

HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA KARVAKROLÜN KOBALT KlorÜR İLE İNDÜKLENEN KİMYASAL HİPOKSİDEKİ KORUYUCU ROLÜ

PROTECTIVE ROLE OF CARVACROL IN COBALT CHLORIDE-INDUCED CHEMICAL HYPOXIA IN CELL CULTURE MEDIA

Ahmi ÖZ¹

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

Cite this article as: Öz A. Hücre Kültürü Ortamında Karvakrolün Kobalt Klorür ile İndüklenen Kimyasal Hipoksidedeki Koruyucu Rolü. Med J SDU 2023; 30(3): 354-361.

Öz

Amaç

Hipoksi nöronal hasar açısından en önemli faktörlerden biridir. Nöronlarda eksprese edilen TRPM7 katyon kanallarının hipoksi ve hücrel pH değişimleri dahil birçok faktörle aktive olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu çalışmada deneysel çalışmalarda hipoksi modeli oluşturmak için sıklıkla kullanılan kobalt klorür (CoCl₂) ile indüklenen in vitro hipoksi modelinde TRPM7 katyon kanallarının güçlü blokörü karvakrolün hücrel sağkalım ve ölüm parametreleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

SH-SY5Y hücreleri kültür flasklarında çoğaltıldı. Hücrelere hipoksi uygulaması için 200 µM CoCl₂ içeren medyum ile 24 saat inkübasyon yapıldı. Karvakrolün etkisinin sınındığı grupta ise hücreler TRPM7 kanal inhibisyonunu sağlamak üzere 1 saat karvakrol (250 µM) içeren medyum ile inkübe edildikten sonra hipoksi uygulanarak inkübasyon tamamlandı. Ardından kültür kaplarından kaldırılan hücreler, apoptoz testi, MTT hücre canlılığı analizi, reaktif oksijen türleri (ROT) üretimi tayini, mitokondriyal membran depolarizasyonu (MMD) tayini ve kaspaz 3, 8 ve 9 enzim aktiviteleri tayini yapıldı.

Bulgular

Kontrolle kıyasla hipoksi uygulaması yapılan grupta hücre canlılığı azalırken canlılığın azaldığını gösteren diğer parametrelerde (apoptoz, ROT üretimi, MMD ve kaspaz aktivitelerinde) artış olduğu belirlendi. Karvakrol ön inkübasyonu sonrasında CoCl₂ ile hipoksi uygulanan grupta ise hücrel canlılığın düştüğünü gösteren parametrelerin yalnız CoCl₂ uygulanan gruba kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı gözlemlendi.

Sonuç

Karvakrol uygulaması ile hipoksik koşulların ortaya çıkardığı anormal hücrel hasar durumu ve hücrel ölüm mekanizmaları yavaşlatılabilmektedir. TRPM7 katyon kanal ekspresyonu iyi bilinen SH-SY5Y hücrelerinde karvakrolün olumlu etkilerinin daha çok TRPM7 kanalları aracılı gerçekleştiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hipoksi, Karvakrol, Nöronkoruma, TRPM7 Katyon Kanalı

Abstract

Objective

Hypoxia is among the most important factors regarding to neuronal injury. TRPM7 cation channels,

Sorumlu yazar ve iletişim adresi / Corresponding author and contact address: A. Ö. / ahmioz@sdu.edu.tr

Müracaat tarihi/Application Date: 08.03.2023 • Kabul tarihi/Accepted Date: 05.07.2023

ORCID IDs of the authors: A.Ö: 0000-0003-1881-8460

which are expressed in neurons, and it is well known that TRPM7 channels are activated by many factors including hypoxia and cellular pH changes. Therefore, in this study, it was aimed to investigate the effect of carvacrol, a potent inhibitor of TRPM7 cation channels, on cellular survival and apoptotic parameters in an in vitro hypoxia model induced by cobalt chloride (CoCl₂), which is frequently used to do hypoxia in experimental studies.

Material and Method

The SH-SY5Y cells were grown in cell culture flasks. Cells were incubated for 24 hours with medium containing 200 µM CoCl₂ to induction of hypoxia. In the group, in which the effect of carvacrol was tested, the cells were incubated with a medium containing carvacrol (250 µM) for 1 h to TRPM7 channel inhibition, and the incubation was completed by applying hypoxia for 24 h. Then, the cells detached from the culture flasks and apoptosis test, MTT cell viability analysis, reactive oxygen species (ROT) production determination, mitochondrial membrane depolarization (MMD) determination and caspase 3,

8 and 9 enzyme activities were performed.

Results

It was demonstrated that while cell viability decreased in the hypoxia-induced group compared to the control, there was an increase in other parameters (apoptosis, ROS production, MMD and caspase activities) that reduced to cell viability. It was observed that the parameters reducing cellular viability were significantly decreased in the hypoxia-treated group upon carvacrol pre-incubation compared to the CoCl₂ group.

Conclusion

Carvacrol administration can be slowed down to abnormal cellular damage and cell death mechanisms caused by hypoxic conditions. It is thought that the positive effects of carvacrol in SH-SY5Y cells, whose TRPM7 cation channel expression is well known, are mediated by mostly TRPM7 channels.

