



**OKSİJEN GLUKOZ YOKSUNLUĞU İLE
OLUŞTURULAN İSKEMİK MİYELİN HASARI
MODELİNDE RESVERATROLÜN OLİGODENDROSİT
İYON KANALLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Mesut ÇELİK

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Halil DÜZOVA**

**İkinci Tez Danışmanı
Doç. Dr. Bilal ÇİĞ**

Doktora Tezi-2026

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OKSİJEN GLUKOZ YOKSUNLUĞU İLE OLUŞTURULAN İSKEMİK
MİYELİN HASARI MODELİNDE RESVERATROLÜN OLİGODENDROSİT
İYON KANALLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Mesut ÇELİK

Fizyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Halil DÜZOVA**

**İkinci Tez Danışmanı
Doç. Dr. Bilal ÇİĞ**

**Tez Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Halil DÜZOVA
Prof. Dr. Süleyman SANDAL
Prof. Dr. Ramazan BAL
Doç. Dr. Fatma Ebru ALGÜL
Dr. Öğr. Üyesi Feyzi DOĞRU**

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından

TDK-2024-3528 proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA
2026

T.C.

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak “Prof. Dr. Halil DÜZÖVA” ve “Doç. Dr. Bilal ÇİĞ” danışmanlıklarında hazırlayıp sunduğum “Oksijen Glukoz Yoksunluğu ile Oluşturulan İskemik Miyelin Hasarı Modelinde Resveratrolün Oligodendrosit İyon Kanalları Üzerine Etkisi” başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 01/07/2026

Mesut ÇELİK

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ix
ABSTRACT	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
TABLolar DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Miyelin Kılıf	4
2.1.1. Demiyelinizan Hastalıklar.....	5
2.2. Multipl Skleroz (MS)	6
2.2.1. Multipl Skleroz (MS) ve İyon Kanalları	7
2.3. Oligodendrositler ve İyon Kanalları	9
2.4. TRP Kanalları	11
2.4.1. TRPA1 Kanalı.....	12
2.4.2. TRPM4 Kanalı	13
2.5. Kir4.1 Kanalı.....	15
2.6. Multipl Sklerozun Deneysel Modelleri ve İskemik Hasar Yaklaşımı	16
2.7. Resveratrol ve Farmakolojik Etkileri.....	18
2.7.1. Resveratrol ve Multipl Skleroz	19
2.7.2. Resveratrol ve Oligodendrosit İyon Kanalları	20
2.8. Patch-Clamp Yöntemi.....	21
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1 Materyal	25
3.1.1. Kullanılan Malzemeler.....	25
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	26
3.2. Metot	28

3.2.1. Etik Kurul Onayı ve Deney Hayvanlarının Barındırılması.....	28
3.2.2. Doku Hazırlığı ve İskemik Miyelin Hasarı (OGD) Modelinin Oluşturulması.....	28
3.2.3. Elektrofizyolojik Kayıtlar	31
3.2.4. Farmakolojik Ajanlar ve Uygulama Protokolleri.....	35
3.2.5. Konfokal Görüntülemeler	37
3.2.6. Bcl-2, Bax, Caspase-3, Kir4.1, TRPM4 ve Olig2 Proteinlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Western Blot Yöntemi ile Analizi	40
3.2.7. İstatistiksel Analizler.....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Tanımlanması.....	46
4.2. Patch-Clamp Ölçüm Sonuçları.....	47
4.2.3. Kontrol Grubunda Oligodendrosit İyon Kanalı Akımları.....	50
4.2.4. Resveratrol Grubunda İyon Kanalı Akımları.....	53
4.2.5. İskemik (OGD) Grubunda İyon Kanalı Akımları.....	57
4.2.6. Resveratrol+İskemi Grubunda Kanal Akımlarının Değerlendirilmesi	62
4.2.7. Ramp Protokolünden Elde Edilen Reversal Potansiyel Değerleri	69
4.3. Western Blot Bulguları	74
4.3.1. Oligodendrosit Kimlik Belirteci Olig2 Ekspresyonu.....	74
4.3.2. Kir4.1 ve TRPM4 İyon Kanalı Protein Ekspresyonları	75
4.3.3. Apoptoza İlişkili Proteinler: BCL-2, BAX ve Kaspaz-3	77
5. TARTIŞMA	80
5.1. İskemik Miyelin Hasarı Modelinde Oligodendrosit İyon Kanalı Aktivitelerinin Değerlendirilmesi.....	80
5.2. İskemi Sürecinde Kir4.1 ve TRPM4 Akımlarının Baskılanması ve Patofizyolojik Anlamı	81
5.3. Resveratrol Ön-Uygulamasının Oligodendrosit Kanal Fonksiyonu Üzerine Koruyucu Etkisi.....	85

5.4. Olig2 Kaybı ve Kaspaz-Bağımsız Hücre Ölüm Mekanizmalarının Değerlendirilmesi	86
5.5. Kir4.1 Protein-Fonksiyon Ayrışması ve Reversibl Post-Translasyonel Mekanizmalar	87
5.6. Dinlenim Membran Potansiyeli ve İçeri Yönlü Akım Bulgularının Değerlendirilmesi	90
5.7. Çalışmanın Sınırlılıkları	91
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	94
KAYNAKLAR	97
EKLER.....	115
Ek 1. Özgeçmiş	115
Ek 2. Etik Kurulu Onayı-1	116
Ek 3. Etik Kurulu Onayı-2	117

TEŞEKKÜR

TDK-2024-3528 numaralı doktora tez projeme maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Lisansüstü eğitimim boyunca tecrübeleriyle bana yol gösteren, tezimin her aşamasına destek veren, sevgi ve saygı duyduğum danışman hocam Prof. Dr. Halil DÜZOVA başta olmak üzere eğitimim ve iyi bir akademisyen olmam konusunda benim için çok değerli emekleri olan İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalındaki hocalarım Prof. Dr. Süleyman SANDAL, Prof. Dr. Sedat YILDIZ, Prof. Dr. Alaadin POLAT, Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU ve Prof. Dr. Suat TEKİN'e,

Çalışmamın tüm aşamalarında emeğiyle yanımda olan değerli hocam Doç. Dr. Bilal ÇİĞ'e,

Tez sürecimde çok değerli bilgi ve tecrübelerini cömertçe paylaşarak laboratuvar desteklerini esirgemeyen çok değerli Prof. Dr. Ramazan BAL hocama ve Arş. Gör. Saadet BEKERECİOĞLU'na,

Tezimin bazı aşamalarında değerli katkılarını gördüğüm İnönü Üniversitesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ahmet KOÇ ve Öğr. Gör. Dr. Nazmi ÖZGEN'e,

Doktora eğitimimde ve tez aşamasında yine yardımlarını gördüğüm Doç. Dr. Kevser TANBEK'e, Mustafa ŞAHİN'e, Gizem BULUT'a, Öğr. Gör. M.Yusuf ÖZER'e, Dr. Engin KORKMAZ'a ve eğitimimdeki zor zamanlarımda bana destek olan değerli çalışma arkadaşlarıma,

Burada ifade edemeyeceğim kadar çok benim için fedakarlıkları ve üzerimde emekleri olan değerli aileme, kıymetli eşime ve canım kızıma,

Sonsuz teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Mesut ÇELİK

ÖZET

Oksijen Glukoz Yoksunluğu ile Oluşturulan İskemik Miyelin Hasarı Modelinde Resveratrolün Oligodendrosit İyon Kanalları Üzerine Etkisi

Amaç: Multipl skleroz (MS), Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'de miyelin kaybı ile karakterize kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. MS patogeneğinde oligodendrosit iyon kanal düzensizlikleri önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, oksijen-glukoz yoksunluğu (OGD) ile oluşturulan iskemik miyelin hasarı modelinde resveratrolün Kir4.1, TRPM4 ve TRPA1 iyon kanalları üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metot: 10-17 günlük BALB/c türü farelerden elde edilen 225 µm kalınlığındaki akut beyin dilimleri Kontrol, Resveratrol (50 µM), İskemi (OGD) ve Resveratrol+İskemi olmak üzere dört gruba ayrıldı. Oligodendrositler Olig2 immünofloresan boyaması ile doğrulandı. Tüm-hücre voltaj-clamp yöntemiyle patch-clamp kayıtları alındı. TRPA1, Kir4.1 ve TRPM4 akım komponentleri sırasıyla polygodial, BaCl₂ ve 9-fenantrol uygulamaları sonrası subtraction yöntemiyle ayrıştırıldı. Olig2, Kir4.1, TRPM4, BCL-2, BAX ve Kaspaz-3 protein ekspresyonları Western blot ile değerlendirildi.

Bulgular: İskemi grubunda Kir4.1 ve TRPM4 akım komponentlerinin belirgin şekilde baskılandığı saptandı. Resveratrol+iskemi grubunda akım genlikleri düşük kalmasına rağmen, iyon kanallarının farmakolojik modülasyonu iskemik gruba göre anlamlı düzeyde korundu ($p<0.05$). Western blot analizinde TRPM4 ve Olig2 ekspresyonlarının resveratrol+iskemi grubunda azaldığı belirlendi ($p<0.05$). Kir4.1, BCL-2, BAX ve Kaspaz-3 düzeylerinde ise anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

Sonuç: Akut iskemik miyelin hasarında Kir4.1 fonksiyon kaybı büyük ölçüde reversibl post-translasyonel mekanizmalarla ilişkili görünürken, TRPM4 hem fonksiyonel hem protein düzeyinde azalmıştır. Resveratrol, iyon kanallarının elektrofizyolojik yanıt verilebilirliğini koruyarak nöroprotektif potansiyel sergilemiştir. Bu bulgular MS için yeni nöroprotektif yaklaşımlara katkı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: İskemik miyelin hasarı, Kir4.1, Multipl skleroz, Oligodendrosit, Resveratrol, TRPM4

ABSTRACT

The Effect of Resveratrol on Oligodendrocyte Ion Channels in an Ischemic Myelin Injury Model Induced by Oxygen-Glucose Deprivation

Objective: Multiple sclerosis (MS) is a chronic neurodegenerative disease characterized by myelin loss in the central nervous system, in which oligodendrocyte ion channel dysfunction plays a key pathogenic role. This study investigated the effects of resveratrol on Kir4.1, TRPM4, and TRPA1 ion channels in an oxygen–glucose deprivation (OGD)-induced ischemic myelin injury model.

Materials and Methods: Acute brain slices (225 μm thick) obtained from 10–17-day-old BALB/c mice were divided into four groups: Control, Resveratrol (50 μM), Ischemia (OGD), and Resveratrol+Ischemia. Oligodendrocytes were identified by Olig2 immunofluorescence staining. Patch-clamp recordings were performed using the whole-cell voltage-clamp configuration. TRPA1, Kir4.1, and TRPM4 current components were isolated by the subtraction method following administration of polygodial, BaCl_2 , and 9-phenanthrol, respectively. Protein expression levels of Olig2, Kir4.1, TRPM4, BCL-2, BAX, and Caspase-3 were evaluated by Western blot analysis.

Results: Kir4.1 and TRPM4 current components were markedly suppressed in the ischemia group. Although current amplitudes remained reduced in the Resveratrol+Ischemia group, pharmacological modulation of ion channels was significantly preserved compared with the ischemia group ($p < 0.05$). Western blot analysis showed reduced TRPM4 and Olig2 expression levels in the Resveratrol+Ischemia group ($p < 0.05$), whereas no significant differences were detected in Kir4.1, BCL-2, BAX, or Caspase-3 expression levels ($p > 0.05$).

Conclusion: In acute ischemic myelin injury, the loss of Kir4.1 function appears to be largely associated with reversible post-translational mechanisms, whereas TRPM4 is reduced at both functional and protein levels. Resveratrol demonstrated neuroprotective potential by preserving the electrophysiological responsiveness of these ion channels. These findings may contribute to the development of novel neuroprotective strategies for multiple sclerosis.

Keywords: Ischemic myelin injury, Kir4.1, Multiple sclerosis, Oligodendrocyte, Resveratrol, TRPM4

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
μm	: Mikrometre
9-fenantrol	: TRPM4 kanal blokeri (9-phenanthrol)
aCSF	: Yapay Beyin Omurilik Sıvısı (artificial cerebrospinal fluid)
ADEM	: Akut Yaygın Ensefalomyelit
ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
AMPA	: α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit
ANOVA	: Varyans analizi (Analysis of variance)
APS	: Amonyum Persülfat
ATP	: Adenozin Trifosfat
Ba⁺²	: Baryum iyonu
BaCl₂	: Baryum klorür
BAX	: Bcl-2 ilişkili X proteini (Bcl-2-Associated X protein)
BCL-2	: B-hücreli Lenfoma 2 (B-cell Lymphoma 2)
CaCl₂	: Kalsiyum Klorür
Cav1.2/Cav1.3	: Voltaj Kapılı L Tipi Kalsiyum Kanalları

Ca²⁺	: Kalsiyum iyonu
CC	: Akım-kenetleme (current-clamp)
CO₂	: Karbondioksit
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
E_{rev}	: Reversal (denge) potansiyeli
EAE	: Deneyisel Otoimmün Ensefalomyelit
ECL	: Geliştirilmiş Kemilüminesans (Enhanced Chemiluminescence)
EGTA	: Etilen Glikol Tetraasetik Asit
ER	: Endoplazmik Retikulum
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GHK	: Goldman–Hodgkin–Katz
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
GTP	: Guanozin Trifosfat
HEPES	: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
HRP	: Yaban Turpu Peroksidazı (Horseradish Peroxidase)
H⁺	: Hidrojen iyonu
IL-10	: İnterlökin 10
IL-1β	: İnterlökin 1 Beta
I–V	: Akım-voltaj (current-voltage)

KBB	: Kan-Beyin Bariyeri
KCl	: Potasyum Klorür
KCNJ10	: Kir4.1 Kanalını Kodlayan Gen
KCNK3	: TASK-1 Kanalını Kodlayan Gen
kDa	: Kilodalton
Kir4.1	: İçe Doğrultucu Potasyum Kanalı 4.1 (Inwardly Rectifying Potassium Channel 4.1)
KOH	: Potasyum Hidroksit
Kv1.3/Kv1.5	: Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları
K⁺	: Potasyum iyonu
LPC	: Lizofosfatidilkolin
M	: Molar
MBP	: Miyelin Bazik Proteini (Myelin Basic Protein)
mg	: Miligram
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
min	: Dakika
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MOG	: Miyelin Oligodendrosit Glikoproteini
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
ms	: Milisaniye

MS	: Multipl Skleroz
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
mV	: Milivolt
MΩ	: Megaohm
nA	: Nanoamper
NaCl	: Sodyum Klorür
NaHCO₃	: Sodyum Bikarbonat
Nav1.2/Nav1.6	: Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları
NCX	: Sodyum-Kalsiyum Değişiricisi
NHE	: Sodyum-Hidrojen Değişiricisi
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NRF2	: Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2
NO	: Nitrik Oksit
nS	: Nanosiemens
OGD	: Oksijen-Glukoz Yoksunluğu (Oxygen-Glucose Deprivation)
Olig2	: Oligodendrosit Transkripsiyon Faktörü 2
OPC	: Oligodendrosit Projenitör Hücresi (Oligodendrocyte Precursor Cell)
pA	: Pikoamper
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate-Buffered Saline)
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

PFA	: Paraformaldehit
pH	: Hidrojen İyonu Konsantrasyonunun Negatif Logaritması
PLP	: Proteolipid Protein
polygodial	: TRPA1 Kanal Blokeri
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
PVDF	: Poliviniliden Florür
RI	: Doğrultma İndeksi (Rectification Index)
RM ANOVA	: Tekrarlı ölçümler ANOVA (repeated-measures ANOVA)
RMP	: Dinlenim Membran Potansiyeli (Resting Membrane Potential)
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
RPM	: Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)
sCaLTs	: Spontan Kalsiyum Geçişleri (Spontaneous Calcium Transients)
SD	: Standart Sapma (Standard Deviation)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SEM	: Standart Hata Ortalaması (Standard Error of the Mean)
Shh	: Sonic Hedgehog
SIRT1	: Sirtuin 1
SOCE	: Depo Kontrollü Kalsiyum Girişi (Store-Operated Calcium Entry)

STIM	: Stromal İnteraksiyon Molekölü (Stromal İnteraction Molecule)
SUR1	: Sülfonilüre Reseptörü 1
TASK-1	: İki Por Domeyinli Potasyum Kanalı (KCNK3 Geni)
TBST	: Tris Tamponlu Salin + Tween-20
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
Th17	: Yardımcı T17 hücreleri
TMEM16A	: Anoctamin-1 kanalı
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
Tris-HCl	: Tris(Hidroksimetil)Aminometan Hidroklorür
TRP	: Geçici Reseptör Potansiyeli (Transient Receptor Potential)
TRPA1	: Geçici Reseptör Potansiyeli Ankinin 1
TRPM2	: Geçici Reseptör Potansiyeli Melastatin 2
TRPM4	: Geçici Reseptör Potansiyeli Melastatin 4
TRPM8	: Geçici Reseptör Potansiyeli Melastatin 8
V	: Volt
V_{rev}	: Reversal (Denge) Potansiyeli
VC	: Voltaj-kenetleme (voltage-clamp)
Wnt	: Wingless-Related İntegration Site (Sinyal Yolağı)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Oligodendrosit projenitör hücrelerinin (OPC) miyelin oluşturma aşamaları. ...	4
Şekil 2.2. MS patofizyolojisinde bazı oligodendrosit iyon kanallarının rolü.	8
Şekil 2.3. OGD ile oluşan patofizyolojik mekanizmalar ve demiyelinizasyon.	18
Şekil 2.4. Resveratrolün kimyasal yapısı.	19
Şekil 2.5. Patch-clamp yönteminde kullanılan kayıt türleri.	23
Şekil 3.1. Hücre dışı solüsyonların hazırlanması ve beyin dilimlerinin elde edilmesi. ...	29
Şekil 3.2. Kullanılan beyin kesitlerinin alındığı bölge.	30
Şekil 3.3. Alınan beyin dokularına yapılan işlemler.	31
Şekil 3.4. Elektrofizyolojik kayıtların alınması.	33
Şekil 3.5. Kimyasal solüsyonların uygulanması ve patch-clamp kayıtlarının alınması protokolü.	36
Şekil 3.6. Konfokal görüntüleme uygulamasının aşamaları.	39
Şekil 3.7. Western blot analizleri için yapılan işlemler.	41
Şekil 4.1. Patch-clamp kayıtlarının alındığı oligodendrosit hücrelerinin konfokal mikroskopi görüntüleri.	46
Şekil 4.2. Grupların Dinlenim Membran Potansiyeli (RMP) değerleri.	48
Şekil 4.3. Bazal (kontrol), iskemi, +BaCl ₂ , +9-fenantröl uygulamaları sonrası içeri yönlü (inward) akımlar.	50
Şekil 4.4. Kontrol grubu Kontrol-H2 hücresi için ramp protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi.	51
Şekil 4.5. Kontrol grubu (Kontrol-H5) step protokolü ham akım kayıtları.	52
Şekil 4.6. Kontrol grubu (Kontrol-H5) step protokolü I-V eğrisi ve subtraction analizi.	52

Şekil 4.7. Kontrol grubu (n = 5) hücrelerinde Kir4.1 ve TRPM4 komponent genliği, reversal potansiyeli ve doğrultma indeksi.....	53
Şekil 4.8. Resveratrol grubu (Resv-H5) step protokolü ham akım kayıtları.....	54
Şekil 4.9. Resveratrol grubu (Resv-H5) için step protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi.....	54
Şekil 4.10. Resveratrol grubu (Resv-H5) için ramp protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi.....	55
Şekil 4.11. Resveratrol grubu (Resv-H1) için ramp protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi.....	56
Şekil 4.12. Resveratrol grubu (n = 5) hücrelerinde Kir4.1 ve TRPM4 komponent genliği, reversal potansiyeli ve doğrultma indeksi değerleri.	57
Şekil 4.13. İskemi grubu (Resv-H5) step protokolü ham akım kayıtları.....	58
Şekil 4.14. İskemi grubu (İskemi-H3) için step protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi.....	59
Şekil 4.15. İskemi grubu (İskemi-H3) hücresi için ramp protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi.	60
Şekil 4.16. İskemi grubu (İskemi-H6) analizi. için ramp protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi.	61
Şekil 4.17. İskemi grubu için her hücrenin Kir4.1 ve TRPM4 komponent genliği, reversal potansiyeli ve doğrultma indeksi değerleri.	62
Şekil 4.18. Resveratrol+İskemi grubu (İskRes-H1) hücresi için step protokolü ham akım kayıtları.	63
Şekil 4.19. Resveratrol+İskemi grubu (İskRes-H1) hücresi için step protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi.....	63
Şekil 4.20. İskemi+Resveratrol grubu (İskRes-H1) hücresi için ramp protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi.....	64
Şekil 4.21. İskemi+Resveratrol grubu (İskRes-H7) hücresi için step protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi.....	65

Şekil 4.22. İskemi+Resveratrol grubu (İskRes-H7) hücresi için ramp protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi.....	66
Şekil 4.23. Resveratrol+İskemi grubu için her hücrenin Kir4.1 ve TRPM4 komponent genliği, reversal potansiyeli ve doğrultma indeksi değerleri.	67
Şekil 4.24. Gruplara göre Kir4.1 (A) ve TRPM4 (B) komponent genliklerinin karşılaştırması.	69
Şekil 4.25. Gruplardaki uygulamalara göre reversal potansiyel (V-rev) değişimleri.	70
Şekil 4.26. Gruplara göre Kir4.1 (A) ve TRPM4 (B) komponentlerinin reversal potansiyellerinin karşılaştırması.	71
Şekil 4.27. Gruplara göre potasyum iletkenliği (gk) değerlerinin karşılaştırılması.	72
Şekil 4.28. Gruplar arası GHK reversal denklemi ile hesaplanan Na^+/K^+ geçirgenlik oranlarının karşılaştırılması.....	73
Şekil 4.29. Dört deney grubunda Olig2 protein ekspresyonunun kantifikasyon sonrası kıyaslanması protein ekspresyonu.....	75
Şekil 4.30. Dört deney grubunda Kir4.1 protein ekspresyonunun kantifikasyon sonrası kıyaslanması protein ekspresyonu.....	76
Şekil 4.31. Dört deney grubunda TRPM4 protein ekspresyonunun kantifikasyon sonrası kıyaslanması protein ekspresyonu.....	77
Şekil 4.32. Dört deney grubunda BCL-2 protein ekspresyonunun kantifikasyon sonrası kıyaslanması protein ekspresyonu.....	77
Şekil 4.33. Dört deney grubunda BAX protein ekspresyonunun kantifikasyon sonrası kıyaslanması protein ekspresyonu.....	78
Şekil 4.34. Dört deney grubunda Caspase-3 protein ekspresyonunun kantifikasyon sonrası kıyaslanması protein ekspresyonu.	78

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. Deney sırasında kullanılan kimyasalların listesi.....	25
Tablo 3.2. Deney sırasında kullanılan cihazların ve laboratuvar aletlerinin gösterimi.....	27
Tablo 4.1. Grupların Dinlenim Membran Potansiyeli (RMP) değerleri ve kontrol grubuna kıyasla ikili karşılaştırması.....	48
Tablo 4.2. İskemi ve resveratrol+iskemi gruplarında ardışık uygulama basamaklarında ölçülen içeri yönlü akım değerleri.....	49
Tablo 4.3. Kontrol grubu kanal komponentlerinin nicel parametreleri.....	53
Tablo 4.4. Resveratrol grubu kanal komponentlerinin nicel parametreleri.....	57
Tablo 4.5. Kontrol grubu ile iskemi grubunun bazı parametrelerinin karşılaştırılması.....	58
Tablo 4.6. İskemi grubu kanal komponentlerinin nicel parametreleri.....	62
Tablo 4.7. Resveratrol+İskemi grubu kanal komponentlerinin nicel parametreleri...	67
Tablo 4.8. Gruplara göre Kir4.1 ve TRPM4 komponent genliklerinin değerleri.....	68
Tablo 4.9. Gruplara göre Kir4.1 ve TRPM4 komponentlerinin reversel potansiyelleri.....	71
Tablo 4.10. Gruplara göre potasyum iletkenliği (gK) ve farmakolojik komponent iletkenlikleri.....	73
Tablo 4.11. Blokör-duyarlı komponentlerin reversel potansiyelleri ve GHK reversel denklemi ile hesaplanan görelî Na^+/K^+ geçirgenlik oranları.....	74
Tablo 4.12. Dört deney grubunda altı proteinin ekspresyon düzeyleri.....	79

1. GİRİŞ

Miyelin kılıfı, sinir hücrelerinin uzantıları olan aksonların etrafındaki koruyucu bir yalıtım tabakasıdır (1). Bu tabaka, sinir iletiminin hızını artırır ve sinir iletiminin düzgün bir şekilde gerçekleşmesini sağlar. Miyelin kılıfı, lipit ve proteinlerden oluşur ve sinir liflerini sarar (2). Miyelin kılıf Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'de oligodendrosit denilen glial hücreleri tarafından yapılır. Oligodendrosit progenitor hücreleri (OPC), oligodendrositlerin öncüleri olarak kabul edilir ve miyelin oligodendrosit hücrelerine farklılaşarak miyelin yapım sürecinin başlatılmasından sorumludur (3). Bunun yanında OPC'ler miyelin yapımı ve bakımı için gerekli olan hücresel bileşenleri üretme yeteneğine sahiptirler. Bu hücreler, MSS'deki sinir iletimini hızlandırmak ve sinir liflerini korumak için kritik bir rol oynarlar (4-6). Oligodendrositler, miyelinizasyonun yanı sıra potasyum homeostazı ve aksonal mikroçevrenin düzenlenmesinde görev alan iyon kanalları sayesinde nöronal fonksiyonların devamlılığında önemli rol oynarlar (7).

Demyelinizan hastalıklar, MSS'de (beyin ve omurilik) bulunan miyelin kılıfının hasar görmesi veya kaybı ile karakterize olan nörolojik bozukluklardır. Bu tür hastalıklar, miyelin kılıfının yıkılması nedeniyle sinir iletiminin bozulması sonucu çeşitli nörolojik semptomların ortaya çıkmasıyla tanınır. Demyelinizan hastalıkların en yaygın olanı Multipl Skleroz (MS)'tir. MS, bağışıklık sisteminin yanlışlıkla kendi miyelin kılıfına saldırması sonucu ortaya çıkar. Hastalık genellikle tekrarlayan nörolojik ataklar ve remisyon dönemleri ile seyreder. MS, görme bozuklukları, hareket sorunları, yorgunluk ve buna benzer başka semptomlara yol açabilir (8).

Resveratrol; üzüm kabuğu ve yer fıstığı gibi kaynaklardan elde edilen, çok yönlü biyolojik etkilerine (anti-inflamatuar, anti-trombosit vb.) ek olarak güçlü nöroprotektif potansiyel barındıran bir polifenoldür. Yapılan çalışmalar resveratrolün iskemiye bağlı beyin hasarına karşı etkili olduğunu ve resveratrolün, vasküler endotelial hücrelerdeki kalsiyum (Ca^{2+}) ile aktive edilen potasyum (K^{+}) kanalları, ventriküler miyositlerdeki L-tipi Ca^{2+} akımları dahil olmak üzere birçok iyon kanalının fonksiyonlarını modüle edebildiğini ileri sürmüştür (9-11).

Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) kanalı nöronların, oligodendrositlerin ve diğer hücre tiplerinin membranlarında bulunan iyon kanalıdır. Bu

kanal ağrı, sıcaklık, inflamasyon ve mekanik uyarıcılar başta olmak üzere bir dizi kimyasal ve fiziksel uyarana karşı hassasiyet gösterir. Ayrıca, TRPA1 kanalları, inflamatuvar yanıtların ve nörojenik inflamasyonun düzenlenmesinde de önemli bir rol oynar. Bu nedenle, TRPA1 kanalları, nörolojik hastalıkların ve ağrı sendromlarının anlaşılması ve tedavisi açısından önemli bir araştırma alanını temsil eder (12, 13). Hamilton ve arkadaşlarının hücre kültüründe iskemik miyelin hasarı modeliyle yaptığı bir çalışmada TRPA1 kanalının farmakolojik olarak antagonize edilmesinin MS sonucu oluşan miyelin hasarını anlamlı derecede azalttığı bulunmuştur (14). İskemide hipoksik şartlardan ötürü oligodendrositlerde artmış hidrojen (H^+) iyonu konsantrasyonu TRPA1 kanalının aktivasyonunu sağlar ve bu durum hücre içerisindeki Ca^{2+} ve Mg^{2+} konsantrasyonlarını artırır. Böylelikle artan bu konsantrasyonlara bağlı olarak oligodendrosit hasarı artabilir. Bu da demiyelinizasyon oluşumunda etkili olabilir (14).

Inwardly Rectifying Potassium Channels/içe doğrultucu potasyum kanalı 4.1 (Kir4.1) kanalı, özellikle MSS'deki nöronlarda ve glial hücrelerde bulunan bir potasyum kanalıdır. Oligodendrosit ve astrosit gibi hücrelerde bu kanal nöronal aktivite sırasında hücre dışı K^+ 'nın uzaklaştırılmasına yardımcı olduğundan, genel işlev kaybı ciddi nörolojik durumlarla ilişkilidir (7). Son araştırmalar, Kir4.1 kanallarının MS patofizyolojisindeki potansiyel rolünün varlığına işaret etmektedir. Kir4.1 kanal aktivitesinin azalmasının astrosit ile oligodendrositlerin işlev bozukluğuna ve bağışıklık sistemi hücrelerinin MSS'de zarar verme yeteneğinin artmasına yol açabileceğini öne sürmektedir. Bu, MS hastalarında görülen demiyelinizasyonun ve nöroinflamasyonun bir sonucu olarak sinir hücrelerinin hasar görmesine katkıda bulunabilir. Bunun yanında yapılan bir çalışmada Kir4.1 kanalının nöronların metabolizması için önemli olan glikoz temini ve laktat uzaklaştırılması noktasında rolleri olduğunu göstermektedir. Bu kanalın eksikliğinde bu fonksiyonlarda bozulma olacağı için demiyelizasyon da artmaktadır (15).

Ca^{2+} ile aktive edilen, seçici olmayan bir katyon kanalı olan geçici reseptör potansiyeli melastatin üyesi 4 (TRPM4)'ün, bağışıklık tepkisinde, insülin salgılanmasında, kardiyovasküler hastalıklarda ve kanserde hücre zarı depolarizasyonuna aracılık ettiği bilinmektedir (16). Oligodendrositlerde bulunan TRPM4 kanalları, membran potansiyelini depolarize ederek nöronal uyarılabilirliği artırabilir ve aynı zamanda bu yolla dolaylı olarak intrasellüler Ca^{2+} konsantrasyonunu artırabilir. Bu, oligodendrositlerin işlevselliğini etkileyebilir ve miyelin oluşturma yeteneklerini azaltabilir. Ayrıca, TRPM4 kanallarının inflamatuvar yanıtları düzenleyebileceği ve bu

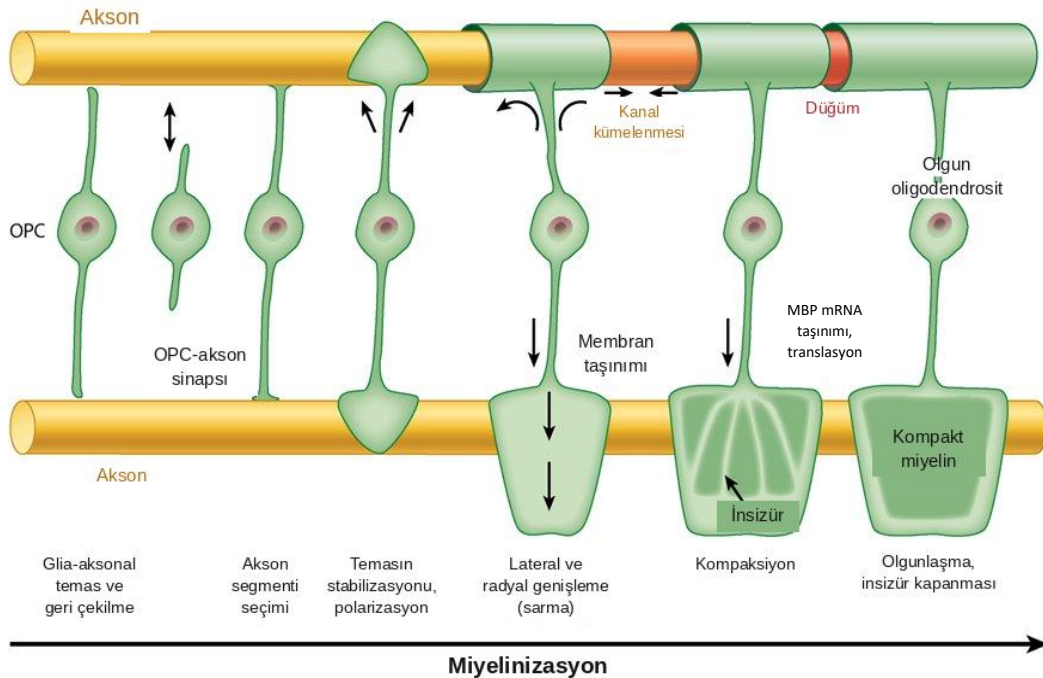
yolla MS'in inflamatuvar bileşenlerini modüle edebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, oligodendrositlerde bulunan TRPM4 kanallarının, MS patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından potansiyel bir hedef olabileceği düşünülmektedir. Farelerde deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) modeliyle yapılmış bir çalışmada, TRPM4'ün knockout edilmesinin klinik semptomları iyileştirdiği ve hastalığın ilerlemesini hafiflettiği gösterilmiştir (16, 17).

Sonuç olarak MS patogenezi, inflamasyonla tetiklenen ancak mitokondriyal disfonksiyon ve iyon kanalı düzensizlikleriyle ilerleyen bir süreçtir. Oligodendrositlerdeki Kir4.1 kaybı ve TRPM4 ile TRPA1 aktivasyonu arasındaki patolojik ilişkinin aydınlatılması ve resveratrol gibi çok yönlü bir potansiyel ajanın, bu kanallar üzerindeki düzenleyici etkilerinin gösterilmesi, kesin tedavisi bulunmayan MS hastalığı için yeni nöroprotektif stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayabilir. Bununla birlikte, oligodendrositlerin Kir4.1, TRPM4 ve TRPA1 iyon kanallarının iskemik miyelin hasarındaki fonksiyonel dinamiklerinin ex vivo akut beyin dilimlerinde tüm-hücre patch-clamp düzeyinde aynı deneysel eksende karakterize edildiği çalışmalar oldukça sınırlıdır. Özellikle resveratrol gibi çok yönlü doğal bir bileşiğin bu üç kanal üzerindeki birleşik elektrofizyolojik etkisi henüz tam olarak tanımlanmamıştır. Mevcut literatür çoğunlukla nöron veya hücre kültürü modellerinde yapılan, tek kanal hedefli çalışmaları içermekte olup, OGD ile indüklenen iskemik koşullarda farmakolojik olarak ayrıştırılmış kanal komponentlerinin *Corpus Callosum* oligodendrositleri özelinde değerlendirildiği bütüncül bir veri seti bulunmamaktadır. Bu çalışma, söz konusu bilgi boşluğunu doldurmak amacıyla oligodendrosit-spesifik koşullarda Kir4.1, TRPM4 ve TRPA1 akım komponentlerini eş zamanlı ele almakta ve resveratrolün koruyucu rolünü hem fonksiyonel düzeyde hem de (Kir4.1 ve TRPM4 için) protein ekspresyon düzeyinde değerlendirmektedir. Bu bilgiler ışığında bu çalışmanın amacı; oluşturulan oksijen-glukoz yoksunluğu (OGD) iskemik modelinde, oligodendrositlerde bulunan Kir4.1, TRPA1 ve TRPM4 kanallarının patch-clamp yöntemiyle fonksiyonlarının ve Kir4.1 ile TRPM4 kanallarının western blot yöntemiyle protein ekspresyon düzeylerinin ölçülerek resveratrolün bunlar üzerine etkinliğini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Miyelin Kılıf

Miyelin kılıf, omurgalı canlıların sinir sisteminde aksonların etrafını sararak elektriksel yalıtım sağlayan, lipitten zengin, özelleşmiş bir kılıf yapısıdır. MSS’de oligodendrositler tarafından, periferik sinir sisteminde (PSS) ise Schwann hücreleri tarafından üretilir. Bu kılıf, aksiyon potansiyelinin Ranvier düğümleri arasında sıçrayıcı (saltatory) iletimle yüksek hızda ve enerji verimli ilerlemesini sağlar. Ağırlığının yaklaşık %70-80’ini lipidlerin oluşturduğu miyelin kılıf, yüksek kolesterol içeriği ile fosfolipitler (fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin), sfingolipitler (sfingomiyelin) ve glikolipitlerden (galaktoserebrozid ve sulfatid) oluşan kompleks bir lipid kompozisyonuna sahiptir. Bu kılıf, Miyelin Bazık Proteini (MBP) ile Proteolipid Protein (PLP) gibi özgül proteinler sayesinde diğer biyolojik membranlardan ayrılır (18, 19). Yalıtım işlevinin ötesinde, aksonlara metabolik destek (örneğin laktat transferi) de sağlayarak nöronal sağkalım ve aksonal bütünlük için kritik bir mikroçevre oluşturur (1, 20).



AR Nave K-A, Werner HB. 2014.
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 30:503–33

Şekil 2.1. Oligodendrosit Projenitör Hücrelerinin (OPC) miyelin oluşturma aşamaları (1).

MSS'de miyelin oluşumu (myelinizasyon), oligodendrosit prekürsör hücrelerinin (OPC) olgun oligodendrositlere farklılaşmasıyla başlayan karmaşık bir süreçtir (Şekil 2.1.). Tek bir oligodendrosit, bazen 50'ye varan uzantı göndererek birden fazla akson segmentini aynı anda miyelinleyebilir. Bu süreç, oligodendrositlerin olağanüstü membran sentez kapasitesi ve yüksek metabolik hızı gerektirir. Yüksek enerji gereksinimi nedeniyle oligodendrositler oksidatif stres ve iskemi/hipoksiye ek olarak eksitotoksisiteye karşı oldukça duyarlıdır. Özellikle glutamat ve aspartat gibi eksitator amino asitlerin AMPA/kainat ve NMDA reseptörlerini aşırı uyarması sonucu gelişen Ca^{2+} girişine bağlı eksitotoksik süreçler oligodendrosit hasarı ve miyelin kaybına yol açabilmektedir. Miyelin kılıfın stabilitesi, hücre içi iyon dengesinin titiz korunmasına bağlıdır. Bu denge bozulduğunda miyelin tabakalarında şişme, vakuolizasyon ve sonunda demiyelinizasyon meydana gelir (1, 14, 18, 21-23).

2.1.1. Demiyelinizan Hastalıklar

Demiyelinizan hastalıklar, MSS veya PSS'de aksonları saran miyelin kılıfının hasar veya kaybıyla karakterize heterojen nörolojik bozukluklardır. Miyelin, oligodendrositler ve Schwann hücreleri tarafından üretilen, elektriksel iletimi hızlandıran bir membran yapısıdır ve bütünlüğünün bozulması sinir iletiminde azalmaya, buna bağlı duyuşal-motor-bilişsel disfonksiyonlara yol açar. Patogeneizde otoimmün yanıtlar, inflamasyon, enfeksiyonlar, metabolik/genetik/çevresel faktörler rol oynar. En yaygın olanı kronik ve tekrarlı inflamasyonlarla karakterize olan MS hastalığıdır. Bu hastalık miyelinde inflamasyon, demiyelinizasyon, gliosis ve aksonal kayıp içeren ubo plakları denen lezyonlarla ortaya çıkar. Güncel çalışmalar, bu hastalıkların miyelin kaybının ötesinde aksonal dejenerasyon ve nörodejenerasyonu içerdiğini, progresif evrelerde kalıcı sakatlıkta kritik olduğunu vurgular. MS dışında Akut Yaygın Ensefalomyelit (ADEM), Nöromiyelit optika spektrum bozukluğu (NMOSD veya Devic hastalığı), Baló sklerozu ve lökodistrofileri gibi hastalıklar da demiyelinizan hastalıklardandır (24-26).

Güncel araştırmalar, multipl skleroz (MS) patogenezinin yalnızca immünolojik dengesizliklerle sınırlı olmadığını, sürece sanal hipoksi (virtual hypoxia) olarak tanımlanan bir enerji yetersizliği mekanizmasının da eşlik ettiğini göstermektedir. İnflamasyonun tetiklediği mitokondriyal disfonksiyon ve ödem aksonal yapılarda ve oligodendrositlerde ciddi bir enerji krizine yol açarak ATP seviyelerini düşürmekte, bu

durum ise Na^+/K^+ -ATPaz gibi iyon pompalarının fonksiyonel kaybına neden olmaktadır. Neticede, iskemik hasara benzer bir kaskadın devreye girmesiyle miyelin bütünlüğü bozulmakta, sinir iletimi kesintiye uğramakta ve kalıcı nörolojik defisitler ortaya çıkmaktadır. (27-29).

Oligodendrositlerdeki iyon kanalları, miyelin bütünlüğünün korunmasında ve MS patofizyolojisinde kritik rol oynar. Kir4.1 kanalları, nöronal aktivite sırasında açığa çıkan potasyumu hücre içine alarak "potasyum tamponlaması" sağlar ve miyelin stabilitesini korur. MS ile iskemik hasarda Kir4.1 ekspresyonunun azalması potasyum birikimine, hücre depolarizasyonuna ve oligodendrosit ölümüne yol açar. Enerji tükenmesinde aktive olan TRPM4 kanalları ise aşırı sodyum girişi ve su akışıyla ozmotik şişmeye neden olarak miyelin ayrışmasını tetikler. Bu mekanizma iskemik miyelin hasarının temel unsurlarındandır (16, 30).

Oksidatif stres ve inflamatuvar mediatörlere duyarlı TRPA1 kanallarının aktivasyonu, oligodendrositlerde hücre içi kalsiyum seviyelerini patolojik düzeylere yükseltir. Miyelin hasarlı bölgelerde kalsiyum birikimi, kalpainler gibi kalsiyuma bağımlı proteazları tetikleyerek miyelin proteinlerini ve hücre iskeletini yıkar. MS'in inflamatuvar ve iskemik bileşenlerinde Kir4.1 fonksiyon kaybı ile TRPM4/TRPA1 aşırı aktivasyonu, miyelin yıkımını tetikleyen kısır döngü oluşturur. (14, 31, 32).

2.2. Multipl Skleroz (MS)

Multipl Skleroz (MS); MSS'de kronik, inflamatuvar, demiyelinizan ve nörodejeneratif karakterli ataklarla seyreden bir hastalık olup, genç erişkinlerde travma dışı nörolojik engelliliğin en yaygın nedenidir. Hastalığın etyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da genetik olarak yatkın bireylerde viral enfeksiyonlar (örneğin Epstein-Barr virüsü), D vitamini eksikliği ve sigara gibi çevresel faktörlerin tetiklemesiyle ortaya çıkan karmaşık bir nöroinflamatuvar süreç olduğu kabul edilmektedir (33-35). Patolojik olarak MS; kan-beyin bariyerinin (KBB) bozulması, Th1 ve Th17 artışı ile Treg azalması sonucu perivasküler alana otreaktif T ve B lenfositlerinin infiltrasyonu, mikrogliya/makrofaj aktivasyonu, oligodendrosit kaybı ve aksonal hasar ile karakterizedir. MS geleneksel olarak bir MSS beyaz cevher hastalığı olarak kabul edilse de güncel veriler gri maddede de yaygın demiyelinizasyon gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. Özellikle ilerleyici MS formlarında belirginleşen subpial kortikal lezyonlar, inflamatuvar yanıtın beyaz maddeye oranla daha düşük olması ve

mevcut görüntüleme tekniklerinin (MRG) sınırlılıkları nedeniyle sıklıkla gözden kaçmaktadır. Buna rağmen, gri madde lezyonlarının içerdiği belirgin aksonal ve nöronal hasar, kortikal patolojilerin MS patogenezindeki kritik rolünü ortaya koymaktadır. (27, 36, 37).

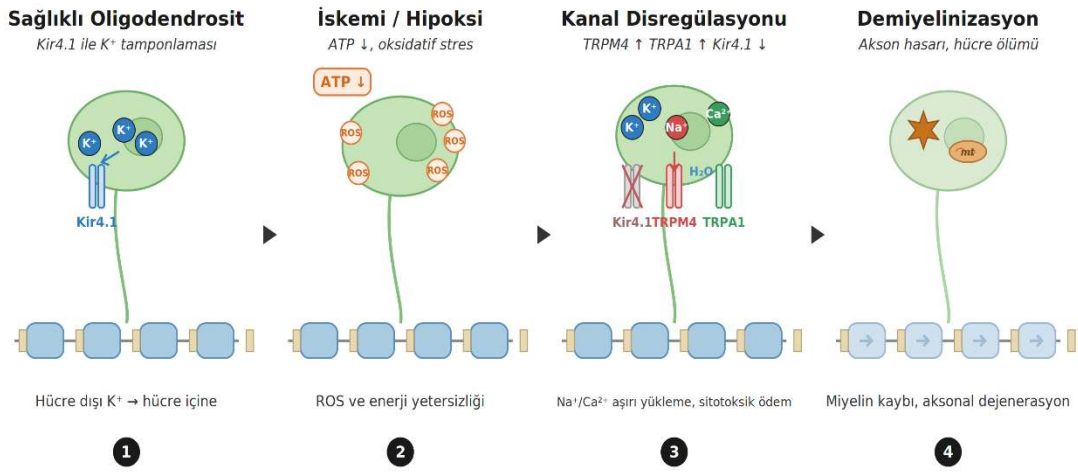
Hastalığın klinik seyri, 2013 yılında yenilenen uluslararası kriterlere göre temel fenotiplere ayrılmıştır. Hastaların yaklaşık %85'i, akut ataklar ve bunları takip eden tam veya kısmi iyileşme dönemleriyle karakterize "Ataklarla Seyreden MS" (Relapsing-Remitting MS, RRMS) tanısı alır. Bu formda başlangıçta inflamatuvar aktivite ön plandayken, zamanla nörolojik rezervin tükenmesiyle birlikte ataklardan bağımsız bir kötüleşme süreci olan "Sekonder Progresif MS" (SPMS) evresine geçiş görülür. Hastaların %10-15'lik bir kısmı ise başlangıçtan itibaren iyileşme dönemleri olmaksızın ilerleyici sakatlık gelişimi gösteren "Primer Progresif MS" (PPMS) grubunu oluşturur. Güncel görüşe göre, fenotipik farklılıklara rağmen tüm formların altında yatan ortak patoloji, periferik immün hücre girişinden ziyade, MSS parankimi içine hapsolmuş kronik inflamasyon (smouldering plaques) ve buna eşlik eden metabolik tükenmişliktir (38-41).

