

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

**MEME KANSERİNDE TRPV1 EKSPRESE EDEN
İMMÜN HÜCRELERİN FENOTİPLERİNDEKİ
DEĞİŞİKLİKLERİN BELİRLENMESİ**

Muhlis AKMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2019-ANTALYA

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

MEME KANSERİNDE TRPV1 EKSPRESE EDEN
İMMÜN HÜCRELERİN FENOTİPLERİNDEKİ
DEĞİŞİKLİKLERİN BELİRLENMESİ

Muhlis AKMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nuray ERİN

Bu tez TÜBİTAK (COST-Proje No: 115S943), Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2017-2745 ve TSA-2018-3007 proje numaraları ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Tıbbi Farmakoloji Programında Y¼ksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 21/06/2019

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nuray ERİN
Akdeniz ¼niversitesi

¼ye : Prof. Dr. S. Sadi ¼ZDEM
Akdeniz ¼niversitesi

¼ye : Doç Dr. Banu ¼ZT¼RK
Sağlık Bilimleri ¼niversitesi

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrencinin

Muhlis AKMAN

İmza

Tez Danışmanı

Nuray ERİN

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca benimle tecrübelerini ve bilgilerini paylaşan, değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Nuray ERİN'e,

Her anımda manevi desteği ile yanımda olan sevgili arkadaşım Seren HAKSEVER'e, yüksek lisansım boyunca hem ablalık hem arkadaşlık yapan Esra NİZAM ve Özlem AKDENİZ'e, kendi tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen arkadaşlarım Dr. M. Gökhan ERTOSUN, Sayra DİLMAÇ ve Gamze KOÇAK'a,

Desteklerini her zaman hissettiğim sayın hocalarım Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER, Prof. Dr. Sadi ÖZDEM ve Prof. Dr. Coşkun USTA'ya, Tıbbi Farmakoloji bölümümdeki bütün hocalarım ve arkadaşlarıma,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Her kararımda arkamda olan babam Dr. Refik AKMAN ve annem Latife AKMAN'a, kardeşlerim Vahit ve Melih'e,

Tüm içtenliğim ile teşekkür ediyorum.

ÖZET

Amaç: Meme kanseri dünya çapında kadınlarda en sık teşhis edilen kanser tipi olup metastatik meme kanserleri tüm ölümlerin %90'ını oluşturmaktadır. Bu yüzden metastatik meme kanserini tedavide yeni hedeflerin keşfi büyük önem taşımaktadır. TRPV1 immün sistemi aktive eden ve düzenleyen bir kalsiyum kanalıdır. Yapılan çalışmalarla TRPV1'in kanser ile ilişkisi bildirilmiştir. TRPV1'in kanser varlığında immün hücreler üzerine olan etkilerini inceleyen çalışma azdır. Bu sebeple çalışmamızda metastatik meme kanseri varlığında TRPV1 ekspresyonundaki olası değişiklikleri belirlemek ve TRPV1 eksprese eden hücrelerin immünofenotiplendirilmesinin yapılması ile bu hücrelerin izole edilerek TRPV1 kanalının immün hücrelerin sitokin salınımına olan etkilerini incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Beyin (4TBM) ve karaciğer (4TLM) metastatik meme kanseri oluşturulmuş fareler ile sağlıklı farelerin immün dokularında hücrelerin fenotiplendirilmesi akış sitometrisi ile belirlenmiştir. Farelerin dalak, lenf nodu ve peritonlarından alınan sıvılardan T hücreler, makrofajlar ve diğer immün hücreler hücre kültrüne alınmış, çeşitli uyarılar altında TRPV1 aktivasyonunun TNF α , IFN γ , IL-6 ve IL-10 sitokinlerinin salınımları üzerinde yaptığı değişiklikler ELISA yöntemiyle belirlenmiştir.

Bulgular: Gr1+TRPV1+ monosit hücre ekspresyonu 4TBM taşıyan farelerde artmıştır. Kanser taşıyan farelerde T hücrelerin IL-6 ve IFN γ salınımları ex vivo TRPV1 agonisti capsaicin uygulaması ile azalmıştır. In vivo olvanil uygulaması sonucunda TRPV1 eksprese eden hücrelerin sayısı kontrol grubuna göre periton dokusunda artmış ve olvanil uygulanan grubun makrofajlarında IL-6 ve TNF α salınımı artmıştır.

Sonuç: 4TBM ve 4TLM metastatik meme kanserinde TRPV1 ekspresyonu ilk defa gösterilmiştir. In vivo olvanil uygulaması makrofajları antitümör yanıt gösterecek şekilde farklılaştırmıştır. Çalışmamız bu farklılaşma hakkında literatüre ön bilgiler sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: 4TBM, 4TLM, TRPV1, olvanil, makrofaj

ABSTRACT

Objective: Breast cancer is the most diagnosed cancer type among women worldwide and metastatic breast cancer accounts for 90% of all breast cancer-related deaths. Therefore, discovery of new targets for the treatment of metastatic breast cancer is important. TRPV1 is a calcium channel which can activate and regulate the immune system. It has been stated that TRPV1 has a relation with cancer. There are few studies examining the role of TRPV1 in immune cells in cancer. In our study, we aimed to determine the changes of TRPV1 expression on immune cells and immunophenotyping of TRPV1 expressing cells, also examining the effects of TRPV1 on cytokine release on isolated immune cells in metastatic breast carcinoma.

Method: Brain (4TBM) and liver (4TLM) metastatic breast carcinoma cells were used to induce tumor in female Balb/c mice. Cell immunophenotyping of tumor bearing and healthy mice were determined by flow cytometry. T cells, macrophages and other cells were isolated from spleen, lymph nodes and peritoneum. The effect of TRPV1 activation on TNF α , IFN γ , IL-6 and IL-10 cytokine releases with/without stimuli challenges on these cells by ELISA.

Results: Gr1+TRPV1+ monocyte cell expression increased in 4TBM bearing mice. IL-6 and TNF α release from T cells obtained from tumor bearing mice were decreased with ex vivo capsaicin treatment. In vivo olvanil treatment increased TRPV1 expressing cell number in peritoneum compared to control group and IL-6 and TNF α release from macrophages obtained from in vivo olvanil treated group were increased.

Conclusion: TRPV1 expression in 4TBM and 4TLM metastatic breast carcinoma were shown first time. In vivo olvanil treatment differentiated the macrophages to antitumor responder type. Our study adds preliminary information to literature.

Key words: 4TBM, 4TLM, TRPV1, olvanil, macrophages.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Metastaz	4
2.1.2. Meme Kanseri	6
2.1.3. Kanserin İmmün Sistem ile İlişkisi	7
2.2. TRP Kanalları	11
2.3. TRPV1 Kanalı	14
2.3.1. TRPV1 Kanalının Aktivasyonu	15
2.3.2. TRPV1'in Ekspresyonu	18
2.3.4. TRPV1'in Kanserdeki Rolü	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM	22
3.1. Hücre Kültürü	22
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Takibi	22
3.1.2. Hücrelerin Sayımı ve Enjeksiyonu	22
3.2. Hayvan Deneyleri	23
3.3. Manyetik İzolasyon	23
3.4. Peritondan Hücre Eldesi	25
3.5. ELISA	25
3.5.1. ELISA İçin Örnek Hazırlanması	26
3.5.2. PBS – Fosfat Tampon Solüsyonu Hazırlanışı	26
3.5.3. ELISA Yöntemi Protokolleri	26
3.6. Akış Sitometrisi	33
3.6.1. %8 Paraformaldehit Hazırlanması	34
3.7. Genel İstatistiksel Analizler	34
3.8. Kullanılan TRPV1 Ajanlarının Hazırlığı	35

3.9.	Çalışmalarda Kullanılan Sarf Malzemeler, Kimyasallar, Kitler ve Cihazlar	35
3.9.1.	Kullanılan Sarf Malzemeler	35
3.9.2.	Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	36
3.9.3.	Kullanılan Alet ve Gereçler	37
4.	BULGULAR	39
4.1.	Sağlıklı Fareler ile 4TBM ve 4TLM Taşıyan Farelerin İmmün Hücrelerindeki TRPV1 Ekspresyonlarındaki Değişimler	39
4.2.	Sağlıklı Fareler ile 4TBM ve 4TLM Taşıyan Farelerin İmmün Hücrelerinin In Vivo Sitokin Salınımlarına TRPV1 Agonisti Olvanil ve Capsaicin'in Etkisi	50
4.3.	Sağlıklı Fareler İle 4Tbm Taşıyan Farelerin In Vivo Sitokin Salınımları ve TRPV1 Agonisti Capsaicin ve TRPV1 Antagonisti Capsazepine Etkisi	55
4.4.	In Vivo Olvanil Tedavisi Alan Farelerin Periton Dokusunda TRPV1 Ekspresyonundaki Değişiklikler	67
4.5.	In Vivo Olvanil Tedavisi Gören Farelerin Sitokin Salınımları ve Ex Vivo TRPV1 Agonisti Capsaicin ve Olvanil ile TRPV1 Antagonisti Capsazepine Uygulamasının Etkisi	68
5.	TARTIŞMA	80
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	85
	KAYNAKLAR	87
	ÖZGEÇMİŞ	97

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Tümör hücrelerinin progresyonu	5
Şekil 2.2.	Tümörlerin immün yanıttan kaçışı	11
Şekil 2.3.	İnsan TRP kanallarının filogenetik haritası	13
Şekil 2.4.	TRPV1'in topolojik modeli	15
Şekil 2.5.	TRPV1'i etkileyen ajanlar	17
Şekil 2.6.	TRPV1'in desentisizasyonu	18
Şekil 3.1.	Manyetik hücre izolasyonunun şematik gösterimi	25
Şekil 3.2.	Fare TNF α ELISA standart hazırlama yöntemi	27
Şekil 3.3.	Fare IFN γ ELISA standart hazırlama yöntemi	28
Şekil 3.4.	Fare IL-6 ELISA standart hazırlama yöntemi	30
Şekil 3.5.	Fare IL-10 ELISA standart hazırlama yöntemi	32
Şekil 4.1.	Sağlıklı hayvanlarda CD45 ve CD3e eksprese eden hücrelerde TRPV1 ekspresyonu	39
Şekil 4.2.	Kullanılan antikorların kesim noktaları	40
Şekil 4.3.	Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerde CD4, CD8a, CD11b ve Gr1 eksprese eden immün hücrelerin oranları	41
Şekil 4.4.	Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin dalaklarında CD11b ve Gr1 ile TRPV1 eksprese eden hücrelerin oranları	42
Şekil 4.5.	Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin dalaklarından elde edilen Gr1, CD11b ve TRPV1 eksprese eden hücrelerin dot plot görüntüsü	43

- Şekil 4.6.** Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin dalaklarından elde edilen CD4 ve CD8a ile TRPV1 eksprese eden hücrelerin oranları 44
- Şekil 4.7.** Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin dalaklarından elde edilen CD4, CD8a ve TRPV1 eksprese eden hücrelerin dot plot görüntüleri 45
- Şekil 4.8.** Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin lenf nodlarından elde edilen CD4 ve CD8a ile TRPV1 eksprese eden hücrelerin oranları 46
- Şekil 4.9.** Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin lenf nodlarından elde edilen CD4, CD8a ve TRPV1 eksprese eden hücrelerin dot plot görüntüleri 47
- Şekil 4.10.** 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin tümör dokusunda Gr1 ve CD11b ile TRPV1 eksprese eden hücrelerin oranları 48
- Şekil 4.11.** 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin tümör dokusunda Gr1 ve CD11b ile TRPV1 eksprese eden hücrelerin dot plot görüntüleri 49
- Şekil 4.12.** Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerden elde edilen T hücreler ve diğer hücrelerin TNF α seviyelerindeki değişiklikler 50
- Şekil 4.13.** Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerden elde edilen T hücreler ve diğer hücrelerin uyarım varlığında TNF α seviyelerindeki değişiklikler 51
- Şekil 4.14.** Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerden elde edilen T hücreler ve diğer hücrelerin IL-6 seviyelerindeki değişiklikler 52
- Şekil 4.15.** Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerden elde edilen T hücreler ve diğer hücrelerin uyarım varlığında IL-6 seviyelerindeki değişiklikler 53