Keywords: Carvacrol, Hypoxia, Neuroprotection, TRPM7 Cation Channel

Giriş

Kan oksijen düzeylerinin eşik altına düşmesiyle dokulara yetersiz oksijen gönderimi ile ortaya çıkan durum hipoksi olarak tanımlanmaktadır (1). Nöronal hücre hasarının başlıca faktörlerinden biri de hipoksidir. Hipoksik koşulların deneysel olarak indüklenebilmesi için hipoksik kabinlerin yanı sıra yaygın olarak literatürde kullanılan bir diğer yöntem de kobalt klorür (CoCl₂) uygulamasıdır (2). Aşırı reaktif oksijen türleri (ROT) üretimi, oksidatif stres ve hipoksi indükleyici faktör-1 alfa (HIF-1α) ekspresyonu artışı gibi fiziksel hipoksiye bağlı hücrel ve moleküler değişiklikler CoCl₂ uygulaması ile de ortaya çıktığından bu yaklaşım kimyasal hipoksi modeli olarak bilinmektedir (3). HIF-1α aynı zamanda bir transkripsiyon faktörüdür ve hipoksik koşullarda çeşitli gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol alır (4).

Geçici reseptör potansiyeli (TRP) katyon kanal ailesinin melastatin alt ailesine mensup TRPM7 kanalları ise hipoksinin de içinde bulunduğu bir dizi çevresel faktörden etkilenmektedir (5). Kapılanma mekanizmasına bakıldığında pH, hipoksi, oksidatif stres ve kolesterol gibi fiziksel faktörler ve kimyasal ajanlarla aktive olabilen bu kanalların bilinen en etkili antagonistlerinden biri de karvakroldür (6, 7). Karvakrol, kekik ve hardal türleri gibi çoğu aromatik bitki esansiyel yağın-

da bulunan fenolik yapıda bileşiktir (8). Karvakrolün antioksidan (9), antibakteriyel (10), antimikrobiyal (11) ve anti-enflamatuvar (12) etkileri üzerine çeşitli araştırmalar literatürde mevcuttur. Karvakrolün etkin bir TRPM7 antagonisti olarak kullanılabileceği ve bu kanallar üzerinde kapatacıcı etkiye sahip olduğu da bir süredir bilinmektedir (13). TRP kanalları ve karvakrol üzerine yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada ise karvakrolün TRPM7'nin yanı sıra TRPM2 ve TRPV4 katyon kanallarının da antagonisti olarak kullanılabileceğine dikkat çekilmiştir (14). SH-SY5Y hücreleri ise hem kolinerjik hem de dopaminerjik nöron benzeri nörokimyasal yapılarından dolayı nörolojik hastalıkların araştırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır (15). Ayrıca TRPM7 ve TRPV4 katyon kanallarının da içinde bulunduğu TRP ailesine üye kanallardan bazıları SH-SY5Y hücrelerinde doğal olarak eksprese edilmektedir (16). Son yıllarda yapılan çalışmalarda TRPM7 kanallarının açılma-kapanma mekanizmasının düzenlenmesiyle kanseri de içeren çeşitli patolojilerde etkili sonuçlar alınabileceği de vurgulanmaktadır (17, 18). Ancak literatürde CoCl₂ ile başlatılan hipokside TRPM7 kanallarının olası rolünü araştıran sınırlı sayıda çalışma olduğundan bu çalışmada güçlü bir TRPM7 kanal antagonisti olan karvakrolün CoCl₂ ile başlatılan hipoksideki olası etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

SH-SY5Y hücre hattı (CRL-2266, ATCC, ABD) 1:1 DMEM:HAM'S F12 (D8437, Sigma Aldrich, ABD) bazal medyumunu, fetal sıgır serumu (FBS, F7524, Sigma Aldrich, ABD) ve Penisilin-Streptomisin (P4458, Sigma Aldrich, ABD) antibiyotik solüsyonu ile hazırlanan büyütme medyumunda kültüre edildi (37 °C sıcaklık ve %5 CO₂). Sayıları eşit şekilde flasklara ekilen hücreler ilk 24 saat inkübasyondan sonra flasklar gruplara ayrılarak kimyasal inkübasyon çalışmalarına başlandı. Gruplar 1- Kontrol, 2- CoCl₂, 3- Karvakrol+ CoCl₂ olacak şekilde belirlendi. Kontrol grubu büyütme medyumunda herhangi bir kimyasal madde ile inkübe edilmezken, ikinci grup 200 µM CoCl₂ (C8661, Sigma Aldrich, ABD) ile 24 saat inkübe edildi (2). Üçüncü grup ise önce 250 µM karvakrol ile 1 saat inkübasyon sonrasında 200 µM CoCl₂ içeren medyuma geçilerek inkübasyonu 24 saate tamamlandı. Tüm inkübasyonlar tamamlanınca deneysel analizlere geçildi. Her gruba ait protein absorbans değerleri Bradford reaktifi kullanılarak belirlendi. Analiz sonuçları protein değerlerine nispetle normalize edildi (19).