MS patofizyolojisinde nörodejenerasyonu açıklayan en güçlü mekanizmalardan biri, "sanal hipoksi" (virtual hypoxia) hipotezidir. İnflamasyon bölgesindeki aktive olmuş mikrogliya ve makrofajlardan salınan Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Nitrik Oksit (NO), mitokondriyal solunum zinciri enzimlerini inhibe ederek oksidatif fosforilasyonu bozar. Bu durum, doku perfüzyonu ve oksijen sunumu normal olsa bile, aksonların ve oligodendrositlerin oksijeni kullanamayarak ağır bir enerji krizine girmesine neden olur. Miyelin kılıfı üreten ve aksonal metabolizmayı destekleyen oligodendrositler, vücudun en yüksek metabolik hızına sahip hücrelerinden biri olduğu için ATP eksikliğine karşı aşırı duyarlıdırlar. Enerji yetmezliği, hücre zarındaki iyon gradiyentini koruyan Na^+K^+ -ATPaz pompalarının çalışmasını bozar ve bu noktada iyon kanallarının patolojik aktivasyonu devreye girerek hücre ölümünü tetikler (40, 42, 43).

2.2.1. Multipl Skleroz (MS) ve İyon Kanalları

Multipl skleroz patofizyolojisinde oligodendrositler ve oligodendrosit öncül hücrelerinde yer alan iyon kanalları, miyelin bütünlüğü ile aksonal iletim ve remiyelinizasyon kapasitesinin düzenlenmesinde kilit rol oynamaktadır (44). Özellikle Kir ve Kv ailesi gibi potasyum kanalları, hücre dışı K^+ dengesinin korunması ile membran potansiyelinin regülasyonu ve akson-glia etkileşiminin sürdürülmesi bakımından kritik

öneme sahiptir (45, 46). Bununla birlikte voltaj kapılı sodyum, kalsiyum ve klorür kanallarının yanı sıra TRP ve belirli ligand kapılı kanallar OPC'lerin proliferasyon, migrasyon ve diferansiyasyon süreçleri ile miyelin üretimi üzerinde doğrudan etkilidir. MS lezyonlarında bu kanal ailelerine ait gen ekspresyonunda gözlenen belirgin değişimlerin nöroinflamasyon, iyon homeostazının bozulması, enerji yetersizliği, demiyelinizasyon ve aksonal dejenerasyon süreçleriyle yakından ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Bu doğrultuda, oligodendrosit iyon kanalları yalnızca hücresel işlev kaybının birer göstergesi değil, aynı zamanda remiyelinizasyonu teşvik etmek ve aksonal hasarı sınırlamak adına stratejik terapötik hedefler olarak değerlendirilmektedir (46-48) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. MS patofizyolojisinde bazı oligodendrosit iyon kanallarının rolü. (1) Sağlıklı hücre, (2) iske mi sonucu ATP düşüşü, (3) kanal düzensizlikleri, (4) demiyelinizasyon oluşumu.

Oligodendrosit ve akson hasarında, iyon kanalları arasındaki dengenin bozulması kritik bir yürütücü mekanizmadır. Sağlıklı MSS'de, oligodendrositlerde yoğun olarak bulunan Kir4.1 (KCNJ10) kanalları, nöronal aktivite sırasında açığa çıkan K⁺'u hücre içine alarak "uzamsal tamponlama" yapar ve ekstraselüler ortamı düzenler. Ancak MS plaklarında, normal görünümlü beyaz cevherde ve iskemik/hipoksik koşullarda Kir4.1 ekspresyonunun ve fonksiyonunun dramatik şekile azaldığı gösterilmiştir (7, 49, 50). Bu kayıp, ekstraselüler alanda K⁺ birikimine, glutamat taşıyıcılarının tersine dönmesine ve eksitotoksisiteye zemin hazırlar. Ayrıca bazı hastalarda Kir4.1'e karşı gelişen otoantikorların varlığı, bu kanalın doğrudan bir immün hedef olduğunu da düşündürmektedir (51-53).

Kir4.1 kaybına eşlik eden ve hücre ölümünü asıl hızlandıran süreç ise TRPM4 kanallarının fonksiyonel bozulmasıdır. Fizyolojik koşullarda kapalı olan veya düşük aktivite gösteren TRPM4 kanalları, ATP seviyeleri düştüğünde (iskemi/hipoksi benzeri durumlarda) ve hücre içi kalsiyum arttığında aktive olur. Aktive olan TRPM4, hücre içine masif Na^+ girişine izin verir ancak Ca^{2+} geçirgenliği yoktur. Hücre içinde artan sodyum konsantrasyonu, ozmotik su girişini tetikleyerek ozmotik hücre şişmesine (sitotoksik ödem) neden olur (16, 54, 55). Ayrıca anaerobik metabolizmanın artmasıyla oluşan laktik asit birikimi, hücre içi H^+ iyonlarının yükselmesine ve metabolik asidoza yol açar. Bu, hücre içi pH'ı dengelemek için Na^+/H^+ değiştiricisini (NHE) aktive eder. NHE de H^+ 'ı dışarı atarken Na^+ girişine neden olarak hücre içi Na^+ birikimini tetikler. Yükselen Na^+ konsantrasyonu ise $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değiştiricisini (NCX) ters yönde çalıştırarak aşırı Ca^{2+} girişini sağlar. Aşırı kalsiyum yüklenmesi mitokondriyal hasar, proteaz aktivasyonu ve oksidatif stres aracılığıyla hücreyi nekrotik ölüm döngüsüne sürükler (56, 57). Yapılan deneysel çalışmalarda, TRPM4 inhibisyonunun veya genetik olarak silinmesinin (knock-out), hem EAE hem de iskemik OGD modellerinde nöroproteksiyon sağladığı ve akson kaybını azalttığı kanıtlanmıştır (16, 54, 55).

Multipl skleroz patofizyolojisinde TRPA1 kanalı nöroinflamasyon, demiyelinizasyon ve nöropatik ağrı süreçlerinde kritik bir aracı olarak öne çıkmaktadır (58). Oligodendrositlerde ve astrositlerde eksprese edildiği saptanan bu iyon kanallarının aktivasyonu, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunu artırarak miyelin hasarını tetiklemekte ve yeni miyelin oluşumunu engellemektedir (59, 60). Deneysel MS modellerinde, TRPA1 eksikliğinin veya farmakolojik inhibisyonunun olgun oligodendrositlerin apoptozunu azalttığı, spinal korddaki nöroinflamatuvar belirteçleri baskıladığı ve demiyelinizasyon sürecini önemli ölçüde sınırladığı gösterilmiştir (58, 61). Özellikle oksidatif stres ürünleri ve iskemik koşullar tarafından aktive edilen TRPA1'in, pro-apoptotik sinyal yollarını düzenleyerek aksonal hasara katkıda bulunduğu düşünülmektedir (61, 62). Bu bulgular, TRPA1 kanallarının MS tedavisinde hem miyelini korumak hem de nöropatik semptomları hafifletmek için stratejik bir terapötik hedef olabileceğini ortaya koymaktadır (58, 59).

2.3. Oligodendrositler ve İyon Kanalları

Oligodendrositler, MSS'de yüksek derecede özelleşmiş glial hücreler olarak görev yapar. Başlıca işlevleri arasında nöron aksonlarının etrafında miyelin kılıf

oluşturarak aksiyon potansiyelinin saltatory (sıçrayıcı) iletimini hızlandırmak yer alır. Bunun yanı sıra oligodendrositler, nöronal enerji metabolizmasına katkıda bulunmak amacıyla aksonlara laktat ve pirüvat gibi yüksek enerjili substratları sağlayarak enerji desteği sunar. Bu destek, miyelin tabakasının aksine aksiyona doğrudan erişim sağlayan metabolik kanallar ve monokarboksilat taşıyıcılar aracılığıyla gerçekleşir (63, 64). Ayrıca, oligodendrositler glia-akson uzun vadeli bütünlüğünü destekleyen metabolik ve yapısal destek mekanizmaları sağlarlar (63, 65). Oligodendrosit oluşum süreci nöral kök hücrelerin farklılaşarak oligodendrosit progenitör hücrelerine (OPC) dönüşmesi, ardından immatür oligodendrositlerin oluşması ve son aşamada matür miyelin üreten hücrelerin ortaya çıkması ile karakterizedir. Bu farklılaşma süreci oldukça karmaşık bir moleküler sinyal ağı tarafından düzenlenir. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF), Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF), İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1) gibi büyüme faktörleri ile Notch, Wnt ve Sonic hedgehog (Shh) sinyal yolları bu süreçte önemli rol oynar (66).

Oligodendrositlerin, miyelin oluşumu ve aksonal destek görevlerinin yerine getirilmesi için de çok sayıda iyon kanalı ve taşıyıcı protein kritik öneme sahiptir. Bu yapılar membran potansiyelinin korunması, iyon homeostazının sağlanması, hücre içi sinyal iletimi ve özellikle Ca^{2+} homeostazının düzenlenmesi gibi temel süreçleri düzenlerken aynı zamanda oligodendrosit progenitör hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması, miyelin oluşumu ve hücre ölüm mekanizmaları üzerinde belirleyici etkileri vardır (16, 30, 67). Oligodendrositlerde en iyi karakterize edilmiş potasyum kanalları arasında inward-rectifier K^+ kanalları (özellikle Kir4.1) yer alır ve bu kanallar potasyumun tamponlanması ile hiperpolarize membran potansiyelinin korunmasında merkezi rol oynar. Voltaj kapılı potasyum kanalları (Kv1.3, Kv1.5) ve bazı iki gözenekli K^+ kanalları (K2P ailesi) ise membran eksitabilitesinin modülasyonuna katkı sağlar (30). Ayrıca voltaj kapılı sodyum kanalları (Nav1.2 ve Nav1.6) da oligodendrositlerde saptanmış olup patolojik durumlarda iyonik homeostazın düzenlenmesi ve akson-glia etkileşimi açısından önemli olabileceği gösterilmiştir. Hücre içi kalsiyum sinyalizasyonu ise voltaj kapılı Ca^{2+} kanalları (L-tipi Cav1.2 ve Cav1.3) ve glutamat reseptörleri (AMPA ve NMDA) aracılığıyla düzenlenir ve bu sistemler oligodendrosit diferansiyasyonu, miyelin oluşumu ile hücrel stres yanıtlarında önemli rol üstlenir (18). Bu çerçevede TRP (Transient Receptor Potential) kanal ailesi, özellikle TRPA1 ve TRPM4 alt tipleri, oksidatif stres ve iskemi gibi patolojik durumlarda stres yanıtları ve Ca^{2+} sinyalleme

düzenlenmesinde kritik konumdadır. TRPA1 blokajının beyaz cevher iskemisinde fonksiyon kaybını azaltabildiği ve TRPM4 kanalının Ca^{2+} ile aktive olup monovalan katyonlara (özellikle Na^+) geçirgenlik sağlayarak membran depolarizasyonuna katkıda bulunduğu raporlanmıştır (14).

İyon kanallarına ek olarak hücrel iyon dengesi, Na^+/K^+ -ATPaz pompası, Na^+/Ca^{2+} değiştiricisi (NCX) ve Na^+/H^+ değiştiricisi (NHE) gibi taşıyıcı sistemler tarafından da düzenlenir. Bu mekanizmalar elektrokimyasal gradyanların korunması ve Ca^{2+} sinyalizasyonunun kontrolü açısından merkezi rol oynarken oligodendrositlerin yüksek enerji gereksinimi nedeniyle enerji metabolizmasıyla doğrudan ilişkilidir (68). Bu nedenle oligodendrosit iyon kanalları ve iyon taşıyıcı sistemleri, yalnızca fizyolojik glial fonksiyonların sürdürülmesi için değil, multipl skleroz gibi demiyelinizan hastalıklarda aksonal hasar, inflamasyon ve nörodejeneratif süreçlerin anlaşılması ile yeni tedavi hedeflerinin geliştirilmesi açısından da kritik bir öneme sahiptir (18, 30).

Depo kontrollü kalsiyum girişi (SOCE), hücre içindeki endoplazmik retikulum (ER) gibi kalsiyum depoları boşaldığında devreye giren bir mekanizmadır. Bu mekanizma, hücrenin kalsiyum dengesini korumak için hücre dışından hücre içine Ca^{2+} girişini sağlar (69). Oligodendrositlerde depo kapılı kalsiyum girişi, ER kalsiyum sensörleri Stromal Interaction Molecule (STIM) 1 ve 2 ile plazma membranındaki ORAI1 kanalının etkileşimiyle yönetilir (70, 71). Bu mekanizma, OPC gelişimi ve miyelin kılıfı oluşumu için kritik olan yerel kalsiyum geçişlerini (sCaLTs) düzenleyen temel unsurdur (72, 73). MS patolojisinde ORAI1 aracılı kalsiyum dengesinin bozulması, miyelinasyon kapasitesini zayıflatmakta ve nöroinflamasyonu tetiklemektedir. Bu durum SOCE yollarını stratejik birer terapötik hedef haline getirmektedir (70, 74).

2.4. TRP Kanalları

Transient Receptor Potential (TRP) kanalları hem MSS hem de PSS fizyolojisinde ve patofizyolojisinde temel rollere sahip transmembran protein kompleksleridir. TRP geninin ilk keşfi, *Drosophila melanogaster* türü sirke sineğinin fotoreseptörlerinde, ışık duyarlılığı bozunmuş bir mutantta yapılmıştır. Bu mutant, parlak ışığa normal yerine geçici (transient) bir yanıt vermiştir (75, 76). Memelilerde TRP kanalları, amino asit dizilim benzerliğine göre altı ana alt ailede sınıflandırılmıştır: TRPC (kanonik), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPA (ankirin), TRPP (polikistin) ve TRPML (mukolipin) (77, 78). Bu iyon kanalları, kimyasal, mekanik ve termal uyarıların yanı sıra

pH, ozmolarite ve çeşitli ligandlar, ikinci haberciler veya sinyal molekülleri tarafından aktive edilen, seçici olmayan katyon kanallarıdır. Bu kanallar MS, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, amiotrofik lateral skleroz (ALS) ve epilepsi başta olmak üzere pek çok nörolojik bozuklukta patofizyolojik süreçlerde yer aldıkları bilinmektedir (78).

2.4.1. TRPA1 Kanalı

Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) kanalı, TRP süper ailesinin ankyrin alt grubuna ait, zengin ankyrin tekrarları içeren kovalent modülasyonlara duyarlı bir kation kanalıdır (59, 79). TRPA proteini insanda ilk olarak fibroblastların onkojenik transformasyonunu inceleyen bir araştırmada tespit edilmiştir. Altı transmembran katmanına sahip olup N terminal dalında 18 ankirin proteini tekrarından oluşmaktadır. İnsanda 8. kromozomundaki 8q13 bandında eksprese edilmektedir (80). *Drosophila*'da 4 adet TRPA kanalı olmasına rağmen memelilerde tek TRPA1 kanalı bulunmaktadır (81). TRPA1 Ca^{2+} , Na^{+} ve K^{+} katyonlarına geçirgen seçici olmayan bir kanaldır (82). MSS'de, dorsal kök gangliyonu, saç folikül hücreleri, trigeminal ve nodoza gangliyonları gibi nosiseptörlerde ve mekanosensör stereosilya ile periferik sinirler gibi duyu terminallerinde özellikle bulunurlar (83). Çevresel toksinler, oksidatif stres ve inflamatuvar mediatörlerle aktive olabilen kanallardır. MSS glial hücrelerde bulunan TRPA1'in, inflamasyon ve nöropatik ağrı süreçlerinde etkili olduğu gösterilmiştir (84, 85). Dış ortam iritanlarına karşı inflamatuvar yanıtta da "bekçi" işlevi gördüğü, çeşitli hücrelerde redoks durumunu ve inflamasyonu düzenlediği bildirilmektedir (79). Bu özellikleriyle TRPA1, çevresel ve endojen stres sinyallerine karşı bir algılayıcı reseptör işlevi görür. Normalde periferik sinir sistemi ağrı reseptörlerinde belirgin olan TRPA1'in fizyolojik rolü, MSS'de daha az anlaşılmıştır ancak artan kanıtlar, TRPA1'in MSS'de nöronların yanında glial hücrelerde de (özellikle oligodendrosit ve astrositlerde) ifade edildiğini ve çeşitli hücrelerde Ca^{2+} sinyallemesini etkileyebileceğini göstermektedir (59, 79).

Yapılan çalışmalar, TRPA1'in tüm beyin genelinde bulunduğunu özellikle beyaz cevher bölgelerinde daha yaygın şekilde ifade edildiğini göstermiştir. *Corpus Callosum* boyunca sıralanan oligodendrositlerde güçlü TRPA1 sinyali gözlenmiştir. CC1 (olgun oligodendrosit), NG2 (progenitör) ve Olig2 gibi hücresel belirteçlerle yapılan çift boyamalarda, *Corpus Callosum*'daki olgun oligodendrositlerin yaklaşık %62'sinde, OPC hücrelerinin ise %64'ünde TRPA1 pozitif bulunmuştur. Gri cevherde bu oran biraz daha

düşüktür (yaklaşık %43). Bunun yanında beyaz cevherdeki astrositlerin de yaklaşık üçte biri TRPA1 pozitif olarak raporlanmıştır (59). Bu veriler, TRPA1'in MSS'de nöronlara ek olarak oligodendrosit ve astrositlerde de yaygın şekilde eksprese olduğunu ve özellikle oligodendrosit soyunda yoğunlaştığını göstermektedir. Ayrıca tek hücre düzeyinde gerçekleştirilen kalsiyum görüntüleme deneylerinde, spesifik TRPA1 agonistleri (örneğin Carvacrol veya JT010) uygulandığında *Corpus Callosum*'daki oligodendrositlerde hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun hızla arttığı gözlenmiştir. Bu durum, TRPA1'in oligodendrosit hücre membranında işlevsel şekilde bulunduğunu ve aktive edilebildiğini kanıtlar (59, 60, 86).

Hipoksi/iskemi ve nöroinflamasyon sırasında artan reaktif oksijen türleri, lipid peroksidasyon ürünleri ve elektrofiller, Ca^{2+} geçirgenliği bulunan TRPA1 kanalını aktive edebilmektedir (87). TRPA1 aktivasyonu; Ca^{2+} girişinin artması, mitokondriyal stres, inflamatuvar yanıt ve hücre ölümüyle ilişkili patolojik süreçlerde rol oynamaktadır (87, 88). Hipoksi ile indüklenen glioblastoma hücre modelinde resveratrol uygulamasının, TRPA1 kanal aktivasyonu ile ilişkili oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal disfonksiyon ve kaspaz-3/-8/-9 düzeylerini azalttığı; glutatyon düzeyi ve glutatyon peroksidaz aktivitesini ise artırdığı bildirilmiştir (89).

2.4.2. TRPM4 Kanalı

TRP süper ailesine mensup sekiz üyeden (TRPM1-TRPM8) oluşan transient reseptör potansiyel melastatin (TRPM) kanalları, Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} ve Zn^{2+} geçişini düzenleyerek membran potansiyeli, iyon homeostazı ve metabolik sinyalizasyon süreçlerinde kritik rol oynarlar (90, 91). TRPM2'nin oksidatif stres, TRPM7'nin magnezyum dengesi ve TRPM8'in termal algı üzerindeki spesifik fonksiyonları hücresel denge için esassen iskemi, inflamasyon veya toksinler gibi patolojik durumlarda bu kanalların aşırı aktivasyonu kontrolsüz katyon girişine sebebiyet verir (91, 92). Meydana gelen sitozolik kalsiyum yüklemesi mitokondriyal disfonksiyonu, reaktif oksijen türlerinin artışı ve kalsiyum bağımlı hücre ölümünü tetikleyerek TRPM kanallarını oksidatif hasar ve hücresel dejenerasyon süreçlerinde merkezi birer moleküler regülatör konumuna taşımaktadır (92, 93).

TRPM4, sodyum iyonlarına geçirgen, kalsiyumla aktive olan ve hücre depolarizasyonunu destekleyen bir nonselektif katyon kanalıdır. TRPM4 sodyum potasyum gibi yalnızca tek değerlikli katyonlara geçirgendir. Kalsiyum gibi iki değerlikli

katyonlara ve anyonlara ise geçirgen değildir (94). Normal dokularda TRPM4 T lenfosit ve mast hücre aktivasyonunu düzenler. Bununla birlikte mast hücrelerinin ve denritik hücre migrasyonunda rol alır. Enflamatuvar dokularda reaktif oksijen radikalleri üretimi ve vasküler endotelyal hücre göçünde TRPM4 rol alır. TRPM4 ekspresyonunun kanserli hücrelerin çoğalması ve metastaz ile ilişkili olduğu bilinmektedir (95). Özellikle inflamasyon sırasında glial hücrelerde ekspresyonu artan TRPM4, hücrel stres yanıtlarını modüle etmektedir (96). Bu nedenle TRPM4 inhibitörlerinin nöroprotektif etkilere sahip olduğu düşünülmektedir (97, 98).

MSS'de TRPM4, nöronlarda ve astrositlerde eksprese edilmektedir. Bunun yanında TRPM4 proteininin OPC ve olgun oligodendrositler dâhil çeşitli glial hücrelerde sitoplazmik ve membranöz düzeyde saptanmıştır. Fizyolojik koşullarda düşük seviyelerde bulunan bu kanal, hipoksi, iskemi veya inflamasyon gibi patolojik durumlarda dramatik bir şekilde yukarı regüle olmaktadır. Özellikle miyelin kılıfı oluşturan oligodendrositler ve aksonal yapılar üzerindeki TRPM4 aktivitesi, enerji metabolizmasının bozulduğu durumlarda hücre içi ATP seviyelerinin düşmesiyle yakından ilişkilidir. ATP seviyesindeki düşüş, kanalı duyarlı hale getirerek normalde fizyolojik olan kalsiyum seviyelerinde bile kanalın açılmasına ve hücre içine aşırı sodyum girişine neden olmaktadır (16, 54).

TRPM4'ün demiyelinizan hastalıklar ve özellikle Multipl Skleroz (MS) ile ilişkisi, çoğunlukla deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) modelleri üzerinden ayrıntılı biçimde ortaya konmuştur. Schattling ve ark. yaptığı bir çalışmada hem EAE hem de insan MS lezyonlarında TRPM4'ün demiyelinize aksonlar üzerinde arttığını ve kanalın aktivitesinin aksonal ve nöronal dejenerasyonu kolaylaştırdığını göstermişlerdir. Buna ek olarak TRPM4'ün genetik silinmesi veya farmakolojik inhibisyonunun klinik skorları, aksonal hasarı ve nöronal kaybı anlamlı biçimde azalttığını bildirmişlerdir (16). Bianchi ve ark. ise Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein (MOG) ³⁵⁻⁵⁵ ile indüklenen EAE modelinde spinal kord dokusunda TRPM4 ekspresyonunun hastalık şiddeti ile paralel olarak arttığını ve glutamat aracılı nöronal dejenerasyon modelinde de kanal aktivitesinin nöronal hasara katkıda bulunduğunu göstermiştir (17). Öte yandan yapılan güncel çalışmalar EAE sırasında SUR1-TRPM4 kompleks kanalının mikrogliya, endotelyal hücreler ve muhtemelen oligodendrosit soyunda yeni indüklenen bir patolojik yolak olarak ortaya çıktığını, bu kompleksin inhibisyonunun da inflamasyonu, kan-beyin

bariyeri bozulmasını, ödemi ve klinik hastalık progresyonunu azalttığını göstermektedir (99, 100).

Yakın zamanda yapılan çalışmalar, TRPM4'ün sadece aksonal hasarda değil, aynı zamanda nöroinflamasyonun düzenlenmesinde de etkili olduğunu ortaya koymuştur. İnflamatuar mediatörlerin salınımı ve kan-beyin bariyeri (KBB) bütünlüğünün bozulması süreçlerinde TRPM4 aktivasyonunun rol oynadığı bilinmektedir. İskemik inme ve MS benzeri lezyon modellerinde, TRPM4'ün inhibe edilmesinin, ödem oluşumunu azalttığı ve nörolojik fonksiyonları koruduğu gözlemlenmiştir (97, 101).

İskemi, hipoksi ve enerji yetmezliği durumlarında iyon homeostazının bozulması Na^+ birikimi, membran depolarizasyonu, hücresel şişme ve sitotoksik ödem gelişimiyle ilişkilidir. TRPM4/SUR1 kompleksi, Ca^{2+} ile aktive olan ancak başlıca monovalent katyon geçirgenliği gösteren bir kanal kompleksi olarak iskemik/reperfüzyon hasarında Na^+ girişini, kan-beyin bariyeri bozulmasını ve sekonder doku hasarını artırabilmektedir (98, 102). Deneysel inme modelinde TRPM4'e özgü bloke edici antikor uygulamasının reperfüzyon hasarını azalttığı ve fonksiyonel iyileşmeyi desteklediği bildirilmiştir (98). Ayrıca oksijen-glukoz yoksunluğu/reoksijenasyon uygulanan insan beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde resveratrol uygulamasının SUR1-TRPM4 ekspresyonunu modüle ettiği gösterilmiştir (103).

2.5. Kir4.1 Kanalı

İçe doğrultucu potasyum kanalları (Inwardly Rectifying Potassium Channels-Kir), hücre zarının elektriksel eksitabilitesinin düzenlenmesinde ve K^+ homeostazının sağlanmasında kritik rol oynayan bir iyon kanalı ailesidir. Bu ailenin önemli bir üyesi olan Kir4.1, *KCNJ10* geni tarafından kodlanan ve özellikle glial hücrelerde (astrositler ve oligodendrositler) yoğun olarak eksprese edilen ATP-duyarlı bir potasyum kanalıdır. Kir4.1 kanalları, diğer potasyum kanallarından farklı olarak, potasyum iyonlarının hücre dışına çıkışından ziyade hücre içine girişini (içe doğrultucu özellik) daha kolaylaştırır ve fizyolojik membran potansiyellerinde dışa doğru küçük bir K^+ akımı oluşturarak hücrenin negatif dinlenme membran potansiyelini (RMP) belirlemede anahtar bir görev üstlenir (104).

MSS'de Kir4.1, esas olarak astrositlerin damar çevresindeki ayakçıklarında (endfeet) ve oligodendrositlerin hücre gövdeleri ile miyelin kılıflarında lokalize olmuştur. Bu kanalın temel işlevi, nöronal aktivite sırasında hücre dışı alana salınan fazla

potasyumun glial hücreler tarafından geri alınarak uzaklaştırılması sürecidir. Bu mekanizma "potasyumun uzamsal tamponlanması" (spatial potassium buffering) olarak adlandırılır. Kir4.1 aracılığıyla glial hücelere alınan K^+ gap junctionlar aracılığıyla dağıtılarak hücre dışı potasyum konsantrasyonunun toksik düzeylere ulaşması engellenir. Bu süreç, nöronların aşırı uyarılmasını (hipereksitabilite) önlemek ve sinyal iletiminin sürekliliğini sağlamak için elzemdir (105, 106).

Oligodendrositler özelinde Kir4.1, miyelinizasyon süreci ve aksonal bütünlük için hayati öneme sahiptir. OPC farklılaşması ve miyelin üretimi sırasında, hücre zarının hiperpolarize durumda kalması gerekmektedir ve bu durum büyük ölçüde Kir4.1 aktivitesi ile sağlanır. Ayrıca, miyelinli aksonlarda aksiyon potansiyeli iletimi sırasında Ranvier düğümlerinden periaksonal boşluğa salınan K^+ iyonlarının, içteki "ad-aksonal" oligodendrosit zarı üzerinden temizlenmesinde Kir4.1 kanalları görev alır. Bu kanalların işlevsizliği veya kaybı, periaksonal alanda potasyum birikimine, aksonal depolarizasyona ve uzun vadede aksonal dejenerasyona yol açmaktadır (30, 51).

MS patogeneğinde Kir4.1 kanalının rolü son yıllarda yoğun bir araştırma konusu haline gelmiştir. Yapılan çalışmalar hem deneysel EAE modellerinde hem de insan MS lezyonlarında, normal görünümlü beyaz cevherde dahi glial Kir4.1 ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığını göstermiştir. Kanalin bu kaybı, potasyum tamponlama kapasitesini düşürerek glutamat toksisitesini artırmakta ve mitokondriyal disfonksiyonu tetiklemektedir. Ayrıca, bazı MS hastalarının serumlarında Kir4.1'e karşı özgül otoantikorların (anti-Kir4.1) saptanması, bu kanalın MS'te bir otoimmün hedef olabileceği hipotezini güçlendirmiştir (52, 53).

İskemi ve enerji yetmezliği durumlarında ATP seviyelerinin düşmesi, Kir4.1 fonksiyonlarını doğrudan etkileyerek hücre dışı K^+ birikimine ve sitotoksik ödeme katkıda bulunur. Bu bağlamda, Resveratrol gibi nöroprotektif ajanların, oligodendrositlerdeki Kir4.1 ekspresyonunu veya aktivitesini koruyarak miyelin hasarını ve aksonal kaybı önleme potansiyeli, moleküler tedavi stratejileri açısından güçlü bir rasyonel temel oluşturmaktadır (107).

2.6. Multipl Sklerozun Deneysel Modelleri ve İskemik Hasar Yaklaşımı

MS, merkezi MSS'de demiyelinizasyon, aksonal hasar ve nörodejenerasyon ile karakterize kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Hastalığın patofizyolojisi bağışıklık sistemi aracılı inflamasyonun yanı sıra metabolik stres, oksidatif hasar ve iyon

homeostazındaki bozulmaların birlikte rol aldığı çok boyutlu bir süreçtir. Bu nedenle MS'in moleküler ve hücrel mekanizmalarını incelemek amacıyla farklı deneysel modeller geliştirilmiştir. Deneysel MS modelleri genel olarak otoimmün/inflamatuvar modeller, toksik demiyelinizasyon modelleri ve iskemik-hipoksik hasar modelleri olarak sınıflandırılmaktadır (108, 109). Literatürde en yaygın kullanılan model olan Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (EAE), hastalığın daha çok immünolojik ve inflamatuvar yönlerini taklit ederken; kuprizon ve lizolesitin gibi kimyasal modeller miyelin kaybı ve remiyelinizasyon süreçlerini incelemek için tercih edilmektedir. Ancak MS lezyonlarının gelişiminde sadece immün hücre infiltrasyonu değil, aynı zamanda doku düzeyinde meydana gelen metabolik yetersizlikler ve vasküler değişiklikler de kritik rol oynamaktadır (110).

EAE modeli, MS araştırmalarında en yaygın kullanılan modeldir ve özellikle T-hücre aracılı inflamatuvar süreçlerin incelenmesinde önemli bilgiler sağlamıştır. Bununla birlikte EAE modeli, oligodendrosit fonksiyonları ve iyon kanal aktivitesi gibi hücrel elektrofizyolojik mekanizmaların doğrudan incelenmesi açısından sınırlı kalabilmektedir (40). Bu durum, demiyelinizasyonun metabolik ve hücrel bileşenlerini daha iyi yansıtan alternatif deneysel yaklaşımlara olan gereksinimi artırmıştır.

Toksik demiyelinizasyon modelleri arasında en sık kullanılan yaklaşımlar cuprizon ve lizolesitin (LPC) modelleridir. Cuprizon modeli, oligodendrosit metabolizmasının bozulması yoluyla yaygın demiyelinizasyon oluştururken; LPC modeli lokal miyelin hasarı ve remiyelinizasyon süreçlerinin incelenmesine olanak sağlamaktadır (111, 112). Bu modeller miyelin biyolojisinin anlaşılmasına önemli katkılar sunmakla birlikte, iyon kanal değişikliklerinin araştırılması açısından sınırlı kalabilmektedir.

MS patofizyolojisinde son yıllarda öne çıkan kavramlardan biri “virtual hypoxia” olarak tanımlanan sanal hipoksi durumudur. Demiyelinizasyon sırasında artan enerji gereksinimi, mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres oligodendrositleri hipoksik hasara karşı daha duyarlı hâle getirmektedir. Bu süreçte iyon homeostazının bozulması ve membran potansiyelindeki değişiklikler hücrel hasar mekanizmalarına katkıda bulunabilmektedir (Şekil 2.3.) (40).

İSKEMİK MİYELİN HASARI KASKADI



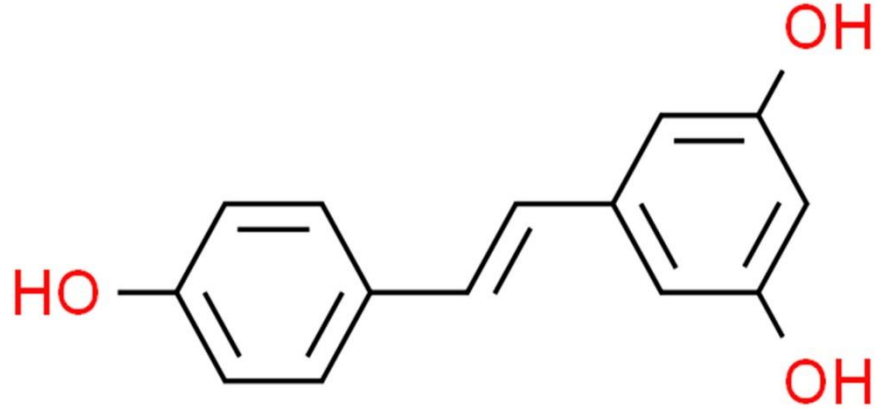
Şekil 2.3. Oksijen-Glukoz Yoksunluğu (OGD) sonucu oluşan sanal hipoksi sonucu gelişen patofizyolojik mekanizmalar ve demiyelinizasyon oluşumu.

Bu bağlamda geliştirilen iskemik-hipoksik beyin dilimi modelleri, oligodendrosit fizyolojisinin kontrollü deneysel koşullarda incelenmesine olanak sağlamaktadır. Organotipik beyin dilimlerinde oluşturulan oksijen-glukoz yoksunluğu (oxygen-glucose deprivation OGD) modeli, demiyelinizasyon ve oligodendrosit hasarının hücresel mekanizmalarının araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu model, iyon kanal aktivasyonu, oksidatif stres ve membran potansiyeli değişimlerinin elektrofizyolojik yöntemlerle doğrudan ölçülmesini mümkün kılmaktadır (113, 114).

2.7. Resveratrol ve Farmakolojik Etkileri

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) (Şekil 2.4.), polifenolik yapıda doğal bir fitoaleksin olup, üzüm kabuğu, yaban mersini ve fıstık gibi bitkilerde biyotik veya abiyotik stres faktörlerine (mantar enfeksiyonları, UV ışını vb.) yanıt olarak sentezlenmektedir. Farmakolojik açıdan en belirgin özelliği hem hidrofilik hem de lipofilik karakter taşıması sayesinde KBB'yi etkin bir şekilde geçebilmesi ve böylece MSS'de terapötik konsantrasyonlara ulaşabilmesidir. Resveratrol'un nöroprotektif etki mekanizmasının merkezinde, hücresel enerji metabolizmasını, mitokondriyal biyogenezi ve stres direncini düzenleyen NAD⁺ bağımlı bir sınıf III histon deasetilaz olan Sirtuin 1 (SIRT1) enzimini güçlü bir şekilde aktive etmesi yer alır. SIRT1 aktivasyonu, PGC-1α (Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama koaktivatör 1-alfa) yolağını

uyararak mitokondriyal fonksiyonları iyileştirir. Böylece ROS üretimini baskılar. Ayrıca, pro-inflamatuar transkripsiyon faktörü NF-κB'nin asetilasyonunu engelleyerek nöroinflamasyonu gen düzeyinde durdurur (115-118).



Şekil 2.4. Resveratrolün Kimyasal Yapısı (119).

2.7.1. Resveratrol ve Multipl Skleroz

MS gibi nörodejeneratif ve demiyelinizan hastalıklarda Resveratrol'ün terapötik potansiyeli, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklerinin sinerjistik etkisine dayanmaktadır. EAE modellerinde yapılan kapsamlı çalışmalar, Resveratrol tedavisinin T-hücre proliferasyonunu baskıladığını, patojenik Th17 hücre yanıtını azalttığını ve anti-inflamatuar sitokinlerin (IL-10 gibi) üretimini artırdığını göstermiştir. Daha da önemlisi, Resveratrol'ün beyin parankimindeki yerleşik immün hücreler olan mikrogliaları "M1" (pro-inflamatuar/toksik) fenotipinden "M2" (onarıcı/koruyucu) fenotipine dönüştürdüğü kanıtlanmıştır. Bu fenotipik değişim, OPC hayatta kalması ve hasarlı bölgelere göç ederek remiyelinizasyonu başlatması için elzem olan uygun mikroçevreyi yaratır. Resveratrol ayrıca, KBB bütünlüğünü koruyarak periferik immün hücrelerin MSS'ye sızmasını engeller ve böylece yeni plak oluşumunun önüne geçer (10, 11, 120).

Oligodendrositler, miyelin sentezi için gereken yüksek metabolik hız ve düşük antioksidan kapasiteleri (düşük glutatyon seviyeleri) nedeniyle oksidatif strese ve eksitotoksisiteye karşı MSS'deki en savunmasız hücrelerdir. İskemik hasar ile MS patolojisinde ekstraselüler glutamat artışı ve serbest radikaller apoptozu tetikler. Resveratrol, serbest radikal süpürücü olarak görev yapmasının yanı sıra SOD, katalaz ve GPx gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artırarak oligodendrositleri korur. Ex vivo Lizofosfatidilkolin (LPC) ile indüklenmiş demiyelinizasyon modellerinde

mitokondriyal membran potansiyelini koruyarak oligodendrosit kaybını önler ve miyelin tamirini hızlandırır (10, 121, 122).

2.7.2. Resveratrol ve Oligodendrosit İyon Kanalları

Oligodendrositler, aksiyon potansiyeli iletimi ve aksonal homeostaz için gerekli olan karmaşık bir iyon kanalı çeşitliliğine sahiptir. İskemik hasar ve MS patogeneğinde bu kanalların disfonksiyonu, hücre içi iyon dengesizliğine ve sonuçta hücre ölümüne yol açar. Resveratrol, iyon kanallarını doğrudan modüle ederek veya kanalların ekspresyon düzeylerini değiştirerek bu patolojik sürece müdahale edebilmektedir (10, 32).

Resveratrol'ün nöroprotektif etkilerinde rol oynayan en kritik ve yeni keşfedilen mekanizmalardan biri, TRP iyon kanalları üzerindeki modülatör etkisidir. Özellikle oksidatif stres sensörü olarak çalışan TRPA1 kanalı, oligodendrositlerde patolojik kalsiyum yüklenmesine neden olan ana kapılardan biridir. Elektrofizyolojik ve moleküler çalışmalar, Resveratrol'ün TRPA1 kanalları üzerinde doğrudan ve güçlü bir inhibitör etkiye sahip olduğunu kanıtlamıştır. Resveratrol, TRPA1 kanalını bloke ederek hücre içine aşırı kalsiyum girişini durdurur, mitokondriyal kalsiyum yükünü azaltır ve kalsiyuma bağlı proteazların (kalpainler) aktivasyonunu engelleyerek miyelin yıkımını önler. Bu mekanizma, Resveratrol'ün sadece bir antioksidan değil, aynı zamanda spesifik bir "kanal modülatörü" olduğunu göstermektedir (123, 124).

İçerideki doğru tulu potasyum kanalı olan Kir4.1 (KCNJ10), oligodendrositlerde potasyum homeostazı ve dinlenme membran potansiyelinin korunması için hayati önem taşır. MS lezyonlarında Kir4.1 ekspresyonunun azaldığı ve bunun da aksonal dejenerasyonla ilişkili olduğu bilinmektedir (7). Resveratrolün glial hücrelerde proinflamatuvar aktivasyonu baskılayabildiği ve oksidatif/inflamatuvar yanıtı azaltabildiği bildirilmiştir. Bunun yanında Kir4.1 gibi oligodendrosit kaynaklı homeostatik kanalların ise aksonal fonksiyon ve bütünlüğün sürdürülmesinde kritik rol oynadığı gösterilmiştir. Bu nedenle resveratrolün, inflamasyon aracılı glial disfonksiyonu azaltarak oligodendrosit-akson etkileşiminin korunmasına katkı sağlayabileceği öngörülebilir (7, 125, 126).

Transient Receptor Potential Melastatin 4 (TRPM4), iskemik hasar sonrası oligodendrositlerde ve diğer sinir sistemi hücrelerinde yukarı regüle olan, kalsiyum ile aktive edilen non-selektif bir katyon kanalıdır. TRPM4 aktivasyonu, hücre içi sodyum birikimine, ardından ozmotik şişmeye ve hücrel onkoza (sitotoksik ödem) yol açar.

Çalışmalar, resveratrolün iskemik modellerde SUR1-TRPM4 kanal kompleksinin ekspresyonunu baskıladığını ve bu sayede serebral ödem ile doku hasarını azalttığını göstermektedir (127).

Resveratrol, SIRT1/AMPK yolu üzerinden ATP sentezini sürdürerek TRPM4'ün duyarlı olduğu ATP seviyesini korur ve bu "ölüm kanalının" kapalı kalmasına yardımcı olur. Ayrıca, TRPM4 aktivasyonu için gereken hücre içi Ca^{2+} artışı, Resveratrol'ün TRPA1 blokajı sayesinde engellendiği için, TRPM4 aktivitesi dolaylı yoldan da baskılanmış olur (123, 128). Öte yandan, MS ve iskemide ekspresyonu azalan Kir4.1 kanalları için Resveratrol, inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β) bu kanalı baskılayıcı etkisini ortadan kaldırır. Kir4.1 kanalının membrandaki varlığının korunması, potasyum tamponlamasının devam etmesini sağlar ve glutamat eksitotoksitesine karşı oligodendrositleri dirençli hale getirir (129, 130).

2.8. Patch-Clamp Yöntemi

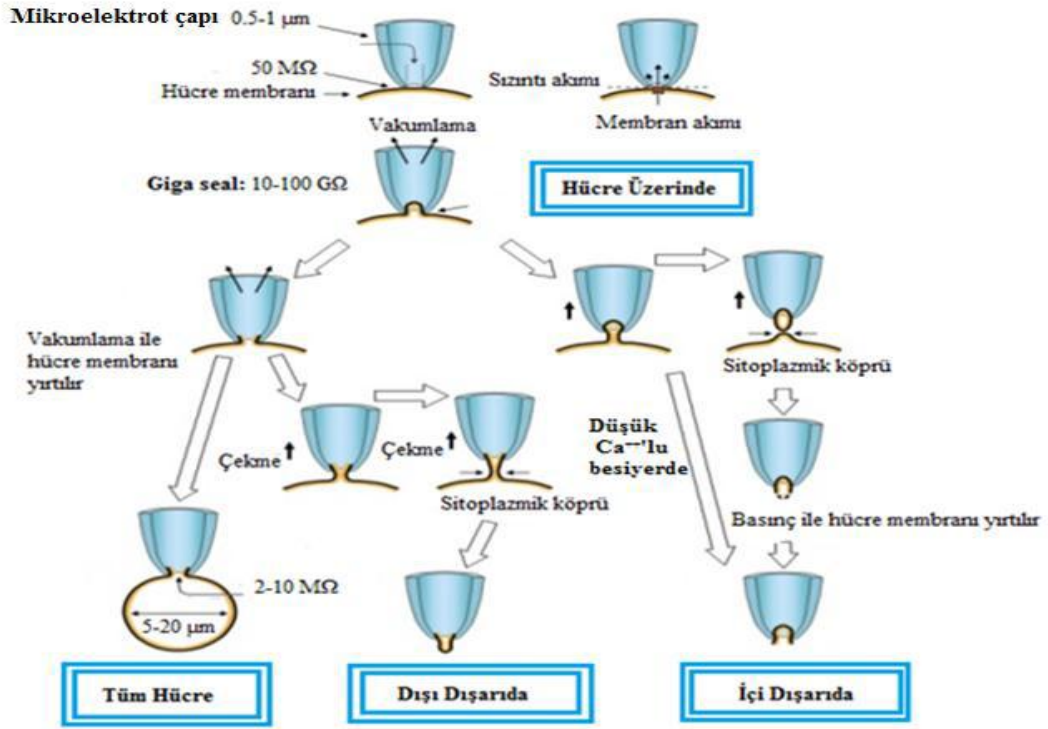
Patch-clamp tekniği, hücre membranı boyunca geçen iyon akımlarını ve membran potansiyelini yüksek zaman ve amplitüd çözünürlüğü ile kaydetmeye olanak tanıyan standart bir elektrofizyolojik yaklaşımdır. Yöntemin temelleri, Neher ve Sakmann'ın tek iyon kanalı düzeyinde ilk doğrudan kayıtları gerçekleştirmesiyle atılmış, daha sonra Hamill ve arkadaşlarının öne sürdüğü standart konfigürasyonlar (whole-cell, cell-attached, inside-out, outside-out vb.) ile bugün kullandığımız klasik biçimini kazanmıştır (131, 132). Günümüzde patch-clamp, hem tek kanal düzeyinde hem de tüm hücre düzeyinde iyon kanalı fonksiyonlarının, aktivasyon-inaktivasyon kinetiğinin ve farmakolojik modülasyonun incelenmesinde güvenilirlik ve doğruluk açısından en yaygın ve etkili yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir (133, 134).

