.15: 30 dk normoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.	125
Şekil 4.16: 30 dk normoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.	125
Şekil 4.17: 30 dk normoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.	126
Şekil 4.18: 60 dk normoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.	127
Şekil 4.19: 60 dk normoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.	127
Şekil 4.20: 60 dk normoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.	128
Şekil 4.21: 30 dk hipoksik ve 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, normoksi grubuna göre ortalama akım yoğunluğu değişimleri ($M \pm SD$).	129
Şekil 4.22: 60 dk hipoksik ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, normoksi grubuna göre ortalama akım yoğunluğu değişimleri ($M \pm SD$).	129

Şekil 4.23: 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.	131
Şekil 4.24: 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	131
Şekil 4.25: 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.	132
Şekil 4.26: 100 μ M Zn ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	132
Şekil 4.27: 100 μ M Zn ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	133
Şekil 4.28: 100 μ M Zn ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.....	133
Şekil 4.29: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	134
Şekil 4.30: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	134
Şekil 4.31: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	135
Şekil 4.32: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	135
Şekil 4.33: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	136

Şekil 4.34: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	136
Şekil 4.35: 100 µM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan grupların, hipoksi grubuna göre ortalama akım yoğunluğu değişimleri (M ± SD).....	137
Şekil 4.36: 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.	138
Şekil 4.37: 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	138
Şekil 4.38: 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.	139
Şekil 4.39: 100 µM Zn ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	139
Şekil 4.40: 100 µM Zn ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	140
Şekil 4.41: 100 µM Zn ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.....	140
Şekil 4.42: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan tüm hücre kaydı.....	141
Şekil 4.43: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	141
Şekil 4.44: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.....	142

Şekil 4.45: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	142
Şekil 4.46: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	143
Şekil 4.47: 5 mM GSH ile edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.....	143
Şekil 4.48: 100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan grupların, hipoksi grubuna göre ortalama akım yoğunluğu değişimleri ($M \pm SD$).....	144
Şekil 4.49: 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	145
Şekil 4.50: 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	146
Şekil 4.51: 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.....	146
Şekil 4.52: 100 μ M Zn ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	147
Şekil 4.53: 100 μ M Zn ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	147
Şekil 4.54: 100 μ M Zn ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.....	148
Şekil 4.55: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	148

Şekil 4.56: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	149
Şekil 4.57: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydına ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.....	149
Şekil 4.58: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	150
Şekil 4.59: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	150
Şekil 4.60: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.....	151
Şekil 4.61: 100 µM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan grupların, hiperkapni grubuna göre ortalama akım yoğunluğu değişimleri (M ± SD).....	151
Şekil 4.62: 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.	152
Şekil 4.63: 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	153
Şekil 4.64: 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.	153
Şekil 4.65: 100 µM Zn ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	154
Şekil 4.66: 100 µM Zn ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H ₂ O ₂ ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	154

Şekil 4.67: 100 μ M Zn ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.....	155
Şekil 4.68: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	155
Şekil 4.69: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	156
Şekil 4.70: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.....	156
Şekil 4.71: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	157
Şekil 4.72: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.....	157
Şekil 4.73: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.....	158
Şekil 4.74: 100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan grupların, hiperkapni grubuna göre ortalama akım yoğunluğu değişimleri ($M \pm SD$).....	158

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

(CH ₃) ₃ SeH	Trimetilselenonyum
2-APB	2-aminoetoksi difenolborat
8Br-cADPR	8-brom siklik adenozin difosfat riboz
ACA	Antranilik asit
ADP	Adenozin difosfat
ADPR	Adenozin difosfat riboz
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin trifosfat
Ca	Kalsiyum
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
cADPR	Siklik ADPR
CaM	Kalmodülin
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CAT	Katalaz
CH ₃ SeH	Metil selenit
CsOH	Sezyum hidroksit
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ERG	Elektroretinogram
FBS	Fetal sığır serumu
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSH-Rx	Glutasyon redüktaz
GS-SeH	Glutasyon selenit
GS-Se-SH	Selendiglutasyon
H	Hidrojen
H ₂ CO ₃	Karbonik asit

H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₂ Se	Hidrojen selenit
HCl	Hidroklorik asit
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HEK293	İnsan embriyonik böbrek hücresi
HNA	4-hidroksinoneal
K	Potasyum
KCl	Potasyum klorür
KOH	Potasyum hidroksit
MDA	Malondialdehit
MFA	Mefanamik asit
Mg	Magnezyum
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MTF-1	Metal duyarlı transkripsiyon faktörü-1
Na	Sodyum
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NFA	Niflumik asit
NMDA	N-metil-d-aspartat
NMDG	N-metil d-glikamin
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
PCO ₂	Parsiyel karbondioksit basıncı
PKA	Proteinkinaz A
PKC	Proteinkinaz C
PO ₂	Parsiyel oksijen basıncı
ROS	Reaktif oksijen türleri
Se	Selenyum
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri
TNF- α	Tümör nekroz faktör-alfa

TRP	Transient Receptor Potantial
TRPA	Transient Receptor Potantial Ankyrin
TRPC	Transient Receptor Potantial Cononcial
TRPM	Transient Receptor Potantial Melastatin
TRPML	Transient Receptor Potantial Mucolipin
TRPP	Transient Receptor Potantial Polycystein
TRPV	Transient Receptor Potantial Vanilloid
TrxR	Tiyoredoksin redüktaz
Zn	Çinko
ZnCl ₂	Çinko klorür
ZnO	Çinko oksit
ZnS	Çinko sülfür
ZnSiO ₄ H ₂ O	Çinko silikat
ZnT-1	Çinko transporter-1

ÖZET

Düzgün Ergün, D. Hipoksi ve Hiperkapninin İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Membranında (HEK293) TRPM2 Kanal Aktivitesine Etkisinin Patch Clamp Tekniği ve Enzimatik Ölçümler ile Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2018.

Bu çalışmada HEK293 hücrelerine hipoksi ve hiperkapni uygulanmasında Zn, Se ve GSH'un etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda HEK293 hücrelerinde; normoksi, hipoksi, hipoksi+Zn, hipoksi+Se, hipoksi+GSH, hiperkapni, hiperkapni+Zn, hiperkapni+Se, hiperkapni+GSH grupları oluşturuldu. Normoksi, hipoksi ve hiperkapni gruplarından 30 dk ve 60 dk gaz karışımları geçirildi, diğer gruplar Zn, Se ve GSH ile inkübe edildikten sonra gaz karışımları geçirildi.

30 dk ve 60 dk hipoksi ve hiperkapni gruplarının MDA ve LDH değerlerinin, 30 dk ve 60 dk normoksi gruplarının aynı değerlerine göre anlamlı olarak arttığı; Zn, Se ve GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk ve 60 dk hipoksi ve hiperkapni uygulanan grupların MDA ve LDH değerlerinin ise 30 dk ve 60 dk hipoksi ve hiperkapni gruplarının aynı değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaldığı tespit edildi. 30 dk ve 60 dk hipoksi ve hiperkapni gruplarında ortalama Ca^{++} akım yoğunluğunun 30 dk ve 60 dk normoksi gruplarının aynı değerlerine göre anlamlı artış gösterdiğini tespit ettik. Zn, Se ve GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk ve 60 dk hipoksi ve hiperkapni uygulanan gruplarda ortalama Ca^{++} akım yoğunluğunun 30 dk ve 60 dk hipoksi ve hiperkapni gruplarının aynı değerlerine göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi. Ayrıca hipoksi ve hiperkapni uygulama süresinin artışının oksidatif stresi anlamlı olarak arttığı bulundu.

Sonuç olarak; hipoksi ve hiperkapninin oksidatif stres aracılığıyla hücre membran hasarına neden olduğu Zn, Se ve GSH'un bu zararlı etkilerden hücre membranını koruyabileceği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Hipoksi, Hiperkapni, TRPM2 kanalı, HEK293, Oksidatif stres.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 50309

ABSTRACT

Duzgun Ergun, D. Study of effect on TRPM2 Channel Activity of Hypoxia and Hypercapnia in Human Embryonic Kidney (HEK293) Cell Membrane with Patch Clamp Tecnique and Enzymatic Measurement. Istanbul University Institute of Health Science, Biophysics Department. PhD Thesis. Istanbul. 2018.

In this study, we aimed to investigate the effects of Zn, Se and GSH on the application of hypoxia and hypercapnia to HEK293 cells.

In our study, study groups were categorized as normoxia, hypoxia, hypoxia+Zn, hypoxia+Se, hypoxia+GSH, hypercapnia, hypercapnia+Zn, hypercapnia+Se and hypercapnia+GSH in HEK293 cells. Normoxia, hypoxia and hypercapnia groups were exposed to gasses mixture for 30 and 60 min while other groups were incubated with Zn, Se and GSH before being exposed to the gas mixtures.

It was determined that a significant increase in MDA and LDH levels in groups that hypoxia and hypercapnia for 30 and 60 min to compared with groups that were normoxia groups and a decrease in MDA and LDH levels in groups that were 30 and 60 min hypoxia and hypercapnia after incubation with Zn, Se and GSH versus same values of hypoxia and hypercapnia groups. We found that Ca^{++} current densities in 30 and 60 min hypoxia and hypercapnia groups were significantly increased compared to same values of normoxia groups. In addition, it was found that Ca^{++} current densities in 30 and 60 min hypoxia and hypercapnia groups after incubation with Zn, Se and GSH decreased significantly compared to same values in hypoxia and hypercapnia groups. Furthermore, it was shown that oxidative stress raised as the duration of hypoxia and hypercapnia exposure increased.

In conclusion, hypoxia and hypercapnia increased caused cellular membrane damage, while addition of Zn, Se and GSH may protect the cell membrane from these damaging effects.

Key Words: Hypoxia, Hypercapnia, TRPM2 channel, HEK293, Oxidative stress

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 50309

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Transient Receptor Potential (TRP) kanal ailesinden TRP-Melastatin-2 (TRPM2), iki değerlikli kalsiyum (Ca^{++}) ve magnezyum (Mg^{++}) iyonları ile tek değerlikli sodyum (Na^+) ve potasyum (K^+) iyonlarına geçirgen, seçici olmayan bir katyon kanalıdır (1-3). TRPM2 kanalları üzerinde Ca^{++} iyonu, hidrojen peroksit (H_2O_2), siklik adenosin difosfat riboz (cADPR) ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkili olduğu bilinmektedir (4-7). İntrasellüler ortama Ca^{++} iyonun girişini sağlayan TRPM2 kanallarının aktivasyon ve inhibisyon mekanizmalarının araştırılması, hücre içi Ca^{++} iyonunun artışına bağlı olarak ortaya çıkan pek çok hastalığın oluşum mekanizmasının bilinmesi açısından önem taşımaktadır (8-11).

Oksijen, hücresel fonksiyonlar için gerekli enerji kaynağı olan adenosin trifosfatın (ATP) üretildiği aerobik glikoz sisteminin son elektron alıcısıdır (12-16). Fizyolojik pH ve 37°C vücut sıcaklığında sağlıklı bireylerde arteriyel kanda parsiyel oksijen basıncı (PO_2) 80-100 mmHg arasında bulunur. PO_2 seviyesinin düşmesi olarak tanımlanan hipoksi, hücrelerin işlevlerini yerine getirememesine, çevreleriyle ilişkilerinin bozulmasına ve dokularda hasar oluşmasına neden olur (17-19).

Organizmada biyolojik süreçlerde etkili olan hücresel enzimler ve kimyasal reaksiyonlar pH değişimine duyarlıdır. Karbondioksit (CO_2) hücre membranından pasif difüzyonla geçerek hücre içerisinde karbonik aside (H_2CO_3), karbonik asit de H^+ ve HCO_3^- iyonlarına ayrışır (20-23). Hiperkapni, arteriyel kandaki parsiyel CO_2 basıncının (PCO_2) fizyolojik sınırlarının üzerinde olmasıdır ve hiperkapni hücresel fonksiyonlar üzerinde olumsuz etki gösterir (24-27).

Serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin oluşumundaki artış ya da yok edilmelerindeki azalma organizmada oksidatif dengenin bozulmasına sebep olur ve oksidatif stres oluşur (28-31). ROS lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA gibi biyomoleküller ile reaksiyona girerek mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna ve hücre membran hasarına neden olur (32-35).

Organizmada süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-Rx), vitamin A, E ve C, flavonoidler ile çinko (Zn^{++}), bakır (Cu) ve selenyum (Se) gibi eser elementler enzimatik ya da enzimatik olmayan yollarla antioksidan etki göstererek serbest

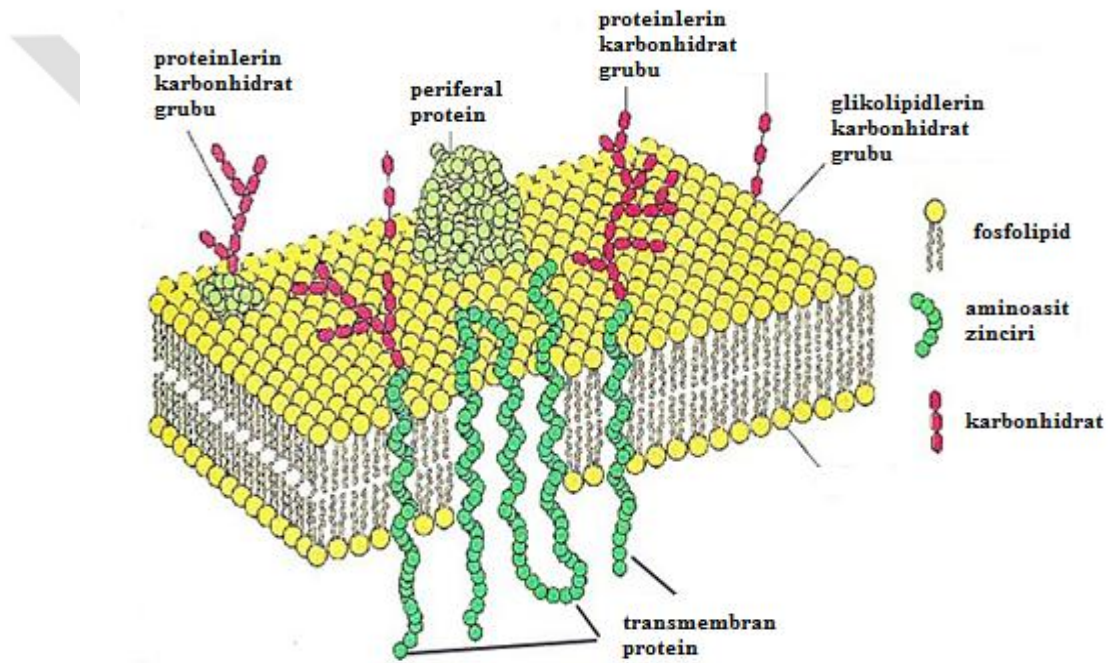
radikaller ile reaksiyona girer ve serbest radikallerin başlattığı zincir reaksiyonlarını durdurur ve böylece hücresel yapıların zarar görmesini engeller (36-38). Zn^{++} , metalloenzimler ve metalloproteinazların yapısına katılarak, moleküllerarası etkileşimlerde yapısal ve düzenleyici rol oynar (39, 40). Se, selenyum bağımlı GSH-Px, iyodotironin deiyodinaz ve tiyoredoksin redüktaz (TrxR) gibi selenoproteinlerin yapısına katılarak reaktif oksijen türlerinin yol açtığı oksidatif hasara karşı lipidleri, DNA, RNA gibi biyomolekülleri ve hücre membranını korur (41-43). GSH, organizmada tiyol grubu içeren, enzimatik reaksiyonlar aracılığı ve serbest radikalleri temizleme özelliği ile hücre membranını lipid peroksidasyonuna karşı koruyan bir antioksidandır (44-47).

Hipoksi ve hiperkapninin etki mekanizmaları üzerine bazı çalışmalar olmasına rağmen, insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK293) hipoksi-hiperkapni-oksidatif stres ilişkisi ve TRPM2 kanalları üzerinde hipoksi ve hiperkapninin etkileri ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Tez çalışmamızda hipoksi ve hiperkapniye maruz kalan insan embriyonik böbrek hücre (HEK293) membranında TRPM2 kanalları üzerinde oksidatif stresin etkisini ve çinko, selenyum ve glutatyonun antioksidan etkilerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

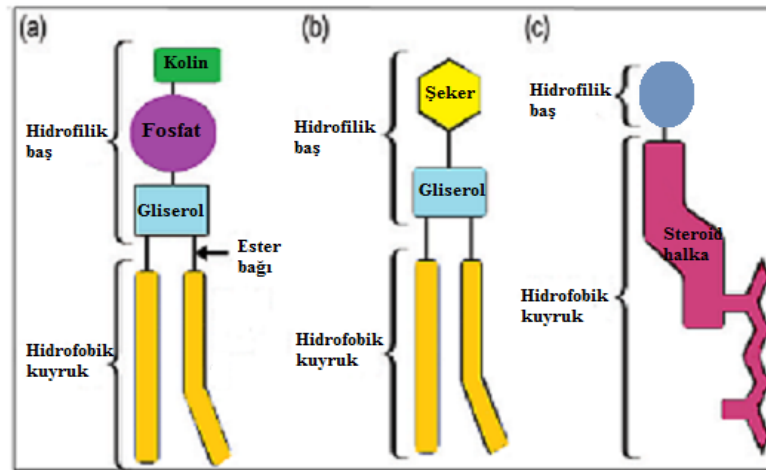
2.1. HÜCRE MEMBRANI VE YAPISI

Hücre membranı, hücre bütünlüğünü sağlayan 7,5-10 nm kalınlığında, elastik bir yapıdır ve lipid, protein ve karbonhidratlardan oluşur. Hücre membranı için 1972’de Singer ve Nicholson tarafından öne sürülen akışkan membran modeli kabul görmektedir. Bu modele göre; hücre membranı, akışkan bir özellik gösterir ve proteinler bu yapılar içine mozaik gibi serpilmiş durumdadır (Şekil 2.1) (48-51).



Şekil 2.1: Hücre membranın yapısı (52).

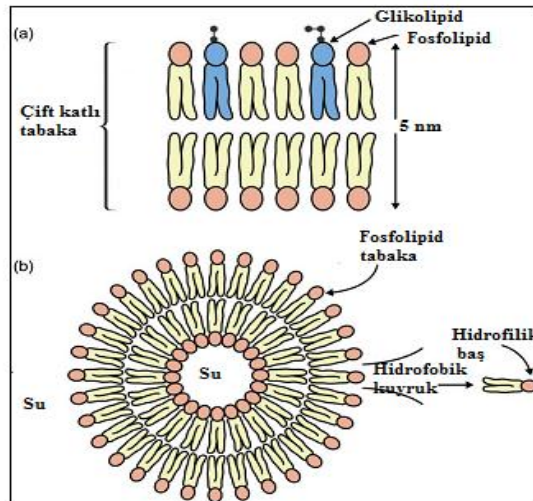
Hücre membranın temel yapısını çift katlı lipid tabakası oluşturur. Hücre membranda fosfolipid, glikolipid ve steroidlerin varlığına rağmen, membran genellikle fosfolipid tabakası olarak tanımlanır. Lipid tabakası, hidrofilik ve hidrofobik iki uca sahip fosfolipid moleküllerinden oluşur. Çift katlı lipid ve fosfolipid molekülleri bir iskelet üzerine yerleşmiş halde polar bir yapıya sahiptir. Fosfolipidler, fosfat içeren hidrofilik baş bölgesi ile yağ asidi içeren hidrofobik bir kuyruk bölümüne sahiptir. Ayrıca gliserol ve fosfat gruplarından oluşan iki yağ asidi zinciri bulundurur (Şekil 2.2) (48-50, 53).



Şekil 2.2: Hücre membran lipidlerinin türleri (50).

(a) Fosfotidilkolin, gliserofosfolipid (b) Glikolipid (c) Stereoid

Bütün hücre membran lipidleri amfipatiktir; hidrofilik baş ve hidrofobik kuyruk içerirler. Fosfolipid molekülleri sıvı içinde bulunduklarında, hidrofilik başlar hücre membranının intrasellüler ve ekstrasellüler ortamında su molekülleri ile temas halindedir. Hidrofobik kuyruk bölümü ise su tarafından itilirken birbirlerini elektriksel olarak çekerler. Böylece hücre membranı su içerisinde ortada birleşme eğilimi gösterir ve lipid bakımından zengin *misel* adı verilen bir yapı oluşur (Şekil 2.3) (48-50, 53).



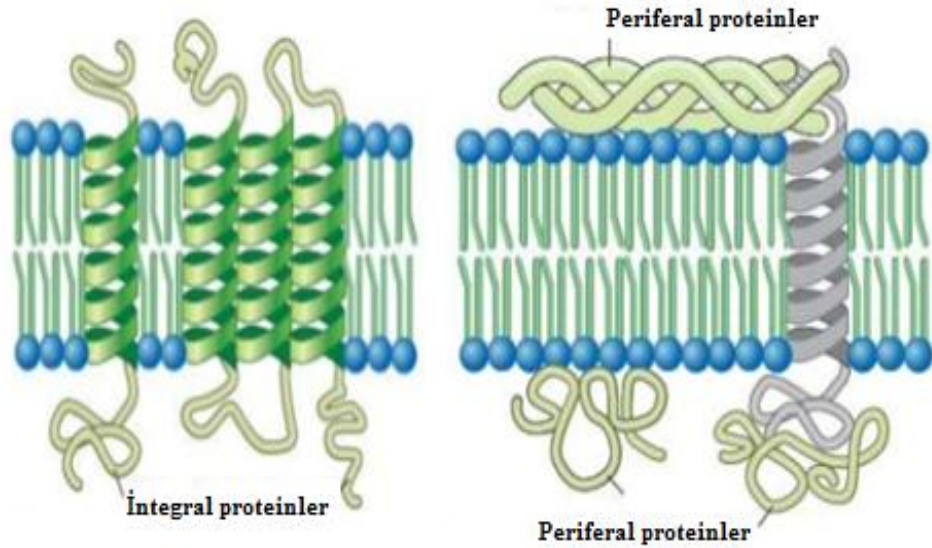
Şekil 2.3: Hücre membran lipidlerinin misel oluşurması.

(a) Çift katlı tabaka.

(b) Hidrofobik kuyruk ve hidrofilik uç bölümünün su içerisinde yerleşimi (50).

Lipidlerin hidrofilik baş gruplarının elektriksel özelliklerinden dolayı lipidler, çözelti içindeki artı yüklü katyonları çekme eğilimindedir. Bu nedenle hücre membranı çift katlı bir tabaka oluşturur. Hücre membranınin çift katlı lipid tabakası, sıvı - kristal özellik gösterir; hareketlilik, kararsızlık ve akıcılık gibi akışkanlara özgü özelliklerin yanı sıra kristallere özgü düzenlilik ve organizasyon gibi özelliklere de sahiptir. Hücre membranınin lipid çift tabakasında lipidlerin dağılımının farklı olması ve polipeptit zincirlerin asimetrik yapıya sahip olmalarından dolayı membran yapısı da asimetrik özellik gösterir. Bu nedenle hücre membranınin iki tarafı birbirinden farklı özelliğe sahiptir (48, 49, 51, 53). Lipid tabaka glikoz, iyonlar ve üre gibi suda eriyen maddeleri geçirmezken, oksijen (O_2), karbondioksit (CO_2) ve alkol gibi yağda kolay eriyen maddeleri geçirir ve hücre yapısının korunmasında önemli rol oynar. Hücre membranı üzerine gömülü halde bulunan kolesterol molekülü, lipid tabakanın vücut sıvılarındaki suda eriyen maddelere karşı geçirgenlik derecesini belirlemenin yanı sıra membranın akıcılığını azaltarak hücre membranıni stabilize eder (48, 49, 53).

Hücre membranında bulunan proteinler, hücre membranınin bir tarafından diğer tarafına geçen integral (içsel) proteinler ve yüzeyde bulunan periferel (yüzeyel) proteinler olmak üzere iki guruba ayrılır (Şekil 2.4) (48, 49).



Şekil 2.4: İntegral ve periferel proteinler (54).

Sulu çözeltilerde çözünmeyip, hidrofobik etkileşimleri bozan deterjanlar ve organik çözücüler ile çözünen integral proteinler; su moleküllerinin, suda eriyen maddelerin ve iyonların ekstrasellüler ve intrasellüler ortam arasında geçişini sağlayan seçici geçirgen kanalları oluştururlar. Bazı integral proteinler, taşıyıcı protein olarak işlev görüp hücre membranından geçemeyen maddelerin aktif taşıma ile lipid tabakadan geçişini sağlarken, bazıları ise enzim ya da reseptör olarak görev yapar. Periferik proteinler sulu çözeltilerde çözünen, ortam pH'ı değiştiğinde hücre membranından ayrılabilen proteinlerdir. Ayrıca periferik proteinler, enzim işlevi ile hücre membranından madde geçişini kontrol eden moleküller olarak da görev yaparlar (54, 55).

Hücre membranında lipid ve proteinlerin dışında hücrenin dış yüzeyine tutunan karbonhidratlar bulunmaktadır. Karbonhidratlar, hormonların bağlanması için reseptör olarak da görev yaparlar (48, 49, 53, 55).

2.1.1. Hücre Membranının Biyofiziksel Özellikleri

2.1.1.1. Hücre Membranının Kapasitans Özelliği

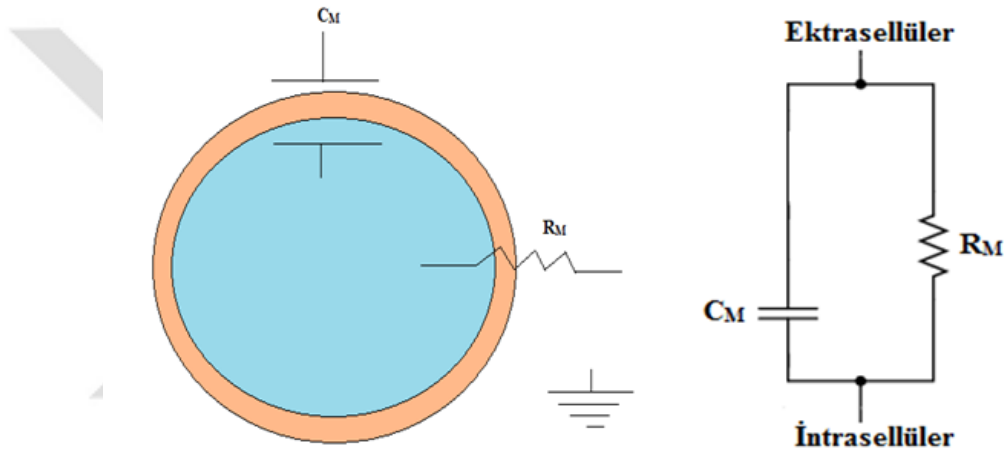
Elektriksel yük depolama özelliği olan kapasitör, farklı polaritelere sahip iki iletken yüzey ve aralarında bulunan yalıtkan bir tabakadan oluşur. Kapasitörün bir yüzeyinde pozitif yükler toplanırken, negatif yükler de elektrostatik çekim kuvvetine göre kapasitörün diğer yüzeyinde toplanır. İki yüzey arasında bulunan yalıtkan madde kalınlığı, dielektrik kalınlık olarak ifade edilir ve elektriksel yüklerin birbirine temas etmesini engeller (51, 52, 56, 57). Böylece pozitif ve negatif yükler elektrostatik çekim kuvveti sayesinde, farklı yüzeylerde depolanmış olur. Kapasitörün yüzeyi ne kadar geniş olursa ve yalıtkan madde varlığında iki yüzey birbiri ile temas etmeden ne kadar yakın olursa, karşılıklı çekim kuvveti o kadar artacağı için kapasitörün depolayacağı yük o seviyede artar. Bir kapasitörün yüzey alanı ve dielektrik kalınlığı sabit tutulduğunda, potansiyel farkı ile orantılı olacak şekilde depolayabileceği elektriksel yük miktarı kapasitans olarak tanımlanır. İyon kanalları değişken direnç özelliğine sahipken 7,5 - 10 nm kalınlığında olan hücre membranı elektriksel açıdan yalıtkan özelliğe sahip çift katlı lipid tabakası içerir ve bu nedenle kapasitör gibi görev yapar (48, 54, 56, 58-60).

Hücre membranının kapasitansı, C_M olarak tanımlanır. $C_M \cong 0,4 - 1,0 \mu F/cm^2$ gibi büyük bir kapasitansa sahip olan hücre membranının iki yüzeyinde, hücre içi ve

hücre dışında pozitif ve negatif yükler elektrostatik çekim kuvvetine göre dizilmişlerdir. Böylece hücre membranı istirahat durumunda iken, hücre içi ve hücre dışı arasında potansiyel fark meydana gelir ve hücre membranı istirahat durumunda voltaj kaynağı gibi davranır (48, 56, 57, 60, 61).

2.1.1.2. Hücre Membranının Elektriksel Eşdeğer Devresi

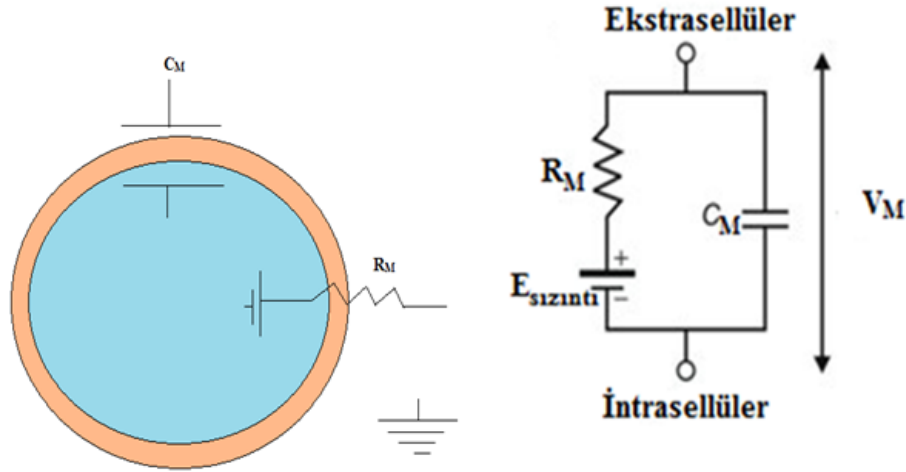
İntrasellüler ve ekstrasellüler sıvılar iyi birer iletkenidir ve yalıtkan çift katlı lipid tabakası ile birbirlerinden ayrılmıştır. Buna göre; hücre basitçe birbirine paralel bir direnç ve kapasitörden oluşan RC devresi olarak modellenenebilir (Şekil 2.5) (56, 59).



Şekil 2.5: Pasif RC hücre eşdeğer modeli (56).

R_M ; Membran direnci, C_M ; Membran kapasitansı.

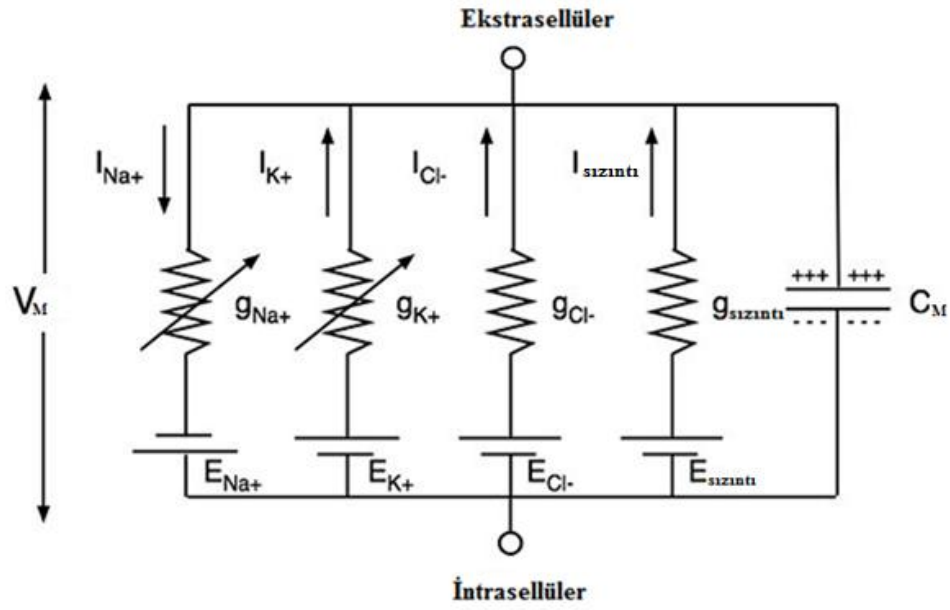
RC hücre modeli pasif bir devredir ve devrenin kutuplarına gerilim voltajı uygulandığı zaman doğrusal akım elde edilir. Hücre membranı istirahat durumundayken, çoğu iyon kanalı kapalı olmasına rağmen, bazı kapı içermeyen pasif iyon kanalları sürekli açık pozisyonudadır ve bu kanallar membran üzerinde sürekli bir sızıntı iletkenliği oluştururlar. RC hücre devresinden farklı olarak, sızıntı iletken ve batarya içeren bu devre istirahat membran potansiyeli (E_M) eklenerek yeniden düzenlenebilir (Şekil 2.6) (48, 50, 54, 56).



Şekil 2.6: Sızıntı iletken ve batarya içeren devre modeli (56).

İntrasellüler ve ekstrasellüler ortamda iyon konsantrasyonunun farklı ve hücre membranının negatif potansiyelde bulunmasından dolayı, iyonların elektriksel olarak birbirlerini çekme-itme özelliği kullanılıp hücre eşdeğer devre modellemesi yapılabilmektedir. İntrasellüler ve ekstrasellüler ortamlar arasındaki potansiyel farkından dolayı, sodyum (Na^+) iyonlarının hücre dışındaki konsantrasyonu hücre içine göre daha fazladır ve Na^+ iyonları hücre içine girme eğilimindedir. Potasyum (K^+) iyonları ise hücre içinde hücre dışına göre daha yüksek konsantrasyonda bulunduğu için hücre dışına çıkma eğilimi gösterirler (58, 60). İntrasellüler ortam ekstrasellüler ortama göre daha negatif olduğundan dolayı, Na^+ iyonunun elektriksel gradyanı ile kimyasal gradyanı aynı yöndedir. K^+ iyonlarının ise elektriksel gradyanı pozitif yüklü olmasından dolayı hücre içine doğrudur. Bu etkilerden dolayı hücre membranı istirahat durumundayken bile hücre içine doğru az da olsa Na^+ 'un, hücre dışına doğru ise çok az miktarda K^+ 'un sızıntısı söz konusudur (48, 49, 56, 60).

Sızıntı akımları ile beraber Na^+ , K^+ ve klor (Cl^-) kanallarını da içeren birbirine paralel bağlı potansiyel kaynakları ve bunlara seri bağlı dirençlerden oluşan hücrenin eş değer devre modeli Şekil 2.7'de görülmektedir (48, 56).



Şekil 2.7: Uyarılabilir hücrenin eş değer devre modeli (62).

C_M ; hücre membran kapasitansı; E_M ; istirahat potansiyeli, E_{iyon} ; her bir iyonun denge potansiyeli, I_{iyon} ; iyon akımı, g ; iletkenlik olmak üzere:

$E_M > E_{iyon}$	$I_{iyon} > 0$	İyonlar hücre dışına çıkma eğilimindedir.
$E_M = E_{iyon}$	$I_{iyon} = 0$	Hücre membranından iyonlar pasif olarak geçer
$E_M < E_{iyon}$	$I_{iyon} < 0$	İyonlar hücre içine girme eğilimindedir.

$$g_{sızıntı} \ll g_{K^+}, g_{Na^+} \text{ ve } g_{Cl^-}$$

2.1.1.3. Hücre Membranın Kapı Özelliği - İyon Kanalları

İyon kanalları, hücre membranını boydan boya geçen, transmembran segmentler içeren glikoproteinler olarak tanımlanmaktadır. İyon kanalının yapısını oluşturan integral proteinler, iç tarafı polar ve yüklü gruplar ile kaplanmış, içi su dolu porlar oluşturmaktadır. Bu porlar genellikle bir iyonun boyutundan daha geniştir; ancak kanalın belirli bir bölgesinde bu alan iyon çapı kadar daralmaktadır. Bu nedenle iyon kanalının dar olan bölgesi iyonlar için seçici bir filtre olarak davranmaktadır (49, 56, 63). Hücre membranında iyon kanalları açık ve kapalı olmak üzere iki farklı konumda bulunurlar. İyon kanalının açılıp kapanmasını sağlayan değişiklikler, yüklü ya da dipolar yapıdaki voltaj sensörünü etkileyen elektriksel kuvvetler veya nörotransmitterlerin bağlanması sonucunda kimyasal değişikliklerin etkisi ile

gerçekleşir. İyon kanallarındaki kapılar, kanalın seçici geçirgenliğini kontrol eder. Bazı kanallarda kapılar, taşıyıcı protein molekülünün uzantısı olarak bulunurken, bazı kanallarda protein molekülünde yapısal değişiklik oluşturarak kanalı açma - kapama özelliği olduğu belirtilmektedir. İyon kanal kapıları açılıp- kapanma özelliğine göre üç gruba ayrılır (49, 50, 53):

1. **Voltaj bağımlı iyon kanalları:** Hücre içi ve hücre dışı arasındaki potansiyel farkına bağlı olarak, iyon kanalı kapısının moleküler yapısı ve kimyasal bağların durumu değişmektedir. Hücre membranının iç tarafının negatif yüklü olması, Na^+ kanalının kapalı olmasına katkı sağlar. Bunun tersi olarak, hücre membranının iç tarafındaki negatif yükün kaybolması yani polaritenin değişmesi iyon kanalı kapılarının açılmasına ve Na^+ iyonlarının hücre içine girmesine neden olur (48-50, 53, 64). Voltaj bağımlı Na^+ ve Ca^{++} kanalları depolarizasyon ile açılıp, hiperpolarizasyon ile kapanır. Depolarizasyon sırasında, voltaj bağımlı Na^+ kanallarına göre, voltaj bağımlı K^+ kanalları daha geç aktive olurlar ve bu süre içinde hücre membranının yeniden polarize olmasını sağlarlar. Depolarizasyon durumu devam ederken Na^+ kanalları inaktive olduğunda kanal kapanırken, K^+ kanalları açık kalır. Depolarizasyonda görülen aktivite azalması sadece depolarizasyona değil, aynı zamanda Ca^{++} kanallarında Ca^{++} iyonuna bağlı olarak da azalabilir. Voltaj bağımlı iyon kanalları voltaja bağlı olarak oldukça yavaş inaktive olurlar (49, 65).
2. **Kimyasal/ligand bağlı iyon kanalları:** Protein yapısındaki iyon kanal kapılarının bazıları kimyasal bir maddenin kendisine bağlanması sonucunda açılır. İyon kanalında kapıyı açıp kapatan moleküller, kimyasal bağlanmada değişikliğe neden olur (49, 56).
3. **Mekanik kapılı iyon kanalları:** Hücre membranında meydana gelen basınç ile açılıp kapanan kanallardır (48, 56, 64).

Hücre membranında bulunan iyon kanallarının en önemli biyofiziksel özelliklerinden birisi; hangi tip iyon kanalı ise o türdeki iyonla karşı seçici geçirgen davranıyor olmasıdır. İyon kanallarının seçici geçirgen özelliği, kanalın yapısı, çapı, elektriksel yükü ve iç yüzeyindeki kimyasal bağların özelliğine bağlıdır (49, 51, 56). İyon kanallarının seçiciliğinde kanal ile ilgili iyonun, hücre membranının her iki

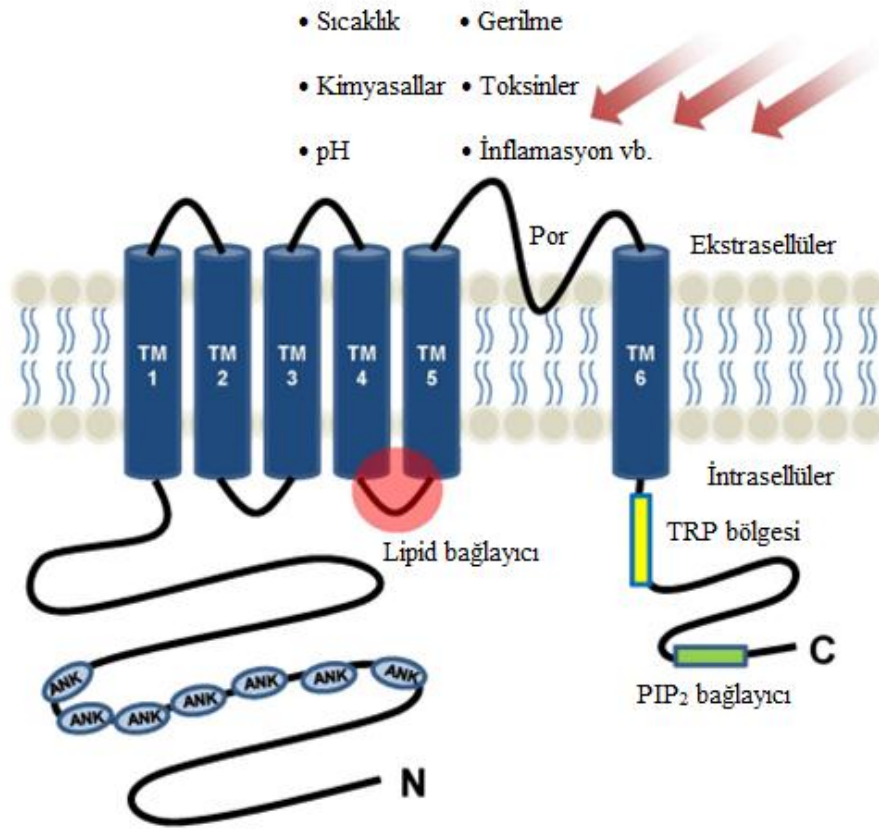
tarafında elektrostatik olarak birbirini itmeleri etkilidir. Na^+ , K^+ ve Ca^{++} gibi iyon kanallarının por bölgesinde yüksek afiniteli ve düşük afiniteli iyon bağlanma bölgesi olmak üzere iki bağlanma bölgesi bulunmaktadır. İyonlar kanallardaki bağlanma bölgelerine yarışmalı olarak bağlanır. Na^+ kanallarından katyonların geçişi sırasında kanal içinde yüklü bir karboksil grubunun bulunduğu ve geçişe yardımcı olduğu bilinmektedir. İyon kanalının en dar bölgesinde bulunan karboksil grubu asidik ortamda bir proton bağlar ve negatif yükünü kaybederek kanalı bloke eder. Hidroksil grupları ya da yapısında amino grupları içeren pozitif yüklü iyonlar karboksil grubu ile hidrojen bağı yapabildikleri için Na^+ kanalından geçebilirler. Metil grubu içeren, karboksil grupları ile hidrojen bağı yapamayan pozitif yüklü iyonlar bu kanaldan geçemez (48, 51, 56, 65). Her bir iyonun hücre içi ve hücre dışındaki konsantrasyonu iyon kanalının geçirgenliği için önemlidir. Belli bir potansiyelin üstünde bu iyonlar, konsantrasyon ve elektiriksel gradyanlarına bağlı olarak hücre içine girmeye ya da hücre dışına çıkmaya eğilimlidir (48, 49, 56, 65).

2.1.2. TRP Kanal Ailesi

Transient Receptor Potential (TRP) kanalları ilk olarak 1989 yılında *Drosophila melanogaster* türü sirke sineklerinin göz hücrelerinde bulunan fotoreseptörler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda keşfedilmiştir (1-3). Normal TRP proteini bulunduran sirke sineklerinden alınan elektroretinogram (ERG) sinyallerinde sürekli aydınlatmaya karşılık olarak hücrelerden alınan yanıtların da sürekli olduğu tespit edilmiştir (66, 67). TRP proteinini kodlayan genlerde ortaya çıkan spontan bir mutasyon sonucunda ışığa karşı sürekli voltaj yanıtı yerine geçici ‘*transient*’ bir voltaj cevabı ile beraber görsel bir defekt olduğu saptanmıştır (68-71). TRP geninin klonlanması ile TRP mutant genindeki eksik olan proteinin, Ca^{++} iyonunun hücreye giriş yollarından birisi olabileceği sonucuna varılmıştır (72-74).

TRP kanalları, N ucu ($-\text{NH}_3$), 6 segmentli transmembran bölgesi ve C ($-\text{COOH}$) ucu olmak üzere 3 temel bölgeden meydana gelmiştir. N ($-\text{NH}_3$) ve C ($-\text{COOH}$) terminal bölgeleri sitoplazmaya doğru yerleşmişlerdir. N ucunda tekrarlayan ankrin ve coiled-coil (sarmal-sarmal; cc) diye isimlendirilen yapılar yer alırken, C ucunda enzimatik nudiks kutu bölümü ve TRP homoloji alanı bulunur. İyonların geçişi, transmembran bölgesindeki 5. ve 6. segmentler arasından gerçekleşmektedir. Bu segmentler arasında bulunan iletken iyon etrafında homotetramerik ve heterotetramerik

yapılar vardır (Şekil 2.8). Transmembran segmentlerinden dördüncüsü pozitif yüklü olmama özelliği ile diğerlerinden ayrılır (1, 4, 71, 75, 76). Bütün TRP kanalları proteinkinaz A (PKA) ve proteinkinaz C (PKC) aktivasyonu sayesinde fosforilasyona uğrar ve yapısal değişiklik gösterir. TRP kanalları direkt plazma membranındaki Ca^{++} kanalları gibi davranmakta ya da Ca^{++} kanallarının modülasyonu için itici güç olan hücre membran potansiyelini değiştiren sitozolik serbest Ca^{++} kanallarında değişimi tetiklediği bilinmektedir (76, 77).



Şekil 2.8: TRP kanallarının yapısı (78).

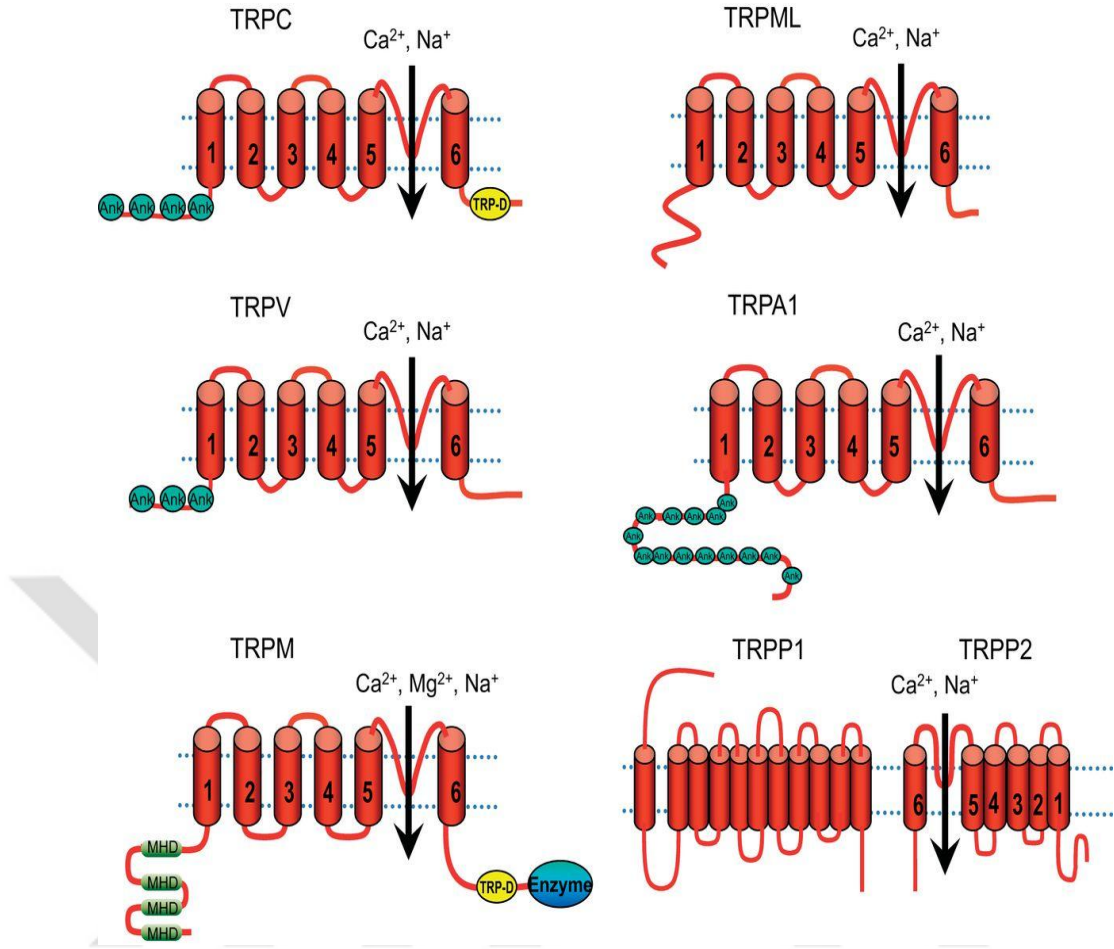
TRP kanallarının major alt ailerinde ısı, reseptör ve ligand yolu ile aktive olan, ayrıca Na^+ , K^+ , Ca^{++} ve Mg^{++} gibi iyonlara farklı seçici - geçirgen özellik gösteren kanalların varlığı bilinmektedir. Plazma membranında TRP kanallarının aktivasyonu, hücrelere Ca^{++} ve/veya Na^+ akışı sonucunda bu iyonların intrasellüler konsantrasyonunun artışı ve hücrelerin depolarizasyonunu sağlamaktadır. Hücre içi

organellerde bulunan TRP kanalları, kanallardan Ca^{++} iyonunun serbest kalmasında ve intrasellüler Ca^{++} konsantrasyonunun düzenlenmesinde rol oynar (1, 71, 78).

TRP kanalları solucan, sirke sineği, zebra balığı, fare ve insan gibi uyarılabilir ve uyarılamayan çok farklı doku ve hücre türlerinde yaygın olarak eksprese edilir. TRP kanalları tat iletimi, sıcaklığın algılanması, Ca^{++} , Mg^{++} iyonlarının geri Emilimi, osmoregülasyon gibi homeostatik fonksiyonlar, hücre hareketliliği ve kas kasılması gibi pekçok sensör fonksiyonları içeren biyolojik rollere sahiptirler (1, 79, 80).

TRP kanallarının 6 tip alt türü vardır (Şekil 2.9):

- TRPC (Transient Receptor Potential Canonical): 7 alt aile
- TRPV (Transient Receptor Potential Vanilloid): 6 alt aile
- TRPP (Transient Receptor Potential Polycystin): 3 alt aile
- TRPML (Transient Receptor Potential Mucolipin): 3 alt aile
- TRPA (Transient Receptor Potential Ankyrin): 1 alt aile
- TRPM (Transient Receptor Potential Melastatin): 8 alt aile (2, 3, 71).



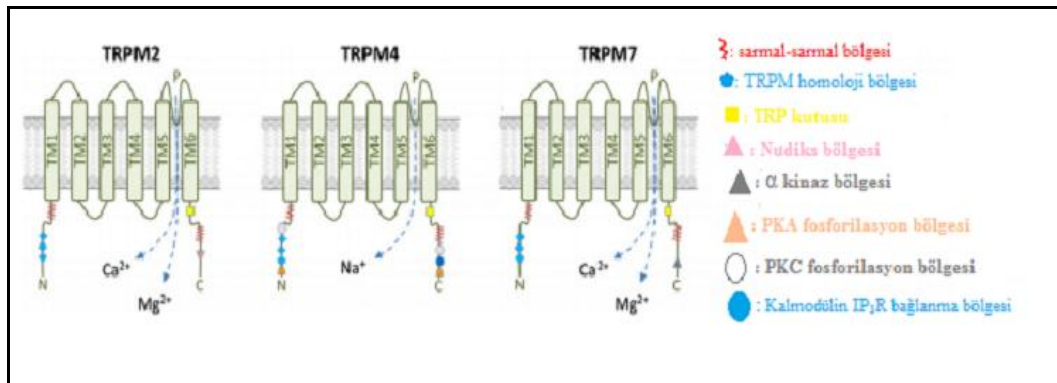
Şekil 2.9: TRP kanallarının yapısı ve alt aileleri (80).

2.1.2.1. TRPM Kanalları

TRP-melastatin alt ailesi (TRPM), tümör supresör melastatin (TRPM1) olarak adlandırılır ve memelilerde TRPM2/TRPM8, TRPM1/TRPM3, TRPM4/TRPM5 ve TRPM6/TRPM7 olmak üzere 4 homolog (biri diğerinin yerine geçen) çifte bölünen sekiz alt üye içerir. TRPM alt aile üyeleri N ucu, TRPM homoloji bölgesi veya MHD olarak tasarlanmış 4 gergin rezidü ile karakterizedir. Ayrıca, TRPM proteinleri, transmembran segmentinin yanında C ucu ile TRP bölgesini içerir. TRPM6 ve TRPM7 fonksiyonel C ucu serin kinaz veya treonin kinaz içerirken, TRPM2 adenin difosfat riboz (ADPR) pirofosfataz faaliyeti gösteren fonksiyonel NUDT9 homoloji bölgesi içerir. Çeşitli TRPM kanallarının (TRPM1-6 ve TRPM8) uzun protein olarak ya da biyolojik yapısına katkı sağlayan kısa varyantları veya izoformları eksprese edilmiştir. Bu varyantların, TRPM kanallarının iyon seçiciliği, fonksiyonu ve kanal lokalizasyonunda önemli rol oynadığı ifade edilmektedir (1, 2, 80).

TRPM kanal aktivitesindeki değişiklikler, patolojik olayların başlamasını tetikleyerek fizyolojik fonksiyonlar üzerinde olumsuz etki gösterir. TRPM kanalı alt ailelerinin bazı üyelerinin aktivitesi, oksidatif stres aracılığı ile düzenlenir. TRPM ailesinde oksidatif stresin en çok etkilediği 3 üyesi TRPM2, TRPM4 ve TRPM7'dir. Bu kanallar, hem birçok normal fizyolojik süreçte hem de çeşitli hastalıklarda etkilidirler. Reaktif oksijen türleri (ROS), hücrel homeostazı bozarak fonksiyonel değişikliğe neden olurlar ve böylece TRPM kanallarının fonksiyonlarını düzenleyebilirler. Bu nedenle, bu kanallar tarafından düzenlenen çeşitli süreçler, oksidatif stres aracılığı ile patolojik fenotipi oluşturularak değiştirilir. Normal hücrel fonksiyonlarda hücre içi ROS'da orta derecede artışlar olurken, hücre içi oksidatif streste büyük artışlar çeşitli hastalıkların belirtici olarak ifade edilmektedir (2, 78, 79).

Ca^{++} geçirgenlikleri farklılık gösteren TRPM kanallarının fonksiyonel yapıları tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, TRPM4 ve TRPM5'in ısıya duyarlı, TRPM2'nin ADPR, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve sıcaklığın değişimi ile aktive olduğu bilinmektedir (Şekil 2.10). TRPM3, TRPM6 ve TRPM7 kanallarının aktivasyonunun hücre içi magnezyum (Mg^{++}) seviyesi ile düzenlendiği, TRPM8 kanalının ise mentol ve düşük sıcaklık ile aktive olduğu, antranilik asit (ACA) uygulandığında ise inaktive olduğu tespit edilmiştir (1, 71).

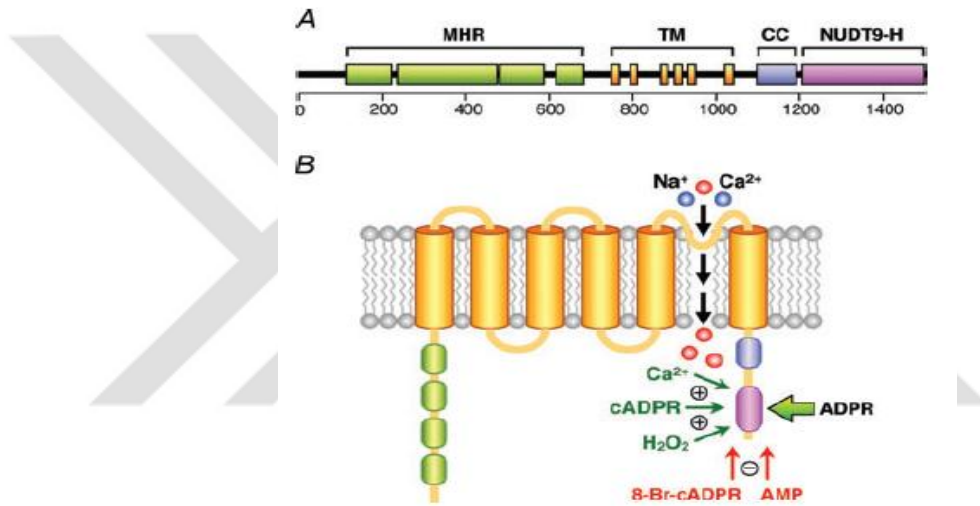


Şekil 2.10: TRPM kanallarının yapısı (2).

TM1-6; Transmembran segmenti, **N;** NH_3 bölgesi, **C;** $COOH$ bölgesi, **P;** Por bölgesi.

2.1.2.2. TRPM2 Kanalı ve Özellikleri

TRPM2 kanalı, iki değerlikli Ca^{++} ve Mg^{++} iyonları ile tek değerlikli Na^+ ve K^+ iyonlarına geçirgen, seçici olmayan bir katyon kanalıdır. TRPM2 kanalı, 1503 amino asitten oluşan, 170 kDa ağırlığında olan bir proteindir. Hücre içine yerleşmiş N ve C ucuna sahip olan TRPM2 kanalının N ucu fonksiyonu bilinmeyen dört homoloji bölgesi (MHR), IQ gibi motifin bağlandığı kalmodülin (CaM) bölgesi ve bunu takip eden 6 transmembran segmenti (TM: S1-S6) içerir. TRPM2'nin C ucu TRP kutusu, sarmal bölgesi (cc) ile nudiks hidrolaz (NUDT9-H) homoloji bölgesi içerir ve 5.-6. segmentleri arasında por halkası yerleşmiştir (Şekil 2.11A) (1, 2, 79).



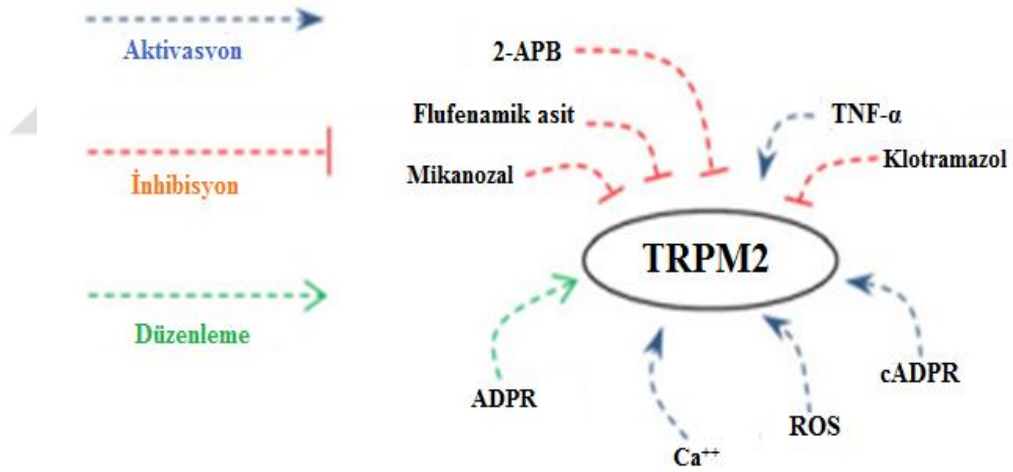
Şekil 2.11: TRPM2 kanalının protein yapısı ve transmembran topolojisi (1).

A. TRPM2 protein yapısı. **B.** TRPM2 transmembran topolojisi

TRPM2 kanalının aktivasyonu üzerine Ca^{++} , H_2O_2 , siklik ADPR (cADPR), reaktif oksijen türleri, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NAADP), araşidonik asit, amiloid β -peptid, konkanavalin - A, sıcaklık ve tümör nekroz faktör alfanın ($\text{TNF-}\alpha$) etkili olduğu belirtilmektedir. Bunlardan bazıları direkt kanal proteini üzerine etki ederken, bazıları ise reaktif oksijen türleri gibi mitokondriden ADPR salınımını tetikleyerek indirekt yolla etki gösterirler (2, 3, 79, 81-83). İntrasellüler ADPR pirofosfataz, TRPM2 kanalının hücre içine bakan C ucundaki NUDT9-H bölgesine enzimatik olarak bağlanarak, ADPR'nin adenosin mono fosfat (AMP) ve riboz 5-fosfata dönüşümünde fonksiyon gösterir. Hücredeki oksidatif hasarın temsilcisi olan ADPR'un TRPM2 aktivasyonunu indüklemesi, intrasellüler Ca^{++} konsantrasyonuna güçlü bir

şekilde bağlıdır. Ca^{++} bağımlı bu TRPM2 aktivasyonu, Ca^{++} duyarlı protein CaM aracılığı ile gerçekleşir (3, 84-87). Ayrıca H_2O_2 , tert-bütil-hidroperoksit (tBuOOH) ve ditiyonit oksidanları ekstrasellüler, ikinci mesajcı araşidonik asit, ADP-riboz (5'-difosforiboz) veya NAADP intrasellüler uygulandığında TRPM2 aktivasyonunu başlattığı gösterilmiştir. Ca^{++} , H_2O_2 ve cADPR ADPR'nin TRPM2 üzerine olan etkisini kolaylaştırır. AMP, ADPR aracılığı ile TRPM2'nin düzenlenmesine negatif etki ederken, 8-brom siklik adenosin difosfat riboz (8Br-cADPR), cADPR ve H_2O_2 aracılı etkiyi inhibe eder (Şekil 2.11B) (1, 2, 3, 81, 82).

2-aminoetoksi difenolborat (2-APB), hızlı ve geri dönüşümlü olarak TRPM2 kanalının inhibisyonunu sağlarken; flufenamik asit, mikanozal ve klotramazol ise geri dönüşümsüz olarak kanalın inhibisyonuna neden olur (Şekil 2.12). Ayrıca ekanazol, mefanamik asit (MFA), niflumik asit (NFA), ACA ve çinkonun TRPM2 kanalının blokeri olarak davrandığı belirtilmektedir (88-92).



Şekil 2.12: TRPM2 kanalları üzerinde etkili oksidatif stress aracılı aktivasyon, inhibisyon ve düzenleyici ajanlar (2).

0.13-1.13 $\mu\text{mol/l}$ olan intrasellüler serbest Ca^{++} seviyesi, ekstrasellüler ortama göre 20,000 kat daha azdır. Metabolik atıklar sonucu üretilen H_2O_2 hücre içersine girerek TRPM kanallarını aktive eder ve hücre içersine Ca^{++} iyonu girişini artırır (71, 88-90). Diğer bir görüşe göre; H_2O_2 'in nükleus, mitokondri gibi hücre içi organellerde ADPR sentezini arttırdığı ve ADPR aracılığı ile TRPM2 kanalının aktive olduğu ifade edilmektedir (6, 7, 8, 85, 90). İntrasellüler Ca^{++} iyonunun artışı apoptoza kadar ilerleyen

fizyopatolojik olayların başlatıcısıdır. İntrasellüler ortama Ca^{++} iyonun girişini sağlayan TRPM2 kanallarının aktivasyon ve inhibisyon mekanizmalarının araştırılması, hücre içi Ca^{++} iyonunun artışına bağlı olarak ortaya çıkan pek çok hastalığın oluşum mekanizmasının bilinmesi açısından önem taşımaktadır (91-94).

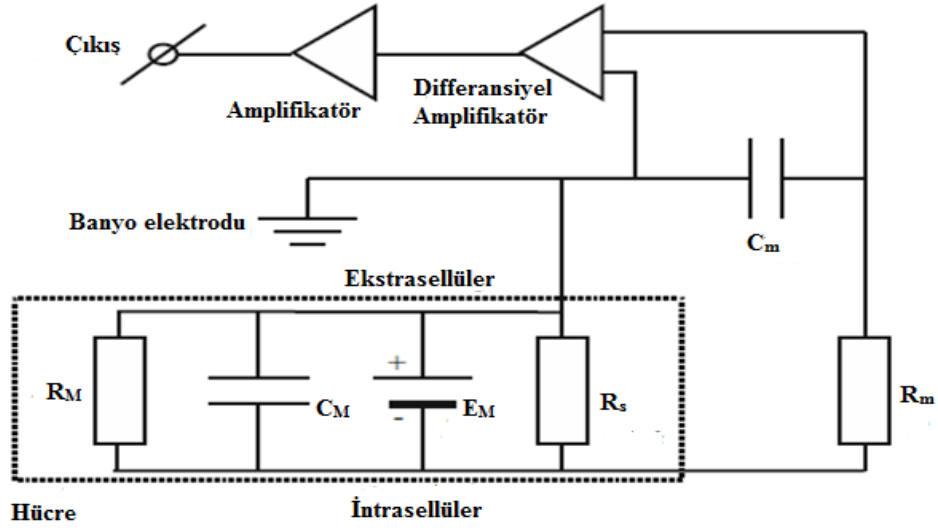
2.2. ELEKTROBİYOFİZİKSEL TARİHÇE VE HÜCRE KAYIT TÜRLERİ

Hücreler ve çoğu hücreyel organellerin bileşenleri nanoskala boyutunda yapılara sahiptirler. Endoplazmik retikulum, nükleus, mitokondri membranı, golgi aygıtı, mikrotübüller, aktin ve miyozin filamentleri gibi bütün hücreyel yapılar sadece elektron mikroskobu veya 100 nm'den daha düşük oranda detaylı çözünürlük sağlayan teknikler ile görüntülenebilirler (56, 95, 96). Hücre membranı, hücre sitoplazmasını içinde bulunduğu ekstrasellüler ortamdan 10 nm'lik bir yapı ile ayırır. Çift katlı lipid tabakasından oluşan hücre membranı, bu tabakaya gömülü halde çeşitli hücreyel tanınma fonksiyonlarında görevli olan proteinler içerir. Bu hücreyel fonksiyonların pek çoğu sitoplazma ve hücreyel fonksiyonların değişimde rol oynayan iyon kanallarının hücre içi ve hücre dışı ortam arasında kimyasal transportunu sağlayarak gerçekleşir. Nanoskala boyutundaki iyon kanalları, hücre membran potansiyelinin değişimini sağlayarak, ekstrasellüler pH'ı değiştirir. Bunun sonucunda, iyon kanalları mekanik stresle ya da intasellüler - ekstrasellüler ligand kapıları ile farklı iyon türlerine seçicilik gösterirler. Hücre membranlarının elektrobiyofiziksel özellikleri ve iyon kanallarından geçen akımların araştırılmasının temeli olarak; aksiyon potansiyelinin kaydedilmesi kabul edilmektedir. İlk defa cam mikroeletrot kullanarak hücre içi aksiyon potansiyelinin kaydedilmesi 1939'da Hodgkin grubu ve sonrasında 1940 yılında Cole ve Curtis grubu tarafından başarılmıştır. Hücre içi aksiyon potansiyelinin kaydedilmesinden sonra, hücre membranından geçen iyon akımlarının ölçülmesini sağlayan tek yöntem olan voltaj klamp tekniği Hodgkin grubu tarafından keşfedilmiştir ve bu keşif ile 1963 yılında Nobel ödülü almışlardır (56, 64, 96). Hodgkin grubundan Katz, diğerlerinden farklı olarak hücre membranının tam olarak homojen bir yapıya sahip olduğunu belirten iletkenlik artışı ifadesi yerine, iyon kanalı aktivitelerinin etkin olduğunu savunmuştur. Bu yüzden, çalışma ekibinden ayrılarak nöromusküler kavşak ile ilgili çalışmalara yoğunlaşmıştır ve bu teorisini ispat ederek 1970 yılı Nobel ödülünü almıştır. Katz'ın öğrencilerinden Sakmann ile Neher, Katz'ın teorisini geliştirerek iyon kanallarına ait birim iletkenliği kayıt etmeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla, cam

mikroelektrotları kas dokusuna temas ettirip küçük bir alanda tek bir iyon kanalını izole ederek iyon akımını kaydetmeyi amaçlamışlardır. Fakat, iyon akımı çok küçük olduğu için, mikroelektrot kenarında meydana gelen sızıntı akımının elektronik gürültü içinde kaybolup temiz bir kayıt alınması başılamamıştır. Neher, sızıntı akımını yok etmek için mikroelektrot içine negatif basınç uyguladı ve böylece ilk kez tek iyon kanalının akım kaydını başarılı bir şekilde gerçekleştirmiştir. Bu tekniği “*patch clamp*” olarak adlandırdılar ve bu çalışmalarıyla 1991 yılında Neher ve Sakmann, Nobel ödülü almışlardır (48, 56, 64).