Hücre Canlılığı Analizi

Grupların inkübasyonlarından sonra hücre canlılığını belirlemede MTT testi kullanılmıştır. Mitokondriyal aktivitesi yüksek olan hücrelerde MTT boyası (M2128, Sigma Aldrich, ABD) ile 37 °C de 90 dk inkübe edilen hücrelerde boyama tamamlanınca suda çözünmeyen formazan kristalleri oluşmaktadır. Dimetil sülfoksit (D8418, Sigma Aldrich, ABD) ile çözdürülen kristaller kuyucuk okuyucu cihazında (Tecan Infinite M200 Pro, Avusturya) 490 nm (referans) ve 650 nm dalga boylarında okumalar yapılarak alınan veriler kontrole nispetle grafiklendirilmiştir (20). 96'lık plakada (Costar, ThermoFisher Sci., ABD) yapılan hücre canlılık testi için hücreler kuyucuk başına ~5x10³ hücre olacak şekilde ekildi. Bir gece inkübatörde bekletilen plakada kuyucuklar gruplara ayrılıp inkübasyon yapıldı. Bu gruplar; Kontrol, CoCl₂ (200 µM, 24 saat), Karvakrol (250 µM, 24 saat), Karvakrol (250 µM, 1 saat), Rutenyum Kırmızısı (RuRed, 1 µM, 24 saat), RuRed (1 µM, 1 saat), Karvakrol+CoCl₂ (önce 1 saat 250 µM Karvakrol ardından 200 µM CoCl₂ ile 24 saat inkübasyon), RuRed+CoCl₂ (önce 1 saat 1 µM Rutenyum Kırmızısı ardından 200 µM CoCl₂ ile 24 saat inkübasyon) gruplarıdır.

Apoptoz Testi

Hücresel apoptoz seviyelerinin belirlenebilmesi amacıyla Bicolor Apopercantage Dye (Belfast, Kuzey İrlanda) kullanılmıştır. Bu test plazma membran bütünlüğü bozulan hücrelerin apoptoz boyası ile daha fazla boyanması sonucu hücrelerin içerisine biriken

boyadan daha fazla absorbans eldesi prensibine dayanmaktadır. Sonuçta daha fazla boyanan hücreler daha koyu renk ve yüksek absorbans vereceğinden grupların inkübasyonlarından sonra kaldırılan hücreler 37 °C de 30 dk apoptoz boyası inkübasyonundan sonra hücrelerden kuyucuk okuyucu cihazında 550 nm dalga boyunda okumalar yapılarak alınan veriler kontrole nispetle grafiklendirilmiştir (21).

Promotör Analizi

TRP kanallarından antagonisti karvakrol olan TRPM7 ve TRPV4'ün insan gen dizisi üzerindeki HIF1-α bağlanma bölgeleri ökaryotik promotör veri tabanı (<https://epd.epfl.ch/>) kullanılarak sorgulanmıştır (25). Genlerin transkripsiyonun başladığı -1000 ve +100 baz bölgesi içindeki muhtemel HIF1- α bağlanma noktaları varsayılan p değeri 0.001 olarak belirlenip gösterilmiştir.

Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu

(MMD) Tayini

Mitokondrilerde membran potansiyeli değişimine göre mitokondrilerde birikebildiğinden JC-1 (420200, Sigma Aldrich, ABD) boyası MMD tayini için hücresel oksidatif parametrelerin konu edildiği çalışmalarda ve iyon kanalı araştırmalarında sıklıkla kullanılan testlerdendir. Grupların inkübasyonlarından sonra kaldırılan hücreler MMD tayininde JC-1 floresan boyası ile 37 °C de 30 dk inkübe edilip boyama sonunda kuyucuk okuyucuda 488 nm dalga boyu uyarım (eksitasyon), 590 nm (JC-1 kümeleşmeleri) ve 525 nm (JC-1 monomerleri) yayılım (emisyon) dalga boylarında okunup yayılımların oranıyla (590/525) veriler hesaplandı. Alınan veriler kontrole nispetle grafiklendirilmiştir (22).

Reaktif Oksijen Türleri (ROT) Üretimi Tayini

Grupların inkübasyonlarından sonra kaldırılan hücrelerdeki ROT üretimini belirlemek için dihidrorodamin-123 (DHR-123, D1054, Sigma Aldrich, ABD) boyası kullanılmıştır. Bu boyanın uygulama prensibi ise floresan ışımaya yapmayan formunun (DHR-123) ROT varlığında floresan rodamin-123 formuna dönüşmesiyle floresan okumalar yapılarak ROT düzeylerine dair veriler sağlanmasıdır. Boya ile 37 °C de 30 dk inkübasyon tamamlanınca kuyucuk okuyucu cihazında 488 nm eksitasyon (uyarım), 530 nm ve 590 nm emisyon (referans) dalga boylarında okumalar yapılarak alınan veriler kontrole nispetle grafiklendirilmiştir (23).

Kaspaz 3, 8 ve 9 Enzim Aktiviteleri Tayini

Grupların inkübasyonlarından sonra kaldırılan hücrelerdeki kaspaz enzim aktivitelerini tayin etmek için hücreler enzimlerin substratlarından oluşan solüsyonla inkübe edildi. Ardından enzim inhibitörleri uygulanarak hücresel kaspaz 3, 8 ve 9 enzimatik aktivite-

leri 360 nm uyarım (eksitasyon) ve 460 nm yayılım (emiyon) dalga boylarında kuyucuk okuyucu cihazında okumalar yapılarak alınan veriler kontrole nispetle grafiklendirilmiştir (24).

