



T.C.

ALANYA ALAADDİN KEYKUBAT ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**SİSPLATİN UYGULANAN PANKREAS VE MİDE KANSERİ
HÜCRELERİNDE MELATONİNİN TRPV1 KANALLARI ARACILI ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşegül YUR

**DANIŞMAN
Doç. Dr. İshak Suat ÖVEY**

**ALANYA
2022**

T.C.
ALANYA ALAADDİN KEYKUBAT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

SİSPLATİN UYGULANAN PANKREAS VE MİDE KANSERİ
HÜCRELERİNDE MELATONİNİN TRPV1 KANALLARI ARACILI ROLÜ

Yüksek Lisans Tezi

AYŞEGÜL YUR
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP

DANIŞMAN
DOÇ. DR. İshak Suat ÖVEY

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 2021-04-01LTP02 kodlu proje kapsamında desteklenmiştir.

ALANYA
2022

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

.....

Ayşegül YUR

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimimim boyunca tecrübelerinden, bilimsel kişiliğinden, mesleki ahlakı ve disiplininden faydalanmamı sağlayan ayrıca çalışmalarım sırasında göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı danışman hocam Doç. Dr. İshak Suat ÖVEY'e teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, derslerinden feyz aldığım değerli hocam Prof. Dr. Ramazan GÜNEŞAÇAR ve Doç. Dr. Hasan Basri SAVAŞ hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarımda bilgi ve deneyimleri ile büyük katkılar sunan Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Aydın CANDAN hocama teşekkür ederim.

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim Yönetimine ve üzerimde emeği olan tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde bana maddi manevi katkı sunan kıymetli annem ve babama teşekkür ederim.

Çalışmalarımda bana ilham veren ve sevgileri ile her daim yanımda olan kızım Elif İZCAR ve oğlum Eren İZCAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayşegül YUR

Alanya, 2022

ÖZET

SİSPLATİN UYGULANAN PANKREAS VE MİDE KANSERİ HÜCRELERİNDE MELATONİNİN TRPV1 KANALLARI ARACILI ROLÜ

Ayşegül YUR

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü,

Nisan,2022 (67 Sayfa)

Mide ve pankreas kanserleri toplumda sıkça görülen ve mortalite oranları yüksek kanser çeşitleridir. Sisplatin, DNA hasarına neden olan ve birçok kanser türünün tedavisinde tercih edilen neoplastik bir ajandır. Mevcut tez çalışması ile sisplatin ve melatoninin birlikte kullanımının mide ve pankreas kanseri hücreleri üzerindeki TRPV1 kanalları aracılı olası etkileri araştırıldı. Bunun için mide ve pankreas hücreleri; kontrol, sisplatin, sisplatin+kapsazepin, sisplatin+melatonin, sisplatin+melatonin+kapsazepin, melatonin ve melatonin+kapsazepin olmak üzere 7 gruba ayrıldı. TRPV1 kanal aktivasyonu için de kapsaisin kullanıldı. Hücrelerde hücre içi kalsiyum iyonu düzeyi, reaktif oksijen radikalleri, mitokondriyal depolarizasyon, kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktivasyonu ve apoptozis düzeyleri ölçüldü.

Mide ve pankreas kanseri hücrelerinde kalsiyum sinyali analizi sonuçları incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla sisplatin, sisplatin+melatonin ve melatonin grupları daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Sisplatin grubu ile sisplatin+melatonin grupları kıyaslandığında sisplatin+melatonin grubundaki sitozolik serbest kalsiyum düzeyi daha yüksektir ($p<0.001$). Yine mide ve pankreas kanser hücrelerinde apoptozis, reaktif oksijen türleri, mitokondriyal depolarizasyon düzeyleri ile kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktivasyonları incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla sisplatin, sisplatin+melatonin ve melatonin gruplarının daha yüksek olduğu ($p<0.001$), sisplatin grubu ile sisplatin+melatonin grubu kıyaslandığında ise genel olarak sisplatin+melatonin grubunun daha yüksek ($p<0.05$ ve $p<0.001$) olduğu görüldü. İlgili analizlerde, TRPV1 kanal blokırı kapsazepin kullanılan sisplatin ve melatoninin ayrı veya birlikte kullanıldığı gruplarda, kapsazepin kullanılmayan benzer gruplara kıyasla değerlerin daha düşük ($p<0.05$ ve $p<0.001$) olduğu görüldü.

Sonuç olarak; sisplatin grubuna kıyasla sisplatin+melatoninin birlikte kullanımının kanser hücrelerinde daha fazla apoptotik etki oluşturduğu ve oluşan bu etkinliğe TRPV1 kanallarının da aracılık ettiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pankreas Kanseri, Mide Kanseri, Apoptozis, Oksidatif Stres, TRPV1



ABSTRACT

THE ROLE OF MELATONIN MEDIATED BY TRPV1 CHANNELS IN CISPLATIN APPLIED PANCREAS AND STOMACH CANCER CELLS

Ayşegül YUR

Department of Molecular Medicine

Graduate School of Alanya Alaaddin Keykubat University,

April, 2022 (67 Pages)

Gastric and pancreatic cancers are frequently seen in the World and they have high mortality rates. Cisplatin is a neoplastic agent that damages the DNA and it is the preferred treatment of many types of cancer. In the current thesis, the possible effects of the combined use of cisplatin and melatonin on gastric and pancreatic cancer cells via TRPV1 channels were investigated. For this reason, gastric and pancreatic cells were divided into 7 groups as control, cisplatin, cisplatin+capsazepine, cisplatin+melatonin, cisplatin+melatonin+capsazepine, melatonin and melatonin+capsazepine. Capsaicin was also used for TRPV1 channel activation. Intracellular calcium ion level, reactive oxygen radicals, mitochondrial depolarization, caspase 3 and caspase 9 enzyme activation and apoptosis levels were measured in the cells.

When the results of calcium signal analysis in gastric and pancreatic cancer cells were examined, cisplatin, cisplatin+melatonin and melatonin groups were found to be higher compared to the control group ($p < 0.001$). When the cisplatin group and cisplatin+melatonin groups are compared, the cytosolic free calcium level in the cisplatin+melatonin group was higher ($p < 0.001$). However, when apoptosis, reactive oxygen species, mitochondrial depolarization levels, and caspase 3 and caspase 9 enzyme activations in gastric and pancreatic cancer cells were examined, cisplatin, cisplatin+melatonin and melatonin groups were higher than the control group ($p < 0.001$), cisplatin group and cisplatin+ When the melatonin group was compared, it was observed that the cisplatin+melatonin group was higher ($p < 0.05$ and $p < 0.001$) In sum, in the related analyzes, it was observed that the values in the groups that used the TRPV1 channel blocker is capsazepine, cisplatin and melatonin separately or together, were lower ($p < 0.05$ and $p < 0.001$) compared to similar groups that did not use capsazepine.

As a result; It was determined that the combined use of cisplatin + melatonin compared to the cisplatin group caused more apoptotic effects in cancer cells and this activity was also mediated by TRPV1 channels.

Keywords: Pancreatic Cancer, Gastric Cancer, Apoptosis, Oxidative Stress, TRPV1



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	3
2.1.Pankreas kanseri.....	3
2.2. Mide kanseri.....	4
2.3. Kemoteropatik ajanlar.....	5
2.3.1. Sisplatin.....	6
2.3.1.1. Sisplatinin sulu çözeltide davranışı.....	7
2.3.1.2. Hücrelerde sisplatin taşınması.....	8
2.3.1.3. Genetik arka planda sisplatine karşı hücrede oluşan mekanizma.....	9
2.4.Antioksidan.....	10
2.4.1.Melatonin.....	10
2.4.1.1.Melatoninin kanser ve nörodejeneratif hastalıklarda kardioprotektif etkisi.....	11
2.5.Transient Receptor Potential (TRP) Kanalları.....	13
2.5.1. TRPV Kanal alt ailesi.....	16
2.5.1.1. TRPV1 kanalları.....	16
2.5.2. TRP Kanallarının proliferatif etkisi.....	18
2.5.3. Pro-Apoptotik oyuncular.....	18
3. MATERYAL VE METOD.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Kullanılan alet ve malzemeler.....	20
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	21
3.2. Metod.....	22

3.2.1.Hücrelerin üretilmesi.....	22
3.2.1.1.Medyumların hazırlanması.....	22
3.2.1.2.Laminar akım kabini ve diğer ekipmanların hazırlanması.....	22
3.1.2.3. Hücrelerin çözdürülmesi.....	22
3.1.2.4. Hücrelerin pasajlanması.....	23
3.2.2.Çalışma gruplar.....	24
3.2.3.Laboratuvar analizleri.....	25
3.2.3.1. Hücre içi sitozolik Ca^{2+} ölçülmesi.....	25
3.2.3.2. Programlı hücre ölümü (Apoptozis) analizi.....	26
3.2.3.3. Hücre içi rot analizi.....	26
3.2.3.4. Mitokondriyal depolarizasyon analizi.....	27
3.2.3.5. Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivitesi analizi.....	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. Laboratuvar analiz sonuçları.....	28
4.1.1. TRPV1 kanalı ve sitozolik Ca^{+2} analiz sonuçları.....	28
4.1.2 Programlı hücre ölümü (apoptozis) analiz sonuçları.....	30
4.1.3 Hücre içi ROT analizi sonuçları.....	31
4.1.4. TRPV1 ve mitokondriyal depolarizasyon analizi sonuçları.....	32
4.1.5.Kaspaz–3 Aktivitesi analiz ve sonuçları.....	33
4.1.6 Kaspaz – 9 Aktivitesi analiz ve sonuçları.....	34
4.2.Mide kanseri ve pankreas kanseri hücrelerinin mikroskop görüntüleri.....	36
5.TARTIŞMA.....	39
6.SONUÇ ve ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR.....	44
ÖZGEÇMİŞ.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Sisplatinin Hücrede etki Mekanizması.....	7
Şekil 2.2	Sisplatinin sulu çözeltideki davranışı.....	8
Şekil 2.3.	Sisplatinin Hücredeki direnç mekanizması.....	8
Şekil 2.4	Antioksidanların etki mekanizması.....	10
Şekil 2.5.	Melatoninin Biyosentezi.....	11
Şekil 2.6	TRP Kanalı Süperalt Ailesi.....	14
Şekil 2.7	Ca ⁺⁺ iyon kanalı aktivasyonu.....	15
Şekil 2.8	TRPV Kanal alt ailesi filogenetik gösterimi.....	16
Şekil 2.9	TRPV1 kanalı aktivasyonu.....	17
Şekil. 4.1 (a, b, c)	TRPV1 Kanalı Ca ⁺² ilişkisi.....	28
Şekil 4.2.	HGC-27 ve Panc-1 Hücrelerinde Sisplatin ve Melatoninin Apoptozis Analizi.....	30
Şekil 4.3.	HGC-27 ve Panc-1 hücre hatlarında ROT hücre içi değerleri analiz sonuçları.....	31
Şekil 4.4.	HGC-27 ve Panc-1 kanser hücre hatlarında mitokondriyal depolarizasyon sonuçları.....	32
Şekil 4.5.	HGC-27 ve Panc-1 hücre hatlarında tüm gruplarda Kaspaz-3 aktivitesi sonuçları,.....	33
Şekil 4.6.	HGC-27 ve Panc-1 Hücre hatlarında tüm gruplarda Kaspaz-9 aktivitesi sonuçları.....	34
Şekil 5.1	HGC-27 Kontrol X10.....	36
Şekil 5.2	HGC-27 + Sisplatin X10.....	36
Şekil 5.3	HGC-27 + Melatonin X10.....	36
Şekil 5.4	HGC-27 Melatonin + Sisplatin X10.....	36
Şekil 5.5	Panc-1 Kontrol Grubu.....	37
Şekil 5.6	Pac-1 + Sisplatin X10 / Panc-1 + Sisplatin X20.....	37
Şekil 5.7	Pac-1 + Melatonin X10.....	37
Şekil 5.8	Pac-1 Sisplatin + Melatonin X20.....	37

KISALTMALAR

AH	: Alzeimer
ATP7	: Bakır taşıyıcı P-tipi ATPaz,
Ca⁺²	: Kalsiyum İyonu
[Ca⁺²]_i	: Hücre içi Kalsiyum İyonu
CAP	: Kapsaisin
Cl	: Klor
Cu	: Bakır
CPZ	: Kapsazepin
Cisp.	: Sisplatin
CP	: Sisplatin
Ctr	: Bakır taşıyıcı
DACP	: Diaqua sisplatin
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ER	: Endoplazmik Retikulum
GSH	: Glutatyon
GTP	: Guanozin Trifosfat
GTPaz	: Guanozin Trifosfataz
HCl	: Hidro Klorik Asit
HGC-27	: Mide Kanseri Hücre Hattı
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
IP3R ve RyR	: Hücre zarı Ca ²⁺ iyon kanalları

MATE	: Çoklu ilaç ekstrüzyon taşıyıcı
MCF-7	: Meme Kanseri Hücre Hattı
Mel.	: Melatonin
MB-468	: Meme kanseri hücre hattı
MRCP	: Manyetik rezonans kolanjiyopankreatografi
MRP	: Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein
MT	: Metalloprotein
miR-499	: MikroRNA parçaları
MI/R	: Miyokardiyal İskemi / Reperfüzyon
MRCP	: Manyetik Rezonans Kolanjiyopankreatografi Aracı
OCT	: Organik Katyon Taşıyıcı
OAT	: Organik anyon taşıyıcı
Panc-1	: Pankreas Kanseri
pH	: Power of Hidrojen
PM	: Plazma Membran
ROT	: Serbest Radikaller
RPM	: Regulation Per Minute (Santrifüj cihazında; 1 dakikadaki dönüş sayısı)
SIRT3	: Sirtuin-3
TRP	: Transient Receptor Potential
TRPA	: Transient Receptor Potential Ankyrin
TRPP	: Transient Receptor Potential Polycystin
TRPC	: Transient Receptor Potential Canonical
TRPM	: Transient Receptor Potential Melastatin
TRPV	: Transient Receptor Potential Vanilloid

TRPML : Transient Receptor Potential Mucolipin

Zn : Çinko



1.GİRİŞ

Kanser, halk arasında en çok endişe duyulan ve muhtemelen değişen yaşam tarzımız, alışkanlıklarımız, artan yaşam beklentilerimiz nedenleriyle insidansı yükselen sağlık sorunları arasında en önemlilerinden biridir [1]. Dünyada yaklaşık olarak her 6 ölümden biri, ülkemizde de her 5 ölümden biri kanser nedeniyledir [2]. Kanser ölümlerinin yaklaşık üçte biri; tütün kullanımı, yüksek beden kütle indeksi (fazla kilolu ya da şişman olma), meyve ve sebzeyi az tüketme, yetersiz fiziksel aktivite, alkol kullanımı gibi birçok sebep kanser hastalığının görülme sıklığını artırmaktadır [1,2].

Kanser, vücudun herhangi bir organ ya da dokusunda ki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve büyümesi sonucu ortaya çıkan önemli bir hastalıktır. Kanser türlerinin büyük bir bölümü edinsel olarak kendiliğinden veya çevresel kaynaklı travma süreçlerine bağlı olarak DNA mutasyonlarıyla ortaya çıkmaktadır [3]. Sağlıklı bir insanda, vücut hücreleri, yalnızca vücut ihtiyaç duyduğu anda, yeni hücreler oluşturmak üzere büyüyüp bölünerek çoğalırlar ancak hücreler yaşlandıysa ya da hasar gördüyse ölürlar ve ölen hücrelerin yerini yeni hücreler alır. Genetik faktörler, enfeksiyon ya da diğer birçok sebepten dolayı bir insanda kanser geliştiğinde düzenli işleyen hücresel süreç bozulur. Hücreler giderek daha anormal hale gelir, yaşlı veya hasar görmüş hücreler ölmeleri gereken zamanda yaşamlarını sürdürerek ihtiyaç duyulmasa da yeni hücreler oluşturmak için bölünmeye devam ederler. Tümör olarak adlandırılan kitleler oluşturabilirler [4].

Kanserli hücre ya da dokular vücutta ilerlerken; hücrenin yaşam döngüsüne doğrudan etki ederek hücrenin apoptozise geçiş yollarını baskılayıp mekanizmayı proliferasyona yönlendirirler. Tüm bu değişenlerin temelini sitoplazmik, mitokondriyal veya endoplazmik retikulum (ER) aracılı mekanizmalar ve Ca^{+2} içeren pro-proliferatuar yollar ile ilişkili pro-apoptotik değişiklikler ve beraberinde hücrelerdeki Ca^{+2} iyon homeostazisindeki değişiklikleri kapsadığı düşünülmektedir. Plazma membranında (PM) bulunan iyon kanalları aracılığı ile hücreye Ca^{+2} iyon girişi, TRP kanallarında sinyal oluşumuna yol açar ve sonrasında yeni oluşmuş hücreler, organ ya da dokuya bağlı tümör hücrelerinde de kalsiyum sinyallerine karşı duyarlılık kaybının oluşması ve sonucunda proliferasyon içinde Ca^{+2} iyonlarının rol aldığı görülmüştür [5].

Kalsiyum iyonunun hücre içine salınmasında sadece membranda bulunan iyon kanalları aracılığı ile olmadığı gözlenmiştir [6]. ER'de lokalize olarak yer alan ve apoptozun düzenlenmesine katıldığı bilinen iyon kanallarının karakterize örneklerinden

olan IP3R ve RyR kanallarının yanı sıra özellikle TRP süper ailesinden TRPM2 ve TRPM8 çalışmaları dikkat çekmektedir [7].

Bu tezin amacı; literatürde ilk kez HGC-27 ve Panc-1 hücrelerinde melatonin sisplatinin birlikte kullanımı sonucu, hücreler içi kalsiyum yoğunluk değişiminde TRPV1 kanalının rolünün belirlenmesi ve TRPV1 kanal aktivasyonu aracılığı ile hücrelerde ki apoptozis seviyesini nasıl etkilediğini araştırmaktır.



2. GENEL BİLGİ

2.1. Pankreas kanseri

Pankreas hem endokrin hem ekzokrin özellik gösteren karma özellikte olan bir organdır. Yapısal olarak iki ayrı bileşenden oluşur. Ekzokrin pankreasın; esas görevi günlük beslenme sonucunda besinlerin ince bağırsakta sindiriminden sorumlu sindirim enzimlerini sentezleyerek sonucunda besinlerin assimilasyonunda görev alır. Ayrıca pankreatik ekzokrin bezde, sindirim enzimlerini üreten acinar hücreleri ile sodyum bikarbonat tuzlarını üreten kanal hücreleri bulunur [8]. Endokrin pankreas ise langerhans adacıklarından oluşur. Endokrin ürünler, kanda şeker homeostazisi için vücutta şeker rezervlerinin oluşmasında görev alan peptid yapılı hormonları salgılar. Pankreas fonsiyonunu endokrin, nörokrin ve parakrin ile intakrin mekanizmaları yolu ile düzenleyen organdır [9].

Pankreas kanseri, kansere bağlı ölüm vakalarında ABD de 4. sırada yer alırken Türkiyede 5. sıradadır. Erken teşhis yöntemlerinin bulunamamış olması ve etkili biyobelirteçlerin olmaması nedeniyle hastalarda genellikle beş yıllık sağkalım oranı %5 olup, geç bir aşamada teşhis edilebilmektedir [10]. Günümüzde agrasif özellikte olan bu kanser türünün henüz tedavisi de yoktur.

Pankreas kanseri için klinik deneylerde incelenmekte olan spesifik iyon kanalı inhibitörleri hala tam olarak bilinmesede ilaç çalışmalarında spesifik mitokondriyal inhibitörlerin kullanılması önemli bir çalışma alanıdır. Bu sebeple mitokondri organeli iç ve dış membranı hücre membranında olduğu gibi çok sayıda iyon kanalı bulundurduğu için ilaç çalışmalarına araştırmaya değer konu olmaktadır [10, 11].

İnsanın günlük yaşamını doğrudan etkileyen tüm bu fonksiyonel moleküllerin salgı organı olması nedeni ile pankreatik hastalıkların tanısı için belirteçlerin ve teröpatik yaklaşımların önemi artmaktadır. İnsanda pankreatik hastalıklar ya doğrudan ortaya çıkar ya da salgılarının eksikliği ile dolaylı olarak sağlık sorunlarına sebep olur. Akut pankreatik hastalığında beslenme ve hipertriglisemi nedeni olarak gösterilirken, kronik pankreatik tanılarında sekretin hormonunun etkisi MRCP-manyetik rezonans kolanjiyopankreatografi aracılı olarak incelenip tanı kaynağı olarak kullanılmaktadır [12]. Kronik pankreatitte; kemik yoğunluğu kaybı sonucunda kırık kemik prevelansı artmakta ve bu durumda D vitamininin pankreatik kanserde ilişkisi olduğu düşünülmektedir [12].

Pankreatik kanser tedavisi sonrasında kemoterapi, hormon tedavisi, radyoterapi ya da akıllı ilaçlar gibi çeşitli adjuvanlardan yararlanılarak kanserin tekrar etme riskini azaltmayı hedeflenmektedir [13].

