

Patch Clamp Yönteminin Biyofiziksel Prensibi ve Tıpta Kullanımı

Dilek DÜZGÜN ERGÜN¹, Şefik DURSUN²

Öz

Patch clamp tekniği, özel bir mikroelektrot aracılığı ile hürelere temas ederek, hücre membran potansiyelinin istenen değere kenetlenmesi ile membrandan geçen iyonik akım değişiminin ya da akım kenetlenerek hücre membran potansiyel değişiminin kaydedildiği elektrobiyofiziksel bir ölçüm yöntemidir. Çalışmanın amacına göre; hücre üzerinde kayıt, tüm hücre kaydı, dışı dışarıda kayıt ve içi dışarıda kayıt olmak üzere dört farklı patch clamp uygulaması vardır. Kalsiyum (Ca^{2+}), magnezyum (Mg^{2+}), sodyum (Na^+) ve potasyum (K^+) gibi iyonların hücre membranından hücre içine girmesi sonucunda hücre içinde bu iyonların, özellikle Ca^{2+} iyonunun konsantrasyonunun artışı ya da azalmasına bağlı olarak ortaya çıkan hastalıkların oluşum mekanizmasının araştırılmasında patch clamp tekniği büyük önem taşımaktadır. Hücre hatlarında ve primer hücre kültürlerinde iyon kanallarından geçen iyonik akım değişimlerinin analiz edilmesi, aritmi, diyabet, epilepsi ve kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok hastalığın tedavisi amacı ile iyon kanallarının aktivatör ve inhibitörlerinin araştırılmasında patch clamp tekniği kullanım alanı bulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Elektrobiyofizik, iyon kanalları, voltaj clamp, patch clamp.

Biophysical Mechanisms and Medical Usage of Patch Clamp Technique

Abstrach

Patch clamp technique is an electrobiophysical measurement method in which the ionic current passing through the membrane is recorded by the desired value clamping of the cell membrane potential, or the membrane potential change is recorded by clamping the current value, by contacting the cells with a special microelectrode. For the purpose of the study; there are four different patch clamp applications: cell attached-on cell recording, whole-cell recording, outside-out recording, and inside-out recording. Patch clamp technique has an important role in the investigation of epidemiology of diseases that are caused by the decrease or increase of the concentrations of calcium (Ca^{2+}), magnesium (Mg^{2+}), sodium (Na^+) and potassium (K^+) ions in the cell. Patch clamp technique is used for the analysis of ionic current changes in ion channels in cell lines and primary cell cultures and the investigation of activators and inhibitors of ion channels for the treatment of many diseases such as arrhythmia, diabetes, epilepsy and cardiovascular diseases.

Keywords: *Electrobiophysics, ion channels, voltage clamp, patch clamp.*

¹ Dr. Dilek DÜZGÜN ERGÜN, İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul
Yazışma Adresi: İstanbul Aydın Üniversitesi, Beşyol Mahallesi İnönü Cad. No:38 34295 Küçükçekmece/İstanbul.
Tel: 444 1 428 e-posta: dilekergun@aydin.edu.tr

² Dr. Şefik DURSUN, Üsküdar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Fizyoterapi Bölümü, İstanbul

Hastalıkların Moleküler Mekanizmalarının Araştırılmasında Patch Clamp Tekniği

Hücreler, canlı organizmanın temel birimlerini oluşturur ve organizmanın çeşitli fonksiyonlarının gerçekleştirilmesinde hücre membranında bulunan reseptörler ve iyon kanalları ile gerçekleşen hücreler arası iletişim önemli rol alır (1-5). Sinir ve kas gibi uyarılabilir hücrelerde, iyon kanallarından iyonların ekstrasellüler-intrasellüler ortamlara geçişi sonucunda aksiyon potansiyeli, nörotransmitter salınımı ve kas kasılmasına yol açan elektriksel sinyaller oluşur. Ayrıca iyon kanalları kardiyovasküler sistemde kalp atımı, ağrı ve sinir sisteminde sinyal iletimi gibi pek çok mekanizmada hayati role sahiptir. Uyarılmayan hücreler ise, hormonal sekresyon, immün hücre duyarlılığı, hücre döngüsü ve iyon geçişi iyon kanalları aracılığı ile gerçekleşir (4-9). İlaç araştırmalarının yaklaşık % 50'sini G protein-bağlı reseptörler ile birlikte iyon kanalları oluşturmaktadır. Günümüzde aritmiler, diyabet, epilepsi, kardiyak hastalıklar, kistik fibroz gibi iyon kanal eksikliği ile direkt ilişkilendirilen yaklaşık 30 "kanalopati" tanımlanmıştır. Kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve epilepsi başta olmak üzere pek çok hastalığın moleküler mekanizmasının anlaşılması ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için hücreler arasındaki sinyal iletimini anlamak ve iyon kanallarının aktivatör/inhibitör mekanizmalarını araştırmak büyük önem taşımaktadır (5, 8, 10, 11).

Patch clamp teknolojisi, hücrelerin elektriksel değişimlerini, hücre membranında bulunan iyon kanallarının yapılarını, açılıp-kapanmalarını, geçirgenliklerini, dinamiğini ve farklı nörotransmitter ve kimyasal ajanlara verdikleri cevapları, hücre membran potansiyeli değişimini, kapasitansını ve sinyal iletimini analiz etmek amacı ile biyofizik, fizyoloji, farmakoloji ve nöroloji başta olmak üzere pek çok multidisipliner alanda yapılan araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (1, 5, 7, 12).

Elektrobiyofiziksel Tarihçe ve Kayıt Türleri

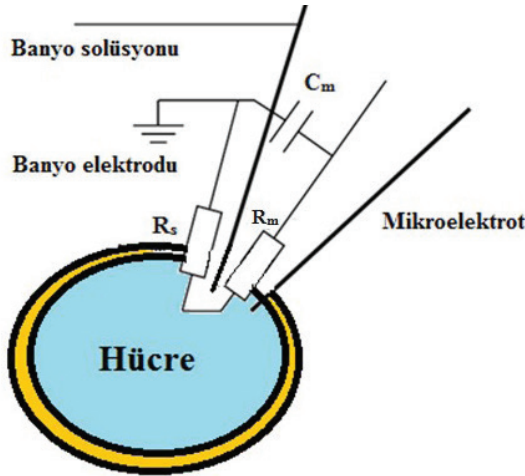
Elektrobiyofiziksel tariheye bakacak olursak, patch clamp tekniğinin geliştirilmesi uzun zaman almıştır ve öncesinde hücre özellikleri ve kayıt türlerine bakmak gerekir. Hücreler ve çoğu hücre içi organellerin bileşenleri nanoskala boyutundadır. Endoplazmik retikulum, nükleus, mitokondri membranı, golgi aygıtı, mikrotübüller, aktin ve

