



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



HL-1 HÜCRELERİNDE DEMİR FAZLALIĞININ T-TİPİ Ca^{+2} KANAL AKIMLARINA AKUT VE KRONİK ETKİLERİ

Şeyma ÖZBEK

GIDA METABOLİZMA VE KLİNİK BESLENME ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. H. Burak KANDİLCİ

ANKARA

2021

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HL-1 HÜCRELERİNDE DEMİR FAZLALIĞININ T-TİPİ
Ca²⁺ KANAL AKIMLARINA AKUT VE KRONİK
ETKİLERİ**

Şeyma ÖZBEK

**GIDA METABOLİZMA VE KLİNİK BESLENME ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. H. Burak KANDİLCİ

Bu çalışma TÜBİTAK 219S111 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2021

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum 'HL-1 hücrelerinde demir fazlalığının T-tipi Ca^{+2} kanal akımlarına akut ve kronik etkileri' başlıklı tez, bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Şeyma ÖZBEK

19.05.2021

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Gıda Metabolizma ve Klinik Beslenme Anabilim Dalında
Şeyma ÖZBEK tarafından hazırlanan
“HL-1 Hücrelerinde Demir Fazlalığının T-tipi Ca^{+2} Kanal Akımlarına Akut ve Kronik Etkileri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15.06.2021

Prof. Dr. Nuray YAZIHAN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. H. Burak KANDİLCİ
Ankara Üniversitesi
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Merve DENİZALTI
Hacettepe Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Demir Yüklenmesine Bağlı Hastalıkların Etiyolojisi	1
1.2. Vücutta Demir Absorbsiyonu, Dağılımı ve Rolü	2
1.3. Demir Yüklenmesi Kardiyomiyopatisi	3
1.4. Voltaj Uyarısı ile Aktive Olan Ca^{+2} Kanallarının Yapısı ve Rolü	4
1.5. Demir Yüklenmesinin Kardiyomiyosit L- ve T- tipi Ca^{+2} Kanalları Üzerine Etkisi	6
1.6. Çalışmanın Amacı	8
2. GEREÇ ve YÖNTEM	9
2.1. HL-1 Hücre Kültürü	9
2.2. Hücrelere Demir Girişinin Ölçülmesi	9
2.3. Kullanılan Solüsyonlar	10
2.4. HL-1 Hücrelerinden mRNA Ölçümü	11
2.4.1. RNA İzolasyonu	11
2.4.2. Primer Tasarımı	11
2.4.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	12
2.4.4. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR)	13
2.5. İmmunofloresans	13
2.6. Elektrofizyoloji	14
2.7. İstatistik	14
3. BULGULAR	15
3.1. HL-1 Hücrelerinde Voltaj ile Aktive Olan Ca^{+2} Kanallarının Moleküler Karakterizasyonu	15
3.2. HL-1 Hücrelerinde Ca^{+2} Akımlarının Voltaj Kıskaçı Yöntemi ile Ölçülmesi	16
3.3. HL-1 Hücrelerine Demir Yüklenmesi ve Hücre Canlılığına Etkisi	18
3.4. HL-1 Hücrelerinde Uzun Süreli Demir İnkübasyonunun Voltaj Bağımlı Ca^{+2} Kanal Ekspresyonlarına Etkisi	20
3.5. HL-1 Hücrelerinde Akut ve Uzun Süreli Demir İnkübasyonunun Voltaj Bağımlı Ca^{+2} Kanal Akımlarına Etkisi	21
3.5.1. Akut Demir Uygulamasının Voltaj Bağımlı T-tipi Ca^{+2} Kanal Akımlarına Etkisi	21
3.5.2. Uzun Süreli Askorbik Asit İnkübasyonunun Voltaj Bağımlı T-tipi Ca^{+2} Kanal Akımlarına Etkisi	22

3.5.3. Farklı Süre ve Konsantrasyonlardaki Demir İnkübasyonunun Voltaj Bağımlı T-tipi Ca^{+2} Kanal Akımlarına Etkisi	23
3.6 Farklı Süre ve Konsantrasyonlardaki Demir İnkübasyonunun Voltaj Bağımlı K^{+} Kanal Akımlarına Etkisi	24
4. TARTIŞMA	26
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	31
ÖZET	32
SUMMARY	33
KAYNAKLAR	34
ÖZGEÇMİŞ	37



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının kurgulanmasında ve gerçekleştirilmesinde her aşamada bilgi ve birikimi ile beni yönlendiren ve yol gösteren saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. H. Burak KANDİLCİ'ye içtenlikle teşekkür ederim. Çalışmaların yürütülmesinde verdiği değerli katkıları için Disiplinlerarası Gıda, Metabolizma ve Klinik Beslenme Anabilim Dalı Bölüm Başkanı saygıdeğer Prof. Dr. Nuray YAZIHAN'a ve tüm bölüm hocalarıma teşekkür ederim.

Biyofizik Anabilim Dalı Arş. Gör. Gül ŞİMŞEK'e tez deneylerimdeki desteğinden dolayı teşekkür ederim. Ayrıca, bu süreçte her zaman yanımda olan aileme ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
bp	Baz çifti
β	Beta
Ca^{+2}	Kalsiyum iyonu
CaCl_2	Kalsiyum klorür
Ca_v	Voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalı
cAMP	Siklik adenosin monofosfat
cDNA	Komplementer DNA
cGMP	Siklik guanosin monofosfat
Cs	Sezyum elementi
CsCl	Sezyum klorür
Ct	Eşik döngü
$\Delta\Delta\text{Ct}$	Delta delta Ct
δ	Delta
DcytB	Duodenal sitokrom b
DIC	Diferansiyel interferans kontrastı
dk	Dakika
DMT1	Divalan metal transporter 1
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EGTA	Etilengilokol-bis(β -aminoetil eter)- <i>N, N, N', N'</i> -tetraasetik asit
FBS	Fetal sığır serumu
Fe	Total demir
Fe^{+2}	Ferröz demir

Fe ⁺³	Ferrik demir
FeCl ₃	Demir klorür
γ	Gama
GI	Gastrointestinal
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCP1	Hem taşıyıcı protein 1
Hepes	4-(2-hidroksietil)-1 piperazinethanosulfonik asit
HO·	Hidroksil radikali
I-V	Akım voltaj ilişkisi
i.p.	Periton içi uygulama
invitro	Hücre dışı ortam
K ⁺	Potasyum iyonu
KCl	Potasyum klorür
L-tipi	Uzun süre aktive olabilen (<i>Long-lasting</i>) Ca ⁺² kanalı
LTCC	L-tipi Ca ⁺² kanalı
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
MΩ	Mega ohm
μM	Mikromolar
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ms	Milisaniye
mRNA	Mesajcı RNA
mV	Milivolt

Na^+	Sodyum iyonu
NaATP	Sodyum adenozin trifosfat
NCX	Sodyum-kalsiyum değiş-tokuşçusu
NaGTP	Sodyum guanozin trifosfat
Na_2HPO_4	Disodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaH_2PO_4	Sodyum dihidrojen fosfat
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NTB	Transferrine bağlı olmayan demir
OD	Optik yoğunluk
OH^-	Hidroksil iyonu
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pF	Piko Farad
RNA	Ribo nükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Gerçek zamanlı PCR
RyR	Ryanodin kanalları
s	Saniye
SEM	Ortalamanın standart hatası
SERCA	SR Ca^{+2} ATPaz pompası
SR	Sarkoplazmik retikulum
τ	Zaman sabiti

T-tipi	Geçici açılan (<i>Transient</i>) Ca^{+2} kanalı
TB	Transferrine bağlı olan demir
TEA-Cl	Tetra etil amonyum klorür
TTCC	T-tipi Ca^{+2} kanalı
VGCC	Voltaj uyarısı ile aktive olan Ca^{+2} kanalları



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Vücutta demir absorpsiyonu ve dokulara girişi.	3
Şekil 1.2. Fenton kimyasal reaksiyonu.	4
Şekil 1.3. Demir yüklenmesinin kardiyak kalsiyum regülasyonunda rol oynayan proteinler üzerindeki olası etkileri.	8
Şekil 2.1. Demir girişi miktar ölçümü için 96-lık kuyularda oluşturulan standart eğri analizi.	11
Şekil 2.2. Deneylerde kullanılan primer verimlerinin analizi.	14
Şekil 3.1. HL-1 hücrelerinde Ca^{+2} kanallarının gen ekspresyonlarının analizi.	17
Şekil 3.2. HL-1 hücrelerinden tam hücre yama kısıracı tekniği ile alınan içe yönelik katyon akım kayıtlarının akım voltaj ilişkisi (I-V) ilişkisi.	19
Şekil 3.3. HL-1 hücrelerinde farklı konsantrasyon ve sürelerde demir inkübasyonlarının hücre içi demir girişine ve hücre proliferasyonuna etkisi.	20
Şekil 3.4. HL-1 hücrelerinin 48 saat 600 μM demir ile inkübasyonunun voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarının gen ekspresyonlarına mRNA düzeyinde etkisi (n:6).	23
Şekil 3.5. İki farklı hücreden iki farklı başlangıç potansiyelinde (A, -120 mV ve B, -70 mV) standart hücre dışı (HEPES) ve pipet solüsyonunda akut demir (150 μM) uygulaması öncesi (kontrol, siyah) ve 3 dk sonrasında (akut demir, gri) art arda alınan içe ve dışa yönelik voltaj bağımlı kanal akımlarına ait I-V eğrileri.	24
Şekil 3.6. 48 saat askorbik asit (1 mM) inkübasyonunun içe yönelik T-tipi Ca^{+2} akımlarına etkisi.	25
Şekil 3.7. 24 ve 48 saat demir inkübasyonunun (300-600 μM) içe yönelik T-tipi Ca^{+2} akımlarına etkisi.	26
Şekil 3.8. A) HL-1 hücrelerinde dışa yönelik katyon akımlarına sırasıyla pipet ve banyo solüsyonlarına Cs ve TEA eklenmesinin etkisi (n:4-19). B) 24 veya 48 saat demir inkübasyonunun (600 μM) ve askorbik asit'in (1 mM) dışa yönelik K^{+} akımlarına etkisi (n:3-10).	27

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Deneylerde kullanılan primerlerin sekans, erime sıcaklıkları ve çoğalttıkları baz çifti uzunlukları 12

Çizelge 3.1. Voltaj bağımlı kanalların mRNA ekspresyonlarında kullanılan primer çiftlerinin amplifikasyon verimleri. 22



1. GİRİŞ

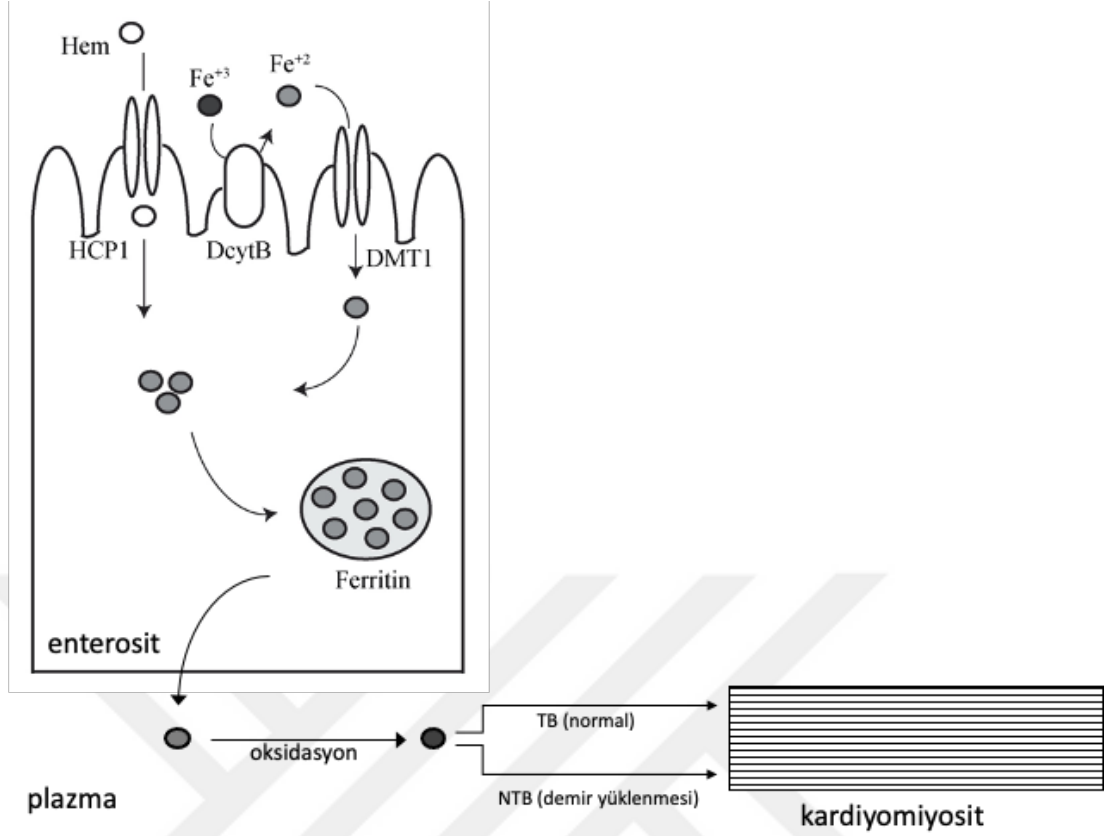
1.1. Vücutta Demir Yüklenmesine Bağlı Hastalıkların Etiyolojisi

Vücutta demir yüklenmesi durumunda demirin öncelikle depolardaki seviyesi çok artar, sonrasında da demir organlarda birikir. En çok demir birikimi gözlenen organlar karaciğer, kalp ve endokrin bezlerdir. Demir birikimine bağlı hasar gözlenen bu organlara özgü semptomlar ile hastalık durumu ortaya çıkar (Powell ve ark., 2000). Vücutta primer demir yüklenmesi (hemokromatozis) çoğu zaman demir düzenleyici genlerdeki bozukluklar ile ilişkilidir. Genel olarak gastrointestinal (GI) demir absorpsiyonunda artış ile karakterize hepsidin seviyesinde azalma ön plandadır (Pietrangelo, 2004). Vücudun aşırı miktarda demir ile karşılaştığı durumlarda sekonder demir yüklenmesi görülür. Bu durum sıklıkla β -talasemi hastalarında görüldüğü gibi hemoglobin bozukluklarına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu hastalıkta, hemoglobinin β -globulin zinciri yapımındaki anormallik sonucunda gelişen ağır hemolitik anemi ile seyreden bir hastalık tablosu ortaya çıkar (Galanello ve Origa, 2010; Olivieri, 1999). Ağır hemolitik anemi yüzünden hastalar sıklıkla kan tranfüzyonuna ihtiyaç duyarlar. Diğer taraftan, doku oksijenasyonundaki yetersizliğe bağlı olarak gelişen hipoksi hepsidin miktarını azalttığı için, GI demir absorpsiyonunda da artış görülür (Hershko, 2010). Sekonder demir yüklenmesi kan transfüzyonlarında, hemolizde veya diyetle demirin aşırı miktarlarda alınması ile ortaya çıkmaktadır (Radford-Smith ve ark., 2018). Vücutta demir aşırı yüklenmesinde fonksiyonel değişiklikler oluşur. Karaciğerde demir birikmesinin kronik karaciğer hastalığına, siroza ve karaciğer karsinomuna yol açabildiği bilinmektedir. Pankreas hasarında kan şekeri yükselir ve demir birikime bağlı olarak özel tipte bir diyabet (bronz) oluşur. Nörolojik hasar durumunda ise, demir yüklenmesinin Alzheimer olasılığını artırabildiği düşünülmektedir (McLaren ve ark., 1983).

