

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**METASTATİK MEME KANSERİNDE TRKA AGONİSTİ
AMİTRİPTİLİN İLE TRPV1 MODÜLATÖRLERİNİN TEK
BAŞINA VE KOMBİNE ETKİLERİ**

Seren HAKSEVER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**METASTATİK MEME KANSERİNDE TRKA AGONİSTİ
AMİTRİPTİLİN İLE TRPV1 MODÜLATÖRLERİNİN TEK
BAŞINA VE KOMBİNE ETKİLERİ**

Seren HAKSEVER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nuray ERİN

Bu tez TÜBİTAK-COST 115S943 ve Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2019-4862 proje numaraları ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans hayatım boyunca tüm bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Nuray ERİN'e,

Her zaman yanımda olmasa bile varlığını hep hissettiren, hayatımda yeri doldurulamayacak bir yere sahip olan değerli meslektaşım Muhlis AKMAN'a,

Bu zorlu süreçte hem yardımlarını benden esirgemeyen hem de gerektiğinde ablalık yapan Esra NİZAM ve Özlem AKDENİZ'e,

Desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşlarım Dr. M. Gökhan ERTOSUN ve Dr. Sayra DİLMAÇ'a,

Bu yolda emin şekilde ilerlememi sağlayan başta Prof. Dr. Sadi ÖZDEM ve Prof. Dr. Coşkun USTA olmak üzere tüm Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda bulunan tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,

En ufak sorumda bile yardımcı olan Sağlık Bilimleri Enstitüsündeki tüm personele,

Benim ben olmamı sağlayan ve buralara kadar getiren, desteklerini hep hissettiğim; bu zorlu süreçte en kötü zamanlarımda hep yanımda olan başta annem Figen HAKSEVER ve babam Metin HAKSEVER'e, ablalarım Sezen ve Seza HAKSEVER'e,

Eve sinirli geldiğimde bile tüm serotonin kaynağıyla ve en kötü zamanlarımda varlığıyla beni sonsuz mutlu eden köpeğim BAXİ'ye

Tüm içtenliğimle teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunuyorum.

ÖZET

Amaç: Meme kanseri, kadınlarda her yıl en sık teşhis edilen kanser tiplerinden biri olup mortalitesi oldukça yüksektir ve metastaz gelişimi tedavisini sınırlamaktadır. Literatürde metastatik meme kanseri hücrelerinin hem TRPV1 hem de TrkA reseptörlerini eksprese ettiği gösterilmiştir. Nöronlar üzerinde yapılan çalışmalarda TrkA reseptör aktivasyonunun TRPV1 kanalının sensitizasyonunu arttırdığı belirtilmiştir. Ancak kanserde bu reseptörlerin tek ve kombine etkileri üzerine yapılan çalışmalar çok azdır. Bu amaçla çalışmamızda TrkA agonisti olan Amitriptilin ve TRPV1 modülatörlerinin tek ve kombine kullanımının metastatik meme kanseri hücre proliferasyonundaki etkileri araştırılmıştır.

Yöntem: 67NR ile 4T1 ve alttipleri 4TBM ve 4THM meme karsinom hücrelerinde TRPV1 ve TrkA ekspresyonuna Western Blot yöntemiyle bakıldı. TrkA agonisti Amitriptilin, TRPV1 agonisti Olvanil ve TRPV1 antagonisti AMG9810'un 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonundaki etkisi hücre kültürü yöntemiyle belirlenmiştir. TrkA ve TRPV1 ilişkisinin 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonundaki etkisinin belirlenmesi için hücre kültürü deneyi yapılmış; etkileşim türünü belirlemek için isobologram grafiği ve CI değerleri çıkarılmıştır.

Bulgular: 67NR, 4T1 ve 4T1 in alttiplerinde hem TRPV1 hem de TrkA ekspresyonu görülmüştür. Amitriptilin, Olvanil ve AMG9810 ajanları 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonunu baskılamıştır. Amitriptilin hem Olvanil hem de AMG9810 ile kombine kullanımında farklı dozlarda sinerjistik etkileştiği görülmüş; matematiksel ifadesi olarak CI değerleri ya 1'e eşit ya da 1'den küçük bulunmuştur.

Sonuç: 67NR, 4T1 ve alttiplerinde TrkA ekspresyonu ilk defa gösterilmiştir. Literatürden farklı olarak TrkA agonisti Amitriptilinin metastatik meme kanseri hücrelerindeki antiproliferatif etkisi ortaya konmuştur. İlk defa metastatik meme kanseri hücrelerinde TrkA-TRPV1 ilişkisinin hücre proliferasyonundaki etkisinin olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: TrkA, TRPV1, amitriptilin, olvanil, amg9810

ABSTRACT

Objective: Breast cancer is the most diagnosed cancer in women with high mortality rate and the development of metastasis limits the treatment options. It has been shown the expression of TrkA and TRPV1 channels in breast carcinoma in literature. Neuronal studies reported that TrkA reseptor activation increases the TRPV1 channel sentisization. However, there are few studies conducted on the activities of these reseptors alone or in combination in cancer. In this study, the effects of the use of TrkA agonist Amitriptilin and TRPV1 modulators alone or in combination in metastatic breast carcinoma investigated.

Method: 67NR, 4T1 and it's subtypes 4TBM and 4THM breast carcinoma cell lines were used to identify the expressions of TRPV1 and TrkA with western blot. The effects of TrkA agonist Amitriptilin, TRPV1 agonist Olvanil and TRPV1 antagonist AMG9810 on cell proliferation were investigated with cell culture techniques. The type of the relation between TrkA and TRPV1 in 4TBM and 4THM cell lines were identified with isobologram graph and CI value in cell culture.

Results: TRPV1 and TrkA expression were seen in 67NR, 4T1, 4THM and 4TBM cell lines. Amitriptilin, Olvanil and AMG9810 agents supressed cell proliferation in both 4TBM and 4THM cell lines. Amitriptilin decreased cell proliferation in different doses in combination either Olvanil or AMG9810 and their CI values found either equal to 1 or less then 1.

Conclusion: The expression of TrkA was shown for the first time in 67NR, 4T1 and it's subtypes. Different from literature, it has been found that Amitriptilin has antiproliferative effects on breast carcinoma cells. The effects of the interaction between TrkA and TRPV1 on cell proliferation were identified in metastatic breast carcinoma for the first time.

Key words: trka, trpv1, amitriptilin, olvanil, amg9810

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Metastaz	4
2.1.2. Meme Kanseri	6
2.2. Sinir Büyüme Faktörü (NGF)	9
2.3. p75 Nörotrofin Reseptör	9
2.4. Tirozin Reseptör Kinaz (Trk) Reseptör	10
2.4.1. Tirozin Reseptör Kinaz A (TrkA)	10
2.4.2. İnflamasyonda NGF ve TrkA	12
2.4.3. Ağrıda NGF ve TrkA	12
2.4.4. Kanserde NGF ve NGF Reseptörleri	13
2.5. TRPV1 Kanalı	14
2.5.1. TRPV1 in Kanserdeki Rolü	16
2.5.2. TrkA ve TRPV1 ilişkisi	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1. Western Blot	18
3.1.1. Western Blot Yöntemi için Hücre Lizatının Hazırlanması	18
3.1.2. Triton-X Lizis Tamponunun Hazırlanması	18
3.1.3. Örneklerdeki Protein Miktar Tayini (BRADFORD Yöntemi)	18
3.1.4. Western Blot Protokolü	19

3.1.5.	Western Blot Jelinin Hazırlanması	21
3.1.6.	Örneklerin Hazırlanması	22
3.1.7.	Örneklerin Jele Yüklenmesi	22
3.1.8.	Transfer İşlemi	22
3.1.9.	Boyama İşlemi	22
3.1.10.	Bloklama İşlemi	23
3.1.11.	Blotlama İşlemi	23
3.1.12.	Görüntüleme İşlemi	23
3.2.	Hücre Kültürü	23
3.2.1.	Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Takibi	23
3.2.2.	Hücrelerin Sayılması	24
3.2.3.	Hücre sayısını belirlemek için standart hazırlanması	24
3.2.4.	Kullanılan Ajanların ve Muamele Konsantrasyonlarının Hazırlanması	25
3.2.5.	Hücre Varlığı Testi (WST-1)	26
3.2.6.	İlaç-ilaç Etkileşimlerinin Belirlenmesi	26
3.3.	Genel İstatiksel Analizler	27
3.4.	Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler, Kimyasallar ve Cihazlar	27
3.4.1.	Kullanılan Sarf Malzemeler	27
3.4.2.	Kullanılan Kimyasallar	28
3.4.3.	Kullanılan Alet ve Cihazlar	29
4.	BULGULAR	30
4.1.	Meme Kanseri Hücrelerinde TrkA ve TRPV1 Ekspresyonunun Gösterilmesi	30
4.2.	TrkA Agonisti Amitriptilin'nin Tek Başına 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi	31
4.3.	TRPV1 Agonisti Olvanil'in Tek Başına 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi	33
4.4.	TRPV1 Antagonisti AMG-9810'un Tek Başına 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi	35

4.5.	TRPV1 Ajanlarının TrkA agonisti Amitriptilin ile Kombine Kullanımının 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi	36
4.5.1.	TRPV1 Agonisti Olvanil ile TrkA Agonisti Amitriptilin ile Kombine Kullanımının 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi	36
4.5.2.	TRPV1 Antagonisti AMG-9810 ile TrkA agonisti Amitriptilin ile Kombine Kullanımının 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi	41
4.6.	TrkA Reseptör Ligandı NGF ile TrkA İnhibitörü GW441756 Kullanımının 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi	46
4.6.1.	TrkA Reseptör Ligandı NGF ile TrkA İnhibitörü GW441756'nın Tek Başına Kullanımının 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi	46
4.6.2.	TrkA Reseptör Ligandı NGF ve TrkA İnhibitörü GW441756'nın Ön Tedavili Kullanımının 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi	49
5.	TARTIŞMA	53
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	59
	KAYNAKLAR	62
	ÖZGEÇMİŞ	72

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	Porilakrilamid jelin hazırlanması
-------------------	-----------------------------------

21



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Kanser Hücresinin Metastaz Aşamaları	5
Şekil 2.2.	TrkA Reseptörünün Hücre içi Sinyalizasyonu	11
Şekil 2.3.	TRPV1 kanalının yapısının şematik halinde gösterimi	15
Şekil 3.1.	Doz-Etki Grafiği için Kullanılan Formül	26
Şekil 3.2.	Kombinasyon İndeks Formülü	27
Şekil 4.1.	67NR, 4T1 hücre hattı ve 4T1 in alttipleri 4TBM,4THM ve 4TLM’de TRPV1 (A) ve TrkA (B) reseptörlerinin ekspresyonu. Pozitif kontrol olarak beyin dokusu (cortex) kullanılmıştır. TRPV1 hemen hemen hepsinde aynı miktarda eksprese edilirken 67NR nin TrkA ekspresyonu metastatik hücre hatlarına göre daha düşüktür. p75 reseptörü de hem 67NR de hem de metastatik meme kanseri hücrelerinde eksprese edilmediği görülmüştür.	30
Şekil 4.2.	%5 FBS ve %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında Amitriptilin konsantrasyonlarının 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi. (A) %5 FBS içeren besiyeri ortamında 4TBM hücre proliferasyonunda en yüksek konsantrasyonda kontrol grubuna göre anlamlı bir baskılanma görülmüştür. (B) %5 FBS içeren besiyeri ortamında 4THM hücre proliferasyonunda yüksek konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre baskılanma gözlemlenmiştir. (C, D) %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında 4TBM ve 4THM hücre hatlarında ise kontrol gruplarına kıyasla doza bağlı bir baskılanma görülmüştür. Analizler kontrol gruplarına göre yapılmıştır ve $p<0.05$ olanlar anlamlı kabul edilmiştir. $*p=0,020$, $**p=0,019$, $****p<0,0001$	32
Şekil 4.3.	TrkA agonisti Amitriptilin’in %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerinde gösterdiği etki ve EC50 değerleri.	33
Şekil 4.4.	%5 FBS ve %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında farklı Olvanil konsantrasyonlarının 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi. (A, B) %5 FBS içeren besiyeri ortamında 4TBM ve 4THM	

- hücrelerinin proliferasyonunda yüksek konsantrasyonda anlamlı bir baskılanma görülmüştür. (C, D) %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında 4TBM ve 4THM hücre hatlarında doza bağlı bir baskılanma görülmüştür. Analizler kontrol gruplarına göre yapılmıştır ve $p<0.05$ olanlar anlamlı kabul edilmiştir. *** $p<0.0002$, **** $p<0,0001$ 34
- Şekil 4.5.** TRPV1 agonisti Olvanil'in %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerinde gösterdiği etki ve EC50 değerleri. 34
- Şekil 4.6.** %5 FBS ve %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında farklı AMG-9810 konsantrasyonlarının 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi. (A, B) %5 FBS içeren besiyeri ortamında 4TBM ve 4THM hücrelerinin proliferasyonunda yüksek konsantrasyonlarda anlamlı bir baskılanma görülmüştür. (C, D) %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında 4TBM ve 4THM hücre hatlarında doza bağlı bir baskılanma görülmüştür. Analizler kontrol gruplarına göre yapılmıştır ve $p<0.05$ olanlar anlamlı kabul edilmiştir. ** $p= 0.0016$, **** $p<0.0001$. 35
- Şekil 4.7.** TRPV1 antagonisti AMG-9810'un %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerindeki etkisiyle elde edilen doz-etki grafiği ve EC50 değerleri. (A, B) 36
- Şekil 4.8.** TRPV1 agonisti 5 μ M Olvanil ile TrkA agonisti 5 μ M Amitriptilin'in kombine kullanımının %5 FBS içeren ortamdaki 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi (A, B) İki ilacın kombine kullanımının kontrol gruplarına göre hücrenin proliferasyonunu baskılandığı 4TBM hücresinde görülmüşken 4THMde etki gözlenmemiştir. ** $p<0,05$ 37
- Şekil 4.9.** TRPV1 agonisti 5 μ M Olvanil ile TrkA agonisti 1 μ M Amitriptilin'in kombine kullanımının %0,2 FBS içeren ortamdaki 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi (A, B) Amitriptilin ve Olvanil ilaçlarının kombine kullanımı anlamlı şekilde kontrol gruplarına göre proliferasyonu baskıladığı her iki hücre hattında görülmüş, 4THM hücre hattında kombine kullanım Olvanil'in

- etkisini arttırdığı gözlemlenmiştir. *** $p=0,0009$, **** $p<0,0001$ 38
- Şekil 4.10.** TRPV1 agonisti 5 μM Olvanil ile TrkA agonisti 5 μM Amitriptilin'in kombine kullanımının %0,2 FBS içeren ortamdaki 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi (A, B). Amitriptilin ve Olvanil ilaçları ayrı ayrı uygulandığında kontrol gruplarına göre proliferasyonu anlamlı ölçüde bastırmış, kombine kullanımda bu etki daha da belirgin gözlemlenmiştir. *** $p=0,0002$, **** $p<0,0001$ 39
- Şekil 4.11.** 4TBM hücresinde %0,2 FBS içeren ortamda Amitriptilin-Olvanil kombine dozlarıyla çıkarılan izobologram grafikleri ve CI değerleri. (A, B) 40
- Şekil 4.12.** 4THM hücresinde %0,2 FBS içeren ortamda Amitriptilin-Olvanil kombine dozlarıyla çıkarılan izobologram grafikleri ve CI değerleri. (A, B) 41
- Şekil 4.13.** TRPV1 antagonisti 5 μM AMG-9810 ile TrkA agonisti 5 μM Amitriptilin'in kombine kullanımının %5 FBS içeren ortamdaki 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi (A, B) İki ilacın kombine kullanımının kontrol gruplarına göre hücrenin proliferasyonunu anlamlı olarak baskılandığı 4TBM ve 4THM hücrelerinde gözlemlenmiştir. *** $p<0,02$, **** $p<0,001$ 42
- Şekil 4.14.** TRPV1 antagonisti 1 μM AMG-9810 ile TrkA agonisti 1 μM Amitriptilin'in kombine kullanımının %0,2 FBS içeren ortamdaki 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi (A, B) İki ilacın kombine kullanımının kontrol gruplarına göre hücrenin proliferasyonunu anlamlı olarak baskılandığı her iki hücre hattında görülmüş, kombine kullanımda AMG-9810 ilacının etkisini arttırdığı gözlemlenmiştir. * $p=0,0249$, *** $p<0,0007$ **** $p<0,0001$ 43
- Şekil 4.15** TRPV1 antagonisti 1 μM AMG-9810 ile TrkA agonisti 5 μM Amitriptilin'in kombine kullanımının %0,2 FBS içeren ortamdaki 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi (A, B) İki ilaç tek başına uygulandığında kontrol grubuna göre proliferasyonu anlamlı ölçüde baskıladığı, iki ilacın kombine kullanımı ise bu etkiyi daha da

- belirginleştirdiği görülmüştür. $*p=0,0182$, $***p=0,0002$
 $****p<0,0001$ 44
- Şekil 4.16.** 4TBM hücresinde %0,2 FBS içeren ortamda Amitriptilin ve AMG-9810'un kombine dozlarıyla çıkarılan izobologram grafiği ve CI değerleri. (A, B) 45
- Şekil 4.17.** 4THM hücresinde %0,2 FBS içeren ortamda Amitriptilin ve AMG-9810'un kombine dozlarıyla çıkarılan izobologram grafiği ve CI değerleri. (A, B) 45
- Şekil 4.18.** TrkA ligandı NGF ile TrkA inhibitörü GW441756'nın tek başına kullanımının %5 FBS içeren ortamdaki 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi (A, B, C). NGF tek başına kullanıldığında anlamlı bir değişiklik gözlemlenmezken, GW441756 ise tek başına uygulandığında kontrol grubuna göre proliferasyonu doza bağlı olarak baskıladığı her iki hücrede de görülmüştür. $**p=0,0023$, $****p<0,0001$ 47
- Şekil 4.19.** TrkA inhibitörü GW441756 ilacının %5 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerindeki etkisi ile elde edilen hücre varlığı yüzdesi-konsantrasyon grafiği ve IC50 değerleri. (A, B) 47
- Şekil 4.20.** TrkA ligandı NGF ile TrkA inhibitörü GW441756'nın tek başına %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi (A, B, C, D). Analizler kontrol grubuna göre yapılmıştır. $**p<0,05$, $****p<0,0001$ 48
- Şekil 4.21.** TrkA inhibitörü GW441756 ilacının %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerindeki etkisi ile elde edilen doz-etki grafiği ve IC50 değerleri (A, B). 49
- Şekil 4.22.** %0,2 FBS içeren ortamda 10 ve 100 ng/mL konsantrasyonlarda NGF ile ön tedavi uygulanan grupların 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi. (A)4TBM hücresinde sadece 100 ng/mL NGF ile ön tedavi edilen sonrasında 15 µM Amitriptilin uygulanan grupta tek Amitriptilin uygulanan gruba göre anlamlı bir baskılanma görülmüştür. (B)4THM hücresinde 10 ve 100 ng/mL

konsantrasyonlarda ön tedavili olarak uygulanan TrkA reseptör ligandı NGF, 100 ng/mL konsantrasyonda kontrole göre anlamlı bir baskılanma gözlenirken tek başına Amitriptilin uygulanan gruplarına göre ise anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. * $p<0.05$, # $p<0.05$ 50

Şekil 4.23. %0,2 FBS içeren ortamda 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda GW441756 ile ön tedavi uygulanan grupların 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi. (A, B) %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerinde 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda ön tedavili olarak uygulanan TrkA reseptör inhibitörü GW441756, her iki konsantrasyonda kontrole göre anlamlı bir baskılanma gözlenirken sadece 10 μ M GW konsantrasyonunda tek başına Amitriptilin uygulanan gruplara göre antiproliferatif etkide artış görülmüştür. 51

SİMGELER ve KISALTMALAR

APS	: Amonyumpersülfat
BDNF	: Beyin-kaynaklı Nörotrofik Faktör
BSA	: Bovin Serum Albumin
CIPA	: Doğuştan anhidrozlu ağrıya karşı duyarsızlık
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EC50	: %50 etki gösteren konsantrasyon
ECL	: Kemoluminesan
EMT	: Epidermal Mezenkimal Geçiş
ER	: Östrojen Reseptörü
FBS	: Fetal Bovin Serum
GAB1	: Gbr2-ilişkili Binder-1
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
gr	: gram
Grb2	: Büyüme faktör reseptör bağ protein-2
GTP	: Guanidin tri fosfat
HER	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü
IC50	: %50 inhibe eden konsantrasyon
IDC	: İnvaziv Duktal Karsinoma
IP3	: İnositol trifosfat
LRR1-3	: Üç lösün içeren tekrarlar

MAPK	: Mitojen-iliskili Protein Kinaz
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
NFkappaB	: Nukleer Faktör Kappa B
ng	: nanogram
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
NT-3	: Nörotrofin-3
NT-4	: Nörotrofin-4
p75^{NTR}	: p75 nörotrofin reseptörü
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
PI3K	: Fosfoinositid 3-Kinaz
PIP2	: Fosfatidilinozitol-4,5-Bisfosfat
PKC	: Protein Kinaz C
PLCγ	: Fosfolipaz C gama
PR	: Progesteron Reseptörü
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
RSK	: Ribozomal s6 Kinaz
SDS	: Sodyumdodesilsülfat
TBS	: Tris-Tamponlu Salin
TBS-T	: Tris-Tamponlu Salin- Tween-20
TNBC	: Üçlü Negatif Meme Kanseri
TNFR	: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
TrkA	: Tropomyozin Reseptör Kinaz A

TrkB	: Tropomyozin Reseptör Kinaz B
TrkC	: Tropomyozin Reseptör Kinaz C
TRP	: Transient Reseptör Potansiyel
TRPV1	: Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid tip I
WST-1	: Suda çözünebilen Tetrazolium Tuzu-1
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar

1. GİRİŞ

Kanser, normal hücrenin mutasyonlar sonucu anormal şekilde çoğalan hücrelere farklılaşması ve bu hücrelerin birleşerek kontrolsüz bir şekilde çoğalıp büyümesiyle oluşan bir hastalıktır. Kanser hücrelerinin başka doku veya organa yayılması olarak adlandırılan metastaz sürecini kanserli hücreler yeni mikroçevre yaratabilmek ve böylelikle yaşamlarını sürdürebilmek için kullanırlar. Kanser hastalarında metastaz istenmeyen bir durumdur ve metastaza bağlı mortalite oranının hala çok yüksek seviyelerdedir. Dünyada akciğer ve kolon kanserinden sonra en çok görülen kanser türlerinden biri olan heterojen yapıdaki erken evre meme kanserinde ölüm oranı tedavilerle her ne kadar azaltılsa da hala kanser hücrelerinin metastaz yapmadan teşhis edilmesi mümkün olmamaktadır. Şu an kullanılan tedavilerle erken evrede teşhis edildiğinde tedavi oranı oldukça yüksek olan meme kanseri metastatik kanser hücrelerine dönüştüğünde ise tedavisi oldukça zordur (Harbeck ve Gnant, 2017).

TRPV1 kanalı, iyon kanalı ailesine mensup en çok çalışılan nonselektif Ca^{+2} kanalıdır. Endojen ve eksojen ligandlarla aktive olabilmektedir. Bu kanalın aktifleşmesiyle hücreiçine porlarından Ca^{+2} akışı sağlanır ve kanalın sürekli açık kalmasıyla kanalın desensitize olmasına neden olur (Carnevale ve Rohacs, 2016). TRPV1 in hem MCF-7, BT-20, PC-3 gibi çeşitli kanser türlerinde eksprese edilmesi hem de ağrıya neden olan kalsiyum sinyalindeki önemli rolü göz önüne alındığında bu kanalın tümörjenez, tümörün sağ kalımını ve proliferasyonunu desteklediği yapılan çalışmalarda gösterilmektedir (Dai, 2016). Bir diğer yandan literatürde TRPV1 ligandı capsaisinin de kanser hücrelerini apoptoza sürüklediği birçok çalışma vardır (Paez Borda ve ark., 1998; Mori ve ark., 2006; Naziroglu ve Ovey, 2015; Xu ve ark., 2020). Dolayısıyla bu kanalın işlevi tam olarak açıklanamamıştır.

Ligandı NGF'nin keşfedilmesiyle yapılan çalışmalarda reseptör tirozin kinaz ailesine mensup TrkA reseptörünün ilk olarak nöronların farklılaşmasında ve sağ kalımında rolü olduğu bulunmuştur (Bibel ve Barde, 2000; Huang ve Reichardt, 2001). Fakat daha yapılan çalışmalarda TrkA'nın ve NGF'nin sadece nöronlarda değil patolojik vakalarda ağrı, inflamasyonda ve kanserde de etkisi olduğu görülmüştür (Raychaudhuri ve

Raychaudhuri, 2004; Denk ve ark., 2017; Faulkner ve ark., 2018). Birçok kanser çeşidinde TrkA ve ligandı NGF'nin upregüle edilmesi kanserdeki varlığının kanseri desteklediğini ortaya koymaktadır (Lagadec ve ark., 2010; Demir ve ark., 2016; Faulkner ve ark., 2018; Herbrich ve ark., 2018). Bir diğer yandan literatürde TrkA ligandı NGF'nin glioma hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığını gösteren çalışma da vardır (Meco ve ark., 2019). Literatür incelendiğinde dorsal root gangliadaki TrkA reseptörünün birçok hücre içi proteinleri kullanarak TRPV1'in sensitizasyonuna neden olduğu belirtilmiştir (Chuang ve ark., 2001; Donatien ve ark., 2018). Fakat kanserde bu iki reseptörün beraber kullanımı ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır.

Literatür bilgileri göz önünde bulundurulduğunda metastatik meme kanseri hücrelerinde TrkA agonisti Amitriptilin'in TRPV1 modülatörlerinin anti-proliferatif etkilerini arttıracak hipotezi kurulmuştur. Bu hipotez doğrultusunda yola çıktığımız çalışmada öncelikle metastatik meme kanseri hücrelerinde TRPV1 ve TrkA ekspresyonun varlığını western blot yöntemiyle gösterildi. Sonrasında TrkA agonisti Amitriptilin, TRPV1 modülatörleri olarak adlandırılan TRPV1 agonisti Olvanil ve TRPV1 antagonisti AMG9810'un tek başına metastatik meme kanseri hücre proliferasyonundaki etkisi hücre kültürüyle belirlendi. Bu verilerden her ilacın doz-etki grafikleri çıkarıldı ve EC50 değerleri hesaplandı. Amitriptilin ile TRPV1 modülatörleri daha sonrasında kombine kullanıldı. Bu çalışma ile TRPV1 ve TrkA reseptörlerinin metastatik meme kanseri hücre proliferasyonundaki etkileri ortaya konulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, insan vücudundaki hücrelerin kontrolsüz bir biçimde durmaksızın çoğalıp, etrafındaki dokulara da yayılmasıyla oluşan bir çeşit hastalıktır. Kanser hücreleri, insan vücudunun herhangi bir dokusunda oluşabilir ve normal hücrelere kıyaslandığında epigenetik/genetik farklılıklar göstermektedirler (Ruddon, 2007). Bu değişiklikler genelde kalıtsaldır; normal hücrenin kanser hücrelerine geçişini tetikler ve proliferasyon olup tümör oluşumunu destekler. Normal hücrenin farklılaşması ile oluşan kanserli hücre, erken evrede normal hücreler gibi görünse de proliferasyon gerçekleştiğinde normal hücreden farklı özellikler göstermeye başlar. Normal hücreler mutasyon geçirir ve onkogen olarak adlandırılan ve kanser gelişimini destekleyen genleri kullanarak kanserli hücrelere farklılaşırlar (Hanahan ve Weinberg, 2011; Hahn ve Weinberg, 2015).