2.2.1. İntrasellüler Kayıt

Patch Clamp sistemine geçmeden önce, elektrobiyofiziksel kayıt yöntemlerinin temeline basit bir örnek olarak, intrasellüler kayıt verilebilir. İntrasellüler kayıt, cam mikroelektrot yardımı ile hücre membranının içine girilmesi ile gerçekleştirilir. Hücre membranının her iki tarafında; birisi intrasellüler ortam, diğeri ekstrasellüler ortam olan banyo solüsyonunda bulunan ve birbirleri ile temasta olan iki mikroelektrot ile hücre membran potansiyeli doğrudan ölçülebilir. Hücre membranına mikroelektrot ile girilmesi sonucunda oluşabilecek hücre membran hasarını en aza indirmek için ucu sivri ve uç çapı nanometre boyutunda olan cam mikroelektrot kullanılması gerekir. Mikroelektrodun hem elektriksel iletkenliği hem de mikroelektrot içindeki sıvı ile sitoplazmanın etkileşiminden dolayı mikroelektrot uç çapı belirli sınırlar arasında tutulmalıdır. İntrasellüler kayıt için eşdeğer devre Şekil 2.13’de gösterilmiştir (48, 95-98).



Şekil 2.13: İntrasellüler kayıt eşdeğer devresi (95).

R_M ; Hücre membran direnci, C_M ; Hücre membran kapasitansı, E_M ; Hücre membran potansiyeli, R_s ; Sızıntı direnci, R_m ; Mikroelektrot direnci, C_m ; Mikroelektrot kapasitansı.

İntrasellüler kayıta, mikroelektrot ve sitoplazma arasındaki elektriksel devrenin tamamlanması için cam mikroelektrot hücre içine girmiştir. Bu şekilde, banyo elektrodu ve mikroelektrot arasındaki potansiyel fark direkt hücre membran potansiyelini yansıtır. Bütün eşdeğer devrelere uygulanabilen bu model için bazı değerlendirmeler söz konusudur:

1. **Mikroelektrot direnci:** Mikroelektrot uç çapının küçük olması, direnci artırır. Mikroelektrodu doldurmak için yüksek iletkenlikte intrasellüler ortam solüsyonu kullanılarak direnç düşük seviyede tutulur ve bu solüsyon prob ile bağlantı oluşturur. İntrasellüler kayıta küçük hücreler için 15-150 MΩ arasında yüksek dirençli mikroelektrotlar kullanılır. Mikroelektrot direncinin hücre membran potansiyeline etkisini gösteren Şekil 2.14'deki eşdeğer devreye göre, hücre membran potansiyeli differansiyel amplifikatörün girdisi ve mikroelektrot direnci ile düzenlenebilir. Differansiyel amplifikatörler, iki giriş arasındaki potansiyel farkını kaydeder. Kirchhoff Kanununa göre; seri dirençteki en büyük voltaj düşmesi en yüksek direncin üzerinde gerçekleşir. Bu nedenle, eğer probun giriş direnci

mikroelektrot direncinden çok yüksek ise, prop en fazla hücre membran potansiyelini gösterir ve prop direnci $1 \text{ G}\Omega$ 'dan yüksek olur. Buna göre;

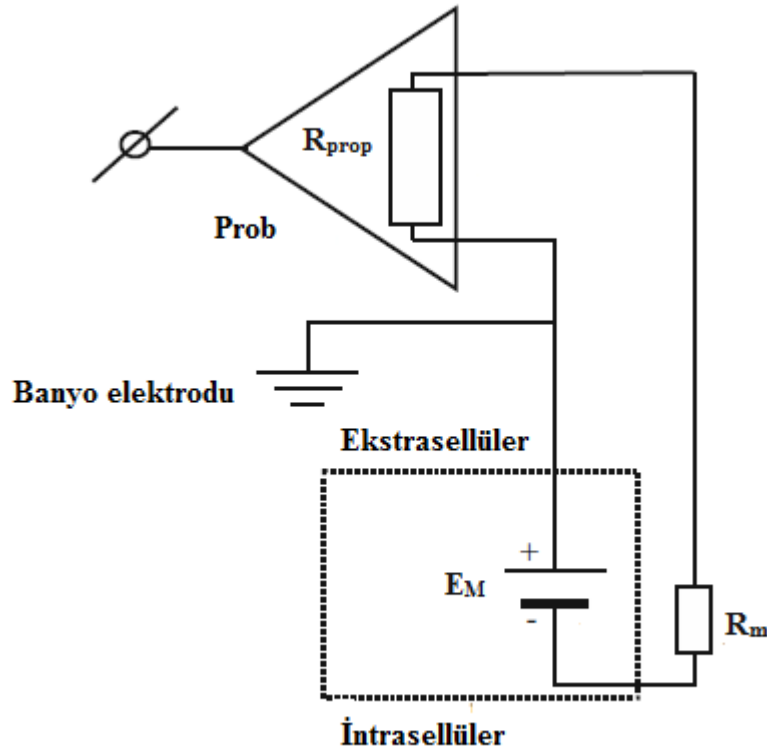
$$E_M = -60 \text{ mV}$$

$$R_m = 50 \text{ M}\Omega$$

$$R_{\text{prop}} > 1 \text{ G}\Omega$$

Total direnç: $1000 + 50 = 1050 \text{ M}\Omega$ olur. Probun göstereceği potansiyel en az;

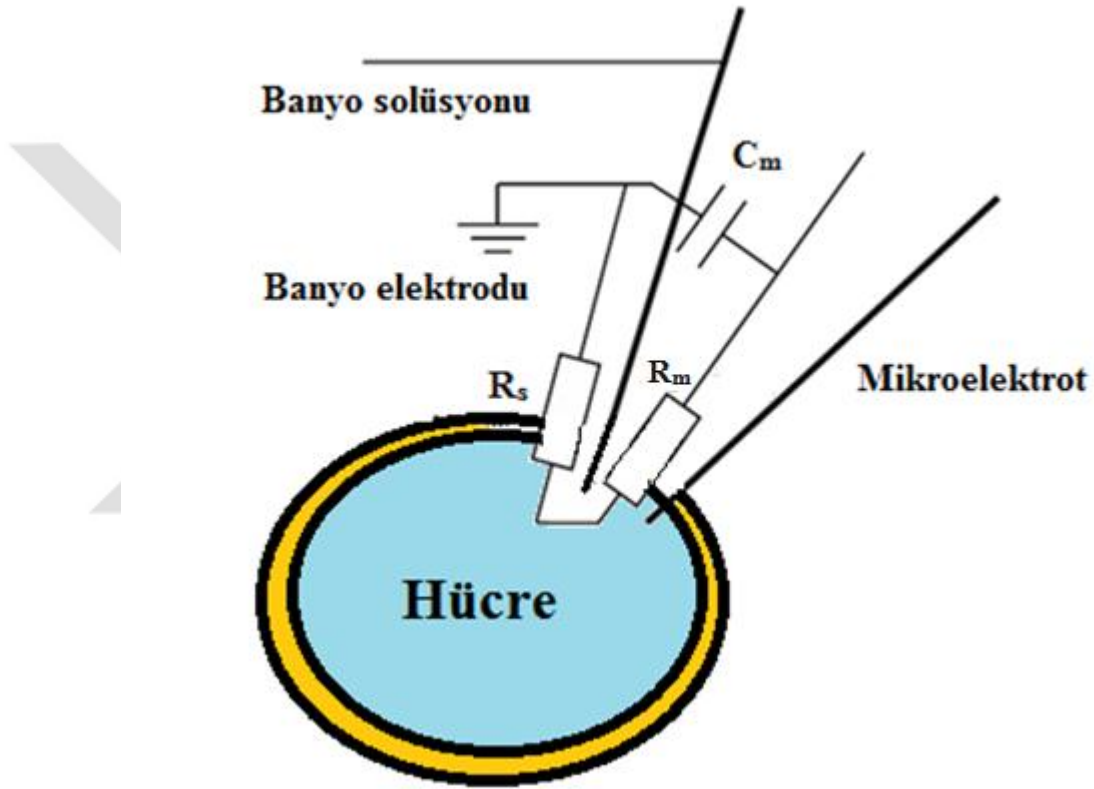
$$1000 \text{ M}\Omega / 1050 \text{ M}\Omega \times (-60 \text{ mV}) = -57,1 \text{ mV} \text{ olacaktır (95-97, 99).}$$



Şekil 2.14: İntrasellüler kayıttı hücre membran potansiyeline mikroelektrot direncinin etkisi (95).

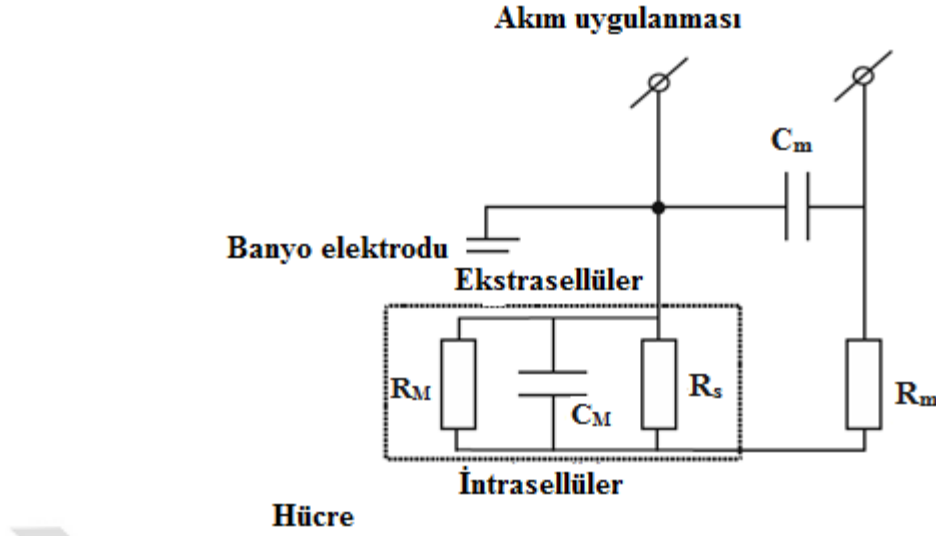
2. Mikroelektrot kapasitansı: Cam mikroelektrot, banyo solüsyonu ve mikroelektrot içindeki intrasellüler ortam solüsyonu arasında potansiyel değişimlerini geciktiren bir kondansatör oluşturur. Aksiyon potansiyeli gibi ani potansiyel değişiklikleri bu etkiyi değiştirir ve çoğu amplifikatör onun etkisini yok etmek için negatif kapasitanslı devre oluşturur. Bu devre sistemi mikroelektrot kapasitansı ile ayarlanabilir (95, 100, 101).

3. Sızıntı direnci: R_s sızıntı direnci, mikroeletrodun hücre membranına vermiş olduğu hasardan dolayı meydana gelir ve intrasellüler ortamdan banyo solüsyonuna kadar olan kısa devreyi etkiler (Şekil 2.15). Sızıntı direnci düşükse, hücre membran potansiyelinin işareti önemli olacaktır. Hücre membran potansiyeli daha az negatif olmaya başlayacaktır ve bu da hücre ölümüne neden olacaktır. Hücre membran hasarını minimum seviyede tutmak için mikroeletrodun hücreye teması sırasında çok dikkatli olunmalı ve R_s direnci maksimumda tutulmalıdır (95, 99, 100, 102).



Şekil 2.15: Hücre-mikroeletrot sistemi (95).

4. Akım uygulanması: Mikroeletrot yardımı ile hücreye küçük akım uygulayarak hücre membran direnci ve kapasitansı ölçülebilir. Hücre membran potansiyelinin değişimi kullanılarak, hücre membran direnci ve kapasitansı hesaplanabilir (Şekil 2.16) (95, 99, 101).



Şekil 2.16: İntrasellüler kayıta akım uygulanması (95).

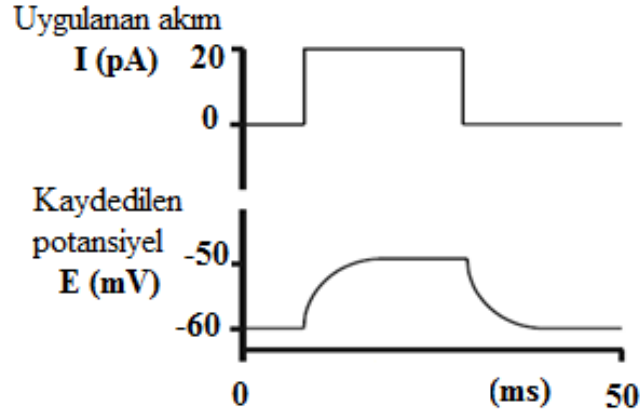
Akım uygulandığında, hücre membran potansiyelinin değişimi, devre direncine bağlıdır ve bu değişim Ohm Kanunu'na göre aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$E_M = IR$$

Akım sabit olduğunda voltaj değişimi, R_s ve R_M paralel dirençleri ile seri bağlı olan R_m direnci ile orantılıdır. R_m direnci, hücreye girmeden önce akım uygulanarak hücre membran potansiyel değişimini ölçmek için iyi bir yöntem olarak bilinir. Hücre membran direnci,

$$R_M = (E_M / I) - R_m \quad \text{eşitliği ile hesaplanır.}$$

Akım uygulanması ile kaydedilen hücre membran potansiyel değişimi Şekil 2.17'de gösterilmiştir. 20 pA'lık akım uygulanması 10 mV'luk potansiyel değişimi ile sonuçlanır. Bu durumda sistem direnci, $10 \text{ mV} / 20 \text{ pA} = 500 \text{ M}\Omega$ olur. Akım uygulanması sırasında, mikroelektrodun hücreye temas etmeden sadece banyo solüsyonunda olduğu durumda, direnç $50 \text{ M}\Omega$ olur. Sızıntı direnci ile birlikte hücre membran direnci $500 - 50 = 450 \text{ M}\Omega$ 'a eşit olur (95, 99, 101, 103).



Şekil 2.17: İntrasellüler kayıta akım uygulandığında oluşan potansiyel değişimi (95).

Mikroelektrot direnci $50 \text{ M}\Omega$ olduğunda hücre membran kapasitansını da içeren RC devresi kullanılarak hücre membran kapasitansı da benzer olarak hesaplanabilir. Hücre membran kapasitansına göre mikroelektrot kapasitansı çok küçük olduğu için mikroelektrot kapasitansı ihmal edilebilir. Burada, ani akım uygulanmasına karşı potansiyel grafiğinde yavaş değişim olduğu görülmektedir.

RC devresinin zaman sabiti τ ;

$$\tau = R_M C_M$$

$$C_M = \tau / R_M \quad \text{olarak ifade edilir (95, 99).}$$

2.2.2. Voltaj Klamp Yöntemi

Hücre membranından kayıt yapılması amaçlandığında kullanılan biyofiziksel kayıt yöntemlerinde çeşitli zorluklar ortaya çıkmaktadır. Birincisi, hücrelerin nanoskala boyutunda olmasından dolayı meydana gelen manipulasyon güçlüğüdür. İkincisi ise, biyoelektriksel sinyallerin zayıf olmasının yanısıra, tek kanal akımları da oldukça küçük olduğundan bu teknikler uygulama açısından en zor laboratuvar teknikleri arasında yer almaktadır. Zayıf akım kayıtlarının yapıldığı bu yöntemlerde, zayıf ve küçük olan sinyal çoğu zaman ortamdaki gürültü içinde kaybolabilir. Düzgün ve ortam gürültüsünden arındırılmış sinyal kaydı yapabilmek için iyi tasarlanmış kayıt sistemlerine ve gürültüden izole edilmiş ortamlara ihtiyaç vardır (48, 56, 64).

Elektrobiyofiziksel deneylerde yaygın olarak hücre membran potansiyeli ve hücre membranından geçen iyonik akımlar kaydedilir. Hücre membran potansiyeli ve hücre membranından geçen iyonik akımlar, seçici-geçirgen hücre membranının iki tarafı arasındaki iyon konsantrasyonu ve iyonların hücre membranı üzerinde hareketi ile oluşur. Hücre membranının iç kısmı, hücre dışına göre daha negatif potansiyele sahiptir. Hücre membran potansiyelinin değişimi, hücresel fonksiyonlarda kritik role sahip olduğu için bu potansiyelin ölçülmesi büyük önem taşır. İyon kanallarının aktivitesi, iyonların hücre içine girişi ve hücreden çıkışına cevap olarak oluşan hücre membran potansiyel değişimi düzenlenerek, intrasellüler kayıt yöntemi ile kaydedilebilir. Hücre membran potansiyelindeki değişimler sıklıkla iyon kanalı aktivitelerini etkileyen fizyolojik bir faktör olduğu için, bu parametreler organizmada pek çok fizyolojik aktivitenin önemli bir göstergesidir. Hücre membran potansiyeli en az üç bağımsız yolla iyon kanalı fonksiyonlarını düzenlediği için, iyon kanalı aktivitelerinin araştırılması oldukça zor bir tekniktir (64, 95, 96):

1. İtici kuvvetlerin değişiminden iyon kanalı aktivitesinin etkilenmesi ve iyon akışının değişimi.
2. Çoğu iyon kanalının hücre membran potansiyeli değişimlerinden etkilenen voltaj bağımlı kapı mekanizmasının olması.
3. Bazı iyon kanallarının, intrasellüler faktörler ile belirli hücre membran potansiyellerinde iyon akışını sınırlaması.

Elektrobiyofiziksel deneylerde temel amaç; normal ve patolojik şartlarda kayıt edilen biyoelektriksel sinyalin yapısal ve iyonik mekanizmalarını araştırmaktır. Hücre membranından geçen iyonik akım, istenen değere kenetlenerek hücre membran potansiyeli ya da hücre membran potansiyeli istenen değere kenetlenerek hücre membranından geçen iyonik akımların değişimi ölçülebilir. Hücre membranının doğrusal olmayan özelliklerinin araştırılmasında, potansiyel istenen değerde tutularak hücre membranından geçen iyonik akımların kaydının yapılmasına olanak sağlayan yöntem **voltaj klamp yöntemi** adı verilir (48, 64, 95, 96). Voltaj klamp yöntemi, ölçülen potansiyelin sabit tutulan (kenetlenen) potansiyel değeri ile kıyaslandığı bir elektronik feed back sisteminden oluşur. Kaydedilen potansiyelin kenetlenen potansiyelden sapması, düzenleyici akım uygulaması ile düzeltilir. Potansiyel ölçümü ve akım uygulanması aynı mikroelettrot ile gerçekleştirildiği için, akım feed backi ani olmalıdır ve intrasellüler kayıt için ince uçlu mikroelettrot kullanılmalıdır (64, 95).

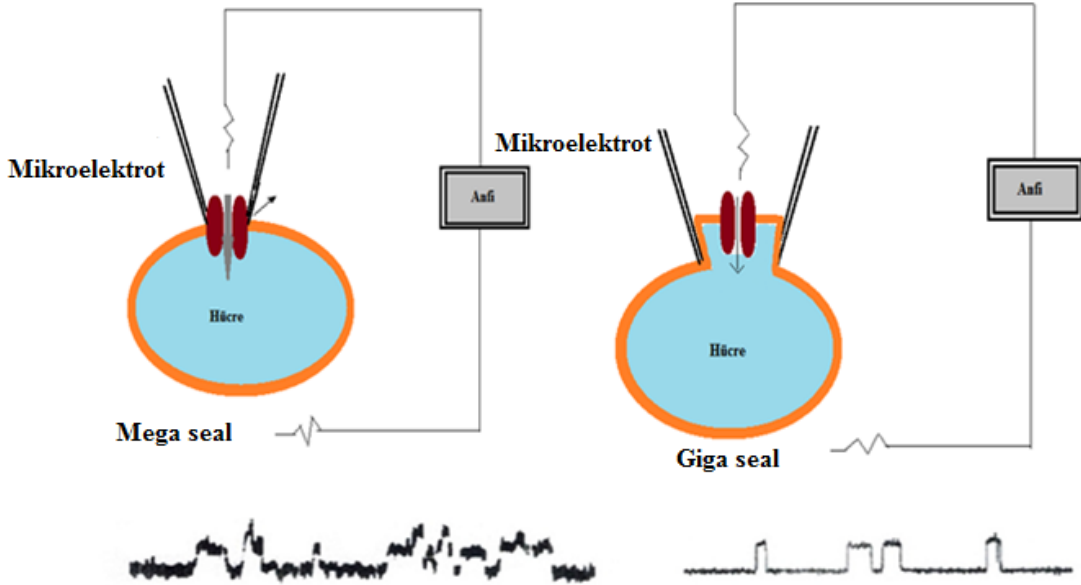
Voltaj klamp yönteminin temel amacı, komut voltajında tutulan hücre membranının tamamından geçen akımı ölçmektir. Bu yöntemle, ilgili kanalın karakteristiğinin belirlenmesine rağmen tek bir kanala ait birim iletkenlik hakkında fikir vermez. Bu amaçla tek kanal akım kayıtlarına olanak sağlayan patch clamp tekniği kullanılmaktadır. Voltaj Clamp Yöntemi geliştirilerek, hücre membranı üzerinde bulunan belirli bir bölgeden ya da tek bir iyon kanalından geçen iyonik akımın / hücre membran potansiyelinin kaydedilmesini sağlayan **Patch Clamp Tekniği** daha geniş uygulama bulmuştur (48, 56, 64).

2.2.3. Patch Clamp Yöntemi

Hücreden hücreye değişmek üzere birim akımlar pA seviyesindedir. Bu boyuttaki bir akımı gürültüden izole edilmemiş bir ortamda kaydetmek oldukça zordur. Bir direnç üzerinde, dış yörüngelerdeki serbest elektronlar termal etkiler ile hareket ettiği için termal gürültü adı verilen istenmeyen gürültüler ortaya çıkar. 1 pA'lık bir akımı % 10 hassaslıkta kaydetmek için sinyal kaynağının en az 2 G Ω dirence sahip olması gerekir (48, 56, 64, 100, 104). Organizmada bulunan hücrelerin neredeyse tamamı bu dirence sahip değildir. Hücrelerin boyutu küçüldükçe, direnci artacağı için küçük dirençli hücre elde etmeyi amaçlayan Erwin Neher ve Bert Sakmann; hücre membranının küçük bir bölümünden kayıt yapmayı hedeflediler. Bu amaçla, ucu inceltilmiş cam kapiller bir mikroelettrot ile hücre membran parçasını sabitleyip, bu cam elettrot ile hücre membranı arasında yüksek elektriksel dirence sahip bir kenetlenme sağlamayı amaçladılar. Mikroelettrot voltajını kontrol ederek, mekanik ve enzimatik teknikler kullanarak küçük uçlu cam mikroelettrotları hücre membranına bastırıp G Ω seviyesinde kayıt düzeneği oluşturmayı denediler. Fakat mikroelettrot ucunun hücre membranına temas ettiği yerde meydana gelen sızıntı akımları sebebiyle en iyi koşulda dahi 10 - 20 M Ω 'luk direnç elde edebildiler. Bu tür sistemlerde yapılan akım kayıtlarında, kaydedilmek istenen sinyal çok zayıf olduğu için ortam ve sistem gürültüsü içinde akım kaybolarak başarılı bir sinyal kaydı yapılamamıştır (56, 64, 95, 98, 100).

Erwin Neher ve Bert Sakmann, cam mikroelettrot içerisine negatif basınç uygulandığı zaman, hücre membranı mikroelettroda doğru emildiğinde cam mikroelettrot yüzeyi ile hücre membranı arasında güçlü bir kaynaşma ile ideal G Ω seviyesinde '**giga seal**' adı verilen sıkı mühürlenme - kenetlenme elde etmişlerdir. Bu

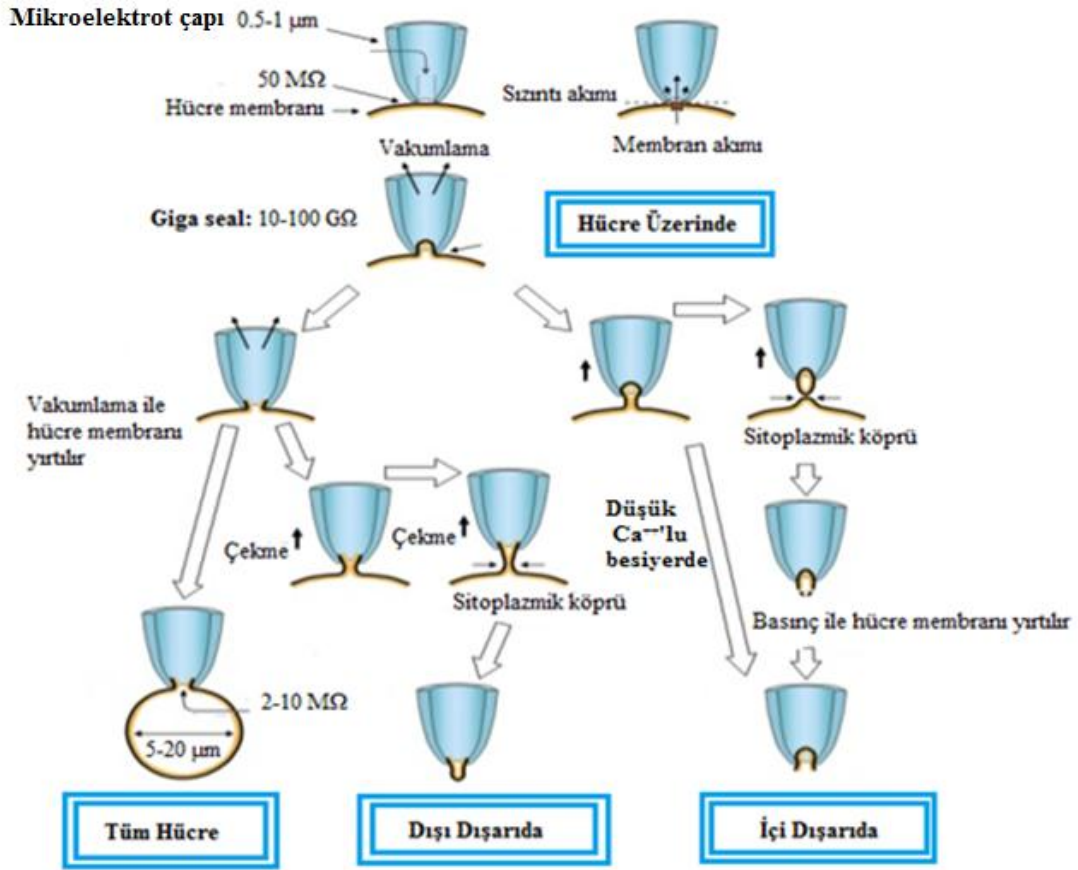
koşullar altında kaydedilen akımların istenen sonuçları verdiği ve iyon kanalı hipotezinin evrensel olarak kabul görmesini sağladığı bilinmektedir (Şekil 2.18) (56, 64).



Şekil 2.18: Giga seal elde edilmesi (56).

Giga seal oluşumunun bilinen tek etkisi gürültüyü azaltmak değil, aynı zamanda sinyal kaynağının direnci arttıkça hücre membran potansiyelinin zaman ve genliğinin kontrolü daha güvenli hale gelir. Burada amaç; mikroelektrot ile temasta bulunan hücre membran parçasını olabildiğince küçük tutarak tek bir iyon kanalı içeren hücre membran bölgesi bulmak ve buradan geçen iyonik akımı ölçmektir. Mikroelektrot uç çapı μm seviyesinde tutulduğu için bu bölgeden geçen iyonik akımlar çok küçük ve kaydedilen akım direkt tek iyon kanalından geçen akıma eşit olur (56, 95, 98).

Çalışmanın amacına, araştırılması istenilen kimyasal, kanal blokörü ya da nörotransmitter maddenin türüne göre dört farklı patch clamp kayıt türü vardır (Şekil 2.19) (96, 102, 105, 106):



Şekil 2.19: Patch clamp yönteminde kullanılan kayıt türleri (106).

- 1- **Hücre üzerinde (Cell attached-on cell) kayıt:** Cam mikroelettrot ile hücre membran parçası arasında sıkı kenetlenme ile giga seal oluşturulduktan sonra elde edilen pozisyondaki kayıt yöntemidir. Bu pozisyon diğer kayıt yöntemlerine geçiş olarak kabul edilir. Yaklaşık 1 - 5 µm yarıçapında ve 2 - 10 MΩ direncinde cam mikroelettrot yapıldıktan sonra mikromanipülatör aracılığı ile ekstrasellüler ortamda bulunan hücreye mikroelettrot ile temas edilir. Mikroelettrot, ekstrasellüler ortama daldırıldıktan sonra ekranda kare dalga görülür (48, 95, 96). Mikroelettrot ucunun bu ortamda bulunan mineraller tarafından kirlenmesini önlemek amacı ile hücreye temas edene kadar, mikroelettroda pozitif basınç uygulamak gerekir. Uygulanan akım, patch clamp sisteminden hücreye temas eden mikroelettrot boyunca geçip hücre membranına geliyorsa, bu pozitif akımdır. Bu yöntemde pozitif yönde basınç uygulanması, hücre membran parçasını hiperpolarize ederek negatif yönde içe akım oluşturur. Hücre membranına mikroelettrot ile temas ettikten sonra, mikroelettrot direnci

% 50 oranında artış gösterene kadar mikroelettrot ile hücreye bastırılır ve sonrasında negatif basınç uygulamasına geçilir (56, 76, 95). R_M hücre membran direnci 1 - 10 G Ω seviyesine gelene kadar basınç sistemi ile negatif basınç uygulamaya devam edilir. Mikroelettrot direncinin negatif yönde arttığı, akım cevabındaki azalmadan anlaşılır. Eğer herhangi bir potansiyel uygulanmayacaksa mikroelettrot 0 mV seviyesinde hücre membran parçasında istirahat durumundaki potansiyelde tutulur ya da istenen potansiyele kenetlenerek hücre membranından geçen iyonik akım kaydedilir (64, 76, 102, 105).

Hücre üzerinde kayıt yönteminde mikroelettrot ekstrasellüler ortam solüsyonu ile doldurulmalıdır. Bu kayıt pozisyonunda ekstrasellüler olarak uygulanan hormon veya kimyasal maddelerin mikroelettrot ile temasta olan hücre membranı parçasındaki iyonik akım üzerine etkisinin analizi yapılabilmektedir. Kayıt sırasında mikroelettrot hücre ile temas halinde olduğundan hücre içi organellerin iyon kanalı üzerine olan etkileri devam etmektedir (97, 102, 105-108).

- 2- Tüm hücre (Whole cell) kaydı:** Hücre üzerinde başlanan kayıt işleminin sonraki aşamasıdır. Mikroelettrot ucu hücre membranına temasta iken negatif basınç uygulanarak oluşturulan giga seal esnasında basınç sistemi ile sürekli vakum yapılarak hücre membranı yırtılır. Mikroelettrot ile hücre membranının yırtılması sonucunda, mikroelettrot ile hücre sitoplazması arasında elektriksel açıdan düşük direçli bir bağlantı kurulur. Mikroelettrot ve hücre sitoplazması arasında denge durumuna gelene kadar, mikroelettrot içerisinde bulunan intrasellüler ortam solüsyonu ile hücre sitoplazması arasında madde alış veriş i devam eder. Böylece mikroelettrot direkt hücre iç i ile temastadır ve mikroelettrot hücre sitoplazmasının voltaj değişimlerini ölçer (76, 95, 100).

Tüm hücre kayıt yöntemi ile yapılan kayıt, bir hücrenin tüm kanallarının verdiği yanıt ı gösterir. Mikroelettrot hücre membranını yırtmıştır, fakat mikroelettrot ve hücre hala temas halinde olduğu için kayıt sırasında hücre iç i organeller ile iyon kanalları etkileşimi devam etmektedir. Bu yöntem, küçük hücrelerden (5 - 20 μm) akım ya da voltaj kaydı almak için kullanılan en uygun patch clamp yöntemi olarak tanımlanmaktadır. Tüm hücre kaydı, hücre membranındaki tüm Ca^{++} kanallarının araştırılması istendiği araştırmalarda

tercih edilmektedir. Ayrıca iyon kanalı aktivatörlerinin, blokerlerinin ve ikinci habercilerin araştırılması amacı ile kullanılmaktadır (76, 102, 105, 109, 110).

- 3- **Dışı Dışarıda (Outside out) kayıt:** Hücre mikrolektrot sıkı kenetleme halinde iken vakumlama ile hücre membranı yırtıldıktan sonra, mikrolektrot dikkatlice hücreden geriye doğru çekilirse mikrolektrot hücre membranından ayrılır ve mikrolektroda yapışıp kopan hücre membran parçaları ters yönde tekrar bir araya gelerek dışı dışarıda adı verilen yönteme geçilmiş olur. Hücre membran parçası hücreden ayrıldığı için, bu yöntemde hücre içi organellerin etkisi ortadan kalkmaktadır ve böylece bu yöntem hücre içi organellerden bağımsız araştırma imkanı sağlamaktadır (56, 105, 107). Hücre membranının hücrelerarası boşluğa bakan tarafı banyo solüsyonu ile temas ederken, intraselüler ortama bakan tarafı ise mikrolektrodun içerisindeki intasellüler ortam solüsyonu ile temas halindedir. Bu yöntemde, mikrolektrot içine intrasellüler ortam solüsyonu doldurulmalıdır. Hücreden izole edilen küçük bir hücre membran parçasındaki iyon kanalları üzerine, hormonların ve kimyasal maddelerin etkisinin araştırılmasında dışı dışarıda kayıt yöntemi kullanılabilir (76, 95, 102, 103, 105).
- 4- **İçi Dışarıda (Inside out) kayıt:** Hücre üzerinde kayıt yönteminde iken, hücre ile temasta olan mikrolektrot hızlıca hücreden geriye doğru çekilirse mikrolektrot hücre membranından ayrılır. Bu işlem esnasında mikrolektrot ucundaki hücre membranının banyo solüsyonundan çıkmamasına dikkat edilmesi gerekir. Mikrolektrot ucundaki hücre membranının hücre içi tarafı banyo solüsyonuna bakacak şekilde hücre membran parçası ters dönerek tekrar birleşir. Bu yöntemde hücrelerin bulunduğu ortam ekstrasellüler ortam solüsyonu ile doldurulurken, mikrolektrot intrasellüler ortam solüsyonu ile doldurulur. Tek kanal araştırmaları, intrasellüler faktörler ile aktive olan iyon kanalları çalışmalarında içi dışarıda kayıt yöntemi kullanılabilir (56, 76, 102, 105).

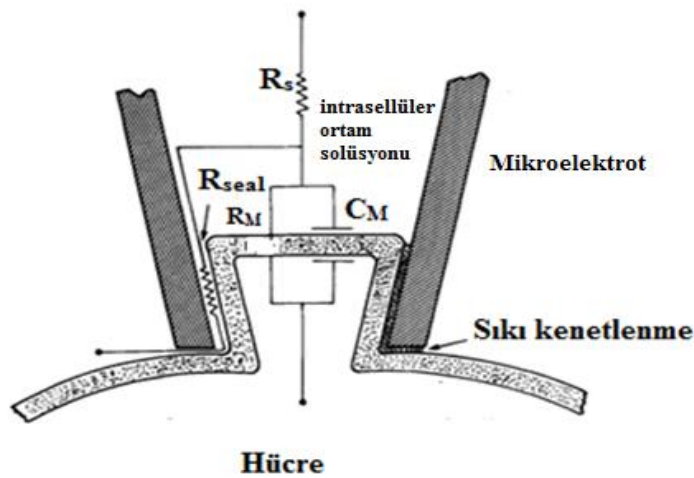
2.2.4. Patch Clamp Yönteminin Biyofiziksel Prensibi

Patch clamp tekniği, istenen dirençte özel olarak hazırlanan mikrolektrotlar yardımı ile hem hücre membranının tümünden hem de hücre membranının elektriksel ve mekanik olarak izole edilmiş küçük bir parçasında hücre membranının potansiyelini

sabit bir değerde tutarak iyon kanalından geçen akımları ya da akımı sabit bir değerde tutarak hücre membran potansiyelinin kayıt ve analiz edildiği elektrobiyofiziksel bir yöntemdir (64, 100, 105). Ucu 0,5 - 1 μm çapına sahip mikroeletrotlar, intrasellüler ortam solüsyonu ile doldurulur; mikroeletrodun manipülatör yardımı ile hücreye temas etmesi sağlanır. Negatif basınç yapılarak mikroeletrot hücre membranına sıkıca kenetlenir. Böylece hücre membranı mikroeletroda yapışır, mikroeletrot içindeki intrasellüler ortam solüsyonu ile mikroeletrot dışındaki solüsyonu hem elektriksel olarak hem de solüsyon içinde bulunan maddelerin geçişi açısından birbirinden izole eden bir engel oluşturur. Böylece bu bölgede giga ohm seviyesinde yüksek elektriksel dirence sahip '*giga seal*' adı verilen engel oluşturulmuş olur. Giga seal oluşumu ile cam mikroeletrot içinde kalan hücre membran parçası '*patch*' ya da '*yama*' olarak adlandırılır (100, 104, 110).

2.2.4.1. Giga seal oluşumu

Hücre membranı ile mikroeletrot temas ettiği zaman, kenetlenme sırasında direnç 10 - 50 $\text{M}\Omega$ aralığındadır. Bu direnç basınç sistemi ile birkaç kez vakum yapılarak $\text{G}\Omega$ seviyesine yükseltilebilir. Bu olay, özellikle hücre membranının mikroeletrot içine emildiği durumda hücre membranının fiziksel olarak bozulmasını gösterir. Neher ve Sakmann 2,5 $\text{M}\Omega$ uç direncine sahip mikroeletrot ile hücre membranının 14 μm^2 bölümünün omega harfine (Ω) benzer şekilde mikroeletrot içine doğru girdiğini ve bu hücre membran parçasının mikroeletrot - hücre membranı kenetlenmesine bağlı olduğunu göstermişlerdir (Şekil 2.20) (100, 104).



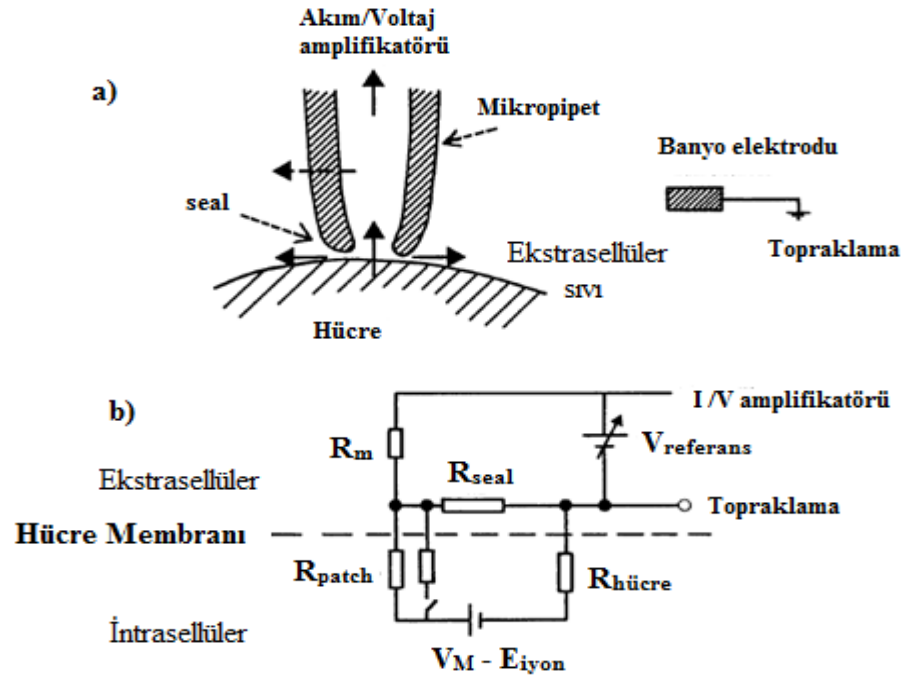
Şekil 2.20: Giga seal oluşumunda mikroeletrot - hücre membranı ilişkisi (104).

Giga seal oluşumunda mikroelettrodun iç duvarı ile hücre membranı arasında temas alanının arttığı görülmektedir. Mikroelettrot ve hücre membranı arasında oluşan etkileşimin fiziksel prensibini açıklamak ve kenetlenme sürecini saptamak için 3 fiziksel kuvvetin etkili olduğu ifade edilmektedir (104):

1. Kalsiyum gibi iki değerlikli katyonları içeren tuz köprüleri
2. Hidrojen bağları
3. Van der waals kuvvetleri.

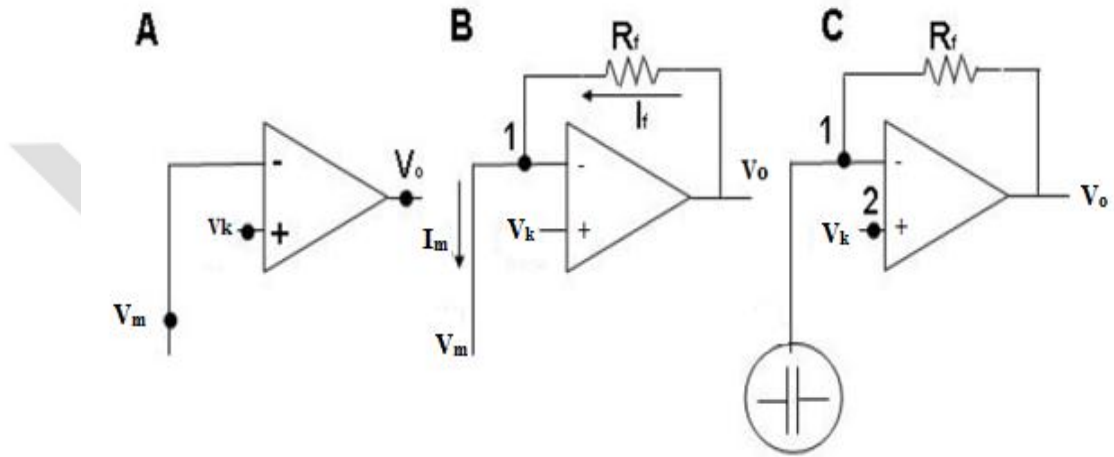
50 - 200 GΩ direncini elde etmek için, iki yüzey arasındaki mesafenin 2-5 Å'den büyük olmadığı ve en yüksek kenetlenme direncinin 400 GΩ olduğu tahmin edilmektedir (95, 104).

Yüksek kenetlenme direnci için iki koşul gereklidir: Birincisi, hücre membran parçasının elektriksel olarak tamamen izole edilmesi, ikinci olarak 1 pA değerindeki küçük akım kayıtlarının da iyi değerlendirilmesi için ortam gürültüsünün azaltılmasıdır (199, 100, 104). Kayıt esnasında R_{seal} ; kenetlenme direnci, R_m ; mikroelettrot direnci olmak üzere hücre membran parçasından kaydedilecek akım, $R_{seal} / (R_{seal} + R_m)$ ile ilişkilidir. Ayrıca, hücre direncinin patch direncinden çok küçük olması ($R_{hücre} \ll R_{patch}$) gerekir (Şekil 2.21) (100, 104).



Şekil 2.21: Patch clamp kaydı hücre - mikroelettrot ilişkisi ve elektriksel eşdeğer devresi (100).

Patch clamp, feed back devre ile hücre membran potansiyelinin (V_m) istenen komut voltajına (V_k) ayarlamak için kullanıldığı bir voltaj klamp tekniğidir. Hücre membran potansiyeli sabit tutularak hücre membranından geçen iyonik akımı ya da akım sabitlenerek hücre membran potansiyeli ölçülür. Patch clamp amplifikatörü, akım-voltaj dönüştürücüsü olarak işlev görür. Bu akım osiloskopta veya bilgisayar ekranında gözlemlenir (Şekil 2.22) (49, 100).



Şekil 2.22: Patch clamp yönteminde akım - direnç - voltaj ilişkisi (49).

- A.** Patch Clamp amplifikatörü, iki giriş arasındaki farkı çıkışa eşitleyen diferansiyel bir amplifikatördür. V_o çıkış potansiyeli, V_m mikroelektrot potansiyeli olmak üzere:

$$V_o = V_k - V_m \quad \text{şeklinde bir ilişki vardır.}$$

- B.** Feed back direnci R_f , amplifikatörün negatif girişi (1 noktası) ve çıkışı arasına yerleştirildiği zaman, 1 noktasındaki voltajı (V_m), komut voltajına (V_k) eşitlemek için akım feed back direnci üzerinden akar. V_k , mikroelektrot voltajının kenetlendiği voltaj değeri için 'komut' haline gelir. Ohm Kanunu akımın, direncin iki ucu arasındaki voltaj farkı ile orantılı olarak bu direnç üzerinden akacağını ifade eder. I_f feed back akımı, I_m mikroelektrot akımı olmak üzere:

$$I_f = (V_o - V_m) / R_f$$

Bu denklem yeniden düzenlenirse aşağıdaki gibi olur:

$$V_o = I_f R_f + V_m$$

Akım korunması gerektiği için, 1 noktasına akan akım mikroelettrot akımına (I_m) eşit olmalıdır.

$$I_f = - I_m$$

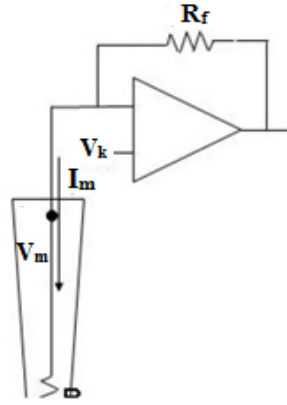
$$V_o = - I_m R_f + V_m$$

$$V_k = V_m$$

$$V_o = - I_m R_f + V_k \quad \text{veya} \quad I_m = (V_k - V_o) / R_f \quad \text{elde edilir.}$$

V_k ve R_f bilinirse, V_o ölçülerek I_m saptanabilir. Ayrıca, patch clamp amplifikatörü, I_m akımını V_o voltajına dönüştürür (49, 100, 111).

C. Mikroelettrot voltajı, hücreye elektrot aracılığı ile bağlantılıdır. Hücre, V_k voltajının ani değişiminde onun şarj edilmesini sağlayan kapasitansı içerir. Bunun sağlanması için, patch clamp amplifikatörleri düzeltici devreler içerir. Patch clamp amplifikatörü, V_k 'yi doğru takip edebilmek için V_m 'yi güçlendirmek amacı ile 1 veya 2 nolu girişine dalga formunda düzeltici ek devreler içerir. Feed back direnci R_f , akım - voltaj dönüşümünü gerçekleştiren patch clamp amplifikatörünün bir bileşenidir. Mikroelettrot akımın tamamı R_f üzerinden geçer. Bu direnç, voltaj kenetleme modunda amplifikatörün kazancını, akım kenetleme modunda ise hücre membranından geçen akımı belirler (49, 95).



Şekil 2.24: Patch clamp tekniğinde mikroelettrot banyo solüsyonunda (49).

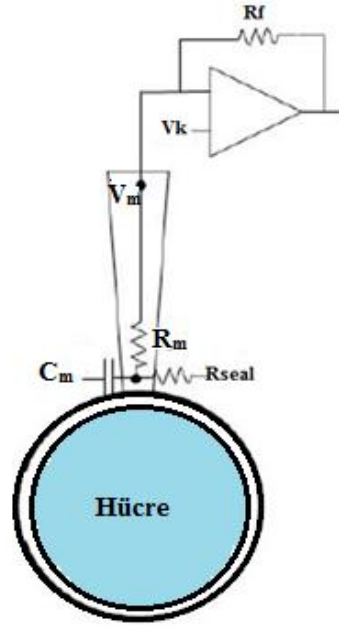
b. Hücre üzerinde yöntem

Giga seal kenetlenmesi bir kez oluştuktan sonra, mikroelettrottan toprağa akan akım uzun sürmez. Kenetlenme sırasında test pulsunun $V_{sealtest}$ boyutunu arttırmak için daha büyük kenetleme direnci (R_{seal}) gereklidir ve R_{seal} , mikroelettrot direnci gibi Ohm Kanunu'ndan hesaplanabilir:

$$R_{seal} = V_{sealtest} / I_m$$

Mikroelettrodun ucu, birisi banyo solüsyonu diğeri mikroelettrot içi solüsyon olmak üzere iki iletkeni ayıran bir dielektrik olduğu için, mikroelettrot kapasitör olarak davranır. Oluşan kare dalganın başlangıcı ve bitişindeki gibi voltajdaki değişimler (dV/dT) de hızlı olduğunda; kapasitör akımı, $I_c = C dV/dT$, büyük olur. Mikroelettrot direnci ve kapasitansı mikroelettrodun sinyal üzerinde zaman sabitli, düşük geçiren bir filtre gibi davranmasına neden olur. Zaman sabiti τ olmak üzere; $\tau_p = R_m C_m$ şeklinde ifade edilir.

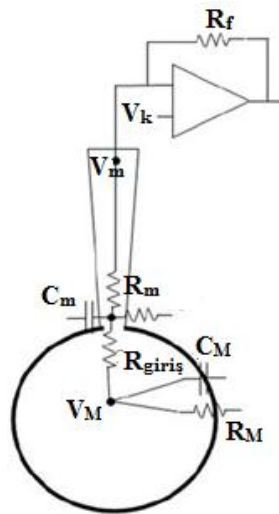
Mikroelettrot kapasitansının oluşturduğu istenmeyen filtrelene, mikroelettrot uç çapının artışı ve R_m 'nin azalması ile minimize edilebilir. Ya da akım uygulanarak % 90'a kadar kapasitans düzeltilebilir (Şekil 2.25) (48, 49, 56, 95).



Şekil 2.25: Patch clamp yönteminde mikroelettrot hücre üzerinde (49).

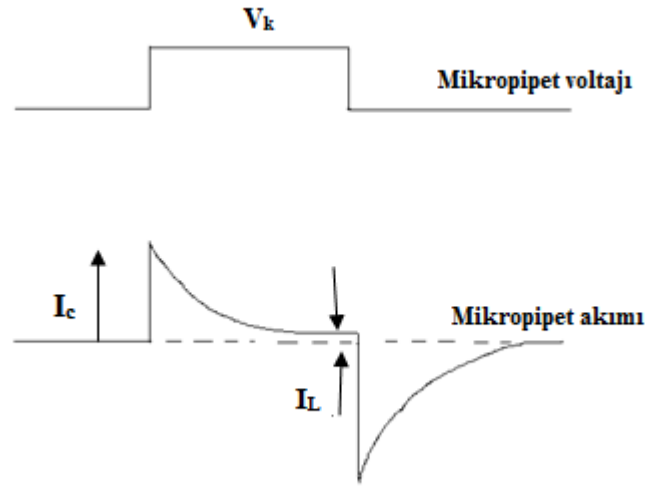
c. Tüm hücre kayıt yöntemi

Hücre membran parçası yırtılarak bir kez tüm hücre yöntemine geçildiğinde, mikroelettrot içindeki solüsyon topraklanmış banyo solüsyonuna akarken hücre membran direnci (R_M) ve kapasitansı (C_M) ölçülebilir. V_k olarak uygulanan voltaj pulsu, C_M ve seri dirençle (R_{seri}) belirlenen ve eksponansiyel olarak azalan dalga formundaki I_m geçici akımını oluşturur (Şekil 2.26) (48, 49, 56, 95).



Şekil 2.26: Tüm hücre kayıt yöntemi (49).

Tüm hücre kayıt (THK) yöntemi ile alınan kayıta, hücre membranı yırtıldıktan sonra hücre içine girer girmez mikroeletrodun potansiyeli ile hücre içi eşitleneceği için hücre içine girmeden mikroeletrot potansiyelini istirahat membran potansiyel değerine sabitlemek gerekir. Bu durumda içe doğru sabit akım oluşur. Hücre içine girdiğinde bu durum ortadan kalkar ve tekrar komut voltajı pulsuna cevap olan akım oluşur. Komut voltajına ulaşmak için kullanılan akım, hücre membran direnci ve hücre membran direncine seri bağlı olan mikroeletrot direncinin tamamını bu voltaj seviyesine getirmek için harcanan akımdır. Bu şekilde bir hücrede voltaj sabit bir değere kenetlendiği zaman, küçük bir depolarizasyon yapılarak hücre membranından geçen akım değerlendirilebilir. Voltaj kenetleme anında sadece potansiyelin değişim süresi boyunca geçen I_c olarak ifade edilen kısa süreli bir kapasitif akım, bunu takiben zayıf ve sabit değerde I_L akımı olduğu gözlemlenmektedir. Voltaj kenetlenmesi sonlandığında, hücre membranı istirahat durumuna dönerken tekrar ters yönde kapasitif akım oluşur (Şekil 2.27) (48, 56).



Şekil 2.27: Voltaj kenetlendiğinde standart akım değişimi (56).

Seri direnç (R_s) etkisiyle, komut voltajı belli bir genlik gecikmesi ile oluşacaktır. Hücre içine girildiği zaman devreye hücre kapasitansı da ekleneceği için hücre belli bir süre sonunda komut voltajına yükselecektir. Böylece seri direnç nedeniyle voltaj ve zamanlama hatası olmak üzere iki hata meydana gelecektir. Mikroeletrot ve hücrenin

oluşturduğu elektronik devre ve V_k 'na cevap olarak oluşan akım Şekil 2.27'de görülmektedir. R_s ve R_m seri bağlı olduğu için hücrede oluşan potansiyel mikroelettrot potansiyelinden farklı olacaktır. $R_s \gg R_m$ olacağından V_k uygulandığında oluşan anlık akım:

$$I_c = V_k / R_s \quad \text{olacaktır.}$$

Hücre membran kapasitansı (C_M), şarj olup sistem yeni komut seviyesine geldikten sonra oluşan akım cevabı ise,

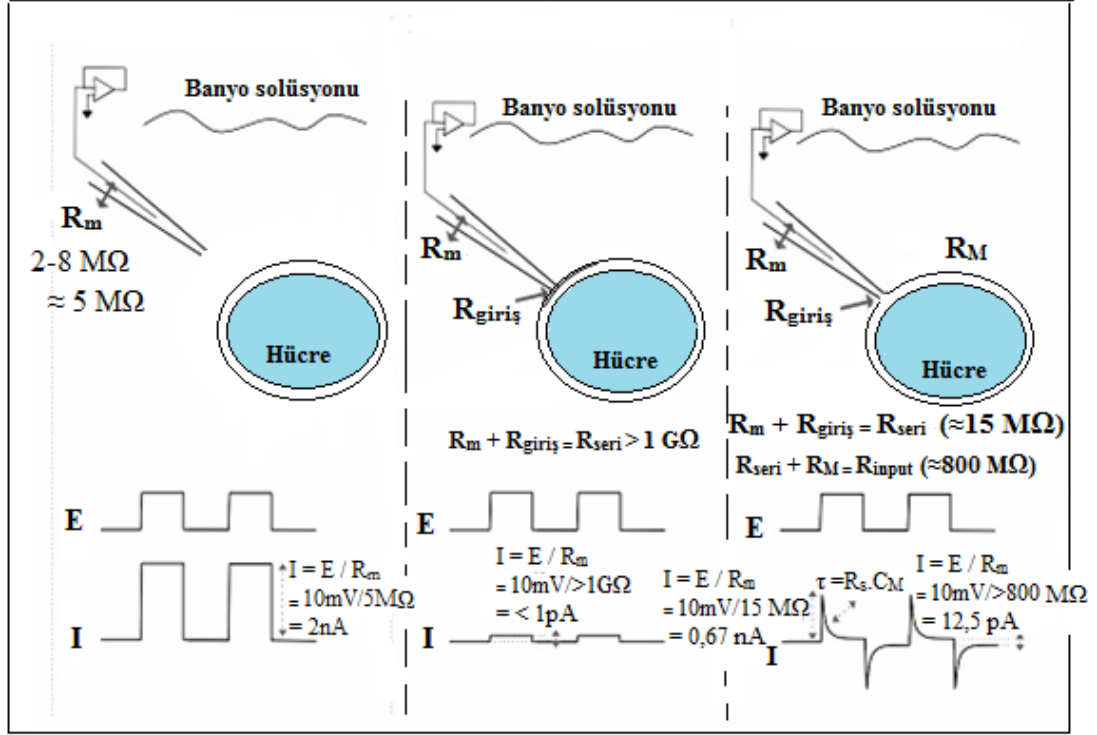
$$I_L = V_k / R_m \quad \text{olacaktır.}$$

Sistem komut voltajına gelirken, R_s hücre membran kapasitansını şarj etmek için gerekli akıma karşı koyacağı için hücrenin komut voltajına gelmesi gecikir. τ zaman sabiti olmak üzere hücre eksponansiyel olarak komut voltajına kenetlenir. Zaman sabiti;

$$\tau = R_s C_M \quad \text{şeklinde ifade edilir.}$$

R_s , C_M ile seri bağlı olduğu için mikroelettrot üzerinden akım uygulandığı zaman, kapasitansın şarj olması gecikecektir. R_s azaltılırsa, τ de küçüleceğinden sistemin frekans bandı artar. Bu durumda ortaya çıkan hataların düzeltilmesi için sistemde R_s kompensasyonu olarak ifade edilen seri direnç düzeltmesi ve C_{slow} olarak ifade edilen kapasitans nötralizasyonu yapılması gerekir (48, 49, 56, 95).

Tüm hücre yönteminin temel adımları ve kayıt sırasında osiloskopta gözlemlenen akım değişimleri Şekil 2.28’de özetlenmiştir:



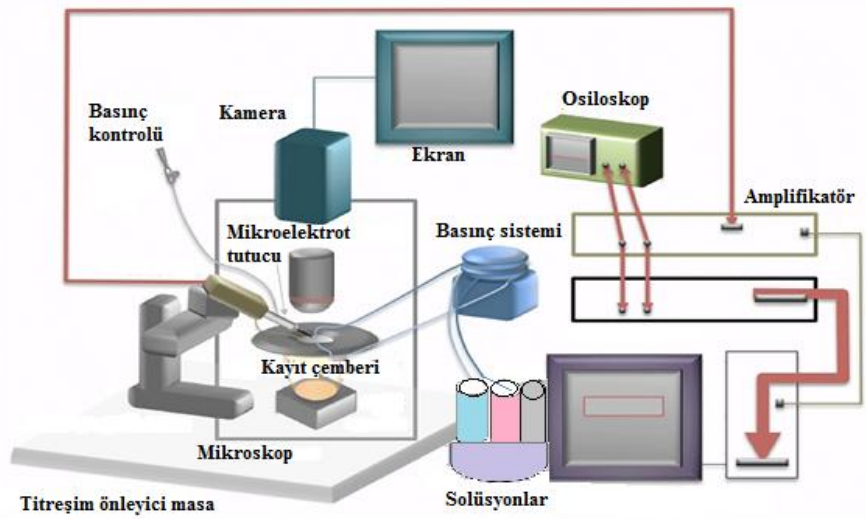
Şekil 2.28: Tüm hücre kayıt yönteminde üç temel adım ve osiloskopta gözlemlenen yanıtları (112).

Hücre içine pozitif yüklü iyon girişi negatif akım oluştururken, hücre dışına negatif yük çıkışı negatif akım oluşturur. Hücre membran potansiyeli iyon potansiyelinden büyük olduğunda, iyon akımı pozitif olur ve iyonlar hücre dışına çıkar. Hücre membran potansiyeli ile iyon potansiyeli eşit olduğunda hücre membranından iyon çıkışı olmaz. Hücre membran potansiyeli iyon potansiyelinden küçük olduğunda, iyon akımı negatif olur ve iyonlar hücre içine girer (48, 56).

2.2.5. Patch Clamp Yönteminde Kullanılan Ekipmanlar

Patch clamp kayıt yönteminde kullanılan ekipmanlar aşağıda verilmiştir (Şekil 2.29):

- Faraday kafesi
- Titreşim önleyici masa
- İnvert mikroskop
- Mikromanipilatör
- Amplifikatör
- Mikroelektrot çekici (Puller)
- Cam mikroelektrot
- Bilgisayar
- Yazılım programı
- Kamera
- Basınç sistemi

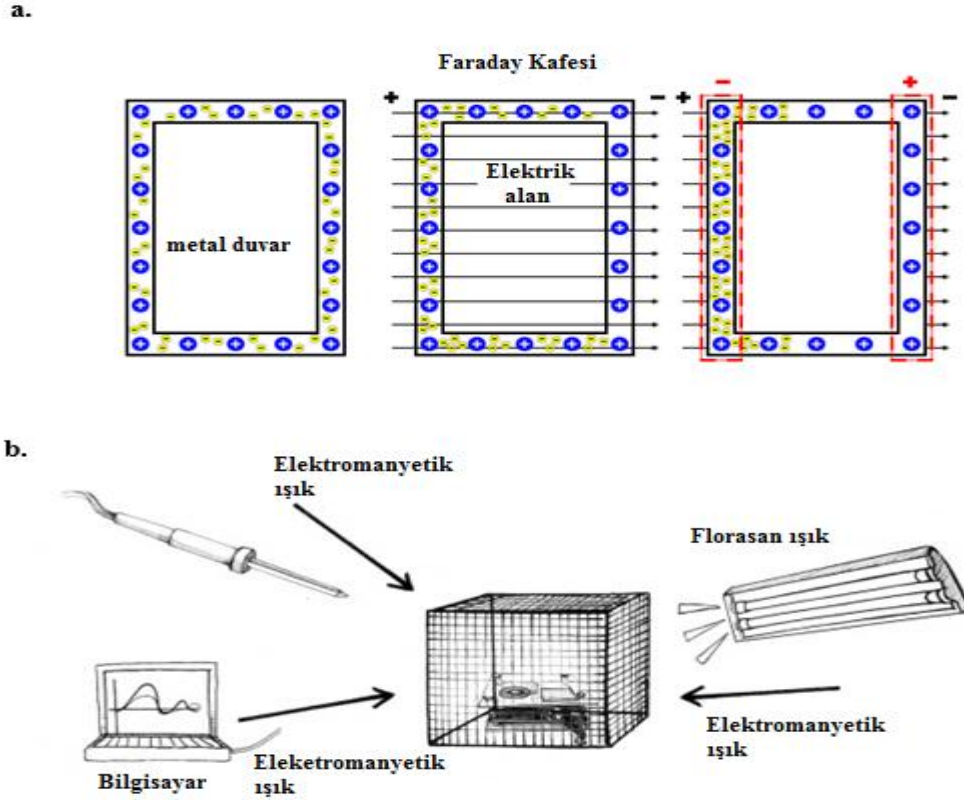


Şekil 2.29: Patch clamp kayıt sistemi (112).

Kırmızı renk elektriksel sinyal kaydının yönünü gösterir.

a. Faraday kafesi

İletken malzemeleri oluşturan atomların en dış yörüngelerindeki elektronlar, atomlarından kolayca ayrılarak hareket etme yeteneğine sahiptirler. Dolayısıyla kapalı bir yüzeye sahip olan iletken bir cisim, elektrik alanı içerisine yerleştirildiğinde bu elektronlar, iletkenin içerisindeki elektrik alan sıfırlanıncaya kadar hareket eder ve yeniden dağılıma uğrar. Elektrik alanın sıfırlanmasıyla birlikte, elektronların hareket etmelerinin sebebi ortadan kalkmış olur. Faraday kafesi bu ilkeye göre çalışır ve içindeki nesneleri dış elektrik alanlara karşı korur. İletken teller ile ağ biçiminde kaplanmış ve topraklanmış her kafesle bu koruma gerçekleştirilebilir. Ağ gözü sıklığı ve topraklama kalitesi korumayı artırır. Faraday kafesi sayesinde dışarıdaki elektrik alan kafesin içine etki edemez (Şekil 2.30 a-b) (64, 95).



Şekil 2.30a-b: Faraday kafesi (113, 114).

Faraday kafesinin işlevliliği için, iletkenlerin iyi topraklanmış olması gerekmektedir. Böylece patch clamp deneyleri esnasında sağlıklı kayıtlar alınması sağlanır (64, 95).

b. Titreşim önleyici masa

Hücre membranı ile mikroeletrodun sıkı bir kenetlenme oluşturduğu patch clamp deneylerinde, kayıt sırasında yüksek hassasiyet gereklidir. Çalışma esnasında, hücre ve mikroeletrodu görmemizi sağlayan mikroskop ve mikroeletrodun hareketini sağlayan mikromanipülatör sistemi titreşim önleyici masa üzerine sabitlenmiş halde bulunmaktadır. Bu sırada oluşabilecek en küçük sarsıntı bile hücre ile mikroeletrot arasında kurulan temasın kopmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle darbe emici özel sistemlerle donatılmış, sarsıntı önleyici bir masanın kullanılması bu sistemin olmazsa olmazlarından (64, 95).

c. İnvert mikroskop

İnvert mikroskoplarda objektifler mikroskop tablasının altına yerleştirilmiş olduğu için hücrelerin görüntülenmesi, kayıt elektrodunun hareket kabiliyeti ve incelenen alanın artırılmasında çok önemli avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca floresans lamba içeren türleri sayesinde floresan ışık yayan hücrelerin görüntülenmesi de mümkündür (64, 95).

d. Mikromanipülatör

Patch clamp deneyleri esnasında invert mikroskop ile hücreler tespit edildikten sonra mikroskopun makro ve mikro vidaları ile bir daha oynanmamalıdır. Mikroeletrodun ucunu hücre membranına temas ettirebilmek için üç boyutlu olarak (öne-arkaya, sağa-sola ve yukarı-aşağı) hareket ettirilmesini sağlayan mikromanipülatörler kullanılmaktadır. Kontrol paneli, keypet ve mikroeletrot ucunun bağlı olduğu headstage'den oluşan bir sistemdir (64, 95).