1.2. Vücutta Demir Absorbsiyonu, Dağılımı ve Rolü

Demir, insan vücudunda ferröz (Fe^{+2}) ve ferrik (Fe^{+3}) formlarda yaygın olarak bulunan bir elementtir (Pantopoulos ve ark., 2012; Siri-Angkul ve ark., 2018). Demir, hem molekülüne bağlı (hem-demir) ya da bağlı olmayan (hem-olmayan demir) iki farklı form şeklinde vücuda diyet ile alınır. Hem-demir et, balık ve kümes hayvanlarından hemoglobin ve miyoglobin ile birlikte, hem-olmayan demir ise bakliyat, tahıl ürünleri ve yeşil yapraklı sebzelerden alınır (Young ve ark., 2018). Hem-demir ferrik formda, hem-olmayan demir ise ferröz formda bağırsaktaki enterosit hücreleri tarafından absorblanabilir. Hem-demir, hem taşıyıcı protein 1 (HCP1) aracılığıyla absorblanır (Gujja ve ark., 2010). Hem-olmayan demir ise transferrin aracılı veya aracısız olarak hücre içine alınabilmektedir (Lawen ve Lane, 2013). Transferrine bağlı olan demir (TB), transferrin reseptörü 1'e bağlandıktan sonra klatriin aracılı endositoz yoluyla hücre içine alınır (Che ve ark., 2020). Transferrine bağlı olmayan demir (NTB) girişinin hücre yüzeyindeki duodenal sitokrom b (DcytB) gibi ferriredüktazlar veya askorbat gibi hücre içi redüktazlar aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. NTB'nin bu enzimler tarafından indirgedikten sonra divalanan metal transporter 1 (DMT1) ya da çinko transmembran transporter aracılı hücre içine alındığı öne sürülmektedir (Gujja ve ark., 2010; Lane ve ark., 2015; Sheftel ve Lill, 2009; Valerio, 2007). Ayrıca, hücre membranında bulunan L- ve T-tipi Ca^{+2} kanallarının transferrin-bağlı olmayan demir için önemli giriş yolları olduklarını gösterilmiştir (Chen ve ark., 2014; Kumfu ve ark., 2012; Kumfu ve ark., 2011; Oudit ve ark., 2003; Oudit ve ark., 2006).

Vücuttaki demirin çoğunluğu kanda hemoglobin yapısında oksijen taşınması ve depolanmasında görev alır. Hücrelerde ise mitokondrideki elektron transportundan sorumlu proteinlerin ve makromoleküllerin yapısında bulunur (Chen ve ark., 2014). Hücre içi demir homeostazı ferritin gibi çeşitli demir bağlayan düzenleyici proteinler ile kontrol altındadır (Abbaspour ve ark., 2014; Kremastinos ve Farmakis, 2011). Fizyolojik koşullarda dolaşımdaki demirin neredeyse tümü TB olarak taşınır. Kanda demir konsantrasyonu arttığında ise transferrin doygunluğa ulaşır ve dokularda NTB şeklinde birikmeye başlar (Hentze ve ark., 2010) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Vücutta demir absorpsiyonu ve dokulara girişi. Bağırsak enterosit hücrelerinde hem-demir, hem taşıyıcı protein (HCP1) aracılığı ile hücre içine alınır. Hem-olmayan demir önce duodenal sitokrom b (DcytB) aracılığı ile indirgenir ve divalent metal transportörü (DMT1) ile hücre içine alınır. Hücre içinde demir çoğunlukla ferritin proteinine bağlı bulunur. Dolaşıma salıverilen demir ferröz formda çoğunlukla transferine bağlı (TB) olarak diğer dokular tarafından absorblanır. Demir yüklenmesinde transferine bağlı olmayan (NTB) formda dokularda birikmeye başlar. (Gujja ve ark., 2010'dan adapte edilmiştir).

1.3. Demir Yüklenmesi Kardiyomiyopatisi

Vücutta fazla demir kalp dokusunda birikerek demir yüklenmesine bağlı kardiyomiyopati oluşturur (Khamsekaew ve ark., 2016; Rose ve ark., 2011; Tsushima ve ark., 1999). Kalpte demir birikimi serumda artan demir miktarına bağlı kademeli olarak gelişen bir durumdur. Normal demir homeostazının olduğu koşullarda kardiyak demir, transferrine bağlı hücre içine alım mekanizmaları tarafından kontrol edilir. Demir yüklemesine bağlı transferrin doygunluğa ulaştığında dolaşımda transferrine bağlı olmayan demir miktarı artmakta ve demirin ferröz formda L-tipi Ca⁺² kanalları (LTCC) ve endozom aracılığı ile kardiyomiyosit içine girdiği düşünülmektedir

(Tsushima ve ark., 1999; Wood, 2008). Hücre içine giren demir ferritine bağlandıktan sonra lizozomda yıkılmak ve uzun süre depo edilmek üzere transport edilmektedir (Wood, 2008). Patolojik demir birikiminin ilk olarak kalpte epikardiyumda başladığı ve sonrasında miyokard ve endokarda yayıldığı düşünülmektedir. Böylece kalbin sistolik fonksiyonunun hastalığın ileri aşamalarına kadar korunduğu öne sürülmüştür (Liu ve Olivieri, 1994). Kardiyomiyositin antioksidan kapasitesi aşıldığında demir Fenton reaksiyonu aracılı hidroksil radikali oluşturmaya başlar (Şekil 1.2). Bu radikal son derece reaktif olduğundan başlıca lipid peroksidasyonuna yol açarak hücrenin membran bütünlüğünde hasara yol açar.



Şekil 1.2. Fenton kimyasal reaksiyonu. Ferröz demir (Fe^{+2}) hücrede endojen hidrojen peroksit (H_2O_2) ile reaksiyona girerek hidroksil radikali ($\text{HO}\cdot$) ve hidroksil iyonu (OH^-) oluşturur. Hidroksil radikali DNA ve diğer biyomoleküllerde hasar oluşturur.

Demir yüklenmesine bağlı kardiyomiyopatisi olan hastalarda sistolik ve diyastolik fonksiyon bozukluğu, elektriksel iletimde yavaşlama ve bradikardi olduğu rapor edilmiştir (Rose ve ark., 2011). Ayrıca, demir yüklenmesinin görüldüğü β -talasemi hastalarında aritmi ve kalp yetmezliği en sık karşılaşılan ölüm nedenlerindendir. Demir fazlalığının kalpte aksiyon potansiyeli morfolojisini etkileyebileceği bildirilmiştir. Farelerde, dört hafta i.p. demir uygulamasından sonra elde edilen sinoatrial düğüm hücrelerinde aksiyon potansiyeli genliğinin ve süresinin azaldığı gözlenmiştir (Rose ve ark., 2011). Benzer şekilde, sıçan neonatal sol ventrikül hücrelerinde *in vitro* şartlarda uzun süreli demir inkübasyonunun (1-3 gün) aksiyon potansiyeli tepe değerini ve süresini azalttığı gösterilmiştir (Kuryshv ve ark., 1999).

1.4. Voltaj Uyarısı ile Aktive Olan Ca^{+2} Kanallarının Yapısı ve Fonksiyonel Rolü

Voltaj uyarısı ile aktive olan Ca^{+2} kanalları (VGCC), voltaj ile aktive olan diğer K^+ ve Na^+ kanallarının dahil olduğu membran iyon kanalı protein ailesinin üyesidir.

VGCC'ler moleküler, farmakolojik, biyofiziksel özellikleri ve doku dağılımlarına göre L-, N-, P-, Q-, R- ve T-tipi olarak sınıflandırılırlar. VGCC'da farklı alt üniteler biraraya gelerek kanal yapısını oluşturur. $\alpha 1$ alt ünitesi kanalın Ca^{+2} seçiciliği, voltaj bağımlı aktivasyonu, Ca^{+2} kanal blokörlerine duyarlılığı gibi özelliklerini belirler. $\alpha 1$ alt ünitesi tek başına fonksiyonel Ca^{+2} kanal aktivitesi için yeterli iken diğer alt üniteler elektrofizyolojik özellikler ve kanal geçirgenliğinde düzenleyici rollere sahiptir. Hücre içinde bulunan β aksesuar alt ünitesi çeşitli kinazlar (cAMP ve cGMP bağımlı kinazlar, protein kinaz C) tarafından fosforillenmeye uygun bölgeler içerir ve bu bölgelerin fosforilasyonu VGCC aktivitesini regüle eder. VGCC'lerin $\alpha 2$ - δ aksesuar alt üniteleri birbirlerine disülfid bağları ile bağlıdır. γ aksesuar alt ünitesinde ise glikolizasyon bölgeleri bulunur (Catterall, 2011; Dolphin, 2018).

Düşük voltajla (daha negatif potansiyellerde) aktive olan ve hızlı inaktivasyon gösteren T (*transient*) -tipi kanallar $\alpha 1$ alt ünite farklarına göre de $\alpha 1G$ (Ca_v 3.1), $\alpha 1H$ (Ca_v 3.2), $\alpha 1I$ (Ca_v 3.3) şeklinde sınıflandırılırlar. Yüksek voltajla aktive (daha pozitif potansiyellerde) olan ve uzun süre açık kalabilen L (*long-lasting*) -tipi kanallar ise $\alpha 1S$ (Ca_v 1.1), $\alpha 1C$ (Ca_v 1.2), $\alpha 1D$ (Ca_v 1.3), $\alpha 1F$ (Ca_v 1.4) farklı $\alpha 1$ alt ünitelerine ayrılmaktadır (Catterall, 2011; Perez-Reyes, 2003; Xia ve ark., 2004). L- tipi kanallarda bulunan Ca_v1 alt ünitesi kasılmanın başlatılması, salgılama ve gen ekspresyonu regülasyonundan sorumludur. N-, P-, Q-, R- tipi kanallarda bulunan Ca_v2 alt ünitesi hızlı sinapslarda sinaptik iletimin başlatılmasında görev almaktadır. T-tipi kanallardaki Ca_v3 alt ünitesi ise kalp, nöron gibi uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyelinin başlatılmasından sorumludur. L- ve T- tipi Ca^{+2} kanallarının alt ünitelerinin izoformlarının eksprese olduğu dokular ve temel fizyolojik özellikleri de birbirlerinden farklıdır. Ca_v 1.1 iskelet kasında bulunur ve kas kasılmasında rol oynar. Ca_v 1.2 kardiyomiyositlerde uyarılma-kasılma çiftleniminde, sinoatriyal düğüm ve atriumda uyarı odağı (*pacemaker*) aktivitesinde önemli rol oynar. Ca_v 1.3 kalp, pankreas ve böbrekte bulunur ve endokrin salgılama ile ilişkilendirilmektedir. Ca_v 1.4 retinal hücrelerde görme fonksiyonuna yardımcı olur. Ca_v 3.1 sinoatriyal düğümde, nöronlarda, düz kas hücrelerinde, böbrek, akciğer gibi birçok dokuda bulunur ve ilgilenilen dokuya bağlı olarak uyarı odağı (*pacemaker*) aktivitesi, nörotransmitter salınımı gibi farklı roller üstlenmektedir. Ca_v 3.2 kardiyak miyositlerde, düz kas

hücrelerinde ve somada eksprese olmaktadır. Ca_v 3.3 ise sinir hücresi gövde dendritlerinde lokalize oldukları ileri sürülmüştür (Catterall ve ark., 2005; Mesirca ve ark., 2015; Ono ve Iijima, 2010). L- ve T-tipi Ca^{+2} kanallarının yapısında aksesuar alt üniteler de (γ , β , $\alpha 2\text{-}\delta$) bulunmaktadır. Kanaldaki aksesuar alt üniteler L- ve T-tipi Ca^{+2} kanallarında ortaktır (Perez-Reyes, 2003).

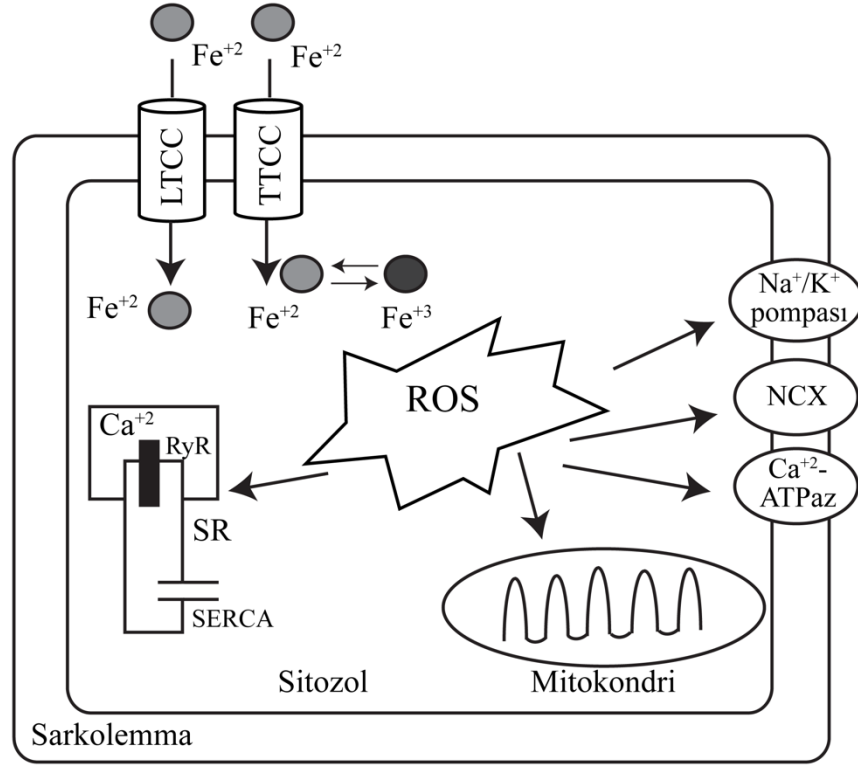
Kardiyomiyositlerde sarkolemmada bulunan VGCC'ler, hücrede aksiyon potansiyeli oluşumu ve Ca^{+2} regülasyonundan sorumlu proteinlerdendir. Kardiyomiyositlerde voltaj ile aktive olan iki ana Ca^{+2} kanal tipi bulunmaktadır. LTCC ventrikülde kardiyak uyarılma-kasılma kenetlenmesinden sorumludur. T-tipi Ca^{+2} kanalları (TTCC) ventrikülden daha çok sinoatrial düğüm, atriumda bulunurlar ve akım yoğunlukları türe göre farklılık gösterir (Ono ve Iijima, 2005; Vassort ve ark., 2006). TTCC akımlarının da kalbin otomatizitesi ve uyarılma-kasılma çiftlenimine anlamlı ölçüde katıldığı düşünülmektedir (Nilius ve ark., 2006; Perez-Reyes, 2003). Örnek olarak, farede T-tipi Ca^{+2} kanalı ($Ca_v3.1$) geninin silinmesi sinoatrial düğümde diyastolik depolarizasyon hızını yavaşlatarak aksiyon potansiyeli süresini uzattığı öne sürülmüştür (Mangoni ve ark., 2006). Özellikle, kalp hipertrofisi gibi patolojilerde TTCC fonksiyonunda artış olduğu bildirilmiştir (Vassort ve ark., 2006). T- ve L- tipi Ca^{+2} kanallarının kapılanma ve geçirgenlik özellikleri birbirlerinden farklıdır. TTCC daha negatif membran potansiyellerinde açılırlar ve bu özellik sinoatriyal düğüm hücrelerinin uyarı odağı (*pacemaker*) potansiyelleri ile örtüşmektedir. Fizyolojik koşullarda I-V ilişkisinde maksimum akım genliğinin $Ca_v1.2$ için 0 mV, $Ca_v1.3$ 'ün -10 mv, $Ca_v3.1$ 'in ise -40 mV civarında olduğu gösterilmiştir (Mesirca ve ark., 2015). LTCC aksine TTCC inaktivasyonu Ca^{+2} bağımlı değildir. TTCC, L-tipine göre daha hızlı inaktive olurlar (Ono ve Iijima, 2010).

