



Derleme/Review

## Patch-Clamp'ın elektrofizyolojik uygulamalarında son gelişmeler

Recent developments on patch-clamp technique in electrophysiological studies

Mustafa Saygın<sup>\*a</sup>, Mustafa Nazıroğlu<sup>b</sup>, Sadettin Çalışkan<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Isparta

<sup>b</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Isparta

### MAKALE BİLGİLERİ

#### Makale Geçmişi:

Geliş 14 / 01 / 2010

Kabul 20 / 01 / 2010

#### \* Yazışma Adresi:

Mustafa Saygın  
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp  
Fakültesi, Fizyoloji AD, Morfoloji Binası,  
Çünür, Isparta  
e-posta: msaygin@med.sdu.edu.tr

#### Anahtar Kelimeler:

Elektrofizyoloji  
Voltaj Klamp  
Patch-clamp  
Katyon Kanalları  
Akım Klamp

#### Key Words :

Electrophysiology  
Voltage Clamp  
Patch-clamp  
Cation Channels  
Current Clamp

### ÖZET

Patch-clamp (yama-menteşe) yöntemi, voltaj kenetleme tekniğinin geliştirilmiş bir uygulaması olup, pipet içerisindeki elektrot vasıtasıyla hücrelerdeki voltaj değişikliklerini ölçme esasına dayalıdır. Patch-clamp yöntemi, özel olarak hazırlanmış mikroelektrot ağzının hücre zarı parçasının (patch, yama) sıkıca yapıştırılarak (clamp, menteşe) ve zar potansiyellerinin sabit bir değere tespit edilmesi ile kanallardan geçen akımların kayıt ve analiz edilmesidir. Çalışmanın amacına, araştırması istenilen kimyasal, kanal blokörü veya nörotansmitter maddenin çeşidine bağlı 1- Hücre üzerinde (Cell attached-On cell) 2- Tüm Hücre Kaydı (Whole-cell recording) 3- Dışı Dışarıda (Outside-out) 4- Inside-out (içi dışarıda) isimli olarak 4 çeşit patch-clamp uygulaması vardır. Son yıllarda, aynı anda birden fazla pipet ile hücreye temas ederek kayıt alma sistemleri geliştirilmiştir. Bu yüzüyl içerisinde iyon kanallarının araştırılmasında en uygun tekniklerden birisi olarak patch-clamp uygulamaları yerini koruyacak gözükmektedir.

*J. Exp. Clin. Med., 2009; 26:148-152*

### ABSTRACT

Patch-clamp technique originated from technique of voltage clamping, which can be applied with an electrode inside of the glass pipette to record the measuring of the voltage alterations in cell membrane. Current in the ion channels has been recording by tip of specific prepared patch pipette. There are four different techniques in the technique namely (1) Cell attached-On cell (2) Whole-cell (3) Outside-out (4) Inside-out. In recent years new techniques were discovered and different records have been taking in a lot of cells. In future it has been seen that patch-clamp recording technique will have importance on the ionic current records in different cell types.

*J. Exp. Clin. Med., 2009; 26:148-152*

© 2009 OMÜ Tüm Hakları Saklıdır.

### 1. Elektrofizyoloji - Tarihsel Çerçeve

Patch-clamp, bütün hücre zarları ve hücre zarı kanallarından iyon akımlarını incelemek için yaygın bir şekilde kullanılan modern bir elektrofizyolojik tekniktir. Bununla birlikte Patch-clamp'ın son zamanlardaki gelişimine yol gösteren deneysel ve teorik temelleri sunmak için, 20. yüzyılın başlarına gitmemiz gereklidir. İlk deneylerin temellerinde hücre fizyolojisindeki iyonların rolü Ringer tarafından 1880'de yapıldı ve iyon dengesi potansiyelleri üzerine çalışmalar Nernst (1888) tarafından gerçekleştirildi. 1902'de Julius Bernstein potasyum iyonları için dinlenme hücre zarı seçici geçirgen olduğunu savunan