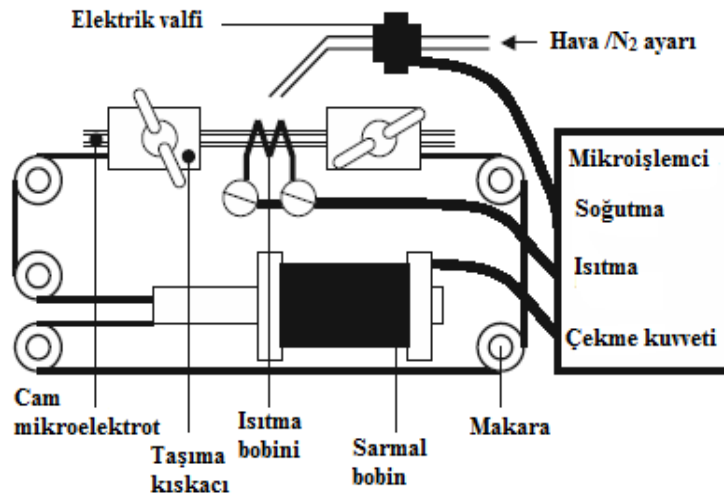
e. Amplifikatör

Hücre veya hücre katmanlarında patch clamp yöntemi ile gürültüden arındırılmış iyi bir kayıt alabilmek için izole ortamlar ve iyi tasarlanmış kayıt sistemi gereklidir. Hücre membran potansiyeli veya hücre membranından geçen iyonik akımları kaydetmek amacı ile amplifikatörler kullanılır; bu esnada en etkin kayıt düzenini sağlamak üzere kullanılan mikroeletrotların direnci olabildiğince küçük, amplifikatörlerin giriş direnci yüksek olmalıdır. Alınan elektrobiyofiziksel kayıtlar yükseltilerek ekranda sayısal veriler olarak gözlemlenir, gerekli yazılım programları kullanılarak değerlendirilir. Patch clamp kayıt sistemi ile tekli kanal ve tek hücre

çalışmalarında hücre membran potansiyeli kenetlenerek pA düzeyindeki akımlar veya akım kenetlenerek mV düzeyindeki potansiyeller, etraftan gelen gürültüden izole edilerek kaydedilir (64, 95).

f. Mikroelektrot çekici (Puller)

Patch clamp sisteminde kullanılan cam mikroelektrotlar, içi boş silindirik tüp şeklindedir. Hücre membranına temas ederek gerektiğinde buradan hücre membran parçası koparabilecek özelliğin olması için cam tüpleri sivriltilerek mikroelektrot haline getiren cihaz mikroelektrot çekicisi (puller) olarak adlandırılır. İstenen çapta ve dirençte yapılmak istenen mikroelektrot, mikroelektrot çekicisinin üzerinde bulunan mikroelektrot oluklarına yerleştirilir. Mikroelektrot tam olarak dengeli şekilde takılarak cihazın orta bölümünde bulunan ısıtma işleminin uygulandığı box ya da true filament bulunan tungsten rezistansın içinden geçirilecek şekilde ileriye doğru sürülür. Yan bölümde bulunan kısıkaçlar yardımı ile mikroelektrot dikkatlice sıkıştırılır ve sabitlenir. Çalışma öncesinde ramp testi yapılarak seçilen uygun sıcaklık ve çekme hızı ayarlanmış cihaz ile mikroelektrot çekim işlemi başlatılır. Mikroelektrot çekimi sırasında, mikroelektrodun orta bölümü ısıtılırken, aynı anda kısıkaçlar ile sıkıştırılmış mikroelektrodun her iki tarafına, zıt yönde ve aynı doğrultuda çekme kuvveti uygulanır. Bu sırada cam mikroelektrot ısı ve kuvvetin etkisiyle yavaş yavaş ortasından ısınıp incelirken, hücre membranına temas edebilecek seviyede sivriltilmiş olur. Cihazda bulunan soğutma sistemi aracılığı ile mikroelektrot içindeki boşluk kapanmaz ve mikroelektrot hazır hale gelir (Şekil 2.31) (64, 95).



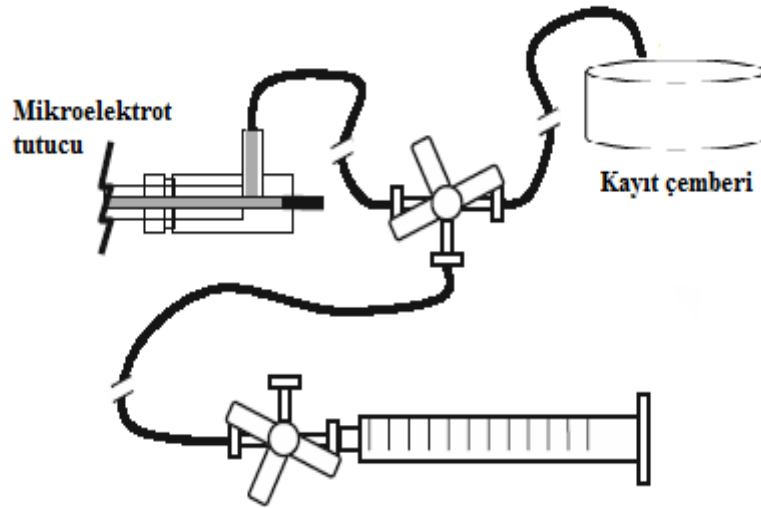
Şekil 2.31: Mikroelektrot çekici şeması (95).

g. Mikroelektrot

Mikroelektrot çekici kullanılarak, çalışmanın konusuna göre farklı çaplara sahip cam mikroelektrot yapılır. İntrasellüler kayıtlarda kullanılan mikroelektrotların direçleri 2 - 10 MΩ arasında olması gerekir. Mikroelektrot çekici ile sıcaklık ve çekme hızı değiştirilerek istenen çapta ve dirençte cam mikroelektrot yapılabilir. Mikroelektrot çekicisi ile yapılan mikroelektrotların uç çapı arttıkça mikroelektrot direncinin düştüğü, azaldıkça yükseldiği bilinmektedir. Bu da mikroelektrodun ucu ne kadar ince olursa iyon geçişinin o kadar fazla engellendiğini ve elektriksel direncin de o kadar arttığını göstermektedir (56, 64, 95).

h. Basınç sistemi

Cam mikroelektrot mikromanipülatör yardımı ile ekstrasellüler ortam solüyonu içine daldırıldığında, mikroelektrot ucunun kirlenmemesi için basınç sistemi ile pozitif basınç yapılması gerekir. Mikroelektrot ile hücreye temas ettikten sonra ise giga seal adı verilen sıkı kenetlenme oluşması ve patch clamp kayıt yöntemlerine geçilmesi için negatif basınç uygulanarak hücre membranının mikroelektrot içine emilmesi sağlanır (Şekil 2.32) (56, 64, 95).



Şekil 2.32: Basınç kontrol sistemi (95).

i. Bilgisayar yazılımı

Patch clamp kayıt sistemine uyumlu olarak Patch master ve Fit master yazılım programı kullanılmaktadır. Kayıt sistemi ile alınan iyonik akım ve hücre membranı potansiyel kayıtları yazılım programları ile sayısal verilere dönüştürülür (64, 95).

j. Bilgisayar

Patch clamp sisteminde iyonik akım ya da hücre membran potansiyeli kayıtlarının takip edilmesi amacı ile kullanılan yazılım programı ve hücrenin gözlemlenmesini sağlayan programın kullanılabilirliği için uygun bir bilgisayara gereksinim vardır (64, 95).

k. Kamera

Bilgisayara ve invert mikroskoba bağlı olan kamera aracılığı ile hücreden alınan görüntü bilgisayara aktarılabilir. Kayıt öncesi hücrenin izlenmesi, kayıt anının görüntülenmesi ya da kayıt alındıktan sonra hücre üzerinde ölçüm ve hesaplama yapılması amacı ile kamera sistemi kullanılabilir. Görüntü invert mikroskoptan ya da kamera ile bilgisayardan takip edilebilir (64, 95).

2.3. OKSİDATİF STRES

2.3.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde tek sayıda elektron taşıyan, fizyolojik ve patolojik birçok süreçte ortaya çıkan oldukça aktif kısa ömürlü atom ya da moleküllerdir. Kararsız yapıya sahip bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle reaksiyona girerek son yörüngelerindeki paylaşılmamış elektronlarını paylaşma eğilimi gösterirler. Serbest radikaller pozitif veya negatif yüklü ya da nötr olabilirler ve biyolojik sistemlerde çoğunlukla elektron transferi sonucunda meydana gelirler (115, 116).

İnsan vücudundaki hücrelere kolaylıkla girebilen oksijen molekülü (O_2) kimyasal yapısından dolayı radikal olmaya çok yatkındır ve hücrelerin en çok kullandığı moleküldür. Bu nedenle serbest radikal, serbest oksijen radikali olarak ifade edilir. Reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinen serbest oksijen radikalleri normal şartlarda organizmada sürekli olarak oluşur. Kontrolsüz serbest radikal üretimi, hücre membranı,

lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA gibi biyomoleküller ile etkileşime girerek hücrede geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz yapısal ve metabolik değişikliklere neden olur (117-120).

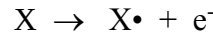
Serbest radikaller endojen ya da ekzojen kaynaklı olarak meydana gelebilirler. Endojen kaynaklı olarak redoks tepkimelerinde; endoplazmik, mitokondriyal ve nükleer elektron iletim sistemlerinde, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi metabolik olaylar sırasında bol miktarda üretilir. Ultraviyole ve x-ışınlarının hücre içerisinde emilimi, hava kirliliği, sigara dumanı, çeşitli ilaçların kullanımı ve kimyasallar gibi çevresel faktörlerin etkisi ile ekzojen kaynaklı olarak serbest radikaller oluşabilir (121-123).

Serbest radikaller temel olarak vücutta üç şekilde meydana gelir:

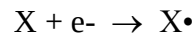
1. **Kovalent bağların homolitik kırılması:** Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık gibi etkilerin sonucunda kovalent bağın kırılması ile bağ yapısındaki iki elektronun her biri farklı atomlar üzerinde kalır ve aktif iki adet serbest radikal oluşur.



2. **Kararlı yapıdaki molekülden bir elektronun ayrılması ya da bir molekülün heterolitik bölünmesi:** Hücresel yapıdaki antioksidanlar, radikal yapıdaki moleküllere bir elektron verip radikalleri indirger ve kendilerinin radikal formu oluşur.



3. **Kararlı yapıdaki moleküle bir elektronun transferi:** Kararlı yapıdaki bir moleküle bir elektron transferi sonucunda molekülün dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron oluşuyorsa, bu tür indirgenme reaksiyonu radikal oluşumuna neden olabilir (23, 29-31).

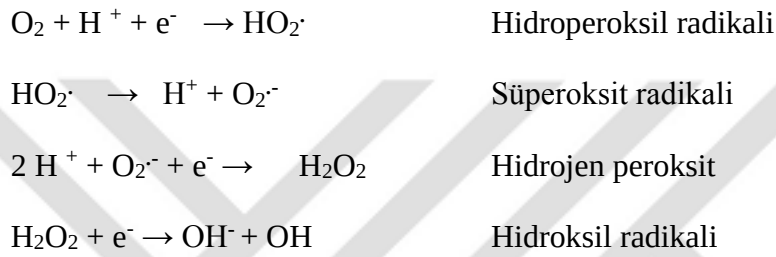


Serbest radikaller, radikal veya radikal olmayan moleküller ile reaksiyona girerek yeni radikallerin oluşumuna neden olurlar. Serbest radikaller ile reaksiyona giren moleküller zincir reaksiyonu ile tüm organizmaya zarar verebilir. Serbest radikallerin yarı ömürleri çok kısa olmasına rağmen, kararsız yapıda oldukları için organizmadaki tüm hücreleri etkileyebilir (Tablo 2.1) (28, 124-126).

Tablo 2.1: Oksidatif stres sonucu meydana gelen serbest radikaller (124, 125).

Bileşik, Simgesi	Özellikleri	Yarı Ömrü (37°)
Süperoksit, $O_2^{\cdot-}$	Otooksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşan bir e^- indirgenmiş form	Spontan ve enzimatik dismutasyon
Hidroksil, $OH^{\cdot}$	Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucunda oluşan, yüksek reaktiviteli üç e^- indirgenmiş form	10^{-9} s
Singlet oksijen, $O_2 \downarrow \uparrow$	İlk uyarılmış form	10^{-6} s
Hidrojen peroksit, H_2O_2	$O_2^{\cdot-}$, $HO_2^{\cdot}$ 'den dismutasyon sonucu ya da direkt O_2 molekülünden oluşan iki e^- indirgenmiş form	Stabil; enzimatik redüksiyon
Hidroperoksil, $HO_2^{\cdot}$	Lipidde çözünen $O_2^{\cdot-}$ 'in protonlanmış formu	
Peroksil, $ROO^{\cdot}$	Organik hidroperoksitlerden hidrojen ayrılması sonucu oluşur.	7 s
Alkoksil, $RO^{\cdot}$	Oksijen merkezli organik radikal	10^{-6} s
Organik hidroperoksit, $ROOH$	Lipid ve timin hidroperoksitleri	
Uyarılmış karbonil, $RO (RO^*)$	Mavi-yeşil fotoemisyon sonucunda oluşur.	

Oksijen molekülü, canlı organizmadaki moleküllerin yapısına girmesi, besin maddelerinde ana element olması, aerobik canlılardaki redoks reaksiyonları ve solunumda önemli rol oynaması nedeniyle hayati öneme sahiptir. Moleküler oksijen, taşıdığı iki eşleşmemiş elektrondan dolayı radikal olarak değerlendirilir. Canlı organizmadaki moleküler oksijenin % 95 - 98'i enzimatik olarak suya çevrilirken, geri kalan kısmı elektron transferi ile hücre içi organellerin yapı ve fonksiyonlarını bozarak, hücre membranında hasara neden olan serbest radikal türevlerini meydana getirir (35, 37, 127, 128).



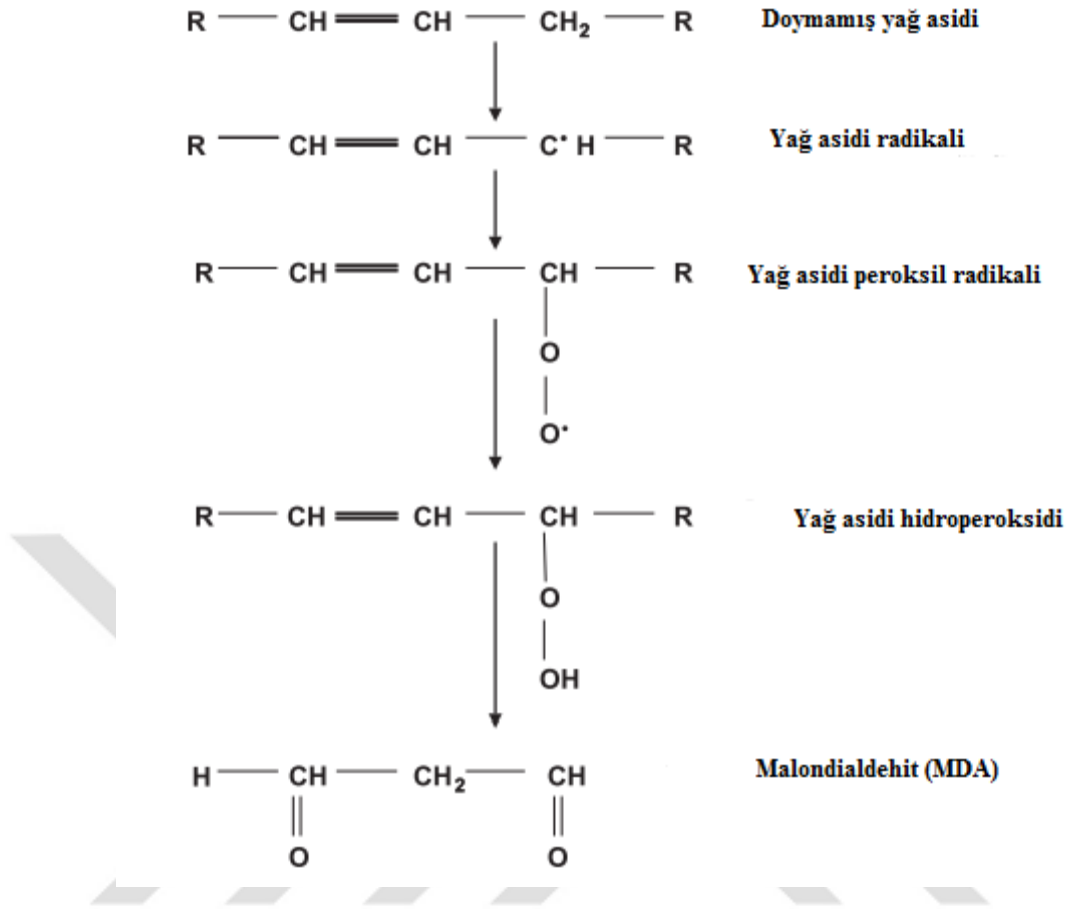
2.3.2. Serbest Radikallerin Hücre Membranı Üzerine Etkileri

Reaktif oksijen türleri, yapılarına elektron transfer ile lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA gibi biyomoleküller ile reaksiyona girmektedir. Hücre membranı, yapısındaki doymamış yağ asitlerinden dolayı reaktif oksijen türlerine oldukça duyarlıdır. Kararsız ve yüksek aktivitedeki reaktif oksijen türleri, organizmada fazla miktarda bulunduğu hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonuna yol açarak yapısal bozulmalara neden olur. Organizmada en sık görülen serbest radikal türü, serbest radikallerin doymamış yağ asidi ile etkileşmesi sonucu alil grubundan bir hidrojenin ayrılması ile oluşan lipid radikalidir. Lipid radikali, ilk olarak oksijen ile tepkimeye girerek lipid peroksi radikalini, sonrasında zincir reaksiyonu ile lipidlerden lipid hidroperoksitlerini oluşturur (32, 129, 130). Karbon atomundaki eşleşmemiş elektron, yağ asidi zincirini radikal hale getirir ve moleküler yapıdaki oksijeni bağlayarak lipid peroksit radikalini meydana getirir ve böylece lipid peroksidasyonu başlamış olur. Lipid radikalleri hücre membranındaki diğer doymamış yağ asitleri ile etkileşime girerek yeni lipid radikalleri oluşturur (28, 35, 126). Lipid peroksi radikali hidrojen atomları ile reaksiyona girerek lipid hidroperoksit radikalini oluşturur. Bu şekilde devam eden zincir reaksiyonu sonucunda malondialdehit (MDA), 4-

hidroksinoneal (HNA), alkoller, pentan ve etan gibi lipid peroksidasyon ürünleri ortaya çıkar. Lipid peroksidasyonunun etkisi ile hücre membran proteinleri, reseptörleri ve bu reseptörlere bağlanan pek çok olayda katalitik etki gösteren enzimler inaktive olur. Bunun sonucunda hücre membranının geçirgenliği ve akışkanlığı gibi biyofiziksel özellikleri değişerek hücre içi iyon dengesizliği ortaya çıkar (32, 35, 130, 131).

2.3.2.1. Malondialdehit

Malondialdehit (MDA) sınıfından tiyobarbitirik asit ile reaksiyon veren maddeler (TBARS; “Thiobarbituric Acid Reactive Substances”), lipid peroksidasyonunun en iyi belirteçlerindendir. MDA, lipid peroksitlerin aldehid formudur ve araşidonik asit ya da linoleik asit benzeri çoklu doymamış yağ asidi zincirlerinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile elde edilen lipid peroksidasyonunun ürünüdür (33, 126, 131, 132). Bu şekilde radikal özellik kazanan yağ asidi zinciri moleküllerarası çift bağ aktarılması ile konjugatlar oluşturur. Sonrasında, lipid radikallerinin oksijen molekülü ile reaksiyona girmesi sonucunda lipid peroksit radikali meydana gelir. Böylece oluşan radikaller hücre membranının yapısındaki yağ asitleri ile birleşerek lipid radikalini oluşturur ve radikal, ortaya çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine dönüşür. Bu şekilde reaksiyon, kendi kendini katalizleyen bir sürece girer. Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin MDA gibi diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sonlanır (Şekil 2.33) (133-136).



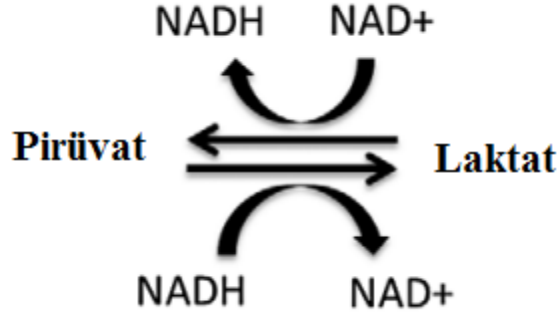
Şekil 2.33: Doymamış yağ asidinden malondialdehit oluşumu (33).

MDA, hücre membranında iyon geçirgenliğini etkileyerek hücre membranındaki proteinlerin moleküliçi ve moleküllerarası çapraz bağlanmasına yol açar. Bunun sonucunda hücre membranının iyon geçirgenliğinin, enzimatik aktivitenin ve akışkanlık gibi biyofiziksel özelliklerinin değişimine neden olur. Hücre membranından oldukça kolay geçebilen MDA molekülü, DNA'nın nitrojen formundaki bazıları ile reaksiyona girerek genotoksik ve karsinojenik etkiler gösterebilir (28, 133, 134, 136).

2.3.2.2. Laktat Dehidrogenaz

Laktat dehidrogenaz (LDH), 13.400 molekül ağırlığında sitoplazmik bir enzimdir ve 2-hidroksi asit oksidoredüktaz ailesinden tetramerik bir enzimdir. LDH, nikotinamid adenin dinükleotidin (NADH) NAD^{+} 'a dönüşümü ile piruvatın laktata dönüşümünü sağlar. Reaksiyon, NADH'den piruvatın C_2 karbonuna bir hidrojen iyonu

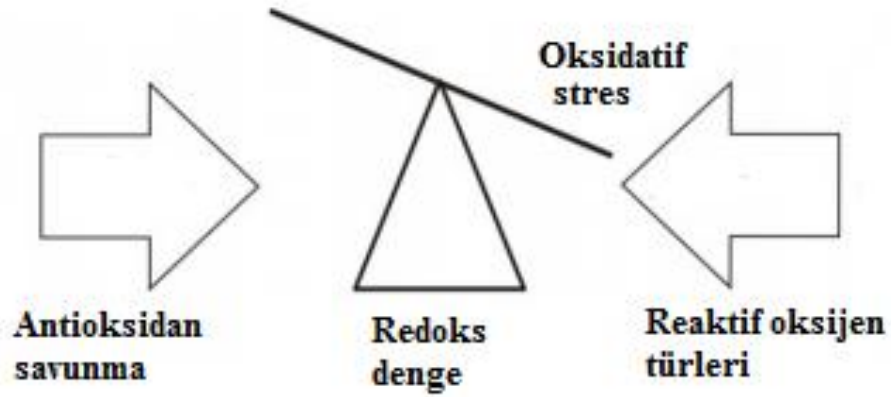
transferini içerir ve anaerobik solunum yapan hücreler tarafından yaygın olarak kullanılır (Şekil 2.34) (137-142).



Şekil 2.34: LDH'nin katalizlediği reaksiyon (143).

Hücre membranı hasara uğradığında ortama salınan LDH enzimi, pirüvatın laktata indirgenmesi ile kalorimetrik olarak ölçülebilir (141, 142, 144). Ölü ya da membranı hasara uğramış olan hücre sayısının artışı, hücre kültür besiyerinde LDH enzim aktivitesinin artışına neden olmaktadır (126, 137, 138, 143).

Organizmada lipid peroksidasyonuna neden olan serbest radikallerin oluşum ve yok edilme hızı arasında '*oksidatif denge*' adı verilen bir ilişki söz konusudur (Şekil 2.35). Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Serbest radikallerin oluşumundaki artış ya da yok edilmesindeki azalma dengenin bozulmasına sebep olur ve '*oksidatif stres*' adı verilen duruma neden olur. Oksidatif stres, serbest radikal oluşum hızı ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengenin bozulduğunu gösterir (28, 29, 30, 31, 145).



Şekil 2.35: Oksidatif denge (129).

2.3.3. Antioksidanlar

Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif hasarı önleyen, azaltan ya da tamir eden moleküller '*antioksidan*' olarak tanımlanır. Organizmada antioksidanlar, serbest radikaller ile reaksiyona girerek, serbest radikallerin başlattığı zincir reaksiyonlarını durdurur ve hücresel yapıların zarar görmesini engeller. Metabolik süreçlerin bir sonucu olarak hücreler sürekli olarak serbest radikal türleri üretirler (32, 33). Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-Rx), vitamin A, E ve C, flavonoidler başta olmak üzere enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, serbest radikalleri etkisiz hale getirir. Antioksidanlar, canlı organizmada oluşturdukları etki mekanizmasına göre dört farklı grupta sınıflandırılabilir (36, 37, 38, 145):

1. Serbest oksijen radikalleri ile etkileşerek onları tutma ya da etkilerini azaltarak daha zayıf yeni bir moleküle çevirme, antioksidanların toplayıcı etkisi olarak tanımlanır. Örnek olarak trakeobronşiyal mukus verilebilir.

2. Serbest oksijen radikalleri ile etkileşerek onlara bir hidrojen iyonu aktararak aktivitelerini azaltma ya da inaktif hale dönüştürme, antioksidanların baskılayıcı etkisi olarak tanımlanır. Örnek olarak vitaminler ve flavonoidler verilebilir.

3. Serbest oksijen radikallerinin zincirlerini kırarak onların fonksiyonlarını engelleme, antioksidanların zincir kırıcı etkisi olarak tanımlanır. Örnek olarak seruloplazmin, hemoglobin ve mineraller verilebilir.

4. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın DNA tamir enzimleri ile onarılması, antioksidanların onarıcı etkisi olarak tanımlanır (32, 36, 37, 132, 133, 136).

Antioksidanlar, organizmada bulundukları yerlere göre Tablo 2.(2-4)'de verildiği gibi sınıflandırılabilir:

Tablo 2.2: Endojen antioksidanlar (37).

Süperoksit dismutaz (SOD)	O_2^- radikalini katalitik olarak yok eder.
Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)	H_2O_2 seviyesi düşük miktarda olduğunda GSH-Px tarafından katalizlenir.
Glutatyon redüktaz (GSH-Rx)	GSH-Px'in substratı olan tek oksijen, $\cdot OH$, H_2O_2 ve lipid peroksidlerin ortadan kaldırılmasında etkilidir.
Katalaz (CAT)	Yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 'in yok edilmesini sağlar.
Sitokrom oksidaz (Sit-O)	Elektron taşıma zinciri içinde O_2 molekülü H_2O molekülüne indirgenirken O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$ salınımını önler.

Tablo 2.3: Ekzojen antioksidanlar (37).

Transferrin	Molekül başına 2 adet Fe^{+3} iyonu bağlar.
Albümin	Cu^{++} ve hemi bağlar, $\text{OH}^{\cdot}$ radikalini temizler.
Seruloplazmin	Ferroksidaz aktivitesinin göstergesidir. Cu^{++} iyonlarını bağlar ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalini temizler.
Askorbik asit	$\text{OH}^{\cdot}$ radikalini yok eder.
Bilirubin	Peroksil radikalini yok eder.
Glikoz	$\text{OH}^{\cdot}$ radikalini yok eder.
Eritrositler	Diffüzyon ile H_2O_2 'i, anyon kanalı ile $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalini eritrosit içine alır. Bu moleküller, SOD ve CAT enzimleri aracılığı ile uzaklaştırılır.
Ürat	Radikalleri yok eder ve metal bağlar.
Laktoferrin	Düşük pH'da molekül başına 2 adet Fe^{+3} 'ü bağlar.
Haptoglobulin	Hemoglobini bağlar.
Hemopeksin	Hemi bağlar.
SOD	Katalitik olarak $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalini yok eder.
GSH-Px	H_2O_2 ve hidroperoksitleri yok eder.

Tablo 2.4: Hücre membranında bulunan antioksidanlar (37).

Vitamin E	Yağda çözünür ve zincirleri kırar.
β -Karoten	Yağda çözünür, radikal temizleyicisi ve singlet O_2 molüekülü inhibitörüdür.
Koenzim Q	Enerji metabolizmasında rol alır ve antioksidan özellik gösterir.
Hücre membranının organizasyonu	Fosfolipid/kolesterol oranı, hücre membran bütünlüğü açısından önemli

SOD, CAT ve GSH, GSH-Px enzimleri enzimatik antioksidan olarak sınıflandırılır. SOD enziminin yapısında Cu, Zn^{++} ve manganez (Mn), GSH-Px enziminin yapısında ise Se iyonu bulunduğu için bu enzimler aynı zamanda metalloenzim olarak da adlandırılır. Ekzojen kaynaklı enzimatik olmayan antioksidanlar ise transferrin, seruloplazmin, bilirubin, albümin, β -karoten ile vitamin E ve C olarak ifade edilir (37, 38).

2.3.3.1. Çinko

Çinko (Zn^{++}), doğada genellikle çinko sülfür (ZnS), çinko oksit (ZnO), çinko klorür ($ZnCl_2$) ve çinko silikat ($ZnSiO_4H_2O$) şeklinde bulunan bir eser elementtir (28, 146-148).

Çinko çeşitli bitkisel ve hayvansal besinler başta olmak üzere; kabuklu deniz hayvanları, et - balık ürünleri, baklagiller, fındık ve ceviz gibi kabuklu yiyeceklerde yaygın olarak bulunur. Süt ürünleri, sebze-meyveler düşük oranda çinko içerirler (149-151).

Günlük çinko gereksinimi bebeklerde 3 mg/gün, 1-10 yaş için 10 mg/gün, yetişkinlerde ise 8-11 mg/gün olarak belirtilmiştir. Çinkonun canlılar için esansiyel

olduğu yıllarca bilinmesine rağmen, çinko eksikliği ilk defa 1961 yılında Prasad tarafından tanımlanmıştır. Organizmaya alınan çinko saç, prostat, karaciğer, kemik, böbrek, pankreas, dalak gibi organ ve dokularda farklı miktarlarda birikmektedir (149-151).

Çinko homeostazı, organizmada ilk olarak gastrointestinal sistem mukozasında düzenlenir; oniki parmak barsağı ve ince barsakta devam eder. Diyetle alınan çinkonun % 15-30'u absorbe edilir. Çinko emilimini, protein bakımından zengin diyet, histidin, lizin, sistein, pisolinik asit, etilendiamin tetra asetik asit (EDTA), B6 vitamini, glisin, kazain, laktoz, vitamin D, metiyonin ve aminoasitler arttırırken, protein bakımından fakir diyet, fitatlar, tanen, psidik ve oksalik asit ve diyet ile alınan demir miktarının artması çinko emilimini azaltır. Ayrıca kadmiyum (Cd), Cu, Se, fosfor (P), kalay (Sn) ve Ca^{++} , çinko absorpsiyonuna etki eder (28, 147, 148).

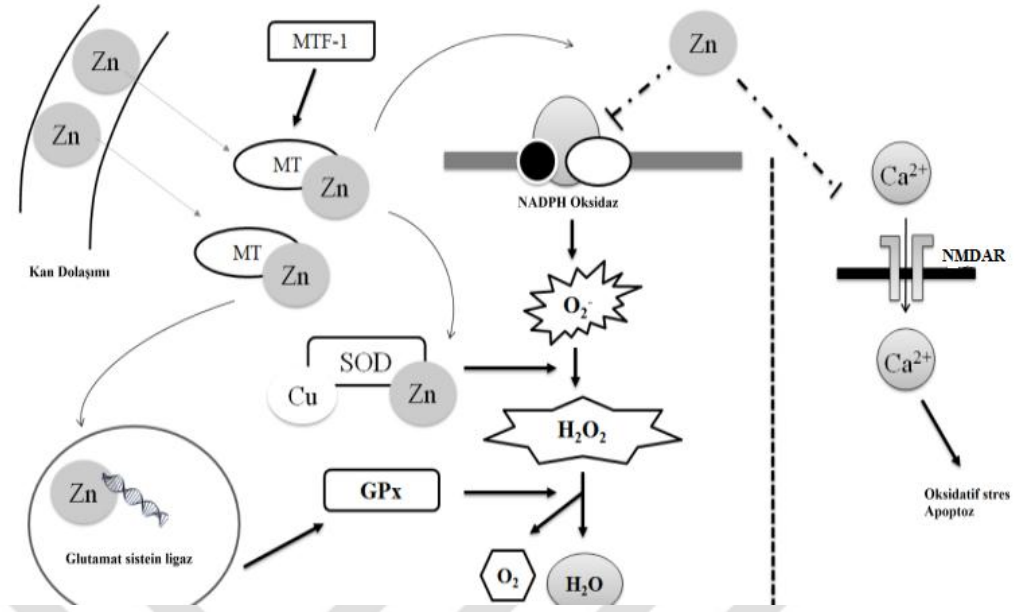
Total vücut çinko konsantrasyonunun belirteçleri, plazma ve serum çinko seviyeleridir. Sabah açlık plazma çinko seviyesi $< 11,5 \mu\text{mol/L}$ (750 mg/L) olarak belirlenmiştir. Plazmada % 60'ı albümine bağlı olan çinkonun % 10'u transferrin, geri kalan kısmı ise α -2-makroglobülin, histidin ve sistein gibi plazma bileşenlerine bağlanır (28, 147, 148).

Karbonhidrat, lipid, protein ve nükleik asit sentezinde önemli rol oynayan çinko, redoks reaksiyonlarına katılmadığı için kararlı halde bulunur. Ayrıca, çinko immün sistem cevabının düzenlenmesi, antioksidan fonksiyonlar, vitamin A metabolizması, enerji metabolizması, protein sentezi, büyüme ve gelişme, hafıza ve görme gibi metabolik fonksiyonlar için de gereklidir (39, 146, 152, 153).

Çinko, intrasellüler ve ekstrasellüler ortama birbirine göre zıt etki gösteren çinko taşıyıcı proteinler (ZnT) ailesi ve transmembran proteinler (ZIP, Zinc-Iron related transporter protein) ile taşınır. Sitoplazmaya çinko alımını ve veziküllerden çinko taşınmasını ZIP transmembran proteinleri sağlarken, çinkonun hücre dışına çıkışını, organellere ve sekretuar veziküllere çinko taşınmasını ZnT'ler gerçekleştirir (147, 148, 154, 155).

Çinko, metalloenzimler ve metalloproteinazların yapısına katılarak, moleküllerarası etkileşimlerde yapısal ve düzenleyici rol oynar. Canlılar için esansiyel element olarak çinko, 300'den fazla enzim ve 2000 transkripsiyon faktörü için kofaktör olarak davranır. Çinko, antioksidan savunma sisteminde etkili olan enzimlerin aktif

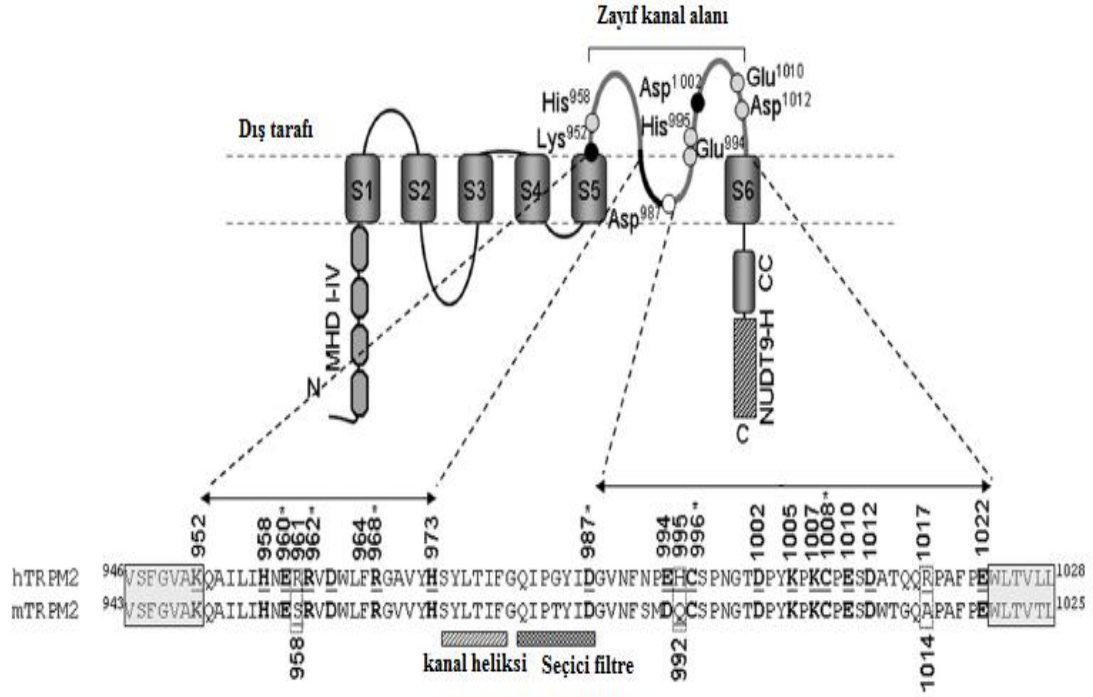
bölgelerine bağlanarak enzimlerin aktivasyonunu sağlar. Çinko ve bakır iyonları, SOD enziminin yapısal bileşeni olarak aktif bölgesinde bulunur. SOD, iki süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlayarak reaktif oksijen türlerinin zararlarını azaltır. Çinkonun antioksidan mekanizmalarından birisi de, glutatyon sentezinin hız sınırlayıcı enzimi olan glutamat sistein ligaz ekspresyonunu etkilemesidir. Çinko, glutatyon ile direkt ya da glutatyon peroksidaz kofaktörü olarak indirekt yoldan serbest radikalleri nötralize eder (39, 40, 155). Çinko, normal fizyolojik şartlarda metallothioneine bağlanarak metallothionein indükleyicisi olarak davranır. Oksidatif stres altında, mikrobeyinler metallothionein kompleksinden salınır ve antioksidan etki oluşturmak için hücrelere yeniden dağıtılır. Metallothionein çinko, bakır, krom, kadmiyum ve civa gibi metal iyonlarını bağlayarak metal iyonlarının toksisitesinin oluşturduğu oksidatif strese karşı hücrenin korunmasında etkilidir. Metal duyarlı transkripsiyon faktörü-1 (MTF-1), metal homeostazı ve oksidatif strese verilen hücresel cevaplarda önemli rol oynar. MTF-1 çinko bağımlı bir transkripsiyon faktörüdür, çinko konsantrasyonu arttığı zaman metallothionein ve çinko transporter-1 (ZnT-1) geninin ekspresyonunu uyarır. ZnT-1, hücre membranı üzerinde bulunur ve hücrelerden fazla çinko akışına izin verir. Böylece, hücre içinde çinko toksisitesini engeller. MTF-1, hücreleri oksidatif strese karşı korur, glutatyon bağımlı antioksidan protein olan selenoprotein geninin (Sepw1) ekspresyonunu aktive eder (39, 40, 154, 155). Çinko, lipid peroksidlerden radikal oluşumunu katalizleyen demir ve bakıra yarışmalı olarak hücre membranına bağlanabilir. Böylece çinko, demir ve bakır iyonları ile yer değiştirerek, reaktif radikallerin oluşumunu engelleyebilir. Çinko, ekstrasellüler ortamdan hücre içine kalsiyum iyonu taşınmasını sağlayan n-metil-d-aspartat (NMDA) reseptörü için inhibitör olarak davranır. Bu fonksiyonu ile çinko eksikliğinde NMDA reseptörü aktive olur; intrasellüler kalsiyum konsantrasyonu artar. İntrasellüler kalsiyum konsantrasyonundaki artış, oksidatif strese neden olan serbest radikallerin salınımını artırır. Ayrıca çinko, bir prooksidan enzim olan ve metallothionein sentezini indükleyen nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH-Oksidaz) reseptörünü inhibe eder. Bunun sonucunda çinko eksikliğinde, NADPH aktive olur ve reaktif oksijen türleri ve nitrojen türleri artış gösterir (Şekil 2.36) (40, 147).



Şekil 2.36: Antioksidan mekanizmaya çinkonun katılımı (40).

GPx; Glutasyon peroksidaz, **MT;** Metallothiyonin, **MTF-1;** Metal duyarlı transkripsiyon faktörü-1, **NADPH;** Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat, **NMDAR;** N-metil-D-aspartat reseptörü, **SOD;** süperoksit dismutaz enzimi, **Zn;** Çinko.

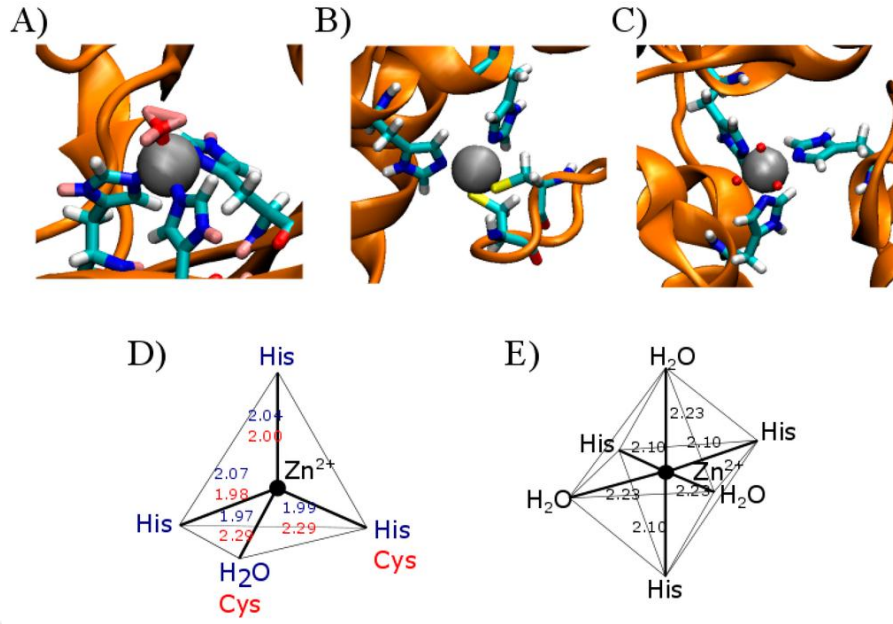
Çinko, çeşitli iyon kanallarının fonksiyonlarını değiştirir ya da onlara yeni fonksiyonlar kazandırır, hücre membranının kararlılığını ve bütünlüğünü korur. Çinko iyonları, glutamat, nikotinik asetilkolin, TRPM2, TRPM3 ve TRPM7 kanallarından geçebilir. Ayrıca TRPM7 kanalları, çinko aracılı nörotoksisitede önemli rol oynar. Ekstrasellüler çinkonun en yaygın etkisi, kanal aktivitesini güçlendiren veya inhibe eden allosterik etki ile gerçekleşir. MHD I-IV, TRPM kanalının dört homoloji bölgesi, S1-S6 transmembran bölümü, CC tetramerizasyon sarmal-sarmal bölgesi, NUDT9-NUD9 homoloji bölgesi olmak üzere TRPM2 kanalının dış por alanı ile çinkonun etkileşimi Şekil 2.37’de görülmektedir (39, 83, 154, 156).



Şekil 2.37: TRPM2 kanalının dış kanal bölgesindeki rezidüler ile çinkonun etkileşimi (154).

S5 segmentini bağlayan kısa döngü ve kanal heliksi ile iyon seçici filtreyi bağlayan uzun döngü ve S6 segmenti, TRP kanalının yapısal olarak dış bölgesinin bileşenidir. hTRPM2 kanalının ilgili bölgesi Zn^{++} ile etkileşebilen histidin, sistein, lizin, aspartat ve glutamat gibi 20 rezidü içerir. Zn^{++} , TRPM2 kanalının zayıf kanal alanındaki por bölgesi ile etkileşerek kanalın inaktivasyonunu indükler (39, 40, 83, 157, 158).

Şekil 2.38’de A, B ve C çinko parmak motifinin yapısal değişimini göstermektedir. Açık mavi renkler çinko atomunu, koyu mavi renkler koordinasyon derecesindeki imidozal nitrojeni, kırmızılar oksijeni, sarılar çinko ile etkileşen sülfür atomunu göstermektedir. D ve E de verilen koordinasyon bağlarının uzunluğu, atom bağlanma uzunlukları A ve B’ye uygulandığında C’deki gibi yapısal değişiklik olmaktadır (39, 148, 159, 160).



Şekil 2.38: Çinko içeren proteinler ve metal koordinasyon geometrilerinin temsili değişimi (39).

Çinko eksikliğinde çinkonun yapısına katıldığı enzimlerin fonksiyonları azalır, hücre replikasyonu yavaşlar, büyüme, gelişme gibi metabolik işlevler azalır. Ayrıca büyüme geriliği, dermatit, iştahsızlık, yara iyileşmesinde gecikme, erkeklerde hipogonadizm, mental letarji, karanlığa uyumda anormallik ve bağışıklık sisteminde zayıflama görülür (28, 157, 158).

2.3.3.2. Selenyum

1817’de sülfürik asit üretiminde çalışan işçilerde toksik bir madde olarak keşfedilen selenyum (Se) doğada saf, inorganik (sodyum selenit, sodyum selenat) ve organik (selenometiyonin, selenosistein) bileşikler şeklinde bulunur (45, 46).

1957’de yapılan bir çalışmada selenyumun E vitamini (α -tokoferol) eksikliği olan sıçanlarda karaciğer nekrozuna karşı koruyucu etkisinin olduğu tespit edildikten sonra; Se büyüme, gelişme ve homeostatik dengenin sürdürülmesinde gerekli esansiyel bir element olarak tanımlanmıştır (28, 45).

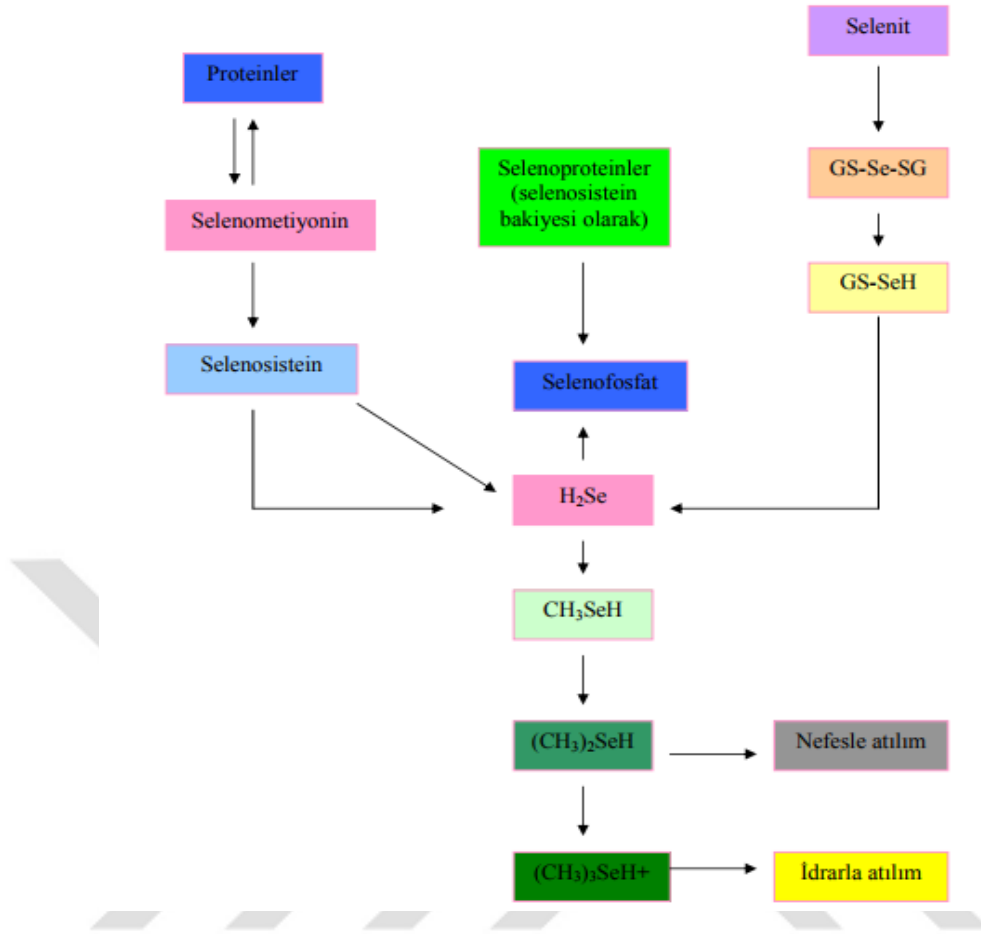
Diyetle alınan selenyumun % 50’ sinin et ve balıktan, % 30- 60’ının tahıllardan geldiği, içme suyundaki selenyum katkısının düşük olduğu bildirilmektedir. Yetişkinlerde tavsiye edilen tüketimi 55 $\mu\text{g/gün}$ olarak belirtilmesine rağmen, 100-200

$\mu\text{g/gün}$ tüketim olması koruyucu etki oluştururken, $400 \mu\text{g/gün}$ üzerinde selenyum tüketiminin toksik etki oluşturduğu belirtilmektedir. Diyet dışında solunum ve deri yolu ile de küçük miktarda da olsa vücuda girebilen selenyum böbrek korteksi başta olmak üzere, karaciğer, pankreas ve hipofiz bezinde birikir (41, 45, 159, 160).

Vücuda alınan selenyumun % 38-85'i barsaklarda emilirken, vücuttan atımı % 90'ı idrarla % 10'u da dışkı ile gerçekleşmektedir. Vitamin A, E ve C, protein ve metiyonin fazlalığı selenyum emilimini ve kullanımını arttırırken; B2 ve B6 vitamini, protein ve metiyonin yetersizliği, civa, gümüş, kurşun, kadmiyum ve arsenik gibi ağır metaller, merkaptan ve sülfür fazlalığı selenyum emilimini azaltmaktadır (41, 46, 159).

Yenidoğan plazma selenyum seviyesi 40-100 ng/ml iken, 10 yaş bireylerde yetişkin dönemin % 90'ına ulaşır ve yetişkinlerde 50-150 ng/ml arasında değişim göstermektedir (45, 159, 160, 161).

İnorganik formdaki selenit ve selenat in vivo olarak organik yapıdaki selenosisteine formuna dönüşür. Diyetle alınan organik formdaki selenometiyonin (SeMet), metiyonin ile yarışmalı olarak metiyonin içeren proteinlerde depolanır ya da transsülfürasyon ile selenosistein (SeCys) çevrilir. Selenosistein katabolizma sonucunda hidrojen selenide (H_2Se) çevrilerek, dimetil selenid ($(\text{CH}_3)_2\text{SeH}$) formunda solunum ile ya da trimetilselenonyum ($(\text{CH}_3)_3\text{SeH}^+$) iyonu olarak idrarla atılır (Şekil 2.39) (41, 42, 45, 46).



Şekil 2.39: Selenyum metabolizması (159).

H_2Se : Hidrojen selenid, **CH_3SeH :** Metil selenid, **$(CH_3)_2SeH$:** Dimetil selenid, **$(CH_3)_3SeH^+$:** trimetilselenonyum iyonu, **$GS-Se-SG$:** Selenodiglutasyon, **$GS-SeH$:** Glutasyon selenid

Yapısında selenosistein aminoasidi bulunan selenyum, selenoproteinler aracılığı ile biyolojik etki gösterir. Biyolojik pH'da anyonik halde bulunan selenosistein bu özelliği ile elektron alışverişi yaparak redoks reaksiyonlarının gerçekleşmesini sağlar. Se, selenyum bağımlı GSH-Px, iyodotironin deiyodinaz ve tiyoredoksin redüktaz (TrxR) gibi selenoproteinlerin yapısına katılır (28, 42, 46, 161). Bu selenoproteinlerden GSH-Px, E vitamini ile uyumlu çalışan enzimatik bir antioksidandır ve reaktif oksijen türlerinin yol açtığı oksidatif hasara karşı lipidleri, hücre içindeki makromolekülleri ve hücre membranını korur. TrxR selenoproteini ise, tiyol bağımlı redoks mekanizmasını içeren hücresel süreçlerde kritik önem taşır (41, 44, 45, 160).

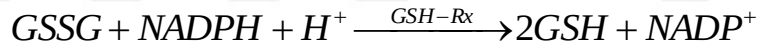
Pek çok enzimin yapısında katalitik rol oynayan selenyumun eksikliği, bu enzimlerin fonksiyonlarında azalma sonucunda antioksidan savunma, redoks regülasyonu ve enerji üretiminde bozulmalar görülebilir (43, 44, 45, 46).

2.3.3.1. Glutasyon

Glutasyon (GSH), organizmada tiyol grubu içeren, enzimatik reaksiyonlar aracılığı ve serbest radikalleri temizleme özelliği ile önemli tripeptit bir antioksidandır. Suda çözünebilen glutasyon pekçok hücrede yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve hücre membranını lipid peroksidasyonuna karşı korur. Hücrede indirgenmiş formda bulunan glutasyon, GSH-Px tarafından okside hali olan GSSH 'ye yükseltgenir (47, 162).



Glutasyon redüktaz, glutasyon peroksidaz katalizasyonu ile oluşan okside glutasyonun indirgenmesini katalizler. Glutasyonun, GSH-Px ve GSH-Rx ile indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları NADPH bağımlı olarak gerçekleşir (163, 164).



GSH, hücre içindeki tekli oksijen (1O_2), süperoksit (O_2^-) ve hidroksi (OH) radikalleri gibi birçok zararlı serbest radikale karşı enzim katalizi olmadan reaksiyona girebilir. Glutasyonun, DNA ve protein sentezi, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücre fonksiyonları dışında antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rolü vardır. İndirgenmiş glutasyon içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur. Glutasyon peroksidazın kofaktörlüğünü yaparak, hidrojen peroksidi metabolize eder. Ayrıca, önemli bir antioksidan olan glutasyon hücre içinde protein, sistein ve koenzim-A gibi moleküllerin tiyol gruplarının ve askorbat, α - tokoferol gibi moleküllerin korunmasında rol alır (47, 162, 164).

2.4. HİPOKSİ VE HİPERKAPNİ

Solunum solunum merkezi, solunum merkezindeki kimoduyar hücreler ve periferel kimoreseptörler aracılığı ile düzenlenir. Bu düzenleme, dolaşımdaki parsiyel oksijen basıncı (PO_2) ve parsiyel karbondioksit basıncı (PCO_2) seviyesi ile hidrojen iyonları (H^+) konsantrasyonunun değişiminin nöronal ağ sistemi ile beyne iletilmesi ve feed-back mekanizması ile kontrol edilmesi sonucunda gerçekleşir. Solunumda akciğerin temel işlevi, pulmoner kapillerdeki kan ile alveoldeki hava arasında gaz (O_2 , CO_2) değişimini gerçekleştirmektir. Bu olay, ortamdaki gazların parsiyel basınçlarına göre diffüzyonla olmaktadır. Böylece, arter kanındaki gaz basınçları sabit kalmakta; deniz seviyesinde ve dinlenme durumunda yapılan solunum sırasında; PO_2 80-100 mmHg, arteriyel PCO_2 35-45 mmHg arasında dengede tutulmaktadır (22, 165-167).

2.4.1. Hipoksi

Canlılığın devam etmesi için yeterli oranda besin maddeleri ile beraber su ve oksijenin de vücuda alınması gerekmektedir. Organizma, besinleri ve suyu depolayıp belirli bir süre aç ve susuz kalarak canlılığını sürdürebilir. Vücutta depolanmayan ve sürekli dış ortamdan alınarak doku ve organlara taşınması gereken oksijen, canlıların varlığını sürdürebilmesi için esansiyel bir elementtir. Oksijen, hücresel fonksiyonlar için gerekli enerji kaynağı olan adenosin trifosfatın (ATP) üretildiği, aerobik glikoz sisteminin son elektron alıcısıdır (13, 15, 165, 168). Fizyolojik pH ve $37^\circ C$ vücut sıcaklığında arteriyel kanda PO_2 80-100 mmHg arasında bulunur. Egzersiz sırasında bile dengede kalan PO_2 , 2500-3000 m yüksekliğe çıkıldığı zaman fizyolojik değerinin altına düşmektedir. PO_2 değerinin azalmasına bağlı olarak, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, konjestif kalp yetmezliği gibi çeşitli kardiyorespiratuvar hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, PO_2 seviyesinin fizyolojik değerinin altına düşmesi, yetişkin bireylerin % 25'ini etkileyen obstrüktif uyku apnesi, pulmoner hipertansiyon, ventriküler hipertrofi ve kardiyorespiratuvar hastalıkların tetikleyebileceği alzheimer gibi nörolojik hastalıklara neden olabilmektedir (19, 52, 166).

Oksijen homeostazının korunması ve bu dengenin sürdürülmesi hormonal, otokrin ve nöronal mekanizmalar aracılığı ile gerçekleşir. Bu mekanizmalarda ortaya çıkacak olan herhangi bir dengesizlik sonucu oksijen seviyesinin düşmesi, hücrelerin işlevlerini yerine getirememesine, çevreleriyle ilişkilerinin bozulmasına ve dokularda hasar oluşmasına neden olur (15, 17, 18). Oksijen konsantrasyonunun azaldığı durumda;

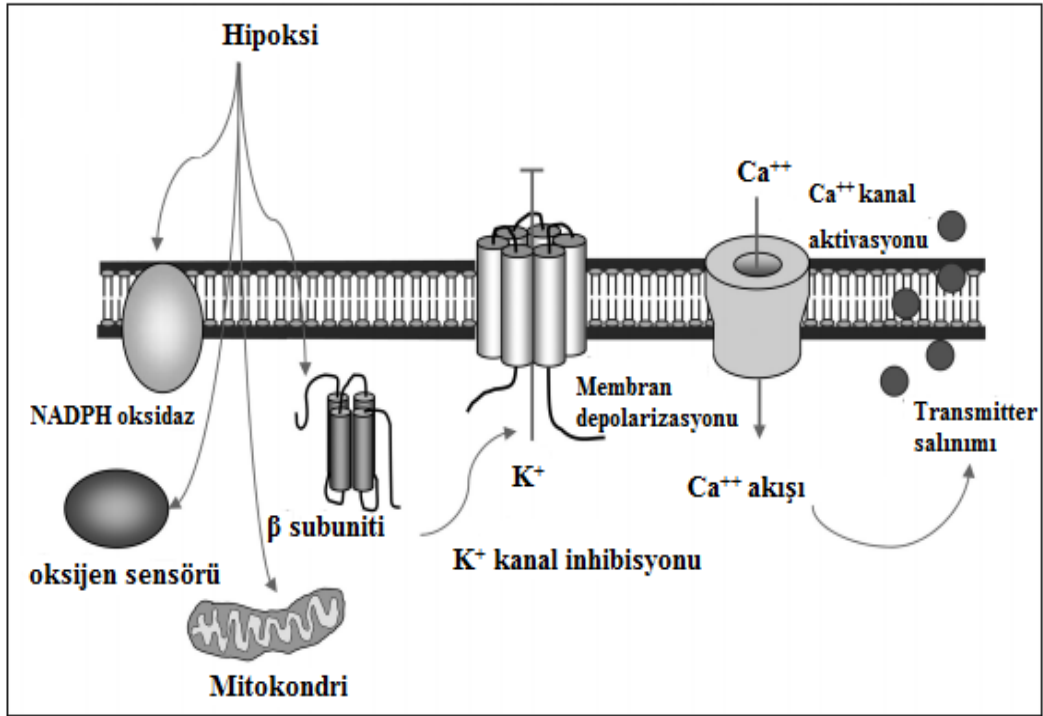
organ, doku ve hücrelerin fonksiyonlarının bozulduğu durumlar hipoksik koşullar olarak ifade edilmektedir (13, 166, 168).

Hipoksi, kandaki oksijenin dokulara yetersiz taşınmasını ifade eder. Parsiyel oksijen basıncı normoksik durumun altına düştüğünde, hücre metabolizması anaerobik mekanizmaya geçiş yapar; glikoz yıkımı laktik asit düzeyinde kalır. Bu durumun uzun süre devam etmesi ise hücre ölümüne neden olur (12, 165, 168).

2.4.1.1. Hipoksinin Hücre Membranı ve Oksidatif Denge Üzerine Etkisi

Hipoksi, hücreler için önemli patolojik bir streştir ve hipoksiye maruz kalan hücreler, normal fizyolojik işlevlerini sürdüremezler. Bu durumdan en çok etkilenen hücresel yapı, enerji üretimini sağlayan mitokondridir (15, 21, 169, 170). Hipoksik şartlarda, mitokondride üretilen hücresel ATP düzeyi azalmakta, biriken adenozin moleküllerinin yıkımı artmakta, enerji üretimi ve tüketimi arasındaki denge bozulmaktadır. Hipoksi sonucu ATP seviyesinin azalması, iyonik dengenin bozulması, asidoz, hücre membranının akışkanlığının bozulması ve geçirgenliğinin artması, proteaz ve fosfolipazların aktivasyonu gibi durumlara yol açmaktadır (130, 171-173).

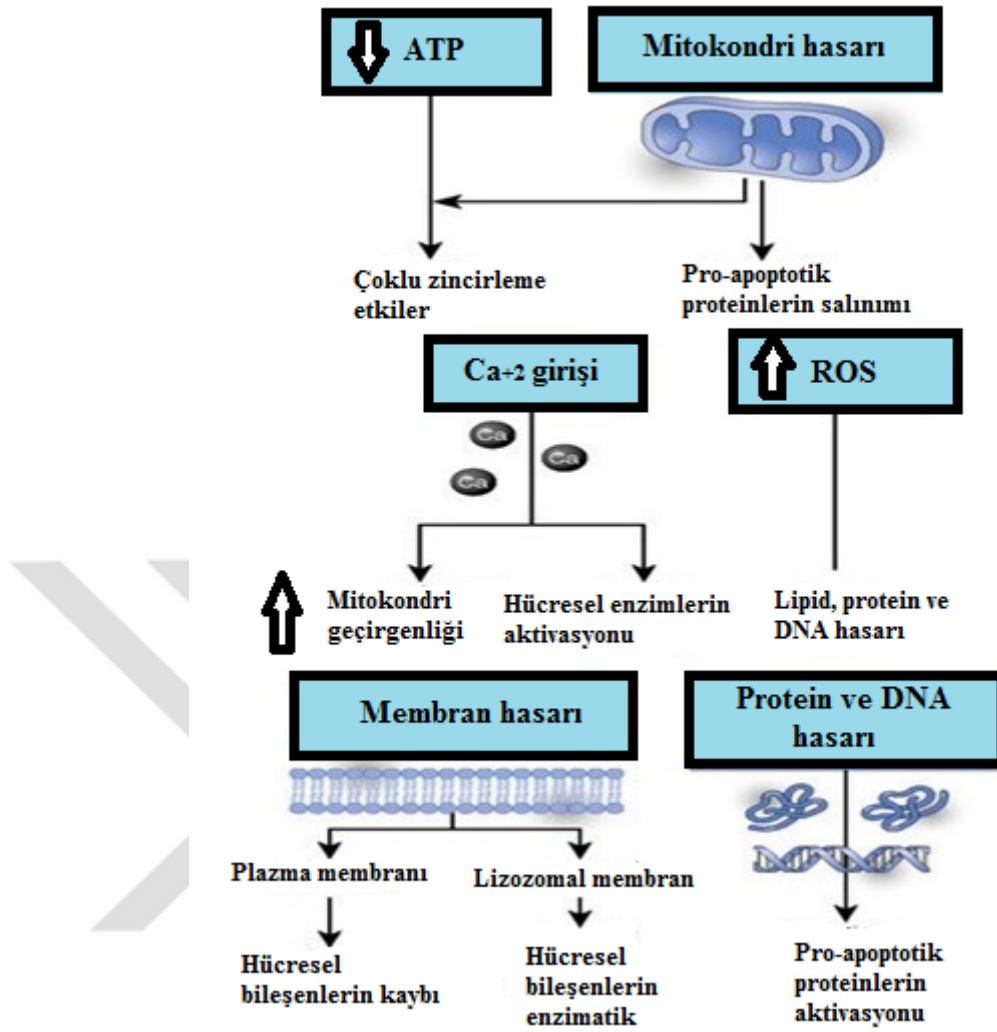
Protein sentezi, hücre membranının bütünlüğünün korunması, geçirgenliğinin düzenlenmesi ve Na^+ , K^+ ve Ca^{++} iyonlarının homeostazısının sürdürülmesi için hayati önem taşıyan ATP molekülünün üretiminin hipoksik durumda azalması ile hücrelerde geri dönüşümsüz süreçler başlayabilir. Aktif iyon transportunu sağlayan Na^+/K^+ -ATPaz pompasının işlevinin bozulması sonucu, hücrelere fazla Na^+ iyonu girişi olurken, hücrelerden K^+ iyonu çıkışı artar. Fosfolipidlerin yıkımının artması ile hücre membranının Ca^{++} iyonlarına geçirgenliği artar ve böylece hücre içinde Ca^{++} iyonları birikir (Şekil 2.40) (21, 130, 167, 170, 174).



Şekil 2.40: Epitel hücrelerin hipoksiye yanıtı (130).

Enerji üretim ve tüketim metabolizması bozularak, aerobik metabolizma ile enerji üretimi azalır, anaerobik glikoliz başlar. Hücresel düzeyde glikojen depoları hızla tükenirken, hücre içi laktik asit birikiminin artışına paralel olarak hücre sitoplazmasının pH'ı düşer (167, 174, 175).

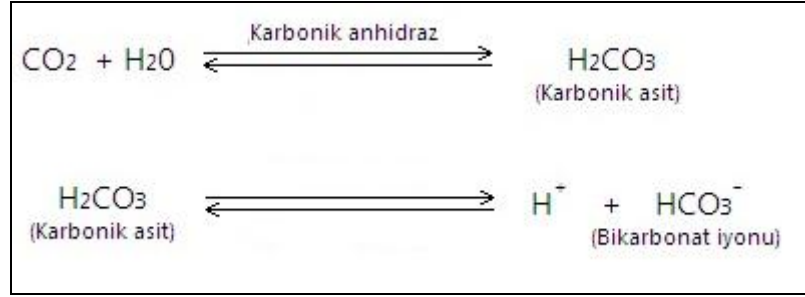
Hipoksi, hücrelerde reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırmaktadır. Oksidatif mekanizmaların aktifleşmesi ile birlikte, serbest radikaller radikal olmayan moleküller ile tepkimeye girerek zincirleme reaksiyonlara neden olabilmektedir (21, 169, 170, 173). Serbest oksijen radikallerinin üretimi artarak organizmadaki oksidan/antioksidan denge bozulur; protein, lipid, karbonhidrat ve nükleik asitler gibi biyomoleküllerin hasar görmesi sonucu apoptoza neden olan öncül apoptotik proteinlerin salınımı artar. Hücre membranının bütünlüğü ve seçici geçirgenliği bozulur ve hücre hasarı tetiklenmiş olur (Şekil 2.41) (21, 130, 176, 177).