miyozin filamentleri gibi bütün hücresel yapılar sadece elektron mikroskobu veya 100 nm'den daha düşük oranda detaylı çözünürlük sağlayan teknikler ile görüntülenebilir (9-12). Hücre membranı, hücre sitoplazmasını içinde bulunduğu ekstrasellüler ortamdan 10 nm'lik bir yapı ile ayırır. Çift katlı lipid tabakasından oluşan hücre membranı, bu tabakaya gömülü halde çeşitli hücre tanınma fonksiyonlarında görevli olan proteinler içerir. Bu hücre fonksiyonların pek çoğu sitoplazma ve hücre fonksiyonların değişiminde rol oynayan iyon kanallarından hücre içi ve hücre dışı ortamlar arasında iyon geçişi sonucunda gerçekleşir. İyon kanalları voltaja bağımlı, mekanik strese duyarlı ya da intrasellüler - ekstrasellüler ligand kapıları sayesinde farklı iyonlara seçici-geçirgenliğe sahiptirler ve iyon kanallarından iyon geçişi sonucunda, hücre membran potansiyeli ve ekstrasellüler ortam pH'ı değişir. Hücre membranının elektrobiyofiziksel özellikleri ve iyon kanallarından geçen akımların araştırılmasının temeli olarak; aksiyon potansiyelinin kaydedilmesi kabul edilmektedir. İlk defa cam mikroelektrot kullanarak hücre içi aksiyon potansiyelinin kaydedilmesi 1939'da Hodgkin grubu ve sonrasında 1940 yılında Cole ve Curtis grubu tarafından gerçekleştirilmiştir. Hücre içi aksiyon potansiyelinin kaydedilmesinden sonra, hücre membranından geçen iyonik akımların ölçülmesini sağlayan tek yöntem olan *Voltaaj Clamp Tekniği* Hodgkin grubu tarafından keşfedilmiştir ve bu keşif ile 1963 yılında Nobel ödülü almışlardır (9, 12-14). Hodgkin grubundan Katz, diğerlerinden farklı olarak hücre membranının tam olarak homojen bir yapıya sahip olduğunu ifade eden iletkenlik artışı modeli yerine, iyon kanalı aktivitesinin etkin olduğu hipotezini savunmuştur. Bu yüzden, çalışma ekibinden ayrılarak nöromusküler kavşak ile ilgili çalışmalara yoğunlaşmıştır; bu teorisini ispatlayarak 1970 yılı Nobel ödülünü almıştır. Katz'ın öğrencilerinden Bert Sakmann ile Erwin Neher, Katz'ın teorisini geliştirerek iyon kanallarına ait birim iletkenliği kaydetmek amacı ile, cam mikroelektrotları kas dokusuna temas ettirip küçük bir alanda tek bir iyon kanalını izole etmişlerdir. Fakat, iyon akımı çok küçük olduğu için, mikroelektrot kenarında meydana gelen sızıntı akımının elektronik gürültü içinde kaybolmasıyla gürültüden izole edilmiş bir kayıt alınması başılamamıştır. Neher, sızıntı akımını yok etmek için mikroelektrot içine negatif basınç uygulayarak

ilk kez tek iyon kanalından iyonik akım kaydını başarılı bir şekilde gerçekleştirmiştir. Bu tekniği “**Patch Clamp Tekniği**” olarak adlandırdılar ve bu çalışmalarıyla Neher ve Sakmann 1991 yılı Nobel Tıp ödülünü almışlardır (10, 13, 15).

İntrasellüler Kayıt

Patch Clamp sistemine geçmeden önce, elektrobiyofiziksel kayıt yöntemlerinin temeline basit bir örnek olarak, intrasellüler kayıt verilebilir. İntrasellüler kayıt, cam mikroelettrot yardımı ile hücre membranının içine girilerek gerçekleştirilir. Hücre membranının her iki tarafında; birisi intrasellüler diğeri ekstrasellüler ortamda bulunan ve birbirleri ile temastaki iki mikroelettrot yardımıyla hücre membran potansiyeli doğrudan ölçülebilir. Mikroelettrot ile hücre içine girilmesi sonucunda oluşabilecek hücre membran hasarını en aza indirmek için ucu sivri ve uç çapı nanometre boyutunda olan cam mikroelettrot kullanılması gerekir. Mikroelettrodun hem elektriksel iletkenliği hem de mikroelettrot içindeki solüsyon ile sitoplazmanın etkileşiminden dolayı mikroelettrot uç çapı belirli sınırlar arasında tutulmalıdır (13, 15-17).



Şekil 1: Hücre-mikroelettrot sistemi (11).

R_s ; Sızıntı direnci, R_m ; Mikroelettrot direnci, C_m ; Mikroelettrot kapasitansı.

Voltaj Clamp Yöntemi

Hücre membranından akım ya da voltaj kaydı amaçlandığında kullanılan biyofiziksel kayıt yöntemlerinde çeşitli zorluklar ortaya çıkmaktadır:

Birincisi, hücrelerin nanoskala boyutunda olmasından dolayı ortaya çıkan hareket etme güçlüğüdür. İkincisi ise, biyoelektriksel sinyallerin zayıf olması ve tek iyon kanalından geçen iyonik akımların çok küçük olmasından dolayı uygulanan tekniklerin en zor laboratuvar teknikleri arasında yer almasıdır. Zayıf akım kayıtlarının yapıldığı bu yöntemlerde, zayıf ve küçük olan sinyal çoğu zaman ortam ve elektronik sistem gürültüsü içinde kaybolabilir. Düzgün ve ortam gürültüsünden izole edilmiş sinyal kaydı alabilmek için iyi tasarlanmış kayıt sistemlerine ve izole ortamlara ihtiyaç vardır (10, 14, 18, 19).

Hücre membran potansiyelindeki değişiklikler iyon kanalı aktivitelerini etkileyen bir faktör olduğu için, iyon kanallarının aktivitesi organizmada pek çok fizyolojik aktivitenin önemli bir göstergesidir. Hücre membran potansiyeli, iyon kanal fonksiyonlarını en az üç bağımsız yolla düzenler:

1. İtici kuvvetlerin değişiminden iyon kanalı aktivitesinin etkilenmesi ve iyon akımının değişimi,
2. Çoğu iyon kanalının hücre membran potansiyel değişimlerinden etkilenen voltaj bağımlı kapı mekanizmasının olması,
3. Bazı iyon kanallarının, intrasellüler faktörler ile belirli hücre membran potansiyellerinde iyon akımını sınırlaması(13, 14, 20, 21).

Elektrobiyofiziksel deneylerde temel amaç; normal ve patolojik şartlarda kaydedilen biyoelektriksel sinyalin iyonik mekanizmalarını araştırmaktır. Hücre membranından geçen iyonik akım, istenen değere kenetlenerek hücre membran potansiyel değişimi ya da hücre membran potansiyeli istenen değere kenetlenerek hücre membranından geçen iyonik akım değişimi ölçülebilir. Hücre membranının özelliklerinin araştırılmasında, hücre membran potansiyeli istenen değerde tutularak hücre membranından geçen iyonik akım değişiminin kaydedilmesini sağlayan yönteme “**Voltaj Clamp Yöntemi**” adı verilir (11, 13, 16, 22). Voltaj clamp yöntemi, ölçülen hücre membran potansiyelinin kenetlenen potansiyel değeri ile karşılaştırıldığı elektronik bir feedback sisteminden oluşur. Kaydedilen hücre membran potansiyelinin kenetlenen potansiyelden sapması, sisteme akım uygulaması ile düzeltilir. Hücre membran potansiyel değişiminin ölçümü ve akım uygulanması aynı

mikroelektrot ile gerçekleştirildiği için, akım feed backi ani olmalıdır ve intrasellüler kayıt için ince uçlu özel mikroelektrot kullanılmalıdır (11, 13, 18, 23).

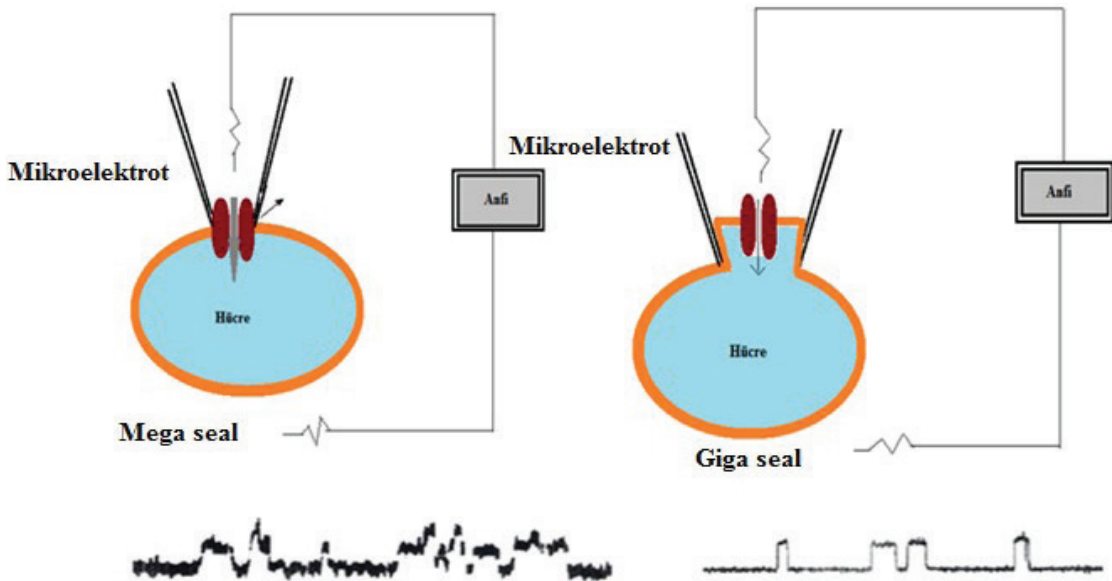
Voltaj clamp yönteminin temel amacı, komut voltajında tutulan hücre membranının tamamından geçen iyonik akımı ölçmektir. Bu yöntem ile ilgili kanalın karakteristiği belirlenebilmesine rağmen tek bir kanala ait birim iletkenlik hakkında fikir vermez. Bu nedenle voltaj clamp yöntemi geliştirilerek, hücre membranı üzerinde bulunan belirli bir bölgeden ya da tek bir iyon kanalından geçen iyonik akımın ya da hücre membran potansiyelinin kaydedilmesini sağlayan **Patch Clamp Yöntemi** daha geniş uygulama alanı bulmuştur (10, 16, 23, 24).