2.2. Mide kanseri

Mide insanda üst abdominalde yer alan, kaslı ve rugal yapılı bir organdır. Midede kardial ve pilor olarak adlandırılan girişte ve çıkışta iki tip sfinkter yapı bulundurulur [14]. Özofagustan gelen besinlerin mideye girdikten sonra özofagusa geri kaçmasını engelleyen kardial sfinkteri, duodenuma geçişi sağlanmış besinlerin ise mideye geri kaçışını engelleyen pilor sfinkteri midenin giriş ve çıkışlarını büzerek kapanmasını sağlar [15]. Fonksiyonel olarak mide kaslarının besinleri ileri geri peristaltik hareketlerle çalkanmasına olanak sağlayan sfinkter yapı sindirim kanalında mideyi ayrı bir bölüm olarak tutma imkanı verir [16]. Gastrointestinal sistemin önemli bir parçası olan mide özofagustan gelen besinlerin ince bağırsağa geçmeden önce dinlendirerek sindirime de hazırlar. Mide özsuyu salgısı olan hidroklorik asit (HCl) yüksek asit salgısı aracılığı ile protein kaynaklı besinleri kimyasal sindirimini başlatırken diğer besinlerin fiziksel sindirimini yapar. Sindirimin devam edip tamamlanacağı ince bağırsağa kimusun geçişini sağlar. Midenin sindirimdeki bu fonksiyonel görevleri nedeniyle bazı hastalıkların oluşumunda doğrudan bazı hastalıkların oluşumunda da dolaylı olarak etkilidir [17]. Birçok mide rahatsızlıkları tanımlanmıştır. Kardial sfinkterin düzgün kapanmaması sebebiyle oluşan reflü gibi günlük yaşam kalitesini etkileyen hastalıkların oluşmasının yanı sıra epitelyal hücre kökenli kanser ya da sarkoma kökenli kanser türleri de ölümcül mide hastalıklarındandır [18].

Mide kanseri tüm hastalıklar içinde Dünyada görülme sıklığı 4. sırada Türkiye'de 5. sıradadır. Cinsiyete bağlı olarak incelendiğinde kanser türleri içinde mortalite olarak Dünyada erkeklerde 3. sırada, kadınlarda 5. sırada olduğu kayda alınmıştır. Türkiye'de cinsiyete bağlı olarak tüm kanser türleri arasında ise mortalitesi erkeklerde 2. sırada ve kadınlarda 4. sırada yer almaktadır [19]. Kanserle mücadelede alternatif olarak in vivo ve in vitro koşullarda yeni çalışmalar ortaya konsada klinik çalışmalarda halen radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaya devam etmektedir [20]. Mide kanseride dahil tüm kanser araştırmalarında da kullanılan kemoterapotik ajanlar vücutta birçok hasara yol açtığı için hasarı azaltma hatta onarım için melatonin gibi antioksidanlardan yararlanılmakta ya da selenyum gibi antioksidanik özellik gösteren kimyasallara başvurulmaktadır [21].

2.3. Kemoterapotik ajanlar

Bakteri, protozoa, mantar, virüsler, helmintlerin meydana getirdiği enfeksiyonlara ya da tümoral (neoplastik) hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçla tedaviye Kemoterapi denir. Tedavide kullanılan kimyasal bileşiklere de Kemoterapotik Ajanlar denir. Kanserde farklı tedavi yöntemleri son on yılda çok ilerleme kaydedilmiş olmasına rağmen kemoterapotik ajanların kullanılması ise halen klinik çalışmalarda en etkin yöntemler arasında yer almaktadır [21]. Kemoterapotik ajanlar özellikle etki mekanizmasına göre farklı sınıflarda değerlendirilir [22]. Kemoterapotik ajanların eldesinde bitkisel kökenli veya sentetik kökenli olarak iki farklı kökenden elde edilir [23]. Bu sınıfları temel alarak incelersek alkil etkide olan ajanlar, mitotik iğ yapısını inhibe ederek müdahale eden ajanlar, antimetabolitler ve topoizomerez enzimini inhibe eden ajanlardır [24].

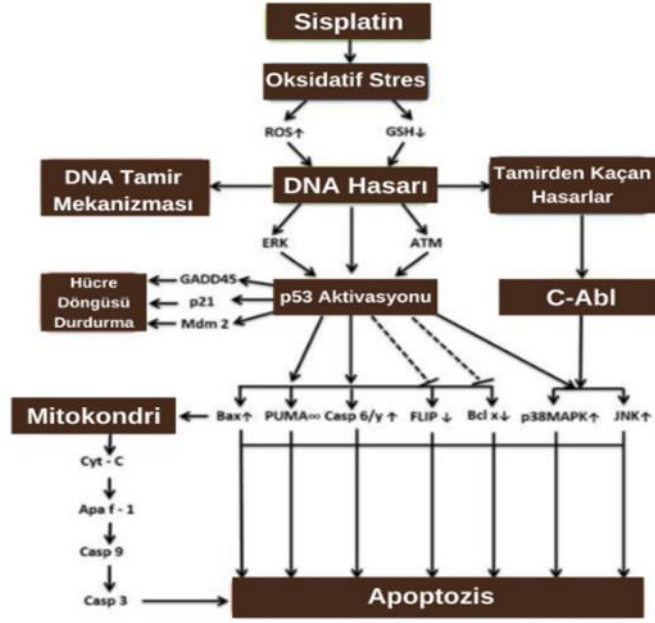
Alkilleyici mekanizmayı tetikleyen ajanlar; platin yapıda olanlar (sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin), hidrazin (temozolomid), nitrojen yapıda olanlar (bisulfan, klorambusil ve melfalan), oksazsafosforinler (siklofosfamid ve ifosfamid) ayrıca araştırması halen devam etmekte olan ajanlar; vinil-kinazolinon kemoterapotik ajanlardır [24]. Kemoterapotik ajanlar hücrede DNA'nın pürin bazı guanin kalıntılarına çapraz bağlar kurarak alkiler ve bunun sonucunda da hatalı DNA ipliği oluşmasına yol açarak DNA amplifikasyonunu durdurarak etkili olurlar [25]. DNA replikasyonunun enzimleri topoizomerez I enzimini ya da topoizomerez II enzimini inhibe eden kemoterapotik ajanlar DNA'da ise iplik kopmalarına neden olur [26]. Antimetabolit etkide kemoterapotikleri pürin analoglar (6-merkaptopurin, kladribin ve azatioprin), pirimidin bazlarla antagonist olanlar (sitarabin, 5-florourasil (5-FU), gemesitabin ve kapesitabin, pürin bazları antagonistleri (fludarabin), antifolatlar (metotreksat) , pemetrekset ve pralatreksat ve ribonükleotid redüktaz enzimleri inhibe edenler (hidroksiüre) olarak çeşitli gruplara ayrılırlar [27]. Antimetabolit özellikteki bu ilaçlar biyosentetik yollar aracılığı ile DNA-RNA sentezini ya bozarak ya da sentezde etkili olan enzimleri (dihidrofolat redüktaz, ribonükleotid redüktaz ve DNA polimeraz) inhibe ederek etkili olurlar [28]. Tüm bunların dışında bazı antimetabolitler pirimidin-pürin bazlarının hatalı eşlenmelerine ve sonucunda DNA ipliklerinde zincir kırılmalarına sebep olurlar [29]. Dosetaksel ve paklitaksel gibi taksanlar, vinkristin ve vinblastin gibi vinka alkaloidler, mitotik iğ inhibitörler karyokinezi metafazda inhibe eder ve mikrotübüler yapıyı değiştirerek hücre ölümüne yol açar [30]. Yeni sentezlenen N-karbonil akrininlerden bir tanesinin insana ait meme kanseri hücrelerinde MB-468'e etkinliği yüksek proliferatif

aktiviteyi tersine çevirerek tübül yapıların polimerizasyonunu inhibe ettiği de yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır [31]. L- asparaginaz gibi bazı enzimler, bortezomib gibi proteazom inhibitörleri, tirozin kinaz enzimini inhibe eden moleküller ve bazı antibiyotiklerde dahil diğer kemoterapötik ajanlarda karakterize kemoterapötikler arasında yer almaktadır [32]. Çoklu sinyal kanallarında bulunan ve hücre büyümesinde etkin tirozin kinaz enzimini inhibe eden imatinib ve erlotinib hücreyi apoptoza sürükleyen mekanizmayı tetikler [33]. Bleomisin ise G2 evresinde olan hücrede DNA üzerinde hasara yol açarak hücre siklusunun durmasına neden olan ROT (serbest radikaller)'un salınmasını indükleyen bir antibiyotiktir [34].

2.3.1. Sisplatin

Sisplatin, cis-diamindikloroplatin adıyla bilinen kemoterapötik etkili kanser araştırmalarında kullanılan platin kökenli ilaçtır. Akciğer, meme, baş - boyun, pankreas, yumurtalık, kolon kanseri de dahil birçok kanser türü tedavisinde kullanılmaktadır [35]. Yapılan araştırmalar sonucunda lenfoma, karsinom, germ hücreli tümör ve sarkoma temelinin farklı kökenden alan çok çeşitli kanser türlerine karşı etkili olduğu da tespit edilmiştir [36]. Sisplatin kanserli hücrede DNA'nın nükleotid yapılarından pürin bazlarıyla çapraz bağ yaparak DNA'nın tamir mekanizmasına etki eder ve hücreleri apoptoza indükler [37].

Son çalışmalar kanser hücreleri sisplatine karşı ilaç direnci geliştirirken özellikle genç hastalarda da çok ciddi alerjik rahatsızlıklar, böbrek rahatsızlıkları, enfeksiyonel hastalıklara karşı immün sistemin zayıflaması, gastrointestinal etkisi ile de kanama ya da işitme kaybı gibi çok sayıda yan etkilere sebep olduğunda ortaya çıkmıştır [38]. Sisplatin etkisi ile DNA hasarı oluşmuş hücreler ya hücrel direnci seçmekte ya da apoptotik yolları aktif etmektedir. Kansere karşı ilaç çalışmalarında en önemli hedef DNA'ya zarar vererek etkili olan ajanlara karşı hücrelerde oluşan hücrel direnci azaltmaktır. Bu nedenle sisplatine karşı direnç geliştirmiş kanser hücrelerinde DNA onarım yollarında etkili olan karakterize proteinlerdeki ve yolaklardaki değişimin tespit edilip tanımlanmasıdır [39].

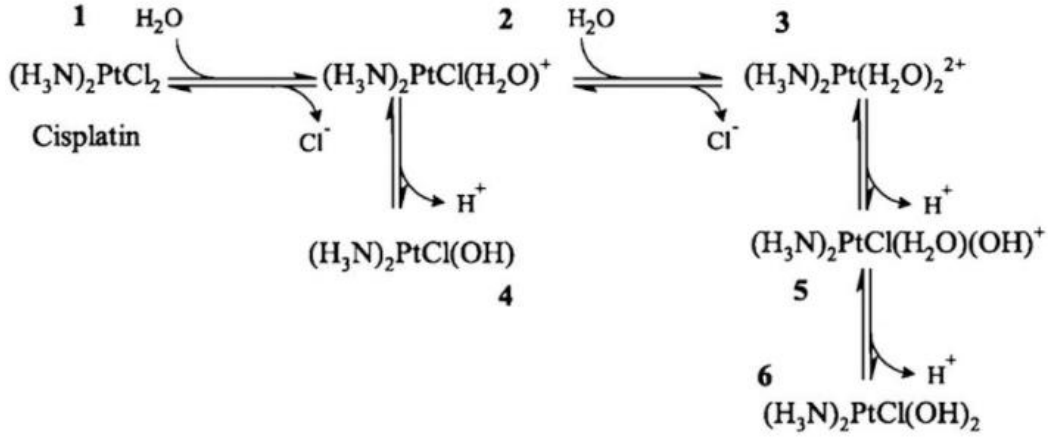


Şekil 2.1: Sisplatinin Hücrede etki Mekanizması

Hücrel direncin etkisini azaltmada etkili olan bir başka uygulama da sisplatinin diğer ilaçlarla kombinlenmesidir. Ayrıca bu yöntemin toksisiteyi azalttığı yapılan çalışmalarda kayda alınmıştır [40].

2.3.1.1. Sisplatinin sulu çözeltide davranışı

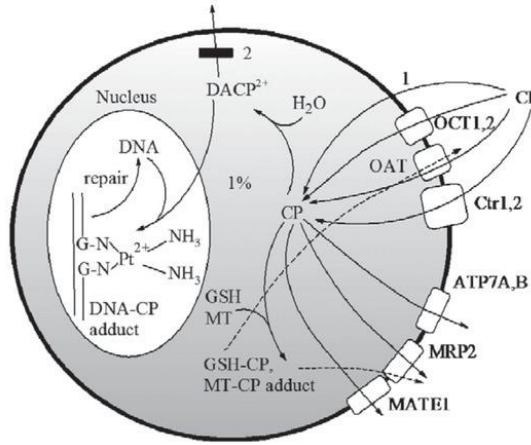
Sisplatinin su içerisinde kimyasal dönüşümü Şekil.2.2' de formüle edilmektedir [41]. Parlak sarı bir katı bir kimyasal olan sisplatin H_2O ile girdiği tepkimede su molekülleri sisplatinin yapısına katılırken yapısından bir Cl^- iyonunu koparır ve monoaqua oluşur. İkinci H_2O molekülü monoaquanın yapısına katılır bir Cl^- iyonu daha uzaklaştırarak diaqua yapısının oluşmasını sağlar. Cl^- salınmış ve H_2O bağlanmış sıvı çok asidik hale gelir ve fizyolojik pH'da protonsuz hale gelir [42].



Şekil 2.2: Sisplatinin sulu çözeltideki davranışı

2.3.1.2. Hücrelerde sisplatin taşınması

Sisplatin ilacının dar etki alanına sahip olmasından dolayı sadece doz artırımına gitmek hücre direncini kırmak için yetersizdir. Direnç mekanizmasında özellikle hücre içinde DNA, RNA ya da çeşitli proteinlerde eklenti oluşturması etkili olduğu düşünülmektedir [43].



Şekil 2.3. : Sisplatinin hücredeki direnç mekanizması

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6572495/>

Sisplatin uygulanmış bir hücrede sisplatinin hücre içine geçişi ve hücrede etkili olduğu mekanizmada hücre içine geçişi pasif difüzyon ile gerçekleşirken (1), hücre dışına pasif difüzyon ile geçişi ise engellenir (2). *ATP7A* proteini bakır organellere iletir ve *ATP7B* proteini ise bir hücreden fazla bakırın uzaklaştırılmasından sorumludur. *ATP7A*

ve *ATP7B* sisplatin kaynaklı dirençte rol oynadığı düşünülmektedir. *ATP7B* gen lokusundaki mutasyon, Wilson hastalığında da gözlenen bakır birikmesine yol açar, *ATP7A* gen lokusunda ki mutasyon ise tersine etki eder Menkes hastalığında gözlenen bakır eksikliğine neden olur [43]. *ATP7A* ve *ATP7B*, değişken olmayan Pt^{2+} - S bağı kuran N-terminal metal bağlama alanlarındaki sistein kalıntısında sisplatini bağlayabilir. İlgili proteinlerin hücrede yüksek seviyelerdeki değerlerde sisplatin birikiminin azalmasına ve dolayısıyla daha düşük sitotoksiste ile ilişkilidir [44].

Bakır taşıyıcı proteinler gibi GSH ve metallothionein yapılı moleküllerde sisplatinin taşınımını etkileyebilir. Bu moleküller yapısal olarak sistein açısından zengin, moleküler ağırlığı düşük proteinler, tiyol gruplarına koordineli olarak sisplatin ve benzer ilaçların hücre içinde inaktivasyonunda etkili olarak direnç geliştirmede sorumlu olduğu düşünülmektedir [45].

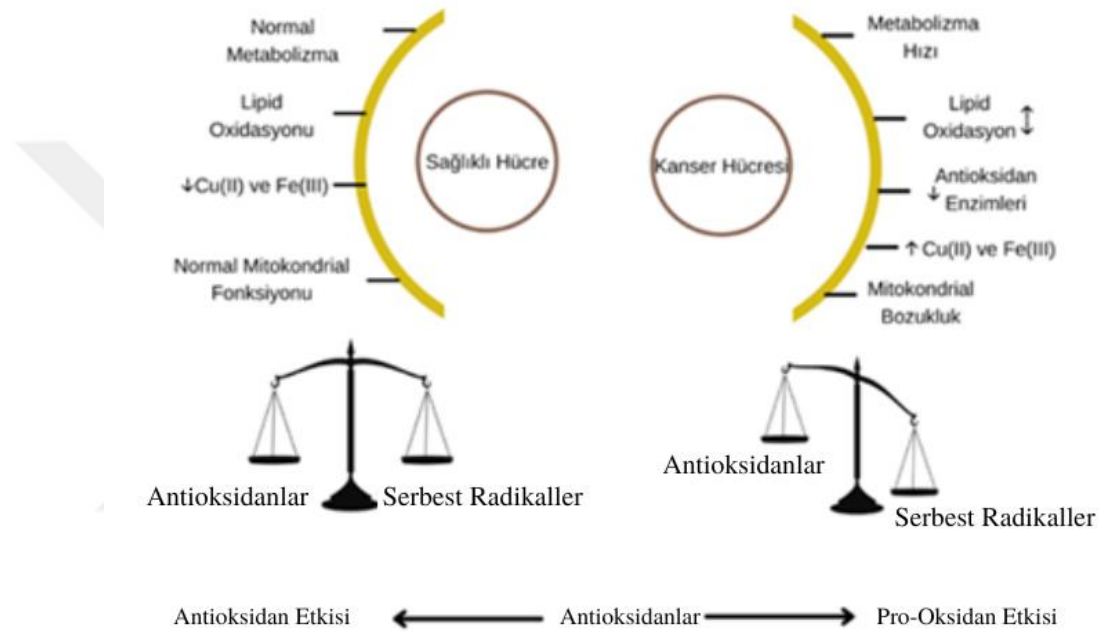
2.3.1.3. Genetik arka planda sisplatine karşı hücrede oluşan mekanizma

Genetik arka planda hücrenin sisplatine karşı oluşturduğu tepkiyi anlamak ve direnç mekanizmasını çözmek ilaç etkinliğini anlamlı yorumlamak için son derece önemlidir [46]. Hücresel direnç sistemi özellikle mutasyon ile gen lokuslarında meydana gelen değişimler sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir [47]. Bu mutasyon bölgelerinde ortaya çıkan genetik polimorfizmler; genetik faktörlerin belirteç olarak tanımlanabilmesinde özellikle bireyselleştirilmiş tedavi temelleri için idealize - optimum sisplatin kompleksleri oluşturmak için bilgi vereceği düşünülmektedir [48].

Araştırmalar sonucunda sisplatinin hücre içine alımında ve hücrede taşınmasında etken yapıların mutasyona dayalı genetik değişkenlikle karşı karşıya kalarak ortaya çıkan polimorfizmin etkisinde olduğu tahmin edilmektedir [49]. Hücrede polimorfik olarak katkı sağlayan taşıyıcılar, sisplatinin hücre içi seviyesini artırıcı yönde işlemlerde etkili olmaktadır. Bunların başında Cu iyonu taşıyıcısı olarak etken Ctr1 ve Ctr2, organik katyon taşıyıcı etkenler OCT 1 ve OCT 2, Cu iyon taşıyıcısı rolünde ATPazlardan *ATP7A* ve *ATP7B*, organik anyon taşıyıcı OAT, glutatyon ve metallothionein, çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein MRP2, çoklu ilaç ekstrüzyon taşıyıcısı-1 (MATE1) özelliktedir [50].

2.4.Antioksidan

Antioksidanlar ve antioksidan davranış gösteren kimyasallar çeşitli hastalıklarda incelemelere ya doğrudan konu olmuş ya da aracılı rolleri araştırılmış moleküllerdir. Bu kimyasalların birçok araştırmada bazı hastalık türlerinde tedavi sebebiyle kalpte oluşan hasarlara karşı iyileştirici etkisi olduğu sonucuna varılırken, melanom kökenli kanser türlerinde olduğu gibi bazı hastalıklarda da bazı antioksidanların kanser hücrelerinde proliferatif etki oluşturduğu düşünülmektedir [51].