Patch-clamp tekniğinin temelinde, elektrolit ile doldurulmuş ince uçlu bir cam mikropipetin hücre membranına yaklaştırılması ve pipet ucu ile membran arasında yüksek dirençli bir temas bölgesi, yani gigaseal, oluşturulması yatar. Bu yüksek dirençli bağlantı, ölçülen elektriksel sinyalin büyük ölçüde pipetin kapladığı membran alanından kaynaklanmasını sağlayarak düşük gürültülü ve yüksek doğrulukta akım kayıtlarına imkân tanır. Patch-clamp sistemi, tipik olarak bir mikropipet, headstage, düşük gürültülü amplifikatör, mikromanipülatör, mikroskop, veri toplama ünitesi ve kayıt yazılımından oluşur. Bununla birlikte elektromanyetik girişimleri azaltmak ve mekanik titreşimi

minimize etmek amacıyla Faraday kafesi ve titreşime dayalı izole masa kullanılması da önerilir (132-134).

Patch-clamp kayıtları temel olarak voltage-clamp ve current-clamp olmak üzere iki ana modda gerçekleştirilir. Voltage-clamp modunda membran potansiyeli araştırmacı tarafından sabit bir değerde tutulur ve bu potansiyeli korumak için gereken akım ölçülerek iyon kanalı akımlarının kinetiği, genliği ve voltaj bağımlılığı nicel olarak değerlendirilir. Current-clamp modunda ise hücreye belirli miktarda akım uygulanır ve buna karşılık gelişen membran potansiyeli değişiklikleri kaydedilir. Bu yaklaşım istirahat membran potansiyeli, aksiyon potansiyeli oluşturma kapasitesi ve hücresel eksitabilitenin analizinde özellikle yaygın olarak kullanılır (133, 134).

Klasik patch-clamp tekniğinde en sık kullanılan kayıt konfigürasyonları, cell-attached, whole-cell, inside-out ve outside-out şeklinde sınıflandırılmaktadır. (Şekil 2.5.) Cell-attached konfigürasyonunda membran bütünlüğü korunur ve tek iyon kanallarının aktivitesi doğal hücre ortamında kayıt altına alınabilir. Whole-cell konfigürasyonunda pipet ucu ile temas eden membran bölgesi kontrollü olarak kırılarak pipet içeriği ile sitoplazma arasında bir elektriksel devamlılık sağlanır; bu sayede tüm hücre düzeyindeki iyon akımları ölçülebilir. Inside-out ve outside-out konfigürasyonları ise kanalın sitoplazmik veya ekstraselüler yüzeyine doğrudan erişim sağladığından, kanal farmakolojisi, ligand bağlanması ve biyofiziksel özelliklerin ayrıntılı incelenmesinde özellikle değerlidir (132, 133).



Şekil 2.5. Patch-clamp yönteminde kullanılan kayıt türleri (135).

Whole-cell konfigürasyonun en önemli sınırlılıklarından biri, zamanla hücre içeriğinin pipet çözeltisi ile yer değiştirmesi, yani intracellular dializinin gelişmesidir. Bu sorunu azaltmak amacıyla geliştirilen perforated-patch yaklaşımında, membran tamamen kırılmadan önce pipet çözeltisine eklenen por oluşturan ajanlar aracılığıyla elektriksel erişim sağlanır. Bu yöntemde en sık kullanılan ajanlar nystatin, amphotericin B ve gramicidin olup, özellikle gramicidin-perforated patch tekniği hücre içi klorür derişimini ve klorür dengesini daha iyi koruduğu için GABAerjik ve klorür-bağımlı iletimin incelendiği deneysel tasarımlarda belirgin avantaj sunar (136, 137).

Patch-clamp deneylerinde kullanılan materyaller kayıt kalitesini doğrudan etkiler. Kayıt pipetleri genellikle borosilikat cam kapillerlerden hazırlanır ve deneysel amaca göre uygun uç çapı ve direnç değerine getirilir. Pipetler tipik olarak bir pipet çekici ile şekillendirilir ve bazı uygulamalarda uç stabilitesini ve gigaseal kalitesini artırmak amacıyla fire-polish işlemine tabi tutulabilir. Pipet ve banyo elektrotlarında yaygın olarak Ag/AgCl elektrotlar kullanılır. Bu elektrotlar düşük elektrot-çözelti arayüz direnci ve düşük gürültü düzeyi nedeniyle özellikle elektrofizyolojik ölçümlerde tercih edilir. İç ve dış çözeltilerin iyonik bileşimi ise hedef hücre tipi, incelenen iyon kanalı, seçilen kayıt modu (voltage-clamp veya current-clamp) ve deneysel hipoteze göre dikkatli şekilde

hazırlanır. Ayrıca deney boyunca çözelti değişimini sağlamak için bir perfüzyon sistemi, hücreye kontrollü yaklaşım için mikromanipülatör ve optik gözlemi desteklemek üzere uygun büyütme kapasitesine sahip bir mikroskop sistemin standart bir parçası olarak kullanılması gerekir (132-134).

Kayıtların güvenilir biçimde yorumlanabilmesi için seri direnç (series resistance), erişim direnci (access resistance), membran kapasitansı, sızıntı (leak) akımı ve temel çizgi gürültüsü gibi teknik parametrelerin dikkatli ve sürekli izlenmesi gereklidir. Özellikle whole-cell voltage-clamp kayıtlarında seri direnç hataları, hızlı ve büyük genlikli akımların gerçekte olduğundan daha küçük veya daha yavaş kaydedilmesine yol açabileceğinden, amplifikatörün seri direnç kompanzasyon ayarlarının uygun ve tutarlı şekilde yapılması büyük önem taşır. Bu nedenle yüksek kaliteli patch-clamp deneyi için stabilize gigaseal oluşumu, düşük gürültülü ve iyi topraklanmış elektriksel ortam ile deney süresince nispeten sabit tutulan erişim direnci, temel ölçüm kriterleri olarak kabul edilmektedir (134).

Son yıllarda patch-clamp tekniği yalnızca klasik manuel uygulamalarla sınırlı kalmamış, aynı zamanda otomatik ve yüksek verimli (high-throughput) sistemlerin geliştirilmesiyle farmakolojik kanal tarama ve çoklu hücre analizi çalışmalarında da yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Otomatik patch-clamp sistemleri, özellikle ilaç keşfinde büyük sayıda bileşiğin iyon kanalı modülasyon potansiyelinin hızlı ve standartlaştırılmış şekilde sınanmasında önemli avantajlar sunmaktadır. Bununla birlikte, hücre seçimi, deneysel kontrol esnekliği ve biyofiziksel ayrıntıların yüksek çözünürlükte incelenmesi açısından manuel patch-clamp yaklaşımı, hâlâ temel biyofizik ve nörofizyoloji araştırmalarında altın standart yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir (138). Bu yönüyle patch-clamp tekniği, iyon kanalı biyofiziğinin, hücresel eksitabilitenin ve patofizyolojik süreçlerin detaylı analiz edildiği deneysel çalışmalarda merkezi ve vazgeçilmez bir konuma sahiptir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1. Kullanılan Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasalların ve antikörlerin tamamı moleküler biyolojik deney ve analizleri için uygundur (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Deney sırasında kullanılan kimyasalların listesi.

Kimyasal	Üretici	Kimyasal	Üretici
NaCl	Sigma	Potasyum glukonat	Sigma
KCl	Sigma	HEPES	Sigma
NaH ₂ PO ₄	Sigma	EGTA	Sigma
NaHCO ₃	Sigma	Fosfokreatinin (tris tuzu)	Sigma
MgCl ₂	Sigma	ATP (Na tuzu)	Sigma
CaCl ₂	Sigma	GTP (tris tuzu)	Sigma
Glukoz	Sigma	KOH	Sigma
Sükroz	Sigma Aldrich	Triton X-100	Thermo Fischer
İyodoasetat	Merck	DAPI	Sigma
Rotenon	Santa Cruz SC 203242	PBS	BioShop
DMSO	Sigma	Primer antikör (Kaspaz-3)	Santa Cruz SC- 65497
Polygodial	MedChem	Primer antikör (Olig2)	Genetex GTX132732
BaCl ₂	Sigma	Primer antikör (Kir4.1)	Affinity DF9260
9-fenantrol	MedChem	Primer antikör (TRPM4)	Biorbyt orb668516
Resveratrol	Med Chem Express HY-16561	Primer antikör (Bcl-2)	Santa Cruz SC-7382

Kimyasal	Üretici	Kimyasal	Üretici
Paraformaldehit (PFA)	Sigma	Primer antikor (BAX)	Santa Cruz SC-7480
Normal keçi serumu	Biorbyt orb2652767	Primer antikor (Caspase-3)	Santa Cruz SC-7148
Protein ekstraksiyon kiti	GeneAll	Sekonder antikor (HRP-konjuge)	Biorbyt orb2302686
Proteaz inhibitör kokteyli	Serva	Alexa Fluor 488	Thermo Fischer
Metanol	Sigma Aldrich	Alexa Fluor 555	Thermo Fischer
Akrilamid/Bis-akrilamid	Bio-rad	Alexa Fluor 647	Thermo Fischer
Tris-HCl	Sigma	ECL kemilüminesans solüsyonu	Thermo Fischer
SDS	Sigma	Yağsız süt tozu	Cistron
Amonyum persülfat (APS)	Sigma	Tween-20	Sigma
TEMED	Panreac Applichem	TBST tamponu	Sigma
İzopropil alkol	Sigma Aldrich	PVDF membran	Bio-Rad
Asetik asit	Sigma Aldrich	Cryomatrix	Epredia

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların ve laboratuvar aletlerinin tamamı moleküler biyolojik deney ve analizleri için uygun kalibrasyondadır (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. Deney sırasında kullanılan cihazların ve laboratuvar aletlerinin gösterimi.

Cihazlar	Markaları
Patch-clamp amplifikatörü	Axopatch 200B (Axon Instruments, USA)
Veri toplama yazılımı	pClamp 10.4 (Axon Instruments, USA)
Mikropipet çekme cihazı	Sutter Instrument Co., USA
Mikromanipülator	Axon Instruments, USA
Mikroskop (patch-clamp düzeneği)	Zeiss, Almanya
Vibratom	Leica VT 1000S (Almanya)
Kriyostat	Leica CM 1520
Konfokal mikroskop	Leica (lazer taramalı)
Konfokal görüntü analiz yazılımı	Leica
Protein konsantrasyon ölçüm cihazı	DeNovix DS-11
Homojenizatör	Heidolph
Santrifüj	Hettich
SDS-PAGE elektroforez sistemi	Bio-Rad Mini-PROTEAN
Elektroforez güç kaynağı	Bio-Rad PowerPac Basic
Membran transfer sistemi	Thermo Scientific Pierce Power Blotter
Western blot görüntüleme sistemi	DeNovix DS-11
Densitometri analiz yazılımı	GeneSys
İstatistiksel analiz ve grafik yazılımı	GraphPad Prism v10.3.1
pH metre	Hanna HI 221
Manyetik karıştırıcı	DLab MS-H380 Pro/ Yellow line
Hassas terazi	Denver Instrument
Otomatik pipet seti	Eppendorf
Buzdolabı / derin dondurucu (−80°C)	Vestel
Sıvı azot tankı	Koçerler Gaz
Oksijen tüpü	Koçerler Gaz

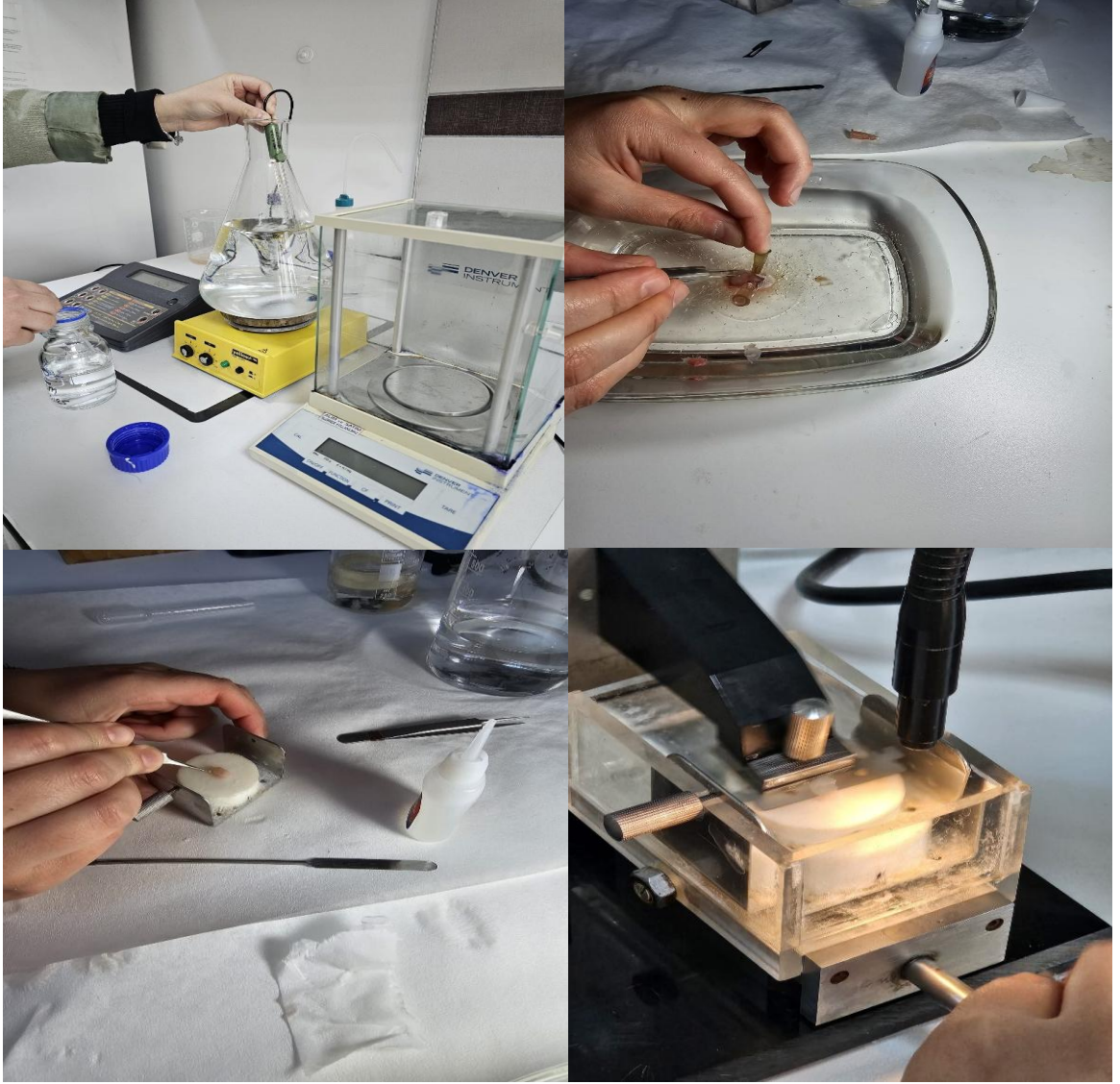
3.2. Metot

3.2.1. Etik Kurul Onayı ve Deney Hayvanlarının Barındırılması

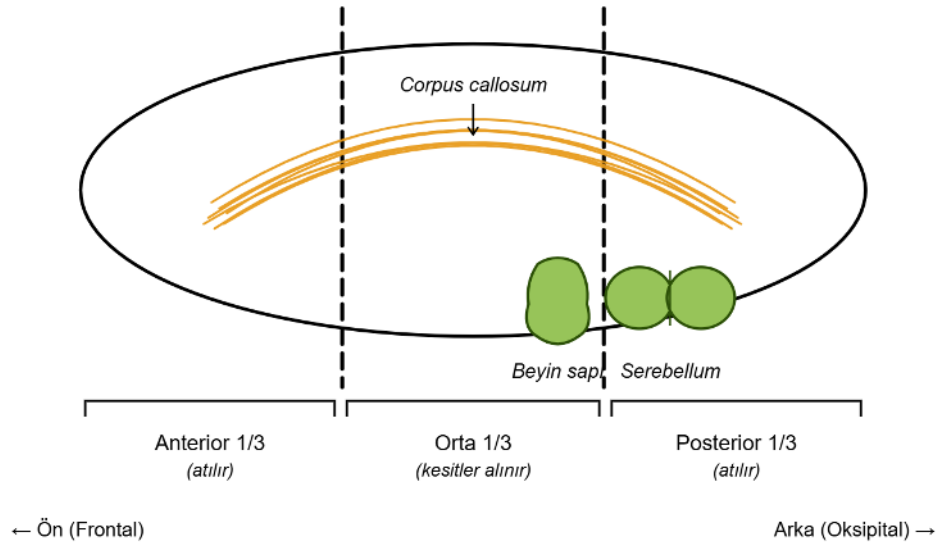
Bu çalışma, Gaziantep Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (Karar No: 2024/10, Tarih: 08.02.2024) ve İnönü Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (Karar No: 2025/13-13, Tarih: 17.09.2025) tarafından onaylanmış protokollere göre gerçekleştirildi. Çalışmada 10-17 günlük, toplam 80 adet erkek Balb-c cinsi fare kullanıldı. Deney hayvanları Gaziantep Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi ile İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Elektrofizyolojik kayıtlar ve konfokal görüntülemeler Gaziantep Üniversitesinde, Western blot çalışmaları ise İnönü Üniversitesinde gerçekleştirildi. Fareler, deney sürecine kadar $22\pm2^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında, optimum nem koşullarında ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünün sağlandığı standart laboratuvar kafeslerinde barındırıldı. Hayvanların yem ve su tüketimi ad libitum olarak sağlandı.

3.2.2. Doku Hazırlığı ve İskemik Miyelin Hasarı (OGD) Modelinin Oluşturulması

Deneyde fareler, etik kurul izinlerinde belirtildiği şekilde herhangi bir anestezi ajan kullanılmaksızın servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edildi. Bu yöntem, uygun koşullarda ve yetkin uygulayıcılarca yapıldığında kemirgenler için kabul edilebilir fiziksel ötanazi yöntemleri arasında tanımlanmaktadır (139). Kafatası hızla açılarak beyin dokuları bütün halinde çıkarıldı ve buz aküsü üzerinde soğutulmuş, oksijenize (95% O₂, 5% CO₂) yapay beyin omurilik sıvısı (aCSF) içerisine alındı. Kullanılan bu yapay beyin omurilik sıvısı (aCSF) 124 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 2 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂ ve 10 mM glukozdan oluşacak şekilde hazırlandı ve pH 7.4 olacak şekilde ayarlandı (14). Solüsyon içerisinde iken oligodendrositlerin yoğun bulunduğu *Corpus Callosum* 'un en kalın olduğu bölgenin alınması için koronal düzlemde ön 1/3'lük ve arka 1/3'lük kısım ayrıldı. Geriye kalan orta 1/3'lük kısım vibratom cihazına (Leica VT 1000S, Almanya) yerleştirilerek koronal düzlemde 225 µm kalınlığında beyin kesitleri elde edildi (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2.) (140, 141).



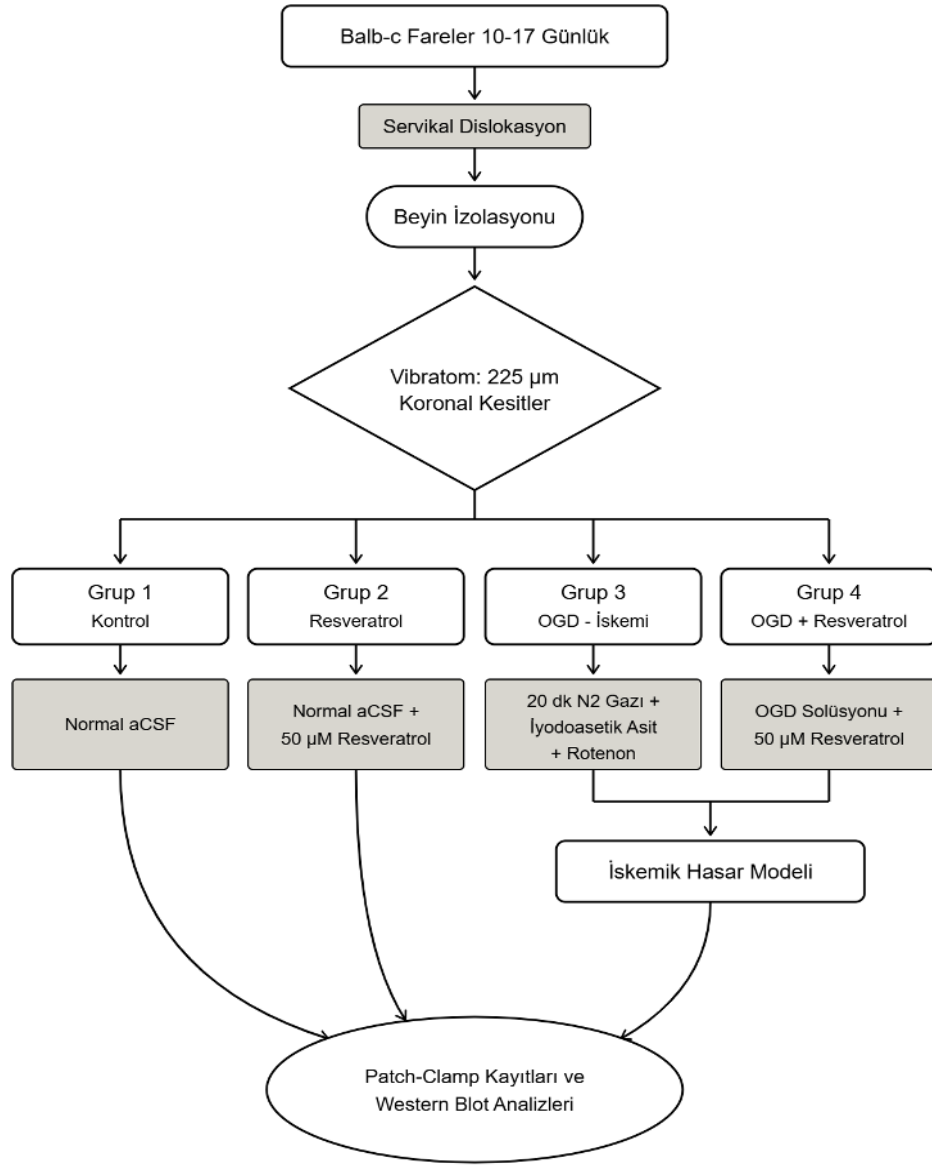
Şekil 3.1. Hücre dışı solüsyonların hazırlanması ve beyin dilimlerinin elde edilmesi.



Şekil 3.2. Kullanılan beyin kesitlerinin alındığı bölge.

Oluşturulan kesitler rastgele dört ana gruba ayrıldı: Kontrol, Resveratrol, Oksijen-Glukoz Yoksunluğu (OGD) grubu ve OGD + Resveratrol grubu. Kontrol grubundaki dilimler normoksik koşullarda standart aCSF içerisinde tutulurken, yalnız resveratrol grubundaki dilimler aynı koşullarda 50 μ M resveratrol ile inkübe edildi. OGD grubunda iskemik miyelin hasarı oluşturulurken, OGD + Resveratrol grubunda aynı iskemik koşullara ek olarak 50 μ M resveratrol uygulandı. Resveratrol uygulama dozu, OGD/iskemiye dayalı nöral doku ve hücre modellerinde daha önce kullanılarak koruyucu etki gösterdiği bildirilen deneysel çalışmalar dikkate alınarak belirlendi (142, 143). Elektrofizyolojik inceleme için her dilimden bir hücre seçilerek kayıt alındı. Aynı deney grubuna ait paralel dilimler ise konfokal ve western blot analizlerinde kullanıldı. İskemik miyelin hasarı oluşturmak amacıyla oksijen-glukoz yoksunluğu (Oxygen-Glucose Deprivation, OGD) modeli uygulandı. Bu modelde, fizyolojik aCSF yerine iskemik miyelin hasarı oluşturmak amacıyla iskemi taklit eden oksijen-glukoz yoksunluğu yaklaşımı esas alındı. Bu kapsamda OGD solüsyonunda fizyolojik aCSF den farklı olarak oksijen nitrojen ile, glukoz ise osmolaritenin korunması amacıyla 7 mM sükroz ile değiştirildi. Ayrıca enerji metabolizmasını daha etkin biçimde baskılamak için glikolizi inhibe eden 2 mM iyodoasetat su içinde çözündürülerek, mitokondriyal elektron taşıma zinciri kompleks I inhibitörü olan rotenon ise 1 μ M olacak şekilde DMSO içerisinde çözülerek solüsyona eklendi (14). İskemi grubundaki dokular, literatürde beyaz cevher ve oligodendrosit hasarı oluşturmak için kullanılan OGD protokolleri temel alınarak,

iskemik koşulları taklit etmek amacıyla bu solüsyon içerisinde 20 dakika süreyle inkübe edildi (144) (Şekil 3.3.).



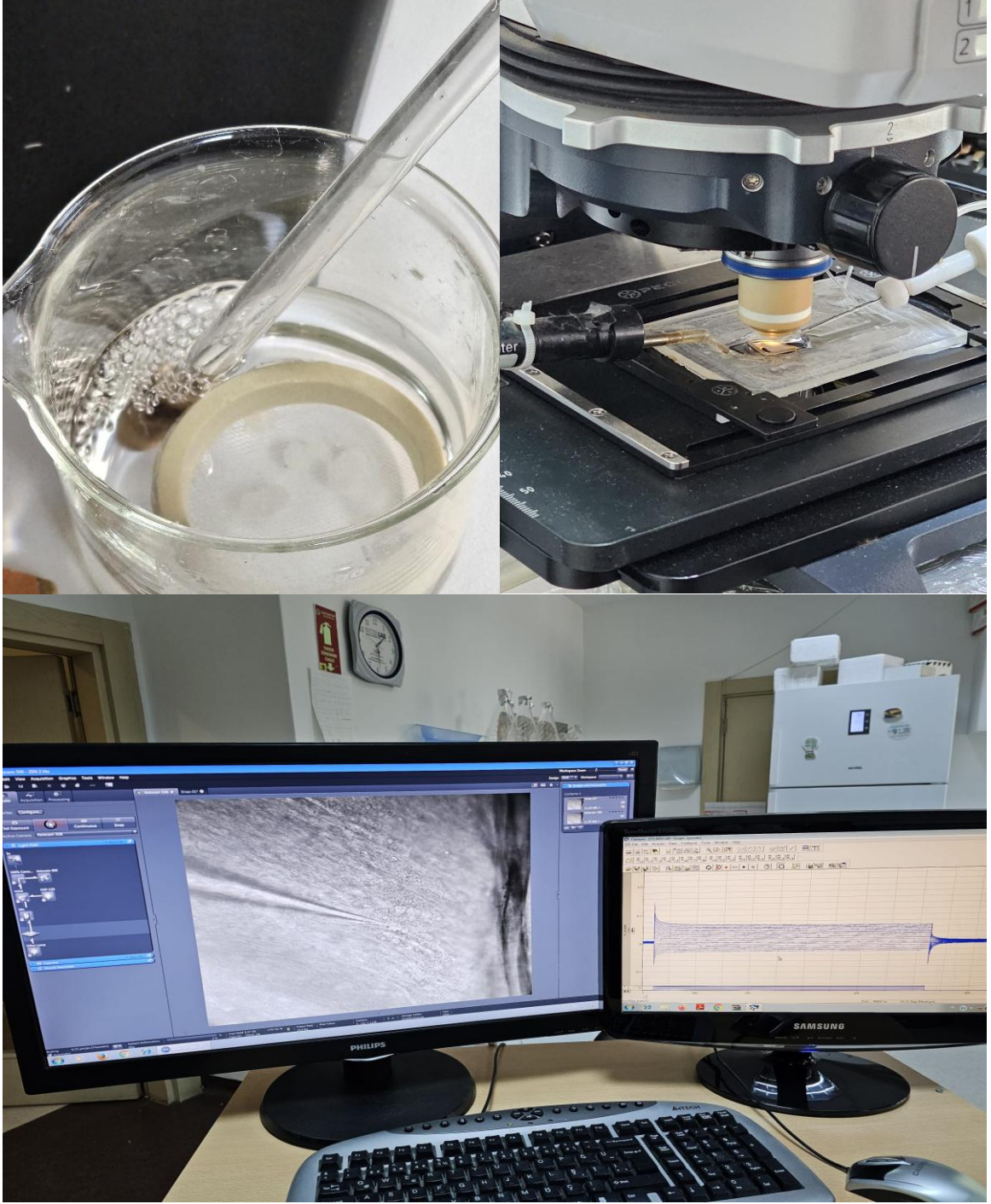
Şekil 3.3. Alınan beyin dokularına yapılan işlemler.

3.2.3. Elektrofizyolojik Kayıtlar

Elektrofizyolojik verilerin elde edilmesi aşaması Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Tüm kayıtlar, koronal beyin kesitlerindeki oligodendrosit hücrelerinden Axopatch 200B amlifikatörü ile tüm-hücre (whole-cell) patch-clamp tekniği kullanılarak alındı. Oligodendrositlere yönelik whole-cell kayıtlarının akut beyin dilimlerinde gerçekleştirilmesi, hücrenin doğal doku mimarisi

içerisindeki iyon kanal özelliklerinin değerlendirilmesi açısından uygun bir deneysel yaklaşım olarak kabul edilmektedir (140). Borosilikat cam kapiller borulardan çekilen mikropipetler hücre zarına yapıştırıldı (gigaseal oluşturuldu). Daha sonra negatif basınç ile hücre zarı perfore edilerek tüm-hücre (whole-cell) konfigürasyonu elde edildi. Pipet içi solüsyon ile hücre içi ortamın dengelenmesinin ardından ilk olarak akım-kenetleme (current-clamp, CC) modunda hücrelerin dinlenme membran potansiyelleri kaydedildi. Ardından kanal aktivitelerini ve akım-voltaj (I-V) ilişkilerini belirlemek amacıyla voltaj-kenetleme (voltage-clamp, VC) moduna geçilerek, yaklaşık 700 ms süreli voltaj adımlarıyla uygulanan spesifik kayıt protokollerinde, başlangıçtaki yaklaşık 200 ms transient evresinden sonraki yaklaşık 500 ms steady-state penceresi analiz edildi (132).

Yapay beyin sıvısı (aCSF) ve uygulanan kimyasallar perfüzyon sistemiyle beyin kesitlerinin olduğu odacığa bir boru ve vana sistemi üzerinden yönlendirilerek aktarıldı. Uç direnci düşük (4-7 MΩ) olan pipetler kullanıldı. Mikropipetler, borosilikat camdan iç çapı 1.0 mm ve dış çapı 1.2 mm çapında olacak şekilde pipet çekme cihazından (Sutter Instrument Co. USA) yapıldılar ve 110 mM potasyum glukonat, 9 mM HEPES, 9 mM EGTA, 4.5 mM MgCl₂, 14 mM fosfokreatinin (tris tuzu), 4 mM ATP (Na tuzu) ve 0.3 mM GTP (tris tuzu) ile dolduruldu. Pipet solüsyonu pH'ı potasyum hidroksit (KOH) ile 7.4'e ayarlandı (145). Uyarı oluşturulması, veri toplama ve sayısallaştırılmış verilerin çevrimdışı analizi, pClamp yazılımı (sürüm 10.4, Axon Instruments) kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler tanımlanan tutma potansiyelinde (holding potential) stabilize edildikten sonra spontan akım kayıtları alındı. Step protokolünde -150 mV ile +50 mV arasında 10 mV'luk adımlar (her basamak yaklaşık 700 ms süreli) uygulandı. Ramp protokolünde ise membran potansiyeli 911 ms süresince -140 mV'tan +40 mV'a doğrusal olarak değiştirildi. Söz konusu protokoller, literatürde yaygın kabul gören standart metodolojilere dayanmaktadır (132, 146). Farmakolojik uygulamalar veya solüsyon değişimleri sırasında hücreler ilgili ajanla sürekli perfüze edildi. İlaç etkisinin temporal gelişimini izlemek amacıyla kayıtlar uygulamanın 3. ve 5. dakikalarında kaydedildi. Bu zamanlama stratejisi, ilaç-reseptör bağlanma kinetiği ve difüzyon süreçleri neticesinde sistemin kararlı duruma (steady-state) ulaşmasını beklemek amacıyla tercih edildi. Böylelikle, erken evredeki geçici yanıtların ötesine geçilerek stabilize akım yanıtlarının daha hassas bir şekilde temsili sağlandı (Şekil 3.4.) (132, 147, 148).



Şekil 3.4. Elektrofizyolojik kayıtların alınması.

Her tespit edilebilir akım komponenti için pik-pik akım genliği (pA), reversal potansiyeli (V_{rev}) ve rektifikasyon indeksi (RI) hesaplandı. Akım genliği, subtraction ile izole edilen I-V eğrisinin uç voltajlarındaki (-140 ve +40 mV) akım değerleri arasındaki fark olarak ölçülmüş olup, ilgili komponentin toplam akım büyüklüğü hakkında bilgi vermektedir. Reversal potansiyeli, I-V eğrisinin sıfır akım eksenini kestiği membran potansiyeli olarak tanımlanmış olup kanalın iyon seçiciliğini gösterir. Tek bir

iyona seçici kanallar için ilgili iyonun Nernst denge potansiyeline yaklaşırken, non-selektif katyon kanalları için 0 mV civarında bulunur (149). Sıvı bağlantı potansiyeli düzeltilmesi uygulanmadığından ölçülen V_{rev} değerleri teorik denge potansiyelinden birkaç mV pozitifte kaymış olabilir. Rektifikasyon indeksi, rampa protokolünün uç voltajlarında ölçülen dışa akımın içe akıma oranı olarak hesaplandı ($RI = |I_{+52 \text{ mV}} / I_{-128 \text{ mV}}|$). $RI < 1$ içe doğrultucu, $RI \approx 1$ zayıf rektifikasyon, $RI > 1$ dışa doğrultucu profil olarak yorumlanır (150, 151).

Membran iletkenliği (g_K), ramp protokolünden elde edilen I-V eğrisinin -120 ile -80 mV arasındaki bölümüne uygulanan lineer regresyonun eğiminden ($\Delta I / \Delta V$) hesaplandı ve nanosiemens cinsinden ifade edildi (152). Oligodendrositlerde Kir4.1 aracılı akımlar Ba^{2+} 'a duyarlı olduğundan, Kir4.1-duyarlı iletkenlik blokör öncesi basamak ile +BaCl₂ basamağı arasındaki iletkenlik farkı; TRPM4-duyarlı iletkenlik ise +BaCl₂ ile +9-fenantröl basamakları arasındaki fark olarak tanımlandı. Blokör-duyarlı bir komponentin pozitif iletkenliğe sahip olması gerektiğinden, komponent iletkenliği negatif olan veya 0.05 nS eşliğinin altında kalan kayıtlarda ilgili komponent ölçülemez kabul edildi ve reversal potansiyeli türetilmedi. Komponentlerin sodyuma göreli potasyum geçirgenliği, ölçülen reversal potansiyellerinden Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) reversal denklemi ile her hücre için ayrı ayrı hesaplandı (152-154). Yalnızca Na^+ ve K^+ geçirgenliği dikkate alınarak $[K^+]_o = 2.5 \text{ mM}$, $[Na^+]_o = 151 \text{ mM}$, $[K^+]_i = 110 \text{ mM}$, $[Na^+]_i \approx 8 \text{ mM}$ ve 22 °C ($S \approx 58.6 \text{ mV/dekad}$) değerleri kullanıldı: $P_{Na}/P_K = ([K^+]_o - A \cdot [K^+]_i) / (A \cdot [Na^+]_i - [Na^+]_o)$, $A = 10^{(V_{rev}/S)}$. Bu koşullarda $E_K = -96.3 \text{ mV}$ olup, saf K^+ -seçici bir kanal için $P_{Na}/P_K \approx 0$ beklenmektedir.

Patch-clamp kayıtlarına dahil edilen hücreler için aşağıdaki ölçütler uygulandı: Dahil etme açısından, Olig2 immünofloresan boyaması ile pozitif profil veren ve *Corpus Callosum* bölgesinde oligodendrosit morfolojisi (küçük yuvarlak/oval soma, az dallanan ince uzantılar) sergileyen hücreler tercih edildi. Whole-cell konfigürasyonuna geçilmeden önce $\geq 1 \text{ G}\Omega$ seal direnci sağlandı (132). Kayıt boyunca holding akımı ve giriş direnci stabil seyreden, arka plan gürültüsü kabul edilebilir düzeyde kalan hücreler analize alındı. Dışlama açısından belirgin hat kayması gösteren hücreler, ardışık ilaç uygulamaları sırasında seal kaybı, giriş direncinde ani değişim veya holding akımında geri dönüşsüz kayma yaşanan hücreler, ilaç uygulama basamaklarından herhangi birinin tamamlanmadığı kayıtlar ve subtraction analizinde değerlendirme yapılmasına olanak vermeyecek düzeyde gürültülü veya bozulmuş kayıt veren hücreler analize dahil

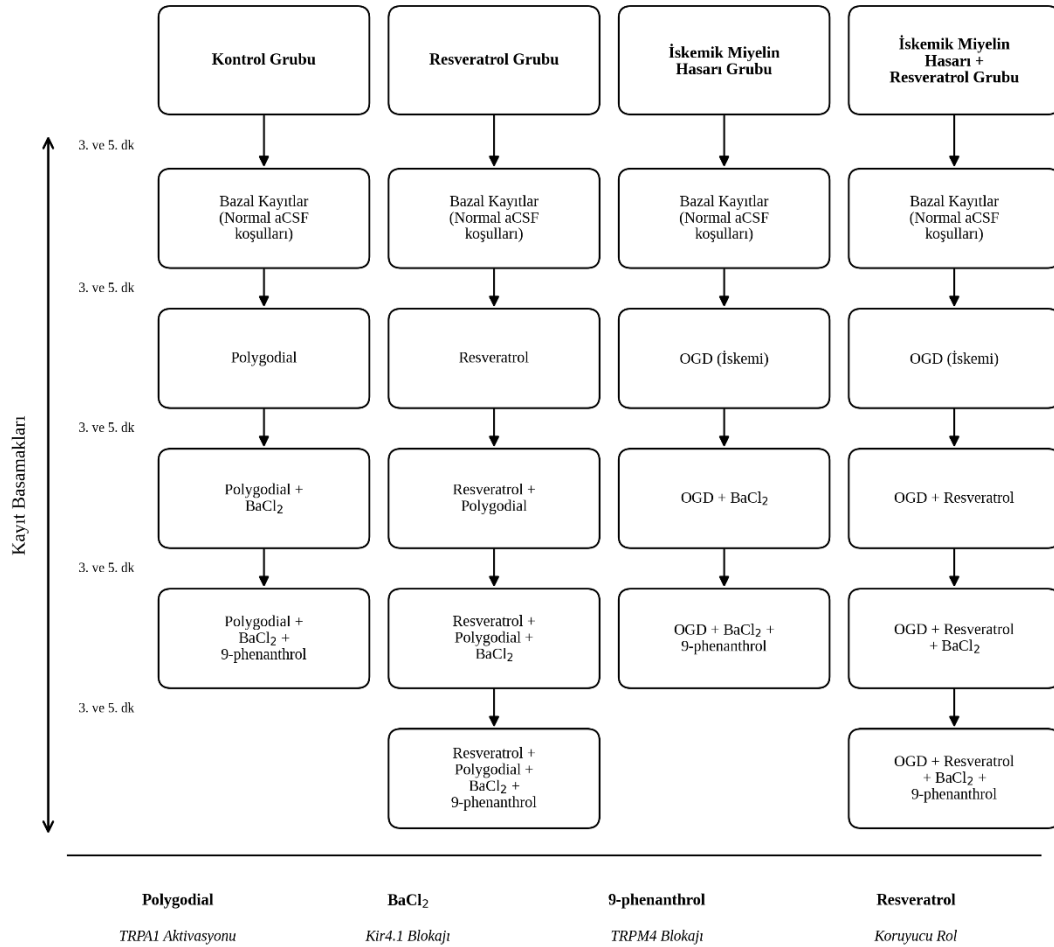
edilmedi. İlgili protokollere göre uygun kayıtları alınabilen hücreler örnek sayısına (n) eklendi. Belirtilen kayıtları alınabilen hücreler değerlendirmeye alındığından, bazı parametrelerde geçerli n grup büyüklüğünden küçüktür. Bu ölçütler, oligodendrosit ve glial hücre patch-clamp çalışmalarında yerleşik kabul gören kalite kontrol prensipleri ile uyumludur (155, 156).

3.2.4. Farmakolojik Ajanlar ve Uygulama Protokolleri

TRPA1, Kir4.1 ve TRPM4 kanallarının oligodendrosit fonksiyonu üzerindeki etkisini ortaya koymak amacıyla farmakolojik ajanlar ardışık biçimde perfüzyon banyosuna uygulandı. TRPA1 kanalının aktivasyonu için 100 μ M polygodial %0.03 DMSO içerisinde çözündürülerek kullanıldı (60). İskemik koşullarda TRPA1 aktivasyonuna eşlik eden iyonik dengesizliğin, özellikle potasyum homeostazındaki bozulmanın, Kir4.1 kanalı ile ilişkisini değerlendirmek amacıyla Kir4.1 blokajı için 100 μ M baryum klorür ($BaCl_2$) suda çözündürülerek uygulandı (157, 158). Düşük doz baryumun Kir4.1 akımlarını etkili biçimde baskılayabildiği ve oligodendrosit kökenli Kir4.1'in beyaz cevherde ekstraselüler potasyum düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (30, 158). Ardından, iskemik hasar ve hücresel şişme süreçleri ile ilişkilendirilen TRPM4 kanalını inhibe etmek amacıyla 30 μ M 9-fenantrol %0.015 DMSO içerisinde çözündürülerek kullanıldı. 9-fenantrol, TRPM4 için yaygın kullanılan bir farmakolojik inhibitör olup iskemiye bağlı hasar modellerinde koruyucu etkiler göstermiştir (159-161). Koruyucu ajan olarak değerlendirilen ve iskemik beyin hasarı, nöroenflamasyon ile beyaz cevher bütünlüğü üzerindeki nöroprotektif etkileri önceki çalışmalar tarafından desteklenen resveratrol, su içinde çözündürülerek 50 μ M final konsantrasyonda perfüzyon solüsyonuna eklenip uygulandı (9, 162). Bu konsantrasyonda (yaklaşık 11.4 μ g/mL) resveratrol sudaki çözünürlük sınırı dahilinde olduğundan DMSO veya etanol gibi ek bir çözücü kullanılmadı. Tüm kimyasalların stok solüsyonları hazırlanarak deneylerde kullanılabilecek kadar uygun koşullarda muhafaza edildi.

Kontrol grubunda, hücrelerden normal aCSF koşullarında bazal kayıtlar alındıktan sonra sırasıyla polygodial, polygodial + $BaCl_2$ ve polygodial + $BaCl_2$ + 9-fenantrol uygulamaları gerçekleştirildi ve her basamakta akım değişiklikleri kaydedildi. Resveratrol grubunda ise bazal aCSF kaydını takiben önce resveratrol uygulandı, ardından resveratrol varlığında sırasıyla polygodial, $BaCl_2$ ve 9-fenantrol eklenerek beş basamaklı protokol tamamlandı. İskemik miyelin hasarı grubunda ise, hücrelerden

normal aCSF koşullarında bazal kayıtlar alındıktan sonra oksijen-glukoz yoksunluğu (OGD) modeli oluşturulup sırasıyla iskemi, BaCl₂ ve 9-fenantrol uygulanarak iskemik ortamda kanal aracılı akım değişiklikleri değerlendirildi. İskemik miyelin hasarı + resveratrol grubunda ise yine normal aCSF kayıtları alındıktan sonra OGD indüksiyonunun ardından iskemik kayıtları alındı, hemen ardından perfüzyon solüsyonuna resveratrol eklendi. Bunu takiben iskemik ve resveratrol içeren ortamda BaCl₂ ve 9-fenantrol ardışık olarak perfüze edilerek nihai elektrofizyolojik kayıtlar elde edildi. Her işlem basamağının 3. ile 5. dakikalarında daha önce açıklanmış elektrofizyolojik kayıtlar alındı. Bu tasarım hem fizyolojik hem de iskemik koşullarda TRPA1 aktivasyonunun etkilerini, Kir4.1 ve TRPM4 blokajının katkısını ve resveratrolün olası koruyucu rolünü aynı deneysel eksen üzerinde karşılaştırmalı olarak incelemeye olanak sağlamaktadır (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Kimyasal solüsyonların uygulanması ve patch-clamp kayıtlarının alınması protokolü.

İlaç uygulamalarının iyon kanalı aktivitesi üzerine etkileri, ardışık ilaç kayıtları arasında çıkarma (subtraction) işlemi uygulanarak ayrıştırıldı. Kontrol ve resveratrol gruplarında polygodial-duyarlı TRPA1 akımı = (bazal kayıt) – (polygodial sonrası kayıt), BaCl₂-duyarlı Kir4.1 akımı = (polygodial sonrası kayıt) – (polygodial + BaCl₂ sonrası kayıt), 9-fenantrol-duyarlı TRPM4 akımı = (polygodial + BaCl₂ sonrası kayıt) – (polygodial + BaCl₂ + 9-fenantrol sonrası kayıt) olarak hesaplandı. İskemi ve resveratrol+iskemi gruplarında polygodial uygulanmadığından TRPA1 akımı bu gruplarda hesaplanmadı. İskemi-duyarlı akım = (bazal kayıt) – (iskemi sonrası kayıt), BaCl₂-duyarlı Kir4.1 ve 9-fenantrol-duyarlı TRPM4 akımları ise aynı sıralamayla hesaplandı.