Kanser hücrelerini normal hücreden ayıran birkaç özellik vardır. Bunlar;

1)Büyümesi: Normal şartlar altında insan hücreleri büyür ve ihtiyaç olduğunda bölünerek yeni hücreleri oluşturabilir. Büyürken yaşlı ya da zarar görmüş olanlar ortadan kaldırılır ve yerine yeni hücreler oluşturulur. Fakat kanser hücrelerinde bu süreç bu şekilde gerçekleşmez. Kanser hücreleri devamlı proliferasyon olmaya devam eder ve ihtiyaç olmadığı halde yeni hücreler oluşur. Abnormal bir şekilde proliferasyon olan kanser hücreleri tümör denilen oluşumu gösterir. Kanser hücresi bir diğer yandan vücutta tümör oluşumunu önleyen bir mekanizma olarak çalışan tümör baskılayıcı genlerde de mutasyona neden olup kendi proliferasyonunu destekler hale getirir. Proliferasyonu baskılayan sinyalleri alamayan kanser hücresi kontrolsüz bir şekilde çoğalır ve böylelikle apoptozdan kaçır.

2)Yanındaki dokulara invazyon yeteneği: Normal hücreler proliferasyon olup belirli bir büyüklüğe ulaşıncı hücrelerden gelen sinyallere cevap oluşturup proliferasyonu durdurabilir. Kanser hücreleri bu sinyallere cevap veremez ve yan dokulara doğru yayılım gösterir.

3)Vücudun diğer bölümlerine metastaz yapma yeteneği: Normal hücreler adezyon molekülleriyle yan hücrelere tutanabilir. Kanser hücrelerinin primer tümörden ayrılıp serbest bir şekilde kalabilir ve vücudun diğer bölümlerine metastaz yapabilir. Bu yanındaki dokulara olabileceği gibi kan dolaşımı ya da lenfatik sistemle diğer organlara da gerçekleştirilebilir (Chambers ve ark., 2002; Chaffer ve Weinberg, 2011; Medicine, 2017).

2.1.1. Metastaz

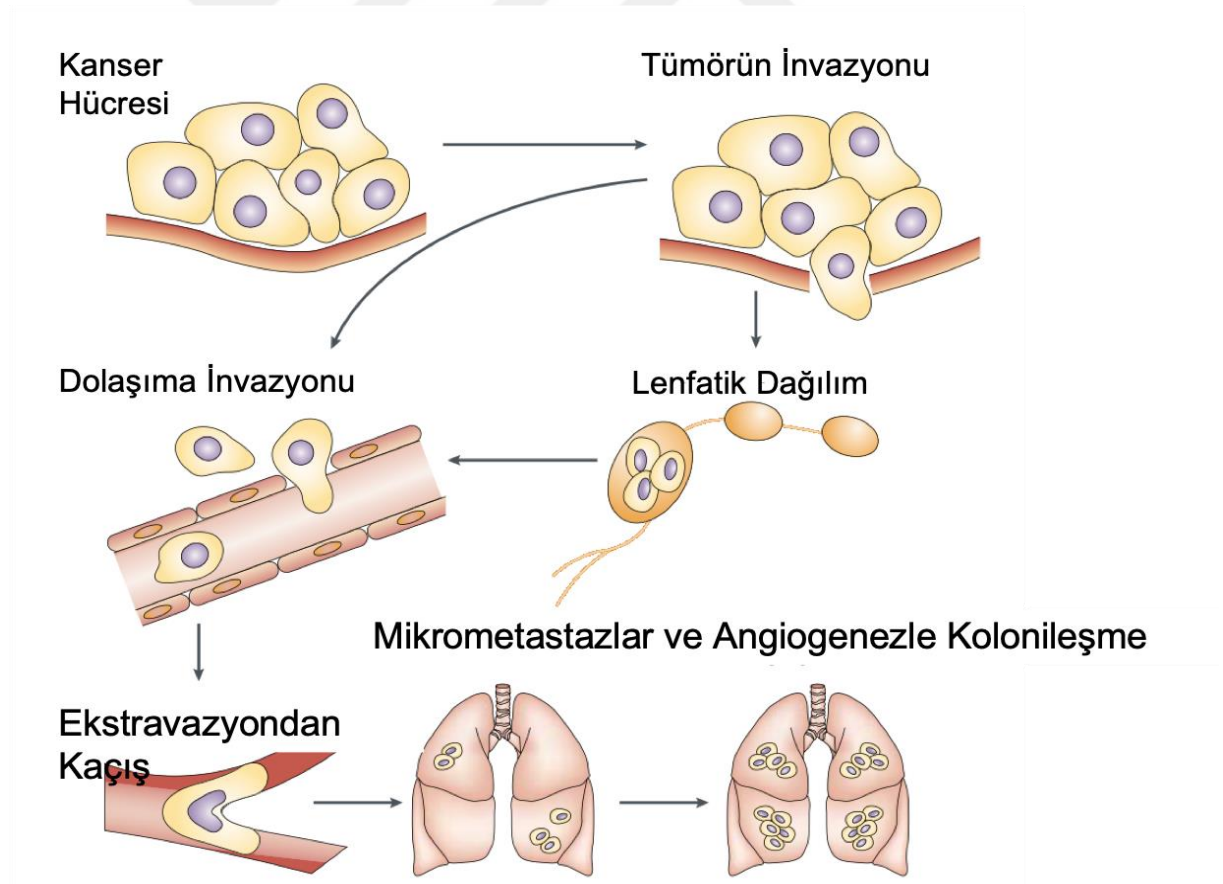
Metastaz yapma yeteneği malign tümörlerin yaygın özelliğidir ve metastaz kanser hastalarında ölümün temel nedenlerinin başında gelmektedir. Metastaz, kanser hücrelerinin vücutta yayıldığı ve primer tümörün bulunduğu bölgeden uzakta organlarda yeni koloniler oluşturan süreçtir (Suhail ve ark., 2019). Genetik olarak stabil olmayan kanser hücreleri primer tümörden uzakta bir yere tümör mikroçevresi oluşturur.

Metastatik koloni oluşturan bir tümör hücresi;

- a) Metastatik kanser hücresinin primer tümörden ayrılması
 - b) Lokal doku stromasına istila etme(invazyon)
 - c) Lenf ve kan damarlarına penetre olma(intravazasyon)
 - d) Dolaşımda hayatta kalma
 - e) Diğer organların kılcal damarlarında veya venüllerine katılma
 - f) Parankim doku içine nüfuz etme (extravazasyon)
 - g) Yeni kolonileştirilmiş ortama uyum sağlama veya mikroçevreyi kendi ihtiyaçlarına uygun şekilde oluşturma
 - h) Yeni tümör oluşturmak için bölünme (kolonizasyon)
- gibi aşamaları gerçekleştirir (Abbas ve ark., 2015).

Bir tümör hücresinin yapabilmesi için yukardaki aşamaların en az beş tanesine sahip olması gerekir. Bunlar arasında mikroçevre ile etkileşim, göç, istila, apoptoza direnç ve anjiyogenezi indükleme fonksiyonu bulunur.Bu beş fonksiyon da proteoliz ve adezyon mekanizması tarafından düzenlenir.Bu basamakların gerçekleşmesi için tümörü oluşturan hücrelerin birbirlerinden ayrılması gerekir.Normalde epitel tabakayı oluşturan hücreler komşu hücrelerle birlikte hareketsiz kalabilmek adına çeşitli adezyon

molekülleri sayesinde sıkı bir şekilde bağlıdır. Tümör hücrelerinde bulunan adezyon moleküllerinde ise fonksiyon kaybı vardır. Tümör hücreleri bu adezyon molekülleri parçalayıp serbest kalabilmek için hem kendisi proteolitik enzimler salgılayarak hem de stromal hücrelerin bu enzimleri salgılamasını uyarır. Proteoliz ve adezyon moleküllerindeki fonksiyon kaybı, tümör hücresinin diğer hücrelerle bağlantısını sağlar; migrasyon ve anjiogenezin desteklenmesine yardımcı olur. Serbest kalan tümör hücresi önce dokunun stromasına invaze olur. İnvazyonu takiben başka bir organa metastaz yapabilmek için önce lenf ya da kan damarına intravazasyonu gerçekleştirir; sonrasında dolaşımdaki bazı etmenlerden sağ kalan tümör hücreleri kan dolaşımından ekstravaze olur. Kan yoluyla ulaştıkları organların kılcal damarlarına ya da venüllerine yapışanlar kolonileşirler ve anjiogenez denilen yeni damarlar oluşturarak hayatta kalabilmek için yeni bir mikroçevre oluşturur (Bacac ve Stamenkovic, 2008).



Şekil 2.1. Kanser Hücresinin Metastaz Aşamaları (Steeg, 2003).

2.1.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, her yıl en sık teşhis edilen kanser tiplerinden biri olup kadınlarda kanser ölümünün önde gelen nedenlerinden biridir (Redig ve McAllister, 2013). Erken evre metastatik olmayan meme kanseri olan hastaların %80'inin tedavisinin mümkün olduğu kabul edilmiştir fakat meme kanseri de dahil birçok kanser türünde olduğu gibi metastaz gelişimi klinik olarak tedavi edilemeyen hastalıklara yol açmaktadır. Meme kanseri hücreleri büyük oranda lenf noduna, kemiğe, akciğere, karaciğere ve beyine metastaz yapmaktadır. Uzak organ metastazları ile ilerlemiş meme kanseri, şu anda mevcut tedavilerle tedavi edilemez olarak kabul edilmektedir. Özellikle meme kanseri hücrelerinin beyine metastazları, en yüksek morbite ve mortalite nedenidir (Louie ve ark., 2013). Bu nedenle meme kanseri ölümlerinin büyük çoğunluğunun metastaz sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir.

Meme kanseri, heterojen bir hastalıktır. Her bir hastada hatta her bir tümör içinde bile farklılık gösterebilir. Hastalığın anlaşılıp uygun tedavinin uygulanması için histolojik ve moleküler yapısına göre incelenmesi gereklidir. Histolojik olarak bakıldığında invaziv meme kanserinde en sık karşılaşılan alttip invazif duktal karsinomadır (IDC). Bu kanser tipinde, tümör yüzeyindeki biyobelirteçlere bakılarak östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) eksprese eden tümörler pozitif hormon reseptör meme kanseri olarak adlandırılır (Turashvili ve Brogi, 2017).

Pozitif hormon reseptör meme kanseri hücrelerinin büyümesi ve metastazı, östrojenden ve/veya progesterondan etkilenir (Lin ve ark., 2010). Östrojenler hem normal meme epitel hücrelerin hem de östrojene bağlı olan meme kanseri hücrelerinin gelişimine neden olur (Higgins ve Baselga, 2011). Östrojen, çekirdekteki östrojen reseptörüne bağlanıp birçok transkripsiyon faktörlerini aktive ederek normal hücrelerin kanserleşmesini gerçekleştirir. Bu hormonlar normal meme hücrelerinde ergenlik, adet döngüsü ve hamilelik sırasında meme gelişimini uyarır. Fakat kadınların adet döngüsü sırasında östrojen ve progesteron arasındaki dengesizlikler hücre proliferasyonunu arttırır ve DNA da bir hasar meydana getirebilir. İşlemin sürekli tekrarlanmasıyla mutasyona yol açan bu kusurlu onarım şekli, normal hücrelerin malign hücrelere dönüşümünü destekleyebilir. Bu sırada östrojen de bu hücrelerin büyümesini ve kanser

gelişiminini destekleyen stromal hücrelerin çoğalmasını uyarır. Östrojenin östrojen reseptörüne (ER) bağlanmasıyla ER gen ekspresyonunu modüle edebildiği gibi hücre dışı sinyaller östrojen olmadan da ER ekspresyonunu ve aktivasyonunu sağlayabilir (Harbeck ve ark., 2019). Meme kansinomunda ER+, PR+ ekspresyonları %70-80 oranında görülürken ER-PR- veya ER+PR- ekspresyonuna çok nadir rastlanmaktadır. Hormon tedavisine en yüksek cevabı oluşturan grup ER+PR+ meme kansinomudur (Turashvili ve Brogi, 2017). Bu nedenle, östrojen üretimini bloke eden ya da östrojenin reseptöre bağlanmasını engelleyen ilaçların hormona duyarlı meme kanseri tedavisinde önemli rollere sahiptir (Harbeck ve ark., 2019).

Bir diğer yandan, meme tümörlerinin birçoğu büyümek için hormona gerek duymazlar. Östrojen ve progesteronun yanı sıra meme kanseri hücrelerinin büyümesi ve metastazı, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2) ile de düzenlenebilir. HER2 hem normal hücrelerin hem de kanser hücrelerin yüzeyinde eksprese edilir. HER2 genindeki bir mutasyon hücrelerin sürekli hızlı bir şekilde proliferasyonuna neden olur ve kanser oluşur. Epidermal büyüme faktör-benzeri ligandların HER2 ine bağlanmasıyla reseptör aktive olur ve mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolu, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) yolu gibi farklı yollardan meme kanseri hücresinin sağkalımına, proliferasyonuna ve metastazına neden olur. Bazı meme kanseri hücrelerinin HER2'yi aşırı eksprese etmesinde HER2'nin hedeflenmesinin, HER2 pozitif meme kanserlerinde etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Fakat HER2'yi aşırı eksprese eden meme kanseri tipine az rastlanması tedavinin kısıtlı meme kanseri hücrelerinin tedavisinde kullanılmasına olanak sağlamıştır (Di Cosimo ve Baselga, 2010).

Meme kanserine moleküler olarak bakıldığında ER, PR ve HER2 reseptör ekspresyonu ile beraber proliferasyon belirteci olan Ki67'ye de bakılır. Ki67, G0 hariç diğer hücre siklus evrelerinde eksprese edilen çekirdek korteks proteindir. Fonksiyonu tam açıklanamasa da hücre bölünmesinde rolü olduğu gösterilmiştir (Penault-Llorca ve Radošević-Robin, 2017). Meme kanserinde de Ki67 indeksi ile tümörün proliferasyon derecesi belirlenir. Bu biyobelirteçlerden başka binlerce biyobelirteç bulunmuştur. Bunlar büyüme, proliferasyon, invazyon-metastaz, epitel mezenkimal geçiş (EMT),

immun cevap, sağkalım gibi fonksiyonlarına göre sınıflandırılmıştır (Turashvili ve Brogi, 2017).

Klinikte de gen ekspresyon analizlerine dayanarak meme kanseri luminal A ve B, bazal-like ve insan epidermal büyüme faktöründen zengin (HER) olarak 4 moleküler altgruba ayrılmıştır (Perou ve ark., 2000). En sık karşılaşılan ve iyi prognozla ilişkilendirilen Luminal A tip meme kanseri ER+ ve/veya PR+ fakat HER2- ile karakterizedir. Yüksek proliferasyona sahip ve oldukça agresif olan Luminal B tip meme kanseri ise ER+ ve/veya PR+ bazen de HER2+ ile karakterizedir. Luminal B tipi meme kanseri, genellikle daha genç yaştaki hastalarda ortaya çıkar ve anti-HER tedavisine olumlu cevap verir. Bazal epitel hücrelerindeki genlerin overeksprese olmasıyla karakterize olan bazal-like ya da üçlü negatif meme kanseri (TNBC) olarak adlandırılan meme kanseri tipi ER-, PR- ve HER2- ekspresyonu ile bilinmekte ve yüksek progresyon göstermektedir. Bu kanser tipi oldukça agresiftir ve yüksek metastatik özelliğe sahiptir (Poloz ve ark., 2017).

TNBC'li hastaların yaşam süreleri metastaza bağlı olarak çok kısadır. TNBC, üç reseptörü de eksprese etmediğinden anti-östrojenik ya da anti-HER2 tedavisine yanıt vermeyecektir. Bu yüzden uygulanacak tedaviye karar verilmesi de fazlasıyla zordur. Kemoterapi, TNBC hastalarda tek sistemik tedavi seçeneği olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalarda klinikte TNBC'nin kemosensitif olmasına rağmen kullanılan antrasiklin veya taksan tedavisine direnç geliştirdiği ve hastalığın sağ kalımını azalttığı görülmektedir (Carey ve ark., 2007).

Heterojen bir hastalık olan meme kanserinde anti-östrojen ya da anti-HER2 gibi belirli tedavilerin uygulanması, metastatik ve oldukça agresif olan TNBC'li hastaların birçok ilaca direnç oluşturmaları göz önüne alındığında mevcut tedavilerin yetersiz olduğu görülmektedir. Bu da metastatik hücre gruplarının tedavisinde yeni arayışlara yönlendirmiştir.

2.2. Sinir Büyüme Faktörü (NGF)

Sinir Büyüme Faktörü (Nerve Growth Factor, NGF), beyin-driven nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3 ve Nörotrofin 4/5’inde dahil olduğu “nörotrofinler” olarak adlandırılan büyüme faktör ailesinin bir üyesidir. 1940’larda Levi Montalcini tarafından bulunmasıyla büyüme faktör çalışmalarına öncü olmuştur. İlk olarak farede sarkoma varlığında tavuk sempatik ve duyuşal gangliolarında tümörden bağımsız anormal büyümelerin gözlemlenmesiyle keşfedilmiştir (Angeletti ve ark., 1964). Diğer tüm nörotrofinler gibi nöronal farklılaşmada, sempatik ve duyuşal sinirlerin sağ kalımında ve proliferasyonunda rol almaktadır (Roux ve Barker, 2002; Szegezdi ve ark., 2008). Son yıllarda nöronlar üzerindeki etkileri dışında NGF’nin sadece sinir sisteminde değil endokrin, kardiovasküler, immün ve kadın/erkek üreme sisteminin gelişiminde önemli katkısı olduğu fark edilmiştir (Tessarollo, 1998).

Nörotrofinler, fonksiyonlarını yapısal olarak farklı olan iki transmembran reseptörleri üzerinden gerçekleştirirler. Bunlar; nörotrofinlerin aynı affinite ile bağlandığı **p75 nörotrofin reseptörü (p75^{NTR})** ve spesifik nörotrofinlerin bağlandığı **tropomiyosin ilişkili kinazlar (Trk)** olarak adlandırılan tirozin kinaz reseptörleridir. NGF, tropomiyosin ilişkili kinaz A (TrkA) reseptörüne yüksek affiniteyle bağlanırken; p75 reseptörüne diğer nörotrofinlerle birlikte aynı affiniteyi gösterir (Bartkowska ve ark., 2010; Schecterson ve Bothwell, 2010).

2.3. p75 Nörotrofin Reseptör (p75^{NTR})

p75^{NTR}, kinaz enzim aktivitesiyle değil, hücre dışından ligandın bağlanıp hücre içindeki proteinlerin aktif hale getirilmesiyle etkisini gösteren yüzey membran reseptörüdür; tüm nörotrofinler aynı affinite ile bağlanır fakat NGF’nin bu reseptöre affinitesi düşüktür (Wang ve ark., 2014). Tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) familyasına ait olan **p75^{NTR}**, dimerik NGF’ye bağlandığında intrasellüler alandaki proteinlerin aktivasyonu için gerekli sinyali oluşturmaktadır (Demir ve ark., 2016). Diğer tüm TNFR ailesinde olduğu gibi, sistein içeren ekstrasellüler alan ve ölüm alanı olarak adlandırılan intrasellüler alana sahiptir. p75 reseptör sinyali hücrede zıt ekiler oluşturabilir; NGF’nin **p75^{NTR}** reseptörüne bağlanmasıyla nükleer faktör kappa-B (NFkappaB) aracılığıyla anti-apoptotik etki oluştururken c-Jun N-terminal kinaz (JNK) aracılığıyla hücreyi apoptoza

götürebilir. Bu yollardan hangisinin tercih edileceği liganda, intrasellüler moleküllerin varlığına ve transmembran co-reseptörlerin ekspresyonuna göre değişmektedir (Molloy ve ark., 2011).

Yapılan çalışmalarda **p75^{NTR}**'nin Trk reseptörlerinden farklı bir yapıya sahip olmasına ve aralarında membran üzerinde bir bağlantı bulunmamasına rağmen TrkA'ya yardımcı olabildiği ya da NGF'nin TrkA'ya bağlanma aktivitesini arttırarak TrkA'nın fosforilasyonunu destekleyebildiği gösterilmiştir (Demir ve ark., 2016).

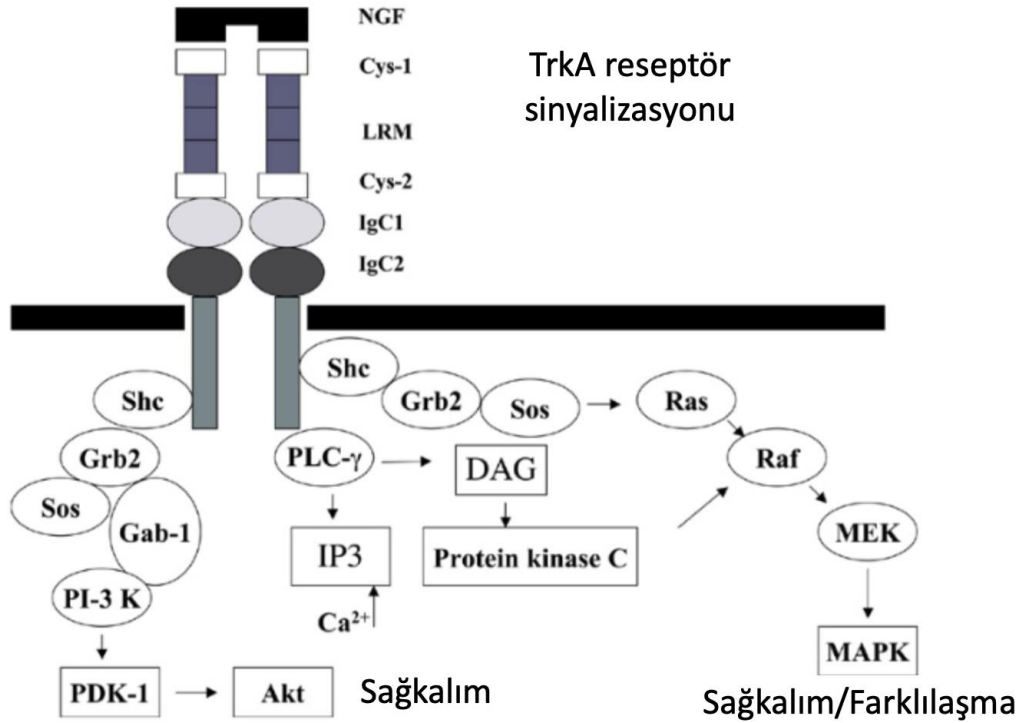
2.4. Tirozin Kinaz Reseptörleri (Trk)

Trk reseptörleri, reseptör tirozin kinaz ailesinden olup NTRK genleri ile kodlanır. Üç çeşit Trk reseptörü bulunmaktadır, bunlar; TrkA, TrkB ve TrkC'dir. Yapısal olarak her bir Trk reseptörü ekstrasellüler ligand bağlama alanı, transmembran alanı ve tirozin kinaz aktivitesi içeren intrasellüler alandan oluşmaktadır. Ekstrasellüler alanı üç lörin içeren tekrarlar (LRR1-3), onu takip eden sistein-zengin yapı ve iki immunoglobulin-benzeri yapılar oluşturur. LRR1-3 yapısı sadece Trk reseptörlerine özgüdür. İntrasellüler alanda ise tam kinaz aktivitesini gösterebilmesi için aktivasyon döngüsü denilen ve her iki yanında tirozin kinaz bölgelerine sahip olan bir yapıya sahiptir. Her nörotrofin, bir Trk reseptörüne spesifiktir. NGF TrkA'ya, BDNF ve NT-4 TrkB'ye, NT-3 TrkC'ye yüksek affiniteyle bağlanır. İlk olarak; dimerik nörotrofinler Trk reseptörlerine bağlanır ve reseptör homodimerizasyonuna neden olur. Bu dimerize reseptör sitoplazmik kuyruktaki tirozin kalıntılarını fosforiller. Bu fosforilasyon reseptör aktivasyonu için gereklidir. Aktive olan reseptör birçok hücre içi moleküllerin fosforilasyonuna neden olur ve transkripsiyon faktörlerin çekirdeğe translokasyonu ile hücrenin sağ kalımını, proliferasyonunu ve büyümesini düzenler (Amatu ve ark., 2019).

2.4.1. Tirozin Kinaz Reseptör A (TrkA)

NGF'nin reseptörü TrkA ya bağlanmasıyla sitoplazmik kuyruktan (Y676, Y680, Y681) fosforillenen TrkA, sitoplazmadaki Gbr2-ilişkili Binder-1 (GAB1), büyüme faktör reseptör bağ protein-2 (Grb2) ve Shc proteinlerini fosforiller. Bu proteinler de önce PI3K sonra Akt kinazı aktive eder. Bu yolla NGF, TrkA reseptörü ile hücrenin sağ kalımını ve apoptozun inhibisyonunu düzenler. Bir başka yoldan ise TrkA'nın fosforilasyonu Ras ve GTP fosforilasyonuna neden olur. Aktive olan Ras, Raf¹ aktive

eder daha sonra mitojen-iliskili protein kinaz (MAPK) ı aktive eder ve ribozomal s6 kinaz (RSK) aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu yoldan ise hücrenin proliferasyonu ve farklılaşması kontrol edilir. Her iki yoldan oluşan RSK ya da Akt aktivasyonu çekirdeğe transloke olan siklik AMP cevap element bağı protein (CREB) transkripsiyon faktörünün fosforilasyonuna neden olur. Bu da NGF nin TrkA üzerinden anti-apoptotik etkilerini ortaya çıkarır (Demir ve ark., 2016). TrkA, Y785 kuyruğundan fosforillenirse de PLC γ fosforillenir. Fosforillenen PLC γ , Fosfatidilinozitol-4,5-Bisfosfat (PIP2) den PKC nin aktivasyonunu sağlayan DAG ve depolardan kalsiyum salınımına neden olan inositol trifosfat (IP3) oluşumunda rol oynar. PLC γ ise böylelikle nöronlarda sinaptik pilastisiteyi sağlar (Beattie ve ark., 2000).



Şekil 2.2. TrkA reseptörünün hücre içi sinyalizasyonu (Ljubica ve H., 2013).

Ligandı NGF'nin bağlanmasıyla TrkA, embriyonik gelişimde ve sinir sisteminin normal fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için baskın olarak nöronal dokularda eksprese edilir. Fakat ligandı olan NGF'nin ve TrkA'nın sadece sinir sisteminde değil, patolojik durumda ağrı oluşumunda, inflamasyonda ve kanser gelişiminde de etkisi olduğu düşünülmektedir (Wang ve ark., 2014; Minnone ve ark., 2017).

2.4.2. İnflamasyonda NGF ve TrkA

Yetişkinlikte vücutta nöronal plastisitenin düzenlenmesi için gerekli olan bazal seviyede NGF üretimi vardır. Bağışıklık hücrelerinin anormal aktivasyonu ve sitokin üretiminin artması ile karakterize edilen inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar üzerine yapılan çalışmalar da inflamasyon alanlarında düşük bazal seviyedeki NGF miktarının inflamasyon sırasında upregüle edildiği görülmüş (Laudiero ve ark., 1992; Manni ve Aloe, 1998; Jacobs ve ark., 2010). Bu inflamasyon sırasındaki NGF artışı immün yanıtı aktive edici gibi görünse de aynı zamanda anti-inflamatuvar sitokin salınımı uyararak hem inflamatuvar yanıtı hem de doku hasarını azaltmak için endojen bir mekanizma olduğu düşünülmektedir.