- Şekil 4.16.** Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerden elde edilen T hücreler ve diğer hücrelerin IFN γ seviyelerindeki değişiklikler 54
- Şekil 4.17.** Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerden elde edilen T hücreler ve diğer hücrelerin uyarım varlığında IFN γ seviyelerindeki değişiklikler 58
- Şekil 4.18.** Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen periton hücrelerinin TNF α seviyelerindeki değişiklikler 56
- Şekil 4.19.** Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen diğer hücrelerinin TNF α seviyelerindeki değişiklikler 57
- Şekil 4.20.** Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen T hücrelerinin TNF α seviyelerindeki değişiklikler 58
- Şekil 4.21.** Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen periton hücrelerinin IFN γ seviyelerindeki değişiklikler 59
- Şekil 4.22.** Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen diğer hücrelerin IFN γ seviyelerindeki değişiklikler 60
- Şekil 4.23.** Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen T hücrelerin IFN γ seviyelerindeki değişiklikler 61
- Şekil 4.24.** Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen periton hücrelerinin IL-6 seviyelerindeki değişiklikler 62
- Şekil 4.25.** Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen diğer hücrelerin IL-6 seviyelerindeki değişiklikler 63
- Şekil 4.26.** Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen T hücrelerin IL-6 seviyelerindeki değişiklikler 64
- Şekil 4.27.** Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen periton hücrelerinin IL-10 seviyelerindeki değişiklikler 65

- Şekil 4.28.** Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen diğer hücrelerin IL-10 seviyelerindeki değişiklikler 66
- Şekil 4.29.** Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen T hücrelerin IL-10 seviyelerindeki değişiklikler 67
- Şekil 4.30.** Çözücü ve olvanil enjekte edilen farelerin peritonunda TRPV1 ekspresyon oranı 68
- Şekil 4.31.** Çözücü ve olvanil enjekte edilen farelerden alınan periton örneklerinde TRPV1 histogramı 68
- Şekil 4.32.** Kontrol ve Olvanil grubu farelerden elde edilen periton hücrelerinin TNF α seviyelerindeki değişiklikler 69
- Şekil 4.33.** Kontrol ve Olvanil grubu farelerden elde edilen diğer hücrelerin TNF α seviyelerindeki değişiklikler 70
- Şekil 4.34.** Kontrol ve Olvanil grubu farelerden elde edilen T hücrelerin TNF α seviyelerindeki değişiklikler 71
- Şekil 4.35.** Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen periton hücrelerinin IFN γ seviyelerindeki değişiklikler 72
- Şekil 4.36.** Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen diğer hücrelerin IFN γ seviyelerindeki değişiklikler 73
- Şekil 4.37.** Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen T hücrelerin IFN γ seviyelerindeki değişiklikler 73
- Şekil 4.38.** Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen periton hücrelerinin IL-6 seviyelerindeki değişiklikler 74
- Şekil 4.39.** Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen diğer hücrelerin IL-6 seviyelerindeki değişiklikler 75
- Şekil 4.40.** Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen T hücrelerin IL-6 seviyelerindeki değişiklikler 76

- Şekil 4.41.** Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen periton hücrelerinin IL- 77
10 seviyelerindeki değişiklikler
- Şekil 4.42.** Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen diğer hücrelerinin IL- 78
10 seviyelerindeki değişiklikler
- Şekil 4.43.** Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen T hücrelerinin IL-10 79
seviyelerindeki değişiklikler



SİMGELER ve KISALTMALAR

CGRP	: Kalsitonin Gen İlişkili Protein
COX2	: Siklooksijenaz 2
CTLA-4	: Sitotoksik T lenfosit İlişkili Protein 4
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EGF	: Endotelyal büyüme faktörü
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent deneyi
ER	: Östrojen reseptörü
FBS	: Fetal dana serumu
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü 2
IFNγ	: İnterferon gama
IL-10	: İnterlökin 10
IL-17A	: İnterlökin 17-A
IL-6	: İnterlökin 6
MHC	: Majör histokompabilite kompleksi
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
NO	: Nitrik oksit
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu

PD-1	: Protein Ölüm reseptörü – 1
PGE2	: Prostaglandin E2
PKA	: Protein kinaz A
PKC	: Protein kinaz C
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Dakikada dönüş sayısı
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute Besiyeri
TAM	: Tümörle ilişkili makrofajlar
TNFα	: Tümör nekroz faktör alfa
TRP	: Transient Receptor Potential
TRPV1	: Transient Receptor Potential Vanilloid 1
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar

1. GİRİŞ

Kanser; hücrelerin gen ekspresyonlarında birtakım değişikliklerin olmasıyla normal hücre işlemlerinin disregülasyonuna ve sonucunda anormal hücre büyümesi ve farklılaşması ile karakterize edilen; bu genetik değişimler ile dokuları işgal edip, vücudun farklı yerlerine metastaz yapacak özellikler kazanan ve bu sayede morbiditeye sebep olan; tedavi edilmez ise kişinin ölmesine sebep olan bir hastalıktır (Ruddon, 2011). Metastaz ise tümör hücrelerinin çoğalma amacıyla çevredeki ya da uzak ikincil bölgelere yayılmasıdır. Kanser tedavisinde birçok yeni tedavi seçeneği ortaya konmuşsa da metastatik meme kanserinin tedavisi halen oldukça sınırlıdır ve yeni tedavi araştırmalarına ihtiyaç vardır.

Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (Geçici reseptör potansiyeli vanilloid 1), TRP süper ailesinin üzerinde en çok çalışılmış üyesidir. TRPV1'in ağrı ve nörojenik enflamasyondaki rolü daha önceki yapılan çalışmalarla ortaya konmuş ve vücuttaki diğer dokularda yeni rollerinin keşfedilmesiyle çalışmalar diğer doku ve hücrelere odaklanmaya başlamıştır (Fernandes ve ark., 2012). Yapılan çalışmalar sonucunda TRPV1 ekspresyonunun kanser varlığı ile birlikte değiştiğinin ortaya konulmasıyla TRPV1, kanser tedavisinde yeni bir hedef olarak dikkat çekmiştir. TRPV1 kanalının capsaicin, sıcaklık ve düşük pH ile aktive edilerek hücre içine Ca^{+2} alınmasını sağlar. Bu sayede hücreye spesifik fonksiyonların gerçekleştirilmesine katkıda bulunur. Yapılan çalışmalar sonucunda TRPV1'in immün sistemde de rolü olduğu ortaya konmuştur. Örneğin CD4+ T hücrelerinin ve makrofajların sitokin salınımına ve dendritik hücrelerin antijen sunma fonksiyonuna ve olgunlaşmasına aracılık ettiği bildirilmiştir (Basu ve Srivastava, 2005; Bertin ve ark., 2014; Ninomiya ve ark., 2017).

TRPV1'in kanser varlığında immün sistem üzerine yapılan çalışma azdır. Literatür bilgisi göz önünde bulundurularak TRPV1 aktivasyonunun anti-tümör yanıt oluşturabileceği hipotezi kurulmuş ve bu hipotez doğrultusunda çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda metastatik meme kanseri varlığında TRPV1 ekspresyonundaki olası değişiklikleri araştırarak TRPV1 eksprese eden hücrelerin immünofenotiplendirilmesinin yapılması ve TRPV1 aktivasyonunun immün hücrelerin sitokin salınımları üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçlar doğrultusunda beyine (4TBM) ve karaciğere (4TLM) metastataz yapan meme

kanser hücresi kullanarak farelerde kanser oluşturuldu. Bu farelerin dalak, lenf nodu ve peritonlarından alınan sıvılarda TRPV1 ekspresyon eden hücrelerin oranlarındaki değişiklikler analiz edildi. Yine bu dokulardan T hücre, makrofaj ve diğer hücreler izole edilip hücre kültürüne alınarak çeşitli uyarıların varlığında TRPV1 aktivasyonunun TNF α , IFN γ , IL-6 ve IL-10 sitokinlerinin salınımları üzerine etkileri araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser; hücrelerin gen ekspresyonlarında birtakım değişikliklerin oluşmasıyla normal hücresel işlemlerin disregülasyonuna ve sonucunda anormal hücre büyümesi ve farklılaşması ile karakterize edilen; bu genetik değişimler ile dokuları işgal edip, vücudun farklı yerlerine metastaz yapacak özellikler kazanan ve bu sayede morbiditeye sebep olan; tedavi edilmez ise kişinin ölmesine sebep olan bir hastalıktır (Ruddon, 2011). 2012 yılında dünya çapında yaklaşık 14 milyon yeni vaka ve kanserle ilişkili 8 milyon ölüm rapor edilmiştir, yapılan istatistikler de kanserin morbidite ve mortalite ana sebeplerinden biri olarak göstermektedir. Görülme sıklığı açısından ise erkeklerde akciğer kanseri, kadınlarda ise meme kanseri olarak karşımıza çıkmaktadır (Forman ve Ferlay, 2014).

On yıllardır süregelen çalışmalar ile kanserin sebepleri ortaya konulmaya çalışılmakta ve devam eden çalışmaların sonuçları bize hastalığın özellikleri ile ilgili her gün yeni bilgiler vermektedir. Kanserin sebepleri arasında genel olarak genetik yatkınlık, çevre ilişkisi, bulaşıcı ajanlar ve dış ortamdaki ajanlara maruziyet olarak belirtilebilir. Kansere genetik ve epigenetik bir hastalık olarak baktığımızda onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve bakıcı genler (örneğin DNA tamir genleri) üzerindeki mutasyonlar sonucunda tümör oluşumu görülmektedir. Bunların yanı sıra dış ortamdaki faktörler de kanser oluşumuna sebep olmaktadır; bu faktörler arasında sigara kullanımı, çeşitli kimyasallara maruziyet ve diyet sayılabilir. Fakat insan kanserlerinin ilk aşamaları halen tam olarak ortaya konulamamıştır (Hahn ve Weinberg, 2015).

Hücreler normal fizyolojik işlevlerini yerine getirirken hücre proliferasyonunu, sağkalımını, farklılaşmasını, migrasyonunu ve çevre hücrelerle iletişimini kontrol eden genler üzerindeki değişiklikler sonucunda hücreler kanser hücreleri haline gelirler.

Kanser hücrelerinin aksiyomatik özellikleri şu şekilde belirtilmektedir;

- Eksojen mitojenlerden bağımsız olarak çoğalma kapasitesi,
- Büyüme inhibitör sinyallerine karşı yanıtızsızlık,

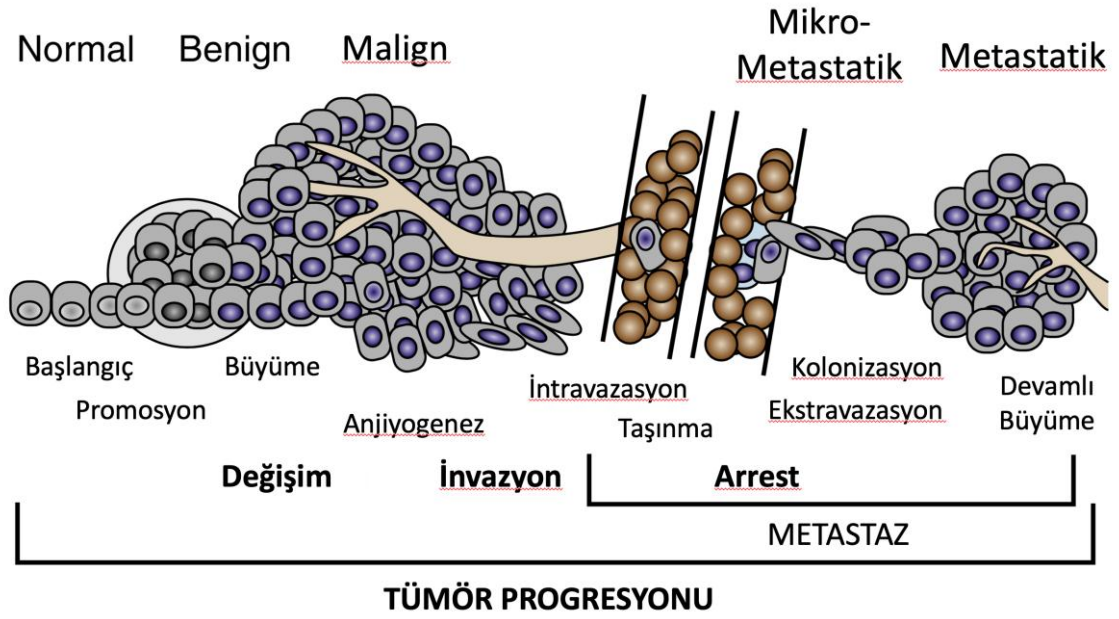
- Apoptoza direnç gösterme,
- Sınırsız proliferasyon potansiyeli,
- Damar oluşturabilme kapasitesi,
- Çevre dokuları işgal sonucunda metastaz yapabilme