1.5. Demir Yüklenmesinin Kardiyomiyosit L- ve T- tipi Ca^{+2} Kanalları ile Diğer Ca^{+2} Proteinleri Üzerine Etkisi

Kardiyomiyositlerde demir yüklenmesinin LTCC üzerine etkisi daha önce araştırılmıştır (Siri-Angkul ve ark., 2018). İzole sol ventrikül hücrelerinde akut olarak

düşük doz (0,5 mM Fe^{+2}) demir süperfüzyonu LTCC artırırken, yüksek doz ($>0,5$ mM Fe^{+2}) bu akımları azaltmıştır (Tsushima ve ark., 1999). Bu sonuçlar, akut demir inkübasyonu etkisinin basitçe Fe^{+2} ile Ca^{+2} arasındaki yarışmaya bağlı olmadığını göstermektedir. Uzun süreli (1 ay) demir yüklemesi yapılan farelerden izole edilen sinoatrial düğüm ve atrium hücrelerinde ise LTCC azaldığı bulunmuştur (Rose ve ark., 2011). Araştırmacılar, bu akımdaki azalmanın Cav1.3 mRNA'sındaki azalmadan kaynaklandığını öne sürmüşlerdir. Ancak, benzer protokol ile demir yüklemesi yapılan farelerden elde edilen ventrikül hücrelerindeki LTCC akımlarında fark gözlenmemiştir (Oudit ve ark., 2003). Bu sonuçlar, demirin voltajla aktive olan Ca^{+2} kanal akımlarında kalp bölgesine özgü etki oluşturduğunu akla getirmektedir. Kalpte, demirin aksiyon potansiyelinden sorumlu voltaj ile aktive olan diğer iyon kanalları üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Kültürdeki sıçan neonatal ventrikül hücrelerinde 72 saat demir inkübasyonunun Na^{+} akımını azalttığı, K^{+} tepe akımını artırdığı ancak diğer potasyum akımlarını etkilemediği bildirilmiştir (Kuryshv ve ark., 1999).

Demir fazlalığının hücrelerde oluşturduğu toksik etkilerin mekanizmasında reaktif oksijen türevlerinin (ROS) rol alabileceği düşünülmektedir. Hücre içine giren fazla miktardaki serbest demirin yukarıda bahsedildiği gibi Fenton reaksiyonu ile ROS oluşumunu arttırdığı ve kalpte Ca^{+2} regülasyonundan sorumlu proteinlerin aktivitesini etkilediği bildirilmiştir (Kaneko ve ark., 1989a; Kaneko ve ark., 1989b; Xu ve ark., 1997). Bu durumun hücre içi Ca^{+2} seviyesini artırarak kasılma disfonksiyonuna yol açtığı düşünülmektedir (Josephson ve ark., 1991). Örnek olarak, Zeitz ve ark. (2002)'nin yaptıkları çalışmada demir aracılı oluşan ROS'un kasılma miyofilament fonksiyonunda ve diastolik Ca^{+2} seviyesinde değişiklikler oluşturduğu ve bu değişikliklerin sodyum-kalsiyum değiş-tokuşçusu (NCX) inhibitörü ile engellendiği bildirilmiştir. Demir aracılı oluşan ROS'un hücre içine NCX aracılı Ca^{+2} girişini artırarak akut diastolik disfonksiyona yol açabileceği öne sürülmüştür (Şekil 1.3). Sonuç olarak, demir yüklenmesinin çeşitli mekanizmalar ile hücre içi Ca^{+2} regülasyonundan sorumlu proteinler ve VGCC'ler üzerine etkileri hücre içi Ca^{+2} düzeyinde artışa yol açmaktadır. Bu koşulların demir yüklenmesi ile gelişen kardiyomiyopatide kasılma disfonksiyonuna yol açtığı düşünülmektedir.



Şekil 1.3. Demir yüklenmesinin kardiyak kalsiyum regülasyonunda rol oynayan proteinler üzerindeki olası etkileri. Ferröz demir L-tipi kalsiyum kanalı (LTCC) ve T-tipi kalsiyum kanalı (TTCC)'ler aracılığı ile hücre içine girer. Demir girişi artışı reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumuna yol açarak hücrede oksidatif stresi artırır. Na⁺/K⁺ pompası, sodyum-kalsiyum değiş-tokuşçusu (NCX), Sarkoplazmik retikulum (SR)'de SR Ca²⁺ ATPaz pompası (SERCA) ve ryanodin kanalları (RyR), sarkolemmal Ca²⁺ ATPaz aktiviteleri etkilenir (Khamsekaew ve ark., 2016'dan uyarlanmıştır).

1.6. Çalışmanın Amacı

Demir yüklenmesi ile oluşan kardiyomiyopatide, kardiyak Ca²⁺ regülasyonunun bozulmasının, sol ventrikül disfonksiyonunun oluşmasına önemli ölçüde katkı sağladığı bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, doğrudan akut ve uzun süreli demir yüklenmesinin fare kardiyak atrium kökenli hücre serisi olan HL-1 hücrelerinde TTCC etkisi araştırıldı. Bu etkilerin ortaya çıkarılması ile kalpte demir fazlalığının indüklediği elektrofizyolojik değişikliklerin mekanizmasında Ca²⁺ iyon kanallarının rolünün aydınlatılması amaçlanmaktadır. Demirin atrial kardiyak iyon kanalları üzerindeki akut ve kronik etkilerinin incelenmesi ile kalpteki aksiyon potansiyeli morfolojisindeki olası değişikliklerin irdelenmesi hedeflenmektedir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

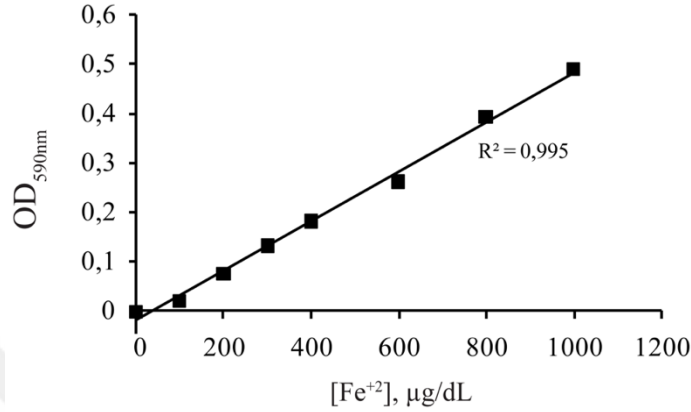
2.1. HL-1 Hücre Kültürü

Fare atrium kökenli HL-1 hücrelerini büyütmek amacıyla, önceden jelatin (%0,02) ve fibronektin (%0,5) ile kaplanan flask ya da 6'lı kuyular kullanıldı. Hücreler, içerisinde 2 mM L-glutamin, 0,1 mM norepinefrin, %10 FBS (fetal sığır serumu), 100 U/ml penisilin ve 100 µM streptomisin bulunan Claycomb besiyeri içerisinde, standart kültür koşullarında (%5 karbondioksit (CO₂), %95 nem ve 37°C) büyütüldü. Biyokimya deneyleri için T-25 flasklara elektrofizyoloji deneyleri için ise 6'lı kuyularda kırık camlara ekilen hücreler % 40-50 yoğunluğa ulaşınca kadar standart hücre besiyerinde inkübe edildi. Demir girişi için deney grupları oluşturulurken hücre besiyeri, norepinefrin ve FBS içermeyen besiyer ile değiştirildi.

2.2. Hücrelere Demir Girişinin Ölçülmesi

HL-1 hücrelerinde demir girişini ölçmek için hücreler T-25'lik flasklara ekildi. Uygun yoğunluğa gelen hücreler besiyeri değiştirilerek 24 ve 48 saat demir ile inkübe edildi. Hücrelere demir yüklemesi için literatürde belirtilen konsantrasyonlarda (300 ve 600 µM) Fe⁺³ (Sigma Aldrich, 157740), 1 mM askorbik asit ile birlikte doğrudan hücre besiyerine eklendi (Chen ve ark., 2014). Daha sonra hücreler iki kez +4°C'de fosfat tamponlu çözelti (PBS) ile yıkandı ve kazınarak tüpe aktarıldı. Hücreler 500 g'de 5 dakika santrifüjlenerek pellet haline getirildi ve +4 °C'deki hipotonik tamponda (5 mM Tris, pH:7,5) çözüldü. Lizatı elde etmek için hücreler önce vortekslendi ve sonrasında 4 kez sonikasyon (15 s sonikasyon 15 s buz üzerinde inkübasyon) uygulandı. Bu işlemten sonra 10 dakika buz üzerinde düzenli aralıklarla ters düz edilerek inkübe edilen örnekler son olarak 10 dakika +4°C 20000g'de santrifüjlendi ve süpernatanttan demir ölçümü yapıldı. Elde edilen lizattan demir içeriğinin ölçülmesi için kolorimetrik kitin talimatları (Bio Assay Systems, DIFE-250) uygulandı. Lizattaki toplam demir konsantrasyonu ile doğrusal orantılı olan renk yoğunluğu,

spektrofotometrede (SpectraMax Plus, MolecularDevices) 590 nm de ölçüldü (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Demir girişi miktar ölçümü için 96-lık kuyularda oluşturulan standart eğri analizi. OD: Optik yoğunluk.

2.3. Kullanılan Solüsyonlar

Demir ölçümü deneylerinde hücrelerin yıkanması için kullanılan fosfat tamponlu solüsyon (PBS); 1,67 g Na₂HPO₄, 0,57 g NaH₂PO₄ ve 8,5 g NaCl (pH:7,4) kullanılarak hazırlandı. Elektrofizyoloji deneylerinde kullanılan standart hücre içi (pipet) solüsyonunda (mM olarak): 125 KCl, 25 HEPES, 3 Na ATP, 5 EGTA, 0,4 Na GTP, 2 MgSO₄ kullanıldı ve pH 7,2 olarak ayarlandı. Banyo solüsyonu ise (mM olarak): 135 NaCl, 20 HEPES, 11 Glukoz, 4,5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂ ile hazırlandı ve pH 7,4 olarak ayarlandı. K⁺ kanal akımlarını inhibe etmek için kullanılan pipet solüsyonu (mM olarak): 125 CsCl, 20 TEA-Cl, 10 EGTA, 5 Na₂ATP, 5 MgCl₂, 10 HEPES, 0,2 NaGTP kullanıldı ve pH 7,3 olarak ayarlandı. Banyo solüsyonu ise (mM olarak): 157 TEA-Cl, 10 HEPES, 5 CaCl₂, 0,5 MgCl₂ ile hazırlandı ve pH 7,4 olarak ayarlandı.

2.4. HL-1 Hücrelerinden mRNA Ölçümü

2.4.1. RNA İzolasyonu

HL-1 hücrelerinden toplam RNA izolasyonu için Trizol kullanıldı. İlk olarak hücrelerin üzerinden besiyer uzaklaştırıldı ve Trizol eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Ardından deney tüpüne alınan hücrelerin üzerine kloroform eklenerek birkaç kez ters düz edilerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu işlemden sonra 12000 g'de 5 dakika +4°C'de santrifüjlendi ve üstteki sıvı kısım alındı. Bu sıvı kısmın üzerine izopropil alkol eklendi ve bir gece boyunca -20 °C'de tutuldu. Ertesi gün bekletilen RNA'lar 12000 g'de 15 dakika +4°C'de santrifüjlendi ve RNA'ların pellet haline gelmesi sağlandı. Pelletin üzerine tuzları uzaklaştırmak amacıyla etanol ilave edilerek tekrar santrifüj yapıldı ve etanol uzaklaştırıldıktan sonra pellet suda çözüldü. Elde edilen RNA miktarı spektrofotometrede (260/280) ölçüldü.