İmmün sistemi hücrelerinin multipotent kök hücreden farklılaştığı lenfoid organların fizyolojik gelişiminde de NGF ve reseptörlerinin yeri vardır (Garcia-Suarez ve ark., 2000). İmmün hücrelerin bu organlarda farklılaşmasını ve gelişimini tamamlayabilmesi için oldukça önemlidir. Bununla birlikte immün hücrelerin yüzeylerinde de NGF reseptörlerine rastlanılmış ve immün yanıt sırasında aktivasyon durumlarına göre reseptör ekspresyonlarının dinamik bir şekilde düzenlendiği görülmüştür (Noga ve ark., 2002). NGF nin reseptörler aracılığıyla reseptör ekspresyonları üzerindeki değişiklik hem immün yanıtı etkilerken hem de doğal ve adaptif immün yanıtlarda salınan sitokinlerin üretimini etkileyen farklı yolları aktive edebilir.

2.4.3. Ağrıda NGF ve TrkA

Prenatal dönemde NTRK1 genindeki genetik mutasyonlardan kaynaklı oluşan TrkA fonksiyon kaybı, doğuştan anhidrozlu ağrıya karşı duyarsızlık (CIPA) hastalığına sahip insanların ağrıyı hissetmemesine ve terlememeye bağlı olarak vücut sıcaklığının artmasına neden olmaktadır. Postnatal dönemde ise yapılan bir çalışmada insana IV olarak NGF'nin verilmesi hastada önce uygulanan bölgede daha sonra tüm vücutta kas hiperalezine neden olmaktadır (Hirose ve ark., 2016). Osteoartritli hastalarda yapılan bir çalışmada ise hastaların sinovial sıvılarında NGF artışı gözlemlenmiş ve buna bağlı olarak ağrı hissettikleri saptanmıştır (Shang ve ark., 2017).

Doku hasarına bağı inflamasyon durumunda hasarlı dokudaki NGF artışının gözlemlenmesi, inflamasyon oluşan bölgeyi korumaya yönelik bir mekanizma olarak düşünülse de NGF ve reseptörü TrkA'nın hem perifer hem de santral sensitizasyonda rol aldığı gözlemlenmektedir. Mekanizma olarak artan NGF'nin TrkA'ya bağlanarak nosiseptif ağrıya neden olan birçok ağrı sinyal yollarını aktive ettiği ortaya atılmıştır (Shang ve ark., 2017).

2.4.4. Kanserde NGF ve NGF Reseptörleri

20. yüzyılda Rita Levi Montalcini'nin keşfettiği NGF'nin bulunmasıyla öncülük ettiği çalışmada NGF'nin sadece perifer dokularda değil neoplastik dokularda da sayılarının fazla olduğunu göstermiştir. Ancak NGF'nin etkisinin kanserin originine, kanser hücrelerin sinyaline, mikroçevreye, progresyonuna ve reseptör ekspresyonuna göre değiştiği düşünülmektedir (Demir ve ark., 2016). Yapılan çalışmalarda tiroid, pankreas, akciğer ve meme insan kanserinde hem NGF hem TrkA reseptörünün ekspresyonunun upregülasyonun tümör büyümesi ve gelişmesine katkı sağladığı görülmüştür (Romon ve ark., 2010).

Meme kanserinde otokrin olarak stimüle üretilen NGF'nin NGF-TrkA-p75 axis inde rolü olduğu görülmüştür. NGF normal meme epitel hücrelerinin büyümesini desteklemezken meme kanseri hücreleri tarafından eksprese edilmektedir ve TrkA üzerinden meme kanseri hücreleri için mitojenik özellik göstermektedir. NGF ve reseptörlerinin hedeflenmesi meme kanseri hücrelerinin sağ kalımını, proliferasyonunu ve invazyonunu azalttığını gösteren prelinik çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda anti-NGF antikorları ve siRNA kullanımı farelerde tümör proliferasyonunu baskılamış ve artan apoptozla beraber daha az metastaz görülmüştür. Başka bir çalışmada TrkA geninin susturulması, kemoterapötik ajanlardan paklitaksele olan duyarlılığı arttırmış; hücreleri kaspaz-3 aracılığıyla apoptoza sürüklemiş ve akciğere metastaz insidansını azaltmıştır (Demir ve ark., 2016).

Başka bir çalışmada NGF nin tümörün oluşturduğu yeni kan damarlarındaki kan akımını düzenlemek için perivasküler sinirlerin inervasyonlarını kolaylaştırdığı ve tümör büyümesini baskıladığını göstermiştir. Bu çalışmada nude farelerde tümör dokusundaki yeni damarların maturasyonunu destekleyerek subkutan olarak verilen NGF nin prostat

kanseri hücrelerinin büyümesini baskıladığı belirtilmiştir. Literatürde immün sistemi baskılanmış farelerde meme kanseri hücrelerinin TrkA reseptör ekspresyonunun artması, hücrelerin invazyon, migrasyon ve metastazını desteklediği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2014).

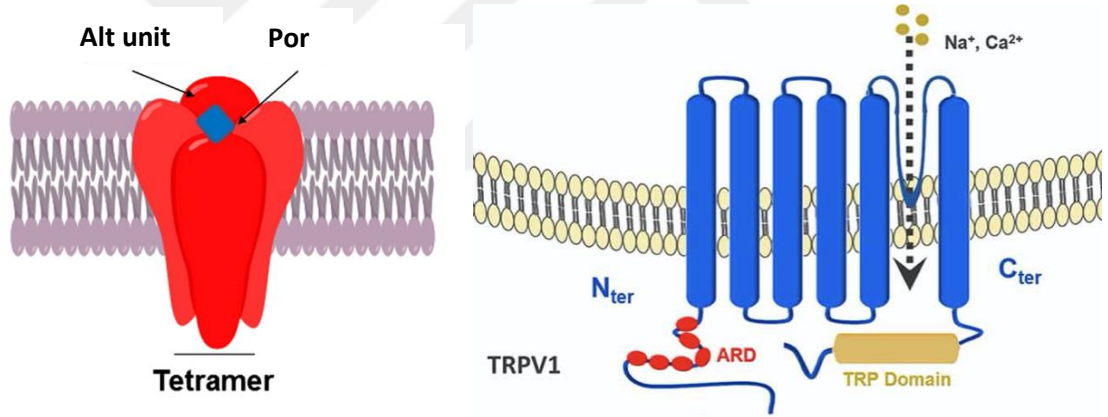
NGF, üçlü negatif meme kanseri olan MDA-MB-231 hücresinde pro-survival sinyali ve bununla beraber anti-NGF, antikor ve siRNA tedavilerine cevap oluşturabiliyor. Normalde NGF, MAP kinazları aktive etmez ve normal meme epitel hücresine mitojenik özellik göstermezken meme kanseri varlığında TrkA ya bağlanıp MAP kinazları aktive edip meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu indüklerler. Bununla birlikte TrkA sinyali meme kanseri metastazında ve anjiogenezinde de rol oynar (F. Gao ve ark., 2018)(Molloy ve ark., 2011).

NGF nin diğer nörotrofinlerle aynı afinite gösterdiği reseptörü $p75^{NTR}$ reseptörüne bağlanarak kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı olarak davrandığı ve hücre büyümesini ve proliferasyonunu baskıladığı görülmüştür (Reis-Filho ve ark., 2006). Başka bir çalışmada $p75^{NTR}$ reseptörünü overeksprese eden kötü huylu beyin tümörünün apoptozunda artış gözlemlenmiştir (Kuchler ve ark., 2011). Meme kanserinde ise NGF nin bağlanmasıyla aktive olan $p75^{NTR}$ reseptörünün meme kanseri hücresinin sağ kalımını desteklediği saptanmıştır. Mekanizması tam bilinmemekle beraber NF-kB yolağını inhibe ederek yaptığı düşünülmektedir (Naderi ve ark., 2007).

2.5. TRPV1 Kanalı

Drasophila melanogaster denilen sinek türünün görsel iletim sistemi ile ilgili yapılan çalışmalarda keşfedilen transient reseptör potansiyeli olarak adlandırılan TRP kanallarının mantar, böcek, balık ve memeliden elde edilen 50'den fazla üyesi vardır (S. Gao ve ark., 2020). TRP kanalları seçici olmayan katyon kanallarıdır. Bu kanallar, vücutta birçok dokuda eksprese edilmektedir; endojen ya da eksojen ligandlarının dışında sıcaklık, pH, osmotik stres ve bakteriyel token gibi fiziksel uyaranlarla da aktive olabilmektedir (J., 2015). Memelilerde amino asit dizilimlerine göre sınıflandırılan 33 TRP kanalının 6 alt sınıfı bulunmaktadır. Bunlar TRPA, TRPC, TRPM, TRPP, TRPML, TRPN ve TRPV olarak adlandırılır (S. Gao ve ark., 2020).

TRP ailesinin ilk keşfedilen iyon kanalı olan TRPV1 (transient reseptör potansiyeli vanilloid tip I) non-selektif bir katyon kanalıdır. İlk 1997’de yapılan çalışmalarda acı biber özütünden elde edilen kapsaisin reseptörü olarak karakterize edilmiştir. Bu kanalın sıcaklık, N-açıl amid, araşidonik asit türevleri, vanilloidler, cannabionidler ve lipopolisakkarit gibi endojen ajanlarla beraber, Olvanil ve analogları Resiniferatoxin ve Capsazapine gibi eksojen ajanlarla da uyarılabildiği görülmüştür (Caterina ve Julius, 2001; Bujak ve ark., 2019).Yapısal olarak bakıldığında TRPV1 kanalı tetramerik bir yapıda olup 6 trans-membran domaininden, sitoplazmik N ve C terminalinden ve 5.-6. Domainler arasında pordan oluşan hidrofobik aralıktan oluşmaktadır (Vercelli ve ark., 2014).



Şekil 2.3. TRPV1 kanalının yapısının şematik halinde gösterimi (Morales-Lazaro ve Rosenbaum, 2015; Muller ve ark., 2018).

TRPV1 kanalının agonisti ile sürekli uyarımı kanalın desentizasyonuna neden olmaktadır ve kanal uyarana karşı cevap oluşturamamaktadır. Kanalin aktive olmasıyla Ca^{+2} por içinden geçer, hücreye girer ve sonrasında kanalın desentizasyonuna neden olacak Ca^{+2} bağımlı süreci başlatır. TRPV1 agonisti Capsaisin’in TRPV1 kanalı aracılığıyla ağrı oluşturduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür. Desensitizasyon oluşumu ile Capsaicin nöropati, romatoid artrit gibi rahatsızlıklarda ağrı kesici olarak da kullanılmaktadır. Bu etkiyi capsaicin’in TRPV1 kanalını sürekli ve uzamış aktivasyonu

sonucunda nosiseptif terminalleri desensitize ederek oluşturduğu tahmin edilmektedir (Tominaga ve Tominaga, 2005).

TRPV1 in sensitizasyonu pH ve sıcaklık ile direk olarak sağlanabilceği gibi PKA (Bhave ve ark., 2002; Hu ve ark., 2002), PKC (Premkumar ve Ahern, 2000), Ca²⁺/CaM-dependent kinase II (J. Jung ve ark., 2004), Src kinaz (Jin ve ark., 2004) hücre içi proteinleri ile TRPV1 aktivitesinin modüle edilebildiği düşünülmektedir.

2.5.1. TRPV1 in Kanserdeki Rolü

TRPV1 kanalının sadece ağrı ve sıcaklık kanalı olarak düşünülse de T hücre aktivasyonu, idrar yolu fonksiyonları, inflamasyon gibi birçok süreçte de rolü bulunmaktadır. Deri, hava yolu, gastrointestinal yol, üriner epitel hücreleri ve immün hücrelerde de TRPV1 kanalı eksprese edilmektedir (Birdier ve ark., 2002; Medzhitov, 2008; Rehman ve ark., 2013; Bertin ve ark., 2014; Yu ve ark., 2016). Kalsiyum sinyali proliferasyon, apoptoz, sitokin salınımı gibi birçok hücre sel olayda da önemli rol oynamaktadır. Buna dayanarak hücrenin mikroçevre ile ilişkisi sadece hücrenin davranışının değil ayrıca akıbetini de etkileyebilmektedir. Bu yüzden hücre-mikroçevre ilişkisinde kilit nokta olduğu düşünülebilmektedir (Bujak ve ark., 2019).

Kanserde kronik inflamasyon, tümör jenez ve tümörün sağ kalımını, proliferasyonunu ve metastazını kalsiyum sinyali ile ilişkilendirilmektedir. TRPV1 in hem inflamasyonda hem de ağrıya neden kalsiyum sinyalinde rol alması kanser progresyonunu da desteklediğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda da insan meme kanseri MCF-7 ve BT-20, insan tiroid karsinoma BCPAP, prostat kanseri LNCaP ve PC-3, üretra kanser hücreleri ve glioma da TRPV1 ekspresyonuna rastlanmıştır (Sanchez ve ark., 2005; Amantini ve ark., 2007; Amantini ve ark., 2009; Weber ve ark., 2016; Xu ve ark., 2018). İnsan üretra kanseri üzerine yapılan bir çalışmada TRPV1 ekspresyonunun downregüle edildiği belirtilmiştir. Böylelikle insan üretra kanserinde TRPV1 ekspresyonu negatif prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Kalogris ve ark., 2010). Tümör jenez gelişiminde yapılan çalışmalara bakıldığında TRPV1 reseptörü eksik farelerde kolitle ilişkili kanserin gelişme gösterdiği ve kolon kanserinin gelişiminde de TRPV1 in etkisi olduğu gösterilmiştir (Vinuesa ve ark., 2012).

2.5.2. TrkA ve TRPV1 İlişkisi

Literatür incelendiğinde TrkA reseptör aktivasyonunun TRPV1 reseptörlerinin sensitizasyonunu arttırdığı bulunmuştur. TrkA pozitif olduğu bilinen dorsal root ganglionlarda yapılan bir çalışmada NGF nin PI3K yolağını kullanıp capsaisin ile indüklenmiş TRPV1 in sensitizasyonunu arttırarak termal hiperaleziyi modüle ettiği rapor edilmiştir (Zhuang ve ark., 2004). Başka bir çalışmada TrkA ligandı olan NGF'nin dorsal root ganglionlarda TRPV1'in ekspresyonunu düzenleyebildiği gösterilmiştir (Winston ve ark., 2001). Kronik prostat iltihabı ilgili yapılan başka bir çalışmada ise ligand NGF'nin TrkA üzerinden TRPV1 ekspresyonunu upregüle ettiği belirtilmiştir (J. Zhang ve ark., 2019). Chakrabarti ve arkadaşları (2018) yaptığı in vivo bir çalışmada diz eklemine inerve eden nöronların artan sensitizasyonunun TrkA ve TRPV1 ekspresyonu ile korele olduğunu gözlemlemişlerdir. TrkA ligandı olan NGF'nin kısmi olarak TRPV1 ekspresyonunu upregüle ettiğini belirtmişlerdir (Chakrabarti ve ark., 2018).

TrkA-TRPV1 arasındaki ilişki ve iki reseptörün de kanser hücrelerinde normal düzeyin üzerinde ekprese ediliyor olması göz önünde bulundurulduğunda kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerinde etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Ancak literatürde bu reseptörlerin etkileri tam olarak ortaya konulmamıştır ve kanser varlığında bu reseptörler arasındaki ilişkiye dair çalışma bulunmamaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Western Blot

Kullandığımız hücre hatlarında TRPV1, TrkA ve p75 reseptörlerin ekspresyonlarının tayin edilmesi amacıyla Western blot yöntemi kullanıldı. Kontrol gen olarak da GAPDH ekspresyonuna bakıldı.

3.1.1. Western Blot Yöntemi için Hücre Lizatının Hazırlanması

67NR, 4T1, 4TBM, 4THM ve 4TLM hücreleri her petride 1000000 hücre olacak şekilde sayılıp ekildi. 48 saat inkübasyonun ardından 600 uL Triton-X Lizis tamponu konularak hücrelerin petri kabından toplandı. Pipetaj yaparak alınan hücreler 1.5 ml'lik deney tüplerine konuldu. Örneklerin hepsi 30 dakika buzda bekletildikten sonra vortekslenip 10.000 rpm'de 1 dakika sentrifüj edildi. Santrifüj edilen deney tüpleri kullanılabilecek kadar -80°C de saklandı.

3.1.2. Triton-X Lizis Tamponunun Hazırlanması

Hücrelerin petri tabanından ayrılması için kullanılan tampon çözelti hazırlanmasında 50 mM HEPES(Sigma-H3375), 100 mM Sodyum Florür (NaF)(Sigma-S7920), %10 Gliserol(Sigma-G2025), 150 mM Sodyum Klorür(NaCl)(Merck-1.06404.1000), %1.2 Triton-X100(Merck-1.08603.1000), 1 mM EGTA(Amresco-0732), 1 mM Sodyum-*o*-vanadat(Sigma-S6508), 1X proteaz inhibitör kokteyli(Roche- 5892970001) ve 1 mM Magnezyum Klorür(MgCl₂)(Sigma-M8266) kullanıldı. Bu çözeltinin pH ı 7,4 e ayarlayıp alikotlanıp -20°C'de saklandı.

3.1.3. Örneklerdeki Protein Miktar Tayini (BRADFORD Yöntemi)

Western blot yönteminden önce hazırlanan lizatlardaki protein miktarı belirlendi. Öncelikle standart hazırlaması yapıldı. Stok standart konsantrasyonu kitte belirtildiği üzere 2,66 mg/ml olarak belirlendi. Her biri bir önceki konsantrasyonun yarısı olacak şekilde ddH₂O ile dilue edilerek 7 tane standart hazırlandı. Örneklerin hazırlanmasında kullanılan 5X protein assay boyası (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate - 500-0006) ddH₂O ile 1X haline getirildi. Her bir örnekten 5 µL alınarak 95 µL ddH₂O ile dilue edildi. 1,5 ml'lik deney tüpünde dilue edilen örneklerden 5 ve 10 µL alınarak

96 kuyucuklu petriye konulup 170 μ L'ye 1X protein assay boyası ile tamamlandı. Örneklerin standart ile karşılaştırılmasının yapılabilmesi için 96 kuyucuklu petrinin bir sırasına da standartlar 40 μ L olarak yüklenir ve örneklerde olduğu gibi 1X protein assay boyası ile 170 μ L'ye tamamlandı. 30 dakika karanlıkta oda ısısında bekletildi. Daha sonra spektrofotometrede 595 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. KCjunior programıyla örneklerdeki protein miktarları hesaplandı. Böylece Western blot yönteminde protein miktarlarının eşitlenebilmesi için her bir örnekten ne kadar alınacağı belirlendi.

3.1.4. Western Blot Protokolü

Western Blot yönteminde kullanılan solüsyonların hazırlanması;

1) Stacking Buffer:

0,5 M Trisbase pH:6,8

1 litre için 60,5 gr Trisbase tartılır ve distile suda çözülür.

2) Resolving Buffer

1,5 M Trisbase pH:8,8

1 litre için 181,64 gr Trisbase tartılır ve distile suda çözülür.

3) 10 x Running Buffer

1 litre için 15 gr Trisbase+50 mL %10 Sodyumdodesilsülfat (SDS)+ 94 gr Glisin karışımı 1 litre su ile tamamlanır.

4) 2 x SDS Loading Dye

20 mL Stacking Buffer+ 40 mL Gliserol+ 20 mL %10 SDS+6 mg bromofenol blue+20 mL ddH₂O karıştırılır. Her biri 900 μ L olacak şekilde deney tüplerine bölünür ve -80°C'de saklanır. Kullanılacağı zaman 100 μ L β -mercaptoethanol eklenip kullanılır.

5) %10 APS

0,1 gr APS 1 mL ddH₂O da çözülür. Taze hazırlanmalıdır.

6) Transfer Buffer

7,25 gr Trisbase+ 3,75 gr Glisin 1 litre distile suda çözülür. Karışıma en son 250 mL methanol eklenir.

7) Akrilamid/Bisakrilamid (%40)

Tüm karışımda 3:10 olacak miktarda alınır.

8) Commasie Blue

0,5 gr Commasie blue + 1800 mL distile su + 200 mL asetik asit ile hazırlanır.

9) Pons Boyası

1 gr Ponceau S + 50 mL asetik asit i 1 L distile suya tamamlanır.

10) 10 x TBS

24,2 gr Trisbase + 80 gr NaCl yaklaşık 800 mL distile suda çözünür. pH=7,6 ya ayarlanır ve karışım distile su ile 1 litreye tamamlanır.

1 x TBS-T karışımı: 10 x TBS den 100 mL alınıp distile su ile 1 litreye tamamlanır.

İçine 1 mL Tween20 eklenerek elde edilir. (% 0,1 Tween-20)

3.1.5. Western Blot Jelinin Hazırlanması

Tablo 3.1. Porilakrilamid jelin hazırlanması

Küçük Western Blot Tankı için;

Resolving	%7	%10	%12	%15	Stacking		
Resolving Buffer	6,2 mL	6,75 mL	7 mL	7,5 mL	Stacking Buffer	1,4 mL	2,9 mL
Acr(%40)	3,5 mL	5,25 mL	6 mL	7,5 mL	Acr(%40)	470 µL	900 µL
%10 SDS	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	%10 SDS	50 µL	100 µL
%10 APS	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	%10 APS	50 µL	100 µL
Su	10 mL	7,7 mL	7 mL	4,7 mL	Su	3 mL	6 mL
Temed	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	Temed	5 µL	10 µL
Toplam	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL		5 mL	10 mL

Büyük Western Blot Tankı için;

Resolving	%7	%10	%12	%15	Stacking		
Resolving Buffer	9,3 mL	15,4 mL	16,5 mL	18,75 mL	Stacking Buffer	1,4 mL	2,9 mL
Acr(%40)	5,3 mL	5,25 mL	9 mL	11,25 mL	Acr(%40)	470 µL	900 µL
%10 SDS	0,3 mL	0,3 mL	0,3 mL	0,3 mL	%10 SDS	50 µL	100 µL
%10 APS	0,3 mL	0,3 mL	0,3 mL	0,3 mL	%10 APS	50 µL	100 µL
Su	15 mL	11,55 mL	10,5 mL	7 mL	Su	3 mL	6 mL
Temed	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL	Temed	5 µL	10 µL
Toplam	30 mL	30 mL	30 mL	30 mL		5 mL	10 mL

3.1.6. Örneklerin Hazırlanması

Bradford yöntemiyle belirlenen miktarlarda örnekler alındı, örneklerin yarısı kadar 2 x SDS- β -mercaptoethanol eklendi. Önce vorteksle karıştırıldı sonra 95°C’de 4 dakika kaynatıldıktan sonra 1 dakika 10000 rpm’de santrifüj yapıldı. Örnekler jele yüklemek için hazır hale geldi.

3.1.7. Örneklerin Jele Yüklenmesi

%10 porilakrilamid jel hazırlandı. Jelin ilk ve son kuyusuna proteinin düzgün yürümesi ya da bantların kaymaması için 15 μ L loading dye yüklendi. Yükleme tankı, örneklerin jele yüklenilmesinden sonra güç kaynağına bağlandı. İlk 120 V akıma ayarlandı. Daha sonra ise örnekler üst jeli geçince akım 150 Va alındı ve jelin sonuna kadar beklendi. Böylelikle örneklerdeki proteinler dikey elektroforez yöntemi ile ayrıştırılmış oldu.

3.1.8. Transfer İşlemi

Jelde ayrıışan proteinlerin membrana geçmesini sağlamak için transfer işlemi uygulandı. Öncelikle jel kullanılacağı yerlerden kesildi. Sandviç hazırlanırken süngerler ve membrana destek sağlayan whatmann kağıtları transfer bufferda ıslatıldı. PVDF membran jel boyutuna yakın olacak şekilde kesildi ve yaklaşık 1 dakika metanolde bekletildi. Sırasıyla siyah yüzey-sünger-whatmann kağıdı (3 kat)-jel-membran-whatman kağıdı (3 kat)-sünger-beyaz yüzey olacak şekilde sandviç hazırlandı. Her bir katmanlar arasında hava kabarcığı kalmaması için roller ile her katın üzerinden geçildi ve sıkı bir şekilde sandviç kapatıldı. Sandviğin siyah yüzeyi transfer tankının siyah yüzeyine kırmızı yüzeyi kırmızıya gelecek şekilde yerleştirildi. Hazırlanan transfer buffer tankın içine eklendi ve siyah kutup siyaha kırmızı kutup kırmızıya yerleşecek şekilde kapağı kapatıldı. Tank gece boyu 40 V akım ile bırakıldı.

3.1.9. Boyama İşlemi

Transfer sonucunda sandviç siyah yüzeyi üste gelecek şekilde açıldı. Jel 10 dakika commasie blue boyasıyla, membran ise 3 dakika pons boyasıyla boyandı. Böylece bantlar görünür hale getirildi. Boyama işlemi sonrasında membran 1 x TBS-T ile yıkandı.

3.1.10. Bloklama İşlemi

Bloklama solüsyonu %1 BSA olacak şekilde 1xTBS-T karışımında hazırlandı. Membran oda ısısında bu bloklama solüsyonu ile 3 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

3.1.11. Blotlama İşlemi

Non-spesifik bağlanmaları engellemek için yapılan bloklama işleminden sonra membran antikorda inkübasyona bırakıldı. Antikorlar %1 BSA içeren 1xTBS-T içinde hazırlandı. Membran primer olarak 1/1500 TRPV1, 1/1000 TrkA, 1/2000 p75 primer antikorları; sekonder olarak ise sırasıyla anti-rabbit 1/3000, 1/50000 ve 1/40000 kullanıldı. Housekeeping protein olarak GAPDH bakıldı. İnkübasyondan sonra membran ECL (Electrochemiluminescence) ile 4 dakika inkübe edildi ve görüntüleme işlemine geçildi.

3.1.12. Görüntüleme İşlemi

Membran görüntülemeleri görüntüleme cihazında (Azure Biosystems-Azure 280) yapıldı. Membran cihazın kendisine ait aparatının siyah yüzeyinin üstüne kondu ve görüntüleme işlemi gerçekleştirildi.

3.2. Hücre Kültürü

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Takibi

Çalışmada fare meme kanseri hattı olan 4T1 hücresinin kalbe(4THM) ve beyne(4TBM) metastaz yapmış metastatik alt grupları kullanılmıştır. 4T1 hücre hattı, Balb-c fare modelinde kendiliğinden oluşmakta ve oldukça agresif olan metastatik meme kanseri hücre modelidir. 4THM diye adlandırılan hücre alt grubu, fareye enjekte edilen metastatik 4T1 hücre hattının kalbe metastazından elde edilmiştir. 4TBM ise metastatik 4T1 hücre hattından elde edilen 4THM hücresinin beyne metastaz yaptığı hücreler olarak adlandırılmıştır.

Hücre kültürü çalışmaların hepsi steril laminar akımlı kabinde yapıldı. Elde edildikten sonra sıvı nitrojende saklanan hücreler önce 37°C sıcaklıktaki su banyosunda çözülüp sonra da 10 mm lik hücre kültür petrilere ekildi. DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's with L-glutamine) besiyerine %5 fetal sıgır serumu (FBS), 1 mM sodyum piruvat, 0,02 mM non-esansiyal amino asit ve 40 mg/ml gentamisin olacak

şekilde eklenip hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürmesi ve çoğalması için uygun ortam sağlandı. Besiyerine ekilen hücreler 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve nem içeren etüvde çoğalmaya bırakıldı. Hücre hatları canlılık, çoğalma ve kontaminasyon adına inverted mikroskopta günlük olarak takip edildi. Hücreler petrilere %80'nin üzerinde bir çoğunluk gösterdiğinde pasajlanarak çoğaltıldı.