Patch Clamp Yöntemi

Hücreden hücreye değişmek üzere iyon kanallarından geçen birim akımlar pA seviyesindedir. Bu boyuttaki küçük bir akımı ortam ve sistem gürültüsünün olduğu bir ortamda kaydetmek oldukça zordur. 1 pA seviyesinde bir iyonik akımı % 10 hassasiyette kaydetmek için sinyal kaynağının en az 2 G Ω direncine sahip olması gerekir (10, 16, 17, 18, 25). Canlı organizmada bulunan hücrelerin neredeyse tamamı bu kadar yüksek bir dirence sahip değildir. Hücrelerin boyutu küçüldükçe, direnci artacağı için büyük direnç elde etmek amacı ile küçük dirençli hücre elde etmeyi hedefleyen Erwin Neher ve Bert Sakmann; hücre

membranının küçük bir bölümünden akım kaydı yapmayı denediler. Bu amaçla, ucu inceltilmiş cam kapiller bir mikroelektrot ile hücre membran parçasını sabitleyip, bu cam elektrot ile hücre membranı arasında yüksek elektriksel dirence sahip bir kenetleme yaptılar. Mikroelektrot voltajını kontrol ederek, mekanik ve enzimatik teknikler ile küçük uçlu cam mikroelektrotları hücre membranına bastırıp G Ω seviyesinde direnç oluşturabilen kayıt düzeneği kurmayı denediler. Fakat mikroelektrot ucunun hücre membranına temas ettiği yerde meydana gelen sızıntı akımları sebebiyle en iyi laboratuvar koşulunda dahi ancak 10-20 M Ω 'luk direnç elde edebildiler. Bu tür sistemlerde yapılan akım kayıtlarında, kaydedilmek istenen akım çok zayıf olduğu için ortam ve sistem gürültüsü içinde kaybolarak başarılı bir kayıt alınması başarısız olmuştur (10, 13, 17, 20, 23).

Erwin Neher ve Bert Sakmann, cam mikroelektrot içerisine negatif basınç uygulanarak hücre membranı mikroelektroda doğru emildiğinde cam mikroelektrot yüzeyi ile hücre membranı arasında güçlü bir kaynaşma ile G Ω seviyesinde "**giga seal**" adı verilen sıkı mühürlenme - kenetleme elde etmişlerdir. Bu koşullar altında kaydedilen akımların istenen sonuçları verdiği ve iyon kanalı hipotezinin evrensel olarak kabul görmesini sağladığı bilinmektedir (Şekil 2) (10, 13, 25).



Şekil 2: Giga seal elde edilmesi (1, 10).

Hücre üzerinde kayıt yönteminde mikroelektrot ekstrasellüler ortam solüsyonu ile doldurulmalıdır. Bu kayıt pozisyonunda ekstrasellüler olarak uygulanan hormon veya kimyasal maddelerin mikroelektrot ile temasta olan hücre membranı parçasındaki iyonik akım üzerine etkisinin analizi yapılabilmektedir. Kayıt sırasında mikroelektrot hücre ile temasta olduğundan hücre içi organellerin iyon kanalı üzerindeki etkileri devam etmektedir (27-29, 31).

2- Tüm hücre (Whole cell) kaydı: Hücre üzerinde başlanan kayıt işleminin sonraki aşaması *tüm hücre kaydı* olarak tanımlanır. Mikroelektrot ucu hücre membranı ile temasta iken negatif basınç uygulanarak oluşturulan giga seal esnasında basınç sistemi ile sürekli vakum yapılarak hücre membranı yırtılır. Mikroelektrot ile hücre membranınin yırtılması sonucunda, mikroelektrot ile hücre sitoplazması arasında elektriksel açıdan düşük direçli bir bağlantı kurulur. Mikroelektrot ve hücre sitoplazması arasında denge durumuna gelene kadar, mikroelektrot içerisinde bulunan intrasellüler ortam solüsyonu ile hücre sitoplazması arasında madde alış verişi devam eder. Böylece mikroelektrot direkt hücre içi ile temasta olur ve mikroelektrot doğrudan hücre sitoplazmasının potansiyel değişimlerini ölçer (30, 32-34). Tüm hücre kayıt (THK) yöntemi ile alınan kayıta, hücre membranı yırtıldıktan sonra hücre içine girer girmez mikroelektrot potansiyeli ile hücre içi potansiyel eşitleneceği için hücre içine girmeden önce mikroelektrot potansiyelini istirahat membran potansiyeline kenetlemek gerekir. Bu durumda hücre içine doğru sabit bir iyonik akım oluşur. Hücre içine girildiğinde bu durum ortadan kalkar ve tekrar komut voltaj pulsuna cevap olan iyonik akım oluşur. Komut voltajına ulaşmak için kullanılan akım, hücre membran direnci ve hücre membran direncine seri bağlı olan mikroelektrot direncinin tamamını bu voltaj seviyesine getirmek için harcanan akımdır. Bu şekilde bir hücrede voltaj sabit bir değere kenetlendiği zaman, küçük bir depolarizasyon yapılarak hücre membranınin geçen iyonik akım değerlendirilebilir (32, 33, 35).

Tüm hücre kayıt yöntemi ile yapılan kayıt, bir hücrenin tüm kanallarının verdiği cevabı gösterir. Mikroelektrot hücre membranını yırtmıştır, fakat mikroelektrot ve hücre hala temas halinde olduğu için kayıt sırasında hücre içi organeller ile iyon kanalları etkileşimi devam etmektedir. Bu yöntem, küçük hücrelerden (5-20 µm) akım ya da potansiyel değişimi kaydetmek için kullanılan en uygun patch clamp yöntemi olarak tanımlanmaktadır. Tüm hücre kaydı, hücre membranındaki tüm Ca²⁺ kanallarının araştırılması istendiği araştırmalarda tercih edilmektedir. Ayrıca iyon kanalı aktivatörlerinin, blokerlerinin ve ikinci habercilerin araştırılması amacı ile bu yöntem kullanılmaktadır (27, 28, 30, 35, 36).

3- Dışı Dışarıda (Outside out) kayıt: Hücre ile mikroelektrot sıkı kenetleme halinde iken vakumlama yapılarak hücre membranı yırtıldıktan sonra, mikroelektrot dikkatlice hücreden geriye doğru çekilirse mikroelektrot hücre membranınin ayrılır ve mikroelektroda yapışıp kopan hücre membran parçası ters yönde tekrar birleşerek *dışı dışarıda yöntemine* geçilmiş olur. Hücre membran parçası hücreden ayrıldığı için, bu yöntemde hücre içi organellerin etkisi ortadan kalkar ve bu yöntem hücre içi organellerden bağımsız araştırma imkânı sağlar (10, 28, 32, 37). Hücre membranınin hücrelerarası boşluğa bakan tarafı banyo solüsyonu ile temas ederken, intrasellüler ortama bakan tarafı ise mikroelektrodun içerisindeki intrasellüler ortam solüsyonu ile temas halindedir. Bu yöntemde, mikroelektrot içine intrasellüler ortam solüsyonu doldurulmalıdır. Hücreden izole edilen küçük bir hücre membran parçasındaki iyon kanalları üzerine, hormonların ve kimyasal maddelerin etkisinin araştırılmasında dışı dışarıda kayıt yöntemi kullanılabilir (11, 27, 28, 30, 38).