2.4.2. Primer Tasarımı

İlgilenilen genlerin tüm transkriptleri Ensembl veritabanından (<http://www.ensembl.org>) elde edildi. L-tipi (Ca_v 1.1, 1.2, 1.3) ve T-tipi (Ca_v 3.1, 3.2, 3.3) gen ekspresyonları için uygun primerler, primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) programı ile oluşturuldu ve primerlerin özgüllüğü blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) programı ile kontrol edildi (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Deneylerde kullanılan primerlerin sekans, erime sıcaklıkları ve çoğalttıkları baz çifti uzunlukları

Primer adı	Primer sekansı (5' -> 3')	Erime sıcaklığı ((T _m)/°C)	Amplikon
Ca _v 1.1 düz primer	AGCATCGTGGAATGGAAACC	51,78	106
Ca _v 1.1 ters primer	TGTTGTTGTCATCCTCTGGC	51,78	
Ca _v 1.2 düz primer	CAACCTGGAACGAGTGGAGT	53,83	

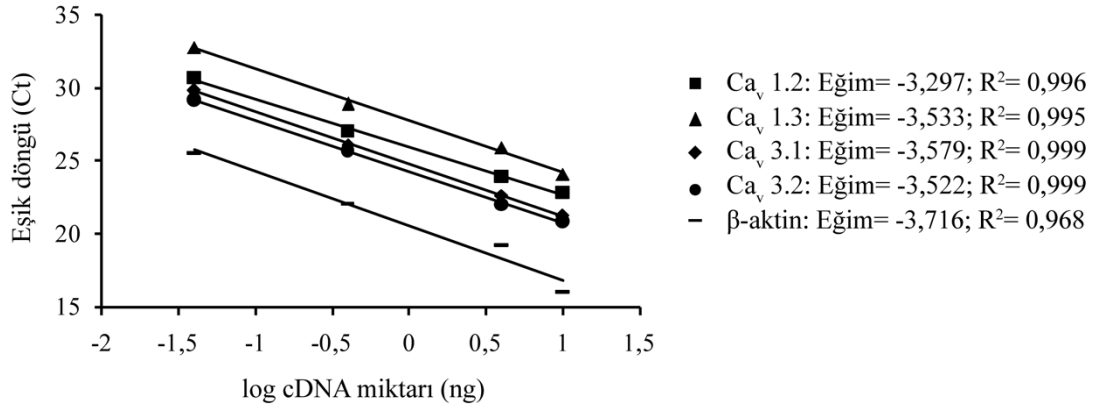
Ca _v 1.2 ters primer	CGTTGGGGTGGAAGAGAAGT	53,83	95
Ca _v 1.3 düz primer	TGAAGTCCATCGCCTCTCTG	53,83	120
Ca _v 1.3 ters primer	TGCTTCGCTTGGTTTGAGTC	51,78	
Ca _v 3.1 düz primer	TTGGCATCGTTGGTGTTCAG	51,78	129
Ca _v 3.1 ters primer	GGCTCTCGTCCTCATTCTCT	53,83	
Ca _v 3.2 düz primer	ACTGGCTGTGACCCCTAATG	53,83	143
Ca _v 3.2 ters primer	GCCGTGAGTCCAAAAGAGTG	53,83	
Ca _v 3.3 düz primer	TCATCTTTGGCATCATCGGC	51,78	131
Ca _v 3.3 ters primer	CTCGTCGTCCCTCTTCTGGTT	53,83	
β-aktin düz primer	GCGTMTTCCCCTCCATCG	63,2	63
β-aktin ters primer	CTGACCCATWCCCACCATC	57,9	

2.4.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

HL-1 hücrelerinden elde edilen toplam RNA'lerden Superscript III First Strand Synthesis System for RT-PCR kiti (Invitrogen,18080-051) ile üretici firmanın önerisi doğrultusunda komplementer DNA (cDNA) sentezlendi. Özetle, 1 µg toplam RNA kit içerisinde bulunan çözelti, enzim, saf su ve spesifik (ters ve düz) primerler ile toplam hacim 20 µl olacak şekilde karıştırıldı. Ardından polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) cihazına (Applied Biosystems, Veriti®) yerleştirilerek sırasıyla 10 dk 25°C, 50 dk 50°C, 5 dk 85°C'de bekletilen total RNA'lerden cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lerden Taq DNA polymerase high fidelity kit (Invitrogen, 11304-011) kullanılarak ilgilenilen genlere ait bölgeler PCR cihazında çoğaltıldı. PCR protokolü ise; 1 dk 94°C ardından 40 döngü 15 s 94°C, 30 s 53°C, 90 s 68°C. Çoğaltılan PCR ürünleri %4 agaroz jelde yürütüldü ve sonrasında görüntülendi.

2.4.4. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR)

Elde edilen cDNA'lar, ilgili genin ters ve düz primerleri, su ve kapiller sisteme (Roche Light Cycler 1.5) uygun floresan bazlı (Cyber Green) RT-PCR kiti (Go-Taq qPCR master mix, Promega) kullanılarak toplam hacim 20 µl olacak şekilde RT-PCR cihazına yüklendi. Deneylerde referans gen olarak β-aktin kullanıldı. Kontrol ve demir yüklenen örneklerden elde edilen mRNA miktarlarının karşılaştırılması $\Delta\Delta Ct$ metodu ile yapıldı. Primerlerin verimi farklı cDNA konsantrasyonlarına (10 ng, 4 ng, 0,4 ng, 0,04 ng) karşılık gelen eşik döngü (Ct) değerlerinden oluşturulan doğrusal denklemin eğiminden formül ($10^{(-1/eğim)}$) ile hesaplandı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Deneylerde kullanılan primer verimlerinin analizi. qPCR’da standart eğriler ilgilenilen cDNA seri dilüsyonlarından elde edildi (reaksiyon başına 10 ng, 4 ng, 0,4 ng, 0,04 ng). Doğrusal regresyon analizi seri dilüsyon log cDNA miktarına karşılık gelen eşik döngü (Ct) değerlerinden yapıldı.

2.5. İmmunofloresans

HL-1 hücrelerine demir yüklenmesinin hücre proliferasyonu üzerine olası etkisini araştırmak amacıyla immunofloresans yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde, hücreler belirlenen konsantrasyon ve sürelerde (300 ve 600 µM, 24 ve 48 saat) Fe⁺³ ile inkübe edildikten sonra hücrelerin üzerinden besiyer uzaklaştırılarak 3 kez PBS ile yıkandı. Ardından -20°C’deki %100 metanol ile 5 dakika fiske edilen hücreler tekrar PBS ile yıkanarak 40 saniye DNA boyası Yo-Pro-1 (2,5 µM; Molecular Probes by Life

tech Y3603) ile inkübe edildi. Daha sonra preparat kurumasını engelleyecek uygun ortama (Diamond antifade Mountant Life tech P36961) ters olarak kapatıldı ve 12 saat ışık almayacak şekilde bırakıldı. Hücrelerden immunofloresans ölçümü için konfokal mikroskop (Leica, SP5) kullanıldı. Yo-Pro-1 boyası için 488 nm dalga boyunda uyarılan hücrelerin emisyon sinyali 495-550 nm dalga boyu aralıklarında toplandı. Hücre sınırları diferansiyel interferans kontrast (DIC) mikroskopisi ile belirlendi.

2.6. Elektrofizyoloji

Hücrelerden voltaj ile aktive olan Ca^{+2} ve K^{+} akımları tüm hücre yama kısaç tekniği ile kaydedildi. Akım kaydı için soda-kireç camından mikropipetler (iç çap:1,1-1,2 mm, dış çap:1,5-1,6 mm) kullanıldı. Mikropipetlerin direnci yatay mikropipet çekici (Sutter Instrument CO., P-97) ile $\sim 2,5 \text{ M}\Omega$ yapıldı. Kanal akım kayıtları için, yama kısaç anfi (Biologic RK-300) ve analog sinyalleri dijital sinyallere dönüştüren ara yüz (Axon CNS Digidata 1400A) kullanıldı. Verilerin analizi *Clampfit* 10 programında yapıldı. HL-1 hücrelerinden voltaja duyarlı akımları ayırmak için standart ve akım kaydı yapılacak kanal tipine özel hücre içi ve dışı solüsyonlar (Bakınız; kullanılan solüsyonlar 2.3) ile kaydedildi. TTCC akımları aktive etmek için membran potansiyeli -110 mV istirahat potansiyeline kenetlendi ve -100 mV'dan başlayarak 10 mV aralıklar ile 70 mV'a kadar 300 ms boyunca depolarize edici test pulsları uygulandı. Elde edilen veriden akım voltaj ilişkisi çıkarıldı. LTCC akım kaydı için hücreler başlangıçta -70 mV istirahat potansiyelinde tutuldu ve böylece voltaja duyarlı TTCC akımları inaktive edildi. Daha sonra -70 mV istirahat potansiyelinden 10 mV'luk aralıklar ile 300'er ms boyunca depolarize edici test uyarıları uygulandı. Akımların inaktivasyon zaman sabitleri (τ), akımlara Boltzmann standart eğri *fit* edilmesi ile hesaplandı.

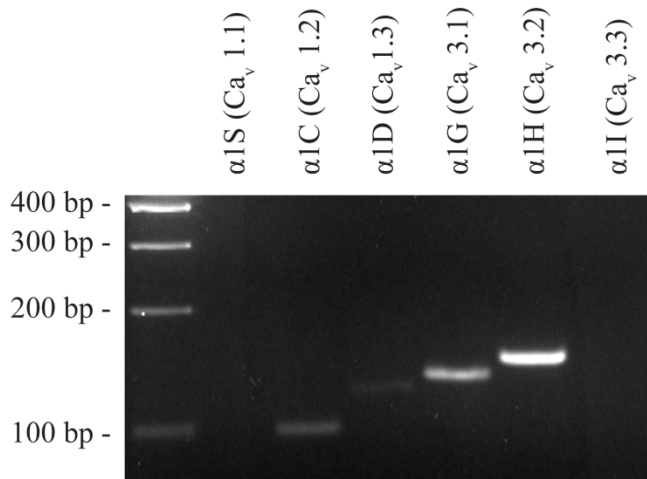
2.7. İstatistik

Sonuçlar ortalama $\pm$ S.E.M şeklinde gösterildi. Gruplar arası fark için çift yönlü Student'ın *t*-test'i kullanıldı (Graphpad Prism 5) ve $P < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. HL-1 Hücrelerinde Voltaj ile Aktive Olan Ca^{+2} Kanallarının Moleküler Karakterizasyonu

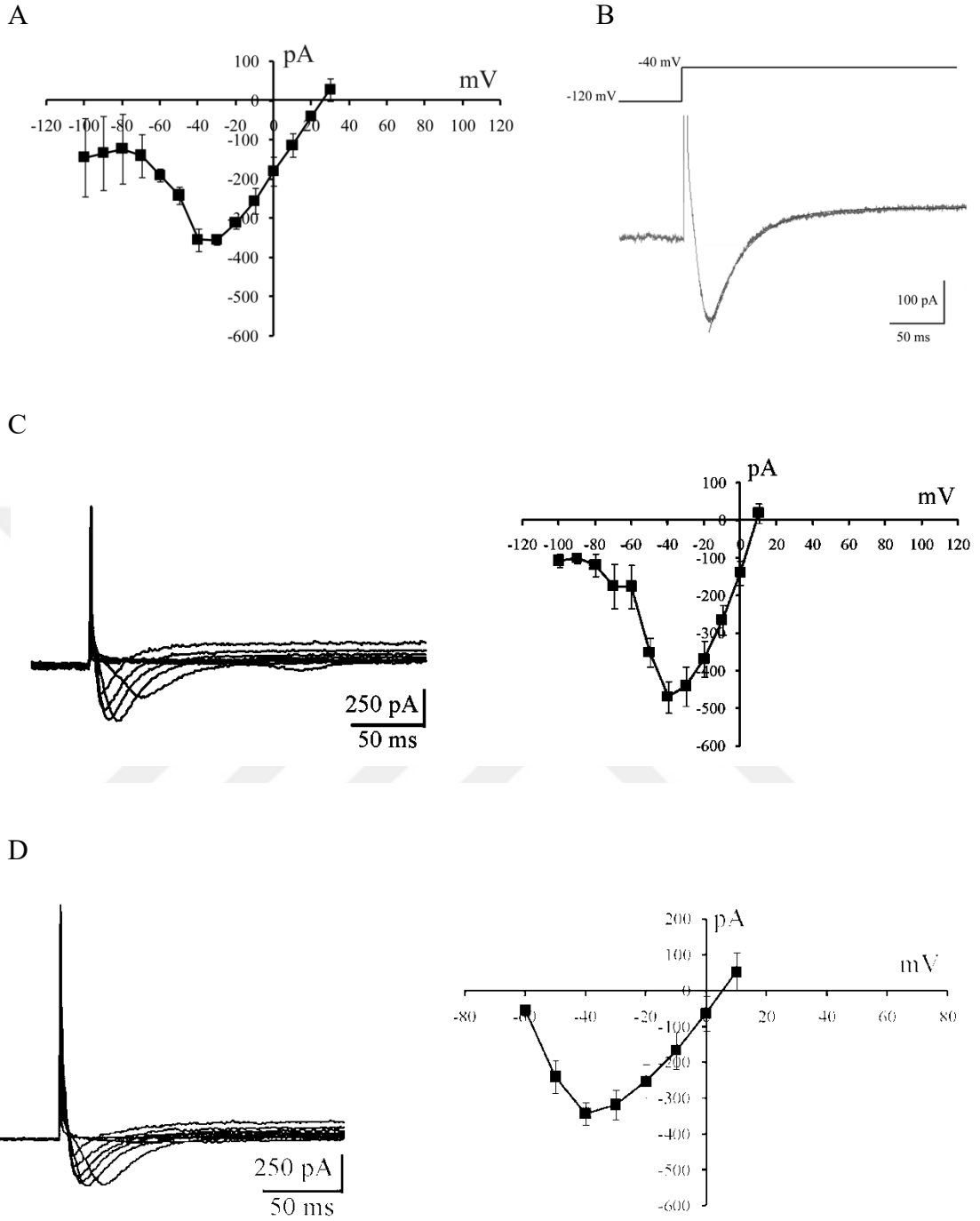
Bu projede ilk olarak voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarının gen ekspresyonları incelendi. Bu amaçla L- ve T- Ca^{+2} kanal alttiplerine özgü primerler (Çizelge 2.1) ile çoğaltılan PCR ürünleri analiz edildi (Şekil 3.1). Agaroze jelde yürütülen PCR ürünlerinde kalp dokusunda bulunan L- tipi $\alpha 1C$ (95 baz çifti (bp)), L- tipi $\alpha 1D$ (120 bp), T- tipi $\alpha 1G$ (129 bp), T- tipi $\alpha 1H$ (143 bp) alt ünite ekspresyonları beklenen büyüklüklerde gözlemlendi. Daha çok iskelet kası ve nöronlarda bulunduğu bildirilen sırasıyla L- tipi $\alpha 1S$ (106 bp) ve T- tipi $\alpha 1I$ (131 bp) alt ünite ekspresyonlarına ise rastlanmadı (Catterall ve ark., 2005; Ono ve Iijima, 2010). HL-1 hücrelerinde daha önce yapılmış çalışmalarda N-, P/Q ve R-tipi Ca^{+2} kanal ekspresyonlarının bulunmadığı gösterildiğinden (Xia ve ark., 2004) bu kanallara ait alt ünite ekspresyonları incelenmedi. Bu sonuçlar, HL-1 hücrelerinde farklı ikişer adet L- ve T- tipi Ca^{+2} izoformu bulunduğunu göstermektedir.



Şekil 3.1. HL-1 hücrelerinde Ca^{+2} kanallarının gen ekspresyonlarının analizi. Her kuyuya ilgili genlere ait PCR ürünleri yüklendi ve etidyum içeren % 4 agaroze jel elektroforezde yürütüldü. Deneylerde 100 bp'lik ladder kullanıldı (GeneON, 304-005).