3.2.2. Hücrelerin Sayılması

Petrilerde çoğaltılan metastatik 4TBM ve 4THM hücre hatları, petri zeminine tutunma özelliğine sahip olduğundan önce petri zemininden ayrılması sağlandı. Bunun için öncelikle hücreler içinde bulunduğu besiyeri çekilip atıldı. Petriye 1 mL Tripsin-EDTA eklenip hücrelerin petri zemininden ayrılması sağlandı ve 15 ml lik steril sentrifüj tüplerine aktarıldı. Daha sonra 1:3 oranında besiyeri ile petride kalan hücreler de alınıp aynı 15 ml lik tüpe eklendi. 15 ml'lik tüp, Tripsin-EDTA lı besiyerini uzaklaştırmak için 700 rpm'de 3 dakika sentrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı. Dipte yapışık kalan hücreler hücre miktarına bağlı olarak besiyeri ile homojenize edildi. Sayımı kolaylaştırmak adına bu süspansiyondan 1:10 olacak şekilde besiyeri ile yeni bir hücre süspansiyonu elde edildi. Hemasitometre (Thoma lamı) ile hücre sayımı gerçekleştirildi. Bu sayımla 1 ml'deki hücre sayısı belirlendi ve 200 µL de 1000 ve 4000 hücre olacak şekilde yeni hücre süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan hücre süspansiyonlarla 96 kuyucuklu petrilere ekim yapıldı.

3.2.3. Hücre Sayısını Belirlemek için Standart Hazırlanması

Hücre varlığı testinde kullanmak üzere her hücre hattı için standart hazırlandı. 10 mm'lik petrideki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreleri zeminden ayırmak için 1 ml Tripsin-EDTA kullanıldı. Hem petride kalan hücreleri toplamak için hem de Tripsin-EDTA'nın etkisini nötralize etmek için besiyeri eklendi. Thoma lamında hücreler sayıldıktan sonra ilk standart 120.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu petrilere ekim yapıldı. Her bir kuyuda bir önceki standarttaki hücre sayısının yarısı olacak şekilde seyrettilerek petriye ekildi. Sonra petrilere 37°C sıcaklıktaki %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda her bir kuyucuğa 100 µL %5 FBS içeren DMEM/F12 ile hazırlanan %10'luk WST-1(Water Soluble Tetrazolium Salt) solüsyonu eklendi. 3 saat

inkübasyondan sonra spektrofotometrede 440 nm dalga boyunda absorbans değeri elde edildi. KCjunior (BIO-TEK) programı kullanarak hücre sayısı hesaplandı.

3.2.4. Kullanılan Ajanların ve Muamele Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Amitriptyline hydrochloride (Sigma-A8404) 10 gr: 10 mM olacak şekilde 5 mg Amitriptilin 1597 µL steril distile suda çözüldü ve alikotlandı.

AMG 9810 (Cayman-14715) 10 mg: 10 mM olacak şekilde 10 mg AMG-9810 2,96 mL DMSO da çözüldü ve alikotlandı.

Olvanil (Tocris-0934): 10 mg, 10 mM olacak şekilde 2.4 mL dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözüldü. Deneyde kullanmak üzere steril laminar kabinde 50 µL olarak alikotlandı ve -20°C'de saklandı.

GW 441756 (Cayman-16915): 10 mg, 36 mM olacak şekilde 1 ml DMSO ile çözüldü. Deneyde kullanmak üzere steril laminar kabinde 50 µL olarak alikotlandı ve -20°C'de saklandı.

Recombinant Mouse beta-NGF Protein (R&D SYSTEM- 1156NG): 100 ug, 100 ug/ml olacak şekilde %0,1 bovin serum albümin (BSA) içeren fosfat tampon solüsyonu (Phosphate buffered saline, PBS) ile çözüldü. Deneyde kullanmak üzere steril laminar kabinde 50 µL olarak alikotlandı ve -20°C'de saklandı.

4TBM ve 4THM hücre hatları kuyucuk başına 1000 ve 4000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu petrilere ekildi. 24 saat inkübasyondan sonra başlangıç sayısını belirlemek için petrinin bir sırasına her bir kuyuya 100 ul %10 WST-1 koyuldu. 3 saat etüvde inkübasyonundan sonra 440 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans değerleri ölçüldü ve bu grup time zero(T0) olarak adlandırıldı. Her iki hücre hattında da kullanılacak ajanlar belirlenen konsantrasyonlarla (TrkA inhibitörü Amitriptilin hydrochloride 1-50 µM, TRPV1 agonisti Olvanil 0,1-30 µM, TRPV1 Antagonisti AMG-9810 dozu, TrkA ligandı NGF Protein 1-500 ng/ml, TrkA inhibitörü GW 441756 0.1-20 µM) muamele edildi. Ajanlar 1000 hücre için %5 FBS içeren besiyeri ile hazırlanıp

hücrelere muamele edilirken 4000 hücre ise %0,2 FBS içeren besiyeri ile hazırlanıp hücrelere 200 µL hacminde uygulandı.

3.2.5. Hücre Varlığı Testi (WST-1)

Kullanılan ajanların hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için WST-1 solüsyonu kullanıldı. Hücrelerin üzerine uygulamak üzere 1:10 oranında olacak şekilde %5 FBS içeren DMEM/F12 ile hazırlandı. 96 kuyucuklu petrillerdeki supernatantlar çekilip her kuyucuğa 100 µL WST-1/DMEM karışımı eklendi. Daha sonra 96 kuyucuklu hücre kültür petrilere etüvde 3 saat inkübasyona bırakıldı. Absorbans değeri, 440 nm dalga boyu aralığında 3 saat sonunda spektrofotometre ile ölçüldü. Bu işlem 1000 hücre için ajan muamelesinden 72 saat sonra yapılırken 4000 hücre için ise 48 saat sonra yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri ile KCjunior programı kullanılarak hücre standardına göre hücre sayıları hesaplandı. Microsoft Excel programında her grubun ortalama, standart sapma ve standart error değerleri hesaplanarak grafik haline getirildi.

3.2.6. İlaç-ilaç Etkileşimlerinin Belirlenmesi

Hücre varlığı deneylerinden elde edilen ortalamalar her deneyin kendi kontrolüne oranlanarak hücre varlığı yüzdesi hesaplandı. Bulunan değer 100'den çıkarılınca inhibisyon yüzdesi bulundu. İlaçların doz-etki grafiği çıkarmak için her bir dozun hücre varlığı yüzdesinin ortalaması, standart sapması ve ortalamanın standart hatası bulundu. Bu grafiği çıkarmak için Graphpad Prism 8 programı kullanıldı. Doz-etki grafiğinden elde edilen EC50 değerleri ve grafik eğimleri, ilaçların kombine kullanımında elde edilen etkiyi ilacın tek başlarına hangi dozda oluşturduğunun hesaplanması için kullanıldı.

$$Y = 100 \times \frac{X^r}{(EC 50)^r + X^r}$$

Y= Etki
X= İlacın dozu
r = Doz-etki grafiğinde elde edilen eğim

Şekil 3.1. Doz-Etki Grafiği için Kullanılan Formül

Kombine edilen ilaçlar için elde edilen değerlerle izobologram grafiği çıkarıldı. Matematiksel olarak değerlendirmek amacıyla Kombinasyon İndeksi (Combination Index-CI) değerleri hesaplandı.

$$CI = \frac{\text{Kombine A dozu}}{\text{Tek A dozu}} + \frac{\text{Kombine B dozu}}{\text{Tek B dozu}}$$

CI<1	Sinerjistik
CI=1	Additif
CI>1	Antagonistik

Şekil 3.2. Kombinasyon İndeks Formülü

İsobologram grafiği ve CI değerlerine göre ilaçların birbirleriyle etkileşiminin matematiksel ifadesi olarak yani sinerjistik veya antagonistik etkileşimi belirlendi.

3.3. Genel İstatiksel Analizler

Her bir deney en az 3'er tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Anlamlılık değerlendirmesi Student's t testi ve tek yönlü ANOVA testleri Graphpad Prism 8 programı kullanılarak yapıldı. p<0,05 olanlar anlamlı kabul edildi.

3.4. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler, Kimyasallar ve Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan bütün gereçler Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi laboratuvarında sağlandı ve yapılan deneyler bu araştırma laboratuvarında yürüldü.

3.4.1 Kullanılan Sarf Malzemeler

- Hücre kültür petrisi (Corning)
- 6 kuyucuklu hücre kültür petrisi (Corning)
- 96 kuyucuklu hücre kültür petrisi (Tocris)
- 15 ml ve 50 ml' lik deney tüpleri (Falcon)
- Steril pipet uçları (10 µL, 100 µL, 200 µL,1000 µL) (Thermo scientific)
- Akış sitometrisi tüpleri (Sarstedt)
- 1,5 ml'lik deney tüpleri (Axygen)
- PVDF membran (Amersham-cat no:10600029)
- Thoma lamı (Marienfeld, C964730)

3.4.2. Kullanılan Kimyasallar

- Fetal Bovine Serum (FBS)-(Gibco,10270106)
- DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)-(Gibco)
- Sodyum Piruvat (Santacruz)
- Non-essential Amino Asit (BiochromK0293)
- Gentamisin (nyztech MB16601)
- Trisbase (AppliChem-77-86-1)
- Tripsin-EDTA (%0,25) (Thermo)
- Sodyum Klorür (NaCl) (Carlo Erba)
- Sodyumdodesilsülfat (SDS)
- Tween20 (merck)
- Bromofenol blue (25 gr) (Sigma, B0126)
- Bovine Serum Albumin (BSA) (100 gr) (Sigma, A7906)
- β -mercaptoethanol (Merck)
- Amonyumpersülfat (APS) (Applichem, 7727-54-0)
- Gliserol (Biotech)
- Glisin (Sigma, 85H07821)
- Akrilamid/Bisakrilamid (%40)
- Commasie Blue
- Metanol (merck)
- Temed (merck)
- ECL (Biorad)
- Cell Proliferation Reagent (WST-1)
- Protein Ladder (Marker)
- Bradford Dye Reagent 5X (Biorad)
- Proteaz inhibitör kokteyli (Roche)
- TrkA Antikoru (Genetex-GTX81329)
- P75 Antikoru (YLBiont-YID3695)
- GAPDH
- Sekonder antikor Anti-Rabbit
- Sekonder antikor Anti-Mouse

- Asetik Asit
- Amitriptyline hydrochloride (Sigma- A8404) 10 gr
- AMG 9810 (Cayman- 14715) 10 mg
- Olvanil (Tocris- 0934) 10 mg
- GW 441756 (Cayman- 16915) 10 mg

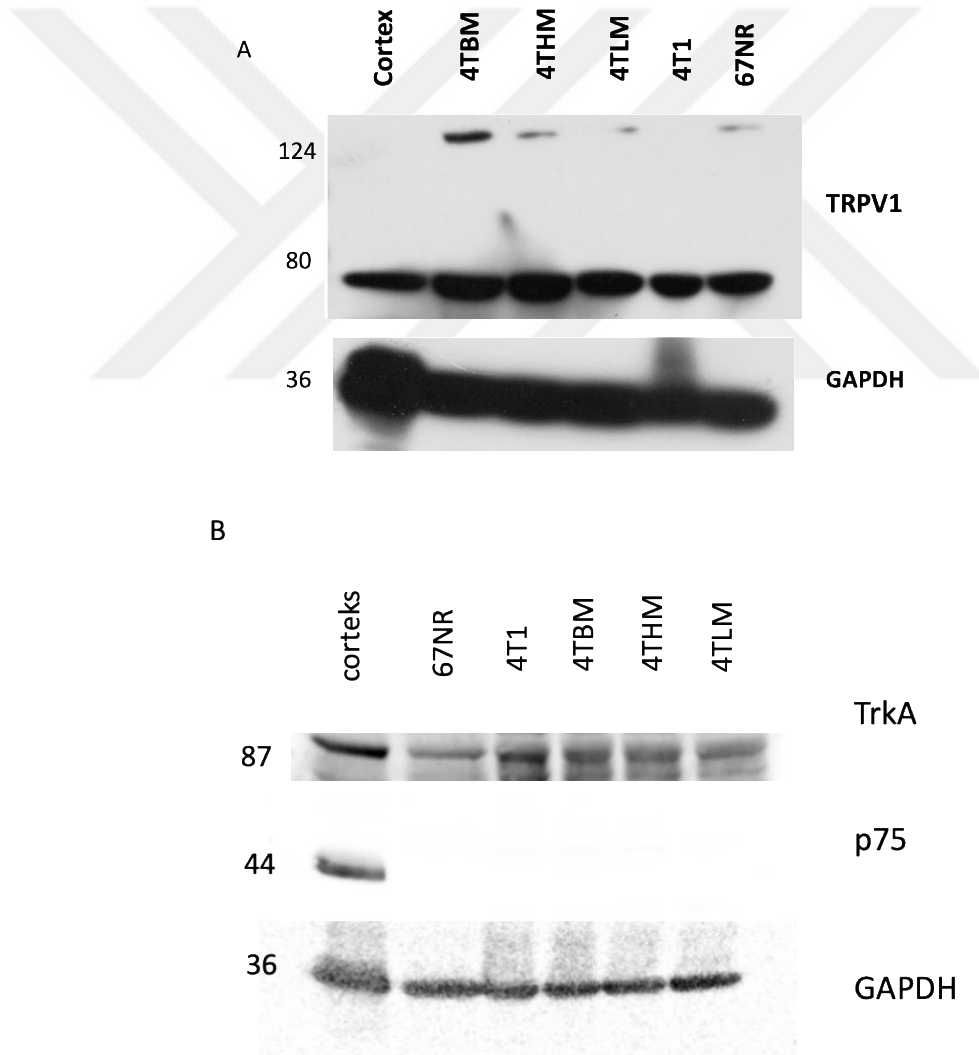
3.4.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Santrifüj ve Mikro Santrifüj (Eppendorf)
- Class II Lamin Air (Esco)
- CO2 inkübatör (%5 CO2) (Thermo)
- Inverted mikroskop (Olympus)
- Buzdolabı (+4 ve -20 °C) (Beko)
- -80 °C Derin Dondurucu (Thermo)
- Vorteks (Velp)
- Su banyosu (Mettler)
- Transfer Cihazı (Amersham)
- Otoklav (Nüve)
- Sıvı azot tankı
- Elektroforez güç kaynağı (Amersham)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Thermo)
- Spektrofotometre (Thermo)
- Hassas Terazî (Denver instrument)
- Distile Su Cihazı (GFL)
- Buz makinesi (Uğur)
- Jel yürütme tankı (Biorad)
- pH metre(isolab)
- Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı (Ika RH Basic)
- Çeker ocak

4. BULGULAR

4.1.Meme Kanseri Hücrelerinde TrkA ve TRPV1 Ekspresyonunun Gösterilmesi

Non-metastatik meme kanseri hücre hattı 67NR, metastatik meme kanseri hücre hattı 4T1 ve 4T1 in alttıpleri olan 4TBM, 4THM, 4TLM hücre hatlarında TRPV1 ve TrkA ekspresyonunun varlığı Western blot yöntemiyle gösterildi.

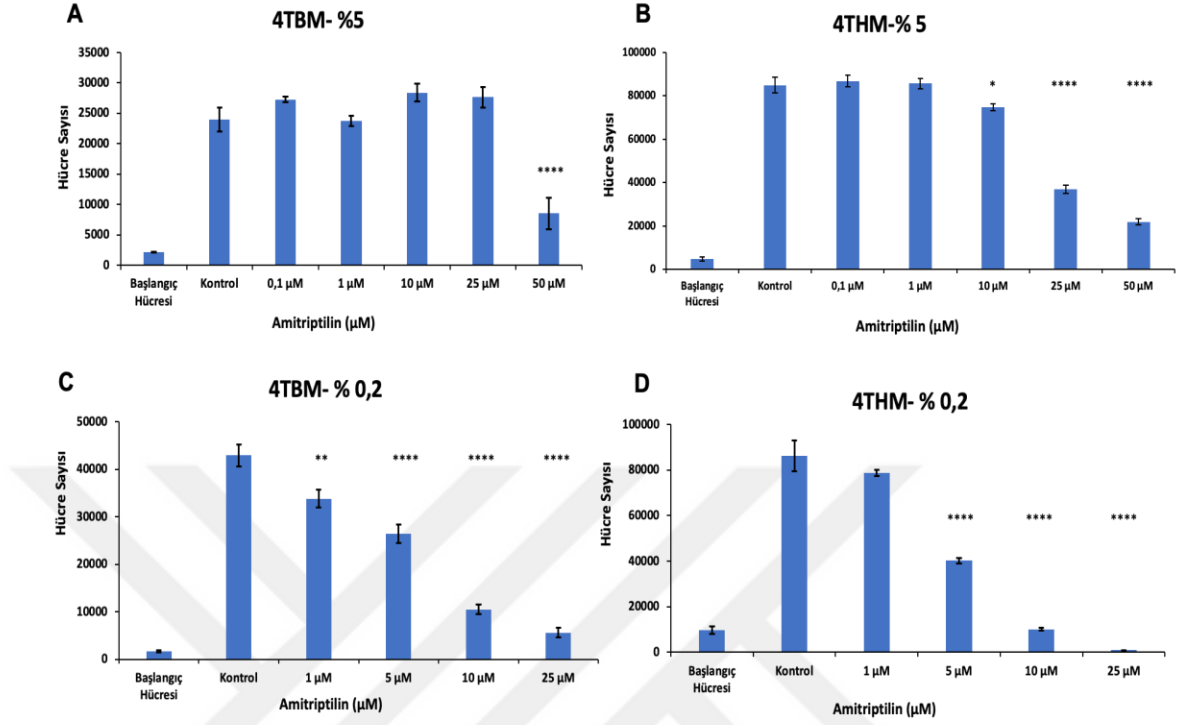


Şekil 4.1. 67NR, 4T1 hücre hattı ve 4T1 in alttıpleri 4TBM, 4THM ve 4TLM’de TRPV1 (A) ve TrkA (B) reseptörlerinin ekspresyonu. Pozitif kontrol olarak beyin dokusu (cortex) kullanılmıştır. TRPV1 hemen hemen hepsinde aynı miktarda eksprese edilirken 67NR nin TrkA ekspresyonu metastatik hücre hatlarına göre daha düşüktür. p75 reseptörü de hem 67NR de hem de metastatik meme kanseri hücrelerinde eksprese edilmediği görülmüştür.

Sonuçlara göre tüm hücre hatlarının hem TRPV1 hem de TrkA eksprese ettiği görülmüştür. Hücre hatlarının hepsi TRPV1 reseptörünü aynı düzeyde eksprese ettiği; metastatik hücre hatlarının TrkA reseptörünü 67NR'den daha fazla eksprese ettiği gözlemlenmiştir. TrkA'nın coreseptörü olan p75 için ise hem 67NR'de hem de metastatik gruplarda p75 reseptörünün eksprese edilmediği görülmüştür. (Şekil 4.1)

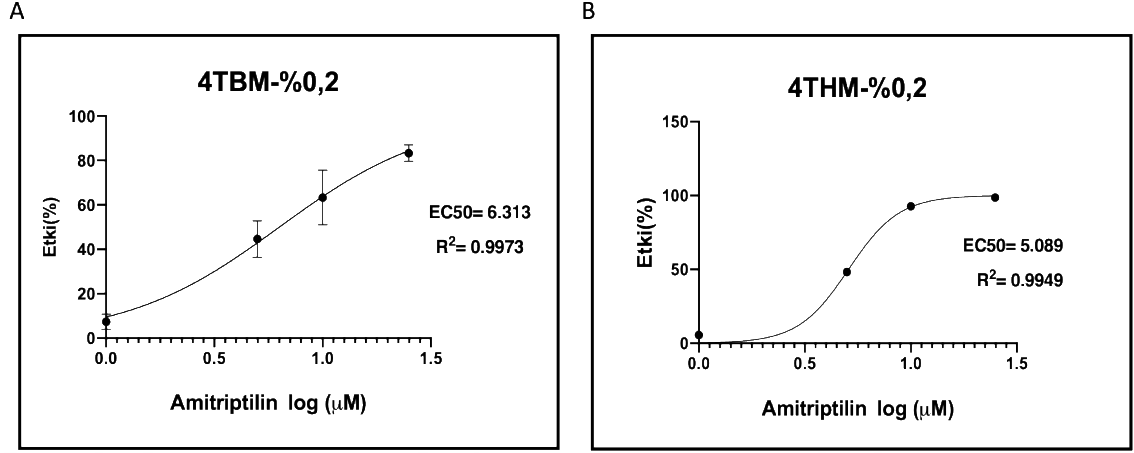
4.2.TrkA Agonisti Amitriptilin'nin Tek Başına 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Balb-c fare modelinde oluşan 4T1 meme kanseri hücrelerinin beyine ve kalbe metastaz yapmış metastatik altgrupları 4TBM ve 4THM hücrelerine %0,2 FBS ve %5 FBS içeren besiyeri ortamında 0,1 ve 50 μ M arası değişen konsantrasyonlarda TrkA agonisti Amitriptilin uygulandı. Amitriptilinin hücre proliferasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi adına WST-1 kiti ile 440 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kaydedildi ve var olan hücre sayıları grafiklendirildi. Sonuçlara göre %5 FBS içeren ortamda yüksek konsantrasyonlarda her iki hücre hattında da hücre proliferasyonunda baskılanma gözlenirken düşük Amitriptilin konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunda kontrole göre değişiklik gözlemlenmemiştir. %0,2 FBS içeren ortamda ise düşük Amitriptilin konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunda kontrole göre bir baskılanma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. %5 FBS ve %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında Amitriptilin konsantrasyonlarının 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi. (A) %5 FBS içeren besiyeri ortamında 4TBM hücre proliferasyonunda en yüksek konsantrasyonda kontrol grubuna göre anlamlı bir baskılanma görülmüştür. (B) %5 FBS içeren besiyeri ortamında 4THM hücre proliferasyonunda yüksek konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre baskılanma gözlemlenmiştir. (C, D) %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında 4TBM ve 4THM hücre hatlarında ise kontrol gruplarına kıyasla doza bağlı bir baskılanma görülmüştür. Analizler kontrol gruplarına göre yapılmıştır ve $p < 0.05$ olanlar anlamlı kabul edilmiştir. * $p = 0,020$, ** $p = 0,019$, *** $p < 0,0001$

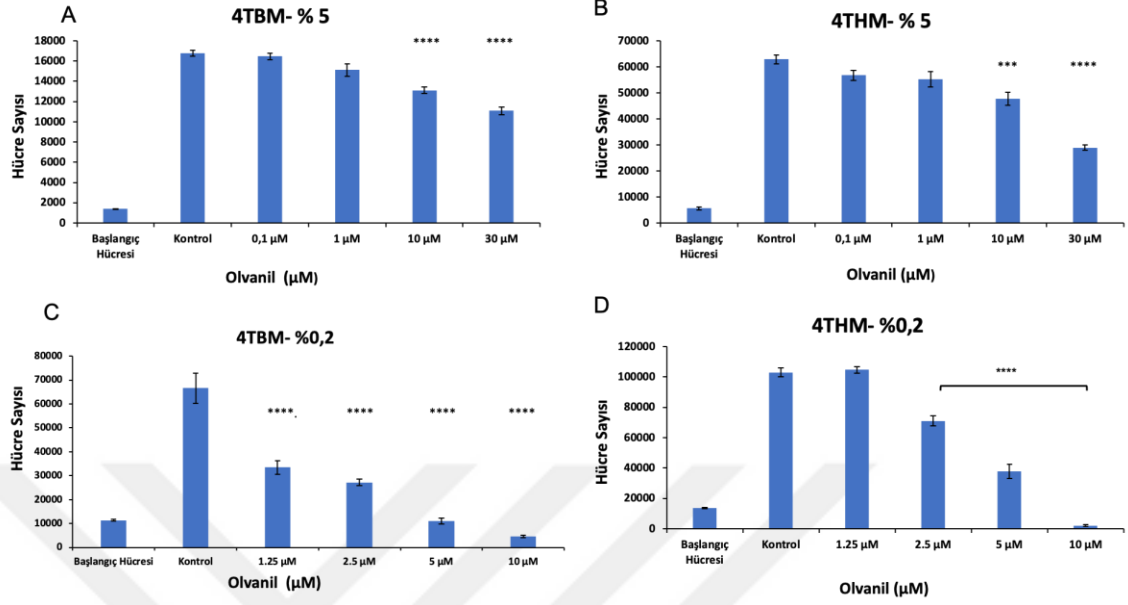
Elde edilen sonuçlara göre anlamlı olarak baskıladığı görülen TrkA agonisti Amitriptilin'nin %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerindeki etkisi ile doz-etki grafiği çıkarılmış ve ilacın her iki hücredeki IC50 değerleri Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. TrkA agonisti Amitriptilin'nin %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerinde gösterdiği etki ve EC50 değerleri.