Çalışma genelinde “Kir4.1 akımı” ve “TRPM4 akımı” ifadeleri, sırasıyla yukarıda tanımlanan BaCl₂-duyarlı ve 9-fenantrol-duyarlı akım komponentlerini ifade etmek amacıyla kullanıldı. Düşük doz BaCl₂ ve 9-fenantrol, sırasıyla Kir4.1 ve TRPM4 için literatürde en yaygın kullanılan farmakolojik blokerler olmakla birlikte tam kanal-selektif değildir. Düşük doz BaCl₂ Kir4.1 başta olmak üzere içe-doğrultucu potasyum kanal ailesini, 9-fenantrol ise TRPM4 başta olmak üzere bazı non-selektif katyon kanallarını baskılayabilmektedir. Bu nedenle ilgili komponentler söz konusu kanalların baskın farmakolojik etkisini yansıtmaktadır. Değerlendirmelerde ise mutlak kanal-spesifik akımlar olarak değil de BaCl₂- ve 9-fenantrol-duyarlı bileşenler olarak yorumlanır.

3.2.5. Konfokal Görüntülemeler

Deney gruplarına ait beyin dokuları, yukarıda belirtildiği şekilde çıkarıldıktan sonra %4 Paraformaldehit (PFA) ile tespit edilmiş ve sukroz solüsyonları kullanılarak dondurma işlemine karşı korundu. Hazırlanan dokulardan kriyostat cihazı ile seri koronal kesitler alındı. Bu kesitlerde oligodendrosit hücrelerini ve iyon kanallarını analiz etmek için Olig2, Kir4.1 ve TRPM4 primer antikorları ile çoklu immünfloresan işaretleme yapıldı. Özellikle Kir4.1 antijeninin uzun süreli fiksasyondan olumsuz etkilenmesi nedeniyle, boyama kalitesini artırmak amacıyla kısa süreli fiksasyon ve hassas permeabilizasyon teknikleri uygulandı (163).

Kesitlerde non-spesifik bağlanmaları minimize etmek amacıyla, %5-10 normal keçi serumu ile %0.1-0.3 Triton X-100 içeren PBS (Fosfat Tamponlu Salin) solüsyonu kullanılarak oda sıcaklığında 2 saat bloklama işlemi uygulandı. Bloklamanın ardından dokular, aynı çözelti içerisinde hazırlanan primer antikorlar ile 4°C’de gece boyunca

(overnight) inkübe edildi. Literatürde, oligodendrosit ve glial dokulara yönelik konfokal immünfloresan çalışmalarında bloklama/permeabilizasyon basamaklarında serum ve Triton X-100 kombinasyonunun kullanımı ile gece boyunca 4°C’de gerçekleştirilen primer antikor inkübasyonu standart protokoller olarak kabul edilmektedir (164, 165).

Primer antikor inkübasyonunun ardından PBS ile yıkanan kesitler, uygun türlere özgü Alexa Fluor 488, 555 veya 647 konjuge sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edildi. Nükleer boyama amacıyla DAPI uygulamasını takiben kesitler, floresan sinyal kaybını önlemek için antifade (floresan koruyucu) özellikli kapatma ortamı (mounting medium) kullanılarak lam üzerine kapatıldı. Bu protokol, oligodendrosit ilişkili immünfloresan analizlerde ve çoklu kanallı konfokal görüntüleme çalışmalarında literatürle uyumlu, standart bir iş akışı olarak benimsendi. Görüntüler lazer taramalı konfokal mikroskop kullanılarak elde edildi. Tüm deney gruplarında karşılaştırılabilirlik sağlamak amacıyla lazer gücü, dedektör kazancı, pinhole açıklığı ve tarama hızı gibi görüntüleme parametreleri tüm örneklerde sabit tutuldu. İlgili bölgelerden z-stack görüntüler alındı, gerekli durumlarda maksimum intensite projeksiyonları oluşturuldu ve analizler Leica yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.6.). Olig2-pozitif hücrelerde Kir4.1 ve/veya TRPM4 immünoreaktivitesinin dağılımı, kolokalizasyonu ve görelî floresan yoğunluğu nicel olarak değerlendirildi. Oligodendrosit çalışmalarında konfokal z-stack görüntüleme ve maksimum intensite projeksiyonu kullanımının standart olduğu bildirilmiştir (166, 167).



Şekil 3.6. Konfokal görüntüleme uygulamasının aşamaları.

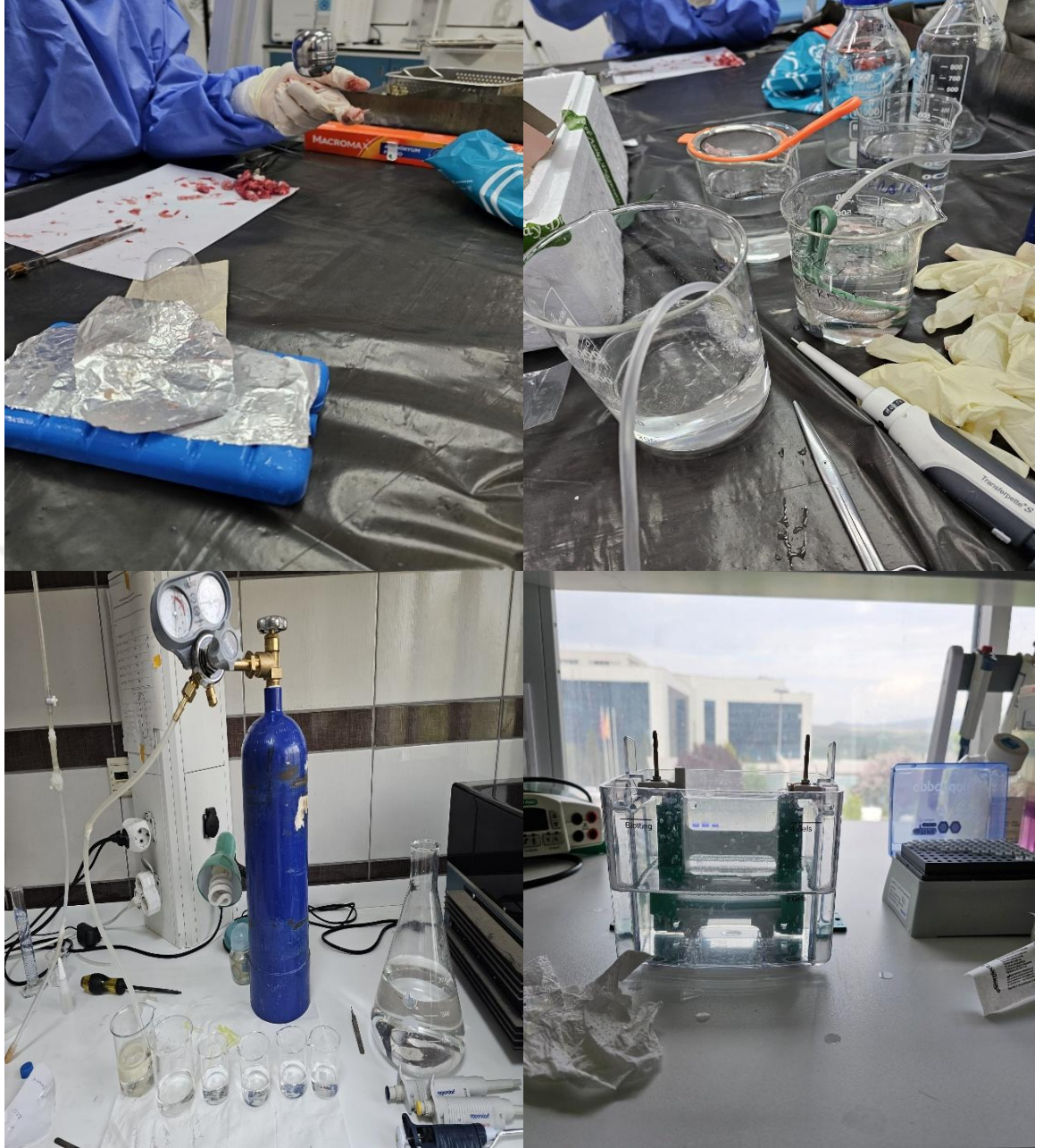
3.2.6. Bcl-2, Bax, Caspase-3, Kir4.1, TRPM4 ve Olig2 Proteinlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Western Blot Yöntemi ile Analizi

Bu çalışmada beyin dokularında Bcl-2, Bax, Caspase-3, Kir4.1, TRPM4 ve Olig2 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri western blot yöntemi ile değerlendirildi. Western blot analizi, proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre SDS-PAGE ile ayrılması, membrana transfer edilmesi, hedef proteine özgü primer ve HRP-konjuge sekonder antikorlarla işaretlenmesi ve kemilüminesans temelli görüntüleme prensibine dayalı olarak gerçekleştirildi. Yöntem, literatürde tanımlanan temel SDS-PAGE ve immüno blotlama prensipleri esas alınarak uygulandı (168-170).

Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Deney Grupları

Western blot analizleri için beyin dokuları, patch-clamp deneylerinde kullanılan hazırlama prosedürüyle benzer şekilde hızla çıkarıldı ve oksijenlendirilmiş solüsyon içinde 225 µm kalınlığında akut beyin dilimlerine ayrıldı. Akut beyin dilimlerinin deney öncesinde aCSF içinde kısa bir dengeleme süresine alınması, doku canlılığının ve ex-vivo fizyolojik bütünlüğün korunması açısından yerleşik bir yaklaşımdır (171). Bu nedenle Doku kesitleri, hazırlama aşamasını takiben normal aCSF içerisinde 15 dakikalık bir stabilizasyon süresine alınmış ve ardından dört deneysel gruba ayrıldı:

1. **Kontrol Grubu:** 20 dakika boyunca normal aCSF içerisinde tutulan kesitler.
2. **Resveratrol Grubu:** 50 µM resveratrol içeren normal aCSF'de 20 dakika inkübe edilen kesitler.
3. **İskemi (OGD) Grubu:** Oksijen-glukoz yoksunluğu (OGD) solüsyonunda 20 dakika süresince inkübe edilen kesitler.
4. **İskemi + Resveratrol Grubu:** 50 µM resveratrol ilave edilmiş OGD solüsyonunda 20 dakika bekletilen kesitler (172, 173). (Şekil 3.7.)



Şekil 3.7. Western blot analizleri için yapılan işlemler.

İnkübasyon süreci sonunda doku örnekleri, protein degradasyonunu minimize etmek amacıyla süratle toplanarak sıvı azotta donduruldu ve analiz gününe kadar doku örnekleri daha önce belirtilen deney gruplarına uygun şekilde gruplandırılarak -80°C 'de saklandı.

Dokuların Homojenizasyonu ve Proteinlerin Ekstraksiyonu

Analiz öncesinde örnekler buz üzerine alınarak kontrollü şekilde çözdürüldü. Beyin doku örnekleri buz üzerinde çalışılarak protein ekstraksiyon kiti (GeneAll, 701-001) ve proteaz inhibitör kokteyli (Serva, 39102.01) ilave edilerek homojenize edildi.

Homojenizasyon işlemi 16.000 RPM hızda 3 dakika süreyle gerçekleştirildi. Homojenizasyon sonrasında örnekler +4°C’de 4000 RPM’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant kısmı dikkatli şekilde alınarak yeni ependorf tüplere aktarıldı. Elde edilen protein ekstraktlarında toplam protein konsantrasyonu DeNovix DS-11 cihazı kullanılarak belirlendi. Protein miktarlarının ölçülmesiyle her bir jel kuyucuğuna eşit miktarda toplam protein yüklenmesi sağlandı. Bu aşama, western blot analizinde gruplar arası karşılaştırmaların güvenilirliği açısından standardizasyon basamağı olarak uygulandı.

Örneklerin Elektroforez İçin Hazırlanması

Protein ekstraktları, elektroforez öncesinde 3 birim hacim homojenat ve 1 birim hacim 4× yükleme tamponu olacak şekilde karıştırıldı. Hazırlanan karışımlar 1.5 ml’lik ependorf tüplere alındı ve proteinlerin denatürasyonunu sağlamak amacıyla su banyosu içerisinde 5 dakika kaynatıldı. Kaynatma işleminden sonra örnekler oda sıcaklığında kısa süre bekletildi ve ardından 4000 RPM’de 1 dakika santrifüj edildi. Böylece örneklerde oluşabilecek yoğunlaşma ve tüp kapağı çevresindeki sıvı birikimi giderilerek yükleme öncesi homojen bir örnek yapısı sağlandı.

SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması

Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması amacıyla poliakrilamid jel elektroforezi uygulandı. Bu amaçla öncelikle %10 separating/lower jel hazırlandı. Her bir jel için 15 ml’lik tüp içerisinde 2 ml saf su, 1.67 ml %30 acrylamide/bis-acrylamide, 1.25 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 25 µL %20 SDS, 25 µL %10 amonyum persülfat (APS) ve son olarak 2.5 µL TEMED karıştırılarak jel solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan separating jel, biri ince diğeri kalın camdan oluşan Bio-Rad Mini-PROTEAN jel kasetine dikkatlice döküldü. Jel yüzeyinde düzgün polimerizasyon sağlamak ve hava kabarcıklarını uzaklaştırmak amacıyla jel üzerine izopropil alkol eklendi. Separating jelin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra izopropil alkol uzaklaştırıldı. Daha sonra %5 stacking/upper jel hazırlandı. Bunun için 15 ml’lik tüp içersine 2.088 ml saf su, 0.506 ml %30 acrylamide/bis-acrylamide, 0.375 ml 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 15 µL %20 SDS, 15 µL %10 APS ve son olarak 1.5 µL TEMED eklendi. Hazırlanan stacking jel, polimerize olmuş separating jelin üzerine döküldü ve kuyucukların oluşması için uygun taraklar yerleştirildi. Jel tamamen donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkarıldı ve kuyucuklar yürütme tamponu ile yıkandı.

Elektroforetik Yürütme Sisteminin Kurulması

Hazırlanan jeller elektroforez tankına yerleştirildi. Jellerin tarak kısmı iç tarafa bakacak şekilde düzeneğe sabitlendi. Elektroforez tankı, jellerin iç ve dış haznelerini tamamen dolduracak şekilde 1× running buffer ile dolduruldu. Eşit miktarda protein içeren örnekler jel kuyucuklarına yüklendi. Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması için elektroforez işlemi Bio-Rad PowerPac Basic güç kaynağı kullanılarak 80 V sabit voltajda gerçekleştirildi. Yaklaşık 3 saat sonunda proteinlerin jel boyunca yeterli düzeyde ayrıldığı gözlemlendi ve yürütme işlemi sonlandırıldı.

Jelin Coomassie Blue ile Boyanması

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra aynı anda yürütülen jellerden biri, yüklenen toplam protein miktarını değerlendirmek ve normalizasyon amacıyla Coomassie Brilliant Blue ile boyandı. Boyama işlemi 30 dakika sürdürüldü. Boyama sonrasında jel, fazla boyanın uzaklaştırılması amacıyla %10 asetik asit ve %50 metanol içeren destaining solüsyonu ile iki kez 15'er dakika yıkandı. Boyanan jel görüntülenerek her kuyucuktaki toplam protein yoğunluğu daha sonra yapılacak densitometrik normalizasyon için kaydedildi.

Proteinlerin Membrana Transferi

Elektroforez sonrası jelde ayrılan proteinlerin membrana aktarılması amacıyla transfer işlemi uygulandı. Transfer için PVDF membran (Bio-Rad) kullanıldı. Transfer öncesinde PVDF membran uygun şekilde aktive edildi ve transfer tamponu ile dengelendi. Jel, membran, filtre kâğıtları ve sünger pedlerden oluşan transfer sandviçi hazırlandı. Proteinlerin jelden membrana aktarılması Thermo Scientific Pierce Power Blotter sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Transfer işlemi tamamlandıktan sonra membran dikkatlice çıkarıldı ve sonraki antikor inkübasyon basamaklarına geçildi.

Bloklama ve Primer Antikor İnkübasyonu

Transfer sonrası membranda nonspesifik bağlanmaları azaltmak amacıyla bloklama işlemi yapıldı. Membran, 1× TBST içerisinde hazırlanmış %5 yağsız süt tozu solüsyonunda oda sıcaklığında 1 saat çalkalanarak inkübe edildi. Bloklama sonrasında membranlar hedef proteinlere özgü primer antikorlarla inkübe edildi. Bu çalışmada hedef proteinler olarak Bcl-2, Bax, Caspase-3, Kir4.1, TRPM4 ve Olig2 analiz edildi. Her bir hedef protein için uygun primer antikor, üretici firma önerileri ve laboratuvar

optimizasyon koşulları doğrultusunda uygun dilüsyonda hazırlanarak membranla temas ettirildi. Çalışmada kullanılan primer antikorlar: Olig2 (GeneTex, GTX132732; tavşan poliklonal), Kir4.1 (Affinity Biosciences, DF9260; tavşan poliklonal), TRPM4 (Biorbyt, orb668516; tavşan poliklonal), Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7382; fare monoklonal, klon C-2), Bax (Santa Cruz Biotechnology, sc-7480; fare monoklonal), Caspase-3 (Santa Cruz Biotechnology, sc-65497; fare monoklonal) ve yükleme kontrolü olarak β -aktin (Elabscience, E-AB-40338) kullanıldı. Bloklama ve antikor dilüsyonu sırasında non-spesifik bağlanmayı azaltmak amacıyla normal keçi serumu (Biorbyt, orb2652767) kullanıldı. Tüm primer ve sekonder antikorlar için dilüsyonlar, ilgili üreticilerin datasheet'lerinde Western blot uygulaması için tavsiye ettiği aralıkta hazırlanmıştır. Primer antikor inkübasyonu +4°C'de gece boyunca çalkalama koşullarında gerçekleştirildi. Bu basamak, hedef proteinlere özgü bağlanmanın sağlanması amacıyla uygulandı.

Yıkama ve Sekonder Antikor İnkübasyonu

Primer antikor inkübasyonu tamamlandıktan sonra membranlar oda sıcaklığında yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkama solüsyonu 1× PBS/Tween içerecek şekilde hazırlandı. Membranlar, primer antikor fazlasının uzaklaştırılması amacıyla 3 kez 10 dakika süreyle yıkandı. Yıkama işlemi sonrasında primer antikoru konak türüne uygun HRP-konjuge sekonder antikor (Biorbyt) kullanıldı. Sekonder antikor, %5 yağsız süt tozu içeren TBST içerisinde uygun dilüsyonda hazırlandı ve membranlar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Sekonder antikor inkübasyonu sonrasında membranlar tekrar 3 kez 10 dakika süreyle yıkandı. Bu yıkama basamağı, nonspesifik bağlanmaların azaltılması ve kemilüminesans sinyalinin özgülüğünün artırılması amacıyla uygulandı.

Kemilüminesans Görüntüleme

Yıkama işlemlerinin tamamlanmasının ardından membran üzerine Enhanced Chemiluminescence (ECL) solüsyonu (Thermo Fisher) uygulandı. ECL solüsyonu membran yüzeyine karanlık ortamda homojen şekilde dağıtıldı. HRP enzimi aracılığıyla oluşan kemilüminesans sinyali görüntüleme sistemi kullanılarak kaydedildi. Görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı ve her bir hedef protein için ayrı ayrı kayıt altına alındı. Western blot tekniğinde hedef proteinin özgül olarak saptanması, elektroforetik ayırım, membrana transfer ve antikor aracılı kemilüminesans görüntüleme basamaklarının birlikte uygulanmasına dayanmaktadır (170).

Protein Bant Yoğunluklarının Hesaplanması

Western blot görüntülerindeki bant yoğunlukları GeneSys yazılımı kullanılarak densitometrik olarak analiz edildi. Yükleme kontrolü olarak her membran β -aktin antikoru ile yeniden incelenmiş ve β -aktin bant yoğunlukları GeneSys programı ile hesaplanmıştır. Her bir membranda hedef proteine ait bant yoğunluğu, aynı kuyucukta belirlenen β -aktin yoğunluğuna oranlanmıştır. Böylece örnekler arasında yükleme farklılıklarından kaynaklanabilecek değişkenlik azaltıldı. Normalize edilen bant yoğunluğu değerleri her grup için kaydedildi. Kontrol grubu değerleri referans alınarak relatif protein ekspresyon düzeyleri hesaplandı. Elde edilen veriler istatistiksel analiz için kullanıldı ve gruplar arası karşılaştırmalar Kontrol, R, İ ve İ+R grupları arasında yapıldı.

3.2.7. İstatistiksel Analizler

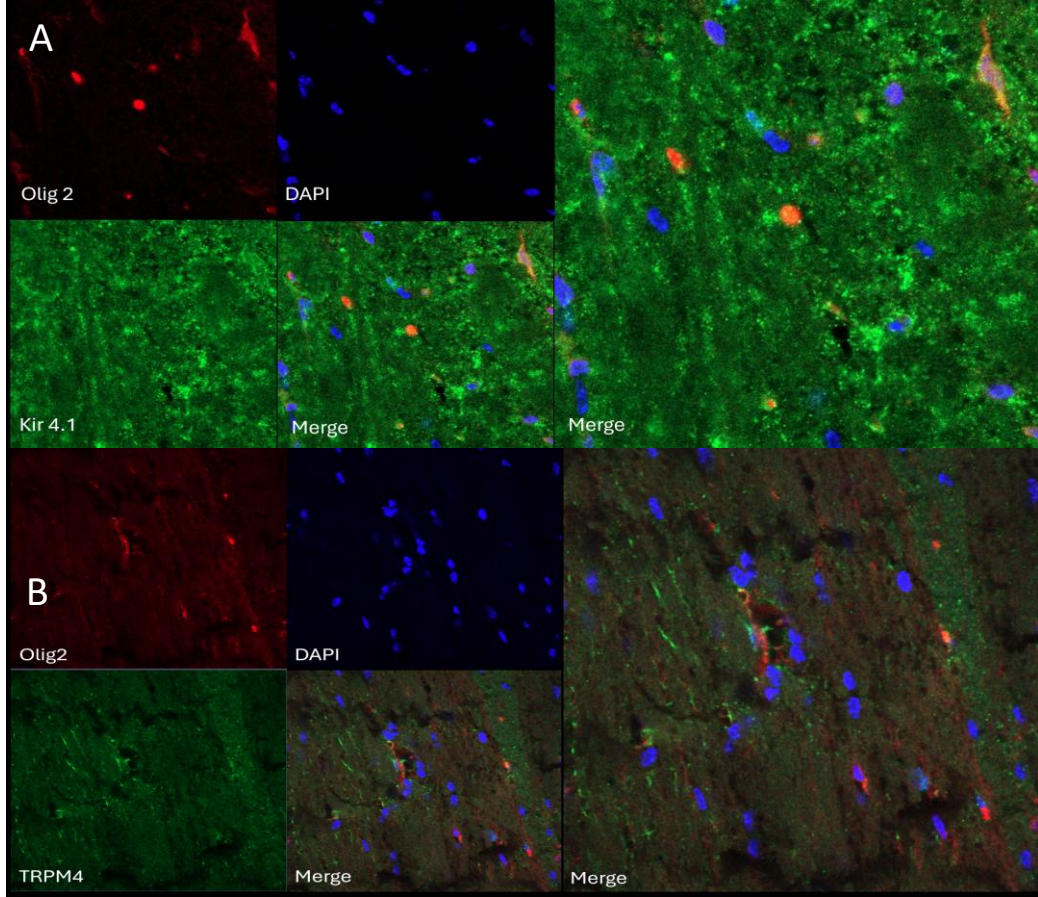
Verilerin istatistiksel analizleri ve grafiksel sunumları GraphPad Prism (Sürüm 10.3.1, GraphPad Software) ile gerçekleştirildi. Normal dağılım uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Belirlenen dışlanma kriterleri dışında kalan tüm örnekler tam sayılarıyla analizlere dahil edildi. Normal dağılan veriler ortalama $\pm$ standart hata ($M \pm SEM$), normal dağılmayan veriler ise Medyan (Min-Max) olarak ifade edildi.

Dört grup arasındaki karşılaştırmalar, parametrik koşullarda tek yönlü ANOVA (post-hoc Tukey veya Games-Howell), parametrik olmayan durumlarda ise Kruskal-Wallis (post-hoc Holm düzeltmeli Dunn) ile değerlendirildi. İki grup karşılaştırması Mann-Whitney U ile yapıldı. Aynı hücrede ölçülen Kir4.1 ve TRPM4 komponentleri eşleştirilmiş örneklem t-testi ile karşılaştırıldı. Western blot verileri her deneyde kontrole normalleştirildiğinden tekrarlı ölçümler tek yönlü ANOVA (Geisser-Greenhouse düzeltmeli), varsayım karşılanmadığında Friedman testi ile analiz edildi. Post-hoc test seçiminde varyans homojenliği Levene testi ile değerlendirildi; varyansların homojen olduğu durumlarda Tukey HSD, varyans heterojenliği saptandığında ise eşit-olmayan varyansa duyarlı Games-Howell testi tercih edildi. Mann-Whitney U testi, küçük örneklem büyüklüğü nedeniyle ($n < 7$) normallik varsayımının güvenle test edilemediği iki-grup karşılaştırmalarında parametrik bağımsız örneklem t-testine alternatif olarak kullanıldı (174-176). Patch-clamp tablolarındaki “p (Kir4.1 ve TRPM4 eşleştirilmiş)” sütunları, aynı hücrede ölçülen Kir4.1 ve TRPM4 komponentleri arasındaki hücre-içi karşılaştırmaya karşılık gelmekte olup gruplar arası fark anlamı taşımamaktadır. Tüm analizlerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Tanımlanması

Patch-clamp kayıtlarının oligodendrosit hücrelerinden alındığını doğrulamak amacıyla, 225 µm kalınlığında hazırlanan akut beyin dilimlerinde oligodendrosit kimlik belirteci olan Olig2 antikoru ile immüno Floresan boyama yapıldı ve konfokal mikroskopi ile görüntüledi. Konfokal görüntüleme yöntemi ile elde edilen mikrograflarda, patch-clamp ile incelenen hücrelerin Olig2 pozitif olduğu ve dolayısıyla oligodendrosit kökenli olduğu doğrulandı (Şekil 4.1.). Ayrıca, çalışmada incelenen iyon kanalları olan Kir4.1, TRPM4 ve TRPA1'in hücre membranındaki dağılımı kanal-spesifik antikorlar ile ko-lokalizasyon analizi yapılarak gösterildi.



Şekil 4.1. Patch-clamp kayıtlarının alındığı oligodendrositlerin konfokal mikroskopi görüntüleri. Görüntülerin ait olduğu belirteçler görüntülerdeki etiketler ile belirtildi. (A) Olig2+Kir4.1 ko-lokalizasyon görüntüsü, (B) Olig2+TRPM4 ko-lokalizasyon görüntüsü. Merge etiketi tüm belirteçlerin aynı anda bulunduğu görüntüyü gösterir.

4.2. Patch-Clamp Ölçüm Sonuçları

Oligodendrosit hücrelerinde iyon kanalı aktivitesi, 225 µm kalınlığındaki ex vivo olarak incelenen akut beyin dilimlerinde tüm-hücre voltaj-clamp konfigürasyonunda iki farklı uyarı protokolü kullanılarak değerlendirildi. Step protokolünde voltaj basamakları -150 mV ile +50 mV arasında 10 mV'lik adımlarla uygulandı, her bir voltaj basamağında 700 ms süreyle steady-state akım kayıtları alındı. Ramp protokolünde ise membran potansiyeli 911 ms süre içinde -140 mV'dan +40 mV'a doğru sürekli ve doğrusal biçimde değiştirildi. Bu sırada anlık akım kaydı alınarak yüksek voltaj çözünürlüklü I-V eğrileri elde edildi.

İlaç uygulamalarının iyon kanalı aktivitesi üzerine etkileri ardışık ilaç kayıtları arasında çıkarma (subtraction) işlemi uygulanarak değerlendirildi. Kontrol ve resveratrol gruplarında polygodial-duyarlı bileşen TRPA1 akımı, BaCl₂-duyarlı bileşen Kir4.1 akımı ve 9-fenantrol-duyarlı bileşen de TRPM4 akımı olarak değerlendirildi. İskemi (OGD) ve resveratrol+iskemi (OGD) gruplarında ise polygodial uygulanmadığı için TRPA1 akımı bu gruplarda hesaplanmadı. Bunun yerine iskemi-duyarlı (kontrol-iskemi), Kir4.1 ve TRPM4 akım bileşenleri analiz edildi. Her hücrenin I-V eğrisinden sıfır akımın geçtiği voltaj değeri (V_{rev}) lineer interpolasyon yöntemiyle belirlendi. Her gruptan örnek olarak bazı hücrelerin kayıt grafikleri kullanıldı. Tüm hücrelerin sayısal verileri ise özet çizelgelerde sunuldu.

4.2.1. Dinlenim Membran Potansiyeli (RMP) Değerleri

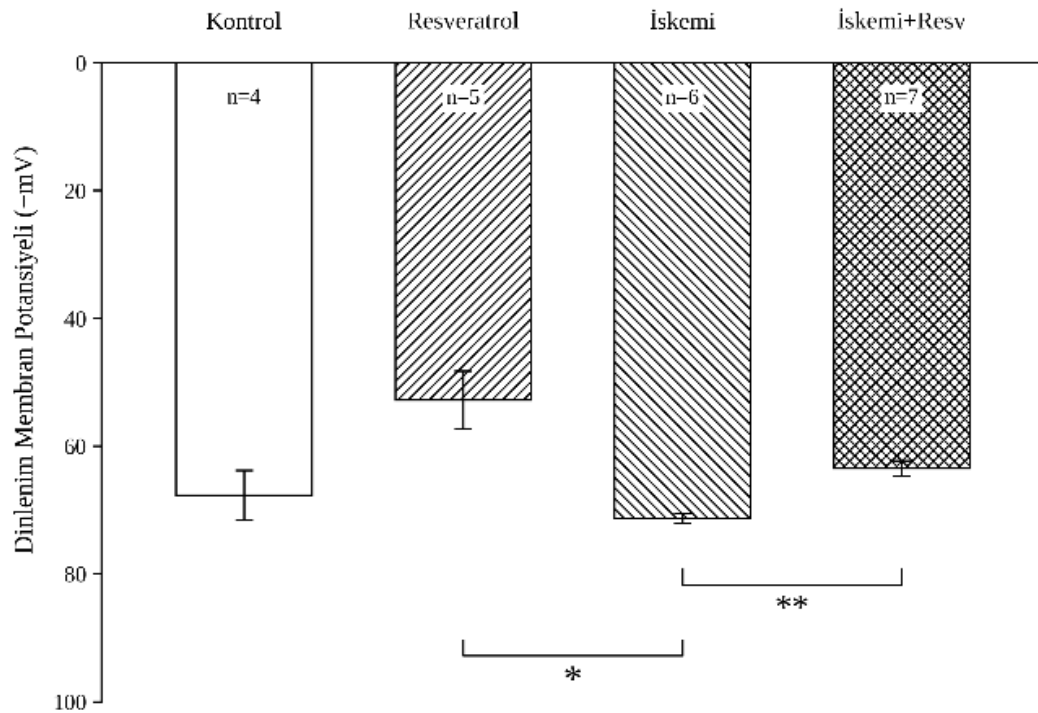
Oligodendrosit hücrelerinin dinlenim membran potansiyeli (RMP), akut beyin dilimlerinde akım-kenetleme (current-clamp) konfigürasyonunda, hücreye akım enjekte edilmeden ölçüldü. Dört deney grubunda elde edilen RMP değerleri ve analiz sonuçları Tablo 4.1'de ile Şekil 4.2'de birlikte sunuldu.

Kontrol grubunda RMP ortalama olarak -67.66 ± 3.95 mV (n=4), resveratrol grubunda -52.73 ± 4.47 mV (n=5), iskemi grubunda -71.21 ± 0.87 mV (n=6) ve resveratrol+iskemi grubunda -63.40 ± 1.24 mV (n=7) olarak saptandı. İskemi grubunda RMP en hiperpolarize değere ulaşırken, resveratrol grubunda en depolarize değer kaydedildi. Hiçbir grup, kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı biçimde farklı değildi (p>0.05). Buna karşı grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0.0058). Bunun yanında anlamlı bulunan tek ikili karşılaştırma resveratrol ile iskemi grupları arasında olduğu görüldü (p=0.0049). İskemi ile resveratrol+iskemi

grupları arasındaki fark ise eğilim düzeyinde kalmış, istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır ($p=0.0698$). Resveratrol+iskemi grubunun RMP ortalamasının (-63.40 mV) kontrol grubuna (-67.66 mV) yakın seyretmesi, resveratrol ön-uygulamasının iskemiye bağlı membran potansiyelinde gözlenen kaymanın bu grupta kontrol değerine daha yakın olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.1. Grupların Dinlenme Membran Potansiyeli (RMP) değerleri (ortalama $\pm$ SEM) ve kontrol grubuna kıyasla ikili karşılaştırma p değerleri.

Grup	n	RMP (M $\pm$ SEM)	SD	p
Kontrol	4	-67.66 ± 3.95 mV	7.90	—
Resveratrol	5	-52.73 ± 4.47 mV	10.00	0.144
İskemi	6	-71.21 ± 0.87 mV	2.12	0.818
İskemi+Resveratrol	7	-63.40 ± 1.24 mV	3.28	0.746



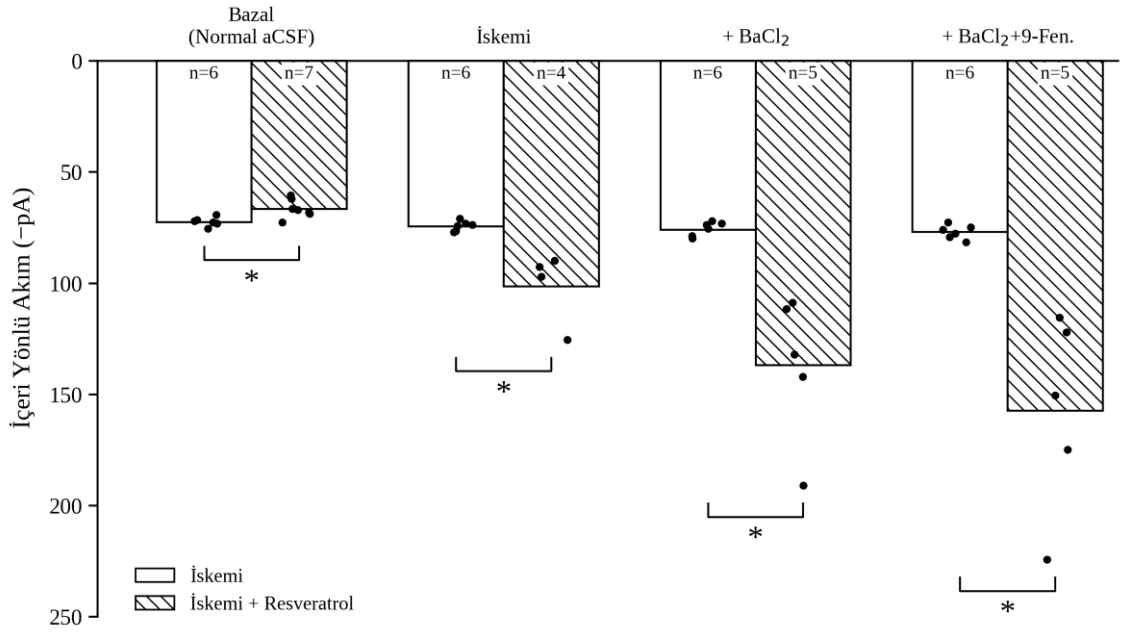
Şekil 4.2. Gruplara göre dinlenme membran potansiyeli (RMP) değerleri. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

4.2.2. İlaç Uygulamaları Sırasında İçeri Yönlü Akım Değişimleri

İskemi ve resveratrol+iskemi gruplarında her hücrede bazal (kontrol) kayıt, iskemi (resveratrol grubunda iskemi+resveratrol), BaCl₂ ve 9-fenantrol uygulama basamaklarında içeri yönlü akım büyüklüğü ölçüldü. İskemi grubunda akım büyüklüğü tüm uygulama basamaklarında stabil kalmıştır (kontrol -72.63 ± 0.88 , iskemi -74.38 ± 1.01 , +BaCl₂ -75.95 ± 1.17 , +BaCl₂+9-fenantrol -76.85 ± 1.31 pA). Buna karşılık resveratrol+iskemi grubunda akım ardışık uygulamalarla giderek artmıştır (bazal -66.51 ± 1.53 , iskemi+resveratrol -101.35 ± 8.22 , +BaCl₂ -136.88 ± 14.82 , +BaCl₂+9-fenantrol -157.29 ± 19.70 pA). İki grup arasındaki fark tüm uygulama basamaklarında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 4.2., Şekil 4.3.).

Tablo 4.2. İskemi ve resveratrol+iskemi gruplarında ardışık uygulama basamaklarında ölçülen içeri yönlü (inward) akım büyüklükleri (ortalama $\pm$ SEM) ve grup içi karşılaştırma p değerleri.

Uygulama basamağı	İskemi grubu	n	Resveratrol+İskemi grubu	n	p
	M $\pm$ SEM (pA)		M $\pm$ SEM (pA)		
Bazal (kontrol)	-72.63 ± 0.88	6	-66.51 ± 1.53	7	0.0301 *
İskemi (resv. grubunda: iskemi+resveratrol)	-74.38 ± 1.01	6	-101.35 ± 8.22	4	0.0453 *
+ BaCl ₂	-75.95 ± 1.17	6	-136.88 ± 14.82	5	0.0145 *
+ BaCl ₂ + 9-fenantrol	-76.85 ± 1.31	6	-157.29 ± 19.70	5	0.0149 *

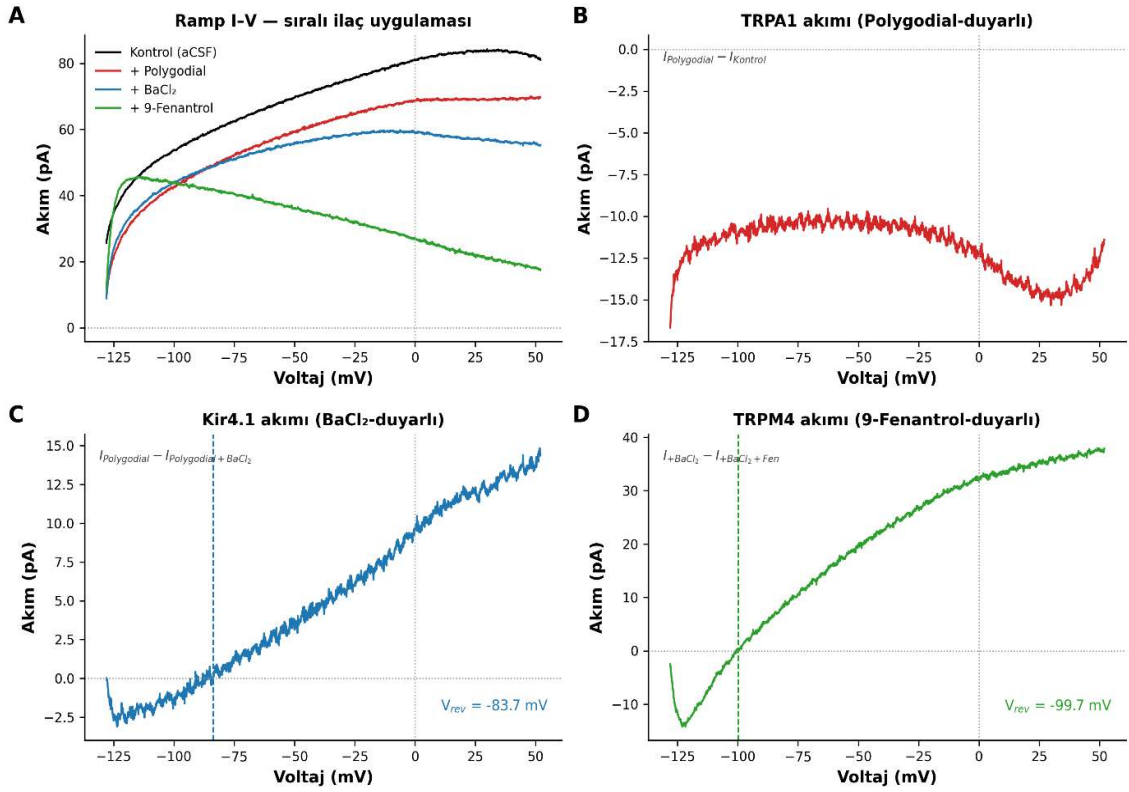


Şekil 4.3. Bazal, iskemi, +BaCl₂ ve +9-fenantrol uygulamaları sonrası içeri yönlü (inward) akım değerleri. *p < 0.05.

4.2.3. Kontrol Grubunda Oligodendrosit İyon Kanalı Akımları

Kontrol grubunda yedi oligodendrosit hücresinden alınan bazal (kontrol) kayıttan sonra sırasıyla polygodial, BaCl₂ ve 9-fenantrol uygulamaları yapıldı ve her basamakta tüm-hücre voltaj-clamp kayıtları alındı. Subtraction yöntemiyle TRPA1, Kir4.1 ve TRPM4 akım bileşenleri hesaplandı. Bu hücrelerden 1. ve 7. hücreler, uzun süreli perfüzyona bağlı belirgin baseline drifti gösterdiğinden komponent analizine dahil edilmeyip grup n=5 hücre üzerinden değerlendirildi. Ramp protokolünden elde edilen kanal komponentlerinin bir örneği 2. kontrol hücresinde (Kontrol-H2) gözlemlendi. Bu hücrede subtraction analizinde Kir4.1 akımı 16.2 pA pik-pik genlikte ve V_{rev} = -83.7 mV, TRPM4 akımı 48.1 pA genlikte ve V_{rev} = -99.7 mV değerinde hesaplandı. Bu reversel potansiyelleri, oligodendrositlerde Kir4.1 ve TRPM4 kanallarının K⁺ denge potansiyeli (yaklaşık -97 mV) civarındaki K⁺-baskın iletkenlik profilini yansıtmaktadır (Şekil 4.4.).

Kontrol grubu — Hücre #2 — Ramp protokolü (−128 → +52 mV, 911 ms)

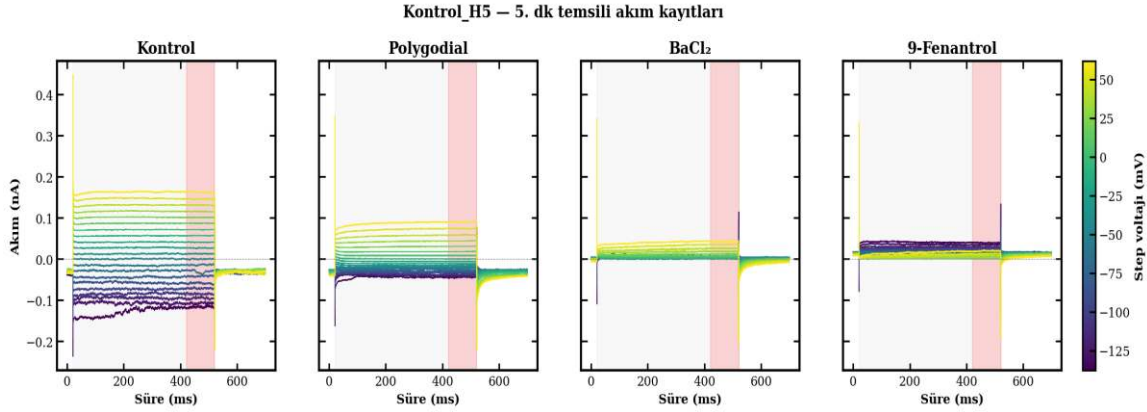


Şekil 4.4. Kontrol grubu (Kontrol-H2) ramp protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi. (A) Ardışık uygulamalara ait I-V eğrileri, (B) TRPA1 akımı, (C) Kir4.1 akımı, (D) TRPM4 akımı.

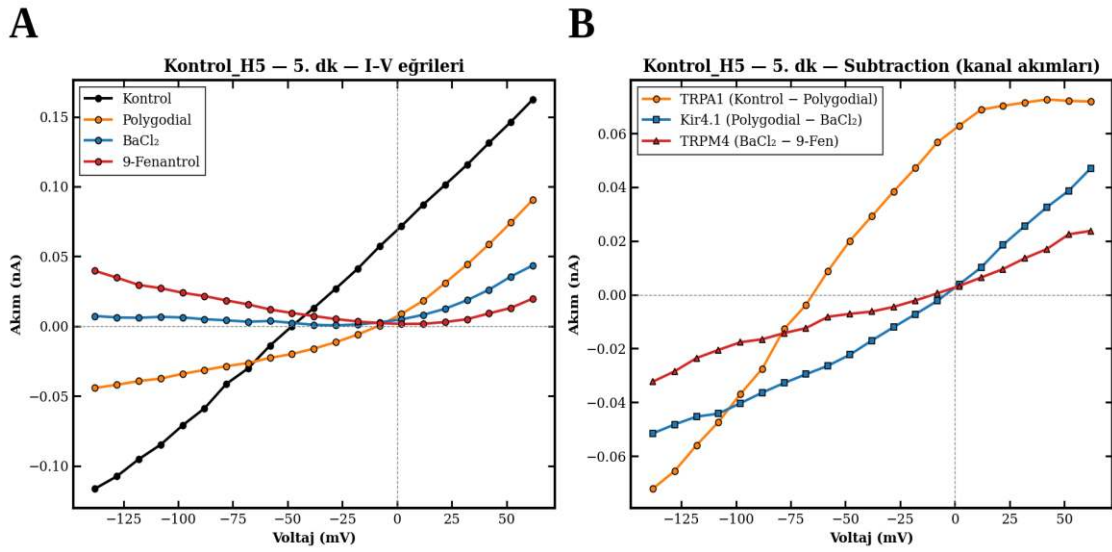
Kontrol grubunda iyon kanalı komponentlerinin belirlenmesi amacıyla, her hücrede voltaj basamağı (step) protokolü uygulanarak içeri/dışarı yönlü akımlar kaydedildi. Kayıtlar önce kontrol koşulunda, ardından sırasıyla polygodial (TRPA1 agonisti), BaCl₂ (Kir blokeri) ve 9-fenanthrol (TRPM4 blokeri) uygulanarak tekrarlandı. Kontrol grubundan temsili bir hücreye (Kontrol-H5) ait akım kayıtları Şekil 4.5.'te verildi. Her step voltajına karşılık gelen akım izleri kararlı durum (steady-state) penceresi boyunca stabil seyretmiştir. Ardışık blokör uygulamalarıyla akım genliğinde kademeli bir azalma gözlemlendi.