Şekil 2.4: Antioksidanların etki mekanizması

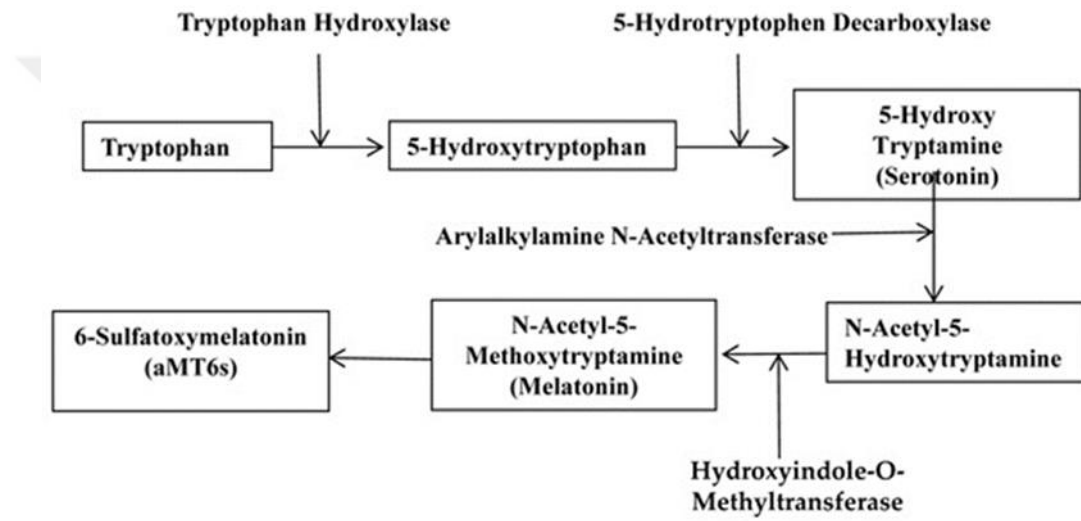
Özellikle yaşlanmaya dayalı hastalıkların tedavisinde ya da kardiyovasküler rahatsızlıkların tedavisinde uygulanan çeşitli ilaçlar aşırı ROT üretimine yol açarak kardiyovasküler sisteme ait hücrelerde fonksiyonel bozukluklara, protein ve lipitte peroksidasyona ve bunların sonucunda da DNA hasarına neden olur [52]. Antioksidanlar hücrelerde oluşan oksidatif stresi azalttığı ve oluşan hasara karşı protektif etki ettiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [53].

2.4.1.Melatonin

Melatonin kimyasal olarak N-asetil-5-metoksitriptamin olarak adlandırılan ve hem insanlarda hem de diğer memelilerde epifiz bezi tarafından karanlıkta sentezlenen özel bir biyokimyasal moleküldür. Melatonin indolik yapıda bir bileşiktir [54].

Canlıda ayrıca melatonin hormonu gastrointestinal sistem, retina, lenfositler, deri ve kemik iliği gibi birçok organda da sentezi mevcuttur [55].

Sirkadiyen ritim olarak adlandırılan ve uzun yıllar almış önemli bir çalışmada sonucunda ortaya konmuş uyku-uyanıklık halinde etkili; 24 saatlik biyoritim döngüsüdür. Tüm hücrelerde bulunan sirkadiyen saatler hücrede en az 12 gen tarafından kontrol edilmektedir. Hücrede santral dogma sirkadiyen saatler ile ilişkilidir [56]. Biyoritmin genler tarafından kontrol edilmesi, DNA da meydana gelen mutasyonlara dayalı olarak ortaya çıkan hastalıklar, değişen melatonin seviyeside dikkate alındığında sirkadiyen saatler kanser ve nörodejeneratif hastalıklarda doğrudan etkilidir [57].



Şekil 2.5.: Melatoninin Biyosentezi

Sirkadiyen melatonin seviyesinin artırmasında etkili olduğu ve birincil metabolit 6-sülfatoksimeatonin (aMT6s) yapısına katıldığı gösterilmiştir. Melatonin sentezi ve salgılanması, hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeğinde (SCN) bulunan 'ana biyolojik saat-biyoritim' kontrolünde düzenlenir [58].

2.4.1.1.Melatoninin diğer hastalıklarda etkisi

Melatonin antiapoptotik özellikte bir antioksidandır. Kanser önleyici ilaçlar ile birlikte kombinlendiğinde kanser ve nörodejeneratif hastalıklarda ilaç kullanımlarından dolayı birçok hasara karşı koruduğu ve onardığı gözlenmiştir. Kardiyal sistemde oluşan hasarlara karşı melatonin kardiyoprotektif etkidedir [59]. İn vivo ve in vitro koşullarda yapılan deneylerde melatonin antioksidan mekanizmasının birçok yolunu kullanarak hücreye etki etmekte olduğu gözlenmiştir [60]. Özellikle antikanser etkisini araştırmak

için melanom kanser incelemelerinde ER stresi ile kombine edildiğinde *PI3K/Akt/mTOR* yolak aracılığı ile melanomlarda hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir [61]. Ayrıca melatoninin melanom hücrelerinde hücre canlılığı, hücre göçü ve klon oluşumları üzerindeki inhibisyonların artması sonucu hücrelerin apoptoza yönelmesi antitümör aktivitesinde etkin olduğunu kuvvetlendirmektedir [62]. Antikanser mekanizması, sitokrom c'ye bağlı apoptotik yolun aktivasyonu ile başlayıp *COX-2/iNOS* ve *NF-κB/p300* sinyal yollarının inhibisyonu ile katkı sunar [63].

Doza bağlı olarak yapılan çalışmalarda ise melatonin (düşük: 10^{-9} - 10^{-5} M – yüksek: 10^{-4} - 10^{-2} M) hem melanom hücrelerinin hücre canlılığını inhibe etmekte hemde fibroblastlar üzerinde inhibisyonunu baskılamadan B16 melanom hücrelerinin proliferasyonunu önlemektedir [64]. Hücrede serbest radikaller olan ROT moleküllerinin açığa çıkması, yüksek melatonin konsantrasyonlarında hücre canlılığı inhibisyonuna neden olabilir [65]. Lösemi kanser türünde melatonin uygulanmış ve kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitelerini inhibe ettiği bu durumda da canlıda eozinofil, lenfosit ve nötrofil hücrelerinin oranlarını bazal seviyelerde ölçülmüştür [66]. Bu özel antioksidan sadece melanom hücreleri apoptoza yönlendirmediği gibi ayrıca hasar görmüş Fas, DR4 ve DR5 ölüm reseptörleri ile ligandları Fas L ve TRAIL'in ekspresyonlarında protektif özellikte iyileşme gözlenmiştir [67]. Daha sonra in vitro koşulda da incelenen melatonin insana ait malign hematolojik hücre hatlarında apoptozun aktive olduğu ve hücre ölümü ile sonuçlandığı gözlenmiştir [68]. Birkaç çalışmada da melatoninin özellikle kadınlarda görülme sıklığı çok yüksek olan rahim ağzı kanseri üzerindeki antikanser etkisi çalışılmış ve melatoninin bu hücrelerde kaspaz-3 aktivasyonu artarak HeLa hücre canlılığını azalttığı ve 3 kemoterapötik ajanın (sisplatin, 5-florourasil ve doksorubisin) sitotoksik etkisinin kanser hattı hücrelerinde önemli ölçüde artırdığı gözlenmiştir [69].

Rahim ağzı kanserinde özellikle melatonin ve sisplatinin birlikte tedavisi ile sisplatinin tek başına tedavisi karşılaştırılmalı deneylenmiş olup birlikte kullanımlarının yüksek mitokondriyal ROT üretimine rağmen apoptoza giren hücrelerin oranının arttığı gözlenmiştir [70].

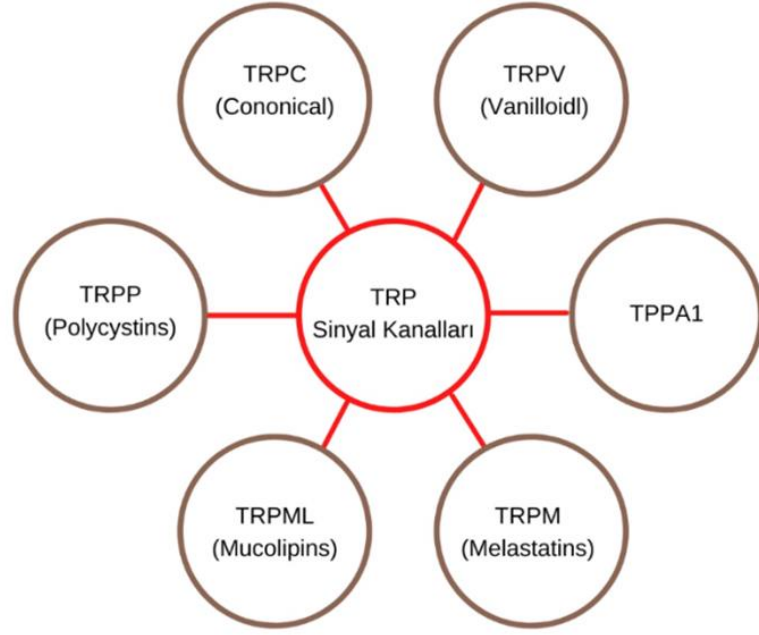
Sirtuinler histon deasetilazdır ve nikotinamid adenin nükleotidine bağlı yapılardır [71]. Sirtuin-3 (SIRT3) mitokondride bulunan ve oksidatif strese bağlı hastalıklara ve ayrıca miyokardiyal iskemi/reperfüzyon (MI/R) karşı korucu özellikte olan sirtuin çeşididir [72]. Melatonin varlığında SIRT3'ün sinyal yolağını tetikleyerek MI/R hasarını iyileştirme rolünü üstlenerek kardiyoprotektif özellikte olduğu çalışmalarla kanıtlanmak

istenmiştir. Farelerle yapılan bir çalışma melatoninin kardiyoprotektif özelliğini ortaya koymakta kanıtlar sunmaktadır. Bu çalışmada fare hasta edilip yeniden iyileştirilmiş ve sonrasında oluşan kalp hasarında ortamda SIRT3 inhibitörü olsun olmasın MI/R işlemine fareler tabi tutulmuştur [73]. Çalışmada reperfüzyondan 10 dk önce intraperitonel olarak (20mg/kg) melatonin verilerek takibe alınarak kasılma fonksiyonunun azaldığı, enfarktüs boyutunun küçüldüğü, laktat dehidrojenaz salınımı azalarak, oksidatif hasardan etkilenmeden apoptotik etkinin azaldığı raporlanmıştır [74]. Sonuç olarak MI/R miyokardial yapılarda melatonin tedavisinde SIRT3 ekspresyonunu regüle ederek ve aktivasyonunu artırma yoluna gittiği dikkate değer bulunmuştur [75]. Hücrelerde süperoksit dismutaz 2'nin asetilasyonunu düşürmü beraberinde melatonin Bcl-2 ekspresyonunu artırmıştır [76]. Melatonin miyokardiallarda postiskemik kardiyakta iyileşme ve enfarktüste küçülme, apoptotik oranlarını azalma deneylenmiştir [77]. Serum kreatin kinazını ve laktat dehidrojenaz salınımını indükleyerek, SIRT1'in etkisini artırmak gibi daha birçok yol kullanarak melatonin kanser ve nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu özellikte olduğu deneylenmiştir [78].

Melatonin için yapılan in vitro ve in vivo koşullarda hayvan deney çalışmaları sonucu elde edilen veriler kemotöröpatik etkide olduğunu göstermekte olup kesin sonucuna varmak için daha çok araştırmaya ihtiyaç olduğu birçok araştırmacı tarafından tavsiye edilir [79].

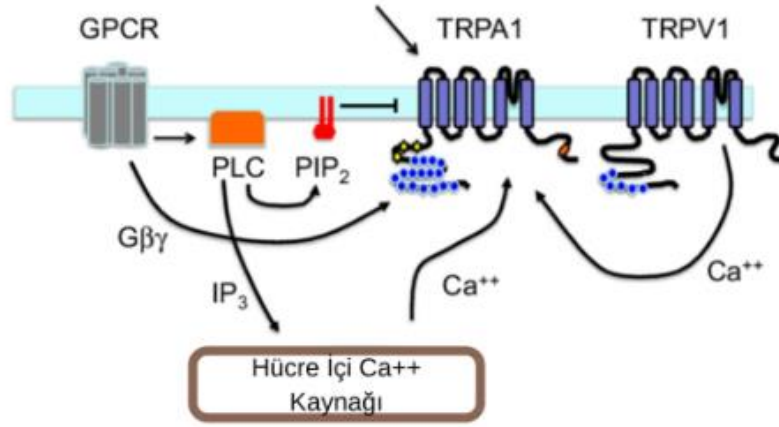
2.5.Transient receptor potential (TRP) kanalları

TRP kanalları, ilk olarak 1960'larda *Drosophila* cinsi meyve sineklerinin fotoreseptör hücrelerinde tespit edilmiştir, genel olarak Ca^{+2} geçirgen transmembran iyon kanallarıdır [80]. Hücre dışı sıvı, hücre içine oranla yaklaşık 10.000 ila 20.000 kat daha fazla oranda Ca^{+2} bulundurduğu dikkate alındığında, sitozoldeki Ca^{+2} konsantrasyonunun değişimine bağlı olarak açılıp kapanan ve bu kanallardan iyon geçişinin hücrenin yaşamsal fonksiyonlarını yerine getirmesinde çok önemli olduğu tespit edilmiştir. TRP iyon kanal üst ailesi memelilerde, kendi içerisinde spesifik bağlanma bölgelerine göre çok sayıda alt tipten oluşmakta ve temelde altı alt ailede incelenmektedir [81].



Şekil 2.6: TRP Kanalı Süperalt Ailesi

Ankyrin (TRPA), Vanilloid (TRPV), Canonical (TRPC), Melastatin (TRPM), Polycystin (TRPP), Mucolipin (TRPML)'dir. Her bir alt aile özgün tanımlayıcı bölgelerine göre belirlenmiş alt birimlere ayrılır ve her alt birim kendi içinde değişik sayıda kanal alt birimlerine sahiptir. Bunlar aynı zamanda anılan alt ailelerinin üyeleridirler. Memeli bir canlı için TRPA alt ailesinin bir, TRPV alt ailesinin altı, TPC alt ailesinin yedi, TRPM alt ailesinin sekiz, TRPP alt ailesinin dört ve TRPML alt ailesinin şimdiye kadar keşfedilen üç alt birimi veya üyesi mevcuttur [82]. Son yıllarda yapılan çalışmalarla TRP iyon kanallarının; apoptozis, kanser, diyabet gibi pek çok araştırmada konu olmasının yanı sıra alzheimer (AH) gibi nörodejeneratif hastalıklarla bağlantısı olduğu çalışmalarla ispatlanmıştır [83].



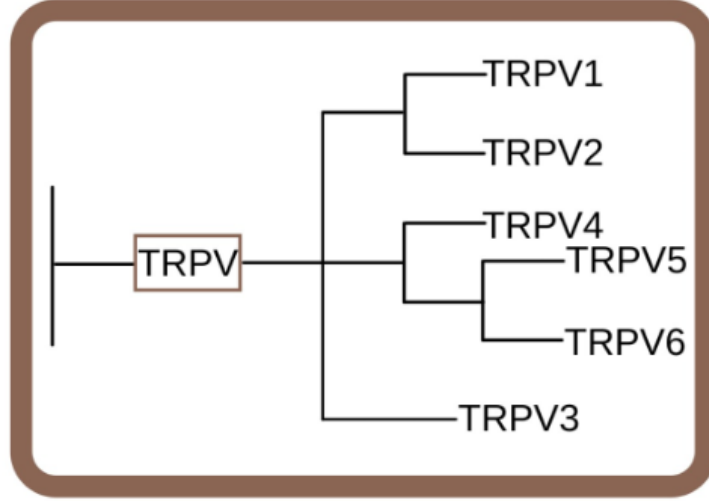
Şekil 2.7: Ca^{++} iyon kanalı aktivasyonu

Kasyon kanalları ile TRP süper ailesinin ortak bir özelliği, altı transmembran segmenti ve belirli bir sekans homolojisi. Ancak, TRP kanalları diğer iyon kanalı ailelerine göre en belirleyici farkı ise kasyon seçiciliklerinin çeşitliliğinde ve spesifik aktivasyon mekanizmalarından kaynaklanır. Özellikle, belirli bir TRP kanalı etkinleştirilebilir ve yanıtı tamamen farklı mekanizmalar tarafından cevap bulabilir, bu da TRP kanallarının 'çoklu sinyal entegrasyonu' kavramına yol açmıştır. Ayrıca, diğer bir ortak özellikte, TRP kanallarının ışık, ses, kimyasallar, sıcaklık, ozmolaritedeki değişimler ve doğrudan temas gibi tüm büyük dış uyaran sınıflarına tepkisinde yatıyor gibi görünmektedir [84].

TRP kanalları, kanserojen veya potansiyel olarak zararlı maddeler içinde özgün reseptör molekülleri olarak hareket ettiği yapılan çalışmalar ile saptanmıştır. Bununla birlikte bu kanalların sinirsel olmayan hücrelerde, örneğin solunum yolunun epitel dokusunda fonksiyonel olarak ekspresyona uğradığı da son yıllardaki çalışmalar ile ortaya konmuştur [85]. TRP kanalları bir dizi kanser türünde de tanımlanmıştır. Zararlı bileşikler için de duyarlı sinyal oluşturan TRP kanalları, hücre savunma mekanizmalarında da yer alır ve apoptotik sinyal iletimi yoluyla toksik maddelere maruz kalmanın ardından da hücre canlılığı etkilenir. Bazı spesifik ilaç veya ilaç metabolitleri bu TRP kanallarını aktive edebilir ve bu da bu sitostatiklerin terapötik etkinliğini etkileyebilir [86].

2.5.1. TRPV Kanal alt ailesi

TRPV kanalları, bazı bitkilerin yapısında bulunduğu kanıtlanmış vanilik asit, vanilin ve kapsaisin gibi doğal vaniloidler aracılığı ile aktive edildiği tespit edilmiş adını da buradan köken alan TRP kanallarıdır [87].



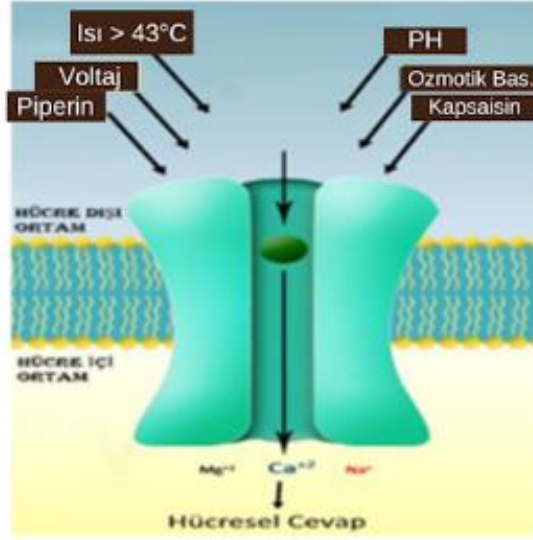
Şekil 2.8: TRPV Kanal alt ailesi filogenetik gösterimi

TRPV kanalları hem hücre membranında hem de birim zar ile çevrili olan organellerin zarında bulunduğu tespit edilmiştir. TRPV kanalları fiziksel etkide basınç, pH, sıcaklık ve kimyasal özellikteki uyarılarla ve biyolojik ajanlarla aktive olduğu tespit edilmiştir. TRPV kanalları hem nosiseptör olarak görev alır hem de kemo-sensör olarak görev alırlar. TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5 ve TRPV6 olmak üzere altı alt tipi bulunmaktadır. TRPV1’den TRPV4’ e kadar olanların nosiseptör özellikte oldukları varsayılmaktadır. TRPV5 ve TRPV6 tiplerinin ise epitelyal kökenli Ca^{+2} kanalı olarak görev yaptıkları düşünülmektedir. TRPV kanalları katyon geçişlerine olanak sağlamasının yanı sıra Ca^{+2} iyon seçiciliği sayesinde hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun dengede tutulmasında da etkilidir [88].

2.5.1.1. TRPV1 Kanalları

Memelilerde birçok fizyolojik ve patolojik durumlarda rol oynayan TRPV1 kanalları periferel ağrının oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir. Seçici olmayan kanallar da kapsaisin (acı kırmızıbiberin keskin bileşeni) ve resiniferatoksin gibi vaniloidler, yüksek ısı ($>43^{\circ}C$), asit ($pH<5$), hücresel voltaj değişikliği, oksidatif stres

ve inflamatuvar medyatörlerin uyarımların birçoğu hücre içine Ca^{+2} geçişine sebep olur. TRPV1 kanalı zararlı birçok uyarımda sinyal verici olarak görev alabilir [89].



Şekil 2.9: TRPV1 kanalı aktivasyonu

TRPV1'nin tekrar tekrar aktivasyonu ölümcül hücresel yaralanmalara, oksidatif stres kaynaklı ve serbest kalsiyum iyonlarının sitozoldeki artışı gibi faktörlerde etkili olduğu saptanmıştır. TRPV1 kanalları merkezi ve periferik primer duyuşal nöronlarda varlığı ve etkisi özellikle incelenmiştir. Ağrılı uyarımların algılanmasına ve taşınmasına katılan TRPV1'in, duyuşal fonksiyonlarındaki rolü üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır [90]. TRPV1'in ekspresyonunun akciğer adenokarsinom hücrelerinde de etkili olduğu tespit edilmiştir. TRPV1 ekspresyonu aynı zamanda akciğer fibroblastlarında ve normal akciğer epitelinde ve duyuşal sinir hücrelerinde etkisi gözlenmiştir. TRPA1 ve TRPV1 kanallarının yapısında ve aktivasyon mekanizmasında tiyol ve sülfidril gruplarının önemi ortaya konmuştur.