3.2. HL-1 Hücrelerinde Ca^{+2} Akımlarının Voltaj Kıskaçı Yöntemi ile Ölçülmesi

Moleküler bulgulardan elde edilen sonuçları doğrulamak ve fonksiyonel kanal ekspresyonlarını incelemek amacıyla HL-1 hücrelerinden Ca^{+2} akımları tüm hücre yama kıskaçı tekniği ile ölçüldü. İlk olarak içe yönelik katyon akımları (Na^{+} ve Ca^{+2}) araştırıldı. Bu amaçla K^{+} akımlarını bloke etmek için hücre dışı solüsyona K^{+} kanal inhibitörü tetraetil amonyum (TEA), pipet solüsyonunda da sezyum (Cs) iyonu konuldu. Ayrıca banyo solüsyonunda Na^{+} konsantrasyonu normalin yaklaşık 30 katı az ($\sim 4 \text{ mM}$), pipet solüsyonunda ise normal hücre içi Na^{+} konsantrasyonunun yaklaşık 10 katı fazla (42 mM) olarak ayarlandı. Na^{+} için ters iyon gradient şartlarında Nernst potansiyeli oda sıcaklığında (20° C) $\sim 60 \text{ mV}$ olarak hesaplandı. Böylece olası Na^{+} akımının, içe yönelik katyon akımlarının aktive olduğu potansiyellerdeki akımlara katkısı ihmal edilebilir düzeyde tutuldu (bkz. tartışma). Bu koşullarda içe yönelik tepe akımlara ait akım voltaj ilişkisi (I-V) grafiği oluşturuldu (Şekil 3.2A). Elde edilen I-V grafiği, kontrol koşullardaki (normal iyon gradientlerinin olduğu) I-V grafiğinden farklı değildi (Şekil 3.2C). Dolayısı ile, voltaj ile aktive olan içe yönelik akımların Ca^{+2} akımı olduğu düşünüldü. Bu akımların ortalama inaktivasyon zaman sabiti (τ) $26,50 \pm 1,00 \text{ ms}$ ölçüldü ($n:4$, bkz. metodlar, Şekil 3.2B). Daha önce HL-1 hücrelerinde yapılmış çalışmada TTCC maksimum akımlarının ($\sim -30 \text{ mV}$) LTCC göre ($\sim +10 \text{ mV}$) daha negatif potansiyellerde oluştuğu bildirilmiştir (Xia ve ark., 2004). TTCC akımları negatif membran potansiyellerinde aktive olduğundan hücreler başlangıçta -120 mV 'luk potansiyelde tutuldu ve sonrasında membran $+10 \text{ mV}$ 'luk adımlar ile depolarize edildi (bkz. metodlar). LTCC akımları için ise membran başlangıçta -70 mV 'da tutuldu ve artan depolarizasyon adımları uygulandı. Böylece membran -70 mV başlangıç potansiyelinde tutularak TTCC inaktive edildiğinden kalan akımlar LTCC olarak değerlendirildi. Ortalama hücre kapasitansı $35 \text{ piko Farad (pF)}$ 'lık hücrelerden farklı protokollerde kayıt alınması akımların I-V karakterini değiştirmeden sadece akım büyüklüklerini etkiledi (Şekil 3.2C, D). Sonuç olarak, kontrol koşullarda elde ettiğimiz içe yönelik akımların I-V ilişkisi HL-1 hücrelerinde yüksek oranda fonksiyonel TTCC bulunduğuna işaret etmektedir.

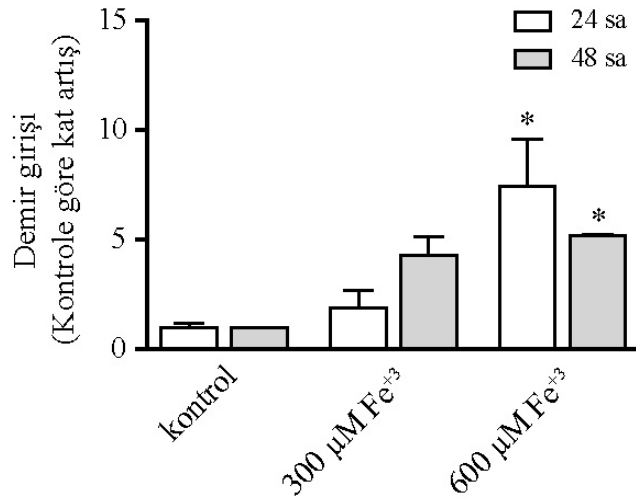


Şekil 3.2. A) HL-1 hücrelerinden tam hücre yama kısıncı tekniği ile alınan içe yönelik katyon akım kayıtlarının akım voltaj ilişkisi (I-V) ilişkisi. Akım kayıtları sırasında K^+ kanalları inhibe edildi ve hücre iç-dış Na^+ gradienti ters tutuldu (n:3). B) Standart banyo ve pipet solüsyonlarında, -120 mV 'dan -40 mV'a depolarize edici test potansiyeli uygulandıktan sonra akımın inaktivasyon zamanı ölçümü için eğri fitini (düz çizgi) gösteren örnek trase. Voltaj protokolü şeklin üstünde gösterilmiştir. C) Standart banyo ve pipet solüsyonlarında, -110 mV (C) veya -70 mV (D) başlangıç potansiyelinde tutulan hücrelere sırasıyla -100 mV ya da -60 mV'dan 0 mV'a kadar 10'ar mV'luk artışlar ile depolarize edici test potansiyelleri uygulandı. Oluşan içe yönelik katyon akım traseleri üst üste getirildi (sol) ve I-V eğrisi (sağ) oluşturuldu (n:7-8). Grafikteki değerler (ortalama $\pm$ standart hata) kenetlenen test potansiyeli için maksimum akım miktarlarıdır.

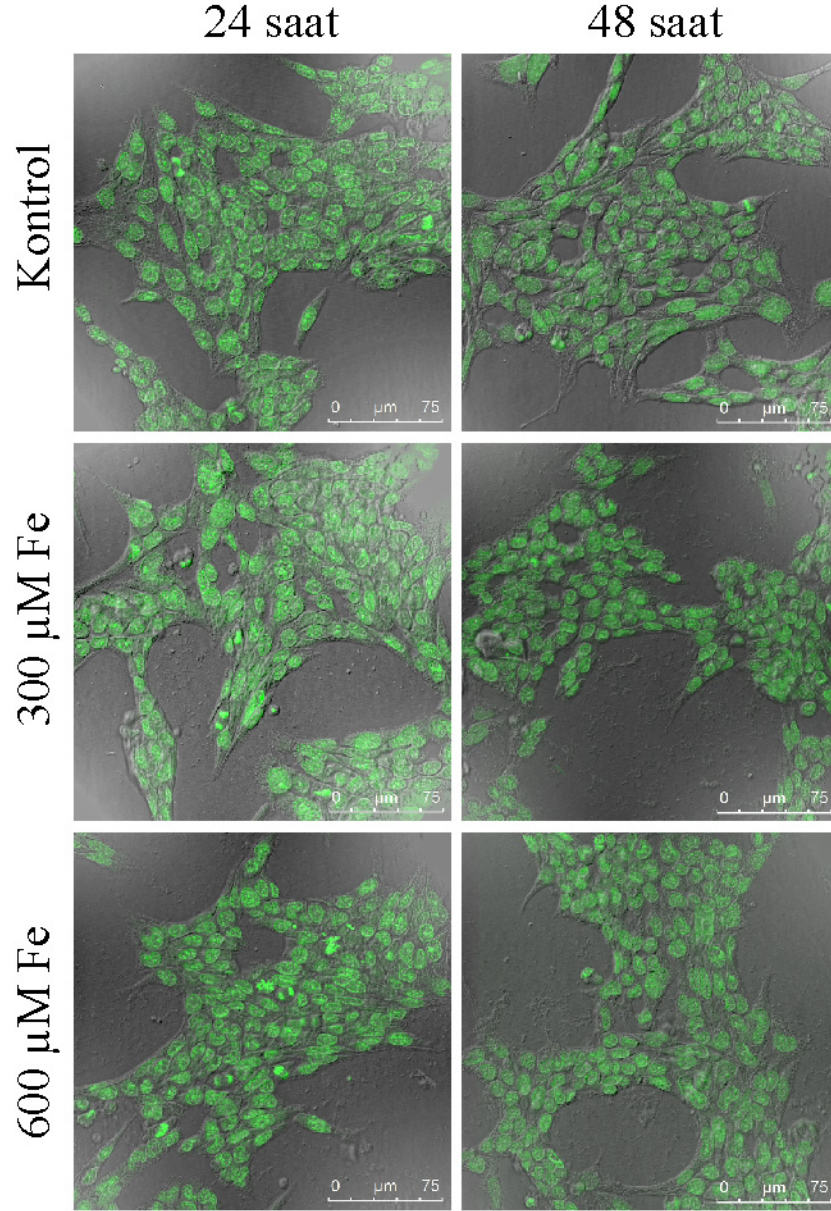
3.3. HL-1 Hücrelerine Demir Yüklenmesi ve Hücre Canlılığına Etkisi

FeCl_3 (300-600 μM)'ün sudaki çözeltisi Fe^{+3} (ferrik) formunda doğrudan hücre besiyerine verildiğinde besiyerindeki serum proteinlerinin koagülasyonuna yol açtı. FBS içermeyen besiyerine doğrudan ferrik demir eklendiğinde ise çözünürlüğünün az olduğu ve uzun sürede demirin flask tabanına çöktüğü gözlemlendi. Ferröz (Fe^{+2})'in sudaki çözünürlüğü ferrik demire göre daha iyi olduğu bilinmektedir. Demirin çözünürlüğü artırmak için, FeCl_3 çözeltisine ferrik demiri ferröz demire indirgeyen askorbik asit (1 mM) eklendi. Distile su veya FBS'siz besiyeri ortamında ferröz demirin uzun süreli inkübasyonu sırasında çökme gözlenmedi ve deneylere bu protokolle devam edildi. Hücre içi demir miktarını ölçmek için kullandığımız kit toplam demir (ferrik ve ferröz formlarında) ölçmektedir. HL-1 hücrelerinde demir inkübasyonu süre ve konsantrasyon bağımlı olarak hücre içine demir girişine yol açtı (Şekil 3.3A). Hücre canlılığı ise demir yüklenmesinden etkilenmedi (Şekil 3.3B).

A



B



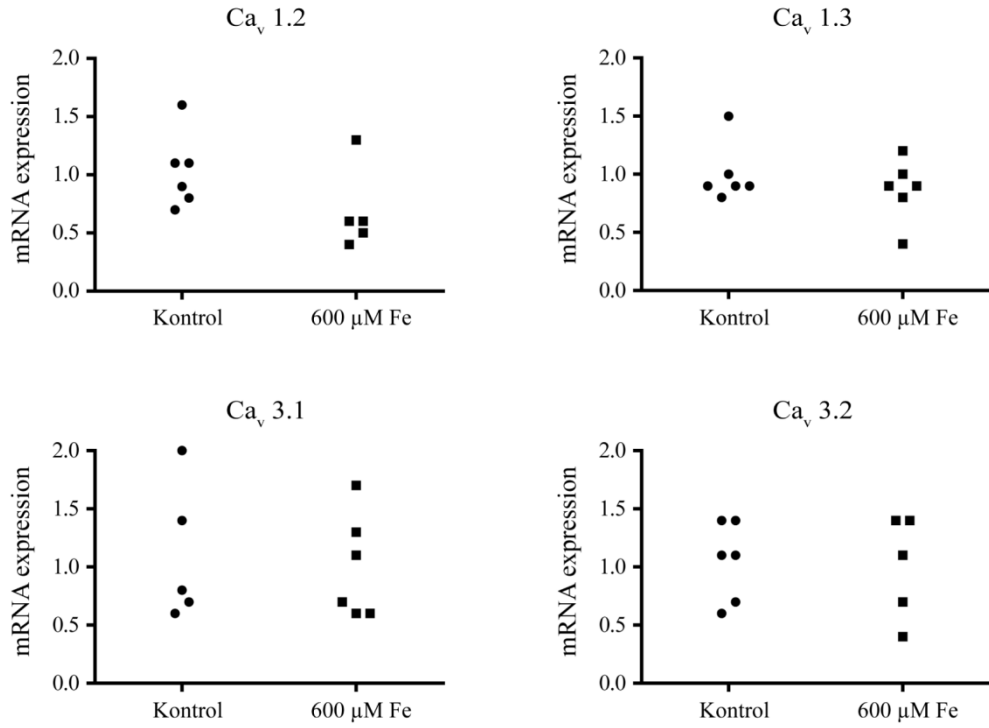
Şekil 3.3. HL-1 hücrelerinde farklı konsantrasyon ve sürelerde demir inkübasyonlarının hücre içi demir girişine (A) ve hücre proliferasyonuna (B) etkisi. Hücre çekirdekleri DNA boyası Yo-Pro 1 ile boyandıktan sonra her deney grubu için aynı alana düşen çekirdek sayısı (yeşil) konfokal mikroskopta belirlendi. Hücre sınırlarını belirlemek için DIC modu kullanıldı ve floresan görüntü ile birleştirildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir (n:3-4; * kontrole göre, $p<0,05$).

3.4. HL-1 Hücrelerinde Uzun Süreli Demir İnkübasyonunun Voltaj Bağımlı Ca^{+2} Kanal Ekspresyonlarına Etkisi

HL-1 hücrelerinden voltaj bağımlı Ca^{+2} kanal genlerine ait mRNA düzeylerini ölçmek için ilk başta doğrusal regresyon analizi yapıldı. RT-PCR reaksiyon ortamına ilgili genlerin artan miktarlarında cDNA eklenmesi Ct değerlerinde doğrusal azalmaya yol açtı (eğim: ~ 3.3 , data gösterilmedi). Analiz sonuçlarından genlere özgü primerlerin verimleri elde edildi (Çizelge 3.1) (Pfaffl, 2001). Uzun süreli demir yüklemesi yapılmış (48 saat, 600 μM) HL-1 hücrelerinden göreceli mRNA ekspresyon analizi yapıldı. Demir yüklemesi Ca_v 1.2, 1.3, 3.1 ve 3.2 mRNA ekspresyonlarını anlamlı olarak değiştirmede (Şekil 3.4).

Çizelge 3.1. Voltaj bağımlı kanalların mRNA ekspresyonlarında kullanılan primer çiftlerinin amplifikasyon verimleri. Elde edilen verim değerleri ile miktar analizi için $\Delta\Delta Ct$ metodunun uygun olduğuna karar verildi.

Gen adı	Verim
Ca_v 1.2	2.01349877
Ca_v 1.3	1.9199332
Ca_v 3.1	1.90595238
Ca_v 3.2	1.92349432
β -aktin	1.85857035



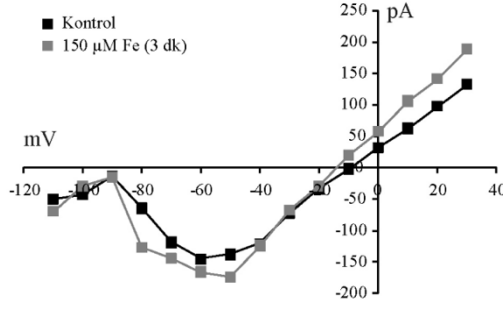
Şekil 3.4. HL-1 hücrelerinin 48 saat 600 μM demir ile inkübasyonunun voltaj bağımlı Ca⁺² kanallarının gen ekspresyonlarına mRNA düzeyinde etkisi (n:6).