İstatistiksel Analiz

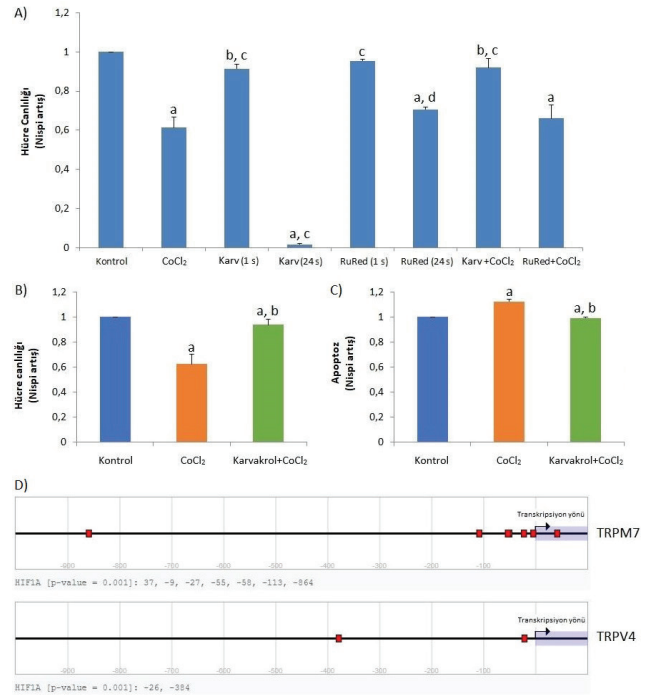
Deneysel sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edildi (SD). Gruplar arasındaki farklılıkların önemi tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) testi ile değerlendirildi. Veriler SPSS, sürüm 13 (SPSS Inc., Chicago, ABD) kullanılarak analiz edildi ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Hücre Canlılığı Analizi Bulguları

96'lık kuyucukta yapılan inkübasyonlardan sonra hücrelerden alınan MTT hücre canlılığı verileri Şekil 1A'da sunulmuştur. Buna göre CoCl_2 (200 μM , 24 saat) uygulamasının hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir. 24 saat 250 μM karvakrol uygulamasının ise hücre canlılığını ciddi ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Kısa süre karvakrol (250 μM , 1 saat) uygulamasından sonra taze medyum ile 24 saat inkübasyonu tamamlanan grupta ise kontrole kıyasla anlamlı bir hücre canlılık değişimi saptanmamıştır. Spesifik olmayan TRPV4 antagonisti RuRed ile TRPV4 kanallarının da etkinliği araştırılmaya çalışılmıştır. Buna göre 24 saat 1 μM RuRed uygulamasının hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir. Kısa süre RuRed (1 μM , 1 saat) uygulamasından sonra taze medyum ile 24 saat inkübasyonu tamamlanan grupta ise kontrole kıyasla anlamlı bir hücre canlılık değişimi saptanmamıştır. Karvakrol+ CoCl_2 (önce 1 saat 250 μM Karvakrol ardından 200 μM CoCl_2 ile 24 saat inkübasyon) grubunda ise CoCl_2 'nin neden olduğu hücre ölümünün karvakrol tarafından baskılandığı ve kontrol düzeylerine yaklaştığı gözlenmiştir. RuRed+ CoCl_2 (önce 1 saat 1 μM RuRed ardından 200 μM CoCl_2 ile 24 saat inkübasyon) grubunda ise CoCl_2 'nin neden olduğu hücre ölümünün RuRed tarafından onarılamayıp yalnız CoCl_2 grubundakine benzer seviyelerde canlılık ölçülmüştür.

Şekil 1B'de sunulan MTT hücre canlılığı analizi bulgularında ise üç grup halinde (Kontrol, CoCl_2 , Karvakrol+ CoCl_2) flaskta çalışılan hücrelerde benzer sonuçlar alınmıştır. Hücre canlılık seviyelerinin ölçülmesiyle CoCl_2 ile oluşturulan hipoksi modelinin kontrole kıyasla hücre canlılığı azalttığı, karvakrol uygulamasından sonra hipoksiye maruz bırakılan grupta ise belirgin ölçüde hücre canlılıkta artış ve kontrol grubu seviyelerine yakınlaşma görülmüştür. Elde edilen veriler apoptoz testi bulgularıyla örtüşmektedir.



Şekil 1

SH-SY5Y hücrelerinin 96'lık plakaya ekilmesiyle elde edilen hücre canlılığı testi bulguları (A) (a: $p < 0,001$ Kontrol grubuna kıyasla, b: $p < 0,05$ Kontrol grubuna kıyasla, c: $p < 0,001$ CoCl_2 grubuna kıyasla, d: $p < 0,01$ CoCl_2 grubuna kıyasla). Yalnızca hipoksi ve karvakrol ön inkübasyonu üzerine hipoksi uygulaması ile oluşan gruplara ait MTT hücre canlılığı testi (B) ve apoptoz testi (C) bulguları (a: $p < 0,001$ Kontrol grubuna kıyasla, b: $p < 0,001$ CoCl_2 grubuna kıyasla). Karvakrolün antagonist etki yaptığı insan TRPM7 ve TRPV4 katyon kanallarının promotör bölgeleri üzerindeki olası HIF1- α transkripsiyon faktörü bağlanma noktalarının gösterimi. TRPM7 promotörü üzerinde 7, TRPV4 promotörü üzerinde 2 bağlanma bölgesi kırmızı kutu ile gösterilmiştir (D).

Apoptoz Testi Bulguları

Apoptoz testi bulgularına ait veriler Şekil 1C'de sunulmuştur. Hücre apoptoz seviyelerinin ölçülmesiyle CoCl_2 ile oluşturulan hipoksi modelinin kontrole kıyasla hücre apoptozunu artırdığı gözlenmiştir. Karvakrol uygulamasından sonra hipoksiye maruz bırakılan grupta ise belirgin ölçüde apoptozda gerileme ve kontrol grubu seviyelerine yakınlaşma görülmüştür.