Kanser hücreleri haline gelen hücrelerin nasıl dokulara invazyon ve metastaz yaptığı ile ilgili yapılan çalışmalar son yıllarda hız kazanmış ve geliştirilen deney modelleri ve araçlar sayesinde sebepler ortaya konulmuştur fakat halen metastaz üzerine cevaplanmayı bekleyen birçok soru bulunmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.1.1. Metastaz

Metastaz, tümör hücrelerinin çoğalma amacıyla çevredeki ya da uzak ikincil bölgelere yayılmasına denilmektedir. Kanserle ilişkili ölümlerin %90'ı metastazdan kaynaklanmaktadır ve halen tam olarak mekanizması aydınlatılamamıştır. Metastatik yayılım sırasında birincil tümör dokusundaki kanser hücresi şu adımları (Şekil 2.1) takip etmektedir;

- Çevre dokuya saldırması
- Lenf ve kan dolaşımına girmesi (İntravazasyon)
- Sağkalım sonrası dolaşım sistemi ile uzak dokulara translokasyonu
- Kan dolaşımından çıkması (Ekstravazasyon)
- Uzak dokunun mikroçevresinde sağkalımı
- Yabancı dokuya adapte olarak hücre proliferasyonunu kolaylaştırması ve ikincil tümör oluşumu (Kolonizasyon) (Chaffer ve Weinberg, 2011)



Şekil 2.1. Tümör hücrelerinin progresyonu. Normal hücrelerin çeşitli mekanizmalarla tümör hücresi haline gelerek diğer dokularda ikincil tümör dokuları oluşturmaları tümör progresyonu olarak adlandırılmaktadır (Acharyya ve ark., 2015)

Metastazın patogeneğinde birçok farklı faktör aynı anda ya da tek başına etki etmektedir. Normal hücreler, kanser hücresi haline geldikten sonra çoğalmaya başlarlar. Bu sırada enflamatuvar hücreler tümör bölgesine çağırılarak anjiyogenez başlatılır. Bu sayede tümör dokusunda damar yapısı oluşturulmaya başlanır. Yüksek sıklıkta mutant varyantları oluşturularak kanser hücreleri pre-metastatik nişler oluşturur. Neoplastik hücreler bu aşamadan sonra çevre dokulara çeşitli motilite mekanizmalarını kullanarak saldırmaya başlar. Hücreler tümör dokusuna giren immün hücrelerin invazif fonksiyonlarını kullanarak lenf ve kan dolaşımına katılır (intravazasyon) ve uzak dokulara taşınırlar. Taşınma sırasında hücreler endotelyuma yapışır ya da damar çapı geçiş için çok dar ise takılır kalırlar (arrest). Yapışan ya da arrest olan hücreler damardan çıkarak (ekstravazasyon) ikinci dokuya yerleşirler. Pre-metastatik nişler yeni bölgede proliferasyona ve kolonizasyona başlayarak ikincil tümör dokusunu oluştururlar (Acharyya ve ark., 2015; Welch ve Hurst, 2019).

Yapılan çalışmalar sonucunda metastazın oldukça karmaşık ve çok aşamalı bir olay olduğu ortaya konmuştur. Tümör hücreleri ile vücudun normal hücreleri arasında gerçekleşen etkileşimler doğrudan metastatik aşamaları etkilemektedir. Bu işleme katılan birçok faktör tanımlanmışsa da metastaz tam olarak anlaşılabilmiş değildir ve metastatik özellik gösteren kanserlerin tedavileri sınırlı düzeyde kalmaktadır (Kozlowski ve ark., 2015).

2.1.2. Meme Kanseri

Elde edilen istatistikî verilere göre dünya çapında kadınlarda en sık teşhis edilen kanser tipi olan meme kanserinin son yıllarda geliştirilen yeni tedavi protokolleri ve yeni teşhis teknikleri sayesinde gelişmiş ülkelerde görülme sıklığı azalsa da gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerde görülme sıklığında artış görülmektedir ve 2012’de 1,7 milyon yeni vaka ile halen ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Forman ve Ferlay, 2014). Ülkemizde de tüm yaş gruplarında kadınlar arasında en sık görülen kanser %24,9 oranla yine meme kanseridir (Hacıkamiloğlu ve ark., 2017).

Meme kanseri klinik açıdan dört farklı moleküler alt-tip ile kategorize edilmektedir, bunlar; luminal A, luminal B, HER2-pozitif ve üçlü negatif meme kanseridir. Bu dört grubun yanı sıra gen kopya sayısı ve ekspresyon analizlerine göre alt tip sayısı artmaktadır (Harbeck ve Gnant, 2017).

Luminal A tümörleri; tümör hücrelerinde östrojen reseptörü (ER) ile ilişkili genlerin yüksek ekspresyonu, insan epidermal büyüme faktör reseptör 2 (HER2neu) genlerinin ve proliferasyonla ilişkili genlerin düşük ekspresyonu ile karakterize iken Luminal B tümörleri düşük seviyede östrojen reseptörü ekspresyonu, değişen seviyelerde HER2neu ekspresyonu ve yüksek oranda proliferasyonla ilişkili genlerin ekspresyonu ile karakterize edilmektedir. Bunların yanı sıra Ki67 indeksi de Luminal alt tiplerin profillerinin çıkarılmasında kullanılmaktadır. Ki67 histon-olmayan nükleer korteks proteindir ve polimeraz-I bağımlı ribozomal RNA sentezinin ilk basamaklarına katılmaktadır. Ki67 ekspresyonu immünohistokimya ile belirlendikten sonra oranı hesaplanarak raporlanmaktadır ve tümörün büyüme hızı hakkında fikir sahibi olunabilmektedir (Penault-Llorca ve Radosevic-Robin, 2017; Hashmi ve ark., 2018).

HER2-pozitif meme kanseri HER2 overekspresyonu ile karakterize olan bir meme kanseri alt tipidir ve meme kanserlerinin yaklaşık %15-20’sini oluşturmaktadır. Üçlü negatif meme kanseri ise tümör hücrelerinde östrojen reseptörünün ekspresyonu \leq %1’den düşüktür, progesteron reseptörü ekspresyonu negatiftir ve normal seviyede HER2 reseptör ekspresyonu göstermektedir. Üçlü negatif meme kanseri diğer alt tiplere göre daha kötü prognoz göstermektedir ve tedavi için moleküler hedefinin az olması da tedavi olanaklarını kısıtlamaktadır (Loibl ve Gianni, 2017; Stovgaard ve ark., 2018).

Meme kanseri bir önceki bölümde anlatılan metastaz aşamalarını takip ederek vücudun farklı bölgelerine yayılarak yeni koloniler oluşturur. Meme kanserinin alt tipleri en yaygın kemik metastazı göstermektedir; istatistiki verilere bakıldığında HER2-pozitif ve luminal B alt tipleri akciğer, karaciğer ve beyin metastazları ile ilişkili bulunmuşken üçlü negatif alt tipi yüksek seviyede beyin, akciğer metastazı gösterirken diğer alt tiplere göre daha az sıklıkta karaciğer ve kemik metastazı yapmaktadır. Bu alt tiplerin sağkalım sürelerine bakıldığında luminal A tipi en iyi sağkalım süresi gösterirken bunu luminal B takip etmektedir. HER2 ve üçlü negatif meme kanseri benzer sağkalım sürelerine sahiptir. Bu alt tiplerin belirlenmesi tedavi seçeneklerinin ortaya konulmasında önem arz etmektedir. Her ne kadar bu hedefler kullanılarak yeni ilaçlar geliştirilmişse de metastatik meme kanseri tedavisi halen çok sınırlıdır. Bu sebeple metastatik meme kanserinin tedavisinde yeni hedefler ve bu hedeflere yönelik ilaç araştırmaları oldukça önemlidir (Scully ve ark., 2012; Lim ve Hortobagyi, 2016; Harbeck ve Gnant, 2017).

2.1.3. Kanserin İmmün Sistem ile İlişkisi

Kanser ile immün sistem arasında kompleks bir ilişki bulunmaktadır. T hücreler kanseri yok etmek için etkili bir savunma oluştururken kanser hücreleri de immün sistemi baskılayacak faktörler salgılayarak bu yanıtın zayıflamasına ve hatta ortadan kaldırılmasını sağlayabilirler. İmmün hücreler doğal (myeloid) ve adaptif (lenfoid) kökenlidirler; myeloid kökenli hücreler makrofajlar, dendritik hücreler, monositler, gralünositler ve doğal öldürücü hücreler gibi hücre tiplerinden oluşmaktadır ve bu hücreler vücuda giren patojenlere karşı ilk yanıtı başlatırlar. Patojenler yakalanıp tanındıktan sonra dendritik hücreler adaptif yanıtı oluşturacak T ve B hücrelerine bu antijenleri (tümör antijenleri de dahil olmak üzere) sunarak adaptif yanıtın oluşturulması sağlanmaktadır. Bu hücreler arasındaki etkileşim kansere karşı gösterilen yanıtın yoğunluğunu ve sonucunu etkilemektedir. Ancak tümörle ilişkili antijenlerin çoğu öz-proteinler olduğu için kansere karşı immün yanıt çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Bununla birlikte bu hücreler tümör mikroçevresine yeterince penetre olamazlarsa tümör eliminasyonu yavaşlar (DeNardo ve Coussens, 2007; Rezaei ve ark., 2015).

İmmün hücreler yanıt oluşturabilmek adına sitokin adı verilen polipeptidleri sentezler ve kullanırlar. Nanomolar veya pikomolar konsantrasyonda salgılanan bu polipeptidler ile hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücresel aktivitelerin

düzenlenmesi gibi hücrel fonksiyonların kontrolü sağlanmaktadır. Kanser hücreleri de hücrelerden sitokin salınımını regüle edebilmektedir fakat mekanizmaları aydınlatılamamıştır (Hirbod-Mobarakeh ve ark., 2015). Bu sitokinlere örnek olarak;

- TNF α : Tümör nekroz faktör alfa olarak isimlendirilir. Pro-enflamatuvar bir sitokin olarak aktif makrofajlardan, NK hücrelerden ve T hücrelerden salgılanır. Endotelial hücreleri etkinleştirerek enflamasyonu başlatır; nötrofilleri etkinleştirir.
- IL-1B: İnterlökin 1 beta makrofajlar, dendritik hücreler, fibroblastlardan salgılanırlar. Endotelial hücreleri etkinleştirerek enflamasyon ve koagülasyon desteklenir, karaciğerde akut faz proteinlerinin salgılanmasını sağlar ve T hücrelerin yardımcı T 17 hücrelerine farklılaşmasını indükler.
- IL-6: İnterlökin 6 pro-enflamatuvar bir sitokindir ve makrofaj, endotelial hücreler ve T hücrelerden salgılanırlar. Karaciğerden akut faz proteinlerinin salgılanmasını, nöron gelişimini, yara iyileşmesinde keratinosit, mezengial hücrelerin çoğalmasını sağlar.
- IL-10: İnterlökin 10 makrofajlardan salgılanırlar ve yardımcı tip 1 T hücrelerinin sitokin salınımını ve hücre gelişimini inhibe ederler. Ayrıca MHC sınıf II ekspresyonlarını baskılar.
- IL-17A: İnterlökin 17 yardımcı T 17 hücrelerinden salgılanmaktadır ve makrofaj ve endotelial hücrelerden kemokin ve sitokin salınımını arttırlar.
- IFN γ : İnterferon gama olarak isimlendirilmektedir. T hücreler ve NK hücrelerden salgılanmaktadır. Makrofajları klasik yolla aktive eder, T hücreleri yardımcı tip 1 T hücrelere farklılaştırır. Diğer hücrelerin yüzeylerinde MHC sınıf I ve II moleküllerinin ekspresyonlarını arttırır (Abbas ve ark., 2015a; Dembic, 2015)

Dendritik hücreler adaptif immün yanıtın başlatılmasında kilit rol oynayan hücrelerdir. Vücuda giren protein yapıları antijenler dendritik hücreler tarafından yakalanıp endositoz ve pinositozla hücre içine alınır. Bu antijenler işlenir ve T hücreleri aktive etmek amacıyla hücre yüzeyinde majör histokompatibilite kompleksi (MHC) Sınıf I veya II adı verilen moleküller ile eksprese edilirler. MHC Sınıf I bütün çekirdekli

hücreler tarafından hücre yüzeyinde eksprese edilirken, MHC sınıf II antijen sunan hücreler tarafından eksprese edilmektedir (Abbas ve ark., 2015b).