3.5. HL-1 Hücrelerinde Akut ve Uzun Süreli Demir İnkübasyonunun Voltaj Bağımlı Ca⁺² Kanal Akımlarına Etkisi

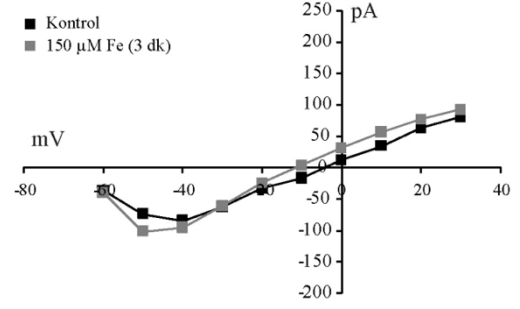
3.5.1. Akut Demir Uygulamasının Voltaj Bağımlı T-tipi Ca⁺² Kanal Akımlarına Etkisi

HL-1 hücrelerine akut demir HEPES tampon çözeltisi içeren banyo ortamına eşit hacimde doğrudan FeCl₃ çözeltisi eklenmesi ile uygulandı. Akut demir uygulamasından önce hücrelerden tam hücre konfigürasyonunda kontrol akım kayıtları alındı. Akut demir uygulamasından ~3 dk sonra aynı hücrelerden farklı protokoller ile TTCC akım kayıtları alındı ve I-V eğrileri oluşturuldu. Akut demir uygulaması içe ve dışa yönelik akımlarda bir değişiklik oluşturmadı (Şekil 3.5).

A



B

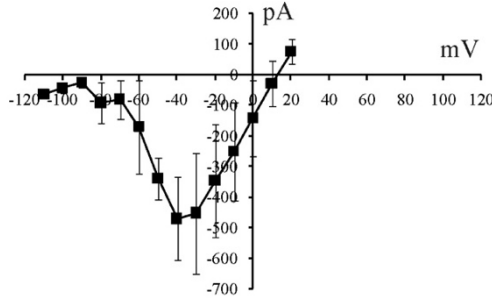


Şekil 3.5. İki farklı hücreden iki farklı başlangıç potansiyelinde (A, -120 mV ve B, -70 mV) standart hücre dışı (HEPES) ve pipet solüsyonunda akut demir (150 µM) uygulaması öncesi (kontrol, siyah) ve 3 dk sonrasında (akut demir, gri) art arda alınan içe ve dışa yönelik voltaj bağımlı kanal akımlarına ait I-V eğrileri. Hücrelere sırasıyla -100 mV ya da -60 mV'dan 0 mV'a kadar 10'ar mV'luk artışlar ile depolarize edici test potansiyelleri uygulandı.

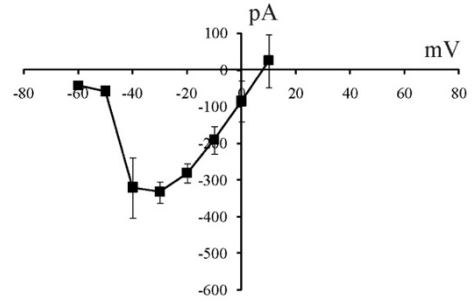
3.5.2. Uzun Süreli Askorbik Asit İnkübasyonunun Voltaj Bağımlı T-tipi Ca^{+2} Kanal Akımlarına Etkisi

Bu çalışmada, hücrelere demir uygulaması (FeCl_3) indirgeyici ajan olarak askorbik asit ile birlikte uygulandı. Literatürde askorbik asit'in tek başına içe yönelik Ca^{+2} akımlarında inhibisyona yol açtığı bildirilmiştir (Nelson ve ark., 2007; Parsey ve Matteson, 1993). Ancak, bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre uzun süre (1 mM, 48 saat) askorbik asit uygulaması TTCC akımlarında kontrole göre bir fark oluşturmadı (Şekil 3.6).

A



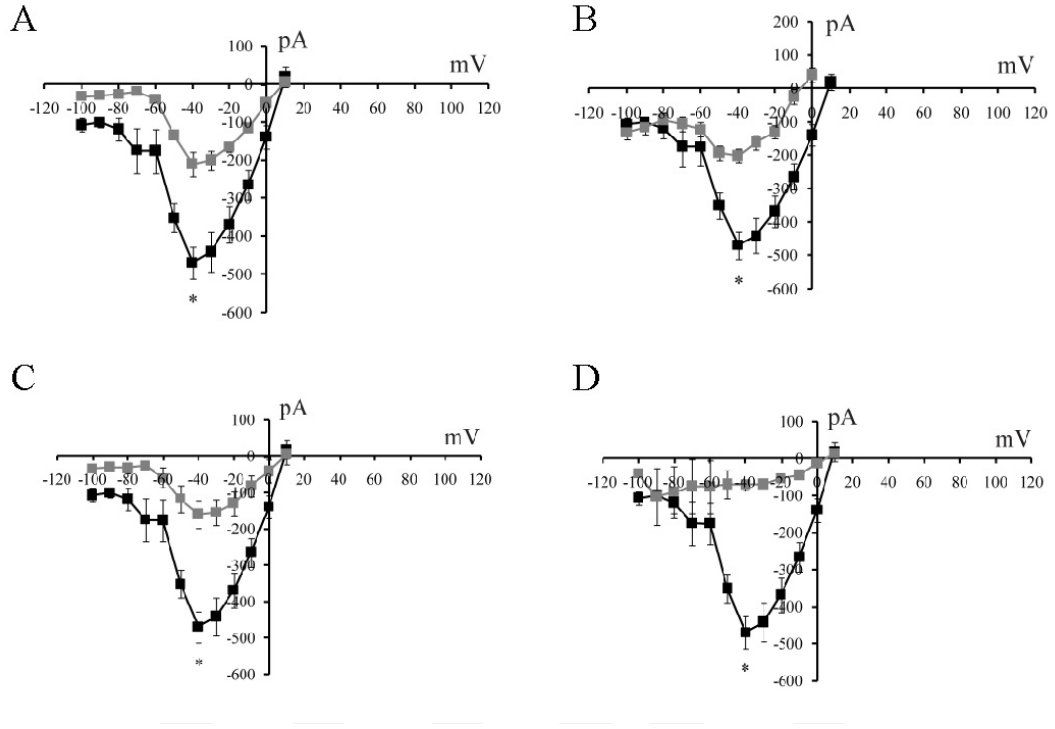
B



Şekil 3.6. 48 saat askorbik asit (1 mM) inkübasyonunun içe yönelik TTCC etkisi. Standart banyo ve pipet solüsyonlarında, -110 mV (A) veya -70 mV (B) başlangıç potansiyelinde tutulan hücrelere sırasıyla -100 mV ya da -60 mV'dan 0 mV'a kadar 10'ar mV'luk artışlar ile depolarize edici test potansiyelleri uygulandı. Oluşan içe yönelik katyon akım traseleri üst üste getirildi I-V eğrileri oluşturuldu (n:2). Grafikteki değerler (ortalama± standart hata) kenetlenen test potansiyeli için maksimum akım miktarlarıdır.

3.5.3. Farklı Süre ve Konsantrasyonlardaki Demir İnkübasyonunun Voltaj Bağımlı T-tipi Ca^{+2} Kanal Akımlarına Etkisi

Hücre canlılığı etkilenmeden hücre içine demir girişinin gözlemlendiği (Şekil 3.3) demir inkübasyon doz ve sürelerinde TTCC miktarları ölçüldü. Bu amaçla bütün deney gruplarında tam hücre konfigürasyonunda başlangıç potansiyeli -120 mV'da tutuldu. 24 ve 48 saat düşük doz (300 μM) demir inkübasyonu TTCC akımlarını benzer miktarlarda azalttı (Şekil 3.7A, B). 24 saat 300 μM demir inkübasyonu TTCC akımlarının dönme (*reversal*) potansiyelini etkilemedi (kontrol: $9,43 \pm 2,09$ mV; 24 saat, 300 μM Fe^{+2} : $9,38 \pm 2,05$ mV, n:4-7). Ayrıca, akımların inaktivasyon süreleri arasında fark gözlenmedi (kontrol τ : $26,50 \pm 1,00$; 24 saat, 300 μM Fe^{+2} : τ : $25,15 \pm 1,53$ ms, n:4). Hücrelerin 24 saat yüksek konsantrasyon demir ile inkübasyonu ise (600 μM) TTCC akımlarında 24 ve 48. saatlerdeki düşük konsantrasyon demir inkübasyonu ile kıyaslandığında daha fazla inhibisyon oluşturmadı (Şekil 3.7C). Ancak 48 saat yüksek doz (600 μM) demir inkübasyonu diğer tüm demir inkübasyonu deney gruplarına göre TTCC akımlarında daha fazla inhibisyon oluşturdu (Şekil 3.7D). Bu sonuçlar TTCC akımlarının demir inkübasyonu ile inhibisyonunda inkübasyon dozu ve süresinin önemli olduğunu göstermektedir.

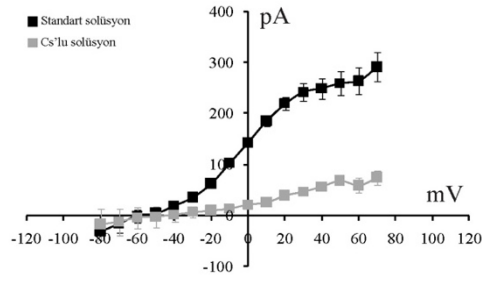


Şekil 3.7. 24 ve 48 saat demir inkübasyonunun (300-600 μM) içe yönelik TTCC etkisi. Standart banyo ve pipet solüsyonlarında, -110 mV başlangıç potansiyelinde tutulan hücrelere sırasıyla -100 mV'dan 0 mV'a kadar 10'ar mV'luk artışlar ile depolarize edici test potansiyelleri uygulandı. Oluşan içe yönelik katyon akım traseleri üst üste getirildi ve I-V eğrileri oluşturuldu. (A) 24 saat, 300 μM Fe^{+2} (n:4); (B) 48 saat, 300 μM Fe^{+2} (n:2); (C) 24 saat, 600 μM Fe^{+2} (n:3); (D) 48 saat, 600 μM Fe^{+2} (n:2). Grafikteki değerler (ortalama $\pm$ standart hata, * $p<0,05$) kenetlenen test potansiyeli için maksimum akım miktarlarıdır.

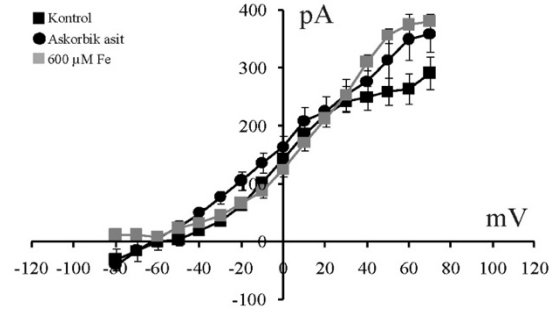
3.6. Farklı Süre ve Konsantrasyonlardaki Demir İnkübasyonunun Voltaj Bağımlı K^+ Kanal Akımlarına Etkisi

Deneylerde kontrol amaçlı demir inkübasyonunun dışa yönelik katyon akımlarına etkisine de bakıldı. Kontrol hücrelerdeki K^+ akımları banyo solüsyonunda TEA, pipet solüsyonunda Cs iyonu varlığında inhibe oldu (Şekil 3.8A). Voltaj ile aktive olan K^+ akımlarının uzun süreli demir inkübasyonundan etkilenmediği bilinmektedir (Kuryshv ve ark., 1999). Bizim bulgularımıza göre de askorbik asit ya da uzun süreli demir inkübasyonundan (24, 48 saat; 600 μM Fe^{+2}) K^+ kanal akımları etkilenmedi (Şekil 3.8B).

A



B



Şekil 3.8. A) HL-1 hücrelerinde dışa yönelik katyon akımlarına sırasıyla pipet ve banyo solüsyonlarına Cs ve TEA eklenmesinin etkisi (n:4-19). B) 24 veya 48 saat demir inkübasyonunun (600 µM) ve askorbik asit'in (1 mM) dışa yönelik K^+ akımlarına etkisi (n:3-10). Standart banyo ve pipet solüsyonlarında, -110 mV başlangıç potansiyelinde tutulan hücrelere sırasıyla -100 mV'dan 0 mV'a kadar 10'ar mV'luk artışlar ile depolarize edici test potansiyelleri uygulandı. Oluşan içe yönelik katyon akım traseleri üst üste getirildi ve I-V eğrileri oluşturuldu. Grafikteki değerler (ortalama±standart hata) kenetlenen test potansiyeli için maksimum akım miktarlarıdır.

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, atrial tümör kökenli HL-1 hücrelerinde (Claycomb ve ark., 1998) akut ve uzun süreli demir yüklemesinin voltaj ile aktive olan TTCC'ların fonksiyonuna etkisi incelenmiştir. İlk olarak, PCR kullanılarak elde edilen moleküler sonuçlarımız, bu hücrelerde voltajla aktive olan Ca^{+2} kanallarından L- tipi $\alpha 1C$ ve $\alpha 1D$, T- tipi $\alpha 1G$ ve $\alpha 1H$ alt ünitelerine ait mRNA'ları eksprese ettiklerini göstermektedir. L- tipi $\alpha 1S$ ve T- tipi $\alpha 1I$ ekspresyonu ise gözlenmemiştir. PCR'da kanal alt ünitelerini çoğaltmak için kullanılan döngü sayısı eşit olduğundan (40 döngü) HL-1 hücrelerinde en çok TTCC ekspresyonu olduğu anlaşılmaktadır. LTCC ekspresyonunun ise bu hücrelerde daha az olduğu gözükmemektedir. Aynı hücrelerde yapılan diğer bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Xia ve ark., 2004). Elektrofizyolojik bulgulara göre negatif membran potansiyellerinde elde edilen içe yönelik katyon akımlarının genliği K^{+} kanal inhibisyonundan etkilenmemektedir. Dolayısı ile, kontrol şartlarda içe yönelik akımlara hücre içinden dışına katyon akımlarının eşlik etmediği ya da ihmal edilebilir olduğu anlaşılmaktadır. Gözlemlenen içe yönelik katyon akımlarının kinetiği çok daha hızlı aktive ve inaktive olabilen (1-2 ms) Na^{+} akımlarına benzememektedir. Elde ettiğimiz içe yönelik katyon akım aktivasyon ve inaktivasyon toplam süresi ~ 50 ms'dir (Şekil 3.2C, D). Bu süre Ca^{+2} akımlarının kinetikleri ile uyumludur (Mesirca ve ark., 2015; Xia ve ark., 2004). Akım kayıtları sırasında hücre içi ve dışı solüsyonlarda ters Na^{+} gradienti (hücre içi fazla, hücre dışı az) olan şartlarda voltaj ile aktive olan içe yönelik katyon akım genliğinde bir değişiklik olmadı (Şekil 3.2A). Bu koşullarda Na^{+} iyonu için Nernst potansiyeli ~ -60 mV olduğundan içe yönelik akım kayıtları sırasında ancak -60 mV'dan daha negatif membran potansiyeli kenetlerinde Na^{+} iyonunun katkısı olacağı öngörülebilir. Elde ettiğimiz sonuçlar, -70 mV'da voltaj ile aktive olan içe yönelik katyon akımının ihmal edilebilir düzeyde olduğunu göstermektedir (Şekil 3.2A). Dolayısı ile HL-1 hücrelerinde voltaj ile aktive olan içe yönelik katyon akımlarında Na^{+} iyonunun olası katkısı minimum olarak düşünülebilir. Bu sonuçlar, HL-1 hücrelerinde gözlemlenen içe yönelik katyon akımlarının Ca^{+2} akımı olduğunu desteklemektedir.