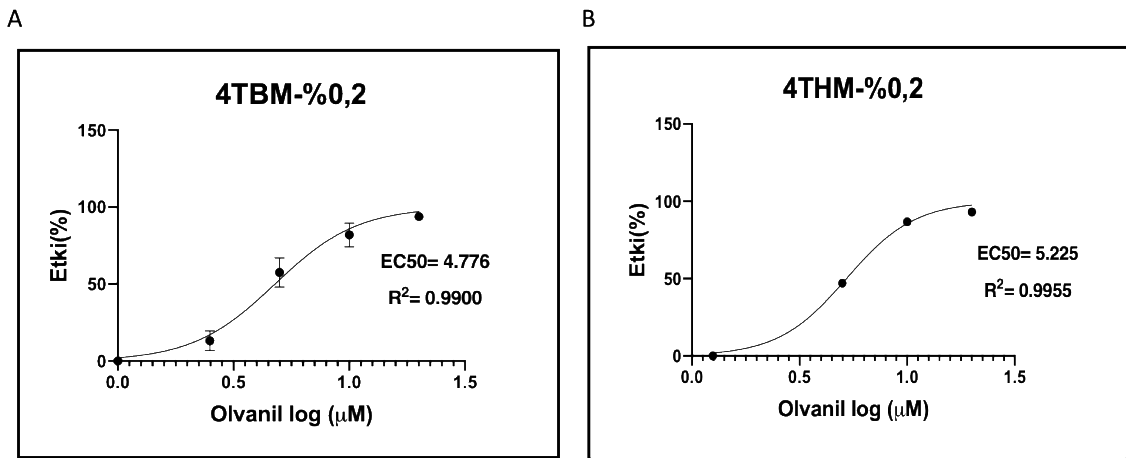
4.3. TRPV1 Agonisti Olvanil'in Tek Başına 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Balb-c fare modelinde oluşan 4T1 meme kanseri hücrelerinin beyine ve kalbe metastaz yapmış metastatik altgrupları 4TBM ve 4THM hücrelerine %0,2 FBS ve %5 FBS içeren besiyeri ortamında 0,1 ve 30 µM arası değişen konsantrasyonlarda TRPV1 agonisti Olvanil uygulandı. Olvanilin hücre proliferasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi adına WST-1 kiti ile 440 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kaydedildi ve var olan hücre sayıları grafiklendirildi. Sonuçlara göre %5 FBS içeren ortamda yüksek konsantrasyonlarda her iki hücre hattında da hücre proliferasyonunda baskılanma gözlenirken düşük Olvanil konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunda kontrole göre değişiklik gözlemlenmemiştir. %0,2 FBS içeren ortamda ise düşük Olvanil konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunda kontrole göre bir baskılanma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. %5 FBS ve %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında farklı Olvanil konsantrasyonlarının 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi. (A, B) %5 FBS içeren besiyeri ortamında 4TBM ve 4THM hücrelerinin proliferasyonunda yüksek konsantrasyonda anlamlı bir baskılanma görülmüştür. (C, D) %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında 4TBM ve 4THM hücre hatlarında doza bağlı bir baskılanma görülmüştür. Analizler kontrol gruplarına göre yapılmıştır ve $p < 0.05$ olanlar anlamlı kabul edilmiştir. *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$

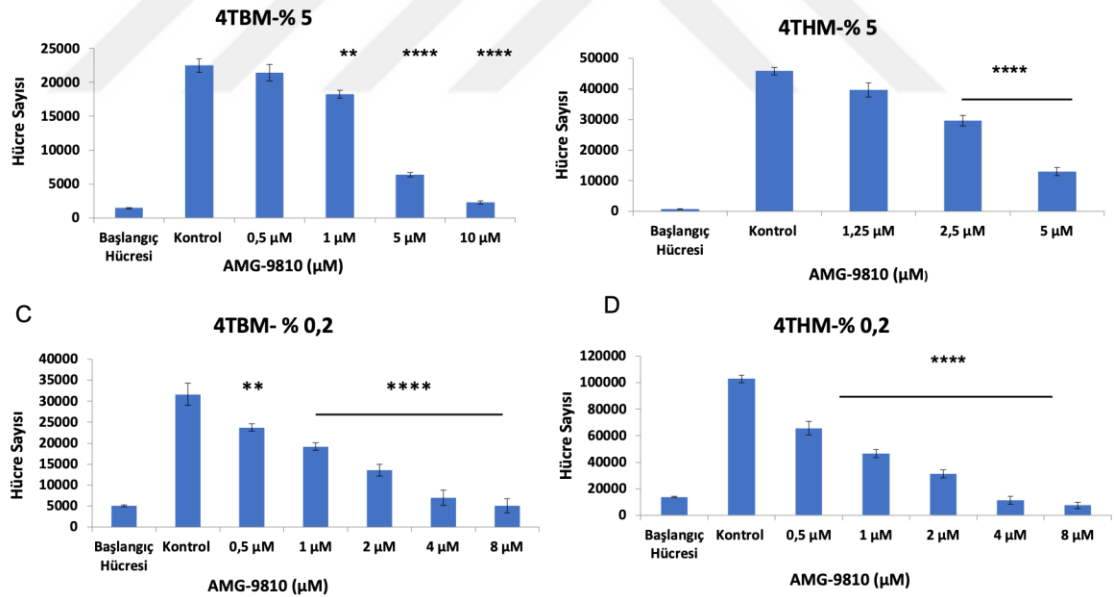
Elde edilen sonuçlara göre anlamlı olarak baskıladığı görülen TRPV1 agonisti Olvanil'in %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerindeki etkisi ile doz-etki grafiği çıkarılmış ve ilacın her iki hücredeki EC50 değerleri Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. TRPV1 agonisti Olvanil'in %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerinde gösterdiği etki ve EC50 değerleri.

4.4. TRPV1 Antagonisti AMG-9810'un Tek Başına 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi

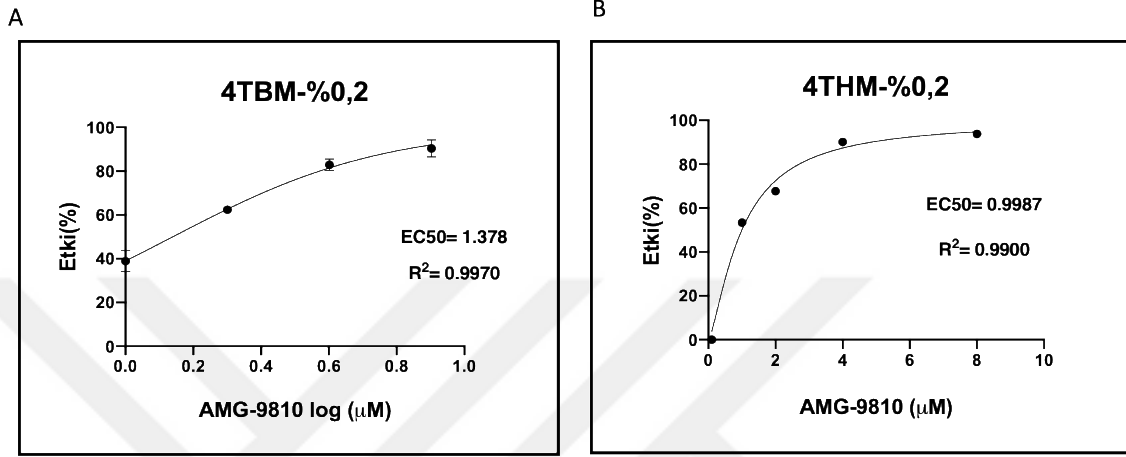
Balb-c fare modelinde oluşan 4T1 meme kanseri hücrelerinin beyine ve kalbe metastaz yapmış metastatik altgrupları 4TBM ve 4THM hücrelerine %0,2 FBS ve %5 FBS içeren besiyeri ortamında 0,5 ve 10 μ M arası değişen konsantrasyonlarda TRPV1 antagonisti AMG-9810 uygulandı. AMG-9810'un hücre proliferasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi adına WST-1 kiti ile 440 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kaydedildi ve canlı hücre sayıları grafiklendirildi. Sonuçlara göre %5 FBS içeren ortamda yüksek konsantrasyonlarda her iki hücre hattında da hücre proliferasyonunda baskılanma gözlenirken düşük AMG-9810 konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunda kontrole göre değişiklik gözlemlenmemiştir. %0,2 FBS içeren ortamda ise düşük konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunda kontrole göre bir baskılanma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. %5 FBS ve %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında farklı AMG-9810 konsantrasyonlarının 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi. (A, B) %5 FBS içeren besiyeri ortamında 4TBM ve 4THM hücrelerinin proliferasyonunda yüksek konsantrasyonlarda anlamlı bir baskılanma görülmüştür. (C, D) %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında 4TBM ve 4THM hücre hatlarında doza bağlı bir baskılanma görülmüştür. Analizler kontrol gruplarına göre yapılmıştır ve $p < 0.05$ olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

** $p = 0.0016$, *** $p < 0.0001$.

Elde edilen sonuçlara göre anlamlı olarak baskıladığı görülen TRPV1 antagonisti AMG-9810'un %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerindeki etkisi ile doz-etki grafiği çıkarılmış ve ilacın her iki hücredeki EC50 değerleri Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.



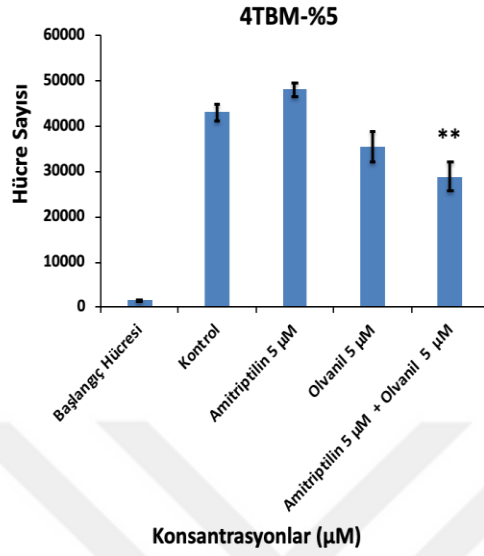
Şekil 4.7. TRPV1 antagonisti AMG-9810'un %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerindeki etkisiyle elde edilen doz-etki grafiği ve EC50 değerleri. (A, B)

4.5. TRPV1 Ajanlarının TrkA agonisti Amitriptilin ile Kombine Kullanımının 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi

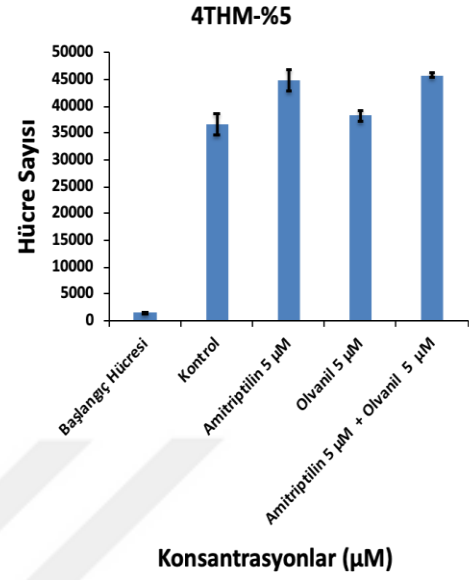
4.5.1 TRPV1 Agonisti Olvanil ile TrkA Agonisti Amitriptilin ile Kombine Kullanımının 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Balb-c fare modelinde oluşan 4T1 meme kanseri hücrelerinin beyine ve kalbe metastaz yapmış metastatik altgrupları 4TBM ve 4THM hücrelerine %5 FBS ve %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında 5 μM konsantrasyonunda TRPV1 agonisti Olvanil ile aynı konsantrasyonda TrkA agonisti Amitriptilin tek ve kombine olarak uygulandı. İki ilacın kombine kullanımının hücrelerin proliferasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi için WST-1 kiti ile 440 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kaydedildi ve var olan hücre sayıları grafiklendirildi.

A

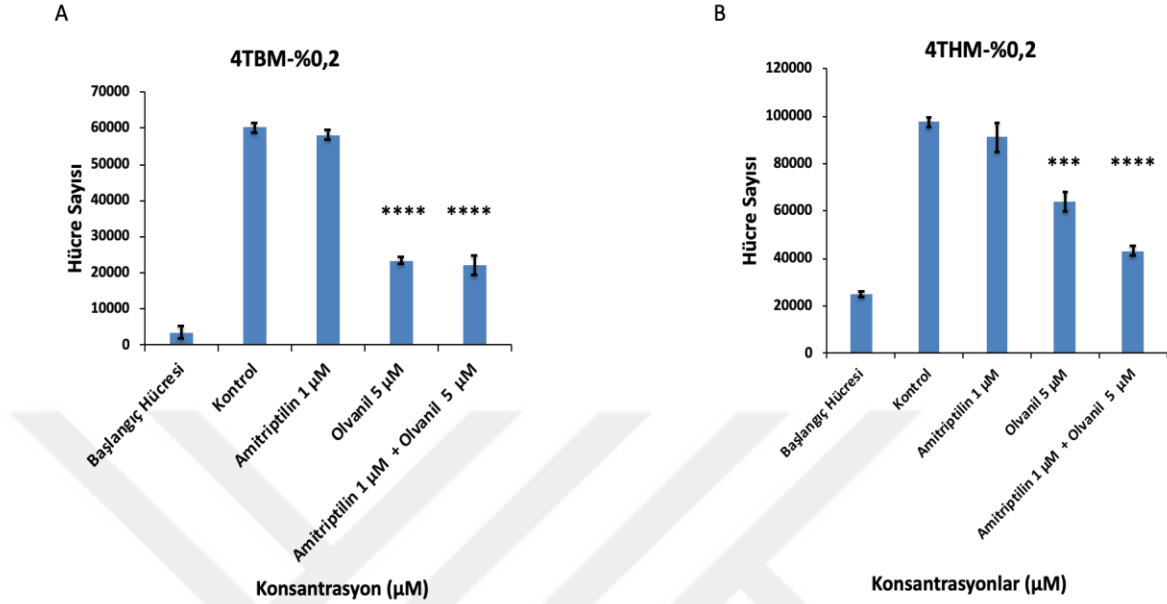


B



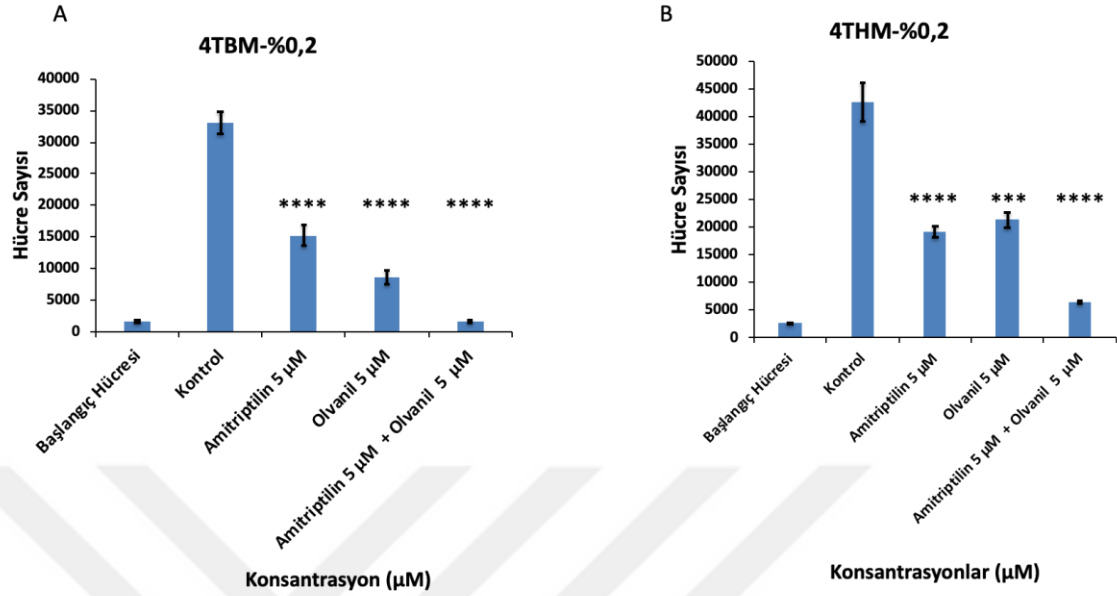
Şekil 4.8. TRPV1 agonisti 5 µM Olvanil ile TrkA agonisti 5 µM Amitriptilin'in kombine kullanımının %5 FBS içeren ortamdaki 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi (A, B) İki ilacın kombine kullanımının kontrol gruplarına göre hücrenin proliferasyonunu baskılandığı 4TBM hücrelerinde görülmüşken 4THMde etki gözlenmemiştir. **** $p < 0,05$**

Sonuçlara göre %5 FBS içeren ortamda iki ilacın kombine kullanımının kontrol gruplarına göre hücrenin proliferasyonunu baskılandığı 4TBM hücrelerinde görülmüşken 4THM de gözlenmemiştir (**Şekil 4.8**).



Şekil 4.9. TRPV1 agonisti 5 µM Olvanil ile TrkA agonisti 1 µM Amitriptilin'in kombine kullanımının %0,2 FBS içeren ortamdaki 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi (A, B) Amitriptilin ve Olvanil ilaçlarının kombine kullanımı anlamlı şekilde kontrol gruplarına göre proliferasyonu baskıladığı her iki hücre hattında görülmüş, 4THM hücre hattında kombine kullanım Olvanil'in etkisini arttırdığı gözlemlenmiştir. *** $p=0,0009$, **** $p<0,0001$

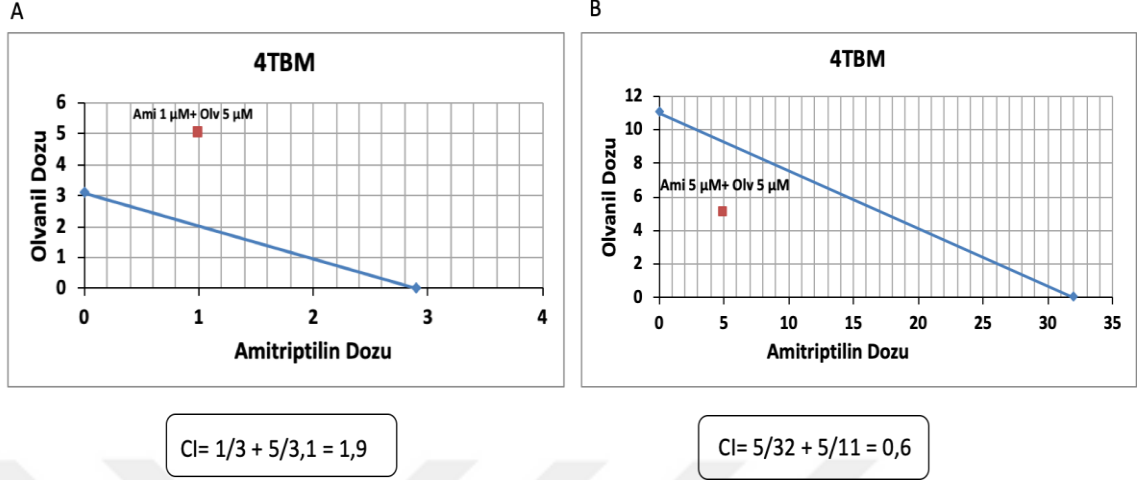
%0,2 FBS içeren ortamda ise 1 µM Amitriptilin tek başına uygulandığında kontrole göre hücre proliferasyonundaki etkisi görülmezken 5 µM Olvanil tek başına uygulandığında kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunu her iki hücre hattında da anlamlı ölçüde baskılamıştır. İlaçların bu konsantrasyonlarda kombine kullanımı hücre proliferasyonunu kontrol grubuna göre belirgin ölçüde baskıladığı gözlemlenmiştir. 4TBM hücre hattında 1 µM Amitriptilin+ 5 µM Olvanil kullanımı, Olvanil'in tek başına yaptığı etkiyi değiştirmezken 4THM hücresinde ise Olvanil'in etkisini arttırdığı görülmüştür (Şekil 4.9).



Şekil 4.10. TRPV1 agonisti 5 µM Olvanil ile TrkA agonisti 5 µM Amitriptilin'in kombine kullanımının %0,2 FBS içeren ortamdaki 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi (A, B). Amitriptilin ve Olvanil ilaçları ayrı ayrı uygulandığında kontrol gruplarına göre proliferasyonu anlamlı ölçüde bastırmış, kombine kullanımda bu etki daha da belirgin gözlemlenmiştir. *** $p=0,0002$, **** $p<0,0001$

%0,2 FBS içeren ortamda hem 5 µM Amitriptilin hem de 5 µM Olvanil'in tek başına uygulandığında yine kontrol grubuna göre her iki hücre hattında da hücre proliferasyonunu anlamlı ölçüde baskılamıştır. İlaçların bu konsantrasyonlarda kombine kullanımı 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonunda daha belirgin bir baskılanmayı ortaya çıkarmıştır (**Şekil 4.10**).

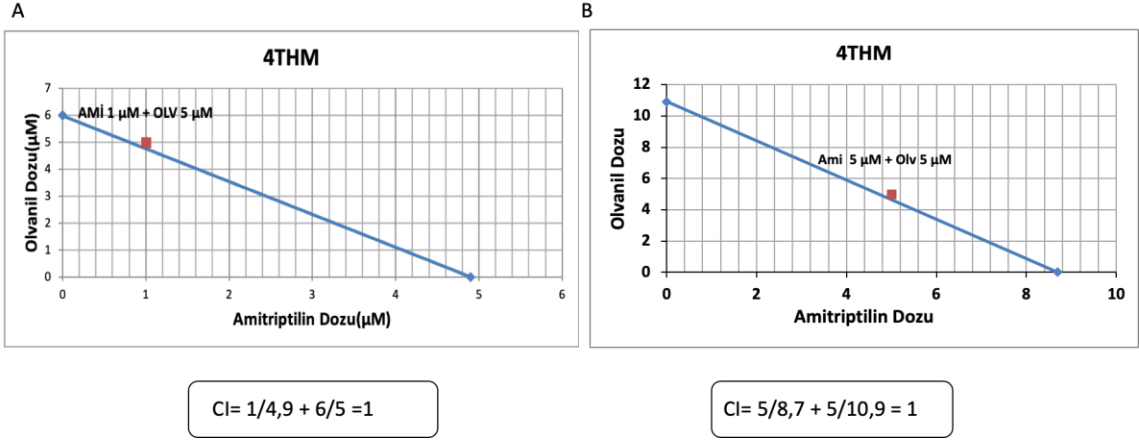
Elde edilen sonuçlara göre 4TBM ve 4THM hücrelerinde proliferasyonunu anlamlı olarak baskıladığı görülen Amitriptilin-Olvanil kombine konsantrasyonlarında iki ilacın birbirleriyle etkileşimini belirlemek için izobologram grafikleri çıkarıldı ve CI değerleri hesaplanıldı.



Şekil 4.11. 4TBM hücresinde %0,2 FBS içeren ortamda Amitriptilin-Olvanil kombine dozlarıyla çıkarılan izobologram grafikleri ve CI değerleri. (A, B)

Grafiklere göre 4TBM hücresinde 5 µM Olvanil'in 1 µM Amitriptilin ile kombine kullanıldığında Olvanil'in etkisini değiştirmedeği, 5 µM Amitriptilin ile kombine kullanıldığında ise sinerjistik etkileşim gösterdiği görüldü. Bu etkileşimlerin matematiksel ifadesi olarak bilinen CI değerleri Ami 1+Olv 5 için 1,9 iken Ami 5+Olv 5 için 0,6 bulunmuştur. CI değeri 1 olan additif etki olarak kabul edilirken CI değeri 1'den küçük ise sinerjistik etkileşim olarak belirtilmiştir (**Şekil 4.11.**).

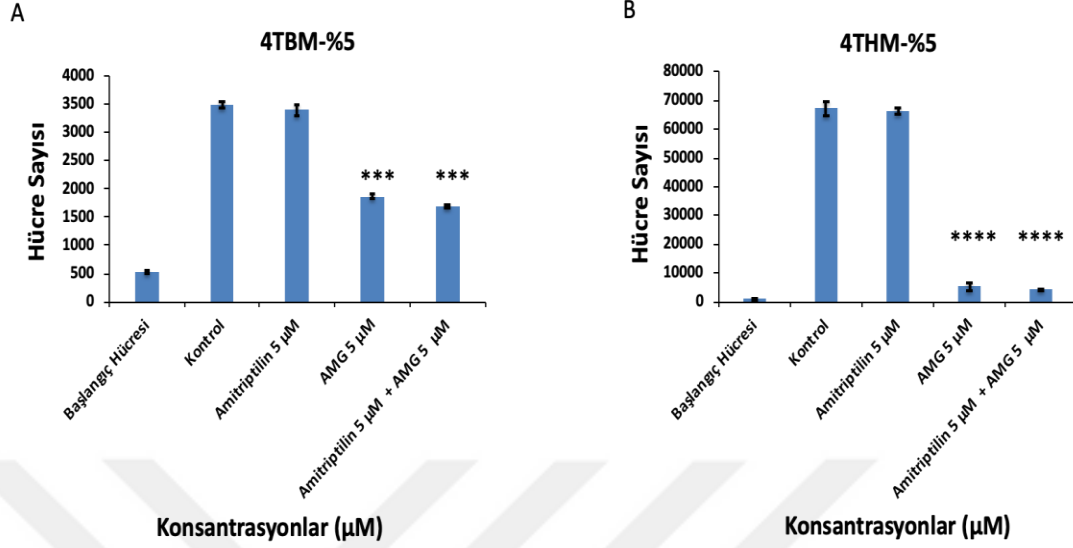
4THM hücresinde ise 5 µM Olvanil + 1 µM Amitriptilin ve 5 µM Olvanil + 5 µM Amitriptilin olarak kombine kullanımı ile iki ilacın birbiriyle additif etkiye yakın etkileştiği görülmüştür. Bu etkileşimlerin matematiksel ifadesi olarak bilinen CI değerleri Ami 1+Olv ve Ami 5+Olv 5 için 1 bulunmuştur. CI değeri 1 olan additif etki olarak kabul edilirken CI değeri 1'den küçük ise sinerjistik etkileşim olarak belirtilmiştir (**Şekil 4.12.**).



Şekil 4.12. 4THM hücrelerinde %0,2 FBS içeren ortamda Amitriptilin-Olvanil kombine dozlarıyla çıkarılan izobologram grafikleri ve CI değerleri. (A, B)

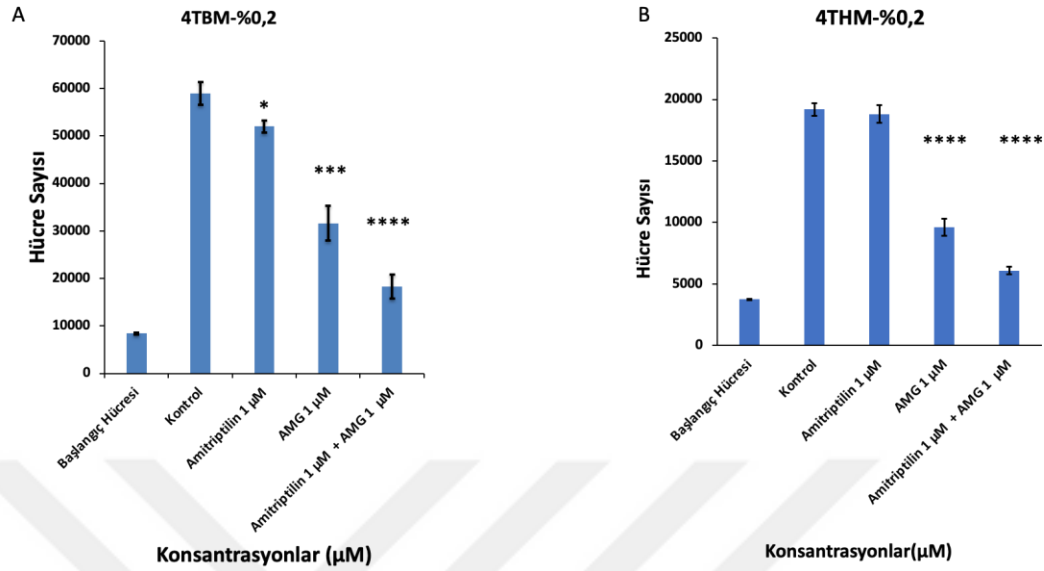
4.5.2. TRPV1 Antagonisti AMG-9810 ile TrkA Agonisti Amitriptilin ile Kombine Kullanımının 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Balb-c fare modelinde oluşan 4T1 meme kanseri hücrelerinin beyine ve kalbe metastaz yapmış metastatik altgrupları 4TBM ve 4THM hücrelerine %5 FBS ve %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında 5 µM konsantrasyonunda TRPV1 agonisti Olvanil ile aynı konsantrasyonda TrkA agonisti Amitriptilin tek ve kombine olarak uygulandı. İki ilacın kombine kullanımının hücrelerin proliferasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi için WST-1 kiti ile 440 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kaydedildi ve var olan hücre sayıları grafiklendirildi.