4- İçi Dışarıda (Inside out) kayıt: Hücre üzerinde kayıt yönteminde iken, hücre ile temasta olan mikroelektrot hızlıca hücreden geriye doğru çekilirse mikroelektrot hücre membranınin ayrılır. Bu işlem esnasında mikroelektrot ucundaki hücre membranınin banyo solüsyonundan çıkmamasına dikkat edilmesi gerekir. Mikroelektrot ucundaki hücre membranınin hücre içi tarafı banyo solüsyonuna bakacak şekilde, hücre membran parçası ters dönerek tekrar birleşir ve *içi dışarıda*

kayıt yöntemine geçilmiş olur. Bu yöntemde hücrelerin bulunduğu ortam ekstrasellüler ortam solüsyonu ile doldurulurken, mikroelektrot intrasellüler ortam solüsyonu ile doldurulmalıdır. Tek kanal araştırmaları, intrasellüler faktörler ile aktive olan iyon kanalları çalışmalarında içi dışarıda kayıt yöntemi kullanılabilir (25, 26, 36, 38).

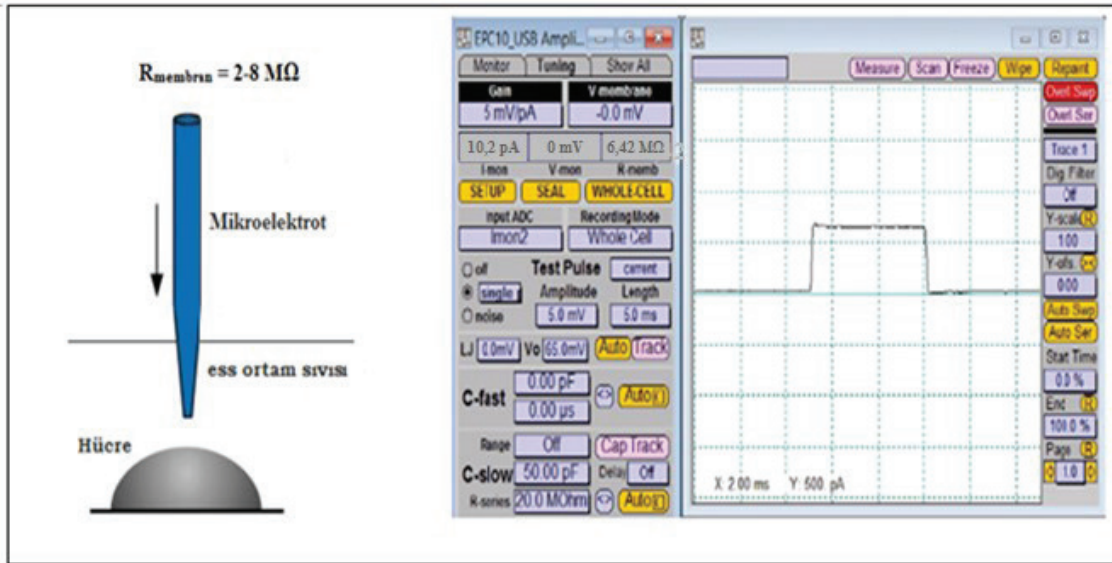
Patch Clamp Yönteminin Biyofiziksel Prensibi

Patch clamp yöntemi, istenen dirençte özel olarak hazırlanan mikroelektrotlar yardımı ile hem hücre membranının tümünden hem de hücre membranının elektriksel ve mekanik olarak izole edilmiş küçük bir parçasından hücre membran potansiyelinin sabit bir değerde tutularak iyon kanalından geçen akımın ya da akım sabit bir değerde tutularak hücre membran potansiyel değişiminin kaydedildiği elektrobiyofiziksel bir yöntemdir (4, 17, 20, 28).

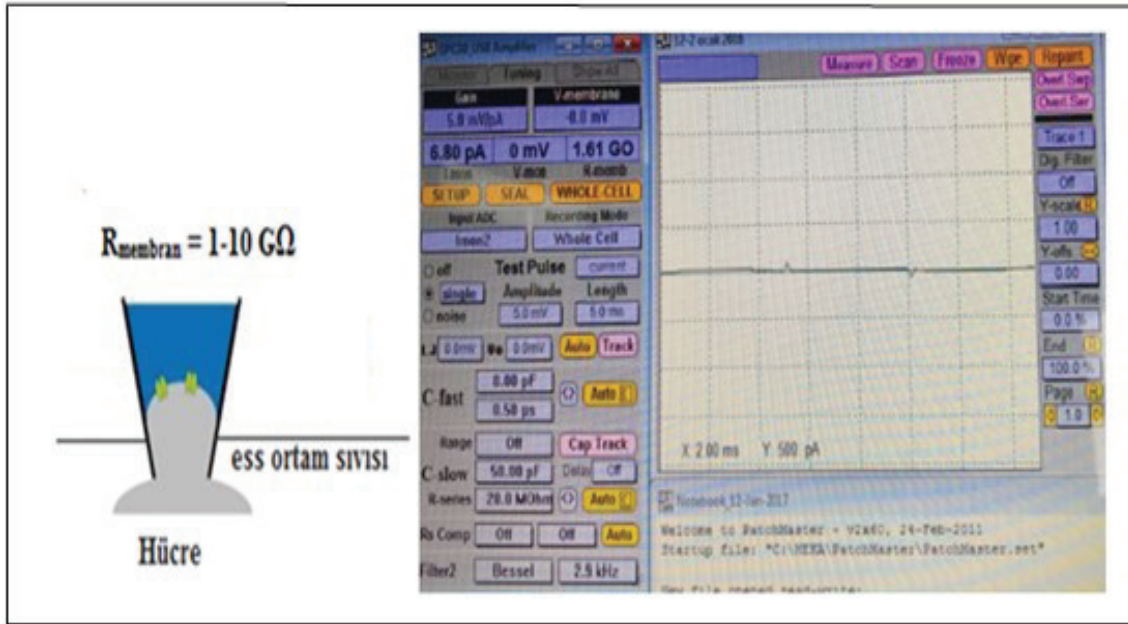
Ucu 0,5-1 μm çapına sahip mikroelektrotlar, intrasellüler ortam solüsyonu ile doldurularak mikroelektrodun manipülatör yardımı ile hücrelerin bulunduğu ekstrasellüler ortam solüsyonuna girmesi sağlanır. Bu duruma yanıt olarak mikroelektrot direnci 2-8 $\text{M}\Omega$ arasında olur ve akım değişiminin değerlendirildiği akım-zaman grafiğinde kare dalga oluşumu gözlemlenir (Şekil 4) (1, 19, 39).

Hücre membranı ile mikroelektrot temas ettiğinde 10-50 $\text{M}\Omega$ aralığında olan direnç, basınç sistemi ile hücreye birkaç kez vakum yapıldığında $\text{G}\Omega$ seviyesine yükseltilebilir. Bu olay, hücre membranının mikroelektrot içine emildiğinde fiziksel deformasyonunu gösterir (35, 40, 41).

Mikromanipülatör ile mikroelektrot hareketi devam ettirilerek hücreye temas etmesi sağlanır. Negatif basınç yapılarak mikroelektrot hücre membranına sıkıca kenetlenir. Böylece hücre membranı mikroelektroda yapışır, mikroelektrot içindeki intrasellüler ortam solüsyonu ile mikroelektrot dışındaki solüsyonu hem elektriksel olarak hem de solüsyon içinde bulunan maddelerin geçişi açısından birbirinden izole eden bir engel oluşturur. Böylece bu bölgede giga ohm seviyesinde yüksek elektriksel dirence sahip “giga seal” adı verilen engel oluşturulmuş olur. Giga seal oluşumu ile cam mikroelektrot içinde kalan hücre membran parçası “patch” ya da “yama” olarak adlandırılır. Sıkı kenetleme oluşumunda R_{membran} direncinin 1-10 $\text{G}\Omega$ arasında olduğu ve kare dalganın şekil değiştirdiği gözlemlenir (Şekil 5) (17, 18, 36).