TRPA1 ve TRPV1 kanalları sarımsakta bulunan gallisin maddesi ve nitrik oksit etkisi ile kovalent değişiklik olur ve sonucunda oksidatif stres başlar. Oksidatif stres ile ağrı ve ağrıya karşı hassasiyet (hyperalgesia) oluşur [91]. H_2O_2 gibi hücre zarını geçebilen oksidanlar TRPV1 kanallarını aktive edebildikleri düşünülmektedir [96]. Oksidatif stres elemanları kinaz enzimleri ve hücre zarı proton yapılarında değişikliklere neden olur [92].

Fizyolojik olarak TRPV1 kanalları inaktif haldeyken; rahatsız edici kimyasal ve termal uyarılar sebebiyle aktive olurlar. CAP, allisin, RTX gibi eksojen ajanlar kanalı aktive ederken, aynı zamanda yüksek sıcaklık, ekstrasellüler ve intrasellüler pH

dengesizlikleri ve anandamid gibi endojen uyaranlar da kanalın aktive olmasını sağlarlar. TRPV1 kanallarının iyonize olmayan elektromanyetik radyasyon (EMR) etkisiyle de aktive olduğu ve kalsiyum iyon geçişine aracılık ederek hücre içi kaspaz yollarının aktivasyonuna ve hücre ölümüne neden olduğu rapor edilmiştir [93]. TRPV1'in aktivasyonunda bir diğer önemli yol ise kanalın prostaglandinler, bradikinin, endojen lipid türevleri gibi enflamatuar medyatörlerle allosterik olarak düzenlenmesidir [94].

2.5.2. TRP Kanallarının proliferatif etkisi

Kanser hücre hatları ile yapılan çalışmalarda TRP kanallarından özellikle TRPV1 ve TRPV2, TRPM4 – TRPM5 – TRPM7, TRPC5 – TRPC6 pro-proliferatif etkide ilişkileri incelenmiş ve gözlenmiştir [95]. TRPV ailesinde yapılan çalışmalarda ilk olarak tanımlanan ayrıca sıcaklık değişimlerine ve voltaja duyarlı olan TRPV1 sinyal yolaklarıdır. TRPV1 sinyal yolağı merkezi sinir sisteminde ve periferik sinir sisteminde sensör görevinde hücre için önemli bir oyuncudur [95]. Özellikle MCF-7 hücre hattında yapılan çalışmalarda TRPV1 sinyal yolağının sensör görevinin dışında ayrıca kanser hücre gelişiminde de etkili olduğu gözlenmiştir. TRPV1 kanser hücresinde agonist ve antagonistleri hücre büyümesinde anti-proliferatif etki ile inhibisyonu indüklemektedir [96].

2.5.3. Pro-apoptotik oyuncular

TRP kanallarının pro-apoptotik oyuncuları herhangi bir model ayırmadan çoklu TRP alt aileleri arasında görünür. TRPC alt ailesi, TRPC3 ve TRPC4 kanal ile temsil edilir, TRPM1 ve TRPM2, TRPM alt ailesini sunar ve TRPV alt ailesi, pro-apoptotik olarak sadece TRPV1 kanalı ile temsil eder. Kanıtların büyük bir çoğunluğu TRPM alt ailesinde ve özellikle TRPM1 kanalına odaklanmıştır. TRPM (melastatin) süperailesi adını, metastatik B16 fare melanom hücrelerinde regüle edilen birkaç genden biri olduğu bulunan TRPM1 kanalından almıştır [97]. TRPM1, 2, 3, 4, 5 ve 8 kanallarının birden çok ekleme varyantına sahip olduğu gösterilmiştir, ancak bu varyantların önemi hala tam olarak tespit edilmemiştir [98]. TRPM1 kanalının yüksek seviyede ekspresyonunun, hücre dışı Ca^{+2} 'e bağımlı bir şekilde HEK293 hücrelerinde sitoplazmik Ca^{+2} 'de artışa neden olduğu ve bunun La^{3+} ve Gd^{3+} tarafından bloke edilebileceği gösterilmiştir [99]. Ancak, erken çalışmalar sırasında kanalın elektrofizyolojik aktivitesinin gözlemlenememiş olması öncelikli olarak bir sızıntı kanalı olarak işlevselliği fikrini düşündürmüştür. Bu durum mGluR6 reseptörünün aktivasyonu ve Go'nun aracılık

ettiği TRPM1 kanalının geçirgenlik özelliğinden ziyade geçitin bütünüyle kapanmasına yol açtığını gösteren retinal bipolar hücrelerde kanal aktivitesi ile ilgisi sonraki çalışmalarla da desteklenmiştir [100]. TRPC1'e benzer şekilde, TRPM1 kanalı, kanserin evresine bağlı olarak karmaşık bir ifade modeli sergiler. Örneğin, insan melanom hücrelerinde TRPM1, benign dokularda yüksek seviyelerde saptanmış, TRPM1 seviyeleri birincil melanomlarda azalırken ve metastatik dokularda kayda değer miktarda TRPM1 mRNA düşüş tespit edilmiştir. Ayrıca; TRPM1 ekspresyonundaki bu azalma, tümörlerin boyutu ve tümör saldırganlığının derecesi gibi tümör progresyon ölçümleri ile korelasyon gösterdiğide tespit edilmiştir [101].

TRPM1 ekspresyonundaki değişiklikler, mikroftalmi transkripsiyon faktörünün hücrel farklılaşma durumuna bağlı olarak TRPM1 kanalının ekspresyonunu düzenlediğine dair çalışmalar ile kanıtlanmıştır. *Trpm1* geninin 6. intronunun miR-211 mikroRNA'sı modeli son yapılan çalışmalar arasındadır [102]. Ekspresyonunun artışı G0 ve G1 fazındaki hücrelerin gelişimini durdurduğu ve hatta proliferasyonu inhibe ettiği bilgisi epitelyal yumurtalık kanseri ve melanom hücrelerinde yapılan çalışmalarla apoptozu indüklediği kanıtlanmıştır [103]. Bazı ek kanıtlar, tam uzunluktaki TRPM1'in plazma membranına madde geçişlerinin düzenlenmesinde rol oynayan kısa bir izoformun (TRPM1-S) varlığına işaret eder ve böylece TRPM1 aracılı Ca^{+2} 'nin kontrollü geçişinde aracılık eder. Son zamanlardaki bazı çalışmalarda TRPM1'in varlığının melanom metastazı gelişimi ile negatif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. TRPM1'in sağlıklı hücrelerde apoptozu kontrol edebileceğini, kanserli hücrelerde ise hücre proliferasyonuna yol açabileceğini düşündürmektedir [104].

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler

Serolojik Pipet (Thermo Scientific, İtalya)

Otomatik Pipet (DLAB, Çin)

Şarjlı Pipet Uçları: 1ml, 5ml, 10 ml, 25 ml hacimlerinde (İtalya)

Cryo tüp (Greiner Bio-One GmbH, Almanya): 1ml, 2ml hacimde

T75 Flakslar: Cell Star, Greiner Bio-One GmbH, (Almanya) 75 ml 250 ml hacimde

T25 Flakslar: Cell Star, Greiner Bio-One GmbH, (Almanya)

Hassas Terazı (weightlab instruments, Türkiye)

Ependorf

Çalkalamalı Su Banyosu

Falkon Tüpleri: ISOLAB, 10 ml, 15 ml ve 50 ml hacimlerinde

Steril 96 lık plakalar

Hassas Terazı: Scaltec SPB 32 (İsviçre)

Bioteck Synergy H1 Microplate Reader; Kalsiyum sinyali, Apoptozis, Reaktif Oksijen Türleri, Kaspaz 3, Kaspaz 9 ve Mitokondriyal Depolarizasyon analizlerinin yapılması

Termo Scientific Forma Termo Cycle CO2 inkübatör; Hücrelerinin ekilmesi, pasajlanması ve kimyasallarla inkübe edilmesi sonrasında bekletilmesi

Termo Scientific Micro CL21R Santrifüj; Medium değişimi ve kimyasallarla inkübasyon öncesi ve sonrası süpernatantı hücrelerden uzaklaştırmak için

Termo Scientific Safe 2020 Laminar Air Flow; Hücrelerinin çözdürülüp flakslara ekilmesi, pasajlanması ve kimyasallarla inkübe edilmesi esnasında kullanmak için

Termo Scientific Cell Counter - Hücre sayım cihazı; Eşit sayıda hücre ile grupların oluşturulması, kimyasallarla inkübasyon sonrası analizi yapılacak tüm gruplarındaki örneklerin eşit sayıda ayarlanması

Zeiss Axio Floresan Vert A.1 mikroskop; Flakslara ekilen hücrelerin üremelerinin kontrolü (uygun konfluens oranına ulaşmış ulaşmadıklarını kontrol etmek) amacıyla

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

HAM'S F12 (Biochrom, Almanya)

DMEM (Biochrom, Almanya)

Fetal Bovine Serum (Cegrogen biotech, Almanya)

Trypsin/EDTA (MULTICELL, Canada)

Penicillin Streptomycin (Biochrom, Almanya)

Etil alkol (%70)

Distile Su

1X Phosphate Buffered Saline (PBS, Biochrom, Almanya)

%0,25' lik Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich, ABD)

APOpercentage, Apoptosis Assay (biocolor, U.K.)

APOpercentage Dye Release (biocolor, U.K.)

AC - DEVD - AMC

AC – LEHD - AMC

Dihydrorhodamine 123 (DHR 123, Sigma Aldrich, ABD)

NP-40

Floresan Kaspaz DTT Boyası

5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1, Life Technologies, ABD) Mitokondriyal Membran Depolarizasyon boyası

JC-1 (BioVision, ABD)

Cisplatin – 1911228 (Koçak Farma, Türkiye)

Melatonin (BioVision, ABD)

Capsazepine (Cayman Chemical, ABD)

Capsaicin (Sigma, ABD)

Probenecid (ChemCruz, Netherlands)

FURA-2 AM (BioVision, ABD)

Fura-2 AM (life technologies, ABD)

Pluronic F-127/ 230-50G (BioVision, ABD)

DME/F-12 1:1 (1X) (Cytiva, ABD)

RPMI 1640, w/o L-Glutamine Sterile Filtered (biowest, France)

3.2. Metod

Mevcut laboratuvar analizleri Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi Lisansüstü Araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.2.1 Hücrelerin üretilmesi

3.2.1.1 Medyumların hazırlanması

HGC-27 ve Panc-1 hücrelerinin ekim ve pasajlanmasında hücre hatlarına uygun olarak farklı medyumunlar (HAM'S F12, Biochrom, Almanya ve DMEM, Biochrom, Almanya) ve karışımları kullanıldı. HGC-27 ve Panc-1 hücre hattı besi ortamı; %89 Medyum (DMEM veya %50 HAM'S F12 + %50 DMEM karışımı), %10 Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom, Almanya) ve %1'i PenicillinStreptomycin (Biochrom, Almanya) antibiyotik kombinasyonu olacak şekilde modifiye edildi. Hazırlanan bu karışım bundan sonraki bölümlerde sadece 'medyum' olarak anıldı [105].

3.2.1.2 Laminar akım kabini ve diğer ekipmanların hazırlanması

HGC-27 ve Panc-1 hücrelerinin ekim, pasajlama ve transfeksiyon işlemleri steril Laminar Akım Kabini (Laminar Flow) içerisinde gerçekleştirildi. Tüm işlemlerin öncesinde laminar flowun (MSC 12, Jouan, ABD) kültür kaplarının yüzeyleri ile temas edecek çalışma alanı, 15 dakika boyunca Ultra Viyole (UV) ışığında sterilize edildi. Hücrelerin ekim işlemine geçmeden önce laminar flowun çalışma yüzeyi, inverted mikroskobun (Zeiss, Primo Vert, Almanya) tablası ve diğer tek kullanımlık olmayan malzemeler %70'lik etil alkol ile dezenfekte edildi. HGC-27 ve Panc-1 hücreleri -196 °C sıcaklıkta sıvı nitrojen tankı içerisinde bulunan 2 ml'lik cryo tüplerde (Greiner Bio-One GmbH, Almanya) muhafaza edildi [105].

3.2.1.3 Hücrelerin çözündürülmesi

Hazırlanan medyumdan tek kullanımlık steril pipetler yardımıyla 75 cm²'lik zemin alanına ve 250 ml'lik hacme sahip olan T75 flask (Cell Star, Greiner Bio-One GmbH, Almanya) paketi laminar flow kabini içerisinde açılıp kapakları açılmadan hazır bir şekilde bekletildi. Bunun yanı sıra 15 ml'lik bir falkon tüp içerisine taze medyumdan 9 ml konuldu. HGC-27 ve Panc-1 hücrelerini ihtiva eden cryo tüp sıvı nitrojen tankı içerisinden alınarak sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda (Termal Laboratuvar Aletleri, Türkiye) yarı sıvı yarı buz haline gelinceye kadar ısıtılıp cryo tüp iç

çeperi eriyince ısıtma işlemi sonlandırılarak ve tüpün etrafı %70'lik etil alkol ile silinerek laminar flow kabini içerisine yerleştirildi. Henüz yarı buz-yarı sıvı haldeyken cryo tüp içerisindeki sıvının tamamı daha önceden hazırlanan içerisinde 9 ml medyum bulunan 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Falkon tüp 100G devirde 5 dakika süreyle ve 20-23 °C sıcaklıkta santrifüj (Kubota 2800, Japonya) edildi. Süpernatant hassas bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra dipte kalan hücreler üzerine 10 ml taze medyum eklendi. 20-25 kez hassas bir şekilde resüspense edip hücrelerin homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Pipetaj işlemi bittikten sonra bu falkon tüp içerisindeki hücre-medyum süspansiyonu daha önceden hazırladığımız boş flasklara aktarıldı. Böylece hücrelerin çözme ve ekim işlemleri tamamlandıktan sonra steril inkübatöre alınarak burada 24 - 48 saat inkübe (37 °C ve %5 CO₂) edildi (HF 90, Heal Force, Smart Cell, ABD) [105].

3.2.1.4. Hücrelerin pasajlanması

Hücrelerin, 25 cm² yüzey alanına sahip T25 flasklara (Cell Star, Greiner Bio-One GmbH, Almanya) pasajlandı. Laminar flow kabini içerisinde ambalajları açılan flasklar kapakları açılmadan hazır bir şekilde bekletildi. T75 flasklarda 24 - 48 saat inkübe edilen hücrelerin üreme yoğunlukları (konfluens) inverted mikroskop yardımıyla tespit edilerek en az %80 konfluens olan flasklar çalışmaya dâhil edildi. Ayrıca mikroskopta kontaminasyon olup olmadığı da değerlendirildikten sonra çalışmaya uygun flasklar laminar flowa alındı [105].

HGC-27 ve Panc-1 hücreleri bulundukları kültür kaplarının zeminine tutunma özelliği göstermektedir. Deneysel çalışmaların yapılabilmesi için flask zemininden kaldırılmaları gerekmektedir. Hücrelerin büyütme medyumunu atık toplama şişesine boşaltıldıktan sonra her bir flaskın üzerine yaklaşık 2,5 ml 1X Phosphate Buffered Saline (PBS, Biochrom, Almanya) konularak yavaş hareketlerle hücreler nazikçe yıkandı. Flask içerisindeki PBS pipet yardımıyla hücrelerin bulunduğu flasktan uzaklaştırıldı. Böylelikle ölü hücre artıkları ve ekstraselüler ortamda bulunan toksik metabolitler ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine %0,25' lik Trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, ABD) çözeltisinden flask zeminini kaplayacak miktarda (yaklaşık olarak 1-2 ml) konularak hücrelerin inverted mikroskop ile tutundukları yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Mikroskop ile hücrelerin flask yüzeyden ayrıldıkları tespit edilince flasklar laminar flow kabinine alındı ve üzerlerine 8-9 ml taze medyum eklendikten sonra çok hassas bir şekilde 10-15 kez pipetaj işlemi uygulandı. Pipetaj işlemi bitince hücreler steril

boş bir 15 ml'lik falkon tüpe alınıp. 5 dakika boyunca 100G de santrifüj edildi. Süpernatantlar atık toplama şişesine dökülecek, böylece hücreler %0,25' lik Tripsin-EDTA'dan arındırılmış oldu. Falkon tüpün dip kısmında biriken HGC-27 ve Panc-1 hücre topluluğu üzerine yaklaşık 5 ml medyum eklendikten sonra tek kullanımlık steril bir pipet yardımıyla hassas bir şekilde pipetaj işlemi uygulandı. Daha önceden hazırladığımız ve içerisine 4'er ml medyum aktardığımız T25 flasklara falkon tüpünde bulunan hücre topluluğu-medyum karışımından 1'er ml alınarak eklendi. Flaskların kapağı kapatıldıktan sonra bulunduğu zemin üzerinde öne arkaya ve sağa-sola doğru çok yavaş hareket ettirilerek hücrelerin flask içerisindeki medyuma homojenize bir şekilde dağılması sağlandı. Böylece pasajlama işlemi tamamlanan hücreler beşe bölündükten sonra inverted mikroskopta son kez kontrol edilerek tekrar inkübatöre alınıp kullanılacak kimyasallara uygun sürelerde (24 - 48 saat) inkübe (37 °C ve %5 CO₂) edildi. Süre sonunda hücrelerin %80'den fazla konfluens ulaşması durumunda; 'Hücrelerin Pasajlanması' başlığı altındaki adımlar takip edilerek yeniden pasajlama işlemi yapıldı. Pasajlama işlemi flasklar içerisindeki hücre yoğunluğuna bakılarak her 48-72 saatte bir tekrarlandı [105].

3.2.2. Çalışma grupları

Pasajlama sonucunda deneylere hazır hale getirilen Pankreas kanseri (Pac-1) ve Mide Kanser (HGC-27) hücreleri; kontrol, sisplatin, sisplatin+kapsazepin, sisplatin+melatonin, sisplatin+melatonin+kapsazepin, melatonin ve melatonin+kapsazepin olmak üzere her hücre hattı için 7 gruba ayrılarak çalışma yapıldı.

Grup 1 (Kontrol Grubu): Hücrelere herhangi bir ilaç uygulanmadı. Sadece hücre kültür ortamında 24 saat bekletildi.

Grup 2 (Sisplatin Grubu): Hücreler 5µM sisplatin ile 24 saat inkübe edildi [39].

Grup 3 (Sisplatin + Kapsazepin): Hücrelere 5µM sisplatin uygulanarak 24 saat inkübe edildi ve sonrasında 0.1 mM kapsazepin ile TRPV1 kanalı bloke edildi [39]. (Kapsazepin TRPV1 antagonistidir; 0.1 mM, 30 dakika)

Grup 4 (Sisplatin + Melatonin Grubu): Hücrelere sisplatin (5 µM. 24 saat) ve Melatonin (2 µM, 24 saat) uygulanmıştır [39].

Grup 5 (Sisplatin + Melatonin + Kapsazepin Grubu): Hücrelerde sisplatin (5 µM, 24 saat) ve Melatonin (2 µM, 24 saat) uygulanmıştır. Ardından TRPV1 kanalı Kapsazepin ile bloke edildi (Kapsazepin; 0.1 mM, 30 dakika) [39].

Grup 6 (Melatonin Grubu): Hücrelere melatonin uygulanıp 24 saat inkübe edildi (2µM, 24 saat) [39].

Grup 7 (Melatonin + Kapsazepin Grubu): Hücrelere melatonin (2µM, 24 saat) uygulandıktan sonra TRPV1 bloke edici olan kapsazepin uygulandı (Kapsazepin; 0.1 mM, 30 dakika) [39].

Gruplarda TPV1 kanalları kalsiyum sinyali analizi dışındaki analizler için Ca^{+2} salınımını bloke eden kapsazepin (0.1 mM) 30 dakika uygulandıktan sonra TRPV1 kanalı stimüle edici kapsaisin 0.1mM 10 dakika uygulanarak reaktif oksijen türleri, mitokondriyal depolarizasyon, kaspaz3, kaspaz9 ve apoptozis (programlı hücre ölümü) düzeyi analizleri yapıldı. Kalsiyum sinyal analizlerinde ise hücreler 20. Siklusta 0.1mM kapsaisin ile ekstraselüler sıvı iyon/madde konsantrasyonuna eş hem kalsiyumlu hemde kalsiyumsuz solüsyonlarda TRPV1 kanalları uyarılarak ile kalsiyum sinyali analizleri yapıldı.