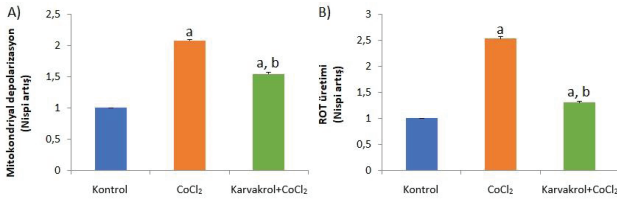
Promotör Analizi Bulguları

İnsan TRPM7 ve TRPV4 gen dizileri üzerindeki HIF1- α bağlanma bölgeleri belirlenmiş ve Şekil 1D'de sunulmuştur. Transkripsiyonun başladığı -1000 ile +100 bazlar arasında kalan promotör bölgesinde ökaryotik promotör veri tabanı üzerindeki JASPAR

2018 eklentisi ile yapılan inceleme sonucunda HIF1- α 'nın olası bağlanma bölgeleri araştırılmıştır. Bu analiz sonucunda hem TRPM7 hem de TRPV4 kanal gen dizisi üzerinde HIF1- α 'nın bağlanma bölgesi olduğu tespit edilmiştir.

MMD Tayini Bulguları

MMD tayini bulguları Şekil 2A'da sunulmuştur. Hücrel MMD seviyelerinin ölçülmesiyle CoCl_2 ile oluşturulan hipoksi modelinin hücrel MMD seviyelerini kontrole kıyasla ciddi ölçüde artırdığı gözlenmiştir. Karvakrol uygulamasından sonra hipoksiye maruz bırakılan grupta ise belirgin ölçüde MMD gerilemesi izlenmesine rağmen bu seviyelerin halen kontrole kıyasla yüksek olduğu değerlendirilmiştir.



Şekil 2

SH-SY5Y hücrelerine yalnız hipoksi ve karvakrol ön inkübasyonu üzerine hipoksi uygulaması ile oluşan gruplara ait mitokondriyal membran depolarizasyonu testi (A) ve ROT üretimi tayini analizi (B) bulguları (a: $p < 0,001$ Kontrol grubuna kıyasla, b: $p < 0,001$ CoCl_2 grubuna kıyasla).

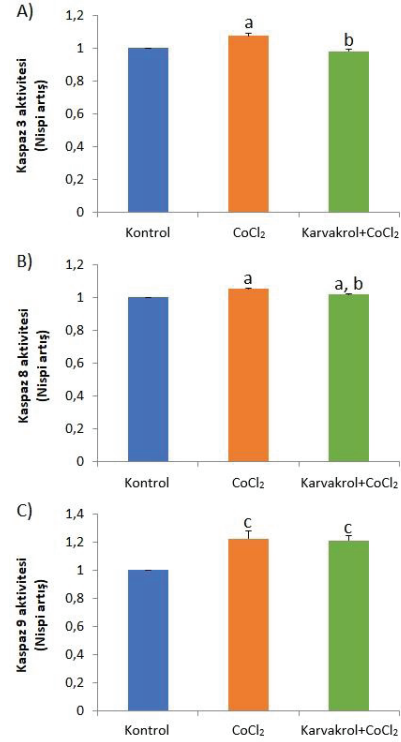
ROT Üretimi Tayini Bulguları

ROT üretimi tayini bulguları Şekil 2B'de sunulmuştur. Hücrel ROT üretimi seviyelerinin ölçülmesiyle CoCl_2 ile oluşturulan hipoksi modelinin hücrel ROT üretim seviyelerini kontrole kıyasla önemli düzeyde artırdığı gözlenmiştir. Karvakrol uygulamasından sonra hipoksiye maruz bırakılan grupta ise belirgin ölçüde ROT üretiminde düşüş izlenmesine rağmen bu seviyelerin halen kontrole kıyasla yüksek olduğu değerlendirilmiştir.

Kaspaz 3, 8 ve 9 Enzim Aktiviteleri Tayini Bulguları

Kaspaz enzimlerine ait enzimatik aktivite bulguları Şekil 3'te sunulmuştur. Hücrel kaspaz 3 (Şekil 3A), kaspaz 8 (Şekil 3B) ve kaspaz 9 (Şekil 3C) enzimatik aktivite düzeylerinin ölçülmesiyle CoCl_2 ile oluşturulan hipoksi modelinin hücrel kaspaz 3, 8 ve 9 enzimlerinin aktivitesini kontrole kıyasla önemli düzeyde artırdığı gözlenmiştir. Karvakrol uygulamasından sonra hipoksiye maruz bırakılan grupta kaspaz 3 aktivitesini tamamen kontrol seviyelerine indirdiği gözlenmiştir. Kaspaz 8 aktivitesinin kontrol seviyelerine yaklaştığı göz-

lenirken kaspaz 9 aktivitesinde kontrole kıyasla halen CoCl_2 de olduğu gibi yüksek seviyelerde seyrettiği değerlendirilmiştir.



Şekil 3

SH-SY5Y hücrelerine yalnız hipoksi ve karvakrol ön inkübasyonu üzerine hipoksi uygulaması ile oluşan gruplara ait kaspaz 3 (A), kaspaz 8 (B) ve kaspaz 9 (C) enzim aktivite tayini bulguları (a: $p < 0,001$ Kontrol grubuna kıyasla, b: $p < 0,001$ CoCl_2 grubuna kıyasla, c: $p < 0,005$ Kontrol grubuna kıyasla).