T hücreler immün sistemin etkinlik göstermesinde en önemli elemandırlar. İmmün sistem B hücreleri kullanarak “hümorale” yanıt gösterir; B hücreler antikorlar salgılayarak immün yanıt gösterirler. T hücreler ise “hücresele” yanıtı organize ederler. Sitokinler sayesinde hücreleri immün yanıtta hazırlar ve yönlendirirler. Bu fonksiyonlarını gösterebilmek için yabancı patojenleri tanıyabileceği moleküller olan antijenlerin T hücrelerine sunulması gerekmektedir. Bu işlem ise dendritik hücreler tarafından MHC Sınıf II ile T hücre reseptörlerine tanıtılmasıyla gerçekleşir. T hücreler, CD4+ ve CD8+ T hücreleri olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. CD4+ hücreler sınıf II MHC ile aktive olurlar ve görevleri immün sistemi kontrol etmektir; B hücrelerin antikor üretmesini sağlarlar, makrofajların mikrobisidal aktivitesini güçlendirirler, sitokin ve kemokin salgılayarak immün yanıtı kontrol ederler. CD4+ hücreler girdikleri etkileşimler sonucunda diğer alt tiplerine farklılaşabilirler, bu hücreler; Yardımcı tip 1, yardımcı tip 2, yardımcı tip 17 ve regülatör T hücreleridir. CD8+ T hücreler ise MHC sınıf I ile aktive olurlar, aktive olduklarında hedef hücrenin duvarını perforin ile parçalayarak içeri granzim A ve B salgırlar ve hedef hücreyi yok ederler. Bu yüzden CD8+ T hücrelere sitotoksik T hücreleri de denilmektedir (Yee, 2006; Zhu ve Paul, 2008). 4T1 ve E0711 fare meme kanser hatları kullanılarak yapılan bir çalışmada meme kanserine gösterilen immün yanıtta CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin doğrudan rol oynadığı bildirilmiştir. Tümör gelişiminin erken döneminde yardımcı tip 1 T hücreleri ile CD8+ T hücrelerinin tümör infiltrate lenfosit (TIL) popülasyonunda çoğunluğu oluşturduğu anca geç dönemde bu popülasyonda çoğunluğun CD4+ T hücrelerine doğru kaydığı görülmüştür (Y. Huang ve ark., 2015).

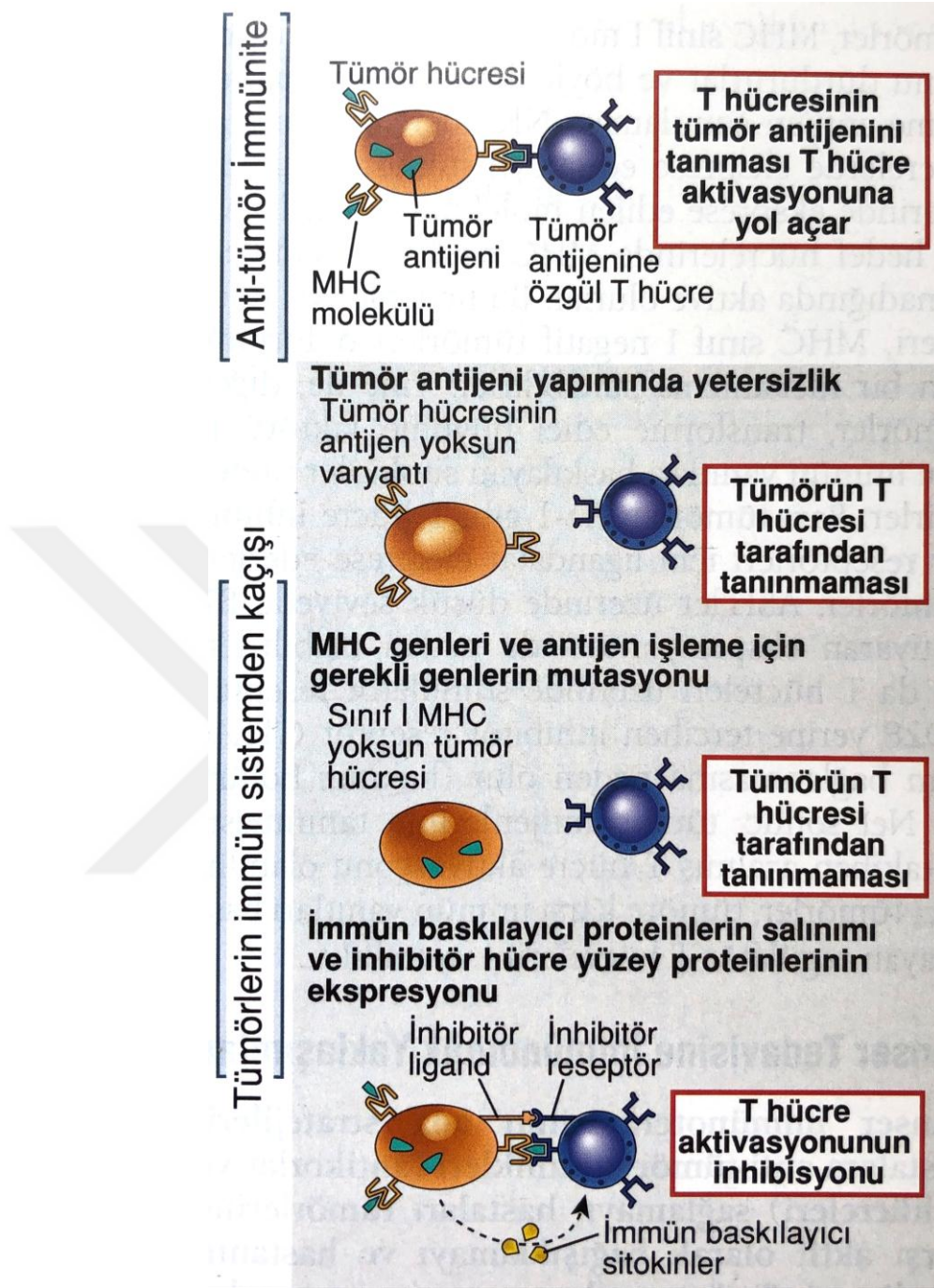
Makrofajlar mononükleer fagositik soydan köken alan ve yüksek plastisite gösteren, çok kolaylıkla fenotip değiştirebilen, hücrelerdir. Makrofajlar genel olarak iki alt popülasyona ayrılmaktadır, M1 makrofajlar “klasik” yolakla aktive olmaktadır; yardımcı tip 1 T hücrelerden salgılanan IFN γ , TNF α ve Toll-benzeri reseptörlerinin (TLR) aktivasyonu ile aktif hale gelirler. Pro-enflamatuvar sitokinler olan TNF, IL-12, IL-23 ve IL-6 ve reaktif oksijen ürünleri, nitrik oksit salgılayarak patojenleri ortadan kaldırırlar ve ayrıca antitümör etki gösterirler. “Alternatif” yolakla aktive olan M2 makrofajlar ise yardımcı tip 2 T hücrelerden salgılanan IL-4 ve IL-13 ile

farklılaşırlar. Yüksek miktarda IL-10 salgırlarlar ve anti-enflamatuvar etki göstererek doku tamirine katılırlar. Tümörü yok etmek için tümör dokusuna gelen makrofajlar ortamda bulunan vazküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), siklooksijenaz 2 kaynaklı prostaglandin E2 gibi mediyatörlere maruz kalınca M2 benzeri fenotipe dönüşürler ve tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) haline gelirler. Bu TAM'lar salgıladıkları epidermal büyüme faktörü (EGF), VEGF, TNF α gibi faktörlerle yeni damar oluşumunu sağlarlar, immün sistemi baskırlarlar ve tümör hücrelerinin büyümesini desteklerler. Bu sebeple makrofajların fenotip değişimini antitümör yanıtı destekleyecek şekilde yönlendirmek tümörü ortadan kaldırma girişimlerinde önem arz etmektedir (Ramanathan ve Jagannathan, 2014; Williams ve ark., 2016).

İmmün hücreler, malign hücreler tarafından eksprese edilen antijenleri yakalayıarak tümöre karşı yanıt oluşturmak amacıyla bu antijenleri işleyerek yüzeilerinde sergilerler. İmmün sistem tarafından antijen olarak algılanan bu molekküler arasında mutasyona uğramış proteinler, tümör baskılayıcı gen ürünleri, aşırı miktarda eksprese edilen öz-proteinler ya da onkojenik virüsler bulunmaktadır. Bu antijenler sitotoksik T lenfositlere tanıtılarak tümör hücrelerinin öldürülmesi sağlanmaktadır. Ancak çoğunlukla bu sistem yetersiz kalmakta ve tümör hücreleri çeşitli mekanizmaları kullanarak immün sistemden kaçmaktadır. Bu mekanizmalara;

- Tümörle ilişkili antijenlerin yeterince eksprese edilmemesi veya kaybı
- Tümör hücrelerinin MHC Sınıf I eksprese etmemesi
- T hücre yüzeilerinde bulunan CTLA-4, PD-1 gibi baskılayıcı reseptörlerin tümör hücreleri tarafından aktive edilerek hücrelerin yanıt vermesinin engellenmesi
- Tümör mikroçevresinde bulunan myeloid kökenli baskılayıcı hücre (MDSC) ve tümörle ilişkili makrofajların salgıladıkları faktörlerle immün yanıtın baskılanması
- Tümör mikroçevresinin asidoza ve hipoksiye uğrayarak immün sistemin baskılanması

Gibi örnekler (Şekil 2.2) verilebilir (Abbas ve ark., 2015c; Davoodzadeh Gholami ve ark., 2017).



Şekil 2.2. Tümörlerin immün yanıtta kaçışı özetlenmiştir. Antitümör immünite T hücrenin tümörle ilişkili antijenlerle aktive olmasıyla gerçekleşir. Ancak antijenler yetersiz ise, MHC sınıf I ekspresyonu yoksa ya da immün sistemi baskılayacak moleküller ortamda bulunuyorsa T hücre antitümör yanıt gösteremez ve tümörler immün sistemden kaçma fırsatı bulurlar. Şekil Abbas ve ark. (2015c)'tan alınmıştır.

