



T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SİNİR BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

OKSALİPLATİNİN NEDEN OLDUĞU NÖROPATİK AĞRI VE TRPV1
KANAL AKTİVASYONU ÜZERİNDE SELENYUMUN KORUYUCU
ETKİSİNİN SIÇAN VE HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA MOLEKÜLER
TEKNİKLERLE ARAŞTIRILMASI

Bilal ÇİĞ
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

Tez. No: 171

ISPARTA-2018

KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Sinir Bilimleri**
Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri
tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/05/2018

- Tez Danışman : Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyofizik A.D
- Üye : Prof. Dr. Leman YALÇINTEPE GÜNEŞTUTAR
İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Biyofizik A.D
- Üye : Prof. Dr. Mehmet KARA
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D
- Üye : Doç. Dr. Vedat Ali YÜREKLİ
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Nöroloji A.D
- Üye : Doç. Dr. Ömer ÇELİK
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyofizik A.D

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri
üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa KAYAN
Enstitü Müdürü

BEYAN

“Oksaliplatinin Neden Olduğu Nöropatik Ağrı ve TRPV1 Kanal Aktivasyonu üzerinde Selenyumun Koruyucu Etkisinin Sıçan ve Hücre Kültürü Ortamında Moleküler Tekniklerle Araştırılması” adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Bilal ÇİĞ



Danışman

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU



ÖNSÖZ

Hayatımın en güzel zamanlarını onlarla paylaştığım, şu hayatta en önemli erdemim insanlığa faydalı olmaktır kavramını bana yaşayarak öğreten annem, ablam, kardeşlerim ve rahmetli babama;

Onunla tanıştığım ilk andan itibaren şükürümü artırma vesilem ve hayat arkadaşım sevgili eşim Dr Esranur ve biricik kızım Zeynep Rana'ma;

İdealist yaklaşımlarıyla, ilerigörüşlü fikirleriyle ve bilimselliğiyle ahlaki erdemleri hayatında yaşayarak birleştiren, bu haliyle de bizlere hep örnek olan saygıdeğer hocam, tez danışmanım S.D.Ü. Tıp Fakültesi Biyofizik A.D. Başkanı Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na;

Bölümde sıkıntılarımı paylaştıkça azalttığım ve desteklerini daima hissettiğim başta S.D.Ü. Tıp Fakültesi Biyofizik Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ömer ÇELİK'e ve Biyofizik A.D. Araştırma görevlileri ve teknisyen arkadaşlarıma;

S.D.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne ve üzerimde emeği olan herkese,

Sonsuz Teşekkürler..

Isparta, 2018



Biricik kızım Zeynep Rana'ya ve Sevgili eşim Dr Esranur'a ithaf ediyorum...

Saygılarımla...

Isparta, 2018

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI	ii
BEYAN	iii
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
GRAFİKLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kemoterapi Kaynaklı Periferik Nöropatik Ağrı.....	4
2.2. KKPN ‘nin Etki Mekanizmaları	5
2.3. Nöronal Etki ve İyon Kanalları.....	6
2.4. Nöronal Lif Kaybı.....	7
2.5. Mitokondriyal Değişiklikler.....	7
2.6. Kalsiyum İyonu.....	9
2.7. Apoptoz.....	10
2.8. Kaspazlar.....	11
2.9. TRP Kanalları ve Ağrı	11
2.10. TRP Kanallarının Nosiseptif Süreç Üzerindeki Etkileri	13
2.11. Periferik ve Spinal Süreçlerde TRP Kanallarının Rolü.....	15
2.12. İnflamasyonda TRP Kanallarının Potansiyel Rolü ve Ağrı.....	16
2.13. TRP Kanalları ve KKPN.....	18
2.14. TRPV1 ve Sistein Oksidasyonu	18
2.15. TRPV1 Kanal İnhibisyonu.....	20
2.16. KKPN için Terapötik Seçenekler.....	21
2.17. Antioksidanlar ve Nöroprotektif Maddeler	22
2.18. Selenyum.....	25
2.19. Selenyumun Antioksidan Aktiviteleri.....	28
2.20. Selenyum ve Hüresel Redoks.....	29

2.21. Selenyumun KKPN Üzerine Etkisi.....	29
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	32
3.1. Gereç.....	32
3.1.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler.....	32
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	33
3.2. YÖNTEM.....	34
3.2.1. Oksaliptatin ve Selenyum.....	34
3.2.2. Grupların Oluşturulması.....	41
3.2.3. Sıçan Çalışması.....	41
3.2.4. Hücrelerin Çoğaltılması.....	42
3.2.4.1. Besiyerlerin Hazırlanması.....	42
3.2.4.2. Laminer Kabinde Çalışma Öncesi Hazırlık.....	42
3.2.4.3. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Pasajlanması.....	43
3.2.4.4. Hücrelerin Çalışılması.....	44
3.2.5. Ağrı Testleri.....	45
3.2.6. AKG, SN ve Hipokampus Hücre İzolasyon Aşamaları.....	45
3.2.7. Hücre içi Kalsiyum Sinyali Analizleri.....	46
3.2.8. Elektrofizyoloji.....	47
3.2.9. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi.....	48
3.2.10. Hücre içi ROS Üretimi Tayini.....	49
3.2.11. Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Tayini.....	49
3.2.12. Apoptoz ve Kaspaz Testleri.....	49
3.2.13. TNF- α , IL-1 β ve IL-6 Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	50
3.2.14. İstatistiksel Analiz.....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. Kalsiyum Sinyali Sonuçları.....	51
4.1.1. Sıçanlarda OXPN durumunda Ca ⁺² Sinyali ve Se'nin Etkileri.....	51
4.1.2. AKG Kalsiyum Sinyali Sonuçları.....	51
4.1.3. SN Kalsiyum Sinyali Sonuçları.....	54
4.2. AKG'de Patch-clamp Sonuçları.....	56
4.3. OX Uygulanan Sıçanların AKG ve SN Nöronlarında Se'nin TRPV1 Aracılı Apoptoz Testleri Üzerine Etkileri.....	60
4.3.1. OX Uygulanan Sıçanların AKG ve SN Nöronlarında Se'nin Kaspaz Aktivasyonları, Hücre içi ROS Üretimi ve JC-1 Düzeyi ve Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	61

4.3.1.1. AKG'nin Apoptoz, ROS, Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu, Kaspaz 3&9 ve MTT (Hücre Canlılığı) Analiz Sonuçları	62
4.3.1.2. SN'de Apoptoz, ROS, Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu, Kaspaz 3&9 ve MTT (Hücre Canlılığı) Analiz Sonuçları	66
4.4. OX Kaynaklı Periferal Nöropatik Ağrılı Sıçanlarda Se'nin Ağrı Testleri Üzerine Etkileri	70
4.5. OX Uygulanan Sıçanların AKG ve SN Nöronlarında Se'nin Sitokinler Üzerine Etkileri	72
4.5.1. TNF- α Düzeylerinin Değerlendirilmesi	73
4.5.2. IL-1 β Düzeylerinin Değerlendirilmesi	76
4.5.3. IL-6 Düzeylerinin Değerlendirilmesi	79
4.6. Hücre Kültürü (İn-Vitro) Çalışma Sonuçları	81
4.6.1. MCF-7 Kalsiyum Sinyali Sonuçları	81
4.6.2. OX Uygulanan İnsan Meme Kanseri MCF-7 Hücre Hattında Se'nin TRPV1 Aracılı Etkisinin Apoptoz, ROS, Mitokondriyal Depolarizasyon, Kaspaz -3 -9 ve MTT Sonuçları Üzerindeki Etkisinin Kontrol Kıyaslamalı Olarak Değerlendirilmesi	83
5. TARTIŞMA	89
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	101
7. ÖZET ve ABSTRACT	103
8.KAYNAKLAR	105
EKLER.....	119

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

5-HT	: 5-hidroksitriptamin
ATF3	: Siklik AMP'ye bağılı transkripsiyon faktörü 3
B2	: Bradikinin reseptörü B2
CAP	: Kapsaisin
Cav	: Voltaj-bağımlı kalsiyum kanalı
cGMP	: Siklik GMP
CGRP	: Kalsitonin gen ilişkili peptit.
COX	: Siklooksijenazlar
cPLA2	: Sitolitik fosfolipaz A2
Cpz	: Kapsazepin
CYP	: Sitokrom P450
EETs	: Epoksiyeikosatetraenoik asitler
ERK	: Hücre dışı sinyal düzenlenmiş kinaz
ERK1/2	: Mitojen ile aktive edilmiş protein kinazlar;
ETAR	: Endotelin reseptörü A tipi
FBS	: Fetal Bovine Serum
GDNF	: Glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör
HETEs	: Hidroksieikosatetraenoik asitler
IL-1 β	: İnterlökin 1 Beta
IL-6	: İnterlökin 6
IP3	: İnositol 1,4,5-trisfosfat
İesl	: İntraepidermal sinir lifleri
iPLA2	: Ca ⁺² 'a duyarsız fosfolipaz A2
KCNK	: potasyum kanal alt ailesi K
KKPN	: Kemoterapötik kaynaklı periferal nöropatik ağrı
LK	: Lökotrien
LOX	: Lipoksijenazlar

MTT bromide	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
NADA	: N-arachidonoyopamin
Nav	: Voltaj kapılı sodyum kanalı
NK1	: Nörokinin reseptörü 1
NMDA	: N-metil-d-aspartat
NMDG	: N-methyl-D-glucamin
OCT2	: Çözünen taşıyıcı aile 22 üye 2 (organik katyon taşıyıcı)
OLDA	: N-oleoyildopamin
OX	: Oksaliplatin
OXPB	: Oksaliplatin kaynaklı periferel nöropatik ağrı
P2X7	: P2X purinoceptor 7
PAR2	: Proteazla aktive edilen reseptör 2
PG	: Prostaglandinler
PGE2	: Prostaglandin E2
PI3K	: Fosfoinositid 3- kinaz
PK	: Protein kinaz
PKR	: Prokineticin reseptörü
PLA2	: Phospholipase A2
PLC	: Phospholipase C
Rsv	: Resolvin
Se	: Selenyum
Tnf- α	: Tümör nekroz faktör alfa
TRKA	: Tirozin kinaz reseptörü A
TRP	: Geçici reseptör potansiyeli katyon kanalı
TRPV1	: TRP katyon kanal alt ailesi vanilloid 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kemoterapi ile indüklenen periferik nöropatik ağrı mekanizmaları.....	5
Şekil 2. Primer duyuşal nöronlarda (AKG) kemoterapötük ajanların sebep olduğu nöropatik ağrı gelişiminde rol alan farklı hedefler arasındaki bağlantılı yolların şematik gösterimi.....	7
Şekil 3. KKPN patogenezi ve ilişkili morfolojik değişiklikler	8
Şekil 4. Nosiseptör nöronlarda TRP kanallarının rollerinin gösterimi	16
Şekil 5. İnflamasyondan kaynaklanan TRP kanallarındaki değişiklikler	17
Şekil 6. TRP kanal modülasyonunda rol oynayan lipid metabolitleri	21
Şekil 7. KKPN’de farklı ve örtüşen mekanizmalar	22
Şekil 8. OX’un neden olduğu nörotoksisitenin patogenezinin mekanizması	24
Şekil 9. Se’nin metabolik yolunun şematik olarak ifade edilmesi.....	26

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. CELDACH 100 mg Oxaliplatin, Sodium Selenite Sigma S5261.	34
Resim 2. Von-Frey filamentleri.	35
Resim 3. MCF-7 İnsan meme kanseri hücre hattı inverted mikroskop görüntüsü	35
Resim 4. Hücreler için solüsyonların içinde bulunduğu +4 C° 'lik buzdolabı	36
Resim 5. Hücreleri çoğalttığımız (37 C°, %5 CO ₂) sıvı ceketli inkübatör	36
Resim 6. Santrifüj cihazı ve inverted mikroskop.....	37
Resim 7. Hücreleri dondurarak sakladığımız sıvı nitrojen tankı (-196 C°)	37
Resim 8. 37 C° 'lik çalkalamalı su banyosu	38
Resim 9. Hücre kültürü ortamındaki Laminer flow cihazı.	38
Resim 10. Primer hücre izolasyonu yaptığımız Laminer flow.....	38
Resim 11. Casy TT system hücre sayım cihazı.	39
Resim 12. Cary Eclips Kalsiyum sinyali cihazı.....	39
Resim 13. AKG nöron hücresine patch-clamp pipeti temas ederken	40
Resim 14. Patch-clamp seti, Faraday kafesi ve Puller cihazı	40

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. AKG hücrelerinin CAP (10 µM) ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan kalsiyum konsantrasyonundaki $[Ca^{+2}]_i$ zamana göre değişimi.....	52
Grafik 2. AKG hücrelerinin CAP (10 µM) ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan toplam kalsiyum miktarı $[Ca^{+2}]_i$ nM olarak ifade edilmesi.....	53
Grafik 3. AKG hücrelerinin CAP (10 µM) ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan toplam kalsiyum miktarı % olarak ifade edilmektedir	53
Grafik 4. SN hücrelerinin CAP (10 µM) ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan kalsiyum miktarının $[Ca^{+2}]_i$ zamana göre değişimi ifade edilmektedir.	54
Grafik 5. SN hücrelerinin CAP (10 µM) ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan toplam kalsiyum miktarı $[Ca^{+2}]_i$ nM olarak ifade edilmektedir	55
Grafik 6. SN hücrelerinde sitozole akan toplam kalsiyum miktarının (%) olarak ifade edilmesi	55
Grafik 7. Patch-clamp kontrol kaydı AKG duyuşal nöron hücrelerinden alınan orijinal kayıttır.	57
Grafik 8. Patch-clamp Kontrol+CAP grubu: OX uygulanmayan sıçan grubundan izole edilen hücrelerden alınan bu kayıta agonist olarak kapsaisin (CAP), antagonist olarak ise kapsazepin (Cpz) kullanılmıştır.	57
Grafik 9. Patch-clamp Kontrol+CAP grubu için I-V grafiğı	58
Grafik 10. Patch-clamp OX+CAP grubu (haftada 2 kez olmak üzere 4 hafta süreyle intraperitoneal OX enjekte edilen gruptaki sıçanlardan elde edilen AKG hücreleri)	58
Grafik 11. Patch-clamp OX+CAP grubu için I-V grafiğı.....	59
Grafik 12. Patch-clamp OX+CAP+Se grubu için alınan kayıt grafiğı	59
Grafik 13. Patch-clamp Se grubu için alınan kayıt grafiğı	59
Grafik 14. AKG'den alınan TRPV1 kanal akım yoğunluklarının sütun grafiğı olarak gösterimi. Parantez içindeki sayılar, n sayıdaki grupları belirtmektedir.....	60
Grafik 15. Sıçan AKG primer duyuşal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se 'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin apoptoz testi açısından değerlendirilmesi	62
Grafik 16. Sıçan AKG primer duyuşal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se 'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin ROS (reaktif oksijen türleri) testi açısından değerlendirilmesi.....	63
Grafik 17. Sıçan AKG primer duyuşal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se 'nin TRPV1 aracılı	

koruyucu etkisinin mitokondriyal membran depolarizasyon (JC-1) testi açısından değerlendirilmesi	63
Grafik 18. Sıçan AKG primer duyusal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se 'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin kaspaz 3 testi açısından değerlendirilmesi	64
Grafik 19. Sıçan AKG primer duyusal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se 'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin kaspaz 9 testi açısından değerlendirilmesi	65
Grafik 20. Sıçan AKG primer duyusal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se 'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin hücre canlılığı (MTT) testi açısından değerlendirilmesi	65
Grafik 21. Sıçan SN primer duyusal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se 'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin apoptoz testi açısından değerlendirilmesi	66
Grafik 22. Sıçan SN primer duyusal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se 'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin ROS (reaktif oksijen türleri) testi açısından değerlendirilmesi.....	67
Grafik 23. Sıçan SN primer duyusal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se 'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin mitokondriyal membran depolarizasyon (JC-1) testi açısından değerlendirilmesi.....	68
Grafik 24. Sıçan SN primer duyusal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se 'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin kaspaz 3 testi açısından değerlendirilmesi	68
Grafik 25. Sıçan SN primer duyusal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se 'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin kaspaz 9 testi açısından değerlendirilmesi.....	69
Grafik 26. Sıçan SN primer duyusal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se 'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin hücre canlılığı (MTT) testi açısından değerlendirilmesi.....	70
Grafik 27. Bu grafik OX ile muamele edilen sıçanlarda Von-frey testi 'nin pençe geri çekme kuvveti üzerindeki selenyum (Se) tedavisinin etkisini kontrol ile kıyaslamalı olarak ifade etmektedir.	71
Grafik 28. Bu grafik OX ile muamele edilen sıçanlarda Hot-plate testinin pençe geri çekme eşik zamanı üzerindeki selenyum (Se) tedavisinin etkisini kontrol ile kıyaslamalı olarak ifade etmektedir.	72
Grafik 29. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se 'nin TNF- α düzeyleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi.....	74
Grafik 30. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se 'nin TNF- α düzeyleri üzerindeki etkisinin % olarak değerlendirilmesi.	75

Grafik 31. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se ‘nin TNF- α düzeyleri üzerindeki etkisinin alan olarak değerlendirilmesi.	75
Grafik 32. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se ‘nin IL-1 β düzeyleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi.	77
Grafik 33. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se ‘nin IL-1 β düzeyleri üzerindeki etkisinin % olarak değerlendirilmesi.	78
Grafik 34. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se ‘nin IL-1 β düzeyleri üzerindeki etkisinin alan olarak değerlendirilmesi.	78
Grafik 35. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se ‘nin IL-6 düzeyleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi.	79
Grafik 36. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se ‘nin IL-6 düzeyleri üzerindeki etkisinin % olarak değerlendirilmesi.	80
Grafik 37. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se ‘nin IL-6 düzeyleri üzerindeki etkisinin alan olarak değerlendirilmesi.	80
Grafik 38. MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin CAP (10 μ M) ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan kalsiyum konsantrasyonundaki [Ca ²⁺] _i zamana göre meydana gelen değişim tüm gruplar için ifade edilmektedir .	82
Grafik 39. MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin CAP (10 μ M) ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan toplam kalsiyum miktarı [Ca ²⁺] _i nM olarak ifade edilmektedir	82
Grafik 40. MCF-7 hücrelerinin CAP (10 μ M) ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan toplam kalsiyum miktarı % olarak ifade edilmektedir	83
Grafik 41. MCF-7 hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan oksidatif stres durumu üzerine Se ‘nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin apoptoz testi açısından değerlendirilmesi.....	84
Grafik 42. MCF-7 hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan oksidatif stres durumu üzerine Se ‘nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin ROS açısından değerlendirilmesi.....	85
Grafik 43. MCF-7 hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan oksidatif stres durumu üzerine Se ‘nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin mitokondriyal membran depolarizasyon açısından değerlendirilmesi	85
Grafik 44. MCF-7 hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan oksidatif stres durumu üzerine Se ‘nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin kaspaz 3 açısından değerlendirilmesi.....	86

- Grafik 45.** MCF-7 hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan oksidatif stres durumu üzerine Se 'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin kaspaz 9 açısından değerlendirilmesi..... 87
- Grafik 46.** MCF-7 hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan oksidatif stres durumu üzerine Se 'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin hücre canlılığı açısından değerlendirilmesi 87



1. GİRİŞ

Kanser, kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize bir hastalık sınıfıdır. Birbirinden farklı yüzden fazla kanser türü vardır ve her biri başlangıçta etkilenen hücre tipine göre sınıflandırılırlar. Değişen hücreler kontrolsüz bir şekilde bölündüğünde, kanserler tümör adı verilen doku kitlelerini oluşturmak üzere bölünürler. Tümörler sindirim, sinir ve dolaşım sistemlerine dönüşebilir; bunlara müdahale edebilir ve vücut fonksiyonlarını değiştiren hormonları serbest bırakabilirler. Bir noktada kalan ve sınırlı büyüme gösteren tümörler genellikle iyi huylu olarak kabul edilir.

Kemoterapi ise kontrolsüz büyüme karakteristiğindeki bu kanser hücrelerini durdurmak için kullanılan bir kanser tedavisidir. Kemoterapi, kanser hücrelerinin büyümesini durdurarak veya yavaşlatarak çalışır. Fakat bu ilaçların sinir sistemi üzerinde önemli düzeyde olumsuz etkileri vardır. Birbirinden farklı bu etkiler nörotoksik, nöroinflamatuvar ve periferik nöropatik ağrı olarak sıralanmaktadır. Bu nöropatik ağrının önlenmesi veya tedavisi için potansiyel olarak hedef olabilecek patogenez bu ilaçların ortak noktasıdır. Oksaliplatin bu kemoterapötik ajanlardan biridir. Oksaliplatin, kolorektal kanser tedavisinin ayrılmaz bir bileşeni, onaylanmış üçüncü nesil platin bazlı bir kemoterapi ajanıdır ancak klinik kullanımı doz sınırlayıcı periferik nöropatik ağrı ve nörotoksisite ile ilişkilidir. Oksaliplatin kaynaklı periferik nöropatik ağrı (OXPN), tedavi sırasında hastaların %80'inde görülen ciddi bir yan etkidir. Bu yan etkiler hastaların ekseriyetle yaşadığı kas krampları, çene spazmları, parestezi olarak ortaya çıkmaktadır ve bunların hepsi soğuk maruziyeti ile daha da kötüleşip kronikleşebilmektedir. İşte bu durum, sitostatiklerin tolere edilebilen dozunu sınırlar ve kemoterapi tedavisinin kesilmesine dahi neden olabilir. Ayrıca bu semptomlar tedavinin kesilmesinden sonra dahi ilerleyebilmektedir (1).

Bu tez çalışmasında OXPN tedavisinde halihazırda kullanılan aneljeziklerin başarısız olması terapötik veya önleyici stratejiler olarak tartışıldı ve kemoterapötik ilaçlardan oksaliplatin (OX) ile ilişkili OXPN için bireyselleştirilmiş, mekanizmaya dayalı tedavinin gerekliliği üzerinde duruldu. OXPN'de ilaç etkinliğini diğer nöropatik ağrı durumlarından bağımsız olarak değerlendirmek gerekmektedir. Çünkü bu kemoterapötik ajan, diğerlerinden

farklı olarak iyon kanalları üzerinde etkindir ve OXPN'nin hücrel mekanizmaları, diğer platin bazlı kemoterapötikler tarafından uyarılan nöropatik ağrı mekanizmalarından biraz farklıdır. Oksaliplatin, ligand kapılı ve voltaj kapılı iyon kanallarının artmış aktivasyonu gibi daha ciddi nöronal etkilere sahiptir. Hücrelerin içinde oksaliplatin, oksalat ve platine indirgenir. Oksalat, hücre içi kalsiyum iyonunu (Ca^{+2}) şelat haline getirir ve nöronal membran potansiyelinde ve voltaj kapılı iyon kanallarının aktivasyonlarında bozulmalara neden olur (2).

Kemoterapötik ajanlar, arka kök gangliyonundaki (AKG) ve arka boynuz nöronlarının plazma membranında lokalize iyon kanallarını, sitozolik iyonik çevreyi ve özellikle de hücre içi bu kalsiyum iyon konsantrasyonunu değiştirerek nöropatik ağrıyı tetikleyen sekonder değişiklikleri başlatır. (3). Ca^{+2} , birçok hücrel fonksiyonun modülasyonunda çok önemli sekonder haberci olarak rol oynar. Ca^{+2} iyonunun sitozolde aşırı düzeydeki artışı hücredeki fizyolojik fonksiyonlara zarar verir. Bu durum hücrel oksidatif stres oluşumu ve apoptozun önemli bir nedeni olarak karşımıza çıkar (4). Sinir hücrelerinde kalsiyum kanallarının aşırı aktivasyonu neticesinde hücre içi kalsiyum iyon konsantrasyonunda [Ca^{+2}]_i önemli düzeydeki artışın nöropatik ağrının patofizyolojisindeki katkısı bilinen bir konudur. Bu kalsiyuma geçiren katyon kanallarından biri de geçici reseptör potansiyeli (TRP) kanal ailesidir. TRP alt familyasından vanilloid 1 (TRPV1), ilk olarak duyuşal nöronlarda ekspresyonları bildirilen bir alt üyedir. Ayrıca bu kanallar oksidatif stres, sıcaklık (43 °C) ve kırmızı acı biber (kapsaisin) gibi çeşitli uyarılara yanıt verirler.

Hücreleri çevreleyen redoks ortamı, reaktif oksijen türlerinin hızlı üretimi nedeniyle değişir. TRPV1 oksidasyon algısında, sistein oksidasyonu temel mekanizma olarak kabul edilmiştir. TRPV1'deki Sistein kalıntılarının, hücrel koşullarda kolay erişilebilir ve modifiye edilebilen, ağırlıklı olarak serbest tiyollere sahip olduğu bilinmektedir. TRPV1 aktivasyonunda bu tiyol (thiol) gruplarının oksidasyonu önemli bir role sahiptir. Selenyum, sistein redox sistemini destekleyerek kanalın yapısındaki tiyol gruplarının oksidasyonunu önleyerek Ca^{+2} girişini ve dolayısıyla da nöropatik ağrıyı baskılar (5).

Sık görülen patojenik durumlardan biri de oksaliplatin kaynaklı OXPN sırasında kuvvetli bir inflamatuvar bileşen içermesidir. Bu inflamatuvar bileşen, tümör nekroz faktörü (TNF- α) ve Interlökinler (IL-1 β ve IL-6) gibi pro-aljezik mediyatörlerin üretilmesine ve salınmasına yol açan spinal kord'un dorsal boynuzundaki mikrogliya, astrositler ve uydu hücrelerinin aktivasyonundan kaynaklanır. OXPN'de yer alan mekanizmalar arasında aksonal transportun bozulması, iyon kanalı ve reseptör aktivitesinin değişmesi, nöronal hasar ve inflamasyon, oksidatif stres ve mitokondriyal hasar yer alır. OXPN'nin mekanizmaya dayalı tedavisi için öneriler incelenecek olursa, geliştirilecek ilaçların, oksaliplatin'in neden olduğu OXPN'ye karşı iyon kanalları odaklı nöroprotektif, anti-inflamatuvar maddelerin kombinasyonunu içermesi gerektiği anlaşılmaktadır (6,7).

Yukarıda bahsedildiği gibi TRPV1 katyon kanalı aktivasyonunda tiyol sistein gruplarının oksidasyonunun büyük önemi varken, Se'de tiyol redoks sisteminin önemli bir üyesi olarak TRPV1 inhibisyonu etkisi yapabilir ve hücre içi Ca⁺² girişini düzenleyerek OX'un neden olduğu periferik nöropatik ağrıyı, inflamasyonu ve apoptozu önleyebilir. Yaptığımız literatür taramasında Se'nin OX'un neden olduğu TRPV1 kanal aktivasyonu üzerinde yapılmış bir moleküler düzeyde bir çalışmanın olmadığını gözlemledik.

Bu tez çalışmasında son veriler ışığında hayvan modeli ve hücre kültürü (MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı) ortamlarında Se'nin TRPV1 katyon kanalları aracılığıyla OXPN'deki rolünü değerlendirdik. OXPN durumunda TRPV1 katyon kanallarının aşırı aktivasyonu ve neticede hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artışı ve bu artış ile tetiklenen kaspazlar, ROS (reaktif oksijen türleri), mitokondriyal membran depolarizasyon (JC-1) düzeylerinin değişimi ve apoptotik yolların aktivasyonu gibi konuları ele aldık. Periferik duyuşal nöron hücrelerinde (Arka kök gangliyonu AKG, Siyatik sinir SN) pro-aljezik belirteçler olan sitokin düzeylerinin değişimini araştırdık. Ağrı testleriyle (Von-Frey, Hot-Plate) Se'nin, OX'un hayvanlar üzerinde etkilerini araştırdık.

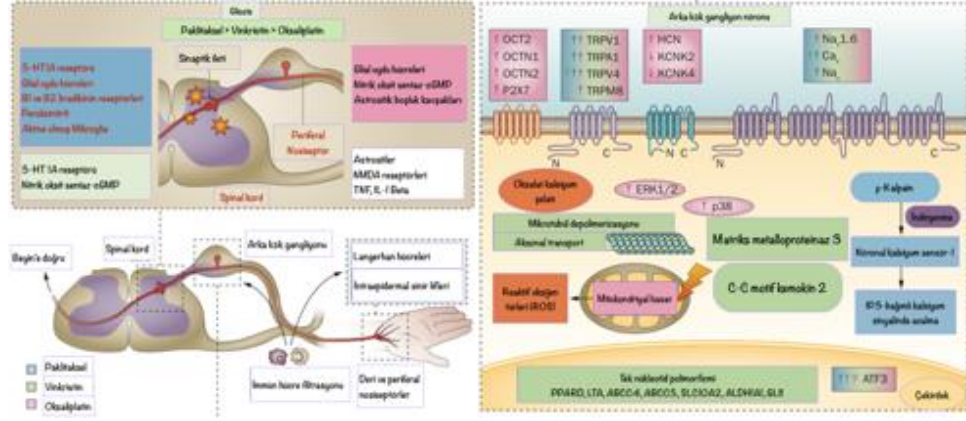
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemoterapi Kaynaklı Periferik Nöropatik Ağrı

Kemoterapi ile indüklenen periferik nöropatik ağrı (KKPN) sitostatik farmakoterapinin ciddi bir yan etkisidir. KKPN, sitostatik ilaçların dozaj ve seçimini sınırlayabilir, daha ileri tedavi döngülerini erteleyebilir veya sitostatik tedavinin kesilmesini sağlayabilir. Semptomlar, tedavi sonrası ağrıdan, parestezilere, duyuşal ataksiye ve mekanik ve soğuk allodiniye kadar değişir. Vücutun ekstremiteleri ağırlıklı olarak etkilenir, ancak tekrarlayan tedavi sırasında ağrı ekstremiteler boyunca ilerleyebilir (8-10). KKPN'ye neden olan kemoterapötikler arasında yaygın olarak kullanılan taksanlar, platin türevleri ve vinka alkaloidlerin yanı sıra nadiren de olsa kullanılan iksabepilon, bortezomib ve talidomid bulunur (11).

Oksaliplatin en sık kullanılan kemoterapötik ilaç grubunun önde gelen platin bazlı bir üyesidir ve biz burada OXPN'nin kemoterapötik ilaca özgü patofizyolojik mekanizmalarını ve bu durumun doğru yönetilmesinin yöntemlerini tartıştık. Oksaliplatin, paklitaksel ve vinkristin gibi kemoterapötik ajanların AKG nöronları üzerinde nörotoksik etkileri vardır (Şekil 1) (12). Bu kemoterapötik ilaçlar, voltaja bağımlı sodyum kanalları NaV, voltaja bağımlı kalsiyum kanalları CaV, geçici reseptör potansiyel TRP iyon kanallarının aktivasyon mekanizmalarını, mitokondriyal elektron taşıma zincirini bozabilen; duyuşal nöronlardaki ATP üretimini değiştirebilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırır (13). Ortak patojenik mekanizmalara rağmen, oksaliplatin'e bağılı nöropati, paklitaksel veya vinkristin kaynaklı KKPN'den daha az şiddetli bir inflamatuvar bileşen içerir. Bu inflamatuvar bileşen, TNF- α ve IL-1 β gibi pro-aljzik mediyatörlerin üretilmesine ve salınmasına yol açan spinal kord'un dorsal boynuzundaki mikrogliya, astrositler ve uydu hücrelerinin aktivasyonlarından kaynaklanır (7).

KKPN'nin başlıca patofizyolojik mekanizmalarının iyi bir şekilde anlaşılması, yalnızca semptomları tedavi etmek yerine etkili, mekanizmaya dayalı tedaviler tasarlamakla mümkündür. Şu anda, KKPN'yi önlemeye yönelik hiçbir tedavi seçeneği mevcut değildir ve tedavisi için sadece birkaç farmakolojik strateji bulunmaktadır (14). Amitriptilin veya gabapentin gibi nöropatik ağrının tedavisinde halen kullanılmakta olan çoğu analjzik ilaç klinik çalışmalarda KKPN'yi hafifletememiştir (2).



Şekil.1 Kemoterapi ile indüklenen periferik nöropatik ağrı mekanizmaları (2).

2.2.KKPN'nin Etki Mekanizmaları

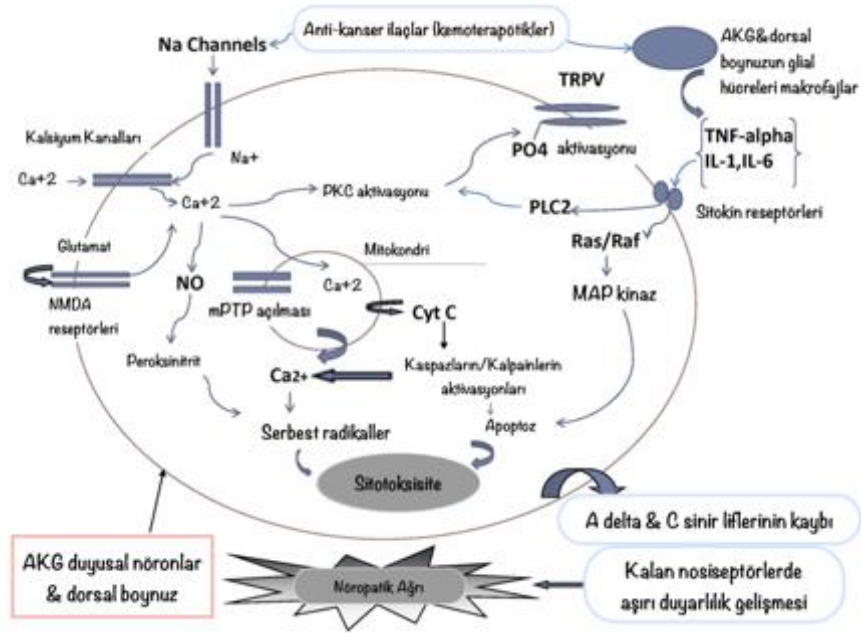
Periferik nöropati, vinkristin, paklitaksel, oksaliplatin, sisplatin ve bortezomib gibi çeşitli anti-kanser ilaç sınıflarının yaygın bir yan etkisidir (15). Bu ajanlar, özellikle tedavi sırasında nosiseptif duyu kaybı yaşayan hastalarda, aksiyon potansiyeli genliğinin azalmasına, periferik ağrının indüklenmesine ve ileti hızının yavaşlamasına sebep olarak duyu sinirleri doğrudan ve dolaylı bir biçimde etkiler. Kemoterapi ile indüklenen, aşırı derecede ağrılı olabilen KKPN hastanın acı çekmesine neden olur ve bu durum potansiyel olarak yararlı olan anti kanser ilaçlarıyla tedaviyi sınırlar. KKPN insidansı, tek bir ajan'ın kullanımıyla %3-7 oranlarındayken kombinasyon rejimlerinin uygulanması bu oranı %38'lere kadar çıkarabilir (16). Klinik olarak kemoterapiye bağlı nörotoksisite tipik olarak duyu nöropati olarak ortaya çıkar ve en sık görülen semptom uyuşukluk, karıncalanma ve yanma ağrısıdır. Kişilerde genellikle karıncalanma ve allodini gelişir. Duyusal semptomlar genellikle ayaklarda simetrik olarak başlar, fakat iki el ve ayakta eş zamanlı görünür (17). En çok vakalar kemoterapötik ilaç tedavisinin kesilmesinden aylarca sonra çözülür, ancak duyu anormallikler ve ağrı bazen kronik bir sorundur (18). Nöropatinin ortaya çıkışı ve şiddeti, tek doz yoğunluğu, birikimli doz, infüzyon süresi, başka kemoterapötik ajanlar ile eşzamanlı tedavi, diyabet ve alkol bağımlılığı vs. bir arada var olan koşullar gibi birçok faktöre bağlıdır.

Platin türevi oksaliplatin, kolorektal karsinomların birinci basamak tedavisinde olarak yaygın olarak kullanılmaktadır ve ayrıca adjuvan tedavi olarak ve ileri kolorektal karsinomda da kullanılır (19). Oksaliplatin iki tip

ciddi nöropatik semptomlara neden olabilir: Akut ağrı sendromunu (AAS) andıran ve genellikle tedaviden sonraki birkaç gün içinde süstitüsyona uğramış erken bir akut ağrı sendromu ve tedavi sırasında sonraki safhalarda ortaya çıkan kronik bir distal sensoryal nöropati olarak sıralayabiliriz (12). Diğer platin bileşiklerinin aksine, oksaliplatin, uygulamadan hemen sonra ortaya çıkan akut ağrılı bir nöropatiyi indüklemektedir (20). Hastalar ekstremiteler ve peri oral paralizilerden, özellikle de soğuk aşırı hassasiyetinden muzdariptirler. Hastaların yaklaşık %90'ında, kramplar, parestezi ve disestezi ile karakterize, soğuk maruziyetiyle tetiklenen veya güçlenen akut, geçici bir sendrom gelişir.

2.3. Nöronal Etki ve İyon Kanalları

OXPN'nin hücrel mekanizmaları, paklitaksel ve vinkristin tarafından indüklenen KKPn mekanizmalarından farklıdır. Oksaliplatin ligand ve voltaj kapılı iyon kanallarının artmış aktivitesi gibi daha ciddi nöronal etkilere sahiptir. Hücrelerin içinde oksaliplatin, oksalat ve platine indirgenir. Oksalat, hücre içi Ca^{+2} 'yi kenetlemekte ve nöronal membran potansiyelinde ve voltaj kapılı iyon kanallarının aktivitesinde bozulmalara neden olmaktadır. Farelerde, oksalat enjeksiyonu, oksaliplatin kaynaklı OXPN'ye benzer şekilde soğuk allodiniye neden olur, oksaliplatin kaynaklı OXPN'de oksalat için bir rolü destekleyen Ca^{+2} ve Mg^{+2} (Ca^{+2} - Mg^{+2}) kombinasyonunun infüzyonu yoluyla bu ağrı hafifletilebilir (21,22). Oksaliplatin kaynaklı OXPN'de çeşitli TRP kanalları rol oynamaktadır. TRPA1, mekanik ve soğuk allodininin mediatörü olarak tanımlanırken, TRPV1, TRPM8 ve TRPV4, AKG nöronlarında duyarlı hale getirilir ve böylece bu hücrelerin aktivasyon eşliğini azaltır (23). Ayrıca oksaliplatin soğuk allodiniye sebep olur ve miyelinli A liflerinin aksiyon potansiyelinde voltaja bağımlı sodyum kanal Na^{+} kanalları aracılığıyla soğuk kaynaklı patlamalar meydana gelmesine aracılık eder (24) (Şekil 2).



Şekil 2. Primer duyuşsal nöronlarda (AKG) kemoterapötik ajanların sebep olduğu nöropatik ağrı gelişiminde rol alan farklı hedefler arasındaki bağlantılı yolların şematik gösterimi (25).

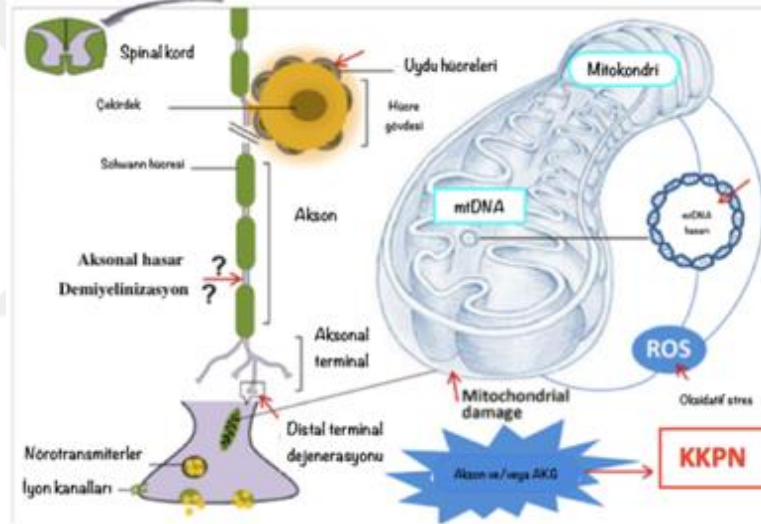
2.4. Nöronal lif kaybı

Plantar arka pençe derisindeki duyu nöronlarının periferal terminal bölgesinde, vinkristin ve Paklitaksel ile uyarılmış ağrılı nöropatik ağrılarda intraepidermal sinir lif kaybı şeklinde duyuşsal sinirlerin kısmen dejenerasyonu gösterilmiştir (26). Sinir liflerindeki kısmi kaybın aşırı uyarımlardan kaynaklandığı, transekte aksonlarda ya da dejenerasyona uğramış sinir terminallerinde yapılan çalışmalar sonucunda kendiliğinden deşarj ve mekanik sensitivite meydana gelmesiyle ortaya konulmuştur (27). Nöropati koşullarında epidermis'teki nosiseptörler (28) de dahil A ve C tipi sinir lifleri (soğuşa ve sıcakuşa duyarlı) kaybı meydana gelir ve soğuk allodiniye sebebiyet veren soğuşa duyarlı A lifleri kaybı oluşur (29). Dolayısıyla, soğuşa özgü sinir liflerinde yaşanan kayıp hayvanlarda soğuk allodininin gelişmesinden bu bölgenin sorumlu olabileceğini akla getirmiştir (30).

2.5. Mitokondriyal Değişiklikler

Nöropatik ağrı da dahil olmak üzere, merkezi ve periferik sinir sisteminde meydana gelen çeşitli nörolojik bozuklukların gelişiminde mitokondriyal

disfonksiyon kritik bir role sahiptir (31). Hücre içi Ca^{+2} sinyal regülasyonu (32), reaktif oksijen türlerinin üretilmesi ve apoptotik sinyal yolları gibi nöropatik ağrının gelişmesinde kritik öneme sahip birbirleriyle bağlantılı mitokondriyal yollar vardır (3). Kemoterapötik ajan kaynaklı periferel nöropatik ağrı, aksonlardaki mitokondrielerde şişkinlik ve boşlukların oluşum insidansında önemli düzeyde artış ile ilişkilidir. Kemoterapötikler, voltaja bağımlı anyon kanallarını içeren multi-moleküler kompleks yapıdaki mitokondriyal permeabilite geçiş porunu (mPTP) açar (33). Nöronal olmayan hücrelerde de kemoterapötikler, mPTP'nin açılmasına ve mitokondride şişkinliğe, boşlukların oluşumuna, mitokondrinin işlevsel olarak bozulmasına neden olur (34) (Şekil 3).



Şekil 3. KKP'nin patogenezi ve ilişkili morfolojik değişiklikler (35).

Kemoterapi ajanlarının nörotoksik etkileri, aksonal hasarın, mitokondriyal hasara ve oksidatif strese neden olmak üzere AKG nöronlarının hücre gövdeleri ve aksonları da dahil olmak üzere periferel sinir sisteminin bileşenlerini olumsuz yönde etkileyen bu durum inflamasyon ile ilişkilidir. AKG nöronları ve çevresindeki uydu hücreleri, çoklu iyon kanallarının ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler (36), nörotransmitterler, bunların reseptörleri ve değiştirilmiş gen ifadesi de dahil olmak üzere patolojik birtakım değişiklikler gösterir. Mitokondriyal disfonksiyon KKP'nin kemirgen modellerinde ağrı davranışları ile doğrudan ilişkili olan önemli patofizyolojik

özellikleri olarak gözükmektedir. Gerçekten de doğrudan mitokondriyal DNA hasarı, kemoterapi kaynaklı KKP'ye katkıda bulunur.

2.6. Kalsiyum İyonu

Kalsiyum, kanser kemoterapi ilaçlarının neden olduğu ağrı da dahil olmak üzere nöropatik ağrının farklı biçimlerinin patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. Sun ve arkadaşları, AKG kültürünü kullanarak kalsiyumun hücre hasarına aracılık etmede önemli rol oynadığını gösterdi. Kalmodulin (kalsiyum bağlayıcı protein) ve kalpain (kalsiyuma bağımlı proteaz), kalsiyumun neden olduğu nöronal hücre hasarının efektörleridir (37).

Paklitaksel'in, dorsal omurilikte alfa-2 delta-1 mRNA ekspresyon düzeyini arttırdığı iyi bilinmektedir (36). Buna göre, paklitaksele bağlı gelişen allodini durumunda gabapentinin önleyici etkisi spinal dorsal boynuzda ve AKG'deki alfa-2 delta-1 alt-biriminde gerçekleşir (38). Hücre dışı ve hücre içi kalsiyum düzeylerini düşüren quin-2, EGTA gibi ilaçlarla Vinkristin ve paklitaksel kaynaklı nöropatik ağrının zayıflatıldığını göstermişlerdir (26).