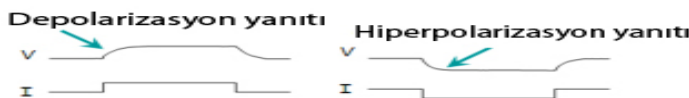
bir hipotez ortaya attı. Bu potasyum elektrot hipotezleri; dinlenme potansiyelinin potasyum iyonları için olan dengeli potansiyele eşit olduğunu öngörür. Bundan başka Bernstein, diğer iyonların karşı hücre membranından difüze olmasını ve depolarize olmasını sağlayan zar parçalanmasından dolayı potasyum iyonları için olan zar seçiciliğinin membran eksitasyon işlemi üzerine geçici olarak kaybolduğunu önerdi. Hemen hemen aynı dönemlerde (1905) Herman yüksek elektrik resistanslı ve kapasitanslı membran ile çevrelenmiş silindirik ileti çekirdeğine sahip olduğu varsayılan akson modelini önerdi. Zarın elektriksel özellikleri üzerine deneysel çalışmalar 1923'te Cole ve

Curtis'in membran rezistansı ve kapasitansını bir wheatson köprüsünü kullanarak ölçmesiyle başlamıştır. Onların sonuçları her bir hücrenin 1 mF/cm<sup>2</sup> (Nilius, 2003; Arsi-ero ve ark., 2007) 'lık bir elektriksel kapasitans ve düşük iletkenlikli zarla çevrelenmiş yüksek iletken sitoplazmaya (tuz banyosunun iletkenliğinin %30-60'ı) sahip olduğunu gösterdi. 1936'da Young mürekkep balığı dev aksonunu yeniden keşfetti (Bernstein, 1902). Bu yeniden buluş, hücre zarlarının elektriksel özellikleri ve aksiyon potansiyeli üretimi üzerine olan gelecek çalışmalar için değerli bir referans sağladı. 1937'de Hodgkin sinir hücrelerinde aksiyon potansiyelinin oluşumu üzerine depolarizasyon dalgasının elektriksel akım şeklinde üretildiğini gösterdi (Hodgkin, 1937). Bu sonuçlar genel olarak Herrman'ın kablo hipotezinin doğruluğunu onayladı. 1939'da Cole ve Cortis mürekkep balığı dev aksonunda wheatstone köprüsünü kullanarak aksiyon potansiyeli ateşlemesi üzerine olan iletkenlik değişikliklerini ölçtü (Cole ve Curtis, 1939). Aynı yıl Hodgkin ve onun çalışma arkadaşı Huxley bir intrasellüler mikroelektrot kullanarak mürekkep balığı dev aksonunda ilk defa tam olarak aksiyon potansiyelini ölçtü (Cole ve Curtis, 1939). Onların sonuçları Curtis ve Cole'un bağımsız olarak ayrıca yaptığı çalışmalarla doğrulandı (Curtis ve Cole, 1940; Curtis ve Cole, 1942). Elde edilen sonuçlar bir aksonda dinlenme zar potansiyeli potasyum iyonları için olan denge potansiyeline yakındı. Bu sonuca göre "potasyum elektrot hipotezi" ni ortaya attı (Hodgkin ve Huxley, 1939; Curtis ve Cole, 1942).

Aksiyon potansiyeli üzerine yapılan çalışmalar Hodgkin-Huxley ve Katz 'ın araştırmalarıyla sona ermiştir. Onların deneyleri depolarizasyon fazında bir genel aksiyon potansiyeli sırasında sodyum iyonları için membran geçirgenliğinin artmasından dolayı intrasellüler mikroelektrot kullanımını gösterdi (Hodgkin ve Huxley, 1952). Voltaj klamp tekniği direk ölçümlerde voltaj kontrolünün altındaki hücre membranına doğru 'klamp' iyonik akımları açıkladı (Hodgkin ve ark., 1952). Voltaj-klamp tekniğinin başlıca 3 prensibi vardır.

1- Hücrelere pozitif akım verirken depolarize, negatif akım verirken hiperpolarize olurlar.

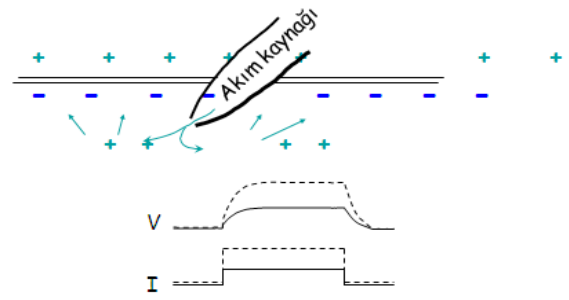
2- Hücrelere akım gönderildiği zaman depolarizasyon ve hiperpolarizasyon için zaman geçer. Çünkü hücrelerin kapasitansının değiştirilmesi gereklidir.