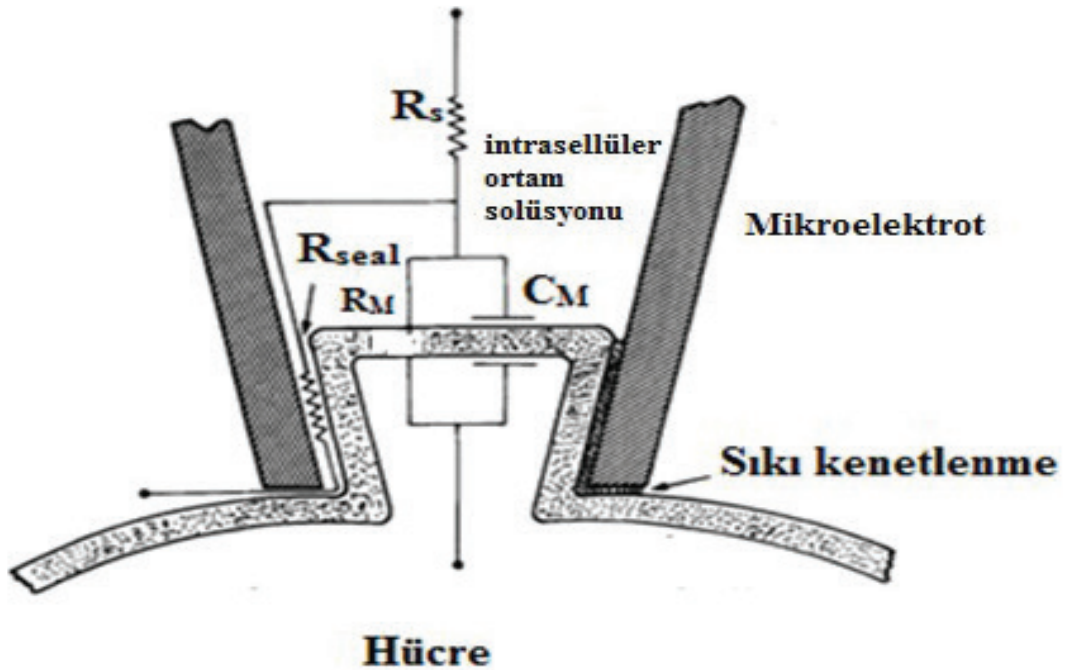


Şekil 4: Mikroelektrot ekstrasellüler ortam solüsyonu içindeyken kare dalga oluşumu (1).



Şekil 5: Giga seal oluşumu (1).

Neher ve Sakmann 2,5 MΩ uç direncine sahip mikroelektrot ile hücre membranının 14 µm² bölümünün omega harfine (Ω) benzer şekilde mikroelektrot içine doğru emildiğini ve bu hücre membran parçasının mikroelektrot - hücre membranı kenetlemesine bağlı olduğunu göstermişlerdir (Şekil 6) (14, 17, 18).



Şekil 6: Giga seal oluşumunda mikroelektrot - hücre membranı ilişkisi (18).

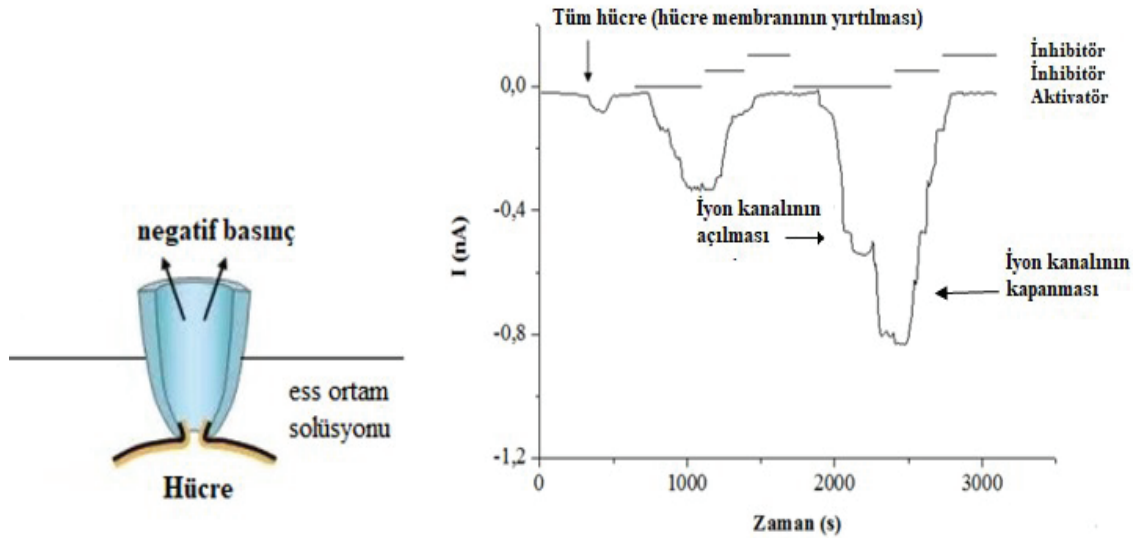
R_{seal} ; Kenetleme direnci, R_s ; Sızıntı direnci, C_M ; Membran kapasitansı, R_M ; Membran direnci.

Giga seal oluşumunda mikroeletrodun iç duvarı ile hücre membranı arasında temas alanının arttığı görülmektedir. Mikroeletrot ve hücre membranı arasında oluşan etkileşimin fiziksel prensibini açıklamak ve kenetleme sürecini saptamak için 3 fiziksel kuvvetin etkili olduğu ifade edilmektedir:

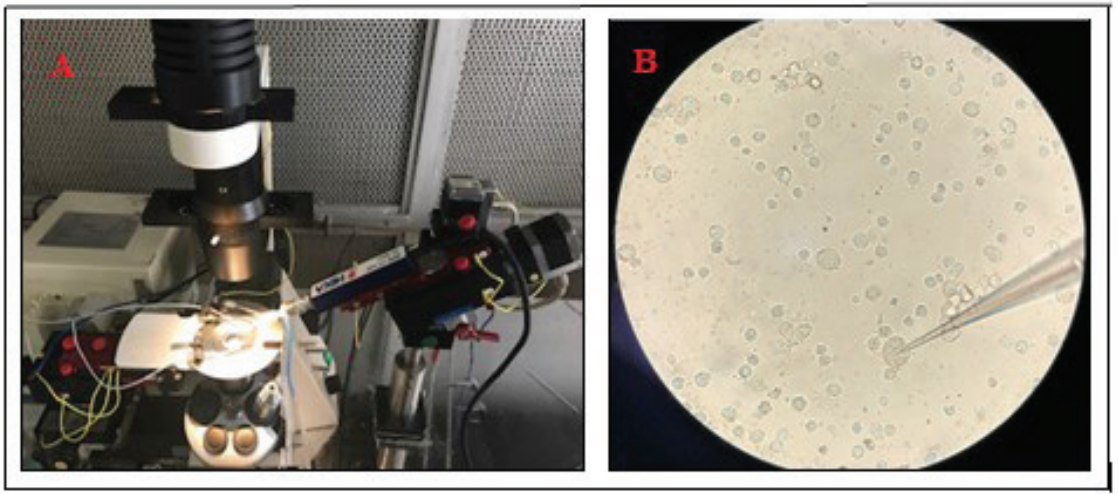
1. Ca^{2+} gibi iki değerlikli katyonları içeren tuz köprüleri
2. Hidrojen bağları
3. Van der waals kuvvetleri (4, 18, 21).

50 - 200 $G\Omega$ direncini elde etmek için, iki yüzey arasındaki mesafenin 2-5 \AA 'den büyük olmadığı ve en yüksek kenetleme direncinin 400 $G\Omega$ olduğu tahmin edilmektedir (11, 18).