Şekil 2.41: Hipoksi sonucunda azalan ATP üretiminin hücre düzeyde etkileri (175).

2.4.2. Hiperkapni

Karbondioksit (CO_2), polar olmayan küçük bir moleküldür ve atmosferdeki havanın CO_2 seviyesi ortalama % 0,04 civarındadır. CO_2 , konsantrasyon gradyanı ve lipid/su bölümündeki CO_2 'in davranışına bağlı olarak pasif difüzyonla biyolojik hücre membranından geçebilir (23, 25, 178, 179). CO_2 geçirgenliği üzerine kolesterolün etkisi ve karbondioksitin hücre membranını geçmek için aquaporin ile rhesus protein kanallarını kullanmasının keşfi ile bu görüş değişmiştir. CO_2 , hücre içerisine girdikten sonra, çok hızlı bir şekilde karbonik anhidraz tarafından hidrate formu olan karbonik aside (H_2CO_3)'e dönüşür. Karbonik asit de hidrojen (H^+) ve bikarbonat (HCO_3^-) iyonlarına ayrışır (23, 180, 181).



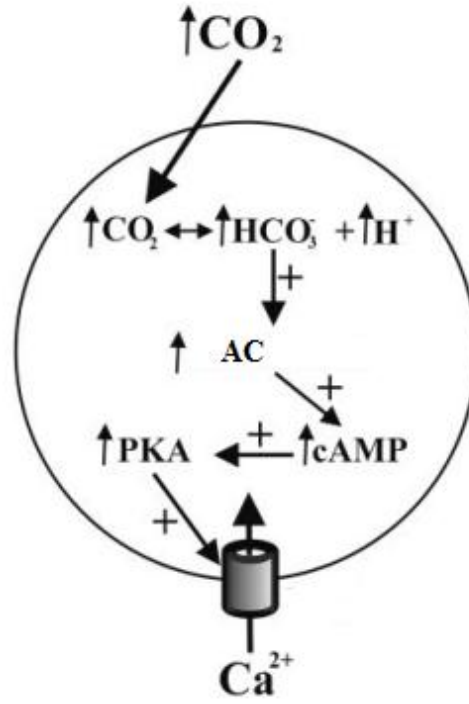
Hücresel enzimler ve kimyasal reaksiyonlar pH değişimine duyarlıdır ve hücreler intrasellüler pH'ın sürdürülmesi için hücre membranından H^+ ve HCO_3^- transportunu sağlarlar. Hücreler, farklı mekanizmalar aracılığı ile CO_2 'e duyarlılık gösterir ve CO_2 konsantrasyonundaki değişiklikler hücresel fonksiyonlar üzerine etki eder (23, 24, 25, 178).

Hiperkapni, arteriyel PCO_2 fizyolojik sınırlarının üzerinde olması ve yükselmeye devam etmesidir. Arteriyel kanda $\text{PCO}_2 > 45$ mmHg ve $\text{PO}_2 < 55$ mmHg olması hiperkapnik solunum yetmezliği olarak tanımlanır. Hiperkapnik solunum yetmezliği nedenleri; kronik obstrüktif akciğer hastalığı, astım ve obstrüktif uyku apnesi gibi ventilasyonu sağlayan hava yollarında, göğüs kafesi ve etrafındaki kaslarda, kasların kasılıp gevşemesini sağlayan solunum merkezinde ve uyarıları kaslara ileten sinir ağında oluşabilecek hastalıklarda ortaya çıkabilir (20, 22, 36, 27, 179).

2.4.2.1. Hiperkapninin Hücre Membranı ve Oksidatif Denge Üzerine Etkisi

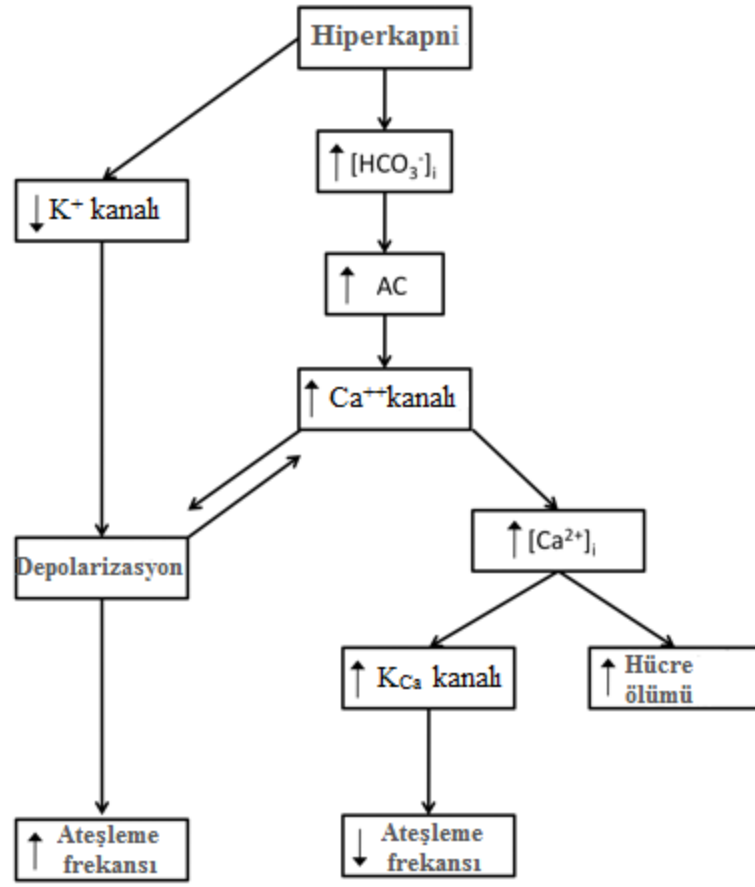
Oksidatif metabolizmanın ana ürünü olan CO_2 , hücre membranından serbestçe geçebildiği için, ekstrasellüler ortamda parsiyel PCO_2 artması intrasellüler pH'ı (pH_i) düşürür. Hücre içindeki karbonik anhidraz fazlalığından dolayı, hızlıca intrasellüler asidoz meydana gelir. Hiperkapni durumunda değişen intrasellüler pH_i 'nin erken veya geç kompensasyon mekanizmaları vardır. İntrasellüler pH'ın 6.9 - 7.2 aralığındaki değişimleri, hücresel enerjettiği değiştirmezken, asidozda hücre membranının yapısal ve fonksiyonel işlevleri olumsuz yönde etkilenir (26, 182, 183).

Hiperkapni durumunda, CO_2 hücre içinde H^+ ve HCO_3^- 'a ayrıştıktan sonra, HCO_3^- konsantrasyonunun artışına paralel olarak çözülebilir formdaki adenil siklazın (AC) etkisiyle anahtar sinyal molekül ikinci haberci 3'-5' siklik adenosin monofosfat (cAMP) üretimi artar. Kalsiyum kanalı aktive olur ve bu kanaldan hücre içine Ca^{++} girişi artar (Şekil 2.42) (23, 178, 179, 181).



Şekil 2.42: CO₂ etkisi ile Ca⁺⁺ kanalının aktivasyonu (181).

Hiperkapni, H⁺ duyarlı K⁺ akımını inhibe ederek hücre membranının depolarizasyonu aracılığı ile aksiyon potansiyeli deşarj frekansının artışına neden olmaktadır. Ayrıca hiperkapnik durumda, HCO₃⁻ konsantrasyonunun artışı ile hücre içi Ca⁺⁺ akımı artmaktadır. Bunun sonucunda, hiperkapnik koşullar aksiyon potansiyeli deşarj frekansının azalmasına ve hücre ölümüne sebep olabilmektedir (Şekil 2.43) (181, 183, 184).



Şekil 2.43: Hiperkapninin hücresel etkileri (27).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Amplifikatör, HEKA EPC-10

Azot tankı (-196 °C), Lab Systems Taylor-Wharton

Buzdolabı, Arçelik

CO₂ inkübatörü, ESCO Cell Culture CO₂ Incubator

Deiyonize su cihazı, Nüve NS-104

Derin dondurucu (-80 °C), Nüve Direct Freeze DF-490

Faraday kafesi

Floresan kaynak, HBO 50

Hassas terazi, Kern PFB

İnkübatör, Nüve Cooled Incubator ES-120

İnvert floresan mikroskop, Zeiss Axivert 40-CFL

İnvert mikroskop, Leitz-Diavert

Kan gazı cihazı, Radiometer ABL-800

Kumanda paneli, Luigs & Neumann SM7

Laminer akım kabini, ESCO Sentinel Gold Microprocessor Control System

Mikroelektrot çekici, Sutter Instruments Flaming/Brown Model P-97

Mikromanipulatör, EPC 10-USB Heka

Osmometre, KNAUER K-7400

Otoklav cihazı, Nüve Steam A-OT 40L

Otomatik pipetör, Isolab

pH Metre, Hanna Instruments pH211 Microprocessor

Sıcaklık kontrol ünitesi, Luigs & Neumann Badcontroller V

Soğutmalı satrifüj, Z326 K - Hermle Labortechnik

Spektrofotometre, UV-1800 Shimadzu UV-VIS Spectrophotometer

Su banyosu, Nüve BM302

Titreşim önleyici masa

3.2. Çalışmada Kullanılan Kitler, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

2 - Aminoetoksi difenolborat (2-APB), Acros

Ampisilin, Sigma

Borasilikat tüpler (1,5 x 0,86 mm), Sutter Instrument

Çinko sülfat, Merck

D - glikoz monohidrat, Merck

Dimetil sülfoksit (DMSO), Wisent

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), Wisent

Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), Sigma

Falkon tüp 15 - 50 ml, Nest

Fenilmetanesülfonil florid (PMSF), Sigma

Fetal bovine serum (FBS), Wisent

Fosfat tampon solüsyonu (PBS), Wisent

Glasiyal asetik asit, Sigma

Glutasyon, Sigma

Hepes free asit, MP Biomedicals

Hidrojen peroksit (H₂O₂), Merck

Hidroklorik asit (HCl), Raftel

İnsülin enjektörü, Hayat

Kalsiyum klorür (CaCl₂), Riedel-De Haen Ag

Kriyotüp, Nest

L - Glutamik asit, AppliChem

Laktatdehidrogenaz (LDH) assay TOX7, Sigma

Lamel, Heinz Herenz

Lennox L agar, Invitrogen Life Technologies, USA

Luria broth, Invitrogen Life Technologies, USA

Magnezyum klorür (MgCl₂), Riedel-De Haen Ag

Maxiprep kit, GeneElute Sigma

Maya özütü, Bacto Yeast Extract

Miniprep kiti, Qiagen

N-metil D-glikamin (NMDG), Acros

Osmometre 400 mOsmol/kg kalibrasyon solüsyonu NaCl, Knauer

Osmometre temizleme solüsyonu, Knauer Y1277

Penisilin-streptomisin antibiyotik solüsyonu, Wisent
Perfectin transfection reagent, Genlantis
pH:7 tampon solüsyonu, Norateks Kimya
pH:9 tampon solüsyonu, Norateks Kimya
Potasyum hidroksit (KOH), Carlo ERba
Potasyum klorür (KCl), Sigma
Protease inhibitor coctail, Sigma
Sezyum hidroksit (CsOH), Sigma
Sodyum hidroksit (NaOH), Merck
Sodyum klorür, Sigma
Sodyum selenit, Sigma
Steril mikropipet 5ml / 10 ml, Nest
Steril su, Nest
Sterilizasyon filtresi (0,2 μ m), Nest
T 25/T75 kültür flaskı, Nest
Thoma lamı, Heinz Herenz
Tiyobarbitürik asit (TBA), Sigma
Triklorikasetik asit (TCA), Sigma
Tripın mavisi, Gibco
Tripsin-EDTA, Wisent
Trypton, Bacto - tryptone
Tris baz, Wisent
Tris HCl, Wisent
Triton X-100, Merck

3.3. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

3.3.1. TRPM2 Plazmidinin Çoğaltılmasında (Transformasyon) Kullanılan Solüsyonlar

50 X TAE (Tris-asetik asit-EDTA)

- 242 g Tris baz
- 57,1 g Glasiyal asetik asit
- 100 ml EDTA (0.5 M)

Distile su ile 1 lt'ye tamamlandı ve otoklav ile sterilize edildi.

Ampisilin Stok

3 g ampisilin sodyum tuzu 30 ml'ye tamamlandı. 0,2 µm'lik enjektör filtreden geçirildi ve 100 g/lt olacak şekilde 1 ml'lik stoklar halinde -20 °C' de saklandı.

LB Sıvı Besiyeri

- 10 g/lt Tripton
- 5 g/lt Maya özütü
- 5 g/lt NaCl

Distile su ile 1 lt'ye tamamlandıktan sonra otoklavlanarak +4°C'de saklandı.

LB Agar Besiyeri

- 1 g Tripton
- 0,5 g Maya özütü
- 1 g NaCl
- 1,5 g Agar

Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve otoklavlandı. Uygun ısıda ihtiyaç ve amaca göre antibiyotik eklenerek petrilere döküldü.

3.3.2. Hücre Kültüründe Örneklerin Hazırlanmasında Kullanılan Solüsyonlar

MDA Ölçümü İçin Lizis Tamponu

- % 0,5 TritonX-100
- 1 mM PMSF
- 10 mM Tris-HCl (pH:7.4)

- 1 mM EDTA
- Proteaz inhibitör kiti

LDH Ölçümü İçin Lizis Tamponu

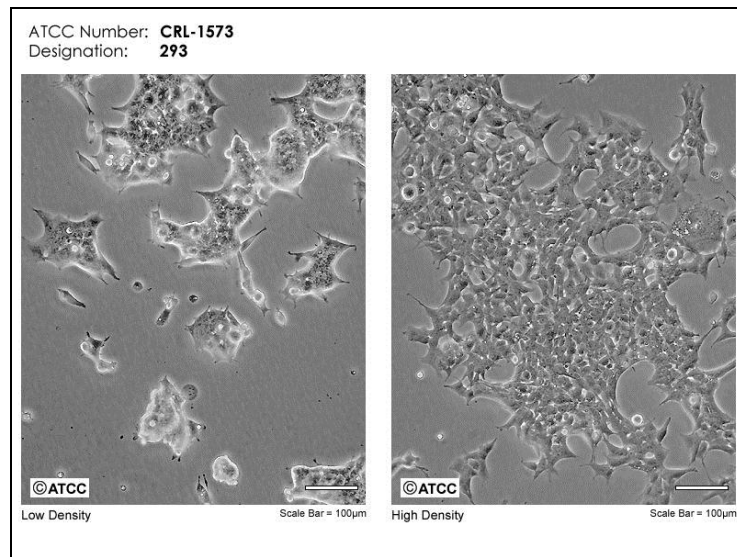
- 25 ml LDH assay substrat solüsyonu
- 25 ml LDH assay kofaktör preperasyonu
- 25 ml LDH assay boya solüsyonu
- 10 ml LDH assay lizis solüsyonu
- 1 N Hidroklorik asit

Malondialdehit (MDA) Analizinde Kullanılan Solüsyonlar

- % 0,75 TBA çözeltisi
- % 30 TCA çözeltisi
- 5 M HCl

3.4. Hücre Kültürü Deneyleri

Hücre kültürü deneyleri İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda bulunan Hücre Kültür Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deneylerde kullanılan insan embriyonik böbrek hücreleri (Human Kidney Embryonic Cells-HEK293 (CRL-1573)) Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonundan (American Type Culture Collection-ATCC) ticari olarak temin edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: HEK293 (CRL - 1573) Hücreleri (185).

3.4.1. Hücrelerin İnkübasyonu, Bakımı ve Gözlenmesi

Deneylerde kullanılan insan embriyonik böbrek hücreleri (Human Kidney Embryonic Cells-HEK293 (CRL-1573)) Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonundan (American Type Culture Collection-ATCC) soğuk zincir ile teslim alındıktan sonra deneysel işlemler yapılana kadar sıvı azot tankında (-196°C) saklandı.

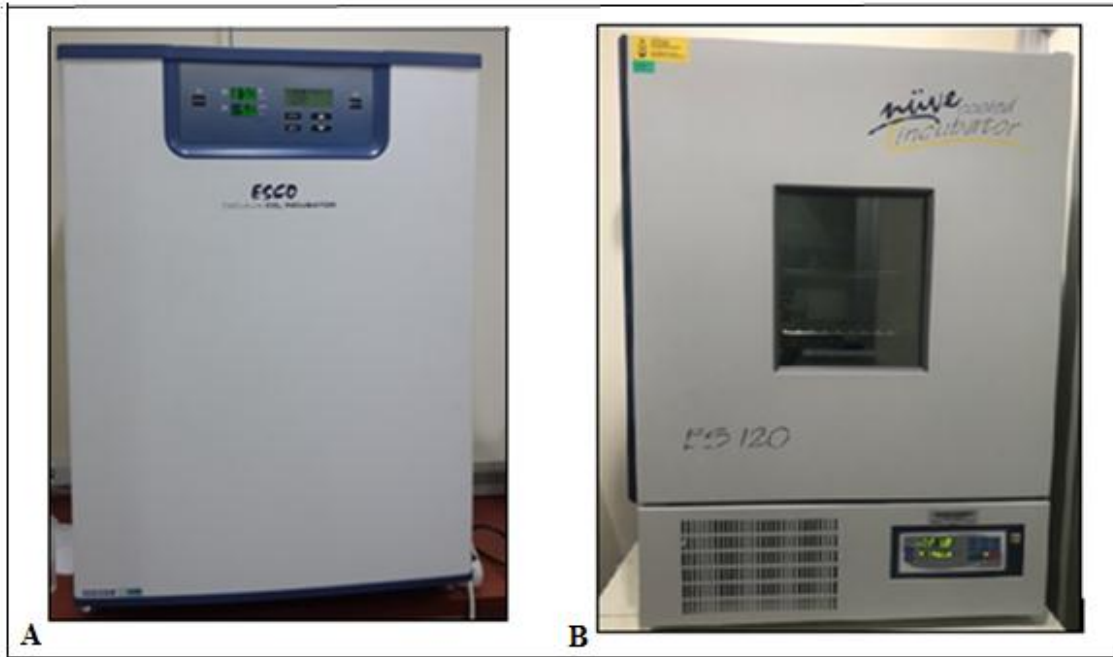
Deneylere başlamadan önce hücre kültür odasında ve laminar akım kabiniinde ESCO Infinity Class II (ESCO Sentinel Gold Microprocessor Control System, USA) (Şekil 3.2) bulunan ultraviyole (UV) lambalar kullanılarak, çalışma ortamının sterilizasyonu sağlandı. Laminar akım kabininin çalışma alanı, laboratuvarın tüm yüzey alanı ve deneylerde kullanılacak olan tüm malzemeler % 70'lik etil alkol ile sterilize edildi.



Şekil 3.2: Laminar akım kabini (ESCO Sentinel Gold Microprocessor Control System, USA).

CO₂ inkübatörünün (ESCO Cell Culture CO₂ Incubator) (Şekil 3.3A) steril koşullara gelmesi için çalışma öncesinde 400 ml distile su kullanılarak dekontaminasyon işlemi gerçekleştirildi. Dekontaminasyon sonrası CO₂ inkübatörü hücrelerin yaşayabileceği 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava olan kültür ortamı koşuluna ayarlandı. Çalışmada kullanılacak olan sarf malzemeler ve bütün materyaller otoklav cihazı (Nüve Steam A-OT 40L) (Şekil 3.4) ile otoklavlandıktan

sonra 37°C'deki soğutmalı inkübatöre (Nüve ES-120, Cooled Incubator) (Şekil 3.3B) konuldu.



Şekil 3.3: A. CO₂ İnkübatörü (ESCO Cell Culture CO₂ Incubator).
B. İnkübatör (Nüve Cooled Incubator, ES120).



Şekil 3.4: Otoklav cihazı (Nüve Steam A - OT).

Hücre kültürü deneylerinde kullanılacak olan tüm solüsyonlar hazırlandıktan sonra sterilizasyon için sterilizasyon filtrelerinden geçirildi ve otoklavlanarak uygun koşullarda saklandı.

3.4.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılacak Solüsyonların Hazırlanması

Deneylerde kullanılacak olan ısı ile inaktive edilmiş fetal sıgır serumunun (FBS) hazırlanması için -20°C 'de bulunan FBS, inaktivasyon işlemi için 55°C 'de su banyosunda (Nüve BM302) (Şekil 3.5) 30 dk bekletildi ve sonrasında 15 ml ve 50 ml falkon tüplere alınarak deneylerde kullanılabilecek kadar tekrar -20°C 'de derin dondurucuya konuldu. Standart kültür besiyeri, cDMEM (complet-komplet DMEM) hazırlanması için $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bulunan Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) solüsyonu ve inaktive FBS 37°C 'ye ayarlanmış etüve alındı ve sıcaklığı 37°C 'ye ulaşınca kadar bekletildi. % 89 DMEM, % 10 ısı ile inaktive edilmiş FBS ve % 1 Penisilin-streptomisin antibiyotik solüsyonu kullanılarak steril koşullarda kültür besiyeri-cDMEM hazırlandı. Hücre pasajlama, dondurma ve dondurulmuş hücrelerin çözündürülmesi gibi deneysel işlemlerde standart kültür besiyeri kullanıldı.



Şekil 3.5: Su banyosu (Nüve BM302).

3.4.2. Hücrelerin Çözündürülmesi

-196°C sıvı azot tankındaki HEK293 hücreleri deneylerde kullanılmak üzere uygun steril koşullarda hızlı bir şekilde çözündürüldü. Bunun için hücrelerin saklandığı

kriyo tüpler orjin noktasından tutularak 37°C'deki su banyosunda 2 dk bekletildi ve hücrelerin çözünmeleri sağlandı. Çözdürülen hücrelerin bulunduğu kriyo tüpler % 70 etil alkol ile sterilize edildikten sonra laminar akım kabinine alındı. -20°C'de bulunan kültür besiyeri, inaktive FBS 37°C'ye ayarlanmış etüve alındı ve sıcaklıkları 37°C'ye ulaşınca kadar beklendi. Kullanılacak olan solüsyonların bulunduğu şişeler ve kriyo tüpler % 70'lik alkol ile silinerek laminar akım kabinine alındı. 15 ml falkon tüp içerisine 8-10 ml kültür besiyeri konuldu ve üzerine kriyo tüpteki hücre süspansiyonu direkt aktararak hafifçe çalkalandı. 1000 rpm'de (revolutions per minute) 5 dk soğutmalı satrifüj cihazı (Z326 K - Hermle Labortechnik) (Şekil 3.6) ile santrifüj edildikten sonra süpernatant atık kutusuna döküldü. Hücre peleti üzerine 5 ml kültür besiyeri konularak 25-30 kez pipetaj yapıldı. 25 cm² alana sahip T25 kültür flaskı üzerine hücre bilgileri yazıldıktan sonra içerisine sırasıyla 8-10 ml kültür besiyeri ve istenen oranda hücre süspansiyonundan konuldu. Hücreler invert mikroskop (Leitz Diavert) (Şekil 3.7) ile gözlemlendikten sonra canlılıklarını sürdürmeleri için CO₂ inkübatörüne yerleştirildi.



Şekil 3.6: Soğutmalı santrifüj (Z326K - Hermle Labortechnik).

Hücreler her gün mikroskopta gözlemlenerek; besiyerinin rengi, bulanıklığı düzenli olarak kontrol edildi. Besiyer rengi sarı ise asiditeyi, mor ise alkaliliği işaret etmektedir. Besiyerin çok bazik ya da asidik olması ortamın kontaminasyonunu, fazla üreme olmuş kültürü ve ölmüş hücreleri gösterir. Besiyerde bulutsu bir görünüm varsa,

kontaminasyonu veya kültürün fazla üremiş olduğunu işaret eder. Bu gibi durumları değerlendirmek için; inkübatörden alınan 25 cm²'lik zemine sahip kültür flasklarında bulunan hücreler kontrol edildi. Sağlıklı hücreler eğer yeterli yoğunlukta ise (en az % 80) deneylerde kullanılmak üzere laminar akım kabinine alındı.



Şekil 3.7: İnvirt mikroskop (Leitz Diavert).

3.4.3. Hücrelerin Pasajlanması

-20°C'de bulunan kültür besiyeri, inaktive FBS ve Tripsin-EDTA solüsyonları 37°C'ye ayarlanmış etüve alındı ve sıcaklıkları 37°C'ye ulaşınca kadar beklendi. Fosfat tampon solüsyonu (PBS) ve bahsedilen solüsyonların bulunduğu şişeler % 70'lik alkol ile silinerek laminar akım kabininde bekletildi. CO₂ inkübatöründen alınan hücreler mikroskopta gözlemlendikten sonra yeterli yoğunluğa ulaşmışsa (% 80) flask % 70'lik alkol ile sterilize edilerek laminar akım kabinine alındı. Adherent HEK293 hücreleri kültür flasklarının tabanına yapışma özelliği gösterdiği için, hücreler üzerinde bulunan kültür besiyeri otomatik pipetör ile aspire edilerek laminar akım kabininde bulunan atık kutusuna atıldı. Hücrelerin yıkanması amacı ile flaskta bulunan hücreler üzerine 3 ml 1xPBS solüsyonu eklenerek 3-5 dk bekletildi ve sonra tekrar üzerindeki solüsyon steril otomatik pipetör ile aspire edildi. Hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılması için 3 ml % 0,25'lik Tripsin - EDTA solüsyonu hücrelerin üzerine eklendi ve flask 5-10 dk CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Hücrelerin yüzeyden ayrılmalari

invert mikroskop ile kontrol edildikten sonra tekrar laminar akım kabinine alındı. Tripsinin aktivitesini sonlandırmak için Tripsin-EDTA + hücre bulunan flask üzerine 5 ml kültür besiyeri konularak 25-30 kez pipetaj yapıldı ve hücrelerin birbirinden tam olarak ayrılması sağlandı. Flasktaki solüsyon 15 ml'lik dibi konik falkon tüpe aktararak 37°C'de 1000 rpm'de 5 dk soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant aspire edilerek hücre peleti üzerine 5 ml kültür besiyeri konuldu ve tekrar 25-30 kez pipetaj yapıldı. Steril bir flask alınarak 8-10 ml kültür besiyeri konulup üzerine hücre süspansiyonundan istenilen miktarda (1×10^5 hücre/ml) hücre 25 cm²'lik steril kültür flasklarına ekildi. Hücrelerin homojen olarak yayılması için kültür flaskı sağa-sola ve öne arkaya doğru yavaşça hareket ettirildi. Hücrelerin son görünümü mikroskopta tekrar gözlemlendikten sonra deneylerde kullanılmak üzere CO₂ inkübatörüne konuldu.

3.4.4. Hücrelerin Dondurulması

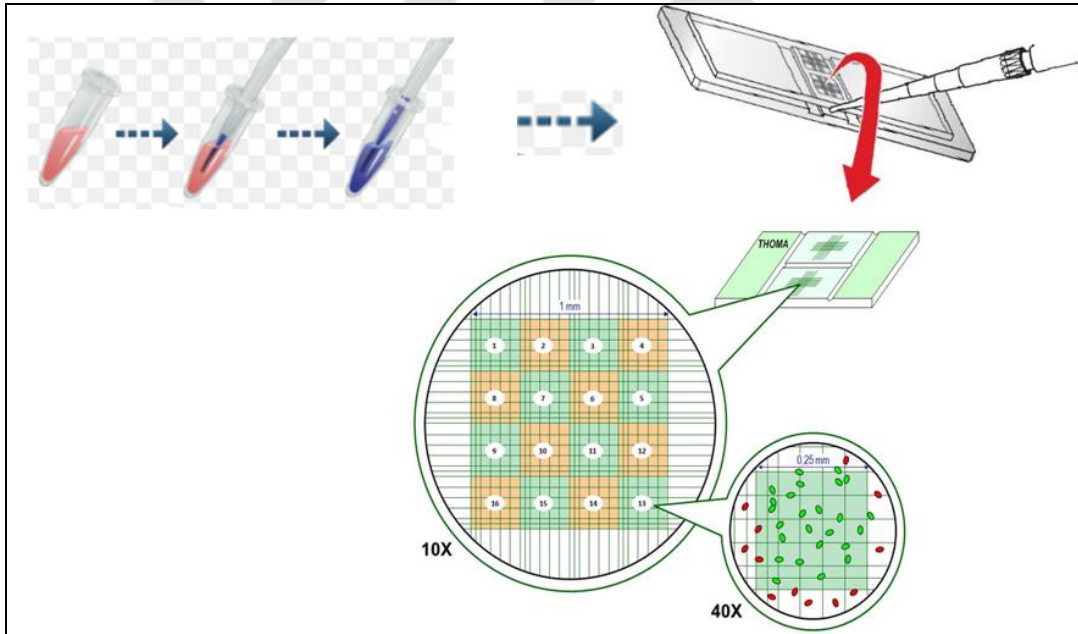
Hücrelerin pasajı yapılırken santrifüj sonrası hücre peleti üzerine 5 ml kültür besiyeri konuldu ve 25-30 kez pipetaj yapılarak hücre + kültür besiyeri solüsyonu elde edilmiş oldu. Bu aşamada buz kalıbı, 2 ml kriyo tüp, dimetilsülfoksit (DMSO) ve 37 °C'de bulunan inaktive FBS, % 70'lik alkol ile silindikten sonra laminar akım kabinine alındı. Kriyo tüpler üzerine hücre pasaj sayısı, tarihi ve hücre türü gibi hücre ile ilgili bilgiler yazıldıktan sonra buz kalıbının üzerinde sırasıyla 1400 µl hücre + kültür besiyeri, 400 µl inaktive FBS ve son aşamada 200 µl DMSO konularak kriyo tüpün kapağı sıkıca kapatıldı. Hücreler buz kalıbı ile -20°C'ye konuldu ve burada 1-2 saat bekletildikten sonra -80°C'ye aktarıldı. Hücreler -80°C'de 12 saat bekletildikten sonra sıvı azot tankına (-196°C) konularak deneylerde kullanılabilecek kadar burada saklandı.

3.4.5. Hücre Sayısının ve Canlılığının Belirlenmesi

CO₂ inkübatöründe bulunan HEK293 hücreleri steril koşullarda laminar akım kabinine alındı. Hücreler üzerindeki besiyer, atık kutusuna döküldükten sonra flaska Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek tutundukları zeminden kaldırıldı. Hücreler üzerine kültür besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı ve karışım 15 ml'lik falkon tüplere aktarılıp 2500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre peleti üzerinde kalan sıvı aspire edildi. Hücre peleti üzerine, kültür besiyeri konularak hücre süspansiyonu haline getirildi ve buradan alınan hücreler 1/1 oranında % 0,4'lük tripan mavisi boya ile boyandı. Hücre sayım aşamasına geçmeden önce thoma lamı ve üzerine konulacak olan

lamel, % 70 etil alkol ile silindi. Otomatik pipetör yardımı ile tripan mavisi ve hücre karışımından alınan örneğin lam-lamel arasına dikkatlice yayılması sağlandı.

Thoma lamı, mikroskopla bakıldığı zaman 16 büyük kare ve her karenin içinde 25 adet küçük kare olmak üzere toplamda $16 \times 25 = 400$ adet küçük kareden oluşmaktadır (Şekil 3.8). Thoma lamı ile hücre sayımının temeli, mikroskop yardımı ile $0,1 \text{ mm}^3$ hacimde sayım yapılarak, matematiksel işlem ile örneğin 1 ml’inde bulunan hücre sayısını belirlemektir. Hücre sayımı yapılırken, genellikle büyük karelerin tümü dikkate alınmaz ve sadece çapraz 8 büyük karede hücre sayım işlemi yapılır. Sayımların ortalaması alınır ve toplamda lam üzerinde 16 kare olduğu için elde edilen sonuç 2 ile çarpılıp $0,1 \text{ mm}^3$ hacmindeki hücre sayısı bulunur. Thoma lamının küçük karelerinin üst ve sağ tarafında bulunan kare çizgileri üzerindeki hücreler sayıma alınırken, küçük karelerin alt ve sol tarafında bulunan kare çizgileri üzerindeki hücreler sayıma alınmaz (186, 187).



Şekil 3.8: Thoma lamı ile hücrelerin sayılması (186, 187).

Mikroskopta gözlemlenen hücreler 16 büyük kare içinde sayılır ve buradaki toplam hücre sayısı N olarak ifade edilir (186, 187).

$$\text{Hücre sayısı/ml} = N \times 10^4 \times \text{seyreltme faktörü}$$

$$\text{Toplam hücre sayısı} = (\text{Hücre sayısı / ml}) \times \text{toplam hacim}$$

Tripan mavisi ile boyama sonucunda, boya membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerde birikir. Bu nedenle, hücre sayımı yapılırken tripan mavisi ile boyanmayan hücreler canlı, boyalı hücreler ise ölü olarak kabul edildi. Buna bağlı olarak hücre canlılığı aşağıdaki şekilde hesaplandı:

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = (\text{Canlı hücre sayısı} / \text{Toplam hücre sayısı}) \times 100$$

3.5. TRPM2 Plazmidinin Çoğaltılması (Transformasyon)

3.5.1. LB ve LB Agar Besiyeri Hazırlanması

LB hazırlanırken her 100 ml için 2,5 g Luria Broth (Invitrogen Life Technologies, USA) ve LB Agar hazırlanırken her 100 ml için 3,2 g Lennox L Agar (Invitrogen Life Technologies, USA) kullanıldı. Otoklav ile sterilize edilmiş su ile istenilen miktara tamamladı. Otoklavlama sonrası yaklaşık 50°C sıcaklığa düştüğünde her 1 ml için 1 µl ampisilin eklendi.

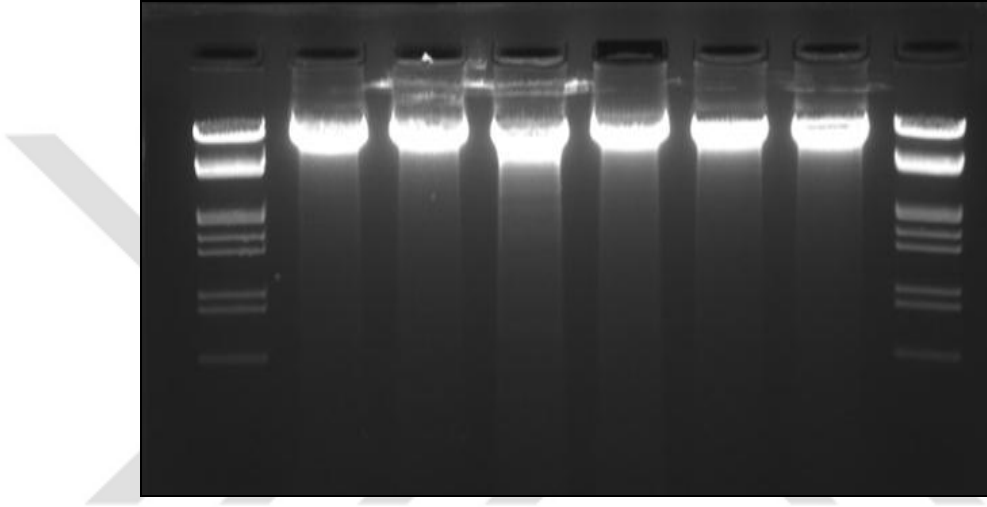
Ampisilin eklenen LB agar alev yanında plate'lere döküldü. 15 dakika boyunca, plate'lerin içinde halen sıvı halde bulunan agarların kurumaları beklendi. Kuruduktan sonra kapakları kapatılarak, ters bir şekilde +4°C'ye konuldu.

3.5.2. Kompetan Hücrelere Plazmid Transformasyonu

TRPM2 genini ifade eden pcDNA3-IRES-EGFP-TRPM2 plazmidini Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'ndan temin edilerek, İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çoğaltıldı. Bakteriyel transformasyonda, önceden hazırlanmış kompetan hücreler olan *E.coli* DH5α kullanıldı. Plazmidler kompetan hücrelere ısı şoku yöntemi ile transforme edildi. Bunun için kompetan hücreler -80°C'den alınarak buz üzerinde erimeye bırakıldı. Plazmidler (1 µl) kompetan hücreler (100 µl) karıştırılarak 30 dakika buz üzerinde tutuldu. Daha sonra hücreler 30 saniye 42°C'de bekletildi ve 60 dakika boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldıktan sonra alev yanında ampisilinli agar plate'lere yayma (spreading) yöntemi ile cam baget kullanılarak ekildi.

3.5.3. Plazmid İzolasyonu

Transformasyon sonucu üremenin gözlemlendiği petrilerden, istenilen plazmidi içeren doğru koloninin belirlenmesi için 6 farklı koloni seçilerek 100 ng/μl Ampisilin içeren 2 ml'lik LB besiyerine konuldu ve gece boyu 37°C çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Ertesi sabah Qiagen Miniprep Kiti ile kit protokolüne uygun olarak her bir koloniden plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmidler % 1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kalite kontrolleri gerçekleştirildi (Şekil 3.9).

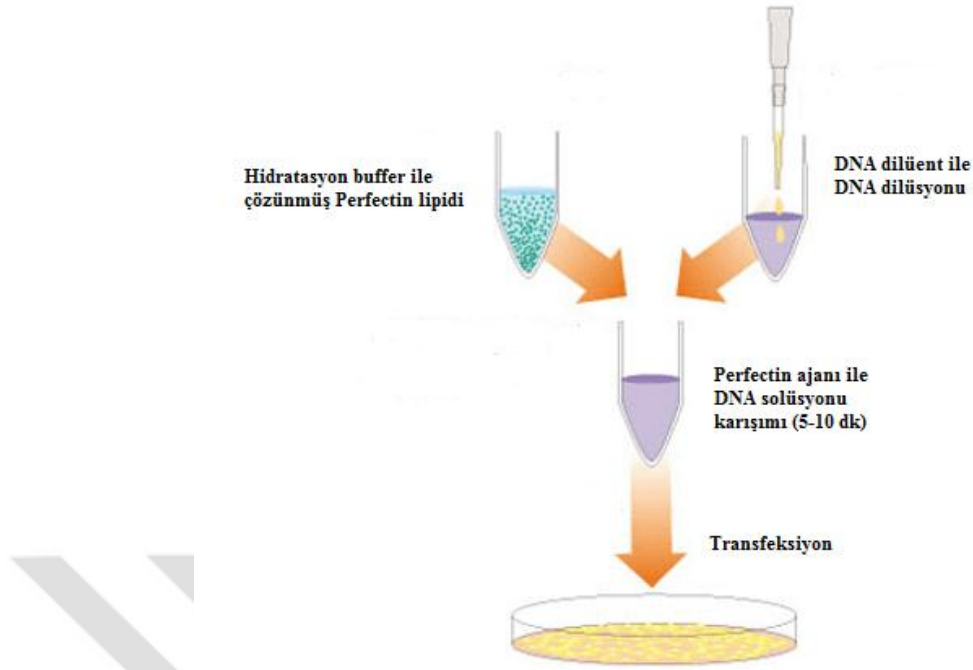


Şekil 3.9: Mini kültür sonrası izole edilen 6 koloninin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.

Doğru koloni belirlendikten sonra daha yüksek miktarda plazmid eldesi amacıyla mini kültürden 1 ml alınarak gece boyu 200 ml antibiyotikli sıvı besiyerinde maksi kültüre bırakıldı. Ertesi sabah 200 ml maksi kültürden Maxi Prep Kit (GeneElute, Sigma) ile üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. Sonuçta 1 μg/ml konsantrasyonda plazmid elde edilmiş oldu.

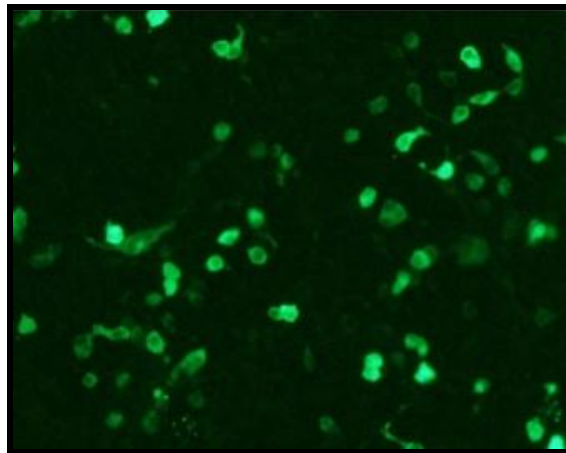
3.6. HEK293 Hücrelerinde TRPM2 Kanal Proteini Ekspresyonu (Transfeksiyon)

Transfeksiyon işlemi bir genin plazmid aracılığı ile başka bir hücrenin çekirdeğine taşınıp DNA'sına yerleştirilmesi ve bu hücreden istenilen proteinin eksprese edilmesidir. HEK293 hücrelerinde TRPM2 kanallarına sahip hücrelerin tespit edilmesi için transfeksiyon işleminin yapılması gerekmektedir. Bu çalışmada transfeksiyon işlemi, Perfectin Transfeksiyon kitinde belirtilen yöntemle yapıldı (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: HEK293 hücrelerine TRPM2 transfeksiyonu (188).

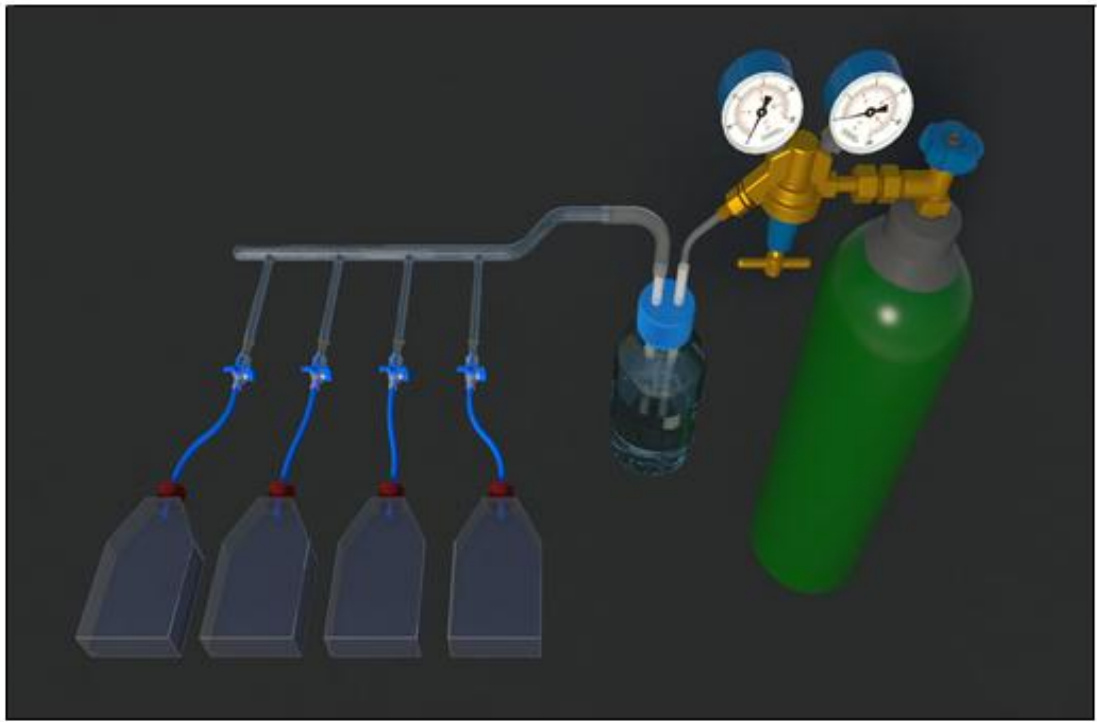
Böylece HEK293 hücrelerinde, yapısında TRPM2 sekansı bulunduran yeşil floresan protein (pcdGFP) transfeksiyonu yapılmış oldu. Transfeksiyon işleminden 24-48 saat sonra floresan mikroskop ile hücreler kontrol edildi. TRPM2 kanalına sahip hücreler floresan ışık altında yeşil renkli bir görüntü oluşturdu ve deneylerde bu şekilde transfeksiyon yapılmış hücreler kullanıldı. Hücrelerin her pasajlanmasında transfeksiyon işlemi tekrar edildi (Şekil 3.11) (71).



Şekil 3.11: Transfekte HEK293 hücrelerinin floresan mikroskopunda görüntüsü.

3.7. HEK293 Hücrelerine Normoksik, Hipoksik ve Hiperkapnik Gaz Karışımı Uygulanması

Tez çalışmasında, 18 farklı deney grubu oluşturulan transfekte HEK293 hücrelerine normoksik, hipoksik ve hiperkapnik olmak üzere 3 farklı gaz karışımı uygulandı (Şekil 3.(12,13). CO₂ inkübatöründe bulunan hücreler düzenekte gaz karışımının bulunduğu tüplere bağlı olan ve valfler ile kontrol edilen bölüme yerleştirildi. Gaz karışımlarının bulunduğu tüplerin gaz çıkış basıncı 0,1-0,2 bar olarak ayarlandı. Gaz karışımlarının örnekten geçmeden önce dengelenmesi ve nemlenmesi için 200 ml distile su konulan cam şişeden geçirilmesi sağlandı. Gaz karışımları 30 dk ve 60 dk olmak üzere iki farklı sürede 25 cm² flasklardaki hücrelerin bulunduğu ortamdan geçirildi.



Şekil 3.12: Gaz karışımlarının uygulandığı sistemin şematik gösterimi.



Şekil 3.13: Gaz karışımlarının uygulandığı sistem.

Belirtilen sürelerin sonunda insülin enjektörü ile flasklardan 200 μ l örnek alınarak Kan Gazı Cihazında (Radiometer ABL-800) yapılan ölçüm sonunda normoksik, hipoksik ve hiperkapnik şartların oluştuğu gözlemlendi (Şekil 3.14).



Şekil 3.14: Kan Gazı Cihazı (Radiometer ABL-800).

3.7.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

18 farklı deney grubu oluşturularak hipoksi ve hiperkapninin HEK293 hücre membranlarındaki TRPM2 kanal aktivitesinde meydana getirebileceği değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine antioksidan (GSH) ve bazı eser elementlerin (Zn ve Se) etkisi araştırıldı. T75 kültür flasklarında çoğaltılan HEK293 hücreleri % 80 yoğunluğa ulaştıktan sonra, Tripsin-EDTA karışımı ile tutundukları zeminden kaldırıldı. Tripan mavisi boya ile hücre sayımı işlemi yapıldı ve deneysel işlemlerin uygulanacağı T-25 flasklara 2.10^5 hücre olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi.

Grup 1 (Normoksi 30 dk; n=6): Hücreler ekildikten sonra 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 5 CO₂, % 20 O₂ ve balans N₂ olan normoksik gaz karışımı 30 dk uygulandı.

Grup 2 (Normoksi 60 dk; n=6): Hücreler ekildikten sonra 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 5 CO₂, % 20 O₂ ve balans N₂ olan normoksik gaz karışımı 60 dk uygulandı.

Grup 3 (Hipoksi 30 dk; n=6): Hücreler ekildikten sonra 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 5 O₂, % 5 CO₂ ve balans N₂ olan hipoksik gaz karışımı 30 dk uygulandı.

Grup 4 (100 µM Zn + Hipoksi 30 dk; n=6): 100 µM Zn eklenerek hazırlanan kültür besiyerine ekimi yapılan hücreler 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 5 O₂, % 5 CO₂ ve balans N₂ olan hipoksik gaz karışımı 30 dk uygulandı (159).

Grup 5 (150 nM Se + Hipoksi 30 dk; n=6): 150 nM Se eklenerek hazırlanan kültür besiyerine ekimi yapılan hücreler 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 5 O₂, % 5 CO₂ ve balans N₂ olan hipoksik gaz karışımı 30 dk uygulandı (43).

Grup 6 (5 mM GSH + Hipoksi 30 dk; n=6): 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe standart kültür besiyerinde bulunan hücreler ekimden 48 saat sonra 5 mM GSH eklenerek hazırlanan kültür besiyerinde 5 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 5 O₂, % 5 CO₂ ve balans N₂ olan hipoksik gaz karışımı 30 dk uygulandı (163).

Grup 7 (Hipoksi 60 dk; n=6): Hücreler ekildikten sonra 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 5 O₂, % 5 CO₂ ve balans N₂ olan hipoksik gaz karışımı 60 dk uygulandı.

Grup 8 (100 µM Zn + Hipoksi 60 dk; n=6): 100 µM Zn eklenerek hazırlanan kültür besiyerine ekimi yapılan hücreler 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 5 O₂, % 5 CO₂ ve balans N₂ olan hipoksik gaz karışımı 60 dk uygulandı.

Grup 9 (150 nM Se + Hipoksi 60 dk; n=6): 150 nM Se eklenerek hazırlanan kültür besiyerine ekimi yapılan hücreler 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 5 O₂, % 5 CO₂ ve balans N₂ olan hipoksik gaz karışımı 60 dk uygulandı.

Grup 10 (5 mM GSH + Hipoksi 60 dk; n=6): 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe standart kültür besiyerinde bulunan hücreler ekimden 48 saat sonra 5 mM GSH eklenerek hazırlanan kültür besiyerinde 5 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 5 O₂, % 5 CO₂ ve balans N₂ olan hipoksik gaz karışımı 60 dk uygulandı.

Grup 11 (Hiperkapni 30 dk; n=6): Hücreler ekildikten sonra 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 20 O₂, % 10 CO₂ ve balans N₂ olan hiperkapnik gaz karışımı 30 dk uygulandı.

Grup 12 (100 µM Zn + Hiperkapni 30 dk; n=6): 100 µM Zn eklenerek hazırlanan kültür besiyerine ekimi yapılan hücreler 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 20 O₂, % 10 CO₂ ve balans N₂ olan hiperkapnik gaz karışımı 30 dk uygulandı.

Grup 13 (150 nM Se + Hiperkapni 30 dk; n=6): 150 nM Se eklenerek hazırlanan kültür besiyerine ekimi yapılan hücreler 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 20 O₂, % 10 CO₂ ve balans N₂ olan hiperkapnik gaz karışımı 30 dk uygulandı.

Grup 14 (5 mM GSH + Hiperkapni 30 dk; n=6): 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe standart kültür besiyerinde bulunan hücreler

ekimden 48 saat sonra 5 mM GSH eklenerek hazırlanan kültür besiyerinde 5 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 20 O₂, % 10 CO₂ ve balans N₂ olan hiperkapnik gaz karışımı 30 dk uygulandı.

Grup 15 (Hiperkapni 60 dk; n=6): Hücreler ekildikten sonra 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 20 O₂, % 10 CO₂ ve balans N₂ olan hiperkapnik gaz karışımı 60 dk uygulandı.

Grup 16 (100 µM Zn + Hiperkapni 60 dk; n=6): 100 µM Zn eklenerek hazırlanan kültür besiyerine ekimi yapılan hücreler 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 20 O₂, % 10 CO₂ ve balans N₂ olan hiperkapnik gaz karışımı 60 dk uygulandı.

Grup 17 (150 nM Se + Hiperkapni 60 dk; n=6): 150 nM Se eklenerek hazırlanan kültür besiyerine ekimi yapılan hücreler 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 20 O₂, % 10 CO₂ ve balans N₂ olan hiperkapnik gaz karışımı 60 dk uygulandı.

Grup 18 (5 mM GSH + Hiperkapni 60 dk; n=6): 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe standart kültür besiyerinde bulunan hücreler ekimden 48 saat sonra 5 mM GSH eklenerek hazırlanan kültür besiyerinde 5 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskına % 20 O₂, % 10 CO₂ ve balans N₂ olan hiperkapnik gaz karışımı 60 dk uygulandı.

3.7.2. Hücre Kültür Ortamlarının PO₂ ve PCO₂ Değerlerinin Analizi

Hücre kültürü deneylerinde kan gazı parametrelerinin (PO₂ ve PCO₂) ölçümü İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda bulunan Kan Gazı Ölçüm Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Deneylerin her aşamasında normoksi, hipoksi ve hiperkapni durumunu değerlendirmek amacı ile kayıt ortamından insülin enjektörü ile alınan 200 µl örnekte, kan gazı parametreleri (PO₂ ve PCO₂) Kan Gazları Cihazı (Radiometer - ABL 800) ile ölçüldü.

Normoksik durumun değerlendirilmesi;

37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saatlik inkübasyonun sonunda kültür flaskından % 5 CO₂, % 20 O₂ ve balans N₂ olan normoksik gaz karışımı 30 dk ve 60 dk olmak üzere iki farklı sürede geçirildi. Flasklardan alınan örneklerde ölçüm sonucunda PO₂ değeri aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$PO_2 = \text{Karışımındaki O}_2 \text{ yüzdesi} \times (\text{Açık hava basıncı} - \text{Su buharı basıncı}) / 100$$

Normoksik gaz karışımı: % 20 O₂ ve % 5 CO₂ ve balans N₂

Açık hava basıncı 760 mmHg, Su buharı basıncı = 47 mmHg

$$PO_2 = 20 (760-47) / 100 = 142,6 \text{ mmHg}$$

$$PCO_2 = 5 (760-47) / 100 = 35,65 \text{ mmHg}$$

Alınan örneklerde yapılan ölçümlerde en az PO₂ = 142,6 mmHg, PCO₂ = 35,65 mmHg gaz basıncı elde edildiğinde ortamın normoksik olduğuna karar verildi.

Hipoksik durumun değerlendirilmesi;

37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saatlik inkübasyonun sonunda kültür flaskından % 5 O₂, % 5 CO₂ ve balans N₂ olan hipoksik gaz karışımı 30 dk ve 60 dk olmak üzere iki farklı sürede geçirildi. Flasklardan alınan örneklerde ölçüm sonucunda PO₂ değeri aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$PO_2 = \text{Karışımındaki O}_2 \text{ yüzdesi} \times (\text{Açık hava basıncı} - \text{Su buharı basıncı}) / 100$$

Hipoksik gaz karışımı: % 5 O₂, % 5 CO₂ ve balans N₂

Açık hava basıncı 760 mmHg, Su buharı basıncı = 47 mmHg

$$PO_2 = 5 (760-47) / 100 = 35,65 \text{ mmHg}$$

Alınan örneklerde yapılan ölçümlerde en az PO₂ = 35,65 mmHg gaz basıncı elde edildiğinde ortamın hipoksik olduğuna karar verildi.

Hiperkapnik durumun değerlendirilmesi;

37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saatlik inkübasyonun sonunda kültür flaskından % 20 O₂, % 10 CO₂ ve balans N₂ olan hiperkapnik gaz karışımı 30 dk ve 60 dk olmak üzere iki farklı sürede geçirildi. Flasklardan alınan örneklerde ölçüm sonucunda PCO₂ değeri aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$PCO_2 = \text{Karışımındaki CO}_2 \text{ yüzdesi} \times (\text{Açık hava basıncı} - \text{Su buharı basıncı}) / 100$$

Hiperkapnik gaz karışımı: % 20 O₂ ve % 10 CO₂ ve balans N₂

Açık hava basıncı 760 mmHg, Su buharı basıncı = 47 mmHg

$$PCO_2 = 10 (760-47) / 100 = 71,3 \text{ mmHg}$$

Alınan örneklerde yapılan ölçümlerde en az PCO₂ = 71,3 mmHg gaz basıncı elde edildiğinde ortamın hiperkapnik olduğuna karar verildi.

3.8. Spektrofotometrik Ölçüm

Hücre kültürü deneylerinde spektrofotometrik ölçümler İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda bulunan Spektrofotometrik Ölçüm Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Lipid peroksidasyonun belirteçlerinden MDA ve hücre membran hasarını gösteren LDH parametrelerinin ölçümü spektrofotometrede gerçekleştirildi.

Spektrofotometrik ölçüm, flasklara 1.10⁵/ml olacak şekilde ekilen hücrelerde farklı deney gruplarının prosedürleri uygulandıktan sonra hazırlanan hücre lizatlarında spektrofotometre cihazı (Shimadzu UV-1800) ile yapıldı.

3.8.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

1. Farklı deneysel prosedürler uygulanan deney gruplarındaki hücreler laminar akım kabinine alındı.
2. Hücre üzerindeki sıvı, atık kabına döküldü.
3. Hücreler üzerine 1xPBS eklenerek flask sağa-sola, öne-arkaya dikkatlice hareket ettirilerek hücrelerin yıkanması sağlandı ve üst sıvı aspire edildi.
4. Hücrelerin tutundukları zeminden kaldırılması için Tripsin-EDTA eklenerek 5-10 dk hücreler inkübe edildi.

5. İnkübasyonun sonunda invert mikroskopta zeminden ayrıldıkları gözlemlenen hücreler üzerine standart kültür besiyeri eklenerek 25-30 kez pipetaj yapıldı ve tripsinin aktivitesi sonlandırıldı.
6. Hücreler üzerindeki total solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere alınarak 2500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve sonrasında üst sıvıları atık kutusuna döküldü.
7. Hücre peleti üzerine 1xPBS eklenerek tekrar 2500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Hücre peleti üzerindeki üst sıvılar atıldı.
8. Hücre peleti üzerine tekrar 1xPBS eklenerek thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı.
9. Her bir deney grubuna 1×10^5 hücre olacak şekilde örnek alındı ve ependorfa aktarıldı.
10. Örnekler 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvılar atıldı.
11. Hücre peleti üzerine 200 µl lizis tampon eklendi ve hücrelerin buz üzerinde insülin enjektörü kullanılarak çek-bırak yöntemiyle patlatılması sağlandı.
12. Elde edilen hücre lizatları ependorflara aktarıldı ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10000 rpm'de 60 dk santrifüjlendi.
13. Santrifüj işleminin sonunda süpernatantlar alınarak yeni bir ependorfa aktarıldı. Örnekler spektrofotometrik ölçüm yapılana kadar -80°C 'de saklandı.

3.8.2. Lipid Peroksidasyon Analizi

3.8.2.1. Malondialdehit Ölçümü

Lipid peroksidasyonu belirteçlerinden MDA ölçümü Buege ve ark.'nın (132) yöntemine göre yapıldı. MDA ölçümünde MDA'nın 90-95 °C sıcaklıkta tiyobarbitürik asitle (TBA) reaksiyona girerek kırmızı renk oluşturmaya ve oluşan rengin 535 nm'de absorbanasının okunmasına dayanan "Tiyobarbitürik Asit Metodu" kullanıldı.

MDA ölçümünde kullanılacak solüsyonların hazırlanması;

- **% 30'luk TCA :** % 99,9 TCA stoğundan 30 ml alınıp 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.
- **% 0,75'lik TBA:** 0,75 g TBA tartılıp 100 ml distile suda çözündürüldü. Direkt distile suda çözünmediği için, 37°C sıcak su bulunan beherde karıştırılarak çözüldü.
- **5 M HCl:** % 37'lik HCl stoğundan 42 ml alınarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

-80°C’de bulunan örnekler oda sıcaklığında çözündürüldükten sonra 250 µl alınarak vidalı kapaklı cam tüplere aktarıldı. Örneğin üzerine 1,5 ml TBA eklendi. 1 ml % 30’luk TCA konulduğunda opak beyaz renk oluştu ve proteinlerin çöktüğü gözlemlendi. Üzerine 100 µl 5 M’lık HCl eklendi.

Tüpler 100°C’de kaynamakta olan suda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda tüplerin soğuması için bekletildi. Örneklerde berrak bir görüntü elde edilmesi için 3000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Örneklerin absorbans değerleri 535 nm’de spektrofotometrik olarak okundu. Aşağıdaki formül kullanılarak lipid peroksidasyon değerleri nmol/ml cinsinden hesaplandı. Burada kullanılan $1,56 \times 10^5$ sabit katsayı, OD; optik dansite olarak ifade edilir.

$$\text{MDA değeri (nmol / } 1 \times 10^5 \text{ hücre) = (OD / } 1,56 \times 10^5 \text{) x (Total hacim / Örnek hacmi) x (} 10^6 \text{)}$$

3.8.2.2. Laktat dehidrogenaz Ölçümü

LDH enzimi, hücre membran bütünlüğünün bozulmasıyla ortaya çıkan sitoplazmik bir enzimdir. Kültür besiyerine salınan LDH miktarı, hücre ölüm oranını verir. Örneklerdeki LDH aktivitesi, piruvatın laktata dönüşümü sırasında gerçekleşen NADH oksidasyonunun ölçümüne dayanan LDH, TOX7 Assay kitinde belirtilen yöntemle göre hücre lizati örnekleri kullanılarak spektrofotometrede ölçüldü.

LDH Lizis Solüsyonu Hazırlanması;

1. İnkübatörden çıkarılan hücreler deney prosedürleri uygulandıktan sonra laminar akım kabinine alınarak, LDH Assay Lizis solüsyonu ile (1/10 v/v) 45 dk % 5 CO₂ inkübatöründe inkübe edildi.
2. Bu şekilde hazırlanan lizis örnekleri ölçüm yapılana kadar -80°C’de saklandı.

LDH Ölçümü;

1. -80°C’de bulunan örnekler çözündürüldükten sonra LDH Assay TOX7 kitinde belirtilen yöntemle göre LDH Assay karışımı hazırlandı.
2. Analizi yapılacak örneklere belirtilen oranda LDH Assay karışımı eklenerek oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.

3. Karışım üzerine 1 N HCl (1/10 v/v) eklenerek reaksiyon sonlandırıldı.
4. Örnekler ölçüm kuvvetlerine konularak spektrofotometrede 490 nm’de ve 690 nm’de (background) absorbansları ölçüldü.
5. 690 nm’de ölçülen sonuçları 490 nm’de ölçülen sonuçlardan çıkarılarak hesaplama yapıldı ve % LDH değerleri hesaplandı:

$$A = A_{490nm} - A_{690nm}$$

3.9. Patch Clamp Deneyleri

Elektrobiyofiziksel ölçümler İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı’nda bulunan Patch Clamp Araştırma Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi.

3.9.1. Patch Clamp Kayıt Sisteminin Çalışması ve Solüsyonların Hazırlanması

Mikroelektrot çekici (Sutter Instrument Company P-97) yardımı ile patch clamp deneylerinde kullanılacak olan borosilikat cam mikroelektrotlar uygun çap ve dirençte yapıldı. Patch Clamp deneylerinde kullanılan solüsyonlarının pH değerleri; intrasellüler ortam solüsyonu (pH=7,2), ekstrasellüler ortam solüsyonu (pH=7,4), N-metil d-glikamin (NMDG⁺) içeren ekstrasellüler ortam solüsyonu (pH=7,4), hidrojen peroksit (H₂O₂) (pH=7,35) ve 2-aminoetoksi difenolborat (2-APB) solüsyonu (pH=11,90) olarak hazırlandı (Tablo 3.(1-3)).

Çözücü olarak tüm solüsyonlarda distile su kullanıldı ve solüsyonların osmolalitesi 310 mosmol/lit olacak şekilde ayarlandı. Semi-Micro Osmometre cihazının, 0 mOsm ve 400 mOsm olmak üzere iki nokta kalibrasyonu gerçekleştirildi. Osmolalitesi ölçülecek olan solüsyonlardan 150 µl örnek alınarak ölçüm tüplerine konuldu ve ölçüm yapıldı (Şekil 3.15) (189).



Şekil 3.15: Semi-Micro Osmometre, KNAUER-K7400.

3.9.1.1. İntrasellüler ortam solüsyonunun hazırlanması

Tablo 3.1’de verilen kimyasallar belirtilen miktarlarda hassas terazi ile tartılarak distile suda çözdürüldü. Distile su ile 1000 ml ‘ye tamamlanan solüsyonun pH’ı sezyum hidroksit (CsOH) ile 7,2’ye ayarlandı. pH ölçümü için pH:7 ve pH:9 tampon solüsyonları ile pH metre cihazı kalibre edildi ve ölçüm yapıldı (Şekil 3.16). Hazırlanan solüsyon ependroflara ayrılarak, deneylerde kullanılabilece kadar -80°C ’de saklandı.



Şekil 3.16: pH Metre, Hanna Instruments pH211 Microprocessor.

Tablo 3.1: İntrasellüler ortam solüsyonu.

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

3.9.1.2. Ekstrasellüler ortam solüsyonunun hazırlanması

Tablo 3.2’de verilen kimyasallar belirtilen miktarlarda hassas terazi ile tartılarak distile suda çözdürüldü. Distile su ile 1000 ml’ye tamamlanan solüsyonun pH’ı potasyum hidroksit (KOH) kullanılarak 7,4’e ayarlandı. pH ölçümü için pH:7 ve pH:9 tampon solüsyonları ile pH metre cihazı kalibre edildi ve ölçüm yapıldı. Hazırlanan solüsyon 50 ml falkon tüplere ayrılarak, deneylerde kullanılana kadar -80°C’de saklandı.

Tablo 3.2: Ekstrasellüler ortam solüsyonu.

Kimyasal Madde	Konsantrasyonu (mM)
NaCl	140
MgCl ₂ 6H ₂ O ₂	1,2
CaCl ₂ 2H ₂ O ₂	1,2
KCl	5
Hepes	10
D-Glikoz.H ₂ O ₂	10

3.9.1.3. N-Metil D-Glikamin (NMDG⁺) içeren ekstrasellüler ortam solüsyonunun hazırlanması

Tablo 3.3’de verilen kimyasallar belirtilen miktarlarda hassas terazi ile tartılarak distile suda çözdürüldü. Distile su ile 1000 ml’ye tamamlanan solüsyonun pH’ı 1 M hidroklorik asit (HCl) ile 7,4’e ayarlandı. pH ölçümü için pH:7 ve pH:9 tampon solüsyonları ile pH metre cihazı kalibre edildi ve ölçüm yapıldı. Hazırlanan solüsyon 50 ml falkon tüplere ayrılarak, deneylerde kullanılabileceği kadar -80°C’de saklandı.

Tablo 3.3: NMDG⁺’li ekstrasellüler ortam solüsyonu.

Kimyasal Madde	Konsantrasyonu (mM)
NMDG	150
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,2
Hepes	10
D-Glikoz·H ₂ O	10

3.9.1.4. 2-Aminoetoksi difenilborat (2-APB) solüsyonunun hazırlanması

2-APB’nin stok solüsyonundan 22,5 mg tartılarak son konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde 1 ml DMSO içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan solüsyon 100 adet ependorfa, her bir ependorfa 10 µl konularak, deneylerde kullanılabileceği kadar -80°C’de saklandı. Patch clamp deneyleri öncesinde derin dondurucudan çıkarılıp çözdürülen 10 µl stok solüsyonu normal ekstrasellüler ortam solüsyonu içinde çözdürüldü (190).