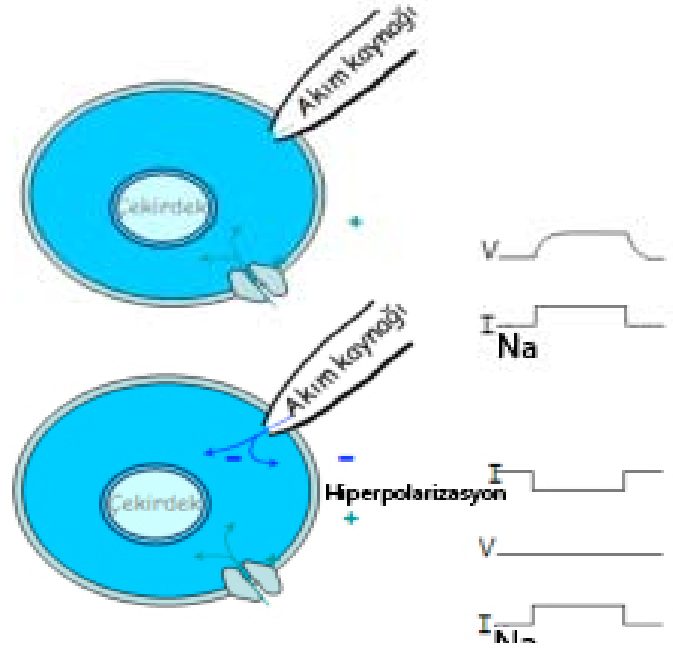
3- Şayet iyonların net bir difüzyonu hücreye yoksa hücre zarı potansiyeli değişmeyecektir.

Hodgkin-Huxley modeli:

Bu model, sodyum ve potasyum iyonları memb-



ran geçirgenliği için kantitatif ölçümler sunar (Hodgkin ve Huxley, 1952). İletkenlik membran voltajı ve zaman her ikisiyle ilgili bir fonksiyondur. Bu model uyarılabilir



hücrelerdeki aksiyon potansiyeli çalışmaları için değerli bir araçtır. Gelecekte en önemli adım deneysel metodların gelişiminin tek kanalların elektrofizyolojide iyonik akımlarının kayıt edilmesi idi. Onun üretilmesi "patch-clamp" tekniği gelişiminden sonra mümkün olmuştur.

### Voltaj Kenetleme



Şek. 1: Voltaj kenetleme tekniği ile kayıt alınması

## 2. Patch-Clamp (Yama-Menteşe)

Patch-clamp yöntemi, özel olarak hazırlanmış mikroelektrot ağzının hücre zarı parçasının (patch, yama) sıkıca yapıştırılarak (clamp, menteşe) ve zar potansiyelinin sabit bir değere tespit edilmesi ile kanallardan geçen

akımların kayıt ve analiz edilmesidir. Ağız ısıtma işlemi ile uygun hale getirilmiş cam pipetler (veya diğer tipleri), pipetin diğer ucundan bir emici pompa ile vakum yaptırılarak hücre zarına sıkıca temas ettirilerek adeta kaynak yaptırılır. Kaynak yaptırılan bölgede gegaohm (109 Ohm) düzeyinde elektriksel direnç oluşmaktadır (gigaseal) (Sigworth ve Neher, 1980; Hamill ve ark., 1981).

### Uygun bir patch-clamp seti şu kısımlardan oluşur;

1- Patch Clamp Amplifiers: Alınan biyopotansiyel kayıtlarını yükselterek anlayabileceğimiz şekiller haline dönüştürür.

2- Bilgisayar: Kayıtların alınması genellikle chart programı ile gerçekleştirilir. Chart programının yanısıra pulse-pulse fit programında kullanılmaktadır.

3- Manipulatorlar: Pipet tutucununun önce hızlı sonra yavaş ve hassas hareket ettirilmesini sağlamada kullanılmaktadır. Diğer bir ifade ile pipet ucu ile hücre zarının tutturulmasında hareket sistemini sağlamaktadır.