Kemoterapötik ajanlar, mitokondri membranında rol oynayarak kalsiyum hareketliliğini etkiler (39). Kemoterapötikler tarafından uyarılmış nöropatik ağrı, duysal primer afferent aksonlarındaki bozulmuş krista ve şişmiş, vakuole olmuş mitokondri sayısında önemli orandaki artış ile ilişkilidir (33). Mitokondri önemli düzeyde tamponlama kapasitesine sahiptir dolayısıyla hücre içi kalsiyum homeostazında ciddi oranda katkı sağlamaktadır. Bozulmuş mitokondriyal kalsiyum alımı veya artmış mitokondriyal kalsiyum kaçağı, kalsiyum sinyallerinin çoğalmasından ve dolayısıyla kemoterapötik ilaca bağlı gelişen ağrıdaki kalsiyum bağımlı süreçlerden sorumlu olabilir. Bunlara dayanarak, mitokondriyal yapıda meydana gelen kemoterapötik ajanlara bağlı değişimler, kalsiyum aracılı gerçekleşen nöronal uyarılabilirlikteki artışa neden olduğu söylenebilir. Dolayısıyla kalsiyum iyonunu ortamdaki uzaklaştıran ilaçların, bozulmuş mitokondriyal kalsiyum regülasyonunu ve nöropatik ağrının olumsuz etkilerini tersine çevirmesi beklenmektedir. Yapılan çalışmalar vinkristin uygulanmasının ardından gelişen nöropatik ağrının sinirlerde kalsiyum düzeylerini yükselttiğini ve kalsiyum düzeylerini düşüren ilaçların da vinkristin kaynaklı nörotoksik etkileri ortadan kaldırdığını göstermiştir (40).

2.7. Apoptoz

Apoptoz neredeyse bir yüzyıl boyunca tanımlanmış olmasına rağmen, 1972'de Currie ve arkadaşları, akut doku hasarından kaynaklanan nekrotik hücre ölümlerinden doğal olarak meydana gelen gelişimsel hücre ölümünü ayırt etmek için ilk olarak "apoptosis" terimini kullanmışlardır (41). Ayrıca, apoptozun hücre proliferasyonu ve ölüm arasındaki dengeye aracılık ederek doku homeostazını sürdürmekten sorumlu olduğunu belirtmişlerdir. Apoptozun morfolojik özellikleri arasında hücre membranı kabarması, hücre büzülmesi, kromatin kondensasyonu ve nükleozomal fragmantasyon sayılabilir. Normal koşullar altında, apoptoza uğrayan hücreler, makrofajlar veya hücrelerin parçalanmış kalıntılarını tüketen komşu hücreler tarafından kabul edilir. Apoptotik yollar, birçok klinik öncesi araştırmaların odak noktasıdır. Apoptoza yol açan iki farklı moleküler sinyal yolağı vardır: intrinsik mitokondri aracılı yolağı ve ekstrinsik veya hücre dışı aktif yolağı (42). İçsel yolağı genellikle, DNA hasarı ve yüksek seviyelerde reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin yanı sıra viral enfeksiyon ve onkojenlerin aktivasyonu gibi hücre içi stres sinyallerine tepki olarak aktive edilir. Dışsal yolağı ise hücre dışı bir ligandın plazma membranı üzerindeki bir reseptöre bağlanmasıyla tetiklenir. Her iki yolağı da hücre içi organellerin ve yapıların hızla parçalanmasına aracılık eden kaspazlar adı verilen proteolitik enzimleri aktive eder. Kaspazlar, aspartik asit içeren motiflerin bölünmesine katılan bir nükleofilik sistein kalıntısı içeren bir protein ailesidir (43). Kaspazlar, bölünme olaylarını başlattıktan sonra aktif oligomerler oluşturan aktif olmayan öncüler olarak ifade edilir. İki grup kaspaz vardır. Bunlar, başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8, kaspaz 9 ve kaspaz 10) ve efektör kaspazlardır (kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7). Kanıtlar, başlatıcı kaspazların oto katalitik aktivasyon yeteneğine sahip olduğunu gösterirken, efektör kaspazların başlatıcı kaspaz klevajı ile aktivasyona ihtiyaç duyduğunu göstermektedir (44).

AKG duyuşal nöronları apoptoza neden olan platin bazlı kemoterapi ilaçlarının primer hedefleri olarak kabul edilir (45). Çekirdekçikte, Platin-DNA adüksiyon oluşumuna bağılı DNA hasarını yansıtan morfolojik değışiklikler meydana gelir (46). AKG, oksaliplatin gibi platin bazlı eksojen toksik maddeler gibi sistemik dolaşıma karışan birçok bileşikler (47) için daha erişilebilir hale getiren fenestre edilmiş kılcal damarlar tarafından vaskülarize

edilir. Platin ile indüklenen periferel nöropatik ağrı, nöroprotektif tedavi tasarımıında anterograd aksonal dejenerasyona yol açan AKG duyu nöronlarında birincil hasar ile saptanan duyuusal bir nöropatidir. Genellikle, platin ile indüklenen periferel nöropati distal ekstremitelerde parestezi ile karakterizedir ve bu durum propriyoseptif kayıp ve duyuusal ataksiye yol açar (47). Nöropatik ağrı semptomları sıklıkla tedavi kesildikten sonra bile bildirilmiştir (48). Nörotoksisiteyi azaltmak veya önlemek için yapılan müdahalelerin birçoğunun başarısız olduğu kanıtlanmıştır (49).

2.8. Kaspazlar

Kaspazların OX ile indüklenen periferel nöropati ile ilişkisi, Ta ve arkadaşları tarafından 2006 yılında bir kaspaz inhibitörü kullanılarak gösterilmiştir. Onlar yaptıkları bu çalışmada sıçan AKG'lerinde Tünel-pozitif hücrelerde bir artış gözlemler ve bu da kaspaz aracılı apoptozu düşündürdü (50). İn-vitro sıçan AKG duyu nöronlarında, OX 'a uzun süre maruz kalmak, apoptoz aracılı hücre ölümüne aracılık eden P38 ve ERK1/2'nin MAP-kinaz proteinlerinin erken aktivasyonunu indükler. Tersine, koruyucu JNK/SapK baskılanır ve böylece OX 'un nörotoksik etkileri artar (51). NGF veya retinoik asit ile AKG hücrelerinin tedavisi ile elde edilen MAP-kinazların fizyolojik fonksiyonunun geri kazanılması, in-vitro OX kaynaklı nörotoksisiteye karşı nöroprotektif etki gösterir. Dahası, PKC'nin de katılımı, OX ve bir PKC inhibitörü olan kalfostin C ile birlikte tedavi edilen hayvanlarda mekanik hiperaljezinin zayıfladığını gözlemleyen Norcini tarafından kanıtlanmıştır (52). Aslında OX, PKC'nin gama izoformlarının aktive edilmesini sağlamış olup beynin bazı bölgelerinde gama/epsilon PKC izoformlarının fosforilasyonunda artışa neden olmuştur. Benzer sonuçların başka bir PKC inhibitörü hiperisin enjeksiyonuyla da elde edildiği bildirilmiştir (52).

2.9. TRP Kanalları ve Ağrı

TRPV1 olarak bildiğimiz kapsaisin reseptörünün moleküler olarak tanımlamasından bu yana, geçici reseptör potansiyeli (TRP) kanalları ağrı bağlamında duyuusal sinir fonksiyonlarının anlaşılmasında önemli bir yere sahiptir. TRP kanallarının birçoğu, ağrıya ya da ağrıya benzer duyuulara neden olan maddelere karşı duyarlılık göstermektedirler; bu maddelere sinamaldehit,

mentol, isilin ve kapsaisin'i örnek olarak verebiliriz. Birçok TRP kanalı ayrıca sıcaklık artışı veya azalışlarına karşı önemli ölçüde hassasiyet göstermektedir. Bazı TRP kanalları, ağrıya neden olan inflamasyon gibi süreçler tarafından aktive edilebilen diğer reseptörlerin aktivasyonu ile duyarlılaşır. TRP kanallarının, duyuşal nöronların aktivasyon mekanizmaları, nörotransmitter salınımı ve spinal kord'ta harekete geçirilmesi ve inflamatuvar mediatörlerin salınımı kadar çeşitli süreçlerde yer aldığı bildirilmektedir. Bu kadar çeşitli ve önemli fonksiyonlara haiz olan TRP kanallarının aktivasyonunun spesifik ve seçici inhibisyonunun, ağrının hafifletilmesinde faydalı olacağı önemle vurgulanmaktadır.

Son on yılda, normal ve ağrılı durumlarda duyuşal algılamadaki faktörleri ve moleküler mekanizmaları aydınlatmak üzere çok fazla araştırma yapılmıştır. Klinik öncesi yapılan bu araştırmalar ile hayvan modellerinde patolojik ağrıya karşı duyuşal duyarlılığın geliştirilmesi ve sürdürülmesinde rol oynayan birçok faktör, yolak ve mekanizma ortaya çıkartılmıştır. Ağrının meydana geldiği alandaki önemli keşifler, meydana gelen hasarın neden olduğu nöronal fonksiyon bozukluğunun açıklanması, periferik nöronun işlevselleşmesinde spinal kord'taki nöronal süreçlerde meydana gelen değişikliklerin tespit edilmesi, nöropatik ağrılı hayvan modellerinin oluşturulması, ağrı gelişiminde immün sistemin ve glial hücrelerin rolünün araştırılması olarak sıralanabilirler. Bu keşifler, anormal derecede artmış ve spontan seyreden ağrıların hafifletilmesi için yeni terapötik yaklaşımların ortaya çıkabileceği yönündeki beklentileri artırmıştır. Bununla birlikte, bu kadar avantajlara rağmen klinik öncesi araştırmalardaki ağrı tedavisine oluşturulan yanıt yavaş ilerlemektedir. Bu durum, kısmen hayvan araştırma modellerinde moleküler ve fizyolojik kilit mekanizmaların klinik rolünün tam olarak anlaşılabilmesi nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Bu, son yıllarda ağrının klinik olarak tedavisine dahil olan mekanik olarak yeni terapötik ajanların nispeten yetersiz olmasıyla kendini belli eder.

Ağrı için yeni ajanların kullanımını artmış olsa da (örneğin gabapentin) tedavinin temel dayanağı opioidler ve steroid olmayan anti-inflamatuvar birtakım ilaçlardır. Ayrıca gabapentin, nöropatik rahatsızlıklar için en çok önerilen ağrı kesici ilaçlardan biri olmasına rağmen iyileşmeye katkısı bakımından geliştirilmeye açıktır (53). Gabapentin'e kıyasla daha güçlü bir ilaç

olan pregabalin ise 10 yıl kadar önce piyasaya girmiştir. Gabapentin'in tedavi potansiyeli yüksek olup mekanizmasının iyi anlaşılabilmesi için daha fazla klinik çalışmalar yapılması gerekmektedir. Son olarak, bir konopeptit N tipi kalsiyum kanal blokörü olan zikonotid aynı zamanda ağrının tedavisinde de faydalıdır, ancak yan etkiler ve uygulama yolu (intratekal), opiyata dirençli, şiddetli kronik ağrı durumunda onun kullanımını sınırlar. Özetle, ağrı için klinik tedavi, reçete edilen çok sayıda hastada yeterli rahatlama sağlamamakta ve bu nedenle önemli ölçüde iyileştirilmesi gerekmektedir. Bu bakımdan yeni mekanizmaların keşfedilmesini amaçlayan farklı terapötik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yeni analjezik arayışlarında önemli bir gelişme olarak, TRPV1 kanallarının küçük moleküllü antagonistlerinin klinik test aşamalarında ilerleme kaydedildiği ifade edilmiştir. Kapsaisin reseptörü olan TRPV1, TRP iyon kanalları ailesinin bir alt üyesidir (54). TRPV1'in yeni analjezik tedavilerin gelişimi için son derece umut verici bir hedef olduğu gösterilmiştir. Nitekim TRPV1'in duyuşal nöronlarda ifadenmesinin keşfini takip eden yıllarda yine duyuşal liflerde TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1 ve TRPM8 de dahil olmak üzere yeni TRP ailesinin alt üyeleri tanımlanmıştır (55). TRPV1 başta olmak üzere TRP kanal ailesinin diğer üyeleri, yeni jenerasyon analjezik ajanların keşfi ile ilgili hedefler olarak umut vadetmektedirler.

Son 20 yılda belki de ağrının moleküler yapısına dair en heyecan verici bulgu, ağrıya neden olduğu bilinen kimyasallar için fonksiyonel reseptörler olarak işlev gören proteinlerin tanımlanması olmuştur. Aslında, bu algojenik moleküller, bu reseptörlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi için muazzam araçlar olarak vazife görmüştür. İlk tespit edilen algojenik madde ise vanilloidler ailesinden bir reseptör olan TRPV1'in agonisti (54) olan kapsaisindir. TRPV1 aynı zamanda reziniferatoksin, vanilloid, zencefil ve karanfil yağının bir bileşeni olan eugenol da dahil olmak üzere diğer birçok algojenik maddeler veya irritantlar ile de aktive olan bir reseptördür.

2.10. TRP Kanallarının Nosiseptif Süreç Üzerindeki Etkileri

Özellikle deride ve duyu nöronlarında eksprese olan bazı TRP kanalları, sıcaklık değişimlerine karşı hassasiyet sergiler. Aslında, TRPV2 ve TRPV3'ün termal duyarlılıkları, moleküler olarak ilk karakterize edildiğinde

aktivasyonlarının belirleyici bir özelliğiydi. Termal olarak hassas her TRP kanalı “termo TRP” in-vitro olarak eşsiz bir aktivasyon eşiği sergiler; örneğin, TRPV1, 43 °C, TRPA1, 17 °C ve TRPV4, 27 °C, TRPV3, 33 °C'de, TRPM8, 26 °C'de ve TRPV2 > 50 °C sıcaklıklarda aktive edilir (56). Bu termo-TRP'ler, duyu sinir lifleri içinde eşsiz örtüşen dağılımlar sergilediğinden, duyu nöronlarının sıcaklık değişimlerine özgü hücrel tepkilerine aracılık etmesi makuldür. Aslında TRPV1, TRPV3 veya TRPA1'i ifadeleyen genetik yapının silinmesi sıcağa (TRPV1, TRPV3) veya soğuğa (TRPA1) karşı duyarlılık kaybı ile sonuçlanır. Özellikle zararlı sıcaklıklarda (17 °C'nin altında veya 43 °C'nin üstünde) soğuk veya sıcak değer aralıklarını tespit etme yeteneği, ağırlı sıcaklık koşullarını algılama özelliği TRPA1, TRPV1 ve TRPV2 gibi kanalları için önemli bir rol olarak doğrulanmıştır. İlginçtir ki, TRPV3^{-/-} fareler, tekrarlanan ısıl uyarılara karşı artmış akım yanıtları sergilese bile, inflamasyona yanıt olarak termal hiperaljezi geliştirmemektedirler. Dolayısıyla termal duyarlılık, nosisepsiyonu sürdürmek için başlı başına yeterli değildir (53).

Bir dizi TRP kanalının diaçilgliserol (DAG) gibi fosfolipit sinyal molekülleri tarafından aktive edildiği gösterilmiştir. Fosfolipid metabolizmasının harekete geçirilmesi, bradikinin ve prostaglandinler gibi nosiseptif sinyalizasyona bağlı G proteini ile birleşmiş reseptörlerin aracılık ettiği önemli bir olaydır. TRPA1, TRPV3 ve TRPV4'ün hepsi de aktivasyonu artan fosfolipaz C (PLC) ile aktive edilir ve fosfatidilinositol bi-fosfat (PIP2) tarafından negatif olarak düzenlenen TRPV1 kanal aktivasyonu, artan PLC aktivasyonu ile duyarlılaşır (57). TRPV4 ve TRPM8 fosfolipaz A2 aktivasyon ürünleri ile indüklenirken, PLC aracılığıyla TRPM8 aktivasyonunu azaltır (58). Bazı durumlarda, anandamid ve N-asil taurin ile TRPV1'in aktive edildiği ve TRPM8'in ise lisofosfolipidler tarafından aktivasyonunun sağlandığı gibi lipid metabolitleri de bu kanalların doğrudan aktivatörleridir. Belki de TRP kanallarının ısı ve fosfolipid hassasiyetinin en ilginç yönü, çoklu uyarıları entegre etme yetenekleri ile ilgilidir. Tominaga ve arkadaşları TRPV1 için sıcaklık ile aktivasyon eşiğinin düşük pH'lı solüsyonlarla (pH 6.4) daha soğuk değerlere kaydırılabileceğini göstererek entegrasyonun ilk kanıtını sağlamıştır. Bunu takiben protein kinaz C aracılı TRPV1'in fosforilasyonunun artması ile kanalı ısıya duyarlı hale getirebileceği gösterilmiştir (59).

Son olarak, PKC aktivasyonundaki orta düzeydeki bir artış ile birlikte düşük pH (6.8), 37 °C'de bile TRPV1 akım yanıtlarının oluşumuna neden olabilir (60). Böylece, TRPV1'in inflamasyonlu ağrı süreçleri esnasında görülebilecek fizyolojik koşullar altında (doku asitlenmesi, inflamatuvar mediatörlerin salınması, artmış lokal kan akımı ve sıcaklık) meydana gelen bir tepkiyi aktive etme kabiliyetine haiz olması, inflamatuvar ağrı süreçlerinde dahli bulunduğunun bir göstergesidir.

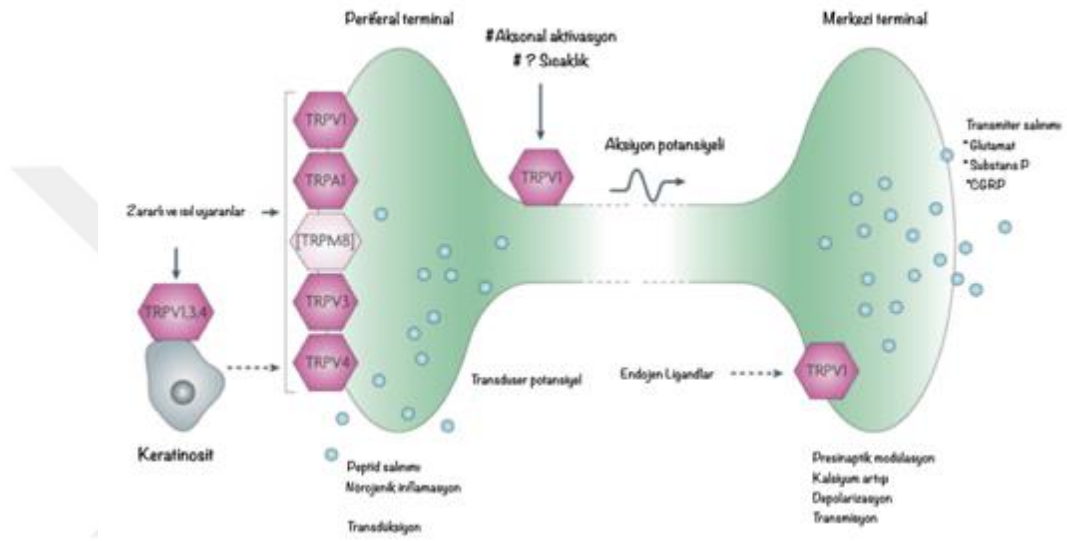
2.11. Periferel ve Spinal Süreçlerde TRP Kanallarının Rolü

Nosiseptif yolların aktivasyonu, tekrarlayan uyaranlara bağlı olarak yanıtta ilerleyici bir artış ile ortaya çıkar. Buna genellikle aktiviteye bağlı plastisite veya sensitizasyon denir (61). Genellikle ağrı ile ilgili iki tür hassasiyet vardır: bunlardan ilki nosiseptöre ait sinir terminallerinin otosensitizasyonu, bir diğeri ise dorsal boynuz nöronlarının duyarlılığı ve sinyalizasyon yolları. Her iki tür hassasiyette de TRP ailesinin önemli katkıları sözkonusudur. Nosiseptör otosensitizasyonu bütünleştirici özelliklerinden dolayı TRPV1 ile önem kazandığı çoğu kez kanıtlanmıştır (şekil 4). TRPV1 ayrıca, nosiseptörlerin depolarizasyonunda önemli bir rol oynar. TRPV1 kanallarının aktivasyonu lokalize sodyum, kalsiyum iyon akışları ile sonuçlanır ve bu durum, yaylımsız nöronal potansiyellere neden olur (62). Bu gibi potansiyeller yeterince güçlü olduğunda, nöronal depolarizasyon oluşur. Bu moleküler entegrasyon, kanal duyarlılığıyla (fosforilasyon) birleştirildiğinde hiperaljezide nosiseptif nöronal transmisyonu sağladığı görülmektedir (şekil 4).

TRPA1'in duyuusal nöronlarda TRPV1 ile birlikte eksprese olduğu bilinmektedir. Merkezdeki hassasiyet artışı ele alındığında hem termal hem de mekanik hipersensitivite üzerinde TRPA1 kanalları anahtar rol oynamaktadır. Dorsal boynuz lamina 1 nosiseptiviteye duyarlı nöronlar nörokinin-1 reseptörleri içerir ve ilgili alıcı alana uygulanan hardal yağı, bu nöronların termal stimülasyona verdiği tepkileri derinden duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (63).

Nosiseptif sürecin diğeri bir yönü de spinal dorsal boynuz giden duyuusal nöron projeksiyonlarında TRPV1, TRPM8 ve TRPA1'in (AKG'lerdeki güçlü ekspresyonu ileri sürülmektedir) güçlü ekspresyonları ile ilgilidir. Bu

presinaptik lokalizasyon, TRP kanallarının nörotransmitterlerin sinaptik salınımına katılma potansiyellerini ortaya koymaktadır. Gerçekten de kapsaisin doğrudan spinal korda uygulandığında nörotransmitterlerin salınmasını tetiklediği iyi bilinmektedir. Ve mentol (TRPM8 agonisti) bir AKG-dorsal boynuzlu ko-kültür sisteminde sinaptik iletimi artırdığı belirtilmektedir. Bu verilere rağmen, presinaptik fizyolojideki bu kanalların işlevi hakkında çok az şey bilinmektedir.

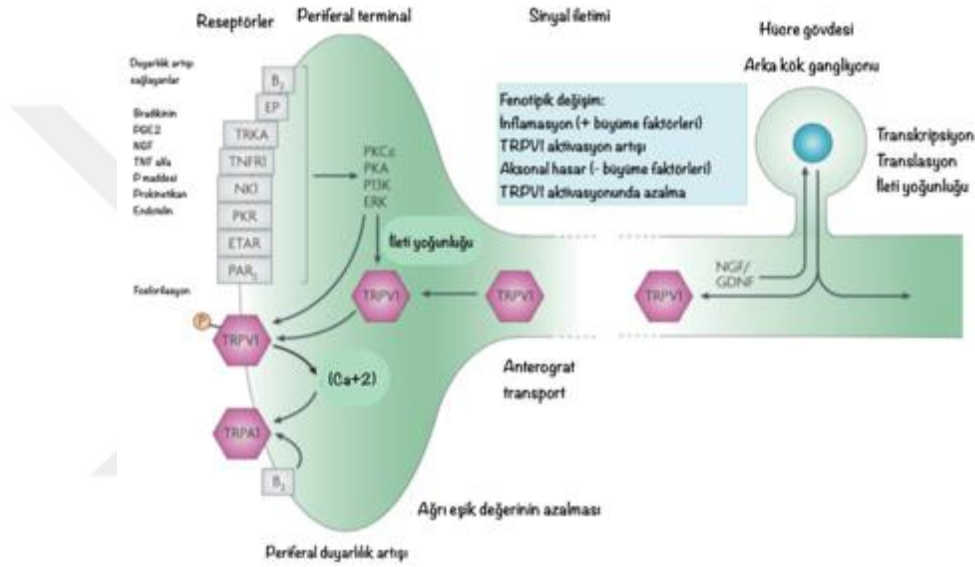


Şekil 4. Nosiseptör nöronların periferik ve merkezi terminallerindeki TRP kanallarının rollerinin gösterilmesi (64).

2.12. İnflamasyonda TRP Kanallarının Potansiyel Rolü ve Ağrı

TRP kanalları ve ağrı üzerine yapılan araştırmalar büyük oranda nosiseptif süreçlerin nasıl işlediğine odaklanmıştır. Bununla birlikte, duyuşal nöronlar, nörojenik inflamasyon ile ilişkilendirilir; bu süreçte substance P (P maddesi) ve CGRP gibi nöropeptidlerin, periferik vazodilatasyon, vasküler sızıntı ve immün hücreler üzerindeki etkileri sonucunda duyuşal sinir liflerinin periferik uçlarından salınımı sağlanır. Bu yanıtların, trigeminal gangliyonun periferik sinir uçlarından salınan CGRP'nin bir vazodilatör, pro-aljezik etkisine aracılık ettiği ve migren dahil bazı rahatsızlıklara katkı sağladığı düşünülmektedir. Kapsaisin deneysel nörojenik inflamasyonu tetiklemek için yaygın olarak kullanıldığından, TRPV1 bu süreçte önemli bir rol üstlenmektedir (Şekil 5).

Gerçekten de kapsazepin bir enterit modelinde (ince bağırsakta meydana gelen tahriş olma durumu) inflamasyon gelişimini önemli ölçüde inhibe eder. Duyusal lif aktivasyonunun inflamasyon üzerindeki etkisi, çift yönlüdür. İnflamasyon süreçleri, aktive edilmiş makrofajlardan, mast hücrelerinden ve diğer immün hücrelerden salınan ve nosiseptörlerde doğrudan ve dolaylı etkileri olan TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokin moleküller üretir (64) (Şekil 5).



Şekil 5. İnflamasyondan kaynaklanan TRP kanallarındaki değişiklikler (64).

T lenfositleri ve mast hücreleri de dahil olmak üzere bazı bağışıklık hücre tiplerinin önemli bir özelliği, reseptörü aktive edilmiş kalsiyum hareketliliğinin varlığıdır. Bu, inositol 1,4,5-trisfosfat (IP3) ile aktive eden ve IP3 ile aktive edilmeyen reseptörlerin yanı sıra SOC (Store operated channels) tarafından sağlanan kalsiyum akımları veya kalsiyum salınımıyla aktive olan kalsiyum akımı (CRAC) aracılı olabilir. Bu akımların, degranülasyon, reaktif oksijen üretimi veya proliferasyon gibi hücre aktivasyonunun fonksiyonel sonucunda önemli roller üstlendiği düşünülmektedir.

2.13. TRP Kanalları ve KKP

Sisplatin ve oksaliplatin ile yapılan tedavinin, AKG nöronlarının primer kültürlerinde TRPV1, TRPA1 ve TRPM8 mRNA up-regülasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Dahası, in-vivo olarak sisplatin ile tedavinin ardından TRPV1 ve TRPA1'in up-regülasyonu ile birlikte oksaliplatin ile in-vivo tedavi sonrasında TRPA1'in up-regülasyonu bildirilmiştir. TRPV1 ve TRPA1 mRNA'larının up-regülasyonu, sisplatin ile tedavi edilen farelerde gözlenen termal hiperaljezi ve mekanik allodini'nin moleküler mekanizmalarına katkıda bulunduğu anlaşılmaktadır. Dahası, sisplatin ile tedavi edilen TRPV1-null farelerin, yine sisplatin ile muamele edilmiş olan wild-type fareler ile karşılaştırıldığında, mekanik allodini geliştiği ancak ısı ile uyarılan ağrısız tepkiler göstermediği tespit edilmiştir.

TRPV1 ve TRPA1'in sisplatin ile indüklenen ağrılı nöropati sonrasında termal hiperaljezi ve mekanik allodini gelişimine katkıda bulunabileceği ve TRPV1'in in-vivo sisplatin kaynaklı termal hiperaljezide kritik bir role sahip olduğu düşünülmektedir (65). TRPV4, paklitaksel ile oluşan ağrılı periferik nöropatide mekanik hiperaljezi oluşumunun tetiklenmesi gibi önemli bir rol üstlenmektedir (66). Oksaliplatin kaynaklı soğuk allodini, TRPM8 ve TRPA1'in artmış duyarlılığı ve ekspresyon seviyelerine atfedilir (23). TRPM8 AKG'de ekspresyon verir ve zararsız serin ve zararlı soğuk (<15 °C) sıcaklıklara tepki verir. Anand ve arkadaşları oksaliplatin tedavisinin, kültürlenmiş AKG nöronlarındaki ısıya yanıtını arttırdığını hem TRPM8 hem de TRPA1 kanallarının oksaliplatin'den etkilendiğini bulmuştur. Kapsazepin'in uygulanmasıyla TRPM8 işlevinin engellenmesinin oksaliplatin kaynaklı soğuk allodini'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (67).

2.14. TRPV1 ve Sistein Oksidasyonu

TRPV1 çalışmamızın asıl konusunu oluşturmaktadır. TRPV1, ağrılı kimyasal uyarılarla, 43 °C'de zararlı ısı uyarılar ve inflamasyon ile aktive olan bir kapsaisin reseptörüdür. AKG nöronlarının alt popülasyonlarında TRPA1, TRPV1 ile birlikte bulunur ve tahriş edici kimyasallar, reaktif oksijen türleri de dahil olmak üzere çeşitli bileşiklerin yol açtığı ağrı ve nörojenik inflamasyonda işlevsel bir role sahiptir. TRPV1, periferik zararlı ısı uyarılar

için bir iletici işlevi gören kapsaisin ve proton duyarlı katyon seçici kanaldır (54).

Proteinler oksidatif modifikasyona duyarlı olmakla beraber kimyasal ve konformasyonel değişikliklere uğrarlar. 20 yaygın amino asit arasında, Sistein tortusu, sülfidril grubundan dolayı yüksek reaktiviteye sahiptir (68). Sistein tortuları sıklıkla enzim katalitik bölgelerinde bulunurlar, burada yapısal proteinleri şekillendirmede merkezi bir rol oynayan yapısal disülfidler oluştururlar. Yüzeydeki sistein kalıntılarının pH değerlerinin fizyolojik pH'a yakın olarak yaklaşık 7,5 olduğu tahmin edilmektedir. Bu, tiyol ve tiyolat formlarındaki sistein popülasyonlarının, çevreleyen ortamın aracılık ettiği pH veya elektrostatik etkileşimlerdeki marjinal pertürbasyonlarla kolayca değiştirilebileceği anlamına gelir (69). Tiyolat, yüksek oranda nükleofiliktir ve böylece, redoks ortamındaki değişiklikleri saptamak için duyarlılık kazandıran, elektrofilik ve oksitleyici ajanlara karşı tiyolden daha duyarlıdır.

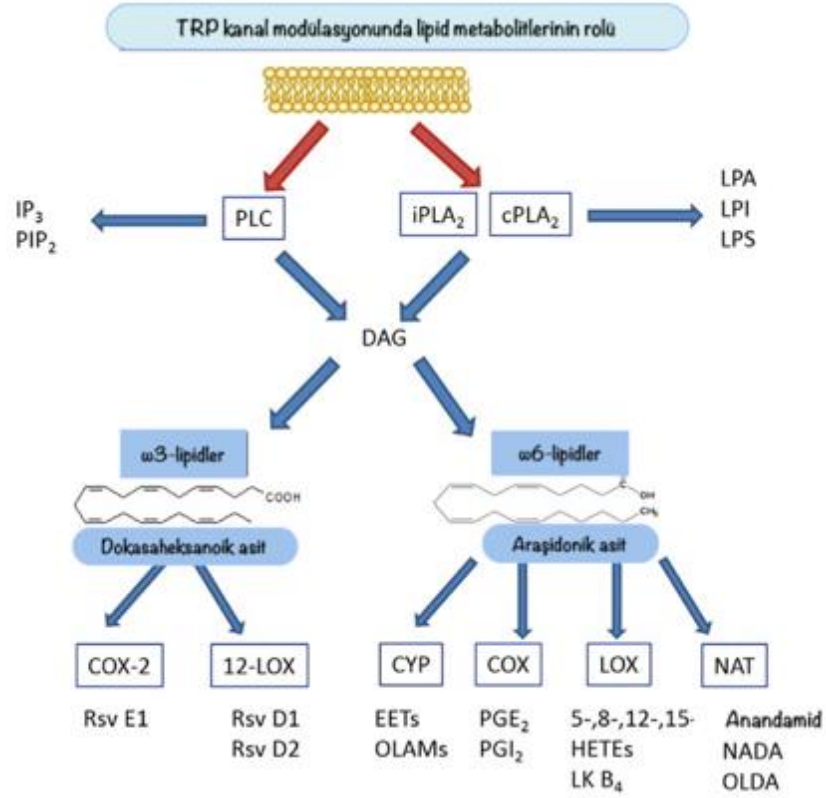
Çeşitli hücre tiplerinde ekspresyona olan çok sayıda TRP kanallarının redoks durumlarında meydana gelen değişikliklerin algılanması için sistein kalıntılarını kullandığı bilinmektedir. Redoks duyarlı TRP kanallarının duyuşal nöronlardaki ilk kanıtı, Szallasi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma ile ortaya çıktı. Bu çalışmada, TRPV1'in güçlü bir agonisti olan resiniferatoksinin dorsal boynuz ve AKG'ye bağlanması, indirgeyici ve oksidan ajanların varlığında değişmiştir (70). Yapılan başka bir çalışmada oksidasyon ve redüksiyonun, sıçan TRPV1 kanallarının heterolog bir HEK293 (embriyonik insan böbrek hücre hattı) ekspresyon sisteminde sıcaklığa karşı hassasiyeti arttırdığını ortaya koymuştur. Hem hücre dışı hem de hücre içi sistein kalıntıları kanalların aktivasyonu için oksidatif modifikasyona tabi tutulur.

Beşinci ve altıncı transmembran bölgeleri arasındaki alanda lokalize olmuş, sıçan TRPV1'lerinde sistein mutasyonu, reaktif disülfid, NO ve H₂O₂ ile TRPV1 aktivasyonunun önemli ölçüde bastırılmasına neden olmuştur. Bununla birlikte, bu sonuç, mutasyonlar ile kapsaisin aktivasyonunun bastırılmasından ötürü, spesifik olmayan yapısal protein bozulmasını ele alan çalışmalar tarafından sorgulanmıştır. Tavuk TRPV1'lerinde, araştırmacılar tüm protein sistein tortularını mutasyona uğratmış ve sonrasında oksidasyonla başlatılan aktivasyondan sorumlu tekil sistein tortularını değerlendirmek için

tek tek sistein kalıntılarını tekrar proteine geri yerleştirmiştir. TRPV1'in oksidasyona duyarlılığını düzeltebilen çok sayıda N- ve C-terminali tersine çevirme mutasyonları saptamışlardır. Ek olarak, tavuklardaki TRPV1'in aktivasyonunun disülfid bağının oluşumu yoluyla dimerizasyonun bir sonucu olduğu öne sürülmüştür. Yukarıdaki oksidasyon kaynaklı TRPV1 aktivasyon modellerinin hepsinin, protein yapısının spesifik olmayan bir şekilde parçalanmasına eğilimli olan sistein bölge yönelimli mutageneze dayanmaktadır. Bu durum, TRPV1 kanallarının indirgeyici ajanlara olan duyarlılığının, bir disülfid bağının varlığına atfedilmesinden dolayı önemlidir (71).

2.15. TRPV1 Kanal İnhibisyonu

KKPN'ye TRP kanallarının katkısı göz önüne alındığında, TRP kanallarının antagonistleri periferden spinal korda nöropatik ağrının iletimini önlemede yardımcı olabilir. İkinci jenerasyon TRPV1 antagonistleri klinik test aşamasındadır ve önümüzdeki birkaç yıl içinde kullanıma girmiş olabilir. Endojen lipid menşe'li TRPV1 inhibitörleri nöroprotektin D1 ve resolvin E1'in (İnsan vücudu tarafından omega-3 yağ asitleri eikosapentaenoik asit ve dokosaheksaenoik asitten üretilen, hücresele inflamasyonu azalttığı düşünülen çeşitli bileşikler) farelerde sinir hasarını takiben mikroglia ve astrositlerin aktivasyonunu ve ardından sitokin salınımını azalttığı gösterilmiştir (72,73), (Şekil 6).



Şekil 6. TRP kanal modülasyonunda rol oynayan lipid metabolitleri. (74)

Dahası, nöroprotektin D1, sinir hasarından kaynaklanan mekanik allodininin iyileşmesine yardımcı olmuştur (75). TRP kanallarının ve glial hücre aktivasyonunun sinerjik inhibisyon mekanizmaları, dirençli gliyoz durumunun (gliyoz, beyinde astrosit üretiminin artış göstermesi) ve artmış TRPV1 aktivasyonunun da dahil olduğu KKP'nde, özellikle de paklitaksel kaynaklı KKP tedavisinde umut verici olabilir. Aynı aileye ait ve aynı zamanda güçlü anti-inflamatuvar özelliklere sahip bir lipid olan maresin-1'in farelerde vinkristine bağlı mekanik allodininin iyileşmesine katkı sağladığı ispat edilmiştir (76). Bununla birlikte, TRP kanal antagonistlerinin kullanımı, KKP mekanizmalarındaki kemoterapötik ilaca bağımlı heterojenite ile sınırlıdır.

2.16. KKP için Terapötik Seçenekler

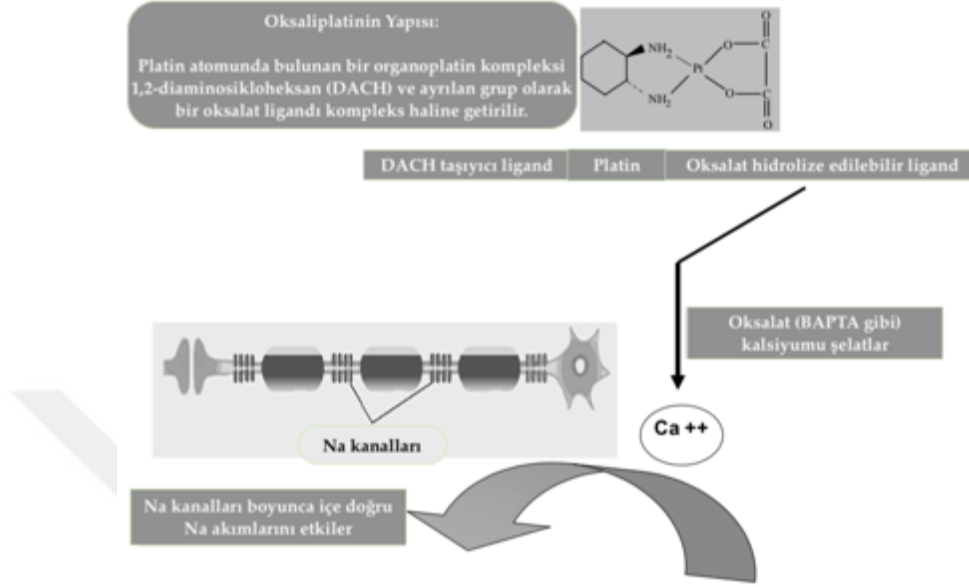
KKP'nin önlenmesi ideal terapi stratejisi ile mümkündür, ancak bugüne kadar, çoğu önleyici stratejiler KKP'nin patofizyolojik mekanizmalarına nedensel olarak değinmeden sadece deneysel olarak test edilmiştir. Bazı

yapılan bir çalışmada paklitaksele bağı mekanik allodini'yi azalttığı keşfedilmiştir (78), ancak tüm antioksidanların periferik sinir sisteminde (PSS) veya merkezi sinir sistemindeki (MSS) ROS üretimini ya da salınımını etkili bir şekilde önlemesi beklenmemektedir.

Mitokondri protektif fonksiyonları ile endojen bir antioksidan olan asetil-l-karnitin, bir klinik çalışmada taksan tarafından indüklenen KKP'nin iyileşmesinde faydasız oldu ve hatta bir grup hastada taksan aracılı KKP'yi şiddetlendirdi (79). Benzer şekilde, 70 hastayı içeren bir çalışmada, lipofilik antioksidan α -lipoik asit platin kaynaklı KKP semptomlarını hafifletemedi (80). Alfa-lipoik asit oksitlenmiş glutatyon disülfidi indirgeyerek serbest glutatyonu geri kazandırdığından, α -lipoik asit ve glutatyonun bir kombinasyonu, indirgenmiş glutatyonu takviye edebilir ve A vitamini ile E vitamini hipotezinde olduğu gibi, kombinasyonunun kullanımı, tek başına α -lipoik asit veya glutatyonundan daha güçlü bir antioksidan etkiye sahip olabilir. Küçük çaplı bir çalışmada, A vitaminin türevi retinoik asidin KKP'nin iyileşmesine katkı sağladığı bulunmuştur (81). Bununla birlikte retinoik asidin cis ve all-trans izomerleri, endojen TRPV1 aktivatörleri olarak tanımlanmıştır, bu nedenle nosiseptörler de dahil olmak üzere periferik duyu nöronlarının eksitabilitesini ve duyarlılığını artırır (82). Bu gözlem temelinde, KKP'yi önlemek için retinoik asit önerilemez. Son olarak, küçük randomize bir faz II çalışması, oksaliplatin kaynaklı KKP semptomlarının bir vitamin B6 türevi ile azaltıldığını bildirmiştir (83).

Dokosaheksaenoid asit ve eikosapentaenoid asitten türeyen omega-3 yağ asitlerinin nöroprotektif, anti-inflamatuvar ve anti-nosiseptif etkileri birçok ağrıya bağlı bağlamda gösterilmiştir (84). Omega-3 lipid tedavisi, plasebo ile karşılaştırıldığında, paklitaksel KKP insidansında belirgin bir azalma ile ilişkilendirildi. Bu çalışmanın sonuçları umut vericiyse de paklitaksel kaynaklı KKP'nin iyileştirilmesinde omega-3 yağ asitlerinin etkinliğini değerlendirmek için daha büyük klinik araştırmalara ihtiyaç vardır. KKP'de aminoasit glutamin'in potansiyel faydalı rolü, gözden geçirilmiş ve başka yerde değerlendirilen küçük klinik çalışmalarla kıyaslanmıştır (85). Az çalışma ile sınırlı olması nedeniyle, KKP'li hastalarda glutamin'in faydalı etkileri hakkında yeterli kanıt bulunmadığı sonucuna varılmıştır (85). Oksaliplatin uygulanmasından sonra, oksalat ile duyu nöronlarda şelatlanmış (şekil 8) iki

değerlikli katyonları doldurmak için (Ca^{+2} - Mg^{+2}) infüzyonları öne sürülmüştür (86). Gerçekten de birkaç küçük klinik çalışma, (Ca^{+2} - Mg^{+2}) infüzyonlarının umut verici etkilerini göstermiştir (87).



Şekil. 8 OX'un neden olduğu nörotoksitenin patogenezi altında yatan mekanizma. Oksalat, bikarbonat iyonları ile oksaliplatin'den intrasellüler salınır (88).

Özetle, küçük klinik çalışmalarda antioksidanların ve nöroprotektif ajanların KKPN'nin hafifletilmesinde veya önlenmesinde gelecek vaat eden ön etkileri bulunmuştur. Bununla birlikte, küçük gruplar, KKPN'ye koruyucu veya iyileştirici herhangi bir terapötik müdahale için büyük klinik kanıtlara dayalı herhangi bir kesin öneri verilememektedir. KKPN'de antioksidanların ve selenyum (Se) gibi nöroprotektif elementlerin olası yararlı etkilerini güvenilir şekilde değerlendirmek için geniş randomize, çalışmalara ihtiyaç vardır. Bier eser element olan Se, diğer antioksidanlara ve nöroprotektif maddelere alternatif olabilir. Se, nitrik oksit sentezini ve NADPH oksidaz aktivitesini azaltır ve böylece ROS üretimini azaltır. Antioksidan tedavisinin tümör büyümesini ve ilerlemesini etkileyebileceği unutulmamalıdır. Bir fare çalışması, N-asetilsistein ve E vitamininin DNA hasarını azaltarak ve tümör süpresör p53'ün aktivasyonunu önleyerek tümör hücresi çoğalmasını ve tümör büyümesini belirgin bir şekilde artırdığı bildirmiştir (89). Bu sonuçlar,

KKPN'yi önlemeye yönelik antioksidan tedavinin denemelerinde risk-fayda analizinin kullanılmasının gerekliliğini vurgulamaktadır (90).