3.9.1.5. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) solüsyonunun hazırlanması

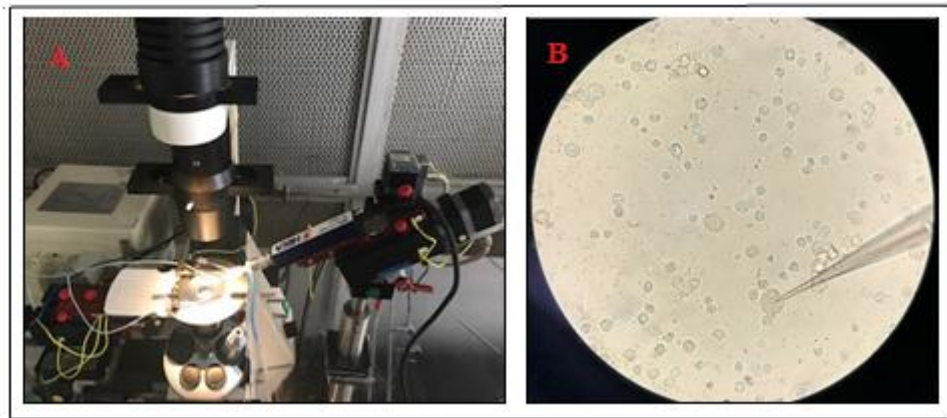
% 30’lik H₂O₂ stoğundan 10,22 µl alınarak 10 ml ekstrasellüler ortam solüsyonunda çözdürülür ve her kayıta taze hazırlanması gerekir.

3.9.2. Patch Clamp Deneyleri

Ölçümler, EPC 10 USB (HEKA, Lamprecht, Almanya) yükselteci kullanılan Patch Clamp tekniği ile tüm hücre (whole cell) kayıt modu kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.(17-18)).



Şekil 3.17: Patch Clamp Kayıt Sistemi.



Şekil 3.18: A. Patch Clamp sisteminde hücre mikroelettrot ilişkisi.

B. Mikroelettrot hücre üzerinde.

Tüm kayıtlar oda sıcaklığında (22-25°C) gerçekleştirildi. Tüm hücre akım kayıtlarında dış çapı 1,5 mm, iç çapı 0,86 mm ve uzunluğu 10 cm olan borosilikat cam mikroelettrotlar kullanıldı (Sutter Instrument, Novato, ABD). Çalışmada istenen

dirençte (2-10 M Ω) mikroelettrot elde etmek için mikroelettrot çekici kullanılarak cam mikroelettrotlar hazırlandı (Sutter Instrument, Novato, ABD) (Şekil 3.19).

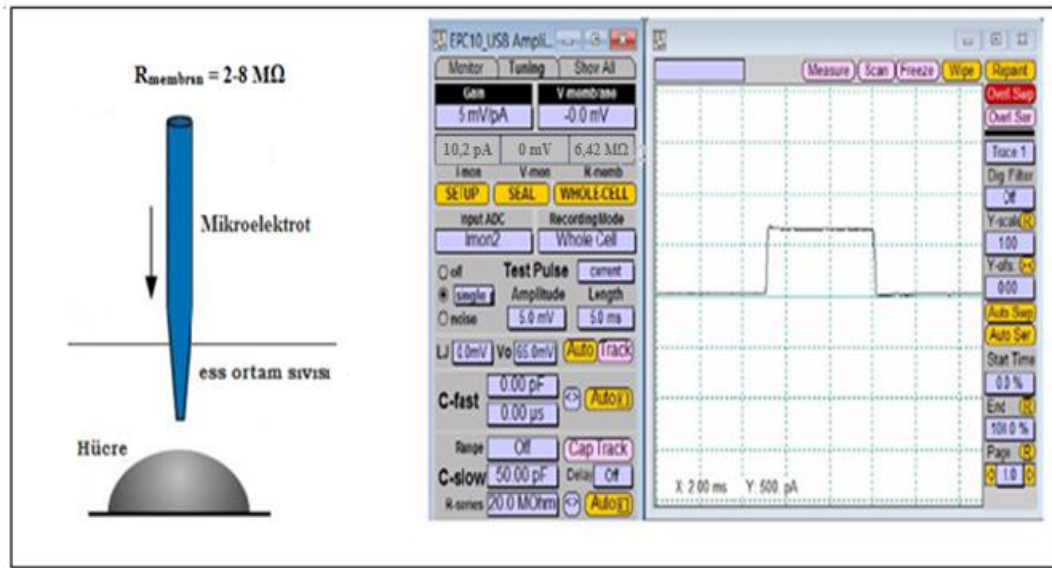


Şekil 3.19: Mikroelettrot Çekici (Puller)

Mikroelettrot çekici ile istenen uç çapı ve dirençte elde edilen mikroelettrotlar daha önceden hazırlanan intrasellüler ortam solüsyonu ile dolduruldu. İntrasellüler ortam solüsyonu doldurulurken mikroelettrot içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Çünkü mikroelettrot içerisinde hava kabarcığının kalması, istenmeyen gürültüye sebep olur ve hücre mikroelettrot arasında sıkı kenetlenme oluşmasını engeller. Mikroelettrot, dikkatlice mikromanipülatöre takılarak yanlarda bulunan vidalar ile sıkıştırıldı.

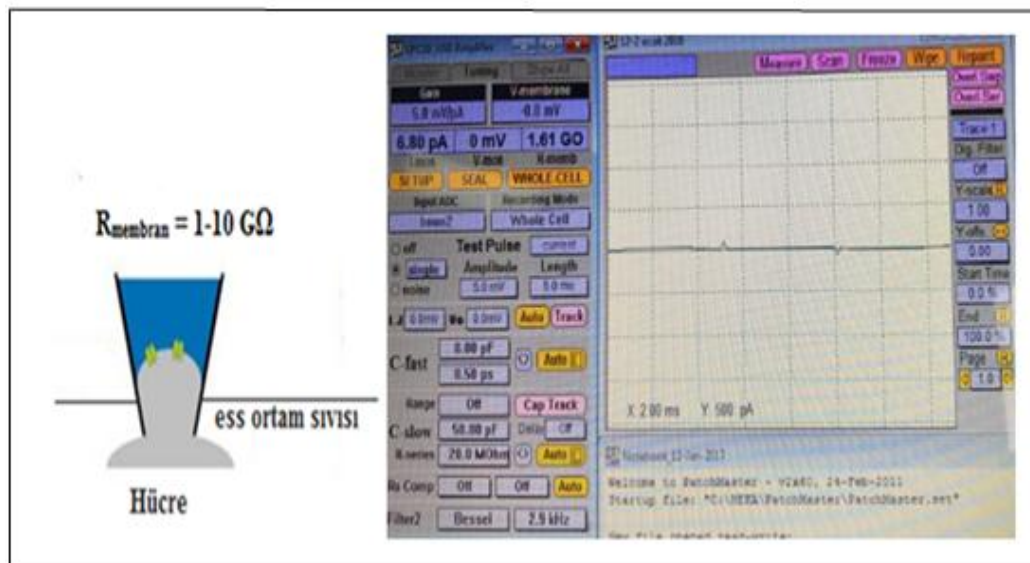
Tüm deney gruplarında deney prosedürleri uygulandıktan sonra 50 μ l örnek alınarak invert mikroskop (Zeiss, Axiovert 40 CFL, Germany) çemberinde bulunan 1000 μ l ekstrasellüler ortam solüsyonu içerisine konuldu. HEK293 hücreleri ekstrasellüler ortam solüsyonu içinde dengelendikten sonra mikroskop ile gözlemlendi. İstenen hücre tespit edildikten sonra kontrol paneli kullanılarak mikromanipülatör ucundaki mikroelettrodun ekstrasellüler ortam solüsyonu içine girmesi sağlandı.

Mikroelettrot ekstrasellüler ortam solüsyonuna temas ettiği anda Patch Master yazılım programından (HEKA, Lamprecht, Almanya) mikroelettrot direnci ($R_{\text{membran}} = 2-10 \text{ M}\Omega$) kaydedildi ve ekranda kare dalga görüldü (Şekil 3.20).



Şekil 3.20: Mikroelektrot ekstrasellüler ortam solüsyonu içindeyken kare dalga oluşumu.

Kontrol paneli yardımı ile mikroskopta gözlemlenerek mikroelektrodun hücreye doğru hareket etmesi sağlandı. Mikroelektrodun hücre membranına temas ettiği andaki R_{membran} direnç değişimi mikroskop ve yazılım programından takip edildi. Mikroelektrot ve hücre membranı arasında giga seal adı verilen sıkı kenetlenme oluşturmak amacı ile sisteme bağlı olan basınç kontrol sistemi ile dikkatlice negatif basınç uygulandı. Sıkı kenetlenme oluşumunda R_{membran} direncinin 1-10 GΩ arasında olduğu ve kare dalganın şekil değiştirdiği gözlemlendi (Şekil 3.21).



Şekil 3.21: Giga seal oluşumu.

HEK293 hücrelerinin hücre içi ve hücre dışı ortamlarda farklı konsantrasyonda bulunan iyonların iyon kanalından geçişini ifade eden akım değişimlerini kaydetmek üzere hücre membran potansiyeli -60 mV değerine kenetlendi. Basınç kontrol sistemi ile negatif basınç yapılarak mikroelettrot-hücre membranı temas bölgesindeki membran parçasının koparılması sağlandı. Böylece tüm hücre yöntemine geçilmiş oldu. Tüm hücre kaydına başladıktan sonra, mikroskop çemberinde bulunan hücrelerin bulunduğu ekstrasellüler ortam solüsyonu peristaltik pompa sistemi ile alınıp 10 mM H₂O₂ bulunan ekstrasellüler ortam solüsyonu ile yer değiştirildi. TRPM2 kanalları üzerinde aktivatör özelliği olduğu bilinen H₂O₂ ile HEK293 hücreleri uyarılarak TRPM2 kanalı aktive edildi. H₂O₂ 'in hücrelerin bulunduğu ortama verilmeye başlandığını zaman kaydedildi. Yazılım programında H₂O₂ etkisi gözlemlendi; kanalın açılarak negatif yönde akımın artış gösterdiği değerde plato durumu sabitleninceye kadar beklendi. Akım değeri dengelendikten sonra, TRPM2 kanalı üzerinde inhibitör etkisinin olduğu özelliği bilinen 2-APB solüsyonundan 0,1 mM konsantrasyonda bulunan ekstrasellüler ortam solüsyonu, H₂O₂ içeren ekstrasellüler ortam solüsyonunun hücrelerin bulunduğu ortama verilme yöntemine benzer olarak verildi. 2-APB'nin hücreler üzerinde oluşturduğu etki yazılım programında görüntülendi ve aynı yöntemle NMDG⁺'li ekstrasellüler ortam solüsyonu hücrelerin bulunduğu ortama gönderildi. Kanalın kapanarak akımın plato değerinde sabitlenmesi gözlemlendi. Son olarak hücrelerin bulunduğu ortama tekrar sırasıyla H₂O₂, 2-APB ve NMDG⁺'li ekstrasellüler ortam solüsyonları gönderilerek kayıt işlemi sonlandırıldı.

Patch Master yazılım programı ile elde edilen sayısal veriler Origin programı kullanarak değerlendirildi. Deney gruplarına ait akım (I) - zaman (t) ve akım (I) - voltaj (V) ilişkisini gösteren grafikler çizildi. Mikroelettrot ekstrasellüler ortam solüsyonuna ilk temas ettiğinde ekranda görülen R_{membran} direnç değeri ve kayıt sırasında iyon kanalından geçen maksimum negatif akım değeri kullanılarak herbir deney grubu için ortalama akım yoğunluğu hesaplandı. Grafikler çizilerek, istatistiksel değerlendirme yapıldı.

3.10. İstatistiksel Analiz

Deneylerden elde edilen veriler, IBM SPSS 21 paket programı ile değerlendirildi. Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma [mean $\pm$ standard deviation] olarak verildi. Verilerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Grupların normal dağılıma uyup uymadığı Kolmogorov Smirnov testi ile yapıldı. Veriler normal dağılıma uyum sağladığı için istatistiksel değerlendirme ANOVA Tamhane's T2 testi ile yapıldı. Tüm istatistiksel karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonundan (American Type Culture Collection-ATCC) ticari olarak temin edilen insan embriyonik böbrek hücreleri (Human Kidney Embryonic Cells-HEK293 (CRL-1573)) 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. 100 µM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile ayrı ayrı inkübe edilen hücrelerin bulunduğu ortama deney prosedüründe belirtildiği gibi, 30 dk ve 60 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulandı. Kontrol grubu olarak, 30 dk ve 60 dk normoksik gaz uygulanan gruplar kullanıldı. Deney sürelerinin sonunda bütün gruplarda PO₂ ve PCO₂ değerleri, lipid peroksidasyonun belirteçlerinden MDA ve hücre membran hasarını gösteren LDH değerleri ölçüldü. Bütün gruplarda transfekte HEK293 hücrelerinde TRPM2 iyon kanallarından geçen iyonik akımların kaydedilmesi patch clamp kayıt sisteminde tüm hücre yöntemi (THK) ile gerçekleştirildi. Gruplar arasında yapılan istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 4.(1-16) ve Şekil 4.(1-74) 'de verildi.

4.1. Hücre Kültür Ortamlarının PO₂ ve PCO₂ Değerleri

HEK293 hücreleri deney prosedürleri uygulanmadan önce 37°C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 97 nemli hava bulunan CO₂ inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültür flaskından normoksik, hipoksik ve hiperkapnik gaz karışımları 30 dk ve 60 dk olmak üzere iki farklı sürede geçirilerek PO₂ ve PCO₂ değerleri ölçüldü. Normoksi, hipoksi ve hiperkapni gruplarında Kan Gazı Cihazı ile ölçülen sonuçlar Tablo 4.(1,2)'de verildi.

Tablo 4.1: 30 dk ve 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde PO_2 ve PCO_2 değerlerinin ($M \pm SD$) normoksi grubuna göre değişimleri.

Gruplar (n=6)	PO_2 (mmHg)	PCO_2 (mmHg)
Normoksi 30 dk	$145,70 \pm 3,10$	$36,08 \pm 1,02$
Hipoksi 30 dk	$40,40 \pm 3,40$	$36,40 \pm 3,23$
100 μ M Zn + Hipoksi 30 dk	$38,70 \pm 2,05$	$37,80 \pm 2,10$
150 nM Se + Hipoksi 30 dk	$37,40 \pm 4,48$	$39,60 \pm 1,80$
5 mM GSH + Hipoksi 30 dk	$40,18 \pm 3,80$	$37,15 \pm 2,80$
Normoksi 60 dk	$152,6 \pm 1,95$	$38,70 \pm 2,20$
Hipoksi 60 dk	$40,40 \pm 5,22$	$36,80 \pm 2,70$
100 μ M Zn + Hipoksi 60 dk	$41,50 \pm 3,04$	$39,50 \pm 4,90$
150 nM Se + Hipoksi 60 dk	$39,50 \pm 7,40$	$37,30 \pm 6,90$
5 mM GSH + Hipoksi 60 dk	$39,14 \pm 3,60$	$40,40 \pm 1,30$

M $\pm$ SD; ortalama $\pm$ standart sapma

Tablo 4.2: 30 dk ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde PO₂ ve PCO₂ değerlerinin (M ± SD) normoksi grubuna göre değişimleri.

Gruplar (n=6)	PO₂ (mmHg)	PCO₂ (mmHg)
Normoksi 30 dk	145,70 ± 3,10	36,08 ± 1,02
Hiperkapni 30 dk	144,50 ± 6,18	74,95 ± 0,40
100 µM Zn + Hiperkapni 30 dk	142,90 ± 5,41	72,80 ± 3,40
150 nM Se + Hiperkapni 30 dk	145,60 ± 5,10	74,40 ± 4,80
5 mM GSH + Hiperkapni 30 dk	141,12 ± 3,40	71,16 ± 3,90
Normoksi 60 dk	152,60 ± 1,95	38,70 ± 2,20
Hiperkapni 60 dk	149,40 ± 3,11	85,83 ± 2,49
100 µM Zn + Hiperkapni 60 dk	146,20 ± 3,44	83,10 ± 3,60
150 nM Se + Hiperkapni 60 dk	148,40 ± 1,78	80,20 ± 0,18
5 mM GSH + Hiperkapni 60 dk	144,18 ± 4,60	81,40 ± 1,20

M ± SD; ortalama ± standart sapma

4.2. Lipid Peroksidasyonu Bulguları

4.2.1. Malondialdehit (MDA) Değerleri

Çalışmamızda HEK293 hücrelerinde 30 dk ve 60 dk hipoksik gaz uygulanan gruplarda ölçülen MDA değerlerinin, 30 dk ve 60 dk normoksik gaz uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) derecede artış gösterdiği tespit edildi. Ayrıca 30 dk ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplardaki MDA değerlerinin de 30 dk ve 60 dk normoksik gaz uygulanan gruplara göre ileri derecede anlamlı olarak ($p < 0.001$) arttığı gözlemlendi (Tablo 4.(3,4) ve Şekil 4.(1,2)).

60 dk hipoksi ve hiperkapni uygulanan gruplarda ölçülen MDA değerlerinin, 30 dk hipoksi ve hiperkapni uygulanan grupların aynı değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gösterdiği saptandı ($p < 0.05$) (Tablo 4.5 ve Şekil 4.3).

100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk ve 60 dk hipoksik gaz uygulanan gruplarda ölçülen MDA değerlerinin, sadece 30 dk ve 60 dk hipoksik gaz uygulanan gruplarda ölçülen MDA değerlerine göre anlamlı ($p < 0.05$) olarak azaldığı tespit edildi (Tablo 4.(6,7) ve Şekil 4.(4,5)).

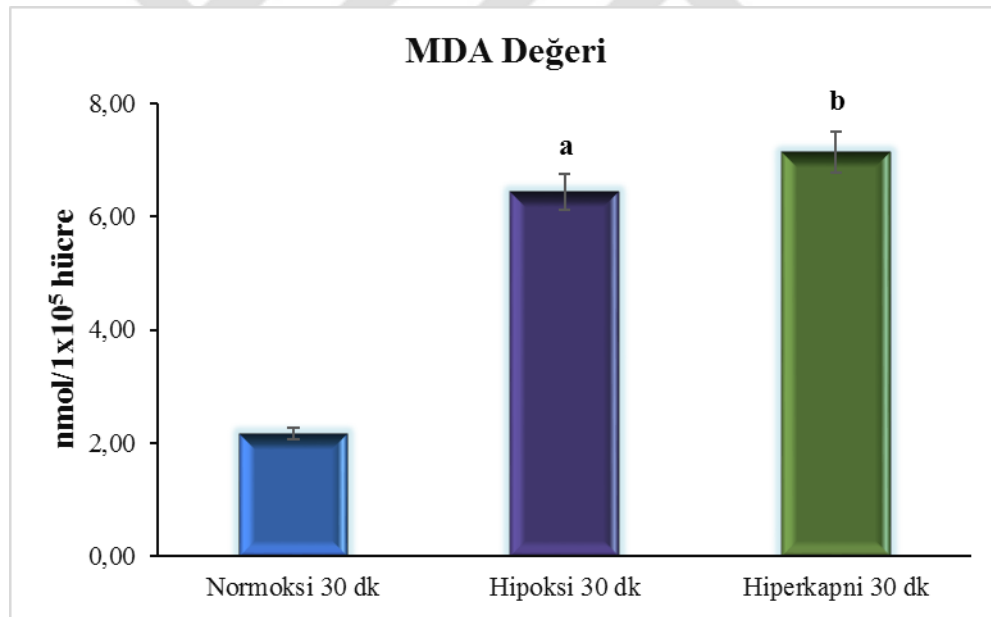
100 μ M Zn ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplardaki MDA değerlerinin, sadece 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplardaki MDA değerlerine göre istatistiksel bakımdan anlamlı ($p < 0.05$) olarak azalma gösterdiği tespit edildi. 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan grupta MDA değerinin, sadece 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan grubun aynı değerlerine göre ileri derecede anlamlı ($p < 0.01$) olarak azaldığı saptandı. Ayrıca 100 μ M Zn, 5 mM GSH ve 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplarda MDA değerlerinin, sadece 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan grupların aynı değerlerine göre ileri derecede anlamlı ($p < 0.01$) olarak azaldığı tespit edildi (Tablo 4.(8,9) ve Şekil 4.(6,7)).

Tablo 4.3: 30 dk hipoksik ve 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), normoksi grubuna göre değişimleri.

Parametre	Normoksi 30 dk (n=6)	Hipoksi 30 dk (n=6)	Hiperkapni 30 dk (n=6)
MDA (nmol/1x10 ⁵ hücre)	2,16 $\pm$ 0,38	6,44 $\pm$ 0,65 ^a	7,14 $\pm$ 0,50 ^b

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.01$, ^b $p < 0.001$; normoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.



Şekil 4.1: 30 dk hipoksik ve 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), normoksi grubuna göre değişimleri.

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

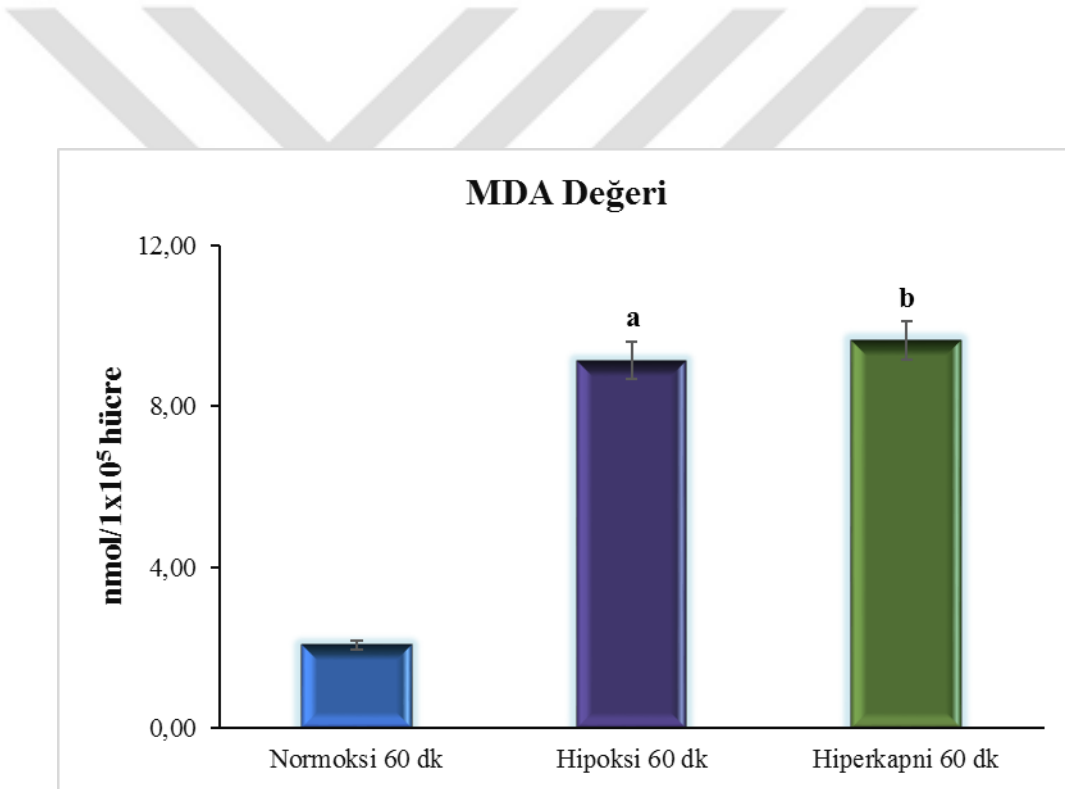
^a $p < 0.01$, ^b $p < 0.001$; normoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.

Tablo 4.4: 60 dk hipoksik ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), normoksi grubuna göre değişimleri.

Parametre	Normoksi 60 dk (n=6)	Hipoksi 60 dk (n=6)	Hiperkapni 60 dk (n=6)
MDA (nmol/ 1×10^5 hücre)	$2,06 \pm 0,25$	$9,14 \pm 0,62^a$	$9,65 \pm 0,76^b$

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.01$, ^b $p < 0.001$; normoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.



Şekil 4.2: 60 dk hipoksik ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), normoksi grubuna göre değişimleri.

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

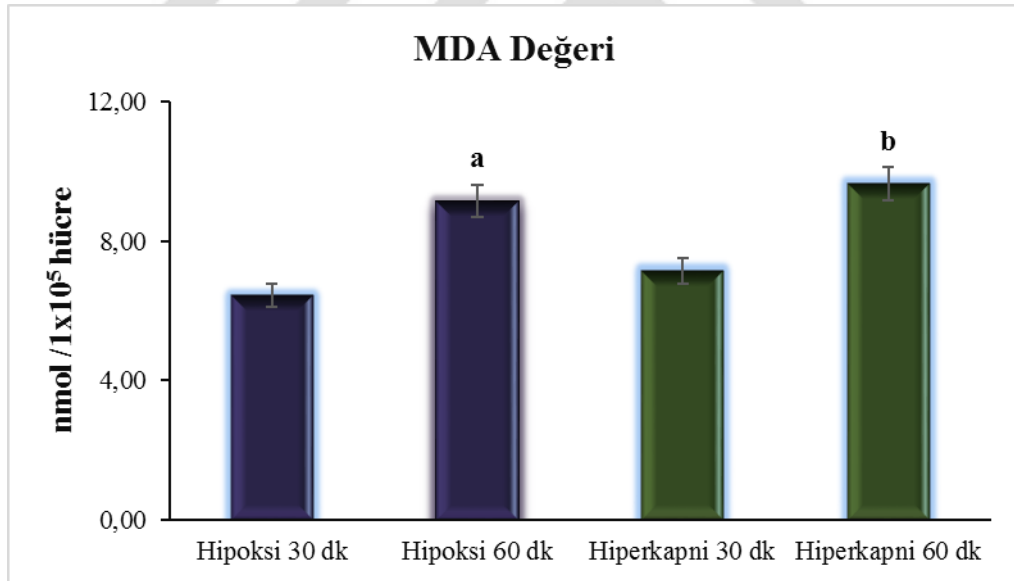
^a $p < 0.01$, ^b $p < 0.001$; normoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.

Tablo 4.5: 30 dk ve 60 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$) değişimleri.

Parametre	Hipoksi 30 dk (n=6)	Hipoksi 60 dk (n=6)	Hiperkapni 30 dk (n=6)	Hiperkapni 60 dk (n=6)
MDA (nmol/1x10 ⁵ hücre)	6,44 $\pm$ 0,65	9,14 $\pm$ 0,62 ^a	7,14 $\pm$ 0,50	9,65 $\pm$ 0,76 ^b

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.05$; hipoksi 30 dk grubu, ^b $p < 0.05$; hiperkapni 30 dk grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.



Şekil 4.3: 30 dk ve 60 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$) değişimleri.

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

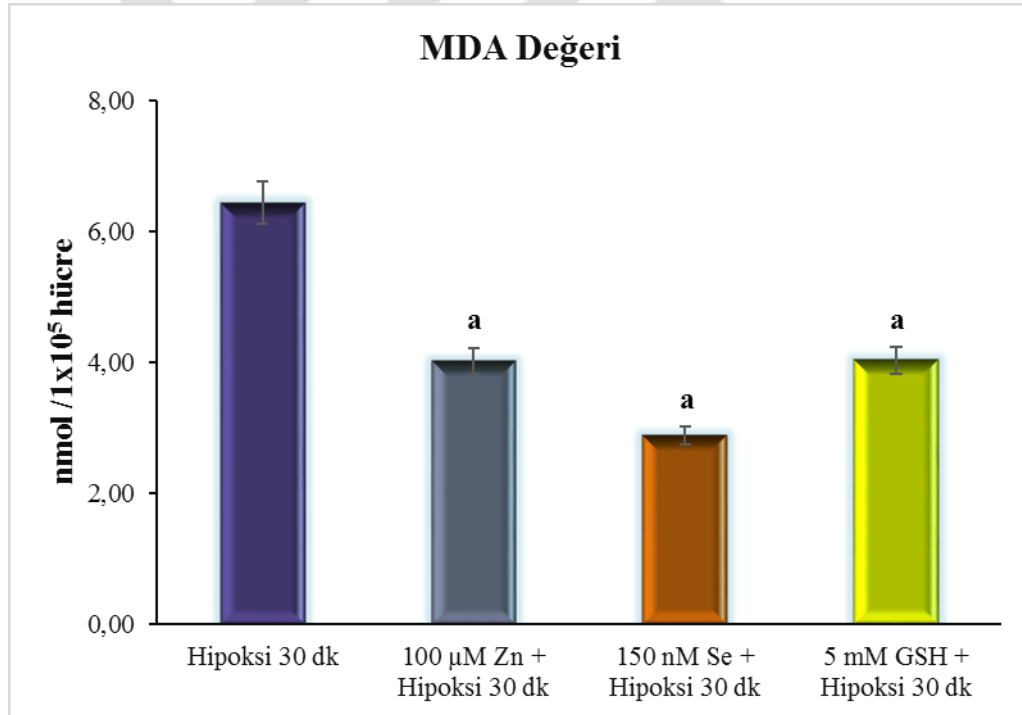
^a $p < 0.05$; hipoksi 30 dk grubu, ^b $p < 0.05$; hiperkapni 30 dk grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.

Tablo 4.6: 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), hipoksi grubuna göre değişimleri.

Parametre	Hipoksi 30 dk (n=6)	100 μM Zn+ Hipoksi 30 dk (n=6)	150 nM Se+ Hipoksi 30 dk (n=6)	5 mM GSH+ Hipoksi 30 dk (n=6)
MDA (nmol/1x10 ⁵ hücre)	6,44 $\pm$ 0,65	4,02 $\pm$ 0,41 ^a	2,89 $\pm$ 0,84 ^a	4,04 $\pm$ 0,56 ^a

M $\pm$ SD; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a *p<0.05; hipoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırma.*



Şekil 4.4: 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), hipoksi grubuna göre değişimleri.

M $\pm$ SD; ortalama $\pm$ standart sapma.

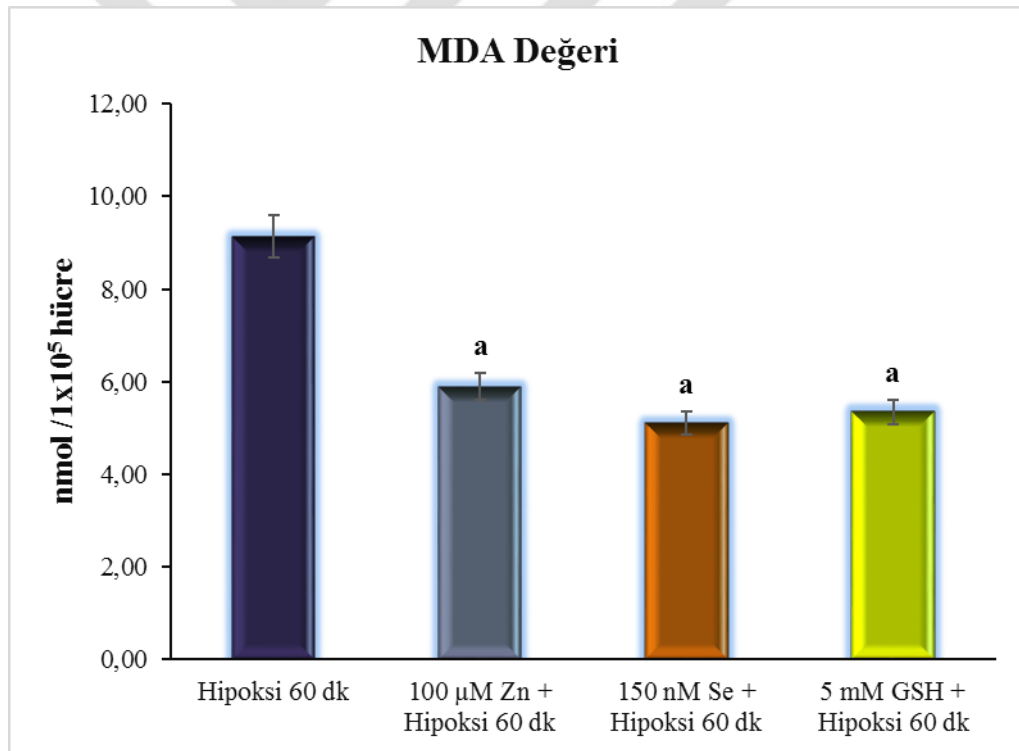
^a *p<0.05; hipoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırma.*

Tablo 4.7: 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), hipoksi grubuna göre değişimleri.

Parametre	Hipoksi 60 dk (n=6)	100 μM Zn + Hipoksi 60 dk (n=6)	150 nM Se + Hipoksi 60 dk (n=6)	5 mM GSH + Hipoksi 60 dk (n=6)
MDA (nmol/ 1×10^5 hücre)	$9,14 \pm 0,62$	$5,89 \pm 0,37^a$	$5,11 \pm 0,44^a$	$5,35 \pm 0,58^a$

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.05$; hipoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırma.



Şekil 4.5: 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), hipoksi grubuna göre değişimleri.

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

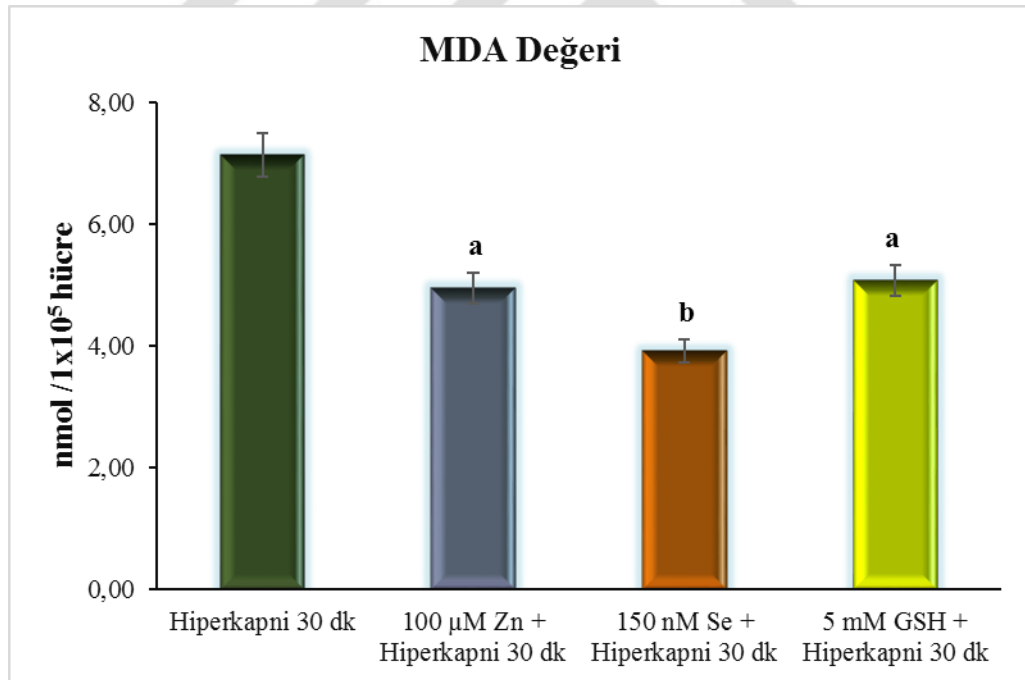
^a $p < 0.05$; hipoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırma.

Tablo 4.8: 100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), hiperkapni grubuna göre değişimleri.

Parametre	Hiperkapni 30 dk (n=6)	100 μ M Zn + Hiperkapni 30 dk (n=6)	150 nM Se + Hiperkapni 30 dk (n=6)	5 mM GSH + Hiperkapni 30 dk (n=6)
MDA (nmol/1x10 ⁵ hücre)	7,14 $\pm$ 0,50	4,95 $\pm$ 0,77 ^a	3,92 $\pm$ 0,44 ^b	5,07 $\pm$ 0,83 ^a

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$; hiperkapni grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.



Şekil 4.6: 100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), hiperkapni grubuna göre değişimleri.

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

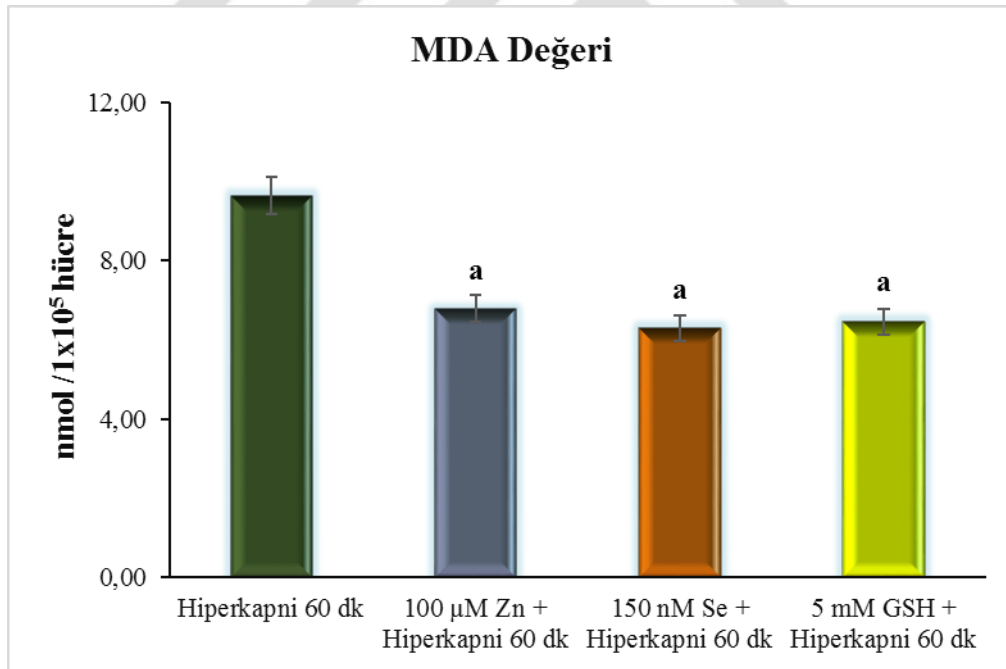
^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$; hiperkapni grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.

Tablo 4.9: 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), hiperkapni grubuna göre değişimleri.

Parametre	Hiperkapni 60 dk (n=6)	100 μM Zn + Hiperkapni 60 dk (n=6)	150 nM Se + Hiperkapni 60 dk (n=6)	5 mM GSH + Hiperkapni 60 dk (n=6)
MDA (nmol/ 1×10^5 hücre)	$9,65 \pm 0,76$	$6,79 \pm 0,48^a$	$6,30 \pm 0,75^a$	$6,45 \pm 0,43^a$

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.01$; hiperkapni grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.



Şekil 4.7: 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA değerlerinin ($M \pm SD$), hiperkapni grubuna göre değişimleri.

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.01$; hiperkapni grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.

4.2.2. Laktat dehidrogenaz (LDH) Değerleri

Çalışmamızda HEK293 hücrelerinde 30 dk ve 60 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan gruplarda LDH değerlerinin, 30 dk ve 60 dk normoksik gaz uygulanan gruplardaki aynı değerler ile karşılaştırıldığında anlamlı (sırası ile $p < 0.01$ ve $p < 0.001$) artış gösterdiği saptandı (Tablo 4.(10,11) ve Şekil 4.(8,9)).

60 dk hipoksi ve hiperkapni uygulanan gruplarda ölçülen LDH değerlerinin, 30 dk hipoksi ve hiperkapni uygulanan grupların aynı değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gösterdiği saptandı (sırası ile $p < 0.001$ ve $p < 0.01$) (Tablo 4.12 ve Şekil 4.10).

100 μ M Zn ile inkübe edildikten sonra 30 dk ve 60 dk hipoksik gaz uygulanan gruplarda ölçülen LDH değerlerinin, sadece 30 dk ve 60 dk hipoksik gaz uygulanan gruplardaki aynı değerlerine göre anlamlı (sırası ile $p < 0.05$ ve $p < 0.001$) olarak azaldığı tespit edildi. Ayrıca 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk ve 60 dk hipoksik gaz uygulanan gruplarda LDH değerlerinin de sadece 30 dk ve 60 dk hipoksik gaz uygulanan gruplardaki aynı değerlere göre ileri derecede anlamlı ($p < 0.01$) olarak azaldığı belirlendi (Tablo 4.(13,14) ve Şekil 4.(11,12)).

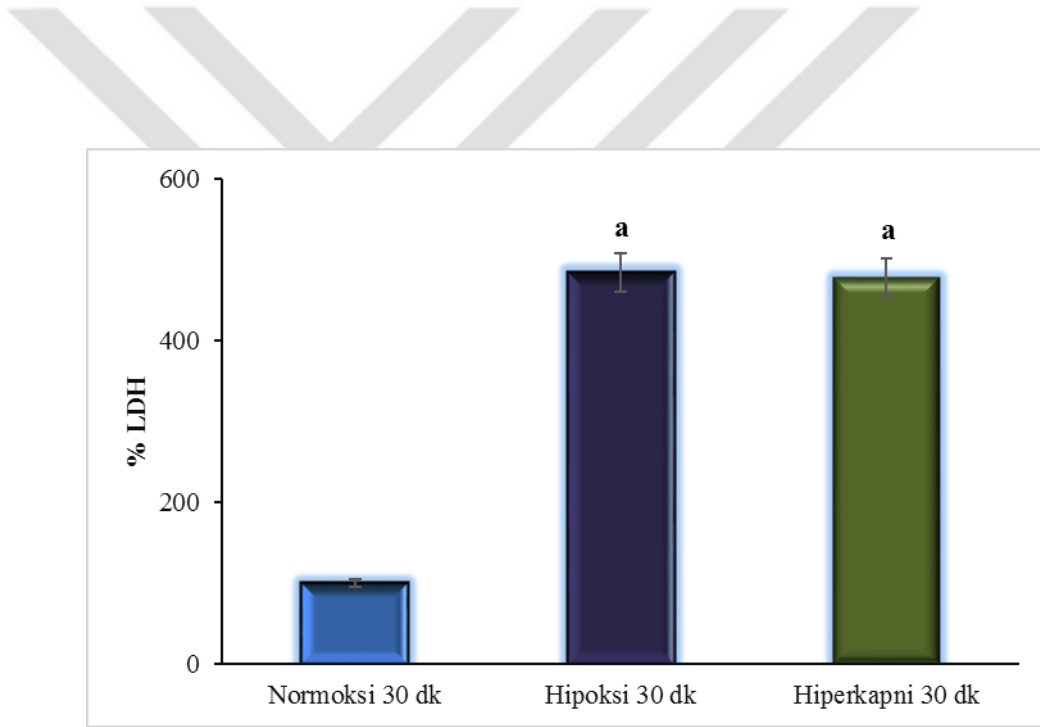
100 μ M Zn ile inkübe edildikten sonra 30 dk ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplardaki LDH değerlerinin, sadece 30 dk ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplardaki LDH değerlerine göre anlamlı (sırası ile $p < 0.05$ ve $p < 0.01$) olarak azaldığı gözlemlendi. Bununla birlikte 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplarda da LDH değerlerinin, sadece hiperkapnik gaz uygulanan gruplara göre ileri derecede anlamlı ($p < 0.01$) olarak azaldığı bulundu (Tablo 4.(15,16) ve Şekil 4.(13,14)).

Tablo 4.10: 30 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin LDH değerlerinin ($M \pm SD$), normoksi grubuna göre değişimleri.

Parametre	Normoksi 30 dk (n=6)	Hipoksi 30 dk (n=6)	Hiperkapni 30 dk (n=6)
LDH ($\mu\text{mol/ml}$)	$0,32 \pm 0,12$	$1,55 \pm 0,27^a$	$1,53 \pm 0,25^a$

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.01$; normoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırma.



Şekil 4.8: 30 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin LDH değerlerinin ($M \pm SD$), normoksi grubuna göre %'de değişimleri.

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma

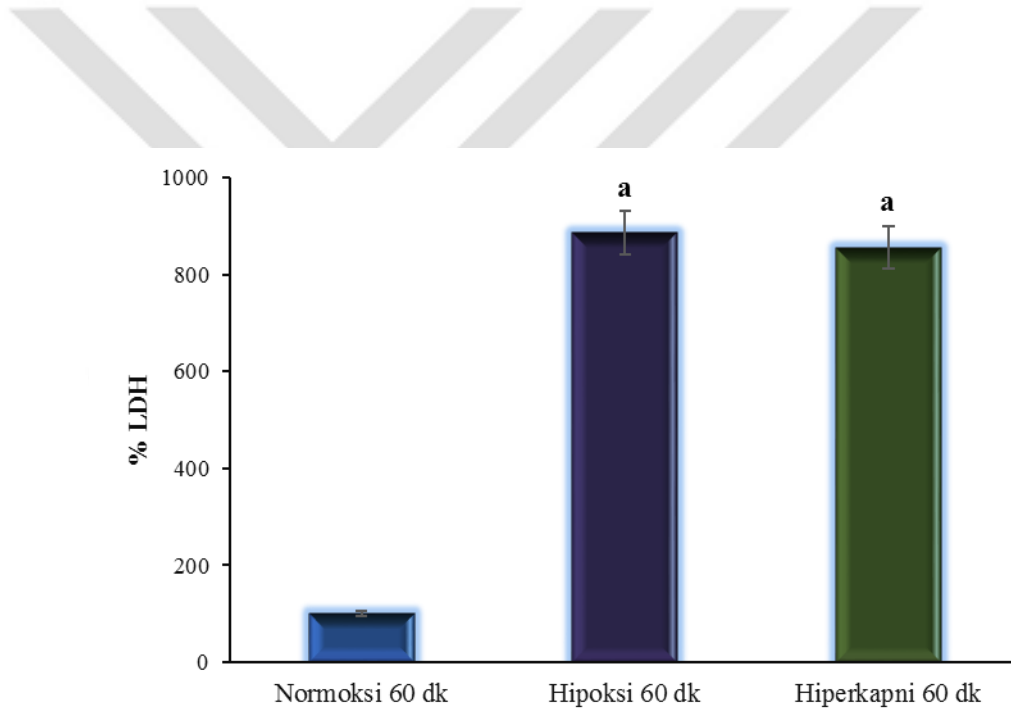
^a $p < 0.01$; normoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırma.

Tablo 4.11: 60 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin LDH değerlerinin ($M \pm SD$), normoksi grubuna göre değişimleri.

Parametre	Normoksi 60 dk (n=6)	Hipoksi 60 dk (n=6)	Hiperkapni 60 dk (n=6)
LDH ($\mu\text{mol/ml}$)	$0,29 \pm 0,11$	$2,57 \pm 0,28^a$	$2,48 \pm 0,33^a$

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.001$; normoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırma.



Şekil 4.9: 60 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin LDH değerlerinin ($M \pm SD$), normoksi grubuna göre %'de değişimleri.

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

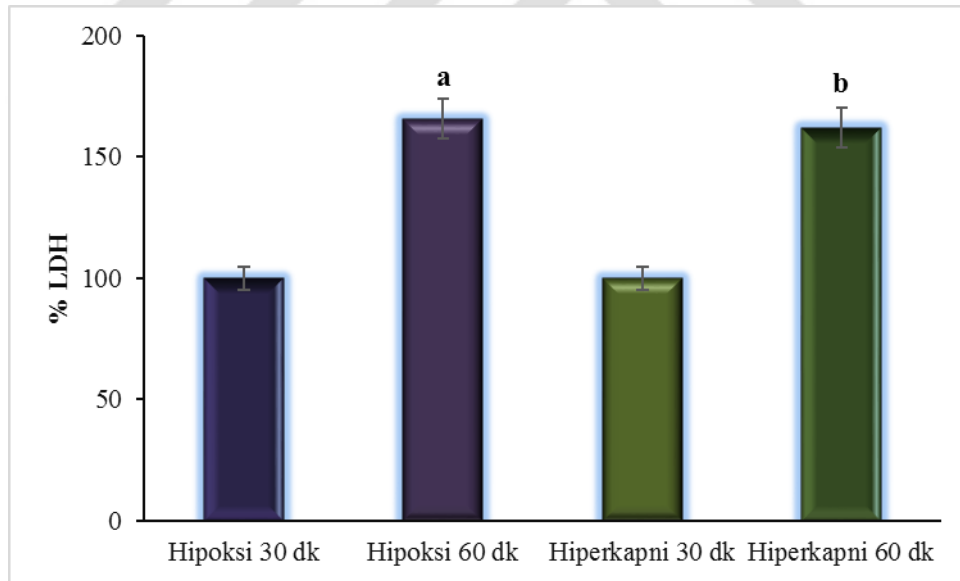
^a $p < 0.001$; normoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırma.

Tablo 4.12: 60 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin LDH değerlerinin ($M \pm SD$), 30 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan hücelere göre değişimleri.

Parametre	Hipoksi 30 dk (n=6)	Hipoksi 60 dk (n=6)	Hiperkapni 30 dk (n=6)	Hiperkapni 60 dk (n=6)
LDH ($\mu\text{mol/ml}$)	$1,55 \pm 0,27$	$2,57 \pm 0,28^a$	$1,53 \pm 0,25$	$2,48 \pm 0,33^b$

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.001$; hipoksi 30 dk grubu, ^b $p < 0.01$; hiperkapni 30 dk grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.



Şekil 4.10: 60 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin LDH değerlerinin ($M \pm SD$), 30 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan hücelere göre %'de değişimleri.

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

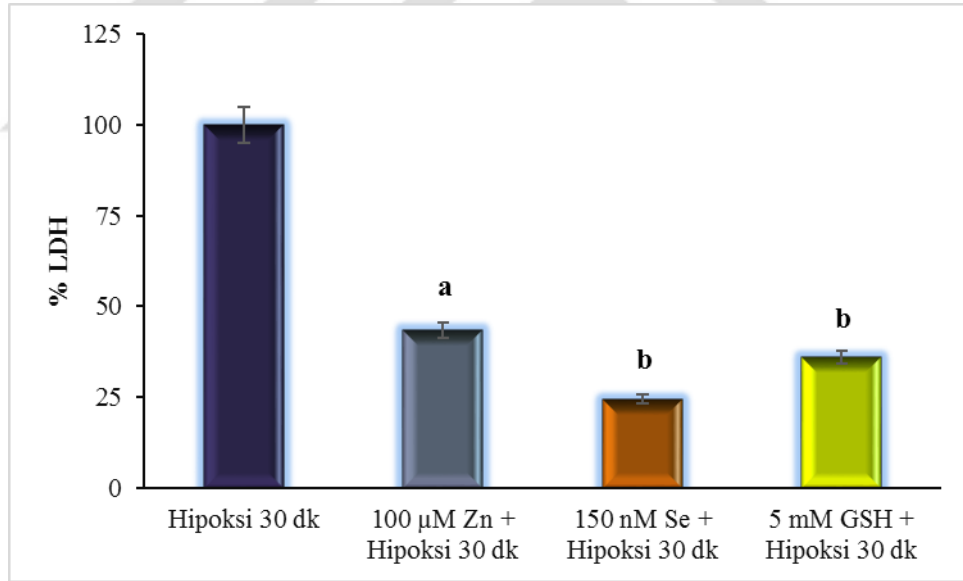
^a $p < 0.001$; hipoksi 30 dk grubu, ^b $p < 0.01$; hiperkapni 30 dk grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.

Tablo 4.13: 100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin LDH değerlerinin ($M \pm SD$), hipoksi grubuna göre değişimleri.

Parametre	Hipoksi 30 dk (n=6)	100 μ M Zn + Hipoksi 30 dk (n=6)	150 nM Se + Hipoksi 30 dk (n=6)	5 mM GSH + Hipoksi 30 dk (n=6)
LDH (μ mol/ml)	1,55 $\pm$ 0,27	0,75 $\pm$ 0,20 ^a	0,38 $\pm$ 0,14 ^b	0,56 $\pm$ 0,24 ^b

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$; hipoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.



Şekil 4.11: 100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin LDH değerlerinin ($M \pm SD$), hipoksi grubuna göre %'de değişimleri.

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

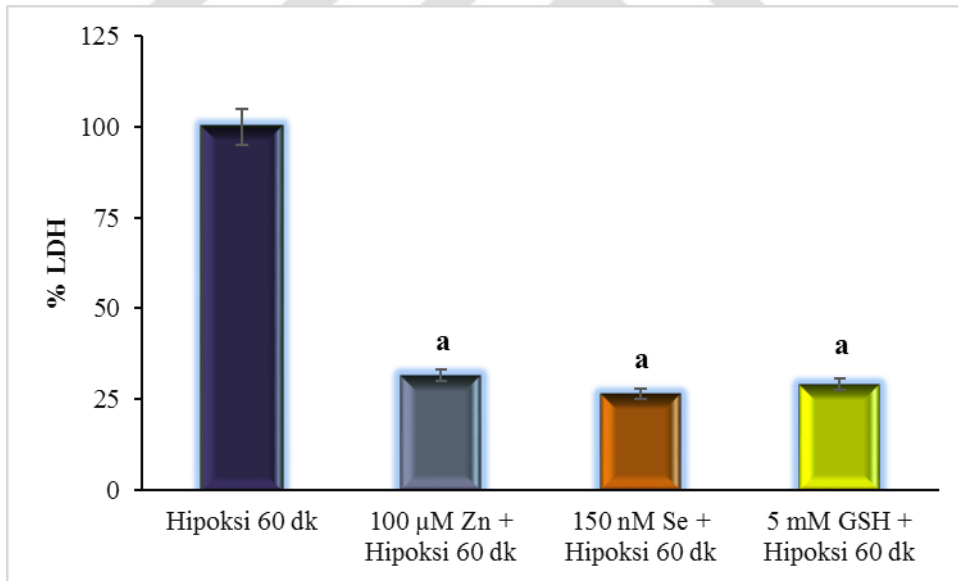
^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$; hipoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.

Tablo 4.14: 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin LDH değerlerinin ($M \pm SD$), hipoksi grubuna göre değişimleri.

Parametre	Hipoksi 60 dk (n=6)	100 μM Zn + Hipoksi 60 dk (n=6)	150 nM Se + Hipoksi 60 dk (n=6)	5 mM GSH + Hipoksi 60 dk (n=6)
LDH ($\mu\text{mol/ml}$)	$2,57 \pm 0,28$	$0,81 \pm 0,13^a$	$0,68 \pm 0,13^a$	$0,77 \pm 0,15^a$

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.001$; hipoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.



Şekil 4.12: 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin LDH değerlerinin ($M \pm SD$), hipoksi grubuna göre %'de değişimleri.

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

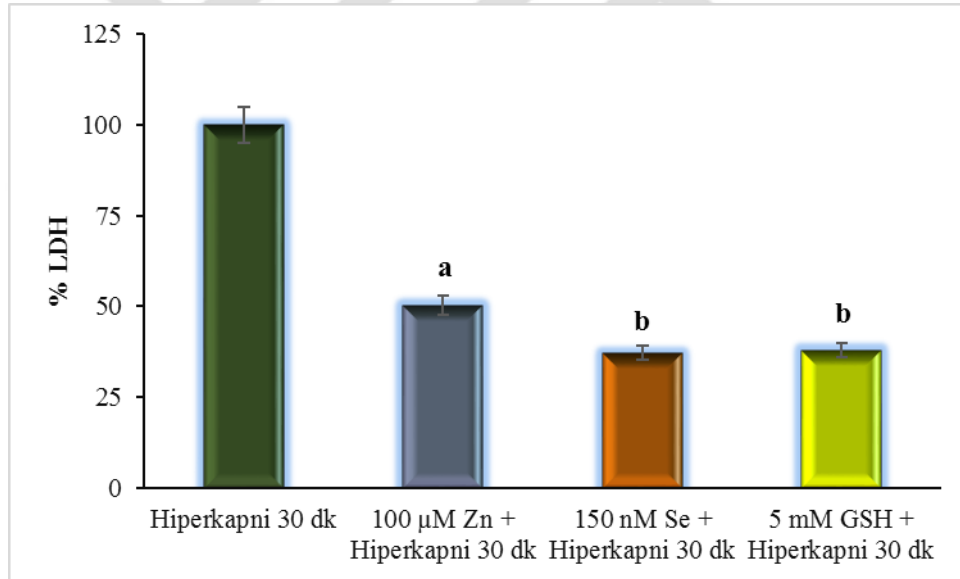
^a $p < 0.001$; hipoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.

Tablo 4.15: 100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin LDH değerlerinin ($M \pm SD$), hiperkapni grubuna göre değişimleri.

Parametre	Hiperkapni 30 dk (n=6)	100 μ M Zn + Hiperkapni 30 dk (n=6)	150 nM Se + Hiperkapni 30 dk (n=6)	5 mM GSH + Hiperkapni 30 dk (n=6)
LDH (μ mol/ml)	1,53 $\pm$ 0,25	0,77 $\pm$ 0,15 ^a	0,57 $\pm$ 0,17 ^b	0,58 $\pm$ 0,13 ^b

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$; hiperkapni grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.



Şekil 4.13: 100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde LDH değerlerinin ($M \pm SD$), hiperkapni grubuna göre %'de değişimleri.

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

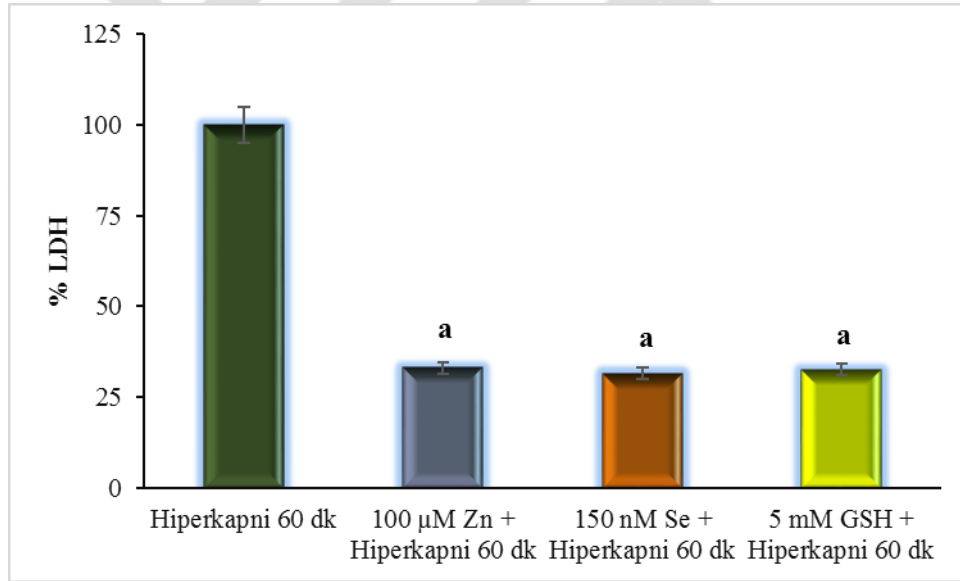
^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, hiperkapni grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.

Tablo 4.16: 100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin LDH değerlerinin ($M \pm SD$), hiperkapni grubuna göre değişimleri.

Parametre	Hiperkapni 60 dk (n=6)	100 μ M Zn + Hiperkapni 60 dk (n=6)	150 nM Se + Hiperkapni 60 dk (n=6)	5 mM GSH + Hiperkapni 60 dk (n=6)
LDH (μ mol/ml)	$2,48 \pm 0,33$	$0,82 \pm 0,14^a$	$0,78 \pm 0,15^a$	$0,81 \pm 0,15^a$

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.01$; hiperkapni grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.



Şekil 4.14: 100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin LDH değerlerinin ($M \pm SD$), hiperkapni grubuna göre %'de değişimleri.

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.01$; hiperkapni grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.

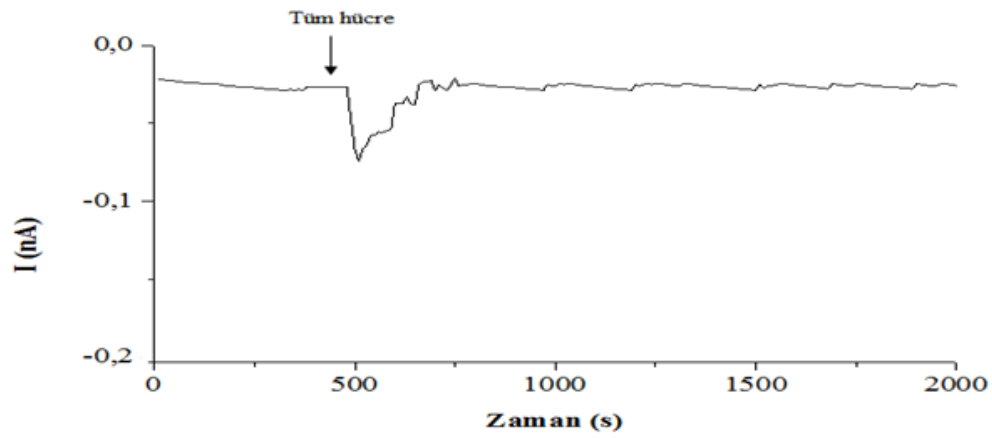
4.3. Patch Clamp Ölçüm Değerleri

HEK293 hücrelerinde TRPM2 kanallarından Patch Clamp-Tüm Hücre Kaydı (THK) yöntemi ile elde edilen veriler kullanılarak, akım (nA) - zaman (s) ve akım (nA) - voltaj (mV) grafikleri *Microcal Origin 8.0* programında çizilmiştir. THK sırasında, iyon kanalından geçen maksimum negatif akım değeri, mikroelektrodun hücrelerin bulunduğu ekstrasellüler ortam solüsyonuna ilk temas ettiği anda oluşan hücre membran direncine ($R_{membran}$) oranlanarak, ortalama akım yoğunlukları (pA/pF) hesaplandı. Akım kaydı sırasında, TRPM2 kanalından hücre içine geçen akımın en fazla olduğu andaki akım değeri, akım (nA) – zaman (s) grafiklerinde 2 ile, kanal istirahat durumuna geçtiği andaki akım değeri ise 1 olarak ifade edilmiştir. Bu akım değerlerinin kenetleme voltajı (-60 mV) ile kesişimi sonucu elde edilen doğrular ise akım (nA) – voltaj (mV) grafiklerinde gösterilmiştir.

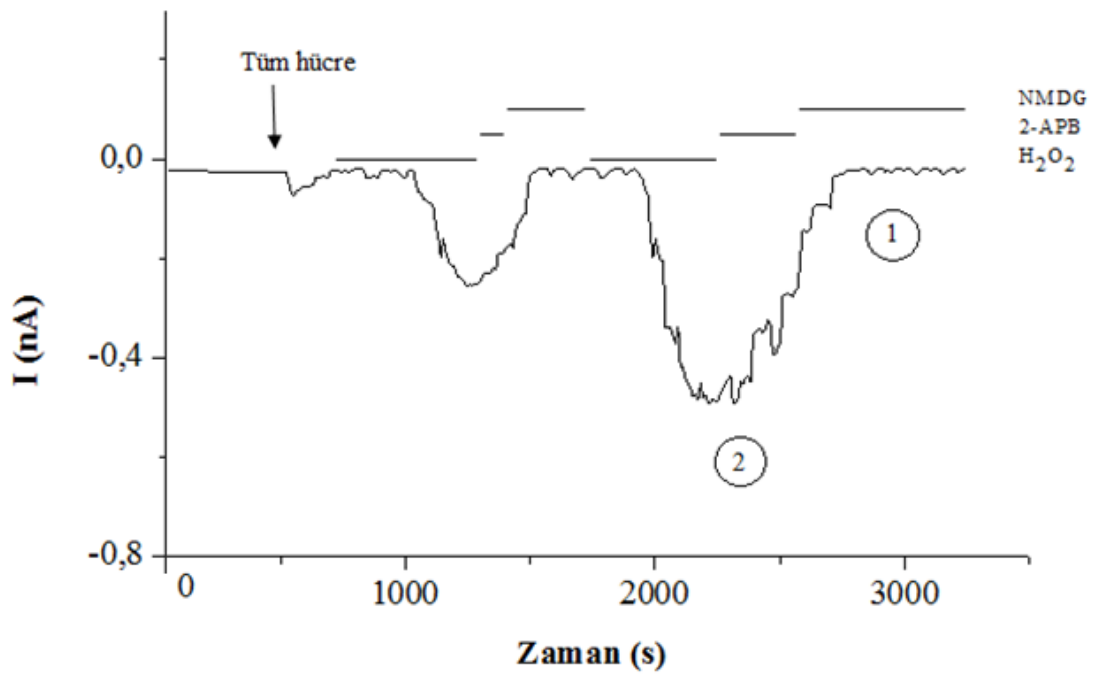
4.3.1. Deney Gruplarının Tüm Hücre Kayıtlarının Analizi

30 dk normoksik gaz uygulanan kontrol grubu ile 30 dk hipoksik ve 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan deney gruplarının akım (nA) – zaman (s), akım (nA) – voltaj (mV) ve ortalama akım yoğunluğu (pA/pF) grafikleri Şekil 4.(15-22)'de verilmiştir.

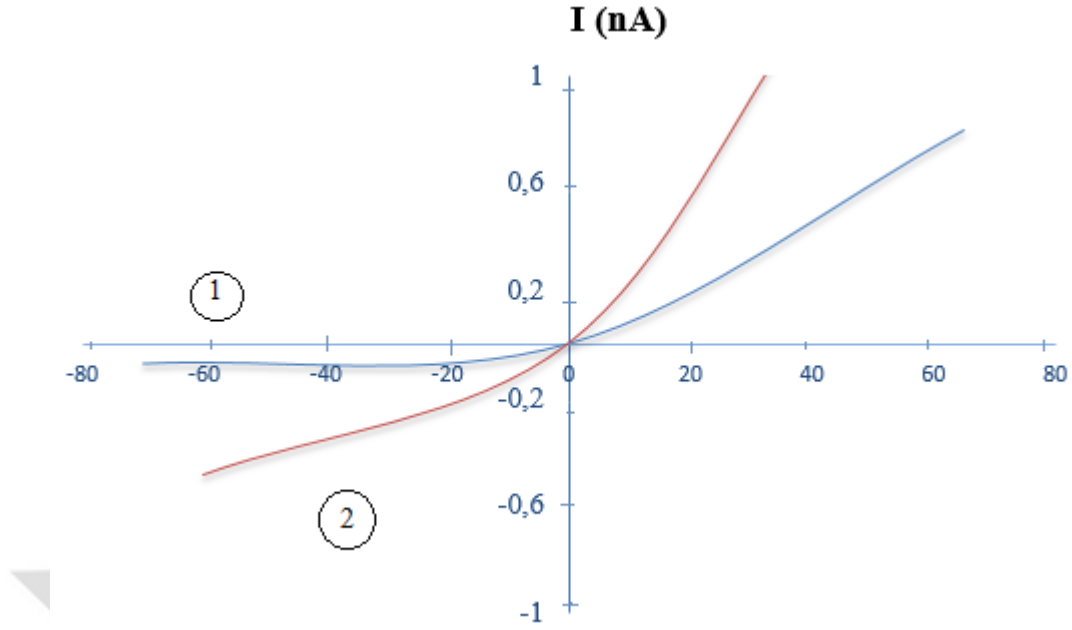
30 dk normoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin H_2O_2 ile uyarılmadan önce THK yöntemiyle alınan kontrol kaydına ait akım (nA) - zaman (s) grafiği Şekil 4.15'de gösterilmiştir. H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanalında akım değişikliği gözlenmemiştir. 30 dk normoksik gaz uygulanan hücrelerin H_2O_2 ile uyarılması sonucunda, negatif yönde akımın arttığı ve TRPM2 kanallarında -0,49 nA değerinde akım oluştuğu akım (nA) – zaman (s) grafiğinde gözlemlendi. H_2O_2 ile uyarılma sonucunda TRPM2 kanalının açıldığı gözlemlendikten ve akım plato değerine ulaştıktan sonra sırası ile 2-APB ve $NMDG^{+}$ 'li ekstrasellüler ortam solüsyonları, tekrar sırası ile H_2O_2 , 2-APB ve $NMDG^{+}$ 'li ekstrasellüler ortam solüsyonları hücrelerin bulunduğu ortama uygulandı. TRPM2 iyon kanalından geçen negatif akım değerinin maksimuma ulaştığı andaki akım değeri kaydedildi ve kanalın tekrar kapanması beklendi. Elde edilen verilere ait akım (nA) – zaman (s), akım (nA) – voltaj (mV) ve ortalama akım yoğunluğu (pA/pF) grafikleri çizildi (Şekil 4.(16, 17, 21)). 30 dk normoksik gaz uygulanan grubun THK sonucunda elde edilen verilerden ortalama akım yoğunluğu değeri -74,11 pA/pF (n=6) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.15: 30 dk normoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.