Aynı hücreye ait akım-voltaj (I-V) eğrileri Şekil 4.6. A'da gösterilmektedir. Dört uygulama koşuluna ait I-V eğrileri birbirinden belirgin biçimde ayrılmış olup, en büyük akım kontrol kaydında, en küçük akım ise tüm blokörlerin uygulandığı koşulda elde edildi. Ardışık koşulların farkı alınarak ilgili kanal akımları ayrıştırıldı (Şekil 4.6. B): Kontrol ile polygodial kayıtları arasındaki fark TRPA1, polygodial ile BaCl₂ kayıtları

arasındaki fark Kir4.1, BaCl₂ ile 9-fenanol kayıtları arasındaki fark ise TRPM4 akımına karşılık gelmektedir. Bu temsili kontrol hücresinde, çalışmanın odağında yer alan Kir4.1 ve TRPM4 komponentlerinin her ikisi de ayrıştırılabilir düzeyde tespit edildi.



Şekil 4.5. Kontrol grubu (Kontrol-H5) step protokolü ham akım kayıtları. Soldan sağa: kontrol, +polygodial, +BaCl₂, +9-fenanol uygulamaları.



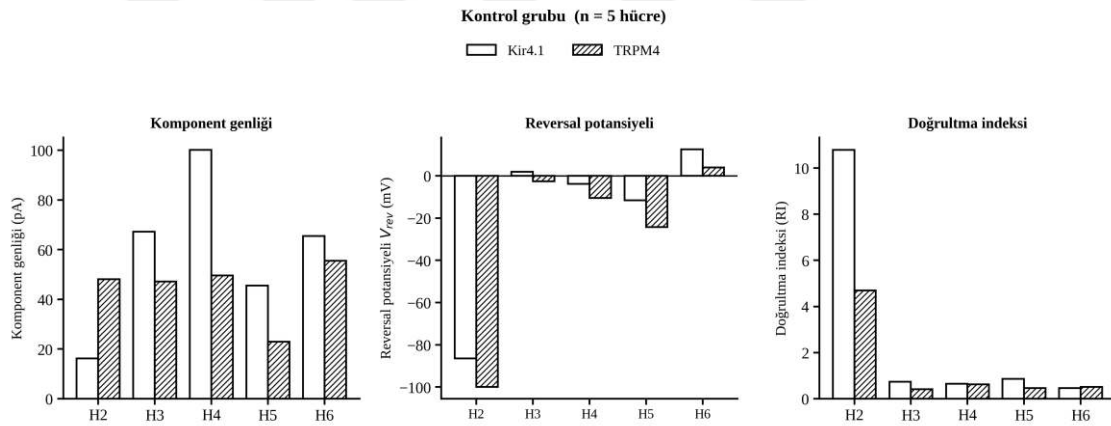
Şekil 4.6. Kontrol grubu (Kontrol-H5) step protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi. (A) Ardışık uygulamalara ait I-V eğrileri, (B) ayrıştırılan kanal komponentleri (TRPA1, Kir4.1, TRPM4).

Kontrol grubuna ait beş hücrenin subtraction analizinden elde edilen kanal komponentlerinin nicel parametreleri (pik-pik genlik, reversel potansiyeli (V_{rev}) ve rektifikasyon indeksi (RI)) Tablo 4.3.'te sunuldu. Kir4.1 ve TRPM4 komponentleri hücreden hücreye genlik ve reversel potansiyeli açısından belirgin değişkenlik göstermiş, yalnızca Kontrol-H2 hücresinde her iki komponent de K⁺ denge potansiyeline yakın

reversal potansiyeli (Kir4.1 -83.7 mV, TRPM4 -99.7 mV) sergilemiştir. Diğer hücrelerde komponentler daha büyük genlikli ancak reversal potansiyeli sıfıra yakın profiller göstermiştir (Şekil 4.7.).

Tablo 4.3. Kontrol grubu kanal komponentlerinin nicel parametreleri (ortalama $\pm$ SEM).

Parametre	Kir4.1 (M $\pm$ SEM)	n	TRPM4 (M $\pm$ SEM)	n	p
Komponent genliği (pA)	58.9 $\pm$ 13.8	5	44.7 $\pm$ 5.6	5	0.347
Reversal potansiyeli (mV)	-17.5 $\pm$ 17.7	5	-26.7 $\pm$ 18.9	5	0.006 *
Doğrultma indeksi (RI)	2.70 $\pm$ 2.02	5	1.34 $\pm$ 0.84	5	0.317

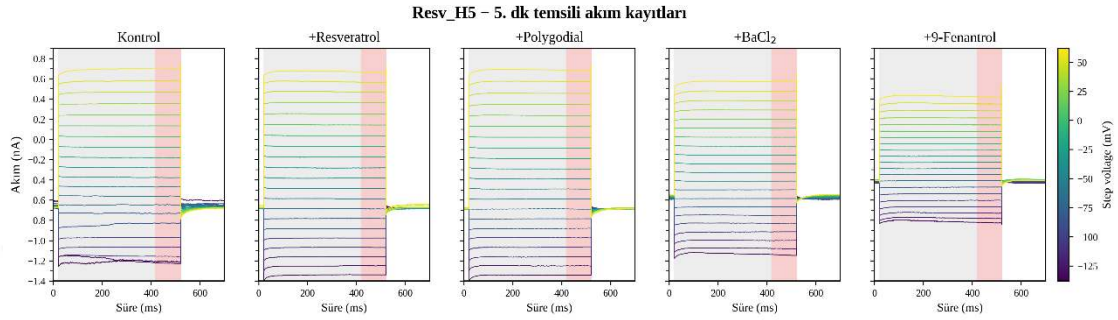


Şekil 4.7. Kontrol grubu (n = 5) hücrelerinde Kir4.1 ve TRPM4 komponent genliği, reversal potansiyeli ve doğrultma indeksi. Her sütun tek bir hücreyi temsil eder.

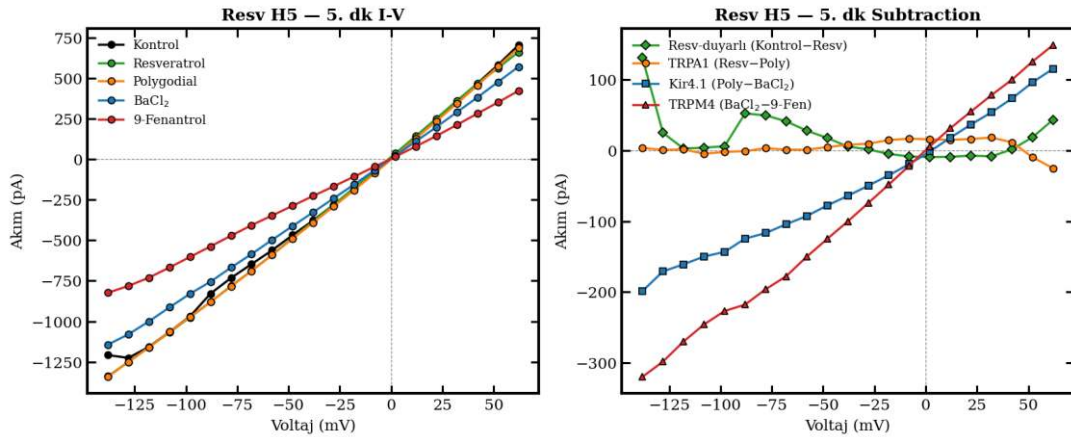
4.2.4. Resveratrol Grubunda İyon Kanalı Akımları

Resveratrol grubunda beş oligodendrosit hücresinde (n=5) bazal kayıt sonrası önce resveratrol uygulandı ve kayıt alındı. Ardından sırasıyla polygodial, BaCl₂ ve 9-fenantril eklenerek beş basamaklı protokol tamamlandı. Bu grupta dikkat çeken bulgu, resveratrolün hücreden hücreye birbirinden farklı yönlerde etki oluşturmasıdır. İki hücrede (Resv-H1, Resv-H5) resveratrol uygulaması akımı belirgin biçimde azaltıcı etki gösterirken, iki hücrede (Resv-H2, Resv-H4) akımı artırıcı yönde etki yaptığı görüldü. Bir hücrede ise (Resv-H3) resveratrolün belirgin bir etkisi olduğu gözlemlenmedi.

Resveratrol grubunda kanal modülasyonunun en belirgin biçimde gösteren örnek hücre Resv-H5 olmuştur. Bu hücrede +62 mV kenetleme voltajında bazal akım yaklaşık +700 pA, -138 mV'da yaklaşık -1200 pA değerlerinde kaydedilmiştir. Subtraction analizinde ise TRPM4 akım bileşeni -138 mV'da yaklaşık -320 pA, Kir4.1 akım bileşeni ise yaklaşık -200 pA gibi olağanüstü büyük genliklerde elde edildi (Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.).



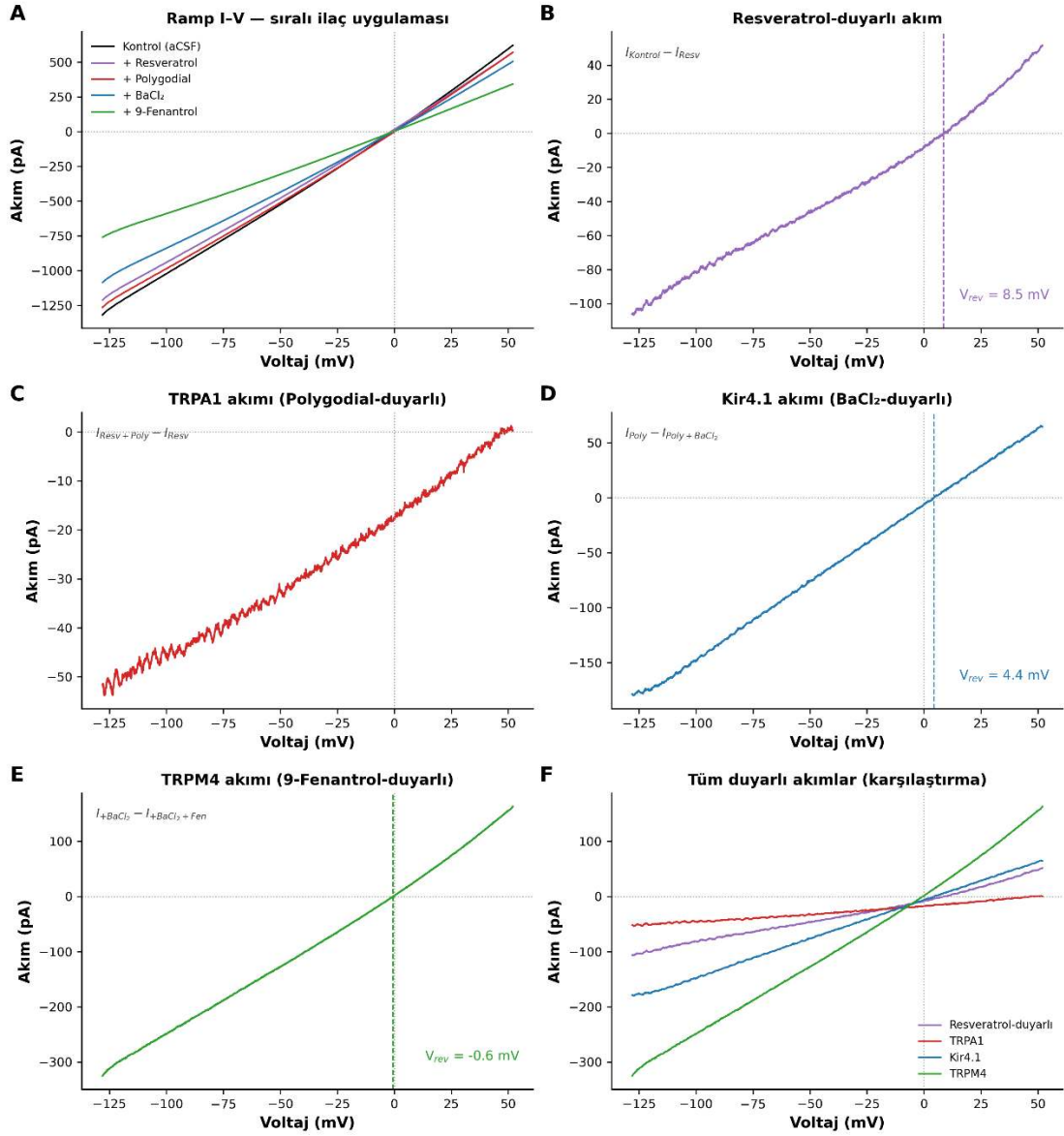
Şekil 4.8. Resveratrol grubu (Resv-H5) step protokolü ham akım kayıtları. Soldan sağa: kontrol, +resveratrol, +polygodial, +BaCl₂, +9-fenanol uygulamaları.



Şekil 4.9. Resveratrol grubu (Resv-H5) step protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi. (A) Ardışık uygulamalara ait I-V eğrileri, (B) ayrıştırılan bileşenler (resveratrol-duyarlı, TRPA1, Kir4.1, TRPM4).

Aynı hücrenin ramp protokolü kayıtları, step protokolüyle uyumlu büyük genlikleri yüksek voltaj çözünürlüğüyle göstermektedir (Şekil 4.10.). Ramp analizinde resveratrol-duyarlı bileşen $V_{rev} = +8.5$ mV, Kir4.1 $V_{rev} = +4.4$ mV ve TRPM4 $V_{rev} = -0.6$ mV olarak hesaplandı.

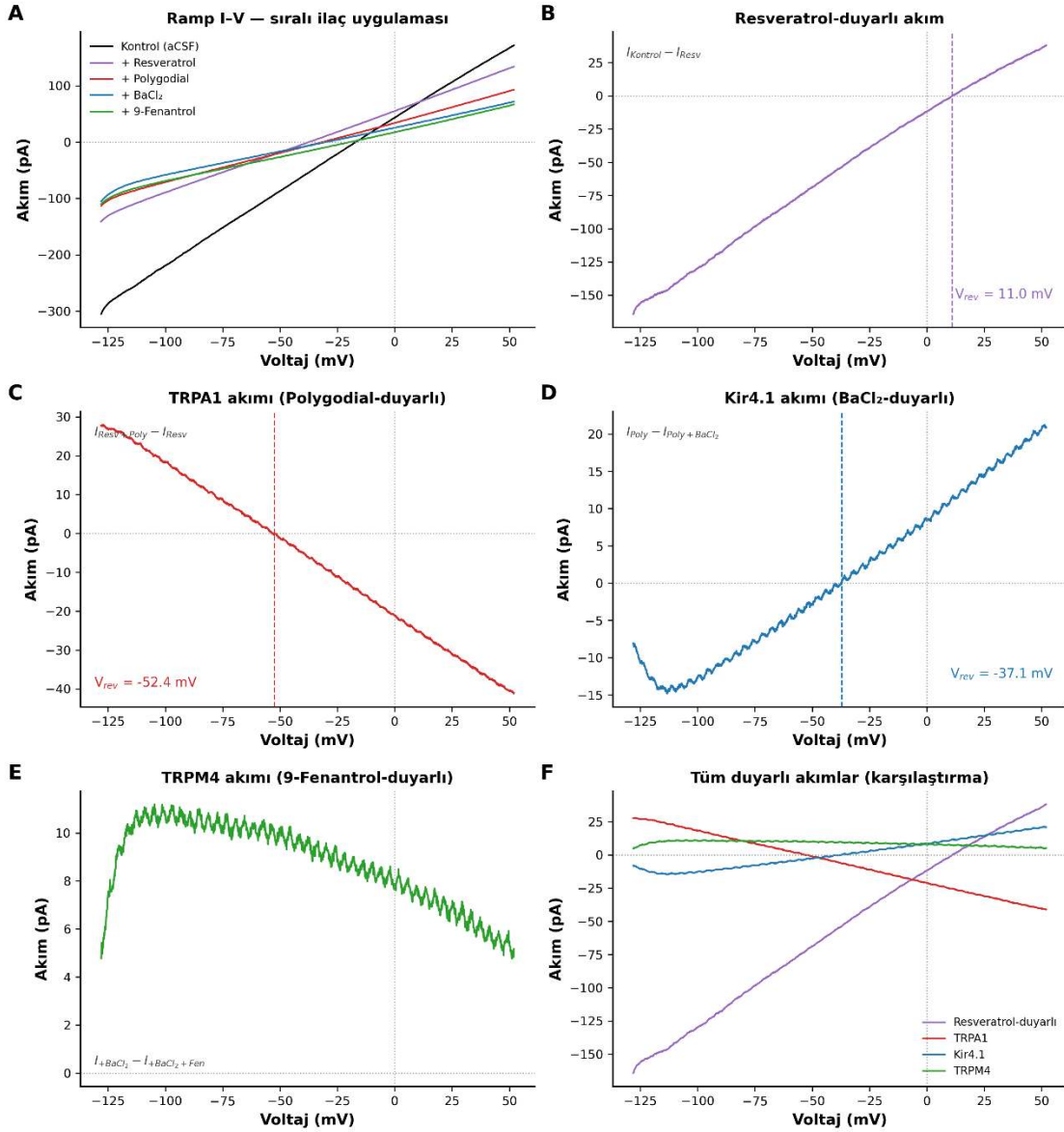
Resveratrol grubu — Hücre #5 — Ramp protokolü (−128 → +52 mV, 911 ms)



Şekil 4.10. Resveratrol grubu (Resv-H5) ramp protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi. (A) Ardışık uygulamalara ait I-V eğrileri, (B) resveratrol-duyarlı akım, (C) TRPA1 akımı, (D) Kir4.1 akımı, (E) TRPM4 akımı, (F) tüm komponentlerin karşılaştırması.

Resveratrol grubunda resveratrolün güçlü inhibitör etkisinin gözlemlendiği bir başka örnek hücre Resv-H1 olmuştur (Şekil 4.11.). Bu hücrede resveratrol-duyarlı bileşen ramp protokolünde $V_{rev} = +11.0$ mV değerinde lineer ve büyük genlikli (>150 pA) bir akım olarak ortaya çıktığı, sonraki ilaç uygulamalarına bağlı kanal akım bileşenleri ise küçük genliklerde kaldığı görüldü.

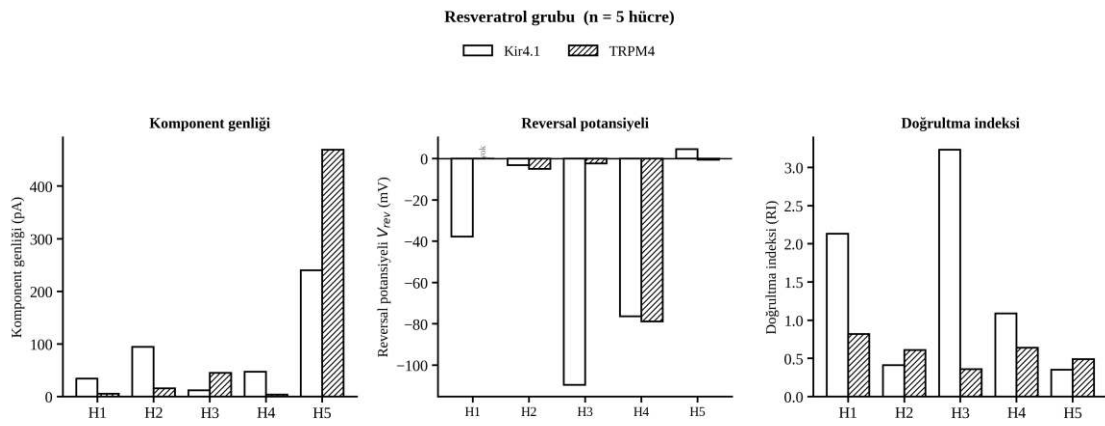
Resveratrol grubu — Hücre #1 — Ramp protokolü (-128 → +52 mV, 911 ms)



Şekil 4.11. Resveratrol grubu (Resv-H1) ramp protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi. (A) Ardışık uygulamalara ait I-V eğrileri, (B) resveratrol-duyarlı akım, (C) TRPA1 akımı, (D) Kir4.1 akımı, (E) TRPM4 akımı, (F) tüm komponentlerin karşılaştırması.

Resveratrol grubunda beş hücrede (n = 5) Kir4.1 ve TRPM4 komponentlerinin genlik, reversal potansiyeli (V_{rev}) ve doğrultma indeksi (RI) değerleri belirlendi. Her hücreye ait değerler Şekil 4.12'de, gruba ait ortalama $\pm$ SEM değerleri ve iki komponentin karşılaştırması ise Tablo 4.4'te gösterildi. Komponent genliği hücreler arasında belirgin değişkenlik göstermiş, özellikle bir hücrede (Resv-H5) hem Kir4.1 hem de TRPM4 akımları diğer hücrelere kıyasla belirgin biçimde yüksek ölçülmüş ve bu durum grup

ortalamalarının yüksek standart hata değerlerine yansımıştır (Kir4.1 genliği 85.6 ± 40.9 pA, TRPM4 genliği 107.8 ± 90.6 pA). Reversal potansiyeli Kir4.1 için -44.5 ± 21.7 mV ($n = 5$), TRPM4 için -21.7 ± 19.1 mV ($n = 4$, bir hücrede TRPM4 V_{rev} ölçülemedi). Doğrultma indeksi ise Kir4.1 için 1.44 ± 0.55 , TRPM4 için 0.58 ± 0.08 olarak bulundu. Aynı hücrelerde Kir4.1 ve TRPM4 komponentleri eşleştirilmiş t-testi ile karşılaştırıldığında, incelenen üç parametrenin hiçbirinde iki komponent arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$).



Şekil 4.12. Resveratrol grubu hücrelerinde Kir4.1 ve TRPM4 komponent genliği, reversal potansiyeli ve doğrultma indeksi. Her sütun tek bir hücreyi temsil eder.

Tablo 4.4. Resveratrol grubu kanal komponentlerinin nicel parametreleri (ortalama $\pm$ SEM).

Parametre	Kir4.1 (M $\pm$ SEM)	n	TRPM4 (M $\pm$ SEM)	n	p
Komponent genliği (pA)	85.6 ± 40.9	5	107.8 ± 90.6	5	0.705
Reversal potansiyeli (mV)	-44.5 ± 21.7	5	-21.7 ± 19.1	4	0.440
Doğrultma indeksi (RI)	1.44 ± 0.55	5	0.58 ± 0.08	5	0.208

4.2.5. İskemik (OGD) Grubunda İyon Kanalı Akımları

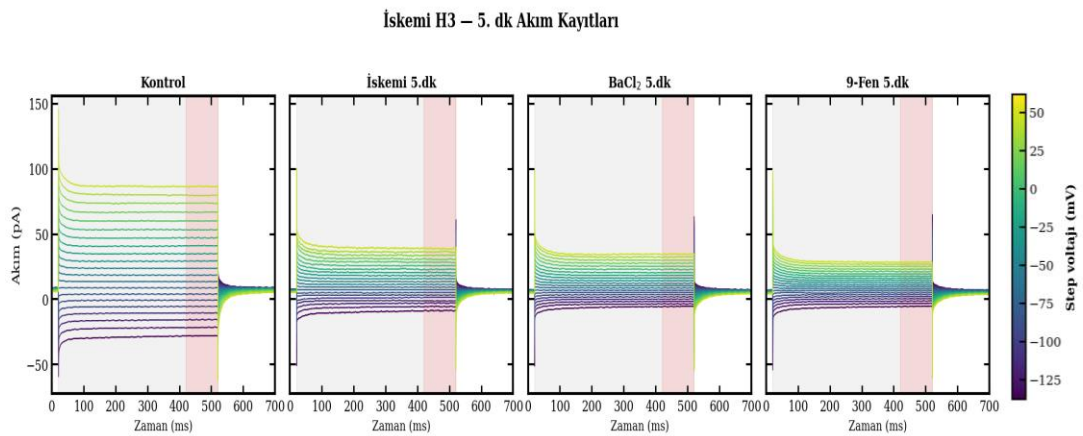
İskemi grubunda yedi oligodendrosit hücresinde ($n=7$) bazal kayıttan sonra oksijen-glukoz yoksunluğu (OGD) modeli uygulanıp kayıt alındı. Ardından sırasıyla BaCl₂ ve 9-fenantrol kayıtları da elde edildi. Bu grupta en dikkat çekici nicel bulgu, Kir4.1 ve TRPM4 akım komponentlerinin genliklerinin kontrol grubuna kıyasla belirgin

biçimde küçülmesi olmuştur. Kir4.1 komponent genliği kontrol grubunda ortalama 58.9 ± 13.8 pA iken iskemi grubunda 15.1 ± 1.5 pA, TRPM4 komponent genliği ise kontrol grubunda 44.7 ± 5.6 pA iken iskemi grubunda 10.0 ± 6.0 pA düzeyine gerilemiştir. Bazal akım genlikleri de iskemi grubunda belirgin biçimde küçülmüş (+52 mV'da ortalama 57.4 pA), kontrol grubunun ortalamasının (221.2 pA) yaklaşık dörtte birine inmiştir (Tablo 4.5.).

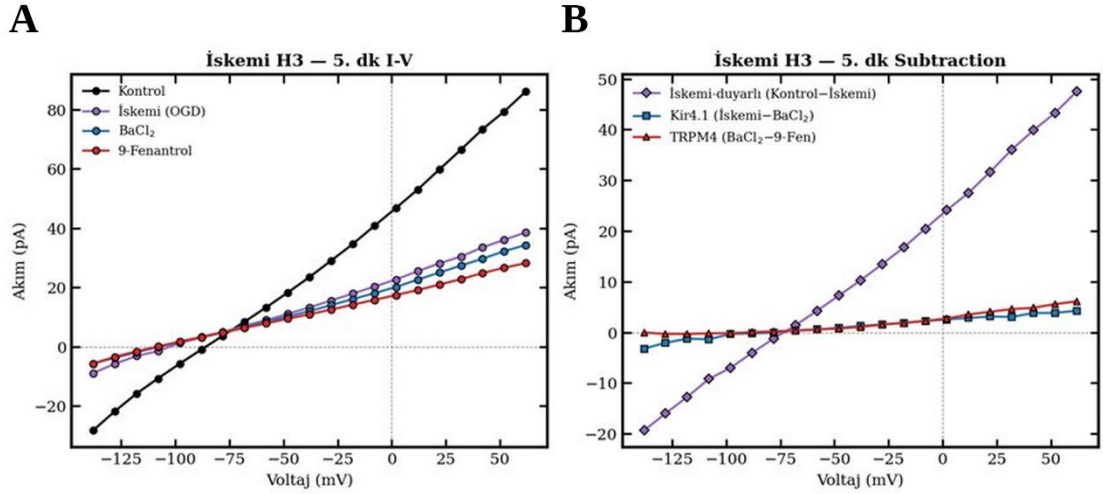
Tablo 4.5. Kontrol grubu ile iskemi grubunun bazı parametrelerinin karşılaştırılması (ortalama $\pm$ SEM).

Komponent	Kontrol (M $\pm$ SEM)	n	İskemi (M $\pm$ SEM)	n
Kir4.1 genlik (pA)	58.9 ± 13.8	5	13.1 ± 2.4	7
TRPM4 genlik (pA)	44.7 ± 5.6	5	10.0 ± 6.0	7
Bazal akım (+52 mV)	~ 221 pA	5	~ 57 pA	7

İskemi grubunda OGD uygulamasının akım profili üzerine etkisinin gözlemlendiği örnek hücrelerden biri İskemi-H3 hücresidir. Bu hücrede +62 mV kenetleme voltajında bazal akım yaklaşık +86 pA değerinde kaydedildi. Bunu takiben OGD uygulaması sonrasında akımın büyük ölçüde azaldığı görüldü. Subtraction analizinde Kir4.1 ve TRPM4 akım komponentleri çok küçük genliklerde (birkaç pA seviyesinde) kaldı (Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.).



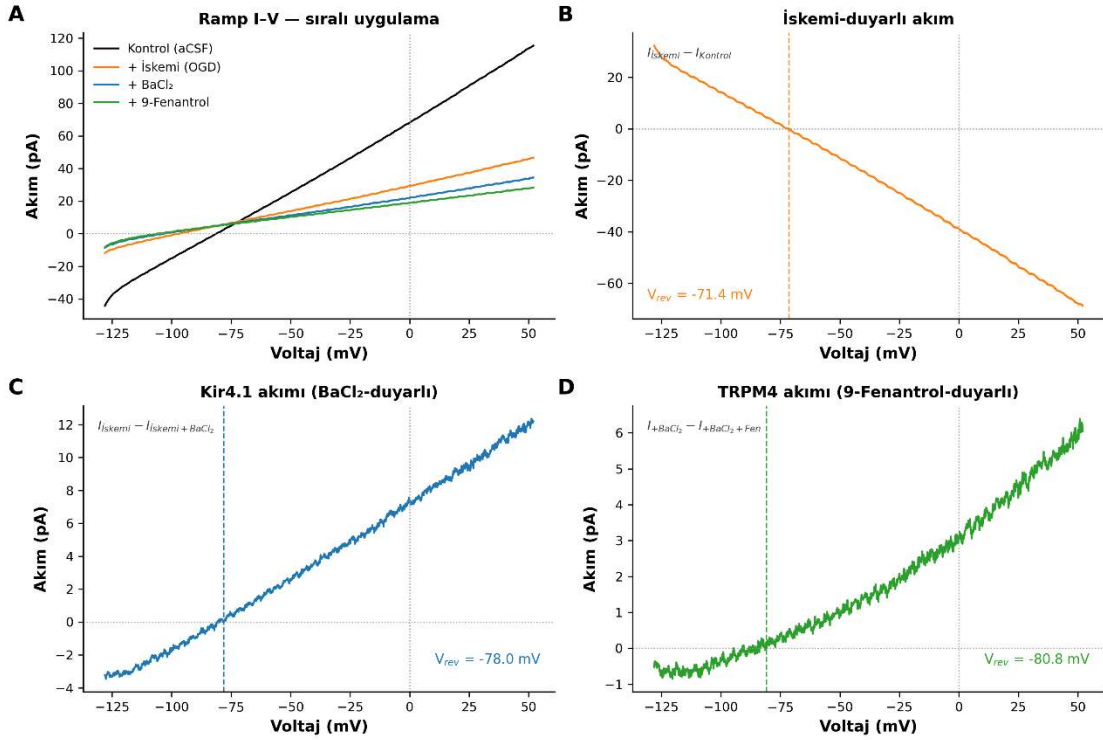
Şekil 4.13. İskemi grubu (İskemi-H3) step protokolü ham akım kayıtları. Soldan sağa: kontrol, +OGD, +BaCl₂, +9-fenanol uygulamaları.



Şekil 4.14. İskemi grubu (İskemi-H3) step protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi. (A) Ardışık uygulamalara ait I-V eğrileri, (B) ayrıştırılan komponentler (iskemi-duyarlı, Kir4.1, TRPM4).

Aynı hücrenin ramp protokolü kayıtları step bulgularını desteklemektedir (Şekil 4.15.). Ramp analizinde iskemi-duyarlı bileşen $V_{rev} = -71.4$ mV değerinde gözlemlendi. Bu durum, OGD altında K^+ iletkenliği üzerinden gözlenen değişikliklerle uyumludur. Kir4.1 ($V_{rev} = -78.0$ mV) ve TRPM4 ($V_{rev} = -80.8$ mV) komponentleri klasik reversel potansiyellerini sergilediği ancak genliklerini yalnızca 12 pA seviyesinde olduğu görüldü. Bu sonuç fonksiyonel yapı korunduğunu ancak kanal aktivitesinin büyük ölçüde baskılandığını göstermektedir.

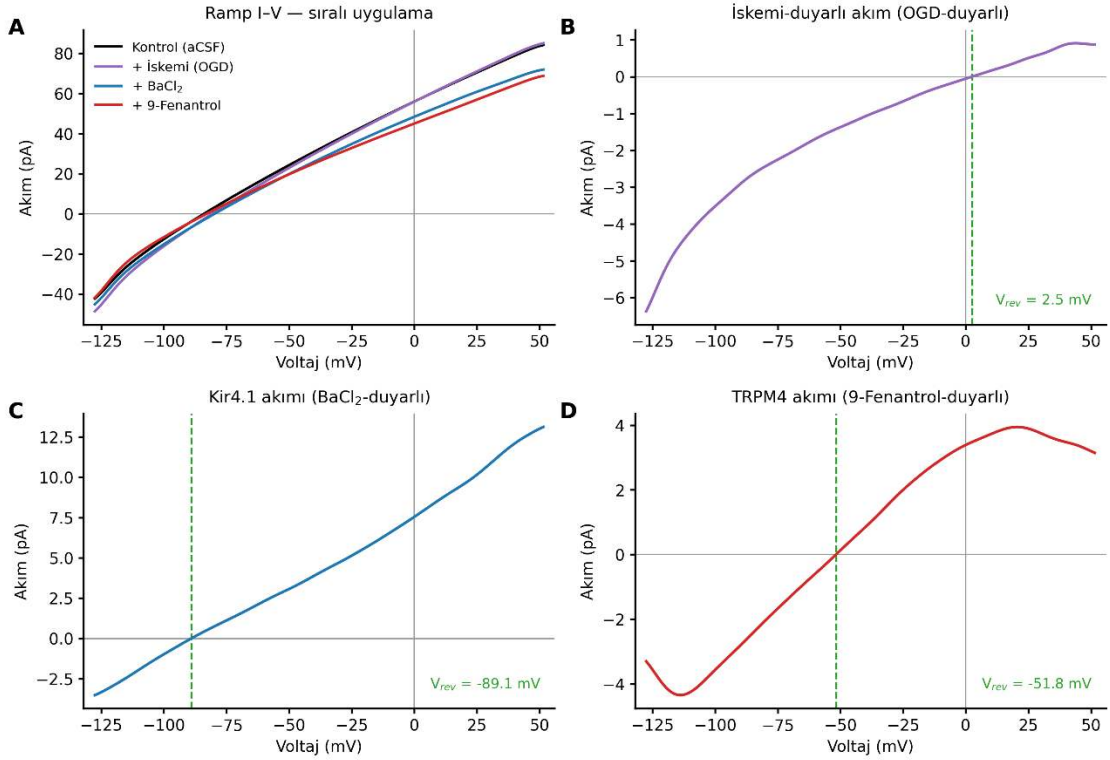
İskemi grubu — Hücre #3 — Ramp protokolü (-128 → +52 mV, 911 ms)



Şekil 4.15. İskemi grubu (İskemi-H3) ramp protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi. (A) Ardışık uygulamalara ait I-V eğrileri, (B) iskemi-duyarlı bileşen, (C) Kir4.1 akımı, (D) TRPM4 akımı.

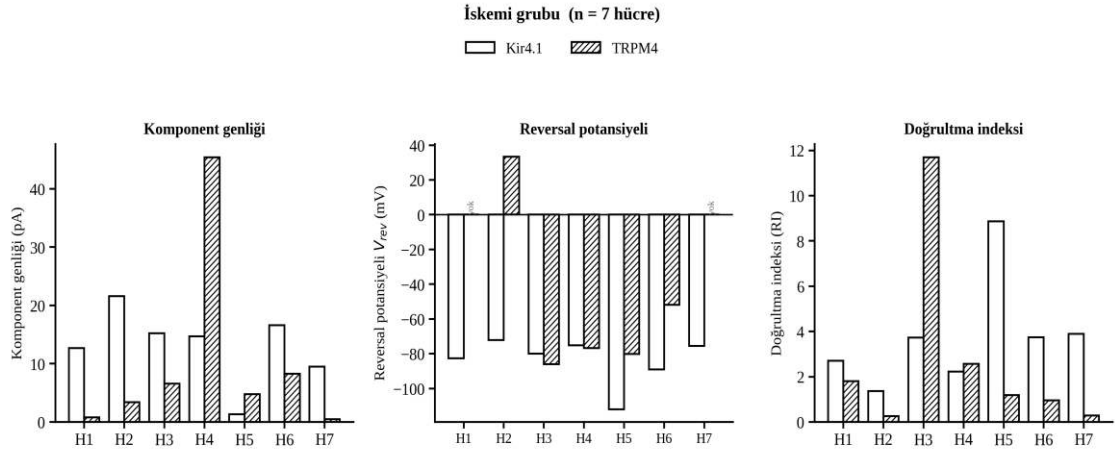
İskemi grubunun farmakolojik etkilerinin sınırlı kaldığı örnek bir hücre de İskemi-H6 hücresi olmuştur (Şekil 4.16.). Bu hücrede tüm ilaç uygulamalarına rağmen I-V eğrileri neredeyse üst üste binmiş ve lineer bir profil sergilemiştir. Subtraction analizinde Kir4.1 ve TRPM4 komponentleri tespit edilebilmiş olsa da genlikler çok küçük (<14 pA) kalmıştır. Bu profil, OGD'nin oligodendrosit membran iletkenliği üzerine sistematik baskılayıcı etkisini net biçimde göstermektedir.

İskemi grubu — Hücre #6 — Ramp protokolü (–128 → +52 mV, 911 ms)



Şekil 4.16. İskemi grubu (İskemi-H6) ramp protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi. (A) Ardışık uygulamalara ait I-V eğrileri, (B) iskemi-duyarlı bileşen, (C) Kir4.1 akımı, (D) TRPM4 akımı.

İskemi grubunda yedi hücrede ($n = 7$) Kir4.1 ve TRPM4 komponentlerinin genlik, reversel potansiyeli (V_{rev}) ve doğrultma indeksi (RI) değerleri belirlendi. Her hücreye ait değerler Şekil 4.17'de, gruba ait ortalama $\pm$ SEM değerleri ve iki komponentin karşılaştırması ise Tablo 4.6'da gösterildi. Komponent genliği Kir4.1 için 13.1 ± 2.4 pA ($n = 7$), TRPM4 için 10.0 ± 6.0 pA ($n = 7$) olarak ölçülmüş olup, her iki komponentin genliği iskemik koşulda görece olarak düşük düzeyde kalmıştır. Reversel potansiyeli Kir4.1 için -83.8 ± 5.2 mV ($n = 7$), TRPM4 için -52.3 ± 22.2 mV ($n = 5$, iki hücrede TRPM4 V_{rev} ölçülemedi) olarak bulundu. Bu grupta Kir4.1 reversel potansiyeli, hücreler arasında dar bir aralıkta dağılmış (düşük standart hata) ve belirgin biçimde hiperpolarize değerlerde yoğunlaşmıştır. Doğrultma indeksi ise Kir4.1 için 3.79 ± 0.92 , TRPM4 için 2.68 ± 1.53 olarak hesaplandı. Aynı hücrelerde Kir4.1 ve TRPM4 komponentleri eşleştirilmiş t-testi ile karşılaştırıldığında, incelenen üç parametrenin hiçbirinde iki komponent arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamadı.



Şekil 4.17. İskemi grubu hücrelerinde Kir4.1 ve TRPM4 component genliği, reversal potansiyeli ve doğrultma indeksi. Her sütun tek bir hücreyi temsil eder.

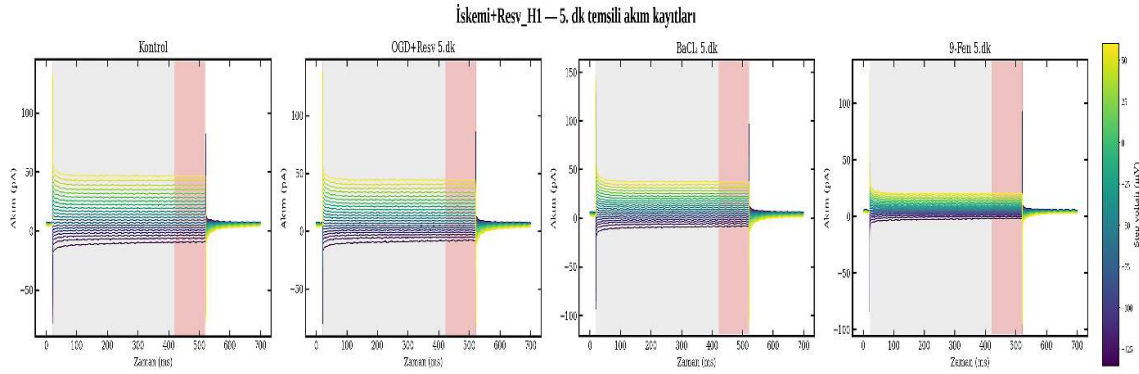
Tablo 4.6. İskemi grubu kanal componentlerinin nicel parametreleri.

Parametre	Kir4.1 (M ± SEM)	n	TRPM4 (M ± SEM)	n	p
Komponent genliği (pA)	13.1 ± 2.4	7	10.0 ± 6.0	7	0.630
Reversal potansiyeli (mV)	-83.8 ± 5.2	7	-52.3 ± 22.2	5	0.170
Doğrultma indeksi (RI)	3.79 ± 0.92	7	2.68 ± 1.53	7	0.560

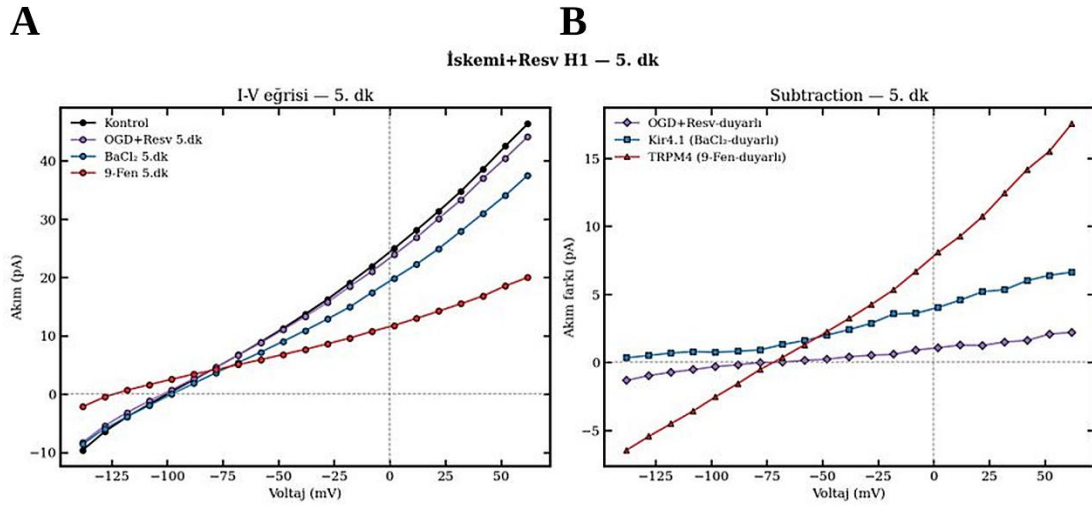
4.2.6. Resveratrol+İskemi Grubunda Kanal Akımlarının Değerlendirilmesi

Resveratrol+iskemi grubunda altı oligodendrosit hücresinde (n=6) bazal kayıt alındıktan sonra OGD ile resveratrol uygulanıp kayıt alındı. Ardından sırasıyla BaCl₂ ve 9-fenantröl kayıtları elde edildi. Çalışmamızın temel hipotezi açısından kritik olan bu grupta, iskemi grubunda baskılanan Kir4.1 ve TRPM4 akım componentlerinin resveratrol uygulaması ile değişip değişmediği nicel parametreler (genlik, reversal potansiyeli) düzeyinde değerlendirildi. Bu grupta component genlikleri iskemi grubuna benzer biçimde düşük kalmış (Kir4.1 10.9 ± 1.3 pA, TRPM4 19.6 ± 5.8 pA), ancak aşağıda ayrıntılandırıldığı üzere reversal potansiyeli dağılımı ve içeri-yönlü akımın farmakolojik modülasyonu açısından iskemi grubundan belirgin biçimde ayrılmıştır.

Bu hücreler içinde uygun yanıt sergileyen hücrelerden birinin İskRes-H1 hücresi olduğu görüldü. Bu hücrede +62 mV'da TRPM4 akımı +17.5 pA, -138 mV'da -6.5 pA değerinde tespit edildi. Aynı hücrede Kir4.1 akımı outward yönde +6.7 pA olarak hesaplandı (Şekil 4.18. ve 4.19.). İskemi grubu hücrelerinin aksine bu hücrede BaCl₂ ve 9-fenanol uygulamalarının akımı kademeli biçimde değiştirebildiği ve subtraction analizinin anlamlı kanal akım komponentleri üretebildiği gözlemlendi.