Resim 1: Patch-clamp seti

4- Titreşimi önleyici masa ve Faraday kafesi: Gigaseal oluşturulduktan sonra pipetin hafif hareketi hücre zarının yırtılmasına neden olmaktadır. Bu titreşimi önleyici masa ile telafi edilmektedir. Ayrıca, kayıt alımı sırasında oda içerisindeki bir ampülün açılması veya gürültü olması kayıt alımını bozmaktadır. Bu aksaklık ise faraday kafesi sayesinde en asgariye indirilmektedir.

5- Perfüzyon sistemleri: Patch çemberi içerisindeki hücrelere hücre dışı yolla değişik sıvı veya sıvı içerisindeki ilaç, nörotransmitter vb. madde aktarılması için kullanılır.



Resim 2: Puller ve Polishing cihazı

maktadır.

6- İverted mikroskop: Hücrelerin görüntülenmesi ve hücre zarı ile pipet ucunun yama menteşe durumunun oluşturulması bu mikroskop altında gerçekleştirilmektedir.

7- Puller: Pipet yapıcı demektir.

8- Glass pipettes: Cam pipetlerin çalışmanın ana konusuna göre değişik tipleri bulunmaktadır. Biz laboratuvarımızda borasilikatlı cam pipetler kullanılmaktadır.

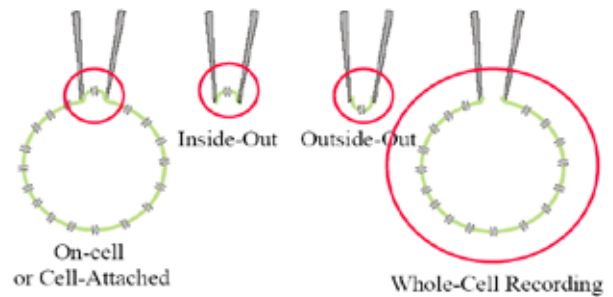


Resim 3: Yükselteç (amplifikatör)

### 3. Patch-Clamp Uygulamaları:

Çalışmanın amacına, araştırması istenilen kimyasal, kanal blokör veya nörotransmitter maddenin çeşidine bağlı olarak 4 çeşit patch-clamp uygulaması vardır. Bunlar; 1- Hücre üzerinde (Cell attached-On cell) 2- Tüm Hücre Kaydı (Whole-cell recording) 3- Dışı Dışarıda (Outside-out) 4- İçi dışarıda (Inside-out) uygulamalarıdır. 1- Hücre üzerinde (Cell attached- On cell): Bu tam bir patch-clamp uygulamasıdır. Bu uygulamanın ilk aşaması ısıtma işlemi ile yaklaşık 1-5 mikrometre yarıçapında bir pipet ucu oluşturulduktan sonra mikroskop çemberindeki

#### FARKLI PATCH-CLAMP ŞEKİLLERİ



Şek. 2: Patch-clamp kayıt şekilleri

hücreye temas edilir. Hücre zarı ile pipet arasında pipetin küt ucundan emici pompa ile vakum oluşturularak gegaohm (Gegaseal) düzeyinde bir akım oluşturulur. Elektrotla temas eden pipet ucundaki hücre zarı kısmı zarın diğer kısımlarından izole edilmiştir fakat hücre içi ortamdan (ikincil haberciler, nörotransmitterler vb.) etkilenir. Zar potansiyeli direk olarak hesaplamadan ziyade, hücrenin bağımsız bir voltaj menteşe yöntemi ile ölçülür. Bu uygulamalar, ikincil haberciler ve diğer düzenleyiciler tarafından hücre zarı kanallarının açılması-kapanması ve voltaj

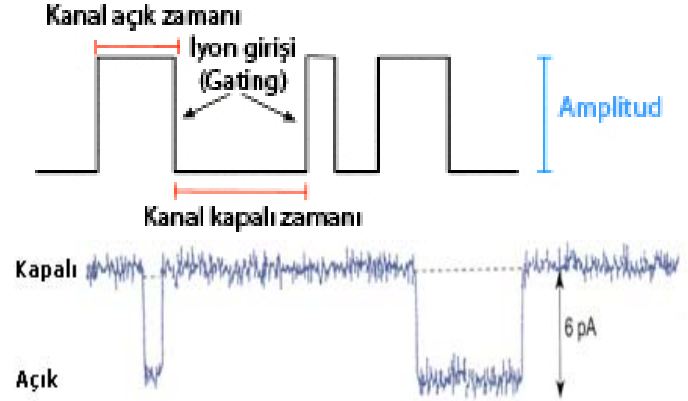
değişiklikleri inceleneceği zaman tercih edilir (Sigworth, 1980; Hamill ve ark., 1981; Sakmann ve Neher, 1983; Teisseyre, 2001; Nilius, 2003)