2.2. TRP Kanalları

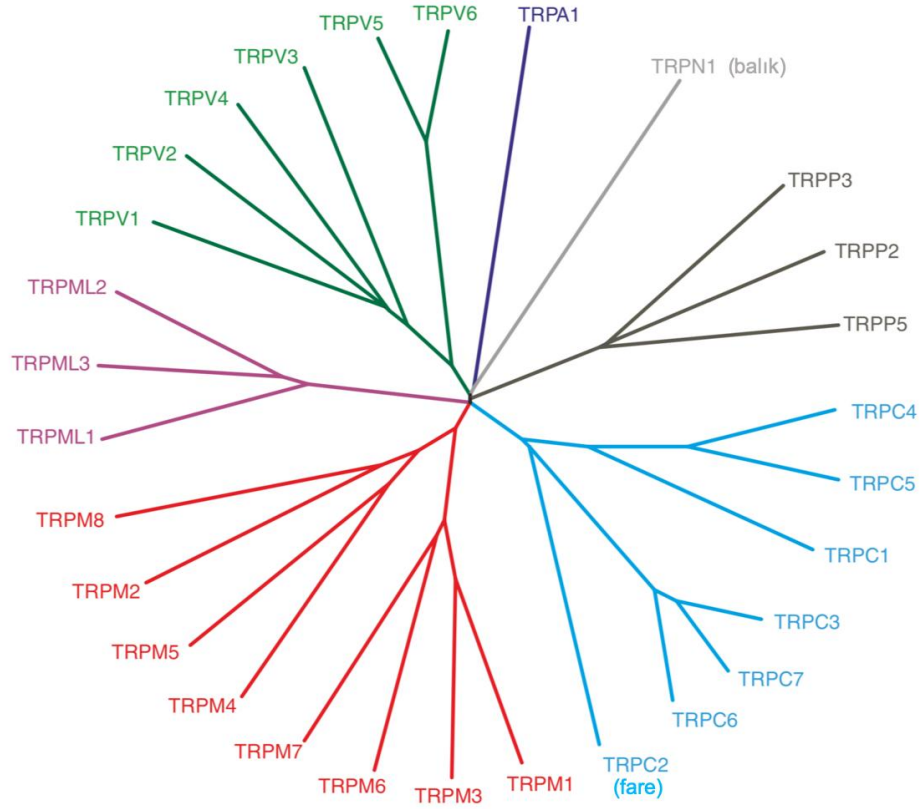
Transient Receptor Potential (geçici reseptör potansiyeli) olarak adlandırılan TRP ailesinin keşfi 1960'ların sonuna dayanmaktadır; *Drosophila* cinsi sineklerin fotoreseptörleri üzerinde çalışan iki araştırmacı tarafından izole edilmesiyle

keşfedilmiştir. Keşfinden sonraki uzun yıllar boyunca fonksiyonu tam olarak çözülememiş ancak amino asit sekans deneyleri sonucunda TRP kanallarının iyon kanalları olduğu anlaşılmış ve fonksiyonları üzerine olan çalışmalar hız kazanmıştır (Hardie, 2011; Montell, 2011).

TRP süper ailesi diğer iyon kanalları ailelerine göre çok fazla çeşitlilik göstermektedir; ışık, ses, kimyasallar, sıcaklık ve dokunma dahil dışarıdan gelen uyaranlara karşı yanıt oluşturmada çeşitli roller oynamaktadırlar (Venkatachalam ve Montell, 2007). TRP kanalları sineklerden memelilere kadar birçok organizmada eksprese edilmekte ve yapılarına göre 7 aileden oluşmaktadır. Bunlar;

- TRPC (canonical)
- TRPV (vanilloid)
- TRPM (melastanin)
- TRPA (ankyrin)
- TRPP (polycystin)
- TRPML (mucolipin)
- TRPN (NompC)

Son yıllarda mayalar üzerine yapılan çalışmalar sonucunda mayaların da TRP kanalları eksprese ettiği görüldü ve 8. aile TRPY (yeast) olarak adlandırıldı (Li, 2017). TRP kanallarının insanlardaki dağılımı şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3. İnsan TRP kanallarının filogenetik haritası (Nilius ve Owsianik, 2011)

TRP süper ailesi vücutta birçok farklı fizyolojik olaya katılmaktadır. Bu fonksiyonlarından en öne çıkanları dış uyaranlara karşı oluşturulan yanıttır. Örneğin TRPM5 dilde tat alma duyusu ile ilişkili iken (Perez ve ark., 2002), TRPV1 kanalı sıcaklığı (>43°C), TRPV2 çok sıcaklığı (>52°C), TRPM8 ise soğluğu algılamamızı sağlamaktadır (Caterina ve ark., 1997; Caterina ve ark., 1999; McKemy ve ark., 2002).

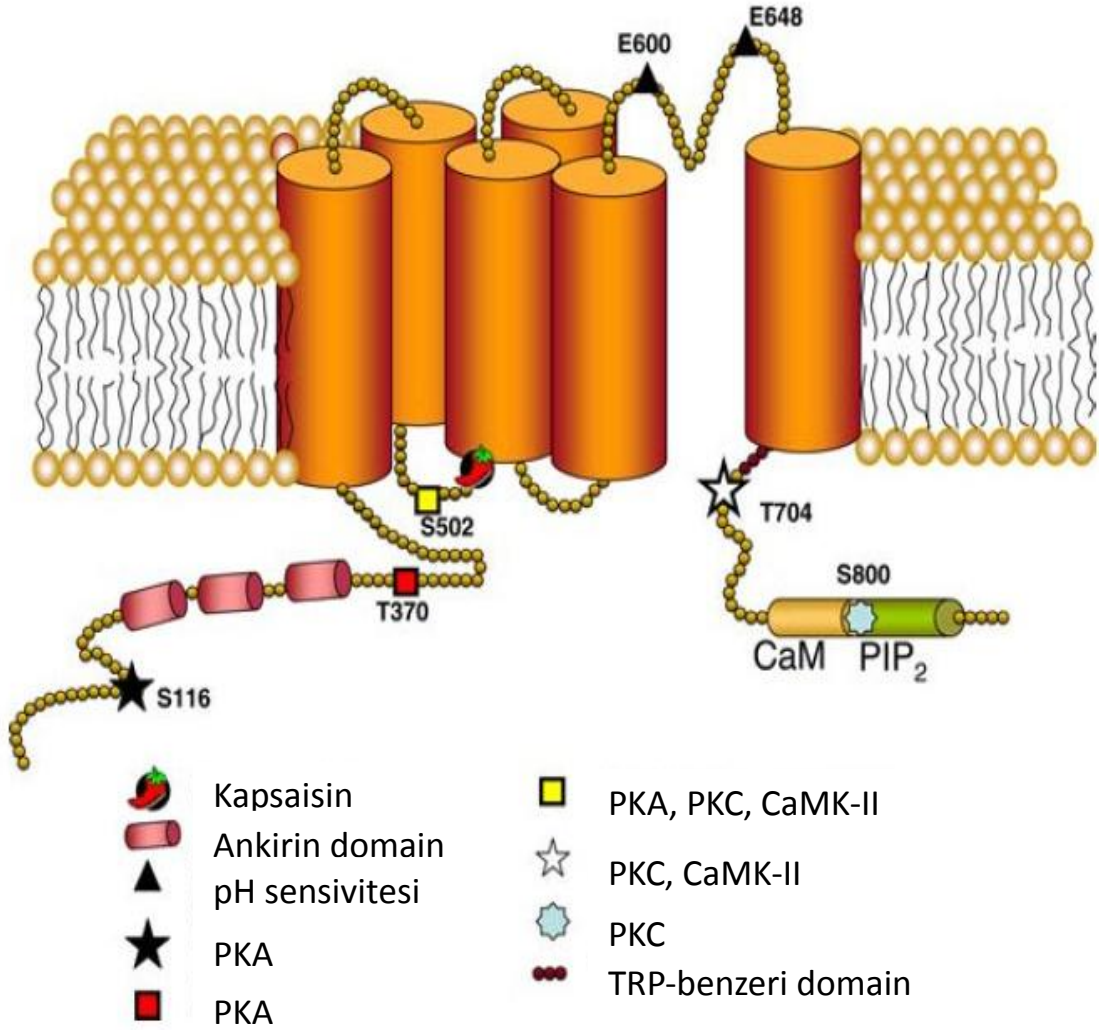
Duyusal iletideki rollerinin dışında TRP kanallarının normal fizyolojik durumlarda da rolleri bulunmaktadır. Kalp kas hücrelerinde ve kan damarlarında bulunan TRPM4, TRPV2, TRPV4, TRPC1, TRPC4, TRPC6 kanallarının kardiyak kontraktileyi, vazküler tonu ve permeabiliteyi regüle ettiği bildirilmiştir (Inoue ve ark., 2004). Neredeyse bütün TRP kanalları beyinde eksprese edilmektedir ve santral sinir sisteminde önemli rollere katılmaktadırlar. Örneğin TRPV1, TRPV2 ve TRPC3 nörotransmitter salınımında rol oynarken, TRPM7 ve TRPM2 oksidatif strese karşı yanıt oluşturulmasını sağlar. Bunların yanında TRPM4 solunum sistemini kontrol eder (Vennekens ve ark., 2012). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada TRPM7'nin silinmesi embriyonik gelişimi etkilemiş ve T hücre oluşumunu engellemiştir (Jin ve ark., 2008).

TRP kanalları ayrıca immün sistemde de bulunmaktadır. TRPM4'ün timüs, dalak gibi lenfoid dokularında eksprese edildiği ve ayrıca B ve T hücre ve monositler gibi immün hücrelerde eksprese edildiği gösterilmiştir. T hücreler üzerindeki TRPM4 inhibe edildiğinde Ca^{+2} salınımının engellendiği görülmüştür. Aynı deneyde TRPM4, agonisti ile uyarıldığında T hücrelerden IL-2 salınımının arttığı gözlemlenmiştir (Launay ve ark., 2004). TRPV2'nin makrofajların fagositozunda rol aldığı rapor edilmiştir. TRPV2-KO farelerle yapılan bir çalışmada TRPV2 taşımayan makrofajların Listeria enfeksiyonuna karşı bakterileri temizlemede yetersiz kaldığı ve bu sebeple mortalitenin arttığı bildirilmiştir (Link ve ark., 2010). TRPM2-KO farelerle yapılan başka bir çalışmada TRPM2-/- farelerin dendritik hücrelerinin olgunlaşmasında ve kemokin aracılı migrasyon yeteneklerinde bozulmalar tespit edilmiştir (Sumoza-Toledo ve ark., 2011).

2.3. TRPV1 Kanalı

Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (Geçici reseptör potansiyeli vanilloid 1), TRP süper ailesinin üzerinde en çok çalışılmış üyesidir. TRPV1'in ağrı ve nörojenik enflamasyondaki rolü daha önceki yapılan çalışmalarla ortaya konmuş ve vücuttaki diğer dokularda yeni rollerinin keşfedilmesiyle çalışmalar diğer doku ve hücrelere odaklanmaya başlamıştır (Fernandes ve ark., 2012).

TRPV1 kanalı altı transmembran domain'den ve sitoplazmik N- ve C- terminus'tan oluşmakta; 5. ve 6. domain'ler arasında por oluşturan hidrofobik bir açıklık bulunmaktadır (Şekil 2.4). N-terminus kısmında üç adet ankirin domain'i taşımaktadır ve C-terminus kısmında (6. transmembran domaininin yakınında) bir TRP domain bulunmaktadır (Caterina ve ark., 1997; Clapham, 2003; Tominaga ve Tominaga, 2005). TRPV1'in intraselüler kısmında N- ve C-termini üzerinde fosfatidil-inositol-4,5-bifosfat (PIP2), protein kinaz A, protein kinaz C ve Ca^{+2} /Kalmodulin-bağımlı kinaz II (CaM-kinaz-II) bağlanma bölgeleri bulunmaktadır (Planells-Cases ve ark., 2005; Grycova ve ark., 2012).



Şekil 2.4. TRPV1'in topolojik modeli. TRPV1'in 6 transmembran domain'leri ve N- ve C-terminus'ları topolojik modelde gösterilmiştir. Fosforilasyon için gerekli olan protein kinaz A (PKA), protein kinaz C (PKC) ve Ca²⁺/Kalmodulin-bağımlı kinaz II (CaMK-II), aktivasyon için gerekli olan kapsaisin ve proton bağlanma noktalarının yanı sıra TRP-benzeri domain ve fosfotidilinositol-4,5-bifosfat (PIP₂) bağlanma bölgeleri şekil üzerinde görülmektedir (Planells-Cases ve ark., 2005).