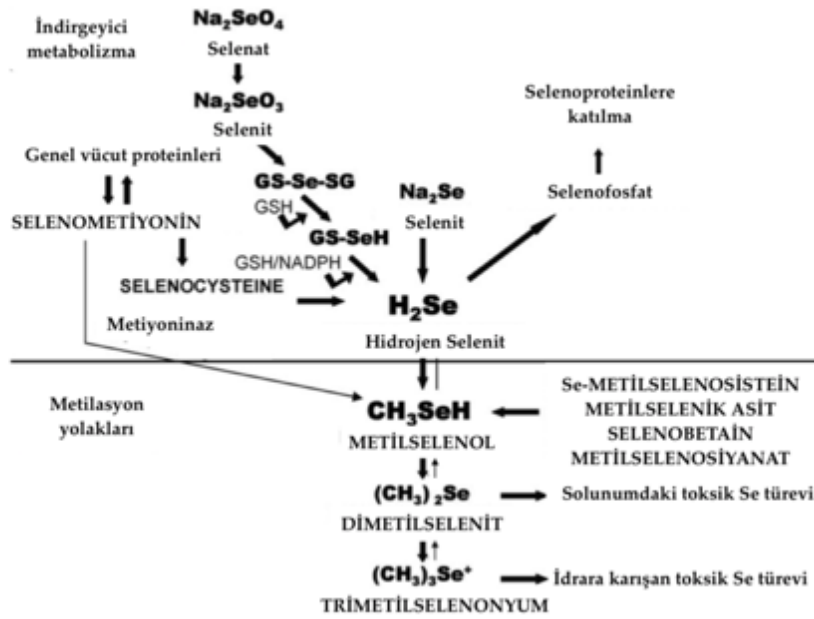
2.18. Selenyum

Se önemli biyolojik rolleri olan temel bir eser elementtir. Biriken kanıtlar, Se bileşiklerinin antikanser özelliklere sahip olduğunu gösterir. Se, spesifik olarak selenosistein formunda proteinlere dahil edilir ve metiyonin yerine selenometiyonin olarak spesifik olmayan bir şekilde dahil edilir. Se'nin yararları, glutatyon peroksidazın (91), tioredoksin redüktaz ve oksidatif strese karşı koruma sağlayan diğer enzimlerin oluşumunda Se'nin temel rolünün keşfinden sonra ortaya çıkmıştır. Bu keşif sonrasında selenoproteinlerin ve selenoenzimlerin tüm yüksek omurgalıların metabolizmasında yer aldığı çok sayıda çalışma ile doğrulanmıştır. İnsan sağlığı için önemli olan birçok alanda Se'nin rolünü gösteren birikmiş kanıtlar (92) Rayman tarafından gözden geçirilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen laboratuvar analizleri ve klinik çalışmaları ile kanser gelişmesine karşı Se'nin koruyucu rolü desteklenmiştir (93). Se'nin biyolojik sistemlerde çoklu rollere sahip olduğu açıktır. Birçoğu antioksidan ve nöroprotektif etkilere sahiptir. Son zamanlarda Se'nin kemoprotektif etkileri hakkında araştırmalar yapılmıştır (92).

Besinsel L-selenometiyonin ve L-selenosistein'in her ikisi de hayvansal protein bileşenlerindedir (94). İnsan Se-eksikliği hastalıkları ilk olarak Çin'in bazı bölgelerinde tanımlanmıştır. Bunlar, keşan hastalığı, endemik kardiyomiyopati, kashin-beck hastalığı ve deforme artritir (92). Diğer birçok çalışma, Se eksikliğinin bazı bağışıklık yeterliliğinin yitilmesi ile birlikte olduğunu göstermektedir. Hem hücre aracılı immünite hem de humoral bağışıklık bozulur (95). Se eksikliği aynı zamanda bazı viral enfeksiyonların (örneğin AIDS'e HIV ilerlemesi) oluşumu, hastalık progresyonu ile bağlantılıdır. Kadınlarda serum Se düzeyindeki azalma, düşük yapma riskini artırır (96) ve erkeklerde sperm motilitesinde ve fertilizasyon şansında azalma ile bağlantılıdır (97). Bazı nörotransmitterler Se eksikliğinden etkilenmektedir. Yaşlılarda düşük plazma Se konsantrasyonları, yaşlılık, Alzheimer hastalığı ve depresyon ile anlamlı bir şekilde ilişkilidir (98). Se, tiroit hormon metabolizmasında, deiyodinaz enziminin bir parçası olarak işlev görür (99). Bulgular, Se ile kardiyovasküler hastalık riski arasında bir korelasyon olduğu

konusunda fikirler mevcuttur (100). Romatoid artrit, pankreatit ve artmış oksidatif stres veya inflamasyon ile ilişkili astım gibi diğer bozuklukların Se'nin düşük seviyelerinden etkilenmesi beklenebilir (101). Genel oksidatif stres cevabının oluşturulması tamamen Se ve enzim düzeylerinden etkilenir (92).

Se, normal diyetlerde çoğunlukla organik formlarda bulunur. Organik Se, esasen selenometiyonin, selenosistein ve Se-metil selülozit formunda gıdalarda bulunurken, inorganik Se, selenit veya selenat olarak çok daha az sıklıkta ve çok düşük miktarlarda ortaya çıkar. Organik formların birçoğunda, selenometiyonin, Se bakımından zengin diyetlerin çoğunda baskın olan formdur. Se'nin hem organik hem de inorganik formları selenoprotein üretmek için vücutta benzer etkinlikle birlikte kullanılmaktadır (102) ancak Se, içinde bulunduğu kimyasal forma bağlı olarak metabolizmanın farklı noktalarına müdahil olur. Se metabolizmasını gösteren bir metabolik şema Şekil 9'de sunulmuştur.



Şekil 9. Se'nin metabolik yolunun şematik olarak ifadesi (103).

Se, selenit ve selenatın inorganik formları, glutatyon (GSH) ile azaltılmaktadır. Bir dizi ara metabolik aşama, H_2Se oluşumuna yol açar veya doğrudan metabolik havuza girer (104). Selenit ve NADPH-bağımlı redüktazlar (105) ile indirgeme yoluyla seleno-diglutatyon (GSSeSG) yoluyla

H₂Se ve elementel Se (Se⁰) üretir. Bu indirgeme yolu süperoksit (O₂•-) radikalının üretimine sıkı sıkıya bağlıdır. Gıdalardaki Se-içeren amino asitlerde bulunan organik Se, aynı anahtar ara maddeye metabolize edilir (106). Dahası, H₂Se, Se ve bunun metilasyon yolunun indirgeyici metabolizması arasındaki ara bileşiktir. H₂Se, ya glutasyon peroksidaz, tioredoksin redüktaz, iyodotironin deiyodinazlar gibi seleno-proteinlerin sentezine yönelik bir öncü olarak işlev görür ya da Se'nin mono-, di- ve tri-metillenmiş formlarını üretmek için tiyol S-metiltransferazların enzimatik reaksiyonu ile adım adım metilasyona (sırasıyla metilselol, dimetildiselenit ve trimetilselenonyum iyonu) uğrar (93). Se'nin ana diyet formu olan selenometiyonin, birçok farklı metabolik reaksiyona maruz kalmaktadır.

Diyetten alınan veya selenometiyoninden türetilen başka bir diyet organik Se türü olan selenosistein de H₂Se'ye dönüştürülür. Selenosistein de H₂Se'den selenofosfat sentetaz ile selenofosfattan sonra H₂Se'den sentezlenir. Böylece selenosistein tüm selenoenzimlerde aktif katalitik bölge oluşturur ve selenoprotein sentezi için gereklidir (107). Selenometiyoninden farklı olarak Se-metilselenosistein, proteinlere dahil edilmez, ancak Beta-liyaz ile doğrudan metil selüloza dönüştürülebilir (108). Se-metilselenosistein gibi, selenobetain, metilseleninik asit ve metilselosiyanat gibi sentetik Se bileşikleride kolayca Se kimyasal reaksiyonunun hücrel olaylarında ana ara metabolit olduğuna inanılan metilselenol üretir (109).

H₂Se havuzuna veya metilselenol havuzuna giren Se bileşikleride tiyol S-metiltransferazlar tarafından metilasyona tabi tutulur ve sırayla nefes içinde dışarı verilen veya idrarda vücuttan Se homeostazına katkıda bulunan farklı metil metabolik Se formları üretir. Düşük Se dozlarında, Se'nin monometilatlı formları, ana form olarak idrarla atılırken, trimetillenmiş formlar yüksek dozlarda baskındır. Trimetilselenonyum iyonunun seviyesi metabolik platoya ulaştığında, dimetilselenit solunuma verilir (110). Genel olarak, metilasyon yolunun, diyetle veya takviyelerde tüm Se için detoksifikasyon yolu olduğu düşünülmektedir (104).

2.19. Selenyumun Antioksidan Aktiviteleri

Tüm canlı aerobik organizmalar, ROS'un neden olduğu oksidatif hasara karşı koruma sağlayan belirli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (111). Bu antioksidan enzimlerin en bilinenleri süperoksit dismutazdır (112). Se'nin, serbest radikalleri temizleyebilen madde olarak veya selenoenzim ailesinin bir bileşeni olarak antioksidan savunmada önemli rollere sahip olduğu bulunmuştur. Oksidatif stresi ortadan kaldırmada etkisinin olduğunu gösteren deneysel kanıtlar, 1973 yılında Se'nin ilk tanımlanmış selenoprotein olan glutatyon peroksidaz (GPx) içerisine dahil edildiği anlaşılmıştır (91).

GPx ailesi enzim üyeleri, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve lipid peroksidlerinin azaltılmasında etkilidir. GPx'in oksidatif stresi azaltmadaki rolüne bakıldığında Se-bağımlı GPx'in kanser önleme için makul bir mekanizma sağladığı öne sürülmüştür. Bununla birlikte, GPx aktivitesinin, normal miktarlarda Se ile beslenen hayvanların dokularında en üst düzeye çıkarıldığı ve diyet olarak yükselmediği bulunmuştur. Kimyasal reaksiyona ulaşmak için gerekli olan yüksek seviyelerde 10 kat arttırılmıştır. Böylece, Se takviyelerinin kimyasal yoldan etkilerini, doymuş GPx seviyelerine bağlı olmayan bir şekilde uyguladıkları görülmüştür (113). Se'nin, antioksidan savunma sistemiyle ilişkili önemli enzimatik fonksiyonlara sahip selenoproteinlerin bir bileşeni olduğu bulunmuştur. Bunlardan biri olan tiyoredoksin redüktaz'ın Se metabolizmasında önemli bir enzim olduğu düşünülmekte, Se bileşikleri azaltılmakta ve hücre içi redoks durumunun kontrol altına alındığı görülmektedir (114). Diğer bir selenoprotein olan selenoprotein P, endotelial hücreleri serbest radikallerin zarar görmesine karşı korumaktadır (92). Bununla birlikte, bazı selenoproteinlerin, özellikle de selenoprotein P'nin optimal ekspresyonunun, daha yüksek miktarda diyetel Se (115) gerektirdiğini ve önemli sayıda bireyde selenoproteinlerin verimli sentezi için daha yüksek bir Se gereksinimine sahip olabileceği açıkça ortaya konmuştur. (116). Selenoprotein ekspresyon seviyelerindeki bireyler arası varyasyon, selenoprotein genlerinde, bireylerin selenoproteinlere Se'yi dahil edebilme verimliliğini belirleyen tek nükleotid polimorfizmleri için hesaba katılabilir (103).

2.20. Selenyum ve Hücresel Redoks

Se, hücresel redoks regülasyonunda önemli bir rol oynayan ve glutatyon peroksidazın fonksiyonu için gerekli olan bir eser elementtir. Bunun nedeni ise selenoenzimin aktif bölgesinin, oksidatif hasara karşı hücresel bileşenleri korumasında kritik role sahip olan yapısal bir bileşeni olmasıdır. Ayrıca Se, antioksidan etki, tiroit hormon metabolizmasının düzenlenmesi, keratinlerin bütünlüğünün sürdürülmesi ve antikor sentezinin uyarılması gibi fizyolojik aktiviteler sergiler (117). Buna ek olarak, daha önceki çalışmalarda Se nöroprotektif bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (118). Birçok çalışma insan ve hayvan modelinde platin ajanlarla birlikte uygulanan antioksidan tedavilerin etkinliğini incelemiştir (119).

2.21. Selenyumun KKPÜ Üzerine Etkisi

Se biyolojik etkilerinin çoğunu, 21. amino asit olarak kabul edilen selenosistein olarak dahil edildiği birkaç selenoprotein vasıtasıyla uygulayan temel bir mikro besleyici maddedir. İnsan selenoproteini, çeşitli fizyolojik süreçlerde yer alan 25 gen tarafından kodlanır. Glutatyon peroksidaz (GPx), tiyoredoksin redüktaz ve selenoprotein, antioksidan savunma, bağışıklık fonksiyonu, embriyogenez ve fertilitateyle ilişkili en iyi bilinen selenoproteinlerdir (120). Son 40 yıldır, Se metabolizması, toksikolojisi ve beslenmesi, çoklu biyolojik fonksiyonlar ve proteinlere dahil edilmesindeki eşsiz mekanizmaları nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Se'nin sinir sistemi için önemi ilk olarak, düşük seviyelerde glutatyon peroksidaz aktivitesine sahip intrakutan nöbetler geçiren çocuklarda, Se kullanımıyla iyileşme gözlenmesi ile anlaşılmıştır (121). Bununla birlikte, Se'nin merkezi sinir sisteminin (MSS) işleyişindeki rolü, oldukça uzun bir süre için belirsiz kalmıştır. Se ile ilgili yapılan biyokimyasal ve nörotoksikolojik çalışmalarla yeni yaklaşımlar ortaya konmuştur (122). İnsan sağlığında Se'nin rolüyle ilgili birçok kapsamlı çalışma (123) yayınlandı. Yine de sinir sistemindeki Se'nin fonksiyonları göz önüne alındığında, iyon kanalları disregülasyonu, mitokondriyal disfonksiyonu, oksidatif stres, kaspaz faaliyetleri, apoptoz gibi moleküler spesifik mekanizmalar doğuran ve bunlarla beraber neticede mikroglia aktivasyonu, aksonal transport bozukluğu ve hipereksitabilite gibi inflamasyon ve nöropatik ağrı durumlarının geliştiği kemoterapötik ajanların kullanımıyla tetiklenen

nöropatik ağrı durumlarındaki rolleri netlik kazanamamıştır. Bu bağlamda ele aldığımız bu tez çalışması kemoterapötik ajanların (OX) kullanımı nedeniyle tetiklenen nöropatik ağrı durumunda mekanizması bozulan iyon kanallarının (TRPV1) Se'nin etkisi ile düzelme durumunu araştıran tek araştırma niteliğindedir.

Se primer duyuşal nöron hücrelerinde kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların neden olduğu sürekli olarak yüksek reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve artmış bazal ROS üretimini önlemek için bir antioksidan savunması ile ROS'a karşı bu hücre tiplerinin savunulmasını ve bu ağrının bertaraf edilmesini sağlar. Buna dayanarak, oksidatif stres yeni antikanser ajanlarının rasyonel tasarımı için tümöre özgü bir hedef olarak kabul edilmiştir. Redoks modüle edici bileşikler arasında Se bileşikleri, ümit verici kemoterapötiklerin yan etkileri nöropatik ağrıya karşı olumlu potansiyellerinden dolayı geliştirilecek ilaçlarda mutlaka göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Se bir dizi biyolojik fonksiyonlarda rol oynayan önemli bir eser elementtir. Se'nin sinyal iletimi ve sinir sisteminin fizyolojik fonksiyonlarının devamında önemli katkılar sağladığı daha önceden yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (124). Aynı zamanda GSH-Px enzimi için bir kofaktör görevi görür ve ayrıca antioksidan savunmaya katılan selenoproteinlere dahil edilir (125). Selenosistein veya selenometiyonin gibi Se'nin birtakım formları olan memeli proteinlerine dahil edilirler (122). Yüksek konsantrasyonlarda biyolojik sistemlere toksik etkisi olsa da düşük dozlardaki Se epilepsi (126) ve ağrı gibi çeşitli nöronal hastalıklarda nöroprotektif maddeler olarak rol oynamaktadır. Se'nin nöroprotektif etkileri, apoptozu inhibe etme yeteneğine ve iyon kanalları yoluyla Ca^{+2} girişini modüle etmesine bağlanır. Arka kök gangliyonları, afferent spinal sinirlerde nöronların hücre gövdelerini içeren arka kökündeki nodüllerdir. Nosiseptif uyarıları elektriksel iletilere dönüştürerek beyne iletirler, ayrıca merkezi sinir sistemindeki sinaptik iletimi modüle ederler (118).

Duyusal nöropatiler ve nöropatik ağrı, tüm dünyada milyonlarca insanı etkileyen yaygın kronik klinik durumlardır. Duyusal nöronopatiler ya sinir hasarlanmasından ya da diyabet ve periferel duyuşal sinirlere zarar veren, kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerden (KKPN) kaynaklanır. Bu

hasarın bir sonucu olarak AKG nöronları aşırı uyarımlı hale gelir. Duyusal nöropatilerin AKG nöronlarının primer dejenerasyonu ile karakterize olduğu ileri sürülmüştür (118). Se'nin nöroprotektif desteğinin AKG, SN nöronlarında sitozolik Ca^{+2} düzeyleri, apoptoz ve oksidatif stres parametreleri üzerine etkileri moleküler analiz teknikleriyle ele alındığında ancak anlaşılabilir. Nitekim yaptığımız tez çalışması bu parametreler eşliğinde Se'nin olumlu etkisini ele almıştır. Yaptığımız bu tez çalışmasının sonuçları incelenecek olursa, kemoterapötik ajanlardan biri olan OX uygulanan sıçanlarda gelişen periferik nöropatik ağrı modelinde Se'nin, TRPV1 aracılı iyileşmeye katkı sağlayıp sağlamadığı, katkı sağlıyorsa da bunu hangi yollar aracılı gerçekleştirdiği, nöronal hücrelerde (AKG, SN) apoptotik yolların, kaspaz kaskadlarının, JC-1 değişimlerinin, ROS üretim seviyelerinin, TRPV1 kanal aktivasyon düzeyleri açısından moleküler tekniklerle ele alınmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler

Amplifikatör: HEKA (Almanya)

Buz yapım cihazı: ITV IQ P5C (Amerika)

Casy TT hücre sayım cihazı: Roche, (Almanya)

Çalkalamalı su banyosu: Biosan Orbital shaker PSU 10i (Türkiye)

Çalkalamalı su banyosu: Termal Laboratuvar Aletleri (Türkiye)

Çoklu kuyucuk okuyucu: Plate reader Infinite 200 Pro, Tecan (Avusturya)

Distile su cihazı: Purelab option DU25 (Amerika)

Faraday kafes sistemi: SDÜ Metal atölyesi (Türkiye)

Hassas terazi: Scaltec SPB 32 (İsviçre)

Hücre kültürü flaskları: (25 ve 75 cm²) (Çin)

Hücre kültürü inkübatör: Heal Force HF90, Smart Cell (Japonya)

Isıl ayarlı manyetik karıştırıcı: Variomag Monoterm (Almanya)

İnverted mikroskop: Zeiss (Almanya)

Kalsiyum sinyali için şeffaf küvet: Sarstedt Cuvvette (Almanya)

Laminer akım kabini: Cryste, Puricube (Güney kore)

Laminer akım kabini: Jouan B4I (Fransa)

Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)

Mikromanüplatör: Marzhauser Wetzlar (Almanya)

Ph metre: Hanna Instruments (Portekiz)

Pipet yapım cihazı (Puller): Sutter Instruments (Amerika)

Pipetler (borosilikat): Sutter Instruments (Amerika)

Pompa (peristaltik): Ismatec (İsviçre)

Santrifüj için falkon tüp: isolab 15 ml ve 50 ml (Almanya)

Soğutmalı santrifüj cihazı: Kubota 2800 (Japonya)

Spektroflorometre cihazı: Varian, Cary Eclipse (Avustralya)

Steril 96'lık çoklu kuyucuk: Greiner Bio-One (Almanya)

Sterio Mikroskop: Olympus Corporation T5, SN (Japonya)

Şarjlı pipet için plastik pipetler: LP Italiana 5, 10 ml (İtalya)

Şarjlı pipet: Hirschmann (Almanya)

Şarjlı pipet: Witeg (Almanya)

Titreşim önleyici masa: SDÜ Metal atölyesi (Türkiye)

Von-Frey ağırlık testi iğneleri: (Japonya)

Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Antibiyotik: Penicillin/Streptomycin, Biochrom (Almanya)

APOPercentage Release Solution: Biocolor (İrlanda)

Apoptoz kit: APOPercentage, Biocolor (İrlanda)

Dimethyl sulphoxide (DMSO): Sigma (Amerika)

DTNB: Sigma (Almanya)

EGTA: Merck (Almanya)

Fetal sığır serumu (FBS): Biochrom (Almanya)

Fura-2 AM: Invitrogen (Amerika)

Kaspaz 3: Kaspaz 3 substrat AC-DEVD-AMC (İsviçre)

Kaspaz 9: Kaspaz 9 substrat AC-LEHD-AMC (İsviçre)

L-glutamic acid: Merck (Almanya)

Medium DMEM: Biochrom (Almanya)

Medium RPMI 1640: Biochrom (Almanya)

Mitokondriyal membran depolarizasyon kit: JC-1, Santa Cruz (Amerika)

Oxaliplatin: Celdach (Hindistan)

Phosphate Buffered Saline (10X, PBS): Biochrom (Almanya)

ROS kiti: Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) (Amerika)

Selenyum (Sodyum Selenit): Approx Sigma 55261 (Almanya)

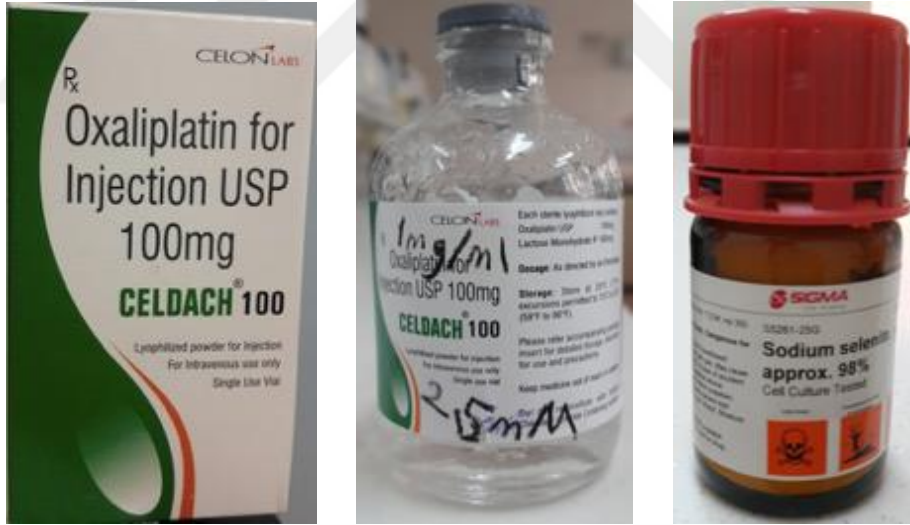
Triton X-100: Sigma (Almanya)

Trypsin-EDTA (%0,25): Sigma Aldrich (ABD)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Oksaliplatin ve Selenyum

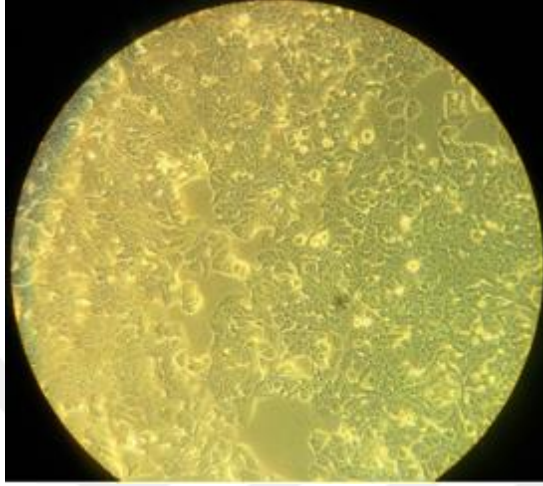
Oksaliplatin, Celdach 100 mg, (Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103) Hindistan'dan tedarik edilmiştir. Hücre kültürü ortamında (MCF-7 hücre hattı) Oksaliplatin 50 μ M doz ile 24 saat inkübe edildi. Se ise 200 nM dozda 2 saat süreyle inkübe edildi (118). Oksaliplatin, %5 glikoz çözeltisi içinde çözülüp farelere 4 mg/kg dozda enjekte edilmiştir (128). Bu dozlar insanlar için (1,7 m boy, 65 kg) 135–175 mg/m² tavsiye edilen dozundan yola çıkarak sıçanlara uygun olan doz hesaplanmıştır. Oksaliplatin her haftanın pazartesi ve salı günleri (Gün 1, 2, 8, 9, 15, 16, 22 ve 23) haftada iki kez periton içi (i.p.) uygulanmıştır. Ağrı testleri 0, 7, 14, 21 ve 28. Günlerde yapılmıştır. Se ise %5 dekstroz sıvısında (sodyum selenit ve 1,5 mg/kg) çözüldükten sonra intraperitoneal ve gün aşırı 4 hafta süreyle (toplam 14 doz) verilmiştir (5,127).



Resim 1. CELDACH 100 mg Oxaliplatin (Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103) Hindistan'dan tedarik edilmiştir. Sodium Selenite, Sigma S5261



Resim 2. Von-Frey filamentleri (20PC Aesthe Modeli, No: 160615, Muromachi Kikai Co., Ltd. Tokyo, Japonya) ve çalışmamıza dahil olan Wistar Albino sıçan üzerinde Von-Frey iğneleriyle ağrı testi yaparken.



Resim 3. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı inverted mikroskop görüntüsü (10X)



Resim 4. Hücreler için hazır aldığımız mediumların (hücre besiyeri) ve çeşitli ilave kullandığımız besleyici solüsyonlarının içinde bulunduğu +4 °C'lik buzdolabı



Resim 5. Hücreleri vücut ortamı koşullarında çoğalttığımız (37 °C, %5 CO₂) sıvı ceketli steril inkübatör.



Resim 6. Herbir hücre türü için spesifik belirli devir hızı ve süresi döndürerek çöktürme işlemini yaptığımız santrifüj cihazı ve hücrelerin morfolojik şekillerini ve büyüme durumlarını değerlendirdiğimiz İverted mikroskop cihazı.



Resim 7. Hücreleri dondurduğumuz sıvı nitrojen tankı ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$)



Resim 8. Hücre kültürü laboratuvarında kullandığımız tüm besiyer ve besleyici yardımcı maddeleri çalışmaya başlamadan önce ısıttığımız 37 °C çalkalamalı su banyosu



Resim 9. Hücre Kültüründeki Laminer flow cihazı. Hücrelerin flasklara ekimi, pasajlanma işlemleri, hücre kaldıma (tripsin yardımıyla) vs hücresel tüm işlemlerin yapıldığı steril ortam



Resim 10. Primer duyusal nöronlardan AKG ve SN nöronlarını izole ettiğimiz steril kabin. Bu kabinde kullanılan bütün ekipmanlar sterilizasyona tabi tutulmuştur.



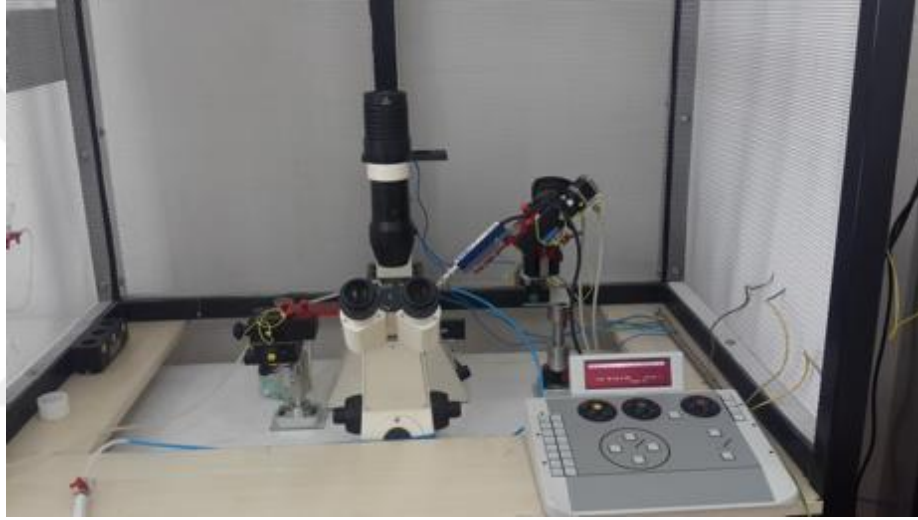
Resim 11. Biyofizik Laboratuvarında kullandığımız Casy TT system hücre sayım cihazı (Almanya)



Resim 12. Hayvanlardan elde ettiğimiz Primer duyusal nöron hücrelerinde ve in-vitro hücre hattında kalsiyum sinyali analizleri için kullandığımız floresans spektrofotometre cihazı (Cary Eclipse, Varian Inc, Sydney, Avustralya).



Resim 13. Hayvanlardan elde ettiğimiz primer duyusal nöron hücrelerinden tek bir AKG hücreinde patch-clamp kaydı alınırken, pipet tek bir hücreye temas ettiği esnada çekilmiş bir fotoğraf.



Resim 14. Patch-clamp (yama-menteşe) seti, Faraday kafesi (Bu cihaz ile bir pipet yardımıyla hücrelere temas edilerek akım kayıtları alınmaktadır) ve puller cihazı (pipet hazırlamak için kullanılmaktadır). Hayvanlardan elde ettiğimiz AKG primer duyusal nöron hücrelerinde bu cihaz ile akım kayıtları aldık.

3.2.2. Grupların Oluşturulması

Çalışma sıçan ve hücre kültürü olarak iki kısımdan meydana gelmiştir

3.2.3. Sıçan çalışması

Bu çalışmada 12 haftalık 180-200 g ağırlığındaki 40 adet diři Wistar Albino sıçanlar kullanılmıştır. Saat 08:00 den akşam 20:00 e kadar ışıklandırılmış özel odalarda, oda koşullarındaki sıcaklık (25 ° C) ve nemde (%65-70) kontrollü koşullar altında kafes başına dörd-beř sıçan dūřecek şeklinde ayarlanmış gruplar halinde organize edilmiştir. Hayvanların kafeslerinde yiyecek ve su bakımından sürekli erişim olanağı sağlanmıştır. Tüm hayvanların deney aşamasında bakım ve denetimi deney hayvanları laboratuvarında sağlanmıştır.

Hayvanlar 4 gruba ayrıldı;

Kontrol grubu (n=10): Herhangi bir ilaç uygulanmamış sağlıklı sıçanlar kullanılmıştır. Bu sıçanlara plasebo intraperitoneal bir kez 1 ml %5 glikoz ve 28 gün süre ile gün aşırı intraperitoneal uygulanmıştır. Tüm sıçanlar 28. gün sonunda sakrifiye edilmiştir.

Se grubu (n=10): Bu gruptaki sıçanlara intraperitoneal Se (1,5 mg/kg ve gün aşırı) (5) ve 28 gün süre ile gün aşırı intraperitoneal uygulanmıştır. Tüm sıçanlar 28. gün sonunda sakrifiye edilmiştir.

OX grubu (n=10): Bu gruptaki sıçanlara intraperitoneal OX (4 mg/kg ve haftada iki kez) (128) ve 28 gün süre ile gün aşırı intraperitoneal uygulanmıştır. Tüm sıçanlar 28. gün sonunda sakrifiye edilmiştir.

OX+Se grubu (n=10): Bu gruptaki sıçanlara intraperitoneal OX (4 mg/kg ve haftada iki kez) ile Se (1,5 mg/kg ve gün aşırı) ve 28 gün süre ile intraperitoneal uygulanmıştır. Tüm sıçanlar 28. gün sonunda sakrifiye edilmiştir.

Hücre kültürü çalışması (4 grup şeklinde planlandı);

Hücre kültürü çalışmaları TRPV1 kanalları yapısında bulunan MCF-7 (ATCC, HTB-22) meme kanser hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler şu gruplardan oluşturuldu;

Kontrol grubu (n=6): Herhangi bir ilaç uygulanmamış MCF-7 meme kanser hücreleri 24 saat süre ile hücre kültürü ortamında tutuldu ve daha sonra ilave 2 saat serum fizyolojik ile inkübe edildi.

Se grubu (n=6): Bu gruptaki hücreler, 24 saat süre ile hücre kültürü ortamında bekletildikten sonra 2 saat 200 nM Se ile inkübe edildi (118).

OX: Bu gruptaki hücreler OX (50 µM) ve 24 saat süre ile hücre kültürü ortamında inkübe edildi ve daha sonra ilave 2 saat serum fizyolojik ile inkübe edildi (129).

OX+Se grubu: Bu gruptaki hücreler önce OX (50 µM) ile 24 saat süre ile hücre kültürü ortamında inkübe edildi ve daha sonra ilave 2 saat 200 nM Se ile inkübe edildi.

3.2.4. Hücrelerin Çoğaltılması

3.2.4.1. Besiyerlerin Hazırlanması

MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı in-vitro pasajlama işlemlerinde RPMI-1640 (Biochrom, Almanya) besiyeri kullanılmıştır. Taze açılan RPMI-1640 (500 ml) besiyer üzerine son konsantrasyonları %10, %1 olacak şekilde sırasıyla inaktive edilmiş FBS (Biochrom, Almanya) ve penisilin streptomisin (Biochrom, Almanya) ilave edildi. Hazırlanmış olduğumuz bu besiyer, hücre kültürü laboratuvarında bulunan dolapta (+4°C) saklandı.

3.2.4.2. Laminer Kabinde Çalışma Öncesi Hazırlık

MCF-7 hücrelerinin ekim, pasajlama işlemleri steril Laminer Kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin ekim işlemi öncesi laminer kabin çalışma yüzeyi ve çalışmada kullanılmak üzere paketleri açılmadan kabin içine aldığımız bütün malzemelerin paketleri %70'lik etil alkolden geçirilmiştir. Sonrasında ise laminer kabin (MSC 12, Jouan, ABD) ve kabin içinde bulunan tüm gereç ve malzemeler, 15 dakika boyunca kabin içine monte edilmiş olan

Ultraviyole (UV) ışığa maruz bırakılarak çalışma öncesi UV-sterilizasyonu yapılmıştır. Çalışma öncesi kullanacağımız bütün besiyer ve diğer tüm solüsyonlar 37 °C’de çalkalamalı su banyosunda 15 dk ısıtıldı ve hepsi %70’lik etil alkolden geçirilerek laminar kabin içine alındı.

3.2.4.3. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Pasajlanması

Hücrelerin pasajlanması için steril paketler halinde satın aldığımız T25 ve T75 flasklar (Cell Star, Greiner Bio-One GmbH, Almanya) paketi açılmadan laminar kabin içine alındı. Kullanıma hazır besiyerden (yukarıda nasıl hazırlandığı anlatılmıştır) şarjlı otomatik pipet yardımıyla T25 ve T75 flasklara (sırasıyla 5 ve 10 ml) aktarıldı. Ayrıca 5ml taze besiyerden 15 ml’lik bir steril falkon tüpe aktarıldı. MCF-7 hücrelerini ihtiva eden cryo tüp (Greiner Bio-One GmbH, Almanya) -196°C sıcaklıkta sıvı nitrojen tankından çıkarıldı ve ön ısıtma işlemi için yaklaşık 1 dk süreyle 37 °C’deki su banyosuna (Termal Laboratuvar Aletleri, Türkiye) daldırılıp ısıtıldı. Isıl muamele sonrasında bu tüp %70’lik etil alkol ile steril lenerek laminar kabine alındı.

Tüp içindeki donuk hücre solüsyonu tam erimeden 15 ml’lik steril falkon tüpteki 5 ml taze besiyer üzerine donuk vaziyetteki bu hücre solüsyonu aktarıldı. 500 G de oda sıcaklığında 5 dk süreyle santrifüj işlemine tabi tutularak (Kubota 2800, Japonya) hücreler çalışmaya hazır hale getirildi. Hücreler santrifüj neticesinde dipte çöktü oluşturdu. Üstteki süpernatant el yordamıyla hassas bir şekilde atık kabına aktararak uzaklaştırıldı. Çökelti halindeki hücreler üzerine bir miktar (burada küçük bir hesaplama yapılarak çalışma planı dahilinde flask sayısı ayarlanır ve ona göre bu hücreler üzerine ilave edilecek besiyer miktarı belirlenir) taze medyum ilave edildi. Pipetaj yapılarak hücrelerin homojen dağılması sağlandı. Pipetaj sonrası hücre solüsyonunun tamamı aynı pipet ile alınarak önceden hazırladığımız flasklara aktarıldı. Kapakları kapatılan flasklar bilek hareketiyle çok hassas bir şekilde hareket ettirilerek hücrelerin homojen bir şekilde flaskın iç yüzeyine dağılması sağlandı. Ekim işlemi sonrasında flasklar inkübatöre (37 °C, %5 CO₂), (HF 90, Heal Force, Smart Cell, Amerika) alınarak burada hücrelerin kontrollü bir şekilde çoğalmaları sağlandı.

3.2.4.4. Hücrelerin Çalışılması

Inverted mikroskop kullanarak flasklardaki hücre yoğunlukları, hücre besiyer renklerinin değişimi (eğer renk pembeden sarıya dönmüşse besiyerlerin değiştirilmesine karar verildi) hücrelerin konfluent (hücrelerin flaskların yüzeylerini tamamen kaplaması) olmasına kadar takip edildi. Konfluent olan flasklar inverted mikroskop yardımıyla tespit edilerek çalışmaya dahil edildi. Bunlarla birlikte hücrelerde herhangi bir bakteriyel veya fungal kontaminasyon olup olmadığı da sürekli mikroskop yardımıyla kontrol edilerek takip edildi. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı adherent karakterize hücrelerdir, dolayısıyla buldukları flaskların taban yüzeyine yapışarak çoğalma özelliği göstermektedirler. Bu yapışkan hücrelerin çalışma öncesi kaldırılması gerekmektedir. Kaldırma işlemi öncesinde flasklar içindeki besiyerlerin tamamı atık kabına boşaltıldı.

Yıkama işlemi için her bir flaska 3 ml 1X Phosphate Buffered Saline (PBS, Biochrom, Almanya) ilave edilerek şarjlı otomatik pipet yardımıyla Pipetaj yapılarak flask tabanı yıkandı. Yıkama işlemi sonrasında ise hücrelerin üzerine %0,25'lik Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich, ABD) flask zeminini kaplayacak miktarda (T25 için, 1-2 ml; T75 için 3-4ml) ilave edilerek hücrelerin zeminden kaldırılması sağlandı. Hücrelerin kalktığı mikroskop yardımıyla kontrol edildi. Mikroskop ile hücrelerin flask yüzeyden ayrıldıkları anlaşılınca flasklar laminar kabine alındı ve üzerlerine 5 ml taze medyum eklendi. 5-6 kez pipetaj işlemi uygulandı. Pipetaj sonrasında hücreler steril bir 15 ml'lik falkon tüpe alındı. 5 dakika boyunca 500 G'de santrifüj edildi. Süpernatant atık kabına atıldı. Böylece Tripsin-EDTA'nın hücreler üzerindeki etkisi kaybolmuş oldu. Dipte biriken hücre üzerine 5 ml taze besiyerden ilave edilerek pipetaj yapıldı. Gruplar oluşturuldu ve hücreler 4 farklı grup isminin yazıldığı flasklara homojen olarak paylaştırıldı. Son konsantrasyonları OX (50 μ M), Se (200nM) olacak şekilde ayarlandı ve inkübe edildi.

3.2.5 Ağrı Testleri

Oksaliplatin kaynaklı nöropatik ağrı değerlendirilmesi kalibre edilmiş Von-Frey filamentleri (20PC Aesthe Modeli, No: 160615, Muromachi Kikai Co., Ltd. Tokyo, Japonya) kullanılarak asılı tel kafeste tutulan sıçanların arka pençesinin plantar yüzüne göre ölçülmüştür (130). Bu ağrı testine özel tasarlanmış farklı kalınlıktaki iğnelere verilen bir yanıt, hayvanın arka pençesini kaldırılması ile tespit edildi. Termal nosiseptif uyaranlara yönelik pençe geri çekme eşik zamanını değerlendirmek için Hot Plate (sıcak plaka) testi için ısı kontrollü plaka (Varioma, ermo Fischer Inc., Langenselbold, Almanya) kullanıldı. Sıcak plaka test cihazı, $55.0 \pm 0,6$ °C'lik sabit bir sıcaklığa sahip elektrikle ısıtılmış bir yüzeye sahipti. Her sıçan sıcak plaka üzerine yerleştirildi ve reaksiyon süresi, sıçanın arka pençesini yalması ya da ayağını artarda çekmesi ile tespit edildi (131). Tüm gruplardaki hayvanlar deneyin başlangıç orta ve son kısımlarında ağrı yanıtları Von-Frey filamanları kullanılıp ölçülerek hem de sıcak plaka (Hot-plate) (55 °C) yöntemi ile nöropatik ağrı oluşumu kabul edilmiştir (130). Bu testler 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerde yapılmıştır. Deney sonunda, tüm hayvanlardan arka kök gangliyon (AKG), siyatik nöron (SN) hipokampus örnekleri elde edilmiştir. Elde edilen taze arka kök gangliyon (AKG), Siyatik (SN) ve Hipokampal nöronları, örneklerinde aşağıdaki analizler yapılmıştır

3.2.6 AKG, SN ve Hipokampus Hücre İzolasyon Aşamaları

Kullanılan bütün cerrahi malzemeler sterilasyona tabi tutularak işlemlere başlanır. Yetişkin sıçanlar intraperitoneal uygulanan 5–10 mg/kg dozunda Xylazine, 40 – 80 mg/kg dozunda Ketamine verilerek hayvanlar dissosiyatif anestezi tekniğiyle genel anestezi altına alınmıştır. Hayvanın ayaklarına pens yardımıyla kısırtma hareketi yapıp tepkileri ölçülerek tepkisiz kaldığı ama kalp atışlarının devam ettiğinden emin olunur ve dekapitasyon yapılır. İvedilikle Kolona vertebralis bölgesi cerrahi makaslar aracılığıyla alınır ve DMEM besiyeri içerisinde inverted mikroskop altında kas dokularından iyice temizlenir. Kolona vertebralis bir bistüri aracılığıyla frontalden distale simetrik bir şekilde iki eş parçaya ayrılır. Karşımıza spinal kord çıkacaktır. Bir pens yardımıyla spinal kord hızlı bir şekilde kaldırılır. İnter-vertebral oyuklarda

karşılıklı dizilmiş arka kök gangliyon nodülleri boynu eğri pens vasıtasıyla taze medium içine alınır. 2,5 mg/ml dozda kolejenaz tip-4 enzimi ile 1 saat inkübatörde enzimatik parçalanır (132). Mekanik ayrıştırma ise farklı kalınlıktaki pipet uçlarından defalarca geçirilerek yapılır.

Laboratuvarımızda önceki çalışmalarda SN izolasyonlarının detayları verildi (130). Burada özetle bahsedecek olursak, SN hayvanların sağ ve sol arka ekstremitelerinde çalışıldı. İzolasyon esnasında iridektomi makası yardımıyla kesi atılarak çevre dokulardan ayrılması sağlandı ve 40 dakika boyunca 37 °C'de çalkalamalı su banyosunda 0.5 mg/ml kollajenaz (tip IV, Sigma) enzimini içeren DMEM solüsyonu ile inkübe edilmiştir. Enzimatik sindirimi durdurmak için 1,25 mg/ml tripsin inhibitörü (tip II-S1, Sigma) ilave edildi. Ayrışma neticesinde SN süspansiyonları 500 g'de 5 dk süreyle santrifüj edildi.

Hipokampus izolasyonunda ise hayvanlar yukarıda anlatıldığı gibi anestezi altına alındıktan hemen sonra dekapite edildi. Mikro cerrahi makas ve pens yardımıyla serebral korteks ivedilikle çıkarıldı. Serebral korteks bisturi yardımıyla, beyin sapı ve serebellumdan ayrıldı. Sağ ve sol hemisferler korpus kallozum hizasından iki eş parçaya bölündü. Bu aşamalar neticesinde her bir hemisferde karşımızda hilal şeklinde ve diğer yapılardan daha koyu renkli hipokampus belirdi. Hipokampus örnekleri mikro cerrahi makas yardımıyla disseke edildi ve parçalara ayrıldı. Hayvanların dekapitasyonunu müteakiben uygulanan işlemlerin tamamı Hank'ın tamponlu tuz çözeltisi (HBSS) içinde gerçekleştirildi (133). Mekanik parçalanma sürecini takiben enzimatik parçalanma aşamasına geçildi (37 °C'lik çalkalamalı su banyosunda 30 dakika boyunca tripsin ile inkübe edildi ve her 10 dakikada bir alt-üst edildi). Hücreler enzimatik parçalanma süreci sonrasında santrifüj edildi (5 dakika 500 g'de) ve supernatant atıldı ve 2 kez HBSS ile yıkama işlemi yapıldı.

3.2.7. Hücre içi Kalsiyum Ca⁺² Sinyali Analizleri

Oksalipatin kaynaklı periferik nöropatik ağrının neden olduğu TRPV1 katyon kanallarının aşırı aktivasyonu ile hücre içi kalsiyum iyon düzeyinin değerlendirilmesi ve Se'nin bu kanal aracılı tedavi edici rolünü kalsiyum sinyali cihazı ile araştırdık. Arka kök gangliyon (AKG) ve Siyatik (SN) primer duyuşal nöron hücreleri izole edildikten sonra hücre kültürüne alındıktan sonra

Ca^{+2} sinyali çalışmalarında kullanıldı. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarının $[Ca^{+2}]_i$ tayini için oda sıcaklığında 45 dakika süreyle $4\mu M$ fura-2 AM ile yüklendi (132).

Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücreler $37\text{ }^\circ C$ 'de probe-esterifikasyona tabi tutuldu (134) ve sonrasında manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2×10^6 olacak şekilde floresans spektrofotometre (Cary Eclipse, Varian Inc, Sydney, Avustralya) haznesine yerleştirildi. Hücre içi serbest Ca^{+2} iyon konsantrasyon düzeyi $[Ca^{+2}]_i$ değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm eksitasyon, 505 nm emisyon dalga boylarında yaklaşık 450-500 saniye süreyle kayıt alındı (135) ve Grynkiewicz ve arkadaşlarının metoduna göre hesaplandı (136). Dört gruba ait TRPV1 kanal aktivasyonu aracılığıyla Ca^{+2} akışı kapsaisin (CAP, 0,1mM) stimülasyonu ile gerçekleştirildi. CAP, kayıt başladıktan 100 sn sonra küvete ilave edildi ve 400-450 sn süreyle kanalın aktivasyon durumu incelendi. TritonX 'in 450. sn'de küvete ilavesiyle hücre içi kalsiyum depoları da dahil olmak üzere bütün hücrelerin membranları parçalandı ve maksimum değer belirlendi. EGTA (500. sn) ile açığa çıkan kalsiyum şelatlanarak minimum değer bulundu. Bu değerler Grynkiewicz ve arkadaşlarının (136) geliştirdiği formülde yerine yazılarak hücre içi kalsiyum düzeyleri gruplar arasında değerlendirildi.

3.2.8. Elektrofizyoloji

Oksaliplatin'i diğer kemoterapi ilaçlarından ayıran en belirgin ayırtedici özelliği iyon kanalları üzerindeki etkisidir. Burada kullanılan patch-clamp (yama-menteşe) tekniği, tek bir hücreye mikropipet yardımıyla dokunarak voltajı sabitleyip akım değişikliklerini ölçme tekniğidir. Bu tez çalışmasında AKG hücrelerinde TRPV1 kanallarının varlığı ve uygulanan kemoterapötik ilaç oksaliplatinin ve Se'nin bu kanal üzerine etkisi Patch-clamp uygulamaları ile araştırılmıştır. Patch-clamp uygulamaları ile ilgili bilgi Nazıroğlu ve Wehage'nin makalelerinde sunulmuştur (163,164). Hücrelerdeki TRPV1 kanalları üzerindeki kapsaisin ve Cpz dozu 100 nM ile 0.1 mM arasında değişmektedir.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada (137), AKG nöronlarında TRPV1'e karşı kapsaisin ve Cpz'nin farklı dozları test edildi ve bu çalışmada agonist ile antagonist dozları (kapsaisin ve Cpz) sırasıyla 10 μ M ve 0.1 mM olarak bulundu. Bu nedenle, mevcut tez çalışmasında bu dozlar kullanılmıştır. Bu amaçla, AKG hücrelerine (10 μ M) kapsaisin hücre dışı (çember içerisine) uygulanmıştır. Bu hücreler fosfat tamponu (PBS) içerisinde sulandırılarak patch clamp çemberine yerleştirilmiştir. Bu hücrelere cam pipetler ve mikromanüplator yardımı ile girilerek HEKA-paket programlarında hücredeki voltaj değişiklikleri kayıt edilmiştir (hücre teması, cell-attach ve tüm hücre, whole-cell). Daha sonra, hücre dışı kapsaisin verilerek TRPV1 kanalları aktive edilmiştir. Daha sonra hücre içi ve hücre dışı kapsazepin (Cpz) (100 μ M), gibi TRPV1 spesifik kanal inhibitörlerin etkisi kapsaisin ile kalsiyum stimülasyonu yapılmadan önce elde edilen AKG hücrelerinin 15 dakika bu maddelerle inkübasyonu ile bu kimyasalların bu AKG nöronlarındaki rolü araştırılmıştır (138).

3.2.9. Hücre Canlılığı (MTT) Analizi

Aşırı düzeyde oluşan oksidatif stresin (hidrojen peroksit) hücreye zararlı olduğu bilinmektedir. Se'nin koruyucu etkilerini değerlendirmek ve oksaliptatin kaynaklı periferik nöropatik ağrı durumunda oksidatif stres miktarını belirleyebilmek için AKG ve SN primer duyuşal nöron hücrelerinde ve in-vitro MCF-7 insan meme kanser hücre hattında canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesi esasına göre çalışan MTT deneyini uyguladık. Bu deneyde sarı renkte olan 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide maddesi canlı hücreler tarafından mitokondriyal solunum yolu ile mor renkli formazan kristaline dönüştürülmektedir. Eğer hücreler canlı değilse bu reaksiyon gerçekleşmez. Renk oluşumu da spektrofotometrik yöntemle niceliksel kolorimetrik temelde değerlendirildi (139). MTT boyası (0,5 mg/ml dozda) ile hücre solüsyonu 37 °C'de 90 dakika karanlıkta inkübe edildi. Ardından, süpernatant uzaklaştırıldı ve formazan kristallerini çözmek için DMSO eklendi. İşlemler iki kere yapıldı. Bir çoklu kuyucuk okuyucu (plate reader) (Infinite pro200; Tecan Austria GmbH, Groedig, Avusturya) (134) kullanılarak her bir kuyucuk için aynı absorban değerleri (490 ve 650 nm)

kullanılarak hücre canlılığı analizi tamamlanmıştır. Veriler, kontrole kıyasla hesaplanarak değerlendirildi.

3.2.10. Hücre içi ROS Üretimi Tayini

Hücre içi ROS üretimi çoklu kuyucuk okuyucu (Pleate reader, infinite pro200 marka, Avusturya) ile yapılmıştır. DHR 123, hücre zarına kolayca nüfuz edebilen floresans olmayan, yüksüz bir boyadır. Hücrenin içerisine girdikten sonra DHR 123, oksidasyon üzerine floresans özellikli bir boya haline gelir ve rodamin 123 (Rh 123) üretir; floresans miktarı ROS üretimi ile orantılıdır. Bu oksidasyon sırasında yağların oksidasyonu ile oluşmuş hücre içerisindeki serbest oksijen radikallerinin miktarı ölçülebilmektedir. Ne kadar çok floresans yayılırsa o kadar serbest oksijen radikalinin varlığını göstermektedir. Rh123'ün floresans yoğunluğu, çoklu kuyucuk okuyucu (Infinite Pro200) içinde ölçülmüştür. Eksitasyon 488 nm'de ve emisyon 543 nm'de (134) olarak belirlendi. Veriler, kontrole kıyasla hesaplanarak değerlendirildi.

3.2.11. Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Tayini

Hücreler, daha önce yaptığımız çalışmalarda tarif edildiği gibi (1,2) 37 °C'de 15 dakika süreyle 1µM JC-1 ile inkübe edildi. Katyonik bir boya olan JC-1, mitokondride potansiyele bağımlı birikimi gösterir. Kırmızı-yeşil floresans yoğunluğu oranında bir azalma ile mitokondri depolarizasyonunu gösterir. Yeşil JC-1 sinyali, 485 nm eksitasyon dalga boyunda ve 535 nm emisyon dalga boyunda, JC-1 kırmızı sinyali 540 nm eksitasyon dalga boyunda ve 590 nm emisyon dalga boyunda ölçüldü. Floresans değişiklikleri çoklu kuyucuk okuyucu (Infinite pro200; Tecan Austria GmbH, Groedig, Avusturya) kullanılarak analiz edildi. Veriler, kontrole kıyasla hesaplanarak değerlendirildi (139).

3.2.12. Apoptoz ve Kaspaz Testleri

Apoptoz testi, APOPercentage apoptozis kiti Biocolor Ltd. (Kuzey İrlanda) ile başka çalışmalarda da (Yazıcı T ve ark., 2017) anlatılan talimatlara uygun olarak gerçekleştirildi. Bir apoptotik hücre membranı asimetrisini kaybettiğinde, APOPercentage boyası aktif olarak apoptotik hücreleri kırmızı

renkte boyayarak hücre içine taşınır, böylece apoptozun spektrofotometre cihazı ile saptanmasına izin verir. Kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerinin belirlenmesi daha önce bildirilen bir yöntem (118,134) temel alınarak yapılmıştır. Kaspaz 3 substratı (AC-DEVD-AMC) ve kaspaz 9 substratı (AC-LEHD-AMC) bölünmeleri 360 nm eksitasyon ve 460 nm'de emisyon dalga boyu ile çoklu kuyucuk okuyucu (plate reader, Infinite pro200) ile ölçülmüştür. Veriler, floresan birim/mg protein olarak kontrole kıyasla hesaplanarak değerlendirildi.

3.2.13. (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) Düzeylerinin Değerlendirilmesi

AKG, SN ve hipokampus nöronal hücrelerdeki IL-6 ve TNF- α (DRG Inc., Marburg, Almanya) ve IL-1 β (Wuhan Fine Biological Technological Co., Ltd, Wuhan, Çin) düzeyleri, bir imalatçının enzim bağlantılı imünosorbent tahlili kullanılarak ölçüldü (140). Numunelerdeki sitokinlerin absorbansı 450 nm'de Infinite Pro200 mikroparka okuyucu (Tecan Inc, Groedig, Avusturya) ile okundu, oysa melatoninin absorbansı 405 nm'de plaka okuyucusunda okundu. Sitokin düzeyleri bu farklı primer hücre tipleri için pg/ml, % ve alan olarak grafiklendi.

3.2.14. İstatistiksel Analiz

Veriler, SPSS istatistik programı (sürüm 17.0, yazılım, SPSS, Chicago, IL) kullanılarak analiz edildi. Tüm sonuçlar, ortalama \pm standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Varyans analizi (ANOVA) ve eşlenmemiş Mann-Whitney U-testi yapıldı ve p değerlerinin 0.05'den küçük ve eşit olduğu kabul edildi. Hot Plate ve Von Frey'in pençe çekme eşik zamanı ve kuvveti, Dixon parametrik olmayan bir test kullanılarak analiz edildi. Anlamlı değerler, en düşük önemlilik farkı testi ile değerlendirildi.

4.BULGULAR

4.1. Kalsiyum (Ca⁺²) Sinyali Sonuçları

4.1.1. Sıçanlarda OXPN durumunda Ca⁺² Sinyali ve Se'nin Etkileri

İntraperitoneal olarak oksaliplatin (OX) uygulanan sıçanlardan izole edilen ve periferik ağrı iletiminden primer sorumlu arka kök gangliyon (AKG) ve siyatik duyu nöronlarında (SN) hücre içi kalsiyum konsantrasyonu [Ca⁺²]_i üzerine TRPV1 aktivasyonunun modülasyonu yoluyla Se'nin etkileri incelendi. Se'nin periferik duysal nöronlardaki TRPV1 kanalları üzerindeki etkisini açıklığa kavuşturmak için, Se ile in-vivo muamele edilen sıçanların nöronları, daha sonra kapsazepin (Cpz, 100 µM) ile bloke edildi. Kapsaisin (CAP, 10 µM) ile uyarılan AKG ve SN nöronal hücrelerinde kalsiyum'un hücre içine (sitozolik) akış miktarında (influx) önemli düzeyde artış meydana geldi. OX-kaynaklı nöropatik ağrılı sıçanların AKG ve SN nöronal hücrelerindeki bu [Ca⁺²]_i artışı, kalsiyuma geçirgen TRPV1 katyon kanallarının CAP ile aktivasyonuna atfedildi (Grafik 1-6). Bu periferdeki duysal nöron hücrelerinin (AKG ve SN) OX gruplarında kontrole kıyasla yüksek kalsiyum konsantrasyonu [Ca⁺²]_i olmasına rağmen, TRPV1 antagonistinin (Cpz) güçlü bir şekilde [Ca⁺²]_i konsantrasyonunu düşürdüğü (Grafik 2,5) gözlenmiştir (OX+Cpz, OX grubuna kıyasla p≤ 0.001).

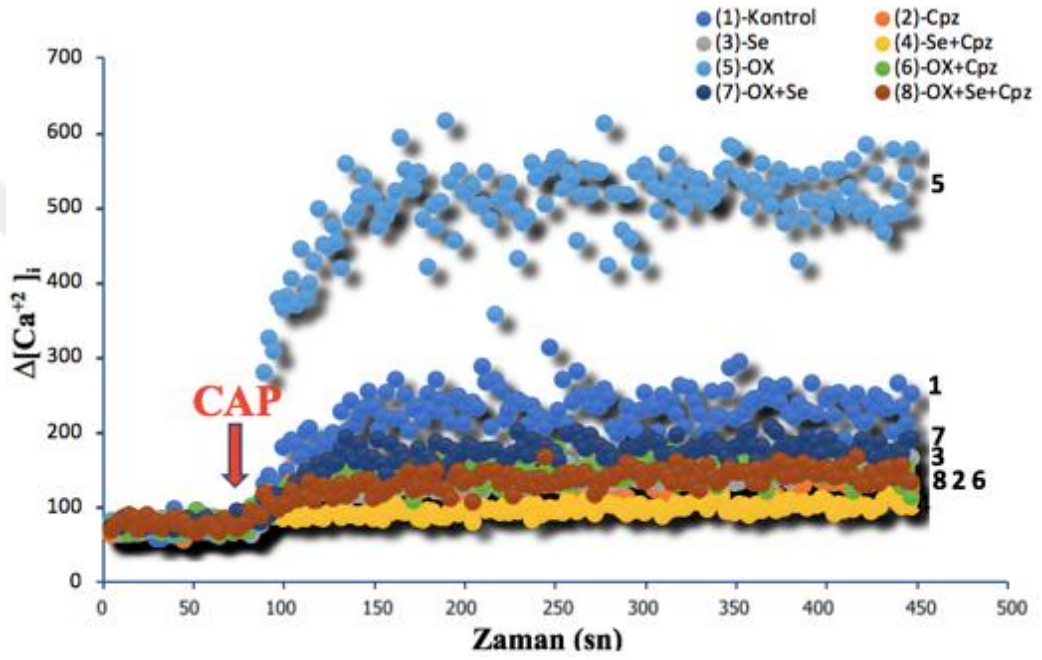
Buna ek olarak, Se ile tedavi edilen gruptaki nöronal hücrelerin [Ca⁺²]_i düzeylerinin kontrole kıyasla ciddi anlamda (p≤ 0.001) düşük olduğunu bulduk (Grafik 2, 5, 14). Bu periferik duysal nöron hücrelerindeki [Ca⁺²]_i düzeyi, OX+Se gruplarında OX grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü (p≤ 0.001) (Grafik 2, 5, 14). Bu nedenle Se, duysal nöronal hücrelerdeki TRPV1 katyon kanallarının aktivasyon mekanizmasını etkileyip OX-kaynaklı periferik nöropatik ağrı durumlarında önemli rol üstlenen hücre içi [Ca⁺²]_i düzeylerindeki önemli artışları engelleyerek yeni tedavi yaklaşımları sunabileceğini akla getirmektedir.

4.1.2. AKG Kalsiyum Sinyali Sonuçları

Kontrol, Se, OX ve OX+Se ile muamele edilen sıçanların arka kök gangliyonlarında kalsiyum [Ca⁺²]_i iyon konsantrasyonuna TRPV1 katyon kanalları aracılığıyla Se etkisi (n= 6 ve ortalama ± SD). Bu sıçanlardan OX grubundakilere OX (4 mg/kg ve haftada iki kez), Se grubundakilere (1,5 mg/kg ve gün aşırı Se) dozlarda 28 gün süre ile intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

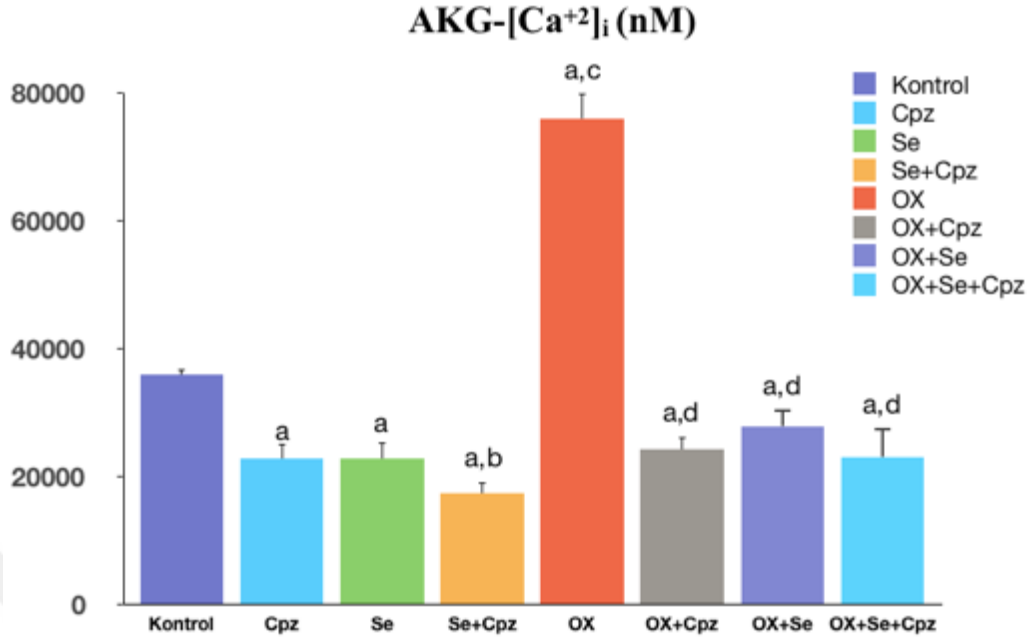
Sakrifiye sonrası (28. gün sakrifiye edildiler), bu kontrol, Se, OX ve OX+Se ile muamele edilmiş hayvanlardan AKG nöronları izole edilerek, Fura-2 ile 45 dk. süreyle yükleme öncesi in-vitro Cpz (100 μ M) ile muamele edildi. Kalsiyum sinyali analizi esnasında 450 sn süreyle CAP (10 μ M) ile TRPV1 kanalları uyarıldı.

a



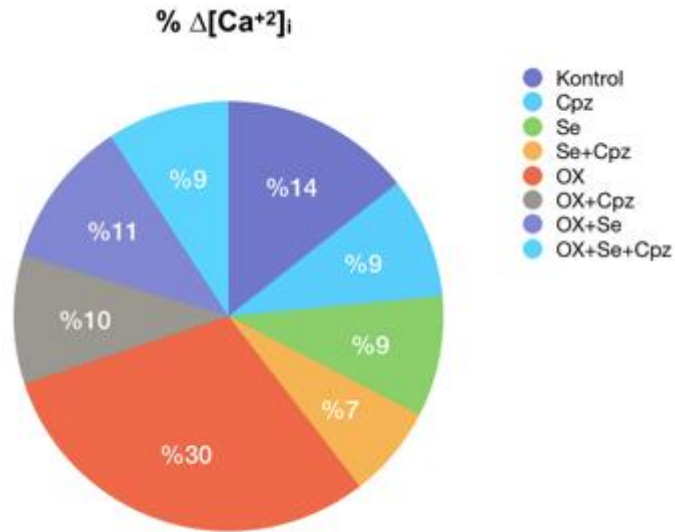
Grafik 1. AKG hücrelerinin CAP ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan kalsiyum konsantrasyonundaki $[Ca^{+2}]_i$ zamana göre değişimi tüm gruplar için ifade edilmektedir

b



Grafik 2. AKG hücrelerinin CAP ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan toplam kalsiyum miktarı [Ca²⁺]_i nM olarak ifade edilmektedir (^ap ≤ 0.001 kontrol grubuna kıyasla; ^bp ≤ 0.05, Cpz, Se gruplarına kıyasla; ^cp ≤ 0.001, Se, Cpz, Se+Cpz gruplarına kıyasla; ^dp ≤ 0.001 OX grubuna kıyasla idi. (n= 6 ve ortalama ± SD).

c

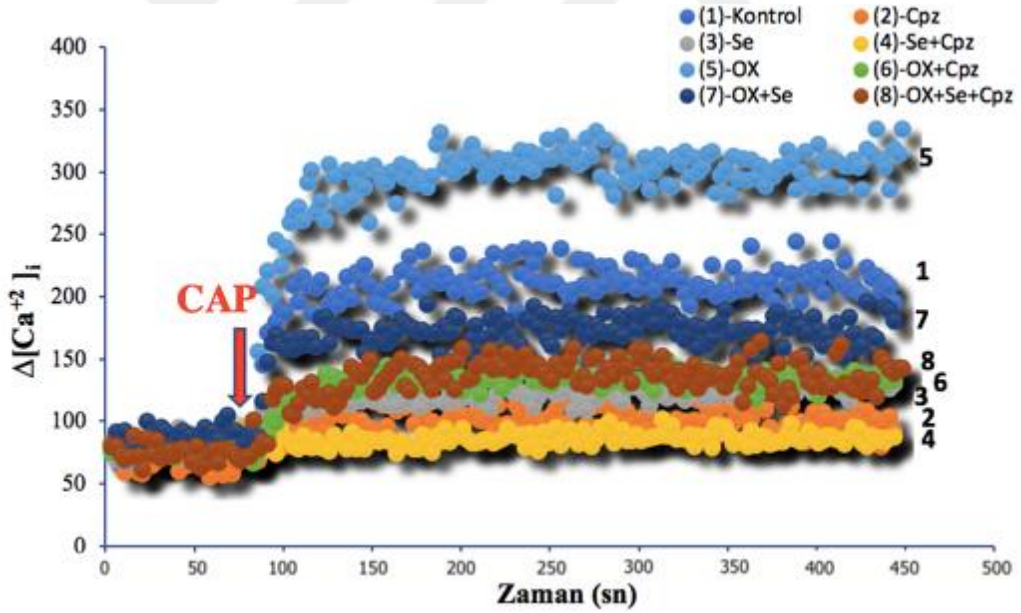


Grafik 3. AKG hücrelerinin CAP ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan toplam kalsiyum miktarı % olarak ifade edilmektedir.

4.1.3. SN Kalsiyum Sinyali Sonuçları

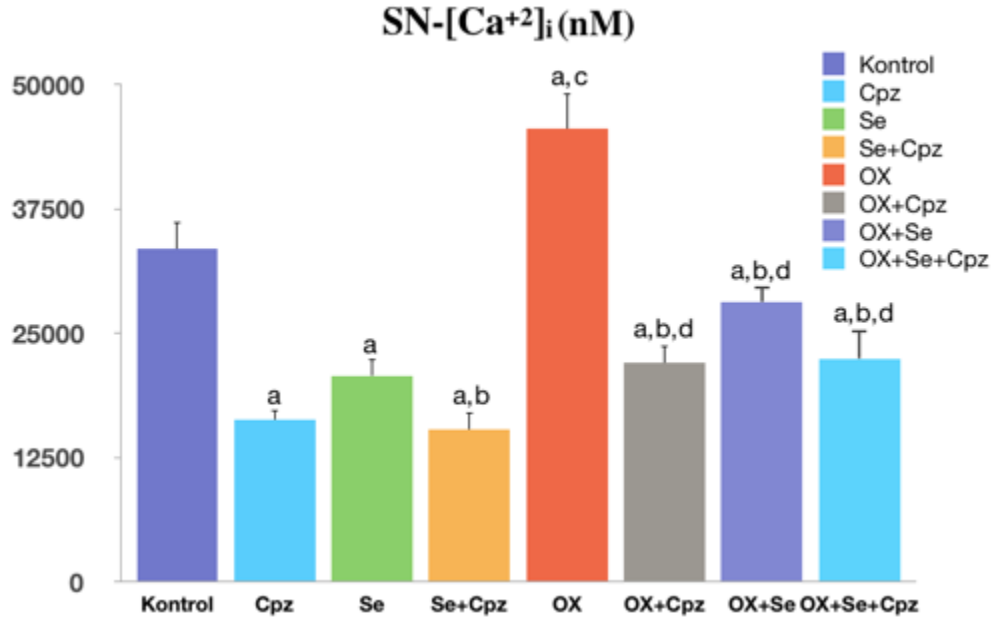
İn-vivo olarak kontrol, Se, OX ve OX+Se grupları oluşturulan sıçanlardan izole edilen siyatik nöronların (SN) intrasellüler kalsiyum $[Ca^{+2}]_i$ iyon konsantrasyonuna TRPV1 katyon kanalları aracılığıyla Se etkisi (n=6 ve ortalama \pm SD) incelendi. OX grubundaki hayvanlara OX (4 mg/kg ve haftada iki kez), Se grubundaki hayvanlara ise Se (1,5 mg/kg ve gün aşırı) belirtilen dozlarda 28 gün süre ile intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Sakrifiye sonrası (28. gün sakrifiye edildiler), kontrol, Se, OX ve OX+Se ile muamele edilmiş bu hayvanlardan SN nöronları izole edilerek, Fura-2 ile 45 dk. süreyle yükleme öncesi in vitro kapsaisin, Cpz (100 μ M) ile muamele edildi. Kalsiyum sinyali analizi esnasında 100. sn hücre solüsyonu küvetine ilave edilen ve 450 sn süreyle etkisi gözlemlenen kapsaisin (CAP, 0.01 mM) ile TRPV1 kanalları uyarıldı.

a



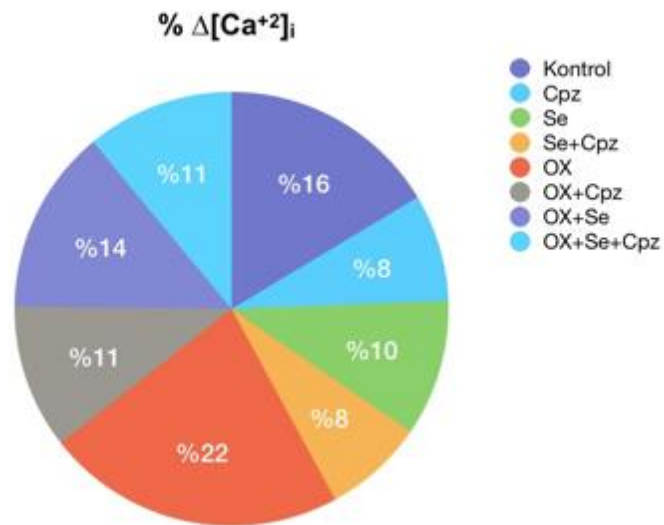
Grafik 4. SN hücrelerinin CAP ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan kalsiyum miktarının $[Ca^{+2}]_i$ zamana göre değişimi ifade edilmektedir.

b



Grafik 5. SN hücrelerinin CAP ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan toplam kalsiyum miktarı [Ca²⁺]_i nM olarak ifade edilmektedir (^ap ≤ 0.001 kontrol grubuna kıyasla; ^bp ≤ 0.05 Se grubuna kıyasla; ^cp ≤ 0.001 Se, Cpz, Se+Cpz gruplarına kıyasla; ^dp ≤ 0.05 Cpz, Se+Cpz gruplarına kıyasla ve ^ep ≤ 0.001 OX grubuna kıyasla idi. (n= 6 ve ortalama ± SD).

c

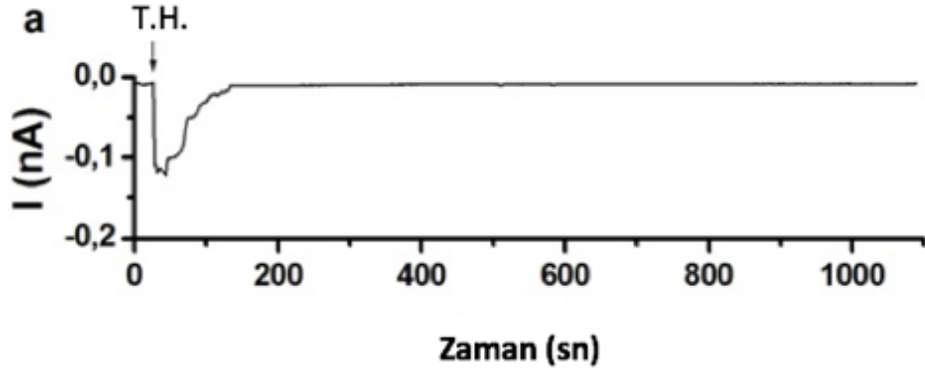


Grafik 6. SN hücrelerinin CAP ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan toplam kalsiyum miktarı % olarak ifade edilmektedir.

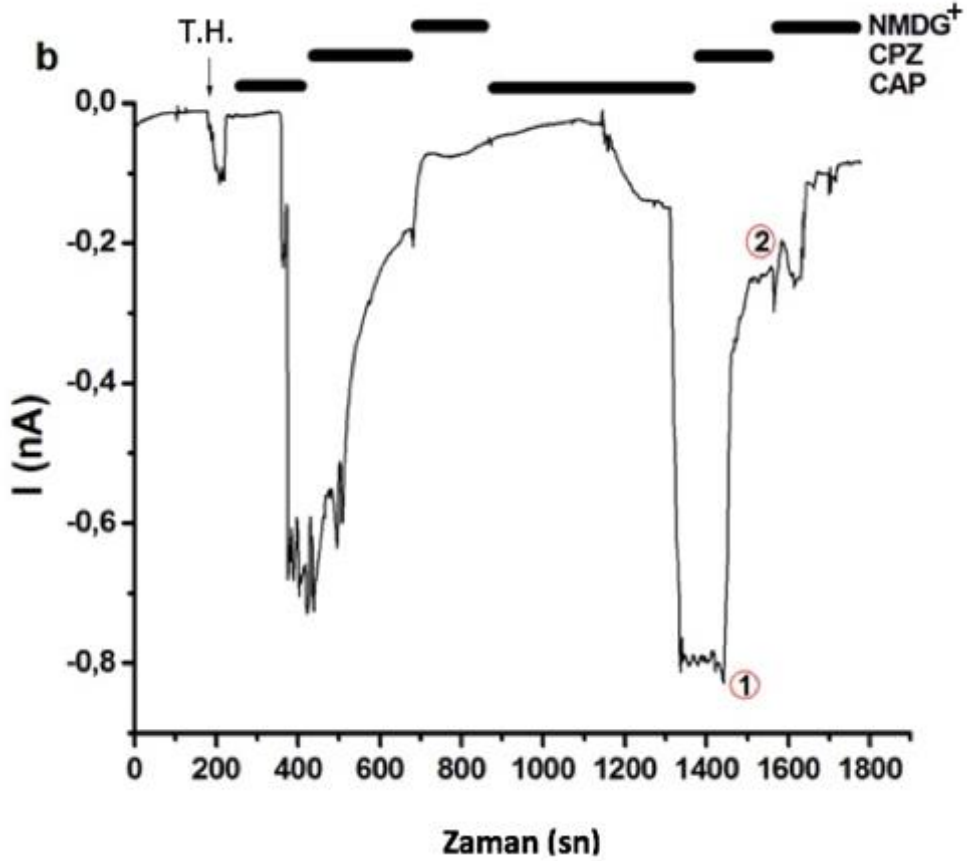
4.2. AKG'de Patch-clamp Sonuçları

OX uygulanan sıçanların AKG nöronlarında Se'nin TRPV1 aracılı iyon akışı üzerine etkilerinin Patch-clamp (Yama Menteşe) yöntemiyle değerlendirilmesi. TRPV1 patch-clamp analizlerinde sıçan AKG'lerinde CAP ile indüklenen akımlar, sırasıyla, Cpz ve NMDG⁺ (Na⁺'nın değiştirilmesi) ile tersinir bloke edildi. Agonistlerin (CAP) yokluğunda herhangi bir akım gözlenmedi (Grafik 7). Grafik 8 ve 10'daki kayıtlarda görüleceği gibi agonist tarafından açılan kanallar Cpz ile bloke edildi. AKG primer duyuşal nöron hücrelerindeki akım yoğunlukları OX+CAP gruplarında kontrol ve kontrol+CAP gruplarına kıyasla belirgin şekilde daha yüksekti ($p \leq 0.001$). Bununla birlikte, akım yoğunlukları ele alındığında kontrol+CAP+Cpz, OX+CAP+Cpz gruplarında OX grubuna göre anlamlı derecede düşüktü ($p \leq 0.001$) (Grafik 14). Nöronlardaki akım yoğunlukları Se tedavileri ile azaldı ve Se + CAP, OX+Se+CAP gruplarında bu değerler düşüktü ($p \leq 0.001$) (Grafik 14).

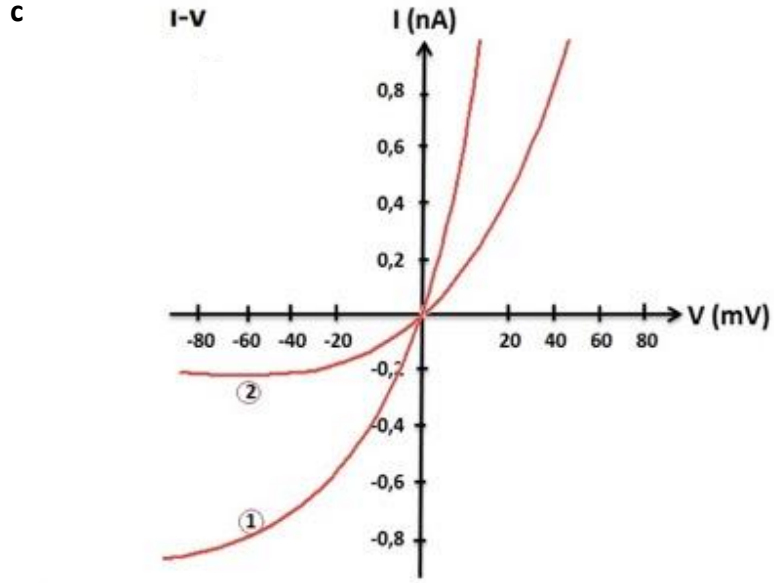
OX grubundaki AKG'lerde alınan patch-clamp kayıtları, CAP'ın TRPV1 kanalları aracılığıyla sitozolde aşırı Ca⁺² birikmesine neden olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, OX ile indüklenen TRPV1 akımları, bir antioksidan eser element olan Se ile oksidatif stres modülasyonu yoluyla tedavi edilerek azaltıldı. Dolayısıyla burada kontrol gruplarındaki ve OX kaynaklı periferel nöropatik ağırlı sıçan AKG'lerinde TRPV1 kanal aktivasyonları birbirleriyle kıyaslandığında önemli düzeyde fark vardı. TRPV1 kanal aktivasyon düzeylerini temsil eden bu değerler arasındaki fark Se uygulanmasıyla neredeyse ortadan kaldırıldı. AKG'deki TRPV1 akımları patch-clamp çemberinde ekstrasellüler kapsaisin (CAP, 10 μ M) ile uyarıldı, hücre dışı kapsazepin (Cpz, 0.1 mM) ile bloke edildi. Tüm hücre (T.H.) whole cell kaydı anlamına gelmektedir.



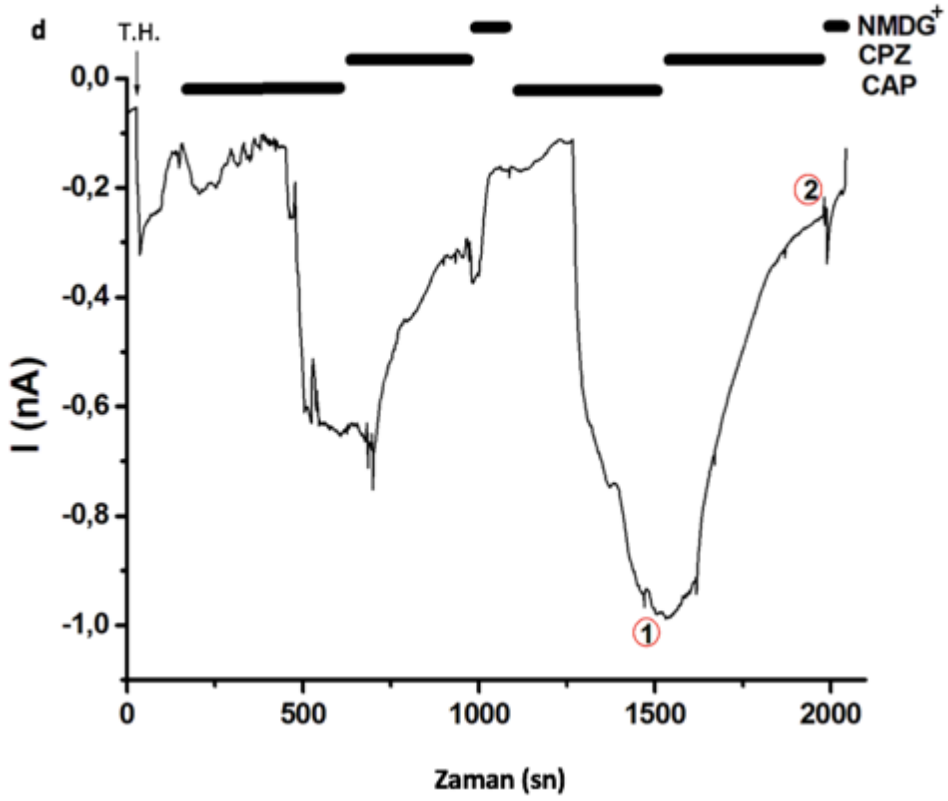
Grafik 7. Bu kontrol kaydı AKG duyuşal nöron hücrelerinden alınan orijinal kayıttır. Burada tüm hücre (W.C., Whole cell) konfigürasyonunda herhangi bir agonist kullanılmadan kayıt alınmıştır



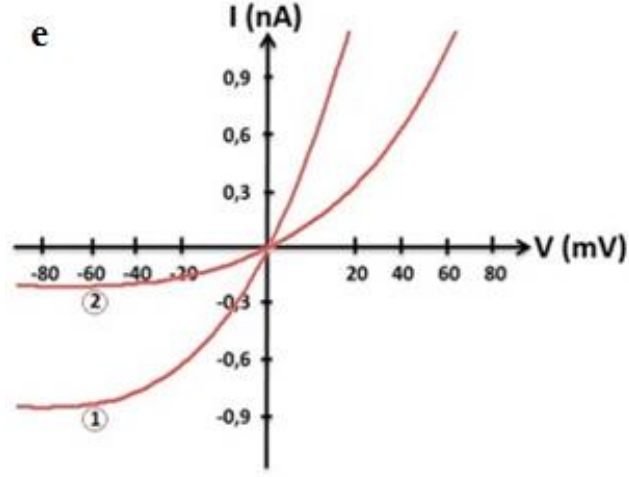
Grafik 8. Kontrol+CAP grubu: OX uygulanmayan sıçan grubundan izole edilen hücrelerden alınan bu kayıta agonist olarak kapsaisin (CAP), antagonist olarak ise kapsazepin (Cpz) kullanılmıştır. TRPV1 akımları patch-clamp çemberinde ekstrasellüler kapsaisin (CAP, 10 μ M) ile uyarıldı, hücre dışı kapsazepin (Cpz, 0.1 mM) ile bloke edildi.



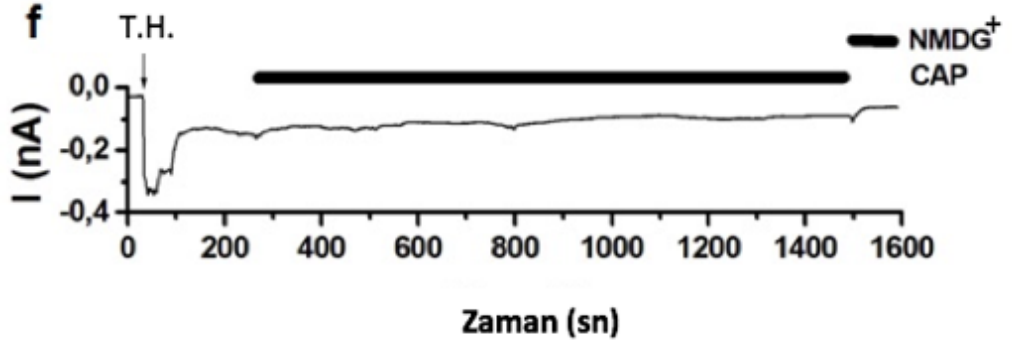
Grafik 9. Kontrol+CAP grubu için I-V grafiği.



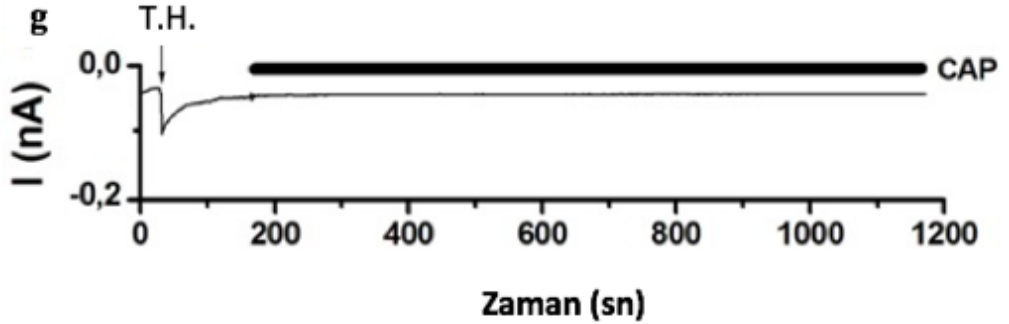
Grafik 10. OX+CAP grubu (haftada 2 kez olmak üzere 4 hafta süreyle intraperitoneal OX enjekte edilen gruptaki sıçanlardan elde edilen AKG hücreleri). Burada uyarıcı olarak CAP, kapatıcı olarak Cpz kullanılmıştır.



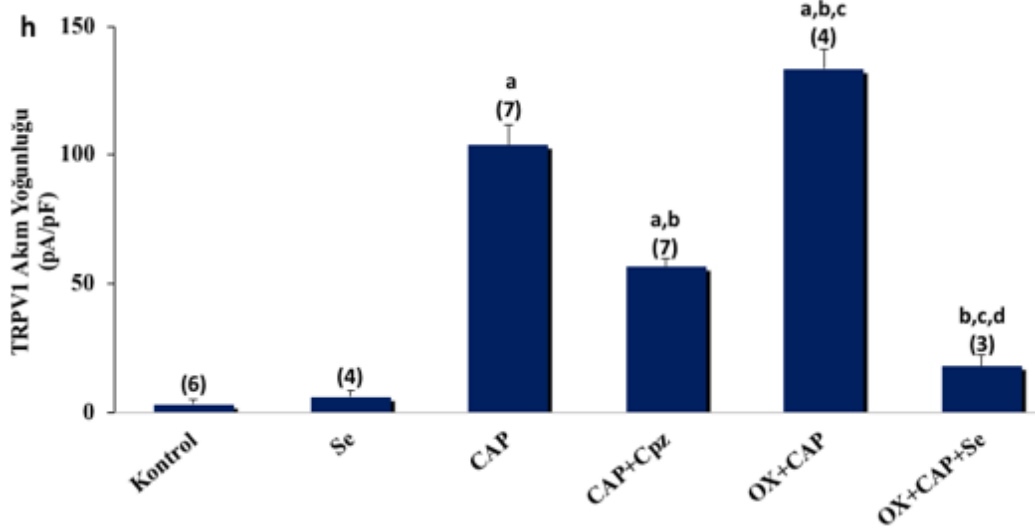
Grafik 11. OX+CAP grubu için I-V grafiği.



Grafik 12. OX+ CAP+Se grubu: İnterperitoneal olarak OX (haftada iki kez toplamda 4 hafta süreyle 4mg/kg) ve Se (gün aşırı, 4 hafta süreyle 1,5 mg/kg) uygulanan sıçanlardan elde edilen AKG'lerden alınan tüm hücre kayıtlarıdır.



Grafik 13. Se grubu: Se, intraperitoneal olarak (haftada 2 kez 4 hafta süreyle 1,5 mg/kg dozlarda) sıçanlara uygulandı. Bu sıçanlardan izole edilen AKG'lerden alınan kayıtlardır. Agonist olarak (CAP, 10 μ M) kullanılmıştır.