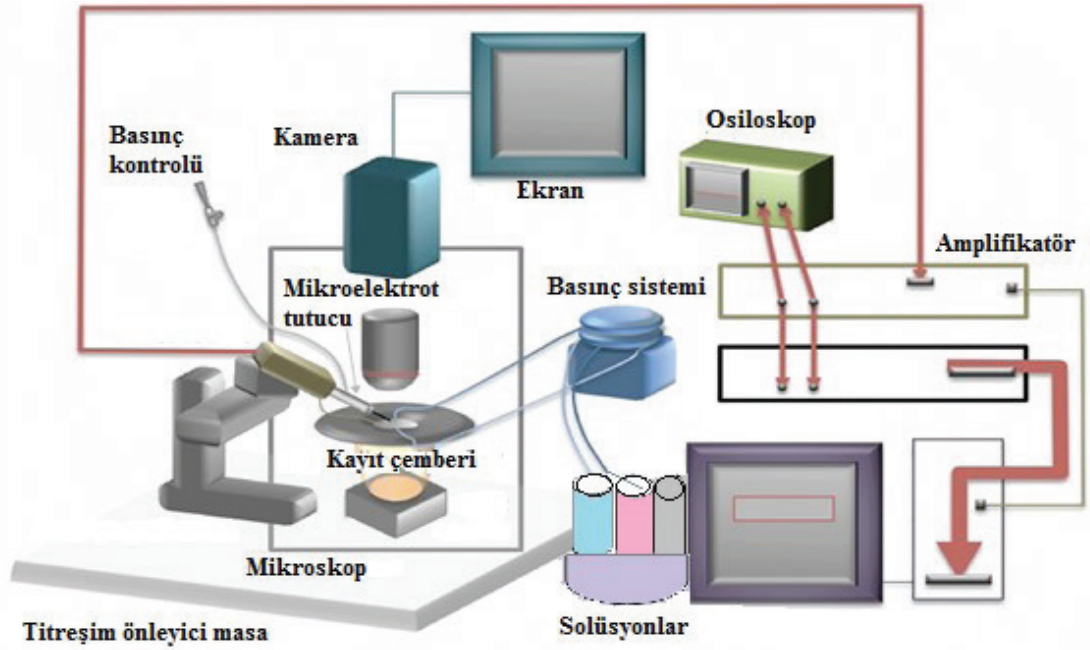
Giga seal oluşturulduktan sonra, diğer pozisyonlarının başlangıcı olan hücre üzerinde kayıt pozisyonuna geçilmiş olur. Hücre üzerinde kayıt pozisyonundayken, mikroeletrot ile hücre içine girildiğinde mikroeletrot potansiyeli ile hücre içi potansiyel eşit olacağından mikroeletrotun potansiyelini hücre istirahat membran potansiyeline kenetlemek için -60 mV değerine sabitleme yapılır ve iyon kanalından geçen akım kaydına başlanır (34, 40). Mikroeletrot, akım değişimini patch clamp sisteminin bağlı olduğu amfiye aktarır ve sisteme bağlı olan bilgisayar ve yazılım programında akım değişimleri sayısal verilere dönüşür. İyon kanalından geçen akım değişimi, yazılım programında sayısal değer ve grafik üzerinden takip edilebilir. Tüm hücre kayıt yöntemine geçerken Şekil 7'de verildiği gibi hücre membran parçası yırtıldığında ani akım düşüşü ekrandan takip edilir. Çalışmanın amacına göre iyon kanalının aktivatör ve inhibitörleri uygulanarak kanalın açılıp-kapanması gözlemlenir ve kayıt işlemi sonlandırılır (1, 17, 24, 37).



Şekil 7: Hücre membranına negatif basınç yapılarak tüm hücre kaydına geçilmesi ve aktivatör/inhibitör uygulaması ile akımın zamana göre değişimi (1).



Şekil 10: A-B. Patch clamp sisteminde hücre-mikroelektrot ilişkisi (1).

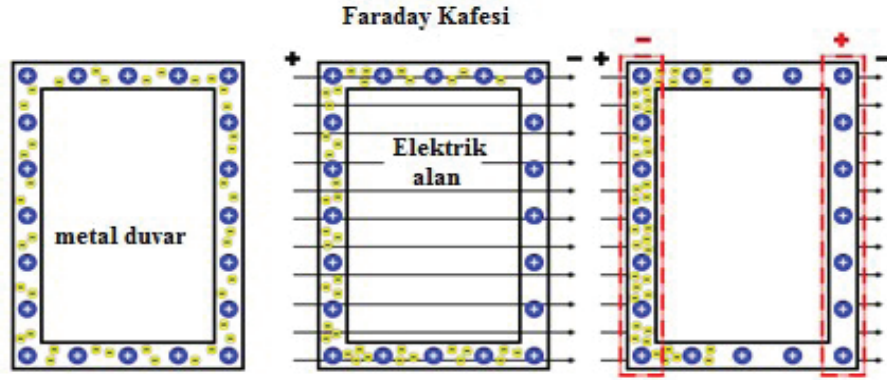


Şekil 11: Patch clamp sisteminin şeması (43).

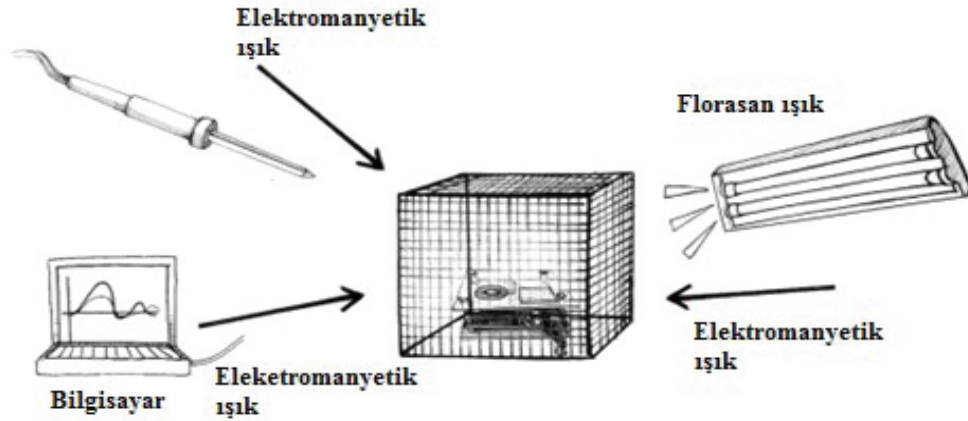
Faraday kafesi: İletken malzemeleri oluşturan atomların en dış yörüngelerindeki elektronlar, atomlarından kolayca ayrılarak hareket etme yeteneğine sahiptirler. Dolayısıyla kapalı bir yüzeye sahip olan iletken bir cisim, elektrik alan içerisine yerleştirildiğinde bu elektronlar, iletkenin içerisindeki elektrik alan sıfırlanmaya kadar hareket eder ve yeniden dağılıma uğrar. Elektrik alanın sıfırlanmasıyla birlikte, elektronların hareket

etmelerinin sebebi ortadan kalkmış olur. Faraday kafesi bu ilkeye göre çalışır ve içindeki kayıt sistemlerini dış elektrik alanlara karşı korur. İletken teller ile ağ biçiminde kaplanmış ve topraklanmış her kafesle bu koruma gerçekleştirilebilir. Ağ gözü sıklığı ve topraklama kalitesi koruma kalitesini artırır. Faraday kafesi sayesinde dışarıdaki elektrik alan kafesin içine etki edemez (Şekil 12 a-b) (11, 13, 24, 42).

a.



b.



Şekil 12a-b: Faraday kafesi (1).

İyi topraklanmış bir faraday kafesi ile patch clamp deneylerinde sağlıklı bir şekilde akım ya da potansiyel değişimi kaydedilebilir (11, 13, 39).

Titreşim önleyici masa: Hücre membranı ile mikroelektrodun sıkı bir kenetleme oluşturduğu patch clamp deneylerinde, kayıt sırasında yüksek hassasiyet gereklidir. Çalışma esnasında, hücre ve mikroelektrodu görmemizi sağlayan invert mikroskop ve mikroelektrodun hareketini sağlayan mikromanipülâtör sistemi titreşim önleyici masa üzerine sabitlenmiş halde bulunmaktadır. Bu sırada oluşabilecek en küçük sarsıntı bile hücre ile mikroelektrot arasında kurulan temasın kopmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle titreşim önleyici özel sistemlerle donatılmış bir masanın kullanılması busistemin olmazsa olmazlarından (11, 13, 37, 42).

İnvert mikroskop: İnvert mikroskoplarda objektifler mikroskop tablasının altına yerleştirilmiş olduğu için hücrelerin görüntülenmesi, kayıt

elektrodunun hareket kabiliyeti ve incelenen alanın arttırılmasında çok önemli avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca floresan lamba içeren türleri sayesinde floresan ışık yayan hücrelerin görüntülenmesi de mümkündür (11, 13, 37, 44).