Kardiyomiyositlerde, TTCC akımlarının voltaj-akım ilişkisinde tepe akım değerleri -40/-30 mV'dur. LTCC akımlarının ise +10 mV civarındadır. Bizim fonksiyonel sonuçlarımız moleküler bulgularımız ile uyumlu olarak HL-1 hücrelerinde daha çok TTCC kanallarının eksprese olduğunu göstermektedir. TTCC akımları oldukça negatif potansiyelerde aktive olabildiği için (-80 mV) LTCC akımlarını elde etmek amacıyla hücreler -70 mV başlangıç potansiyelinde tutularak TTCC akımları inaktive edildi. Bu protokolle elde edilen akımlar akım-voltaj ilişkisini sağa kaydırmadan sadece maksimum akım genliğinde azalma oluşturdu. Başlangıç potansiyelinin -120 mV yerine -70 mV'da tutulması daha az sayıda TTCC kanalının test potansiyelinde aktive olduğunu göstermektedir. Dolayısı ile, demir yüklemesinin incelendiği deney gruplardaki elektrofizyolojik kayıtların büyük bir çoğunluğunun fonksiyonel olarak TTCC eksprese eden hücrelerden alındığını düşündürmektedir.

TTCC ilk olarak, tek kanal seviyesinde Nowycky ve ark. (1985) tarafından tanımlanmıştır. Bu kanallar, diğer voltaj ile aktive olan Ca^{+2} kanallarından hızlı aktivasyonları, yavaş deaktivasyon ve -60 mV ve daha negatif potansiyelerde eşik kanal aktivasyonları ile ayrılırlar (Carbone ve Lux, 1984; Iftinca ve Zamponi, 2009; Perez-Reyes, 2003). Bulgularımıza göre bazı deneylerdeki içe yönelik katyon akımlarındaki voltaj aktivasyon eşiği -80 mV'dur (Şekil 3.6A). Bu sonuçlar, atrial hücrelerde TTCC kalpte dinlenim membran potansiyeli oluşumuna katkı sağladığını ve dinlenim membran potansiyellerinde hücre içine sürekli Ca^{+2} girişi olabileceğini öneren çalışmalar ile uyumludur (Perez-Reyes, 2003). TTCC'nın α altüniteleri üç ayrı gen tarafından kodlanmaktadır. *CACNA1G* ($\alpha 1G$), *CACNA1H* ($\alpha 1H$), *CACNA1I* ($\alpha 1I$), genleri sırası ile Ca_v 3.1, 3.2, 3.3 olarak adlandırılan kanallarını oluşturan nükleotid dizilerini barındırır (Catterall ve ark., 2005). Bu α altünitelerden Ca_v 3.3'ün diğerlerine göre (Ca_v 3.1 veya Ca_v 3.2) daha yavaş aktivasyon ve inaktivasyon kinetiği (~150 ms) gösterdiği bilinmektedir (Elies ve ark., 2016). Bu tez çalışmasında elde edilen moleküler bulgulara göre, HL-1 hücrelerinde Ca_v 3.3 ekspresyonu bulunmamaktadır. Sonuçlarımız, akımların kinetikleri ve akımların I-V ilişkisinin bu hücrelerde göreceli olarak daha hızlı fonksiyonel Ca_v 3.1, Ca_v 3.2 izoformlarının olduğunu desteklemektedir.

TTCC akımlarına akut demirin etkisini inceleyebilmek için demir, banyo ortamına doğrudan eklendi. Deneylerde ilk önce hücrelerden tam hücre konfigürasyonunda kontrol akım kayıtları alındı. Daha sonra akut (~3 dk) demir uygulaması yapıldıktan sonra akım kayıtları tekrarlandı. Akut demir uygulaması yapılırken ferröz demirin okside olmasını engellemek için FeCl_3 (150 μM) çözeltisi taze hazırlandı ve banyo ortamına eşit hacimde eklenerek tam karışım sağlandı. Banyo ortamında 2 mM Ca^{+2} varlığında akut demir uygulaması içe yönelik akımların I-V ilişkisinde, tepe akım değerlerinde ve *reversal* potansiyelinde bir değişiklik oluşturmadı. Bu sonuçlar demirin doğrudan kanal proteinine bağlanarak hızlı bir etki oluşturmadığını veya daha önceki çalışmalarda öne sürüldüğü gibi kanal geçirgenliğinde azalmaya yol açmadığını düşündürmektedir (Lopin ve ark., 2012; Tsushima ve ark., 1999). Tsushima ve ark. (1999) akut demir inkübasyonunun LTCC geçirgenliği üzerine etkilerinin doza bağımlı olduğunu bildirmektedir. Doza bağımlı olarak, 0,25 mM konsantrasyonda demir süperfüzyonu tepe akımlarını değiştirmemekte, 0,5 mM konsantrasyon tepe akımlarını artırmakta, 0,5 mM konsantrasyonun üzerinde ise tepe akımlarını azaldığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, Lopin ve ark. (2012) 0,25 mM konsantrasyonda akut demir uygulaması ile Ca_v 3.1 tepe akımlarında zayıf bir inhibisyon, buna karşılık 1,85 mM demir konsantrasyonunda ise daha güçlü inhibisyon gözlemişlerdir. Ayrıca, aynı çalışmada TTCC akımlarının I-V ilişkisi akut demir uygulaması ile sağa (depolarizasyon) kaydığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda akut demir uygulaması için kullandığımız demir konsantrasyonu 0,125 mM'dır. Diğer çalışmalar ile karşılaştırılınca, bu tez çalışmasında akut demir uygulamasının TTCC akımları üzerindeki farklı etkileri, uygulanan demir konsantrasyonundaki farklara bağlı olabilir. Ayrıca, bu tez çalışmasında kullanılan HL-1 hücrelerinde en fazla Ca_v 3.2 izoformu eksprese olmaktadır. Diğer çalışmalarda akut demir inkübasyonunun etkileri farklı Ca^{+2} kanal tiplerinde (Ca_v 3.1 ya da LTCC) araştırıldığından etkilerin araştırılan izoforma özgül olma olasılığı bulunmaktadır.

Uzun süreli demir yüklemesi sonrasında da TTCC akımlarının *reversal* potansiyellerinde anlamlı bir kayma olmaması, bu kanallardan hücre içinden dışarıya demir geçmediğini düşündürmektedir (Oudit ve ark., 2003) (Şekil 3.7). Demir

yüklemesi dışı yönelik K^+ akımlarını (Şekil 3.8) ve hücre canlılığını (Şekil 3.3B) etkilemedi. Bu sonuçlardan TTCC fonksiyonunun uzun süreli demir yüklemesinden spesifik olarak etkilendiği anlaşılmaktadır. Ek olarak, uzun süreli demir inkübasyonu ise Ca^{+2} kanal mRNA ekspresyonlarını değiştirmedikten kanal fonksiyonundaki inhibisyon, kanal sayısındaki azalma yüzünden gerçekleşmemektedir. TTCC’da uzun süreli demir inkübasyonu ile görülen inhibisyonun, inkübasyonda kullanılan demir konsantrasyonundan daha çok inkübasyon süresine bağımlı olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum kanal yapısında hücre içi demir artışına bağlı kanalın fonksiyonuna etki edebilecek proteinlerin regülasyonunda değişiklikleri akla getirmektedir.

Örnek olarak, demir yüklenmesine bağlı gelişen kardiyomiyopatiye kalp kalsiyum regülasyonunda rol oynayan proteinlerin fonksiyonlarındaki değişikliklerin yol açabileceği öne sürülmektedir (Oudit ve ark., 2003). Kardiyomiyositlerde hücre içi Ca^{+2} döngüsünden sorumlu bu proteinlerin aktivitesindeki bozulmalar çoğunlukla hücre içi Ca^{+2} artışı ile sonuçlanabilmektedir. Hücrede artan demir aracılı oluşan ROS’un da hücre içindeki Ca^{+2} ’un artışına yol açabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, hücre içinde artan demirin LTCC inaktivasyonunu yavaşlattığı ve bu durumun tepe akımlarındaki azalmaya rağmen hücre içinde Ca^{+2} artışına katkı sağlayabileceği gösterilmiştir (Tsushima ve ark., 1999). Hücre içinde artan Ca^{+2} , kalp kasılmasını bozarak kardiyak disfonksiyona aracılık etmektedir. Nöronlarda yapılan çalışmalarda, LTCC inaktivasyonundaki yavaşlamanın hücre içinde artan demirin kanalın Ca^{+2} aracılı inaktivasyonuna yol açan Ca^{+2} bağlanma bölgelerine Ca^{+2} ’un yerine yarışmalı olarak bağlanmasından kaynaklandığı öne sürülmektedir (De Leon ve ark., 1995; Imredy ve Yue, 1994). Bizim bulgularımıza göre, 24 saat 300 μM demir inkübasyonu TTCC inaktivasyon süresini değiştirmedikten (bkz. bulgular 3.5.3), en azından TTCC inaktivasyon süresinin uzamasına bağlı Ca^{+2} artışının mekanizmasının kalp için ağırlıklı olarak geçerli olmadığı söylenebilir.

Çalışmamızda, HL-1 hücrelerinin dinlenme membran potansiyellerinin oldukça depolarize değerlerde (-20/-30 mV) olduğu görüldü ve dolayısı ile aksiyon potansiyeli kaydı alınamadı. Ayrıca, hücrelere akım keneti konfigürasyonunda negatif akım enjekte edilmesi de dinlenme membran potansiyelini yeterince hiperpolarize

değerlere kaydırmadı. HL-1 hücrelerinde aksiyon potansiyeli kaydedilmiş diğer çalışmalarda ise membran potansiyelinin -80 mV civarında olduğu (Pelloux ve ark., 2006) ya da spontan atım gösteren HL-1 hücre tipinden alındığı rapor edilmiştir (Takeuchi ve ark., 2013). Dolayısı ile ileride, spontan atım gösteren HL-1 hücre serisi sipariş edilerek bu deney grubunun tekrarının yapılması planlanmaktadır. HL-1 hücrelerinde aksiyon potansiyelinin diyastolik depolarizasyon evresinde TTCC'nin sorumlu olduğu gözükmemektedir (Yang ve Murray, 2011). Bizim bulgularımıza göre demir yüklenmesi TTCC akımlarında inhibisyona yol açtığından aksiyon potansiyeli morfolojisinin etkilenme potansiyeli bulunmaktadır. Bu tez çalışmasından elde edilen deneysel veriler, normal diyetle artan GI demir absorpsiyonu, kan transfüzyonları veya demirin diyetle aşırı alınması (Afrika aşırı demir yükü) gibi durumlarda kalpte demir yüklenmesine bağlı kardiyak disfonksiyon gelişebileceğini desteklemektedir. Demir yüklenmesine bağlı gelişen kardiyomiopatiye standart tedavi olarak flebotomi, demir şelasyonu yapan ajanların kullanımı ve diyet kontrolü uygulanmaktadır (Gujja ve ark., 2010). Hastalara, kırmızı et gibi demir içeriğinden zengin besinlerin az tüketilmesi, demir absorpsiyonunu artırdığı için alkol alımının azaltılması (Conrad ve Barton, 1980), vitamin C ve demir içeren multivitamin tabletlerinin kullanılmaması önerilmektedir (Felitti ve Beutler, 1999). Ayrıca, demiri bağlayarak absorpsiyonunu azaltan tannat, fitat, oksalat, kalsiyum ve fosfat içeriği zengin besinlerin tüketilmesi de hastalara tavsiye edilmektedir (Conrad ve Barton, 1981).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında kalpte demir fazlalığının indüklediği elektrofizyolojik değişikliklerin mekanizmasında uyarılma-kasılma çiftleniminde rol aldığı düşünülen TTCC'nın rolü ortaya çıkartıldı (Nilius ve ark., 2006; Perez-Reyes, 2003). Elde edilen sonuçların demir toksisitesine bağlı gelişen kardiyomiyopati mekanizmalarının bir bölümünü aydınlatma ve yeni tedavi stratejileri oluşturulmasına katkı sağlama potansiyeli bulunmaktadır.



ÖZET

HL-1 Hücrelerinde Demir Fazlalığının T-tipi Ca^{+2} Kanal Akımlarına Akut ve Kronik Etkileri

Demir insan vücudunda en çok bulunan metaldir ve birçok fizyolojik süreçte (hemoglobin, demir içeren enzimlerin yapısında bulunur) rol oynamaktadır. Vücutta demirin absorpsiyonu, depolanması ve dağılımı sıkı kontrol altındadır. Demir homeostazının değiştiği hemokromotosiz gibi metabolik bozukluklarda fazla demir kalp gibi önemli organlarda depolanır. Bu durumda örnek olarak, demir toksisitesinin gözlemlendiği talasemi majör hastalarında, erken dönemde atrial dilatasyon ve disfonksiyona ve daha sonrasında ise ventriküler disfonksiyona yol açtığı rapor edilmiştir. Kalpte demir fazlalığından aksiyon potansiyeli morfolojisinin etkilendiği bilinmektedir. Ancak, gelişen bu elektrofizyolojik değişikliklerin mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Kalpte T-tipi Ca^{+2} kanal akımlarının akut ve kronik demir yüklemesinden nasıl etkilendiği de bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında atrial kökenli, L- ve T-tipi Ca^{+2} kanallarını endojen olarak eksprese HL-1 hücrelerinden tüm hücre yama kısıracı metodu kullanılarak akım kayıtları alındı. Hücrelere demir yüklemesi için in vitro koşullarda hücre dışı ortama FeCl_3 eklendi ve T-tipi Ca^{+2} kanal kinetiklerine akut ve kronik (24-48 saat) etkisi incelendi. Elde ettiğimiz bulgulara göre 48 saat demir yüklemesi L- ve T-tipi Ca^{+2} kanal ekspresyonlarını değiştirmedi. Akut demir uygulaması (150 μM , 3 dk) T-tipi Ca^{+2} kanal akımlarını değiştirmedi. Ancak demir yüklemesi süre (24 ve 48 saat) ve konsantrasyon (300, 600 μM) bağımlı olarak aksiyon potansiyeline etkili olabilecek T-tipi Ca^{+2} kanal akımlarını azalttı. Bu tezden elde edilen hücresel elektrofizyolojik sonuçlar kalp gibi komplike sistemlerin demir toksisitesine verdikleri yanıtın mekanizmasının anlaşılmasına ve yeni potansiyel tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: demir yüklemesi, HL-1 hücreleri, T-tipi Ca^{+2} kanalı.