Grafik 14. AKG'den alınan TRPV1 kanal akım yoğunluklarının sütun grafiği olarak gösterimi. Parantez içindeki sayılar, n sayıdaki grupları belirtmektedir. (^ap<0.001 Kontrol ve Se'ye kıyasla; ^bp<0.001 CAP'a kıyasla; ^cp<0.001 CAP+Cpz'ye kıyasla; ^dp<0.001 OX+CAP'a kıyasla)

4.3. OX Uygulanan Sıçanların AKG ve SN Nöronlarında Se'nin TRPV1 Aracılı Apoptoz Testleri Üzerine Etkileri

Bu bölümde kontrol ve OX gruplarının AKG ve SN primer duyuşal nöron hücrelerinde Se'nin apoptoz, hücre canlılığı (MTT), kaspaz 3, kaspaz 9 aktivitesi, hücre içi ROS üretimi ve JC-1 düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Apoptoz analizleri, çoklu kuyucuk okuyucuda APOPercentage apoptozis kiti Biocolor Ltd. (Kuzey İrlanda) ile gerçekleştirildi. Diğer analizlerde aynı şekilde ilgili boyama prosedürleri (mitokondriyal membran depolarizasyon için JC-1, ROS için DHR-123, MTT için 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide boyaları kullanıldı) sonrasında ivedilikle çoklu kuyucuk okuyucuda okundu. AKG ve SN nöronal hücrelerde TRPV1 katyon kanallarının CAP ile stimülasyonunu müteakip, apoptoz düzeyleri (Grafik 15 ve 21), ROS ve JC-1 ve seviyeleri (Grafik 16,17; Grafik 22,23), kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktiviteleri (Grafik 18,19; Grafik 24,25) kontrole kıyasla belirgin şekilde artış gösterirken MTT düzeylerinde (Grafik 20,26) belirgin bir azalma meydana geldi ($p \leq 0.05$). OX grubunda kontrole kıyasla apoptoz düzeyleri, kaspaz aktiviteleri ve JC-1 ve ROS seviyeleri kontrole kıyasla belirgin şekilde artış gösterirken MTT düzeylerinde aynı şekilde belirgin bir azalma meydana geldi ($p \leq 0,001$). OX+Se grubunda

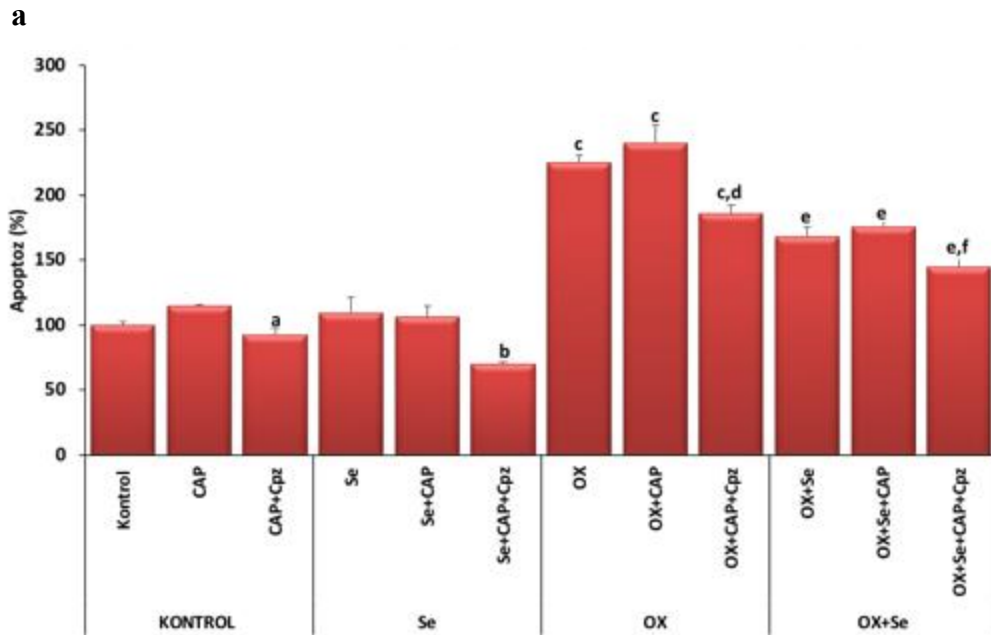
OX grubuna kıyasla apoptoz testi değerlerinde önemli düzeyde bir azalma, MTT seviyesinde bir artış gözlenmiştir ($p \leq 0,05$). Se grubundaki apoptoz değerleri OX ve OX+Se gruplarına kıyasla önemli düzeyde azalma sergilemişlerdir. Cpz (tüm gruplarda) ile hücrelerin ön-muamelesi ve hemen ardından CAP ile hücrelerin TRPV1 aracılı uyarımı ile (burada Cpz+CAP gruplarından bahsedilmektedir), CAP ile indüklenen oksidatif sitotoksisiteyi belirgin bir şekilde azaltmıştır, bu durum hücrenin hayatını idame ettirmesine önemli düzeyde ($p \leq 0,05$) katkı sağlamıştır.

4.3.1. OX Uygulanan Sıçanların AKG ve SN Nöronlarında Se'nin Kaspaz Aktivasyonları, Hücre içi ROS Üretimi ve JC-1 Düzeyi ve Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Kaspaz aktivite analizleri, çoklu kuyucuk okuyucuda kaspaz 3 ve kaspaz 9 substratları ile gerçekleştirildi. AKG ve SN 'lerde Kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktiviteleri, TRPV1 spesifik açıcısı CAP aracılı aktivasyonu ile (Grafik 18, 19) belirgin olarak artmıştır ($p \leq 0.05$). Bununla birlikte, Cpz ($p \leq 0,05$) muamelesi ile TRPV1 kanallarının inhibisyonu yoluyla nöronlardaki kaspaz aktivitelerinde belirgin olarak azalma sağlanmıştır. Buna ek olarak, AKG ve SN nöronlarında Se ile TRPV1 kanallarının inhibisyonunu takiben apoptoz, JC-1 ve ROS düzeyleri ve kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktiviteleri belirgin şekilde azaldı ($p \leq 0.001$). Bununla birlikte Se grubundaki hücre canlılığı düzeyleri, (Cpz muamelesi olsun/olmasın) ile OX gruplarına kıyasla belirgin şekilde artış gösterdi ($p \leq 0.001$). Bu sonuçlar incelenecek olursa oluşan nöropatik ağrının TRPV1 aktivasyonuna atfedilebileceği anlaşılmaktadır. OX kaynaklı bu nöropatik ağrıdan Se aracılı TRPV1 inhibisyonu ile başa çıkılabileceği görülmektedir.

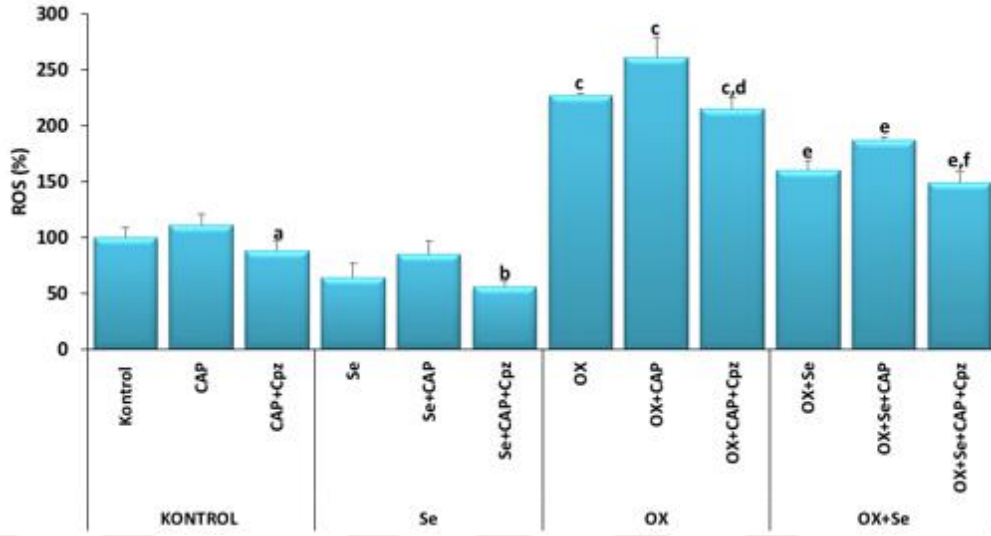
4.3.1.1. AKG (Arka kök gangliyon) Apoptoz, ROS, JC-1, Kaspaz 3, Kaspaz 9, MTT (Hücre Canlılığı) Analiz Sonuçları

OX ile uyarılan sıçanların AKG'lerinde TRPV1 (a, b, c, d, e ve f) kanal aktivasyonları yoluyla Se'nin apoptoz, hücre canlılığı (MTT), JC-1, hücre içi ROS üretimi, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri üzerine etkileri (ortalama \pm SD ve $n = 6$) incelendi. Değerler kontrole kıyasla kat artışı olarak ifade edilmiştir. Bu AKG nöronları kontrol, OX ve Se ile muamele edilen hayvanlardan izole edilmiştir. Nöronlardaki TRPV1 kapıları, kapsaisin (10 μ M) ile uyarılıp Cpz (0,1 mM) tarafından inhibe edilmiştir.



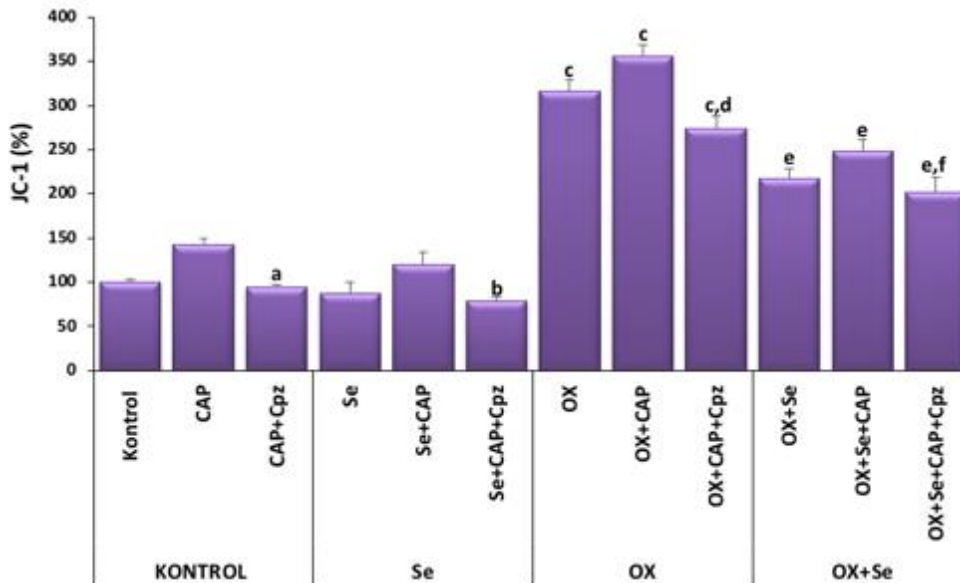
Grafik 15. Sıçan AKG primer duyuşal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se 'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin apoptoz testi açısından değerlendirilmesi (kontrol grubundan CAP'a kıyasla, ^a $p \leq 0,05$), (Se grubundan Se ve Se+CAP'a kıyasla, ^b $p \leq 0,05$), (kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^c $p \leq 0,001$; OX grubundaki OX ve OX+CAP'a kıyasla ^d $p \leq 0,05$), (OX grubuna kıyasla ^e $p \leq 0,05$; OX+Se grubundaki OX+Se ve OX+Se+CAP'a kıyasla ^f $p \leq 0,05$) ($n = 6$ ve ortalama \pm SD).

b



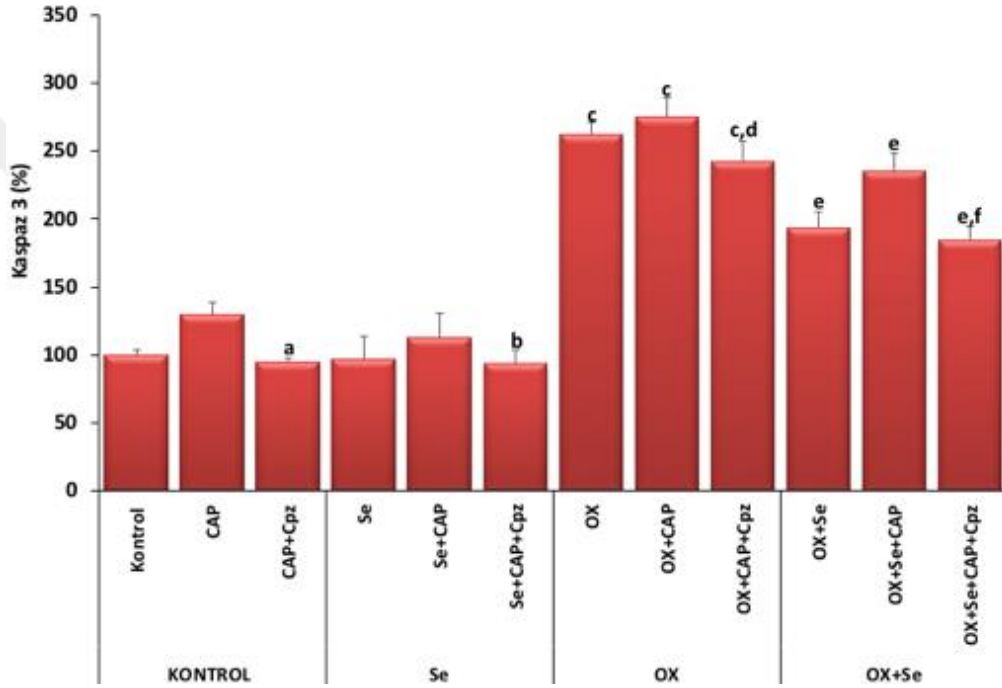
Grafik 16. Sıçan AKG primer duyuşal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se ‘nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin ROS (reaktif oksijen türleri) testi açısından değerlendirilmesi (kontrol grubundan CAP’a kıyasla, ^a $p \leq 0,05$), (Se grubundan Se ve Se+CAP’a kıyasla, ^b $p \leq 0,05$), (kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^c $p \leq 0,001$; OX grubundaki OX ve OX+CAP’a kıyasla ^d $p \leq 0,05$), (OX grubuna kıyasla ^e $p \leq 0,05$; OX+Se grubundaki OX+Se ve OX+Se+CAP’a kıyasla ^f $p \leq 0,05$) (n= 6 ve ortalama \pm SD).

c



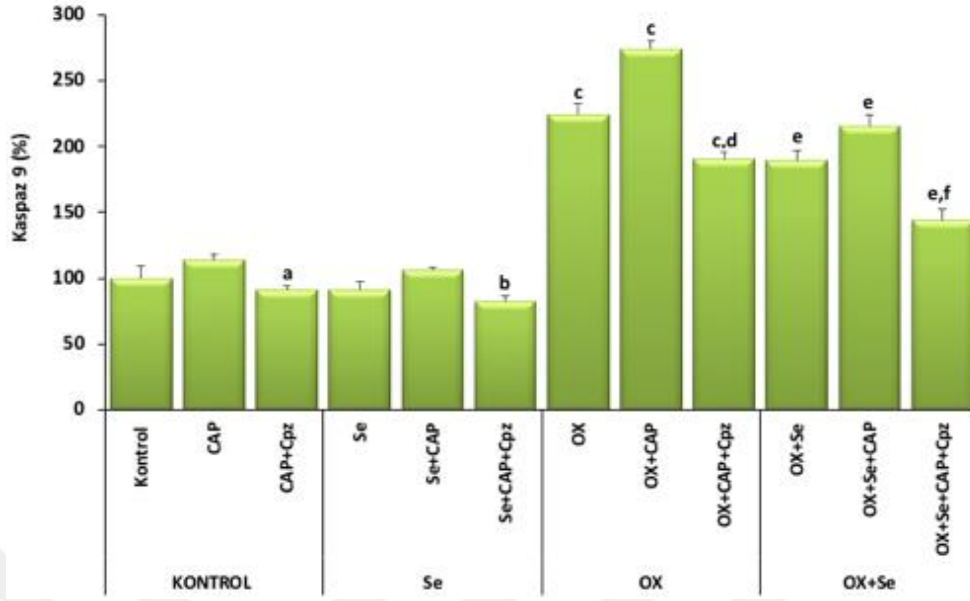
Grafik 17. Sıçan AKG primer duyuşal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin JC-1 testi açısından değerlendirilmesi (kontrol grubundan CAP'a kıyasla, ^a $p \leq 0,05$), (Se grubundan Se ve Se+CAP'a kıyasla, ^b $p \leq 0,05$), (kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^c $p \leq 0,001$; OX grubundaki OX ve OX+CAP'a kıyasla ^d $p \leq 0,05$), (OX grubuna kıyasla ^e $p \leq 0,05$; OX+Se grubundaki OX+Se ve OX+Se+CAP'a kıyasla ^f $p \leq 0,05$) (n= 6 ve ortalama \pm SD).

d



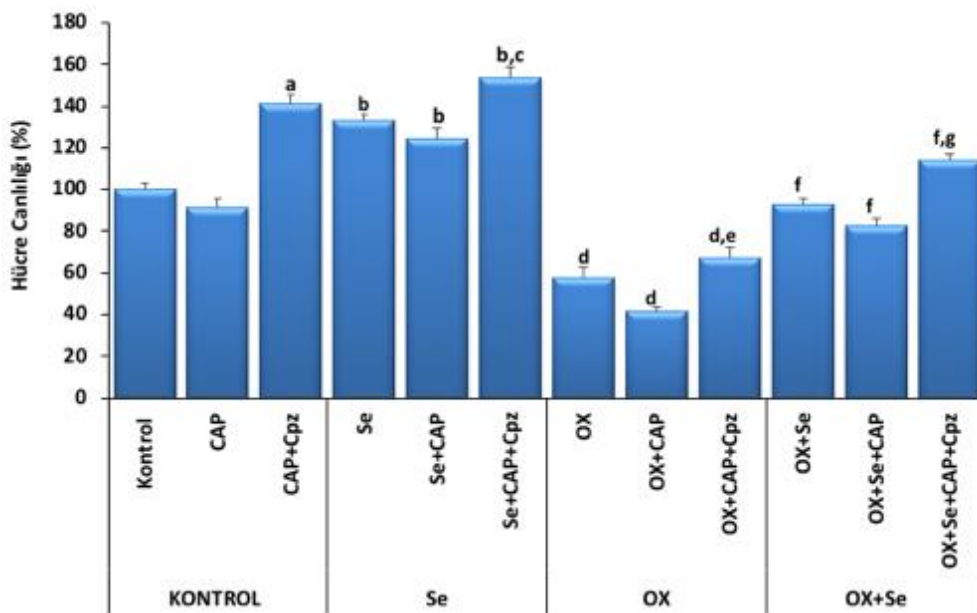
Grafik 18. Sıçan AKG primer duyuşal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin kaspaz 3 testi açısından değerlendirilmesi (kontrol grubundan CAP'a kıyasla, ^a $p \leq 0,05$), (Se grubundan Se ve Se+CAP'a kıyasla, ^b $p \leq 0,05$), (kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^c $p \leq 0,001$; OX grubundaki OX ve OX+CAP'a kıyasla ^d $p \leq 0,05$), (OX grubuna kıyasla ^e $p \leq 0,05$; OX+Se grubundaki OX+Se ve OX+Se+CAP'a kıyasla ^f $p \leq 0,05$) (n= 6 ve ortalama \pm SD).

e



Grafik 19. Sıçan AKG primer duyuşal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin kaspaz 9 testi açısından değerlendirilmesi (kontrol grubundan CAP'a kıyasla, ^a $p \leq 0,05$), (Se grubundan Se ve Se+CAP'a kıyasla, ^b $p \leq 0,05$), (kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^c $p \leq 0,001$; OX grubundaki OX ve OX+CAP'a kıyasla ^d $p \leq 0,05$), (OX grubuna kıyasla ^e $p \leq 0,05$; OX+Se grubundaki OX+Se ve OX+Se+CAP'a kıyasla ^f $p \leq 0,05$) (n= 6 ve ortalama \pm SD).

f

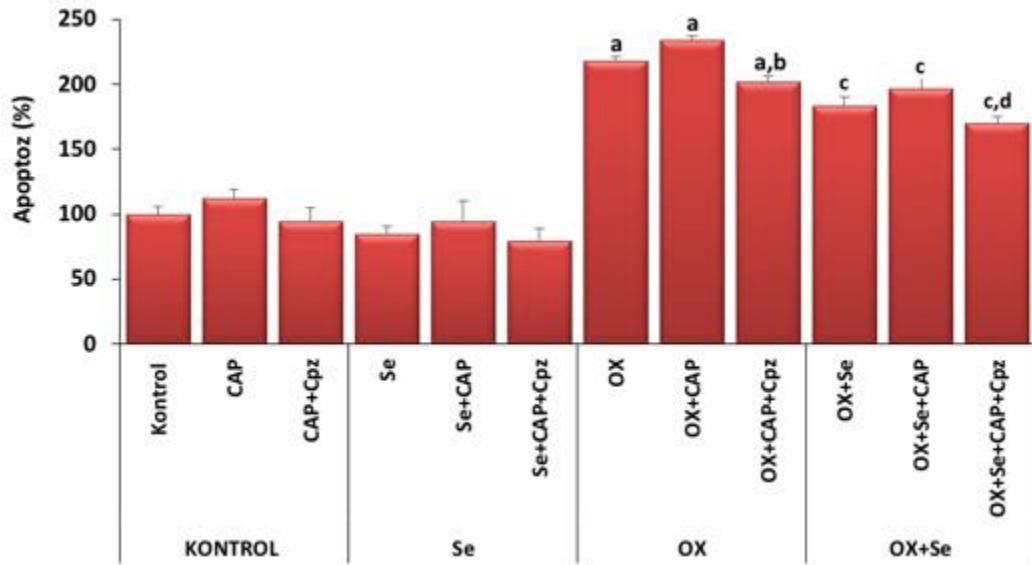


Grafik 20. Sıçan AKG primer duyuşal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin hücre canlılığı (MTT) testi açısından değerlendirilmesi (Kontrol grubundan Kontrol ve CAP'a kıyasla, ^a $p \leq 0,05$), (Kontrol grubuna kıyasla, ^b $p \leq 0,05$; Se grubundan Se ve Se+CAP'a kıyasla, ^c $p \leq 0,05$), (kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^d $p \leq 0,001$; OX grubundaki OX+CAP'a kıyasla ^e $p \leq 0,05$), (OX grubuna kıyasla ^f $p \leq 0,05$; OX+Se grubundaki OX+Se ve OX+Se+CAP'a kıyasla ^g $p \leq 0,05$) (n= 6 ve ortalama \pm SD).

4.3.1.2. SN'de Apoptoz, ROS, JC-1, Kaspaz 3, Kaspaz 9 ve MTT (Hücre Canlılığı) Analiz Sonuçları

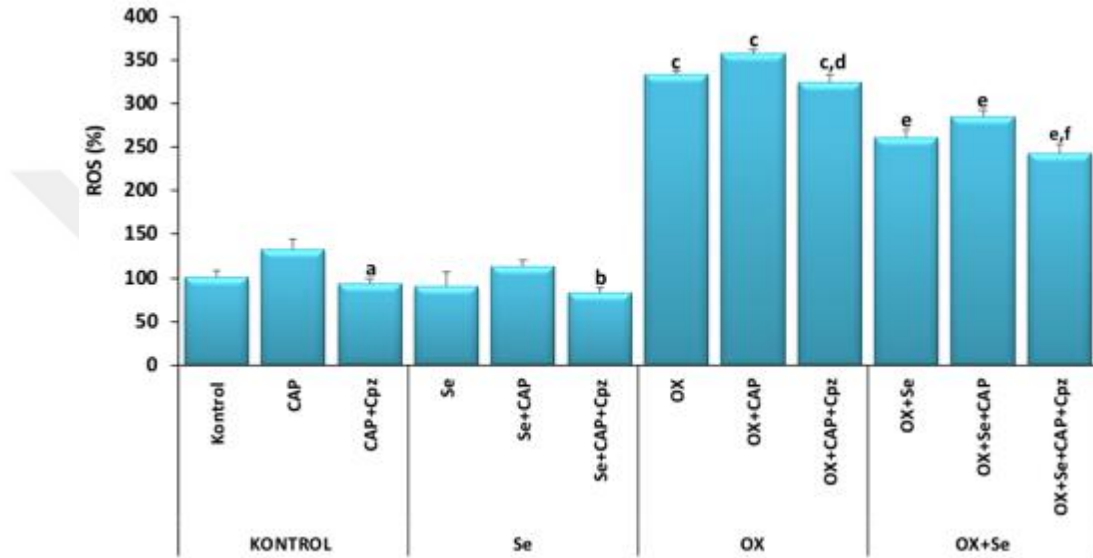
OX ile uyarılan sıçanların SN'lerinde TRPV1 (a-f) kanal aktivasyonları yoluyla Se'nin apoptoz, hücre canlılığı (MTT), JC-1, hücre içi ROS üretimi, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri üzerine etkileri (ortalama \pm SD ve n = 6). Değerler kontrole kıyasla kat artışı olarak ifade edilmiştir. Bu SN nöronları kontrol, OX ve Se ile muamele edilen hayvanlardan izole edilmiştir. Nöronlardaki TRPV1 kapıları, kapsaisin (10 μ M) ile uyarılıp Cpz (0,1 mM) tarafından inhibe edilmiştir.

a



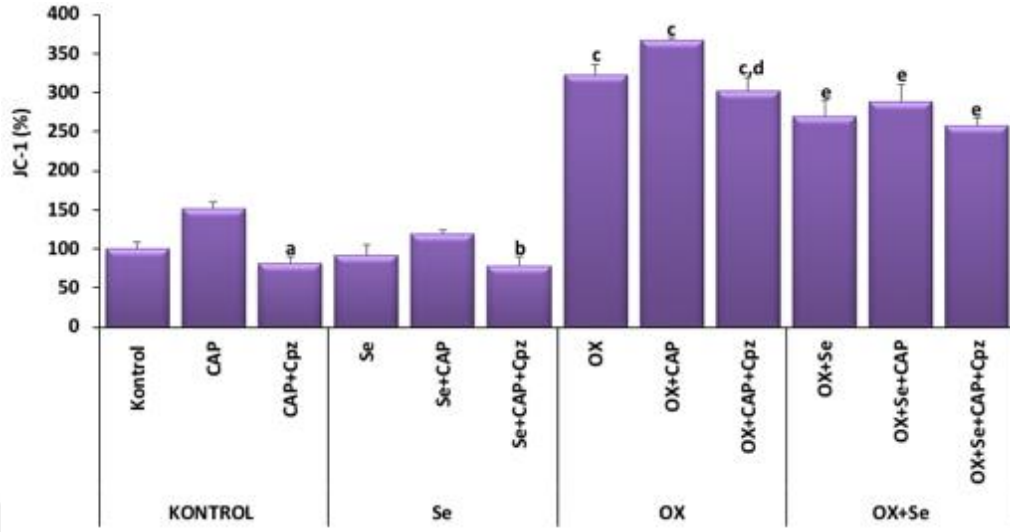
Grafik 21. Sıçan SN primer duyusal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin apoptoz testi açısından değerlendirilmesi (kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^a $p \leq 0,001$; OX grubundaki OX ve OX+CAP'a kıyasla ^b $p \leq 0,05$), (OX grubuna kıyasla ^c $p \leq 0,05$; OX+Se grubundaki OX+Se ve OX+Se+CAP'a kıyasla ^d $p \leq 0,05$). (n= 6 ve ortalama \pm SD).

b



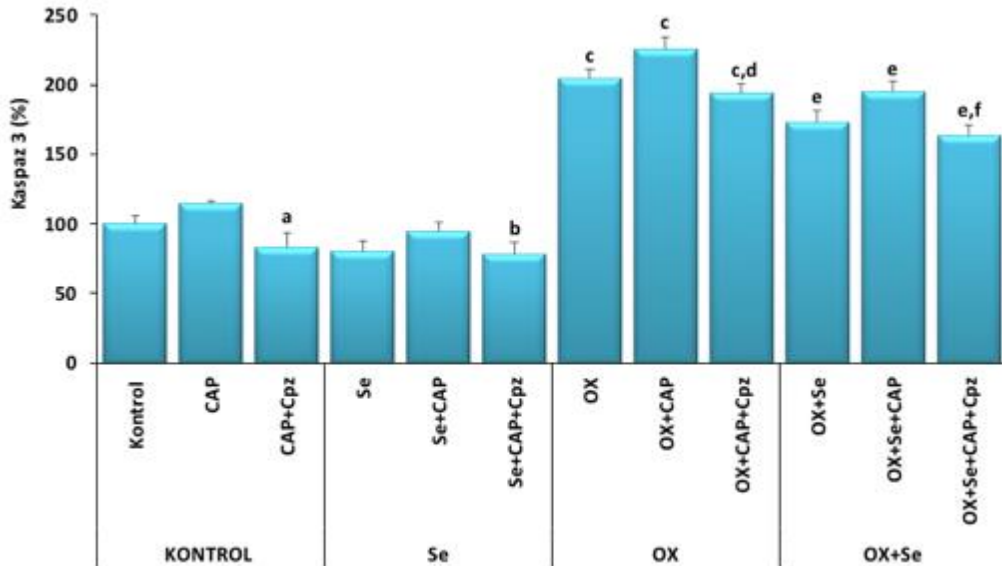
Grafik 22. Sıçan SN primer duyusal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin ROS (reaktif oksijen türleri) testi açısından değerlendirilmesi (kontrol grubundan CAP'a kıyasla, ^a $p \leq 0,05$), (Se grubundan Se ve Se+CAP'a kıyasla, ^b $p \leq 0,05$), (kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^c $p \leq 0,001$; OX grubundaki OX ve OX+CAP'a kıyasla ^d $p \leq 0,05$), (OX grubuna kıyasla ^e $p \leq 0,05$; OX+Se grubundaki OX+Se ve OX+Se+CAP'a kıyasla ^f $p \leq 0,05$). (n= 6 ve ortalama \pm SD).

c



Grafik 23. Sıçan SN primer duyuşal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin JC-1 testi açısından değerlendirilmesi (kontrol grubundan CAP'a kıyasla, $^a p \leq 0,05$), (Se grubundan Se+CAP'a kıyasla $^b p \leq 0,05$) (kontrol ve Se gruplarına kıyasla $^c p \leq 0,001$; OX+CAP'a kıyasla $^d p \leq 0,05$), (OX grubuna kıyasla $^e p \leq 0,05$). (n= 6 ve ortalama \pm SD).

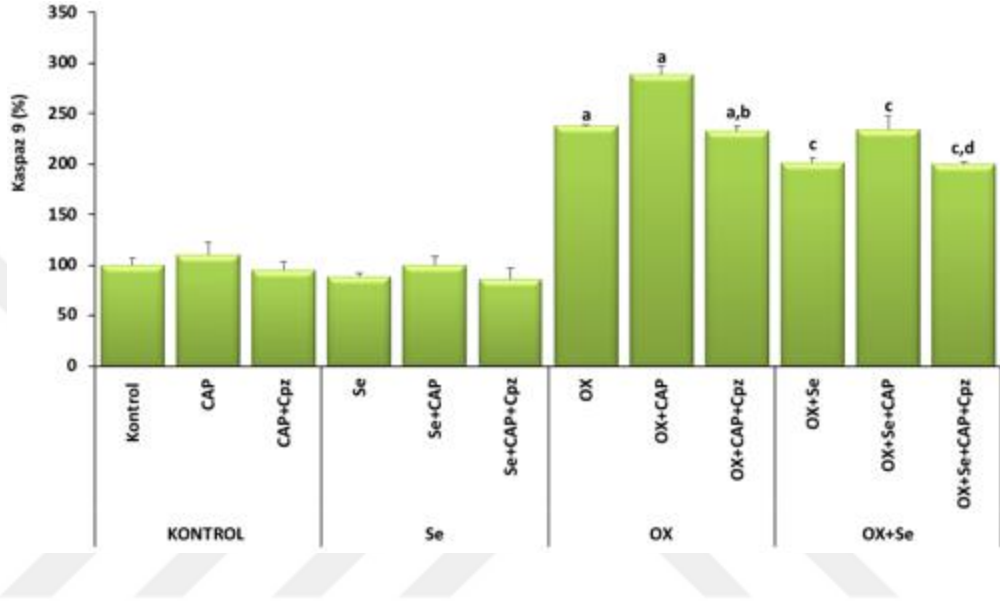
d



Grafik 24. Sıçan SN primer duyuşal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se'nin TRPV1 aracılı koruyucu

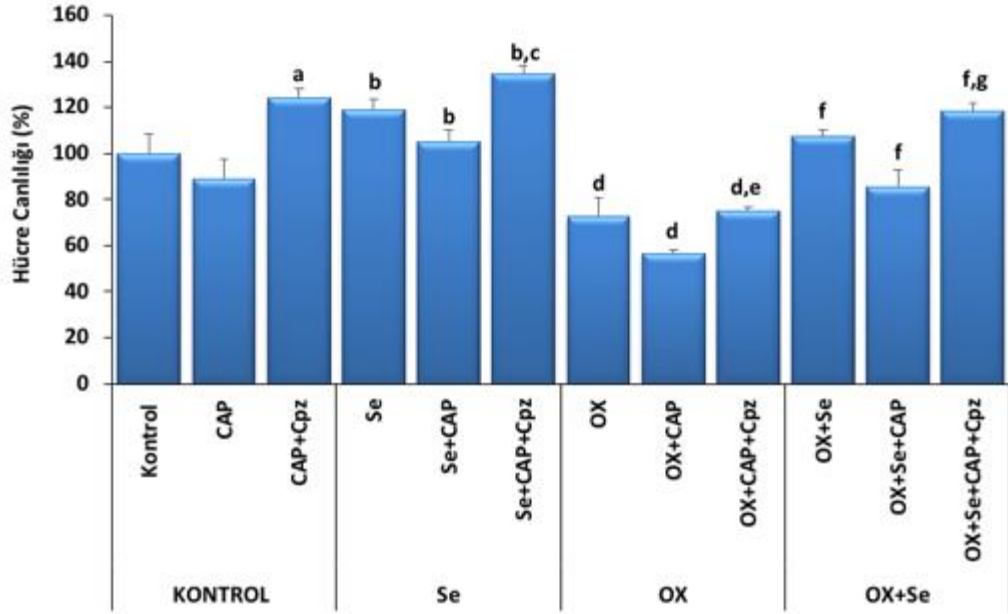
etkisinin kaspaz 3 testi açısından değerlendirilmesi (kontrol grubundan CAP'a kıyasla, ^a $p \leq 0,05$), (Se grubundan Se ve Se+CAP'a kıyasla, ^b $p \leq 0,05$), (kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^c $p \leq 0,001$; OX grubundaki OX ve OX+CAP'a kıyasla ^d $p \leq 0,05$), (OX grubuna kıyasla ^e $p \leq 0,05$; OX+Se grubundaki OX+Se ve OX+Se+CAP'a kıyasla ^f $p \leq 0,05$). (n= 6 ve ortalama \pm SD).

e



Grafik 25. Sıçan SN primer duyusal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin kaspaz 9 testi açısından değerlendirilmesi (kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^a $p \leq 0,001$; OX grubundaki OX+CAP'a kıyasla ^b $p \leq 0,05$), (OX grubuna kıyasla ^c $p \leq 0,05$; OX+Se grubundaki OX+Se+CAP'a kıyasla ^d $p \leq 0,05$). (n= 6 ve ortalama \pm SD).

f



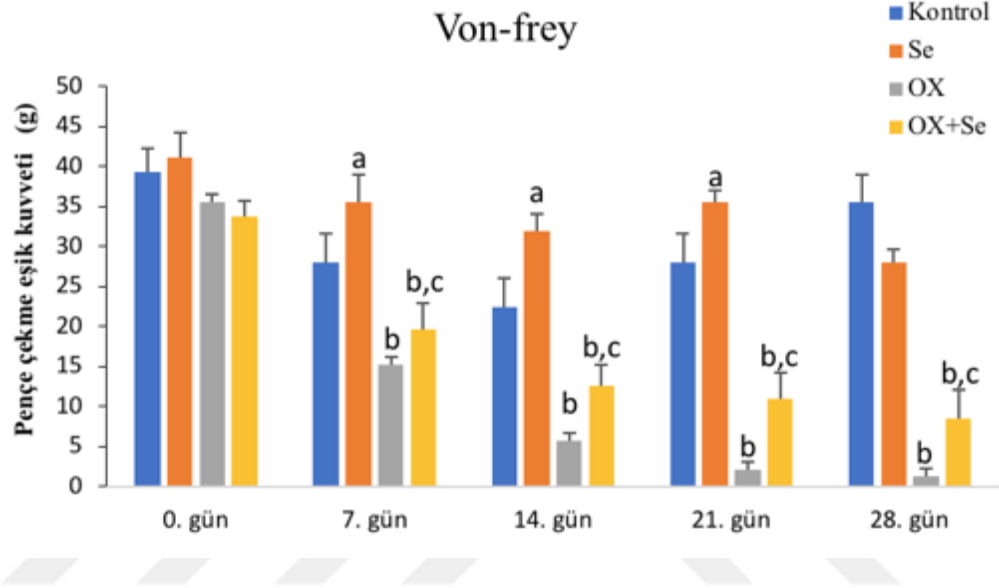
Grafik 26. Sıçan SN primer duyuşal nöron hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan nöropatik ağrı durumu üzerine Se'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin hücre canlılığı (MTT) testi açısından değerlendirilmesi (kontrol ve CAP'a kıyasla, ^a $p \leq 0,05$), (kontrol grubuna kıyasla ^b $p \leq 0,05$), (Kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^d $p \leq 0,01$; OX+CAP'a kıyasla ^e $p \leq 0,05$), (OX grubuna kıyasla ^f $p \leq 0,01$; OX+Se+CAP'a kıyasla ^g $p \leq 0,05$). (n= 6 ve ortalama \pm SD).

4.4. OX Kaynaklı Periferal Nöropatik Ağrılı Sıçanlarda Se'nin Ağrı Testleri Üzerine Etkileri.

OX, Se uygulanan sıçanlarda nosiseptörler üzerindeki bu ilaçların etkisini belirleyebilmek için tedavi öncesi ve sonrası Von-Frey ve Hot-Plate ağrı testleri yapıldı. İntraperitoneal 4mg/kg doz ile haftada 2 kez olmak üzere 4 hafta süreyle OX enjekte edilen sıçanlarda yapılan Von-frey (farklı kalınlıktaki iğne uçları) ve Hot-plate (sıcak plaka) ağrı testleri incelendiğinde 7. günden itibaren, bilateral olarak pençe çekme eşik kuvvetinde (Grafik 27) ve pençe çekme eşik zamanında (Grafik 28) önemli ölçüde bir azalma meydana geldiği ve bu azalmanın müteakip haftalarda kademeli olarak devam ettiği gözlenmektedir. Öte yandan, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, OX grubunda 2., 3. ve 4. haftalarda mekanik aşırı duyarlılıkta artış gözlemlendi ($p \leq 0,001$). Bununla birlikte, sadece Se uygulanan

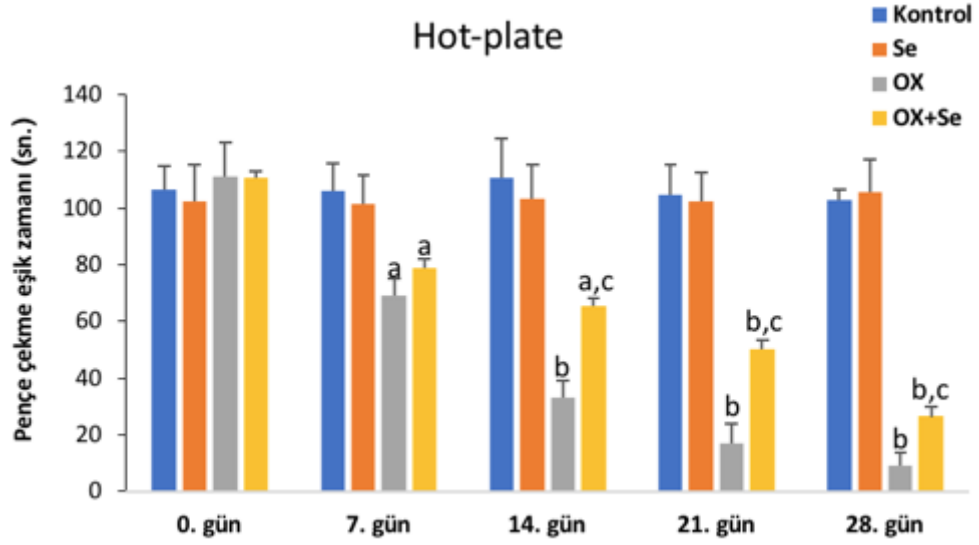
grup sonuçları kontrole benzer seyretti. OX ile birlikte sıçanlara Se uygulandığında (OX+Se), sadece OX grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde (Grafik a, b; $^c p \leq 0,05$) antihiperaljezik etki gözlemlendi. Bununla birlikte, Se ile tedavi sonrasında mekanik uyarılara karşı hassasiyet eşik değerinde belirgin bir artış saptanmıştır ($p \leq 0,05$) ($n= 10$ ve ortalama \pm SD).

a



Grafik 27. Bu grafik OX ile muamele edilen sıçanlarda Von-frey testi'nin pençe geri çekme kuvveti üzerindeki Se tedavisinin etkisini kontrol ile kıyaslamalı olarak ifade etmektedir. ($n=10$ ve ortalama \pm SD). (Von-frey testi: kontrol gruplarına kıyasla $^a p \leq 0,05$, 0. güne ve kontrol gruplarına kıyasla $^b p \leq 0,001$, OX grubuna kıyasla $^c p \leq 0,05$). ($n= 10$ ve ortalama \pm SD).

b



Grafik 28. Bu grafik OX ile muamele edilen sıçanlarda Hot-plate testinin pençe geri çekme eşik zamanı üzerindeki Se tedavisinin etkisini kontrol ile kıyaslamalı olarak ifade etmektedir. (n= 10 ve ortalama ± SD). Hot-plate testi: 0. gün gruplarına kıyasla ^ap ≤ 0.05, 0. güne kıyasla ^bp ≤ 0.001, OX grubuna kıyasla ^cp ≤ 0.05).

4.5. OX Uygulanan Sıçanların AKG Ve SN Nöronlarında Se'nin Sitokinler Üzerine Etkileri

Burada proinflamatuvar belirteçlerden TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi sitokinlerin AKG ve SN duyusal nöron hücrelerinde OX kaynaklı periferik nöropatik ağrı durumundaki ortamda salınımının artışı değerlendirilmiştir. Ayrıca bu sitokin seviyelerinin artışının periferdeki duyusal nöronlarda gerçekleştiğini ispatlamak için merkezi sinir sisteminden hipokampus hücrelerinde de bütün grupların sitokin artış durumları değerlendirilmiştir. Kullanılan sitokinleri iki sınıfta kategorize etmek mümkündür: proinflamatuvar sitokinler ve anti-inflamatuvar sitokinler. Proinflamatuvar sitokinler, çeşitli fizyolojik fonksiyonları düzenleyebilen ve travma, ağrı ve enfeksiyon sürecinde önemli bir rol oynayan küçük molekül peptidlerdir. Proinflamatuvar bu sitokinler TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi belirteçleri içerir. Her geçen gün artan sayıda kanıt, bunlar gibi proinflamatuvar sitokinlerin omurilikte, AKG'de ve

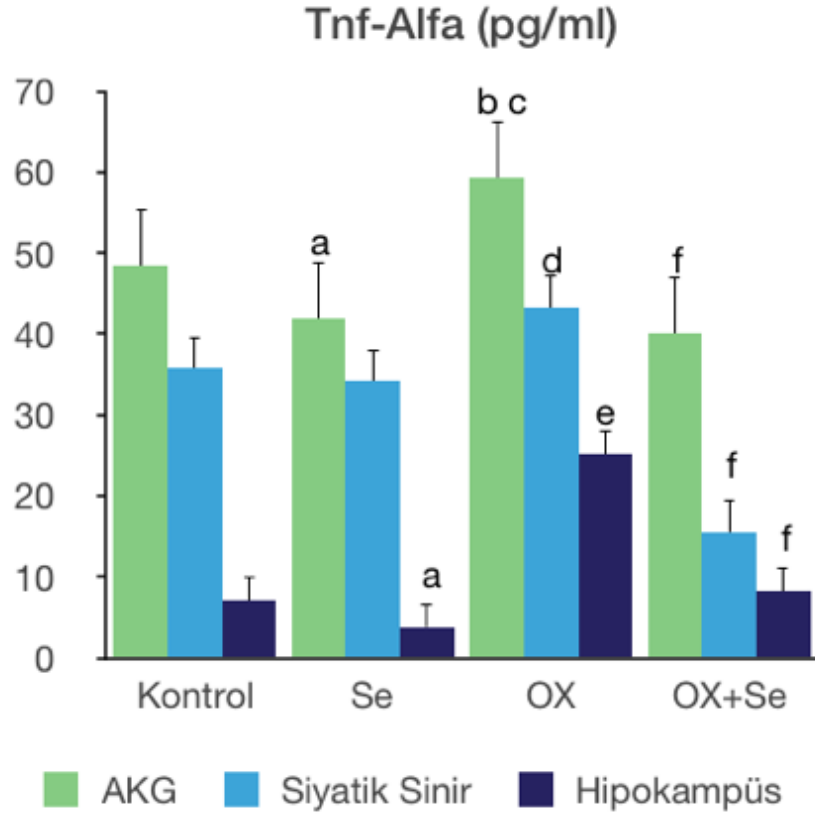
siyatik periferel duyusal nöronlarda hiperalezik, nöropatik ve yaralanma gibi çeşitli hastalık koşullarında ağrı aşırı duyarlılığına katkıda bulunmaktadır (141).

Son yıllarda, kemoterapötiklerin tetiklediği nöropatik ağrı mekanizmaları üzerine yapılan çalışmaların derinleşmesi ve nöroinflamasyon çalışma alanının giderek genişlemesi ile kemoterapötik kaynaklı nöropatik ağrıda sitokin seviyelerinin düzenlenmesindeki etki mekanizmalarının analjezik ilaçların geliştirilmesi için yeni hedefler sağlayacakları bilinmektedir. Tez çalışmasının bu bölümünde, periferel sinir sisteminde meydana gelen OX kaynaklı nöropatik ağrı üzerine odaklanarak proinflamatuvar sitokinler TNF- α , IL-1 β , IL-6 için inflamatuvar mekanizmalara genel bir bakış sunmak amaçlanmıştır. AKG, SN ve hipokampus nöronal primer hücrelerin ortalama TNF- α , IL-1 β ve IL-6 seviyeleri Grafik 29-37 'de gösterilmiştir.