3.2.3. Laboratuvar analizleri

3.2.3.1. Hücre içi sitozolik Ca^{2+} ölçülmesi

Kalsiyum sinyali analizlerinde kullanılacak T25 flasklardaki HGC-27 ve Panc-1 hücreleri %0.25' lik Trypsin EDTA ile kaldırıldıktan sonra 2 ml hacimli ependorflara aktararak 100G de 5dk süre ile santrifüj edildi. Daha sonra üstte kalan medium dibe çöken hücrelerden dikkatlice uzaklaştırılarak 1 kez de 1xPBS ile hücreler pipetaj işlemi ile yıkanarak tekrar 100G de 5dk. süre ile santrifüj edildi. Süpernatant tekrar uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 1000 µl hacimde HEPES buffer saline [HBS; 5mM KCl, 10 mM D-glikoz, 1mM $MgCl_2$, 145 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, (1.2 mM). 10 mM HEPES ve %0.1 (w/v) sığır serum albümini (BSA); pH 7.4] içerisine 5µM Fura-2-AM ve % 0.05 Pluronic F-127 konulmuş solüsyonda 1 saat 37 °C de karanlıkta inkübe edildi. İşlemin bitimini takiben hücreler tekrar 100G de 5 dk süre ile santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Fura-2-AM'nin de-esterifikasyonu sağlamak için hücreler her bir kuyucuğa 200 µl HBS solüsyonu içerisinde 2.5 mM probenesid olacak şekilde (her grup eşit hücre sayılarında hem kalsiyumlu hem de kalsiyumsuz HBSS ve probenesid karışımı solüsyon ile iki kez) 37°C de 20 dakika karanlıkta inkübe edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 3×10^4

sayıda hücre gelecek şekilde siyah renkli 96 kuyucuklu plakalara (Grainer Cell Star, Life Sciences ABD) konuldu. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, emisyon dalga boyu 510 nm’de floresan ışık ile uyarılarak her 3 saniyede bir (1 siklus) otomatik enjektörlü kuyucuk okuyucu cihazında (Synergy™ H1, Biotek, ABD) kayıt alındı. Kayıt başladıktan sonraki 20. siklusta otomatik enjektör aracılığıyla her bir kuyucuğa 0.1 mM kapsaisin (TRPV1 kanal agonisti) eklendi ve 50. siklusa kadar kayıt alınmaya devam edildi. Sitozolik Ca^{+2} düzeyi analizi Martinez ve ark.’nın 2016 yılında yapmış oldukları çalışma Uguz ve ark.’nın 2009 yılında yapmış oldukları çalışma ile modifiye edilerek gerçekleştirildi [106,107].

3.2.3.2. Apoptozis analizi

HGC-27 ve Panc-1 hücre hatları için oluşturulmuş her grup için ayrı eppendorflar içerisinde 1 ml 1X PBS ile dilüe edilen izole hücrelerden 150 µl lik hacim, apoptozis testi için alındı. Alınan 150 µl hücre süspansiyonu her bir eppendorfta 50’şer µl’lik gruplar oluşturacak şekilde 3’e bölünerek herbiri üzerine 950 µl 1XPBS koyuldu. Pipetaj yapıldıktan sonra üzerine 5 µl apoptozis boyasından (APOPercentage, Biocolor, İngiltere) ilave edilerek 30 dk süreyle çalkalama cihazında çalkalama işlemine tabii tutuldu. Çalkalama sonrası 4x100 g’de 5 dk süre ile santrifüj edildi. Sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. Üzerine 1X PBS eklenerek tekrar santrifüj işlemi uygulanarak ortamdaki kullanılmayan boyanın fazlası uzaklaştırıldı. Boya uzaklaştırıldıktan sonra 200 µl APOpercentage Dye Release’den eklenip pipetaj işleminden sonra tekrar santrifüj işlemi uygulandı. Süpernatant alınıp sonrasında kuyucuklara aktarılıp 550 nm dalga boyunda Infinite 200 Pro (Avusturya) marka kuyucuk okuyucu cihazında okundu. HGC-27 ve Panc-1 hücre hatlarında her grup için okunan değerler kontrol ile kıyaslanarak hesaplanıp sonuç grafikleri oluşturuldu [108].

3.2.3.3. Hücre içi ROT analizi

Eppendorf içerisinde 1xPBS ile sulandırılmış izole hücrelerden 150 µl’lik hacim alınarak ROT üretim tayini analizi için yapılması için her bir eppendorfta 50’şer µl olacak şekilde 3’e bölünecek ve üzerlerine 950 µl 1XPBS koyuldu. Sonrasında 810 kez pipetaj yapılarak homojen hale getirilip üzerine 1 µl Dihydrorhodamine 123 (DHR 123, Sigma Aldrich, ABD) ROT boyasından konulduktan sonra tekrar 8-10 kez pipetaj işlemi yapıldı. Bu işlemi takiben eppendorflar 30 dk süreyle çalkalamalı su banyosunda 37°C’de inkübe edildi. Süre bitimini takiben 4x100G de 5 dakika boyunca santrifüj edildikten sonrasında

süpernatant atılarak üzerlerine 300 µl 1XPBS koyulup tekrar pipetaj işlemi uygulandı. Her bir plate kuyucuğuna 100 µl hücre süspansiyonu olacak şekilde bölünerek plate reader cihazında (Infinite 200 Pro, Avusturya) 488 nm eksitasyon (uyarım) ve 530 ve 590 nm emisyon dalga boylarında okunup aradaki fark değer olarak belirlendi [108].

3.2.3.4. Mitokondriyal depolarizasyon analizi

Eppendorf içerisinde 1xPBS ile sulandırılmış izole hücrelerden 150 µl'lik hacim alınarak her bir eppendorfta 50'şer µl olacak şekilde 3'e bölünerek üzerlerine 950 µl 1XPBS konulduktan sonra homojen bir karışım sağlanıncaya kadar pipetaj işlemi yapıldı. Üzerine 1 µl 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1, Life Technologies, ABD) mitokondriyal membran depolarizasyon boyasından konularak tekrar pipetaj yapıldı. Eppendorflar 30 dk süreyle çalkalamalı su banyosunda 37°C'de inkübe edildikten sonra süre bitimini takiben 4x100 g de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Sonrasında süpernatant atılarak üzerlerine 300 µl 1XPBS koyularak tekrar pipetaj yapıldı. Her bir plate kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde hücre süspansiyonları bölünerek plate reader'da 488 nm eksitasyon, 590 nm (JC-1 kümeleşmeleri) ve 525 nm (JC-1 monomerleri) emisyon dalga boylarında okunup 590/525 nm emisyon oranıyla sonuçlar hesaplandı. Veriler kontrol grubuna kıyasla nispi artış şeklinde grafiklendirildi [109].

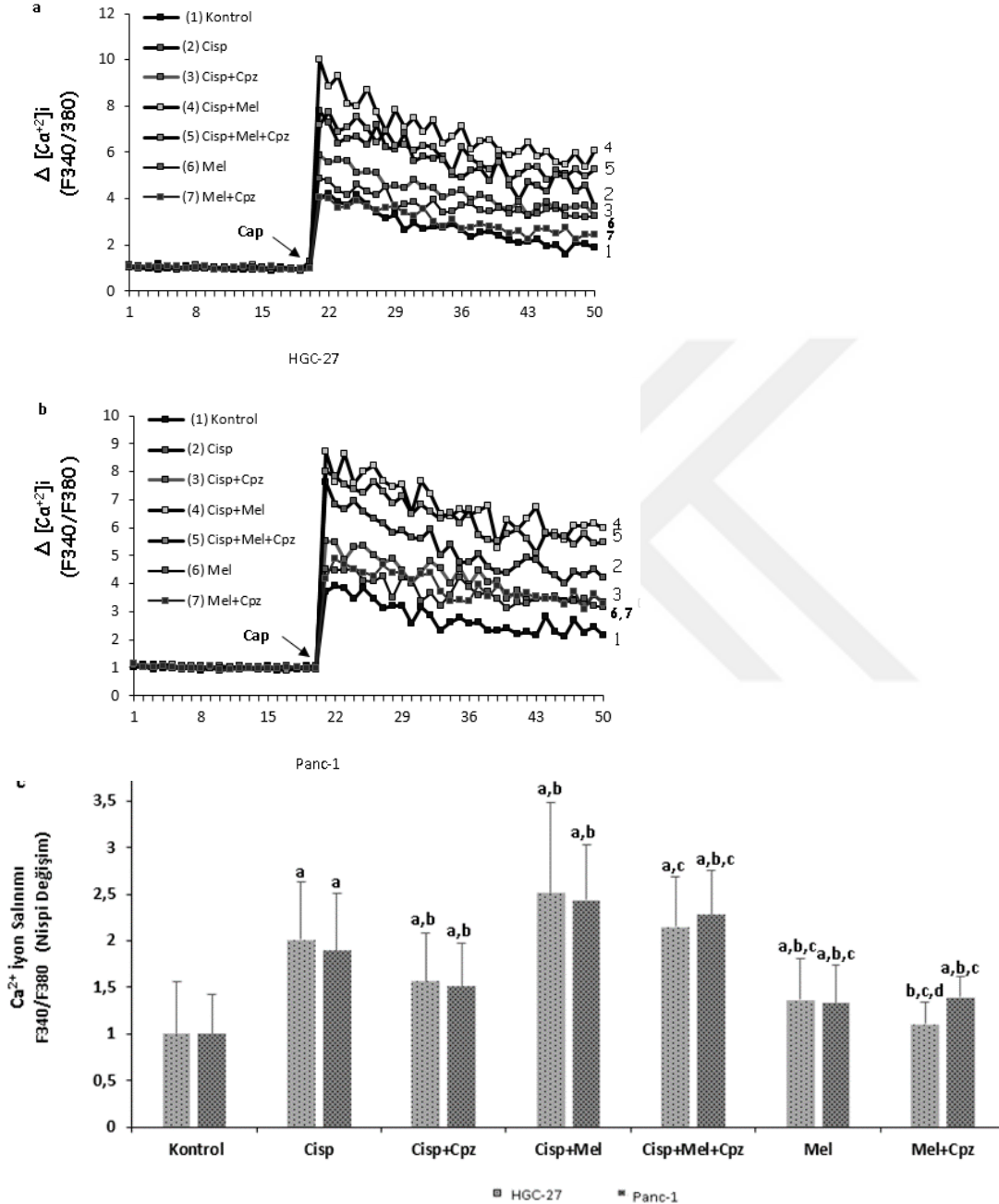
3.2.3.5. Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivitesi analizleri

Kaspaz 3 ve kaspaz 9 substrat tamponlarının hazırlanması için 2,5 ml kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponu ham solüsyonlarından ayrı ayrı 15 ml'lik falkon tüplerine koyuldu. Her 2 tüpe de 2,5 µl NP-40 kimyasalından ilave edildikten sonrasında vortekslenip floresan kaspaz DTT boyasından 12,5 µl koyulup tekrar vortekste karıştırıldı. 1 ml 1XPBS ile seyreltilmiş hücrelerden 150 µl'si kaspaz 9, 150 µl'si kaspaz 3 analizi için ayrılarak çalışıldı. Her iki analiz için de 150 µl hücre süspansiyonu her bir eppendorfta 15 µl olacak şekilde 10 kuyucuğa eşit bir şekilde koyulup üzerlerine öncesinde hazırlayacak olduğumuz kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponlarından 50'şer µl eklendi. Sonrasında açığa çıkan enzimler infinite 200 Pro marka (Avusturya) kuyucuk okuyucu cihazında 360 nm eksitasyon ve 460 nm emisyon dalga boylarında okunarak kaspaz 3 ve 9 enzim aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen veriler kontrole kıyasla misli artış olarak değerlendirildi [109].

4. BULGULAR

4.1. Laboratuvar analiz sonuçları

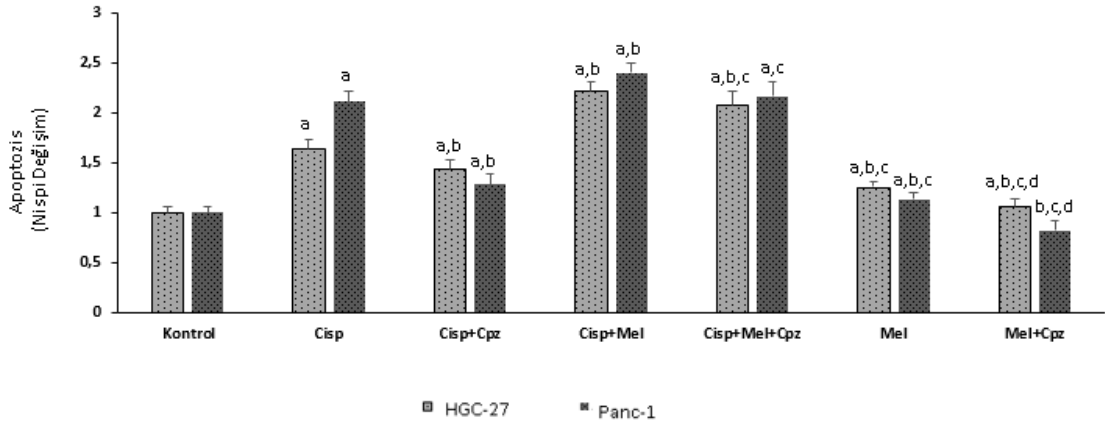
4.1.1 TRPV1 Kanalı ve sitozolik Ca^{2+} iyonu ilişkisi



Şekil. 4.1 (a, b, c): HGC-27 ve Panc-1 hücre hatlarında Sisplatin (5 μ M, 24 saat) ve Melatoninin (2 μ M, 24 saat) TRPV1 kanalı aracılı sitozolik kalsiyum iyonu düzeyine etkisini göstermektedir. Hücreler analizlerden 30 dk. önce TRPV1 kanal inhibitörü olan kapsazepin (Cpz, 0.1 mM) ile inkübe edildi. Analizler esnasında 20. siklusta TRPV1 kanal stimülatörü olan kapsaisin (Cap, 0.1 mM) ile kanal stimülasyonları yapıldı. (Ort $\pm$ SD ve n=3). ^ap<0.001 Kontrol grubuna kıyasla, ^bp<0.001 Cisp grubuna kıyasla, ^cp<0.001 Cisp+Mel grubuna kıyasla, ^dp<0.05 Mel grubuna kıyasla.

HGC-27 ve Panc-1 hücre hattındaki hücrelerde CAP (0.1mM) ile uyarılan TRPV1 kanallarının aktivasyonunun sitozolik Ca^{+2} miktarındaki değişim üzerine etkisi incelenmesi yapıldı. Fura-2 AM ile işaretlenmiş Ca^{+2} bulunan ortamda TPV1 kanalları analiz öncesinde kanal aktivasyonunu net bir şekilde göstermesi amacıyla CPZ (0.1 mM, 30dk.) ile inhibe edildi ve kayıt sırasında CAP (kapsaisin) ile uyarım yapılarak toplamda 150 sn (50 siklus) kayıt alındı ve yaklaşık 41-43 siklus saşamalarında kalsiyum düzeyinin kayıtlarda stabil hale geldiğı görüldü. HGC-27 ve Panc-1 hücrelerinde Sisplatin (5 μ M, 24 saat) ve melatoninin (2 μ M, 24 saat) TRPV1 kanal aracılı sitozolik Ca^{+2} iyon salınımı üzerine etkisi Şekil 4.1.(a,b, c) grafiklerinde gösterilmiştir. Her iki hücre hattında da tüm gruplar kapsaisin ile uyarıldı. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde Kontrol grubuna kıyasla Cisp, Cisp+Mel ve Mel gruplarının hücre içi Ca^{+2} iyonu düzeylerinin daha yüksek olduğu görüldü ($p<0.001$). Cisp grubu ile Cisp+Mel grubu kıyaslandığında Cisp+Mel grubunda hücre içi kalsiyum düzeyinin Cisp grubuna kıyasla daha fazla olduğu görüldü ($p<0.001$). Fakat Cisp grubu ile Mel grupları arasında kıyaslama yapıldığında ise Mel grubunda sitozolik Ca^{+2} iyonu düzeyinin her iki hücre hattında da Cisp grubuna kıyasla daha az olduğu sonucu elde edildi ($p<0.001$). Cisp grubu ile Cisp+Cpz grubu kıyaslandığında ise TRPV1 kanal inhibitörü uygulanan Cisp+Cpz grubunda hücre içi Ca^{+2} düzeyinin her iki hücre hattında da Cisp grubuna kıyasla daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). Cisp+Mel ile Mel grupları kıyaslandığında ise her iki hücre hattında da Mel gruplarında sitozolik kalsiyum düzeyinin daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). Cisp+Mel grupları ile Cisp+Mel+Cpz grupları kıyaslandığında ise Cisp+Mel gruplarında Ca^{+2} düzeyinin daha fazla olduğu görüldü ($p<0.001$). Mel grupları ile Mel+Cpz grupları kıyaslandığında ise HGC-27 hücrelerinde Mel+Cpz grubunda daha az sitozolik Ca^{+2} düzeyi varlığı görülürken ($p<0.05$), Panc-1 hücrelerinde ise Mel grubu ile Mel+Cpz grupları arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmadı. (Değerler; Ortalama $\pm$ Standart Sapma, ^a $p<0.001$ vs kontrol, ^b $p<0.001$ vs Cisp., ^c $p<0.001$ vs Cisp+ Mel, ^d $p<0.05$ vs) [106,107].

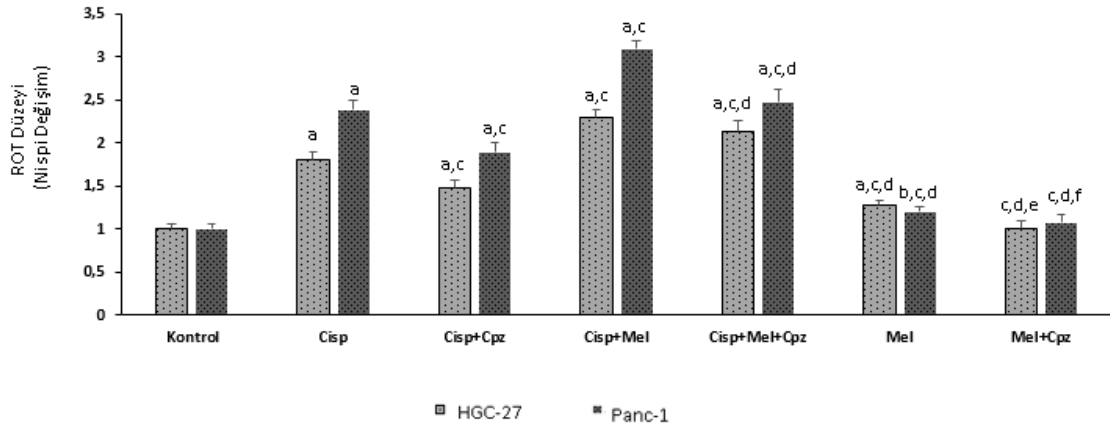
4.1.2. Programlı hücre ölümü (apoptozis) sonuçları



Şekil 4.2. HGC-27 ve Panc-1 hücre hatlarının Sisplatin (5 μ M, 24 saat) ve Melatoninin (2 μ M, 24 saat) TRPV1 kanalı aracılı apoptozis düzeyine etkisini göstermektedir. Hücreler analizlerden 30 dk. önce TRPV1 kanal inhibitörü olan kapsazepin (Cpz, 0.1 mM) ile 10 dk. önce de TRPV1 kanal stimülatörü olan kapsaisin (Cap, 0.1 mM) ile inkübe edildi. (Ort $\pm$ SD ve n=10). ^ap<0.001 kontrol grubuna kıyasla, ^bp<0.001 Cisp grubuna kıyasla, ^cp<0.001 Cisp+Mel grubuna kıyasla, ^dp<0.001 Mel grubuna kıyasla.

HGC-27 ve Panc-1 hücre hatlarının her ikisinde de tüm gruplar kapsaisin ile uyarıldı. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde Kontrol grubuna kıyasla Cisp, Cisp+Mel ve Mel gruplarında apoptozis düzeylerinin daha yüksek olduğu görüldü (p<0.001). Cisp grubu ile Cisp+Mel grubu kıyaslandığında Cisp+Mel grubunda apoptozis düzeyinin Cisp grubuna kıyasla her iki hücre hattında da daha fazla olduğu görüldü (p<0.001). Cisp grubu ile Mel grupları arasında kıyaslama yapıldığında ise Mel grubunda apoptozis düzeyinin her iki hücre hattında da Cisp grubuna kıyasla daha az olduğu görüldü (p<0.001). Cisp grubu ile Cisp+Cpz grubu kıyaslandığında ise TRPV1 kanal inhibitörü uygulanan Cisp+Cpz grubunda programlı hücre ölümü düzeyinin her iki hücre hattında da Cisp grubuna kıyasla daha düşük olduğu görüldü (p<0.001). Cisp+Mel ile Mel grupları kıyaslandığında ise her iki hücre hattında da Mel gruplarında apoptozis düzeyinin daha düşük olduğu görüldü (p<0.001). Cisp+Mel grupları ile Cisp+Mel+Cpz grupları kıyaslandığında ise Cisp+Mel gruplarında apoptozis düzeyinin daha fazla olduğu görüldü (p<0.001). Mel grupları ile Mel+Cpz grupları kıyaslandığında ise HGC-27 ve Panc-1 hücrelerinin her ikisinde de Mel+Cpz grubunda daha az apoptozis düzeyi görüldü (p<0.001) [108].