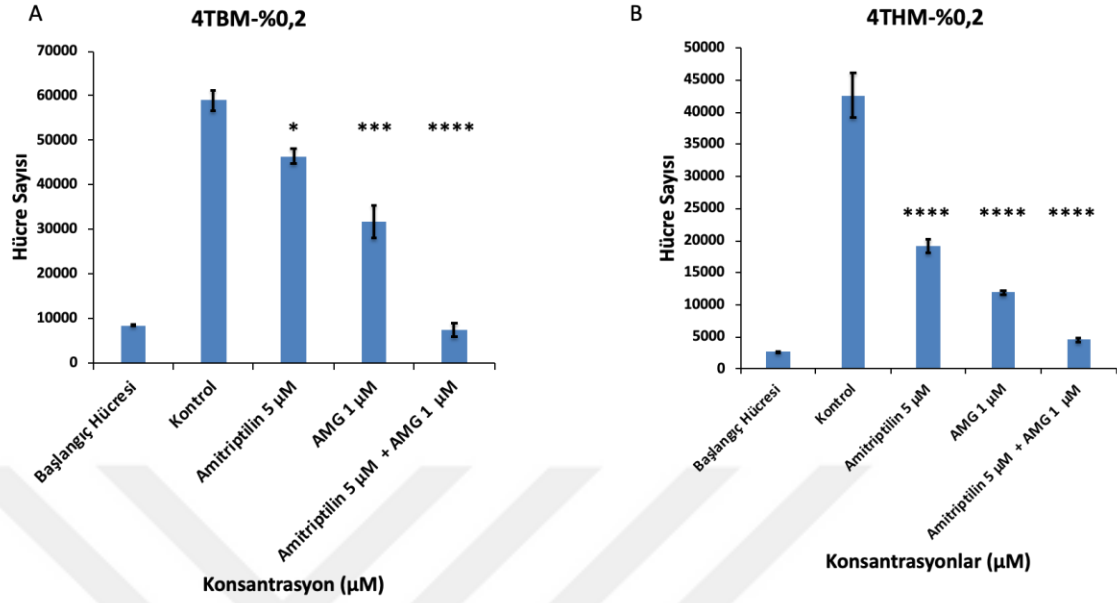
Şekil 4.13. TRPV1 antagonisti 5 μM AMG-9810 ile TrkA agonisti 5 μM Amitriptilin'in kombine kullanımının %5 FBS içeren ortamdaki 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi (A, B) İki ilacın kombine kullanımının kontrol gruplarına göre hücrenin proliferasyonunu anlamlı olarak baskılandığı 4TBM ve 4THM hücrelerinde gözlemlenmiştir. *** $p < 0,02$, **** $p < 0,001$

Sonuçlara göre %5 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerinde iki ilacın kombine kullanımının kontrol gruplarına göre hücrenin proliferasyonunu anlamlı olarak baskılandığı fakat 5 μM Amitriptilin'in AMG-9810'un etkisini değiştirmediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.13.).



Şekil 4.14. TRPV1 antagonisti 1 μM AMG-9810 ile TrkA agonisti 1 μM Amitriptilin'in kombine kullanımının %0,2 FBS içeren ortamdaki 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi (A, B) İki ilacın kombine kullanımının kontrol gruplarına göre hücrenin proliferasyonunu anlamlı olarak baskılandığı her iki hücre hattında görülmüş, kombine kullanımda AMG-9810 ilacının etkisini arttırdığı gözlemlenmiştir. * $p=0,0249$, *** $p<0,0007$ **** $p<0,0001$

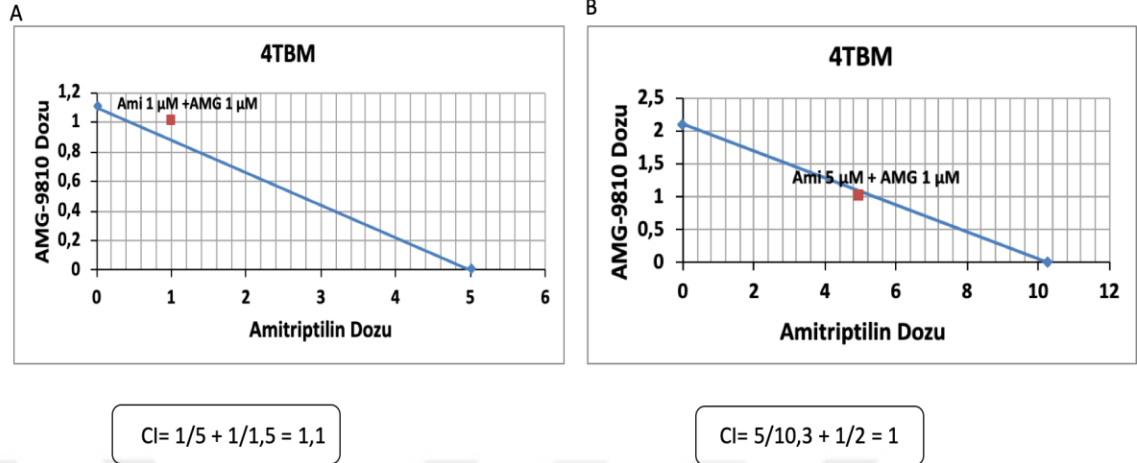
%0,2 FBS içeren ortamda ise 4TBM de 1 μM Amitriptilin tek başına uygulandığında hücre proliferasyonundaki baskılanma görülmezken 1 μM AMG-9810 tek başına uygulandığında kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunu her iki hücre hattında da anlamlı ölçüde baskılamıştır. İlaçların bu konsantrasyonlarda kombine kullanımı hücre proliferasyonunu hem kontrol grubuna göre baskılamış hem de 1 μM Amitriptilin, 1 μM AMG -9810'un antiproliferatif etkisini arttırmıştır. (Şekil 4.14.).



Şekil 4.15. TRPV1 antagonisti 1 µM AMG-9810 ile TrkA agonisti 5 µM Amitriptilin'in kombine kullanımının %0,2 FBS içeren ortamdaki 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi (A, B) İki ilaç tek başına uygulandığında kontrol grubuna göre proliferasyonu anlamlı ölçüde baskıladığı, iki ilacın kombine kullanımı ise bu etkiyi daha da belirginleştirdiği görülmüştür. * $p=0,0182$, *** $p=0,0002$ **** $p<0,0001$

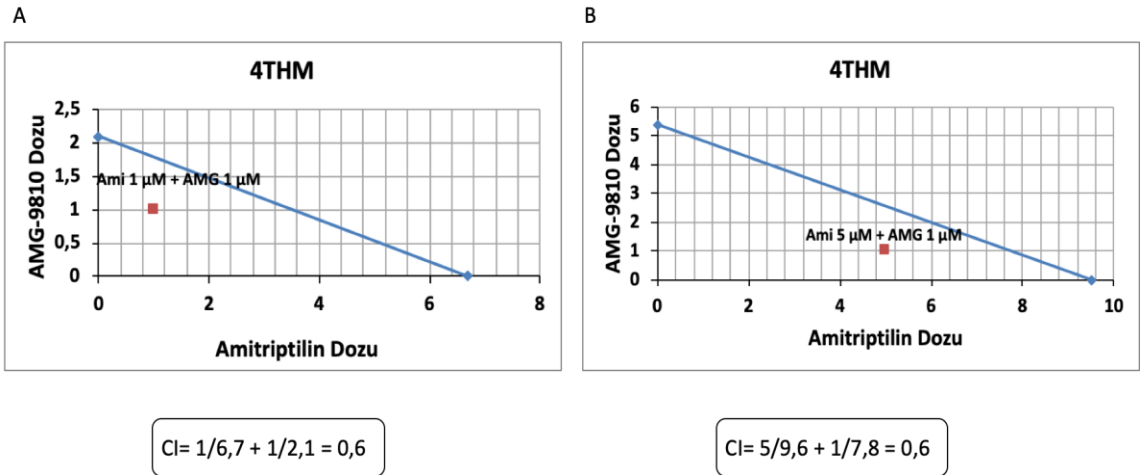
%0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerinde 5 µM Amitriptilin tek başına uygulandığında kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunda anlamlı bir baskılanma gözlemlenirken 1 µM AMG-9810 ile kombine kullanıldığında AMG'nin anti-proliferatif etkisini arttırdığı görülmüştür (**Şekil 4.15.**).

Elde edilen sonuçlara göre hücre proliferasyonunu anlamlı olarak baskıladığı görülen kombine Amitriptilin - AMG-9810 konsantrasyonlarında 4TBM ve 4THM hücresinde iki ilacın birbirleriyle etkileşimini belirlemek için izobologram grafikleri ve CI değerleri hesaplanıldı.



Şekil 4.16. 4TBM hücrelerinde %0,2 FBS içeren ortamda Amitriptylin ve AMG-9810'un kombine dozlarıyla çıkarılan izobologram grafiği ve CI değerleri. (A, B)

Grafiğe göre 4TBM hücrelerinde 1 µM AMG-9810'un 1 µM ve 5 µM Amitriptylin ile kombine kullanıldığında antiproliferatif etkinin arttığı görüldü. Bu etkileşimlerin matematiksel ifadesi olarak bilinen CI değerleri Ami 1+AMG 1 için 1,1 iken Ami 5+AMG 1 içinse 1 bulunmuştur. CI değeri 1 olan additif etki olarak kabul edilirken CI değeri 1'den küçük ise sinerjistik etkileşim olarak belirtilmiştir (**Şekil 4.16.**).



Şekil 4.17. 4THM hücrelerinde %0,2 FBS içeren ortamda Amitriptylin ve AMG-9810'un kombine dozlarıyla çıkarılan izobologram grafiği ve CI değerleri. (A, B)

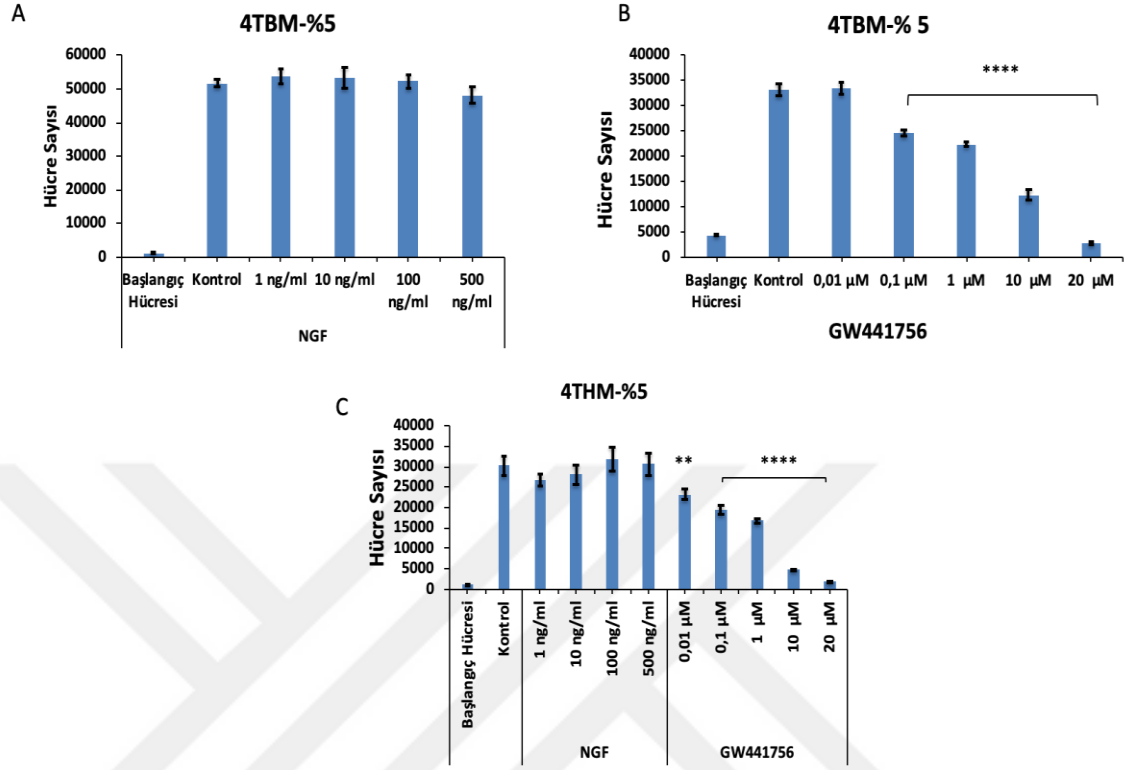
4THM hücrelerinde ise 1 µM AMG-9810'un antiproliferatif etkisi 1 ve 5 µM Amitriptylin ile arttığı görülmüş ve 5 µM Amitriptylin ile kombinesinde daha belirgin bir sinerjistik etkileşim gözlemlenmiştir. Bu etkileşimlerin matematiksel ifadesi olarak bilinen CI değerleri Ami 1+Amg 1 ve Ami 5+Amg 1 için 0,6 bulunmuştur. CI değeri 1

ise additif etki olarak kabul edilirken CI değeri 1'den küçük ise sinerjistik etkileşim olarak belirtilmiştir. (Şekil 4.17.).

4.6.TrkA Reseptör Ligandı NGF ile TrkA İnhibitörü GW441756 Kullanımının 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi

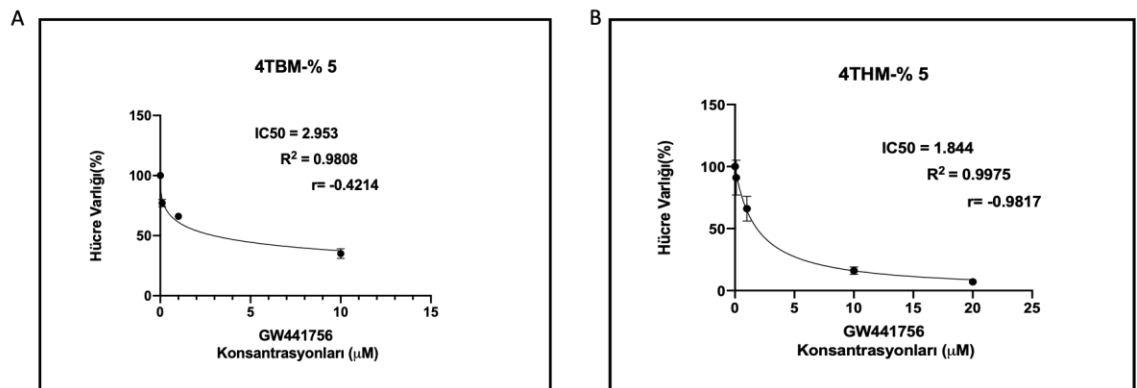
4.6.1.TrkA Reseptör Ligandı NGF ile TrkA İnhibitörü GW441756'nın Tek Başına Kullanımının 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Balb-c fare modelinde oluşan 4T1 meme kanseri hücrelerinin beyne ve kalbe metastaz yapmış metastatik altgrupları 4TBM ve 4THM hücrelerine %5 FBS ve %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında 1 ve 500 ng/mL arasında değişen konsantrasyonlarda TrkA reseptör ligandı NGF ve 0,01-20 μ M arasında değişen konsantrasyonlarda TrkA inhibitörü GW441756 tek başına uygulandı. İki ilacın hücrelerin proliferasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi için WST-1 kiti ile 440 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kaydedildi ve var olan hücre sayıları grafiklendirildi. Sonuçlara göre %5 FBS içeren ortamda TrkA reseptör ligandı NGF nin 1,10,100 ve 500 ng/mL değişen konsantrasyonlarda tek başına uygulandığında kontrole göre anlamlı bir değişiklik gözlemlenmezken TrkA inhibitörü GW441756 nın 0,01,0,1,1,10 ve 20 μ M değişen dozlarda uygulandığında ise kontrole göre her iki hücrede de proliferasyonu doza bağlı olarak baskılandığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.18.).



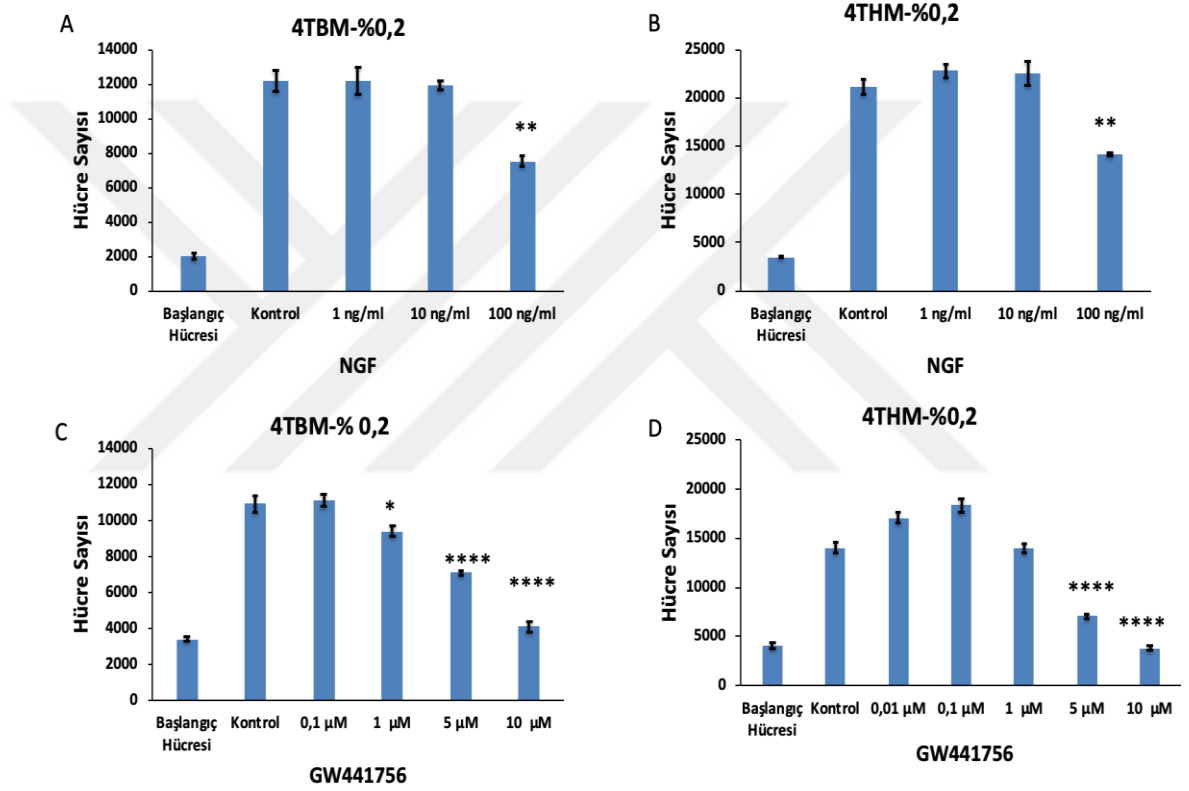
Şekil 4.18. TrkA ligandı NGF ile TrkA inhibitörü GW441756'nin tek başına kullanımının %5 FBS içeren ortamdaki 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi (A, B, C). NGF tek başına kullanıldığında anlamlı bir değişiklik gözlemlenmezken, GW441756 ise tek başına uygulandığında kontrol grubuna göre proliferasyonu doza bağlı olarak baskıladığı her iki hücrede de görülmüştür. ** $p=0,0023$, **** $p<0,0001$.

Tek başına elde edilen sonuçlara göre anlamlı olarak baskıladığı görülen TrkA inhibitörü GW441756 ilacının %5 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerindeki etkisi ile doz-etki grafiği çıkarılmış ve ilacın her iki hücredeki IC₅₀ değerleri Şekil 4.19.'de gösterilmiştir.



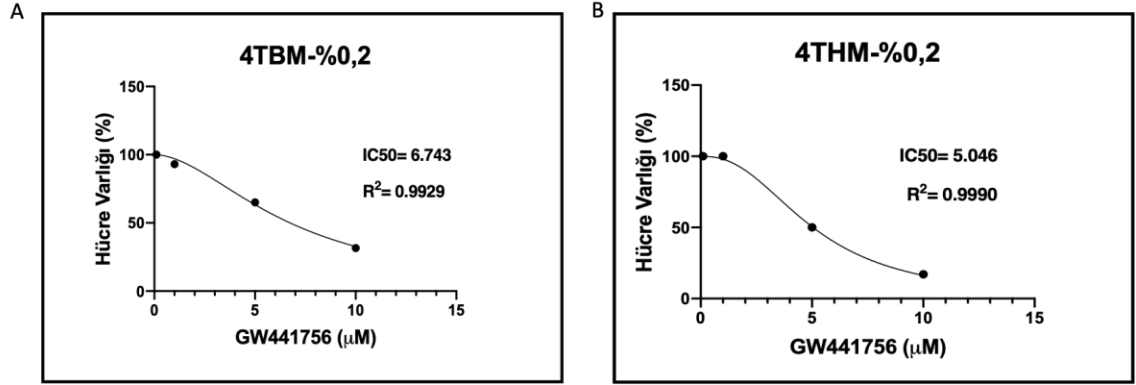
Şekil 4.19. TrkA inhibitörü GW441756 ilacının %5 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerindeki etkisi ile elde edilen hücre varlığı yüzdesi-konsantrasyon grafiği ve IC₅₀ değerleri. (A, B)

%0,2 FBS içeren ortamda ise her iki hücrede TrkA reseptör ligandı NGF 100 ng/ml konsantrasyonunda uygulandığında kontrole göre anlamlı bir baskılanma görülmüştür. GW441756 uygulandığında ise 4TBM hücre proliferasyonunda 1,5,10 μ M konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı bir baskılanma gözlemlenirken 4THM hücre proliferasyonunda ise 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarında baskılanma görülmüştür (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. TrkA ligandı NGF ile TrkA inhibitörü GW441756'nın tek başına %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi (A, B, C, D). Analizler kontrol grubuna göre yapılmıştır. ** $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$

Tek başına elde edilen sonuçlara göre anlamlı olarak baskıladığı görülen TrkA inhibitörü GW441756 ilacının %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerindeki etkisi ile doz-etki grafiği çıkarılmış ve ilacın her iki hücredeki IC50 değerleri Şekil 4.21.'de gösterilmiştir.



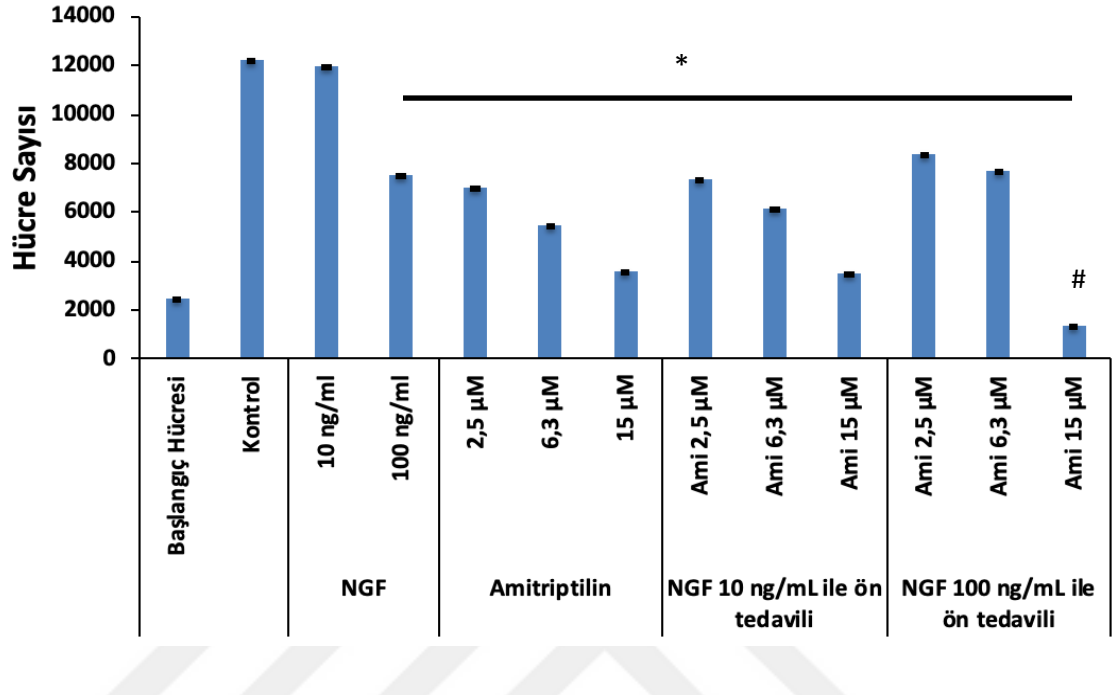
Şekil 4.21. TrkA inhibitörü GW441756 ilacının %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerindeki etkisi ile elde edilen doz-etki grafiği ve IC50 değerleri (A, B).

4.6.2. TrkA reseptör ligandı NGF ve TrkA inhibitörü GW441756'nın Ön Tedavili Kullanımının 4TBM ve 4THM Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Balb-c fare modelinde oluşan 4T1 meme kanseri hücrelerinin beyne ve kalbe metastaz yapmış metastatik altgrupları 4TBM ve 4THM hücrelerine %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında 1 ve 100 ng/mL konsantrasyonlarda TrkA reseptör ligandı NGF ve 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda TrkA inhibitörü GW441756'nın ön tedavili kullanımından sonra Amitriptilin ile kombine uygulandı. Hücre proliferasyonuna etkisinin belirlenmesi için var olan hücre sayıları grafiklendirildi. Sonuçlara göre %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerine 1 ve 100 ng/mL konsantrasyonlarda ön tedavili olarak NGF uygulanan grupta kontrole göre anlamlı bir baskılanma gözlenmiş; tek başına Amitriptilin uygulanan gruplara göre ise sadece 4TBM hücresinde 100 ng/mL NGF ile ön tedavi görmüş 15 µM Amitriptilin uygulanan grupta antiproliferatif etki artmıştır. (Şekil 4.22).