Mikromanipülâtör: Patch clamp deneyleri esnasında invert mikroskop vasıtasıyla hücreler tespit edildikten sonra mikroskopun makro ve mikro vidaları ile bir daha oynanmamalıdır. Mikroelektrodun ucunu hücre membranına temas ettirebilmek için üç boyutlu olarak (öne-arkaya, sağa-sola ve yukarı-aşağı) hareket ettirilmesini sağlayan mikromanipülâtörler kullanılmaktadır. Kontrol paneli, keypet ve mikroelektrot ucunun bağlı olduğu headstage'den oluşan bir sistemdir (11, 13, 39, 45).

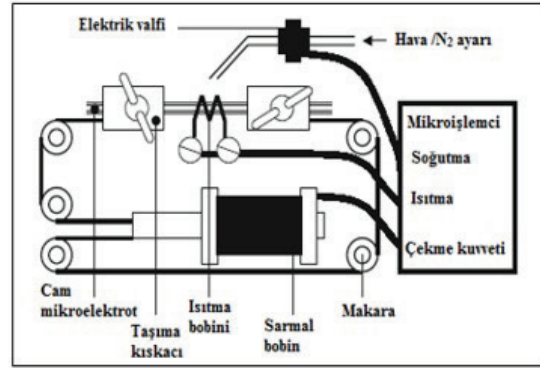
Amplifikatör: Hücre veya hücre katmanlarında patch clamp yöntemi ile iyi bir kayıt alabilmek için gürültüden izole bir ortama ve iyi tasarlanmış bir kayıt sistemine ihtiyaç vardır. Hücre membran potansiyeli veya hücre membranından geçen iyonik akımları kaydetmek amacı ile amplifikatörler kullanılır; en etkin kayıt düzenini oluşturmak için kullanılan mikroelektrotların direnci olabildiğince küçük, amplifikatörlerin giriş direnci ise yüksek olmalıdır. Alınan akım ya da potansiyel değişimini gösteren sonuçlar yükseltilerek ekranda sayısal veri olarak gözlemlenir, gerekli yazılım programları kullanılarak değerlendirilir. Patch clamp kayıt sistemi ile tekli kanal ve tek hücre çalışmalarında hücre membran potansiyeli kenetlenerek pA düzeyindeki iyonik akımlar veya akım kenetlenerek mV düzeyindeki potansiyel değişimleri ortam ve sistem gürültüsünden izole edilerek kaydedilir (11, 13, 37, 44).

Mikroelektrot çekici (puller): Patch clamp sisteminde kullanılan cam mikroelektrotlar, içi boş silindirik tüp şeklindedir. Hücre membranına temas ederek gerektiğinde buradan hücre membran parçası koparabilecek özelliğin olması için cam tüpler özel ısı ve çekme kuvveti uygulanarak sivriltilir; cam silindir

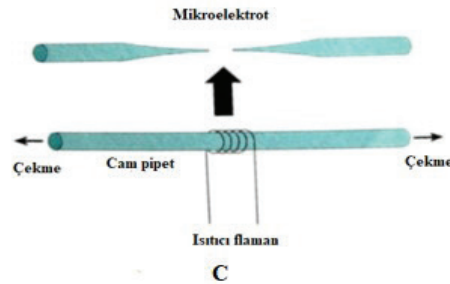
tüpleri mikroelektrot haline getiren bu tür cihazlar mikroelektrot çekicisi (puller) olarak adlandırılır. İstenen çapta ve dirençte yapılmak istenen mikroelektrot, mikroelektrot çekicisinin üzerinde bulunan mikroelektrot oluklarına yerleştirilir. Mikroelektrot tam olarak dengeli şekilde takılarak cihazın orta bölümünde bulunan ısıtma işleminin uygulandığı box ya da true filament bulunan tungsten rezistansın içinden geçirilecek şekilde ileriye doğru sürülür. Yan bölümde bulunan kısıkaçlar yardımı ile mikroelektrot dikkatlice sıkıştırılır ve sabitlenir. Çalışma öncesinde ramp testi yapılarak seçilen uygun sıcaklık ve çekme hızı ayarlanmış cihaz ile mikroelektrot çekim işlemi başlatılır. Mikroelektrot çekimi sırasında, mikroelektrodun orta bölümü ısıtılırken, aynı anda kısıkaçlar ile sıkıştırılmış mikroelektrodun her iki tarafına, zıt yönde ve aynı doğrultuda çekme kuvveti uygulanır. Bu sırada cam mikroelektrot ısı ve kuvvetin etkisiyle yavaş yavaş ortasından ısınıp incelirken, hücre membranına temas edebilecek seviyede sivriltilmiş olur. Cihazda bulunan soğutma sistemi aracılığı ile mikroelektrot içindeki boşluk kapanmaz ve mikroelektrot hazır hale gelir (Şekil 13) (11, 13, 39).



A



B

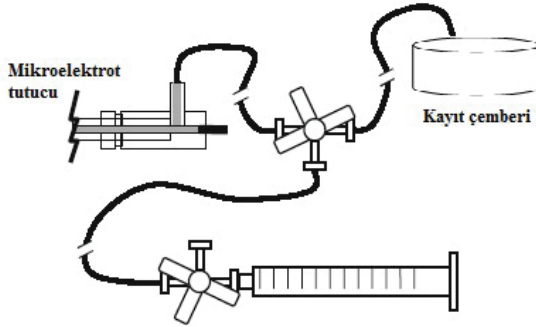


C

Şekil 13: A. Mikroelektrot çekici. B-C. Mikroelektrot çekici şeması (1, 11).

Mikroelektrot: Mikroelektrot çekici kullanılarak, çalışmanın konusuna göre farklı çaplara sahip cam mikroelektrot yapılır. İntrasellüler kayıtlarda kullanılan mikroelektrotların direçleri 2 - 10 MΩ arasında olması gerekir. Mikroelektrot çekici ile sıcaklık ve çekme hızı değiştirilerek istenen çapta ve dirençte cam mikroelektrot yapılabilir. Mikroelektrot çekicisi ile yapılan mikroelektrotların uç çapı arttıkça mikroelektrot direncinin düştüğü, azaldıkça yükseldiği bilinmektedir. Bu da mikroelektrodun ucu ne kadar ince olursa iyon geçişinin o kadar fazla engellendiğini ve elektriksel direncin de o kadar arttığını göstermektedir (10, 11, 13, 25).

Basınç sistemi: Mikromanipülator yardımı ile cam mikroelektrot ekstrasellüler ortam solüyonu içine daldırıldığında, mikroelektrot ucunun kirlenmemesi için basınç sistemi ile pozitif basınç uygulanması gerekir. Mikroelektrot ile hücreye temas ettikten sonra giga seal adı verilen sıkı kenetleme oluşması ve patch clamp kayıt yöntemlerine geçilmesi için negatif basınç uygulanarak hücre membranının mikroelektrot içine emilmesi sağlanır (Şekil 14) (10, 11, 13, 44).



Şekil 14: Basınç kontrol sistemi (11).

Bilgisayar yazılımı : Patch clamp kayıt sistemine uyumlu olarak Patch master ve Fit master gibi akım ya da potansiyel değişim sonuçlarını sayısal verilere dönüştüren yazılım programları kullanılmaktadır (11, 13, 37).

Bilgisayar: Patch clamp sisteminde iyonik akım ya da hücre membran potansiyeli kayıtlarının takip edilmesi amacı ile kullanılan yazılım programı ve hücrenin gözlemlenmesini sağlayan programın kullanılabilmesi için uygun bir bilgisayara gereksinim vardır (11, 13, 45).

Kamera: Bilgisayara ve invert mikroskoba bağlı olan kamera aracılığı ile hücreden alınan görüntü bilgisayara aktarılabilir. Kayıt öncesi hücrenin izlenmesi, kayıt anının görüntülenmesi ya da kayıt alındıktan sonra hücre üzerinde ölçüm ve hesaplama yapılması amacı ile kamera sistemi kullanılabilir. Görüntü invert mikroskoptan ya da kamera ile bilgisayardan takip edilebilir (11, 13, 39, 45).