Tartışma

Oksijen tüketimi, normal fizyolojik oksijen koşulları altında hücrelerin enerji ihtiyacını sağlayan en önemli hücrel metabolik süreçlerden biridir. Nöronal hücreler yüksek oksijen tüketim ihtiyacı nedeniyle hipoksiye karşı hassasiyet göstermektedir. Deneysel hipoksinin kimyasal modeli olan CoCl_2 uygulaması sıklıkla araştırmalarda kullanılmaktadır. Deneysel modellerin bir özelliği de patolojik belirteçleri yansıtabilmesidir (26). CoCl_2 uygulamasının hipoksi belirteci olan HIF-1 α ekspresyonunu artırdığı ve hipoksik koşulları yansıttığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (27,28). Hipoksi ile HIF-1 proteininin ekspresyon artışı ve HIF-1 ile indüklenen düzenleyici gen ekspresyonlarının tetiklenmesi doku oksijen konsantrasyonunun azalmasına karşı hücrenin hayatta kalmasını sağlamak için çeşitli hücre içi adaptif sinyal yollarını aktive edilmektedir (29,30). Hücrede ROT'un aşırı üretimi-

nin iki ana nedeni, yüksek miktarda oksijen tüketimi ve hücrel oksidan durumunu etkileyen hipoksidir. Hipoksik koşulların hücrel ROT düzeylerini artırdığı da bilinmektedir. Son elektron alıcısı olan moleküler oksijenden yoksunluk elektron taşınmasındaki aksamalar nedeniyle mitokondriyal ROT üretimi artışına sebep olmaktadır (31). ROT'un hücrel metabolik fonksiyonları düzenleyen lipitler, nükleik asitler ve proteinler gibi organik yapısal bileşenler üzerinde yıkıcı etkileri vardır. TRP kanal ailesinin ROT'a duyarlı kanal tiplerini barındırması bu kanalları potansiyel terapötik hedef haline getirmektedir (32). Karvakrol TRPM7'nin en sık kullanılan antagonisti olmasına rağmen güncel çalışmalar karvakrolün TRPV4 gibi başka kanallar üzerine de etkili olabileceği üzerinde durmaktadır (33). TRPM7'nin farklı antagonistlerinin konu edildiği diğer çalışmalarla kıyaslandığında çalışmamızdan elde edilen karvakrol inkübasyonuna bağlı hücre canlılığında artma ve apoptozun azalması bulgularına benzer sonuçların alınmış olması karvakrol uygulamasıyla hipoksi tahribatındaki azalma ve diğer hücrel parametrelerdeki değişimlerin hipoksiye duyarlı aktivasyon gösterebilen TRPM7 katyon kanalları aracılığı olduğunu düşündürmektedir (34). Transkripsiyon faktörleri, gen ekspresyonunun başlatılması için gen üzerinde belirli dizilere bağlanabilen ve RNA polimerazın transkripsiyona başlayacağı bölgeleri işaretleyen proteinlerdir. Hipoksik koşullarda ekspresyonu artan ve hücrede biriken HIF-1 α da bir transkripsiyon faktörüdür (35). Yapılan biyoinformatik incelemede HIF1- α 'nın hem TRPM7 hem de TRPV4 katyon kanallarının promotör bölgelerinde farklı sayıda olası bağlanma bölgeleri olabileceğini göstermiştir. Ancak hücre canlılığı verilerinden hareketle rutenyum kırmızısı uygulamasıyla TRPV4 inhibisyonunun CoCl_2 ile indüklenen hipoksizde karvakrolün hücre canlılığı üzerine olan koruyucu etkisi kadar etkili olmadığını gözlenmiştir. TRPM7 katyon kanalları ise hipoksinin yanı sıra ROT'a duyarlı aktivasyon gösterebilen kanallardandır (36). TRPM7 katyon kanallarının aşırı aktivasyonu ile hücrel apoptoz mekanizmaları üzerine doğru orantılı bir ilişki bulunmaktadır (5). TRPM7 katyon kanalları hücre canlılığı ve özellikle embriyonal gelişim süreçlerinde önemli kanallardandır. TRPM7'nin delesyonu embriyonal gelişimi olumsuz etkilediği bilinmektedir (37). Ayrıca TRPM7 katyon kanalları ile ilgili yapılmış araştırmalar nöronlarda da eksprese edilen bu kanalların hücre sağkalımı üzerinde rolü olabileceğini göstermiştir (38). Benzer şekilde siRNA uygulamaları ile ekspresyonu baskılandığında da hücrel canlılıkta anlamlı azalmalar görülebilmektedir (16). Bu gibi nedenlerle TRPM7 temelli stratejilerde genom düzenleme metotları yerine farmakolojik inhibisyon yöntemleri de ön plana çıkmaktadır. TRPM7 katyon kanallarını far-