2- Tüm Hücre Kaydı (Whole-cell recording): Hücre üzerinde işleminin daha ileri aşamasıdır. Pipet ucu ile zara yapılan kaynak vakum pompası ile devamlı vakum yaptırılarak zar yırtılır. Pipet elektrotu direk hücre sitoplazması voltaj değişimlerini ölçer. Pipet ucu zarın yırtılması nedeni ile pipet içerisindeki solüsyonu hücre sitoplazmasına, hücre sitoplazması sıvısı da pipet içerisine geçer ve denge durumuna gelirler. Bu tip uygulamalar hücre zarı tüm kalsiyum kanallarının araştırılması gerektiği durumlarda tercih edilir. Bu uygulama, nöronların hücre zarı kısımlarına kolayca girilmesini sağlar. Hücre içi ikincil habercilerin hücre zarı yıkılmasına bağlı olarak kayıp edildiği için onların yokluğunda ne gibi olayların olduğunu araştırmak için tercih edilir. Ayrıca, hücre içerisine aktivatör veya inaktivatör madde kolaylıkla verilerek hücre zarı cevapları kontrol edilir (Hamill ve ark., 1981; Teisseyre, 2001; Nilius, 2003; Nazıroğlu ve ark., 2007; Nazıroğlu ve Lückhoff 2008; Bal ve ark., 2009).

3- Dışı Dışarıda (Outside-out): Dışı dışarıda şekli; hücre tüm hücre kaydı döneminde iken, hücre zarının dışarı koparılması durumunda kayıt alınmasıdır. Çember hücre dışı solüsyon içerirken, pipet içerisi hücre içi solüsyonla doldurulur. İçi dışarıda kaydından ayrılan özelliği budur. Yama şekillendirilmesi ekstraselüler taraf ile banyo solüsyonuna maruz kalan tek iyon kanalları içerir. Hücre dışı faktörlerin (örn. nörotransmitter maddeler) araştırılmasına ihtiyaç duyulduğunda tercih edilir. Bu durumlarda dışı dışarıda kaydı tek kanal akımlarının tüm hücre kayıtları sık izlenir (Hamill ve ark. 1981; Teisseyre, 2001; Nilius, 2003).

4- İçi dışarıda (Inside-out): Hücre whole cell döneminde, manipulatörün mikro ayardan makro ayara alınması ile hızlı geri çekme hareketi yaptırılarak, hücre zarının dışarı koparılması durumunda kayıt alınmasıdır. Bu durumda hücre zarı ve dolayısı ile iyon kanalları hücre zarından dışarıya alınmaktadır. Fakat bu durumda pipet ucundaki hücre zarının tampon içerisinden çıkmamasına dikkat edilmelidir. Pipet ucundaki hücre zarı parçacığı günümüzde açıklanamayan nedenlerle ters dönmektedir. Dışı dışarıda kayıt sisteminde hücre zarının içi ve dışarıyı yer değiştirmez iken, içi dışarıda kayıt sisteminde pipet ucundaki hücre zarı yer değiştirip dışı içeriye ve içi dışarıya gelmektedir. Bu tip patch-clamp uygulanmasının içi dışarıda ismi buradan gelmektedir. Bu nedenle, çember hücre dışı solüsyon içerirken, pipet içerisi hücre içi solüsyonla doldurulur. İçi dışarıda yöntemi kalsiyum gibi intrasellüler faktörler tarafından aktive edilen özellikle iyon kanalları çalışmaları için faydalıdır. Ayrıca, tekli kanal araştırmalarının uygulanması, içi dışarıda yöntemi ile araştırılabilir. Bu uygulamadan anlaşılacağı gibi, pipet ucundaki aradaki kanalların değişik

maddelere maruz kalmasıyla halen açılıp kapanabiliyorlar ise, bunların aktivasyonunda hücre içi organellere gerek olmadığına ve hücre kanalını açan unsurların (örneğin TRPM2 kanallarındaki N terminal ucu gibi) zarın üzerinde olduğu sonucu çıkarılır (Hamill ve ark. 1981; Teisseyre, 2001; Nilius, 2003; Nazıroğlu ve Lückhoff, 2008).