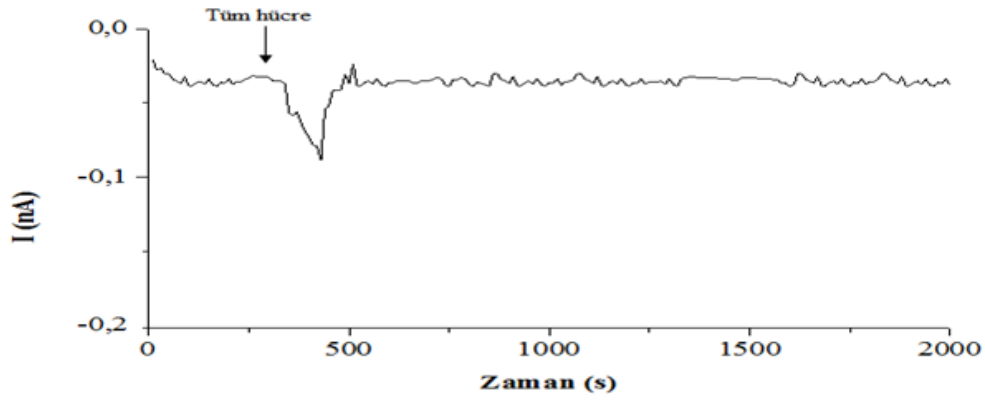


Şekil 4.16: 30 dk normoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.

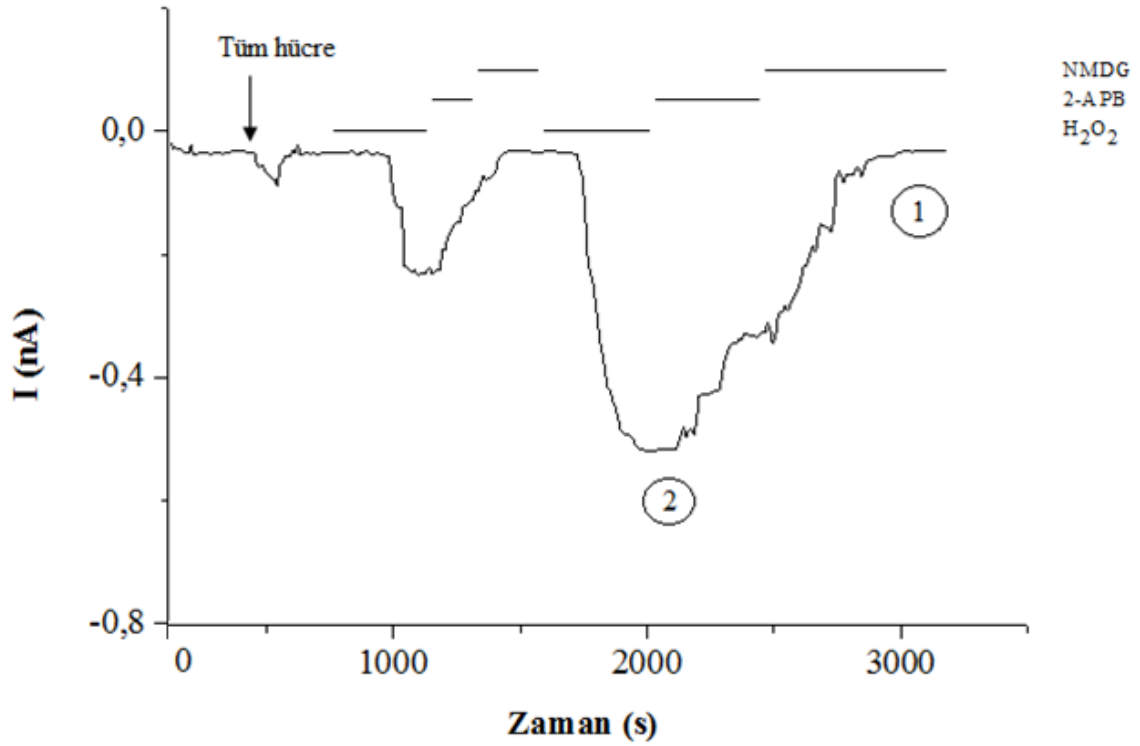


Şekil 4.17: 30 dk normoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.

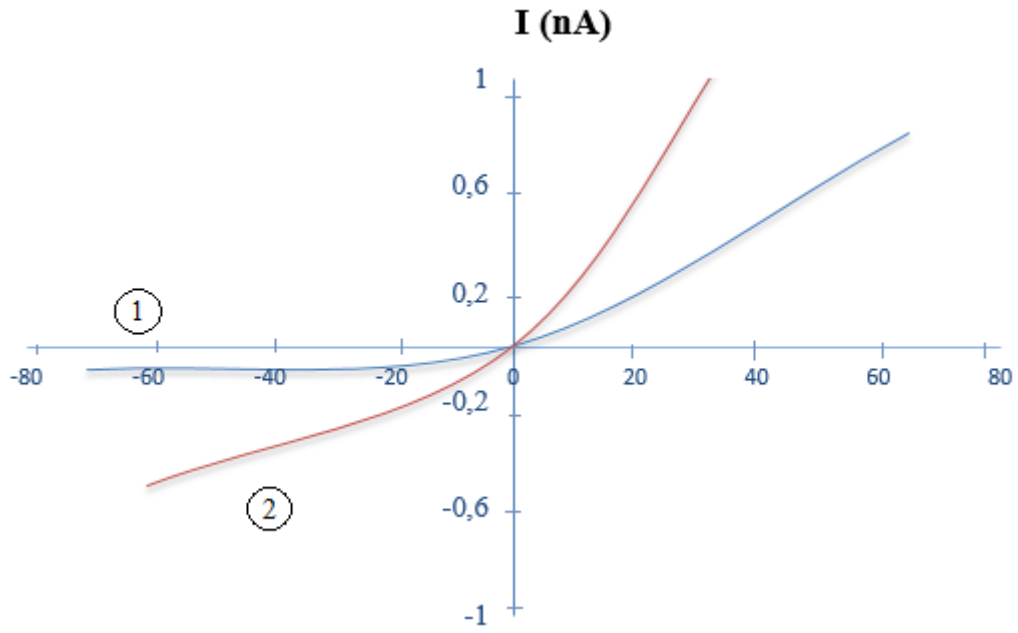
60 dk normoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin H_2O_2 ile uyarılmadan önce THK yöntemiyle alınan kontrol kaydına ait akım (nA) - zaman (s) grafiği Şekil 4.18’de verilmiştir. H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanalında akım değişikliği gözlemlenmedi. 60 dk normoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin H_2O_2 ile uyarılması sonucunda negatif yönde akımın arttığı ve TRPM2 kanallarında -0,52 nA değerinde akım olduğu akım (nA) – zaman (s) grafiğinde gözlemlendi. TRPM2 kanalının H_2O_2 ile uyarılması sonucunda açıldığı gözlemlendikten ve akım platoya ulaştıktan sonra sırası ile 2-APB ve $NMDG^{+}$ ’li ekstrasellüler ortam solüsyonları, tekrar sırası ile H_2O_2 , 2-APB ve $NMDG^{+}$ ’li ekstrasellüler ortam solüsyonları hücrelerin bulunduğu ortama uygulandı. TRPM2 iyon kanalından geçen negatif akım değerinin maksimuma ulaştığı andaki akım değeri kaydedildi ve kanalın tekrar kapanması beklendi. Elde edilen verilere ait akım (nA) – zaman (s), akım (nA) – voltaj (mV) ve ortalama akım yoğunluğu (pA/pF) grafikleri çizildi (Şekil 4.(19, 20, 21)). 60 dk normoksik gaz uygulanan grupta yapılan THK sonucunda elde edilen verilerden ortalama akım yoğunluğu değeri -91,02 pA/pF (n=6) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.18: 60 dk normoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.

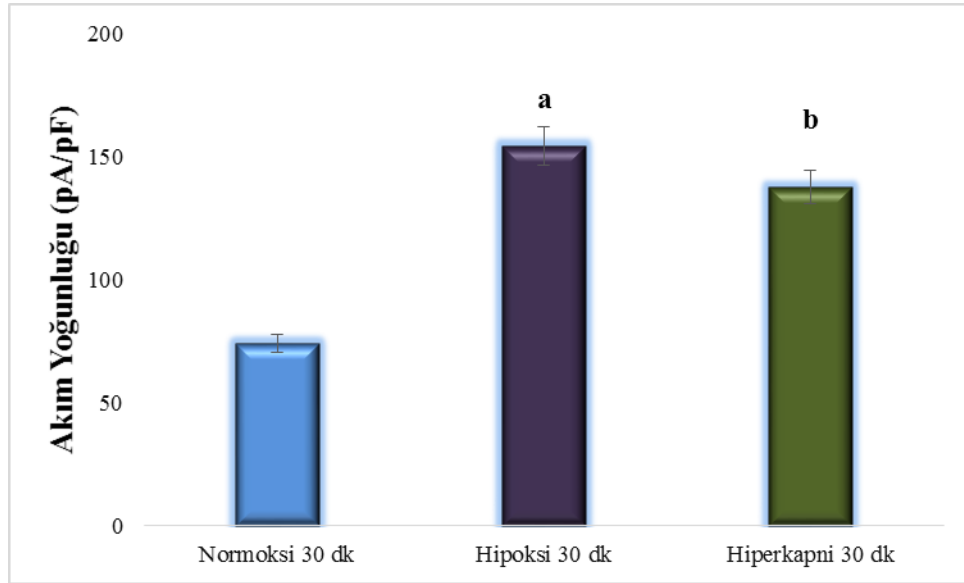


Şekil 4.19: 60 dk normoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



Şekil 4.20: 60 dk normoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.

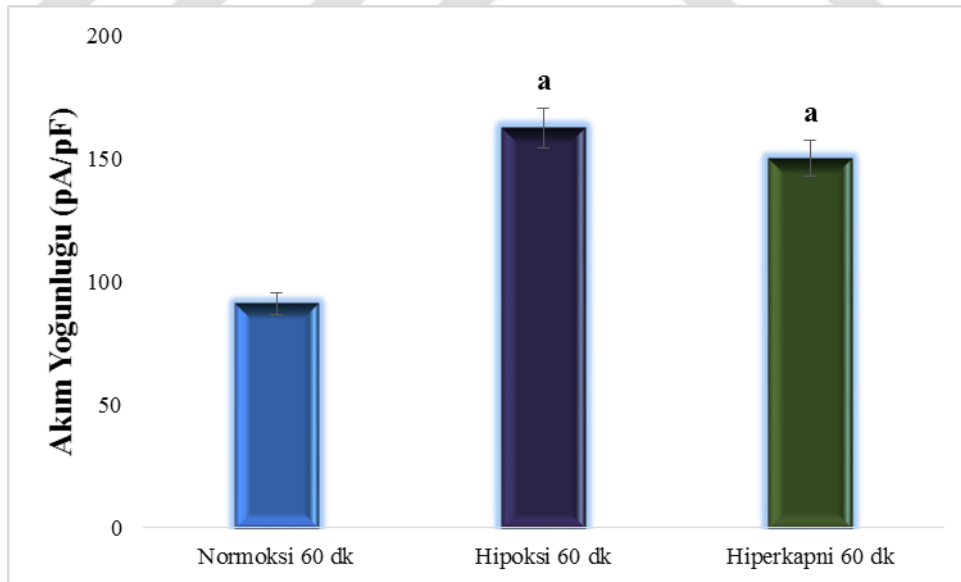
30 dk hipoksik ve 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplarda ortalama akım yoğunluklarının, kontrolleri olan 30 dk normoksik gaz uygulanan grubun aynı değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir (sırası ile $p < 0.01$, $p < 0.05$) (Şekil 4.21). Benzer şekilde 60 dk hipoksik ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan grupların ortalama akım yoğunluklarının, 60 dk normoksik gaz uygulanan grubun aynı değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p < 0.01$) artış gösterdiği bulundu (Şekil 4.22).



Şekil 4.21: 30 dk hipoksik ve 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, normoksi grubuna göre ortalama akım yoğunluğu değişimleri ($M \pm SD$).

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.01$, ^b $p < 0.05$; normoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırmaları.



Şekil 4.22: 60 dk hipoksik ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, normoksi grubuna göre ortalama akım yoğunluğu değişimleri ($M \pm SD$).

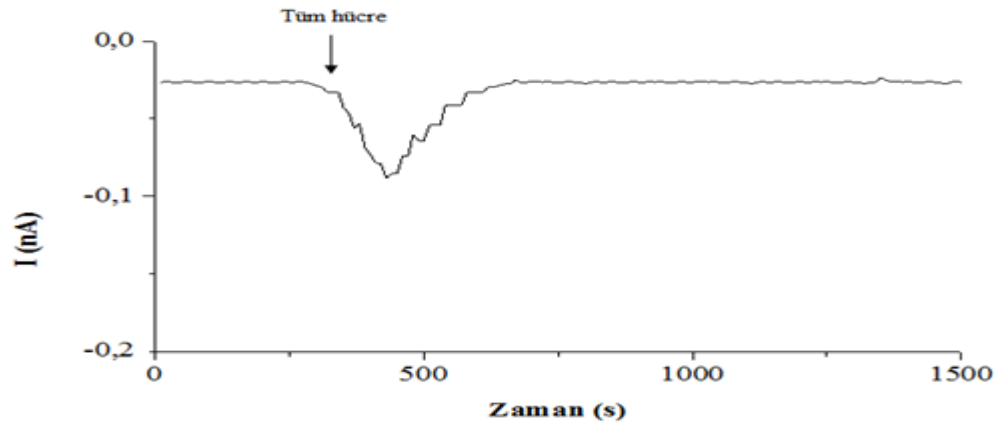
$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

^a $p < 0.01$; normoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırma.

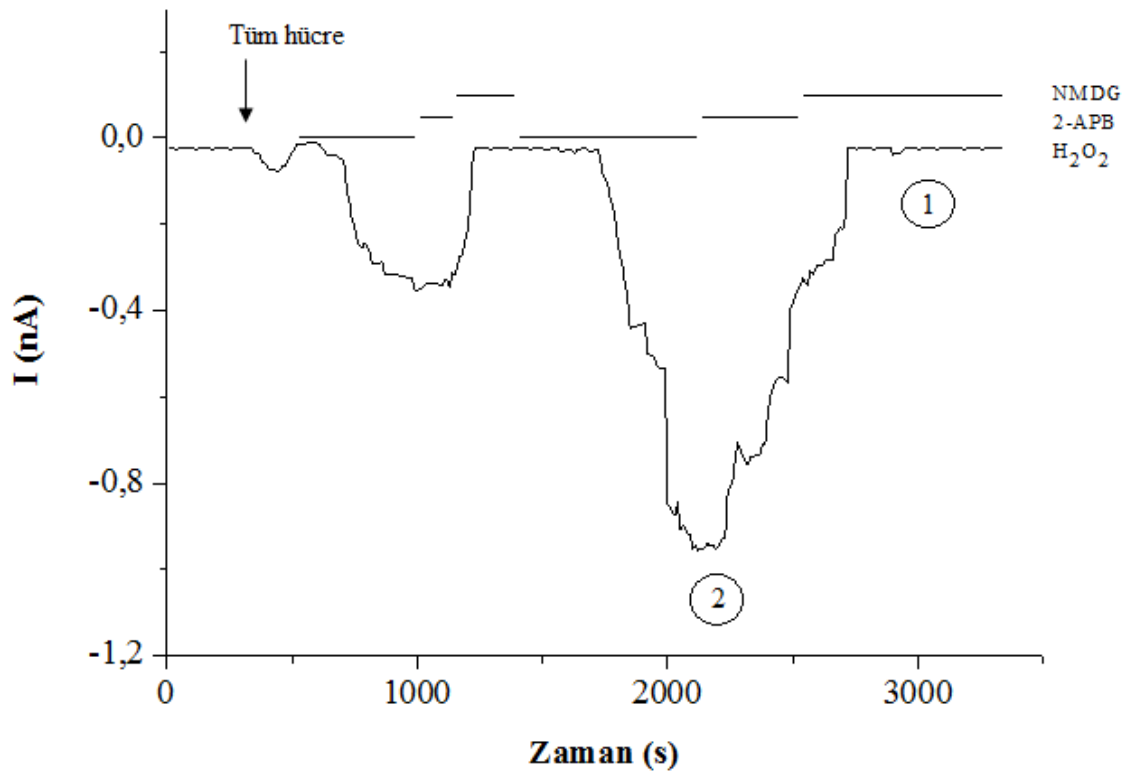
4.3.2. Hipoksi Gruplarında Tüm Hücre Kayıtlarının Analizi

Sadece 30 dk ve 60 dk hipoksik gaz uygulanan, 100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk ve 60 dk hipoksik gaz uygulanan gruplardan THK yöntemiyle elde edilen akım (nA) – zaman (s), akım (nA) – voltaj (mV) ve ortalama akım yoğunluğu (pA/pF) grafikleri Şekil 4.(23-48)'da verilmiştir.

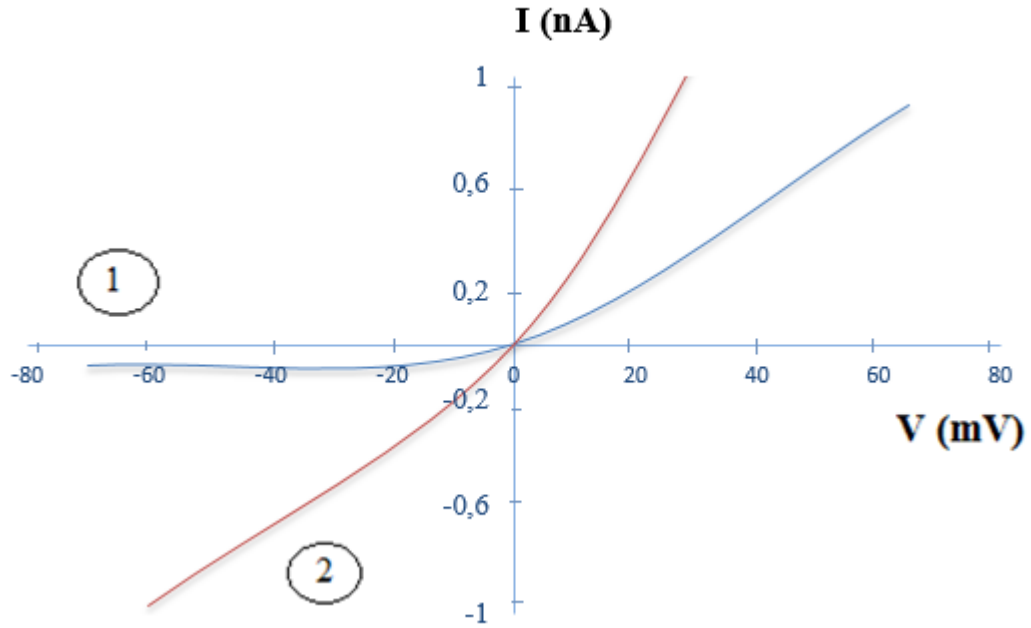
Sadece 30 dk hipoksik, 100 μ M Zn + 30 dk hipoksik, 150 nM Se + 30 dk hipoksik ve 5 mM GSH + 30 dk hipoksik gruplarında H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarında akım değişikliği gözlemlenmedi (Şekil 4.(23, 25, 29, 32)). Aynı gruplarda H_2O_2 ile uyarım sonrasında negatif yönde akımın arttığı tespit edildi. H_2O_2 ile uyarılması sonucunda TRPM2 kanalı açıldıktan ve akım platoya ulaştıktan sonra, sırası ile 2-APB ve NMDG⁺'li ekstrasellüler ortam solüsyonu, tekrar sırası ile H_2O_2 , 2-APB ve NMDG⁺'li ekstrasellüler ortam solüsyonları hücrelerin bulunduğu ortama uygulandı. TRPM2 iyon kanalından geçen negatif akım değerinin maksimuma ulaştığı andaki akım değeri kaydedildi ve kanalın tekrar kapanması beklenildi. Deney gruplarında TRPM2 kanallarında sırası ile -0,97 nA, -0,65 nA, -0,51 nA ve -0,61 nA değerlerinde akımların olduğu akım (nA) - zaman (s) grafiklerinde gözlemlendi (Şekil 4.(24, 27, 30, 33)). Elde edilen verilere ait akım (nA) - voltaj (mV) ve ortalama akım yoğunluğu (pA/pF) grafikleri çizildi (Şekil 4.(25, 28, 31, 34, 35)). Sadece 30 dk hipoksik gaz uygulanan grubun ortalama akım yoğunluğu değeri ile karşılaştırıldığında, 100 μ M Zn ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan grupların aynı değerlerinde $p < 0.05$, 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan grubun aynı değerlerinde ise $p < 0.01$ seviyesinde istatistiksel bakımdan anlamlı (n=6) azalma olduğu bulundu.



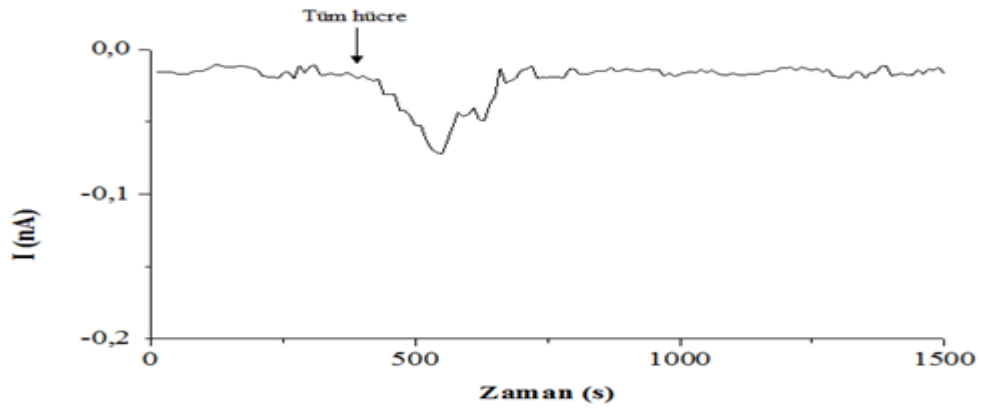
Şekil 4.23: 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



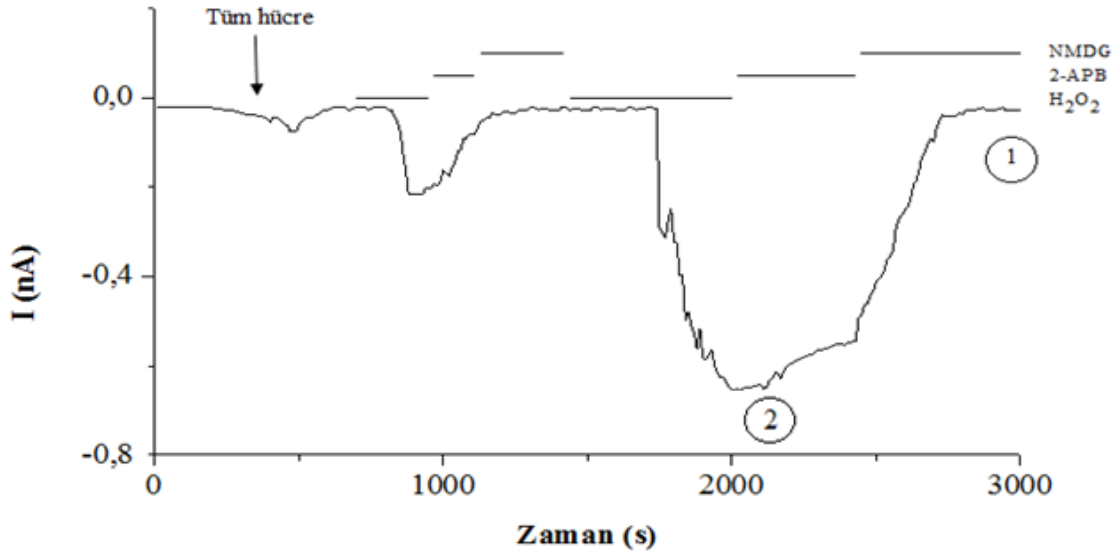
Şekil 4.24: 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



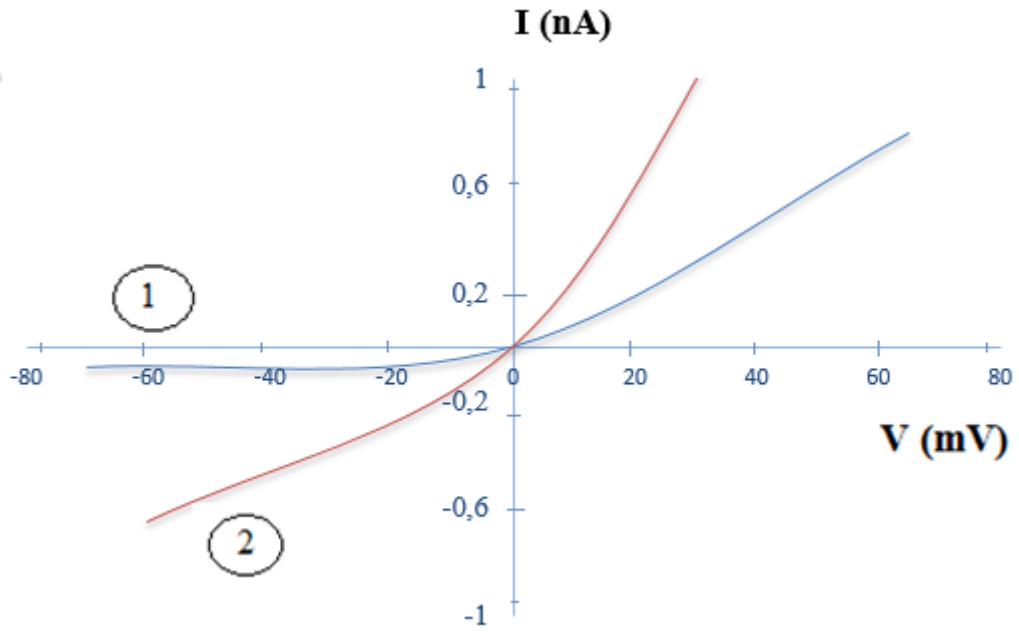
Şekil 4.25: 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.



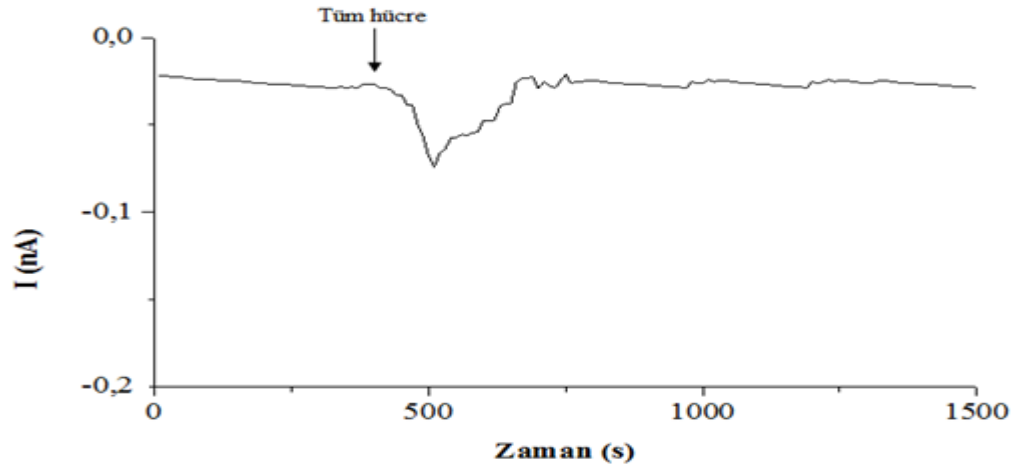
Şekil 4.26: 100 μM Zn ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



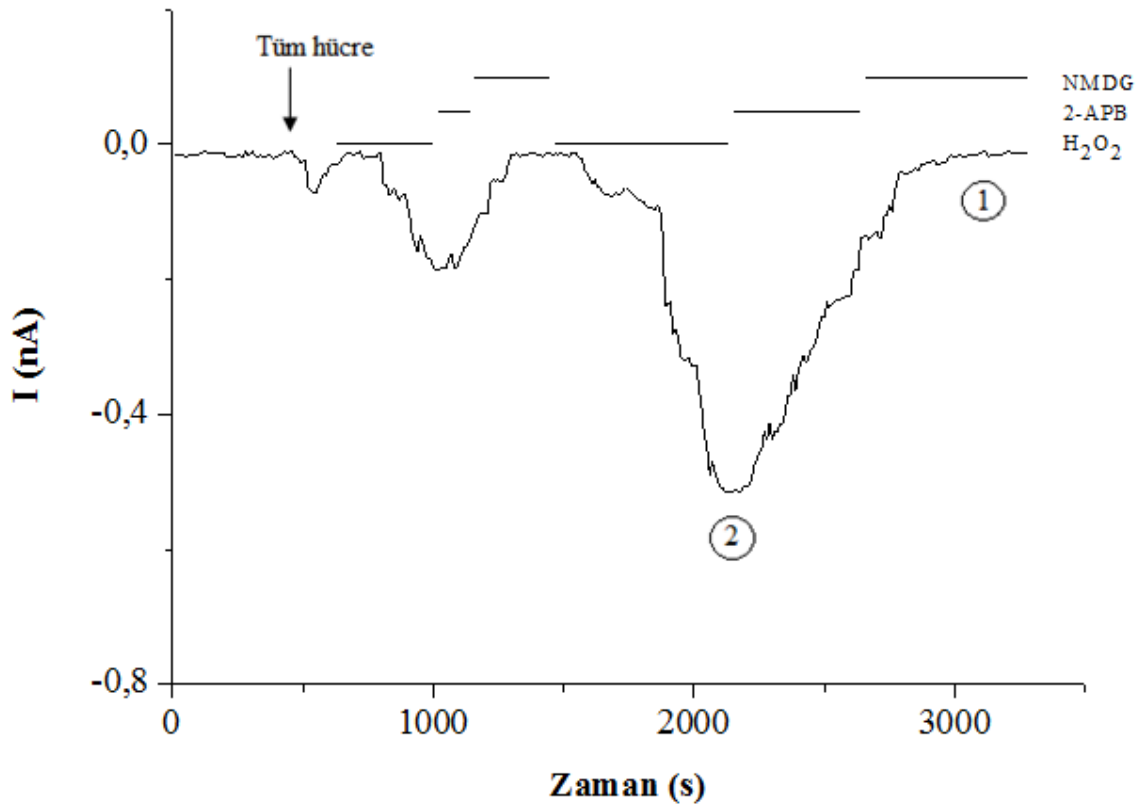
Şekil 4.27: 100 μM Zn ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



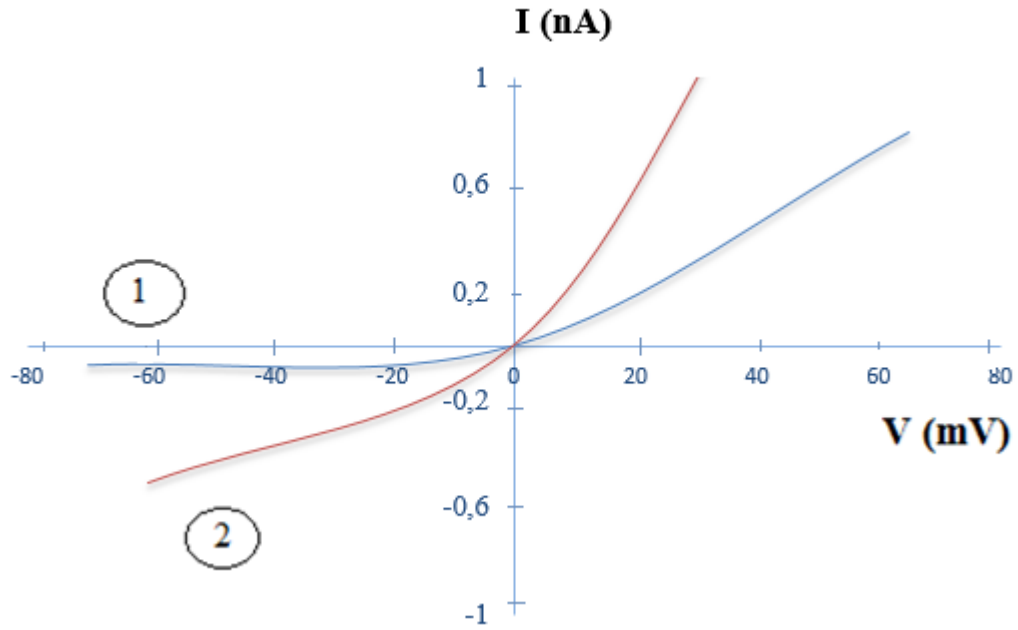
Şekil 4.28: 100 μM Zn ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.



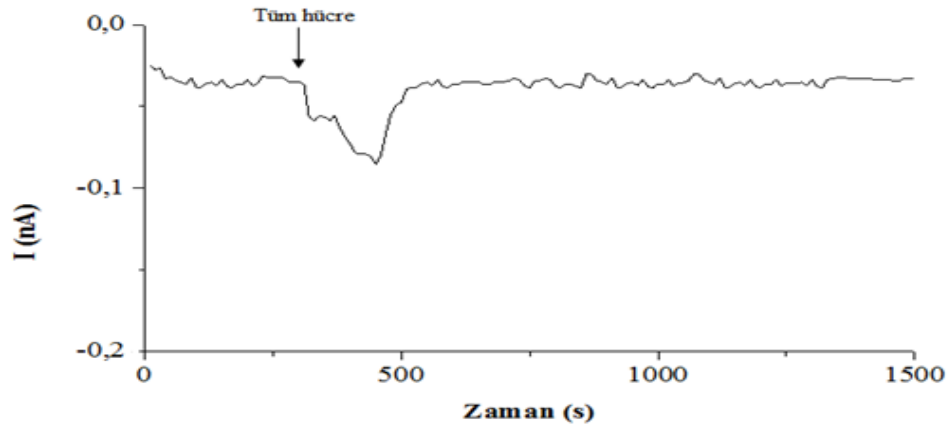
Şekil 4.29: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



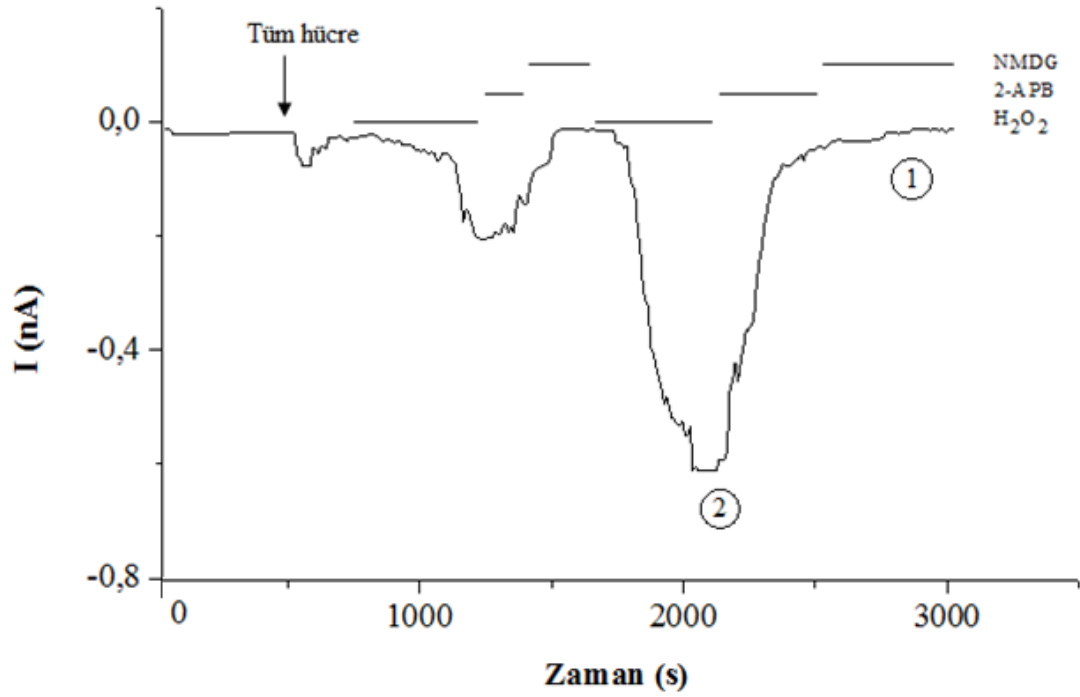
Şekil 4.30: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



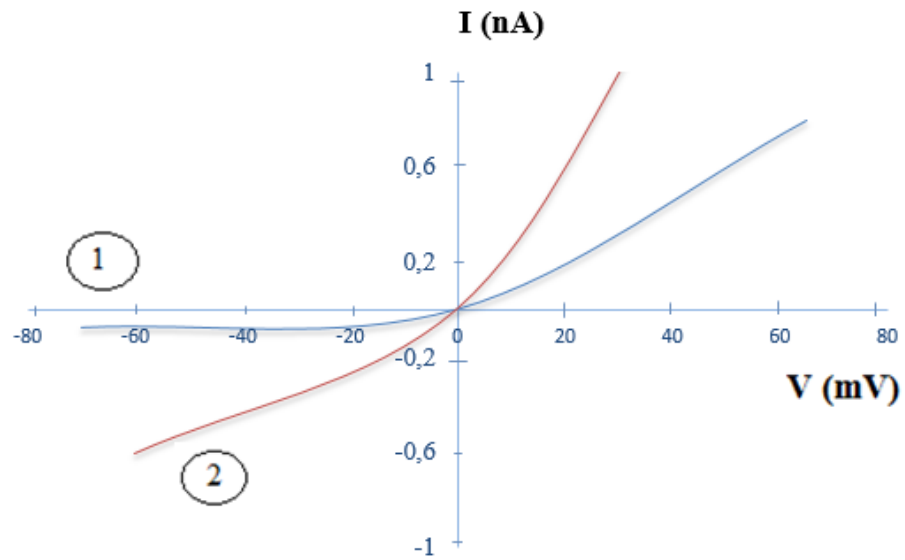
Şekil 4.31: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.



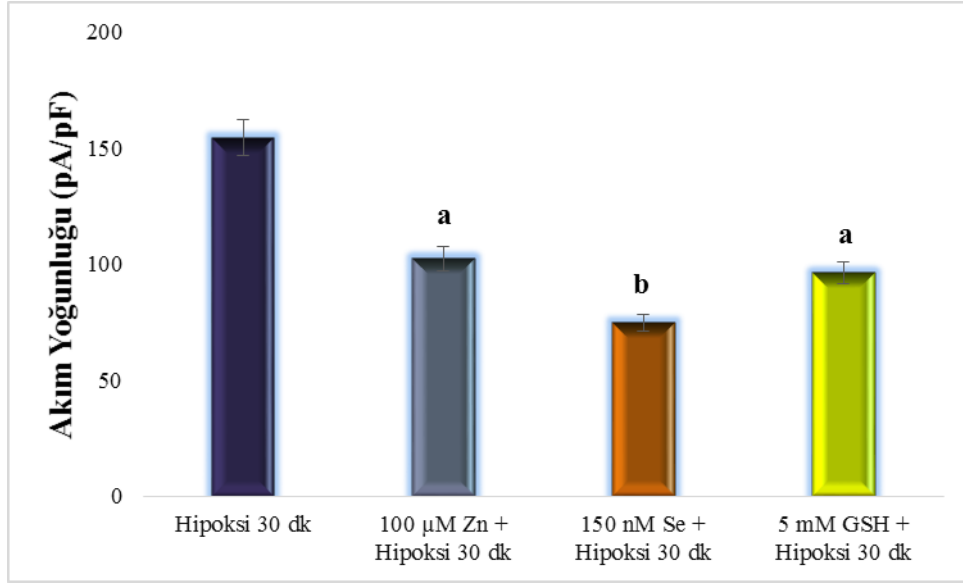
Şekil 4.32: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



Şekil 4.33: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



Şekil 4.34: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarımı sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.



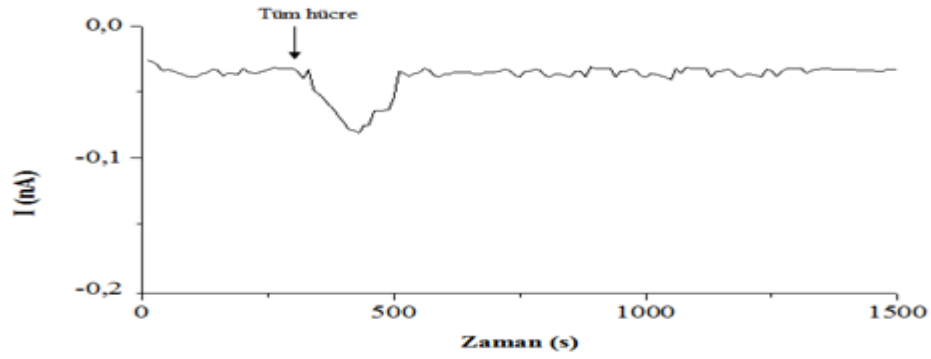
Şekil 4.35: 100 µM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan grupların, hipoksi grubuna göre ortalama akım yoğunluğu değişimleri ($M \pm SD$).

$M \pm SD$; ortalama $\pm$ standart sapma.

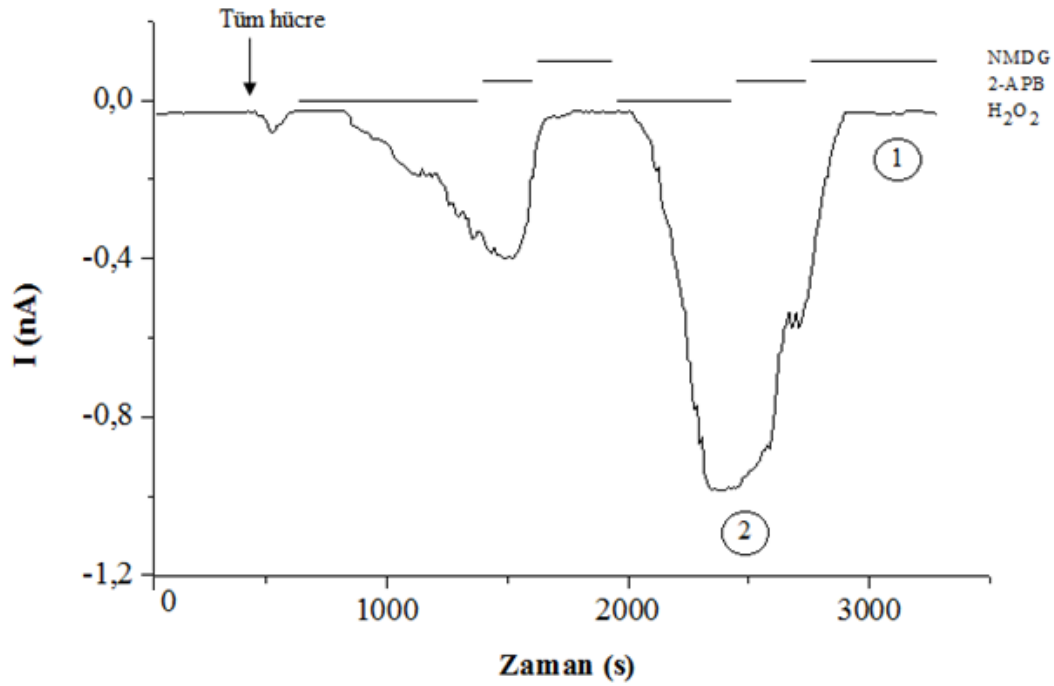
^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$; hipoksi 30 dk grubu ile istatistiksel karşılaştırma.

Sadece 60 dk hipoksik, 100 µM Zn + 60 dk hipoksik, 150 nM Se + 60 dk hipoksik ve 5 mM GSH + 60 dk hipoksik gruplarında, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarında akım değişikliği gözlemlenmedi (Şekil 4.(36, 39, 42, 45)). Sadece 60 dk hipoksik gaz uygulanan, 100 µM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan gruplarda H_2O_2 ile uyarım sonrasında, negatif yönde akımın arttığı gözlemlendi. H_2O_2 ile uyarılması sonucunda TRPM2 kanalının açıldığı tespit edildikten ve akım platoya ulaştıktan sonra sırası ile 2-APB ve $NMDG^{+}$ 'li ekstrasellüler ortam solüsyonları, tekrar sırası ile H_2O_2 , 2-APB ve $NMDG^{+}$ 'li ekstrasellüler ortam solüsyonları hücrelerin bulunduğu ortama uygulandı. TRPM2 iyon kanalından geçen negatif akım değerinin maksimuma ulaştığı andaki akım değeri kaydedildi ve kanalın tekrar kapanması beklendi. Bu gruplarda TRPM2 kanallarında sırası ile -0,99 nA, -0,70 nA, -0,60 nA ve -0,68 nA değerlerinde akımların oluştuğu akım (nA) - zaman (s) grafiklerinde gözlemlendi (Şekil 4.(37, 40, 43, 46)). Elde edilen verilere ait akım (nA) - voltaj (mV) ve ortalama akım yoğunluğu (pA/pF) grafikleri çizildi (Şekil 4.(38, 41, 44, 47, 48)). 100 µM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH

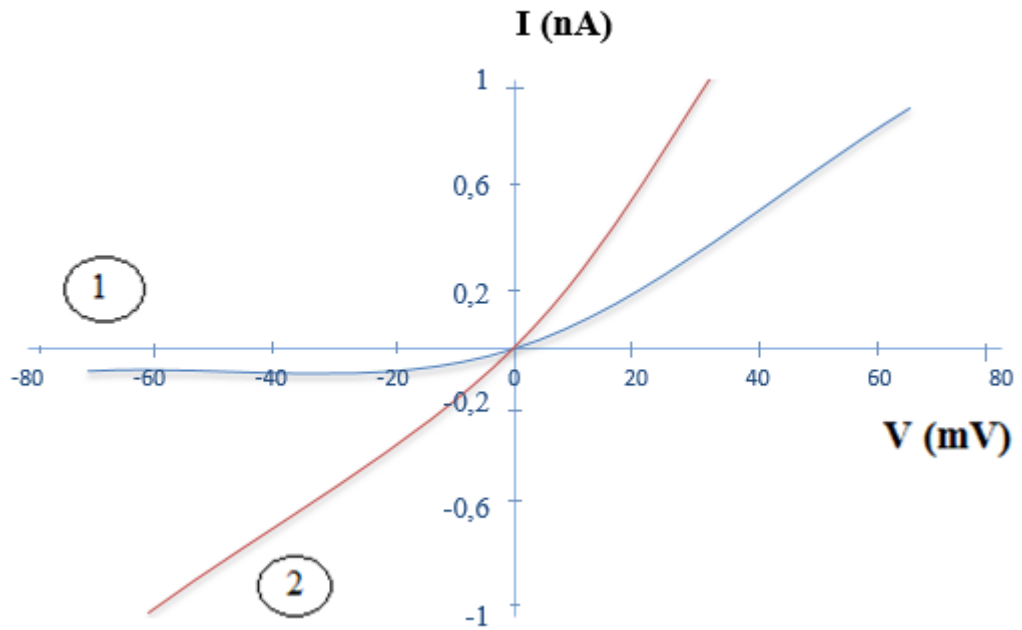
ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan grupların, sadece 60 dk hipoksik gaz uygulanan grup ile karşılaştırıldığında ortalama akım yoğunluklarında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı ($n=6$) ($p < 0.01$) azalma olduğu tespit edilmiştir.



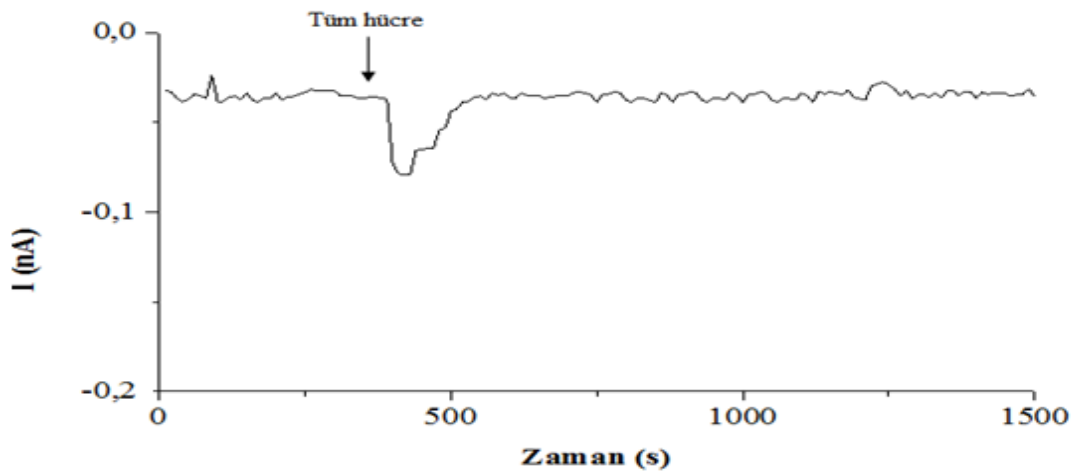
Şekil 4.36: 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



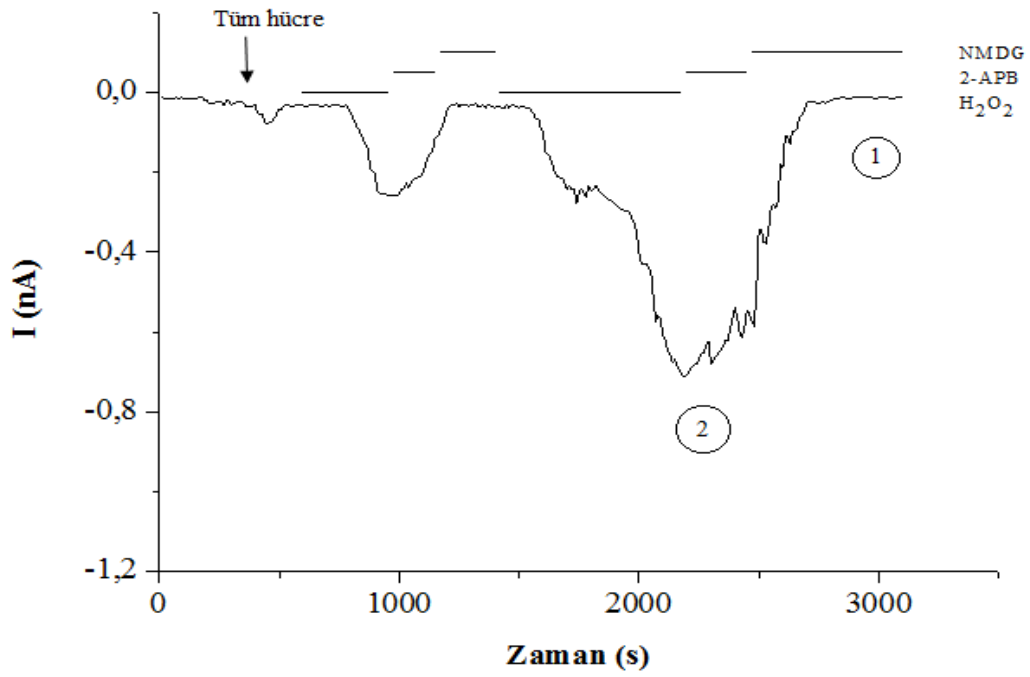
Şekil 4.37: 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



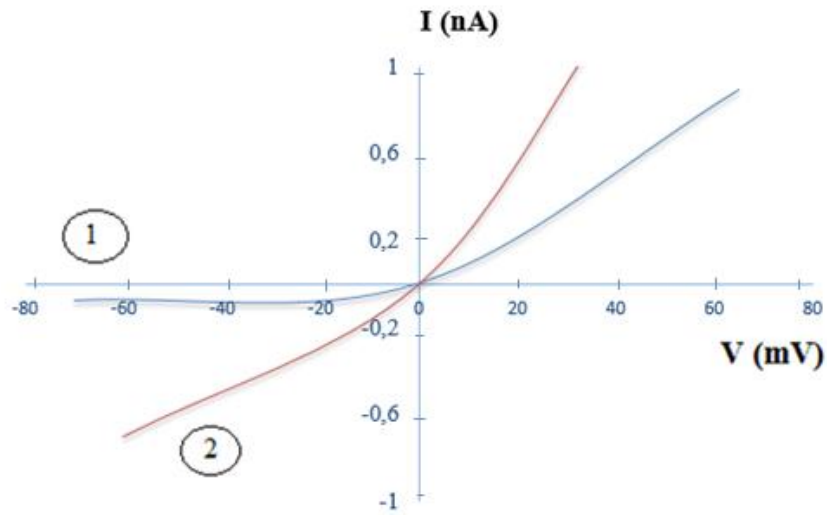
Şekil 4.38: 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.



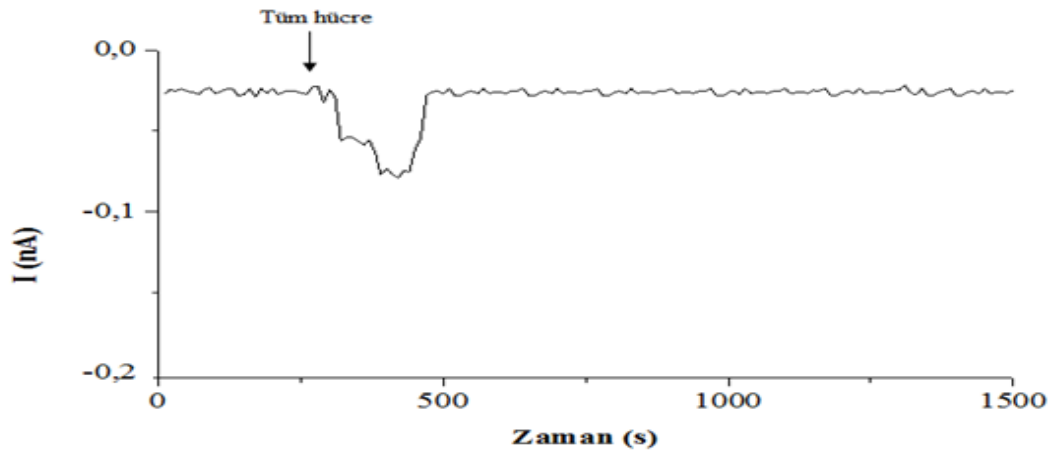
Şekil 4.39: 100 μM Zn ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



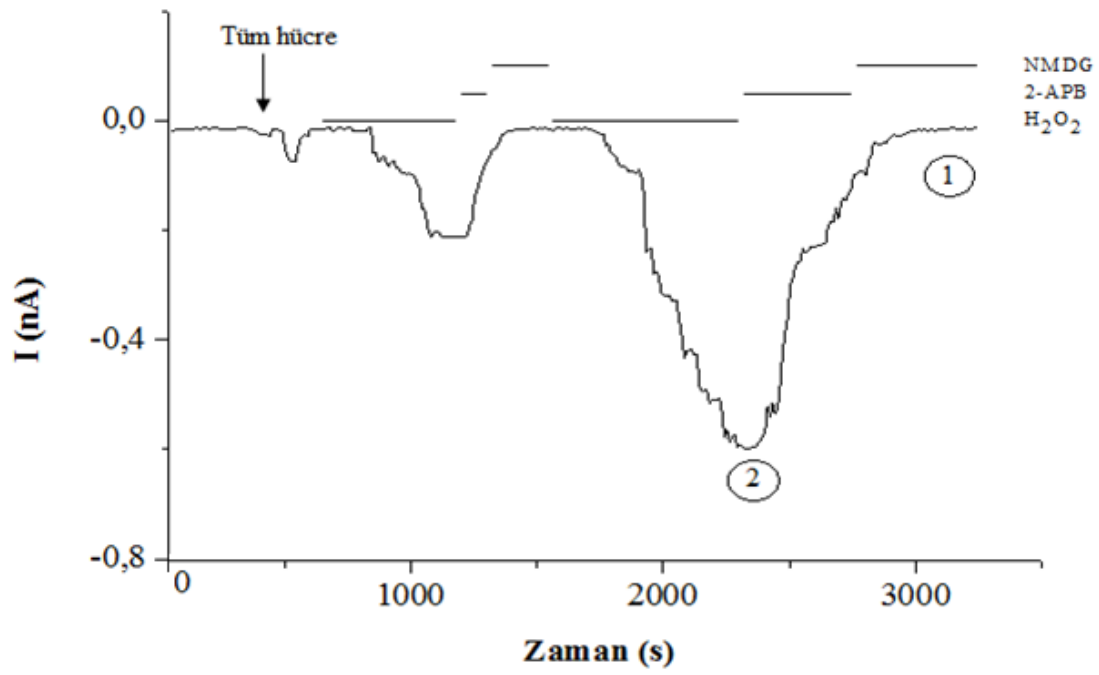
Şekil 4.40: 100 μM Zn ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



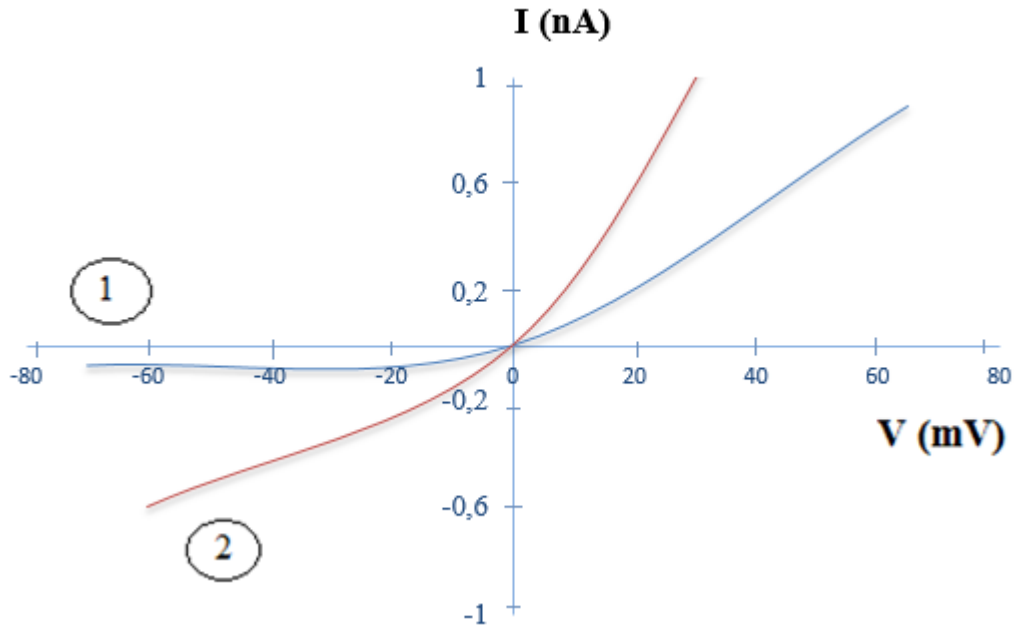
Şekil 4.41: 100 μM Zn ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.



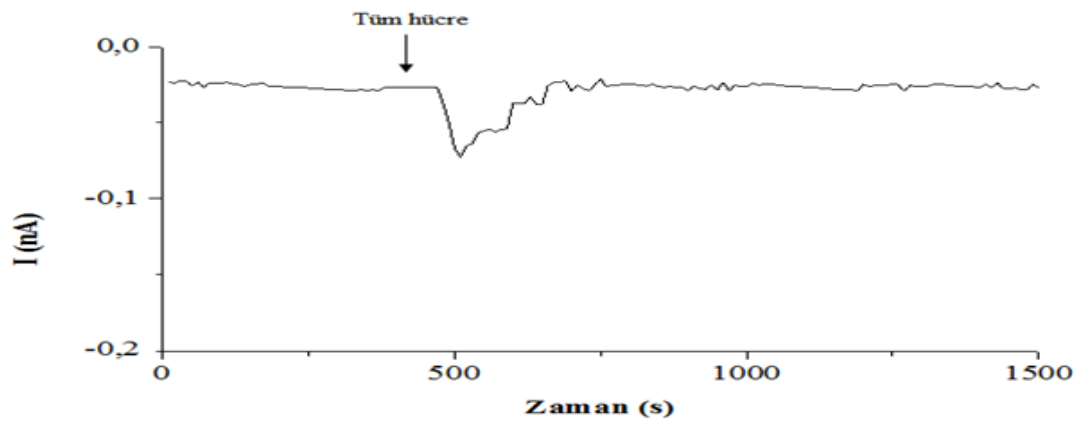
Şekil 4.42: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan tüm hücre kaydı.



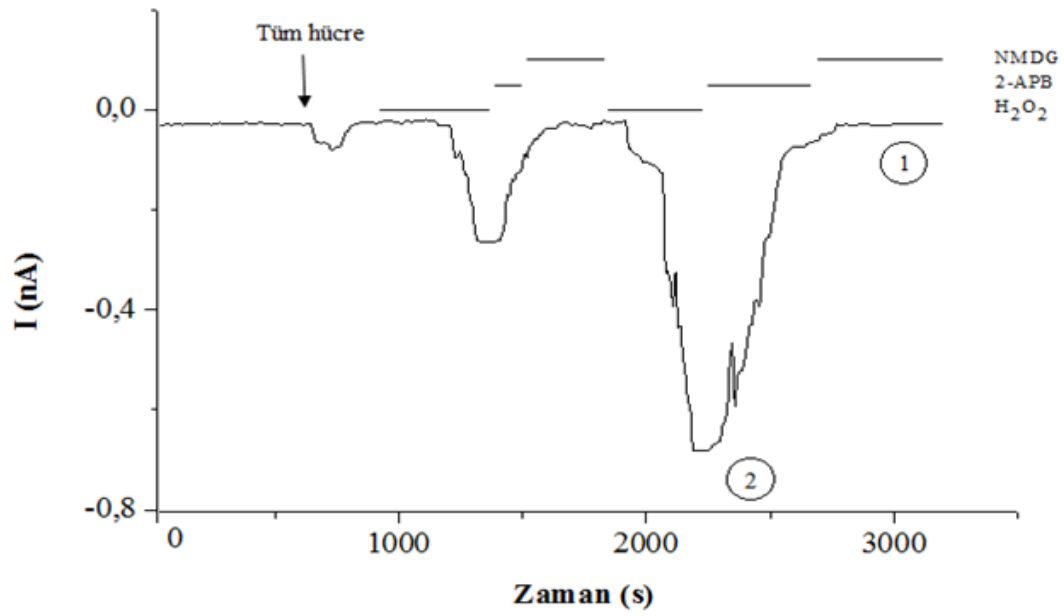
Şekil 4.43: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



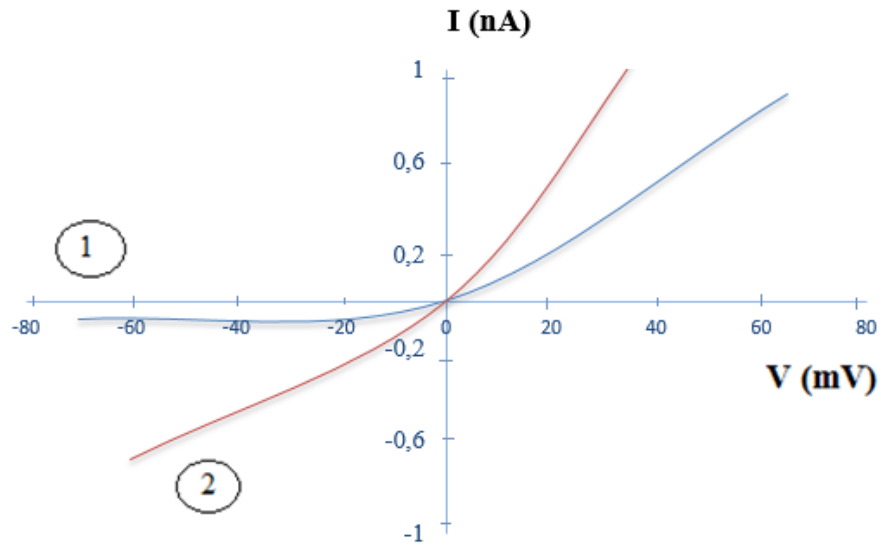
Şekil 4.44: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.



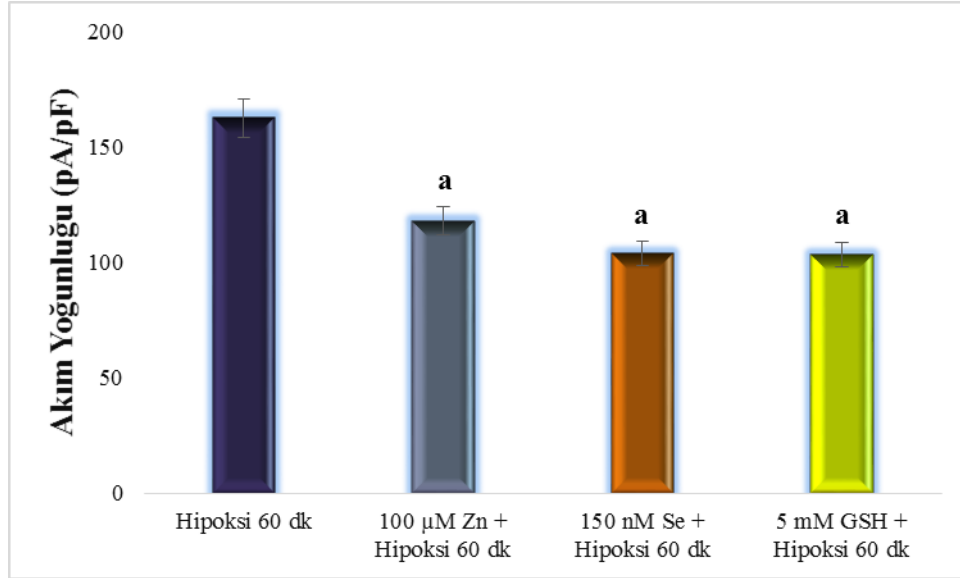
Şekil 4.45: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



Şekil 4.46: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



Şekil 4.47: 5 mM GSH ile edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.