makolojik olarak inhibe etmenin hipoksik koşullarda nöronlardan nörit uzantılarını geri çekme davranışını azalttığı bildirilmiştir. Hipoksinin nöronlara bu olumsuz etkisini azaltmada TRPM7 kanal inhibisyonunun önemi daha önce de vurgulanmıştır (5,39). Bir başka araştırmada ise karotis ligasyonu ile iskemiye maruz bırakılan yeni doğan farelere karvakrol uygulamasının beyin infarkt lezyon alanlarını, nöronal hücre ölümünü ve apoptotik markör protein ekspresyonlarını baskılamada etkili olduğu, karvakrol uygulanmayan gruplarda ise tam aksine sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (40). Benzer şekilde çalışmamızdan elde edilen bulgulara bakıldığında karvakrol uygulamasıyla SH-SY5Y hücrelerinde apoptozun azaldığı, kaspaz enzim aktivitelerindeki anlamlı farklılıklar, ROT üretiminin ve MMD'nin baskılanması ile hücrel canlılığın arttığı görülmektedir. Bu sonuçlar karvakrolün sadece fiziksel hipoksi veya iskemi uygulamasıyla etkili olmadığını aynı zamanda CoCl_2 ile başlatılan kimyasal hipoksi modelinde de benzer güçlü etkilere sahip olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca karvakrolün bu olumlu etkilerini güçlü antioksidan özelliğinin yanı sıra TRPM7 gibi katyon kanalları üzerindeki antagonistik etkisi ile olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak hipoksinin hücrel hasara sebep olan etkisini azaltmada TRPM7 kanal inhibitörlerinin ve karvakrolün önemi giderek artmaktadır. Bununla birlikte in vivo hayvan deneyleri ile small hairpin / small interfering RNA (sh/siRNA) temelli post-translasyonel modifikasyon yöntemleriyle de kanal ekspresyonlarının baskılandığı ve hipoksi modellerinin uygulandığı yeni araştırmalara halen ihtiyaç duyulmaktadır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Etik Kurul Onayı

Bu makale, insan veya hayvanlar üzerinde herhangi bir çalışma içermemektedir.

Finansman

Bu araştırma, kamu, ticari veya kar amacı gütmeyen sektörlerdeki finansman kuruluşlarından herhangi bir finansal destek almamıştır.

Verilerin Ulaşılabilirliği

Tüm veriler makalede ve/veya ek dosyalarda mevcuttur.

Yazar Katkıları

AÖ: Çalışmanın planlanması; Verilerin İşlenmesi, Formal Analizler, Araştırma, Metodoloji, Validasyon, Görüşeleştirme, Makalenin Yazımı.