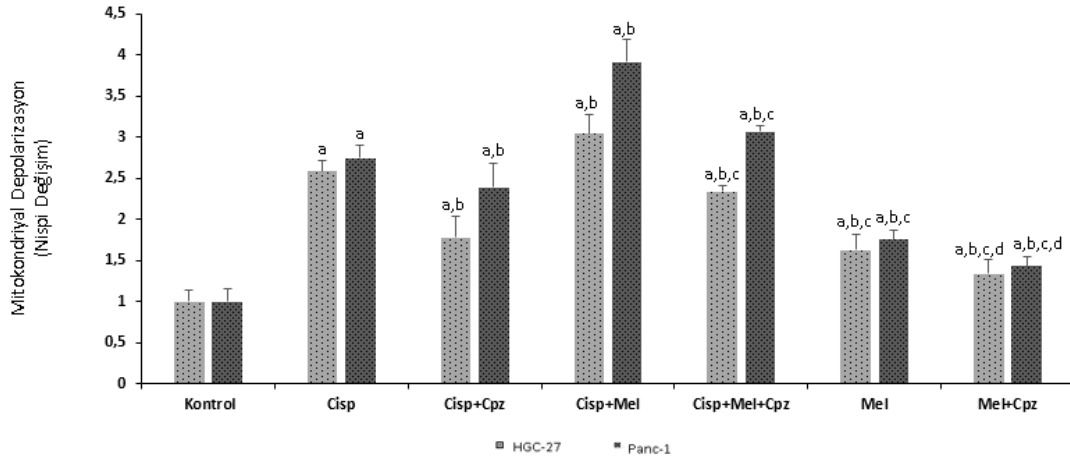
4.1.3. Hücre içi reaktif oksijen türü sonuçları



Şekil 4.3. HGC-27 ve Panc-1 hücre hatlarının Sisplatin (5 μ M, 24 saat) ve Melatoninin (2 μ M, 24 saat) TRPV1 kanalı aracılı hücre içi reaktif oksijen türleri düzeyine etkisini göstermektedir. Hücreler analizlerden 30 dk. önce TRPV1 kanal inhibitörü olan kapsazepin (Cpz, 0.1 mM) ile 10 dk. önce de TRPV1 kanal stimülatörü olan kapsaisin (Cap, 0.1 mM) ile inkübe edildi. (Ort $\pm$ SD ve n=10). ^ap<0.001 ve ^bp<0.05 Kontrol grubuna kıyasla, ^cp<0.001 Cisp grubuna kıyasla, ^dp<0.001 Cisp+Mel grubuna kıyasla, ^ep<0.001 ve ^fp<0.05 vs Mel grubuna kıyasla

HGC-27 ve Panc-1 hücre hatlarının her ikisinde de tüm gruplar kapsaisin ile uyarıldı. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde Kontrol grubuna kıyasla Cisp, Cisp+Mel ve Mel gruplarında reaktif oksijen türleri düzeylerinin daha yüksek olduğu görüldü (p<0.001, p<0.05). Cisp grubu ile Cisp+Mel grubu kıyaslandığında Cisp+Mel grubunda reaktif oksijen türleri düzeyinin Cisp grubuna kıyasla her iki hücre hattında da daha fazla olduğu görüldü (p<0.001). Cisp grubu ile Mel grupları arasında kıyaslama yapıldığında ise Mel grubunda reaktif oksijen türleri düzeyinin her iki hücre hattında da Cisp grubuna kıyasla daha az olduğu görüldü (p<0.001). Cisp grubu ile Cisp+Cpz grubu kıyaslandığında ise TRPV1 kanal inhibitörü uygulanan Cisp+Cpz grubunda reaktif oksijen türleri düzeyinin her iki hücre hattında da Cisp grubuna kıyasla daha düşük olduğu görüldü (p<0.001). Cisp+Mel ile Mel grupları kıyaslandığında ise her iki hücre hattında da Mel gruplarında reaktif oksijen türleri düzeyinin daha düşük olduğu görüldü (p<0.001). Cisp+Mel grupları ile Cisp+Mel+Cpz grupları kıyaslandığında ise Cisp+Mel gruplarında reaktif oksijen türleri düzeyinin daha fazla olduğu görüldü (p<0.001). Mel grupları ile Mel+Cpz grupları kıyaslandığında ise HGC-27 hücrelerinde (p<0.001), Panc-1 hücrelerinde ise (p<0.05) düzeyinde Mel+Cpz gruplarında daha az reaktif oksijen türleri varlığı görüldü [108].

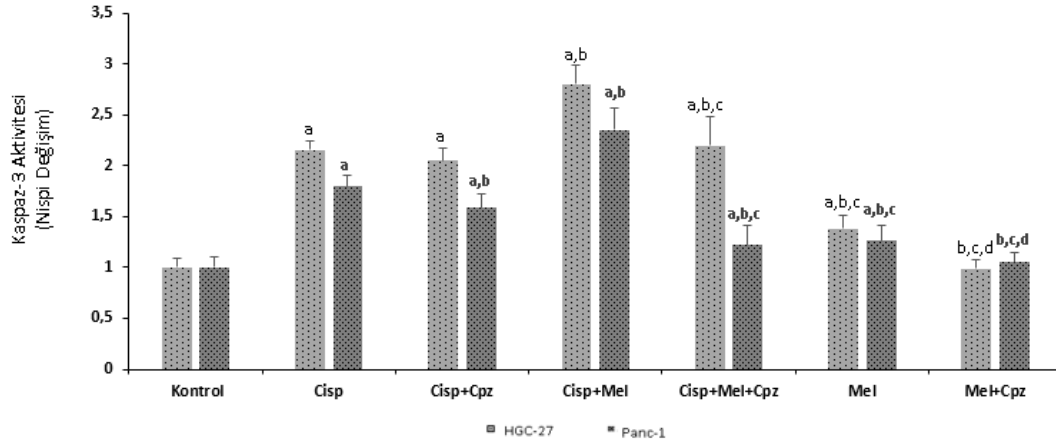
4.1.4. Mitokondriyal depolarizasyon analiz sonuçları



Şekil 4.4. HGC-27 ve Panc-1 hücre hatlarının Sisplatin (5 μ M, 24 saat) ve Melatoninin (2 μ M, 24 saat) TRPV1 kanalı aracılı mitokondriyal depolarizasyon düzeyine etkisini göstermektedir. Hücreler analizlerden 30 dk. önce TRPV1 kanal inhibitörü olan kapsazepin (Cpz, 0.1 mM) ile 10 dk. önce de TRPV1 kanal stimülatörü olan kapsaisin (Cap, 0.1 mM) ile inkübe edildi. (Ort $\pm$ SD ve n=10). ^ap<0.001 Kontrol grubuna kıyasla, ^bp<0.001 Cisp grubuna kıyasla, ^cp<0.001 Cisp+Mel grubuna kıyasla, ^dp<0.001 Mel grubuna kıyasla.

Hücre hatlarının her ikisinde de tüm gruplar kapsaisin ile uyarıldı. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde Kontrol grubuna kıyasla Cisp, Cisp+Mel ve Mel gruplarında mitokondriyal depolarizasyon düzeylerinin daha yüksek olduğu görüldü ($p<0.001$). Cisp grubu ile Cisp+Mel grubu kıyaslandığında Cisp+Mel grubunda a mitokondriyal depolarizasyon düzeyinin Cisp grubuna kıyasla her iki hücre hattında da daha fazla olduğu görüldü ($p<0.001$). Cisp grubu ile Mel grupları arasında kıyaslama yapıldığında ise Mel grubunda mitokondriyal depolarizasyon düzeyinin her iki hücre hattında da Cisp grubuna kıyasla daha az olduğu görüldü ($p<0.001$). Cisp grubu ile Cisp+Cpz grubu kıyaslandığında ise TRPV1 kanal inhibitörü uygulanan Cisp+Cpz grubunda mitokondriyal depolarizasyon düzeyinin her iki hücre hattında da Cisp grubuna kıyasla daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). Cisp+Mel ile Mel grupları kıyaslandığında ise her iki hücre hattında da Mel gruplarında mitokondriyal depolarizasyon düzeyinin daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). Cisp+Mel grupları ile Cisp+Mel+Cpz grupları kıyaslandığında ise Cisp+Mel gruplarında mitokondriyal depolarizasyon düzeyinin daha fazla olduğu görüldü ($p<0.001$). Mel grupları ile Mel+Cpz grupları kıyaslandığında ise HGC-27 ve Panc-1 hücrelerinin her ikisinde de Mel+Cpz grubunda daha az mitokondriyal depolarizasyon düzeyi görüldü ($p<0.001$) [109].

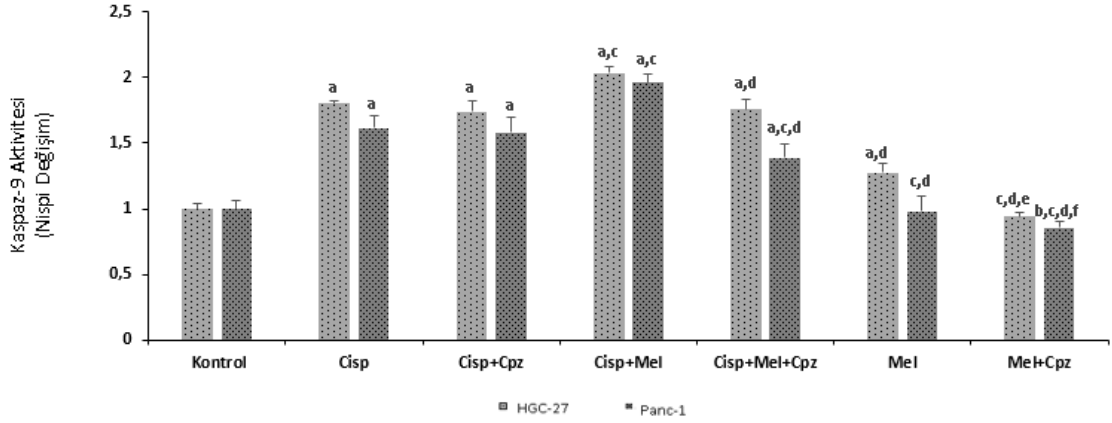
4.1.5. Kaspaz – 3 aktivitesi sonuçları



Şekil 4.5. HGC-27 ve Panc-1 hücre hatlarının Sisplatin (5 μ M, 24 saat) ve Melatonin (2 μ M, 24 saat) TRPV1 kanalı aracılı kaspaz 3 aktivitesi düzeyine etkisini göstermektedir. Hücreler analizlerden 30 dk. önce TRPV1 kanal inhibitörü olan kapsazepin (Cpz, 0.1 mM) ile 10 dk. önce de TRPV1 kanal stimülatörü olan kapsaisin (Cap, 0.1 mM) ile inkübe edildi. (Ort $\pm$ SD ve n=10). ^ap<0.001 Kontrol grubuna kıyasla, ^bp<0.001 Cisp grubuna kıyasla, ^cp<0.001 Cisp+Mel grubuna kıyasla, ^dp<0.001 Mel grubuna kıyasla.

Hücre hatlarının her ikisinde de tüm gruplar kapsaisin ile uyarılmıştır. Kaspaz 3 aktivasyonu sonuçları incelendiğinde Kontrol grubuna kıyasla her iki hücre hattında da Cisp, Cisp+Mel ve Mel gruplarında kaspaz 3 aktivasyon düzeylerinin daha yüksek olduğu görüldü ($p<0.001$). Cisp grubu ile Cisp+Mel grubu kıyaslandığında Cisp+Mel grubunda Kaspaz 3 aktivasyon düzeyinin Cisp grubuna kıyasla her iki hücre hattında da daha fazla olduğu görüldü ($p<0.001$). Cisp grubu ile Mel grupları arasında kıyaslama yapıldığında ise Mel grubunda Kaspaz 3 aktivasyon düzeyinin her iki hücre hattında da Cisp grubuna kıyasla daha az olduğu görüldü ($p<0.001$). Cisp grubu ile Cisp+Cpz grubu kıyaslandığında ise TRPV1 kanal inhibitörü uygulanan Cisp+Cpz grubunda Kaspaz 3 aktivasyon düzeyinin Panc-1 hücre hattında da Cisp grubuna kıyasla daha düşük olduğu görülürken ($p<0.001$), HGC-27 hücre hattında ise Cisp ile Cisp+Cpz grupları arasında istatistiki bir fark görülmedi. Cisp+Mel ile Mel grupları kıyaslandığında ise her iki hücre hattında da Mel gruplarında Kaspaz 3 düzeyinin daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). Cisp+Mel grupları ile Cisp+Mel+Cpz grupları kıyaslandığında ise Cisp+Mel gruplarında Kaspaz 3 aktivasyon düzeyinin HGC-27 ve Panc-1 hücre hatlarında da daha fazla olduğu görüldü ($p<0.001$). Mel grupları ile Mel+Cpz grupları kıyaslandığında ise HGC-27 ve Panc-1 hücrelerinin her ikisinde de Mel+Cpz grubunda daha az kaspaz 3 aktivasyon düzeyi görüldü ($p<0.001$) [109].

4.1.6. Kaspaz – 9 aktivitesi sonuçları



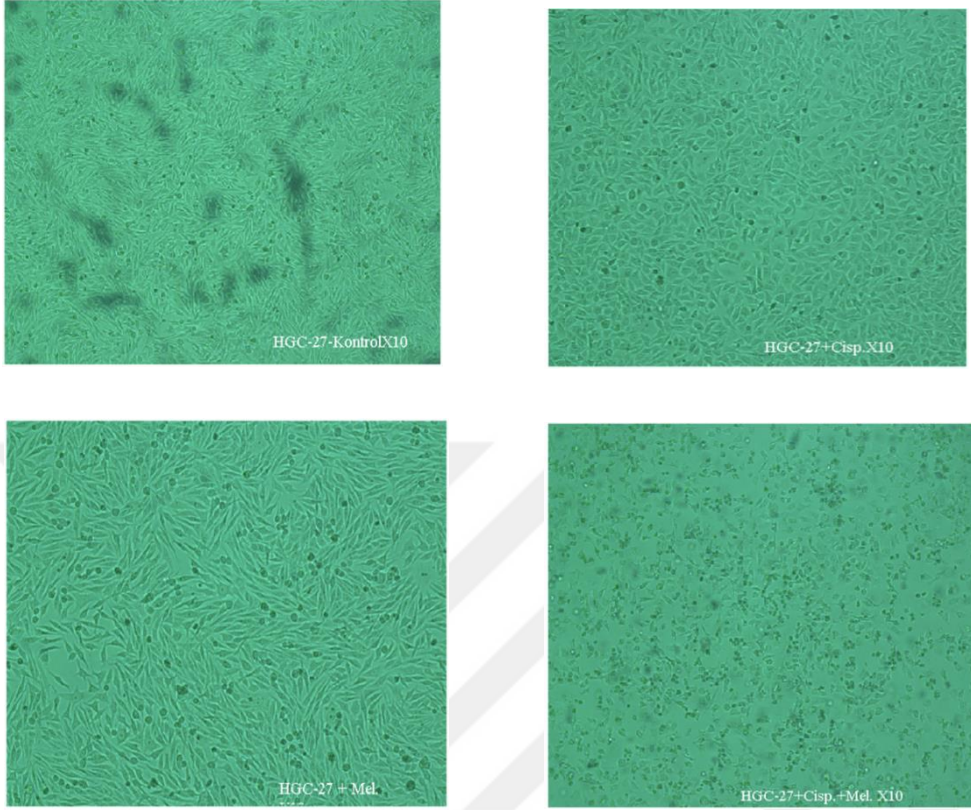
Şekil 4.6. HGC-27 ve Panc-1 hücre hatlarının Sisplatin (5 μ M, 24 saat) ve Melatoninin (2 μ M, 24 saat) TRPV1 kanalı aracılı kaspaz 9 aktivitesi düzeyine etkisini göstermektedir. Hücreler analizlerden 30 dk. önce TRPV1 kanal inhibitörü olan kapsazepin (Cpz, 0.1 mM) ile 10 dk. önce de TRPV1 kanal stimülatörü olan kapsaisin (Cap, 0.1 mM) ile inkübe edildi. (Ort $\pm$ SD ve n=10). ^ap<0.001 ve ^bp<0.05 Kontrol grubuna kıyasla, ^cp<0.001 Cisp grubuna kıyasla, ^dp<0.001 Cisp+Mel grubuna kıyasla, ^ep<0.001 ve ^fp<0.05 Mel grubuna kıyasla.

Hücre hatlarının her ikisinde de tüm gruplar kapsaisin ile uyarılmıştır. Kaspaz 9 aktivasyonu sonuçları incelendiğinde Kontrol grubuna kıyasla her iki hücre hattında da Cisp ve Cisp+Mel gruplarında kaspaz 9 aktivasyon düzeylerinin daha yüksek olduğu görüldü ($p<0.001$). HGC-27 grubunda control grubu ile Mel grubu kıyaslandığında Mel grubunda Kaspaz 9 aktivasyon düzeyinin daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$), fakat Panc-1 hücrelerinde ise Kontrol ve Mel grupları arasında istatistiki olarak herhangi bir fark saptanmadı. Cisp grubu ile Cisp+Mel grubu kıyaslandığında Cisp+Mel grubunda Kaspaz 9 aktivasyon düzeyinin Cisp grubuna kıyasla her iki hücre hattında da daha fazla olduğu görüldü ($p<0.001$). Cisp grubu ile Mel grupları arasında kıyaslama yapıldığında ise Mel grubunda Kaspaz 9 aktivasyon düzeyinin her iki hücre hattında da Cisp grubuna kıyasla daha az olduğu görüldü ($p<0.001$). Cisp grubu ile Cisp+Cpz grubu kıyaslandığında ise TRPV1 kanal inhibitörü uygulanan Cisp+Cpz grubunda Kaspaz 9 aktivasyon düzeyinin HGC-27 ve Panc-1 hücre hatlarında da Cisp grubuna kıyasla daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). Cisp+Mel ile Mel grupları kıyaslandığında ise her iki hücre hattında da Mel gruplarında Kaspaz 9 düzeyinin daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). Cisp+Mel grupları ile Cisp+Mel+Cpz grupları kıyaslandığında ise Cisp+Mel gruplarında Kaspaz 9 aktivasyon düzeyinin her iki hücre hattında da daha fazla olduğu görüldü ($p<0.001$). Mel grupları ile Mel+Cpz grupları kıyaslandığında ise HGC-27

hücrelerinde ($p<0.001$), Panc-1 hücrelerinde ise ($p<0.05$) düzeyinde Mel+Cpz gruplarında daha az kaspaz 9 aktivasyon düzeyi görüldü [109].



5. Mide Kanseri ve Pankreas Kanseri Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri

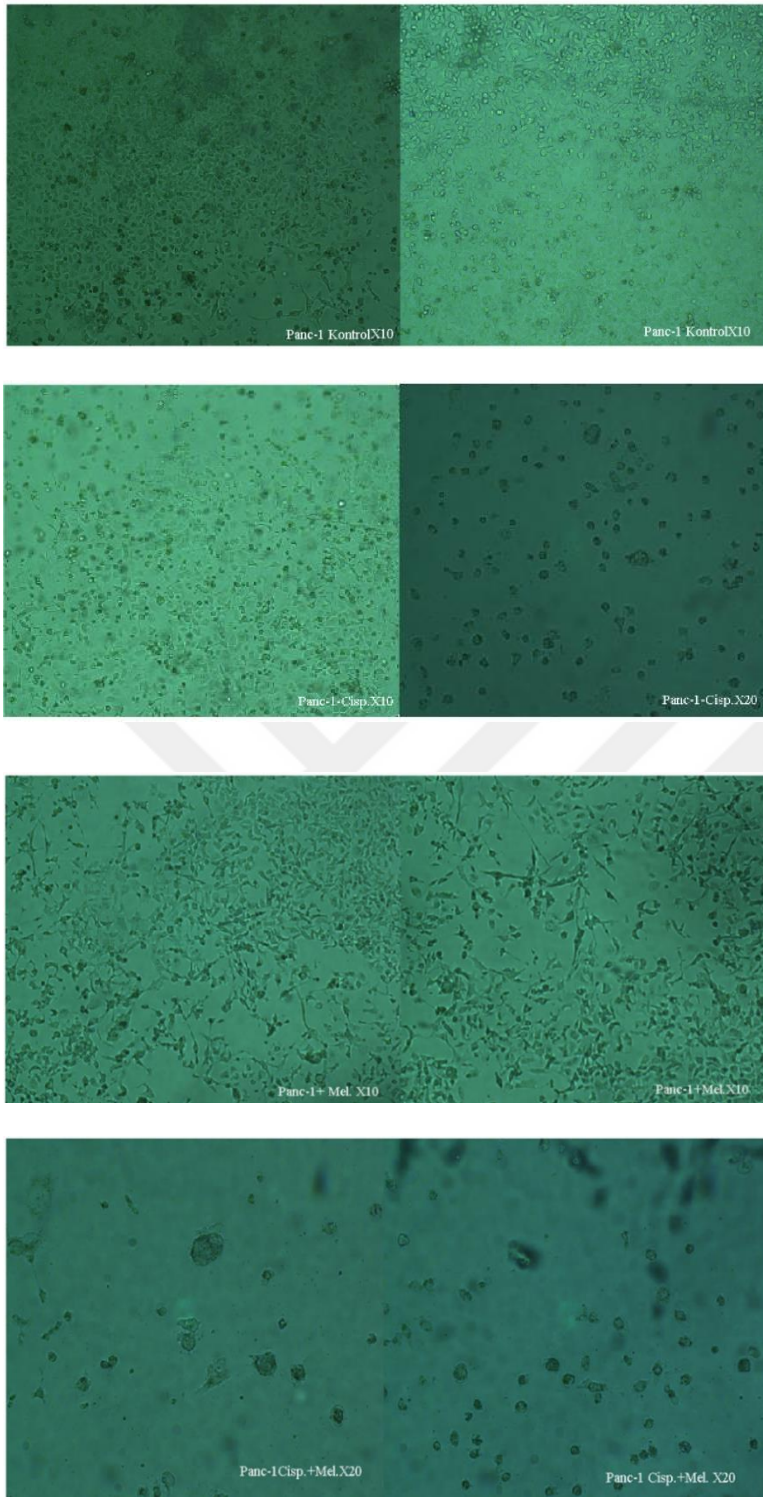


Şekil 5.1 : HGC-27 – Kontrol X10

Şekil 5.2 : HGC-27 + Sisplatin X10

Şekil 5.3 : HGC-27 + Melatonin X10

Şekil 5.4 : HGC-27 – Melatonin + Sisplatin X10



Şekil 5.5 : Panc-1 Kontrol Grubu **Şekil 5.6 :** Pac-1 + Sisplatin X10 / Panc-1 + Sisplatin X20
Şekil 5.7: Pac-1 + Melatonin X10 **Şekil 5.8 :** Pac-1 Sisplatin + Melatonin X20

Mikroskop (Zeiss Axio Floresan Vert A.1) ile her iki hücre hattında da görüntülenme yapılmıştır. Yapılan bu görüntülenmelerde her iki hücre hattında da kontrol grubuna kıyasla melatonin grubunda apoptoza giden hücre sayısı fazla iken sisplatin grubunda ise hem kontrol hem de melatonin grubuna kıyasla daha fazla hücre ölümü gözlemlendi. Sisplatinin melatonin ile kombinlendiği her iki hücre hattı gruplarında ise apoptozise giden hücre sayısı en fazla olduğu gözlemlenmiştir. Mikroskop görüntülemelerinde hücre grupları ile yapılan her iki hücre hattı laboratuvar analizleri ile arasında uyumlu sonuç vermiştir.