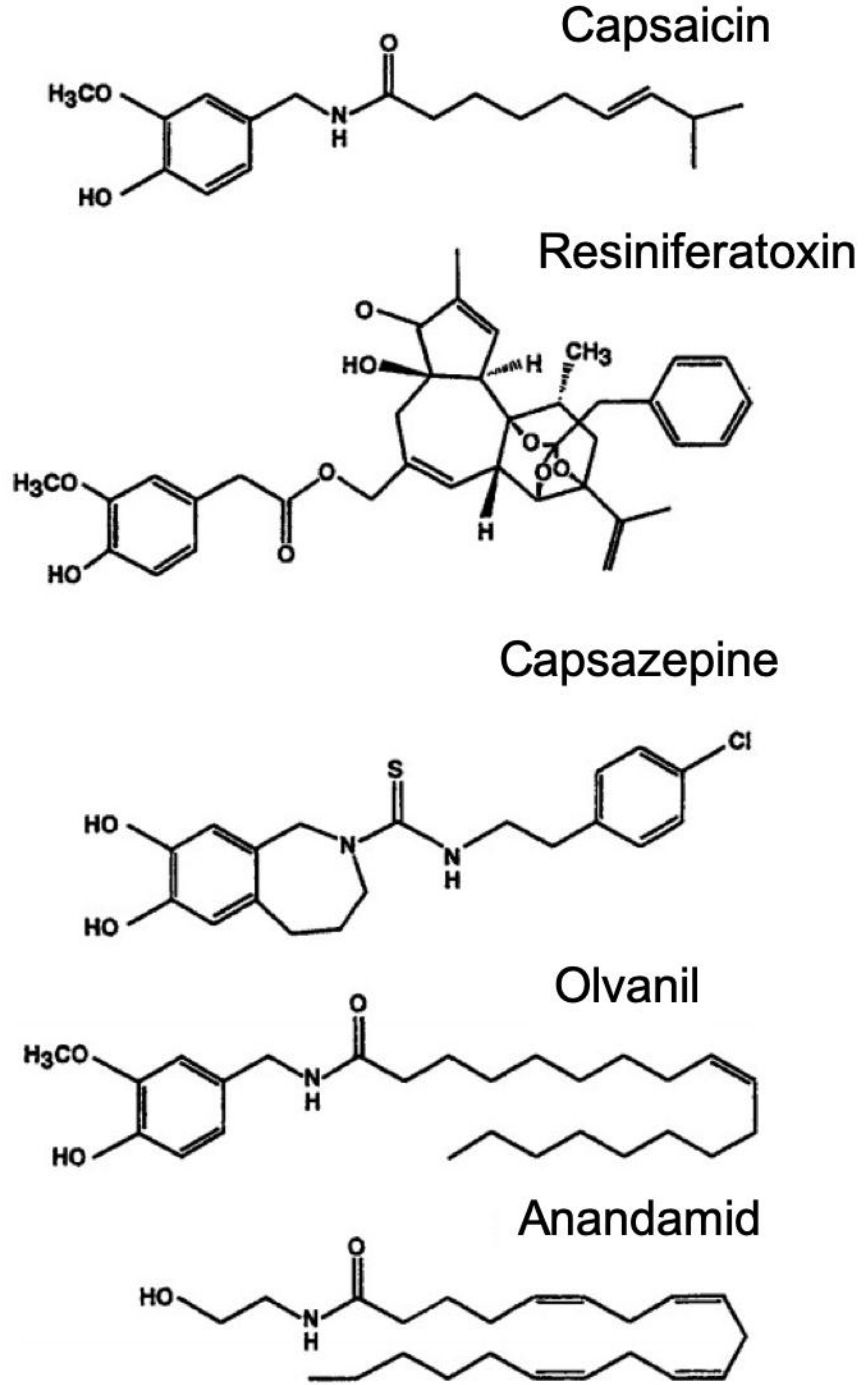
2.3.1. TRPV1 Kanalının Aktivasyonu

TRPV1 kanalının aktive edilmesiyle hücre içine Na⁺/Ca²⁺/K⁺ iyon girişi sağlanır ancak TRPV1'in kalsiyum geçirgenliği sodyuma göre yaklaşık 10 kattır ve Ca²⁺ seçiciliği olduğu söylenebilir (Gunthorpe ve ark., 2002; Cortright ve Szallasi, 2009).

TRPV1 kanalının aktivasyonu birden çok ajanla modüle edilmektedir. Kanala adını veren vanilloidler bu ajanların başında gelmektedir. *Capsicum* cinsi biberden izole edilen vanilloid türevi keskin bir bileşen olan capsaicin ve capsaicin analogları resiniferatoxin ve olvanil yüksek derecede lipofilik özellik göstermektedir; hücre içine alınır ve reseptörün intraselüler kısmına bağlanarak aktive eder (Jung ve ark., 1999;

Alsalem ve ark., 2016). Endojen bileşikler olan anandamid, N-araşidonoil-dopamin (NADA), N-oleoildopamin, araşidonik asit ve lipooksijenaz türevleri olan 12-(S)- ve 15-(S)-hidroperoksieikosatetraneoik asit (12S-HPETE ve 15SHPETE) ve lökotrien B4 TRPV1'i aktive etmektedir (Zygmunt ve ark., 1999; Hwang ve ark., 2000; S. M. Huang ve ark., 2002; Chu ve ark., 2003). Bu ajanların dışında TRPV1 43°C ve üzeri sıcaklıkla, asidifikasyonla (pH<6) da aktive olmaktadır (Caterina ve ark., 1997; Tominaga ve Tominaga, 2005). Bradikinin, NGF (sinir büyüme faktörü), PAR2 (proteaz-aktive reseptör 2) agonistleri ile de TRPV1 aktivasyonu modüle edilmektedir (Chuang ve ark., 2001; Amadesi ve ark., 2004). TRPV1 üzerine etkisi bildirilen bazı ajanlar Şekil 2.5'te verilmiştir.

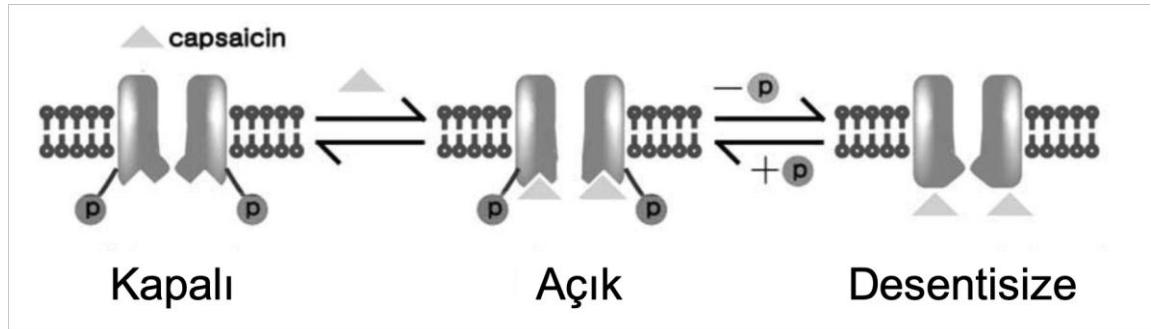




Şekil 2.5. TRPV1'i etkileyen ajanlar. Capsaicin ve analogları resiniferatoxin ve olvanil TRPV1'in eksojen agonisti iken anandamid endojen agonistidir. Capsazepine ise TRPV1 antagonistidir (Caterina ve Julius, 2001).

TRPV1'in uzamış ya da tekrarlayan aktivasyonu sonucunda desensitizasyon indüklenmektedir ve reseptör sonraki uyarılara karşı duyarsız hale gelmektedir (Şekil 5). TRPV1'in desensitizasyonu Ca^{+2} bağımlıdır (Mohapatra ve Nau, 2003). TRPV1 aktivasyonu ile hücreye alınan Ca^{+2} kalsineurin'in aktive olmasına ve kanalı desensitize etmesine sebep olmaktadır (Şekil 2.6). Daha sonra aktive olan CaMK-II

TRPV1'i tekrar sentisize eder. Bu denge ile TRPV1'in aktivasyonu ve desentisizasyonu kontrol edilmiş olur (Jung ve ark., 2004).



Şekil 2.6. TRPV1'in desentisizasyonu (Suh ve Oh, 2005)

TRPV1'in protein kinaz A, protein kinaz C ve Ca^{+2} /Kalmodulin-bağımlı kinaz II ile modülasyonu sonucunda TRPV1'in aktivitesi potansiyelize edilmektedir. N-terminus'ta bulunan Ser116 ve Thr370 rezidüleri defosforile olduklarında TRPV1 desentisize olmaktadır. Prostaglandin E2 gibi profinlamatuvar mediatörlerle sağlanan PKA aktivasyonu sonucu bu rezidüer fosforillenir ve TRPV1 sentisizasyonu sağlanır (Bhave ve ark., 2002; Mohapatra ve Nau, 2003). Ser502 ve Ser800 rezidüleri Alanin ile değiştiğinde TRPV1 aktivasyonu elimine edilmektedir. PKC'nin uyarılması ile Ser502 ve Ser800 fosforile olmakta ve TRPV1 sentisize edilmektedir (Numazaki ve ark., 2002; Bhave ve ark., 2003). Bradikinin G-protein bağlı reseptörü olan Bradikinin Reseptör 2'ye (BK2), NGF ise tirozin kinaz (TrkA) reseptörlerine bağlanarak fosfolipaz C (PLC)'yi aktive ederler. PLC plazma membranındaki PIP2'yi hidrolize ederek TRPV1'in sentisizasyonunu sağlamaktadır (Chuang ve ark., 2001). Ca^{+2} /kalmodulin-bağımlı kinaz II, TRPV1 aktivitesini Ser502 ve Thr704 rezidüerini fosforillereyik kontrol etmektedir. Böylelikle TRPV1 desentisizasyonu inhibe edilmiş olur. (Jung ve ark., 2004).

2.3.2. TRPV1'in Ekspresyonu

TRPV1 daha çok somatik ve iç organ duyu nöronlarının neredeyse yarısında, dorsal root, trigeminal ve vagal ganglianın küçük ve orta büyüklükteki sinirlerinde eksprese edilmektedir (Caterina ve ark., 1997; Helliwell ve ark., 1998). TRPV1+/+ ve TRPV1-/- farelere TRPV1 agonisti [3H]-Resiniferatoxin radyoaktif işaretli antikor uygulanarak yapılan bir çalışmada TRPV1'in santral sinir sisteminde geniş bir dağılım gösterdiği tespit edilmiştir (Roberts ve ark., 2004).

Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar TRPV1 nöronlar dışında da eksprese edildiğini göstermiştir. İnsan derisi üzerinde yapılan bir çalışmada TRPV1'in kutanöz duyu sinir liflerinde, mast hücrelerinde, epidermal keratinositlerde, dermal kan damarlarında, saç foliküllerinde, ter bezlerinde, farklılaşmış sebositlerde bulunmuş ve deride geniş yayılım göstermesi sebebiyle TRPV1'in nosisepsiyon ve nörojenik enflamasyonda rol oynayabileceği belirtilmiştir (Stander ve ark., 2004). İnsan keratinositleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada TRPV1'in capsaicin ile uyarılması sonucunda pro-enflamatuvar mediyatörler olan IL-8 ve prostaglandin E2 salınımı artmıştır; araştırmacılar TRPV1'in epidermal hasar sonrasında oluşan enflamasyonda rolünün olabileceğini bildirmiştir (Southall ve ark., 2003). Sıçan kalplerinin gelişimi üzerinde yapılan bir deneyde kardiyomiyositlerin TRPV1 mRNA ekspresyonları değerlendirilmiş ve neonatal sıçanların kalplerinde TRPV1 eksprese edilirken yetişkinlerde bu ekspresyon kaybolmuştur. Bu sonuçlar da kalp gelişiminde TRPV1'in etkili olduğunu göstermektedir (Dvorakova ve Kummer, 2001).

TRPV1'in immün sistemde de eksprese edildiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. T hücre reseptör (TCR) aktivasyonunu takiben hücrenin aktivasyonu için hücre içine Ca^{+2} girişi başlatılır. Yeterli miktardaki Ca^{+2} ile TCR sinyal yolağı ve önemli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu sağlanır. Bertin ve ark. (2014) çalışmasında $CD4^{+}$ T hücrelerinin aktivasyonunda TRPV1'in rolü araştırılmıştır. Kontrol olarak TRPV1^{-/-} farelerin kullanıldığı çalışmada $CD4^{+}$ T hücrelerinin TRPV1 eksprese ettiği ve TCR sinyalizasyonuna katılan TRPV1'in T hücrenin proinflatuvar sitokinlerin ($IFN\gamma$, IL-17A ve TNF) salgılamasına aracılık ettiği görülmüştür. Sıçanların neonatal döneminde capsaicin uygulanması timüs bezinin ağırlığını ve hücre sayısını oldukça azaltmış ve bununla birlikte timosit proliferasyonu ve T hücrelerinin mitojenlerine karşı verdiği yanıt azalmış, apoptotik hücre ölümü indüklenmiştir. Devam eden çalışmalarda timositlere capsaicin uygulandığında hücre içine alınan Ca^{+2} miktarı artmış ve T hücrelerinin apoptoza gittiği görülmüştür. TRPV1 antagonisti capsazapine uygulaması ile T hücrelerde apoptoz inhibe edilmiştir (Amantini ve ark., 2004; Santoni ve ark., 2004).