4.5.1. TNF- α Düzeylerinin Değerlendirilmesi

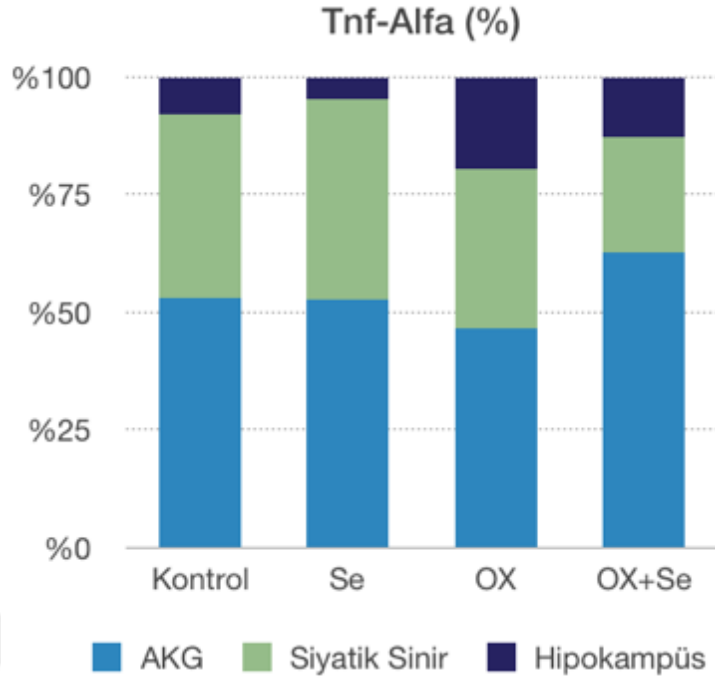
AKG ve hipokampus hücrelerinde TNF- α düzeylerinde sadece Se enjekte edilen sıçan grubunda kontrole kıyasla (kontrol grubuna kıyasla, ^ap \leq 0,05) anlamlı bir azalma söz konusudur (Grafik 29). AKG'lerdeki TNF- α düzeyleri OX grubunda kontrol ve Se gruplarına kıyasla anlamlı bir artış (kontrol grubuna kıyasla, ^bp \leq 0,05; Se grubuna kıyasla ^cp \leq 0,001) sergilemiştir. SN'nin OX grubundaki TNF- α düzeyleri kontrole ve Se gruplarına kıyasla anlamlı bir artış (kontrol ve Se grubuna kıyasla, ^dp \leq 0,05) sergilemiştir. Merkezi sinir sisteminin önemli bir parçası olan (hatta burada OX kaynaklı periferel nöropatik ağrı durumunda meydana gelen sitokin düzeylerindeki artışların daha ziyade periferel sinir sisteminde gerçekleştiğini göstermek için hipokampusu kullandık) hipokampus nöronlarının OX grubunda kontrol ve Se gruplarına kıyasla TNF- α düzeylerinde önemli düzeyde artış (kontrol ve Se gruplarına kıyasla, ^ep \leq 0,001) söz konusudur. AKG, SN ve hipokampus nöronlarının OX+Se gruplarındaki TNF- α düzeyleri OX grubuna kıyasla Se'nin etkisiyle önemli düzeyde azalma (OX+Se gruplarına kıyasla, ^fp \leq 0,001) göstermiştir (n= 6 ve ortalama \pm SD).

a



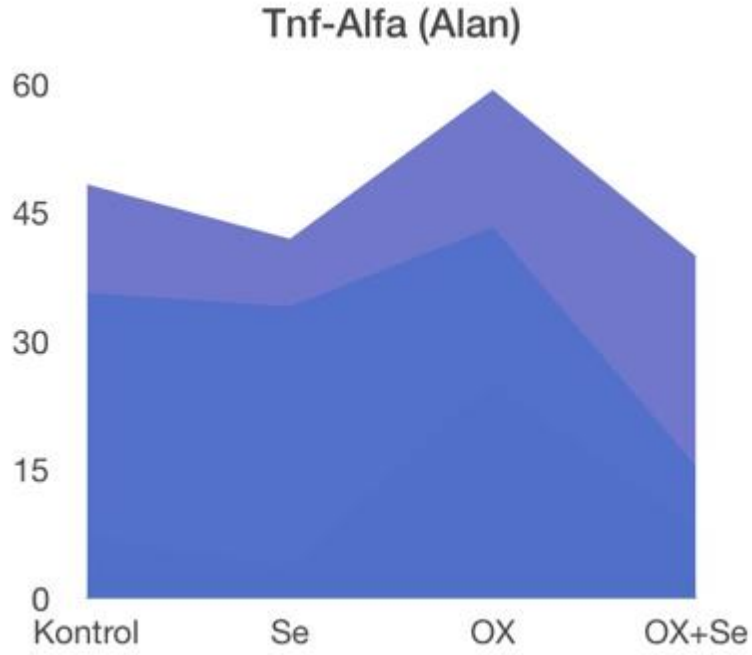
Grafik 29. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se'nin TNF- α düzeyleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi. (n= 6 ve ortalama \pm SD). Kontrol grubuna kıyasla ^ap \leq 0,05; kontrole kıyasla ^bp \leq 0,05; Se'ye kıyasla ^cp \leq 0,001; kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^dp \leq 0,05; kontrol ve Se'ye kıyasla ^ep \leq 0,001 OX grubuna kıyasla ^fp \leq 0,001) (n= 6 ve ortalama \pm SD).

b



Grafik 30. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se'nin TNF- α düzeyleri üzerindeki etkisinin % olarak değerlendirilmesi.

c

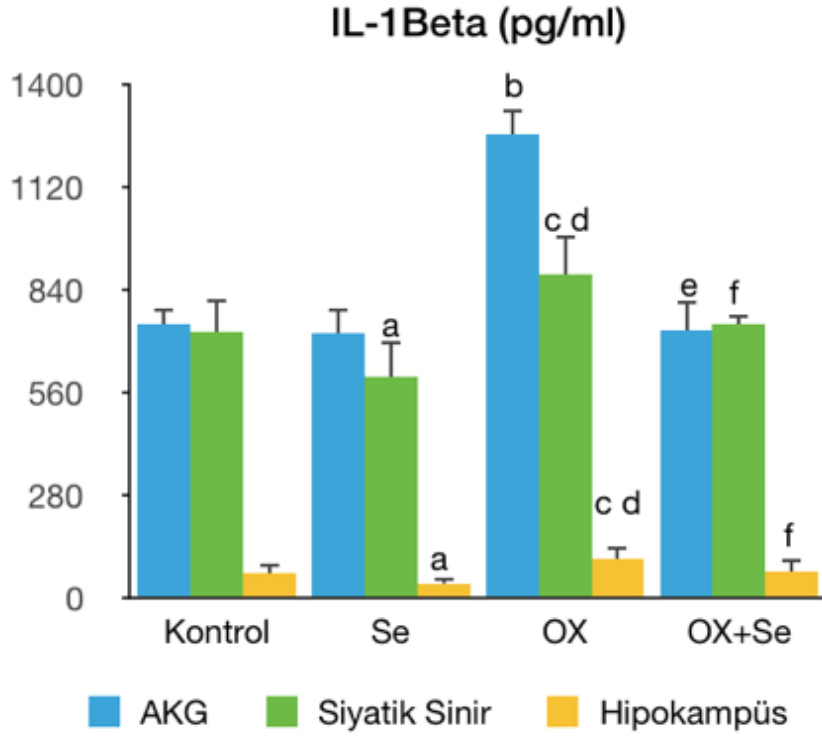


Grafik 31. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se'nin TNF- α düzeyleri üzerindeki etkisinin alan olarak değerlendirilmesi.

4.5.2. IL-1 β Düzeylerinin Değerlendirilmesi

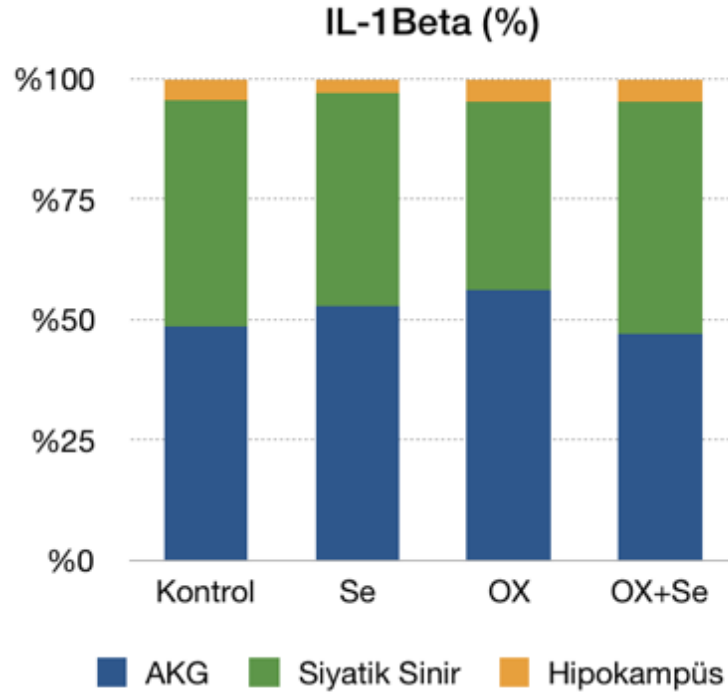
IL-1 β düzeylerine bakıldığında SN ve hipokampus hücrelerinin sadece Se enjekte edilen sıçan grubunda kontrole kıyasla (kontrol grubuna kıyasla, ^ap \leq 0,05) anlamlı bir azalma söz konusudur (Şekil 32). AKG'lerdeki IL-1 β düzeyleri OX grubunda kontrol ve Se gruplarına kıyasla anlamlı bir artış (kontrol ve Se gruplarına kıyasla, ^bp \leq 0,001) sergilemiştir. SN'nin OX grubundaki IL-1 β düzeyleri kontrole ve Se gruplarına kıyasla anlamlı bir artış (kontrol grubuna kıyasla ^cp \leq 0,05; Se grubuna kıyasla, ^dp \leq 0,001) sergilemiştir. Hipokampus nöronlarının OX grubunda kontrol ve Se gruplarına kıyasla IL-1 β düzeylerinde önemli düzeyde artış (kontrol grubuna kıyasla ^ep \leq 0,05; Se grubuna kıyasla, ^dp \leq 0,001) söz konusudur. AKG'nin OX+Se grubu OX grubuna kıyasla Se'nin etkisiyle IL-1 β düzeyleri açısından önemli düzeyde bir azalma (OX grubuna kıyasla ^ep \leq 0,001) sergilemiştir. SN ve hipokampus nöronlarının OX+Se gruplarındaki IL-1 β düzeyleri OX grubuna kıyasla önemli düzeyde azalma (OX+Se gruplarına kıyasla, ^fp \leq 0,05) göstermiştir (n= 6 ve ortalama \pm SD).

a



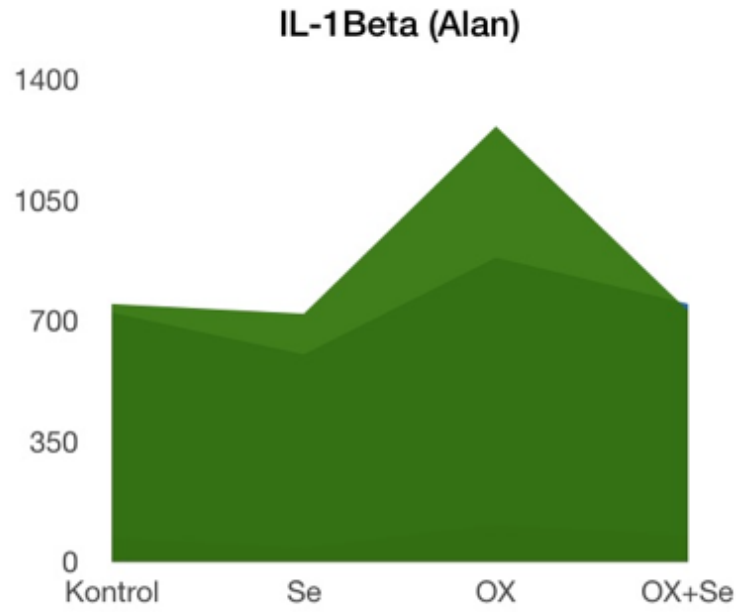
Grafik 32. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se'nin IL-1 β düzeyleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi. Kontrol grubuna kıyasla ^a $p \leq 0,05$; kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^b $p \leq 0,001$; kontrole kıyasla ^c $p \leq 0,05$; Se'ye kıyasla ^d $p \leq 0,001$; OX'a kıyasla ^e $p \leq 0,001$; OX'a kıyasla ^f $p \leq 0,05$ (n= 6 ve ortalama \pm SD).

b



Grafik 33. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se'nin IL-1 β düzeyleri üzerindeki etkisinin % olarak değerlendirilmesi.

c

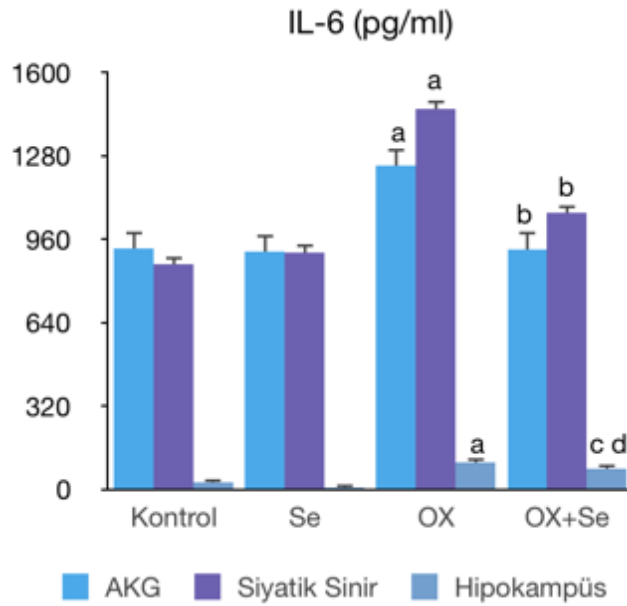


Grafik 34. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se'nin IL-1 β düzeyleri üzerindeki etkisinin alan olarak değerlendirilmesi.

4.5.3. IL-6 Düzeylerinin Değerlendirilmesi

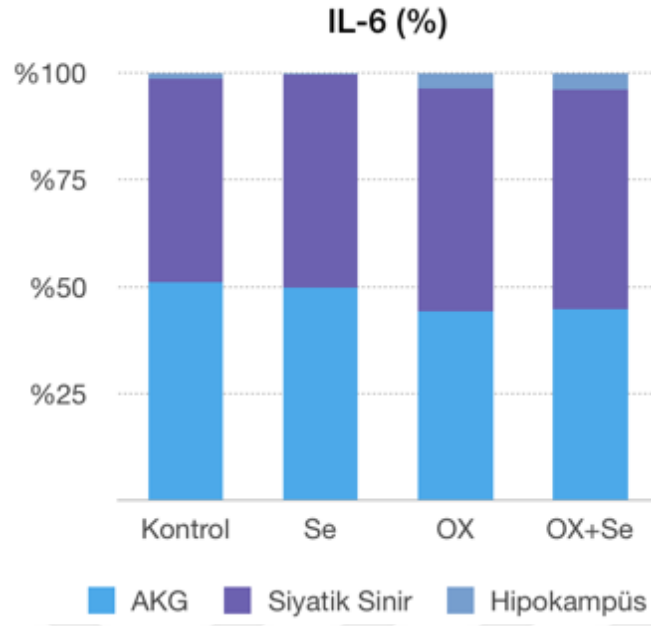
IL-6 düzeylerine bakıldığında AKG, SN ve hipokampus hücrelerinin OX enjekte edilen sıçan grubunda kontrol ve Se gruplarına kıyasla (kontrol ve Se gruplarına kıyasla, ^a $p \leq 0,001$) anlamlı bir artış söz konusudur (Şekil 35). AKG'nin ve SN'nin OX+Se grubu OX grubuna kıyasla Se'nin etkisiyle IL-6 düzeyleri açısından önemli düzeyde bir azalma (OX grubuna kıyasla ^b $p \leq 0,001$) sergilemiştir. Hipokampus nöronlarının OX+Se gruplarındaki IL-6 düzeyleri kontrol ve Se gruplarına kıyasla (kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^c $p \leq 0,001$) önemli düzeyde artış; OX grubuna kıyasla önemli düzeyde azalma (OX grubuna kıyasla, ^d $p \leq 0,05$) göstermiştir (n= 6 ve ortalama \pm SD).

a



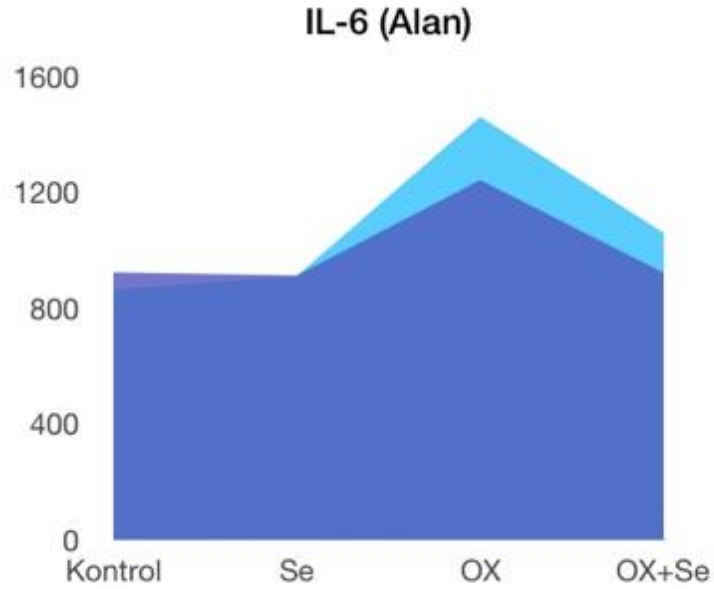
Grafik 35. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se'nin IL-6 düzeyleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi. (n= 6 ve ortalama \pm SD). Kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^a $p \leq 0,05$; OX grubuna kıyasla ^b $p \leq 0,05$; Se'ye kıyasla ^c $p \leq 0,001$; kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^d $p \leq 0,05$; kontrol ve Se'ye kıyasla ^e $p \leq 0,001$ OX grubuna kıyasla ^d $p \leq 0,05$) (n= 6 ve ortalama \pm SD).

b



Grafik 36. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se'nin IL-6 düzeyleri üzerindeki etkisinin % olarak değerlendirilmesi.

c



Grafik 37. Kontrol, OX ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde Se'nin IL-6 düzeyleri üzerindeki etkisinin alan olarak değerlendirilmesi.

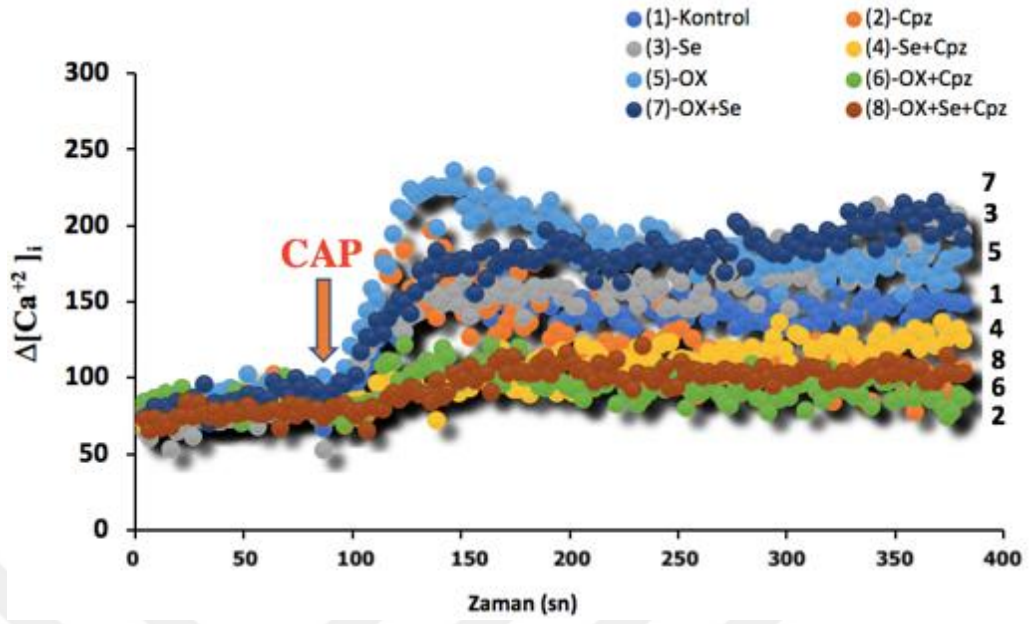
4.6. Hücre Kültürü (İn-Vitro) Çalışma Sonuçları



4.6.1. MCF-7 Kalsiyum Sinyali Sonuçları

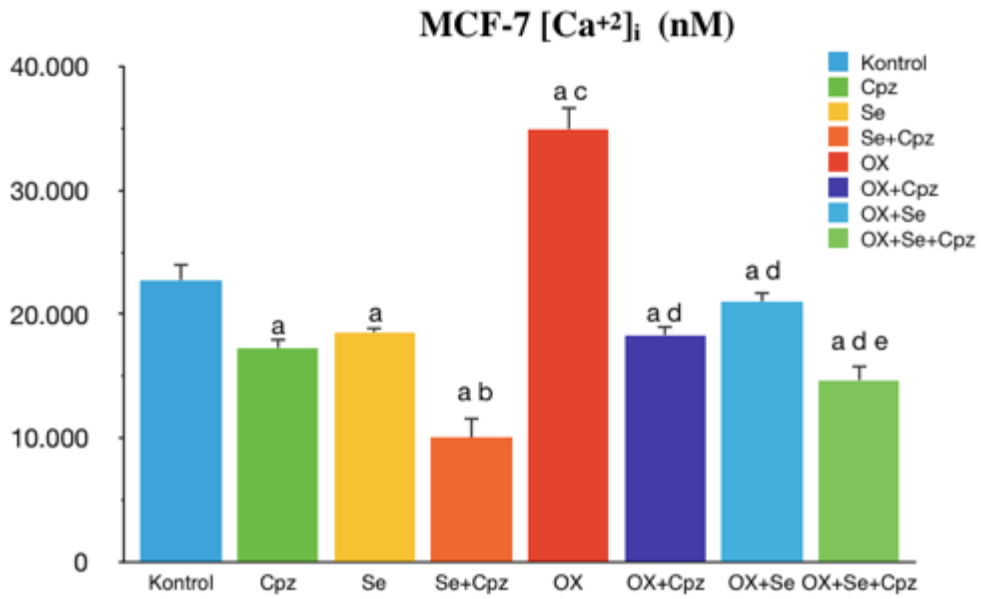
Kontrol, Se, OX ve OX+Se ile muamele edilen MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında kalsiyum $[Ca^{+2}]_i$ iyon konsantrasyonuna TRPV1 katyon kanalları aracılığıyla Se etkisi ($n=6$ ve ortalama \pm SD). Bu sıçanlardan OX grubundakilere OX (50 μ M, 24 saat), Se grubundakilere (200 nM, 2 saat Se) in-vitro uygulanmıştır. İnkübasyon sonrası bu kontrol, Se, OX ve OX+Se ile muamele edilmiş hücreler Fura-2 ile 45 dk. süreyle yükleme öncesi kapsazepin (Cpz, 0,1 mM) ile muamele edildi. Kalsiyum sinyali analizi esnasında 400 sn süreyle CAP (10 μ M) ile TRPV1 kanalları uyarıldı.

a



Grafik 38. Bu eğri grafiğinde MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin CAP (10 μ M) ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan kalsiyum konsantrasyonundaki $[Ca^{+2}]_i$ zamana göre meydana gelen değişim tüm gruplar için ifade edilmektedir

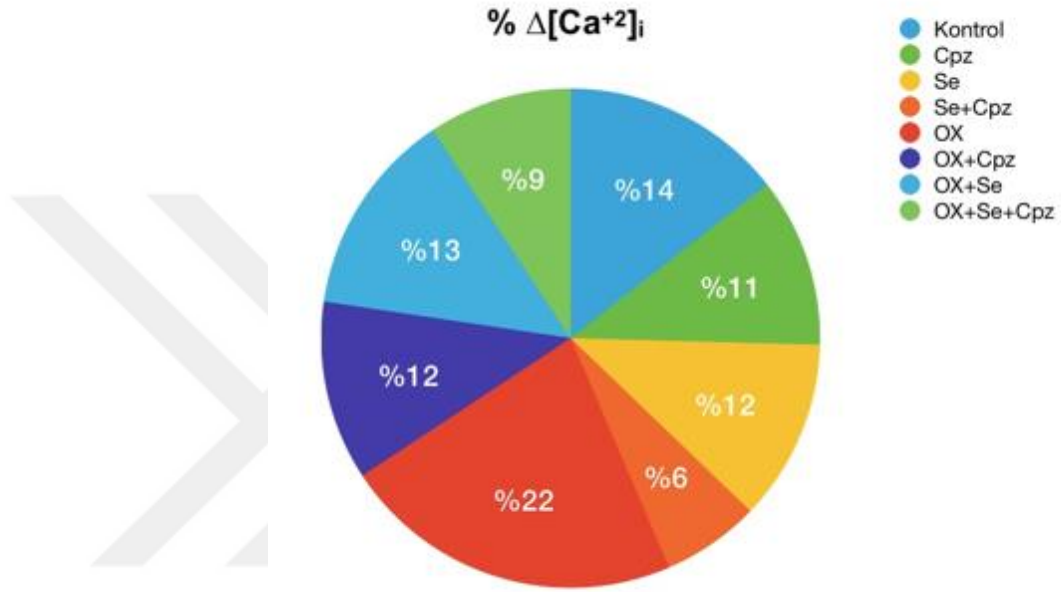
b



Grafik 39. Bu grafikte MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin CAP (10 μ M) ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan toplam kalsiyum miktarı $[Ca^{+2}]_i$ nM

olarak ifade edilmektedir (^ap≤ 0.001 kontrol grubuna kıyasla; ^bp≤ 0,001 kontrol, Cpz ve Se gruplarına kıyasla; ^cp≤ 0,001 Cpz, Se ve Se+Cpz gruplarına kıyasla; ^dp≤ 0,001 OX grubuna kıyasla; ^ep≤ 0,001 OX+Cpz ve OX+Se gruplarına kıyasla idi (n= 6 ve ortalama ± SD).

c

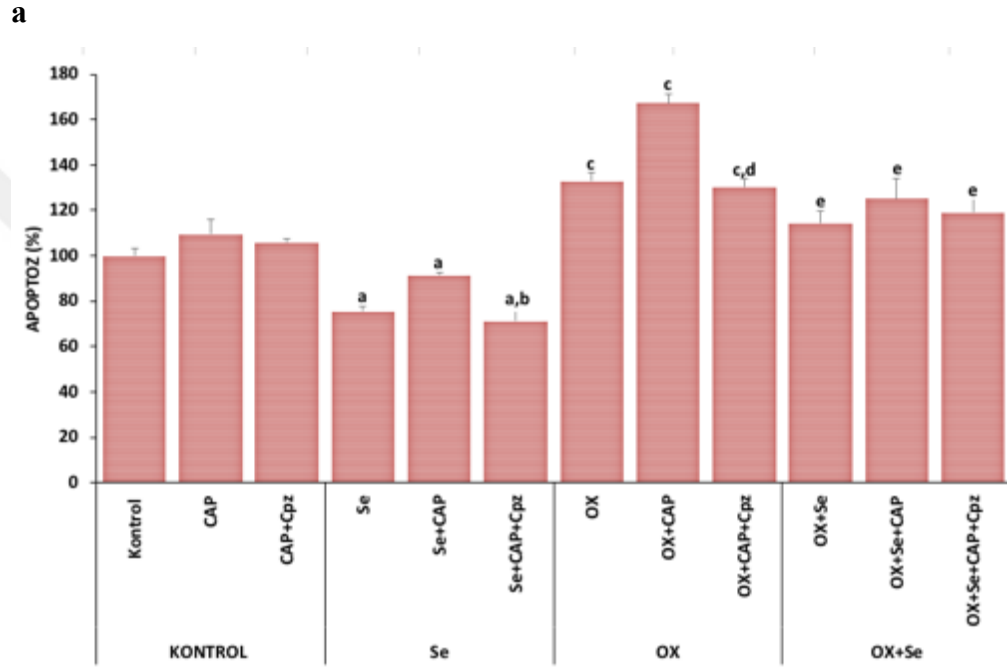


Grafik 40. MCF-7 hücrelerinin CAP (10 µM) ile aktive edilmesiyle birlikte sitozole akan toplam kalsiyum miktarı % olarak ifade edilmektedir.

4.6.2. OX Uygulanan İnsan Meme Kanseri MCF-7 Hücre Hattında Se'nin TRPV1 Aracılı Etkisinin Apoptoz, ROS, JC-1, Kaspaz 3, Kaspaz 9 ve MTT Sonuçları Üzerindeki Etkisinin Kontrol Kıyaslamalı Olarak Değerlendirilmesi

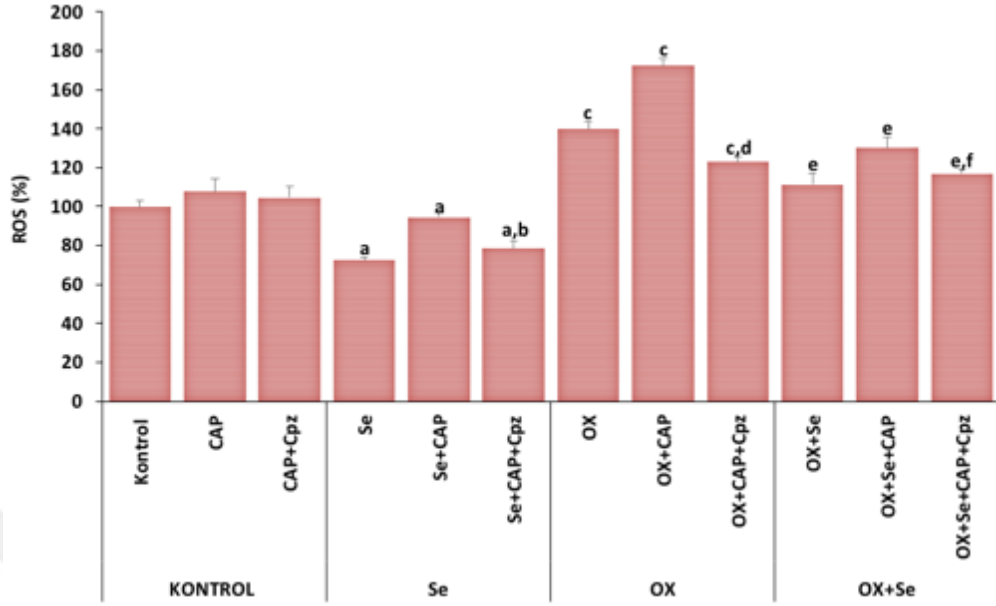
Bu bölümde OX ile inkübe edilen MCF-7 kanser hücrelerinde kaspaz değerleri ile gösterilen programlanmış hücre ölümü oranı üzerine Se ve OX'un etkilerini in-vitro olarak araştırdık. Dört gruba ait kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri ile birlikte apoptoz sonuçları sırasıyla Şekil 41-46'da gösterilmektedir. OX, OX + CAP, OX + CAP+ Cpz gruplarına ait değerler kontrol grubuna göre önemli düzeyde (p <0,05) yüksekti. OX + Se, OX + Se + CAP ve OX + Se + CAP+ Cpz gruplarına ait değerler ise OX grubuna göre belirgin şekilde (p <0,05) azaldı. Ayrıca Se gruplarında apoptoz, ROS, JC-1, kaspaz 3, kaspaz 9 değerlerinde

kontrol, OX ve OX+Se gruplarına kıyasla anlamlı bir azalma ($p < 0,05$) gözlenmiştir. Burada Se, hayvan modelimizdeki apoptoz sonuçlarını doğrudan nitelikte TRPV1 aracılı OX kaynaklı apoptoz yollarını bloke etmiştir. Kontrol, Se, OX ve Se+OX gruplarındaki ortalama MTT değerleri Şekil 48’de gösterilmektedir. MTT değerleri OX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük ($p < 0,05$) bulundu ($n= 6$ ve ortalama \pm SD).



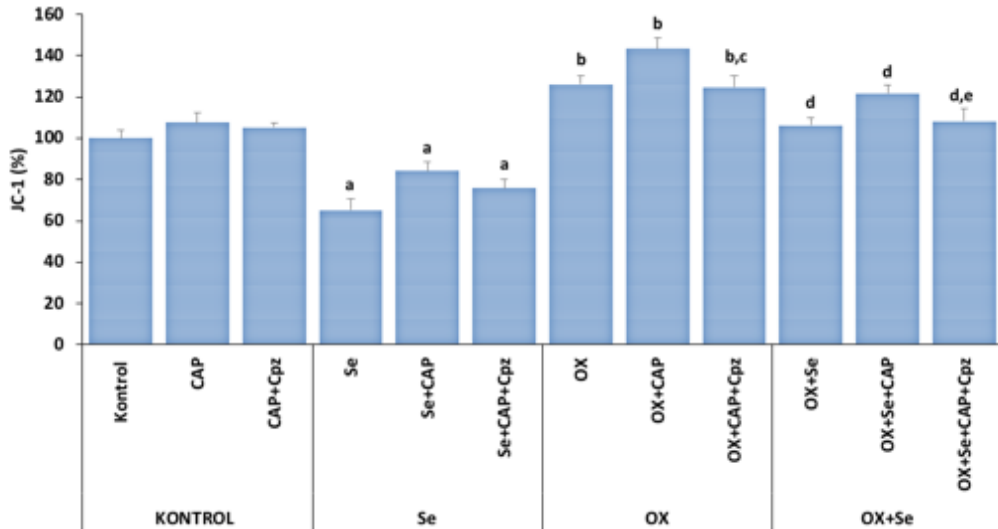
Grafik 41. MCF-7 hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan oksidatif stres durumu üzerine Se'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin apoptoz testi açısından değerlendirilmesi (kontrol grubuna kıyasla, ^a $p \leq 0,05$; Se+CAP'a kıyasla, ^b $p \leq 0,05$), (Kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^c $p \leq 0,01$; OX+CAP'a kıyasla ^d $p \leq 0,01$), (OX grubuna kıyasla ^e $p \leq 0,05$) ($n= 6$ ve ortalama \pm SD).

b



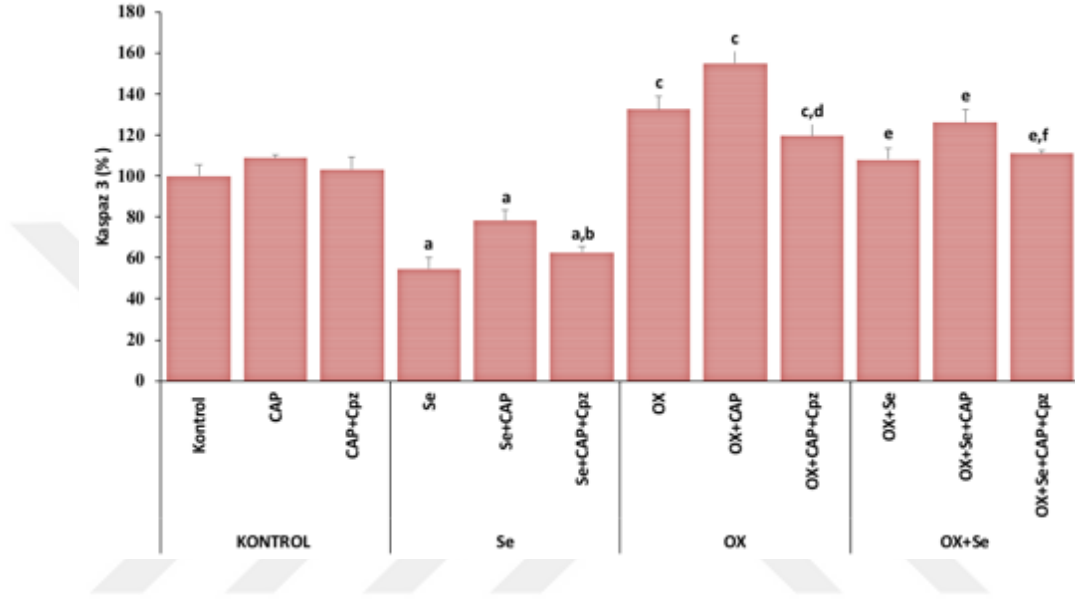
Grafik 42. MCF-7 hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan oksidatif stres durumu üzerine Se'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin ROS açısından değerlendirilmesi (Kontrol grubuna kıyasla, ^a $p \leq 0,05$; Se+CAP'a kıyasla, ^b $p \leq 0,05$), (Kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^c $p \leq 0,01$; OX+CAP'a kıyasla ^d $p \leq 0,01$), (OX grubuna kıyasla ^e $p \leq 0,05$; OX+Se+CAP grubuna kıyasla ^f $p \leq 0,05$) (n= 6 ve ortalama \pm SD).

c



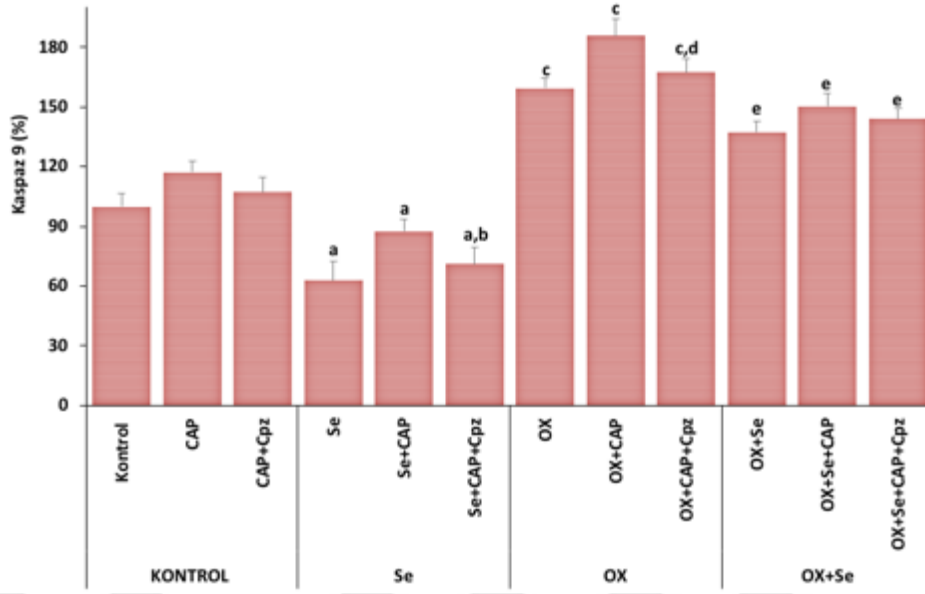
Grafik 43. MCF-7 hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan oksidatif stres durumu üzerine Se'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin JC-1 açısından değerlendirilmesi (Kontrol grubuna kıyasla, ^ap ≤ 0,05), (Kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^bp ≤ 0,05; OX+CAP'a kıyasla ^cp ≤ 0,05), (OX grubuna kıyasla ^dp ≤ 0,05; OX+Se+CAP'a kıyasla ^ep ≤ 0,05) (n= 6 ve ortalama ± SD).

d



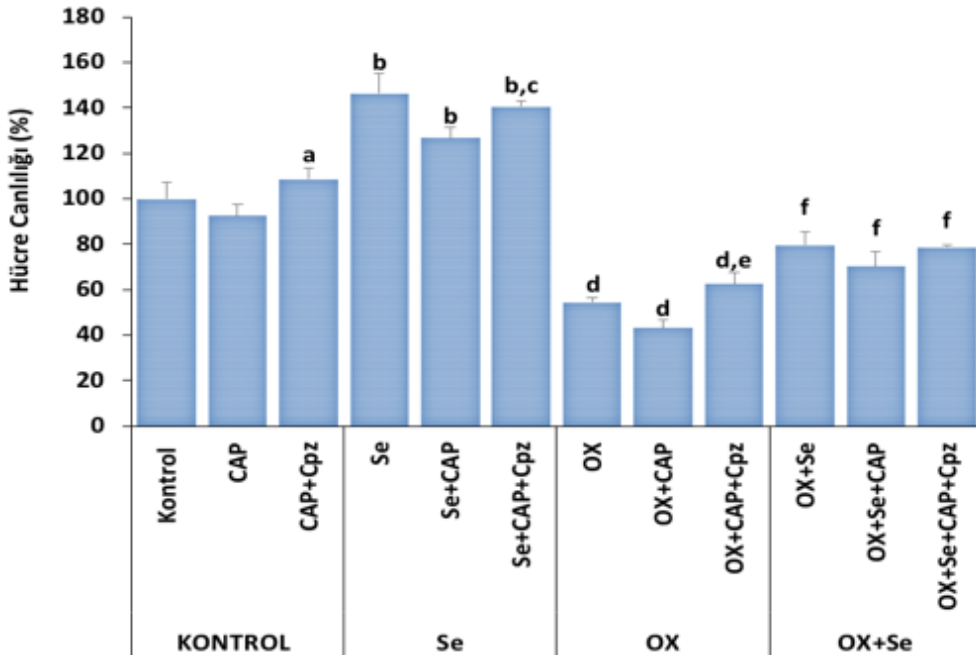
Grafik 44. MCF-7 hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan oksidatif stres durumu üzerine Se'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin kaspaz 3 açısından değerlendirilmesi (kontrol grubuna kıyasla, ^ap ≤ 0,05; Se+CAP'a kıyasla, ^bp ≤ 0,05), (Kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^cp ≤ 0,05; OX+CAP'a kıyasla ^dp ≤ 0,05), (OX grubuna kıyasla ^ep ≤ 0,05; OX+Se+CAP'a kıyasla ^fp ≤ 0,05) (n= 6 ve ortalama ± SD).

e



Grafik 45. MCF-7 hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan oksidatif stres durumu üzerine Se'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin kaspaz 9 açısından değerlendirilmesi (kontrol grubuna kıyasla, ^a $p \leq 0,05$; Se+CAP'a kıyasla, ^b $p \leq 0,05$), (Kontrol ve Se gruplarına kıyasla ^c $p \leq 0,01$; OX+CAP 'a kıyasla ^d $p \leq 0,05$), (OX grubuna kıyasla ^e $p \leq 0,05$) (n= 6 ve ortalama \pm SD).

f



Grafik 46. MCF-7 hücrelerinde OX etkisiyle oluşturulan oksidatif stres durumu üzerine Se'nin TRPV1 aracılı koruyucu etkisinin hücre canlılığı açısından değerlendirilmesi (CAP'a kıyasla, ^ap ≤ 0,05), (kontrol grubuna kıyasla ^bp ≤ 0,05; Se+CAP'a kıyasla ^cp ≤ 0,05), (Kontrol ve Se gruplarına kıyasla, ^dp ≤ 0,01; OX+CAP'a kıyasla ^ep ≤ 0,01), (OX grubuna kıyasla ^fp ≤ 0,05) (n= 6 ve ortalama ± SD).



5. TARTIŞMA

Oksaliplatin yaygın klinik kullanımdadır ve bu ilaç ile tedavi nöropatik ağrı ile sınırlıdır. Kemoterapötiklerin hücresel etki mekanizmalarındaki benzerlikler ve farklılıklar daha önce çeşitli tümör hücre tiplerinde yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (55,142). Duyusal nöropatik ağrı, oksaliplatin de dahil birçok kemoterapötiklerin doz sınırlayıcı yan etkisidir. OX'un nöropatik ağrıdaki rolünü iyon kanalları açısından karakterize etmek ve karşılaştırmak için in vitro sıçan AKG ve SN modeli kullandık. Bu primer kültür modelinin, hastalarda nöropati oluşturan moleküler ve hücresel olayların incelenmesinde yararlı olduğuna dair önemli deliller vardır (143-145).