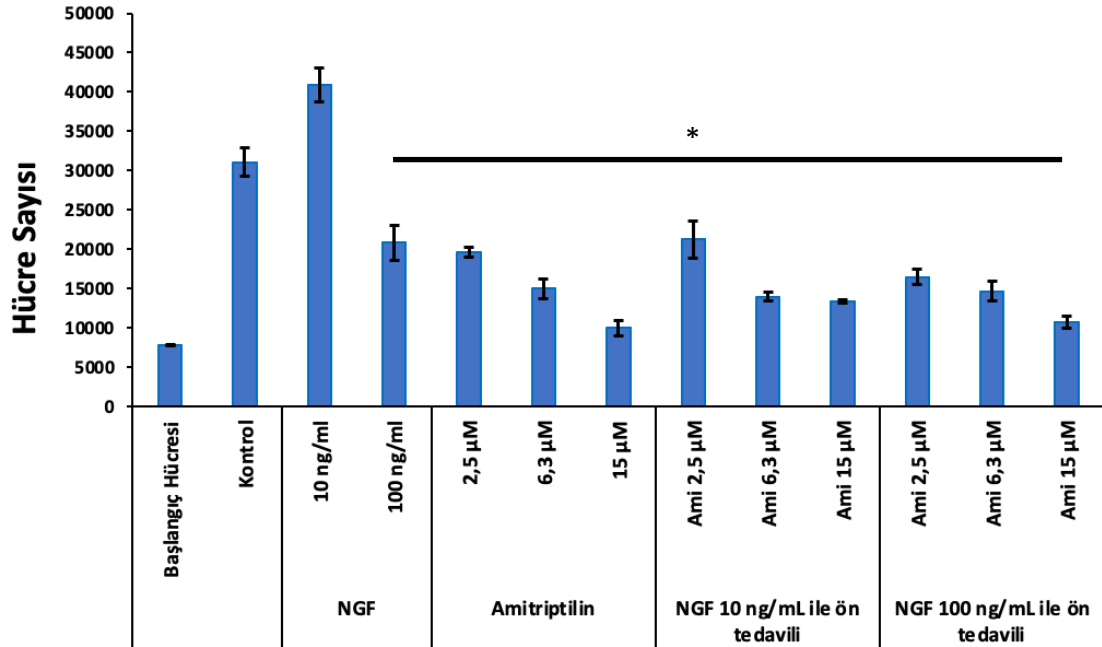
A

4TBM-%0,2



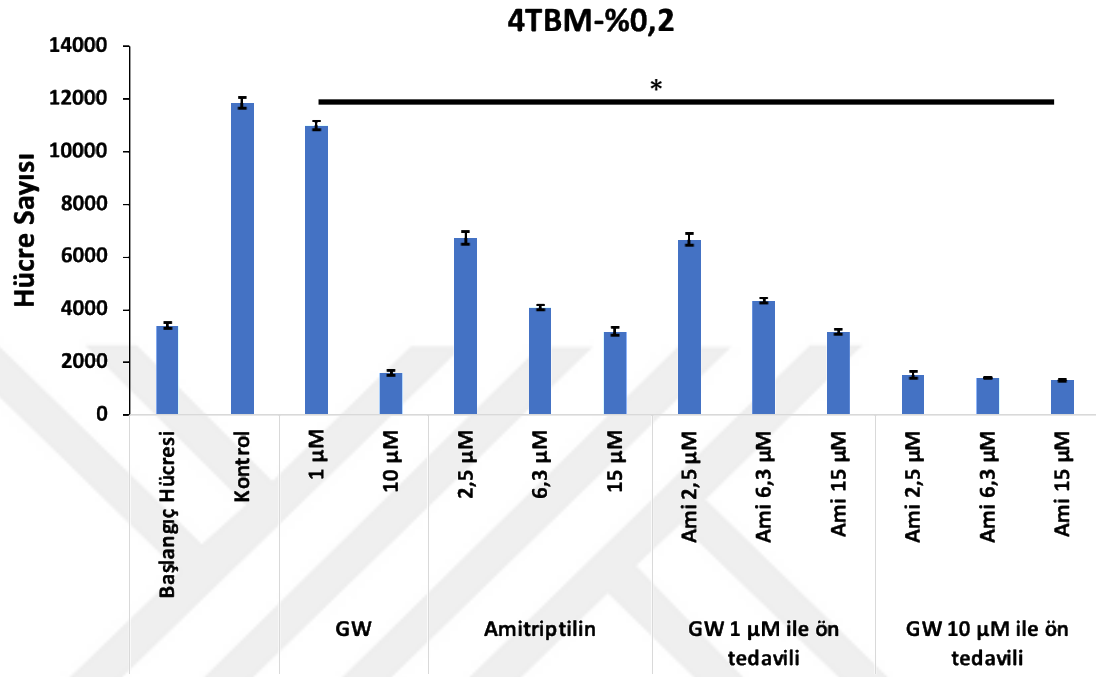
B

4THM-%0,2

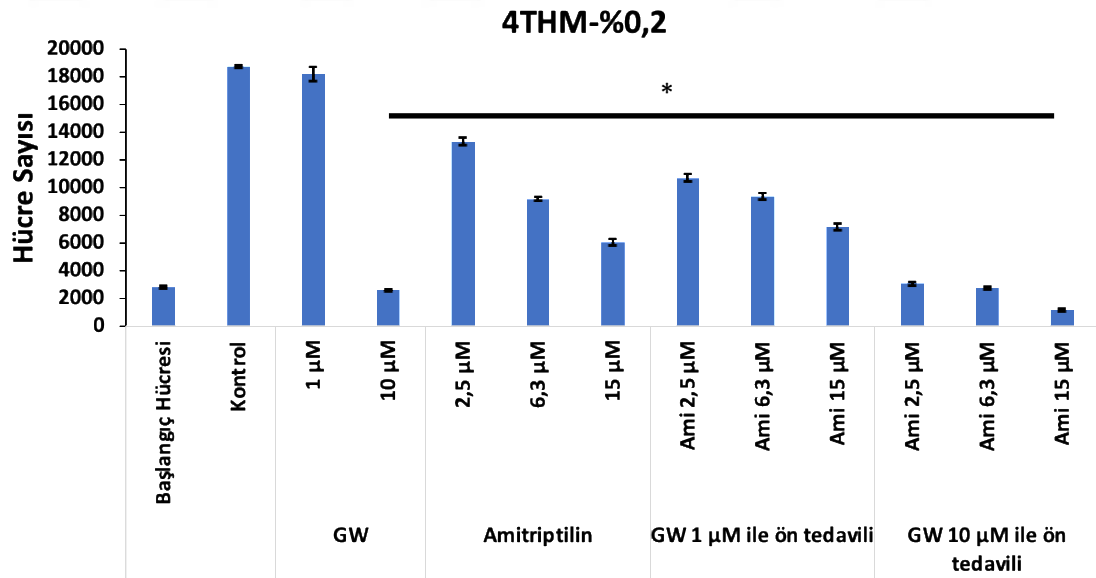


Şekil 4.22. %0,2 FBS içeren ortamda 10 ve 100 ng/mL konsantrasyonlarda NGF ile ön tedavi uygulanan grupların 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi. (A)4TBM hücresinde sadece 100 ng/mL NGF ile ön tedavi edilen sonrasında 15 µM Amitriptilin uygulanan grupta tek Amitriptilin uygulanan gruba göre anlamlı bir baskılanma görülmüştür. (B)4THM hücresinde 10 ve 100 ng/mL konsantrasyonlarda ön tedavili olarak uygulanan TrkA reseptör ligandı NGF, 100 ng/mL konsantrasyonda kontrole göre anlamlı bir baskılanma gözlenirken tek başına Amitriptilin uygulanan gruplarına göre ise anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. * $p<0.05$, # $p<0.0$

A



B



Şekil 4.23. %0,2 FBS içeren ortamda 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda GW441756 ile ön tedavi uygulanan grupların 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonuna etkisi. (A, B) %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerinde 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda ön tedavili olarak uygulanan TrkA reseptör inhibitörü GW441756, her iki konsantrasyonda kontrole göre anlamlı bir baskılanma gözlenirken sadece 10 µM GW konsantrasyonunda tek başına Amitriptilin uygulanan gruplara göre antiproliferatif etkiye artış görülmüştür.

Sonuçlara göre %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerinde 10 µM konsantrasyonda ve ön tedavili olarak GW441756 uygulanan grupların hepsinde kontrole göre anlamlı bir baskılanma gözlenmiştir. Ön tedavili 1 µM GW uygulanmış grupta her iki hücre hattında da tek başına Amitriptilin uygulanan gruplara göre anlamlı bir baskılanma görülmemiştir. İki hücrede de 10 µM GW441756 ön tedavili olarak uygulanan grupta Amitriptilin uygulanan gruplara göre antiproliferatif etki artmıştır. (**Şekil 4.23**).



5. TARTIŞMA

Uzun yıllar boyunca kadınlarda meme kanseri en çok rastlanan kanser çeşidi olmuştur ve mortalite oranı halen oldukça yüksektir. Günümüze kadar primer meme tümörünü hedefleyen stratejiler iyi sonuç vermiş fakat diğer organlara metastazı önlemek için sistemik tedavilerle istenilen sonuç elde edilememiştir. Kişiden kişiye değişen özellikleri ve metastaz yapana kadar teşhisinin zor olması metastatik meme kanserinin tedavisini tedavi edilemez olarak kabul edilmiştir. Özellikle 4. evre meme kanseri olarak bilinen metastatik meme kanseri hücrelerinin günümüzde uygulanan tedavilere direnç geliştirip yanıt vermemesi ya da tedaviden yıllar sonra tekrarlayabiliyor olması yeni tedavi arayışlarına yönlendirmektedir (Redig ve McAllister, 2013; Feng ve ark., 2018).

Literatürde meme kanseri dahil prostat kanseri, tiroid karsinoma, glioma gibi birçok kanser çeşidinde TRPV1'in ekspresyonu gösterilmiştir (Sanchez ve ark., 2005; Vercelli ve ark., 2014; Vercelli ve ark., 2015; Weber ve ark., 2016; Xu ve ark., 2018). Weber ve ark. (2016), üçlü negatif meme kanseri hücresinde yaptığı bir çalışmada TRPV1 ekspresyonunun upregüle edildiğini bildirmiştir (Weber ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda da hem nonmetastatik hücre hattı 67NR hem metastatik hücre hattı 4T1 ve alttiplerinin TRPV1 kanalını eksprese ettiği görülmüştür.

Nöronal hücrelerin gelişimi ve sağ kalımı için nörotrofin sinyalini oluşturan Trk reseptörlerinin insan kanserlerinde onkojenik potansiyele sahip olduğu görülmüştür. Literatürdeki bu çalışma TrkA'nın kanserdeki keşfine yol açmıştır (Barbacid ve ark., 1991). Literatürde TrkA reseptörünün melanoma, glioblastoma, prostat, pancreas ve meme kanseri dahil birçok kanser çeşidinde de ekspresyonu belirtilmiştir (Z. Zhu ve ark., 2002). Biz de bu çalışmamızda 4T1 metastatik meme kanseri hücresinin alttipleri olan 4TBM, 4THM ve 4TLM hücrelerde ve non-metastatik hücre hattı olarak kabul edilen 67NR meme kanseri hücresinde literatürde ilk defa TrkA ekspresyonunun varlığını gösterdik.

Meme kanserinde hem p75 hem de TrkA ekspresyonu gözlemlenmiştir (Aragona ve ark., 2001). Bu iki reseptörün arasındaki denge kanser hücresinin sağ kalımını ya da ölümünü belirlemektedir. Meme kanseri ile ilgili bir çalışmada meme tümöründe TrkA reseptörünün upregülasyonu ve p75 in downregülasyonu rapor edilmiştir (Davidson ve ark., 2004). Prostat kanser hücreleri ile yapılan bir çalışmada epitel hücrelerin NGF ya da TrkA ekspresyonu değişmezken p75 ekspresyonu azaltması tümör gelişimini ve invazyonunu TrkA üzerinden desteklediğini düşündürmektedir (Molloy ve ark., 2011). Akciğer kanserinde ise tümörde TrkA ekspresyonu varken p75 ekspresyonuna rastlanmamıştır ve tümör gelişimini TrkA reseptörü ile desteklemektedir (Demir ve ark., 2016). Bu çalışmalardan yola çıkılarak kanser hücresinin TrkA/p75 dengesini kendi lehine çevirdiği düşünülebilir. Bizim çalışmamızda da kullandığımız 67NR ile metastatik meme kanseri hücresi 4T1 ve alttiplerinde literatürle benzer şekilde apoptoz reseptörü olan p75 ekspresyonuna rastlanmazken TrkA reseptörünü eksprese ettikleri gözlemlendi. Dolayısıyla meme kanseri hücrelerinin TrkA ekspresyonunu artırarak kanser hücresinin proliferasyonunu, sağ kalımını ve metastazı desteklediği düşünülebilir.

Yapılan çalışmalarda NGF'nin TrkA ya bağlanmasıyla hücre sağ kalımını, proliferasyonunu hem nöronal hem de nöronal olmayan hücrelerde düzenlediği belirtilmiştir (Com ve ark., 2007). Pankreas kanserinde ve nöroblastomada hücre büyümesi NGF/TrkA sinyali ile ilişkilendirilmiştir ve bu yolağın bloke edilmesi tümör büyümesini anlamlı şekilde baskılamıştır (George ve ark., 1998; Z. W. Zhu ve ark., 2001; Brodeur ve ark., 2009). Meme kanseri hücreleriyle yapılan bir çalışmada ise TrkA ligandı olan NGF'nin TrkA'nın sürekli aktif kalmasına ve hücre proliferasyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir (Lagadec ve ark., 2010). Yine meme kanseriyle yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda TrkA reseptörünün stimülasyonun meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu desteklediğini belirtmiştir (Nakagawara, 2001; Lagadec ve ark., 2009; Hondermarck, 2012). Meme kanserinin hem NGF'yi otokrin olarak eksprese etmesi (Adriaenssens ve ark., 2008) hem de TrkA reseptörünü overeksprese etmesi (Dolle ve ark., 2003) yapılan çalışmalarda anti-NGF, siRNA ve TrkA inhibitörlerinin kullanılmasına olanak sağlamıştır. Ancak literatürde TrkA ligandı ektopik NGF'nin farklı özellikteki glioma hücrelerinde proliferasyonu baskıladığı bunu da hücrelerin yaşlanmasını indükleyerek sağladığını ortaya atan bir çalışma da vardır

(Meco ve ark., 2019). Bizim çalışmamızda da TrkA agonisti olduğu literatürde belirtilmiş olan (Jang ve ark., 2009; Dai ve ark., 2017; L. Zhang ve ark., 2020). Amitriptilin'nin literatürdeki birçok çalışmadan farklı olarak hem %5 FBS ortamında hem de %0,2 FBS ortamında hücre proliferasyonunu baskıladığı görülmüştür. Bu sonuçtan yola çıkarak Amitriptilin'in bu etkiyi TrkA üzerinden yaptığı düşünülmektedir.

TRPV1 ekspresyonundaki değişiklikler aslında kanser hücresinin tümörjenez ve prognozunu belirlemektedir. Birçok kanser çeşidinde TRPV1 ekspresyonun upregüle olması kanser hücresinin bu kanalı kendi progresyonu için kullandığını düşündürmüştür (Czifra ve ark., 2009). Yakın zamanda yapılan bir çalışma kanser hücrelerinin capsaisin, anandamide gibi TRPV1 agonistlerini kullanarak kanalın açılmasını sağladığını, hücre içi Ca miktarını arttırdığı ve birçok proteinin aktivasyonu ile hücre proliferasyonunu desteklediğini öne sürmektedir (Zhai ve ark., 2020). Fakat TRPV1'in sürekli uyarıma karşı desensitizasyona uğraması hem agonistin hem de antagonistin etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Bunun üzerine yapılan bir çalışmada birçok kanser çeşidiyle yapılan çalışmalarda TRPV1 agonisti capsaisin'in kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü gösterilmiştir (Paez Borda ve ark., 1998; Chueh ve ark., 2004; Mori ve ark., 2006; Oh ve ark., 2008; Thoenissen ve ark., 2010; Diaz-Laviada ve Rodriguez-Henche, 2014). Üçlü negatif meme kanseri ile yapılan bir çalışmada TRPV1'in artmış ekspresyonuyla beraber TRPV1 agonisti Capsaisin uygulandığında hücre proliferasyonunda baskılanma gözlemlenmiş ve hücre içi homeostazisinin bozulmasıyla apoptoza ya da nekroza gittiği rapor edilmiştir (Weber ve ark., 2016). Panreas kanserinde yapılan çalışmalarda capsaisin gibi bir vanilloid analogu olan resinferatoxin'in kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü in vitro olarak gösterilmiştir (Hartel ve ark., 2006; Ziglioli ve ark., 2009). Bu çalışmalara destek olacak olan Vercelli ve ark.'larının (2014) MCF-7 insan meme kanseri hücresinde yaptığı bir çalışmada hem TRPV1 agonistleri capsaisin ve resinferatoxin hem de TRPV1 antagonistleri capsazepine ve 5-iodoresinferatoxin hücre proliferasyonunu anlamlı bir şekilde baskıladığı belirtilmiştir. Mekanizmasının da TRPV1 agonistin reseptörü desensitizasyona sürüklediği; antagonistin ise reseptörün fonksiyonel blokajı ile hücre homeostazisinin bozulduğu düşünülmektedir (Vercelli ve ark., 2014). Dolayısıyla literatüre bakıldığında agonistlerin ve antagonistlerin tümör hücrelerinde TRPV1 modulatorleri gibi işlev gördüğü gözlemlenmiştir. Literatürden

yola çıkararak tek başına hem TRPV1 agonisti Olvanil hem de antagonisti AMG-9810 ile muamele ettiğimiz 4TBM ve 4THM metastatik meme kanseri hücrelerinde anlamlı şekilde hücre proliferasyonunun baskılandığını gördük. TRPV1 Agonisti Olvanilin 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonundaki inhibisyonu %5 FBS içeren serumlu ortamda 10 ve 30 μ M dozlarda anlamlı olarak gözlemlenmiştir. %0,2 FBS içeren hücrelerin otokrin faktörlerle proliferasyonu olduğu ortamda ise inhibisyon 2,5 μ M ve üstü konsantrasyonlarda doza bağlı olarak daha belirgin şekilde ortaya çıkmıştır. TRPV1 Antagonisti AMG-9810 un hücre proliferasyonundaki inhibisyonunda %5 FBS içeren serumlu ortamda 1-10 μ M arası değişen konsantrasyonlarda doza bağlı olarak baskılanma söz konusu olmuştur. %0,2 FBS içeren ortamda ise 0,5 μ M ve üstü konsantrasyonlarda aynı şekilde doza bağlı olarak inhibisyon görülmüştür.

Literatür incelendiğinde dorsal root ganglionlarda TrkA ligandı olan NGF nin PI3K yolağını kullanarak TRPV1 sensitizasyonunu arttırdığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada hem dorsal root ganglionlarda hem de kronik prostat iltihabında NGF nin TRPV1 ekspresyonunu upregüle ettiği gösterilmiştir (Zhuang ve ark., 2004; J. Zhang ve ark., 2019). Donatien ve ark. (2018) yaptığı bir çalışmada ise NGF'nin p38 MAPK yolağı ile TRPV1 sensitizasyonunu sağladığı rapor edilmiştir (Donatien ve ark., 2018). Duyusal nöronlarda yapılan bir çalışmada ise NGF'nin TrkA üzerinden fosfolipaz C(PLC) yi aktive ettiği, PLC'nin PIP2 yi hidrolize ederek TRPV1 sensitizasyonunu arttırdığı belirtilmiştir (Chuang ve ark., 2001). Nöronlarda yapılan çalışmalar göz önüne alındığında TrkA reseptörünün TRPV1 kanalını etkilediği açıktır fakat literatürde kanser hücreleri ile yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda bu iki reseptörün beraber kullanımında metastatik meme kanseri hücre proliferasyonundaki etkiyi gösterebilmek için 4TBM ve 4THM hücrelerine hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bilinen TrkA ligandı Amitriptilin ile TRPV1 modölatörlerini kombine olarak uygulanmıştır. Etkiyi değerlendirebilmek adına isobologram grafiği ve CI değerlerini karşılaştırıldı. Sonuçlara göre %5 FBS içeren ortamda Amitriptilin ile TRPV1 agonisti Olvanil ya da TRPV1 antagonisti AMG-9810 kombine kullanıldığında etki gözlemlenmezken %0,2 FBS içeren ortamda ise iki ilacın kombine kullanımının hücre proliferasyonundaki baskılayıcı etkiyi arttırdığı gözlemlendi. %0,2 FBS ortamında 4TBM ve 4THM metastatik meme kanseri hücre hatlarında 5 μ M Amitriptilin ile 5 μ M

Olvanil kombine uygulandığında bu ilacın birbirleriyle sinerjistik etkileştiğini hem isobologram grafiği ile hem de CI değeri ile ortaya kondu. AMG9810 ilacında ise %0,2 FBS içeren ortamda 1 μ M Amitriptilin ile 1 μ M AMG9810 kombine kullanımında bu konsantrasyonlarda iki ilacın additif etkileştiğini, 5 μ M Amitriptilin ile 1 μ M AMG9810 un kombine kullanımında iki ilacın birbirleriyle açık bir şekilde sinerjistik etkileştiği görüldü. Dolayısıyla metastatik meme kanseri hücrelerinde TrkA reseptörü ile TRPV1 kanalının mekanizması bilinmeyen bir şekilde etkileştiği ve beraber kullanılınca anti-proliferatif etkinin arttığı söylenebilir.

2019 yılında yapılan bir çalışma 100 ng NGF'nin glioma hücrelerini yaşlanmaya indükleyip hücre proliferasyonunu baskıladığını öne sürülmüştür (Meco ve ark., 2019). Bizim sonuçlarımızda da tek başına 100 ng NGF kullandığımızda metastatik meme kanseri hücrelerinden 4TBM ve 4THM hücrelerinde hücre proliferasyonunun baskılandığı görüldü. %0,2 FBS içeren ortamda gördüğümüz bu etki bize hücrelerin otokrin olarak ürettiği NGF'nin kendi hücre proliferasyonunu sağlaması için yeterli olmadığını düşündürmüştür.

Kullandığımız selektif TrkA inhibitörü GW441756'nın başka bir çalışmada TrkA ya bağlanarak pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Bapat ve ark., 2016). Farelerde TrkA ya bağlanıp reseptörü aktive eden mesane ağrısı sendromuna neden olan NGF'nin bu etkisinin GW441756 ile geri döndürülebildiği görülmüştür (Dias ve ark., 2019). Nöroblastoma hücrelerinde GW441756'nın TrkA aktivitesi inhibisyonunun, hücre dışı sinyalle aktive olan proteinlerin fosforilasyonunu baskılandığı gösterilmiştir (E. J. Jung ve ark., 2013). Fakat TrkA ya spesifik olan bu inhibitörün meme kanseri hücrelerindeki etkisi ile ilgili bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda da literatürde ilk defa TrkA inhibitörü GW441756'nın 4TBM ve 4THM metastatik meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği görüldü. Bu sonucumuzdan yola çıkarak metastatik meme kanseri hücrelerinin TrkA reseptörünü kendi lehine çevirerek proliferasyonunu arttırdığı düşünülebilir.

Amitriptilinin hücre proliferasyonundaki baskılayıcı etkisinin TrkA üzerinden olup olmadığını araştırmak için 4TBM ve 4THM hücrelerine TrkA üzerinden etki eden ajanlarla ön tedavi edilen gruba Amitriptilin uygulandı. Sonuçlarımıza göre TrkA agonisti NGF ile ön tedavi edilen grup ile Amitriptilinin tek başına uygulandığı grup arasında anlamlı bir fark görülmedi. Burdan yola çıkarak NGF ile Amitriptilinin TrkA reseptörüne bağlanıp reseptörü farklı yerlerden fosforile ettiği düşünülebilir. Ön tedavili olarak ise GW441756 kullanıldığında 4TBM ve 4THM hücrelerine ön tedavili olarak 1 ve 10 μ M TrkA inhibitörü GW uygulanan grup ile tek başına GW uygulanan grup aynı miktarda proliferasyonu baskıladığı görülmüştür. Bu da Amitriptilinin tam agonist olduğunu işaret etmektedir.

Çalışmamızdaki bütün verilere bakıldığında TrkA ile TRPV1 in birbirleriyle sinerjistik olarak etkileştiği açıktır. Sonucumuzda TrkA agonisti olduğu bilinen Amitriptilin ile TRPV1 modülatörleri olan Olvanil ve AMG9810 un belirli dozlarda additif ya da sinerjistik olarak etkileştiği görülmüştür. Bu sinerjistik etkinin açıklanabilmesi için TrkA reseptörünün TRPV1 kanalını etkileyen downstream moleküllerindeki değişikliklerin ortaya konması gerekmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- 1) Nonmetastatik hücre hattı 67NR, metastatik hücre hattı 4T1 ve alttiplerinde TRPV1 ekspresyonu görülmüştür.
- 2) Nonmetastatik hücre hattı 67NR, metastatik hücre hattı 4T1 ve alttiplerinde TrkA ekspresyonu gösterilmiştir.
- 3) %5 FBS içeren ortamda TrkA agonisti Amitriptilinin 4TBM ve 4THM metastatik meme kanseri hücre proliferasyonunu 25 μ M ve üstündeki konsantrasyonlarda anlamlı olarak baskıarken %0,2 FBS içeren ortamda ise 1 μ M ve üstündeki konsantrasyonlarda doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladığı görülmüştür.
- 4) 4TBM ve 4THM hücrelerin proliferasyonu baskıladığını gördüğümüz TrkA agonisti Amitriptilinin %0,2 FBS içeren ortamda hücre proliferasyonundaki inhibisyon yüzdeleri doz-etki grafikleri çıkarılmış ve EC50'si 4TBM için 6,3 μ M, 4THM için 5 μ M bulunmuştur.
- 5) TRPV1 agonisti Olvanil %5 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM metastatik meme kanseri hücre proliferasyonunu 10 μ M ve üstündeki konsantrasyonlarda inhibe ederken %0,2 FBS içeren ortamda ise 1,25 μ M ve üstündeki konsantrasyonlarda doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir.
- 6) TRPV1 agonisti Olvanilin %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonundaki inhibisyon yüzdeleri kullanılarak doz-etki grafiği çıkarılmış ve EC50'si 4TBM için 4,7 μ M iken 4THM için 5,2 μ M bulunmuştur.
- 7) %5 FBS içeren ortamda TRPV1 antagonisti AMG9810'un 4TBM ve 4THM metastatik meme kanseri hücre proliferasyonunu 1 μ M ve üstündeki konsantrasyonlarda anlamlı olarak baskıarken %0,2 FBS içeren ortamda ise 0,5 μ M ve üstündeki konsantrasyonlarda doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladığı görülmüştür.

8) %0,2 FBS içeren ortamda TRPV1 antagonisti AMG9810'un 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonundaki inhibisyon yüzdeleri kullanılarak doz-etki grafiği çıkarılmış ve EC50'si 4TBM için 1,3 μ M iken 4THM için 0,9 μ M bulunmuştur.

9) %5 FBS içeren ortamda 5 μ M Amitriptilin ile 5 μ M Olvanil kombine kullanımında 4TBM hücre proliferasyonunu anlamlı olarak baskılandığı fakat 4THM hücre proliferasyonunu ise değiştirmedeği gözlemlenmiştir.

10) %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM hücre hattında 1 μ M Amitriptilin+ 5 μ M Olvanil kullanımı, kontrole göre anlamlı bir baskılanma görülmüştür fakat tek 5 μ M Olvanil ile aynı etkiyi oluşturmuştur. 4THM hücre hattında ise kontrole göre anlamlı bir baskılanma gözlemlenmiştir. 4THM hücrelerinde iki ilacın kombine kullanıldığı konsantrasyonlarda CI değeri 1 bulunmuştur.

11) %0,2 FBS içeren ortamda 5 μ M Amitriptilin+ 5 μ M Olvanil kontrol grubuna göre hem 4TBM hem 4THM hücre hattında hücre proliferasyonunu anlamlı ölçüde baskılamıştır. 4TBM hücrelerinde bu konsantrasyonlarda iki ilacın kombine kullanımında CI değeri 0,6 iken 4THM hücrelerinde 1 bulunmuştur.

12) %0,2 FBS içeren ortamda 1 μ M TRPV1 antagonisti AMG-9810 ile 1 μ M TrkA agonisti Amitriptilin'in kombine kullanımının 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonunda kontrole göre anlamlı bir baskılanma söz konusudur. 4TBM hücrelerinde kombine kullanımında CI değeri 1,1 iken 4THM hücrelerinde ise 0,6 bulunmuştur.

13) %0,2 FBS içeren ortamda 5 μ M Amitriptilin + 1 μ M AMG-9810'un 4TBM ve 4THM hücrelerinde kombine kullanımında hücre proliferasyonunun kontrol grubuna göre baskılandığı görüldü. 4TBM hücrelerinde CI değeri 1 iken 4THM hücrelerinde 0,6 bulunmuştur.

14) %5 FBS içeren ortamda tek başına kullanılan TrkA ligandı NGF, 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonunda etki göstermezken TrkA inhibitörü GW441756'nın tek başına kullanımı kontrole göre 4TBM ve 4THM hücre proliferasyonunu doza bağlı olarak inhibe etmiştir. GW441756 ilacının %5 FBS ortamında 4TBM ve 4THM hücrelerindeki

inhibisyon yüzdeleri ile doz-etki grafiği ıkarımıştır ve IC50 değeri 4TBM hücresinde 3 iken 4THM hücresinde 1,8 bulunmuştur.

15) %0,2 FBS içeren ortamda tek başına kullanılan TrkA ligandı NGF 100 ng/ml konsantrasyonunda 4TBM ve 4THM hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı görülmüştür. TrkA inhibitörü GW441756 ise hücre proliferasyonunu doza bağlı olarak baskılanmıştır. GW441756 ilacının bu ortamda 4TBM ve 4THM hücresindeki inhibisyon yüzdeleri ile doz-etki grafiği çıkarılmış ve IC50 değeri 4TBM hücresinde 6,7 iken 4THM hücresinde 5 bulunmuştur.

16) %0,2 FBS içeren ortamda 4TBM ve 4THM hücrelerine 1 ve 10 μ M TrkA inhibitörü GW441756 n tedavili kullanılan Amitriptilin grubunda sadece GW441756'nın etkisi görülmüş bu yüzden Amitriptilinin tam agonist olduğu düşünülmüştür.