Anti-enflamatuvar özelliği olduğu bilinen baharatların araştırıldığı bir çalışmada fareler 10 μ M capsaicin ile beslenmiş ve capsaicin periton makrofajlarının süperoksit anyonları, hidrojen peroksit ve nitrit radikallerinin üretimini baskılamıştır (Joe ve

Lokesh, 1994). RAW264.7 makrofajlarla yapılan *in vitro* çalışmada hücrelerin TRPV1 eksprese ettiği belirtilmiş ve lipopolisakkarit (LPS) ve IFN γ , ile uyarıldıklarında salgıladıkları NO (nitrik oksit) ve prostoglandin E2 mediyatörlerinin TRPV1 analogları capsaicin ve resiniferatoxin ve ilginç olarak TRPV1 antagonisti capsazepine ile azaldığı bildirilmiştir (Chen ve ark., 2003). Makrofajlar üzerine yapılan bir başka çalışmada da LPS ile uyarılan makrofajlara TRPV1 antagonistleri AMG-9810 ve capsazepine uygulanmış ve LPS indüklü makrofajlardan salgılanan IL-6, IL-1 β , IL-18 sitokinlerinin üretimi baskılanmış; pro-IL-1 β ve COX2 ekspresyonları da azalmıştır. Hem J774.1 hem de fare periton makrofajlarında LPS'nin indüklediği enflamatuvar yanıt TRPV1 antagonistleriyle baskılanmıştır (Ninomiya ve ark., 2017).

Dendritik hücrelerde de TRPV1'in rolü üzerine yapılan çalışmalarda birbirine karşıt sonuçlar bulunmuştur. Basu and Srivastava (2005) çalışmalarında dendritik hücrelerin TRPV1 eksprese ettiklerini göstermişlerdir. Olgunlaşmamış dendritik hücelere capsaicin uygulandığında antijen sunma ve ko-stimülatör moleküllerinde artış olmuş ve hücreler olgunlaşma sürecine girmiştir. Aynı deneyler TRPV1^{-/-} hücrelerle yapıldığında bu etki görülmemiştir. TRPV1^{+/+} hücelere TRPV1 antagonisti capsazepine uygulandığında da aynı şekilde bu etkiler inhibe edilmiştir. Bu sonuçlar TRPV1 aktivasyonunun dendritik hücre olgunlaşmasında rolünün olduğunu ortaya koymaktadır. Fakat Toth ve ark. (2009) dendritik hücreleri *in vitro* pro-enflamatuvar antikörlerle uyarılmışlar ve uyarılan hücelere capsaicin uygulandığında doza bağımlı olarak dendritik hücrelerin olgunlaşması inhibe edilmiştir. Dalak dendritik hücrelerinde TRPV1'in rolünün araştırıldığı bir başka çalışmada da CD11c⁺F4/80-dendritik hücelere capsaicin uygulandığında hücrelerin CGRP salgıladıkları rapor edilmiş ve bu etkinin TRPV1^{-/-} hücrelerde görülmediği bildirilmiştir. Th1 (Yardımcı T 1) hücrelerine capsaicin uygulandığında ise IFN γ salınımının inhibe edildiği görülmüştür. (Assas ve ark., 2016).

2.3.4 TRPV1'in Kanserdeki Rolü

Yapılan çalışmalar sonucunda TRPV1 ekspresyonunun kanser varlığı ile birlikte değiştiğinin ortaya konulmasıyla TRPV1, kanser tedavisinde yeni bir hedef olarak dikkat çekmiştir. Birçok kanser tipinde TRPV1 kanalının aktivasyonunun kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü bildirilmiştir. İnsan pankreatik kanserinde ve kronik pankreatitis durumunda TRPV1 ekspresyonunun arttığı görülmüş ve MIA PaCa-2 ve

Capan-1 pankreas kanser hücrelerine in vitro resiniferatoxin uygulanması sonucunda hücrelerin proliferasyonlarının azaldığı raporlanmıştır (Hartel ve ark., 2006). Glioma hücreleriyle yapılan bir çalışmada normal insan astrositlerine oranla U373 hücreleri daha yüksek TRPV1 ekspresyonu gösterirken U87, FC1 ve FLS hücreleri daha az TRPV1 ekspresyonu göstermiştir. Glioblastoma derecesi arttıkça TRPV1 ekspresyonunun ters orantı göstererek azaldığı da aynı çalışmada bildirilmiştir (Amantini ve ark., 2007).

İnsan mesanesinde ise normal ürotelyum transizyonel hücre karsinomuna dönüştüğünde TRPV1 ekspresyonu azalmaktadır (Lazzeri ve ark., 2005). RNA-Seq analizi ile 11 meme kanser dokusu ve 49 meme kanser hücre hattında TRP kanallarının incelendiği meta-analizde TRPV1'in bütün örneklerde eksprese edildiği görülmüş ve normal meme dokusuna göre kanserli dokuda ekspresyonun arttığı bildirilmiştir.

Üçlü negatif meme kanser fenotipi gösteren SUM149PT hücre hattının normal meme dokusuna göre artmış TRPV1 ekspresyonu ile karakterize edilmiştir. TRPV1 ekspresyonundaki değişikliklerin kanser hücrelerinin progresyonunda ve sağkalımında rolünün olabileceği hipotezi öne sürülmüştür. Aynı çalışmada hücrelerin capsaicin ile uyarılması sonucunda hücre proliferasyonunda azalma görülmüştür (Weber ve ark., 2016).

Literatürde TRP kanallarının antikanser hedef olarak kullanılabilceği belirtilmektedir. TRPV1'in meme kanserinde ekspresyonunun artması kanser hücrelerinin kalsiyum iyonunu hücre büyümesini kontrol amacıyla kullandığını düşündürmektedir. Meme kanserinde TRPV1 aktivasyonunun antiproliferatif etki göstermesi de meme kanserini tedavide hedef olarak TRPV1'in kullanılabilceğini göstermektedir. Bu sebeple meme kanserinde TRPV1'in aktivitesinin rolü ve terapötik gücü hakkında çalışmalara ihtiyaç vardır (Ouadid-Ahidouch ve ark., 2013; Weber ve ark., 2016).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre hatlarının Çoğaltılması ve Takibi

Çalışmada 4T1 fare meme kanseri hücre hattının beyin (4TBM) ve karaciğere (4TLM) metastaz yapmış alt tipleri kullanılmıştır. 4T1 hücreleri Balb/c farelerde kendiliğinden oluşmaktadır ve agresif özellikler gösteren bir metastatik meme kanseri hücre hattıdır. 4T1 hücreleri enjekte edilen farelerin kalp metastazlarından elde edilen hücreler 4THM olarak adlandırılmaktadır. Elde edilen 4THM hücreleri kullanılarak oluşturan tümör modelinde farelerde görülen beyin (4TBM) ve karaciğer (4TLM) metastazlarından elde edilen hücreler ise 4TBM ve 4TLM olarak adlandırılmıştır.

Hücre kültür deneyleri steril laminar hava akımlı çalışma kabini içinde yapıldı. Sıvı nitrojende saklanan hücreler, 37°C su banyosunda çözüldükten sonra 10 mm'lik hücre kültür petrilere ekildi ve normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan ortamda; DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle Medium/nutrient mixture F-12) besiyerine %5 fetal sığır serumu (FBS), 1 mM sodyum piruvat, 0.02 mM non-essential amino asit ve 40 mg/ml gentamisin eklenerek hücrelerin çoğaltılması sağlandı. Hücreler 37°C sıcaklık ile %5 CO₂ ve nem içeren etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. Kullanılan hücre hatlarının canlılık, çoğalma ve kontaminasyon açısından durumları inverted mikroskopta günlük takip edildi. Petrilere %80'in üzerinde hücre yoğunluğu gözlemlendiğinde hücreler pasajlanarak çoğaltıldı.

3.1.2. Hücrelerin Sayımı ve Enjeksiyonu

Çalışmalarda kullanılan 4TBM ve 4TLM metastatik meme kanser hücreleri petri tabanına tutunma özelliği gösterdiği için sayım işlemi öncesinde petri tabanından ayrılması sağlandı. Bu amaçla hücrelerin bulunduğu besiyeri çekilip atıldı ve sonrasında üzerine 1 mL Tripsin-EDTA eklendi. 1-2 dakika sonrasında hücreler tutundukları yüzeyden ayrılınca 1:3 oranında besiyeri eklenerek 15 mL'lik santrifüj tüpüne alındı. Tripsin-EDTA bulunan besiyerinden kurtulmak amacıyla 700 rpm'de 3 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüjden sonra süpernatantlar atıldı ve hücre pelletleri 5 mL besiyeri ile tekrar süspanse edildi. Sayım amacıyla bu süspansiyondan 1:10 oranında seyreltilerek yeni bir hücre süspansiyonu elde edildi. Hemasitometre ile sayım işlemi gerçekleştirildi. Belirlenen hücre sayısını elde etmek için gerekli

hesaplamalar yapıldı ve belirlenen seyreltme miktarı doğrultusunda hücre süspansiyonları elde edildi. Bu süspansiyonlar 700 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi ve yine süpernatantlar atıldıktan sonra peletler Hank's solution ile 10^6 hücre/mL olacak şekilde süspansiyon edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonları farelere enjekte edildi.

3.2. Hayvan Deneyleri

Hayvan deneyleri için 6-8 haftalık dişi Balb/c fareler kullanıldı. Fareler 0,1-0,2 cc ketamin-ksilazin ile uyutulduktan sonra sol ön koltuk altları tıraş edildi ve hazırlanan hücre süspansiyonları deri altına 0,2 cc olacak şekilde enjekte edildi. Fareler daha sonra gruplara ayrıldı ve 14 gün boyunca su ve yeme erişimleri serbest olacak şekilde gözlemlendi. 14 günün sonunda fareler sakrifiye edildi. Öncelikle farelerin peritonuna 5 mL %3 FBS içeren serum fizyolojik enjekte edildi ve yaklaşık 5 dakika beklendikten sonra karın boşluğundan sıvılar toplandı. Bu işlemden sonra farelerin dalak ve lenf nodları steril olarak çıkarıldı ve dokular %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyeri içerisinde toplandı. Diğer çalışmalar steril laminar hava akımlı çalışma kabiniinde gerçekleştirildi. Dokular iki kere gentamisin içeren PBS ile yıkandıktan sonra steril filtrelerden ezilerek geçirildi. Toplanan peletler tekrar PBS ile sulandırıldı ve 1000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atıldı ve peletler tekrar PBS ile sulandırıldı. Örnekler tekrar santrifüjlendikten sonra tampon çözelti ile sulandırıldı. Çalışmaların geri kalanına bu örnekler üzerinden devam edildi.