Şek. 3: Tekli kanal (inside-out) kayıtları ve kondüktansı. Kanal açık zamanı, kanalın açık olduğu süreyi göstermektedir. İyon (katyon) girişine bağlı olarak hücre içi veya iyon kanal negatifliği azalmaktadır. İyon çıkışı oluncu negatiflik artmaktadır.

### Son yıllardaki patch-clamp sistemindeki gelişmeler:

Yükselteç (Amplifier) lerdeki gelişmeler

Son yıllarda yapılan sistemlerde patch-clamp sistemi cihazlarında teknolojiye paralel gelişmeler olmaktadır. Örneğin, kendi laboratuvarımızda mevcut HEKA firmasının yükselteç (amplifier) cihazında 10 yıl öncesine kadar EPC7 modeli varken, bugün EPC10 modeli kullanılmaktadır. Bu sayede alınan biyopotansiyeller daha anlamlı şekillere dönüştürülmektedir. Bu yükselteçlerin şu özellikleri vardır. C hızlı uzatılmış denge aralığı. Geniş band aralığındaki kayıtlar için düzenlemeye izin veren filtre-2. 3 elektrotu destekleyen başlık modu. Ayrıca, yeni EPC-10 USB başlık düşük gürültü değerleri sağlamaktadır. Özellikle 1 ve 10 kHz bandları ile ilgili olarak kayıt sistemleri geliştirilmiştir. İsteğe göre patch amperometre uygulamaları ve 3 elektrot konfigürasyonları için özel başlık talepleri karşılanmaktadır.

Patch clamp tekniğinde yeni gürültü giderme tekniklerindeki gelişmeler

**Bakır levhalar:** Faraday Kafesi içerisinde kayıt alma esnasında gürültü kaynaklarını en aza indirmek için mikro elektrot sistemi çevresine şekilde gösterildiği gibi bakır levhalar yerleştirilir (Şek. 1). Bakır levhalar yerleştirilmeden önce patch çemberinin düzgün bir şekilde yerleştirilmesi ve hücrelerden kayıt almak için tüm hücre kayıt sisteminin oluşturulması gerekmektedir.

Vax (mum) ile pipet ucunun kaplanıp hücrede sabit kalmasının sağlanması: Bu işlemde ilk olarak dış hekimliğinde de kullanılan renkli mumlardan 25 ml beher içerisine bir miktar konulur. Beher etrafından geçirilen doğru akım ile beher ısıtılarak mum eritilir. Daha sonra, pipet yapıcı (puller) cihazında yapılan mikropipet 10 cc'lik bir enjektörün ucuna yaklaşık 10 cm uzunluğunda yerleştirilen plastik serum borusunun uç kısmına, mikropipetin

arka tarafı gelecek şekilde yerleştirilir. Daha sonra enjektör aracılığı ile vakum uygulanıp, cam beher içerisine konulup elektrik geçirilerek eritilmiş düzenek içerisindeki mumu hızlıca batırılıp çıkarılır. Sonrasında mikroskop altında yine polishing cihazı eşliğinde mikropipet ucuna elektrik verilerek mumun pipet içerisinden çıkması ve pipetin ucunun açılması sağlanır. Bu şekilde mikropipetin dış kısmı mum ile kaplanmıştır ve hücreye temas edildiğinde mum sayesinde pipetin hareketleri minimuma indirilip gürültü seviyesi azaltılmış olacaktır (Nazıroğlu ve Lückhoff, 2008).

Pipet ucunun istenilen düzeye getirilmesi (polishing): Bilindiği gibi patch pipetlerinin ucunun 1-5 µm arasında olması gereklidir. Fakat bazen pipet yapımcıların rezistanslarındaki zamana bağlı değişikliklere bağlı olarak istenilen düzeyde pipet ucu oluşturamamakta ve pipet uçları geniş olmakta, bu durumda patch pipetinde 3-6 GOhm arasında olması gereken hücre zarı direnç (r-membrane) değerlerini çok yüksek olmasına neden olmaktadır. Bu durumlarda, pipetin sivri ucu lehim makinesi benzeri ısıtma

sistemine yakınlaştırılarak (Resim 2) ve 2-3 sn kadar ısıya maruz bırakılarak geniş olan pipet ucunun istenilen düzeylere getirilmesi sağlanmaktadır (Nazıroğlu ve Lückhoff, 2008).