Şekil 4.48: 100 µM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hipoksik gaz uygulanan grupların, hipoksi grubuna göre ortalama akım yoğunluğu değişimleri ($M \pm SD$).

ortalama $\pm$ standart sapma ($M \pm SD$)

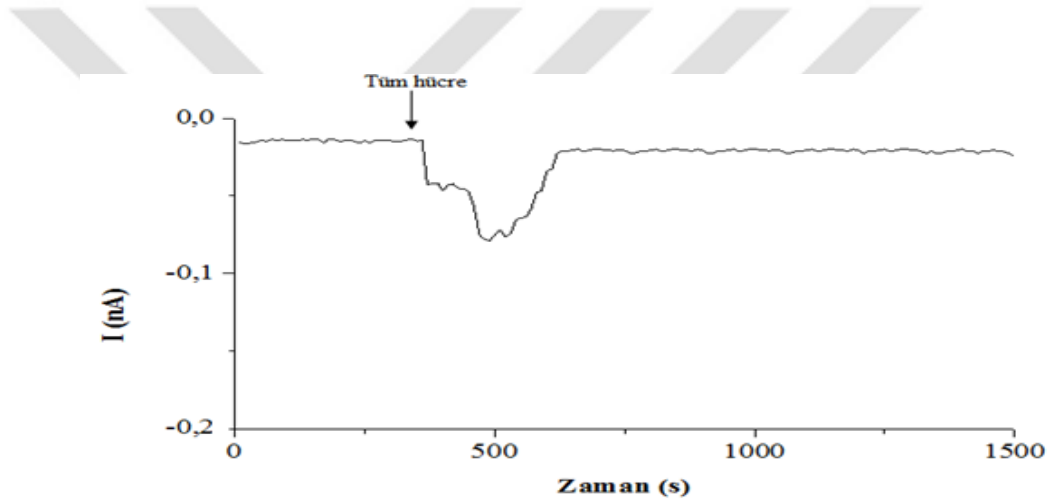
^a $p < 0.01$; hipoksi grubu ile istatistiksel karşılaştırma.

4.3.3. Hiperkapni Gruplarında Tüm Hücre Kayıtlarının Analizi

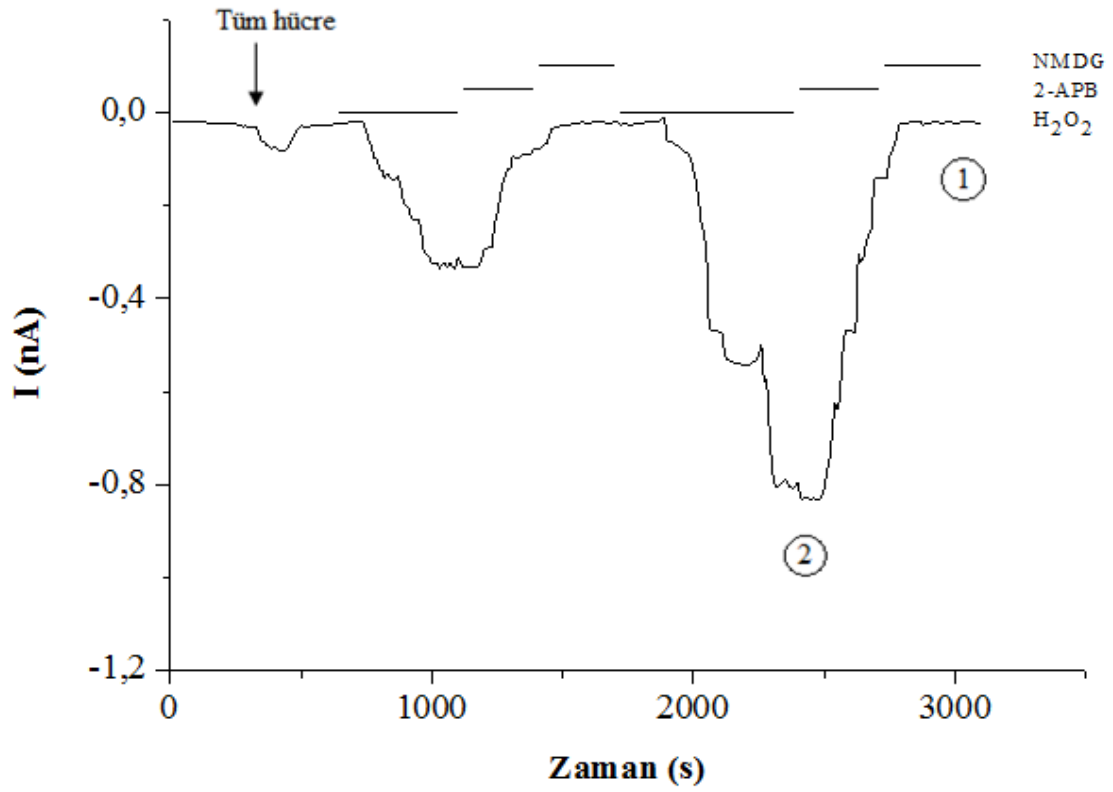
Sadece 30 dk ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan ve 100 µM Zn, 150 nM Se ve 5 nM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplardan alınan THK yöntemiyle elde edilen akım (nA) – zaman (s), akım (nA) – voltaj (mV) ve ortalama akım yoğunluğu (pA/pF) grafikleri Şekil 4.49-74’de verilmiştir.

Sadece 30 dk hiperkapni, 100 µM Zn + 30 dk hiperkapni, 150 nM Se + 30 dk hiperkapni ve 5 mM GSH + 30 dk hiperkapni gruplarında, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarında akım değişikliği gözlemlenmedi (Şekil 4.(49, 52, 55, 58)). Aynı gruplarda H_2O_2 ile uyarım sonucunda, TRPM2 kanalının açıldığı ve negatif yönde akımın arttığı gözlemlendi. TRPM2 kanalının H_2O_2 uygulaması sonucunda açıldığı gözlemlendikten ve akım plato değerine ulaştıktan sonra sırası ile 2-APB ve $NMDG^{+}$ ’li ekstrasellüler ortam solüsyonları, tekrar sırası ile H_2O_2 , 2-APB ve $NMDG^{+}$ ’li ekstrasellüler ortam solüsyonları hücrelerin bulunduğu ortama uygulandı. TRPM2 kanalından geçen negatif akım değerinin maksimuma ulaştığı andaki akım değeri

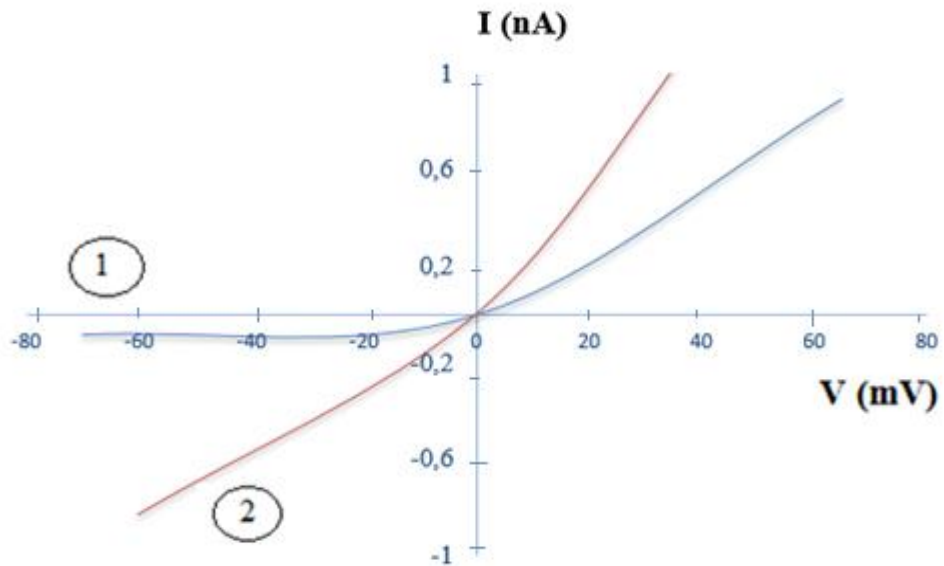
kaydedildi ve kanalın tekrar kapanması beklendi. TRPM2 kanallarının açılması sırasında deney gruplarında sırası ile -0,83 nA, -0,53 nA, -0,44 nA ve -0,67 nA değerlerinde akımların oluştuğu akım (nA) - zaman (s) grafiklerinde gözlemlendi (Şekil 4.(50, 53, 56, 59)). Elde edilen verilere ait akım (nA) - voltaj (mV) ve ortalama akım yoğunluğu (pA/pF) grafikleri çizildi (Şekil 4.(51, 53, 57, 60, 61)). Deney gruplarının ortalama akım yoğunlukları sadece 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan grubun aynı değerleri ile karşılaştırıldığında, 100 μ M Zn ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan grupta $p < 0.05$, 150 nm Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplarda ise $p < 0.01$ değerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma olduğu saptanmıştır ($n=6$).



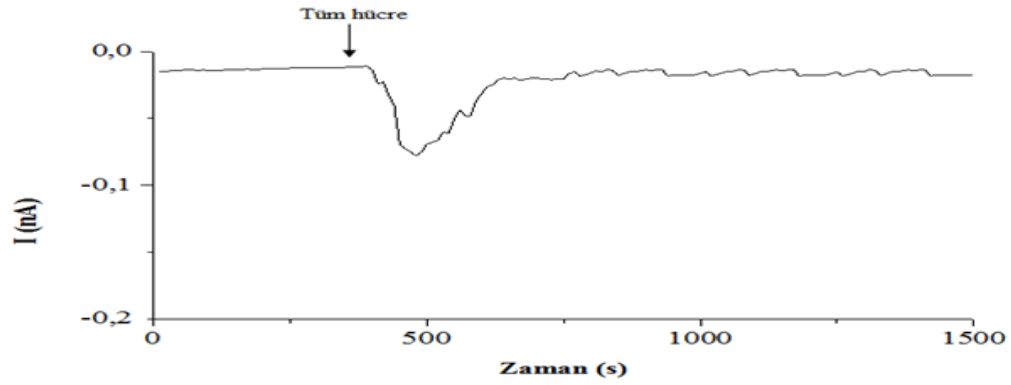
Şekil 4.49: 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



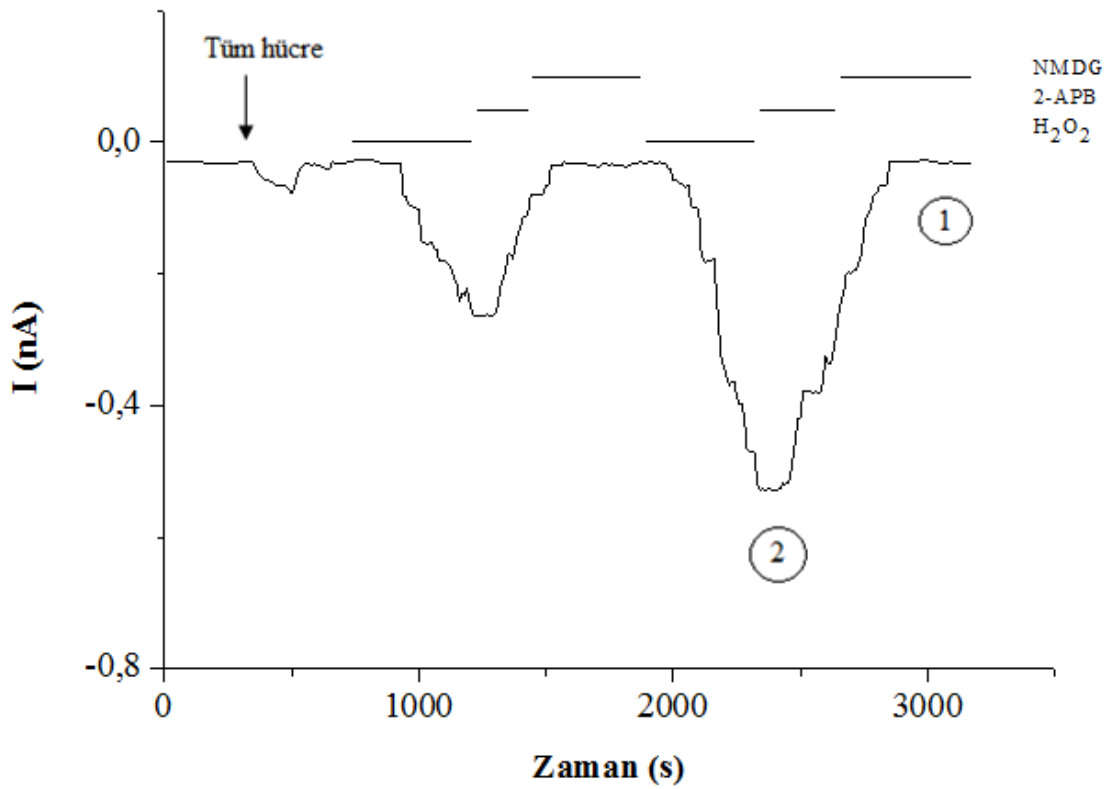
Şekil 4.50: 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



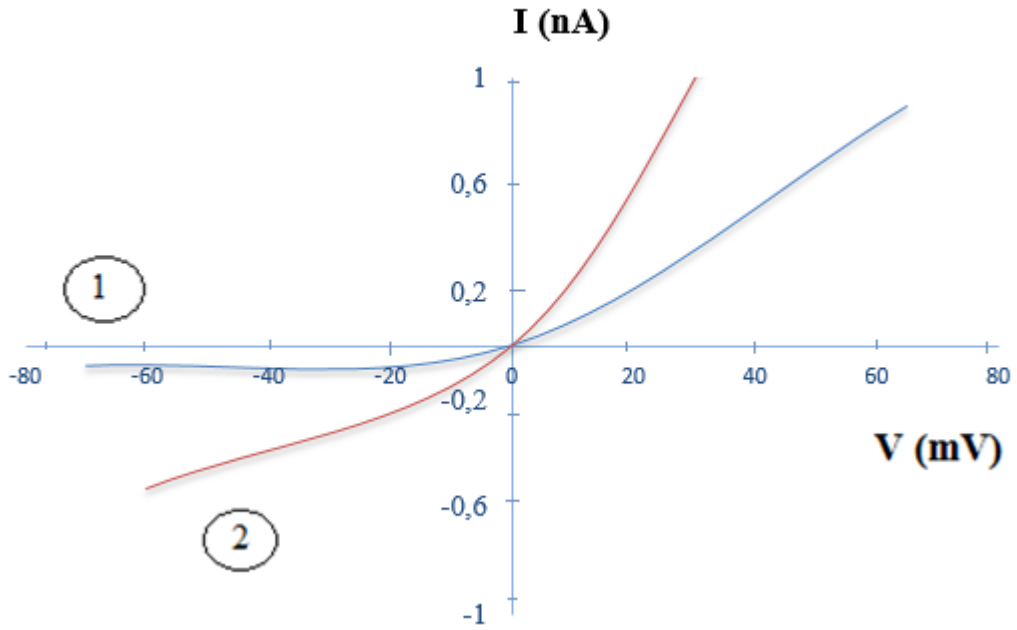
Şekil 4.51: 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.



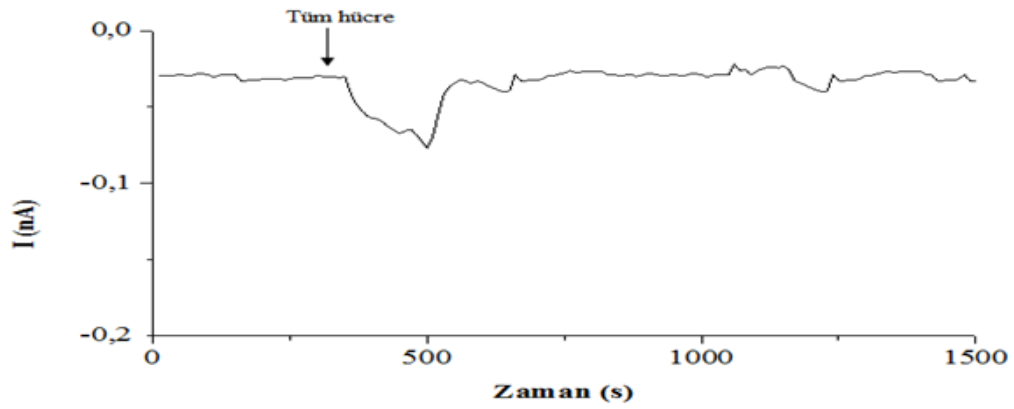
Şekil 4.52: 100 μ M Zn ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



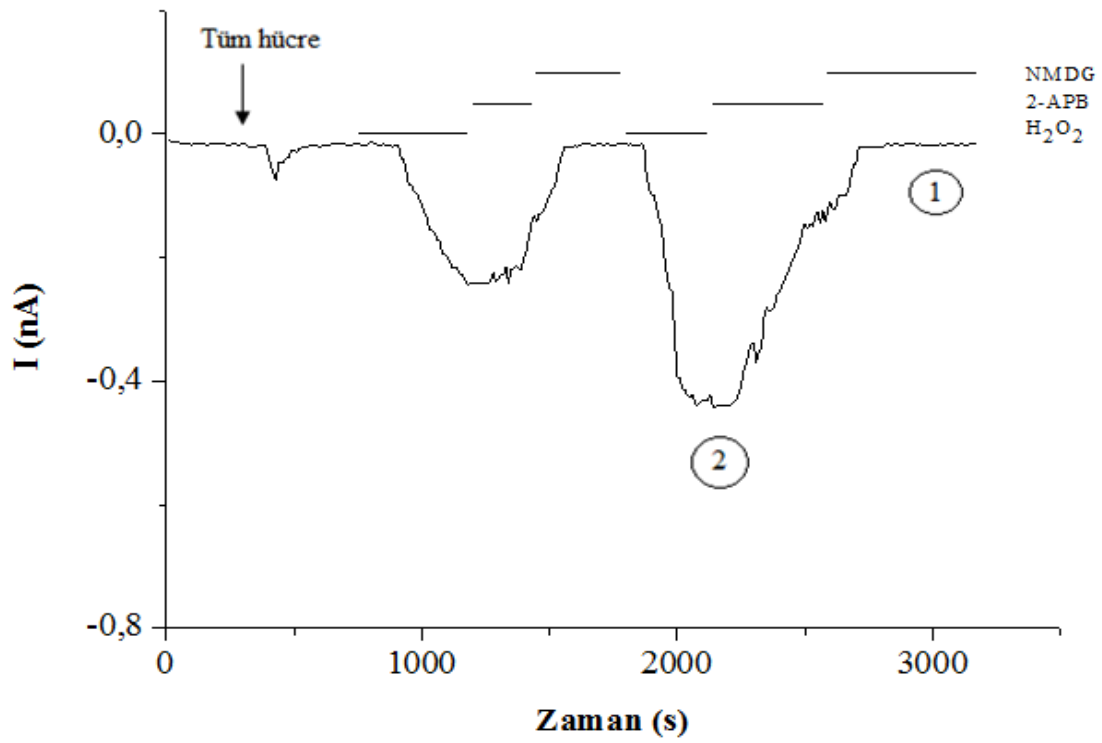
Şekil 4.53: 100 μ M Zn ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



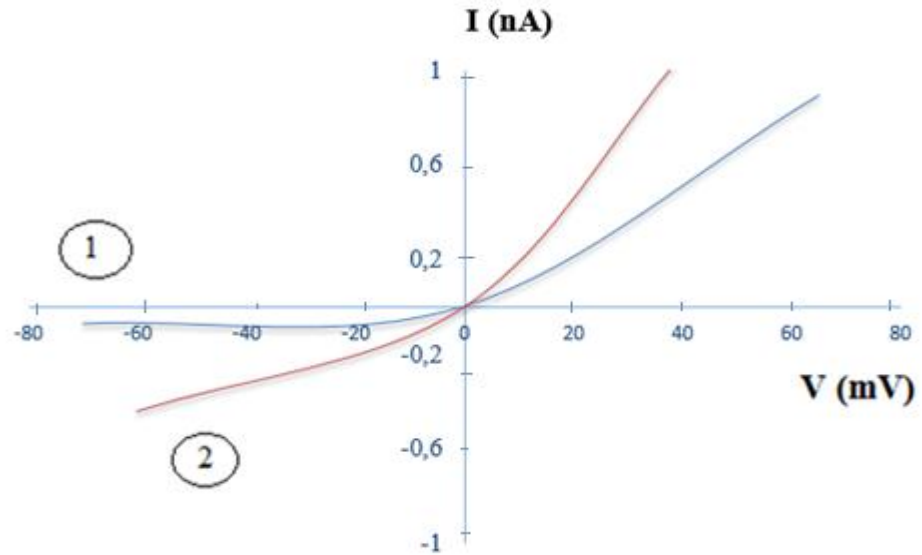
Şekil 4.54: 100 μ M Zn ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.



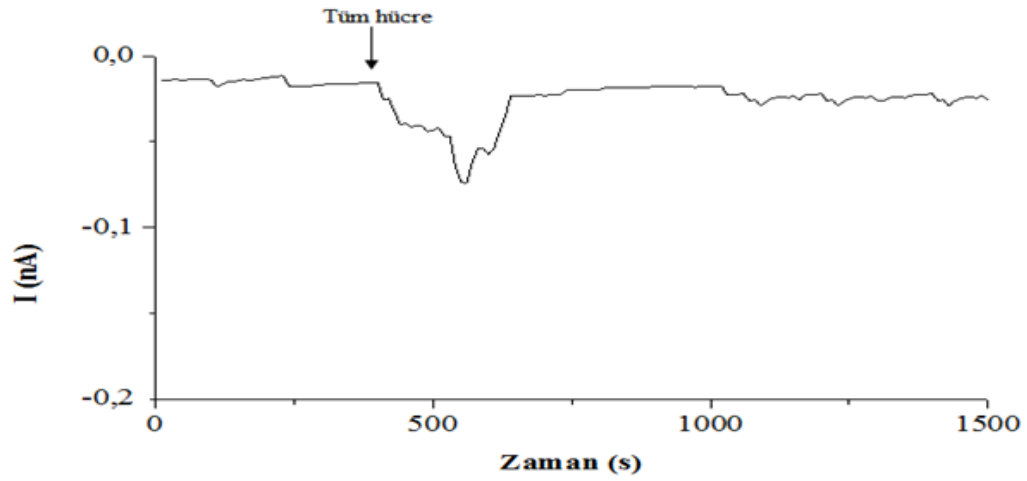
Şekil 4.55: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



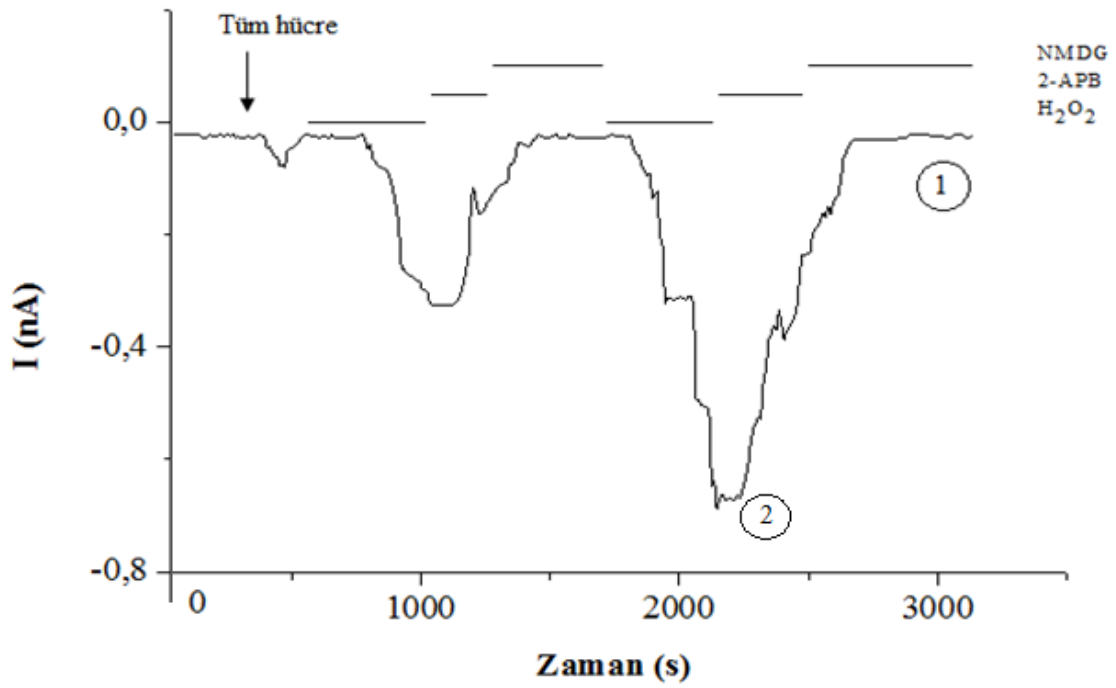
Şekil 4.56: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



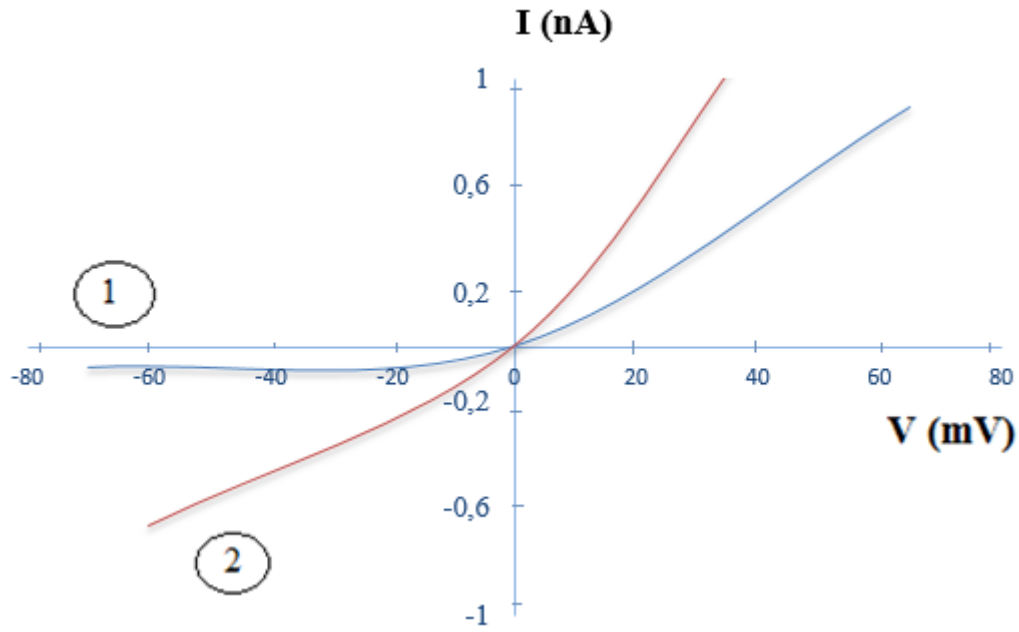
Şekil 4.57: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydına ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.



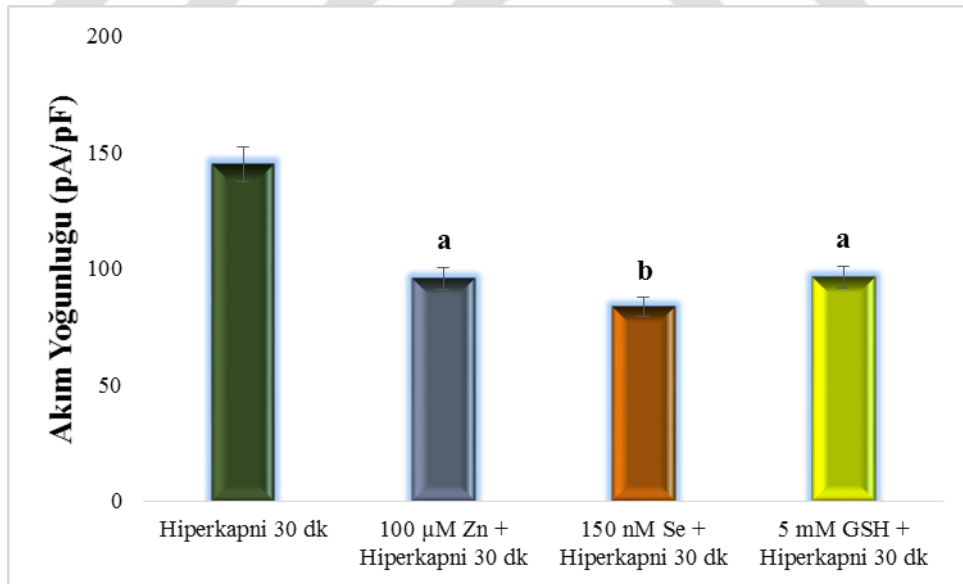
Şekil 4.58: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



Şekil 4.59: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



Şekil 4.60: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.

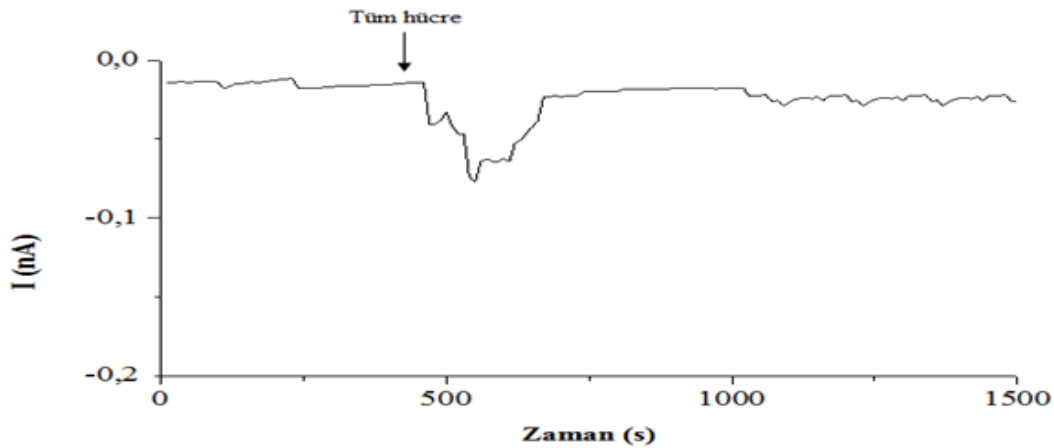


Şekil 4.61: 100 µM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan grupların, hiperkapni grubuna göre ortalama akım yoğunluğu değişimleri ($M \pm SD$).

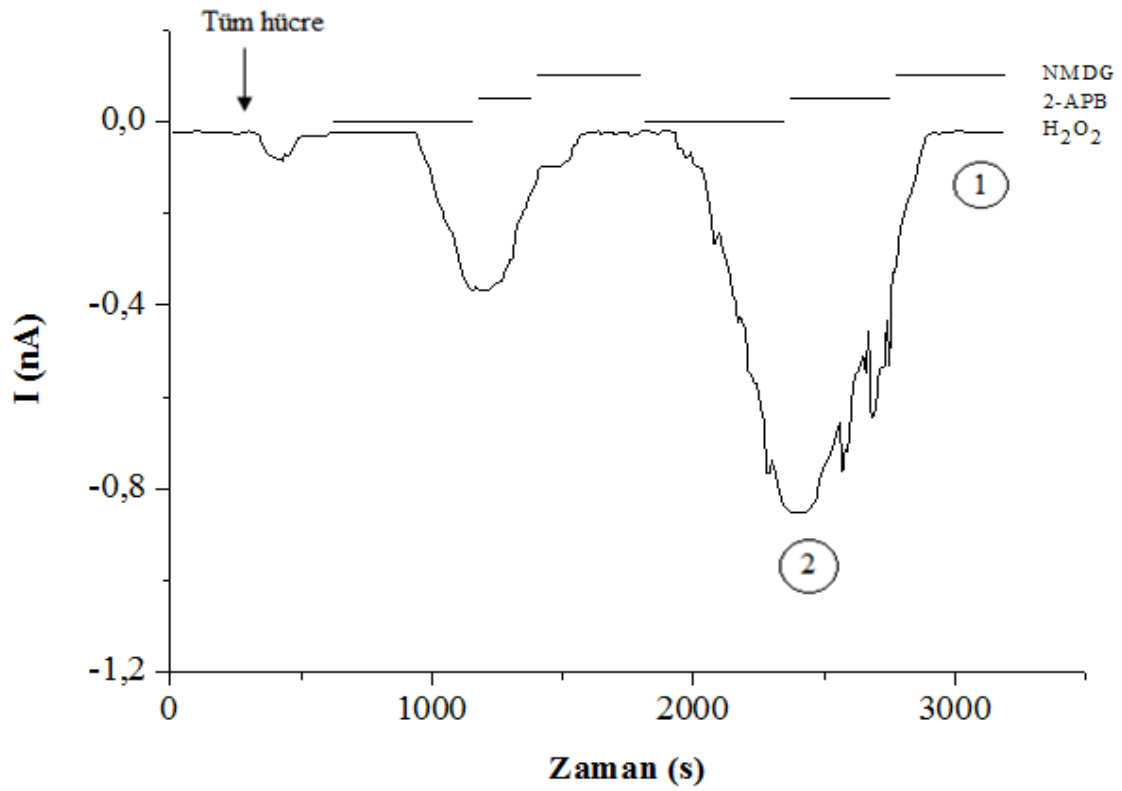
ortalama $\pm$ standart sapma ($M \pm SD$)

^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$; hiperkapni grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.

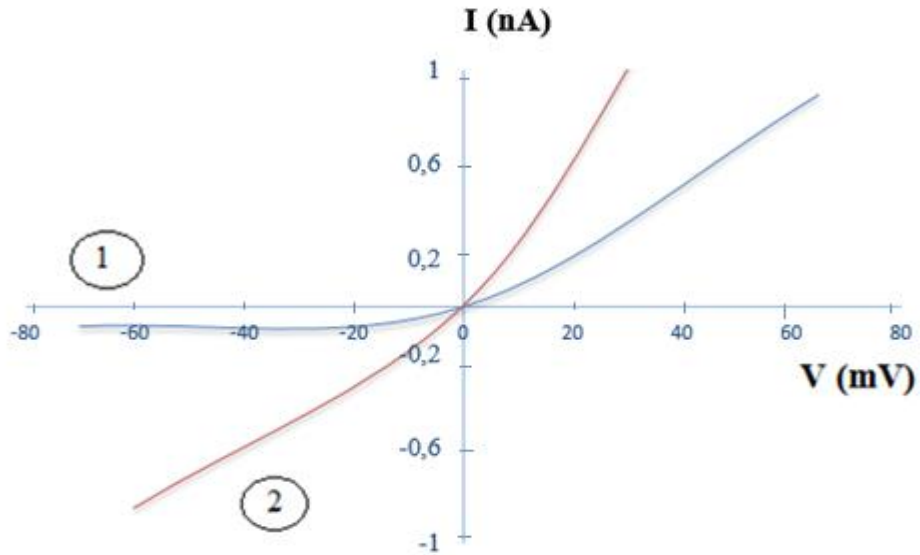
Sadece 60 dk hiperkapni, 100 μ M Zn + 60 dk hiperkapni, 150 nM Se + 60 dk hiperkapni ve 5 mM GSH + 60 dk hiperkapni gruplarında, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarında akım değişikliği gözlemlenmedi (Şekil 4.(62, 65, 68, 71)). Aynı deney gruplarında H_2O_2 ile uyarım sonucunda negatif yönde akımın arttığı gözlemlendi. TRPM2 kanalının H_2O_2 uygulaması sonucunda açıldığı gözlemlendikten ve akım platoya ulaştıktan sonra sırası ile 2-APB ve NMDG⁺'li ekstrasellüler ortam solüsyonları, tekrar sırası ile H_2O_2 , 2-APB ve NMDG⁺'li ekstrasellüler ortam solüsyonları hücrelerin bulunduğu ortama uygulandı. TRPM2 iyon kanalından geçen negatif akım değerinin maksimuma ulaştığı andaki akım değeri kaydedildi ve kanalın tekrar kapanması beklendi. Deney gruplarında TRPM2 kanallarında sırası ile -0,85 nA, -0,67 nA, -0,51 nA ve -0,65 nA değerlerinde akımların oluştuğu akım (nA) - zaman (s) grafiklerinde gösterildi (Şekil 4.(63, 66, 69, 73)). Elde edilen verilere ait akım (nA) - voltaj (mV) ve ortalama akım yoğunluğu (pA/pF) grafikleri çizildi (Şekil 4.(64, 67, 70, 73, 74)). Deney gruplarının ortalama akım yoğunlukları sadece 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan grup ile karşılaştırıldığında, 100 μ M Zn ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplarda $p < 0.05$, 150 nm Se ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan grupta ise $p < 0.01$ seviyesinde istatistiksel bakımdan anlamlı derecede azalma olduğu tespit edilmiştir (n=6).



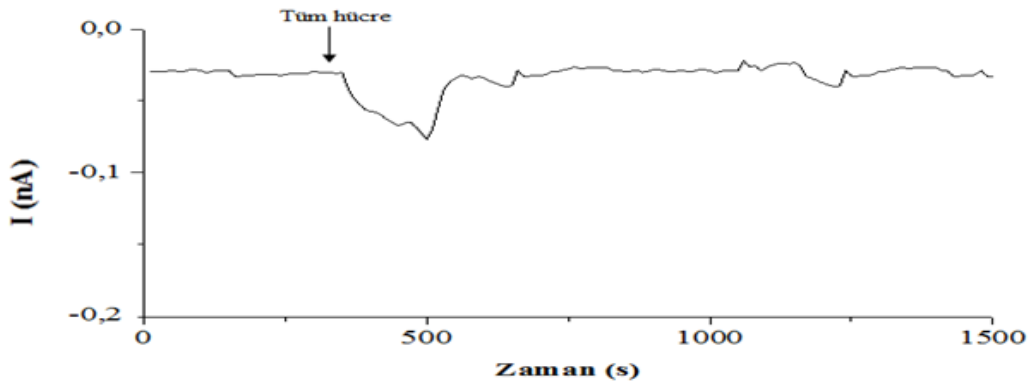
Şekil 4.62: 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



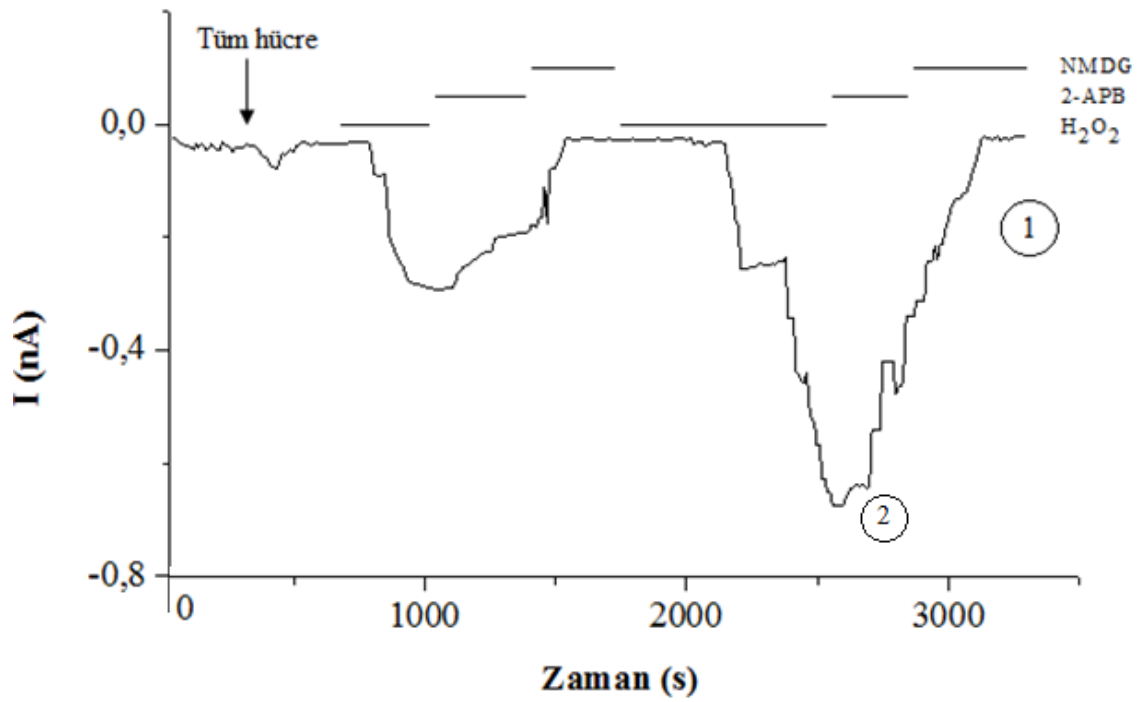
Şekil 4.63: 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



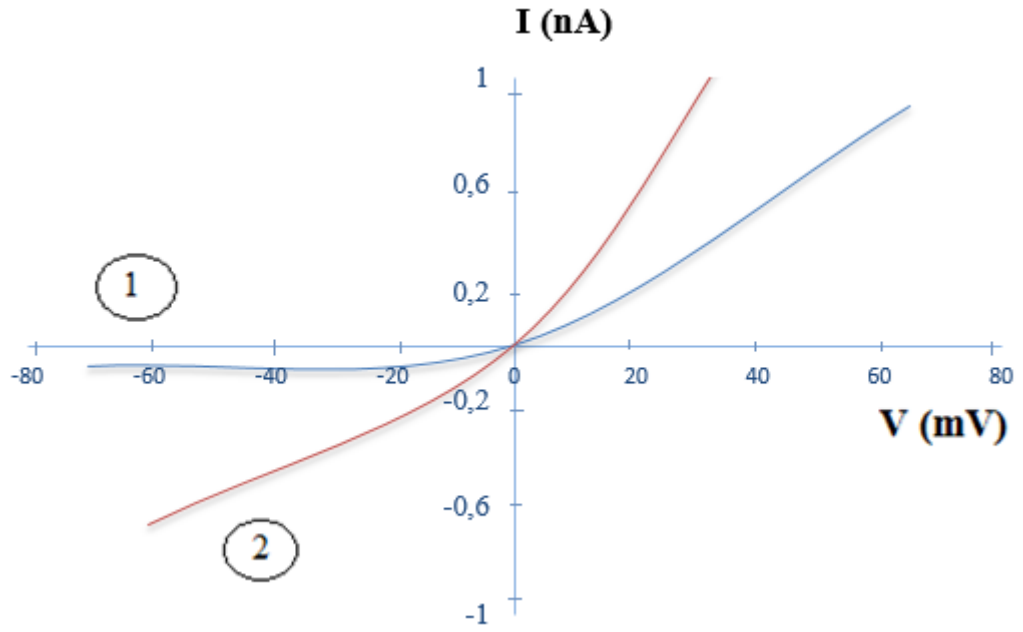
Şekil 4.64: 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.



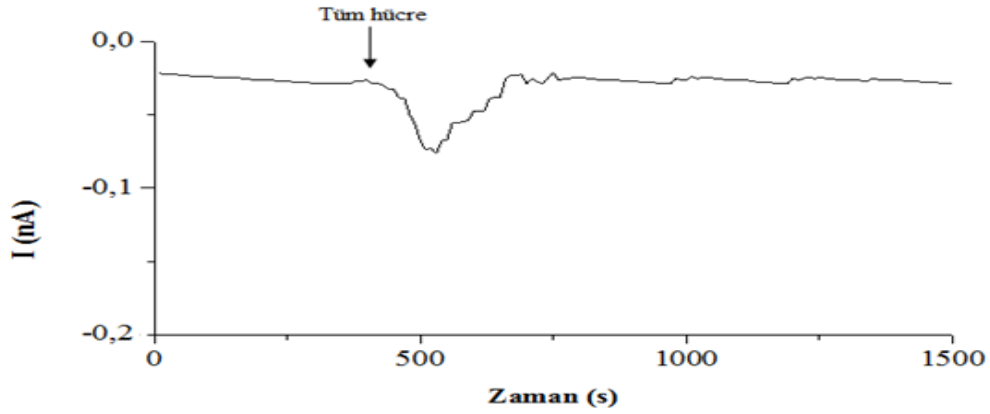
Şekil 4.65: 100 μ M Zn ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



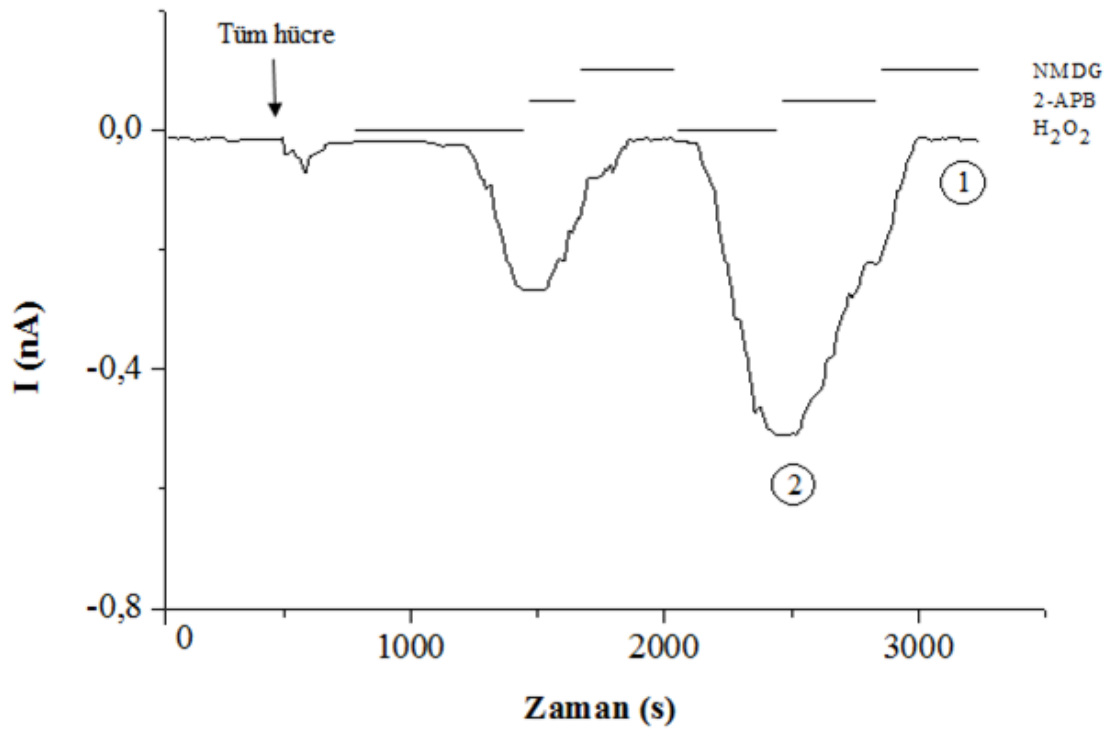
Şekil 4.66: 100 μ M Zn ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



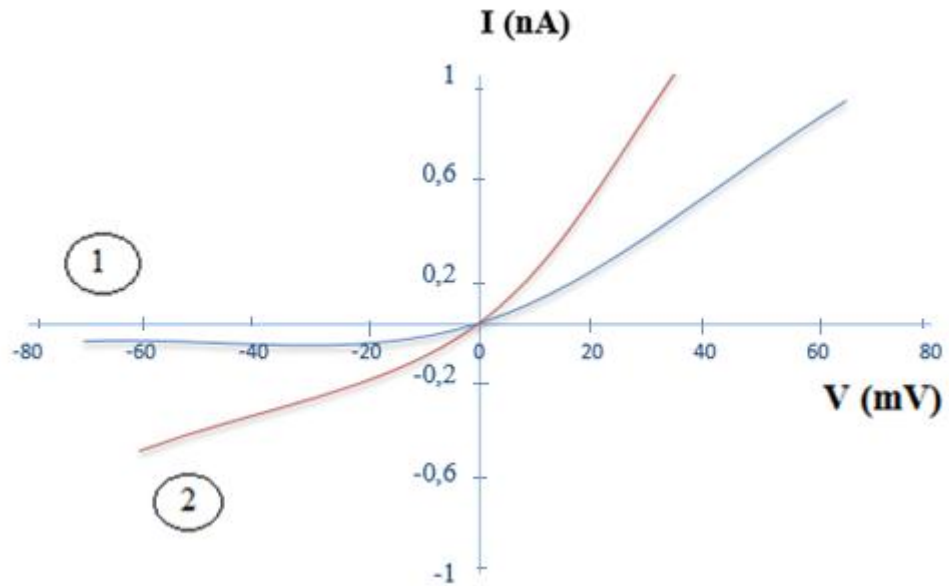
Şekil 4.67: 100 μ M Zn ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.



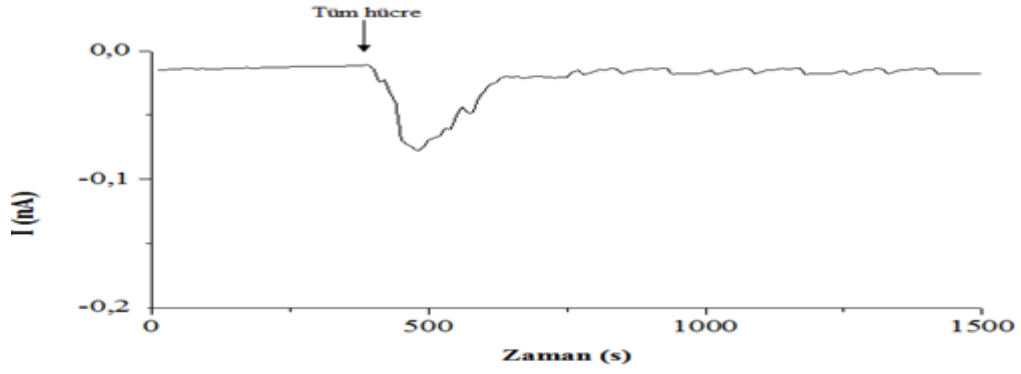
Şekil 4.68: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



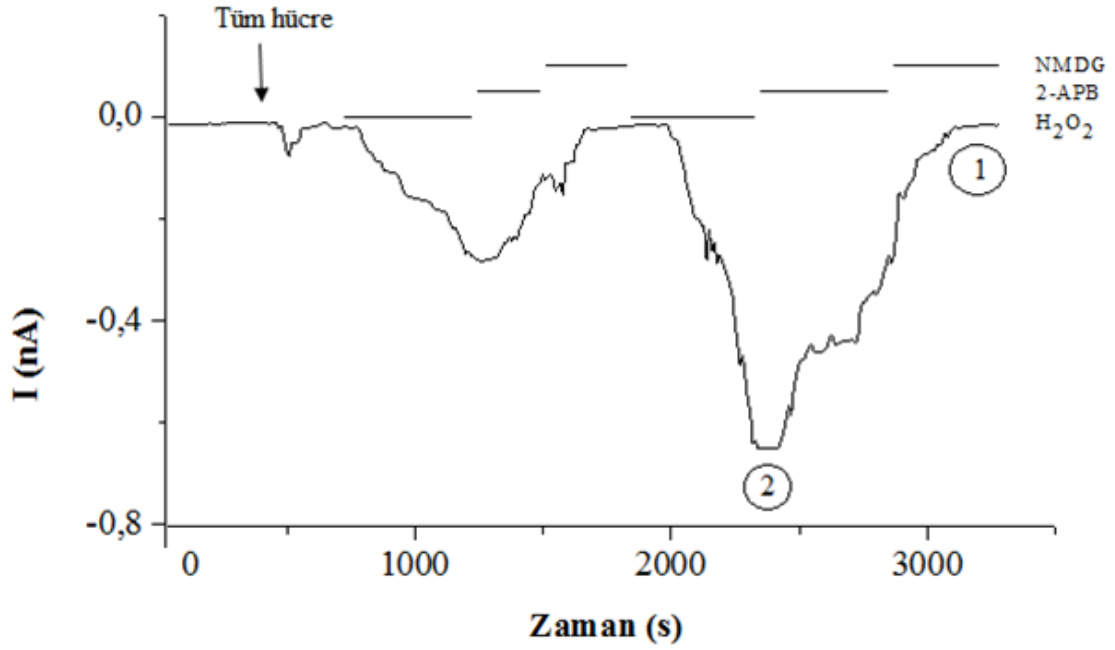
Şekil 4.69: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



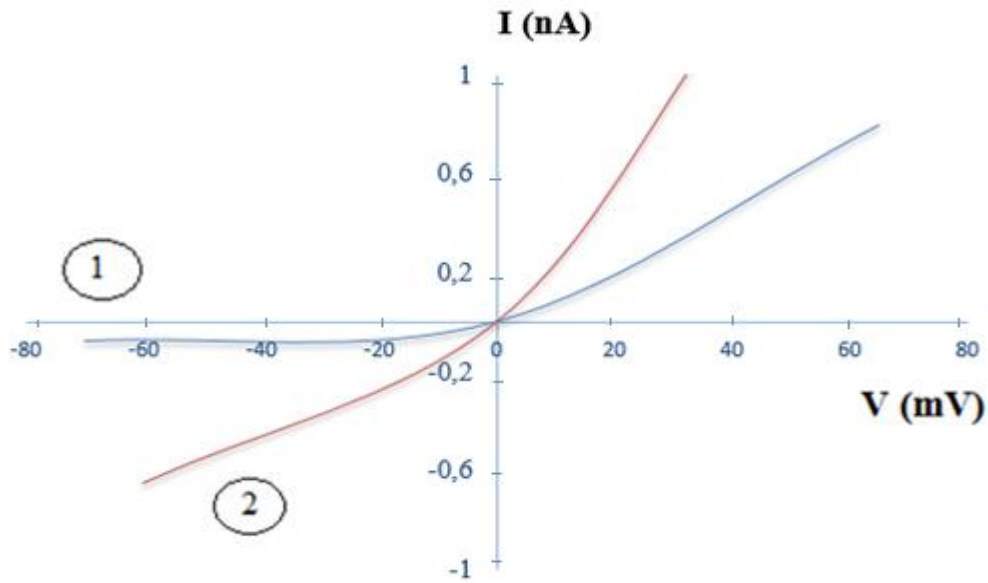
Şekil 4.70: 150 nM Se ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.



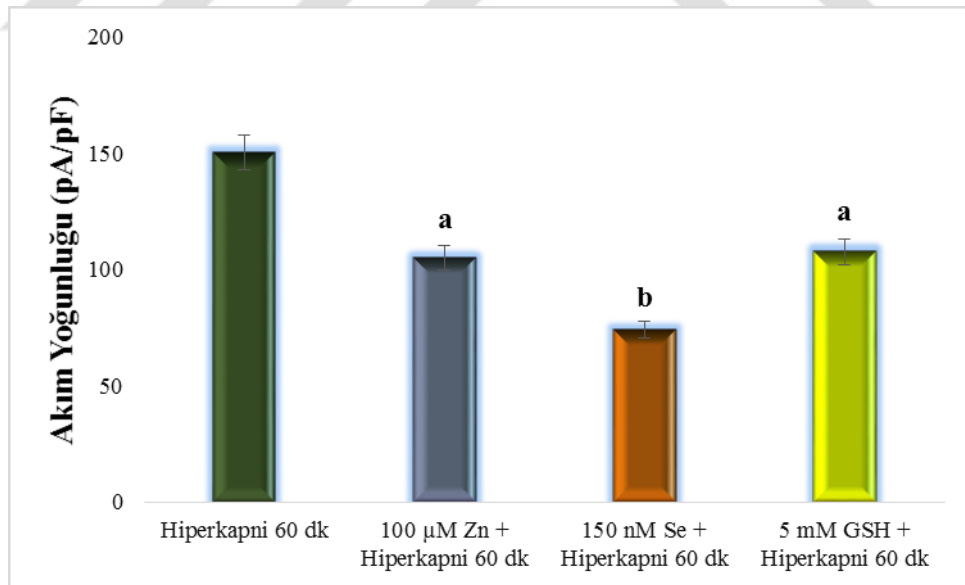
Şekil 4.71: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarılmadan önce TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



Şekil 4.72: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kaydı.



Şekil 4.73: 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinin, H_2O_2 ile uyarım sonucu TRPM2 kanallarından THK yöntemiyle alınan kayda ait akım (nA) - voltaj (mV) ilişkisi.



Şekil 4.74: 100 µM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan grupların, hiperkapni grubuna göre ortalama akım yoğunluğu değişimleri ($M \pm SD$).

ortalama $\pm$ standart sapma ($M \pm SD$)

^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$; hiperkapni grubu ile istatistiksel karşılaştırılmaları.

5. TARTIŞMA

TRP-Melastatin alt ailesinden TRPM2 kanalı, iki değerlikli Ca^{++} ve Mg^{++} iyonları ile tek değerlikli Na^+ ve K^+ iyonlarına geçirgen, seçici olmayan bir katyon kanalıdır (191-194). TRPM2 kanallarının aktivasyonu üzerinde Ca^{++} , H_2O_2 , cADPR, ROS, NAADP, araşidonik asit, amiloid β -peptid, konkanavalin-A, sıcaklık ve TNF- α 'nın etkili olduğu belirtilmektedir. Ayrıca ekanazol, MFA, NFA, ACA ve çinkonun TRPM2 kanalının blokleri olarak davrandığı belirtilmektedir (195-197). İntrasellüler ortama Ca^{++} iyonunun girişini sağlayan TRPM2 kanallarının aktivasyon ve inhibisyon mekanizmalarının araştırılması, hücre içi Ca^{++} iyonunun artışına bağlı olarak ortaya çıkan pek çok hastalığın oluşum mekanizmasının bilinmesi açısından önem taşımaktadır (198-200).

TRPM2 kanallarında hipoksi ve hiperkapninin etki mekanizmaları üzerine çeşitli çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, transfekste HEK293 hücrelerinin TRPM2 kanallarında hipoksi - hiperkapni - oksidatif stres ilişkisi ve Ca^{++} iyon akımı üzerinde etkileri ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Tez çalışmamızda hipoksi ve hiperkapninin TRPM2 kanalları ve Ca^{++} iyon akımı üzerine etkilerini ve bu etkiler üzerinde hipoksi ve hiperkapninin uygulama süresinin sonuçlarını araştırmayı planladık. Bu amaçla, HEK293 hücrelerinde 30 dk ve 60 dk hipoksi ve hiperkapni deney grupları oluşturuldu.

Çalışmamızda HEK293 hücrelerinde 30 dk ve 60 dk hipoksik gaz uygulanan gruplarda MDA değerlerinin, 30 dk ve 60 dk normoksik gaz uygulanan grupların aynı değerleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel bakımdan ileri derecede anlamlı artış gösterdiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde HEK293 hücrelerinde 30 dk ve 60 dk hipoksik gaz uygulanan gruplardaki LDH değerlerinin, 30 dk ve 60 dk normoksik gaz uygulanan gruplardaki LDH değerlerine göre de artışının istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olduğu saptanmıştır.

Canlıların varlığını sürdürmesi için besin maddeleri ve su ile beraber vücutta depolanamayan oksijenin sürekli dış ortamdan alınarak doku ve organlara taşınması gerekir. Oksijen, hücresel fonksiyonlar için gerekli enerji kaynağı olan ATP'ın üretildiği aerobik glikoz sisteminin son elektron alıcısıdır. Hipoksiye maruz kalınmasında en çok etkilenen ATP molekülüdür (201-205). Protein sentezi, hücre

membranının bütünlüğünün korunması, geçirgenliğinin düzenlenmesi ve Na^+ , K^+ ve Ca^{++} iyonlarının homeostazısının sürdürülmesi için hayati önem taşıyan ATP molekülü üretiminin hipoksik durumda azalması ile hücrelerde geri dönüşümsüz süreçler başlamış olur (203, 205-207).

Hipoksi, hücrelerde reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırmakta, oksidatif mekanizmaların aktifleşmesi ile birlikte serbest radikaller, radikal olmayan moleküller ile tepkimeye girerek zincirleme reaksiyonlara neden olabilmektedir (202, 204). Hipoksi sonucu ATP miktarının azalması, iyon dengelerinin bozulması, asidoz oluşması, hücre membranının akışkanlığının bozulması ve geçirgenliğinin artması, proteaz ve fosfolipazların aktivasyonu gibi durumlara yol açmaktadır. Hipoksi sonucu fosfolipidlerin yıkımının artması ile hücre membranının Ca^{++} iyonlarına geçirgenliği artar ve hücre içinde Ca^{++} iyonları birikir. Hipoksinin indüklediği bu değişimlerden sorumlu en önemli faktörlerden birisi oksidatif stresin artışıdır (172, 201, 204, 205).

Yajima ve ark (34), fare embriyonik fibroblast (MEFs) hücrelerinde hipoksik koşullarda lipid peroksidasyonun arttığını ve hücre membran hasarının oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Düzenli fiziksel egzersizlerin oksidatif strese karşı koruyucu etkisini araştıran bir diğer çalışmada ise, aralıklı hipoksiye maruz kalan bireylerde lipid peroksidasyon belirteçlerinden lipid hidroperoksidaz ve plazma MDA konsantrasyonunun artış gösterdiğini tespit etmişlerdir (33).

Peterson ve ark (208), Sprague-Dawley sıçan femurundan izole edilen mezenkimal stroma hücrelerinde hipoksik koşullarda, oksidatif stres enzimi olan NADPH ekspresyonunun ve reaktif oksijen türlerinin arttığını, bunun sonucunda LDH aktivitesinin artışı ile hücre canlılığının azaldığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda hipoksiye maruz kalan HEK293 hücrelerinde serbest oksijen radikallerinin artışına paralel olarak MDA ve hücre membran hasarını gösteren LDH değerlerinin arttığı bulunmuştur. Hipoksi sonrası, organizmadaki oksidan/antioksidan denge bozulduğu zaman protein, lipid, karbonhidrat ve nükleik asitler gibi biyomoleküllerin hasar görmesi sonucu apoptoza neden olan öncül apoptotik proteinlerin salınımı artar. Bunun sonucunda, hücre membranının bütünlüğü ve seçici geçirgenliği bozulur, hücre hasar tetiklenmiş olur (172, 204, 205).

Araştırmamızda elde ettiğimiz bulgular, hipoksinin oksidatif etkisini ortaya koyan literatür bilgileri ile paralellik göstermektedir. Bununla birlikte daha önemlisi hipoksik gaz uygulama süresinin, MDA ve LDH değerlerinin artışında etkili olduğu; 60 dk hipoksi uygulanan grupta oksidatif stresin ve hücre membran hasarının 30 dk hipoksi uygulanan grubun aynı değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gösterdiği bulunmuştur.

Organizmada biyolojik süreçlerde etkili olan hücresel enzimler ve kimyasal reaksiyonlar pH değişimine duyarlıdır ve hücreler intrasellüler pH'ın fizyolojik sınırlarda kalması için hücre membranından H^+ ve HCO_3^- transportunu sağlar. Eğer parsiyel karbondioksit basıncı ekstrasellüler ortamda artmış ise CO_2 , hücre membranından pasif diffüzyonla geçerek hücre içerisinde karbonik anhidraz enzimi tarafından H_2CO_3 'e, H_2CO_3 de H^+ ve HCO_3^- iyonlarına ayrışır. Bu alanda daha önce yapılmış araştırmalarda, hücrelerin farklı mekanizmalar aracılığı ile CO_2 'e duyarlılık gösterdiği ve hiperkapnik durumda CO_2 konsantrasyonunda ortaya çıkan değişikliklerin, bu yolla hücresel fonksiyonları olumsuz etkilediği ileri sürülmüştür (209-211).

CO_2 hücre içinde H^+ ve HCO_3^- 'e ayrıştıktan sonra, HCO_3^- konsantrasyonunun artışına paralel olarak çözülebilir formdaki adenil siklazın (AC) etkisiyle anahtar sinyal molekül ikinci haberci 3'-5' cAMP üretimi artar. Kalsiyum kanalı aktive olur ve bu kanaldan hücre içine Ca^{++} girişi artar. Bunun sonucunda, aksiyon potansiyeli depolarizasyon frekansı azalır ve hücresel ölüme sebep olabilir. Ayrıca hiperkapni, H^+ duyarlı K^+ akımını inhibe ederek hücre membranının depolarizasyonu aracılığı ile aksiyon potansiyeli depolarizasyon frekansının artışına neden olabilir (208-212).

Çalışmamızda HEK293 hücrelerinde 30 dk ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplardaki MDA ve LDH değerlerinin, 30 dk ve 60 dk normoksik gaz uygulanan grupların aynı değerlerine göre ileri derecede anlamlı artış gösterdiği sonucu elde edilmiştir.

Organizmada pH değişimleri ve CO_2 konsantrasyonunun ilişkili olduğu, CO_2 konsantrasyonunun artışı olarak bilinen hiperkapninin hücre membranından geçen Ca^{++} iyonlarının akışını bozduğu ve hücreyi apoptoza götürdüğü ifade edilmektedir (82, 184, 213, 214).

Görüldüğü gibi daha önce yapılmış araştırmaların oksidatif stres etkileri ile ilgili sonuçları bulgularımızı destekler niteliktedir. Ayrıca bulgularımıza göre HEK293

hücrelerinde 60 dk hiperkapni uygulanan gruptaki MDA ve LDH değerlerinin, 30 dk hiperkapni uygulanan gruptaki aynı değerlere göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği tespit edilmiştir. HEK293 hücrelerinde MDA ve LDH değerleri üzerine hiperkapninin uygulama süresinin de etkili olduğu, hiperkapni uygulama süresine bağlı olarak oksidatif stres ve hücre membran hasarının arttığı sonucuna varılmıştır.

Serbest radikallerin, reaktif oksijen türlerinin oluşumundaki artış ya da yok edilmesindeki azalma organizmada oksidatif dengenin bozulmasına sebep olur ve oksidatif stres oluşur. Metabolik süreçlerin bir sonucu olarak hücreler sürekli olarak serbest radikal ve ROS üretirler. Normal değerlerinden yüksek miktarda bulunan reaktif oksijen türleri lipidler, proteinler, karbohidratlar ve DNA gibi biyomoleküller ile reaksiyona girerek mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna ve hücre membran hasarına yol açar (215, 216). Reaktif oksijen türlerinden en sık görülen lipid radikali, lipid peroksidasyonuna neden olarak hücre membran proteinleri, reseptörleri ve bu reseptörlere bağlanan pek çok olayda katalitik etki gösteren enzimler inaktive olur ve böylece hücre membranının geçirgenliğini değiştirir (216-219). Lipid peroksidasyonun en iyi belirteçlerinden MDA nükleik asitler, proteinlerin amino grupları ve fosfolipitlere bağlanarak toksik etki gösterir. MDA, hücre membranındaki proteinlerin molekülleri ve moleküllerarası çapraz bağlanmasına yol açarak, hücre membranının iyon geçirgenliği, akışkanlığı ve enzimatik aktivitesi gibi biyofiziksel özelliklerinin değişimine neden olur. Ayrıca hücre membranından kolaylıkla geçebilen MDA molekülü, DNA'nın nitrojen formundaki bazıları ile reaksiyona girerek genotoksik ve karsinogenik etkiler gösterebilir. Hücre membranı hasara uğradığında, ortama LDH enzimi salınır ve LDH ölçümü lipid peroksidasyonunun seviyesinin belirlenmesini sağlar (220-223).

Organizmada SOD, CAT, GSH, GSH-Px, GSH-Rx, vitamin A, E ve C, flavonoidler, Zn, Cu ve Se gibi eser elementler enzimatik ya da enzimatik olmayan yollardan antioksidan etki göstererek serbest radikaller ile reaksiyona girer ve serbest radikallerin başlattığı zincir reaksiyonlarını durdururlar; böylece hücresel yapıların zarar görmesini engellerler (224, 225).