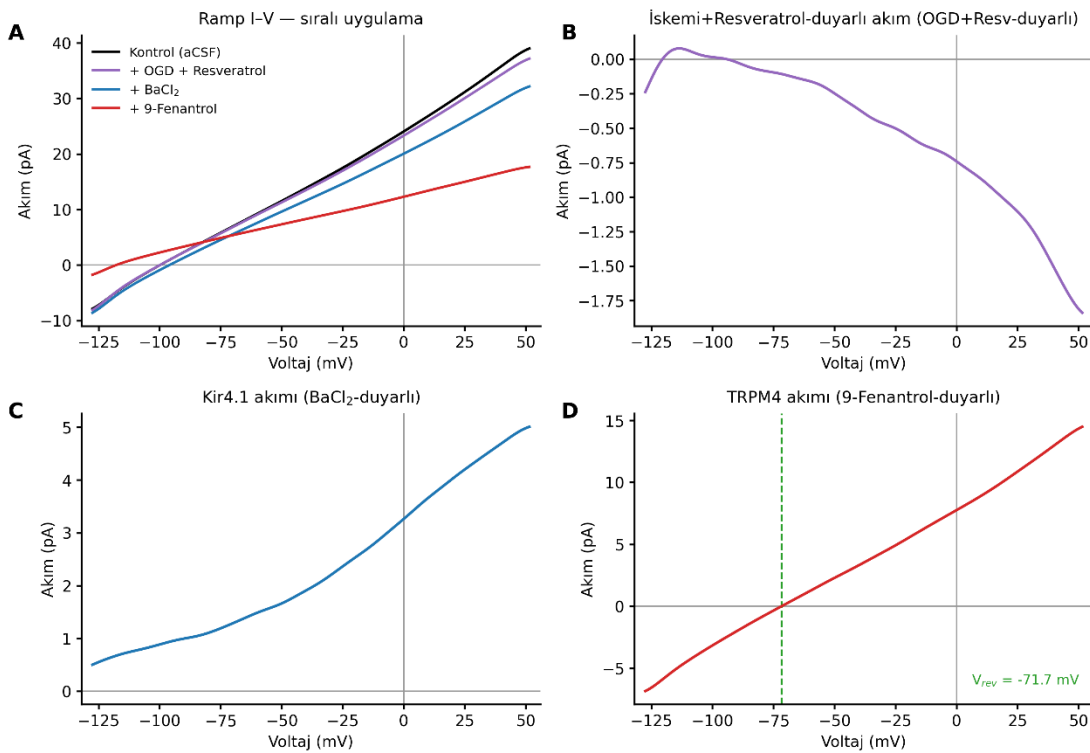
Şekil 4.18. Resveratrol+İskemi grubu (İskRes-H1) step protokolü ham akım kayıtları. Soldan sağa: kontrol, +OGD+resveratrol, +BaCl₂, +9-fenanol uygulamaları.



Şekil 4.19. Resveratrol+İskemi grubu (İskRes-H1) step protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi. (A) Ardışık uygulamalara ait I-V eğrileri, (B) ayrıştırılan komponentler: Kir4.1 akımı (+6.7 pA outward), TRPM4 akımı (+17.5 pA outward, -6.5 pA inward).

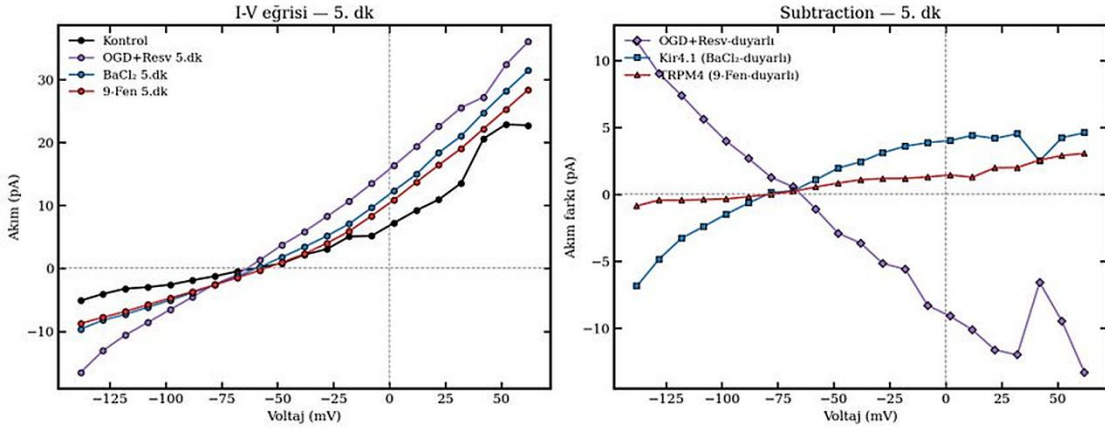
Aynı hücrenin ramp protokolü kayıtları step bulgularını yüksek voltaj çözünürlüğüyle desteklemektedir. Ramp analizinde TRPM4 akımı $V_{rev} = -71.7$ mV değeri ile 9-fenantrol-duyarlı non-selektif katyon kanalı profilini sergilemiştir. TRPM4, Ca^{2+} -aktif olan ve monovalan katyonlara geçirgen bir kanaldır. Ölçülen V_{rev} 'in K^+ denge potansiyeline yakın olması bu hücrede K^+ -baskın seçici geçirgenlikten değil, intrasellüler kayıt çözeltisindeki yüksek K^+ konsantrasyonu ve aşağıdaki subtraction analizinin K^+ akımlarına eşlik eden artık bir komponentin katkısından kaynaklanıyor olabilir (Şekil 4.20.).

İskemi + Resveratrol grubu — Hücre #1 — Ramp protokolü (–128 → +52 mV, 911 ms)



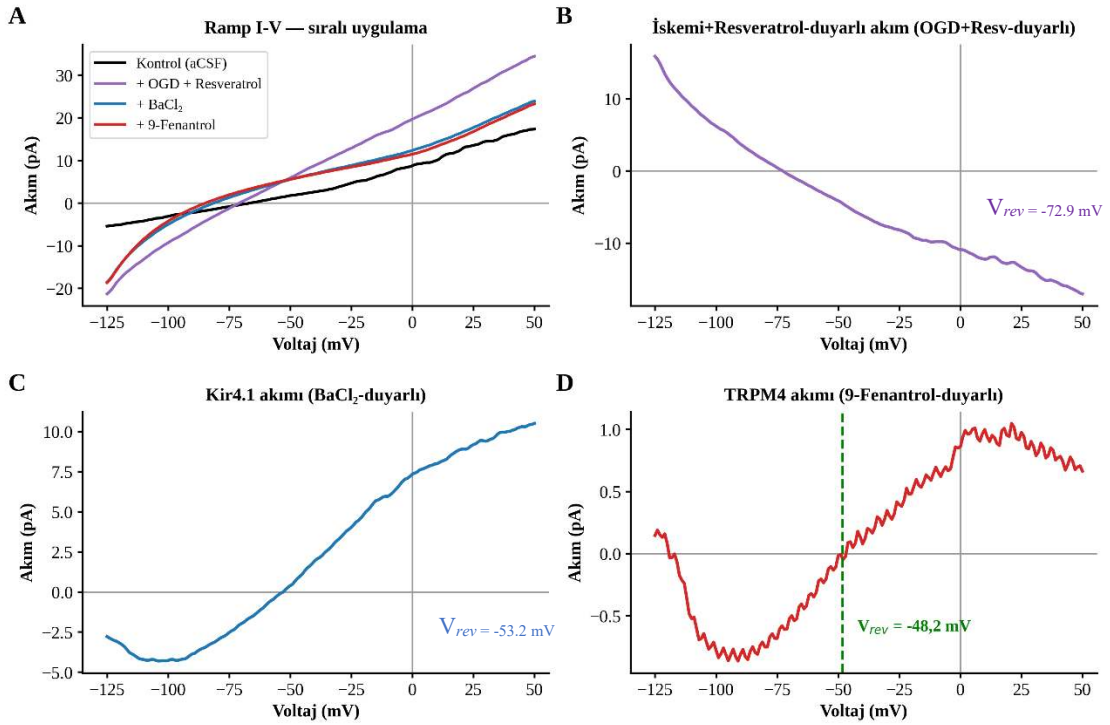
Şekil 4.20. Resveratrol+İskemi grubu (İskRes-H1) ramp protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi. (A) Ardışık uygulamalara ait I-V eğrileri, (B) iskemi+resveratrol-duyarlı bileşen, (C) Kir4.1 akımı, (D) TRPM4 akımı.

Resveratrol+iskemi grubunda kanal akımı geri dönüşünün gözlemlendiği bir başka iyi örnek, Kir4.1 akımının klasik profiliyle gözlemlendiği İskRes-H7 hücresi olmuştur (Şekil 4.21.). Bu hücrede subtraction analizinde Kir4.1 akımı +62 mV'da +6.0 pA outward, –138 mV'da ise –7.9 pA inward yönde tespit edildi (Şekil 4.21.).

A**B****İskemi+Resv H7 — 5. dk**

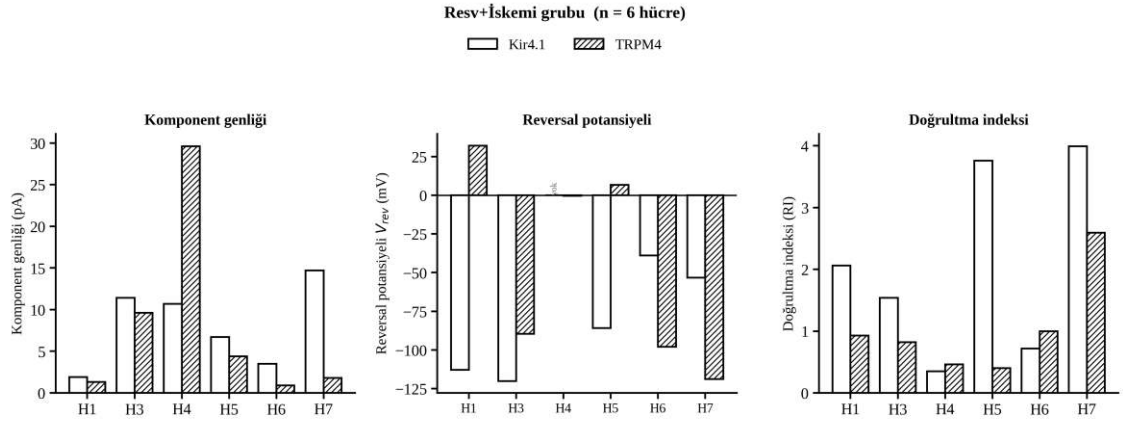
Şekil 4.21. Resveratrol+İskemi grubu (İskRes-H7) step protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi. (A) Ardışık uygulamalara ait I-V eğrileri, (B) ayrıştırılan komponentler (OGD+resveratrol-duyarlı, Kir4.1, TRPM4).

İskemi+Resveratrol grubundan yine aynı hücreye (İskRes-H7) ait ramp protokolü kayıtları, aynı hücrenin step protokolü bulgularını yüksek voltaj çözünürlüğüyle desteklemektedir (Şekil 4.22.). Ham I-V eğrilerinden ardışık koşulların farkı alınarak üç akım komponenti ayrıştırıldı. (OGD+resveratrol)-duyarlı akım -72.9 mV'de sıfır akımı düzeyini kesmiştir (Şekil 4.22. B). BaCl₂-duyarlı Kir4.1 akımı reversel potansiyelini -53.2 mV'de göstermiş olup, bu değer aynı hücrenin step protokolünden elde edilen Kir4.1 reversel potansiyeli (-53.3 mV) ile neredeyse birebir örtüşmektedir (Şekil 4.22. C). 9-fenantrol-duyarlı TRPM4 akımı ise düşük genlikli (yaklaşık ± 1 pA) bir komponent olarak ayrıştırıldı ve reversel potansiyeli -48.2 mV olarak belirlendi (Şekil 4.22. D).



Şekil 4.22. Resveratrol+İskemi grubu (İskRes-H7) ramp protokolü I-V eğrileri ve subtraction analizi. (A) Ardışık uygulamalara ait I-V eğrileri, (B) OGD+resveratrol-duyarlı akım, (C) Kir4.1 akımı, (D) TRPM4 akımı.

Resveratrol+İskemi grubunda altı hücrede ($n = 6$) Kir4.1 ve TRPM4 komponentlerinin genlik, reversal potansiyeli (V_{rev}) ve doğrultma indeksi (RI) değerleri belirlendi. Her hücreye ait değerler Şekil 4.23'te, gruba ait ortalama $\pm$ SEM değerleri ve iki komponentin karşılaştırması ise Tablo 4.7'de gösterildi. Komponent genliği Kir4.1 için 8.15 ± 2.02 pA ($n = 6$), TRPM4 için 7.93 ± 4.53 pA ($n = 6$) olarak ölçülmüş olup, her iki komponentin genliği bu grupta düşük düzeyde kalmıştır. Reversal potansiyeli Kir4.1 için -82.3 ± 16.0 mV ($n = 5$, bir hücrede Kir4.1 V_{rev} ölçülemedi), TRPM4 için -44.7 ± 26.4 mV ($n = 6$) olarak bulundu. Doğrultma indeksi ise Kir4.1 için 2.07 ± 0.62 , TRPM4 için 1.03 ± 0.33 olarak hesaplandı. Aynı hücrelerde Kir4.1 ve TRPM4 komponentleri eşleştirilmiş t-testi ile karşılaştırıldığında, incelenen üç parametrenin hiçbirinde iki komponent arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamadı ($p > 0.05$).



Şekil 4.23. Resveratrol+İskemi grubu hücrelerinde Kir4.1 ve TRPM4 komponent genliği, reversal potansiyeli ve doğrultma indeksi. Her sütun tek bir hücreyi temsil eder.

Tablo 4.7. Resveratrol + İskemi grubu kanal komponentlerinin nicel parametreleri (ortalama $\pm$ SEM).

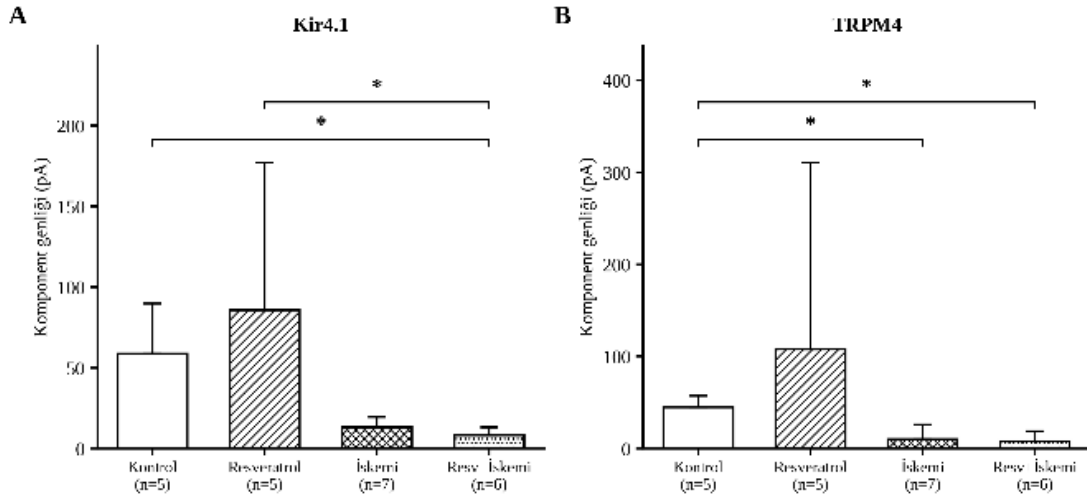
Parametre	Kir4.1 (M $\pm$ SEM)	n	TRPM4 (M $\pm$ SEM)	n	p
Komponent genliği (pA)	8.15 $\pm$ 2.02	6	7.93 $\pm$ 4.53	6	0.961
Reversal potansiyeli (mV)	-82.3 $\pm$ 16.0	5	-44.7 $\pm$ 26.4	6	0.526
Doğrultma indeksi (RI)	2.07 $\pm$ 0.62	6	1.03 $\pm$ 0.33	6	0.112

Dört deney grubunun Kir4.1 ve TRPM4 komponent genlikleri Tablo 4.8'de verildi. Kir4.1 komponent genliği kontrol (58.9 pA) ve resveratrol (85.6 pA) gruplarında belirgin biçimde yüksek iken, iskemi (13.1 pA) ve resveratrol+iskemi (8.15 pA) gruplarında düşük düzeyde kalmıştır. TRPM4 genliği için de benzer bir örüntü gözlemlendi. Bu örüntü, iskemik koşulların oligodendrosit Kir4.1 ve TRPM4 akım genliklerini belirgin biçimde baskıladığını göstermektedir. Hiçbir grupta iki komponent arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p > 0.05$).

Tablo 4.8. Gruplara göre Kir4.1 ve TRPM4 komponent genliklerinin değerleri (ortalama $\pm$ SEM). Tüm hücreler dahil edildi ve genlik filtresi uygulanmadı.

Grup	Kir4.1 genlik (pA) M $\pm$ SEM	TRPM4 genlik (pA) M $\pm$ SEM	n	p
Kontrol	58.9 $\pm$ 13.8	44.7 $\pm$ 5.6	5	0.347
Resveratrol	85.6 $\pm$ 40.9	107.8 $\pm$ 90.6	5	0.705
İskemi	13.1 $\pm$ 2.4	10.0 $\pm$ 6.0	7	0.630
Resv+İskemi	8.15 $\pm$ 2.02	7.93 $\pm$ 4.53	6	0.961

Kir4.1 ve TRPM4 komponent genliklerinin dört çalışma grubu arasındaki karşılaştırması şekil 4.24'te gösterildi. Değerler tüm hücreler üzerinden, genlik filtresi uygulanmadan hesaplandı. Kir4.1 komponent genliği kontrol grubunda 58.9 $\pm$ 13.8 pA, resveratrol grubunda 85.6 $\pm$ 40.9 pA iken, iskemik gruplarda belirgin biçimde düşmüş olduğu görüldü (İskemi 13.1 $\pm$ 2.4 pA, Resveratrol+İskemi 8.15 $\pm$ 2.02 pA) ve gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0.003). İkili karşılaştırmalarda resveratrol+İskemi grubunun Kir4.1 genliği hem kontrol (p=0.011) hem de resveratrol (p=0.021) grubuna kıyasla anlamlı biçimde düşüktür (şekil 4.24. A). TRPM4 komponent genliği de benzer bir örüntü göstermiş, kontrol grubunda 44.7 $\pm$ 5.6 pA iken iskemik gruplarda azalmıştır (İskemi 10.0 $\pm$ 6.0 pA, Resveratrol+İskemi 7.93 $\pm$ 4.53 pA). Gruplar arası fark anlamlı bulundu (p=0.016). İkili karşılaştırmalarda kontrol grubunun TRPM4 genliği hem iskemi (p=0.034) hem de resveratrol+iskemi (p = 0.034) grubundan anlamlı biçimde yüksektir (şekil 4.24. B). Resveratrol grubunda TRPM4 genliği yüksek bir ortalama (107.8 $\pm$ 90.6 pA) sergilemekle birlikte, bu değer çok büyük standart sapmasıyla belirgin hücreler arası değişkenliği yansıtılmaktadır.

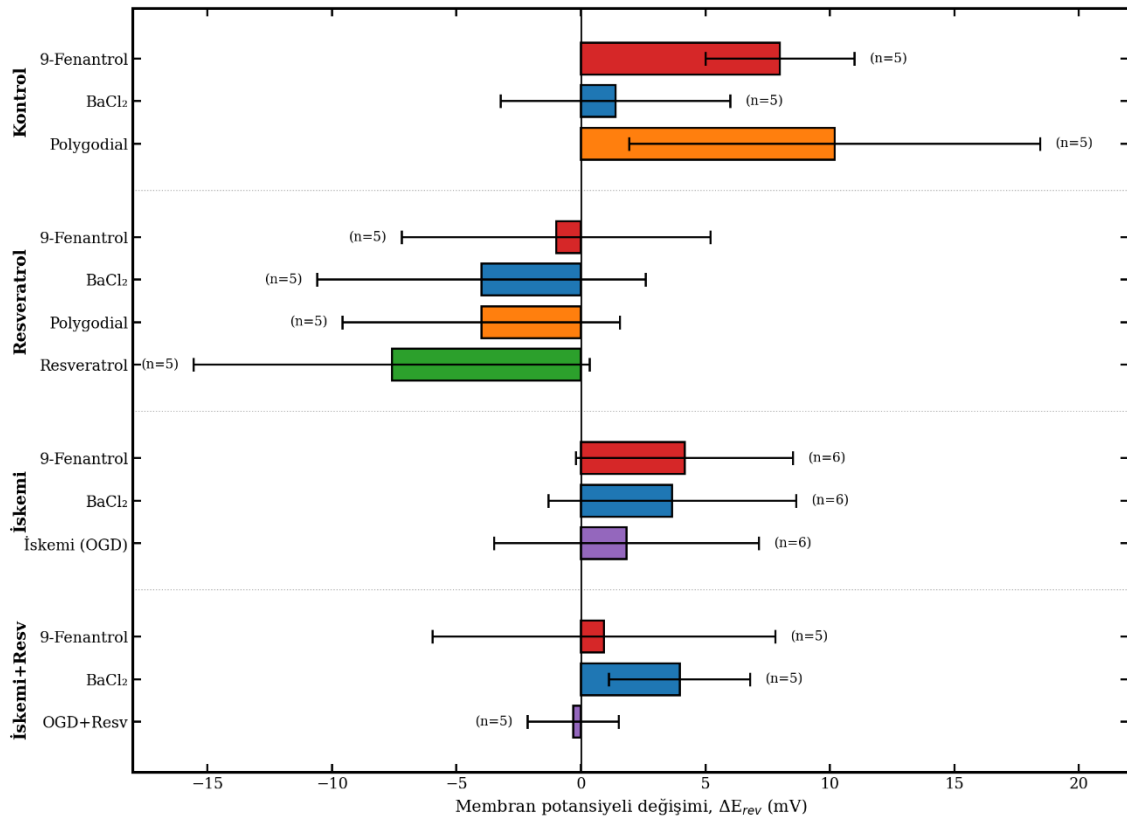


Şekil 4.24. Gruplara göre Kir4.1 (A) ve TRPM4 (B) komponent genliklerinin karşılaştırması (M $\pm$ SEM). *p < 0.05.

4.2.7. Ramp Protokolünden Elde Edilen Reversal Potansiyel Değerleri

Ramp protokolünün step protokolüne kıyasla en önemli avantajı, her hücrede kanal komponentinin sıfır akım eksenini geçtiği voltajın (V_rev, reversal potansiyeli) hassas biçimde belirlenebilmesidir. Çalışmamızda dört deney grubunda toplam 23 hücre için Kir4.1, TRPM4 ve TRPA1/iskemi-duyarlı akım komponentlerine ait reversal potansiyel değerleri ramp protokolüyle hesaplandı. Tablo 4.9., dört grupta kanal komponenti bazında elde edilen V_rev değerlerinin karşılaştırmasını sunmaktadır.

Kir4.1 komponentinin reversal potansiyeli iskemi grubunda -79.1 ± 2.3 mV, resveratrol+iskemi grubunda -86.4 ± 15.0 mV; TRPM4 reversal potansiyeli ise iskemi grubunda -71.5 ± 7.9 mV, resveratrol+iskemi grubunda -45.0 ± 25.8 mV olarak ölçüldü (Tablo 4.9.). İskemi ve resveratrol+iskemi gruplarında tespit edilebilen Kir4.1 komponentlerinin reversal potansiyellerinin K⁺ denge potansiyeli (yaklaşık -97 mV) civarında toplanması, bu komponentlerin K⁺ denge potansiyeline yakın reversal potansiyelleri ile uyumlu olduğunu göstermektedir (Şekil 4.25.).



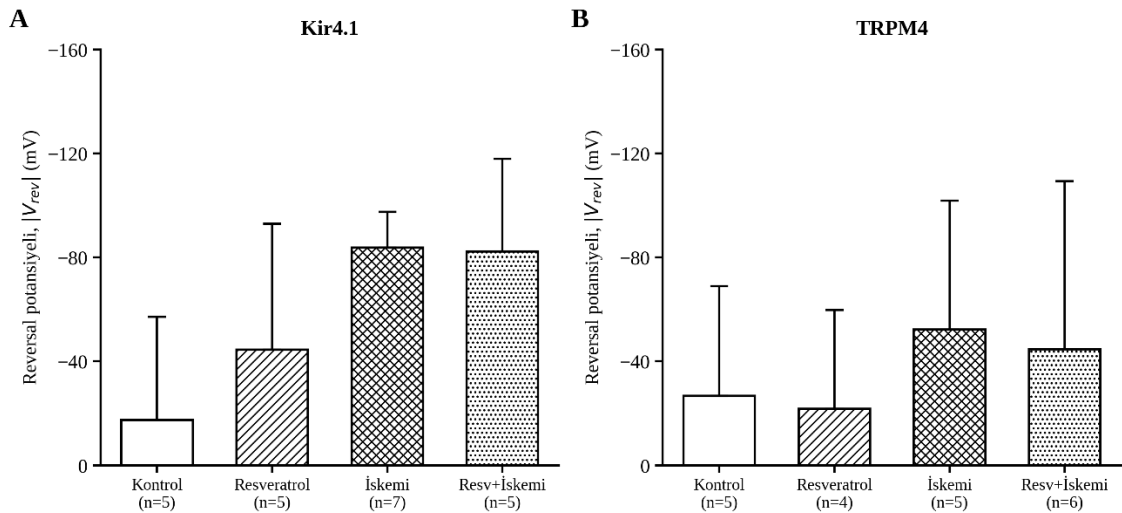
Şekil 4.25. Gruplardaki uygulamalara göre reversel potansiyel (V_{rev}) değişimleri ($M \pm SEM$).

Kir4.1 ve TRPM4 komponentlerinin reversel potansiyelleri (V_{rev}) dört çalışma grubu arasında karşılaştırıldı. Elde edilen p değerleri, aynı hücrelerde Kir4.1 ile TRPM4'ün eşleştirilmiş t-testi ile karşılaştırılmasından bulundu. Gruba ait ortalama $\pm$ SEM değerleri Tablo 4.9'da gruplar arası karşılaştırma ise Şekil 4.26'da verildi. Analize yalnızca ilgili komponentin V_{rev} değeri ölçülebilen hücreler dahil edildiğinden, bazı parametrelerde geçerli n grup büyüklüğünden küçüktür. Kir4.1 reversel potansiyeli kontrol grubunda -17.5 ± 17.7 mV ($n = 5$) iken, iskemik gruplarda belirgin biçimde daha hiperpolarize değerlere kaymıştır (İskemi -79.1 ± 2.3 mV, $n = 7$; Resveratrol+İskemi -86.4 ± 15.0 mV, $n = 5$), resveratrol grubunda ara bir değer (-44.5 ± 21.7 mV, $n = 5$) gözlemlendi (Şekil 4.26. A). Kontrol grubunda gözlenen yüksek standart hata ($SEM = 17.7$ mV) ve görece depolarize ortalama V_{rev} değeri, ölçüm yapılan hücreler arasında V_{rev} dağılımının geniş olduğunu ve bazı hücrelerin K^+ denge potansiyeline yakın klasik K^+ -baskın profil sergilerken bazı hücrelerin sızıntı ve/veya katyon karışımı bir iletkenliği yansıtacak şekilde daha depolarize V_{rev} verdiğini göstermektedir. TRPM4 reversel potansiyeli ise kontrol grubunda -26.7 ± 18.9 mV ($n = 5$), resveratrol grubunda $-21.7 \pm$

19.1 mV (n = 4), iskemi grubunda -71.5 ± 7.9 mV (n = 7) ve resveratrol+iskemi grubunda -45.0 ± 25.8 mV (n=6) olarak bulundu (Şekil 4.26. B). Gruplar arası karşılaştırmada reversal potansiyellerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Bu nedenle Şekil 4.26'da anlamlılık işareti gösterilmedi. Aynı hücrelerde Kir4.1 ile TRPM4 reversal potansiyelleri eşleştirilmiş t-testi ile karşılaştırıldığında, yalnızca kontrol grubunda iki komponent arasında anlamlı bir fark bulundu ($p = 0.006$). Diğer gruplarda anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo 4.9. Gruplara göre Kir4.1 ve TRPM4 komponentlerinin reversal potansiyelleri (V_{rev} ; ortalama $\pm$ SEM).

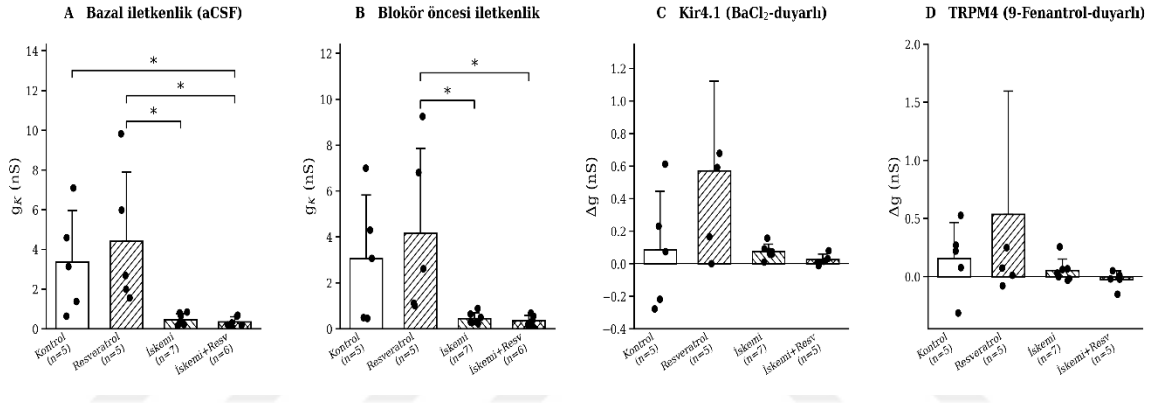
Grup	Kir4.1 Vrev (mV) M $\pm$ SEM	n	TRPM4 Vrev (mV) M $\pm$ SEM	n	p
Kontrol	-17.5 ± 17.7	5	-26.7 ± 18.9	5	0.732
Resveratrol	-44.5 ± 21.7	5	-21.7 ± 19.1	4	0.126
İskemi	-79.1 ± 2.3	7	-71.5 ± 7.9	5	0.317
Resv+İskemi	-86.4 ± 15.0	5	-45.0 ± 25.8	6	0.195



Şekil 4.26. Gruplara göre Kir4.1 (A) ve TRPM4 (B) komponentlerinin reversal potansiyellerinin karşılaştırması (M $\pm$ SEM).

Bazal (aCSF) koşulda ölçülen toplam iletkenlik gruplar arasında anlamlı farklılık göstermiştir (kontrol 3.37 ± 1.16 nS, resveratrol 4.41 ± 1.56 nS, iskemi 0.47 ± 0.11 nS, iskemi+resveratrol 0.35 ± 0.10 nS, $p=0.002$) (Şekil 4.27., Tablo 4.10.). Komponent iletkenliklerinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (Kir4.1 $p=0.160$, TRPM4

p=0.198). GHK denklemi ile hesaplanan görel Na^+/K^+ geçirgenlik oranlarında da fark bulunamadı (Kir4.1 p=0.190, TRPM4 p=0.051). Buna karşılık ardışık farmakolojik basamaklar arasındaki değişim yalnızca iskemi grubunda anlamlı bulundu (p=0.024). Bu grupta BaCl_2 uygulaması tutarlı bir iletkenlik kaybına yol açmıştır (p=0.016, kontrol p=0.813, resveratrol p=0.125, iskemi+resveratrol p=0.188). Ayrıca iskemi grubunda BaCl_2 -duyarlı komponentin reversel potansiyeli dar bir dağılım göstererek potasyum denge potansiyeline yaklaşmış ($-78.4 \pm 1.7\text{mV}$, $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}} = 0.017 \pm 0.006$), kontrol ve resveratrol gruplarında ise oldukça geniş bir dağılım sergilemiştir (sırasıyla $-29.5 \pm 50.2\text{mV}$ ve $-28.5 \pm 37.4\text{mV}$) (Şekil 4.28., Tablo 4.11.).

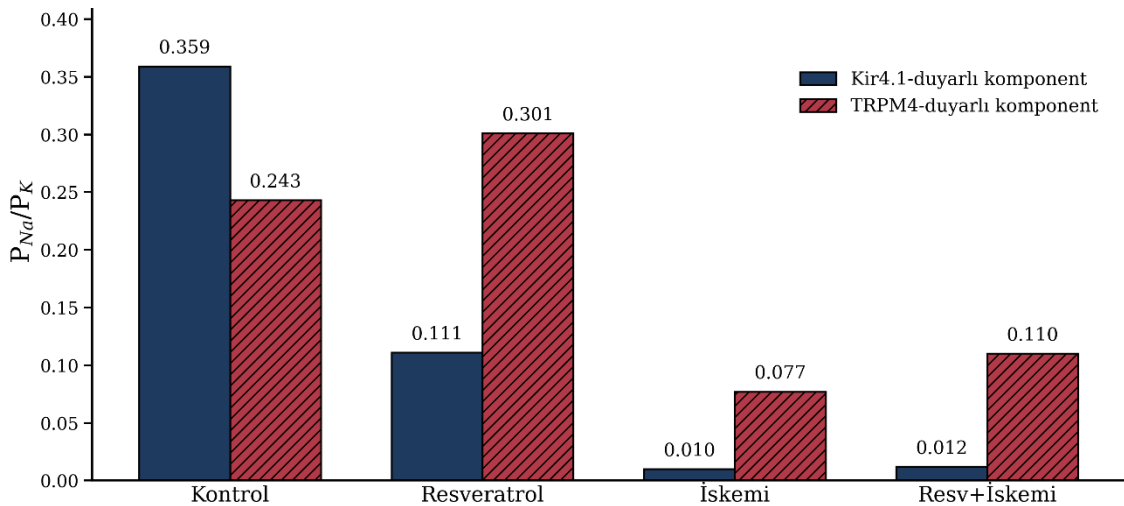


Şekil 4.27. Gruplara göre potasyum iletkenliği (g_K) değerlerinin karşılaştırılması. Ramp I-V grafikleri eğimlerinden hesaplandı. *p<0.05

Tablo 4.10. Gruplara göre potasyum iletkenliği (g_K) ve farmakolojik komponent iletkenlikleri (ortalama $\pm$ SEM).

Parametre	Kontrol (n = 5)	Resveratrol (n = 5)	İskemi (n = 7)	İskemi+Resv (n = 6)	p	Post-hoc (p < 0.05)
g bazal (aCSF)	3.37 $\pm$ 1.16	4.41 $\pm$ 1.56	0.47 $\pm$ 0.11	0.35 $\pm$ 0.10	0.002	R>İ (0.015) R>İR (0.022) K>İR (0.035)
g blokör öncesi	3.06 $\pm$ 1.23	4.16 $\pm$ 1.65	0.45 $\pm$ 0.09	0.35 $\pm$ 0.10	0.006	R>İ (0.015), R>İR (0.022)
g +BaCl ₂	2.98 $\pm$ 1.29	3.59 $\pm$ 1.55	0.37 $\pm$ 0.09	0.36 $\pm$ 0.10	0.085	—
g +9-Fenantrol	2.82 $\pm$ 1.38	3.06 $\pm$ 1.23	0.32 $\pm$ 0.10	0.36 $\pm$ 0.080	0.126	—
Kir4.1 (BaCl ₂ -duyarlı)	0.08 $\pm$ 0.16	0.57 $\pm$ 0.25	0.08 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.01	0.160	—
TRPM4 (9-Fen-duyarlı)	0.16 $\pm$ 0.14	0.53 $\pm$ 0.47	0.05 $\pm$ 0.04	-0.03 $\pm$ 0.03	0.198	—
Kir4.1 katkısı (%)	27.6 $\pm$ 26.9	23.9 $\pm$ 11.3	18.2 $\pm$ 3.7	12.8 $\pm$ 10.0	0.399	—
TRPM4 katkısı (%)	31.6 $\pm$ 21.1	5.2 $\pm$ 5.6	18.3 $\pm$ 13.4	-18.6 $\pm$ 13.0	0.252	—
Grup içi p	0.145	0.088	0.024	0.472	—	—
BaCl ₂ basamağı p	0.813	0.125	0.016	0.188	—	—

Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. Tüm iletkenlikler nanosiemens (nS) cinsindendir ve ramp protokolü I-V eğrisinin -120 ile -80 mV aralığındaki lineer regresyon eğiminden ($\Delta I/\Delta V$) hesaplandı. Kir4.1 = g(blokör öncesi) - g(+BaCl₂), TRPM4 = g(+BaCl₂) - g(+9-fenantrol). Yüzde katkılar blokör öncesi iletkenliğe oranlandı. K: Kontrol, R: Resveratrol, İ: İskemi, İR: İskemi+Resveratrol.



Şekil 4.28. Gruplar arası GHK reversel denklemi ile hesaplanan Na^+/K^+ geçirgenlik oranlarının karşılaştırılması.

Tablo 4.11. Blokör-duyarlı komponentlerin reversal potansiyelleri ve GHK reversal denklemleri ile hesaplanan göreceli Na^+/K^+ geçirgenlik oranları (ortalama $\pm$ SEM).

Grup	n	Kir4.1 Vrev (mV)	Kir4.1 PNa/PK	n	TRPM4 Vrev (mV)	TRPM4 PNa/PK
Kontrol	3	-29.5 ± 29.0	0.496 ± 0.252	4	-38.9 ± 22.0	0.420 ± 0.154
Resveratrol	4	-28.5 ± 18.7	0.435 ± 0.212	3	-2.7 ± 1.0	0.671 ± 0.030
İskemi	6	-78.4 ± 1.7	0.017 ± 0.002	3	-69.6 ± 9.1	0.038 ± 0.021
İskemi+Resv	–	hesaplanamadı*	hesaplanamadı*	1	-88.8	0.006
p		0.190	0.190		0.051	0.051

*İskemi+resveratrol grubunda Kir4.1-duyarlı komponentin ortalama iletkenliği 0.025 ± 0.015 nS olup (bireysel değerler -0.011 ile 0.081 nS arasında), belirlenen 0.05 nS eşikini yalnızca bir hücrede aşmıştır. Bu hücrede de fark akımı ölçüm aralığı ($-128/+52$ mV) içinde sıfırı kesmediğinden reversal potansiyeli tanımlanamadı. Bu grupta toplam membran iletkenliğinin diğer gruplara kıyasla düşük olması (0.35 ± 0.10 nS), mutlak eşik bu grupta daha kısıtlayıcı biçimde işlemesine yol açmaktadır. Eşik 0.01 nS'ye kadar düşürülmesi geçerli hücre sayısını yalnızca ikiye çıkarmakta olup, bu düzeyde hesaplanan reversal potansiyelleri gürültü ile ayırt edilemeyeceğinden analiz dışı bırakıldı. Dolayısıyla bu grupta Kir4.1-duyarlı geçirgenlik oranının hesaplanamamış olması, ölçüm eksikliğinden değil, komponent genliğinin yöntemin çözünürlük sınırının altında kalmasından kaynaklanmaktadır.

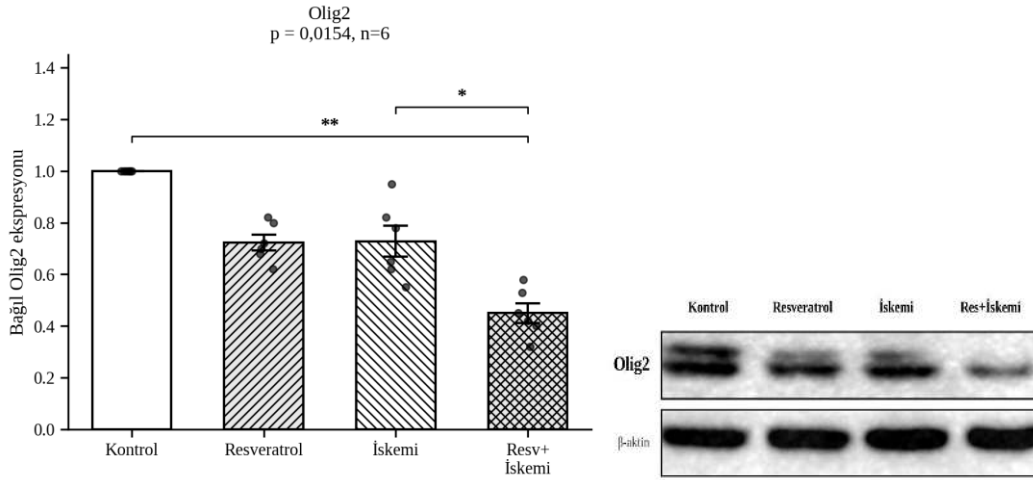
4.3. Western Blot Bulguları

Patch-clamp ile elde edilen fonksiyonel verileri moleküler düzeyde tamamlamak amacıyla, dört deney grubuna ait *Corpus Callosum* bölgesini içeren beyin dilimi protein lizatlarında çalışılan iyon kanalı proteinleri (Kir4.1 ve TRPM4), oligodendrosit kimlik belirteci Olig2 ve apoptoza ilişkili proteinler (BCL-2, BAX ve Caspase-3) Western blot yöntemi ile değerlendirildi. Densitometri ile elde edilen bant yoğunlukları her bir deneyde kontrol grubu değeri 1'e normalize edilerek bağıl ekspresyon değerlerine dönüştürüldü. BAX proteini için $n=8$, diğer beş protein için $n=6$ bağımsız deney kullanıldı. İstatistiksel analiz tekrarlı ölçümler için tek yönlü ANOVA (RM one-way ANOVA, Geisser-Greenhouse düzeltmeli) ile gerçekleştirilmiş, çoklu karşılaştırmalar için Tukey post-hoc testi uygulandı.

4.3.1. Oligodendrosit Kimlik Belirteci Olig2 Ekspresyonu

Olig2 (32 kDa) protein ekspresyonu için yapılan tekrarlı ölçümler tek yönlü ANOVA gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ortaya koymuştur ($p = 0.0154$). Tukey çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında resveratrol+iskemi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p = 0.0067$, **). İskemi grubu (0.729 ± 0.135) ile resveratrol+iskemi grubu (0.450 ± 0.091) arasında da anlamlı bir fark bulundu ($p = 0.0458$, *). En belirgin azalma

resveratrol+iskemi grubunda saptanmış olup, bu grupta Olig2 ekspresyonu kontrol değerinin yaklaşık yarısına gerilemiştir (Şekil 4.29.).



Şekil 4.29. Dört deney grubunda Olig2 (~32 kDa) protein ekspresyonunun kantifikasyon sonrası kıyaslanması (M ± SEM, n = 6). *p <0.05, **p <0.01.

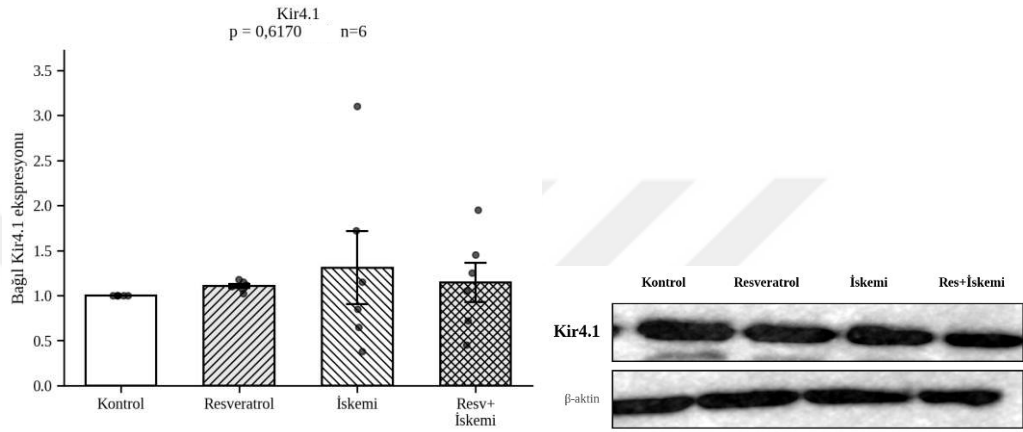
Olig2 oligodendrosit progenitör hücrelerinin temel kimlik belirteçlerinden biri olduğundan, ekspresyon düzeyindeki azalma ya total oligodendrosit sayısının azaldığına ya da hücrelerin Olig2-bağımsız bir farklılaşma yoluna yöneldiğine işaret etmektedir. Resveratrol+iskemi grubunda azalmanın hem kontrole hem de iskemi grubuna göre belirgin biçimde derinleşmesi ilk bakışta paradoksal görünmektedir. Ancak patch-clamp bulgularımızla birlikte değerlendirildiğinde bu durum, resveratrolün hasarlı oligodendrositleri korumaktan çok işlevini yitirmiş hücrelerin elenmesini hızlandırmış olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Fakat çalışmamızda hücre canlılığı/ölüm belirteçleri (TUNEL, propidium iyodür, anneksin V boyaması vb.) ile doğrudan değerlendirme yapılmadığından bu yorum kanıtlanmış bir mekanizma olarak değil, alternatif bir hipotez olarak sunulmaktadır. Bu çerçevede sağ kalan hücre popülasyonunun fonksiyonel olarak daha sağlıklı olabileceği önerilse de doğrulanması için ileri çalışmalar gereklidir.

4.3.2. Kir4.1 ve TRPM4 İyon Kanalı Protein Ekspresyonları

Patch-clamp bulgularında fonksiyonel düzeyde önemli farklılıklar gösteren Kir4.1 ve TRPM4 kanal proteinlerinin ekspresyon düzeyleri dört grupta da Western blot ile değerlendirildi.

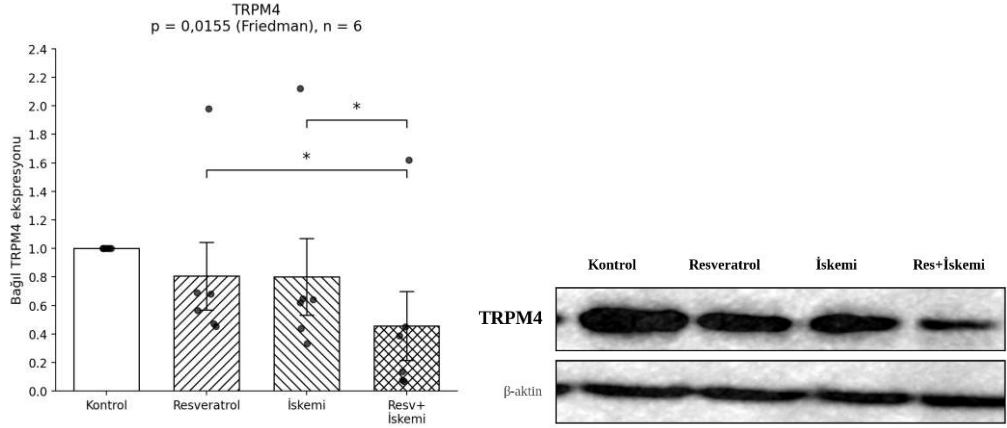
Kir4.1 (42 kDa) ekspresyonu için yapılan tekrarlı ölçümler tek yönlü ANOVA gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ortaya koymamıştır (p = 0.6170).