#### Sonuç:

Patch-clamp uygulamaları sayesinde elektrofizyolojiye yeni bir soluk gelmiştir. Bu yöntemle hücre zarındaki kanalların yapıları, açılıp kapanmaları ve değişik nörotansmitter ve kimyasal ajanlara cevapları incelenebilmektedir. Patch-clamp çalışmaları önderliğinde özellikle katyon kanallarını doğrudan bloke eden maddelerin araştırılması önem arz etmektedir. Yakın zamanlarda keşfedilen birçok iyon kanallarının (özellikle transient receptor potential, TRP) araştırılmasında patch-clamp uygulamaları önemini korumaktadır (Nazıroğlu ve ark., 2007). Gelecekte önemini koruyacak olan bu elektrofizyolojik uygulamaların yurdumuzda bu tekniğin uygulanmasına başlayacak olanlara yardımcı olmak amacı ile hazırlanan bu derleme sunumu sayesinde temel bilgilerin elde edileceğini ümit ediyoruz.

#### KAYNAKLAR:

- Arsiero, M., Lüscher, H.R., Giugliano M., 2007. Real-time closed-loop electrophysiology: towards new frontiers in in vitro investigations in the neurosciences. *Arch. Ital. Biol.* 145, 3-4, 193-209.
- Bal R., Baydas G., Nazıroğlu M., 2009. Electrophysiological properties of ventral cochlear nucleus neurons of the dog. *Hear. Res.* 256, 93-103.
- Bernstein, J., 1902. Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme. *Erster Theil Pflügers Arch.* 92, 521-562.
- Cole, K., Curtis H., 1939. Electrical impedance of the squid giant axon during activity. *J. Gen. Physiol.* 22, 649-670.
- Curtis, H., Cole, C., 1940. Membrane action potentials from the squid giant axon. *J. Cell. Comp. Physiol.* 15, 147-152.
- Curtis, H., Cole, K., 1942. Membrane resting and action potentials from the squid giant axon. *J. Cell. Comp. Physiol.* 19, 135-144.
- Hamill, O., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. Sigworth, F. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391, 85-100.
- Hodgkin, A., 1937. Evidence for electrical transmission in nerve. Part I and II. *J. Physiol. (Lond.)* 90, 183-210, 211-232.
- Hodgkin, A., Huxley, A., 1939. Action potentials recorded from inside a nerve fibre. *Nature (Lond.)* 144, 710-711.
- Hodgkin, A., Huxley, A., Katz, B. 1952. Measurements of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* 116, 424-448.
- Hodgkin, A., Huxley, A. 1952. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* 116, 449-472.
- Hodgkin, A. Huxley, A. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (Lond.)* 117, 500-544.
- Nazıroğlu, M., Lückhoff, A., Jungling E., 2007. Antagonist effect of flufenamic acid on TRPM2 cation channels activated by hydrogen peroxide. *Cell Biochem. Funct.* 25: 383-387.
- Nazıroğlu, M., 2007. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochemi. Res.* 32, 1990-2001. Review.
- Nazıroğlu, M., Lückhoff A., 2007. A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-ribose in TRPM2 channels: Single channel events. *Neurochemi.Res.* 2008b, 33, 1256-1262.
- Nazıroğlu, M., Lückhoff A., 2008. Effects of antioxidants on calcium influx through TRPM2 channels in transfected cells activated by hydrogen peroxide. *J. Neurol. Sci.* 270, 152-158.
- Nilius, B., 2003. *Pflügers Archiv* and the advent of modern electrophysiology. From the first action potential to patch clamp. *Pflügers Arch.* 447, 267-271.
- Sakmann, B., Neher, E., 1983. Single channel recording. Plenum, New York.
- Sigworth, F., 1980. The variance of sodium current fluctuations at the node of Ranvier. *J. Physiol. (Lond.)* 307, 97-129.
- Sigworth, F., Neher, E., 1980. Single Na<sup>+</sup> currents observed in cultured rat muscle fibres. *Nature (Lond.)* 287, 447-449.
- Teisseyre, A. 2001, The Patch-Clamp technique and its application in investigations of the preproperties of human T lymphocyte potassium channel. *Cellular & Molecular Biology.* 6, 93-105.