Kaynaklar

- Span PN, Bussink J. Biology of hypoxia. *Semin Nucl Med.* 2015;45(2):101–9.
- Uğuz AC, Öz A, Yılmaz B, Altunbaş S, Çelik Ö. Melatonin attenuates apoptosis and mitochondrial depolarization levels in hypoxic conditions of SH-SY5Y neuronal cells induced by cobalt chloride (CoCl₂). *Turkish Journal of Biology.* 2015;39(6):896–903.
- Ardyanto TD, Osaki M, Tokuyasu N, Nagahama Y, Ito H. CoCl₂-induced HIF-1 α expression correlates with proliferation and apoptosis in MKN-1 cells: A possible role for the PI3K/Akt pathway. *Int J Oncol.* 2006;29(3):549–55.
- Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014;49(1):1–15.
- Sun HS. Role of TRPM7 in cerebral ischaemia and hypoxia. *Journal of Physiology.* 2017;595(10):3077–83.
- Sun Y, Sukumaran P, Varma A, Derry S, Sahmoun AE, Singh BB. Cholesterol-induced activation of TRPM7 regulates cell proliferation, migration, and viability of human prostate cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2014;1843(9):1839–50.
- Li M, Du J, Jiang J, Ratzan W, Su LT, Runnels LW, et al. Molecular Determinants of Mg²⁺ and Ca²⁺ Permeability and pH Sensitivity in TRPM6 and TRPM7s. *Journal of Biological Chemistry.* 2007;282(35):25817–25830.
- Bytqi-Damoni A, Kestane A, Taslimi P, Tuzun B, Zengin M, Bilgili HG, et al. Novel carvacrol based new oxypropanolamine derivatives: Design, synthesis, characterization, biological evaluation, and molecular docking studies. *J Mol Struct.* 2020;1202:1–12.
- Mastelic J, Jerkovic I, Blažević I, Poljak-Blaži M, Borović S, Ivančić-Baće I, et al. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *J Agric Food Chem.* 2008;56(11):3989–96.
- Xu J, Zhou F, Ji BP, Pei RS, Xu N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol.* 2008 Sep;47(3):174–9.
- López-Mata MA, Ruiz-Cruz S, Silva-Beltrán NP, Ornelas-Paz JDJ, Zamudio-Flores PB, Burrueal-Ibarra SE. Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with carvacrol. *Molecules.* 2013;18(11):13735–53.
- de Carvalho FO, Silva ÉR, Gomes IA, Santana HSR, do Nascimento Santos D, de Oliveira Souza GP, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activity of carvacrol in the respiratory system: A systematic review and meta-analysis. *Phytotherapy Research.* 2020;34(9):2214–29.
- Parnas M, Peters M, Dadon D, Lev S, Vertkin I, Slutsky I, et al. Carvacrol is a novel inhibitor of *Drosophila* TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell Calcium.* 2009;45(3):300–9.
- Nazıroğlu M. A novel antagonist of TRPM2 and TRPV4 channels: Carvacrol. *Metab Brain Dis.* 2022;37(3):711–28.
- Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener.* 2017;12(10):1–11.
- Öz A, Çelik Ö. The effects of neuronal cell differentiation on TRPM7, TRPM8 and TRPV1 channels in the model of Parkinson's disease. *Neurol Res.* 2022;44(1):24–37.
- Alanazi R, Nakatogawa H, Wang H, Ji D, Luo Z, Feng BGZ ping, et al. Inhibition of TRPM7 with carvacrol suppresses glioblastoma functions in vivo. 2022;(March):1483–91.
- Abumaria N, Li W, Clarkon AN. Role of the chanzyme TRPM7 in the nervous system in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2019;76(17):3301–10. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03124-2>
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1–2):248–54.
- Yazğan Y, Nazıroğlu M. Involvement of TRPM2 in the Neurobiology of Experimental Migraine: Focus on Oxidative Stress and Apoptosis. *Mol Neurobiol.* 2021;58(11):5581–601.
- Öz A, Çelik Ö, Övey İS. Effects of different doses of curcumin on apoptosis, mitochondrial oxidative stress and calcium influx in DBTRG glioblastoma cells. *Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress.* 2017;9(2):617–29.
- Çiğ B, Yıldızhan K. Resveratrol diminishes bisphenol A-induced oxidative stress through TRPM2 channel in the mouse kidney cortical collecting duct cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction.* 2020;40(6):570–83.
- Övey İS, Nazıroğlu M. Effects of homocysteine and memantine on oxidative stress related TRP cation channels in in-vitro model of Alzheimer's disease. *Journal of Receptors and Signal Transduction.* 2020;41(3):273–83.
- González D, Espino J, Bejarano I, López JJ, Rodríguez AB, Pariente JA. Caspase-3 and -9 are activated in human myeloid HL-60 cells by calcium signal. *Mol Cell Biochem.* 2010;333(1–2):151–7.
- Dreos R, Ambrosini G, Périer RC, Bucher P. The Eukaryotic Promoter Database: expansion of EPDnew and new promoter analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan;43:D92-6.
- Öz A. Experimental cell culture models for investigating neurodegenerative diseases. *J Cell Neurosci Oxid Stress.* 2019;11(2):835–51.
- Chen Y, Liu L, Xia L, Wu N, Wang Y, Li H, et al. TRPM7 silencing modulates glucose metabolic reprogramming to inhibit the growth of ovarian cancer by enhancing AMPK activation to promote HIF-1 α degradation. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.* 2022;41(1):1–19.
- Römmelt C, Munsch T, Drynda A, Lessmann V, Lohmann CH, Bertrand J. Periprosthetic hypoxia as consequence of TRPM7 mediated cobalt influx in osteoblasts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2019;107(6):1806–13.
- Ranjbar Taklimie F, Gasterich N, Scheld M, Weiskirchen R, Beyer C, Clarner T, et al. Hypoxia Induces Astrocyte-Derived Lipocalin-2 in Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar;20(6).
- Song S, Park JT, Na JY, Park MS, Lee JK, Lee MC, et al. Early expressions of hypoxia-inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor increase the neuronal plasticity of activated endogenous neural stem cells after focal cerebral ischemia. *Neural Regen Res.* 2014 May;9(9):912–8.
- Kung-Chun Chiu D, Pui-Wah Tse A, Law CT, Ming-Jing Xu I, Lee D, Chen M, et al. Hypoxia regulates the mitochondrial activity of hepatocellular carcinoma cells through HIF/HEY1/PINK1 pathway. *Cell Death Dis.* 2019 Dec;10(12):934.
- Öz A, Uğuz AC. Migren patogenezinde oksidatif strese duyarlı TRP kanallarının rolleri. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi.* 2016;22(4):144–50.
- Nazıroğlu M. A novel antagonist of TRPM2 and TRPV4 channels: Carvacrol. *Metab Brain Dis.* 2022;37(3):711–28. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00887-1>
- Sun HS, Horgen FD, Romo D, Hull KG, Kiledal SA, Fleig A, et al. Waixenicin A, a marine-derived TRPM7 inhibitor: a promising CNS drug lead. *Acta Pharmacol Sin.* 2020;41(12):1519–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41401-020-00512-4>
- Slemc L, Kunej T. Transcription factor HIF1A: downstream targets, associated pathways, polymorphic hypoxia response element (HRE) sites, and initiative for standardization of reporting in scientific literature. *Tumor Biology.* 2016;37:14851–61.
- Coombes E, Jiang J, Chu XP, Inoue K, Seeds J, Branigan D, et al. Pathophysiologically relevant levels of hydrogen peroxide induce glutamate-independent neurodegeneration that involves activation of transient receptor potential melastatin 7 channels. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(10):1815–27.
- Jin J, Desai BN, Navarro B, Donovan A, Andrews NC, Clapham DE. Deletion of *Trpm7* disrupts embryonic development and thymopoiesis without altering Mg²⁺ homeostasis. *Science (1979).* 2008;322(5902):756–60.

38. Sun Y, Sukumaran P, Singh BB. Magnesium-Induced Cell Survival Is Dependent on TRPM7 Expression and Function. *Mol Neurobiol.* 2020;57(1):528–38.
39. Turlova E, Ji D, Deurloo M, Wong R, Fleig A, Horgen FD, et al. Hypoxia-Induced Neurite Outgrowth Involves Regulation Through TRPM7. *Mol Neurobiol.* 2023;60(2):836–50. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12035-022-03114-9>
40. Chen W, Xu B, Xiao A, Liu L, Fang X, Liu R, et al. TRPM7 inhibitor carvacrol protects brain from neonatal hypoxic-ischemic injury. 2015;1–13.