OXPN'nin önlenmesi umut verici bir fikirdir, bununla birlikte bu yaklaşımın etkinliği için gerekli klinik bulgular azdır. Gelecekte, önleyici stratejiler, klinik ortamda semptom temelli değil, mekanizmaya dayalı bir yaklaşımla değerlendirilmelidir. Klinik bulgulara dayanarak çok az sayıda ilaç oksaliplatin kaynaklı OXPN'nin tedavisi için şu anda kullanılmaktadır. Kullanılan bu ilaçlar merkezi sinir sistemindeki nörotransmitter seviyelerini dengeler ve oksaliplatin kaynaklı OXPN'nin patogenezinde rol oynayan nöronal hipereksitabilite'yi azaltabilir. Kullanılan bu ilaçlardan biri olan Duloksetinin başarısı, başlangıçta KKP'n'i tetikleyen kemoterapötik ilaca göre hastaların sınıflandırılmasının ilaç etkinliğini daha da rafine değerlendirilmesini sağlamasıdır (146). Bununla birlikte, bu gibi ilaçlar mikrogliyoze ve inflamatuvar yanıtları engelleyemez ve bu nedenle oksaliplatin kullanımıyla ilişkili OXPN tedavisinde daha az etkili olur. TRP kanallarını bloke etme ve sitokin salınımını azaltma (147) gibi çift etkiye sahip olan ilaçların kullanımı, oksaliplatin ile indüklenen OXPN'nin monoterapisi için en umut verici ajanlar olacaktır. Dolayısıyla geliştirilecek olan ilaçların etkin ve kalıcı çözümler sunabilmesi, bu kemoterapötik ajanlardan kaynaklanan ağrıyı önemli ölçüde hafifletebilmesi için özellikle iyon kanallarından TRP katyon kanallarının moleküler mekanizmaları göz önünde bulundurularak planlanması gerekmektedir. Bununla birlikte, kemoterapi alan hastalar zaten zayıflamış bir bağışıklık sistemine sahip oldukları için güçlü bir bağışıklık-baskılayıcı program önlenmelidir.

KKP'li hastalar genellikle kemoterapi sırasında farklı ilaçların kombinasyonunu almışlardır ve bu nedenle çeşitli yan etkilerine maruz kalmaktadırlar. Ayrıca, farklı kemoterapötiklerin kombinasyonel kullanımının

artması, çapraz reaksiyona neden olabilir ve ilaçların sitostatik antineoplastik etkinliğini etkileyebilir. Bu nedenle KKP tedavisinde amaç monoterapi olmalıdır.

Nöropatik ağrı ile ilgili yukarıda açıklanan mekanizmalar bağımsız değildir ve bu yolların tümü birbiriyle ilişkili olabilir. Antikanser ajanlarının, AKG ve dorsal boynuz duyuşal nöronlarının sodyum kanalı fonksiyonel karakteristiklerindeki değişiklikleri tetikleyerek hücre içi sodyum iyon düzeylerini arttırmak için açılma sıklığını, süresini arttırdığı ve bunun da kalsiyum kanallarının daha fazla açılmasına neden olabileceği varsayılabilir. Kalsiyum kanallarının alfa 2-delta alt biriminin artmış ekspresyonu ayrıca hücre dışı kalsiyumun girişinin artmasından sorumlu olabilir (12,13,24). Dahası, artmış presinaptik glutamat salımına yanıt olarak belirgin NMDA reseptör aktivasyonu vasıtasıyla hücre dışı kalsiyumun fazlaca sitozole girişi de katkıda bulunabilir. Sitolik kalsiyumun artması, özellikle mitokondriler gibi hücre içi depolarından daha fazla kalsiyum salmak için bir tetikleyici olarak işlev görür. Kalsiyum artışı, nöronal hücre gövdeleri ve aksonal terminallerin sitotoksitesite üretmesine sebep olan nitrik oksit ve serbest oksijen radikallerinin üretimine yanısıra duyuşal nöronlarda direk olarak aşırı duyarlılık değişiklikleri üreten TRPV1 'in fosforilasyonu ve aktivasyonuna yol açan protein kinaz C'nin aktivasyonu da dahil olmak üzere diğer sekonder değişikliklerin sayısını tetikleyebilir (59,60).

Kemoterapötik ajanların kullanımıyla beraber A δ ve C liflerinde (soğuk ve sıcak spesifik) bir kayıp ve bunun sonucunda sinir liflerinin dejenerasyona uğramasıyla spontan deşarj meydana gelir. Bu spontan deşarj neticesinde nosiseptörlerin aşırı duyarlılığından dolayı mekano-duyarlılık gelişir. Dorsal boynuz ve AKG'nin glial hücrelerinden ve makrofajlarından salınan TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinler, nöropatik ağrının gelişimine katkıda bulunan PKC ve MAP kinazın aktivasyonu da dahil olmak üzere değişiklikleri ortaya çıkarmak için duyuşal nöron lokalize sitokin reseptörleri üzerine etki ederek bu kaskada katılırlar (51,52). Dahası, bu inflamatuvar mediyatörler, nöronal eksitabilitiyi arttırmak için çeşitli iyon kanallarının (TRP kanalları) ekspresyon seviyelerini de artırabilir ve ayrıca nosiseptörlerin zararlı olan ve zararsız olan uyarıcılara karşı tepkilerini arttırmak için doğrudan etki yapabilir ve nöropatik ağrının patogeneşine önemli katkıda bulunurlar.

Bu çalışmada OX'un periferik nöropatik ağrıya yol açtığı ve Se'nin OX kaynaklı bu ağrıyı kısmen önlediği görülmüştür. OX'un nörotoksik bir etkiye sahip olduğu iyi bilinmesine rağmen (148,149) Se'nin OX ile indüklenen nöropatik ağrı üzerindeki nöroprotektif etkisi ilk olarak bu çalışmada gösterilmiştir. Bu sonuçla uyumlu olarak, önceki çalışmalar Se'nin periferik ve merkezi sinir sistemini OX dışında nörotoksositeye karşı koruduğunu göstermiştir (150,151). OX kaynaklı nöropatik ağrıyı açıklamak için birkaç olası patofizyolojik mekanizma önerilmiştir. Bunlardan bazıları sinir dokusunda reaktif oksijen radikalleri ve antioksidan enzim aktivitesinin azalmasıdır. OX'un periferik sinirlerde ve vücuttaki başka dokularda reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine neden olduğu gösterilmiştir (152) ve plazma antioksidan seviyelerinde azalma, ROS birikmesi, lipid peroksidasyon ve enzim inaktivasyonu gibi oksidan-antioksidan dengesizliğine neden olmuştur (153-155). Ayrıca, önceki çalışmalarla tutarlı olarak, glutatyon peroksidaz düzeyinin sıçanlarda OX ile indüklenen nörotoksositeyi önlediği gösterilmiştir (156,157).

Diğer yandan Se hücreleri serbest radikallerin zararlı etkilerinden korur ve glutatyon peroksidazın (GSH-Px) aktif bölgesini etkiler. GSH-Px bir selenoenzimdir ve peroksitleri suya indirgeyerek ortadan kaldırabilir. Benzer şekilde Nazıroğlu ve ark. Se'nin sıçanlarda böbrek, karaciğer ve lens dokularına sisplatin kaynaklı oksidatif hasarı önlediğini ifade etmiştir (158). Ayrıca Se, sikloksigenaz ve lipoksigenaz kaskadı içeren anti-inflamatuvar özelliklere sahiptir ve sitokin ve kemokin ekspresyonunu etkiler (119). Se, nörolojik bozukluklarda oksidatif hasarı azaltmak için nöroprotektif bir ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen OX kaynaklı periferik nöropatik ağrı üzerindeki potansiyel önleyici etkileri daha önce araştırılmamıştır. Bu çalışmada sıçanlarda yapılan ağrı testleri, elektrofizyolojik iyon kanalları aracılı moleküler incelemeler sonucunda Se'nin OX kaynaklı nöropatik ağrıyı önemli düzeyde azalttığı önlediği görüldü. Se'nin TRPV1 kanalları aracılı bu nöroprotektif etkileri, antioksidan özellikleri ile ilişkili gibi görünmektedir.

Bu tez çalışmasında spesifik olarak, periferik sinir sisteminin AKG, SN gibi primer duyu nöronlarında OX kaynaklı nöropatik ağrıya (OXPN) Se'nin TRPV1 aracılı tedavi edici rolü incelendi. Oksaliplatin ile oluşturulan kemoterapötik ajan kaynaklı bu ağrı modeli ayrıca MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında in-vitro olarak çalışıldı. Sonuçlar birbirini doğrular nitelikteydi.

Önceki çalışmalar, sıçanlarda kemoterapi rejiminin başlatılmasından sonra mekanik hiperaljezi ve hipersensitivite dahil olmak üzere tek bir OX enjeksiyonunun sıçanlarda nöropatik ağrı ürettiğini göstermiştir (159,160). Fakat Se'nin bu ağrı türü üzerine TRPV1 katyon kanalları aracılı etkisi henüz çalışılmamıştır. Burada Se'nin OX enjekte edilen sıçanlarda yapılan Von-Frey ve Hot-Plate ağrı testlerinde pençe geri çekme kuvveti ve pençe geri çekme eşik zamanında anlamlı değişikliklere sebep olduğunu gözlemledik. Ağrı testi sonuçları incelenecek olursa OX uygulandıktan 1 hafta sonrasında itibaren, bilateral olarak pençe çekme eşiklerinde (Grafik 27) ve pençe çekme eşik zamanında (Grafik 28) önemli ölçüde bir azalma meydana geldiği ve bu azalmanın müteakip haftalarda kademeli olarak devam ettiği gözlenmektedir. Öte yandan, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, OX grubunda 2, 3 ve 4. haftalarda mekanik aşırı duyarlılıkta artış gözlemlendi. Bununla birlikte, sadece Se uygulanan grup sonuçları kontrole benzer seyretti. OX ile birlikte sıçanlara Se uygulandığında, sadece OX grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde antihiperalezik etki gözlemlendi. Bununla birlikte, Se ile tedavi sonrasında mekanik uyarılara karşı hassasiyet eşik değerinde belirgin bir artış saptanmıştır.

OX kanser tedavisinde son derece etkili olmasına rağmen, AKG nöronlarındaki nörotoksisitenin sık rastlanan yan etkileri vardır. Bu nörotoksisitenin anahtar mekanizmaları hala tartışmalıdır. Bununla birlikte, kalsiyum homeostazındaki bozulmanın OX kaynaklı nörotoksisiteye aracılık ettiği öne sürülmüştür (23,161-164). Kalsiyum iyonlarının hücre içine girdiği spesifik iyon kanallarından birisi de TRP katyon kanallarıdır ve ilk olarak Drosophila'da tanımlanmışlardır. Bunlar arasında trp gen mutasyonları taşıyan fotoreseptörler sürekli ışığa bir geçici voltaj yanıtı sergilerler (166). Bu TRP katyon kanalları OX gibi kemoterapötik ajanların ortak bir yan etkisi olan periferik nöropatik ağrının gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, TRP'lerin bu duruma kesin katkısı tam olarak bilinmemektedir (165,166). TRP ailesinin bir alt ailesi olan TRPV1 katyon kanallarının, özellikle oksidatif stres ve inflamasyondan kaynaklanan hücre ölümlerindeki olası rolü nedeniyle ilgi duyduk (167). TRPV1 kanalları Ca^{+2} 'ye geçirgen olduğundan ve daha önce diğer oksidatif strese bağlı nörodejeneratif hastalıklarda rol oynadığından (166,167), bu kanalların aktivasyonu OXPN patogenezinde katkıda bulunabilecek potansiyel olarak önemli bir mekanizmadır.

TRPV1 kanallarının bu ağrıdaki rolünü aydınlatmak üzere bu kanallardan patch-clamp kayıtları aldık. AKG hücrelerinden alınan patch-clamp akım kayıtlarında ve kalsiyum sinyali (AKG, SN ve MCF-7 hücrelerinde) sonuçlarında OX ile artan TRPV1 aktivasyonunu Se'nin baskıladığını belirledik. TRPV1 patch-clamp analizlerinde sıçan AKG'lerinde CAP ile indüklenen akımlar, sırasıyla, Cpz ve NMDG⁺ (Na⁺'nın değiştirilmesi) ile tersinir bloke edildi. Agonistlerin (CAP) yokluğunda herhangi bir akım gözlenmedi (Grafik 7). Grafik 8 ve 10'daki kayıtlarda görüleceği gibi agonist tarafından açılan kanallar Cpz ile bloke edildi. AKG primer duyuşal nöron hücrelerindeki akım yoğunlukları OX+CAP gruplarında kontrol ve kontrol+CAP gruplarına kıyasla belirgin şekilde daha yüksekti. Bununla birlikte akım yoğunlukları ele alındığında kontrol+CAP+Cpz, OX+CAP+Cpz gruplarında OX grubuna göre anlamlı derecede düşüktü (Grafik 14). Nöronlardaki akım yoğunlukları Se tedavileri ile azaldı ve Se+CAP, OX+Se+CAP gruplarında düşüktü (Grafik 14). Bu sonuçlar, CAP'ın TRPV1 kanalları aracılığıyla sitozole aşırı Ca²⁺ yüklemesine neden olduğunu açıkça belirtmiştir. Bununla birlikte, OX ile indüklenen TRPV1 akımları, oksidatif stres modülasyonu yoluyla bir antioksidan eser element olan Se ile tedavi edilerek azaltıldı.

Yapılan literatür taramalarında Fura-2 kalsiyum sinyali çalışma sonuçları OX'un hücre içi sinyalizasyon açısından bizlere önemli çıktılar sunduğunu ortaya koymaktadır (168-170). Bu bulgular ilgi çekicidir çünkü Ca²⁺, hücre sağkalımı, nöronal uyarılabilirlik, nörotransmitter salınımı, sinaptik plastisite metabolizma, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü dahil olmak üzere birçok hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynayan birçok sinyal iletim yollarından sorumlu kritik bir hücre içi sekonder habercidir (171-173). Ca²⁺'nin OXPN indüksiyonuna dahil olduğu iyi bilinmektedir. OXPN'de Ca²⁺ sinyallerinin uzamsal ve zamansal düzenini modüle ederek, çeşitli hücre sinyalleri manipüle etmek ve tamamen farklı hücre süreçleri düzenlemek mümkün olabilir. Bu süreçler, çalışmanın odak noktası haline gelen büyük bir kalsiyum sinyalizasyon aracıyla ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, periferik nöronlarda bu Ca²⁺ sinyali aracı hakkında çok az şey bilinmektedir. Ayrıca bileşenlerinin periferik nöropatide nasıl değiştirilebileceği bilinmemektedir. Akut OX uygulanması, Ca²⁺ aracılı kalpain aktivasyonuna yol açan hücre içi

Ca²⁺ salınımlarını aktive eder (165). Bu bakımdan TRPV1 aracılı kalsiyum sinyali bu tez çalışmasında odak noktası olmuştur. Burada kalsiyum sinyalizasyonu üzerinde durularak patch-clamp çalışmalarında alınan tek bir hücrede alınan kayıtlara burada çoklu hücre popülasyonlarından alınan TRPV1 katyon kanal aktivasyonu kayıtlarıyla katkı sağlanmıştır.

Bu bağlamda kalsiyum sinyali sonuçları değerlendirilecek olursa, intraperitoneal olarak OX uygulanan sıçanlardan izole edilen ve periferel ağrı iletiminden primer sorumlu AKG ve SN'de hücre içi kalsiyum konsantrasyonu [Ca²⁺]_i üzerine TRPV1 aktivasyonunun modülasyonu yoluyla Se'nin etkileri incelendi. Se'nin periferel duyuşal nöronlardaki TRPV1 kanalları üzerindeki etkisini açıklığa kavuşturmak için, Se ile in-vivo muamele edilen sıçanların nöronları, daha sonra kapsazepin ile bloke edildi. CAP ile uyarılan AKG ve SN nöronal hücrelerinde kalsiyum'un hücre içine (sitozolik) akış miktarında önemli düzeyde artış meydana geldi. OX-kaynaklı nöropatik ağrılı sıçanların AKG ve SN nöronal hücrelerindeki bu [Ca²⁺]_i artışı, kalsiyuma geçirgen TRPV1 katyon kanallarının CAP ile aktivasyonuna atfedildi (Grafik 1-6 Grafik 10). Periferdeki bu duyuşal nöron hücrelerin OX gruplarında kontrol grubuna kıyasla yüksek düzeyde hücre içi kalsiyum konsantrasyonu [Ca²⁺]_i olmasına rağmen, TRPV1 antagonistinin (Cpz) güçlü bir şekilde bu [Ca²⁺]_i konsantrasyonunu baskıladığı (Grafik 2,5) görölmektedir.

Buna ek olarak, Se ile tedavi edilen gruptaki nöronal hücrelerin [Ca²⁺]_i düzeylerinin kontrole kıyasla ciddi anlamda düşük olduğunu bulduk (Grafik 2, 5, 14). Bu periferel duyuşal nöron hücrelerindeki [Ca²⁺]_i düzeyi, OX+Se gruplarında OX grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü (Grafik 2, 5, 14). Bu sonuçlar ele alındığında Se'nin OX-kaynaklı periferel nöropatik ağrı durumlarında hücre içi [Ca²⁺]_i düzeylerindeki önemli artışları engelleyerek periferel duyuşal nöronlardaki TRPV1 katyon kanallarının aktivasyon mekanizmalarını etkileyip nöroprotektif roller üstlenmesi gibi pozitif etkileri nedeniyle, yeni tedavi yaklaşımlarında çok önemli katkılar sağlayabileceğini akla getirmektedir. İn-vivo periferel nöronların yanısıra in-vitro hücre kültürü kalsiyum sinyali sonuçlarına bakacak olursak, kontrol, Se, OX ve OX+Se ile muamele edilen MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında kalsiyum [Ca²⁺]_i iyon konsantrasyonuna TRPV1 katyon kanalları aracılığıyla Se'nin etkisine bakıldı. Bu sıçanlardan OX grubundakilere oksaliptatin (50µM 24 saat OX), Se

grubundakilere (200 nM 2 saat Se) in-vitro uygulanmıştır. OX grubunda hücre içi kalsiyum düzeyinde kontrole kıyasla önemli düzeyde bir artış gözlemlendi. Se uygulanmasıyla da kalsiyum düzeyi önemli ölçüde azaldı. Bu sonuçlar hayvan çalışma sonuçlarını doğrular niteliktedir.

Ayrıca apoptoz sonuçlarında da Se'nin kullanıldığı gruplarda diğer gruplara kıyasla azalma görüldü. AKG ve SN nöronal hücrelerde TRPV1 katyon kanallarının CAP ile stimülasyonunu müteakip, apoptoz düzeyleri (Grafik 15 ve 21), ROS ve JC-1 ve seviyeleri (Grafik 16,17; Grafik 22,23), kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktiviteleri (Grafik 18,19; Grafik 24,25) kontrole kıyasla belirgin şekilde artış gösterirken MTT düzeylerinde (Grafik 20,26) belirgin bir azalma meydana geldi ($p \leq 0.05$). OX grubunda kontrole kıyasla apoptoz düzeyleri, kaspaz aktiviteleri ve JC-1 ve ROS seviyeleri kontrole kıyasla belirgin şekilde artış gösterirken MTT düzeylerinde aynı şekilde belirgin bir azalma meydana geldi. OX+Se grubunda OX grubuna kıyasla apoptoz testi değerlerinde önemli düzeyde bir azalma, MTT seviyesinde bir artış gözlemlenmiştir. Se grubundaki apoptoz değerleri OX ve OX+Se gruplarına kıyasla önemli düzeyde azalma sergilemişlerdir. Cpz (tüm gruplarda) ile hücrelerin ön-muamelesi ve hemen ardından CAP ile hücrelerin TRPV1 aracılı uyarımı (Cpz+CAP gruplarından bahsedilmektedir) ile, CAP ile indüklenen oksidatif sitotoksisteyi belirgin bir şekilde azaltmıştır, bu durum hücrenin hayatını idame ettirmesine önemli düzeyde katkı sağlamıştır.

MCF-7 meme kanseri hücre hattında apoptoz, ROS, JC-1, kaspaz 3 ve kaspaz 9 sonuçlarına bakacak olursak, OX ile inkübe edilen MCF-7 kanser hücrelerinde kaspaz değerleri ile gösterilen programlanmış hücre ölümü oranı üzerine Se ve OX'un etkilerini in-vitro olarak araştırdık. Dört gruba ait kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri ile birlikte apoptoz sonuçları sırasıyla Grafik 43-47'de gösterilmektedir. OX, OX + CAP, OX + CAP+ Cpz gruplarına ait değerler kontrol grubuna göre önemli düzeyde. OX + Se, OX + Se + CAP ve OX + Se + CAP+ Cpz gruplarına ait değerler ise OX grubuna göre belirgin şekilde azaldı. Ayrıca Se gruplarında apoptoz, ROS, JC-1, kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerlerinde kontrol, OX ve OX+Se gruplarına kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Burada Se, hayvan modelimizdeki apoptoz sonuçlarını doğrular nitelikte TRPV1 aracılı OX kaynaklı apoptoz yollarını bloke etmiştir. Fakat bu sonuçlar literatürdeki birtakım sonuçlarla zıtlık arz ediyor olabilir (139) ancak buradaki

apoptoz sonuçları Se'nin düşük doz ve zamandaki (200 nM, 2 saat) sonuçlarıydı. Çünkü neticede kanser hücre hattı olan MCF-7'de Se'nin apoptoz, ROS, kaspaz, JC-1 düzeylerini artırması, hücre canlılığını azaltması beklenirken biz burada tam tersini bulduk. İleride farklı dozlarda uygulayacağımız Se ile bu zıtlığı telafi etmeyi umuyoruz. Ayrıca Se ile alakalı literatürdeki yayınlar incelenecek olursa hem faydalı hem de toksik zararlı etkilerinin olduğu anlaşılmaktadır. Bu da bizim çıkarımımızı doğrulamaktadır.

Nöronal AKG, SN hücrelerinde ve nöronal olmayan MCF-7 hücre hattında apoptoz, kaspaz-3, kaspaz-9, sitozolik ROS ve $[Ca^{+2}]_i$ değerlerinin OX indüksiyonu ile arttığını bulduk. Bu nedenle, sıçanlara OX indüksiyonları, artan oksidatif stres, hücre içi Ca^{+2} akışı ve apoptoz ile karakterize edilir. Bu durum ayrıca in-vitro modelde uyumlu sonuçlarla desteklenmiştir. Bununla birlikte, selenyum ile tedavi, OXPN sıçan modelinde AKG, SN ve Hipokampal nöronlar üzerinde yararlı etkiler gösterdiği bu çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla açığa çıkartılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma, Se uygulamalarını, özellikle OX ile indüklenen sıçanlarda oksidatif stres, Ca^{+2} sinyali ve apoptoz redoks sistemi üzerindeki etkileriyle referans gösteren ilk çalışmadır. Oksidatif stres, lipit, protein ve DNA hasarlarına neden olur. Oksidatif hasar, OX kaynaklı hücre lizisi ve oksidatif stres (immün yanıtın bir parçası olarak) sonrasında oluşabilen ROS aracılığıyla gerçekleşir (174,175).

AKG ve hipokampus hücrelerinde TNF- α düzeylerinde sadece Se enjekte edilen sıçan grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir azalma söz konusudur (Grafik 31-33). AKG'deki TNF- α düzeyleri OX grubunda kontrol ve Se gruplarına kıyasla anlamlı bir artış sergilemiştir. SN'nin OX grubundaki TNF- α düzeyleri kontrole ve Se gruplarına kıyasla anlamlı bir sergilemiştir. Merkezi sinir sisteminin önemli bir parçası olan (hatta burada OX kaynaklı periferik nöropatik ağrı durumunda meydana gelen sitokin düzeylerindeki artışların daha ziyade periferik sinir sisteminde gerçekleştiğini göstermek için hipokampusu kullandık) hipokampus nöronlarının OX grubunda kontrol ve Se gruplarına kıyasla TNF- α düzeylerinde önemli düzeyde artış söz konusudur. AKG, SN ve hipokampus nöronlarının OX+Se gruplarındaki TNF- α düzeyleri OX grubuna kıyasla Se'nin etkisiyle önemli düzeyde azalma göstermiştir. Sonuçta, bu sıçanlardan izole edilen AKG ve SN periferik duyu ve merkezi sinir sisteminden hipokampal

nöron hücrelerinde OX kaynaklı ağrıya neden olan pro-aljezik sitokinleri baskıladığını gözlemledik.

IL-1 β ve IL-6 düzeylerine bakıldığında AKG, SN ve hipokampus hücrelerinin sadece Se enjekte edilen sıçan grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir azalma söz konusudur (Grafik 32 ve 35). AKG'deki IL-6 ve IL-1 β düzeyleri OX grubunda kontrol ve Se gruplarına kıyasla anlamlı bir artış sergilemiştir. SN'nin OX grubundaki IL-1 β düzeyleri kontrole ve Se gruplarına kıyasla anlamlı bir artış sergilemiştir. Hipokampus nöronlarının OX grubunda kontrol ve Se gruplarına kıyasla IL-6 ve IL-1 β düzeylerinde önemli düzeyde artış söz konusudur. AKG'nin OX+Se grubu OX grubuna kıyasla Se'nin etkisiyle IL-1 β düzeyleri açısından önemli düzeyde bir azalma sergilemiştir. SN ve hipokampus nöronlarının OX+Se gruplarındaki IL-6 ve IL-1 β düzeyleri OX grubuna kıyasla önemli düzeyde azalma göstermiştir.

Makrofaj aktivasyonuna bağlı gelişen nöroinflamasyon kaynaklı oksidatif stres, OXPN sonrası nöronal dejenerasyon ürünlerinde önemli rol oynar (176). Selenyum, bu etkileri antioksidan rol oynayarak ve antioksidan redoks sistem yollarını modüle ederek azaltabilir. Elde ettiğimiz sonuçlar, OXPN sonrası periferdeki oksidatif stres artışı raporlarının sonuçlarıyla doğrulanmıştır (177-180). OXPN'deki yüksek [Ca⁺²]_i seviyeleri mitokondriyal permeabilite geçiş porunun sürekli açılmasını indükleyebilir ve bir dizi reaksiyonu tetikleyebilir. Bunlar arasında kalsiyum salınımı, oksidatif fosforilasyonun kesilmesi, matris şişmesi ve nihayetinde sitokrom c ve diğer apoptojenik proteinlerin salınmasıyla dış zarın kopması sayılabilir (173). Bu nedenle mitokondriyal kalsiyum homeostazının disregülasyonu, mitokondriyal disfonksiyonu ve sonraki apoptozu tetiklemede çok önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte selenyum, protein tiyol gruplarının modifikasyonu ile geçişli mitokondriyal geçirgenliği indükler, bu da sitokrom c serbestleşmesi ve mitokondriyal membran depolarizasyonunun kaybı ile sonuçlanır (181,182). Mevcut AKG, SN ve MCF-7 hücrelerindeki ROS ve [Ca⁺²]_i değerleri, selenyumun, nöronal ve nöronal olmayan hücrelerde TRPV1 kanal aktivitesinin modülasyonu yoluyla [Ca⁺²]_i konsantrasyonunu azaltmasına rağmen, OX maruziyeti ile arttırılmıştır. Bu hücrelerde TRPV1'in selenyum ile tedavisi ile modülasyonu, mitokondriyal ROS üretimi, apoptoz ve hücre zarı Ca⁺² akışının azalmasının nedeni olabilir. Reaktif oksijen türleri, mitokondriyal membran potansiyelinin çöküşünü

indükler ve bu nedenle apoptoz dahil olmak üzere bir dizi mitokondriye bağlı süreçleri tetikler (118,173). Apoptoz, esasen kaspaz olarak bilinen sistein proteazları tarafından yürütülen programlanmış hücre ölüm yolaklarıdır. Kaspazların apoptotik kaskadı, kaspaz-3, -8 ve -9'u içeren apikal (başlatıcı) kaspazların aktivasyonu ile başlatılır (182). Zararlı uyaranlara ve ilgili hücrel stres durumlarına yanıt olarak, başlatıcı kaspazları, apoptotik hücre ölümünü düzenleyen yürütücü kaspazlarını doğrudan veya dolaylı olarak aktive eder (183,184). Kompleks I'in inhibisyonu, ATP sentezinde ve oksidatif radikallerin birikiminde bir azalmaya neden olarak, zararlı oksidatif strese ve hücre ölümüne neden olur (172). Son zamanlardaki çalışmalar da ROS'a yanıt olarak nöronlarda ve hücre hatlarında apoptozun indüksiyonunu göstermiştir (118,185,186). Mitokondriyal oksidatif strese bağlı hücre ölümünün mekanizması, OX ile indüklenen sıçanların AKG'lerinde çalışılmıştır (187).

Bununla birlikte, mitokondriyal oksidatif stres indükleyici ajanların post-mitotik nöronlardan nasıl ve ne şekilde etkilendiğinin belirlenmesi gerekmektedir. Ancak, selenyumun nöronal hücrelerde antioksidan, anti-apoptotik ve anti-inflamatuvar özellikleri vardır (4,183,186,188). Benzer şekilde nöronlarda oksidatif hasara bağlı selenyumun (189) koruyucu rolleri, ROS üretimi, MAPK/ERK aracılı apoptoz sinyali, bax ve kaspaz-3 ve -9 değerleri için apoptotik hücre ölümünü bloke ederek gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada, selektif tedavi ile azalmış olmasına rağmen, OX indüksiyonu ile AKG ve SN apoptoz, kaspaz-3 ve -9 değerleri artmıştır. Burada, selenyumun, OXPN'ye maruz kalan sıçanların AKG, SN nöronlarının yanısıra in-vitro olarak MCF-7 hücre hattında da apoptotik hücre ölümünü inhibe etmek için antioksidan ve anti-inflamatuvar özellikler ile hareket ettiğini gösterdik. Apoptotik süreç, kaspaz-3, -8 ve -9 gibi tüm kaspaz aktivitelerini içerir ancak selenyum gibi antioksidanlar kaspaz-3 ve -9 aktiviteleri üzerinde koruyucu etkilere neden olurken kaspaz-8 üzerinde etkisi görülmemiştir. (183,184). Apoptoz seviyeleri OX grubunda kontrol ve Se gruplarına göre daha yüksekti, kaspaz-3 ve -9 değerleri Se tedavileriyle kontrol seviyelerine geri getirildi. Sistein, bu proteinlerin aktivitesini modüle edebilen serbest radikaller tarafından modifikasyona yatkın olan tiyol grubunun reaktivitesinden dolayı oksidatif bir hedeftir, bu nedenle oksidasyona dayalı regülasyon için kaspaz-3 ve -9 hedefleri oluşturur (190,191). Ek olarak Se'nin, nöronlarda tiyol gruplarında modülatör

rollere sahip olmasına (192) istinaden tiyol grubu regülatör özelliklerine bağlı olarak, Se ile tedavi sonrasında kaspaz aktiviteleri ve apoptoz değerleri kontrol değerlerine geri getirilmiştir. Ek olarak, OX-kaynaklı apoptozun mekanizmasını anlamak için yapılan önceki çalışmalar, aynı zamanda, sitokrom c salınımını takiben kaspaz-3 ve -9'un aktivasyonları olan apoptozun intrinsik yolağının da rol oynadığını göstermiştir (193-195). Önceki gözlemlerle uyumlu olarak, sonuçlarımız ayrıca, OX uygulanan sıçanlardan alınan AKG ve SN nöronlarının intrinsik apoptotik yolağın aktive edildiğini ortaya koymuştur.

Bu tez çalışmasının sonuçları bağlamında, Se ile kombine kemoterapinin antikanser ilaçların doz sınırlayıcı yan etkilerinden en önemlisi olan nöropatik ağrıyı hafifletebileceğini açıkça göstermektedir. Bildiğimiz kadarıyla, kemoterapötiklerden oksaliplatin kaynaklı nöropatik ağrının TRPV1 kanalları aracılığıyla sitokin düzeyleri, kaspaz 3, kaspaz 9, apoptoz ve oksidatif stres analizleri ve Ca^{+2} sinyalizasyonu üzerine Se 'nin etkisini moleküler temelde inceleyen başka bir çalışma yoktur. Bu sonuçlar, oksaliplatin ve Se kombinasyonunun, sadece oksaliplatin kullanımına kıyasla ve apoptotik aktiviteyi azalttığı ve TRPV1 kanal aktivitelerinin modülasyonu yoluyla Ca^{+2} birikimini azalttığını açıkça göstermektedir. Bu nedenle, Se'nin oksaliplatin ile kombine kullanıldığında nöropatik ağrı gelişen periferik duyuşal nöron hücrelerinin ağrı tedavisinde değerlendirilmesi gerektiğini bizlere göstermektedir. Ayrıca in-vitro MCF-7 meme kanseri hücre hattından elde ettiğimiz sonuçlara da bakacak olursak, diğer sonuçları destekler nitelikte, TRPV1 katyon kanallarının aşırı aktivasyonu yoluyla artan hücre içi Ca^{+2} konsantrasyon değişimi ve hücre apoptozunda kalsiyum sinyalinin rolünü açığa çıkarmış olup, potansiyel tedavi olarak TRPV1 kanal inhibitörlerinin kullanılabilceğini bize göstermiştir. Mitokondriyal depolarizasyon ve ROS aktivitesi, hücre içi $[Ca^{+2}]_i$ 'a bağlıdır ve OXPN kaynaklı hücre dışı ortamdan Ca^{+2} 'un TRPV1 kanalları yoluyla aşırı düzeyde girişi sonucu tetiklenir (196).

Kapsaisin ve TRPV1 kanallarının aktivasyonu yoluyla kolorektal kanser hücrelerinde apoptoz ve oksidatif stres bildirilmiştir, bununla birlikte bir TRPV1 antagonisti olan Cpz, apoptotik ve oksidatif stres etkilerini engellemiştir (197). İki iyi bilinen apoptotik yol vardır: hücre yüzeyi ölüm reseptör bağımlı ekstrinsik yol ve mitokondriye bağımlı intrinsik yol. Bu yollara ek olarak, apoptoz, endoplazmik retikulum oksidatif stresi (ER stresi) ile indüklenir. Bu ise esasen

hücre içi serbest Ca^{+2} konsantrasyonundaki artışa neden olur (130). Se hücre içi kalsiyum artışının asıl kaynağı olan TRPV1 katyon kanalları için bir modülatör rolü sergilemiştir. Bu hücrelerde OX ile indüklenen apoptoz, kaspaz 3 ve kaspaz 9 düzeylerindeki artış, Se tarafından baskılanmış oldu. Hücrelerin Se ile muamele edilmesi neticesinde, OX ile indüklenen oksidatif toksisitenin azaldığı ve hücre canlılığının arttığı gözlenmiştir.

Redoks ajanlar TRP kanallarını doğrudan oksidatif amino asit modifikasyonu yoluyla ya da dolaylı olarak ikincil haberciler aracılığıyla aktive eder. Bu çalışmada TRPV1 kanalları kapsaisin tarafından aktive edildiğinde bu modülasyonu OX ile oluşturulan nöropatik ağrı durumunu ve Se 'nin TRPV1 aracılı etkilerini araştırmak amacıyla inceledik. OX kaynaklı nöropatik ağrı durumundaki tiyol-aktivasyonunun hücre içi etki alanı, hücre içi yerleşimli sisteinlere etki ederek olduğunu gösteren önceki çalışmalar ile tutarlıdır (198). TRPV1 kanalının oksidatif duyarlılaşması için N-terminus (199) ve C-terminus önemlidir. TRPV1 kanalları, sistein modifikasyonu yoluyla oksidatif strese sebep olan maddeler tarafından doğrudan aktive edilir. Fizyolojik olarak redoks duyarlı-TRP kanallarının aşırı aktivasyonu neticesinde artan hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu ile kaspaz kaskadlarının tetiklenmesi, apoptotik yolların aktivasyonu, pro-inflamatuvar sitokin salınımlarındaki aşırı miktardaki artış ve neticede inflamasyon ve ağrı yanıtlarına aracılık eden önemli bir rol üstlendiği ortaya çıkmaktadır. Bu durum kemoterapötiklerin kullanımıyla ortaya çıkan nöropatik ağrı durumunda da önemli çıktılar sağlamaktadır. Patofizyolojik olarak redoks duyarlı TRPV1 kanalları kemoterapi kaynaklı OXPN ve hiperaljezi ile ilişkilidir. Bu bulguların, daha önce tedavi edilemeyen OX kaynaklı periferik nöropatik ağrı için etiyolojilerin aydınlatılmasına yol açacağını tahmin ediyoruz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kemoterapötik ajanlarla tedaviyi sonrası periferel nöronlarda hücre içi anormal Ca^{+2} iyon düzeyi, kanal ekspresyon seviyelerinde artış ve ısıya karşı aşırı duyarlılık geliştiği rapor edilmiştir. Meydana gelen bu hücrenel olayların kemoterapi sonrası gelişen periferel nöropatik ağrıda rol oynadığı ifade edilmektedir. Ca^{+2} iyonuna geçirgen kanallardan biri de TRP katyon kanalları ailesinin alt üyesi olan TRPV1 olup, bu kanal 43°C sıcaklık ve kırmızı acı biberde bulunan kapsaisin molekülü gibi uyaranlarla aktive edilir. TRPV1, platin bazlı tedavi sonrası gelişen ısıl hiperaljeziden ve duyuşal nöronlardaki mekanik allodinden sorumludur. Bu tez çalışmasında kanserli hastalarda (özellikle de kolon kanserinde) yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardan biri olan OX'a maruz bırakılan sağlıklı sıçanların AKG, SN periferel nöronlarında TRPV1 kanalları aracılı periferel nöropatik ağrı gelişimi değerlendirilmiş olup Se'nin iyileşmedeki rolü ele alınmıştır. Bu durum zaten kemoterapötiklerin önde gelen doz sınırlayıcı bir yan etkisidir.

Çalışmamızı anlamlı kılan dikkat çekici özellik ise bu ağrı durumunun Se'nin TRPV1 katyon kanalları aracılığıyla etkisini moleküler tekniklerle araştıran tek çalışma olmasıdır. Çünkü OXPN'de Se'nin TRPV1 aracılı etkisi henüz çalışılmamıştır. OX'a maruz bırakılan hayvanlarda pençe çekme kuvveti ve pençe çekme eşik zamanında önemli düzeyde bir azalma tespit ettik. OX alan gruptaki hayvanlara 55 °C'de sıcak plaka (Hot-plate) ağrı testi yaptığımızda OX'un etkisiyle hayvanların ağrı eşik değerleri düştüğünden dolayı kontrol ve Se gruplarına kıyasla çok erken sürelerde ayaklarını kaçınmaya başladılar. Aynı sonuçları farklı kalınlıklardaki Von-Frey ağrı testleriyle de gözlemledik. Se ile muamele durumunda bu değerler yüksekti. Bu sıçanlardan elde edilen AKG, SN ve Hipokampus nöronal hücrelerinde aynı zamanda gruplar arası pro-aljezik sitokin düzeylerini karşılaştırdık ve neticede TNF- α , IL-1 β , IL-6 düzeylerinde OX gruplarında meydana gelen önemli düzeydeki artışın Se+OX gruplarında azaldığını gözlemledik. Bu da selenyumun OX kaynaklı ağrı düzeyini azaltmadaki rolünü ortaya koymuş oldu. Bununla birlikte genel olarak sitokin seviyeleri hücre grupları arasında kıyaslandığında periferel nöronlardaki OX kaynaklı meydana gelen sitokin salınımında, merkezi sinir sistemine (hipokampus) kıyasla önemli düzeyde bir artış gözlemlendi. Bu durum bizim

hayvanlara intraperitoneal uyguladığımız kemoterapötik ajanın (OX), periferel nöronları etkilediği bilgisini doğrulamış oldu.

Patch-clamp (yama menteşe) analizleri sonucu AKG hücrelerinde OX kaynaklı TRPV1 aşırı aktivasyonunun Se'nin etkisiyle azaldığını belirledik. Kalsiyum sinyali sonuçları da benzer şekildeydi. Apoptoz, ROS, kaspaz 3, kaspaz 9 ve JC-1 sonuçları da diğer tüm sonuçları destekler nitelikte OX ile artan apoptoz Se etkisiyle azaldı. Hücre kültürü sonuçları da deney hayvanları çalışma sonuçlarını destekler nitelikteydi. Tüm bu çalışma sonuçlarıyla birlikte OXPN'nin mekanizmaya dayalı tedavisi için öneriler incelenecek olursa, geliştirilecek ilaçların, oksaliplatin'in neden olduğu OXPN'ye karşı iyon kanalları odaklı nöroprotektif, anti-inflamatuvar maddelerin kombinasyonunu içermesi gerektiği anlaşılmaktadır. Geliştirilecek olan bu ilaç kesinlikle Se ihtiva etmeli ve ilk defa duyuşal nöronlarda keşfedilmiş olan TRPV1 kanallarını modüle edecek şekilde dizayn etmelidir. Özetle, verilerimiz ilk kez, OXPN mekanizmalarının, AKG ve SN'de mitokondriyal ROS, apoptoz ve ağrı indükleyerek TRPV1 kanalları yoluyla aracılık edilebileceğini öne sürdü. Bununla birlikte, OXPN'nin ağrı, oksidan ve apoptotik etkileri, Se tedavisi ile nöronlarda TRPV1'in bloke edilmesiyle tersine çevrildi. Bu nedenle, Se'nin kullanımı OX kaynaklı ağrı, mitokondriyal oksidatif stres ve apoptozis tedavisinde etkili bir yeni yaklaşım olabilir. Ek olarak, TRPV1 kanalları OX kaynaklı apoptoz ve periferel ağrının tedavisinde önemli farmakolojik hedefler olabilir.

ÖZET

OKSALİPLATİNİN NEDEN OLDUĞU NÖROPATİK AĞRI VE TRPV1 KANAL AKTİVASYONU ÜZERİNDE SELENYUMUN KORUYUCU ETKİSİNİN SIÇAN VE HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA MOLEKÜLER TEKNİKLERLE ARAŞTIRILMASI

Nöropatik ağrı için onaylanan birçok ilaç, oksaliplatin (OX) kaynaklı nöropatik ağrı tedavisinde yeterince etki göstermemektedir. OX ile ilişkili nörotoksositeye, hücre içi kalsiyum düzeyi artışı, apoptoz ve oksidatif stresin aracılık ettiği bildirilmesine rağmen, bu değerler üzerinde selenyumun (Se) koruyucu etkisi henüz yeterince bilinmemektedir. Bu nedenle, bu tez çalışmada, Se uygulamasının, OX kaynaklı nöropatik ağrılı sıçanların periferik nöronlarında (AKG, SN) ve hücre kültürü ortamında (MCF-7) oksidatif stres, apoptoz, ROS, mitokondriyal zar depolarizasyonu (JC-1), TRPV1 kanal aktivasyonu üzerindeki etkileri araştırıldı.

Bu çalışmada 40 yetişkin wistar albino sıçan Kontrol, Se, OX, OX+Se olarak 4 gruba ayrıldı. Sıçanlara OX (haftada iki kez 4 mg/kg) ve Se (gün aşırı 1,5 mg/kg) intraperitoneal olarak 4 hafta süreyle uygulandı. Hücre kültürü çalışmada da aynı gruplarda, MCF-7 meme kanseri hücreleri OX (24 saat süreyle 50 µM) ve Se (2 saat süreyle 200 nm) ile inkübe edildi.

Hem in-vivo hem de in-vitro sitozolik serbest kalsiyum, apoptoz, JC-1, oksidatif stres seviyeleri ve kaspaz-3 ve -9 aktiviteleri OX grubunda kontrole göre daha yüksekti. Sıçanlarda ağrı (Von-Frey ve Hot-plate) testlerinde OX grubunda pençe çekme eşik kuvveti ve eşik zamanında, TNF-alfa, IL-1 beta ve IL-6 düzeylerinde kontrole kıyasla yükselme gözlemlendi. Bu yükselen değerlerin Se uygulamaları ile azaldığı gözlemlendi.

Sonuç olarak, Se'nin, in-vivo ve in-vitro bu ağrı modellerinde TRPV1 kanal aktivasyonu yoluyla oksidatif stres, apoptoz ve kalsiyum girişi üzerinde koruyucu etkileri olduğunu gözlemledik. Bu sonuçlar, OX'un neden olduğu nöropatik ağrıyı önlemek için potansiyel ilaç geliştirme kaynağı olabilir.

Anahtar kelimeler: Apoptoz; Oksaliplatin; Periferik Ağrı; Selenyum; Oksidatif stres; Interlökin; TRPV1.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF SELENIUM ON OXALIPLATIN INDUCED NEUROPATHIC PAIN AND TRPV1 CHANNEL ACTIVATION BY MOLECULAR TECHNIQUES IN RAT AND CELL CULTURE MEDIUM.

Many drugs already approved in the treatment of neuropathic pain have failed in the oxaliplatin (OX)-induced peripheral neuropathic pain. Dorsal root ganglion (DRG) and sciatic nerve (SN) have main role for induction of the pain. Increase of intracellular calcium, apoptosis, intracellular reactive oxygen species (ROS) production, mitochondrial membrane depolarization (JC1) and cytokine levels were reported in the DRG and SN of OX-treated human and animals, although protective effects of selenium (Se) on the levels have not been clarified yet. We aimed to investigate protective effects of TRPV1 channel activation, JC1, ROS, apoptosis, cytokine production and pain intensity levels in DRG and SN of OX-treated rat and MCF-7 breast cancer cells

In this study, 40 adult Wistar albino rats were divided into 4 groups as Control, Se, OX, OX + Se. OX (4 mg/kg twice a week) and Se (1.5 mg / kg every other day) were administered intraperitoneally to rats for 4 weeks. In the cell culture study, MCF-7 cells were incubated with OX (50 μ M for 24 h) and Se (200 nM for 2 h) in the same groups. Both in vivo and in vitro cytosolic free calcium, apoptosis, ROS, JC1 and cytokine (TNF- α , IL-1 β and IL-6) levels, and caspase-3 and -9 activities were higher in the OX group than in the control. However, the levels were decreased in the rats by the Se treatment. In the pain tests (Von-Frey and Hot-plate), mechanic and heat peripheral pain sensitivity values were increased by OX treatment, although the values were decreased by the Se treatment.