Çinko, antioksidan savunma sisteminde etkili olan enzimlerin aktif bölgelerine bağlanarak enzimlerin aktivasyonunu sağlar. Ayrıca çinko, glutatyon ile direkt ya da glutatyon peroksidaz kofaktörü olarak indirekt yoldan serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltır (40, 226, 227). Glutatyon peroksidaz enziminin aktivasyonu için

önemli bir antioksidan olan selenyum, hücre membranına zarar veren lipid peroksidasyona karşı hücreyi korur. Organizmada tiyol grubu içeren GSH, enzimatik reaksiyonlar aracılığı ve serbest radikalleri yok etme özelliği ile hücre membranını lipid peroksidasyonuna karşı korur (228-230).

100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk ve 60 dk hipoksik gaz uygulanan grupların MDA ve LDH değerlerinin, sadece 30 dk ve 60 dk hipoksik gaz uygulanan gruplardaki MDA ve LDH değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdiği tespit edildi. Benzer şekilde 100 μ M Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplardaki MDA ve LDH değerlerinin de, sadece 30 dk ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplardaki aynı değerler ile karşılaştırıldığında, anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.

Araştırmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre antioksidanlarla inkübe edilen HEK293 hücrelerinde, hipoksi ve hiperkapninin hücreye verdiği oksidatif hasarlar nedeniyle artmış olan MDA ve LDH değerleri anlamlı olarak azalmıştır. Bu da uygulanan çinko, selenyum ve glutatyonun konsantrasyonlarının ve uygulama sürelerinin antioksidan etki göstermelerinde etkili olduklarını ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda HEK293 hücrelerinde hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan deney gruplarında, TRPM2 kanallarından geçen akımlar üzerine hipoksi ve hiperkapninin etkileri değerlendirilirken; akımın zamana göre değişimi ve akımın voltaj ile ilişkisini gösteren akım (nA) - zaman (s) ve akım (nA) - voltaj (mV) grafikleri çizildi ve gruplar arasında ortalama akım yoğunluğu değişimleri (pA/pF) analiz edildi. 30 dk normoksik, 30 dk hipoksik ve 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293 hücrelerinde, H_2O_2 ile uyarım olmadan akım değişimi olmazken, H_2O_2 ile uyarım sonucunda TRPM2 kanallarında negatif yönde akımın arttığı gözlemlendi. Akım plato değerine ulaştıktan sonra, sırası ile 2-APB ve NMDG⁺’li ekstrasellüler ortam solüsyonları hücrelerin bulunduğu ortama gönderildikten sonra kayıt sonlandırıldı. Deney gruplarında THK yöntemi ile elde edilen verilerden ortalama akım yoğunluğu değerleri hesaplandı.

H_2O_2 uyarım sonucunda 30 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan grupların ortalama akım yoğunlukları, 30 dk normoksik gaz uygulanan grubun aynı değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artış olduğu tespit edildi. Ayrıca 60 dk normoksik, 60 dk hipoksik ve 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan HEK293

hücrelerinde, H_2O_2 ile uyarım olmadan akım değişimi gözlemlenmezken H_2O_2 ile uyarım sonucunda TRPM2 iyon kanallarında negatif yönde akımın arttığı saptandı. 60 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan grupların ortalama akım yoğunluklarının artışının, 60 dk normoksik gaz uygulanan grubun aynı değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Bulgularımıza göre H_2O_2 ile uyarım sonucunda hücre içine doğru kalsiyum akım değerinin ve hücre içerisinde kalsiyum miktarının arttığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızda hipoksi ve hiperkapninin oluşturduğu oksidatif stres, hücre membran hasarı ve TRPM2 kanal akımları üzerine Zn, Se ve GSH'un etkilerini araştırmak amacı ile HEK293 hücrelerinden oluşturulan deney grupları 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildi ve farklı sürelerde hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanarak elektrobiyofiziksel ölçümler yapıldı.

30 dk hipoksik gaz uygulanan grup ile 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan gruplarda, H_2O_2 ile uyarım olmadan akım değişimi gözlemlenmezken, H_2O_2 ile uyarım sonucunda negatif yönde akımın arttığı gözlemlendi. TRPM2 kanalının H_2O_2 uygulaması sonucunda açıldığı tespit edildikten ve akım platoya ulaştıktan sonra sırası ile 2-APB, $NMDG^{+}$ 'li ekstrasellüler ortam solüsyonu, tekrar H_2O_2 , 2-APB ve $NMDG^{+}$ 'li ekstrasellüler ortam solüsyonu hücrelerin bulunduğu ortama uygulandı. TRPM2 iyon kanalından geçen negatif akım değerinin maksimuma ulaştığı andaki akım değeri kaydedildi ve kanalın tekrar kapanması beklendi. Aynı deney prosedürleri 60 dk hipoksik gaz uygulanan gruplarda da tekrarlandı. Deney gruplarının akım - zaman ve akım - voltaj grafikleri çizildi. Elde edilen verilerden ortalama akım yoğunlukları hesaplandı.

Araştırmamızda 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hipoksik gaz uygulanan gruplardaki ortalama akım yoğunlukları, sadece 30 dk hipoksik gaz uygulanan grubun aynı değerleriyle karşılaştırıldığında anlamlı derecede azalmanın olduğu gözlemlendi. Bu azalmanın 60 dk hipoksik gaz uygulanan gruplarda ise ileri derecede anlamlı olduğu saptandı.

Çalışmamızda sadece 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan, 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplarda da H_2O_2 ile uyarım olmadan akım değişimi gözlemlenmezken, H_2O_2 ile uyarım sonucunda kanalın açıldığı ve negatif yönde akımın arttığı tespit edildi. HEK293

hücrelerinin bulunduğu ortama H_2O_2 uygulaması sonucunda TRPM2 kanalının açıldığı gözlemlendikten kısa bir süre sonra, akım platoya ulaştı. H_2O_2 uygulamasına benzer olarak sırası ile 2-APB ve $NMDG^{++}$ li ekstrasellüler ortam solüsyonu, tekrar sırası ile H_2O_2 , 2-APB ve $NMDG^{++}$ li ekstrasellüler ortam solüsyonu uygulandı. TRPM2 iyon kanalından geçen negatif akım değerinin maksimuma ulaştığı andaki akım değeri kaydedildi ve kanalın tekrar kapanması beklendi. Aynı deney prosedürleri 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplarda da tekrarlandı. Deney gruplarının akım - zaman ve akım - voltaj grafikleri çizildi. Elde edilen verilerden ortalama akım yoğunlukları hesaplandı ve grafikleri çizildi.

Sadece 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan grup ile, 100 μM Zn, 150 nM Se ve 5 mM GSH ile inkübe edildikten sonra 30 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplarda ortalama akım yoğunluğu değerlerinin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Akım yoğunluğu ile ilgili benzer sonuçlar, 60 dk hiperkapnik gaz uygulanan gruplar arasında da gözlenmiştir. Pek çok enzimin yapısına katılarak katalitik rol oynayan selenyum, reaktif oksijen türlerinin yol açtığı oksidatif hasara karşı lipidleri, DNA, RNA gibi biyomolekülleri ve hücre membranını korur (42, 228, 229). Çalışmamızda selenyum uygulanan gruplarda, selenyumun koruyucu etki oluşturduğu gözlemlenmiştir. Ancak selenyumun ortalama akım yoğunluğunun azalmasındaki etkisinin, diğerlerinden farklı olarak ileri derecede anlamlı olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda hipoksinin ve hiperkapninin HEK293 hücrelerinde oksidatif stresi arttırdığı MDA ve LDH değerlerinin artışı ile tespit edildi. Normoksi gruplarına göre 30 dk ve 60 dk hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan gruplarda TRPM2 kanalından geçen Ca^{++} iyonlarının artışı, akım - zaman ve akım - voltaj grafiklerinde değerlendirildi. Hipoksi ve hiperkapni gruplarında negatif yönde akımın arttığı ortalama akım yoğunluğu grafiklerinde gözlemlendi. Çalışmamızda farklı sürelerde hipoksiye ve hiperkapniye maruz kalan HEK293 hücrelerinde, TRPM2 kanal aktivitesinin artması sonucunda hücre içine giren Ca^{++} iyon akımını arttırdığı gözlemlendi. Hücre içine giren Ca^{++} miktarının artması hücre içi organellerden Ca^{++} salınımını tetikler ve hücrede oksidatif stresin artması, hücre membran hasarına neden olmaktadır (42, 106, 163). Hipoksi ve hiperkapninin indüklediği oksidatif stres sonucunda artan reaktif oksijen türleri ve hücre membran hasarını azaltmak amacı ile deney gruplarında antioksidan etkisi bilenen çinko, selenyum ve glutatyon ile inkübe edildikten sonra hücrelerde lipid

peroksidasyon ve Ca^{++} akımlarını değerlendirdik. Çinko, selenyum ve glutatyon ile inkübe edilen gruplarda MDA ve LDH değerlerinin ve TRPM2 kanallarından geçen negatif yönde akımın azaldığını tespit ettik. TRPM2 iyon kanalından geçen negatif yönde akımın azalması sonucunda hücre içine giren Ca^{++} iyonlarının deney gruplarında olduğu gibi artış göstermediğini, oksidatif stresin azaldığını ve bu antioksidanların hipoksi ve hiperkapninin hücre membranında oluşturabileceği hücre hasara karşı koruyucu etki oluşturduklarını gözlemledik. Ayrıca çinko ile inkübe edilen gruplarda, hipoksi ve hiperkapni gruplarına göre ortalama akım yoğunluklarının azalmış olduğunu saptadık. Ekstrasellüler çinko, allosterik modülasyon etkisi ile iyon kanal aktivitesini attırır ya da kanalı inhibe eder. TRPM2 kanalında S5 ve S6 ekstrasellüler bölgesinde iyon seçici filtrelerin olduğu ve bu bölgenin histidin, sistein, lizin, aspartat veya glutamat olmak üzere çinko ile etkileşen 20 farklı rezidü bölgesi içerdiği bilinmektedir. Çinko, TRPM2 zayıf kanal alanındaki por bölgesi ile etkileşerek kanalın inaktivasyonunu indükler (39, 83, 227). Ayrıca çinko, ekstrasellüler ortamdan intrasellüler ortama Ca^{++} taşınmasını sağlayan NMDA reseptörü için inhibitör olarak davranır. Çinko eksikliğinde NMDA reseptörü aktive olur ve intrasellüler Ca^{++} konsantrasyonu artar. İntrasellüler Ca^{++} konsantrasyonundaki artış, oksidatif strese neden olan serbest radikallerin salınımını artırır. Bunun yanı sıra çinko, bir prooksidan enzim olan ve metalloprotein sentezini indükleyen NADPH oksidaz reseptörünü inhibe eder. Bunun sonucunda çinko eksikliğinde, NADPH aktive olur ve reaktif oksijen türleri ve nitrojen türleri artış gösterir (147, 226, 227).

Yetişkin sıçan kardiyak fibroblastlarında eksprese edilen TRPM2 kanallarında yapılan çalışmada, hipoksik stresin hücre membranından geçen iyonik akımlar üzerinde etkili olduğu bildirilmektedir. Hipoksinin Ca^{++} kanalları üzerine etki ederek Ca^{++} iyon akışını etkilediği ve hipoksik grupta, normoksik gruba göre akım yoğunluğunun istatistiksel olarak artış gösterdiği saptanmıştır (87, 171, 176).

Sıçan kardiyak fibroblastlarında TRPM2 kanallarında yapılan çalışmada, hipoksiye maruz kalan hücrelerin ortalama akım yoğunluğunun, normoksiye maruz kalan hücrelerin aynı değerlerine göre, -70 mV'da anlamlı derecede artarken, 10-40 mV arasında anlamlı derecede azalma olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca hipoksiye maruz kalan hücrelerde -70 mV'da kenetleme yapıldığında hücre içine yönelmiş Ca^{++} akımının

normoksiye göre % 297 oranında artış gösterirken, 40 mV'da hücre dışına akım % 182 oranında artış gösterdiğini rapor etmişlerdir (171).

Hipoksiye maruz kalan sıçan primer kortikol nöronlarında voltaj bağımlı kalsiyum kanallarından geçen Ca^{++} akımının, normoksiye maruz bırakılan hücrelerin aynı değerleri ile karşılaştırıldığında artış gösterdiği, fakat sonrasında 48 saat normoksi uygulandığında tekrar Ca^{++} akımının azaldığı bildirilmiştir (176).

Summers ve ark (214), glomus hücrelerinde hiperkapninin hücre içine doğru olan Ca^{++} akımını arttırdığını rapor etmişlerdir.

Starkus ve ark (82), HEK293 hücrelerinde ekstrasellüler asidik pH'ın TRPM2 kanallarının inaktivasyonunda etkili olan ikinci inhibitör modülatörü olarak davrandığını rapor etmişlerdir. Kanaldan geçen akımın inhibisyonu için kanalın açık olması gerektiğini ve negatif potansiyellerde inhibisyonun voltaj bağımlı olarak daha hızlı gerçekleştiğini ifade etmişlerdir. Ayrıca artmış sitosolik pH tamponlama kapasitesi veya intrasellüler Ca^{++} konsantrasyonu, ekstrasellüler asidifikasyonun oluşturduğu kanal inaktivasyon hızını azalttığını bildirmişlerdir.

Yang ve ark (154), HEK293 hücrelerinde TRPM2 kanal akımları üzerine çinkonun inhibisyon etkisi olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, çinkonun etkisinde TRPM2 kanalının açık veya kapalı durumda olmasının önemli olduğunu; kanal açık durumdayken çinkonun inhibe edici özellik gösterirken, kanal kapalı durumda olduğunda ise çinkonun etkisinin geri dönüşümlü olduğunu göstermişlerdir.

Kim ve ark (231), primer kortikol nöronlarda $CoCl_2$ ile oluşturulan kimyasal hipoksi modelinde, hipoksinin sebep olduğu nöronal hücre ölümünü çinkonun daha çok arttırdığını, deferokzamin veya NaN_3 ile oluşturulan kimyasal hipoksi modellerinde ise çinkonun, hipoksinin sebep olduğu nöronal hücre ölümünü azaltarak antioksidan özellik gösterdiği saptamışlardır.

İnsülin salgılayan pankreatik β - hücreleri (INS1) ve HEK293 hücrelerinde H_2O_2 ile uyarılan TRPM2 kanallarında yapılan çalışmada, hücre ölüm oranının artış gösterdiği bildirilmiştir. Oksidatif strese yol açan H_2O_2 'in hücre içi kalsiyum ve çinko salınımını arttırdığını ve hücre içi çinko konsantrasyonu artışının hücre ölümü ile ilişkili olduğu belirtmiştir. Ayrıca, TRPM2 kanalının Ca^{++} iyonları dışında, çinko iyonuna da geçirgen olabileceği; intrasellüler ortamdan serbestleşen çinkonun,

ekstrasellüler Ca^{++} iyon girişini tetikleyerek, hücre ölümünün artışından sadece Ca^{++} miktarının artışının değil aynı zamanda hücre içi çinko konsantrasyonu artışının da esansiyel rol oynadığı rapor edilmiştir (153).

Sarada ve ark (205), hipoksiye maruz kalan nöroblastoma hücrelerinde hipoksinin sitotoksiteyi, serbest radikal üretimini ve apoptozu arttırdığı, GSH, GSH-Rx, GSH-Px ve SOD değerlerini azalttığını tespit etmişlerdir. Selenyum ile inkübe edildikten sonra hipoksi uygulanan hücrelerde kontrol grubunun aynı değerleri ile karşılaştırıldığında ise sitotoksite ve serbest radikal üretiminin azaldığını, GSH, GSH-Rx, GSH-Px ve SOD üretiminin arttığını göstermişlerdir.

Nazıroğlu ve ark (43), CHO hücrelerine ekstrasellüler selenyum uygulamasının, H_2O_2 ile indüklenen TRPM2 akımını tamamen bloke ettiğini, intrasellüler selenyum uygulamasının ise H_2O_2 ile indüklenen TRPM2 akımının inhibisyonunda 2-APB ve ACA kadar etkili olduğunu bulmuşlardır. TRPM2 akımının inhibisyonunda, intrasellüler selenyum uygulamasının ekstrasellüler selenyum uygulamasına göre daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda selenyum ile inkübe edilen HEK293 hücrelerinde, hipoksi ve hiperkapninin indüklediği oksidatif stresin azaldığı MDA ve LDH değerlerinin ölçümü ile gösterilmiştir. Ayrıca oksidatif stres ile indüklenen TRPM2 kanalları üzerinde selenyumun antioksidan etki gösterip kanalın aktivasyonunu ve kanaldan geçen Ca^{++} akımını azalttığı gösterilmiştir. Sadece hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan gruplara göre selenyum ile inkübe edildikten sonra hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan gruplarda ortalama akım yoğunluğunun azaldığını tespit ettik. Bu sonuçlar, hipoksi ve hiperkapninin etkisi ile artan oksidatif strese karşı selenyumun korucuyu etki oluşturduğunu ve hücrel hasarı önlediğini göstermektedir.

Özgül ve ark (232), CHO hücrelerinde 2 saat süre ile 10 mM ekstrasellüler ya da 2 mM intrasellüler GSH inkübasyonunun TRPM2 akımının inhibisyonu için yeterli olmadığını göstermişlerdir.

Hipoksiye maruz kalan sıçanlarda plazma ve doku MDA değerlerinin, kontrol grubunun aynı değerleri ile karşılaştırıldığında artış gösterdiğini; kan GSH, GSH-Px, plazma protein ve selenyum konsantrasyonunun azaldığını tespit edilmiştir. Selenyum ilave edildikten sonra hipoksi uygulanan gruplarda MDA değerlerinin kontrol grubunun

aynı değerlerine göre azaldığını, plazma ve doku GSH seviyesi ile kan ve doku GSH-Px seviyesi ve plazma protein konsantrasyonunun artış gösterdiği rapor edilmiştir (233).

Yılmaz ve ark (183) astrosit hücre kültüründe, kimyasal yolla oluşturulan asidozlu grupta LDH değerlerinin kontrol grubunun aynı değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artış gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca GSH ile inkübe edilen asidozlu grupta LDH değerlerinin, asidozlu grubun aynı değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma gösterdiğini bildirmişlerdir.

İnsan mikrogliya ve astrosit hücreleri ile THP-1 ve U373 hücrelerinde, GSH sentezini inhibisyonunun oksidatif stresi indüklediği ve TNF- α , IL-6 ve nitrit iyonlarının salınımının arttığı rapor edilmiştir. Hücreler GSH ile inkübe edildiğinde, TRPM2 kanallarından geçen Ca^{++} akımının inhibe olduğu ve GSH sentezinin azalmasının nöroinflamasyondan sorumlu olduğu belirtilmiştir (162).

Belrose ve ark (164), hipokampal piramidal nöronlarına GSH sentezinin öncüsü olan NAC tedavisi uygulandığı zaman, TRPM2 kanallarında ortalama akım yoğunluğunun azaldığını, GSH sentezi inhibe edildiği zaman ortalama akım yoğunluğunun arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, GSH'un TRPM2 kanalını inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Glutasyonun antioksidan etkisi üzerine yapılan çalışmalarda, glutasyonun enzimatik etki ile hücrelerde oluşan lipid peroksidasyonu azalttığı ifade edilmektedir (230).

Bizim çalışmamızda da glutasyon ile inkübe edilen gruplarda lipid peroksidasyon göstergesi olarak bilinen MDA ve hücre membran hasarını gösteren LDH değerlerinin, sadece hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanan grupların aynı değerlerine göre azaldığı gösterilmiştir.

Hipoksi ve hiperkapninin farklı sürelerde HEK293 hücrelerine uygulanması ile TRPM2 kanallarından hücre içine geçen Ca^{++} akımlarının değerlendirilmesi sonucunda, hipoksi ya da hiperkapni uygulama süresinin artmasına bağlı olarak hücre içine giren Ca^{++} akımının da artış gösterdiği bulundu. Hipoksi ve hiperkapninin uygulama süresinin artışı, hücrelerde Ca^{++} akışını arttırarak hücre içi organellerden daha fazla Ca^{++} salınımını tetikleyebilir ve oksidatif stresi arttırarak hücre membran geçirgenliğini bozar ve geri dönüşümsüz süreçlere neden olabilir.

Hipoksik ve hiperkapnik gaz uygulanmasının Ca^{++} kanal akımları üzerine etkilerini, hücre içi ortamların asidik yöne kaymasına bağlı olarak açıklayabiliriz. Hipoksida hücrenin ATP üretimi için gerekli olan oksijenin yetersizliği, ortamda laktik asidin birikmesine neden olacaktır. Bir metabolik asit olan laktik asitin etkisi, hücre ve hücre içi organellerin membranlarında hasara sebep olacak ve hücre fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyecektir. Bu nedenle laktik asidin hücre içinde stres ortamı oluşturduğunu kabul edebiliriz. Hücrelerin bulunduğu ortamdan karbondioksit geçirilmesinde de karbonik asit oluşup benzer etkiler ortaya çıkacaktır.

Sadece H^+ iyonu konsantrasyonunun hücre içi ve hücre dışı değişiklikleri ile Ca^{++} kanal akımları üzerinde yapılmış çalışmalarda (82, 234, 235), hem hücre içi hem de hücre dışı H^+ iyonu konsantrasyonu artışının, Ca^{++} kanalını inhibe ettiği belirtilmektedir. Deney şartlarımızda hipoksi ve hiperkapninin hücre içi oksidatif stres açısından diğer araştırmalardan farklı bir ortam oluşturduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle yukarıdaki çalışmalarda özel deney şartlarında H^+ iyonu artışının, Ca^{++} kanalını inhibe ettiği ifade edilmesine rağmen biz farklı bir değerlendirme yapmaktayız.

Hipoksik ve hiperkapnik ortamlar birbirine benzer olarak TRPM2 kanallarından geçen Ca^{++} akım yoğunluğunun, normoksi grubuna göre anlamlı artışına sebep olmuştur. Araştırmamızda hipoksi ve hiperkapninin lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA ve hücre membran hasarını gösteren LDH'ı arttırdığı ortaya konularak, ROS'ları arttırdığı gösterilmiştir. Bulgularımıza göre; muhtemel olarak hipoksi ve hiperkapninin hücre içi ROS artışı ile beraber H^+ iyonu miktarını da arttırdığı ve böylece, Ca^{++} akımının dolayısı ile hücre içi Ca^{++} miktarının artışına neden olduğunu söyleyebiliriz. Ca^{++} akım yoğunluğunun artmasının birincil nedeni ROS artışıdır. Ancak H^+ iyonu artışının da bu etkiye katkı sağladığını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak;

- ❖ Hipoksi ve hiperkapninin HEK293 hücrelerinde TRPM2 kanal aktivitesini ve hücre içine giren Ca^{++} akımını arttırarak hücre içi oksidatif strese neden olduğu saptandı,
- ❖ Hipoksi ve hiperkapni uygulama süresi arttıkça, oksidatif stres ve hücre membran hasarının anlamlı olarak artış gösterdiği tespit edildi,

- ❖ Çinko, selenyum ve glutatyon uygulamasının, hipoksi ve hiperkapninin sebep olduğu oksidatif stresi azalttığı, bunun sonucunda oksidatif stresin neden olduğu hücresel hasara karşı bu antioksidanların koruyucu etki oluşturdukları sonucuna varıldı,
- ❖ Hipoksi ve hiperkapninin hücresel düzeyde etki mekanizmasının araştırılması, hücre membran bütünlüğü, Ca^{++} iyon dengesi, lipidler ve proteinler üzerinde oluşturabileceği etkileri ve bu etkilere karşı antioksidanların ve TRPM2 kanal aktivasyonunun etki mekanizmalarının birlikte araştırılması açısından çalışmamız diğer araştırmalardan farklılık göstermektedir,
- ❖ HEK293 hücrelerinde TRPM2 Ca^{++} iyon kanalları üzerinde yapılan araştırmamız sonucunda elde edilen bulgularımızın, farklı konsantrasyonda ve sürede antioksidanlar ile inkübe edilen değişik hücre hatlarında yapılarak desteklenmesi gerekmektedir,
- ❖ Bu araştırma özellikle hipoksi ve hiperkapninin böbrek ve kimoreseptör hücre membranlarındaki Ca^{++} akımına etkileri üzerine olabilir.

KAYNAKLAR

1. Toledo A, Toledo S, Penner R. TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling. *The Journal of Physiology* 2011; 589 (7): 1515-25. doi: 10.1113/jphysiol.2010.201855.
2. Simon F, Varela D, Verrugio CC. Oxidative stress-modulated TRPM ion channels in cell dysfunction and pathological conditions in humans. *Cellular Signalling* 2013; 25 (7): 1614-24. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.03.023.
3. Takahashi N, Kozai D, Kobayashi R, Ebert M, Mori Y. Roles of TRPM2 in oxidative stress *Cell Calcium* 2010; 50(3): 279-87. doi: 10.1016/j.ceca.2011.04.006.
4. Nazıroğlu M, Lückhoff A, Jüngling E. Antagonist effect of flufenamic acid on TRPM2 cation channels activated by hydrogen peroxide. *Cell Biochemistry and Function* 2007; 25(4): 383-7. doi: 10.1027/cbf.1310.
5. Chen GL, Zeng B, Eastmond S, Elsenussi SE, Boa AN, Xu SZ. Pharmacological comparison of novel synthetic fenamate analogues with econazole and 2-APB on the inhibition of TRPM2 channels. *British Journal of Pharmacology* 2012; 167(6): 1232-43. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02058.x.
6. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 2001; 411(6837): 595-9. doi: 10.1038/35079100.
7. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Molecular Cell* 2005; 18(1): 61-9. doi: 10.1016/j.molcel.2005.02.033.
8. Heiner I, Eisfeld J, Halaszovich CR, Wehage E, Jüngling E, Zitt C, Lückhoff A. Expression profile of the transient receptor potential (TRP) family in neutrophil granulocytes: Evidence for currents through long TRP channel 2 induced by ADP-ribose and NAD. *Biochemical Journal* 2003a; 371(3): 1045-53. doi: 10.1042/BJ20021975.
9. Lange I, Penner R, Fleig A, Beck A. Synergistic regulation of endogenous TRPM2 channels by adenine dinucleotides in primary human neutrophils. *Cell Calcium* 2008; 44(6): 604-15. doi: 10.1016/j.ceca.2008.05.001.

10. Minke B. TRP channels and Ca^{2+} signaling. *Cell Calcium* 2006; 40(3): 261-75. doi: 10.1016/j.ceca.2006.05.002.
11. Zheng J. Molecular Mechanism. *Comprehensive Physiology* 2013; 3(1):221-42. doi: 10.1002/cphy.c120001.
12. Öztürk L, Metin G, Pelin Z. Aralıklı Hipoksi ve Fizyolojik Uyum. *Solunum* 2003; 5(3): 121-126.
13. Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Seminars in Cancer Biology*. 2009; 19: 12-16.
14. Erdemli G, Crunelli V. Response of thalamocortical neurons to hypoxia: a whole cell patch clamp study. *The Journal of Neuroscience* 1998; 18(14): 5212-24.
15. Liu L, Wise DR, Diehl JA Simon MC. Hypoxic reactive oxygen species regulate the integrated stress response and cell survival. *The Journal of Biological Chemistry* 2008; 283(45): 31153–62.
16. Lima CBC, Santos SA, Junior DRA. Hypoxic stress, hepatocytes and caco-2 viability and susceptibility to shigella flexneri invasion. *Revista do Instituto the Medicina Tropical Sao Paulo* 2013; 55(5): 341-346. doi: 10.1590/S0036-46652013000500008.
17. Taylor CT. Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochemical Journal* 2008; 409: 19–26.
18. Bustos E, Esveile C, Contreras J, Maurer I, Sarabia L. Effects of chronic stimulated hypobaric hypoxia on mouse spermatogenesis. *International Journal of Morphology* 2006; 24(3): 481-488.
19. Peers C, Kemp PJ. Ion channel regulation by chronic hypoxia in models of acute oxygen sensing. *Cell Calcium* 2004; 36(3-4): 341-8. doi: 10.1016/j.ceca.2004.02.005.
20. Koşar F. Solunum Yetmezliğine Yaklaşım. *Solunum* 2005; 7: 42-4.
21. Behna C, Araneda OF, Llanos AJ, Celedion G, Gonzalez G. Hypoxia-related lipid peroxidation: Evidences, implications and approaches. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2007; 158(2-3): 143-50. doi: 10.1016/j.resp.2007.06.001.
22. Mutlu LC, Hacıevliyagil SS, Günen H, Kızıncı Ö. The Effect of supplemental oxygen on hypoxemia and hypercapnia in COPD patients with acute respiratory failure. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2006; 13(4): 231-236.

23. Matthaes A, Greco A, Dagostino MP, Paroni G, Fontana A, Vinciguerra M, Mazzocchi G, Seripa D, Vendemiale G. Effects of hypercapnia on peripheral vascular reactivity in elderly patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical Interventions in Aging* 2014; 9: 871–8.
24. Cheng HLM. Effect of hyperoxia and hypercapnia on tissue oxygen and perfusion response in the normal liver and kidney. *Plos One* 2012; 7(7): e40485. doi:10.1371/journal.pone.0040485.
25. <https://www.cs.mcgill.ca>
Erişim: 14.07.2017
26. Stengl M, Ledvinova L, Chvojka J, Benes J, Jarkovska D, Holas J, Soukup P, Svirglerova J, Matejovic M. Effects of clinically relevant acute hypercapnic and metabolic acidosis on the cardiovascular system: an experimental porcine study. *Critical Care* 2013; 17(6): R303. doi: 10.1186/cc13173.
27. Imber AN, Putnam RW. Postnatal development and activation of L-type Ca^{+2} currents in locus ceruleus neurons: implications for a role for Ca^{+2} in central chemosensitivity. *Journal of Applied Physiology* 2012; 112: 1715-26. doi: 10.1152/jappphysiol.01585.2011.
28. Pastacı Özsoğacı N. Elektromanyetik alan uygulamasının (wi-fi 2.4 ghz) insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK293) apoptoz ve oksidatif stres değerleri üzerine selenyum ve çinkonun etkisi. *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı, Doktora Tezi*, İstanbul 2016.
29. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Periodontology* 1997; 24(5): 287-96.
30. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report. *Journal of Nutrition* 2004; 134(11): 3143- 63.
31. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2006; 160(1): 1-40.
32. Sezer K, Keskin M. Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü. *Fırat Üniversitesi sağlık Bilimleri Veterinerlik Dergisi* 2014; 28(1): 49-56.

33. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiological Reviews* 2010; 88(4): 1243-76. doi: 10.1152/physrev.00031.2007
34. Yajima D, Motani H, Hayakawa M, Sato Y, Sato K, Iwase H. The relationship between cell membrane damage and lipid peroxidation under the condition of hypoxia-reoxygenation: analysis of the mechanism using antioxidants and electron transport inhibitors. *Cell Biochemistry and Function* 2009; 27: 338-343. doi: 10.1002/cbf.1578.
35. Repetto M, Semprine J, Boveris A. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. *World's largest Science, Technology & Medicine Open Access Book Publisher* 2012; 4-28. doi: 10.5772/45943.
36. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage *Clinical Chemistry* 1995; 41(12): 1819-28.
37. Yoshikawa T, Naito Y. What is oxidative stress? *Japan Medical Association Journal* 2002; 45(7): 271-6.
38. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39(1): 44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
39. Peralta FA, Toro JPH. Zinc as allosteric ion channel modulator: ionotropic receptors as metalloproteins. *International Journal of Molecular Sciences* 2016; 17: 1059. doi: 10.3390/ijms17071059.
40. Marreiro DN, Cruz KJC, Morais JBS, Beserra JB, Severo JS, Oliveira ARS. Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms. *Antioxidants* 2017; 6(24): 1-9. doi: 10.3390/antiox6020024.
41. Roman M, Jitarub P, Barbante C. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics* 2014; 6(1): 25-54. doi: 10.1039/c3mt00185g.
42. Takahashi K, Sakamoto K, Kimura J. Hypoxic stress induces transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channel expression in adult rat cardiac fibroblasts. *Journal of Pharmacological Sciences* 2012; 118(2): 186-97.
43. Nazıroğlu M, Özgül C, Küçükayaz M, Çiğ B, Hebeisen S, Bal R. Selenium modulates oxidative stress-induced trpm2 cation channel currents in transfected

- chinese hamster ovary cells, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2013; 112: 96–102.
44. Zeng H. Selenium as an essential micronutrient: Roles in cell cycle and apoptosis, *Molecules* 2009; 14: 1263-1278. doi: 10.3390/molecules14031263.
 45. Gan F, Xue H, Huang Y, Pan C, Huang K. Selenium alleviates porcine nephrotoxicity of ochratoxin a by improving selenoenzyme expression in vitro. *Plos One* 2015; 10(3): 1-18. doi: 10.1371/journal.pone.0119808.
 46. Gan F, Xue H, Huang Y, Pan C, Huang K. Selenium alleviates porcine nephrotoxicity of ochratoxin a by improving selenoenzyme expression in vitro. *Plos One* 2015; 10(3): 1-18 doi: 10.1371/journal.pone.0119808.
 47. Leggatt RA, Brauner CJ, Schulte PM, Iwama GK. Effects of acclimation and incubation temperature on the glutathione antioxidant system in killifish and RTH-149 cells. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2007; 146: 317-26.
 48. Pehlivan F. *Biyofizik*. 2. Baskı, Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık; 2007.
 49. Cooper GM. *The Cell A Molecular Approach*. 7th Edition. Canada: Oxford University Press; 2007.
 50. Watson H, Biological membranes, *Essays in Biochemistry* 2015; 59: 43-69. doi: 10.1042/bse0590043.
 51. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition. *Garland Science* 2002.
 52. Wolfe SL. *Molecular and Cellular Biology*. California: Wadsworth Publishing Company; 1993.
 53. Janmey PA, Kinnunen PKJ, Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends in Cell Biology* 2006; 16(10): 538-46. doi: 10.1016/j.tcb.2006.08.009.
 54. Samosa RC. *Cellular & Molecular Biology: Membrane Proteins*. Maed Biology; 2012.
 55. Suh BC, Hille B. PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: How and why? *Annual Review of Biophysics* 2008; 37: 175-195.
 56. Puralı N. *Hücre Elektrofizyolojisi ve Görüntülemenin Temelleri*. İstanbul: Veri Medikal Yayınları; 2012.

57. Plonsey R, Malmivuo J. *Bioelectromagnetism: Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields*. New York Oxford Oxford University Press; 1995.
58. Coronado R, Latorre R. Phospholipid bilayers made from monolayers on patchpipettes. *Biophysical Journal* 1983; 43: 231-6.
59. Suchyna TM, Markin VS, Sachs F. Biophysics and structure of the patch and the gigaseal. *Biophysical Journal* 2009; 97: 738–47.
60. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journals of Physiology* 1952; 117(4): 500-44.
61. Goldman DE. Potential, impedance and rectification in membranes. *The Journal of General Physiology* 1943; 27 (1): 37-60.
62. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 1981; 391: 85–100.
63. Taylor WR, Jones DT, Green NM. A method for alpha-helical integral membrane protein fold prediction. *Proteins* 1994; 18(3): 281-94. doi:10.1002/prot.340180309.
64. Çelik Ö. Oksidatif stresle aktive edilen trpm2 katyon kanallarının inaktivasyonunda melatoninin etkisinin patch-clamp sistemi ile araştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Isparta* 2011.
65. Scott RH, Pearson HA, Dolphin AC. Aspects of vertebrate neuronal voltage activated calcium currents and their regulation. *Neurobiology* 1991; 36: 485-520.
66. Minke B. Drosophila mutant with a transducer defect. *Biophysics Structure and Mechanism* 1977; 3(1): 59-64.
67. Minke B. The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *Journal of Neurogenetics* 2010; 24(4): 216-33.
68. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience* 2001; 2(6): 387-96.
69. Montell C. Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Science's Signaling STKE* 2001; 6(90): re1. doi: 10.1126/stke.2001.90.re1.

70. Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Science's Signaling STKE*. 2005a; 22(272): re3. doi: 10.1126/stke.2722005re3.
71. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2005; 51(3): 187-200.
72. Hardie RC, Minke B. The trp gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 1992; 8(4): 643-51.
73. Hardie RC, Minke B. Novel Ca^{2+} channels underlying transduction in *Drosophila* photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca^{2+} mobilization. *Trends Neuroscience* 1993; 16(9): 371-6.
74. Hardie RC. TRP channels in *Drosophila* photoreceptors: the lipid connection. *Cell Calcium* 2003; 33(5-6): 385-93.
75. Saygın M, Nazıroğlu M. Recent developments on molecular mechanisms role on activation of TRPM2 cation channels, *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2010; 27: 42-45.
76. Özgül C, Nazıroğlu M. Nörolojik hücrelerde TRPM2 katyon kanallarının moleküler mekanizmalardaki rolleri. *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2010; 27: 144-151.
77. Özgül C. Arka kök gangliyon hücrelerinde oksidatif stresle aktive edilen TRPM2 katyon kanallarının inhibisyonunda n-asetil sisteinin etkisinin patch-clamp sistemi ile araştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, Isparta 2013.
78. Yoo S, Lim JY, Hwang SWV, Sensory TRP Channel Interactions with Endogenous Lipids and Their Biological Outcomes, *Molecules* 2014; 19 (4): 4708-44. doi: 10.3390/molecules19044708.
79. Tan CH, McNaughton PA. The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature* 2016; 536 (7617): 460-3. doi: 10.1038/nature19074.
80. Yue Z, Xie J, Yu AS, Stock J, Du J, Yue L. Role of TRP channels in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 2015; 308: 157-82.
81. Fonfria E, Marshall ICB, Benham CD, Boyfield I, Brown JD, Hill K, Hughes JP, Skaper SD, McNulty S. TRPM2 channel opening in response to oxidative stress is

- dependent on activation of poly (ADP-ribose) polymerase. *British Journal of Pharmacology* 2004; 143(1): 186-192. doi: 10.1038/sj.bjp.0705914.
82. Starkus JG, Fleig A, Penner R. The calcium-permeable non-selective cation channel TRPM2 is modulated by cellular acidification. *The Journal of Physiology* 2010; 588(8): 1227-40. doi: 10.1113/jphysiol.2010.187476.
 83. Zhan K, Yu P, Liu C, Luo, Yang W. Detrimental or beneficial: the role of TRPM2 in ischemia/reperfusion injury. *Acta Pharmacological* 2016; 37: 4–12.
 84. Kühn FJP, Kühn C, Nazıroglu M, Lückhoff A. Role of an N-Terminal Splice Segment in the Activation of the Cation Channel TRPM2 by ADP-Ribose and Hydrogen Peroxide. *Neurochemical Research* 2009; 34(2): 227-33. doi: 10.1007/s11064-008-9755-0.
 85. Kolisek M, Beck A, Fleig A. Cyclic ADP-Ribose and Hydrogen Peroxide Synergize with ADP-Ribose in the Activation of TRPM2 Channels. *Molecular Cell* 2005; 18(1): 61-9. doi: 10.1016/j.molcel.2005.02.033.
 86. Winking M, Hoffmann DC, Kühn C, Hilgers RD, Lückhoff A, Kühn FJP. Importance of a Conserved Sequence Motif in Transmembrane Segment S3 for the Gating of Human TRPM8 and TRPM2. *Plos One* 2012; 7(11): e49877. doi: org/10.1371/journal.pone.0049877.
 87. Sun L, Yau HY, Wong WY, Li RA, Huang Y, Yao X. Role of TRPM2 in H₂O₂-Induced Cell Apoptosis in Endothelial Cells. *Plos One* 2012; 7(8): e43186. doi: 10.1371/journal.pone.0043186.
 88. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Molecular Cell* 2002; 9(1): 163-73.
 89. Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jüngling E, Zitt C, Lückhoff A. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(26): 23150-6. doi: 10.1074/jbc.M112096200.
 90. Kühn FJP, Lückhoff A. Sites of the NUDT9-H Domain Critical for ADP-ribose Activation of the Cation Channel TRPM2. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(45): 46431-37. doi: 10.1074/jbc.M407263200.

91. 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* 2008; 270(1-2): 152-8. doi: 10.1016/j.jns.2008.03.003.
92. Kashio M, Sokabe T, Shintakua K, Uematsuc T, Fukutaa N, Kobayashic N, Morid Y, Tominagaa M. Redox signal-mediated sensitization of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012; 109(17): 6745-50. doi: 10.1073/pnas.1114193109.
93. Lange I, Yamamoto S, Partida-Sanchez S, Mori Y, Fleig A, Penner R. TRPM2 functions as a lysosomal Ca^{2+} -release channel in beta cells. *Science Signaling* 2009; 2(71): 23-32. doi: 10.1126/scisignal.2000278.
94. Pantaler E, Lückhoff A. Inhibitors of TRP channels reveal stimulus-dependent differential activation of Ca^{2+} influx pathways in human neutrophil granulocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2009; 380(6): 497-507. doi: 10.1007/s00210-009-0464-2.
95. Molleman A. Patch Clamping An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology. *John Wiley & Son Ltd* 2003; 5-41.
96. Zhao Y, Inayat S, Dikin DA, Singer JH, Ruoff RS, Troy JB. Patch clamp technique: Review of the current state of the art and potential contributions from nanoengineering. *Journal of Nanoengineering and Nanosystems* 2009; 222(1): 1-11. doi: 10.1243/17403499JNN149.
97. Sakmann B, Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annual Review of Physiology* 1984; 46: 455-72.
98. Franciolini F. Patch clamp technique and biophysical study of membrane channels. *Experientia* 1986; 42 (6): 589-594.
99. Sherman AJ, Shrier A, Cooper E. Series resistance compensation for whole-cell patch-clamp studies using a membrane state estimator. *Biophysical Journal* 1999; 77: 2590-601.
100. Ogden D, Stanfield P. Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording. 2015; 53-78.
101. Neher E. Ion channels for communication between and within cells. *Physiology or Medicine* 1991; 10-25.

102. Bruce G. Kornreich DVM. The patch clamp technique: Principles and technical considerations. *Journal of Veterinary Cardiology* 2007; 9(1): 25-37. doi: 10.1016/j.jvc.2007.02.001.
103. Sakmann B, Neher E. Single-Channel Recording. 2nd Ed, Newyork: Springer. 2009.
104. Franciolini F. Patch clamp technique and biophysical study of membrane channels. *Experientia* 1986; 42(6): 589-714.
105. Chen CC, Cang C, Fenske S, Butz E, Chao YK, Biel M, Ren D, Schott CW, Grimm C. Patch-clamp technique to characterize ion channels in enlarged individual endolysosomes. *Nature Protocols* 2017; 12:1639-58. doi: 10.1038/nprot.2017.036.
106. 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* 2008; 270(1-2): 152-8. doi: 10.1016/j.jns.2008.03.003.
107. Davie JT, Kole MH, Letzkus JJ, Rancz EA, Spruston N, Stuart GJ, et al. Dendritic patch-clamp recording. *Nature Protocols* 2006; 1(3): 1235-47.
108. Chen K, Featherstone DE, Broadie K. Electrophysiological recording in the *Drosophila* embryo. *Journal of visualized experiments: JoVE* 2009; 27: 1348. doi: 10.3791/1348.
109. Monen SH, Schmidt PH, Wondergem R. Membrane potassium channels and human bladder tumor cells. I. Electrical properties. *The Journal of Membrane Biology* 1998; 161(3): 247-56.
110. Quinn K, Beech DJ. A method for direct patch-clamp recording from smooth muscle cells embedded in functional brain microvessels. *Pflügers Archive: European journal of physiology* 1998; 435(4): 564-9.
111. Hamill OP. Patch-clamp technique. *John Wiley & Sons* 2014; 1-14. doi: 10.1002/9780470015902.a0003382.pub2.
112. <https://www.axolbio.com/page/whole-cell-patch-clamp-protocol>
Erişim: 24.04.2017
113. <https://nationalmaglab.org/about/around-the-lab/what-the/faraday-cage>
Erişim: 05.05.2017
114. <http://wiki.backyardbrains.com/Experiment: The Faraday Cage>
Erişim: 05.05.2017

115. Knight JA. Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of The New York Academy of Sciences* 2000; 30(2): 145-58.
116. Khan AU, Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA* 1994; 91(26): 12365-72.
117. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2007; 18(9): 567-79.
118. Akyol O, Herken H, Uz E, Fadillioğlu E, Unal S, Söğüt S, Özyurt H, Savaş HA. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2002; 26(5): 995-1005.
119. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1992; 119(6): 598-620.
120. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of The New York Academy of Sciences* 2000; 899: 136-347.
121. Morrow JD, Chen Y, Brame CJ, Yang J, Sanchez SC, Xu J, Zackert WE et al. The isoprostanes: unique prostaglandin-like products of free-radical-initiated lipid peroxidation. *Drug Metabolism Reviews* 1999; 31(1): 117-139.
122. Morgan MJ, Kim YS, Liu Z. Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death. *Antioxidant Redox Signaling* 2007; 9(9): 1471-83.
123. Huy LAP, He H, Huy CP. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health *International Journal of Biomedical Science* 2008; 4(2): 89–96.
124. Özdemir F. Radyasyonun oluşturduğu serbest radikallerin ortadan kaldırılmasında CoQ10'un koruyucu etkisi. *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalı, Doktora Tezi*, Eskişehir 2004.
125. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of The New York Academy of Sciences* 2000; 899: 136-47.
126. Demirci T. Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2011; 21(2): 141-9.

127. Gracy RW, Talent JM, Kong Y, Conrad CC. Reactive oxygen species: The unavoidable environmental insult? *Mutation Research* 1999; 428: 17–22.
128. Koca N, Karadeniz F. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Dergisi* 2011; 32-7.
129. Wagener F, Carels CE, Lundvig DMS. Targeting the Redox Balance in Inflammatory Skin Conditions. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, 14(5): 9126-67. doi: 10.3390/ijms14059126.
130. Bardou O, Trinh NTN, Brochiero E. Molecular diversity and function of K channels in airway and alveolar epithelial cells, *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* 2009; 296: 145-155.
131. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* 1995; 41: 1819-28.
132. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation in methods in enzymology. *Methods Enzymology* 1978; 302-10.
133. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working? *Critical Reviews Food Science and Nutrition* 1995; 35(1-2): 21-39. doi: 10.1080/10408399509527683.
134. Clarkson PM. Antioxidants and physical performance. *Critical Reviews Food Science and Nutrition* 1995; 35(1-2): 131-141. doi: 10.1080/10408399509527692.
135. Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, Pomblum VC, Rocha JBT, Farina M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification *Química Nova* 2009; 32(1): 169-174.
136. Martfnez MC. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 1995; 77: 147-61.
137. Valvona CJ, Fillmore HL, Nunn PB, Pilkington GJ. The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. *Brain Pathology* 2016; 26(1): 3-17. doi: 10.1111/bpa.12299.
138. Rossignol F, Solares M, Balanza E, Coudert J, Clottes E. Expression of lactate dehydrogenase a and b genes in different tissues of rats adapted to chronic hypobaric hypoxia, *Journal of Cellular Biochemistry* 2003; 89: 67-79.

139. Miao P, Sheng S, Sun X, Huang JLG. Lactate dehydrogenase a in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 2013; 65(11): 904-10.
140. Chan FKM, Moriwaki K, Rosa MJ. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase (ldh) activity. *Methods Molecular Biology* 2013; 979: 65-70. doi: 10.1007/978-1-62703-290-2_7.
141. Baba C, Yanagida K, Kanzaki T, Baba M. Colorimetric lactate dehydrogenase (LDH) assay for evaluation of antiviral activity against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in vitro. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 2005; 16(1): 33-9.
142. Chan FM, Moriwaki K, Rose MJ. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity. *Methods in Molecular Biology* 2013; 979: 65–70. doi: 10.1007/978-1-62703-290-2_7.
143. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reactive oxygen particles and antioxidant defence. *Journal of the Turkish Nephrology* 1997; 3-4: 92-95.
144. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* 2006; 160 (2): 171-7.
145. Downs CA, Helms MN. Regulation of ion transport by oxidants. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 2013; 305: 595-603.
146. Nilsson JR. How cytotoxic is zinc? A study on effects of zinc on cell proliferation, endocytosis and fine structure of the ciliate tetrahymena. *Acta Protozoologica* 2003; 42: 19-29.
147. Özçelik D. Bakır, çinko, kurşun ve kadmiyum katkılı besinlerle beslenen civcivlerin kan, serum ve değişik dokularındaki eser element konsantrasyonlarının ölçülmesi ve besi performansına etkilerinin saptanması. *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı, Doktora Tezi*, İstanbul 1998.
148. Stefanidou M, Maravelias C, Dona A, Spiliopoulou C. Zinc: a multipurpose trace element. *Archives Toxicology* 2006; 80(1): 1-9. doi: 10.1007/s00204-005-0009-5.
149. Reeves PG, Anderson MB, Hewman SM. High zinc concentrations in culture media affect copper uptake and transport in differentiated human colon adenocarcinoma cells. *Journal Nutrition* 1996; 126(6): 1701-12.

150. Canzoniero LMT, Turetsky DM, Choi DW. Measurement of intracellular free zinc concentrations accompanying zinc induced neuronal death, *The Journal of Neuroscience* 1999, 19: 1-6.
151. Palmiter RD. Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1. *Proceedings of The National Academy of Science* 2004; 101(14): doi: 4918-23. 10.1073/pnas.0401022101.
152. Manna PT, Munsey TS, Abuarab N, Li F, Asipu A, Howell G, Sedo A, Yang W, Naylor J, Beech DJ, Jiang LH, Sivaprasadarao A. TRPM2-mediated intracellular Zn^{2+} release triggers pancreatic β -cell death, *Journal of Biochemistry* 2015; 466: 537-546. doi: 10.1042/BJ20140747.
153. Ebert R, Ulmer M, Zeck S, Weigl JM, Schneider D, Stopper H, Schupp N, Kassem M, Jakop M. Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells in vitro. *Stem Cells* 2006; 24: 1226-35.
154. Yang W, Manna PT, Zou J, Luo J, Beech DJ, Sivaprasadarao, Jiang LH. Zinc inactivates melastatin transient receptor potential 2 channels via the outer pore. *The Journal of Biological Chemistry* 2011; 286(27): 23789-98.
155. Düzgün D. Diabetik tavşanların kan ve intraoküler sıvılarında osmotik basınç ile Zn, Cu ve Cr eser element seviyelerinin araştırılması. *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul 2011.
156. Kiselyova K, Muallema S. ROS and intracellular ion channels. *Cell Calcium* 2016; 60(2): 108-114. doi: 10.1016/j.ceca.2016.03.004.
157. Czochara MT, Paśko P, Reczyński W, Szłósarczyk M, Bystrowska B, Opoka W. Zinc and propolis reduces cytotoxicity and proliferation in skin fibroblast cell culture: total polyphenol content and antioxidant capacity of propolis, *Biological Trace Elements Research* 2014; 160: 123-131. doi: 10.1007/s12011-014-0019-3.
158. Meerarani P, Ramadass P, Toborek M, Bauer HC, Bauer H, Hennig B, Zinc protects against apoptosis of endothelial cells induced by linoleic acid and tumor necrosis factor α 1-3, *The American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 71: 81-7.
159. Erkekoğlu PÜ. Selenyum eksikliği olan ve selenyum suplementasyonu yapılan sıçanlarda di-2-(etilhekzil) fitalatın (DEPH) reproduktif toksisitesinin değerlendirilmesi. *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi*, Ankara 2009.

160. Marreiro DN, Cruz KJY, Morais JBS, Beserra JB, Severo JS, Oliveira ARS. Zinc and oxidative stress: Current mechanisms, *Antioxidants* 2017; 6(2): 24. doi: 10.3390/antiox6020024.
161. Rosario SEJ, Self WT. Targeting selenium metabolism and selenoproteins: Novel avenues for drug discovery. *Metallomics* 2010; 2: 112-116.
162. Lee M, Cho T, Jantarantotai N, Wang YT, McGeer E, McGeer PL. Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *Federation of American Societies For Experimental Biology* 2010; 24(7): 2533-45. doi: 10.1096/fj.09-149997.
163. Nazıroğlu M, Özgül C, Çiğ B, Doğan S, Uğuz AC. Glutathione Modulates Ca²⁺ Influx and Oxidative Toxicity Through TRPM2 Channel in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *The Journal of Membrane Biology* 2011; 242:109-118. DOI 10.1007/s00232-011-9382-6.
164. Belrose JC, Xie YF, Gierszewski LJ, MacDonald JF, Jackson MF. Loss of glutathione homeostasis associated with neuronal senescence facilitates TRPM2 channel activation in cultured hippocampal pyramidal neurons. *Molecular Brain* 2012; 5-11. doi: 10.1186/1756-6606-5-11.
165. Gao L, Song Y, Tanga M, Liua C, Hua X, Luo H, Hescheler J. Effect of hypoxia on hyperpolarization-activated current in mouse dorsal root ganglion neurons. *Brain Research* 2006; 1078(81): 49-59. doi.org/10.1016/j.brainres.2006.01.037.
166. Shimoda LA, Polak J. Hypoxia. 4. Hypoxia and ion channel function. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 2011; 300(5): 951-67. doi: 10.1152/ajpcell.00512.2010.
167. Ursavaş A, Ege E, Uzaslan EK, Coşkun F, Atabey M, Rodoplu E, Özkubat Ö, Özyardımcı N. Akut hiperkapnik solunum yetmezlikli hastalarda noninvaziv pozitif basınçlı ventilasyonun başarısını etkileyen faktörlerin değerlendirilmesi solunum hastalıkları 2004; 15: 119-126.
168. Veit F, Pak O, Brandes RP, Weissmann N. Hypoxia- dependent reactive oxygen species signaling in the pulmonary circulation: focus on ion channels. *Antioxidants & Redox Signaling* 2015; 22(6): 537-52. doi: 10.1089/ars.2014.6234.
169. Calapoğlu NŞ. Hipoksiye karşı hücresel cevabın düzenleyicisi: HIF-1 regulator of cellular response to hypoxia. *Smyrna Tıp Dergisi* 2016; 48-53.

170. Dosek A, Ohnob H, Acsa Z, Taylor AT, Radak Z. High altitude and oxidative stress, *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2007; 158(2-3): 128-31. doi: 10.1016/j.resp.2007.03.013.
171. Xiang K, Earl D, Dwyer T, Behrle BL, Tietz E, Greenfield J. Hypoxia enhances high-voltage-activated calcium currents in rat primary cortical neurons via calcineurin, *Epilepsy Research* 2012; 99: 293-305.
172. Ensari E. Gebelikte olaylanan deneysel hipokside ginkgo biloba'nın testis dokusunda olası etkisinin incelenmesi. *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, Ankara 2010.
173. Bailey DM, Davies B, Young IS. Intermittent hypoxic training: implications for lipid peroxidation induced by acute normoxic exercise in active men. *Clinical Science* 2001; 101: 465–475.
174. Basım S. Alt Ekstremitede iskemi-reperfüzyon oluşturulan ratlarda ginkgo biloba egb 761'in barsak anastomoz iyileşmesi üzerine etkisi. *T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi*, İstanbul 2005.
175. **genelpatoloji.com.tr**
Erişim: 10.07.2017
176. Dean RWPJ, Mulkey DK, Henderson RA, Potter SJ, Putnam RW. Hyperoxia, reactive oxygen species, and hyperventilation: oxygen sensitivity of brain stem neurons. *Journal of Apply Physiology* 2004; 96: 784-791. doi: 10.1152/japplphysiol.00892.2003.
177. Halliwell B, Chirio S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1993; 57(5): 715-24.
178. Vohwinkel CU, Lecuona E, Sun H, Sommer N, Vadasz I, Chandel NS, Sznajder JI. Elevated CO₂ levels cause mitochondrial dysfunction and impair cell proliferation. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 2011; 286(43): 37067-76. doi: 10.1074/jbc.M111.290056.
179. Servillo G, Derobertis E, Coppola M, Tufano R. Local and Systemic Effects of Hypercapnia. *Anaesthesia, Pain, Intensive Care and Emergency Medicine* 2001; 189-194. doi: 10.1007/978-88-470-2903-3_14.
180. Sharabi K, Lecuona E, Helenius LT, Beitel GJ, Sznajder JI, Gruenbaum Y. Sensing, physiological effects and molecular response to elevated CO₂ levels in

- eukaryotes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2209; 13(11-12): 4304-18.
181. Putnam RW, Filosa JA, Ritucci NA. Cellular mechanisms involved in CO₂ and acid signaling in chemosensitive neurons. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 2004; 287: 1493–1526. doi: 10.1152/ajpcell.00282.2004.
 182. Shigemura M, Lecuona E, Sznajder JI. Effects of hypercapnia on the lung. *The Journal of Physiology* 2017; 2431-37. doi: 10.1113/JP273781.
 183. Yılmaz Ö, Taşkiran D. Astrosit hücre kültürlerinde pH değişikliğinin yarattığı toksisite ve glutatyonun koruyucu etkisi. *Journal of Neurological Sciences* 2010; 27(1): 61-68.
 184. Ketabchi F, Egmenazarov B, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Moosavi MS, Dehghani GA, Weissmann N, Sommer N. Effects of hypercapnia with and without acidosis on hypoxic pulmonary vasoconstriction. *The American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* 2009; 297: 977–83. doi: 10.1152/ajplung.00074.2009.
 185. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1573#characteristics>
Erişim: 03.05.2017
 186. <http://www.gsbio.cn/en/index.php?a=procon&id=352&oneid=116>
Erişim: 03.05.2017
 187. http://insilico.ehu.eus/counting_chamber/thoma.php
Erişim: 03.05.2017
 188. https://www.biocat.com/genomics/transfection-reagents/standard_efficiency-dna-transfection-for-cell-lines
Erişim: 05.05.2017
 189. 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. *The Journal of Membrane Biology* 2011a; 241(2): 69-75.
 190. Togashi K, Inada H, Tominaga M. Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *British Journal of Pharmacology* 2008; 153(6): 1324-30.

191. Daniel N, Cortright James E, Krause Daniel C. TRP channels and pain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2007; 1772 (8): 978-88.
192. Blake SD, Tweed CM, McKamey SG, Koh DW. Transient receptor potential, Melastatin-2 (TRPM2) blockade: perspectives on potential novel clinical utility in cancer. *Translational Cancer Research* 2017; 6(2): 342-7. doi: 10.21037/tcr.2017.03.11.
193. Hecquet CM, Ahmmed GU, Malik AB. TRPM2 channel regulates endothelial barrier function. *Membrane Receptors, Channels and Transporters in Pulmonary Circulation* 2009; 661: 155-67.
194. Volk T, Hensel M, Kox WJ. Transient Ca^{2+} changes in endothelial cells induced by low doses of reactive oxygen species: Role of hydrogen peroxide. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1997; 171: 11-21.
195. Hecquet CM, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB. Role of TRPM2 channel in mediating H_2O_2 -induced Ca^{2+} entry and endothelial hyperpermeability. *Circulation Research* 2008; 102: 347-55.
196. Fonfria E, Marshall IC, Benham CD. TRPM2 channel opening in response to oxidative stress is dependent on activation of poly (ADP-ribose) polymerase. *British Journal of Pharmacology* 2004; 143: 186-192.
197. Wilkinson JA, Scragg JL, Boyle JP, Nilius B, Peers C. H_2O_2 -stimulated Ca^{2+} influx via TRPM2 is not the sole determinant of subsequent cell death. *European Journal of Physiology* 2008; 455(6): 1141-51. doi: 10.1007/s00424-007-0384-2.
198. Tong Q, Zhang W, Conrad K. Regulation of the transient receptor potential channel TRPM2 by the Ca^{2+} sensor calmodulin. *The Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 9076-85.
199. Bari MR, Akbar S, Eweida M, Kuhn FJ, Gustafsson AJ, Luckhoff A, Islam MS. H_2O_2 -induced Ca^{2+} influx and its inhibition by N-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid in the β -cells: involvement of TRPM2 channels. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2009; 13, 3260-67.
200. Shii M, Shimizu S, Hagiwara T, Wajima T, Miyazaki A, Mori Y, Kiuchi Y. Extracellular-added ADP-ribose increases intracellular free Ca^{2+} concentration through Ca^{2+} release from stores, but not through TRPM2-mediated Ca^{2+} entry, in rat β -cell line RIN-5F. *Journal of Pharmacological Sciences* 2006a; 101: 174-8.

201. Arnould T, Michiels C, Alexandre I, Remacle J. Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 1992; 152: 215-21.
202. Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Progress in Neurobiology* 2000; 62: 215-49.
203. Cornfield DN, Stevens T, McMurtry IF, Abman SH, Rodman DM. Acute hypoxia causes membrane depolarization and calcium influx in fetal pulmonary artery smooth muscle cells. *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 1994; 266: 469-75.
204. Wheaton WW, Chandel NS. Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2011; 300(3): 385-93. doi: 10.1152/ajpcell.00485.2010.
205. Sarada SKS, Himadri P, Ruma D, Sharma SK, Pauline T. Selenium protects the hypoxia induced apoptosis in neuroblastoma cells through upregulation of Bcl-2. *Brain Research* 2008; 29-39. doi: 10.1016/j.brainres.2008.02.041.
206. Comellas AP, Dada LA, Lecuona E, Pesce LM, Chandel NS, Quesada N, Budinger GR, Strous GJ, Ciechanover A, Sznajder JI. Hypoxia-mediated degradation of Na, K-ATPase via mitochondrial reactive oxygen species and the ubiquitin-conjugating system. *Circulation Research* 2006; 98: 1314-22.
207. Liu L, Wise DR, Diehl JA, Simon MC. Hypoxic reactive oxygen species regulate the integrated stress response and cell survival. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283: 31153-62.
208. Peterson KM, Aly A, Lerman A, Lerman LO, Porcel MR. Improved survival of mesenchymal stromal cell after hypoxia preconditioning: Role of oxidative stress. *Life Sciences* 2011; 88: 65- 73.
209. Schneiderman R, Kubin J, Mishra OP, Delivoria PM. Brain cell membrane modification following hypercapnia and recovery in newborn piglets. *Pediatric Pulmonology* 1994; 18(2): 81-8.
210. Doerr CH, Gajic O, Berrios JC, Caples S, Abdel M, Lymp JF, Hubmayr RD. Hypercapnic acidosis impairs plasma membrane wound resealing in ventilator-injured lungs. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2005; 171(12): 1371-7.

211. Vadasz I, Hubmayr RD, Nin N, Sporn PHS, Sznajder JJ. Hypercapnia: A Nonpermissive Environment for the Lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2012; 46(4): 417-21.
212. Shu-FangHe J, Wei Y, Eyzaguirre C. Effects of relative hypoxia and hypercapnia on intracellular pH and membrane potential of cultured carotid body glomus cells. *Brain Research* 1991; 556(2): 333-8.
213. Cui N, Zhang X, Tadepalli JS, Yu L, Gai H, Petit J, Pamulapati RT, Jin R, Jiang C. Involvement of TRP channels in the CO₂ chemosensitivity of locus coeruleus neurons. *Journal of Neurophysiology* 2011; 105: 2791-801. doi: 10.1152/jn.00759.2010.
214. Summers BA, Overholt JL, Prabhakar NR. CO₂ and pH independently modulate L-type Ca⁺² current in rabbit carotid body glomus cells. *Journal of Neurophysiology* 2002; 88: 604-12.
215. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 2010; 4(8): 118–26. doi: 10.4103/0973-7847.70902.
216. Mohammed AA, Ibrahim AA. Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanism. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2004; 12: 1–18.
217. Ebadi M. Antioxidants and free radicals in health and disease: An introduction to reactive oxygen species, oxidative injury, neuronal cell death and therapy in neurodegenerative diseases. *Arizona: Prominent Press*; 2001.
218. Cord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine* 2000; 108: 652–9.
219. Axelsen PH, Komatsu H, Murray IV. Oxidative stress and cell membranes in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Physiology (Bethesda)* 2011; 26(1): 54-69. doi: 10.1152/physiol.00024.2010.
220. Hussien R, Brooks GA. Mitochondrial and plasma membrane lactate transporter and lactate dehydrogenase isoform expression in breast cancer cell lines. *Physiological Genomics* 2011; 43(5): 255-64. doi: 10.1152/physiolgenomics.00177.2010. Epub 2010 Dec 21.
221. Kanter MM, Lesmes GR, Kaminsky LA, La Ham-Saeger J, Nequin ND. Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer

- race. Relationship to lipid peroxidation. *European Journal Applied Physiology and Occupational Physiology* 1988; 57(1): 60-3.
222. Ayala A, Munoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonena. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014; 1-31.
 223. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology* 1990; 186: 407-21.
 224. Birben E, Şahiner ÜM, Sackesen C, Erzurum S, Kalaycı Ö. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal* 2012; 5(1): 9-19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
 225. Lushchak VL. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions* 2014; 5(224): 164-75. doi: 10.1016/j.cbi.2014.10.016.
 226. Verstraeten SV, Zago MP, MacKenzie GG, Keen CL, Oteiza PI. Influence of zinc deficiency on cell-membrane fluidity in Jurkat, 3T3 and IMR-32 cells. *Biochemical Journal* 2004; 378(2): 579-87.
 227. Boyd L, Dell O. Role of Zinc in Plasma Membrane Function. *Journal of Nutrition* 2000; 130: 1432-6.
 228. Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health *Environmental Health and Preventive Medicine* 2008; 13(2): 102-8. doi: 10.1007/s12199-007-0019-4.
 229. Chu FF, Doroshow JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 2571-76.
 230. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2000; 57: 1825-35.
 231. Kim S, Seo JW, Oh S, Kim SH, Kim I, Suh N, Lee JY. Disparate roles of zinc in chemical hypoxia-induced neuronal death. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2015; 9: 1-9.
 232. 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. *Physiology & Behavior* 2012; 106: 122-8.

233. Sarada SK, Sairam M, Dipti P, Anju B, Pauline T, Kain AK, Sharma SK, Bagawat S, Ilavazhagan G, Kumar D. Role of selenium in reducing hypoxia-induced oxidative stress: An in vivo study. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2002; 56(4): 173-8.
234. Smirnow SV, Knock GA, Belevych AE, Aaronson PI. Mechanism of effect of extracellular pH on L-type Ca^{2+} channel currents in human mesenteric arterial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2000; 279: 76-85.
235. Zhou W, Jones SW. The effects of external pH on calcium currents in bullfrog sympathetic neurons. *Biophysical Journal* 1996; 70: 1326-34.

İNTİHAL RAPORU SONUCU

HİPOKSİ VE HİPERKAPNİNİN İNSAN EMBRİYONİK BÖBREK HÜCRE MEMBRANINDA (HEK293) TRPM2 KANAL AKTİVİTESİNE ETKİSİNİN PATCH CLAMP TEKNİĞİ VE ENZİMATİK ÖLÇÜMLER İLE ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

%6	%4	%2	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	hsord.org.tr İnternet Kaynağı	%1
3	www.arss.org İnternet Kaynağı	%1
4	acikerisim.aku.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
5	www.turkbiyofizik.com İnternet Kaynağı	<%1
6	www.turkiyeklinikleri.com İnternet Kaynağı	<%1
7	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	www.bezmialemscience.org	