Meme kanseri dahil birçok kanser hücresinde overeksprese edilen TrkA ve TRPV1 ajanlarının metastatik meme kanseri hücrelerinde beraber kullanımını ilk defa bu çalışmamızda gösterilmiştir. Literatürde TrkA'nın TRPV1 kanalını desteklediği açıktır. Bizim sonuçlarımızda da metastatik meme kanseri hücre proliferasyonunda bu iki reseptörün etkileştiğini göstermektedir. TrkA'nın TRPV1 kanalını nasıl etkilediğinin tam olarak belirlenmesi için daha kapsamlı moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmakta özellikle bu iki kanalın yolaklarının nasıl etkileştiği ortaya konulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abbas, A. K., H., L. A., & S., P. Antijenin toplanması ve lenfositlere sunumu (4 ed.). İstanbul,Türkiye: Elsevier; 2015, p:
- Adriaenssens, E., Vanhecke, E., Saule, P., Mougél, A., Page, A., Romon, R., . . . Hondermarck, H. Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* 2008; 68 (2): 346-351.
- Amantini, C., Ballarini, P., Caprodossi, S., Nabissi, M., Morelli, M. B., Lucciarini, R., . . . Santoni, G. Triggering of transient receptor potential vanilloid type 1 (trpv1) by capsaicin induces fas/cd95-mediated apoptosis of urothelial cancer cells in an atm-dependent manner. *Carcinogenesis.* 2009; 30 (8): 1320-1329.
- Amantini, C., Mosca, M., Nabissi, M., Lucciarini, R., Caprodossi, S., Arcella, A., . . . Santoni, G. Capsaicin-induced apoptosis of glioma cells is mediated by trpv1 vanilloid receptor and requires p38 mapk activation. *J Neurochem.* 2007; 102 (3): 977-990.
- Amatu, A., Sartore-Bianchi, A., Bencardino, K., Pizzutilo, E. G., Tosi, F., & Siena, S. Tropomyosin receptor kinase (trk) biology and the role of ntrk gene fusions in cancer. *Ann Oncol.* 2019; 30 (Suppl_8): viii5-viii15.
- Angeletti, P. U., Liuzzi, A., Levi-Montalcini, R., & Gandiniattardi, D. Effect of a nerve growth factor on glucose metabolism by sympathetic and sensory nerve cells. *Biochim Biophys Acta.* 1964; 90: 445-450.
- Aragona, M., Panetta, S., Silipigni, A. M., Romeo, D. L., Pastura, G., Mesiti, M., . . . La Torre, F. Nerve growth factor receptor immunoreactivity in breast cancer patients. *Cancer Invest.* 2001; 19 (7): 692-697.
- Bacac, M., & Stamenkovic, I. Metastatic cancer cell. *Annu Rev Pathol.* 2008; 3: 221-247.
- Bapat, A. A., Munoz, R. M., Von Hoff, D. D., & Han, H. Blocking nerve growth factor signaling reduces the neural invasion potential of pancreatic cancer cells. *PLoS One.* 2016; 11 (10): e0165586.
- Barbacid, M., Lamballe, F., Pulido, D., & Klein, R. The trk family of tyrosine protein kinase receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1072 (2-3): 115-127.
- Bartkowska, K., Turlejski, K., & Djavadian, R. L. Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2010; 70 (4): 454-467.

Beattie, E. C., Howe, C. L., Wilde, A., Brodsky, F. M., & Mobley, W. C. Ngf signals through trka to increase clathrin at the plasma membrane and enhance clathrin-mediated membrane trafficking. *J Neurosci.* 2000; 20 (19): 7325-7333.

Bertin, S., Aoki-Nonaka, Y., de Jong, P. R., Nohara, L. L., Xu, H., Stanwood, S. R., . . . Raz, E. The ion channel trpv1 regulates the activation and proinflammatory properties of cd4(+) t cells. *Nat Immunol.* 2014; 15 (11): 1055-1063.

Bhave, G., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D. J., Oxford, G. S., & Gereau, R. W. t. Camp-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (vr1) by direct phosphorylation. *Neuron.* 2002; 35 (4): 721-731.

Bibel, M., & Barde, Y. A. Neurotrophins: Key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 2000; 14 (23): 2919-2937.

Birder, L. A., Nakamura, Y., Kiss, S., Nealen, M. L., Barrick, S., Kanai, A. J., . . . Caterina, M. J. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor trpv1. *Nat Neurosci.* 2002; 5 (9): 856-860.

Brodeur, G. M., Minturn, J. E., Ho, R., Simpson, A. M., Iyer, R., Varela, C. R., . . . Evans, A. E. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res.* 2009; 15 (10): 3244-3250.

Bujak, J. K., Kosmala, D., Szopa, I. M., Majchrzak, K., & Bednarczyk, P. Inflammation, cancer and immunity-implication of trpv1 channel. *Front Oncol.* 2019; 9: 1087.

Carey, L. A., Dees, E. C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D. T., Collichio, F., . . . Perou, C. M. The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007; 13 (8): 2329-2334.

Carnevale, V., & Rohacs, T. Trpv1: A target for rational drug design. *Pharmaceuticals (Basel).* 2016; 9 (3).

Caterina, M. J., & Julius, D. The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24: 487-517.

Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* 2011; 331 (6024): 1559-1564.

Chakrabarti, S., Pattison, L. A., Singhal, K., Hockley, J. R. F., Callejo, G., & Smith, E. S. J. Acute inflammation sensitizes knee-innervating sensory neurons and decreases mouse digging behavior in a trpv1-dependent manner. *Neuropharmacology.* 2018; 143: 49-62.

Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2 (8): 563-572.

- Chuang, H. H., Prescott, E. D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S. E., Basbaum, A. I., . . . Julius, D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from ptdins(4,5)p2-mediated inhibition. *Nature*. 2001; 411 (6840): 957-962.
- Chueh, P. J., Wu, L. Y., Morre, D. M., & Morre, D. J. Tnox is both necessary and sufficient as a cellular target for the anticancer actions of capsaicin and the green tea catechin (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Biofactors*. 2004; 20 (4): 235-249.
- Com, E., Lagadec, C., Page, A., El Yazidi-Belkoura, I., Slomianny, C., Spencer, A., . . . Hondermarck, H. Nerve growth factor receptor trka signaling in breast cancer cells involves ku70 to prevent apoptosis. *Mol Cell Proteomics*. 2007; 6 (11): 1842-1854.
- Czifra, G., Varga, A., Nyeste, K., Marincsak, R., Toth, B. I., Kovacs, I., . . . Biro, T. Increased expressions of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1 in human prostate carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009; 135 (4): 507-514.
- Dai, Y. Trps and pain. *Semin Immunopathol*. 2016; 38 (3): 277-291.
- Dai, Y., Wang, S., Li, C., Chang, S., Lu, H., Huang, Z., . . . Ge, J. Small molecule antidepressant amitriptyline protects hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis through trka signaling pathway. *Eur J Pharmacol*. 2017; 798: 9-15.
- Davidson, B., Reich, R., Lazarovici, P., Ann Florenes, V., Nielsen, S., & Nesland, J. M. Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors trka and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2004; 83 (2): 119-128.
- Demir, I. E., Tieftrunk, E., Schorn, S., Friess, H., & Ceyhan, G. O. Nerve growth factor & trka as novel therapeutic targets in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1866 (1): 37-50.
- Denk, F., Bennett, D. L., & McMahon, S. B. Nerve growth factor and pain mechanisms. *Annu Rev Neurosci*. 2017; 40: 307-325.
- Di Cosimo, S., & Baselga, J. Management of breast cancer with targeted agents: Importance of heterogeneity. [corrected]. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010; 7 (3): 139-147.
- Dias, B., Serrao, P., Cruz, F., & Charrua, A. Effect of water avoidance stress on serum and urinary ngf levels in rats: Diagnostic and therapeutic implications for bps/ic patients. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 14113.
- Diaz-Laviada, I., & Rodriguez-Henche, N. The potential antitumor effects of capsaicin. *Prog Drug Res*. 2014; 68: 181-208.

Dolle, L., El Yazidi-Belkoura, I., Adriaenssens, E., Nurcombe, V., & Hondermarck, H. Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene*. 2003; 22 (36): 5592-5601.

Donatien, P., Anand, U., Yiangou, Y., Sinisi, M., Fox, M., MacQuillan, A., . . . Anand, P. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expression in clinical pain disorder tissues and role in neuronal sensitization. *Pain Rep*. 2018; 3 (5): e676.

Faulkner, S., Jobling, P., Rowe, C. W., Rodrigues Oliveira, S. M., Roselli, S., Thorne, R. F., . . . Hondermarck, H. Neurotrophin receptors trka, p75(ntr), and sortilin are increased and targetable in thyroid cancer. *Am J Pathol*. 2018; 188 (1): 229-241.

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., . . . Ren, G. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis*. 2018; 5 (2): 77-106.

Gao, F., Griffin, N., Faulkner, S., Rowe, C. W., Williams, L., Roselli, S., . . . Hondermarck, H. The neurotrophic tyrosine kinase receptor trka and its ligand ngf are increased in squamous cell carcinomas of the lung. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 8135.

Gao, S., Kaudimba, K. K., Guo, S., Zhang, S., Liu, T., Chen, P., & Wang, R. Transient receptor potential ankyrin type-1 channels as a potential target for the treatment of cardiovascular diseases. *Front Physiol*. 2020; 11: 836.

Garcia-Suarez, O., Germana, A., Hannestad, J., Ciriaco, E., Laura, R., Naves, J., . . . Vega, J. A. Trka is necessary for the normal development of the murine thymus. *J Neuroimmunol*. 2000; 108 (1-2): 11-21.

George, D. J., Suzuki, H., Bova, G. S., & Isaacs, J. T. Mutational analysis of the trka gene in prostate cancer. *Prostate*. 1998; 36 (3): 172-180.

Hahn, W. C., & Weinberg, R. A. *Cancer: A genetic disorder* (4th Edition ed.). ABD: Elsevier Saunders; 2015, p: 1.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011; 144 (5): 646-674.

Harbeck, N., & Gnant, M. Breast cancer. *Lancet*. 2017; 389 (10074): 1134-1150.

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., . . . Cardoso, F. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2019; 5 (1): 66.

Hartel, M., di Mola, F. F., Selvaggi, F., Mascetta, G., Wente, M. N., Felix, K., . . . Friess, H. Vanilloids in pancreatic cancer: Potential for chemotherapy and pain management. *Gut*. 2006; 55 (4): 519-528.

Herbrich, S. M., Kannan, S., Nolo, R. M., Hornbaker, M., Chandra, J., & Zweidler-McKay, P. A. Characterization of trka signaling in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2018; 9 (53): 30092-30105.

Higgins, M. J., & Baselga, J. Targeted therapies for breast cancer. *J Clin Invest*. 2011; 121 (10): 3797-3803.

Hirose, M., Kuroda, Y., & Murata, E. Ngf/trka signaling as a therapeutic target for pain. *Pain Pract*. 2016; 16 (2): 175-182.

Hondermarck, H. Neurotrophins and their receptors in breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2012; 23 (6): 357-365.

Hu, H. J., Bhawe, G., & Gereau, R. W. t. Prostaglandin and protein kinase a-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: Potential mechanism for thermal hyperalgesia. *J Neurosci*. 2002; 22 (17): 7444-7452.

Huang, E. J., & Reichardt, L. F. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001; 24: 677-736.

J., C. M. (2015). An introduction to transient receptor potential ion channels and their roles in disease. In S. A. (Ed.), *Trp channels as therapeutic targets*. ABD: Elsevier.

Jacobs, B. L., Smaldone, M. C., Tyagi, V., Philips, B. J., Jackman, S. V., Leng, W. W., & Tyagi, P. Increased nerve growth factor in neurogenic overactive bladder and interstitial cystitis patients. *Can J Urol*. 2010; 17 (1): 4989-4994.

Jang, S. W., Liu, X., Chan, C. B., Weinshenker, D., Hall, R. A., Xiao, G., & Ye, K. Amitriptyline is a trka and trkb receptor agonist that promotes trka/trkb heterodimerization and has potent neurotrophic activity. *Chem Biol*. 2009; 16 (6): 644-656.

Jin, X., Morsy, N., Winston, J., Pasricha, P. J., Garrett, K., & Akbarali, H. I. Modulation of trpv1 by nonreceptor tyrosine kinase, c-src kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287 (2): C558-563.

Jung, E. J., Lee, S. Y., & Kim, C. W. Proteomic analysis of novel targets associated with trka-mediated tyrosine phosphorylation signaling pathways in sk-n-mc neuroblastoma cells. *Proteomics*. 2013; 13 (2): 355-367.

Jung, J., Shin, J. S., Lee, S. Y., Hwang, S. W., Koo, J., Cho, H., & Oh, U. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by ca²⁺/calmodulin-dependent kinase ii regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem*. 2004; 279 (8): 7048-7054.

Kalogris, C., Caprodossi, S., Amantini, C., Lambertucci, F., Nabissi, M., Morelli, M. B., . . . Santoni, G. Expression of transient receptor potential vanilloid-1 (trpv1) in urothelial

cancers of human bladder: Relation to clinicopathological and molecular parameters. *Histopathology*. 2010; 57 (5): 744-752.

Kuchler, J., Hartmann, W., Waha, A., Koch, A., Endl, E., Wurst, P., . . . Pietsch, T. P75(ntr) induces apoptosis in medulloblastoma cells. *Int J Cancer*. 2011; 128 (8): 1804-1812.

Lagadec, C., Meignan, S., Adriaenssens, E., Foveau, B., Vanhecke, E., Romon, R., . . . Le Bourhis, X. Trka overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene*. 2009; 28 (18): 1960-1970.

Lagadec, C., Romon, R., Tastet, C., Meignan, S., Com, E., Page, A., . . . Le Bourhis, X. Ku86 is important for trka overexpression-induced breast cancer cell invasion. *Proteomics Clin Appl*. 2010; 4 (6-7): 580-590.

Laudiero, L. B., Aloe, L., Levi-Montalcini, R., Buttinelli, C., Schilter, D., Gillessen, S., & Otten, U. Multiple sclerosis patients express increased levels of beta-nerve growth factor in cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett*. 1992; 147 (1): 9-12.

Lin, S. X., Chen, J., Mazumdar, M., Poirier, D., Wang, C., Azzi, A., & Zhou, M. Molecular therapy of breast cancer: Progress and future directions. *Nat Rev Endocrinol*. 2010; 6 (9): 485-493.

Ljubica, I., & H., S. U. (2013). *Neurotrophins*. In (second ed.): Elsevier.

Louie, E., Chen, X. F., Coomes, A., Ji, K., Tsirka, S., & Chen, E. I. Neurotrophin-3 modulates breast cancer cells and the microenvironment to promote the growth of breast cancer brain metastasis. *Oncogene*. 2013; 32 (35): 4064-4077.

Manni, L., & Aloe, L. Role of il-1 beta and tnfr-alpha in the regulation of ngf in experimentally induced arthritis in mice. *Rheumatol Int*. 1998; 18 (3): 97-102.

Meco, D., Di Francesco, A. M., Melotti, L., Ruggiero, A., & Riccardi, R. Ectopic nerve growth factor prevents proliferation in glioma cells by senescence induction. *J Cell Physiol*. 2019; 234 (5): 6820-6830.

Medicine, U. N. L. o. (2017). *Cancer*.

Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454 (7203): 428-435.

Minnone, G., De Benedetti, F., & Bracci-Laudiero, L. Ngf and its receptors in the regulation of inflammatory response. *Int J Mol Sci*. 2017; 18 (5).

Molloy, N. H., Read, D. E., & Gorman, A. M. Nerve growth factor in cancer cell death and survival. *Cancers (Basel)*. 2011; 3 (1): 510-530.

Morales-Lazaro, S. L., & Rosenbaum, T. A painful link between the trpv1 channel and lysophosphatidic acid. *Life Sci.* 2015; 125: 15-24.

Mori, A., Lehmann, S., O'Kelly, J., Kumagai, T., Desmond, J. C., Pervan, M., . . . Koeffler, H. P. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2006; 66 (6): 3222-3229.

Muller, C., Morales, P., & Reggio, P. H. Cannabinoid ligands targeting trp channels. *Front Mol Neurosci.* 2018; 11: 487.

Naderi, A., Teschendorff, A. E., Beigel, J., Cariati, M., Ellis, I. O., Brenton, J. D., & Caldas, C. Bex2 is overexpressed in a subset of primary breast cancers and mediates nerve growth factor/nuclear factor-kappaB inhibition of apoptosis in breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 2007; 67 (14): 6725-6736.

Nakagawara, A. Trk receptor tyrosine kinases: A bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett.* 2001; 169 (2): 107-114.

Naziroglu, M., & Ovey, I. S. Involvement of apoptosis and calcium accumulation through trpv1 channels in neurobiology of epilepsy. *Neuroscience.* 2015; 293: 55-66.

Noga, O., Englmann, C., Hanf, G., Grutzkau, A., Guhl, S., & Kunkel, G. Activation of the specific neurotrophin receptors trka, trkb and trkc influences the function of eosinophils. *Clin Exp Allergy.* 2002; 32 (9): 1348-1354.

Oh, S. H., Kim, Y. S., Lim, S. C., Hou, Y. F., Chang, I. Y., & You, H. J. Dihydrocapsaicin (dhc), a saturated structural analog of capsaicin, induces autophagy in human cancer cells in a catalase-regulated manner. *Autophagy.* 2008; 4 (8): 1009-1019.

Paez Borda, A., Angulo Frutos, J., Lujan Galan, M., Llanes Gonzalez, L., & Berenguer Sanchez, A. [initial aspects of a program for in vitro transfection of cytokine genes into lncap tumor cells]. *Actas Urol Esp.* 1998; 22 (6): 472-477.

Penault-Llorca, F., & Radosevic-Robin, N. Ki67 assessment in breast cancer: An update. *Pathology.* 2017; 49 (2): 166-171.

Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., . . . Botstein, D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; 406 (6797): 747-752.

Poloz, Y., J.O.Dowling, R., & Stambolic, V. (2017). Fundamental pathways in breast cancer signaling from the membrane. In P. Veronesi, O. D. Gentilini, & M. C. Leonardi (Eds.), *Breast cancer innovations in research and management*. Springer: Springer.

Premkumar, L. S., & Ahern, G. P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase c. *Nature.* 2000; 408 (6815): 985-990.

Raychaudhuri, S. P., & Raychaudhuri, S. K. Role of ngf and neurogenic inflammation in the pathogenesis of psoriasis. *Prog Brain Res.* 2004; 146: 433-437.

Redig, A. J., & McAllister, S. S. Breast cancer as a systemic disease: A view of metastasis. *J Intern Med.* 2013; 274 (2): 113-126.

Rehman, R., Bhat, Y. A., Panda, L., & Mabalirajan, U. Trpv1 inhibition attenuates il-13 mediated asthma features in mice by reducing airway epithelial injury. *Int Immunopharmacol.* 2013; 15 (3): 597-605.

Reis-Filho, J. S., Steele, D., Di Palma, S., Jones, R. L., Savage, K., James, M., . . . Ashworth, A. Distribution and significance of nerve growth factor receptor (ngfr/p75ntr) in normal, benign and malignant breast tissue. *Mod Pathol.* 2006; 19 (2): 307-319.

Romon, R., Adriaenssens, E., Lagadec, C., Germain, E., Hondermarck, H., & Le Bourhis, X. Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways. *Mol Cancer.* 2010; 9: 157.

Roux, P. P., & Barker, P. A. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol.* 2002; 67 (3): 203-233.

Ruddon, R. W. (2007). Characteristics of human cancer. In. ABD: Oxford University Press.

Sanchez, M. G., Sanchez, A. M., Collado, B., Malagarie-Cazenave, S., Olea, N., Carmena, M. J., . . . Diaz-Laviada, I. I. Expression of the transient receptor potential vanilloid 1 (trpv1) in lncap and pc-3 prostate cancer cells and in human prostate tissue. *Eur J Pharmacol.* 2005; 515 (1-3): 20-27.

Schechterson, L. C., & Bothwell, M. Neurotrophin receptors: Old friends with new partners. *Dev Neurobiol.* 2010; 70 (5): 332-338.

Shang, X., Wang, Z., & Tao, H. Mechanism and therapeutic effectiveness of nerve growth factor in osteoarthritis pain. *Ther Clin Risk Manag.* 2017; 13: 951-956.

Steeg, P. S. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3 (1): 55-63.

Suhail, Y., Cain, M. P., Vanaja, K., Kurywchak, P. A., Levchenko, A., Kalluri, R., & Kshitiz. Systems biology of cancer metastasis. *Cell Syst.* 2019; 9 (2): 109-127.

Szegezdi, E., Herbert, K. R., Kavanagh, E. T., Samali, A., & Gorman, A. M. Nerve growth factor blocks thapsigargin-induced apoptosis at the level of the mitochondrion via regulation of bim. *J Cell Mol Med.* 2008; 12 (6A): 2482-2496.

Tessarollo, L. Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998; 9 (2): 125-137.

- Thoennissen, N. H., O'Kelly, J., Lu, D., Iwanski, G. B., La, D. T., Abbassi, S., . . . Koeffler, H. P. Capsaicin causes cell-cycle arrest and apoptosis in er-positive and -negative breast cancer cells by modulating the egfr/her-2 pathway. *Oncogene*. 2010; 29 (2): 285-296.
- Tominaga, M., & Tominaga, T. Structure and function of trpv1. *Pflugers Arch*. 2005; 451 (1): 143-150.
- Turashvili, G., & Brogi, E. Tumor heterogeneity in breast cancer. *Front Med (Lausanne)*. 2017; 4: 227.
- Vercelli, C., Barbero, R., Cuniberti, B., Odore, R., & Re, G. Expression and functionality of trpv1 receptor in human mcf-7 and canine cf.41 cells. *Vet Comp Oncol*. 2015; 13 (2): 133-142.
- Vercelli, C., Barbero, R., Cuniberti, B., Racca, S., Abbadessa, G., Piccione, F., & Re, G. Transient receptor potential vanilloid 1 expression and functionality in mcf-7 cells: A preliminary investigation. *J Breast Cancer*. 2014; 17 (4): 332-338.
- Vinuesa, A. G., Sancho, R., Garcia-Limones, C., Behrens, A., ten Dijke, P., Calzado, M. A., & Munoz, E. Vanilloid receptor-1 regulates neurogenic inflammation in colon and protects mice from colon cancer. *Cancer Res*. 2012; 72 (7): 1705-1716.
- Wang, W., Chen, J., & Guo, X. The role of nerve growth factor and its receptors in tumorigenesis and cancer pain. *Biosci Trends*. 2014; 8 (2): 68-74.
- Weber, L. V., Al-Refae, K., Wolk, G., Bonatz, G., Altmuller, J., Becker, C., . . . Hatt, H. Expression and functionality of trpv1 in breast cancer cells. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2016; 8: 243-252.
- Winston, J., Toma, H., Shenoy, M., & Pasricha, P. J. Nerve growth factor regulates vr-1 mrna levels in cultures of adult dorsal root ganglion neurons. *Pain*. 2001; 89 (2-3): 181-186.
- Xu, S., Cheng, X., Wu, L., Zheng, J., Wang, X., Wu, J., . . . Zhang, L. Capsaicin induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in anaplastic thyroid carcinoma cells via trpv1-mediated mitochondrial calcium overload. *Cell Signal*. 2020; 75: 109733.
- Xu, S., Zhang, L., Cheng, X., Yu, H., Bao, J., & Lu, R. Capsaicin inhibits the metastasis of human papillary thyroid carcinoma bcpap cells through the modulation of the trpv1 channel. *Food Funct*. 2018; 9 (1): 344-354.
- Yu, X., Yu, M., Liu, Y., & Yu, S. Trp channel functions in the gastrointestinal tract. *Semin Immunopathol*. 2016; 38 (3): 385-396.

Zhai, K., Liskova, A., Kubatka, P., & Busselberg, D. Calcium entry through trpv1: A potential target for the regulation of proliferation and apoptosis in cancerous and healthy cells. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (11).

Zhang, J., Yi, Q. T., Gong, M., Zhang, Y. Q., Liu, D., & Zhu, R. J. Upregulation of trpv1 in spinal dorsal root ganglion by activating ngf-trka pathway contributes to pelvic organ cross-sensitisation in rats with experimental autoimmune prostatitis. *Andrologia.* 2019; 51 (8): e13302.

Zhang, L., Peng, X., Ai, Y., Li, L., Zhao, S., Liu, Z., . . . Huang, L. Amitriptyline reduces sepsis-induced brain damage through trka signaling pathway. *J Mol Neurosci.* 2020; 70 (12): 2049-2057.

Zhu, Z., Kleeff, J., Kaye, H., Wang, L., Korc, M., Buchler, M. W., & Friess, H. Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog.* 2002; 35 (3): 138-147.

Zhu, Z. W., Friess, H., Wang, L., Bogardus, T., Korc, M., Kleeff, J., & Buchler, M. W. Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2001; 7 (1): 105-112.

Zhuang, Z. Y., Xu, H., Clapham, D. E., & Ji, R. R. Phosphatidylinositol 3-kinase activates erk in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through trpv1 sensitization. *J Neurosci.* 2004; 24 (38): 8300-8309.

Ziglioli, F., Frattini, A., Maestroni, U., Dinale, F., Ciuffreda, M., & Cortellini, P. Vanilloid-mediated apoptosis in prostate cancer cells through a trpv-1 dependent and a trpv-1-independent mechanism. *Acta Biomed.* 2009; 80 (1): 13-20.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Seren	Uyruğu	Türk
Soyadı	Haksever	Tel no	05383000302
Doğum tarihi	01.01.1994	e-posta	serennhaksever@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Metin Nuran Çakallıklı Anadolu Lisesi	2011
Lisans	Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2017
Yüksek Lisans		
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
-	-	-

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	61

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Metastatik meme kanseri hücrelerinde ekstraselüler matriks proteini Fibulin-4'ün rolünün araştırılması: TGF- β 1, LTBP-1 ve BMP-1 ile ilişkisi, Bursiyer	Tübitak-1001	2018-2021
Metastatik meme kanserinde TrkA agonisti Amitriptilin ile TRPV1 modülatörlerinin tek başına ve kombine etkileri, Araştırmacı	Akdeniz Üniversitesi BAP	2018-2021

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler:

Ulusal ve Uluslararası Kongrelerde sunulan ve kongre kitapçığında yayınlanan bildiriler:

- 1) **Haksever Seren**, Erin N. ‘TRPV1 modulators synergistically enhances anti-proliferative effects of Amitriptyline on metastatic breast carcinoma cells’ Poster presentation, Sixth International Conference Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring, 29 April – 2 May 2019, Tbilisi, Georgia.
- 2) **Haksever Seren**, Erin N. ‘TRPV1 Agonist Olvanil decrease the proliferation of breast carcinom cell.’ Poster presentation, 1st Basic Oncology Symposium (1. Temel Onkoloji Sempozyumu), 9-11 May 2018, İzmir, Turkey.
- 3) **Haksever Seren**, Erin N. ‘Inhibition of bone morphogenetic protein 1 activity decreases proliferation of metastatic breast carcinoma cells; an effect independent of transforming growth factor- β .’ Poster presentation, COST ACTION- STRATAGEM WG3 Meeting, Belgrade, Serbia.
- 4) Akman M, Nizam E, **Haksever S**, Erin N. “Activation of TRPV1 with Olvanil restores functions of immune cells in tumor-bearing mice” Oral presentation, Sixth International Conference Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring, 29 Nisan – 2 Mayıs 2019, Tiflis, Gürcistan.