Patch clamp sistemi teknolojik gelişmelere paralel olarak gelişmekte ve multidisipliner alanda kullanım alanı bulmaktadır. Günümüzde en yaygın görülen hastalıklardan aritmi, diyabet, epilepsi, ağrı ve kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok hastalığın oluşum mekanizmalarının araştırılması ve bu hastalıklar için tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla patch clamp tekniğinin kullanımı araştırmalara önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Düzgün Ergün D. Hipoksi ve Hiperkapninin İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Membranında (HEK293) TRPM2 Kanal Aktivitesine Etkisinin Patch Clamp Tekniği ve Enzimatik Ölçümler ile Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2018.
2. Quinn K, Beech DJ. A method for direct patch-clamp recording from smooth muscle cells embedded in functional brain microvessels. *Pflugers Archive: European journal of physiology* 1998;435(4): 564-9.
3. Saygın M, Nazıroğlu M, Caliskan S. Recent developments on patch-clamp technique in electrophysiological studies. *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2009; 26: 148-52.
4. Sherman AJ, Shrier A, Cooper E. Series resistance compensation for whole-cell patch-clamp studies using a membrane state estimator. *Biophysical Journal* 1999;77: 2590-601.
5. Zhang D. Patch Clamp: A Powerful technique for studying the mechanism of acupuncture. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012;1-7. doi: 10.1155/2012/534219.
6. Malboubi M. Study of Gigaseal Formation in Patch Clamping Using Nanotechnology. School of Mechanical Engineering, Doctor of Philosophy. 2011.
7. Polder HR, Swandulla D. The Use of control theory for the design of voltage clamp systems: A simple and standardized procedure for evaluating system parameters. *Journal of Neuroscience Methods* 2001;109: 97-109.
8. Majid M. Study of Gigaseal Formation in Patch Clamping Using Nanotechnology. The University of Birmingham, School of Mechanical Engineering College of Engineering and Physical Sciences, Doctor of Philosophy Thesis, 2011.
9. Hille B. Ion Channels of Excitable Membranes. 3th Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, U.S.A., 2001.
10. Puralı N. Hücre Elektrofizyolojisi ve Görüntülemenin Temelleri. İstanbul: Veri Medikal Yayınları; 2012.
11. Molleman A. Patch Clamping An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology. John Wiley & Son Ltd. 2003; 5-41.
12. Zhao Y, Inayat S, Dikin DA, Singer JH, Ruoff RS, Troy JB. Patch clamp technique: Review of the current state of the art and potential contributions from nanoengineering. *Journal of Nanoengineering and Nanosystems* 2009; 222(1): 1-11. doi: 10.1243/17403499JNN149.
13. Çelik Ö. Oksidatif stresle aktive edilen trpm2 kation kanallarının inaktivasyonunda melatoninin etkisinin patch-clamp sistemi ile araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Isparta 2011.
14. Fatima SK. Patch Clamp Technique. InTech; 2012.
15. Samosa RC. Cellular & Molecular Biology: Membrane Proteins. Maed Biology; 2012.
16. Pehlivan F. Biyofizik. 2. Baskı, Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık; 2007.
17. Ogden D, Stanfield P. Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording. 2015;53-78.
18. Franciolini F. Patch clamp technique and biophysical study of membrane channels. *Experientia* 1986;42(6): 589-714.
19. Reinhold P, Erwin N. The Patch-Clamp Technique in the Study of Secretion. *Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie*, 12(4): 159-63, 1989.
20. Hamill O, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved Patch Clamp Techniques for Highresolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflugers Archive* 1981;391: 85-100.
21. Barry PH, Lynch JW. Liquid junction potentials and small cell effects in patchclamp analysis. *The Journal of Membrane Biology* 1991;121(2): 101-117.
22. Walz W, Boulton W, Boulton AA, Baker GB. Patch-Clamp Analysis: Advanced Techniques. Humana Press, 2002.
23. Leon KL, Marc S, Yumin S, Kirti T. The Patch clamp technique. *Neurosurgery*, 1995. 36(2): 382-92 doi: 10.1227/00006123-199502000-00020.

24. Jurkat RK, Lehmann FH. The Patch clamp technique in ion channel research. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2004;5(4): 387-95.
25. Schanne OF, Lavalle M, Laprade R, Gagn S. Electrical properties of glass microelectrodes. *Proceedings of the IEEE* 1968;56: 1072-82.
26. Teisseyre A. The Patch clamp technique and its application in investigations of the preproperties of human T lymphocyte potassium channel. *Cellular & Molecular Biology* 2001;6: 93-105.
27. Bruce G, Kornreich DVM. The patch clamp technique: Principles and technical considerations. *Journal of Veterinary Cardiology* 2007;9(1): 25-37. doi: 10.1016/j.jvc.2007.02.001.
28. Chen CC, Cang C, Fenske S, Butz E, Chao YK, Biel M, Ren D, Schott CW, Grimm C. Patch clamp technique to characterize ion channels in enlarged individual endolysosomes. *Nature Protocols* 2017;12: 1639-58. doi: 10.1038/nprot.2017.036.
29. Nazıroğlu M, Lückhoff A. Effects of antioxidants on calcium influx through TRPM2 channels in transfected cells activated by hydrogen peroxide. *Journal of The Neurological Sciences* 2008; 270(1-2): 152-8. doi: 10.1016/j.jns.2008.03.003.
30. Özgül C, Nazıroğlu M. Nörolojik hücrelerde TRPM2 katyon kanallarının moleküler mekanizmalardaki rolleri. *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2010;27: 144-51.
31. Sakmann B, Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annual Review of Physiology* 1984;46: 455-72.
32. Davie JT, Kole MH, Letzkus JJ, Rancz EA, Spruston N, Stuart GJ. Dendritic patch-clamp recording. *Nature Protocols* 2006;1(3): 1235-47.
33. Chen K, Featherstone DE, Broadie K. Electrophysiological recording in the *Drosophila* embryo. *Journal of visualized experiments: JoVE* 2009;27: 1348. doi: 10.3791/1348.
34. Nilius B. Pflügers Archive and the advent of modern electrophysiology. From the first action potential to patch clamp. *Pflügers Archive*, 447, 267-71, 2003.
35. Monen SH, Schmidt PH, Wondergem R. Membrane potassium channels and human bladder tumor cells. I. Electrical properties. *The Journal of Membrane Biology* 1998; 161(3): 247-56.
36. Quinn K, Beech DJ. A method for direct patch-clamp recording from smooth muscle cells embedded in functional brain microvessels. *Pflügers Archive: European Journal of Physiology* 1998;435(4): 564-9.
37. Sigworth FJ. Electronic Design of the Patch Clamp. In: Sakmann B, Neher E(eds) *Single-Channel Recording*. 2nd Edition. Plenum Press, New York, London, 95-126, 1995.
38. Sakmann B, Neher E. *Single-Channel Recording*. 2nd Edition, Newyork: Springer. 2009.
39. Sakmann R, Neher E. Geometric Parameters of Pipettes and Membrane Patches. In: Sakmann B, Neher E(eds). *Single-Channel Recording*. 2nd Edition. Plenum Press, New York, London, 17–20, 1995.
40. Bari MR, Akbar S, Eweida M, Kuhn FJ, Gustafsson AJ, Luckhoff A, Islam MS. H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and its inhibition by N-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid in the β -cells: involvement of TRPM2 channels. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2009;13,3260-67.
41. Hamill OP. Patch-clamp technique. *John Wiley & Sons* 2014;1-14. doi: 10.1002/9780470015902.a0003382.pub2.
42. Arsiero M, Lüscher HR, Giugliano M. Real-time closed-loop electrophysiology: towards new frontiers in in vitro investigations in the neurosciences. *Archives Italiennes de Biologie* 2007;145,3(4): 193-209.
43. <https://www.axolbio.com/page/whole-cell-patch-clamp-protocol> Erişim: 24.04.2017
44. Veenstra, RD, Brink PR. Patch-Clamp Analysis of Gap Junctional Currents. In: *Cell-Cell Interactions*, edited by Stevenson BR, Gallin WJ & Paul DL. Oxford: Oxford University Press, 167-201, 1992.
45. Smith TG, Lecar H, Redman SJ, Gage PW (ed). *Voltage and Patch Clamping With Microelectrodes*. The William and Wilkins Company, Baltimore, 1985.