Grup ortalamaları kontrol (1.000), resveratrol (1.109 ± 0.073), iskemi (1.309 ± 0.404) ve resveratrol+iskemi (1.146 ± 0.404) sırasıyla incelendiğinde, kontrole göre anlamlı düzeyde değişim saptanmadı. Ancak iskemi grubunda gözlenen yüksek varyans (SEM = 0.404) bireysel deneyler arasındaki dramatik farklılığı yansıtmakta olup, bu durum patch-clamp'ta da iskemi grubunda Kir4.1 akım komponentinin tüm hücrelerde aynı şekilde davranmadığı bulgumuzla doğrudan tutarlıdır (Şekil 4.30.).



Şekil 4.30. Dört deney grubunda Kir4.1 (~42 kDa) protein ekspresyonunun kantifikasyon sonrası kıyaslanması (M ± SEM, n = 6).

TRPM4 ekspresyonu için Friedman testi gruplar arasında anlamlı bir farklılık ortaya koymuştur ($p = 0.0155$). Grup ortalamaları kontrol (1.000), resveratrol (0.806 ± 0.238), iskemi (0.800 ± 0.269) ve resveratrol+iskemi (0.457 ± 0.242) olarak ölçüldü. Bonferroni-düzeltilmiş post-hoc eşleştirilmiş t-testleri ($\alpha = 0.05/6 = 0.0083$) ile yapılan ikili karşılaştırmalarda, resveratrol+iskemi grubu hem resveratrol grubundan ($p = 0.018$, *) hem de iskemi grubundan ($p = 0.017$, *) anlamlı biçimde daha düşük TRPM4 ekspresyonu sergilemiştir. Buna karşılık kontrol-resveratrol, kontrol-iskemi, kontrol-resveratrol+iskemi ve resveratrol-iskemi karşılaştırmaları Bonferroni eşiğinin üstünde kalmıştır. Bu örüntü, TRPM4 protein düzeyindeki belirgin azalmanın yalnızca iskeminin veya yalnızca resveratrolün etkisi olarak değil, iki koşulun birlikte uygulandığı durumda ortaya çıkan özgül bir baskılanma olduğunu göstermektedir (Şekil 4.31.). Bu bulgu, patch-clamp'ta resveratrol+iskemi grubundaki yedi hücreden dördünde TRPM4 akım komponentinin yok ya da çok zayıf olduğu sonucumuzla doğrudan örtüşmektedir.

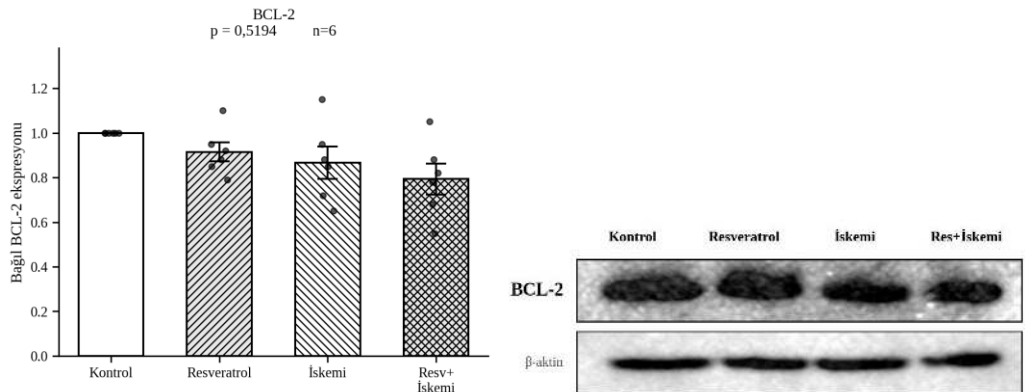


Şekil 4.31. Dört deney grubunda TRPM4 (~134 kDa) protein ekspresyonunun kantifikasyon sonrası kıyaslanması ($M \pm SEM$, n = 6). *p < 0.05.

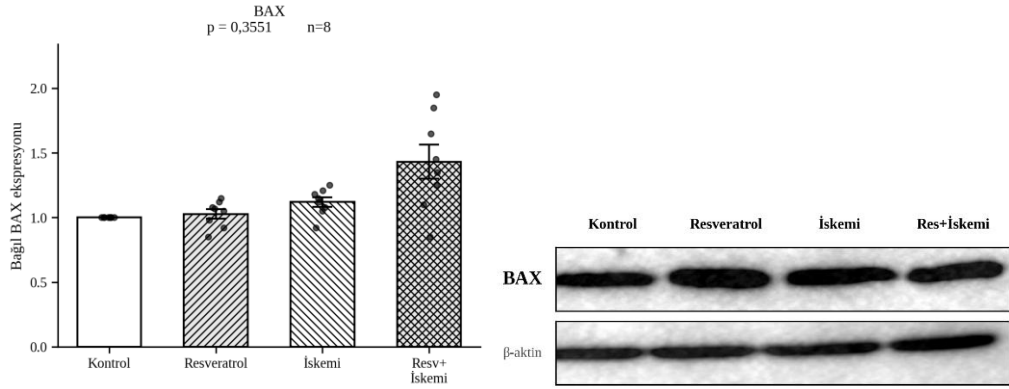
4.3.3. Apoptoza İlişkili Proteinler: BCL-2, BAX ve Kaspaz-3

Hücrel apoptoz yollarının dört deney grubunda nasıl etkilendiğini değerlendirmek amacıyla anti-apoptotik BCL-2, pro-apoptotik BAX ve apoptoz uygulayıcı Kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Tekrarlı ölçümler tek yönlü ANOVA üç protein için de gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (BCL-2: p = 0.5194, BAX: p = 0.3551, Caspase-3: p = 0.6482).

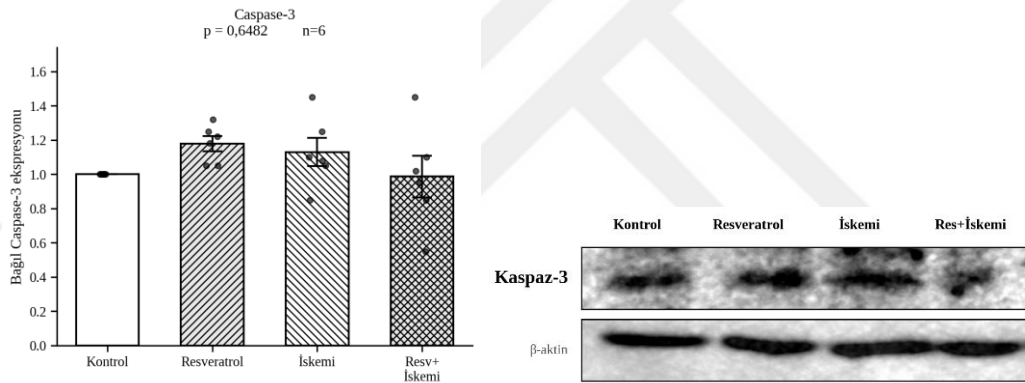
BCL-2 ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşüş göstermiştir (p>0.05) (Şekil 4.32.). BAX ekspresyonu tersine küçük bir artış eğilimi göstermiş, resveratrol+iskemi grubunda kontrol değerinin yaklaşık 1.4 katına yükselmiştir (Şekil 4.33.). Caspase-3 ekspresyonu için belirgin bir gruplar arası fark gözlenmedi (Şekil 4.34.).



Şekil 4.32. Dört deney grubunda BCL-2 (~26 kDa) protein ekspresyonunun kantifikasyon sonrası kıyaslanması ($M \pm SEM$, n = 6).



Şekil 4.33. Dört deney grubunda BAX (~21 kDa) protein ekspresyonunun kantifikasyon sonrası kıyaslanması ($M \pm SEM$, $n = 8$).



Şekil 4.34. Dört deney grubunda Caspase-3 (~32 kDa) protein ekspresyonunun kantifikasyon sonrası kıyaslanması ($M \pm SEM$, $n = 6$).

BCL-2/BAX oranı, hücrenin apoptotik sürece yatkınlığını gösteren önemli bir moleküler belirteçtir. Anti-apoptotik BCL-2 proteini hücre yaşamını desteklerken, pro-apoptotik Bax proteini mitokondriyal hasarı ve kaspaz aktivasyonunu artırmaktadır. Bu nedenle BCL-2/BAX oranındaki azalma apoptozun arttığını, artış ise hücresel sağkalımın korunduğunu göstermektedir. Ayrıca bu oran; nörodejeneratif hastalıklar, iskemi ve inflamatuvar süreçlerde önemli bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir (177). Bu oran kontrol grubunda 1.000 olarak normalleştirildiğinde, resveratrol+iskemi grubunda yaklaşık 0.55 düzeyine gerileyerek pro-apoptotik bir kayma eğilimine işaret etmiştir. Ancak bu eğilim istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır. ($p > 0.05$)

Apoptoz proteinlerinde belirgin bir aktivasyon paterni gözlenmemesi, çalışmamızda saptanan oligodendrosit Olig2 ekspresyon kayıplarının klasik kaspaz- aracılı apoptoz yolağından farklı yolların devreye girmiş olabileceğini düşündürmektedir. Ancak ferroptoz, nekroptoz veya otofaji için spesifik belirteç ölçümü yapılmadığından bu mekanizmalar ancak ileri çalışmalarla doğrulanabilir hipotezler olarak kabul edilmelidir. Bu konunun ayrıntılı değerlendirmesi 5. Bölümde tartışılmıştır.

Çalışılan altı protein için elde edilen ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel sonuçlar Tablo 4.12.'de özetlenmiştir.

Tablo 4.12. Dört deney grubunda altı proteinin ekspresyon düzeyleri ($M \pm SEM$; bağıl değerler) ve istatistiksel sonuçları.

Protein	Kontrol	Resveratrol	İskemi	Res+İskemi	p değeri
BCL-2	1.00	0.92 ± 0.10	0.87 ± 0.23	0.79 ± 0.22	0.5194
BAX	1.00	1.03 ± 0.13	1.12 ± 0.15	1.43 ± 0.34	0.3551
Caspase-3	1.00	1.18 ± 0.12	1.13 ± 0.28	0.99 ± 0.34	0.6482
Kir4.1	1.00	1.11 ± 0.07	1.31 ± 0.40	1.15 ± 0.40	0.6170
TRPM4	1.00	0.81 ± 0.24	0.80 ± 0.27	0.46 ± 0.24	0.0155 *
Olig2	1.00	0.72 ± 0.09	0.73 ± 0.14	0.45 ± 0.09	0.0154 *

5. TARTIŞMA

5.1. İskemik Miyelin Hasarı Modelinde Oligodendrosit İyon Kanalı Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Multipl skleroz (MS) patogenezinin yalnızca otoimmün-inflamatuvar bir süreç olmadığı, sürece eşlik eden mitokondriyal disfonksiyon ve enerji yetersizliğine bağlı bir "sanal hipoksi" (virtual hypoxia) bileşeninin oligodendrosit hasarında merkezi bir rol oynadığı anlayışı son yıllarda giderek güçlenmektedir (40, 42). Bu mekanik perspektif, iskemik beyin dilimi ve oksijen-glukoz yoksunluğu (oxygen-glucose deprivation, OGD) modellerinin MS patofizyolojisinin oligodendrosit-merkezli bileşenlerinin incelenmesinde geçerli ve giderek tercih edilen deneysel araçlar haline gelmesini sağlamıştır (14, 113). Çalışmamızda 225 µm kalınlığındaki akut beyin dilimlerinde uygulanan OGD modeli; oligodendrositlerin kendine özgü mikroçevresinin korunmasına olanak vermesi, tüm-hücre voltaj-clamp kayıtları ile fonksiyonel iyon kanalı aktivitesinin doğrudan ölçülmesine imkân tanınması ve farmakolojik ilaç uygulamalarının ardışık biçimde yapılabilmesi yönleriyle MS sonucu oluşan demiyelinizasyonun fonksiyonel-elektrofizyolojik bileşeninin incelenmesi açısından oldukça uygun bir yaklaşım sunmuştur (164, 178).

Oligodendrositlerin elektrofizyolojik repertuarında en iyi karakterize edilmiş iki potasyum bileşeni içe-doğrultucu Kir4.1 ve s akımı oluşturan TASK-1 (KCNK3) kanalı olup bu kanallara ek olarak Hamilton ve ark.'nın yaptıkları bir çalışma ile asitle aktive olabilen, Ca²⁺ geçirgen TRPA1 kanallarının da oligodendrositlerde ifade edildiği ve iskemik miyelin hasarının patogenezinde temel rol oynadığı gösterilmiştir (13). Çalışmamızda kontrol grubundaki yedi oligodendrosit hücresinden dördünde Kir4.1, üçünde TRPM4 ve dördünde TRPA1 akımına ait klasik komponentlerin tespit edilmesi, literatürdeki kanal dağılım sıklıklarıyla genel olarak uyumludur ve OGD modelimizin oligodendrosit fonksiyonel kanal repertuarını başarıyla kayıt altına alabildiğini göstermektedir (164, 179). Özellikle Kontrol-H1 hücresinde Kir4.1, TRPM4 ve TRPA1 akım komponentlerinin tümünün eş zamanlı olarak gözlemlenmesi bu üç kanalın aynı oligodendrosit popülasyonunda fonksiyonel olarak birlikte bulunabildiğini doğrudan göstermektedir.

Çalışmamızda kullanılan ramp protokolü ($-140 \text{ mV} \rightarrow +40 \text{ mV}$, 911 ms), klasik step protokolüne kıyasla iki belirgin avantaj sunmuştur. Birincisi, ramp protokolünün her bir voltaj değerinde sadece milisaniye düzeyinde örnekleme alması, kanal komponentlerinin ardışık-zamanlı reversal potansiyellerinin (V_{rev}) yüksek voltaj çözünürlüğüyle hesaplanmasına imkân vermiştir. Kontrol-H2 hücresinde Kir4.1 ve TRPM4'ün V_{rev} değerleri, oligodendrositlerin K^+ denge potansiyeli (yaklaşık -90 mV) civarındaki klasik baskın K^+ -iletkenlik profilini açıkça yansıtmaktadır (15). İkincisi, ramp protokolü kısa süreli olduğu için sürdürülen voltaj basamaklarına göre membran kapasitansı kaynaklı transient akımlardan daha az etkilenmekte ve özellikle voltaj bağımsız iletkenliklerin değerlendirilmesinde daha temiz veri sağlamaktadır. Bu özellikler, çalışmamızın ramp tabanlı analizinin sonraki bölümlerde tartışılan grup karşılaştırmalarına nicel zemin oluşturmasını sağlamıştır.

5.2. İskemi Sürecinde Kir4.1 ve TRPM4 Akımlarının Baskılanması ve Patofizyolojik Anlamı

Çalışmamızın patch-clamp düzeyindeki en dikkat çekici bulgusu, OGD uygulanmış oligodendrositlerde yapılan patch-clamp ölçümlerinde Kir4.1 ve TRPM4 fonksiyonel akım komponentlerinin neredeyse tamamen kaybolması ya da klasik profillerini yitirmesi olmuştur. İskemi grubunda Kir4.1 ve TRPM4 komponent genlikleri kontrol grubuna kıyasla belirgin biçimde küçülmüş, komponentler tespit edilebilir ancak küçük genlikte kalmıştır. $+62 \text{ mV}$ 'da bazal akım genlikleri çoğu hücrede 20-90 pA aralığına sıkışmıştır. Bu sonuç, iskeminin oligodendrosit membran iletkenliği üzerine sistematik baskılayıcı etkisini açık biçimde göstermektedir.

Kir4.1 fonksiyon kaybının patofizyolojik önemi son yıllarda yoğun biçimde araştırılmıştır. Schirmer ve ark., oligodendrositlerdeki Kir4.1 kanalının akson bütünlüğü için gerekli olduğunu; oligodendrosit-spesifik koşullu *Kcnj10* (Kir4.1) silinmesinin görsel-uyarı potansiyellerinde gecikme, retinal sinirlerde incelleme ve ilerleyici motor defisitlere yol açtığını göstermişlerdir (7). Liu ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada ise Kir4.1 kanallarının küçük molekül 2-D08 ile farmakolojik aktivasyonunun OPC farklılaşmasını desteklediğini ve EAE modelinde miyelin onarımını teşvik ettiğini ortaya koymuştur (180). Buna ek olarak Nicot ve ark., MS hastalarında Kir4.1'in birinci ekstraselüler döngüsünün aglikolize formuna karşı otoimmün yanıt geliştiğini gösterip kanalın bir nöroinflamatuvar otoantijen olarak konumunu güçlendirmişlerdir (181).

Bütün bu bulgular çalışmamıza paralel bir şekilde Kir4.1 fonksiyonel kaybının yalnızca iskemik koşullarda değil, otoimmün ve metabolik patolojilerde de oligodendrosit ölümü ve aksonal hasara neden olduğunu göstermektedir.

İskemi grubunda gözlenen TRPM4 akım komponentinin kaybolması ise ilk bakışta literatürdeki klasik bilgilerle çelişiyor gibi görünmektedir. Çünkü literatürde TRPM4, iskemi/hipoksi koşullarında fonksiyonel olarak yukarı-regüle olan ve sitotoksik ödeme aracılık eden bir kanal olarak rapor edilmiştir (16, 97). Bu görünüşteki paradoks birkaç şekilde açıklanabilir: birincisi, Schattling ve ark.'nın çalışmasında olduğu gibi TRPM4'ün yukarı-regülasyonu özellikle nöronlarda ve aksonal yapılarda gözlenmiş olup, oligodendrosit-spesifik yanıtın farklı zaman-seyirleri izlemesi söz konusu olabilir (16). İkincisi, Gerzanich ve ark. tarafından detaylandırılan SUR1-TRPM4 kompleksinin de novo ekspresyonu çoğunlukla 24-48 saatlik bir gecikme sonrasında gerçekleşmektedir (97). Çalışmamızda kullanılan akut OGD modeli (kısa akut iskemik dönem ardından 5-10 dakikalık kayıt) bu uzun gelişimsel durumu yakalamamış olabilir. Üçüncüsü, akut OGD koşullarında genel hücre içi enerji çöküşü, TRPM4'ün de dahil olduğu çoğu ATP-modüle iyon kanalının aktivitesini birlikte baskılayan katastrofik bir membran çöküşü oluşturmuş olabilir.

İskemi grubunda iskemi-duyarlı bileşenin (kontrol-iskemi farkı) ramp analizinde $V_{rev} = -71.4$ mV gibi K^+ denge potansiyeline yakın bir değerde gözlenmesi önemli bir bulgudur. Bu değer, iskeminin oligodendrosit membranındaki etkisinin ağırlıklı olarak K^+ iletkenliğinin baskılanması üzerinden gerçekleştiğini düşündürmektedir. Hamilton ve ark.'nın iskemik miyelin hasarı modelinde tanımladıkları H^+ -bağımlı TRPA1 aktivasyonu yolağı, hücre içi pH düşüşünün TRPA1 aracılığıyla Ca^{2+} girişine yol açtığını ve bu Ca^{2+} artışının K^+ iletkenliğini ikincil olarak baskıladığını ortaya koymuştur (14). Bizim sonuçlarımız bu farmakolojik durumu oligodendrosit-spesifik koşullarda göstermiştir.

Kir4.1 komponentinin reversel potansiyelleri bazı hücrelerde beklenen K denge potansiyeline oldukça yakın bulunurken, bazı hücrelerde daha depolarize değerlere kaymıştır (105). Bu durum, akut beyin dilimlerinde yapılan whole cell patch-clamp kayıtlarında subtraksiyon analizinin yalnızca Kir4.1 akımını değil, düşük düzeyde kalan sızıntı iletkenlikleri ve diğer rezidüel membran akımlarını da içerebilmesine bağlı olabilir. Ayrıca oligodendrositlerin kompleks morfolojisi nedeniyle ortaya çıkan bazı sınırlamalar, seri direnç kompanzasyonunun tam olmaması ve $BaCl_2$ uygulamasının

spesifik olmaması da reversal potansiyelinde hücreler arası değişkenliğe katkıda bulunabilir. Bu nedenle reversal potansiyelleri tek başına kanal kimliğini belirlemek amacıyla kullanılmamış olup inward rektifikasyon, BaCl₂ duyarlılığı ve I-V profili ile değerlendirilmiştir.

TRPM4 komponentinde resveratrol grubunda sıfıra yakın Vrev değeri literatürle uyumlu olmakla birlikte, özellikle iskemi gruplarında daha negatif Vrev değerleri elde edilmiştir (182). Bu bulgu, 9-fenantrol duyarlı akımın saf TRPM4 akımından ziyade OGD koşullarında sızıntı, rezidüel K⁺ iletkenliği ve farmakolojik birtakım sınırlılıkları içeren bir komponent olarak değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Çalışmamızdaki en tutarlı elektrofizyolojik bulgulardan biri de BaCl₂-duyarlı iletkenliğin yalnızca iskemi grubunda hem anlamlı bir kayıp üretmesidir. Bu grupta komponentin reversal potansiyeli K⁺'ya yakın ve dar dağılımlıdır ($-78.4 \pm 1.7\text{mV}$), yani ölçülen akım gerçekten K⁺-seçici bir iletkenliğe (Kir4.1) karşılık gelmektedir. Kir4.1 (KCNJ10), oligodendrositlerin dinlenme potansiyelini belirleyen ve juksta-aksonal K⁺ tamponlamasını sağlayan başlıca içeri doğrultucu potasyum kanalı olup, oligodendrosite özgü kaybı aksonal dejenerasyona yol açmakta ve nöron-oligodendrosit K⁺ mekiğinin bozulması demiyelinizan hasarda nöronal hipereksitabiliteye katkıda bulunmaktadır (7, 164, 183). Kontrol ve resveratrol gruplarında aynı komponentin reversal potansiyelinin çok geniş dağılım göstermesi, bu hücrelerde bazal sızıntı iletkenliğinin belirgin biçimde yüksek olması ve görece küçük Kir4.1 bileşeninin bu arka plan üzerinde güvenilir biçimde çözölememesiyle açıklanmaktadır (184).

TRPM4-duyarlı komponente ilişkin bulgular ise dikkatle yorumlanmalıdır. TRPM4 seçici olmayan bir katyon kanalı olduğundan 9-fenantrol-duyarlı akımın reversal potansiyelinin 0 mV civarında ($P_{Na}/P_{K} \approx 1$) olması beklenirken, çalışmamızda hiçbir grupta bu değere ulaşılmamıştır. Bunun başlıca nedeni, 9-fenantrol'ün TRPM5 üzerinde etkisiz olmakla birlikte TRPM4'ü bloke ettiği konsantrasyon aralığında Ca²⁺ ile aktive olan klorür kanalı TMEM16A'yı da inhibe etmesi olabilir (159, 185, 186). Dolayısıyla ölçülen akımın bir klorür bileşenini içerdiği düşünülebilir. Ayrıca iskemik gruplarda bu komponentin genliği gürültü düzeyine yaklaştığından, hesaplanan reversal potansiyeli komponentini değil de rezidüel sızıntı akımını yansıtmakta ve bunun sonucunda potansiyel K⁺'a doğru kaymaktadır. Bu nedenle düşük geçirgenlik oranı, TRPM4 baskılanmasının bağımsız bir kanıtı olarak sunulamaz. SUR1-TRPM4 kompleksinin

MSS hasarında indüklendiği ve hücrel şışmeye aracılık ettiği iyi belgelenmiş olduğundan, bu bileşenin ex vivo dilim kaydında izole edilememesi kanalın patofizyolojik önemini değil, tek-hücre rampa kaydının çözünürlük sınırlarını yansıtmaktadır. Bu durum da TRPM4'e ilişkin asli kanıtımızın Western blot verileri olduğu görülmektedir. Resveratrolün komponent düzeyinde anlamlı etki göstermemesi de beklenmedik bir durum değildir. Çünkü resveratrolün koruyucu etkisi büyük ölçüde SIRT1 ve NRF2 yolakları üzerinden saatler-günler ölçeğinde gelişen transkripsiyonel yanıtlara dayanmaktadır (162).

Bu çalışmada I-V eğrilerinden hesaplanan slope conductance değerleri, OGD koşullarında oligodendrosit membranının pasif ve farmakolojik olarak duyarlı iletkenlik profilinin belirgin biçimde değiştiğini göstermektedir. Özellikle iskemi grubunda bazal iletkenliğin düşük olması ve BaCl₂ uygulamasıyla ortaya çıkan anlamlı iletkenlik kaybı, OGD'nin oligodendrositlerde K⁺ ağırlıklı membran iletkenliğini ve Kir4.1 ile ilişkili farmakolojik yanıt kapasitesini baskılayabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, bazal g_K değerlerinin gruplar arasında müdahale öncesinde de farklılık göstermesi, bu bulgunun yalnızca OGD etkisi olarak yorumlanmasını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle mevcut veriler, OGD'nin doğrudan ve tek başına Kir4.1 kaybı oluşturduğunu göstermekten ziyade, iskemik koşullarda oligodendrositlerin düşük iletkenlikli ve farmakolojik uyarıya kısıtlı yanıt veren bir elektrofizyolojik fenotipe geçtiğini desteklemektedir. Resveratrol+iskemi grubunda akım komponentlerinin tümüyle normale dönmemesine rağmen bazı farmakolojik yanıtların korunması, resveratrolün hasarlı oligodendrositlerde kanal protein ekspresyonunu doğrudan artırmaktan çok, mevcut kanal havuzunun modüle edilebilirliğini veya membran düzeyindeki fonksiyonel yanıt verebilirliği kısmen sürdürdüğünü düşündürmektedir. Bu durum, Kir4.1 protein düzeyinde anlamlı değişiklik olmamasına karşın fonksiyonel yanıtın baskılanmasıyla uyumlu olup, akut OGD'de kanal fonksiyon kaybının protein kaybından ziyade membran lokalizasyonu, kanal gating'i, hücre içi pH/ATP değişimleri veya post-translasyonel düzenlemelerle ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada I-V eğrilerinden hesaplanan slope conductance değerleri, OGD koşullarında oligodendrosit membranının pasif ve farmakolojik olarak duyarlı iletkenlik profilinin belirgin biçimde değiştiğini göstermektedir. Özellikle iskemi grubunda bazal iletkenliğin düşük olması ve BaCl₂ uygulamasıyla ortaya çıkan anlamlı iletkenlik kaybı, OGD'nin oligodendrositlerde K⁺ ağırlıklı membran iletkenliğini ve Kir4.1 ile ilişkili farmakolojik yanıt kapasitesini

baskılayabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, bazal g_K değerlerinin gruplar arasında müdahale öncesinde de farklılık göstermesi, bu bulgunun yalnızca OGD etkisi olarak yorumlanmasını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle mevcut veriler, OGD'nin doğrudan ve tek başına Kir4.1 kaybı oluşturduğunu göstermekten ziyade, iskemik koşullarda oligodendrositlerin düşük iletkenlikli ve farmakolojik uyarıya kısıtlı yanıt veren bir elektrofizyolojik fenotipe geçtiğini desteklemektedir. Resveratrol+iskemi grubunda akım komponentlerinin tümüyle normale dönmemesine rağmen bazı farmakolojik yanıtların korunması, resveratrolün hasarlı oligodendrositlerde kanal protein ekspresyonunu doğrudan artırmaktan çok, mevcut kanal havuzunun modüle edilebilirliğini veya membran düzeyindeki fonksiyonel yanıt verebilirliği kısmen sürdürdüğünü düşündürmektedir. Bu durum, Kir4.1 protein düzeyinde anlamlı değişiklik olmamasına karşın fonksiyonel yanıtın baskılanmasıyla uyumlu olup, akut OGD'de kanal fonksiyon kaybının protein kaybından ziyade membran lokalizasyonu, kanal gating'i, hücre içi pH/ATP değişimleri veya post-translasyonel düzenlemelerle ilişkili olabileceğini göstermektedir.

5.3. Resveratrol Ön-Uygulamasının Oligodendrosit Kanal Fonksiyonu Üzerine Koruyucu Etkisi

Resveratrol+iskemi grubunda Kir4.1 ve TRPM4 komponent genlikleri iskemi grubuna benzer biçimde düşük kalmakla birlikte, bu grup içeri-yönlü akımın farmakolojik modülasyonu açısından iskemi grubundan belirgin biçimde ayrılmıştır. İskemi grubunda bazal kayıttan son uygulama basamağına kadar içeri yönlü akım büyük ölçüde değişmeden kalırken, resveratrol+iskemi grubunda akım ardışık uygulamalarla giderek ve belirgin biçimde artmış, $BaCl_2$ ve 9-fenantrol uygulamalarının akımı kademeli olarak modüle edebildiği gözlenmiştir. İki grup arasındaki fark, uygulamanın tüm basamaklarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu bulgu, resveratrolün iskemik koşullarda dahi Kir4.1 ve TRPM4 kanallarının farmakolojik olarak modüle edilebilir duruma getirebildiğini ve bu kanalların fonksiyonelliğini büyük ölçüde korumaya yardımcı olduğunu göstermektedir.

Bu fonksiyonel korunma, ramp protokolünden elde edilen reversel potansiyel analiziyle de desteklenmektedir. Resveratrol+iskemi grubunda tespit edilebilen Kir4.1 komponentlerinin reversel potansiyelleri K^+ denge potansiyeli civarında toplanmış, bu da tespit edilebilen komponentlerin K^+ -baskın iletkenlik kimliğini koruduğunu göstermiştir.

Resveratrolün etkisi yalnızca akım büyüklüğü düzeyinde değil, kanal komponentlerinin moleküler kimliği düzeyinde de kendini göstermektedir. Bu paterne literatürde de kısmi destek bulunmaktadır: Alquisiras-Burgos ve arkadaşları, insan beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde (HBEC-5i) resveratrol ön uygulamasının OGD/reoksijenasyon koşullarında indüklenen SUR1-TRPM4 ekspresyonunu baskıladığını ve fonksiyonel kompleks aktivitesinin göstergesi olan hücre içi Na^+ birikimini azalttığını göstermiştir (103). Çalışmamız bu koruyucu etkinin oligodendrosit düzeyinde, fonksiyonel iyon kanalı aktivitesi parametreleri üzerinden de geçerli olduğunu ortaya koymaktadır.

Western blot verileri bu fonksiyonel tabloyu tamamlamaktadır. TRPM4 protein ekspresyonu resveratrol+iskemi grubunda kontrol değerinin yaklaşık yarısına düşmüştür. Patch-clamp'ta da aynı gruptaki hücrelerin çoğunda TRPM4 akım komponentinin yok ya da çok zayıf olduğu bulgusu, bu protein-fonksiyon paralelliğini doğrulamaktadır. Birlikte değerlendirildiğinde resveratrol, iskemik koşullarda kanal proteininin bir kısmını eksprese düzeyinde de baskılayarak kalan kanalları ise farmakolojik olarak modüle edilebilir bir havuz halinde koruyarak iki düzeyli bir nöroprotektif etki sergilemektedir.

5.4. Olig2 Kaybı ve Kaspaz-Bağımsız Hücre Ölüm Mekanizmalarının Değerlendirilmesi

Olig2 protein ekspresyonundaki belirgin azalma (özellikle resveratrol+iskemi grubunda kontrole göre yaklaşık %55'lik düşüş) çalışmamızın en sürpriz bulgularından biridir. İlk bakışta bu sonuç paradoksal görünmektedir. Çünkü hipotezimiz resveratrolün oligodendrositleri koruması yönündeydi. Ancak bu bulgu son birkaç yılda hızla gelişen yeni bir literatürle birlikte değerlendirildiğinde anlam kazanmaktadır. Kaddatz ve ark. tarafından yapılan bir çalışma, metabolik stres altındaki oligodendrositlerde Olig2 protein ekspresyonunun mRNA düzeyinde değişiklik olmaksızın hızla post-translasyonel olarak kaybolduğunu göstermiştir (187). Yazarlar bu bulguyu kuprizon toksik demiyelinizasyon modelinde göstermiş ve OLIG2-düşük olarak adlandırdıkları stres-ilişkili oligodendrosit popülasyonunun integre stres yanıtı (Activating Transcription Factor 3, ATF3) belirteçleri ile pozitif boyandığını rapor etmişlerdir. Bu çerçevede çalışmamızda resveratrol+iskemi grubunda gözlenen Olig2 kaybı, total oligodendrosit ölümünden ziyade hücrelerin metabolik stres yanıtının bir göstergesi olarak yorumlanabilir.

Bu yorumu güçlendiren en önemli bulgumuz, BCL-2, BAX ve Kaspaz-3 ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmamış olmasıdır.

Klasik kaspaz-bağımlı apoptoz yolağının aktive edilmemiş olması, çalışmamızda gözlenen Olig2 kaybının ve fonksiyonel kanal değişikliklerinin alternatif hücre ölüm mekanizmaları (nekroptoz, ferroptoz veya otofajik hücre ölümü) ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Chapman ve ark., olgunlaşmış oligodendrositlerin akut hasara ekzekütör Kaspaz-3 aktivasyonu olmaksızın yanıt verdiğini ve gecikmiş bir DNA-hasar tabanlı yolakla öldüklerini göstermişlerdir (188). Bu literatür, klasik apoptoz proteinlerindeki sessizlikle birlikte gözlenen Olig2 kaybının, oligodendrosit-spesifik bir geç hücre-stres yanıtını yansıtır olabileceğini güçlendirmektedir.

Anti-apoptotik BCL-2 ile pro-apoptotik BAX proteinlerinin oranı, hücrelerin apoptotik sürece yatkınlığını gösteren önemli bir moleküler belirteçtir (177). Kontrol grubunda 1.00 olarak normalleştirildiğinde, resveratrol+iskemi grubunda BCL-2/BAX oranı yaklaşık 0.55 düzeyine gerileyerek pro-apoptotik bir kayma eğilimine işaret etmiştir. Ancak bu eğilim istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır. Bu sınırdaki kayma, klasik apoptoz yolağının tam anlamıyla aktive olmasa da hücrelerel stres dengesinin pro-apoptotik tarafa hafifçe meyllediğine işaret etmekle birlikte çalışmamızda gözlenen Olig2 kaybının asıl olarak kaspaz-bağımsız yolaklar üzerinden gerçekleştiği yorumunu desteklemektedir.

5.5. Kir4.1 Protein-Fonksiyon Ayrışması ve Reversibl Post-Translasyonel Mekanizmalar

Çalışmamızın en dikkat çekici moleküler bulgularından biri, Kir4.1 protein ekspresyonunun gruplar arasında anlamlı biçimde değişmemiş olmasıdır. Buna karşın iskemi grubunda gözlenen yüksek varyans, patch-clamp bulgularımızla iyi bir tutarlılık göstermektedir. İskemi grubu hücrelerinde Kir4.1 fonksiyonel aktivitesi tüm hücrelerde aynı şekilde davranmamış, bazı hücreler küçük ve klasik bir Kir4.1 profili sergilerken bazıları atipik veya silik profiller göstermiştir. Western blot'taki yüksek varyans, bu hücre-hücre değişkenliğin protein düzeyindeki yansıması olabilir. Benzer bir tablo Song ve arkadaşları tarafından geçici orta serebral arter oklüzyonu (tMCAO) modelinde de bildirilmiştir. NG2-glia hücrelerinde Ba^{2+} -duyarlı Kir4.1 akımları, iskemik tarafta kontralateral değerlerin yaklaşık dörtte birine düşmüş, buna karşın protein düzeyindeki azalmanın akım kaybıyla doğrusal bir ilişki göstermediği vurgulanmıştır (189). Bizim çalışmamızda da fonksiyonel akımın belirgin düşüşüne karşılık Kir4.1 protein

ekspresyonunda paralel bir azalmanın gözlenmemesi, bu literatürle uyumlu bir patofizyolojik tabloya işaret etmektedir.

Bu bulgu önemli bir mekanizmaya işaret etmektedir: İskemi koşullarında Kir4.1'in fonksiyonel kaybı ağırlıklı olarak protein degradasyonundan kaynaklanmaz. Bunun yanında kanal kapama, kümeleşme bozukluğu, post-translasyonel modifikasyonlar (özellikle fosforilasyon) veya membran lokalizasyon bozukluğu gibi reversibl mekanizmalardan kaynaklanmış olabilir. Bu yorumun moleküler temeli iyi tanımlanmıştır. Wang ve arkadaşları, Kir4.1 proteininin Src ailesi protein tirozin kinazları (SFK) tarafından fosforillendiğini ve bu modifikasyonun kanal aktivitesi için belirleyici olduğunu kütle spektrometri ve elektrofizyolojik kayıtlarla göstermişlerdir. SFK inhibisyonu kanal akımını protein miktarından bağımsız biçimde baskılamaktadır (190). Brasko ve arkadaşları ise oligodendrositlerdeki Kir4.1/Kir5.1 kompleksinin PKA, PIP₂, hücre içi pH ve CO₂ tarafından dinamik biçimde düzenlendiğini, sitoplazmik bir Kir5.1 havuzunun fosforilasyona bağımlı etkileşimler aracılığıyla heteromerik kanalı membrana yönlendirdiğini ve bu yapının ekstraselüler ortam değişikliklerine hızlı bir membran cevabı sağladığını rapor etmiştir (164). Bu literatür ışığında çalışmamızın bulgusu, iskemik enerji çöküşüyle birlikte düşen ATP ve PIP₂ düzeylerinin ya da pH/Ca²⁺ değişikliklerinin SFK/PKA aracılı fosforilasyon dengesini bozarak membran Kir4.1 havuzunu fonksiyonel olarak susturduğu ancak protein degradasyonunu tetikleyecek kadar uzun süreli olmadığı bir senaryoyu desteklemektedir. Bu reversibl durum, çalışmamızın temel hipotezinin (resveratrol önışleminin Kir4.1 fonksiyonel kaybını kısmen önleyebilmesi) moleküler temelini oluşturmaktadır: Resveratrol, henüz protein düzeyinde gerçekleşmemiş olan kanal aktivitesi kaybının önüne fonksiyonel düzeyde geçmiştir.

Kanal proteininin varlığını korumakla birlikte fonksiyonel aktivitesini yitirmesi, literatürde de tarif edilen bir patofizyolojik durumdur. ATP-duyarlı potasyum kanallarının enerji yetmezliğinde modülasyonu, PIP₂ bağımlı kanalların lipid mikroortam değişiklikleriyle kapanması ve potasyum kanallarının fosforilasyon durumlarına göre membrandan uzaklaştırılması bu reversibl mekanizmaların bilinen örnekleridir. Bu kavramın en açık deneysel ispatlarından biri yapılan bir çalışmada SeSAME sendromu Kir4.1 mutantları üzerinde gösterilmiştir. Hücre yüzeyi biyotinlenme deneyleri, R297C, C140R ve T164I gibi mutasyonların plazma membranına eksprese olduğunu (yani protein varlığını koruduğunu) ancak fonksiyonel akım üretmediğini ortaya koymuştur (191).

Yani Kir4.1'de "protein var, fonksiyon yok" tablosu hem genetik hem edinsel koşullarda gözlenen tutarlı bir patofizyolojik durumdur. Bizim akut OGD modelimizde de büyük olasılıkla benzer bir prensip işlemekte, ancak temel altta yatan mekanizma mutasyon değil, post-translasyonel/biyofiziksel kanal susturulmasıdır. Benzer bir reversibl tablonun başka bir membran proteininde de gösterilmiş olması bu yorumu güçlendirir. Şimşek ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, kardiyak NHE1 taşıyıcısının akut hipoksi sırasında total protein miktarında değişiklik olmaksızın sarkolemmadan içselleştirilerek fonksiyonel olarak sustuğunu ve reoksijenasyon ile aktivitenin geri kazanıldığını göstermiştir (192). Bu, iskemik stresin geri dönüşümlü membran kanal/taşıyıcı susturmasının protein-fonksiyon ayrışması ile karakterize olduğu fikrini bağımsız bir membran proteininde doğrulamaktadır.

Bu mekanizmanın temelinde hücresel sonuç açısından da anlamlı bir karşılığı vardır. Yapılan yakın tarihli bir çalışmada, iskemik inmede NG2-glia hücrelerinde Kir4.1 kanalının küçük molekül agonistleriyle aktivasyonunun remiyelinizasyonu desteklediğini göstermiştir (158). Aynı şekilde yapılan bir çalışmada, Kir4.1'in oligodendrosit gelişimini Na^+/H^+ değiştiricisi üzerinden hücre içi pH'ı düzenleyerek desteklediğini bildirmiştir (193). Yani protein düzeyinde korunmuş, ancak fonksiyonel olarak susturulmuş bir Kir4.1 havuzunun varlığı, terapötik açıdan yeniden aktive edilebilir bir hedef olduğu anlamına gelmektedir. Çalışmamızda resveratrol+iskemi grubunda gözlenen kanal komponentlerinin yeniden ortaya çıkışı ve farmakolojik modülasyona yanıt vermesi, bu yorumla doğrudan örtüşmektedir.

Son olarak, TRPM4 ekspresyonunda gözlenen azalma (özellikle resveratrol+iskemi grubunda) ile Kir4.1 ekspresyonunun korunması arasındaki bu ayrışma, iki kanalın iskemik yanıtta farklı moleküler yollarla etkilendiğine işaret etmektedir. Kir4.1 için ağırlıklı mekanizma reversibl post-translasyonel susturma iken, TRPM4 için klasik ekspresyon-bazlı bir düzenleme (muhtemelen resveratrolün SIRT1/AMPK yolağı üzerinden gen ekspresyonunu da modüle etmesi) söz konusu olabilir (127). Bu iki katmanlı düzenleme tablosu, resveratrolün iskemik miyelin hasarına karşı koruyucu etkisinin tek bir mekanizmaya değil hem ekspresyon hem fonksiyonel düzeyde paralel müdahalelere dayandığını düşündürmektedir.

5.6. Dinlenim Membran Potansiyeli ve İçeri Yönlü Akım Bulgularının Değerlendirilmesi

Çalışmanın subtraction temelli kanal komponenti analizlerini tamamlayan iki tüm-hücre parametresi (dinlenim membran potansiyeli (RMP) ve ardışık ilaç uygulamaları sırasındaki içeri yönlü akım büyüklüğü) kanal düzeyindeki bulgularla tutarlı bir tablo ortaya koymuştur.

Dört deney grubunda akım-kenetleme konfigürasyonunda ölçülen RMP değerleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir. İskemi grubunun RMP ortalaması tüm gruplar içinde en hiperpolarize değer olarak saptanmıştır. İlk bakışta bu bulgu, Kir4.1 fonksiyonel kaybının membran depolarizasyonuna yol açtığını gösteren literatürle çelişiyor gibi görünmektedir. Neusch ve ark., Kir4.1 geninin silinmesinin oligodendrositlerde RMP'yi -59.7 mV'dan -34.3 mV'a kadar depolarize ettiğini bildirmiştir (51). Ancak çalışmamızda ölçülen değer, kalıcı genetik bir Kir4.1 kaybını değil, akut iskemik strese verilen erken hücrel yanıtı yansıtmaktadır. Akut oksijen-glukoz yoksunluğu koşullarında hücre dışı K^+ konsantrasyonunun yükselmesi ve enerji bağımlı iyon taşıyıcılarının bozulması, kısa vadede membranı paradoksal biçimde hiperpolarize edebilir. Bu durum, geç dönemde gelişen depolarizasyondan önce gelen bir evre olarak değerlendirilmelidir. İskemi grubunun bu denli homojen ve dar dağılım göstermesi, kaydedilen popülasyonun benzer bir akut yanıt evresinde yakalandığına işaret etmektedir.

Çalışmamızda resveratrol+iskemi grubunda RMP ortalaması kontrol grubuna belirgin biçimde yaklaşmıştır. İskemi ile resveratrol+iskemi grupları arasındaki fark istatistiksel anlamlılık sınırının hemen üzerinde kalmış olsa da gözlenen eğilim resveratrol ön-uygulamasının iskemiye bağlı membran potansiyeli kaymasını sınırlandırma yönündedir. Bu gözlem, resveratrol+iskemi grubunda Kir4.1 ve TRPM4 akım komponentlerinin bazı hücrelerde yeniden ortaya çıkması ve V_{rev} dağılımının iskemi grubuna kıyasla belirgin biçimde daralması bulgularıyla aynı yöndedir. Üç bağımsız parametre (kanal komponenti sıklığı, V_{rev} homojenliği ve RMP) tutarlı biçimde resveratrolün hasarlı oligodendrositlerin elektrofizyolojik kimliğini stabilize ettiğine işaret etmektedir. Resveratrol grubunda ise RMP en depolarize değeri sergilemiştir. Bu grupta hem geniş dağılım hem de depolarize ortalama, resveratrolün iskemik olmayan koşullarda kanal aktivitesi üzerinde heterojen ve kısmen inhibitör bir etki gösterdiğine ilişkin önceki bulgularımızla uyumludur.

Ardışık ilaç uygulamaları sırasında ölçülen içeri yönlü akım büyüklüğü, iskemi ve resveratrol+iskemi grupları arasında belirgin bir ayrışma ortaya koymuştur. İskemi grubunda içeri yönlü akım, bazal kayıttan son uygulama basamağına kadar tüm aşamalarda büyük ölçüde değişmeden kalmıştır. Bu durum, iskemiye maruz kalan hücrelerde kanal popülasyonunun farmakolojik uyarılara yanıt verme kapasitesini büyük ölçüde yitirdiğine işaret etmektedir. Buna karşılık resveratrol+iskemi grubunda içeri yönlü akım ardışık uygulamalarla giderek ve belirgin biçimde artmıştır. İskemi grubunda akımın uyarılara yanıtsız kalması, Bölüm 5.5'te tartışılan "kanal proteini varlığını korumakla birlikte fonksiyonel aktivitesini yitirir" şeklindeki protein-fonksiyon ilişkili yorumunu bütün-hücre düzeyinde de desteklemektedir.