6.TARTIŞMA

Kanser, hücrenin kontrol merkezi olarak görev yapan çekirdekte yer alan DNA'nın, çeşitli nedenlerle hasarına bağlı olarak görülen kontrolsüz hücre üremesi olarak tanımlanır [110]. Kanser çocukluk döneminde daha nadir görülen bir hastalık iken, orta ve ileri yaş dönemlerinde ise daha sık görülmektedir. Çocukluk döneminde daha çok lösemi, nöroblastom, glioblastom (beyin tümörü) gibi kanser türleri görülürken yetişkinlerde cinsiyete göre farklılık gösterse de akciğer, kolon, meme, prostat, ovaryum, mide ve pankreas kanserleri değişen oranlarda sıkça görülmektedir. Dolayısı ile çocukluk ve erişkin dönemde görülen kanser türleri farklılık göstermektedir.

Mide kanserinin erkek ve kadınlarda görülme sıklığı dünya geneline bakıldığında 5. sırada olmasına rağmen pankreas kanseri de mide kanseri ile neredeyse aynı görülme sıklığına sahiptir, fakat mortalite oranları pankreas kanserinde mide kanserine göre daha yüksek seyretmektedir. Her iki kanser türünde de ilk etapta kemoterapötik ilaçlar ile sağaltım öngörülürken daha da ilerlemiş vakalarda cerrahi sağaltımda tercih edilebilmektedir. Mide ve Pankreas kanseri tedavilerinde çeşitli kemoterapi ilaçları kullanılsa da, özellikle kemoterapötik ajan olarak sispilatinin ve kombinasyonlarının tercih edilmesi hastalık sağaltımında iyileşme oranını önemli ölçüde artırmaktadır. Sisplatinin etki mekanizması incelendiğinde, kanser hücrelerinde nükleer DNA ya bağlanarak ve transkripsiyonu ve/veya DNA replikasyon mekanizmasını bozarak DNA biyosentezini engeller. Bu işlem gerçekleşirken, diğer taraftan da hücresel fonksiyonların sekteye uğraması neticesinde hücre içi reaktif oksijen/nitrojen türlerinin salınımında artış meydana gelir [111].

Hücresel homeostazisin sağlanmasında hücre içi ve hücre dışı iyon konsantrasyon dengesinin sağlanması mutlak suretle gereklidir. Bu hassas iyonik dengenin sağlanmasında çeşitli aktivasyon mekanizmalarına sahip iyon kanalları ve taşıyıcı protein mekanizmaları görev alır. Bunlardan birisi de Transient Receptor Potential (TRP) kanallarıdır. TRP kanalları da memelilerde 6 farklı subfamilyaya ayrılmış kanallar olup, ısı, pH ve hücrede artan reaktif oksijen türlerinin üretimine bağlı olarak oluşan oksidatif stres ile aktive olmaktadır. TRP Vanilloid 1 (V1) kanalları da oksidatif strese duyarlı olarak aktif olan kanallardır. Diğer taraftan kanser tedavisinde kullanılan sisplatin gibi antineoplastik ajanlar da hücre içi serbest oksijen radikal düzeylerini artırdıklarından TRPV1 kanal aktivasyonuna neden olarak hücre içi iyon dengesinin bozulmasına,

hücrenin apoptozise uğramasına neden olur. Bu durum kemoterapötik ajanların kendi etki mekanizmaları haricinde de dolaylı olarak TRPV1 kanalları üzerinden hücre ölümüne neden olduklarının bir göstergesidir [112].

Bu tez çalışmasında da mide ve pankreas kanser hücrelerinde sisplatin ve melatoninin TRPV1 kanalları aracılı etkileri araştırılmıştır. Sisplatin kullanımının her iki hücre kültüründe de hücre içi serbest kalsiyum düzeylerinin artmasına TRPV1 kanallarının aracılık ettiği, sisplatinle birlikte melatoninin birlikte kullanımının kanal aktivasyonunun daha da arttığı, sonuç olarak da kanser hücrelerinde programlı hücre ölümünü (apoptozis) artırdığı belirlendi. Aynı şekilde Casado Zapico ve arkadaşlarının 2010 yılında kemik kanser hücrelerinde yapmış oldukları çalışmada, melatoninin antineoplastik ilaçlarla kombine kullanımı ile sinerjik etki gösterdiği, intrasellüler apoptotik yolları tetikleyerek daha fazla apoptozise neden olduğu bildirilmiştir. Uğuz ve arkadaşlarının 2012 yılında pankreatik tümör hücrelerinde yapmış oldukları çalışmada da cisplatin ve melatonin kullanımının hücre kültürü ortamında apoptozisi artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca mide kanser hücrelerinde 2015 yılında Li ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada da sisplatinin apoptotik etkisinin melatonin kullanımı ile daha da arttığı, birlikte sinerjik etki gösterdikleri bildirilmiştir. Ancak bizim çalışmamızın aksine, kanser hastaları veya hayvanlarda üzerinde yapılan klinik çalışmalar incelendiğinde melatoninin kemoterapötik ajanların vücutta oluşturacağı toksik etkilerine karşı koruyucu etkinlik gösterdikleri bildirilmiştir (Başak k 2020; Pourhanifeh MH 2020; Lissoni P 1989) [113].

TRPV1 kanalları hücre ve bazı organellerin membranlarında eksprese edilen ve $43\text{ }^{\circ}\text{C} \leq$ ve düşük pH, serbest radikaller ve kapsaisin gibi acı biber özütü ile uyarılabilir (Zhao R 2017, Zhang X 2012). Mevcut tez çalışmasında da sisplatin ve melatoninin ayrı ayrı ve kombine kullanımlarının hücre içi reaktif oksijen radikalleri düzeyini artırdığı ve TRPV1 kanal aktivasyonunu tetiklediği belirlendi. Bu durumun sisplatin ve melatoninin birlikte uygulandığı gruplarda daha fazla olduğu görüldü. Sonuçta kanser hücrelerinde daha fazla mitokondrial depolarizasyon ve akabinde mitokondrial işlev bozukluğuna neden olarak daha fazla TRPV1 kanal aktivasyonuna bağlı gelişen sitozolik kalsiyum iyonu artışına neden olduğu belirlendi. Yapılan mevcut tez çalışmasına benzer olarak Sakallı Çetin ve ark. 'nın 2017 yılında yapmış oldukları bir çalışmada MCF-7 meme kanseri hücrelerinde sisplatin kullanımının kanser hücrelerinde TRPV1 kanal aktivasyonuna neden olarak reaktif oksijen türlerinin düzeyini, hücre içi kalsiyum iyon

düzeyini ve mitokondrial depolariasyonu artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca yine aynı çalışmada kaspaz 9 ve kaspaz 3 düzeylerinin artışına binaen sisplatinin TRPV1 kanalları aracılığı ile apoptozisi tetiklediği bildirilmiştir. Yine Sheth ve ark.'nın 2017 yılında kohlea hücrelerinde yapmış oldukları bir çalışmada sisplatin kullanımının bu hücrelerde reaktif oksijen türlerinin düzeylerini ve mitokondrial disfonksiyona neden olduğu, dolayısı ile TRPV1 kanal aktivasyonuna neden olarak bu hücrelerde apoptozise neden olduğu bildirilmiş, klinik deneylerde de sisplatin kullanımının kohlea hücrelerinde TRPV1 kanal aşırı aktivasyonuna neden olarak hücre ölümüne ve sonuç olarak işitme kaybına neden olabileceği rapor edilmiştir. Ayrıca Shim ve ark.'nın 2019 yılında 7-12 haftalık yetişkin C57BL/6N ırkı farelerde yapmış oldukları bir çalışmada sisplatin kullanımının sinir hücrelerinde reaktif oksijen türlerinde artışa neden olarak oksidatif strese artışa neden olduğunu, oluşan oksidatif stresinde TRPA1 ve TRPV1 kanalları aktivasyonuna neden olarak sinir hücrelerinde hassasiyete ve ağrıya neden olduğu bildirilmiştir [114].

Melatonin ve diğer antioksidan özellikli hormon, madde veya elementler pro-apoptotik veya anti-apoptotik özellikleri dolayısı ile klinik ve hücre kültürü çalışmalarında herhang bir ilaçla veya kemoterapötik ajanlarla birlikte sıkça kullanılmaktadır. Mevcut tez çalışmasında da mide ve pankreas hücrelerinde sisplatinle birlikte melatonin kullanıldı. Melatonin kullanımının sisplatinin kanser hücreleri üzerindeki etkinliğini daha da artırdığı ve bu etkinlikte aşırı TRPV1 kanal aktivasyonunun da hücre içi kalsiyum iyon miktarını artırarak sisplatinin etki mekanizması haricinde dolaylı olarak apoptozisi indüklediği görüldü. Fernandez-Gil ve ark. 'nın 2019 yılında baş ve boyun kanser hücreleri üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada melatoninin sisplatin ile birlikte kullanımının, mitokondrial reaktif oksijen türleri düzeyini artırarak kanser hücrelerinde apoptozisi tetiklediği bildirilmiştir. Yine Plaimée ve ark. 'nın 2015 yılında akciğer adenokarsinom hücrelerinde yapmış oldukları çalışmada da mevcut tez çalışmasına uygun olarak melatonin sisplatinin apoptotik etkinliğini artırdığı ve kanser hücrelerinde anti-proliferatif etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. Fakat Moradi ve ark. 'nın 2021 yılında, Ilbey ve ark. 'nın 2008 yılında sıçanlar üzerine yapmış olduğu çalışmalarda ise sıçan testis hücrelerinde sisplatin toksisitesi üzerine melatoninin koruyucu rolü olduğu ve reaktif oksijen türlerinin üretimini azaltarak apoptozisi engellediği bildirilmiştir. Yine Ali ve ark. 'nın 2020 yılında sıçanlarda yapmış oldukları bir çalışmada sisplatin uygulanan sıçanlarda böbreklerde

nefrotoksisite üzerine melatoninin koruyucu rol üstlendiği ve bu sayede böbrek fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir. Melatoninin koruyucu rolüne ilave olarak Mercantepe ve ark. 'nın 2018 yılında sıçanlarda yapmış oldukları çalışmada melatoninin sisplatinle indüklenen akut böbrek hasarı modelinde koruyucu rolü olduğu, melatoninin nefrotoksisiteyi önlemede önemli katkıları olduğu bildirilmiştir [115].



7.SONUÇ ve ÖNERİLER

Hücrelerde iyon dengesini sağlayan birçok kanal ve taşıyıcı protein mevcuttur. Hastalık oluşum sürecinde ise bu denge bozulur. Bu duruma fizyopatolojik süreç veya tedavide kullanılan ilaçların etki mekanizmaları gibi çeşitli nedenlerle gerçekleşen doğrudan veya dolaylı iyon kanal aktivasyonları neden olmaktadır. TRPV1 kanalları da ısı, pH gibi ve hücrede artan reaktif oksijen türlerinin düzeyine bağlı olarak aktivasyon gösteren kanallardır. Mevcut tez çalışmasında da mide ve pankreas hücrelerinde sisplatin ve melatoninin birlikte ve ayrı kullanımının TRPV1 kanal aracılı mitokondri bağımlı apoptotik mekanizmalar üzerine etkisi araştırıldı.

Sisplatinin tek başına kullanımı haricinde, melatonin ile birlikte kullanımının sinerjik etki oluşturarak kanser hücrelerinde hücre ölümünü (apoptozis) daha fazla tetiklediği belirlendi. TRPV1 kanal aktivasyonu neticesinde sitozolde artan kalsiyum iyon düzeyinin mitokondrial depolarizasyonu tetiklediği, daha fazla mitokondriden reaktif oksijen türlerinin salınımına neden olduğu, sonuç olarak kaspaz 9 ve kaspaz 3 enzim aktivasyonlarına neden olarak apoptozisin artış gösterdiği belirlendi. Gerçekleştirilen kalsiyum sinyali, reaktif oksijen türü düzeyleri, mitokondrial depolarizasyon ile kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktivasyonu ve apoptozis analizlerinde TRPV1 kanal inhibitörü kapsazepin kullanılan gruplarda, kullanılmayan gruplara göre ölçülen değerlerin daha az tespit edilmesi, sisplatin ve melatonin kullanımı ile aktive olan TRPV1 kanallarının, tedavideki dolaylı etkinliğinin belirlenmesi bakımından önemlidir [116,117].

Antioksidan moleküllerin *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalarda doza bağlı farklı etkinlik gösterebilecekleri bilinmektedir. Mevcut tez çalışması da hücre kültürü ortamında gerçekleştirilmiştir. Literatürde ilk kez mide ve pankreas hücrelerinde sisplatin ve melatoninin birlikte kullanılması, sinerjik etkinlik göstermeleri, bu etkinliklerinde TRPV1 kanallarının da aracılık ettiğinin keşfedilmesi gibi yeniliklerin hepsi birlikte değerlendirildiğinde, mevcut tez çalışmasının özgün ve literatüre katkı sunacak potansiyele sahip olduğu anlaşılmaktadır. Ancak benzer deneysel planlamanın deney hayvanları üzerinde de benzer hastalık modelleri oluşturularak uygulanması, sisplatin ve melatonin *in-vivo* deneylerdeki sonuçlarının değerlendirilmesi ve yorumlanması bakımından önemli olabilir [118,119].

KAYNAKÇA

1. Robbins Patoloji 9. Baskı Sayfa 161-162
2. Sağlık Bakanlığı Verileri, 2017
3. World Health Organisation, Locally Advanced Squamous Carcinoma of the Head and Neck, Union Int. Cancer Control Rev. Cancer Med. WHO List Essent. Med, 2014.
4. Prevarskaya N, Zhang L, Barrit G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1772(8): 937-946.
5. Övey IS, Naziroğlu M. Homocysteine and cytosolic GSH depletion induce apoptosis and oxidative toxicity through cytosolic calcium overload in the hippocampus of aged mice: involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Neuroscience*. 2015; 22(284): 225-233.
6. Öz A, Çelik Ö. Curcumin inhibits oxidative stress-induced TRPM2 channel activation, calcium ion entry and apoptosis values in SH-SY5Y neuroblastoma cells: Involvement of transfection procedure. *Mol Membr Biol* 2016; 33 (3–5): 76–88.
7. Yazğan Y, Naziroğlu M. Ovariectomy-Induced Mitochondrial Oxidative Stress, Apoptosis, and Calcium Ion Influx Through TRPA1, TRPM2, and TRPV1 Are Prevented by 17beta-Estradiol, Tamoxifen, and Raloxifene in the Hippocampus and Dorsal Root Ganglion of Rats. *Mol Neurobiol*. 2016; 10. (Epub ahead of print) PubMed PMID:27832523.
8. Logsdon CD, Simeone DM, Binkley C, et al. Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 2649–57.
9. Lowe AW, Olsen M, Hao Y, et al. Gene expression patterns in pancreatic tumors, cells and tissues. *PLoS ONE* 2007; 2: e323.
10. Mahon PC, Baril P, Bhakta V, et al. S100A4 contributes to the suppression of BNIP3 expression, chemoresistance, and inhibition of apoptosis in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 6786–95.
11. Eibl G, Takata Y, Boros LG, et al. Growth stimulation of COX-2-negative pancreatic cancer by a selective COX-2 inhibitor. *Cancer Res* 2005; 65: 982–90.
12. Baril P, Gangeswaran R, Mahon PC, et al. Periostin promotes invasiveness and resistance of pancreatic cancer cells to hypoxia-induced cell death: role of the β 4 integrin and the PI3k pathway. *Oncogene* 2007; 26: 2082–94.
13. Akada M, Crnogorac-Jurcevic T, Lattimore S, et al. Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with decreased expression of BNIP3 in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3094–101.
14. Arumugam T, Simeone DM, Van Golen K, Logsdon CD. S100P promotes pancreatic cancer growth, survival, and invasion. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5356–64.
15. Nakajima S, Doi R, Toyoda E, et al. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4125–33.
16. Ellenrieder V, Hendler SF, Ruhland C, Boeck W, Adler G, Gress TM. TGF- β -induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system. *Int J Cancer* 2001; 93: 204–11.
17. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 415–28.
18. Ambasta RK, Sharma A, Kumar P (2011) Nanoparticle mediated targeting of VEGFR and cancer stem cells for cancer therapy. *Vasc Cell* 3: 26
19. Uguz AC, Cig B, Espino J, Bejarano I, Naziroglu M, Rodríguez AB, Pariente JA. Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. *J Pineal Res* 2012; 53 (1): 91–98.

20. Duff SE, Jeziorska M, Rosa DD, et al. Vascular endothelial growth factors and receptors in colorectal cancer: implications for anti-angiogenic therapy. *European Journal of Cancer*. 2006;42(1):112–117.
21. Espino J, Pariente JA, Rodríguez AB. Role of melatonin on diabetes- related metabolic disorders. *World J Diabetes* 2011; 2 (6): 82–91.
22. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2014;64:9-29. DOI: 10.3322/caac.21208. -DOI – PubMed
23. Lang F, Ritter M, Völkl H, Haussinger D. The biological significance of cell volume. *Ren Physiol Biochem*. 1993;16:48-65.-PubMed
24. Logsdon CD, Simeone DM, Binkley C, et al. Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 2649–57.
25. Lowe AW, Olsen M, Hao Y, et al. Gene expression patterns in pancreatic tumors, cells and tissues. *PLoS ONE* 2007; 2: e323.
26. Mahon PC, Baril P, Bhakta V, et al. S100A4 contributes to the suppression of BNIP3 expression, chemoresistance, and inhibition of apoptosis in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 6786–95.
27. Eibl G, Takata Y, Boros LG, et al. Growth stimulation of COX-2-negative pancreatic cancer by a selective COX-2 inhibitor. *Cancer Res* 2005; 65: 982–90.
28. Baril P, Gangeswaran R, Mahon PC, et al. Periostin promotes invasiveness and resistance of pancreatic cancer cells to hypoxia-induced cell death: role of the β 4 integrin and the PI3k pathway. *Oncogene* 2007; 26: 2082–94.
29. Akada M, Crnogorac-Jurcevic T, Lattimore S, et al. Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with decreased expression of BNIP3 in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3094–101.
30. Arumugam T, Simeone DM, Van Golen K, Logsdon CD. S100P promotes pancreatic cancer growth, survival, and invasion. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5356–64.
31. Ellenrieder V, Hendler SF, Ruhland C, Boeck W, Adler G, Gress TM. TGF- β -induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system. *Int J Cancer* 2001; 93: 204–11
32. P. Maier, L. Hartmann, F. Wenz, and C. Herskind, “Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 1, p. 102, 2016.
33. H. Wang, X. Mu, H. He, and X.-D. Zhang, “Cancer radiosensitizers,” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 39, no. 1, pp. 24–48, 2018.
34. Hiramatsu A, Miwa H, Shikami M, et al. Disease-specific expression of VEGF and its receptors in AML cells: possible autocrine pathway of VEGF/type1 receptor of VEGF in t(15;17) AML and VEGF/type2 receptor of VEGF in t(8;21) AML. *Leukemia and Lymphoma*. 2006;47(1):89–95.
35. R. Marullo, E. Werner, N. Degtyareva et al., “Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions,” *PLoS One*, vol. 8, no. 11, article e81162, 2013
36. J. M. Pascoe and J. J. Roberts, “Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds. I. DNA interstrand cross-linking and cytotoxic properties of platinum(II) compounds,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 23, no. 9, pp. 1359–1365, 1974.
37. D. R. Green, L. Galluzzi, and G. Kroemer, “Metabolic control of cell death,” *Science*, vol. 345, no. 6203, article 1250256, 2014.