SUMMARY

The acute and Chronic Effects of Iron Overload on T-type Ca^{2+} Calcium Currents in HL-1 Cells

Iron is the most abundant transition metal in the human body and plays substantial role in many physiological processes (part of the hemoglobin structure and iron containing enzymes). In human body, absorption, storage and distribution of iron is tightly regulated. Dysregulation of iron hemostasis in metabolic disorders such as hemochromatosis may lead to deposition of excess iron in vital organs including the heart. In this condition, atrial dilatation and dysfunction have been reported to be earlier markers followed by depressed ventricular function of iron toxicity in patients with thalassemia major. It has been shown that cardiac action potential morphology can be affected with iron overload. However, the mechanism involved in these electrophysiological parameters has not been resolved. The knowledge regarding the direct electrophysiological effects of acute and chronic iron overload and its mechanism on the natively expressed cardiac T-type Ca^{2+} channel ($\text{Ca}_v 3.1$, $\text{Ca}_v 3.2$) is still lacking. In this thesis, mice atrium derived HL-1 cells was used which exhibit both L- and T-type Ca^{2+} channel endogenously. Using whole cell patch clamp, voltage dependent channel currents were obtained. The acute and chronic (24-48 hours) effect of in vitro FeCl_3 treatment on T-type channels kinetics was observed. 48 hours of iron overloading did not alter the expressions of L- and T-type Ca^{2+} channels. Acute iron exposure (150 μM , 3 min) did not change T-type Ca^{2+} channel currents. However, iron overload reduced T-type Ca^{2+} channel currents in a time (24 and 48 hours) and concentration (300, 600 μM) dependent manner that could potentially effect action potential. All the electrophysiological results obtained from this study will help to clarify the complex response mechanisms involved such as heart in iron toxicity.

Keywords: HL-1 cells, iron overload, T-type Ca^{+2} channel.

KAYNAKLAR

- ABBASPOUR N, HURRELL R, KELISHADI R (2014). Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci*, **19**: 164-174.
- CARBONE E, LUX HD (1984). A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature*, **310**: 501-502.
- CATTERALL WA (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**: a003947.
- CATTERALL WA, PEREZ-REYES E, SNUTCH TP, STRIESSNIG J (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*, **57**: 411-425.
- CHE J, YANG J, ZHAO B, ZHANG G, WANG L, PENG S, SHANG P (2020). The Effect of Abnormal Iron Metabolism on Osteoporosis. *Biol Trace Elem Res*, **195**: 353-365.
- CHEN MP, CABANTCHIK ZI, CHAN S, CHAN GC, CHEUNG YF (2014). Iron overload and apoptosis of HL-1 cardiomyocytes: effects of calcium channel blockade. *PLoS One*, **9**: e112915.
- CLAYCOMB WC, LANSON NA, JR., STALLWORTH BS, EGELAND DB, DELCARPIO JB, BAHINSKI A, IZZO NJ, JR. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 2979-2984.
- CONRAD ME, BARTON JC (1980). Anemia and iron kinetics in alcoholism. *Semin Hematol*, **17**: 149-163.
- CONRAD ME, BARTON JC (1981). Factors affecting iron balance. *Am J Hematol*, **10**: 199-225.
- DE LEON M, WANG Y, JONES L, PEREZ-REYES E, WEI X, SOONG TW, SNUTCH TP, YUE DT (1995). Essential Ca(2+)-binding motif for Ca(2+)-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels. *Science*, **270**: 1502-1506.
- DOLPHIN AC (2018). Voltage-gated calcium channels: their discovery, function and importance as drug targets. *Brain Neurosci Adv*, **2**
- ELIES J, SCRAGG JL, BOYLE JP, GAMPER N, PEERS C (2016). Regulation of the T-type Ca(2+) channel Cav3.2 by hydrogen sulfide: emerging controversies concerning the role of H₂S in nociception. *J Physiol*, **594**: 4119-4129.
- FELITTI VJ, BEUTLER E (1999). New developments in hereditary hemochromatosis. *Am J Med Sci*, **318**: 257-268.
- GALANELLO R, ORIGA R (2010). Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis*, **5**: 11.
- GUJJA P, ROSING DR, TRIPODI DJ, SHIZUKUDA Y (2010). Iron overload cardiomyopathy: better understanding of an increasing disorder. *J Am Coll Cardiol*, **56**: 1001-1012.
- HENTZE MW, MUCKENTHALER MU, GALY B, CAMASCHELLA C (2010). Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*, **142**: 24-38.
- HERSHKO C (2010). Pathogenesis and management of iron toxicity in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci*, **1202**: 1-9.
- IFTINCA MC, ZAMPONI GW (2009). Regulation of neuronal T-type calcium channels. *Trends Pharmacol Sci*, **30**: 32-40.
- IMREDY JP, YUE DT (1994). Mechanism of Ca(2+)-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels. *Neuron*, **12**: 1301-1318.
- JOSEPHSON RA, SILVERMAN HS, LAKATTA EG, STERN MD, ZWEIER JL (1991). Study of the mechanisms of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced cellular injury and calcium overload in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, **266**: 2354-2361.
- KANEKO M, BEAMISH RE, DHALLA NS (1989a). Depression of heart sarcolemmal Ca²⁺-pump activity by oxygen free radicals. *Am J Physiol*, **256**: H368-374.
- KANEKO M, ELIMBAN V, DHALLA NS (1989b). Mechanism for depression of heart sarcolemmal Ca²⁺ pump by oxygen free radicals. *Am J Physiol*, **257**: H804-811.
- KHAMSEEKAEW J, KUMFU S, CHATTIPAKORN SC, CHATTIPAKORN N (2016). Effects of Iron Overload on Cardiac Calcium Regulation: Translational Insights Into Mechanisms and Management of a Global Epidemic. *Can J Cardiol*, **32**: 1009-1016.
- KREMASTINOS DT, FARMAKIS D (2011). Iron overload cardiomyopathy in clinical practice. *Circulation*, **124**: 2253-2263.

- KUMFU S, CHATTIPAKORN S, CHINDA K, FUCHAROEN S, CHATTIPAKORN N (2012). T-type calcium channel blockade improves survival and cardiovascular function in thalassemic mice. *Eur J Haematol*, **88**: 535-548.
- KUMFU S, CHATTIPAKORN S, SRICHAIRATANAKOOL S, SETTAKORN J, FUCHAROEN S, CHATTIPAKORN N (2011). T-type calcium channel as a portal of iron uptake into cardiomyocytes of beta-thalassemic mice. *Eur J Haematol*, **86**: 156-166.
- KURYSHEV YA, BRITTENHAM GM, FUJIOKA H, KANNAN P, SHIEH CC, COHEN SA, BROWN AM (1999). Decreased sodium and increased transient outward potassium currents in iron-loaded cardiac myocytes. Implications for the arrhythmogenesis of human siderotic heart disease. *Circulation*, **100**: 675-683.
- LANE DJ, MERLOT AM, HUANG ML, BAE DH, JANSSON PJ, SAHNI S, KALINOWSKI DS, RICHARDSON DR (2015). Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: Key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochim Biophys Acta*, **1853**: 1130-1144.
- LAWEN A, LANE DJ (2013). Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxid Redox Signal*, **18**: 2473-2507.
- LIU P, OLIVIERI N (1994). Iron overload cardiomyopathies: new insights into an old disease. *Cardiovasc Drugs Ther*, **8**: 101-110.
- LOPIN KV, GRAY IP, OBEJERO-PAZ CA, THEVENOD F, JONES SW (2012). Fe(2)(+) block and permeation of CaV3.1 (alpha1G) T-type calcium channels: candidate mechanism for non-transferrin-mediated Fe(2)(+) influx. *Mol Pharmacol*, **82**: 1194-1204.
- MANGONI ME, TRABOULSIE A, LEONI AL, COUETTE B, MARGER L, LE QUANG K, KUPFER E, COHEN-SOLAL A, VILAR J, SHIN HS, ESCANDE D, CHARPENTIER F, NARGEOT J, LORY P (2006). Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. *Circ Res*, **98**: 1422-1430.
- MCLAREN GD, MUIR WA, KELLERMEYER RW (1983). Iron overload disorders: natural history, pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **19**: 205-266.
- MESIRCA P, TORRENTE AG, MANGONI ME (2015). Functional role of voltage gated Ca(2+) channels in heart automaticity. *Front Physiol*, **6**: 19.
- NELSON MT, JOKSOVIC PM, SU P, KANG HW, VAN DEUSEN A, BAUMGART JP, DAVID LS, SNUTCH TP, BARRETT PQ, LEE JH, ZORUMSKI CF, PEREZ-REYES E, TODOROVIC SM (2007). Molecular mechanisms of subtype-specific inhibition of neuronal T-type calcium channels by ascorbate. *J Neurosci*, **27**: 12577-12583.
- NILIUS B, TALAVERA K, VERKHRATSKY A (2006). T-type calcium channels: the never ending story. *Cell Calcium*, **40**: 81-88.
- NOWYCKY MC, FOX AP, TSIEN RW (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, **316**: 440-443.
- OLIVIERI NF (1999). The beta-thalassemias. *N Engl J Med*, **341**: 99-109.
- ONO K, IJIMA T (2005). Pathophysiological significance of T-type Ca²⁺ channels: properties and functional roles of T-type Ca²⁺ channels in cardiac pacemaking. *J Pharmacol Sci*, **99**: 197-204.
- ONO K, IJIMA T (2010). Cardiac T-type Ca(2+) channels in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, **48**: 65-70.
- OUDIT GY, SUN H, TRIVIERI MG, KOCH SE, DAWOOD F, ACKERLEY C, YAZDANPANAH M, WILSON GJ, SCHWARTZ A, LIU PP, BACKX PH (2003). L-type Ca²⁺ channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. *Nat Med*, **9**: 1187-1194.
- OUDIT GY, TRIVIERI MG, KHAPER N, LIU PP, BACKX PH (2006). Role of L-type Ca²⁺ channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy. *J Mol Med (Berl)*, **84**: 349-364.
- PANTOPOULOS K, PORWAL SK, TARTAKOFF A, DEVIREDDY L (2012). Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*, **51**: 5705-5724.
- PARSEY RV, MATTESON DR (1993). Ascorbic acid modulation of calcium channels in pancreatic beta cells. *J Gen Physiol*, **102**: 503-523.
- PELLOUX S, ROBILLARD J, FERRERA R, BILBAUT A, OJEDA C, SAKS V, OVIZE M, TOURNEUR Y (2006). Non-beating HL-1 cells for confocal microscopy: Application to mitochondrial functions during cardiac preconditioning. *Prog Biophys Mol Bio*, **90**: 270-298.
- PEREZ-REYES E (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev*, **83**: 117-161.
- PFAFFL MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**: e45.

- PIETRANGELO A (2004). Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med*, **350**: 2383-2397.
- POWELL LW, SUBRAMANIAM VN, YAPP TR (2000). Haemochromatosis in the new millennium. *J Hepatol*, **32**: 48-62.
- RADFORD-SMITH DE, POWELL EE, POWELL LW (2018). Haemochromatosis: a clinical update for the practising physician. *Intern Med J*, **48**: 509-516.
- ROSE RA, SELLAN M, SIMPSON JA, IZADDOUSTDAR F, CIFELLI C, PANAMA BK, DAVIS M, ZHAO D, MARKHANI M, MURPHY GG, STRIESSNIG J, LIU PP, HEXIMER SP, BACKX PH (2011). Iron overload decreases CaV1.3-dependent L-type Ca²⁺ currents leading to bradycardia, altered electrical conduction, and atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, **4**: 733-742.
- SHEFTEL AD, LILL R (2009). The power plant of the cell is also a smithy: the emerging role of mitochondria in cellular iron homeostasis. *Ann Med*, **41**: 82-99.
- SIRI-ANGKUL N, XIE LH, CHATTIPAKORN SC, CHATTIPAKORN N (2018). Cellular Electrophysiology of Iron-Overloaded Cardiomyocytes. *Front Physiol*, **9**: 1615.
- TAKEUCHI A, KIM B, MATSUOKA S (2013). The mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCLX, regulates automaticity of HL-1 cardiomyocytes. *Sci Rep*, **3**: 2766.
- TSUSHIMA RG, WICKENDEN AD, BOUCHARD RA, OUDIT GY, LIU PP, BACKX PH (1999). Modulation of iron uptake in heart by L-type Ca²⁺ channel modifiers: possible implications in iron overload. *Circ Res*, **84**: 1302-1309.
- VALERIO LG (2007). Mammalian iron metabolism. *Toxicol Mech Methods*, **17**: 497-517.
- VASSORT G, TALAVERA K, ALVAREZ JL (2006). Role of T-type Ca²⁺ channels in the heart. *Cell Calcium*, **40**: 205-220.
- WOOD JC (2008). Cardiac iron across different transfusion-dependent diseases. *Blood Rev*, **22 Suppl 2**: S14-21.
- XIA M, SALATA JJ, FIGUEROA DJ, LAWLOR AM, LIANG HA, LIU Y, CONNOLLY TM (2004). Functional expression of L- and T-type Ca²⁺ channels in murine HL-1 cells. *J Mol Cell Cardiol*, **36**: 111-119.
- XU KY, ZWEIER JL, BECKER LC (1997). Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ Res*, **80**: 76-81.
- YANG Z, MURRAY KT (2011). Ionic mechanisms of pacemaker activity in spontaneously contracting atrial HL-1 cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, **57**: 28-36.
- YOUNG I, PARKER HM, RANGAN A, PRVAN T, COOK RL, DONGES CE, STEINBECK KS, O'DWYER NJ, CHENG HL, FRANKLIN JL, O'CONNOR HT (2018). Association between Haem and Non-Haem Iron Intake and Serum Ferritin in Healthy Young Women. *Nutrients*, **10**
- ZEITZ O, MAASS AE, VAN NGUYEN P, HENSMANN G, KOGLER H, MOLLER K, HASENFUSS G, JANSSEN PM (2002). Hydroxyl radical-induced acute diastolic dysfunction is due to calcium overload via reverse-mode Na(+)-Ca(2+) exchange. *Circ Res*, **90**: 988-995.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Şeyma

Soyadı: ÖZBEK

Doğum yeri ve tarihi:

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji
Yerleşkesi Gıda, Metabolizma ve Klinik Beslenme Anabilim Dalı 06100, Sıhhiye,
Altındağ, Ankara, 0312 5958280

II- Eğitimi

Lisans: Kırklareli Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü

Ortaöğretim: Hasanoğlu Atatürk Anadolu Öğretmen Lisesi

İlköğretim: Çeltikçi İlköğretim Okulu

Yabancı dil: İngilizce

III- Bilimsel Etkinlikleri

Fare atrium kökenli HL-1 hücrelerinde in vitro şartlarda uzun süreli Fe^{+2} inkübasyonunun T-tipi Ca^{+2} kanalları ve aksiyon potansiyeli morfolojisine etkisi.
KANDİLCİ H.Burak (Doç.Dr.) TÜBİTAK, 219S111 (Yüksek Lisans öğrencisi).