In conclusion, we observed that Se induced neuroprotective effects against oxidative stress, apoptosis, inflammation, calcium entry through TRPV1 activation and pain sensitivity in the OX-treated rats and MCF-7 cells. Se may potential drug for treatment of OX-induced neuropathic pain.

Keywords; Apoptosis; Oxaliplatin; Peripheral Pain; Selenium; Oxidative stress; Interleukin; TRPV1.

KAYNAKLAR

1. Sprowl JA, Ciarimboli G, Lancaster CS, Giovinazzo H, Gibson AA, Du G, Janke LJ, Cavaletti G, Shields AF, Sparreboom A. Oxaliplatin-induced neurotoxicity is dependent on the organic cation transporter OCT2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 2;110(27):11199-204.
2. Sisignano M, Baron R, Scholich K, Geisslinger G. Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain. *Nat Rev Neurol*. 2014 Dec;10(12):694-707.
3. Jaggi AS, Singh N. Therapeutic targets for the management of peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2011 Aug;10(5):589-609.
4. Naziroglu M. Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress-induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem Res*. 2009 Dec;34(12):2181-91.
5. Kahya MC, Naziroglu M, Övey İS. Modulation of Diabetes-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Ca(2+) Entry Through TRPM2 and TRPV1 Channels in Dorsal Root Ganglion and Hippocampus of Diabetic Rats by Melatonin and Selenium. *Mol Neurobiol*. 2017 Apr;54(3):2345-2360.
6. Ji XT, Qian NS, Zhang T, Li JM, Li XK, Wang P, Zhao DS, Huang G, Zhang L, Fei Z, Jia D, Niu L. Spinal astrocytic activation contributes to mechanical allodynia in a rat chemotherapy-induced neuropathic pain model. *PLoS One*. 2013 Apr 9;8(4):e60733.
7. Peters CM, Jimenez-Andrade JM, Kuskowski MA, Ghilardi JR, Mantyh PW. An evolving cellular pathology occurs in dorsal root ganglia, peripheral nerve and spinal cord following intravenous administration of paclitaxel in the rat. *Brain Res*. 2007 Sep 7;1168:46-59.
8. Pachman DR, Barton DL, Watson JC, Loprinzi CL. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 Sep;90(3):377-87.
9. Loprinzi CL, Maddocks-Christianson K, Wolf SL, Rao RD, Dyck PJ, Mantyh P, Dyck PJ. The Paclitaxel acute pain syndrome: sensitization of nociceptors as the putative mechanism. *Cancer J*. 2007 Nov-Dec;13(6):399-403.
10. Grisold W, Cavaletti G, Windebank AJ. Peripheral neuropathies from chemotherapeutics and targeted agents: diagnosis, treatment, and prevention. *Neuro Oncol*. 2012 Sep;14 Suppl 4:iv45-54.
11. Argyriou AA, Bruna J, Marmiroli P, Cavaletti G. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): an update. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012 Apr;82(1):51-77.
12. Park SB, Krishnan AV, Lin CS, Goldstein D, Friedlander M, Kiernan MC. Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies. *Curr Med Chem*. 2008;15(29):3081-94.
13. Materazzi S, Fusi C, Benemei S, Pedretti P, Patacchini R, Nilus B, Prenen J, Creminon C, Geppetti P, Nassini R. TRPA1 and TRPV4 mediate

- paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. *Pflugers Arch*. 2012 Apr;463(4):561-9.
14. Hershman DL, Lacchetti C, Dworkin RH, Lavoie Smith EM, Bleeker J, Cavaletti G, Chauhan C, Gavin P, Lavino A, Lustberg MB, Paice J, Schneider B, Smith ML, Smith T, Terstriep S, Wagner-Johnston N, Bak K, Loprinzi CL; American Society of Clinical Oncology. Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol*. 2014 Jun 20;32(18):1941-67.
 15. Wolf S, Barton D, Kottschade L, Grothey A, Loprinzi C. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. *Eur J Cancer*. 2008 Jul;44(11):1507-15.
 16. Connelly E, Markman M, Kennedy A, Webster K, Kulp B, Peterson G, Belinson J. Paclitaxel delivered as a 3-hr infusion with cisplatin in patients with gynecologic cancers: unexpected incidence of neurotoxicity. *Gynecol Oncol*. 1996 Aug;62(2):166-8.
 17. Dougherty PM, Cata JP, Cordella JV, Burton A, Weng HR. Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients. *Pain*. 2004 May;109(1-2):132-42.
 18. Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudhry V, Arbuck SG, Donehower RC. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Semin Oncol*. 1993 Aug;20(4 Suppl 3):1-15.
 19. Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol*. 1998 Apr;25(2 Suppl 5):4-12.
 20. Pasetto LM, D'Andrea MR, Rossi E, Monfardini S. Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006 Aug;59(2):159-68.
 21. Gamelin L, Capitain O, Morel A, Dumont A, Traore S, Anne le B, Gilles S, Boisdron-Celle M, Gamelin E. Predictive factors of oxaliplatin neurotoxicity: the involvement of the oxalate outcome pathway. *Clin Cancer Res*. 2007 Nov 1;13(21):6359-68.
 22. Sakurai M, Egashira N, Kawashiri T, Yano T, Ikesue H, Oishi R. Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat: involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. *Pain*. 2009 Dec 15;147(1-3):165-74.
 23. Anand U, Otto WR, Anand P. Sensitization of capsaicin and icilin responses in oxaliplatin treated adult rat DRG neurons. *Mol Pain*. 2010 Nov 24;6:82.
 24. Deuis JR, Zimmermann K, Romanovsky AA, Possani LD, Cabot PJ, Lewis RJ, Vetter I. An animal model of oxaliplatin-induced cold allodynia reveals a crucial role for Nav1.6 in peripheral pain pathways. *Pain*. 2013 Sep;154(9):1749-57.
 25. Jaggi AS, Singh N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. *Toxicology*. 2012 Jan 27;291(1-3):1-9.
 26. Siau C, Xiao W, Bennett GJ. Paclitaxel- and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells. *Exp Neurol*. 2006 Oct;201(2):507-14.

27. Devor, M., Seltzer, Z., 1999. Pathophysiology of damaged nerves in relation to chronic pain. In: Wall, P.D., Melzack, R., Textbook of Pain. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 129–164.
28. McCarthy BG, Hsieh ST, Stocks A, Hauer P, Macko C, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC. Cutaneous innervation in sensory neuropathies: evaluation by skin biopsy. *Neurology*. 1995 Oct;45(10):1848-55.
29. Ochoa JL, Yarnitsky D. The triple cold syndrome. Cold hyperalgesia, cold hypoaesthesia and cold skin in peripheral nerve disease. *Brain*. 1994 Feb;117 (Pt1):185-97.
30. Polomano RC, Mannes AJ, Clark US, Bennett GJ. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain*. 2001 Dec;94(3):293-304.
31. Bouillot S, Martin-Négrier ML, Vital A, Ferrer X, Lagueny A, Vincent D, Coquet M, Orgogozo JM, Bloch B, Vita C. Peripheral neuropathy associated with mitochondrial disorders: 8 cases and review of the literature. *J Peripher Nerv Syst*. 2002 Dec;7(4):213-20.
32. Shishkin V, Potapenko E, Kostyuk E, Girnyk O, Voitenko N, Kostyuk P. Role of mitochondria in intracellular calcium signaling in primary and secondary sensory neurones of rats. *Cell Calcium*. 2002 Sep;32(3):121-30.
33. Flatters SJ, Bennett GJ. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. *Pain*. 2006 Jun;122(3):245-57.
34. André N, Braguer D, Brasseur G, Gonçalves A, Lemesle-Meunier D, Guise S, Jordan MA, Briand C. Paclitaxel induces release of cytochrome c from mitochondria isolated from human neuroblastoma cells'. *Cancer Res*. 2000 Oct 1;60(19):5349-53.
35. Han Y, Smith MT. Pathobiology of cancer chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN). *Front Pharmacol*. 2013 Dec 18;4:156.
36. Xiao W, Boroujerdi A, Bennett GJ, Luo ZD. Chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy: analgesic effects of gabapentin and effects on expression of the alpha-2-delta type-1 calcium channel subunit. *Neuroscience*. 2007 Jan 19;144(2):714-20.
37. Sun X, Windebank AJ. Calcium in suramin-induced rat sensory neuron toxicity in vitro. *Brain Res*. 1996 Dec 2;742(1-2):149-56.
38. Matsumoto M, Inoue M, Hald A, Xie W, Ueda H. Inhibition of paclitaxel-induced A-fiber hypersensitization by gabapentin. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Aug;318(2):735-40.
39. Kidd JF, Pilkington MF, Schell MJ, Fogarty KE, Skepper JN, Taylor CW, Thorn P. Paclitaxel affects cytosolic calcium signals by opening the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*. 2002 Feb 22;277(8):6504-10.
40. Kaur G, Jaggi AS, Singh N. Exploring the potential effect of *Ocimum sanctum* in vincristine-induced neuropathic pain in rats. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*. 2010 Jan 25;5:3.
41. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.
42. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):205-19.

43. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6.
44. Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist*. 2006 Apr;11(4):342-57.
45. Cavaletti G, Fabbri D, Minoia C, Frattola L, Tredici G. Carboplatin toxic effects on the peripheral nervous system of the rat. *Ann Oncol*. 1998 Apr;9(4):443-7.
46. Carozzi VA, Canta A, Chiorazzi A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? *Neurosci Lett*. 2015 Jun 2;596:90-107.
47. Price CJ, Hoyda TD, Ferguson AV. The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state. *Neuroscientist*. 2008 Apr;14(2):182-94.
48. Lo Monaco M, Milone M, Batocchi AP, Padua L, Restuccia D, Tonali P. Cisplatin neuropathy: clinical course and neurophysiological findings. *J Neurol*. 1992 Apr;239(4):199-204.
49. Albers JW, Chaudhry V, Cavaletti G, Donehower RC. Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Mar 31;(3):CD005228.
50. Ta LE, Espeset L, Podratz J, Windebank AJ. Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding. *Neurotoxicology*. 2006 Dec;27(6):992-1002.
51. Rutkove SB. Effects of temperature on neuromuscular electrophysiology. *Muscle Nerve*. 2001 Jul;24(7):867-82.
52. Norcini M, Vivoli E, Galeotti N, Bianchi E, Bartolini A, Ghelardini C. Supraspinal role of protein kinase C in oxaliplatin-induced neuropathy in rat. *Pain*. 2009 Nov;146(1-2):141-7.
53. Cortright DN, Krause JE, Broom DC. TRP channels and pain. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1772(8):978-88. Epub 2007 Mar 19.
54. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997 Oct 23;389(6653):816-24.
55. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4(4):307-20.
56. Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A. Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci*. 2006;29:135-61.
57. Grant AD, Cottrell GS, Amadesi S, Trevisani M, Nicoletti P, Materazzi S, Altier C, Cenac N, Zamponi GW, Bautista-Cruz F, Lopez CB, Joseph EK, Levine JD, Liedtke W, Vanner S, Vergnolle N, Geppetti P, Bunnnett NW. Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. *J Physiol*. 2007 Feb 1;578(Pt 3):715-33.
58. Rohacs T, Lopes CM, Michailidis I, Logothetis DE. PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci*. 2005 May;8(5):626-34.
59. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 1998 Sep;21(3):531-43.
60. Crandall M, Kwash J, Yu W, White G. Activation of protein kinase C sensitizes human VR1 to capsaicin and to moderate decreases in pH at

- physiological temperatures in *Xenopus* oocytes. *Pain*. 2002 Jul;98(1-2):109-17.
61. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. 2000 Jun 9;288(5472):1765-9.
 62. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:619-47.
 63. Mazario J, Basbaum AI. Contribution of substance P and neurokinin A to the differential injury-induced thermal and mechanical responsiveness of lamina I and V neurons. *J Neurosci*. 2007 Jan 24;27(4):762-70.
 64. Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Jan;8(1):55-68.
 65. Ta LE, Bieber AJ, Carlton SM, Loprinzi CL, Low PA, Windebank AJ. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. *Mol Pain*. 2010 Mar 5;6:15.
 66. Alessandri-Haber N, Dina OA, Joseph EK, Reichling DB, Levine JD. Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. *J Neurosci*. 2008 Jan 30;28(5):1046-57.
 67. Gauchan P, Andoh T, Kato A, Kuraishi Y. Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci Lett*. 2009 Jul 17;458(2):93-5.
 68. Marino SM, Gladyshev VN. Analysis and functional prediction of reactive cysteine residues. *J Biol Chem*. 2012 Feb 10;287(7):4419-25.
 69. Marino SM, Gladyshev VN. Cysteine function governs its conservation and degeneration and restricts its utilization on protein surfaces. *J Mol Biol*. 2010 Dec 17;404(5):902-16.
 70. Szallasi A, Blumberg PM. [³H] resiniferatoxin binding by the vanilloid receptor: species-related differences, effects of temperature and sulfhydryl reagents. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1993 Jan;347(1):84-91.
 71. Ogawa N, Kurokawa T, Mori Y. Sensing of redox status by TRP channels. *Cell Calcium*. 2016 Aug;60(2):115-22.
 72. Ji RR, Xu ZZ, Strichartz G, Serhan CN. Emerging roles of resolvins in the resolution of inflammation and pain. *Trends Neurosci*. 2011 Nov;34(11):599-609.
 73. Xu ZZ, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Yang R, Serhan CN, Ji RR. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nat Med*. 2010 May;16(5):592-7.
 74. Taberner FJ, Fernández-Ballester G, Fernández-Carvajal A, Ferrer-Montiel A. TRP channels interaction with lipids and its implications in disease. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Sep;1848(9):1818-27.
 75. Tsujino H, Kondo E, Fukuoka T, Dai Y, Tokunaga A, Miki K, Yonenobu K, Ochi T, Noguchi K. Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Mol Cell Neurosci*. 2000 Feb;15(2):170-82.
 76. Serhan CN, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park CK, Xu ZZ, Ji RR, Zhu M, Petasis NA. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *FASEB J*. 2012 Apr;26(4):1755-65.

77. Bast A, Haenen GR. Ten misconceptions about antioxidants. *Trends Pharmacol Sci.* 2013 Aug;34(8):430-6.
78. Kim HK, Zhang YP, Gwak YS, Abdi S. Phenyl N-tert-butyl nitron, a free radical scavenger, reduces mechanical allodynia in chemotherapy-induced neuropathic pain in rats. *Anesthesiology.* 2010 Feb;112(2):432-9.
79. Hershman DL, Unger JM, Crew KD, Minasian LM, Awad D, Moinpour CM, Hansen L, Lew DL, Greenlee H, Fehrenbacher L, Wade JL 3rd, Wong SF, Hortobagyi GN, Meyskens FL, Albain KS. Randomized double-blind placebo-controlled trial of acetyl-L-carnitine for the prevention of taxane-induced neuropathy in women undergoing adjuvant breast cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2013 Jul 10;31(20):2627-33.
80. Guo Y, Jones D, Palmer JL, Forman A, Dakhil SR, Velasco MR, Weiss M, Gilman P, Mills GM, Noga SJ, Eng C, Overman MJ, Fisch MJ. Oral alpha-lipoic acid to prevent chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Support Care Cancer.* 2014 May;22(5):1223-31.
81. Arrieta Ó, Hernández-Pedro N, Fernández-González-Aragón MC, Saavedra-Pérez D, Campos-Parra AD, Ríos-Trejo MÁ, Cerón-Lizárraga T, Martínez-Barrera L, Pineda B, Ordóñez G, Ortiz-Plata A, Granados-Soto V, Sotelo J. Retinoic acid reduces chemotherapy-induced neuropathy in an animal model and patients with lung cancer. *Neurology.* 2011 Sep 6;77(10):987-95.
82. Yin S, Luo J, Qian A, Du J, Yang Q, Zhou S, Yu W, Du G, Clark RB, Walters ET, Carlton SM, Hu H. Retinoids activate the irritant receptor TRPV1 and produce sensory hypersensitivity. *J Clin Invest.* 2013 Sep;123(9):3941-51.
83. Coriat R, Alexandre J, Nicco C, Quinquis L, Benoit E, Chéreau C, Lemaréchal H, Mir O, Borderie D, Tréluyer JM, Weill B, Coste J, Goldwasser F, Batteux F. Treatment of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by intravenous mangafodipir. *J Clin Invest.* 2014 Jan;124(1):262-72.
84. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2008 Mar;47(2):147-55.
85. Amara S. Oral glutamine for the prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Ann Pharmacother.* 2008 Oct;42(10):1481-5.
86. Grolleau F, Gamelin L, Boisdron-Celle M, Lapied B, Pelhate M, Gamelin E. A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J Neurophysiol.* 2001 May;85(5):2293-7.
87. Ishibashi K, Okada N, Miyazaki T, Sano M, Ishida H. Effect of calcium and magnesium on neurotoxicity and blood platinum concentrations in patients receiving mFOLFOX6 therapy: a prospective randomized study. *Int J Clin Oncol.* 2010 Feb;15(1):82-7.
88. Saif MW, Reardon J. Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Ther Clin Risk Manag.* 2005 Dec;1(4):249-58.
89. Sayin VI, Ibrahim MX, Larsson E, Nilsson JA, Lindahl P, Bergo MO. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Sci Transl Med.* 2014 Jan 29;6(221):221ra15.
90. Park SB, Goldstein D, Krishnan AV, Lin CS, Friedlander ML, Cassidy J, Koltzenburg M, Kiernan MC. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: a critical analysis. *CA Cancer J Clin.* 2013 Nov-Dec;63(6):419-37.

91. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 1973 Feb 9;179(4073):588-90.
92. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet*. 2000 Jul 15;356(9225):233-41.
93. Meuillet E, Stratton S, Prasad Cherukuri D, Goulet AC, Kagey J, Porterfield B, Nelson MA. Chemoprevention of prostate cancer with selenium: an update on current clinical trials and preclinical findings. *J Cell Biochem*. 2004 Feb 15;91(3):443-58.
94. Spallholz JE. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radic Biol Med*. 1994 Jul;17(1):45-64.
95. Spallholz JE, Boylan LM, Larsen HS. Advances in understanding selenium's role in the immune system. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;587:123-39.
96. Barrington JW, Lindsay P, James D, Smith S, Roberts A. Selenium deficiency and miscarriage: a possible link? *Br J Obstet Gynaecol*. 1996 Feb;103(2):130-2
97. Scott R, MacPherson A, Yates RW, Hussain B, Dixon J. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *Br J Urol*. 1998 Jul;82(1):76-80.
98. Hawkes WC, Hornbostel L. Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit. *Biol Psychiatry*. 1996 Jan 15;39(2):121-8.
99. Brtkova A, Brtko J. Selenium: metabolism and endocrines (Minireview). *Endocr Regul*. 1996 Sep;30(3):117-128.
100. Kardinaal AF, Kok FJ, Kohlmeier L, Martin-Moreno JM, Ringstad J, Gómez-Aracena J, Mazaev VP, Thamm M, Martin BC, Aro A, Kark JD, Delgado-Rodriguez M, Riemersma RA, van't Veer P, Huttunen JK. Association between toenail selenium and risk of acute myocardial infarction in European men. The EURAMIC Study. *European Antioxidant Myocardial Infarction and Breast Cancer*. *Am J Epidemiol*. 1997 Feb 15;145(4):373-9.
101. Knekt P, Heliövaara M, Aho K, Alfthan G, Marniemi J, Aromaa A. Serum selenium, serum alpha-tocopherol, and the risk of rheumatoid arthritis. *Epidemiology*. 2000 Jul;11(4):402-5.
102. Shiobara Y, Yoshida T, Suzuki KT. Effects of dietary selenium species on Se concentrations in hair, blood, and urine. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998 Oct;152(2):309-14.
103. Letavayová L, Vlcková V, Brozmanová J. Selenium: from cancer prevention to DNA damage. *Toxicology*. 2006 Oct 3;227(1-2):1-14.
104. Lu J, Jiang C, Kaeck M, Ganther H, Vadhanavikit S, Ip C, Thompson H. Dissociation of the genotoxic and growth inhibitory effects of selenium. *Biochem Pharmacol*. 1995 Jul 17;50(2):213-9.
105. Hsieh HS, Ganther HE. Acid-volatile selenium formation catalyzed by glutathione reductase. *Biochemistry*. 1975 Apr 22;14(8):1632-6.
106. Tanaka T, Reddy BS, el-Bayoumy K. Inhibition by dietary organoselenium, p-methoxybenzene-selenol of hepatocarcinogenesis induced by azoxymethane in rats. *Jpn J Cancer Res*. 1985 Jun;76(6):462-7.
107. Hatfield DL, Gladyshev VN. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol*. 2002 Jun;22(11):3565-76.

108. Foster, S.J., Kraus, R.J., Ganther, H.E., 1986. The metabolism of selenomethionine, Se-methylselenocysteine, their selenonium derivatives, and trimethylselenonium in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 251, 77–86.
109. El-Bayoumy, K., Sinha, R., 2004. Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds. *Mutat. Res.* 551, 181–197.
110. Itoh, M., Suzuki, K.T., 1997. Effects of dose on the methylation of selenium to monomethylselenol and trimethylselenonium ion in rats. *Arch. Toxicol.* 71, 461–466.
111. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J., 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 266, 37–56.
112. Davies, K.J.A., 1994. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 1–31.
113. Combs Jr., G.F., Gray, W.P., 1998. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol. Ther.* 79, 179–192.
114. Madeja, Z., Sroka, J., Nystrom, C., Bjorkhem-Bergman, L., Nordman, T., Damdimopoulos, A., Nalvarte, I., Eriksson, L.C., Spyrou, G., Olsson, J.M., Bjornstedt, M., 2005. The role of thioredoxin reductase activity in selenium-induced cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 69, 1765–1772.
115. Xia, Y., Hill, K.E., Byrne, D.W., Xu, J., Burk, R.F., 2005. Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of China. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 829–834.
116. Rayman, M.P., 2005. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc. Nutr. Soc.* 64, 527–542.
117. Miller S, Walker SW, Arthur JR, Nicol F, Pickard K, Lewin MH, et al. Selenite protects human endothelial cells from oxidative damage and induces thioredoxin reductase. *Clin Sci (Lond)* 2001;100(5):543–50.
118. Uğuz AC, Nazıroğlu M. Effects of selenium on calcium signaling and apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons induced by oxidative stress. *Neurochem Res.* 2012 Aug;37(8):1631-8.
119. Erken HA, Koç ER, Yazıcı H, Yay A, Önder GÖ, Sarıcı SF. Selenium partially prevents cisplatin induced neurotoxicity: preliminary study. *Neurotoxicology.* 2014 May;42:71-5.
120. Fontelles CC, Ong TP. Selenium and Breast Cancer Risk: Focus on Cellular and Molecular Mechanisms. *Adv Cancer Res.* 2017;136:173-192.
121. Weber GF, Maertens P, Meng XZ, Pippenger CE. Glutathione peroxidase deficiency and childhood seizures. *Lancet.* 1991 Jun 15;337(8755):1443-4.
122. Schweizer U, Brauer AU, Koehler J, Nitsch R, Savaskan NE (2004) Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res Rev* 45:164–178
123. Sanz-Medel A, Montes-Bayón M, Luisa Fernández Sánchez M. Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics. *Anal Bioanal Chem.* 2003 Sep;377(2):236-47.
124. Wirth EK, Conrad M, Winterer J et al (2010) Neuronal seleno-protein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. *FASEB J* 24:844–852
125. McKenzie RC, Arthur JR, Beckett GJ (2002) Selenium and the regulation of cell signaling, growth, and survival: molecular and mechanistic aspects. *Antioxid Redox Signal* 4:339–351

126. Nazıroğlu M Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress-induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem Res* 2009 34:2181–2191
127. Nazıroğlu M, Karaoğlu A, Aksoy AO. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology*. 2004 Feb 15;195(2-3):221-30.
128. Fujita S, Ushio S, Ozawa N, Masuguchi K, Kawashiri T, Oishi R, Egashira N. Exenatide Facilitates Recovery from Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Rats. *PLoS One*. 2015 Nov 4;10(11):e0141921.
129. Martelli L, Ragazzi E, Di Mario F, Basato M, Martelli M. Cisplatin and oxaliplatin cytotoxic effects in sensitive and cisplatin-resistant human cervical tumor cells: time and mode of application dependency. *Anticancer Res*. 2009 Oct;29(10):3931-7.
130. Yüksel E, Nazıroğlu M, Şahin M, Çiğ B. Involvement of TRPM2 and TRPV1 channels on hyperalgesia, apoptosis and oxidative stress in rat fibromyalgia model: Protective role of selenium. *Sci Rep*. 2017 Dec 13;7(1):17543.
131. Dogrul, A., Gul, H., Yesilyurt, O., Ulas, U. H. Yildiz, O. Systemic and spinal administration of etanercept, a tumor necrosis factor alpha inhibitor, blocks tactile allodynia in diabetic mice. *Acta Diabetol*. 48, 135–142 (2011).
132. Akpınar H, Nazıroğlu M, Övey İS, Çiğ B, Akpınar O. The neuroprotective action of dexmedetomidine on apoptosis, calcium entry and oxidative stress in cerebral ischemia-induced rats: Contribution of TRPM2 and TRPV1 channels. *Sci Rep*. 2016 Nov 22;6:37196.
133. Ghazizadeh V, Nazıroğlu M. Electromagnetic radiation (Wi-Fi) and epilepsy induce calcium entry and apoptosis through activation of TRPV1 channel in hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Metab Brain Dis*. 2014 Sep;29(3):787-99.
134. Çiğ B, Nazıroğlu M. Investigation of the effects of distance from sources on apoptosis, oxidative stress and cytosolic calcium accumulation via TRPV1 channels induced by mobile phones and Wi-Fi in breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Oct;1848(10 Pt B):2756-65.
135. Nazıroğlu M, Sahin M, Ciğ B, Aykur M, Erturan I, Ugan Y. Hypericum perforatum modulates apoptosis and calcium mobilization through voltage-gated and TRPM2 calcium channels in neutrophil of patients with Behcet's disease. *J Membr Biol*. 2014 Mar;247(3):253-62.
136. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985 Mar 25;260(6):3440-50.
137. Nazıroğlu M. Activation of TRPM2 and TRPV1 Channels in Dorsal Root Ganglion by NADPH Oxidase and Protein Kinase C Molecular Pathways: a Patch Clamp Study. *J Mol Neurosci*. 2017 Mar;61(3):425-435.
138. Nazıroğlu M, Övey İS. Involvement of apoptosis and calcium accumulation through TRPV1 channels in neurobiology of epilepsy. *Neuroscience*. 2015 May 7;293:55-66.
139. Sakallı Çetin E, Nazıroğlu M, Çiğ B, Övey İS, Aslan Koşar P. Selenium potentiates the anticancer effect of cisplatin against oxidative stress and calcium ion signaling-induced intracellular toxicity in MCF-7 breast cancer cells: involvement of the TRPV1 channel. *J Recept Signal Transduct Res*. 2017 Feb;37(1):84-93.

140. Demirci K et al. Selenium attenuates apoptosis, inflammation and oxidative stress in the blood and brain of aged rats with scopolamine-induced dementia. *Metab Brain Dis* 2017; 32: 321–329.
141. Li QY, Xu HY, Yang HJ. [Effect of proinflammatory factors TNF- α , IL-1 β , IL-6 on neuropathic pain]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2017 Oct;42(19):3709-3712.
142. Donzelli E, Carf¹ M, Miloso M, Strada A, Galbiati S, Cavaletti G, et al. Neurotoxicity of platinum compounds: comparison of the effects of cisplatin and oxaliplatin on the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Neuro-Oncol* 2004;67(1–2):65–73.
143. Cavaletti G, Tredici G, Petruccioli MG, Donde E, Tredici P, Marmiroli P, et al. Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat. *Eur J Cancer* 2001;37(18):2457–63.
144. Fischer SJ, McDonald ES, Gross L, Windebank AJ. Alterations in cell cycle regulation underlie cisplatin induced apoptosis of dorsal root ganglion neurons in vivo. *Neurobiol Dis* 2001;8(6):1027–35.
145. McDonald ES, Randon KR, Knight A, Windebank AJ. Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: a potential mechanism for neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 2005;18(2):305–13.
146. Smith EM, Pang H, Cirrincione C, Fleishman S, Paskett ED, Ahles T, Bressler LR, Fadul CE, Knox C, Le-Lindqwister N, Gilman PB, Shapiro CL; Alliance for Clinical Trials in Oncology. Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2013 Apr 3;309(13):1359-67.
147. Ji, R. R., Xu, Z. Z. Gao, Y. J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2014 13, 533–548.
148. Park SB, Kiernan MC. Oxaliplatin and neuropathy: A role for sodium channels. *Clin Neurophysiol*. 2018 Mar;129(3):670-671.
149. Weidner K, Behnes M, Haas J, Rusnak J, Fuerner P, Kuska M, Mukherji A, Borggreffe M, Hofheinz RD, Akin I. Oxaliplatin-Induced Acute ST Segment Elevation Mimicking Myocardial Infarction: A Case Report. *Oncol Res Treat*. 2018;41(1-2):52-56.
150. Liu X, Gao Y, Li D, Liu C, Jin M, Bian J, Lv M, Sun Y, Zhang L, Gao P. The neuroprotective and antioxidant profiles of selenium-containing polysaccharides from the fruit of *Rosa laevigata*. *Food Funct*. 2018 Mar 1;9(3):1800-1808.
151. Martini F, Pesarico AP, Brüning CA, Zeni G, Nogueira CW. Ebselen inhibits the activity of acetylcholinesterase globular isoform G4 in vitro and attenuates scopolamine-induced amnesia in mice. *J Cell Biochem*. 2018 Feb 5.
152. Lu YX, Wu QN, Chen DL, Chen LZ, Wang ZX, Ren C, Mo HY, Chen Y, Sheng H, Wang YN, Wang Y, Lu JH, Wang DS, Zeng ZL, Wang F, Wang FH, Li YH, Ju HQ, Xu RH. Pharmacological Ascorbate Suppresses Growth of Gastric Cancer Cells with GLUT1 Overexpression and Enhances the Efficacy of Oxaliplatin Through Redox Modulation. *Theranostics*. 2018 Feb 2;8(5):1312-1326.
153. Pelosof L, Yerram S, Armstrong T, Chu N, Danilova L, Yanagisawa B, Hidalgo M, Azad N, Herman JG. GPX3 promoter methylation predicts

- platinum sensitivity in colorectal cancer. *Epigenetics*. 2017 Jul 3;12(7):540-550.
154. Waseem M, Tabassum H, Parvez S. Neuroprotective effects of melatonin as evidenced by abrogation of oxaliplatin induced behavioral alterations, mitochondrial dysfunction and neurotoxicity in rat brain. *Mitochondrion*. 2016 Sep; 30:168-76.
 155. Sorensen JC, Petersen AC, Timpani CA, Campelj DG, Cook J, Trewin AJ, Stojanovska V, Stewart M, Hayes A, Rybalka E. BGP-15 Protects against Oxaliplatin-Induced Skeletal Myopathy and Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Mice. *Front Pharmacol*. 2017 Apr 10;8:137.
 156. Wu WJ, Zhang Y, Zeng ZL, Li XB, Hu KS, Luo HY, Yang J, Huang P, Xu RH. β -phenylethyl isothiocyanate reverses platinum resistance by a GSH-dependent mechanism in cancer cells with epithelial-mesenchymal transition phenotype. *Biochem Pharmacol*. 2013 Feb 15;85(4):486-96.
 157. Kim ST, Chung YH, Lee HS, Chung SJ, Lee JH, Sohn UD, Shin YK, Park ES, Kim HC, Bang JS, Jeong JH. Protective effects of phosphatidylcholine on oxaliplatin-induced neuropathy in rats. *Life Sci*. 2015 Jun 1;130:81-7.
 158. Naziroglu M, Karaoğlu A, Aksoy AO. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology*. 2004 Feb 15;195(2-3):221-30.
 159. Ferrier J, Bayet-Robert M, Pereira B, Daulha L, Eschalier A, Pezet D, Moulinoux JP and Balayssac D. A polyamine-deficient diet prevents oxaliplatin-induced acute cold and mechanical hypersensitivity in rats. *PLoS One* 2013; 8: e77828.
 160. Ling B, Coudore-Civiale MA, Balayssac D, Eschalier A, Coudore F and Authier N. Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat. *Toxicology* 2007; 234: 176–184.
 161. Schmitt LI, Leo M, Kleinschnitz C, Hagenacker T. Oxaliplatin Modulates the Characteristics of Voltage-Gated Calcium Channels and Action Potentials in Small Dorsal Root Ganglion Neurons of Rats. *Mol Neurobiol*. 2018 Mar 30.
 162. Chukyo A, Chiba T, Kambe T, Yamamoto K, Kawakami K, Taguchi K, Abe K. Oxaliplatin induced changes in expression of transient receptor potential channels in the dorsal root ganglion as a neuropathic mechanism for cold hypersensitivity. *Neuropeptides*. 2018 Feb;67:95-101.
 163. Hsieh YL, Chen HY, Yang CH, Yang CC. Analgesic Effects of Transcutaneous Ultrasound Nerve Stimulation in a Rat Model of Oxaliplatin-Induced Mechanical Hyperalgesia and Cold Allodynia. *Ultrasound Med Biol*. 2017 Jul;43(7):1466-1475.
 164. Schulze C, McGowan M, Jordt SE, Ehrlich BE. Prolonged oxaliplatin exposure alters intracellular calcium signaling: a new mechanism to explain oxaliplatin-associated peripheral neuropathy. *Clin Colorectal Cancer*. 2011 Jun;10(2):126-33.
 165. Taguchi K. [Role of Transient Receptor Potential Channels in Paclitaxel- and Oxaliplatin-induced Peripheral Neuropathy]. *Yakugaku Zasshi*. 2016;136(2):287-96.
 166. Naziroğlu M TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochem Res* 2011;36:355–366

167. Nazıroğlu M, Dikici DM, Dursun S Role of oxidative stress and Ca(2+) signaling on molecular pathways of neuropathic pain in diabetes: focus on TRP channels. *Neurochem Res* 2012; 37:2065–2075
168. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res.* 2000 Apr;6(4):1205-18.
169. Boehmerle W, Splittgerber U, Lazarus MB, McKenzie KM, Johnston DG, Austin DJ, Ehrlich BE. Paclitaxel induces calcium oscillations via an inositol1,4,5-trisphosphate receptor and neuronal calcium sensor 1-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 28;103(48):18356-61.
170. Boehmerle W, Zhang K, Sivula M, Heidrich FM, Lee Y, Jordt SE, Ehrlich BE. Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain-mediated neuronal calcium sensor-1 degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jun 26;104(26):11103-8.
171. Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron.* 1998 Jul;21(1):13-26
172. Nazıroğlu M New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res* 2007; 32:1990–2001
173. Espino J, Bejarano I, Paredes SD, Barriga C, Rodríguez AB, Pariente JA Protective effect of melatonin against human leukocyte apoptosis induced by intracellular calcium overload: relation with its antioxidant actions. *J Pineal Res* 2011; 51:195–206
174. Osada T, Hsu D, Hammond S, Hobeika A, Devi G, Clay TM, Lysterly HK, Morse MA. Metastatic colorectal cancer cells from patients previously treated with chemotherapy are sensitive to T-cell killing mediated by CEA/CD3-bispecific T-cell-engaging BiTE antibody. *Br J Cancer.* 2010 Jan 5;102(1):124-33.
175. Castedo M, Coquelle A, Vitale I, Vivet S, Mouhamad S, Viaud S, Zitvogel L, Kroemer G. Selective resistance of tetraploid cancer cells against DNA damage-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Dec;1090:35-49.
176. Wang YS, Li YY, Cui W, Li LB, Zhang ZC, Tian BP, Zhang GS. Melatonin Attenuates Pain Hypersensitivity and Decreases Astrocyte-Mediated Spinal Neuroinflammation in a Rat Model of Oxaliplatin-Induced Pain. *Inflammation.* 2017 Dec;40(6):2052-2061.
177. Joseph EK, Chen X, Bogen O, Levine JD. Oxaliplatin acts on IB4-positive nociceptors to induce an oxidative stress-dependent acute painful peripheral neuropathy. *J Pain.* 2008 May;9(5):463-72.
178. Carozzi VA, Marmiroli P, Cavaletti G. The role of oxidative stress and antioxidant treatment in platinum-induced peripheral neurotoxicity. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010 Nov;10(7):670-82.
179. Lee JS, Kim YT, Jeon EK, Won HS, Cho YS, Ko YH. Effect of green tea extracts on oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in rats. *BMC Complement Altern Med.* 2012 Aug 15;12:124.
180. Areti A, Komirishetty P, Akuthota M, Malik RA, Kumar A. Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and promotes neuroprotection by inducing autophagy during oxaliplatin-evoked peripheral neuropathy. *J Pineal Res.* 2017 Apr;62(3).

181. Kim TS, Jeong DW, Yun BY, Kim IY Dysfunction of rat liver mitochondria by selenite: induction of mitochondrial permeability transition through thiol-oxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294:1130–1137
182. Hallak M, Vazana L, Shpilberg O, Levy I, Mazar J, Nathan I A molecular mechanism for mimosine-induced apoptosis involving oxidative stress and mitochondrial activation. *Apoptosis* 2008;13:147–155
183. Zhang Y, Liu H, Jin J, Zhu X, Lu L, Jiang H The role of endogenous reactive oxygen species in oxymatrine-induced caspase-3-dependent apoptosis in human melanoma A375 cells. *Anticancer Drugs* 2010; 21:494–501
184. Shang D, Li Y, Wang C, Wang X, Yu Z, Fu X A novel polysaccharide from *Selen-enriched Ganoderma lucidum* induces apoptosis of human breast cancer cells. *Oncol Rep* 2011; 25:267–272
185. Celik O, Nazıroğlu M Melatonin modulates apoptosis and TRPM2 channels in transfected cells activated by oxidative stress. *Physiol Behav* 2012; 107:458–465
186. Nazıroğlu M, Cig B, Ozgul C Neuroprotection induced by N-acetylcysteine against cytosolic glutathione depletion-induced calcium influx in dorsal root ganglion neurons of mice: role of TRPV1 channels. *Neuroscience* 2013; 242:151–160
187. Canta A, Pozzi E, Carozzi VA. Mitochondrial Dysfunction in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN). *Toxics*. 2015 Jun 5;3(2):198-223.
188. Özgül C, Nazıroğlu M TRPM2 channel protective properties of N-acetylcysteine on cytosolic glutathione depletion dependent oxidative stress and Ca²⁺ influx in rat dorsal root ganglion. *Physiol Behav* 2012; 106:122–128
189. Jeo JE, Kang SK Selenium effectively inhibits ROS-mediated apoptotic neural precursor cell death in vitro and in vivo in traumatic brain injury. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:1199–1210
190. Junn E, Mouradian MM Apoptotic signaling in dopamine-induced cell death: the role of oxidative stress, p38 mitogen-activated protein kinase, cytochrome c and caspases. *J Neurochem* 2001; 78:374–383
191. Elphick LM, Hawat M, Toms NJ, Meinander A, Mikhailov A, Eriksson JE, Kass GE Opposing roles for caspase and calpain death proteases in L-glutamate-induced oxidative neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 232(2):258–267
192. Arakawa M, Ito Y N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases: basic and clinical pharmacology. *Cerebellum* 2007; 6:308–314
193. McQuade RM, Carbone SE, Stojanovska V, Rahman A, Gwynne RM, Robinson AM, Goodman CA, Bornstein JC, Nurgali K. Role of oxidative stress in oxaliplatin-induced enteric neuropathy and colonic dysmotility in mice. *Br J Pharmacol*. 2016 Dec;173(24):3502-3521.
194. Waseem M, Sahu U, Salman M, Choudhury A, Kar S, Tabassum H, Parvez S. Melatonin pre-treatment mitigates SHSY-5Y cells against oxaliplatin induced mitochondrial stress and apoptotic cell death. *PLoS One*. 2017 Jul 21;12(7):e0180953.
195. Nazıroğlu M, Senol N, Ghazizadeh V, Yürüker V. Neuroprotection induced by N-acetylcysteine and selenium against traumatic brain injury-induced apoptosis and calcium entry in hippocampus of rat. *Cell Mol Neurobiol*. 2014 Aug;34(6):895-903.

196. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996 Jul 12;86(1):147-57.
197. Kim CS, Park WH, Park JY, Kang JH, Kim MO, Kawada T, Yoo H, Han IS, Yu R. Capsaicin, a spicy component of hot pepper, induces apoptosis by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in HT-29 human colon cancer cells. *J Med Food*. 2004 Fall;7(3):267-73.
198. Wang S, Chuang HH. C-terminal dimerization activates the nociceptive transduction channel transient receptor potential vanilloid 1. *J Biol Chem*. 2011 Nov 25;286(47):40601-7.
199. Salazar H, Llorente I, Jara-Oseguera A, García-Villegas R, Munari M, Gordon SE, Islas LD, Rosenbaum T. A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nat Neurosci*. 2008 Mar;11(3):255-61.
200. Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jüngling E, Zitt C, Lückhoff A. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem*. 2002 Jun 28;277(26):23150-6.
201. Naziroğlu M, Lückhoff A. A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-Ribose in TRPM2 channels: single channel events. *Neurochem Res*. 2008 Jul;33(7):1256-62.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Bilal ÇİĞ
Doğum Yeri ve Yılı : Malatya, 1984
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : bilalcig@sdu.edu.tr



Eğitim Durumu:

Lise : Malatya Lisesi, 2001
Lisans : Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü, 2009
Yüksek Lisans : SDÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik A.D., 2014
Doktora : SDÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilimleri A.D., 2018

Mesleki Deneyim:

Araştırma Görevlisi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.D. 2011- (devam ediyor)

Yabancı Dil Puanı: 76,25

Ödüller:

- ✓ Genç Araştırmacı Bursu Ödülü”, EACR sponsorluğunda 2. Antikanser Ajanları Kongresi, Nisan 2014, Bodrum, TÜRKİYE.
- ✓ 4. ULUSLARARASI BEYİN ARAŞTIRMA ORGANİZASYONU IBRO / APRC Tahran Nörobilim Okulu: Nörolojik Hastalıklara Temel Yaklaşımlar (bursiyer olarak katıldım), 17-28 Ekim 2014, Tahran-İran.
- ✓ FENS CAJAL Nörobilim Eğitim Programı: ‘Hastalık ve Sağlıkta Beyindeki İyon Kanalları (bursiyer olarak katıldım), 04-22 Eylül 2017, Bordeaux / Fransa.
- ✓ Avrupa Kanser Araştırmaları Derneği (EACR) Seyahat Ödülü (Travel Grant), 04-22 Eylül 2017.
- ✓ Poster Birinciliği ‘Selenyumun oksaliplatin kaynaklı nöropatik ağrıda koruyucu etkileri: TRPA1 ve TRPV1 katyon kanallarının rolü’ (2. Uluslararası Beyin Araştırma Okulu, 6-12 Kasım 2017 ISPARTA).

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

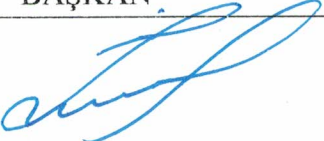



TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
05.05.2016	06	01

Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 05 MAYIS 2016 tarihinde Saat 09:30'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır,

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.D. Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'nun yürütücüsü olduğu Arş. Gör. Bilal ÇİĞ, Doktora Öğrencisi İshak Suat ÖVEY'in yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, "Oksaliplatinin Neden Olduğu Nöropatik Ağrı ve TRPV1 Kanal Aktivasyonu üzerinde Selenyumun Koruyucu Etkisinin Sıçanlarda Moleküler Tekniklerle Araştırılması" başlıklı çalışma;

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Sıçan (Wistar Albino)	Dişi	40	12 Haftalık / 180-200gr

Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından oy birliği ile UYGUN görülmüştür.

Prof. Dr. İbrahim BARUT BAŞKAN	Prof. Dr. Mustafa Çağrı SAVAŞ BAŞKAN YARDIMCISI	Prof. Dr. Ersin USKUN ÜYE
	KATILMADI	
Prof. Dr. Emel SESLİ ÇETİN ÜYE	Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY ÜYE
	KATILMADI	
Yrd. Doç. Dr. Ayşe KOCABIYIK ÜYE	Vet. Hekim Yaşar GÜNAYDIN ÜYE	Öğretmen Hasan Ali ÇETİN ÜYE
KATILMADI	