5.7. Çalışmanın Sınırlılıkları

Çalışmamızın bulgularının yorumlanmasında bazı sınırlılıkları göz önünde bulundurmak gerekmektedir. Birinci olarak, her patch-clamp grubunda nispeten düşük hücre sayısının ($n = 5-7$) bulunması, gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel güç sınırlamasına yol açmıştır. Özellikle ramp protokolünden hesaplanan reversal potansiyel değerlerinin istatistiksel anlamlılığa ulaşmamış olmasında bu örneklem genişliğinin payı vardır. Ancak çalışmamızda her hücrenin ardışık beş ilaç aşamasında detaylı kayıtlarının alınması ve subtraction analizleriyle kanal-spesifik bileşenlerin ayrıştırılması, nicel saptamaların yanında niteliksel akım profili karşılaştırmasını da olanaklı kılmıştır. Ayrıca, akut beyin dilim hazırlığında gigaseal başarı oranı, hücre stabilitesi ve oligodendrositlerin hücre tipinin doğrulanmasının teknik zorlukları göz önüne alındığında bu hücre sayısı, oligodendrosit patch-clamp literatürü için karşılaştırılabilir düzeydedir.

İkinci olarak, çalışmamızda fonksiyonel olarak patch-clamp ile incelenen TRPA1 kanalının protein ekspresyon düzeyi Western blot ile değerlendirilememiştir. Bu durum, TRPA1 için protein-fonksiyon ilişkisinin Kir4.1 ve TRPM4 düzeyinde olduğu kadar bütüncül biçimde tartışılmasını sınırlandırmıştır. Gelecek çalışmalarda TRPA1 ekspresyonunun da Western blot ve qRT-PCR ile değerlendirilmesi, oligodendrosit-spesifik iskemik yanıtın kanal düzeyinde daha eksiksiz bir tablosunun çizilmesine olanak sağlayacaktır.

Üçüncü olarak, kullandığımız akut OGD modeli, MS'in kronik ve tekrarlayıcı patofizyolojisini tam olarak yansıtmamaktadır. MS'te görülen miyelin hasarı haftalar-

aylar süren bir süreçte gerçekleşirken bizim modelimizdeki iskemi maruziyeti dakikalar düzeyindedir. Bu nedenle, çalışmamızda saptanan moleküler etkilerin (özellikle Olig2 ekspresyonundaki azalma) kronik iskemik koşullarda nasıl evrileceği, uzun süreli OGD veya kronik EAE modelleri ile ex vivo olarak ileride incelenmesi gereken bir konudur. Bu bağlamda, organotipik beyin dilim kültürlerinde günler-haftalar süren iskemik maruziyet protokolleri çalışmamızın bulgularının zaman-bağımlı evrimini incelemek için uygun bir platform sunabilir (114).

Dördüncü olarak, resveratrolün biyoyararlanımı klinik çeviride önemli bir engel olarak durmaktadır. Resveratrol oral alımdan sonra hızla glukuronid ve sülfat metabolitlerine dönüşmekte ve plazma yarı-ömrü kısa kalmaktadır (194). Ayrıca kan-beyin bariyerini geçme oranı sınırlıdır. Çalışmamız bu konuyu doğrudan kapsamamış olsa da gelecek çalışmalarda nanopartikül-kapsüllü, lipozomal veya intranazal resveratrol formülasyonlarının kullanılması; in vivo nöroprotektif etkilerin moleküler hedeflere daha verimli ulaşmasına imkân verebilir. Özellikle laktoferrin-konjüge edilmiş PLGA nanopartikülleri ile resveratrolün beyin biyoyararlanımının önemli ölçüde artırıldığı in vivo Alzheimer modellerinde gösterilmiştir. Benzer formülasyonların MS modellerinde de denenmesi anlamlı olabilir (194).

Beşinci olarak, çalışmamızda kullanılan ilaç konsantrasyonları (resveratrol için literatürde kullanılan 50 μ M, polygodial 100 μ M, BaCl₂ 100 μ M, 9-fenantrol 30 μ M) patch-clamp deneyleri için kabul gören doz aralıklarında olmakla birlikte, in vivo elde edilebilen plazma/doku konsantrasyonlarından yüksektir. Bu nedenle, çalışmamızda gözlemlenen kanal modülasyon etkilerinin in vivo eşdeğer dozlarda da gösterilebilmesi için doz-yanıt eğrilerinin oluşturulması ve fizyolojik aralıkta etkinin doğrulanması gereklidir. Bu çalışmada g_K ve GHK temelli analizler patch-clamp bulgularının biyofiziksel yorumunu güçlendirmekle birlikte, bu analizlerin bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Öncelikle g_K hesaplamaları ramp I-V eğrisinin belirli bir negatif voltaj aralığındaki slope conductance değerine dayandığından, tüm hücrelerde aynı voltaj aralığı kullanılmış olsa da hücre boyutu, membran kapasitansı, seri direnç değişimleri ve kayıt stabilitesi sonuçları etkileyebilir. Ayrıca GHK ile hesaplanan göreceli Na⁺/K⁺ geçirgenlik oranları, blokör duyarlı subtraction akımlarının reversel potansiyellerinden türetildiği ve bazı gruplarda geçerli hücre sayısı düşük olduğu için kesin kanal seçiciliği göstergesi olarak değil, destekleyici ve hipotez oluşturucu bir analiz olarak değerlendirilmelidir. Bu nedenle çalışmanın ana elektrofizyolojik sonucu, GHK

oranlarından ziyade BaCl₂duyarlı-Kir4.1 ile ilişkili ve 9-fenantrol duyarlı-TRPM4 ile ilişkili farmakolojik komponentlerin genlik ve iletkenlik profilleri üzerinden yorumlanmalıdır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, oksijen-glukoz yoksunluğu (OGD) ile oluşturulan ex vivo iskemik miyelin hasarı modelinde resveratrolün oligodendrosit Kir4.1, TRPM4 ve TRPA1 iyon kanalları üzerine etkileri patch-clamp ve Western blot yöntemleri ile bütünsel biçimde değerlendirildi. Elde edilen başlıca bulgular ve gelecek çalışmalara yönelik öneriler aşağıda özetlendi.

1. İskemik koşullar, *Corpus Callosum* oligodendrositlerinde Kir4.1 ve TRPM4 akım komponentlerini belirgin biçimde baskılamış ve resveratrol uygulaması bu fonksiyonel kaybı tam olarak tersine çevirmemekle birlikte kanalları farmakolojik ajanlara yanıt verebilir bir profile yaklaştırarak modüle edilebilir bir kanal havuzunun korunmasını sağlamıştır. Bu bulgu resveratrolün her koşulda eş düzeyde koruyucu bir etki sergilemediğini ancak OGD koşullarında oligodendrosit iyon kanalı yanıt profilini modüle edebildiğini düşündürmektedir.
2. TRPM4 protein ekspresyonu gruplar arasında farklılık gösterdiği görüldü. Resveratrol+iskemi grubunun hem resveratrol hem de iskemi gruplarına kıyasla daha düşük düzeyde TRPM4 ekspresyonu sergilediği gözlemlendi. Bu durum TRPM4 baskılanmasının yalnızca iskemiye veya yalnızca resveratrole özgü olmadığını, iki koşulun birlikte uygulandığı durumda ortaya çıkan özgül bir etki olabileceğine göstermektedir. Bunun yanında bu durum, patch-clamp kayıtlarında aynı gruptaki hücrelerin çoğunda TRPM4 komponentinin yok ya da çok zayıf bulunmasıyla uyumlu görünmektedir.
3. Olig2 protein ekspresyonu özellikle resveratrol+iskemi grubunda belirgin azalma gösterdiği görüldü, buna karşılık klasik apoptoz belirteçlerinde (Bcl-2, Bax, Caspase-3) kayda değer bir değişiklik gözlenmedi. Bu örüntü, oligodendrosit kaybının kaspaz-aracılı klasik apoptozdan farklı yollarla (post-translasyonel mekanizmalar veya alternatif hücre ölüm yolları) seyrediyor olabileceğini düşündürmektedir.
4. Kir4.1 protein ekspresyonu gruplar arasında belirgin bir farklılaşma göstermezken, patch-clamp kayıtlarında Kir4.1 akım komponentinin iskemi koşullarında belirgin biçimde baskılandığı görüldü. Bu protein-fonksiyon ayrışması, kanalın fonksiyonel kaybının protein düzeyinde değil; olası post-

translasyonel mekanizmalar (fosforilasyon, oksidasyon veya membran değişiklikleri) ile gerçekleşiyor olabileceğine işaret etmektedir.

5. Çalışmamızda iskemi ve resveratrol+iskemi gruplarında polygodial uygulanmadığı için TRPA1 akımı doğrudan ölçülemedi ve TRPA1 protein ekspresyonu Western blot ile değerlendirilemedi. Gelecek çalışmalarda polygodial içeren protokollerin tüm gruplara uygulanması, TRPA1 ekspresyonunun Western blot ve qRT-PCR ile değerlendirilmesi ve farmakolojik ajanların DMSO bağımlı bileşenden tam olarak ayrıştırılabilmesi amacıyla paralel bir kontrol grubunun eklenmesi oligodendrosit-spesifik iskemik yanıtın kanal düzeyinde daha eksiksiz biçimde tanımlanmasına katkı sağlayacaktır.
6. Olig2 kaybının klasik apoptoz dışındaki yolaklarla seyrettiği hipotezinin doğrulanması amacıyla, gelecek çalışmalarda ferroptoz (GPX4, ACSL4, MDA), nekroptoz (RIP1, RIP3, MLKL) ve otofaji (LC3, p62) için özgül belirteçlerin değerlendirilmesi yarar sağlayacaktır. Ayrıca Kir4.1 protein-fonksiyon ayrışmasının altında yatan post-translasyonel mekanizmaların aydınlatılması için fosforilasyon-özgül antikorlar, yüzey-biyotinilasyon ve PIP₂ bağlanmasıya yönelik çalışmaların yapılması önerilmektedir.
7. İletkenlik ve GHK geçirgenlik analizleri, Kir4.1 ve TRPM4 komponentlerinin gruplar arasında anlamlı farklılık göstermediğini, buna karşılık BaCl₂-duyarlı iletkenliğin yalnızca iskemi grubunda tutarlı ve anlamlı bir azalma ürettiğini ve bu grupta potasyum denge potansiyeline yakın reversal potansiyeliyle beklenen K⁺-seçici Kir4.1 değerlerini sergilediğini ortaya koymuştur. Elektrofizyolojik ölçümlerin düşük örneklem sayısı, yüksek bazal sızıntı iletkenliği gibi durumlar nedeniyle sınırlı çözünürlüğe sahip olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. İleri çalışmalarda iletkenliklerin hücre kapasitansına normalize edilmesi önerilmektedir.
8. Bu çalışmadaki ex vivo OGD modeli akut iskemik miyelin hasarını modellemekte olup, bulguların kronik demiyelinizasyon ve gerçek MS patolojisi koşullarındaki geçerliliği, in vivo kuprizon veya EAE modellerinde resveratrol uygulamasının iyon kanalı merkezli sonuçlarla değerlendirilmesini gerektirmektedir. Resveratrolün biyoyararlanımının sınırlı olması nedeniyle, kan-beyin bariyerini geçirebilen nano-partikül taşıyıcılar, lipozomal formülasyonlar veya kararlı

analoglar kullanılarak biyoyararlılığı artırılmış resveratrol türevlerinin oligodendrosit iyon kanalı üzerindeki etkinliğinin araştırılması, bulguların klinik uygulamaya taşınması açısından önem taşımaktadır.



KAYNAKLAR

1. Nave K-A, Werner HB. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30(1):503-33.
2. Simkins TJ, Duncan GJ, Bourdette D. Chronic demyelination and axonal degeneration in multiple sclerosis: pathogenesis and therapeutic implications. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2021;21(6):26.
3. Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci.* 2006;9(2):173-9.
4. Dawson MR, Levine JM, Reynolds R. NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res.* 2000;61(5):471-9.
5. Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup W. Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF α -receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *J Neurosci Res.* 1996;43(3):299-314.
6. Snaidero N, Möbius W, Czopka T, Hekking LH, Mathisen C, Verkleij D, et al. Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI (3, 4, 5) P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell.* 2014;156(1):277-90.
7. Schirmer L, Möbius W, Zhao C, Cruz-Herranz A, Ben Haim L, Cordano C, et al. Oligodendrocyte-encoded Kir4. 1 function is required for axonal integrity. *Elife.* 2018;7:e36428.
8. Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* 2017;133(2):223-44.
9. Shu F-Q, Lu Y-G, Tang H-P, Ye Z-Y, Huang Y-N, Wang M, et al. Resveratrol noncompetitively inhibits glycine receptor-mediated currents in neurons of rat central auditory neurons. *Brain Res Bull.* 2021;169:18-24.
10. Ghaiad HR, Nooh MM, El-Sawalhi MM, Shaheen AA. Resveratrol promotes remyelination in cuprizone model of multiple sclerosis: biochemical and histological study. *Mol Neurobiol.* 2017;54(5):3219-29.

11. Fonseca-Kelly Z, Nassrallah M, Uribe J, Khan RS, Dine K, Dutt M, et al. Resveratrol neuroprotection in a chronic mouse model of multiple sclerosis. *Front Neurol*. 2012;3:84.
12. Nilius B, Szallasi A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol Rev*. 2014;66(3):676-814.
13. Julius D. TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2013;29(1):355-84.
14. Hamilton NB, Kolodziejczyk K, Kougoumtzidou E, Attwell D. Proton-gated Ca²⁺-permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia. *Nature*. 2016;529(7587):523-7.
15. Looser ZJ, Ravotto L, Jung RB, Werner HB, Ruhwedel T, Möbius W, et al. Potassium regulates axon-oligodendrocyte signaling and metabolic coupling in white matter. *bioRxiv*. 2022:2022.11.08.515614.
16. Schattling B, Steinbach K, Thies E, Kruse M, Menigoz A, Ufer F, et al. TRPM4 cation channel mediates axonal and neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med*. 2012;18(12):1805-11.
17. Bianchi B, Smith PA, Abriel H. The ion channel TRPM4 in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and in a model of glutamate-induced neuronal degeneration. *Mol Brain*. 2018;11(1):41.
18. Simons M, Nave K-A. Oligodendrocytes: myelination and axonal support. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(1):a020479.
19. Aggarwal S, Yurlova L, Simons M. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol*. 2011;21(10):585-93.
20. Simons M, Trotter J. Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol*. 2007;17(5):533-40.
21. Fancy SP, Baranzini SE, Zhao C, Yuk D-I, Irvine K-A, Kaing S, et al. Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev*. 2009;23(13):1571-85.

22. Matute C, Domercq M, Sánchez-Gómez MV. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *Glia*. 2006;53(2):212-24.
23. Micu I, Jiang Q, Coderre E, Ridsdale A, Zhang L, Woulfe J, et al. NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. *Nature*. 2006;439(7079):988-92.
24. Coutinho Costa VG, Araújo SE-S, Alves-Leon SV, Gomes FCA. Central nervous system demyelinating diseases: glial cells at the hub of pathology. *Front Immunol*. 2023;14:1135540.
25. Filippi M, Preziosa P, Rocca M, Bar-Or A, Piehl F, Solari A, et al. Erratum to: Multiple sclerosis (Nature Reviews Disease Primers,(2018), 4, 1,(43), 10.1038/s41572-018-0041-4). *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):49-.
26. Jiang J, Sun Y, Ma Y, Xu C, Zhao X, Fu H. Advances in Therapeutics Research for Demyelinating Diseases. *Pharmaceuticals*. 2025;18(12):1835.
27. Lassmann H. Multiple sclerosis pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(3):a028936.
28. Lassmann H. The contribution of neuropathology to multiple sclerosis research. *Eur J Neurol*. 2022;29(9):2869-77.
29. Campbell G, Mahad DJ. Mitochondrial dysfunction and axon degeneration in progressive multiple sclerosis. *FEBS Lett*. 2018;592(7):1113-21.
30. Larson VA, Mironova Y, Vanderpool KG, Waisman A, Rash JE, Agarwal A, et al. Oligodendrocytes control potassium accumulation in white matter and seizure susceptibility. *Elife*. 2018;7:e34829.
31. Paez PM, Lyons DA. Calcium signaling in the oligodendrocyte lineage: regulators and consequences. *Annu Rev Neurosci*. 2020;43(1):163-86.
32. Matute C. Glutamate and ATP signalling in white matter pathology. *J Anat*. 2011;219(1):53-64.
33. Ascherio A, Munger KL, editors. Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to prevention—an update. *Semin Neurol*; 2016: Thieme Medical Publishers.

34. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis—a review. *Eur J Neurol*. 2019;26(1):27-40.
35. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol*. 2015;14(3):263-73.
36. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*. 2005;128(11):2705-12.
37. Bö L, Geurts J, Mörk S, Van Der Valk P. Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2006;113:48-50.
38. Pukoli D, Vécsei L. Smouldering lesion in MS: microglia, lymphocytes and pathobiochemical mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2023;24(16):12631.
39. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278-86.
40. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2015;14(2):183-93.
41. Klineova S, Lublin FD. Clinical course of multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(9):a028928.
42. Trapp BD, Stys PK. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2009;8(3):280-91.
43. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain*. 2011;134(7):1914-24.
44. Boscia F, Elkjaer ML, Illes Z, Kukley M. Altered expression of ion channels in white matter lesions of progressive multiple sclerosis: what do we know about their function? *Front Cell Neurosci*. 2021;15:685703.
45. ELBini I, Neili N-e. Potassium channels at the crossroads of neuroinflammation and myelination in experimental models of multiple sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023;653:140-6.

46. Wang J, Shen Y, Liao P, Yang B, Jiang R. Roles of Ion Channels in Oligodendrocyte Precursor Cells: From Physiology to Pathology. *Int J Mol Sci.* 2025;26(15):7336.
47. Cherchi F, Bulli I, Venturini M, Pugliese AM, Coppi E. Ion channels as new attractive targets to improve re-myelination processes in the brain. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7277.
48. Ohashi K, Shibasaki K, Nakazawa H, Kunimasa R, Nagayasu K, Shirakawa H, et al. Transient receptor potential melastatin 3 is functionally expressed in oligodendrocyte precursor cells and is upregulated in ischemic demyelinated lesions. *Biol Pharm Bull.* 2021;44(2):181-7.
49. Schirmer L, Srivastava R, Kalluri SR, Böttinger S, Herwerth M, Carassiti D, et al. Differential loss of KIR4. 1 immunoreactivity in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 2014;75(6):810-28.
50. Zha T, Fang X, Wan J, Chen X, Lin J, Chen Q. Preclinical insights into the role of Kir4. 1 in chronic pain and depression: mechanisms and therapeutic potential. *Biomolecules.* 2025;15(2):165.
51. Neusch C, Rozengurt N, Jacobs RE, Lester HA, Kofuji P. Kir4. 1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J Neurosci.* 2001;21(15):5429-38.
52. Srivastava R, Aslam M, Kalluri SR, Schirmer L, Buck D, Tackenberg B, et al. Potassium channel KIR4. 1 as an immune target in multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2012;367(2):115-23.
53. Schirmer L, Srivastava R, Hemmer B. To look for a needle in a haystack: the search for autoantibodies in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2014;20(3):271-9.
54. Simard JM, Woo SK, Bhatta S, Gerzanich V. Drugs acting on SUR1 to treat CNS ischemia and trauma. *Curr Opin Pharmacol.* 2008;8(1):42-9.
55. Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(4):225-38.
56. Stys PK, Waxman SG, Ransom BR. Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na⁺ channels and Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci.* 1992;12(2):430-9.

57. Waxman SG. Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(12):932-41.
58. Dalenogare DP, Souza Monteiro de Araújo D, Landini L, Titiz M, De Siena G, De Logu F, et al. Neuropathic-like nociception and spinal cord neuroinflammation are dependent on the TRPA1 channel in multiple sclerosis models in mice. *Cells.* 2023;12(11):1511.
59. Giacco V, Flower G, Artamonova M, Hunter J, Padilla Requerey A, Hamilton NB. Transient receptor potential Ankyrin-1 (TRPA1) agonists suppress myelination and induce demyelination in organotypic cortical slices. *Glia.* 2023;71(6):1402-13.
60. Lajos W, Flower G, Giacco V, Kaul A, La Mache C, Brăban A, et al. TRPA1 block protects against loss of white matter function during ischaemia in the mouse optic nerve. 2021.
61. Sághy É, Sipos É, Ács P, Bölcskei K, Pohoczky K, Kemeny A, et al. TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination—A new target against oligodendrocyte apoptosis. *Glia.* 2016;64(12):2166-80.
62. Kriszta G, Nemes B, Sándor Z, Ács P, Komoly S, Berente Z, et al. Investigation of cuprizone-induced demyelination in mGFAP-driven conditional transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor knockout mice. *Cells.* 2019;9(1):81.
63. Looser ZJ, Faik Z, Ravotto L, Zanker HS, Jung RB, Werner HB, et al. Oligodendrocyte–axon metabolic coupling is mediated by extracellular K⁺ and maintains axonal health. *Nat Neurosci.* 2024;27(3):433-48.
64. Asadollahi E, Trevisiol A, Saab AS, Looser ZJ, Dibaj P, Ebrahimi R, et al. Oligodendroglial fatty acid metabolism as a central nervous system energy reserve. *Nat Neurosci.* 2024;27(10):1934-44.
65. Philips T, Rothstein JD. Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons. *J Clin Invest.* 2017;127(9):3271-80.
66. Emery B. Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science.* 2010;330(6005):779-82.

67. Verkhatsky A, Steinhäuser C. Ion channels in glial cells. *Brain Res Rev.* 2000;32(2-3):380-412.
68. Stys PK. White matter injury mechanisms. *Curr Mol Med.* 2004;4(2):113-30.
69. Hogan PG, Rao A. Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;460(1):40-9.
70. Korshunov KS, Prakriya M. Store-operated calcium channels in the nervous system. *Annu Rev Physiol.* 2025;87(1):173-99.
71. Serwach K, Gruszczynska-Biegala J. Target molecules of STIM proteins in the central nervous system. *Front Mol Neurosci.* 2020;13:617422.
72. Papanikolaou M, Lewis A, Butt A. Store-operated calcium entry is essential for glial calcium signalling in CNS white matter. *Brain Struct Funct.* 2017;222(7):2993-3005.
73. Rui Y, Pollitt SL, Myers KR, Feng Y, Zheng JQ. Spontaneous local calcium transients regulate oligodendrocyte development in culture through store-operated Ca²⁺ entry and release. *eNeuro.* 2020;7(4).
74. Hundehage P, Epping L, Meuth SG. Calcium homeostasis in multiple sclerosis. *Neurol Int Open.* 2017;1(03):E127-E35.
75. Cosens D, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature.* 1969;224(5216):285-7.
76. Minke B. The history of the *Drosophila* TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *J Neurogenet.* 2010;24(4):216-33.
77. Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem.* 2007;76(1):387-417.
78. Rather MA, Khan A, Wang L, Jahan S, Rehman MU, Makeen HA, et al. TRP channels: role in neurodegenerative diseases and therapeutic targets. *Heliyon.* 2023;9(6).
79. Tian C, Li S, He L, Han X, Tang F, Huang R, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 contributes to the lysophosphatidylcholine-induced oxidative stress and cytotoxicity in OLN-93 oligodendrocyte. *Cell Stress Chaperones.* 2020;25(6):955-68.

80. Jaquemar D, Schenker T, Trueb B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem.* 1999;274(11):7325-33.
81. Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE.* 2005;2005(272):re3-re.
82. Nilius B, Flockerzi V. Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels: Springer; 2014.
83. Nagata K, Duggan A, Kumar G, García-Añoveros J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci.* 2005;25(16):4052-61.
84. Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Transient Receptor Potential A1 Is a Sensory Receptor for Multiple Products of Oxidative Stress. *J Neurosci.* 2008;28(10):2485-94.
85. Trevisan G, Benemei S, Materazzi S, De Logu F, De Siena G, Fusi C, et al. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain.* 2016;139(5):1361-77.
86. Kakae M, Nakajima H, Tabori S, Kawashita A, Miyanohara J, Morishima M, et al. The astrocytic TRPA1 channel mediates an intrinsic protective response to vascular cognitive impairment via LIF production. *Sci Adv.* 2023;9(29):eadh0102.
87. Talavera K, Startek JB, Alvarez-Collazo J, Boonen B, Alpizar YA, Sanchez A, et al. Mammalian transient receptor potential TRPA1 channels: from structure to disease. *Physiol Rev.* 2020.
88. Fila M, Przyslo L, Derwich M, Sobczuk P, Pawlowska E, Blasiak J. The TRPA1 ion channel mediates oxidative stress-related migraine pathogenesis. *Molecules.* 2024;29(14):3385.
89. Ertlav K. Resveratrol Reduces Hypoxia-Caused Increases of Apoptosis and Oxidative Neurotoxicity via TRPA1 Cation Channel Suppression in Glioblastoma Cells. *Online Turk J Health Sci.* 2025;10(4):382-9.
90. Huang Y, Fliegert R, Guse AH, Lü W, Du J. A structural overview of the ion channels of the TRPM family. *Cell Calcium.* 2020;85:102111.

91. Jimenez I, Prado Y, Marchant F, Otero C, Eltit F, Cabello-Verrugio C, et al. TRPM channels in human diseases. *Cells*. 2020;9(12):2604.
92. Jiang L-H, Yao X, Çiğ B. TRP channels in oxidative stress signalling. *MDPI*; 2023. p. 1251.
93. Zhang M, Ma Y, Ye X, Zhang N, Pan L, Wang B. TRP (transient receptor potential) ion channel family: structures, biological functions and therapeutic interventions for diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):261.
94. Wang J, Qiao S, Liang S, Qian C, Dong Y, Pei M, et al. TRPM4 and TRPV2 are two novel prognostic biomarkers and promising targeted therapy in UVM. *Front Mol Biosci*. 2022;9:985434.
95. Gao Y, Liao P. TRPM4 channel and cancer. *Cancer Lett*. 2019;454:66-9.
96. Weber KS, Hildner K, Murphy KM, Allen PM. Trpm4 differentially regulates Th1 and Th2 function by altering calcium signaling and NFAT localization. *J Immunol*. 2010;185(5):2836-46.
97. Gerzanich V, Woo SK, Vennekens R, Tsybalyuk O, Ivanova S, Ivanov A, et al. De novo expression of Trpm4 initiates secondary hemorrhage in spinal cord injury. *Nat Med*. 2009;15(2):185-91.
98. Chen B, Gao Y, Wei S, Low SW, Ng G, Yu D, et al. TRPM4-specific blocking antibody attenuates reperfusion injury in a rat model of stroke. *Pflugers Arch*. 2019;471(11):1455-66.
99. Makar TK, Gerzanich V, Nimmagadda VK, Jain R, Lam K, Mubariz F, et al. Silencing of Abcc8 or inhibition of newly upregulated Sur1-Trpm4 reduce inflammation and disease progression in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*. 2015;12(1):210.
100. Jha RM, Rani A, Desai SM, Raikwar S, Mihaljevic S, Munoz-Casabella A, et al. Sulfonylurea receptor 1 in central nervous system injury: an updated review. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21):11899.
101. Simard JM, Kent TA, Chen M, Tarasov KV, Gerzanich V. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol*. 2007;6(3):258-68.

102. Stokum JA, Shim B, Negoita S, Tsymbalyuk N, Tsymbalyuk O, Ivanova S, et al. Cation flux through SUR1-TRPM4 and NCX1 in astrocyte endfeet induces water influx through AQP4 and brain swelling after ischemic stroke. *Sci Signal*. 2023;16(788):eadd6364.
103. Alquisiras Burgos I, Hernández Cruz A, Aguilera P. Resveratrol pretreatment modulates SUR1-TRPM4 expression induced by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation in brain microvascular endothelial cells. *Neurol Res*. 2026:1-9.
104. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*. 2010;90(1):291-366.
105. Nwaobi SE, Cuddapah VA, Patterson KC, Randolph AC, Olsen ML. The role of glial-specific Kir4. 1 in normal and pathological states of the CNS. *Acta Neuropathol*. 2016;132(1):1-21.
106. Thuringer D, Chanteloup G, Boucher J, Pernet N, Boudesco C, Jegou G, et al. Modulation of the inwardly rectifying potassium channel Kir4. 1 by the pro-invasive miR-5096 in glioblastoma cells. *Oncotarget*. 2017;8(23):37681.
107. Song J, Cheon SY, Jung W, Lee WT, Lee JE. Resveratrol induces the expression of interleukin-10 and brain-derived neurotrophic factor in BV2 microglia under hypoxia. *Int J Mol Sci*. 2014;15(9):15512-29.
108. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1079-106.
109. Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol*. 2014;122:173-89.
110. Smith P. Animal models of multiple sclerosis. *Curr Protoc*. 2021;1(6):e185.
111. Praet J, Guglielmetti C, Berneman Z, Van der Linden A, Ponsaerts P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;47:485-505.

112. Zendedel A, Beyer C, Kipp M. Cuprizone-induced demyelination as a tool to study remyelination and axonal protection. *J Mol Neurosci*. 2013;51(2):567-72.
113. Fern RF, Matute C, Stys PK. White matter injury: Ischemic and nonischemic. *Glia*. 2014;62(11):1780-9.
114. Humpel C. Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience*. 2015;305:86-98.
115. Gomes BAQ, Silva JPB, Romeiro CFR, Dos Santos SM, Rodrigues CA, Gonçalves PR, et al. Neuroprotective mechanisms of resveratrol in Alzheimer's disease: role of SIRT1. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018(1):8152373.
116. Li J, Feng L, Xing Y, Wang Y, Du L, Xu C, et al. Radioprotective and antioxidant effect of resveratrol in hippocampus by activating Sirt1. *Int J Mol Sci*. 2014;15(4):5928-39.
117. Tellone E, Galtieri A, Russo A, Giardina B, Ficarra S. Resveratrol: a focus on several neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015(1):392169.
118. Rosa PM, Martins LAM, Souza DO, Quincozes-Santos A. Glioprotective effect of resveratrol: An emerging therapeutic role for oligodendroglial cells. *Mol Neurobiol*. 2018;55(4):2967-78.
119. Zou X, Xu H, Qian W. The role and current research status of resveratrol in the treatment of osteoarthritis and its mechanisms: a narrative review. *Drug Metab Rev*. 2024;56(4):399-412.
120. Zhang F, Liu J, Shi J-S. Anti-inflammatory activities of resveratrol in the brain: role of resveratrol in microglial activation. *Eur J Pharmacol*. 2010;636(1-3):1-7.
121. El-Sayed SA, Fouad GI, Rizk MZ, Beherei HH, Mabrouk M. Comparative neuroprotective potential of nanoformulated and free resveratrol against cuprizone-induced demyelination in rats. *Mol Neurobiol*. 2025;62(3):2710-25.
122. Villar-Delfino PH, Santos RP, Christo PP, Nogueira-Machado JA, Volpe CMO. Antioxidant effects of resveratrol in granulocytes from multiple sclerosis patients. *Explor Neurosci*. 2024;3(5):362-74.

123. Yu L, Wang S, Kogure Y, Yamamoto S, Noguchi K, Dai Y. Modulation of TRP channels by resveratrol and other stilbenoids. *Mol Pain*. 2013;9:1744-8069-9-3.
124. Nalli M, Ortar G, Moriello AS, Morera E, Di Marzo V, De Petrocellis L. TRPA1 channels as targets for resveratrol and related stilbenoids. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;26(3):899-902.
125. Ghazavi H, Shirzad S, Forouzanfar F, Negah SS, Rad MR, Vafaei F. The role of resveratrol as a natural modulator in glia activation in experimental models of stroke. *Avicenna J Phytomed*. 2020;10(6):557.
126. Schlotterose L, Cossais F, Lucius R, Hattermann K. Breaking the circulus vitiosus of neuroinflammation: Resveratrol attenuates the human glial cell response to cytokines. *Biomed Pharmacother*. 2023;163:114814.
127. Simard JM, Woo SK, Gerzanich V. Transient receptor potential melastatin 4 and cell death. *Pflugers Arch*. 2012;464(6):573-82.
128. Shen J-D, Zhang Y-W, Wang B-Y, Bai L, Lu S-F, Zhu L-L, et al. Effects of resveratrol on the levels of ATP, 5-HT and GAP-43 in the hippocampus of mice exposed to chronic unpredictable mild stress. *Neurosci Lett*. 2020;735:135232.
129. Zhang L-N, Hao L, Wang H-Y, Su H-N, Sun Y-J, Yang X-Y, et al. Neuroprotective effect of resveratrol against glutamate-induced excitotoxicity. *Adv Clin Exp Med*. 2015;24(1):161-5.
130. Zhang H, Zhang X, Chai Y, Wang Y, Zhang J, Chen X. Astrocyte-mediated inflammatory responses in traumatic brain injury: mechanisms and potential interventions. *Front Immunol*. 2025;16:1584577.
131. Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*. 1976;260(5554):799-802.
132. 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. *Pflugers Arch*. 1981;391(2):85-100.
133. Hill CL, Stephens GJ. An introduction to patch clamp recording. *Patch clamp electrophysiology: Methods and protocols*. 2020:1-19.

134. Kodirov SA. Whole-cell patch-clamp recording and parameters. *Biophys Rev.* 2023;15(2):257-88.
135. Nazıroğlu M, Lückhoff A. Effects of antioxidants on calcium influx through TRPM2 channels in transfected cells activated by hydrogen peroxide. *J Neurol Sci.* 2008;270(1-2):152-8.
136. Kyrozis A, Reichling DB. Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. *J Neurosci Methods.* 1995;57(1):27-35.
137. Hess S, Wratil H, Kloppenburg P. Perforated patch clamp recordings in ex vivo brain slices from adult mice. *Bio Protoc.* 2023;13(16).
138. Ghovanloo M-R, Dib-Hajj SD, Waxman SG. The evolution of patch-clamp electrophysiology: robotic, multiplex, and dynamic. *Mol Pharmacol.* 2025;107(1):100001.
139. Jin L, Ying Z, Xueying P, Jian W, Guofeng Y, Jing Z, et al. A brief interpretation of AVMA guidelines on euthanasia of animals: 2020 edition. *Lab Anim Comp Med.* 2021;41(3):195.
140. Agathou S, Káradóttir RT. Whole-cell patch clamp recordings from oligodendrocyte lineage cells in brain slices. *Oligodendrocytes: Methods and Protocols: Springer;* 2019. p. 141-68.
141. Spitzer SO, Sitnikov S, Kamen Y, Evans KA, Kronenberg-Versteeg D, Dietmann S, et al. Oligodendrocyte progenitor cells become regionally diverse and heterogeneous with age. *Neuron.* 2019;101(3):459-71. e5.
142. Zamin LL, Dillenburg-Pilla P, Argenta-Comiran R, Horn AP, Simão F, Nassif M, et al. Protective effect of resveratrol against oxygen–glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: involvement of PI3-K pathway. *Neurobiol Dis.* 2006;24(1):170-82.
143. Huang T, Gao D, Jiang X, Hu S, Zhang L, Fei Z. Resveratrol inhibits oxygen-glucose deprivation-induced MMP-3 expression and cell apoptosis in primary cortical cells via the NF- κ B pathway. *Mol Med Rep.* 2014;10(2):1065-71.
144. Salter MG, Fern R. NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature.* 2005;438(7071):1167-71.

145. Bal R, Erdogan S, Theophilidis G, Baydas G, Naziroglu M. Assessing the effects of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the cholinergic synapses of the stellate cells of the mouse cochlear nucleus using whole-cell patch-clamp recording. *Neurotoxicology*. 2010;31(1):113-20.
146. Sakmann B. Single-channel recording: Springer Science & Business Media; 2013.
147. Auzmendi JA, Smoler M, Moffatt L. Dynamics of T-junction solution switching aimed at patch clamp experiments. *PLoS One*. 2015;10(7):e0133187.
148. Lukacs P, Pesti K, Földi MC, Zboray K, Toth AV, Papp G, et al. An advanced automated patch clamp protocol design to investigate drug—ion channel binding dynamics. *Front Pharmacol*. 2021;12:738260.
149. Olsen ML, Sontheimer H. Functional implications for Kir4. 1 channels in glial biology: from K⁺ buffering to cell differentiation. *J Neurochem*. 2008;107(3):589-601.
150. Seifert G, Hüttmann K, Binder DK, Hartmann C, Wyczynski A, Neusch C, et al. Analysis of astroglial K⁺ channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the Kir4. 1 subunit. *J Neurosci*. 2009;29(23):7474-88.
151. Marmolejo-Murillo LG, Aréchiga-Figueroa IA, Moreno-Galindo EG, Ferrer T, Zamora-Cárdenas R, Navarro-Polanco RA, et al. Kir4. 1/Kir5. 1 channels possess strong intrinsic inward rectification determined by a voltage-dependent K⁺-flux gating mechanism. *J Gen Physiol*. 2021;153(5):e201912540.
152. Hille B. Ionic channels of excitable membranes, Sinauer Assoc. Inc, Sunderland, MA. 2001.
153. Goldman DE. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J Gen Physiol*. 1943;27(1):37-60.
154. Hodgkin AL, Katz B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol*. 1949;108(1):37.
155. Schröder W, Seifert G, Hüttmann K, Hinterkeuser S, Steinhäuser C. AMPA receptor-mediated modulation of inward rectifier K⁺ channels in astrocytes of mouse hippocampus. *Mol Cell Neurosci*. 2002;19(3):447-58.

156. Olsen M, Higashimori H, Campbell S, Hablitz J, Sontheimer H. Functional expression of Kir4. 1 channels in spinal cord astrocytes. *Glia*. 2006;53(5):516-28.
157. Papanikolaou M, Butt AM, Lewis A. A critical role for the inward rectifying potassium channel Kir7. 1 in oligodendrocytes of the mouse optic nerve. *Brain Struct Funct*. 2020;225(3):925-34.
158. Hong X, Jian Y, Ding S, Zhou J, Zheng X, Zhang H, et al. Kir4. 1 channel activation in NG2 glia contributes to remyelination in ischemic stroke. *EBioMedicine*. 2023;87.
159. Guinamard R, Hof T, Del Negro C. The TRPM 4 channel inhibitor 9-phenanthrol. *Br J Pharmacol*. 2014;171(7):1600-13.
160. Simard JM, Tarasov KV, Gerzanich V. Non-selective cation channels, transient receptor potential channels and ischemic stroke. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2007;1772(8):947-57.
161. Wang J, Takahashi K, Piao H, Qu P, Naruse K. 9-Phenanthrol, a TRPM4 inhibitor, protects isolated rat hearts from ischemia–reperfusion injury. *PLoS One*. 2013;8(7):e70587.
162. Owjifard M, Rahimian Z, Karimi F, Borhani-Haghighi A, Mallahzadeh A. A comprehensive review on the neuroprotective potential of resveratrol in ischemic stroke. *Heliyon*. 2024;10(14).
163. Kalsi AS, Greenwood K, Wilkin G, Butt AM. Kir4. 1 expression by astrocytes and oligodendrocytes in CNS white matter: a developmental study in the rat optic nerve. *J Anat*. 2004;204(6):475-85.
164. Brasko C, Hawkins V, De La Rocha IC, Butt AM. Expression of Kir4. 1 and Kir5. 1 inwardly rectifying potassium channels in oligodendrocytes, the myelinating cells of the CNS. *Brain Struct Funct*. 2017;222(1):41-59.
165. Khawaja RR, Agarwal A, Fukaya M, Jeong H-K, Gross S, Gonzalez-Fernandez E, et al. GluA2 overexpression in oligodendrocyte progenitors promotes postinjury oligodendrocyte regeneration. *Cell Rep*. 2021;35(7).
166. Mrejeru A, Wei A, Ramirez JM. Calcium-activated non-selective cation currents are involved in generation of tonic and bursting activity in dopamine neurons of the substantia nigra pars compacta. *J Physiol*. 2011;589(10):2497-514.

167. Ye L, Daguano Gastaldi V, Curto Y, Wildenburg A-F, Yu X, Hindermann M, et al. Transcriptional dynamics of the oligodendrocyte lineage and its regulation by the brain erythropoietin system. *Nat Commun.* 2025;16(1):8291.
168. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
169. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350-4.
170. Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012;4(9):429.
171. Kamen Y, Evans KA, Ng YT, Dietmann S, Káradóttir RT. Oligodendrocyte precursor cell AMPA receptors differ with age and brain region while kainate receptors remain stable. *iScience.* 2025;28(10).
172. Chen Z-H, Han Y-Y, Shang Y-J, Zhuang S-Y, Huang J-N, Wu B-Y, et al. Cordycepin ameliorates synaptic dysfunction and dendrite morphology damage of hippocampal CA1 via A1R in cerebral ischemia. *Front Cell Neurosci.* 2021;15:783478.
173. Escobar I, Xu J, Jackson CW, Stegelmann SD, Fagerli EA, Dave KR, et al. Resveratrol preconditioning protects against ischemia-induced synaptic dysfunction and cofilin hyperactivation in the mouse hippocampal slice. *Neurotherapeutics.* 2023;20(4):1177-97.
174. Field A. *Discovering statistics using IBM SPSS statistics*: Sage publications limited; 2024.
175. Ghasemi A, Zahediasl S. Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. *Int J Endocrinol Metab.* 2012;10(2):486.
176. Kim H-Y. Statistical notes for clinical researchers: assessing normal distribution (2) using skewness and kurtosis. *Restor Dent Endod.* 2013;38(1):52.
177. Vogler M, Braun Y, Smith VM, Westhoff M-A, Pereira RS, Pieper NM, et al. The BCL2 family: from apoptosis mechanisms to new advances in targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2025;10(1):91.

178. Káradóttir R, Hamilton NB, Bakiri Y, Attwell D. Spiking and nonspiking classes of oligodendrocyte precursor glia in CNS white matter. *Nat Neurosci.* 2008;11(4):450-6.
179. Marrero H, Astion ML, Coles JA, Orkand RK. Facilitation of voltage-gated ion channels in frog neuroglia by nerve impulses. *Nature.* 1989;339(6223):378-80.
180. Liu M, Jin S, Fu X, Xie C, Chen Y, Chang L, et al. Activation of Kir4.1 Channels by 2-D08 Promotes Myelin Repair in Multiple Sclerosis. *Adv Sci.* 2025;12(34):e02032.
181. Nicot AB, Harb J, Garcia A, Guillot F, Mai H-L, Mathé CV, et al. Aglycosylated extracellular loop of inwardly rectifying potassium channel 4.1 (KCNJ10) provides a target for autoimmune neuroinflammation. *Brain Commun.* 2023;5(2):fcad044.
182. Launay P, Fleig A, Perraud A-L, Scharenberg AM, Penner R, Kinet J-P. TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell.* 2002;109(3):397-407.
183. Kapell H, Fazio L, Dyckow J, Schwarz S, Cruz-Herranz A, Mayer C, et al. Neuron-oligodendrocyte potassium shuttling at nodes of Ranvier protects against inflammatory demyelination. *J Clin Invest.* 2023;133(7).
184. Peric M, Nikolic L, Andjus PR, Bataveljic D. Dysfunction of oligodendrocyte inwardly rectifying potassium channel in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci.* 2021;54(7):6339-54.
185. Grand T, Demion M, Norez C, Mettey Y, Launay P, Becq F, et al. 9-phenanthrol inhibits human TRPM4 but not TRPM5 cationic channels. *Br J Pharmacol.* 2008;153(8):1697-705.
186. Burris SK, Wang Q, Bulley S, Neeb ZP, Jaggar JH. 9-Phenanthrol inhibits recombinant and arterial myocyte TMEM 16 A channels. *Br J Pharmacol.* 2015;172(10):2459-68.
187. Kaddatz H, Wenzel L, Pril E, Meien S, Harz V, Burkert L, et al. Loss of oligodendrocyte transcription factor 2 protein expression in metabolically stressed oligodendrocytes. *Acta Neuropathol.* 2026;151(1):31.

188. Chapman TW, Kamen Y, Piedra ET, Hill RA. Oligodendrocyte maturation alters the cell death mechanisms that cause demyelination. *J Neurosci*. 2024;44(13).
189. Song F, Hong X, Cao J, Ma G, Han Y, Cepeda C, et al. Kir4. 1 channels in NG2-glia play a role in development, potassium signaling, and ischemia-related myelin loss. *Commun Biol*. 2018;1(1):80.
190. Wang W-H, Lin D-H. Inwardly rectifying K⁺ channels 4.1 and 5.1 (Kir4. 1/Kir5. 1) in the renal distal nephron. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2022.
191. Tang X, Hang D, Sand A, Kofuji P. Variable loss of Kir4. 1 channel function in SeSAME syndrome mutations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;399(4):537-41.
192. Şimşek G, Vaughan-Jones RD, Swietach P, Kandilci HB. Recovery from hypoxia-induced internalization of cardiac Na⁺/H⁺ exchanger 1 requires an adequate intracellular store of antioxidants. *J Cell Physiol*. 2019;234(4):4681-94.
193. Wang N, Zhou L, Shao CY, Wang XT, Zhang N, Ma J, et al. Potassium channel Kir4. 1 regulates oligodendrocyte differentiation via intracellular pH regulation. *Glia*. 2022;70(11):2093-107.
194. Loureiro JA, Andrade S, Duarte A, Neves AR, Queiroz JF, Nunes C, et al. Resveratrol and grape extract-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules*. 2017;22(2):277.

EKLER

Ek 1. Özgeçmiş



Ek 2. Etik Kurulu Onayı-1



Ek 3. Etik Kurulu Onayı-2