38. C. Doerrier, J. A. García, H. Volt et al., "Permeabilized myocardial fibers as model to detect mitochondrial dysfunction during sepsis and melatonin effects without disruption of mitochondrial network," *Mitochondrion*, vol. 27, pp. 56–63, 2016.
39. Zemła A, Grzegorek I, Dziegiel P, Jabłońska K. Melatonin Synergizes the Chemotherapeutic Effect of Cisplatin in Ovarian Cancer Cells Independently of MT1 Melatonin Receptors. *In Vivo*. 2017 Sep-Oct;31(5):801-809. doi: 10.21873/invivo.11133. PMID: 28882945; PMCID: PMC5656852.
40. S. Casado-Zapico, J. Rodriguez-Blanco, G. García-Santos et al., "Synergistic antitumor effect of melatonin with several chemotherapeutic drugs on human Ewing sarcoma cancer cells: potentiation of the extrinsic apoptotic pathway," *Journal of Pineal Research*, vol. 48, no. 1, pp. 72–80, 2010.
41. R. J. Reiter, J. C. Mayo, D.-X. Tan, R. M. Sainz, M. Alatorre-Jimenez, and L. Qin, "Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers," *Journal of Pineal Research*, vol. 61, no. 3, pp. 253–278, 2016.
42. Y. Yamano, K. Uzawa, K. Saito et al., "Identification of cisplatin-resistance related genes in head and neck squamous cell carcinoma," *International Journal of Cancer*, vol. 126, no. 2, pp. 437–449, 2010.
43. Makovec T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol Oncol*. 2019 Mar 28;53(2):148-158. doi: 10.2478/raon-2019-0018. PMID: 30956230; PMCID: PMC6572495.
44. Tadini-Buoninsegni F, Sordi G, Smeazzetto S, Natile G, Arnesano F. Effect of cisplatin on the transport activity of P_{II}-type ATPases. *Metallomics*. 2017 Jul 19;9(7):960-968. doi: 10.1039/c7mt00100b. PMID: 28636017.
45. A. Erez and R. J. DeBerardinis, "Metabolic dysregulation in monogenic disorders and cancer — finding method in madness," *Nature Reviews. Cancer*, vol. 15, no. 7, pp. 440–448, 2015.
46. P. E. Porporato, N. Filigheddu, J. M. B. S. Pedro, G. Kroemer, and L. Galluzzi, "Mitochondrial metabolism and cancer," *Cell Research*, vol. 28, no. 3, pp. 265–280, 2018.
47. D. J. Hausenloy and D. M. Yellon, "Ischaemic conditioning and reperfusion injury," *Nature Reviews. Cardiology*, vol. 13, no. 4, pp. 193–209, 2016.
48. S. Fulda, L. Galluzzi, and G. Kroemer, "Targeting mitochondria for cancer therapy," *Nature Reviews. Drug Discovery*, vol. 9, no. 6, pp. 447–464, 2010.
49. L. Galluzzi, O. Kepp, M. G. V. Heiden, and G. Kroemer, "Metabolic targets for cancer therapy," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 12, no. 11, pp. 829–846, 2013.
50. D. Acuña-Castroviejo, G. Escames, C. Venegas et al., "Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 71, no. 16, pp. 2997–3025, 2014.
51. Casado-Zapico S, Rodriguez-Blanco J, Garcia-Santos G, Martin V, Sanchez-Sanchez AM, Antolin I *et al* (2010) Synergistic antitumor effect of melatonin with several chemotherapeutic drugs on human Ewing sarcoma cancer cells: potentiation of the extrinsic apoptotic pathway. *J. Pineal Res.* 48, 72–80.
52. G. Kroemer, L. Senovilla, L. Galluzzi, F. André, and L. Zitvogel, "Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer," *Nature Medicine*, vol. 21, no. 10, pp. 1128–1138, 2015.
53. Fulda S, Debatin KM (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4798–4811.
54. C. Alonso-González, A. González, C. Martínez-Campa, J. Gómez-Arozamena, and S. Cos, "Melatonin sensitizes human breast cancer cells to ionizing radiation by

- downregulating proteins involved in double-strand DNA break repair,” *Journal of Pineal Research*, vol. 58, no. 2, pp. 189–197, 2015.
55. P. Plaimée, N. Weerapreeyakul, S. Barusrux, and N. P. Johns, “Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells,” *Cell Proliferation*, vol. 48, no. 1, pp. 67–77, 2015.
 56. D. Acuña-Castroviejo, I. Rahim, C. Acuña-Fernández et al., “Melatonin, clock genes and mitochondria in sepsis,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 74, no. 21, pp. 3965–3987, 2017.
 57. R. Reiter, S. Rosales-Corral, D.-X. Tan et al., “Melatonin, a full service anti-cancer agent: inhibition of initiation, progression and metastasis,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 4, p. 843, 2017.
 58. C. Venegas, J. A. García, G. Escames et al., “Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations,” *Journal of Pineal Research*, vol. 52, no. 2, pp. 217–227, 2012. [20]
 59. Y.-X. Lu, D.-L. Chen, D.-S. Wang et al., “Melatonin enhances sensitivity to fluorouracil in oesophageal squamous cell carcinoma through inhibition of Erk and Akt pathway,” *Cell Death & Disease*, vol. 7, no. 10, article e2432, 2016.
 60. Y.-Q. Shen, A. Guerra-Librero, B. I. Fernandez-Gil et al., “Combination of melatonin and rapamycin for head and neck cancer therapy: suppression of AKT/mTOR pathway activation, and activation of mitophagy and apoptosis via mitochondrial function regulation,” *Journal of Pineal Research*, vol. 64, no. 3, article e12461, 2018.
 61. Kelleher FC, Rao A, Maguire A. Circadian molecular clocks and cancer. *Cancer Lett.* 2014 Jan 1;342(1):9-18. doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.040. Epub 2013 Oct 4. PMID: 24099911.
 62. Hebert AS, Dittenhafer-reed KE, Yu W, et al. Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial protein acetylome. *Mol Cell* 2013;49:186-199.
 63. Bochaton T, Crola-da-silva C, Pillot B, et al. Inhibition of myocardial reperfusion injury by ischemic postconditioning requires sirtuin 3-mediated deacetylation of cyclophilin D. *J Mol Cell Cardiol* 2015;84:61-69.
 64. Z. Ma, Y. Yang, C. Fan et al., “Melatonin as a potential anticarcinogen for non-small-cell lung cancer,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 29, pp. 46768–46784, 2016.
 65. Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol* 2007;27:8807-8814.
 66. Pi H, Xu S, Reiter RJ, et al. SIRT3-SOD2-mROS-dependent autophagy in cadmium-induced hepatotoxicity and salvage by melatonin. *Autophagy* 2015;11:1037-1051.
 67. P. J. Hissin and R. Hilf, “A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues,” *Analytical Biochemistry*, vol. 74, no. 1, pp. 214–226, 1976.
 68. Tseng AH, Shieh SS, Wang DL. SIRT3 deacetylates FOXO3 to protect mitochondria against oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 2013;63:222-234.
 69. R. H. Jaskot, E. G. Charlet, E. C. Grose, M. A. Grady, and J. H. Roycroft, “An automated analysis of glutathione peroxidase, S-transferase, and reductase activity in animal tissue,” *Journal of Analytical Toxicology*, vol. 7, no. 2, pp. 86–88, 1983
 70. Fan LL, Sun GP, Wei W, Wang ZG, Ge L, Fu WZ and Wang H: Melatonin and doxorubicin synergistically induce cell apoptosis in human hepatoma cell lines. *World J Gastroenterol* 16(12): 1473-1481, 2010.
 71. Altun A and Ugur-Altun B: Melatonin: Therapeutic and clinical utilization. *Int J Clin Pract* 61(5): 835-845, 2007.

72. Jockers R, Delagrange P, Dubocovich ML, Markus RP, Renault N, Tosini G, Cecon E and Zlotos DP: Update on melatonin receptors: Iuphar review 20. *Br J Pharmacol* 173(18): 2702- 2725, 2016.
73. Danielczyk K and Dziegiel P: mt1 melatonin receptors and their role in the oncostatic action of melatonin. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 63: 425-434, 2009.
74. Barrett P, Conway S and Morgan PJ: Digging deep--structurefunction relationships in the melatonin receptor family. *J Pineal Res* 35(4): 221-230, 2003.
75. Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, PopovskaGorevski M and Dubocovich ML: Mt1 and mt2 melatonin receptors: A therapeutic perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 56: 361-383, 2016. Zemla et al: MT1 Melatonin Receptors in Ovarian Cancer Cells 807
76. Martin- Renedo J, Mauriz JL, Jorquera F, Ruiz- Andres O, Gonzalez P, Gonzalez-Gallego J (2008) Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line. *J. Pineal Res.* 45, 532–540.
77. Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP and Olcese J: International union of basic and clinical pharmacology. Lxxv. Nomenclature, classification, and pharmacology of g protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* 62(3): 343-380, 2010.
78. Jablonska K, Pula B, Zemla A, Kobierzycki C, Kedzia W, Nowak-Markwitz E, Spaczynski M, Zabel M, PodhorskaOkolow M and Dziegiel P: Expression of the mt1 melatonin receptor in ovarian cancer cells. *Int J Mol Sci* 15(12): 23074- 23089, 2014.
79. Gerdin MJ, Masana MI, Rivera-Bermúdez MA, Hudson RL, Earnest DJ, Gillette MU and Dubocovich ML: Melatonin desensitizes endogenous mt2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: Relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *FASEB J* 18(14): 1646-1656, 2004.
80. Nazıroğlu M (2015) Role of melatonin on calcium signaling and mitochondrial oxidative stress in epilepsy: focus on TRP channels. *Tr J Biol* 39:813–821
81. Hiton JK, Rath P, Heisell CV, Beckstein O, Van Horn WD. Understanding thermosensitive TRP channels as versatile polymodal cellular sensors *Biochemistry*. 2015; 54(15): 2401-2413.
82. Taylor-Clark TE. Role of reactive oxygen species and TRP channels in the cough reflex. *Cell Calcium*. 2016; 60(3): 155-162.
83. Riehle M, Tsvetkov D, Gohlke BO, Preissner R, Harteneck C, Gollasch M, Nürnberg B. Molecular basis for the sensitivity of TRP channels to polyunsaturated fatty acids. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2018 Aug;391(8):833-846. doi: 10.1007/s00210-018-1507-3. Epub 2018 May 8. PMID: 29736621; PMCID: PMC6061713.
84. Rychkov GY, Barritt GJ. Expression and function of TRP channels in liver cells. *Adv Exp Med Biol*. 2011;704:667-86.doi: 10.1007/978-94-007-0265-3_35. PMID: 21290321.
85. Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1772(8):93746.doi:10.1016/j.bbadis.2007.05.006.Epub2007Jun2.PMID:17616360.
86. Seeböhm G, Schreiber JA. Beyond Hot and Spicy: TRPV Channels and their Pharmacological Modulation. *Cell Physiol Biochem*. 2021 May 28;55(S3):108-130. doi: 10.33594/0000000358. PMID: 34043299.
87. Santoni G, Farfariello V, Amantini C. TRPV channels in tumor growth and progression. *AdvExpMedBiol*.2011;704:947-67.doi:10.1007/978-94-007-0265-3_49.PMID: 21290335.
88. Tam CW, Mo CW, Yao KM and Shiu SY: Signaling mechanisms of melatonin in antiproliferation of hormone-refractory 22rv1 human prostate cancer cells: Implications for prostate cancer chemoprevention. *J Pineal Res* 42(2): 191-202, 2007.

89. Gao N, Yang F, Chen S, Wan H, Zhao X, Dong H. The role of TRPV1 ion channels in the suppression of gastric cancer development. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020 Oct 2;39(1):206.doi:10.1186/s13046-020-01707-7.PMID:33008449;PMCID: PMC7531167.
90. Abbas MA. Modulation of TRPV1 channel function by natural products in the treatment of pain. *Chem Biol Interact.* 2020 Oct 1;330:109178. doi: 10.1016/j.cbi.2020.109178. Epub 2020 Jul 29. PMID: 32738201.
91. Xia R, Samad TA, Btresh J, Jiang LH, Kays I, Stjernborg L, Dekker N. TRPV1 signaling: mechanistic understanding and therapeutic potential. *Curr Top Med Chem.* 2011;11(17):2180-91. doi: 10.2174/156802611796904843. PMID: 21671876.
92. Huang J, Liu J, Qiu L. Transient receptor potential vanilloid 1 promotes EGFR ubiquitination and modulates EGFR/MAPK signalling in pancreatic cancer cells. *Cell Biochem Funct.* 2020 Jun;38(4):401-408. doi: 10.1002/cbf.3483. Epub 2020 Jan 6. PMID: 31907951.
93. Kuppusamy M, Ottolini M, Sonkusare SK. Role of TRP ion channels in cerebral circulation and neurovascular communication. *Neurosci Lett.* 2021 Nov 20;765:136258. doi:10.1016/j.neulet.2021.136258. Epub 2021 Sep 22. PMID: 34560190; PMCID: PMC8572163.
94. Corrigan F, Mander KA, Leonard AV, Vink R. Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. *J Neuroinflammation.* 2016 Oct 11;13(1):264.doi:10.1186/s12974-016-0738-9.PMID:27724914;PMCID: PMC5057243.
95. Santoni G, Farfariello V, Amantini C. TRPV channels in tumor growth and progression. *Adv Exp Med Biol.* 2011;704:947-67. doi: 10.1007/978-94-007-0265-3_49. PMID: 21290335.
96. Cerny AC, Huber A. Regulation of TRP signalling by ion channel translocation between cell compartments. *Adv Exp Med Biol.* 2011;704:545-72. doi: 10.1007/978-94-007-0265-3_30. PMID: 21290316.
97. Giannelli G, Azzariti A, Sgarra C, Porcelli L, Antonaci S, Paradiso A. ZD6474 inhibits proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology.* 2006;71(4):479–485.
98. Chen X, Lu M, He X, Ma L, Birnbaumer L, Liao Y. TRPC3/6/7 Knockdown Protects the Brain from Cerebral Ischemia Injury via Astrocyte Apoptosis Inhibition and Effects on NF- κ B Translocation. *Mol Neurobiol.* 2017 Dec;54(10):7555-7566. doi: 10.1007/s12035-016-0227-2. Epub 2016 Nov 8. PMID: 27826749.
99. Vega-Vela NE, Osorio D, Avila-Rodriguez M, Gonzalez J, García Segura LM, Echeverria V, Barreto GE (2016) L-type calcium channels modulation by estradiol. *Mol Neurobiol* [Epub ahead of print].doi:10.1007/s12035-016-0045-6
100. Malagarie-Cazenave S, Olea-Herrero N, Vara D, Díaz-Laviada I (2009) Capsaicin, a component of red peppers, induces expression of androgen receptor via PI3K and MAPK pathways in prostate LNCaP cells. *FEBS Lett* 583:141–147
101. Lee CS, Park SY, Ko HH, Han ES (2004) Effect of change in cellular GSH levels on mitochondrial damage and cell viability loss due to mitomycin in small cell lung cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 68, 1857–1867.
102. Bishayee K, Ghosh S, Mukherjee A, Sadhukhan R, Mondal J, Khuda- Bukhsh AR (2013) Quercetin induces cytochrome- c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma: signal cascade and drug- DNA interaction. *Cell Prolif.* 46, 153–163.
103. Zhou Q, Gui S, Wang Y (2014) Melatonin inhibits the migration of human lung adenocarcinoma A549 cell lines involving JNK/MAPK pathway. *PLoS One* 9, e101132. doi:10.1371/journal.pone.0101132.

104. Fic M, Podhorska- Okolow M, Dziegiel P, Gebarowska E, Wysocka T, Drag- Zalesinska M *et al* (2007) Effect of melatonin on cytotoxicity of doxorubicin toward selected cell lines (human keratinocytes, lung cancer cell line A- 549, laryngeal cancer cell line Hep- 2). *In Vivo* 21, 513–518.
105. Plaimee, P., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S., & Johns, N. P. (2015). Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells. *Cell proliferation*, 48(1), 67–77. doi.org/10.1111/cpr.12158
106. Hilmi C, Guyot M, Pagès G (2012) VEGF spliced variants: possible role of anti-angiogenesis therapy. *J Nucleic Acids* doi: 10.1155/2012/162692
107. Uğuz AC, Naziroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, Pariente JA. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol* 2009; 232 (1–3): 15–23.
108. Martínez NA, Ayala AM, Martínez M, Martínez-Rivera FJ, Miranda JD, Silva WI. Caveolin-1 Regulates the P2Y2 Receptor Signaling in Human 1321N1 Astrocytoma Cells. *J Biol Chem* 2016; 291 (23): 12208–12222.
109. Öz A, Çelik Ö. Curcumin inhibits oxidative stress-induced TRPM2 channel activation, calcium ion entry and apoptosis values in SH-SY5Y neuroblastoma cells: Involvement of transfection procedure. *Mol Membr Biol*. 2016;33(3-5):76-88. doi: 10.1080/09687688.2017.1318224.
110. Bejarano I, Redondo PC, Espino J, Rosado JA, Paredes SD, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB. Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res* 2009; 46 (4): 392–400.
111. Arzuman L, Beale P, Chan C, Yu JQ, Huq F. Synergism from combinations of tris(benzimidazole) monochloroplatinum(II) chloride with capsaicin, quercetin, curcumin and cisplatin in human ovarian cancer cell lines. *Anticancer Res*. 2014 Oct;34(10):5453-64. PMID: 25275041.
112. Semenza GL (2002) HIF–1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 8: 62–67.
113. Kallergi G, Markimanolaki H, Giannoukarak V, Papadaki MA, Strati A, et al. (2009) Hypoxia-inducible HIF-1 α and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 11: 84.
114. Vordermark D (2010) Hypoxia-specific targets in cancer therapy: role of splice variants. *BMC Med* 8: 45.
115. Alvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C, Cos S (2012) Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. *J Pineal Res* doi: 10.1111/jpi.12007.
116. Margheri M, Pacini N, Tani A, Nosi D, Sguecco R, et al. (2012) Combined effects of melatonin and all-trans retinoic acid and somatostatin on breast cancer cell proliferation and death: molecular basis for the anticancer effect of these molecules. *Eur J Pharmacol* 681: 34–43.
117. Lissoni P, Barni S, Meregalli S, Fossati V, Cazzaniga M, et al. (1995) Modulation of cancer endocrine therapy by melatonin: a phase II study of tamoxifen plus melatonin in metastatic breast cancer patients progressing under tamoxifen alone. *Br J Cancer* 71: 854–856
118. Lee S, Chen TT, Barber CL, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell*. 2007;130(4):691–703.
119. Lee TH, Seng S, Sekine M, et al. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Medicine*. 2007;4, e186(6):1101–1116.

ÖZGEÇMİŞ

Yüksek Lisans Öğrencisi Ayşegül YUR

Kişisel Bilgiler:

Adı Soyadı : Ayşegül YUR

Eğitim ve Mesleki Gelişimi:

Ankara Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Orta Öğrenim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi / Biyoloji Öğretmenliği, Tezsiz Yüksek Lisans Derecesi ile Mezun (5 Yıl) (2000-2005)

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Lisans Üstü Eğitim (2020-2022)

Alanya Ayşe Melahat Erkin Anadolu Lisesi, Biyoloji Öğretmeni (2005-2007)

Kayseri Erkilet Yatılı Bölge Okulu (2007-2008)

İstanbul Bahçeşehir Eğitimde Nitelik Dershanesi, Biyoloji Öğretmeni – Müd. Yard. (2008-2011)

İstanbul Halkalı Uğur Anadolu Lisesi, Biyoloji Öğretmeni (2017-2019)

Bahçeşehir Koleji, Biyoloji Öğretmeni (2021-)

Yayıncılık; Uğur Eğitim Kurumları 9.-10.-11. Sınıflar Laboratuvar Kitabı,

Uğur Eğitim Kurumları, 12. Sınıf Kaynak Kitabı,

Diğer kaynaklar Soru Yazımı

Yabancı Dil : İngilizce: GRE-GMAT : 150,

TOEFL