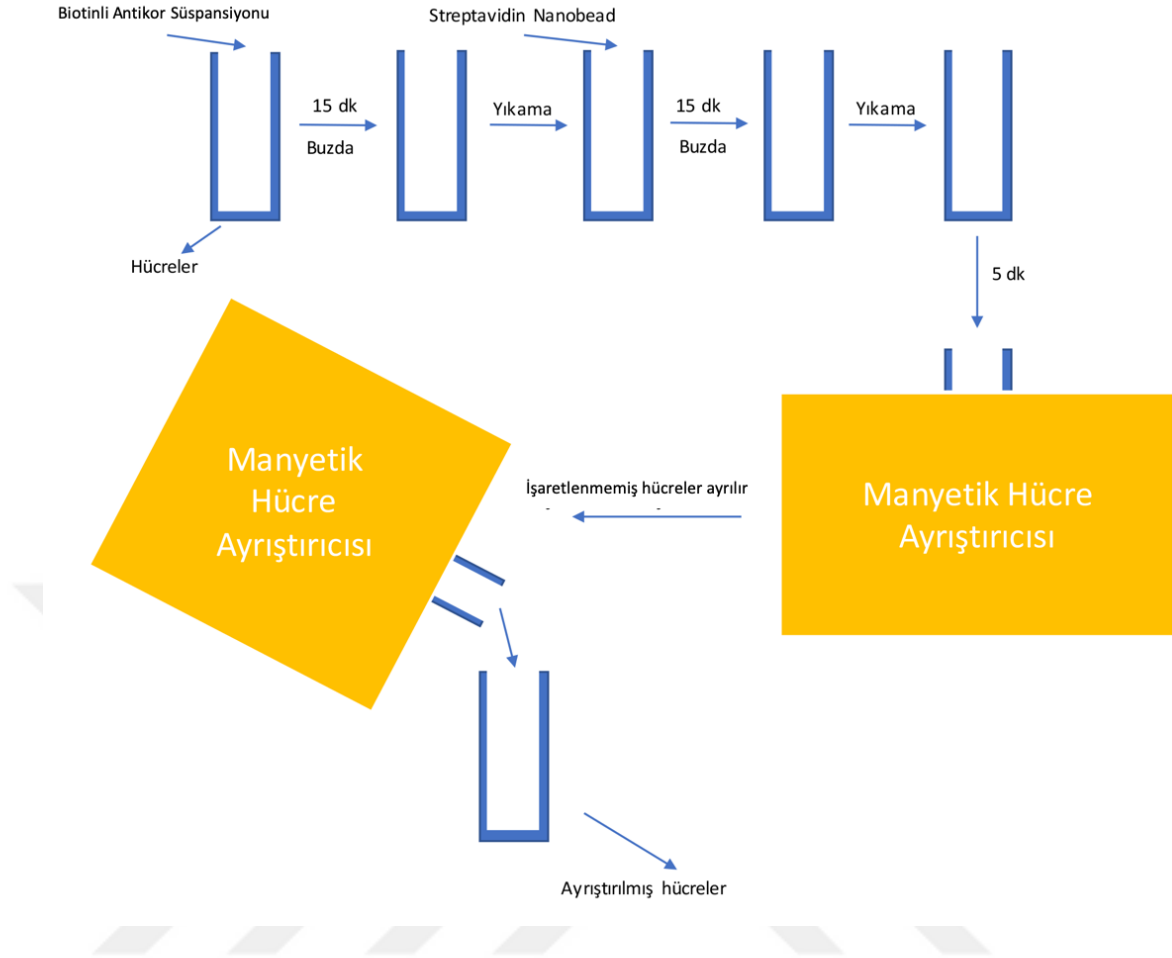
Toplanan periton sıvıları da 1000 rpm'de 8 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatantları atıldı ve peletler tekrar %10 FBS içeren RPMI besiyeri ile sulandırıldı. Çalışmalara bu örnekler üzerinden devam edildi.

Tümörlü hayvanların yanı sıra sağlıklı Balb/c fareler de deneylerde kullanıldı ve aynı işlemlere tabi tutuldu.

3.3. Manyetik İzolasyon

Hücre kültürü deneylerinde T hücreleri diğer immün hücrelerden ayırmak amacıyla manyetik izolasyon protokolü izlenmiştir. Farelerden toplanan dalak ve lenf nodları iki kere gentamisin içeren PBS ile yıkandıktan sonra steril filtrelerden ezilerek geçirildi. Toplanan peletler tekrar PBS ile sulandırıldı ve 1000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atıldı ve peletler tekrar PBS ile sulandırıldı. Örnekler tekrar santrifüjlendikten sonra tampon çözelti ile sulandırıldı.

Bu tampon çözeltinin içine biotin bağlı antikor süspansiyonu (Biolegend – 480031) eklendi. Bu süspansiyon içerisinde anti-Ly-6G/Ly6C (Gr-1), anti-CD45R/B220, anti-CD49b, anti-CD19, anti-CD11b, anti-CD24, anti-TER-119/Erythroid antikorları bulunmaktadır. Antikor eklendikten sonra buzda 15 dakikalık inkübasyon süresinden sonra hücreler 1000 rpm’de 3 dakika santrifüjlendi. Örneklerin süpernatantları atılıp tekrar tampon çözelti ile tekrar sulandırıldı ve yine buzda 15 dakika streptavidin nanobead süspansiyonu ile inkübe edildi. Streptavidin nanobead’ler süspansiyon içerisindeki biotin bağlı antikora bağlanmaktadır. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler tekrar santrifüjlenip tampon çözelti ile sulandırıldıktan sonra manyetik izolasyon aletinin içerisinde 5 dakika bekletilmiştir. Bu sürede tüp içerisinde bulunan streptavidin nanobead bağlı antikorlar tüp çeperine tutunur; süre sonunda tüp içeriği, alet içerisinden çıkarılmadan başka bir tüpe alınır. Bu ayrılan hücreler CD3e+ T hücrelerdir. Tüp çeperinde kalan hücreler tampon çözelti ile sulandırılmıştır. Bu şekilde belirli hacimde hücre toplandıktan sonra bütün hücreler santrifüjlenmiş, süpernatantları atılarak %10 FBS içeren RPMI-1640 ile sulandırılmıştır. Hemisitometre ile sayım işlemi gerçekleştirildikten sonra her bir kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Hücreler ekildikten sonra uyarıcı olarak lipopolisakkarit (LPS – 0,1 mg/mL), Concanavalin A (ConA – 0,5 mg/mL), irradie tümör hücreleri (4TBM ve 4TLM – 5×10^3), rekombinant IL-10 (50 ng/mL) ve IFN γ (100 ng/mL) eklenmiştir. TRPV1 agonisti olarak Capsaicin (1 μ M) ve Olvanil (1 μ M) ve TRPV1 antagonisti Capsazepine (1 μ M) uygulanmıştır. Son hacim 250 mL olacak şekilde besiyeri eklenmiştir.



Şekil 3.1. Manyetik hücre izolasyonunun şematik gösterimi.

3.4. Peritondan Hücre Eldesi

Farelerin periton dokusundan da hücreler izole edilmiştir. Ketamin-ksilazin ile uyutulan fareler sakrifiye edilmeden önce karın kısmı makasla periton zarına zarar vermeden açıldı. Periton içerisine yaklaşık 5 mL, %3 FBS içeren serum fizyolojik enjekte edildi. 5 dakika beklendikten sonra periton sıvısı enjektör yardımıyla toplandı. Hücreler 1000 rpm’de 3 dakika santrifüjlendikten sonra steril laminar hava akımlı çalışma kabine alındı ve 1 kere gentamisin içeren PBS ile yıkandı. Tekrar çöktürülen hücreler cell wash tampon çözeltisiyle sulandırıldı ve akış sitometrisi için gerekli hacim ayrıldı. Kalan hücreler tekrar santrifüjle çöktürüldü ve %10 FBS içeren RPMI-1640 ile sulandırıldı. Hemasitometre ile sayım işlemi gerçekleştirildikten sonra her bir kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır.

3.5. ELISA

Hücrelerin farklı uyarılar ve TRPV1 agonist ve antagonist uygulaması sonucunda sitokin salınımlarındaki değişiklikler ELISA yöntemi ile belirlendi.

3.5.1. ELISA İçin rnek Hazırlanması

Hayvan deneylerinden edilen immün hücreler manyetik izolasyonla T hücrelere ve kalan ‘‘diğer’’ hücreler olacak şekilde ayrılan hücre ile peritondan elde edilen hücreler her bir kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyeri ile 96 kuyucuklu pleytlere ekildi. Hücre kültürü hazırlanırken uyarıcı olarak Lipopolisakkarit, Concanavalin A, rekombinant IL-10 ve rekombinant IFN γ proteinleri kullanılmıştır. Ex vivo TRPV1 agonisti olarak Capsaicin ve Olvanil, TRPV1 antagonisti olarak Capsazepine 1 μ M konsantrasyonda uygulanmıştır. Toplam hacim 250 μ L olacak şekilde hücreler ekilip etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 16 saat sonrasında kuyulardan 120 μ L besiyeri TNF α seviyeleri ölçülmek üzere depo pleyte alındı ve yerine yeniden besiyeri eklendi; alınan örnekler de -80°C dolaba kaldırıldı. 40 saat sonrasında toplam 250 μ L besiyeri IFN γ , IL-6 ve IL-10 seviyeleri ölçülmek üzere depo pleyte alındı ve -80C dolaba kaldırıldı. Daha sonrasında ELISA deneyleri gerçekleştirildi.

3.5.2. PBS – Fosfat Tampon Solüsyonu Hazırlanışı

Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS - Phosphate Buffer Saline) hazırlamak için 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.44 gr NaH $_2$ PO $_4$ ve 0.24 gr KH $_2$ PO $_4$ tartıldı ve 800 mL distile su içerisinde çözüldü. Çözeltinin pH'ı 7.4'e ayarlandı. Sonrasında toplam hacim distile suyla 1 L'ye tamamlandı. Çözelti otoklav ile sterilize edildikten sonra deneylerde kullanıldı.

3.5.3. ELISA Yöntemi Protokolleri

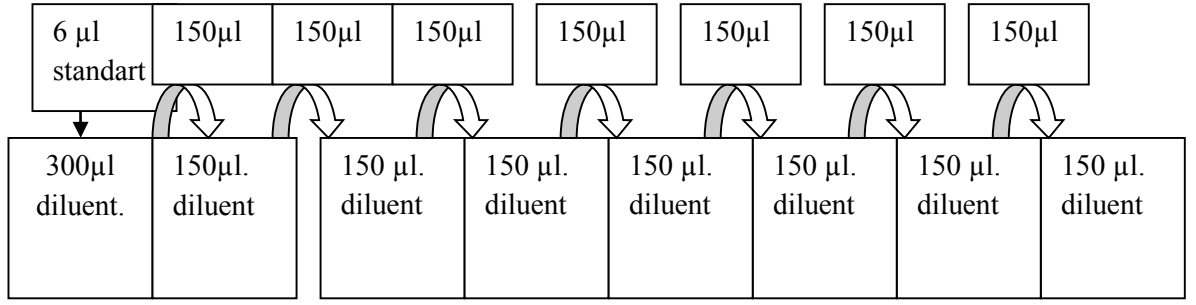
Fare TNF α ELISA (Biolegend – 430901)

Solüsyon hazırlığı:

Capture Antikor: 1/500 dilüsyon ile kit içerisinde gelen hazır sulandırılmış capture antikor kullanıldı.

Detection Antikor: 1/500 dilüsyon ile kit içerisinde gelen hazır sulandırılmış detection antikor kullanıldı.

Standart: Kit içerisinde toz halinde gelen flakon, 200 μ L dilüent ile sulandırıldı. 1. Standart 2000 pg/mL ile başlamaktadır.



Şekil 3.2. Fare TNF α ELISA standart hazırlama yöntemi

Dilüent: PBS içerisinde %1 BSA

Coating buffer: 8.4 gr NaHCO₃ ve 3.56 gr Na₂CO₃ 1 L distile su içerisinde çözüldü ve pH 9,5 olacak şekilde ayarlandı.

Bloklama çözeltisi: PBS içerisinde %1 BSA

Yıkama solüsyonu: PBS içerisinde %0.05 Tween 20

HRP: 1:1000 oranında dilüent ile hazırlandı.

Substrat: TMB A ve B solüsyonları 1:1 oranında gerekli hacimde karıştırıldı ve ışık görmemesi sağlandı.

Durdurma solüsyonu: 2N H₂SO₄ gerekli hacimde kullanıldı.

Capture antikor gerekli miktarda hazırlanıp her bir kuyucuğa 100 µL hacim olacak şekilde 96 kuyucuklu high binding petriye dağıtıldı ve petrinin üzeri kapatıldı.

- Gece boyu +4°C derecede inkübe edilmesi sağlandı.
- 4 kez yıkama solüsyonuyla yıkama işlemi yapıldı.
- Bloklama çözeltisi her bir kuyucuğa 200 µL dağıtıldı.
- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 2 kez yıkama işlemi yapıldı.
- Standart ve örnekler 100 µL olarak kuyucuklara yüklendi.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama işlemi yapıldı.

- Detection antikorunu 100 µL olarak kuyucuklara yüklendi.
- 1,5 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama işlemi yapıldı.
- HRP çözeltisi hazırlanıp 100 µL yüklendi
- 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama işlemi yapıldı.
- Substrat gerekli hacimde hazırlandı ve 100 µL olacak şekilde kuyucuklara dağıtıldı.
- 30 dakika renk değişimine göre karanlıkta oda ısısında inkübe edildi.
- 100 µL durdurma solüsyonu eklendi.
- 450-570 nm dalga boyunda okuma işlemi yapıldı.
- Elde edilen değerler KCjunior programında hesaplandı.

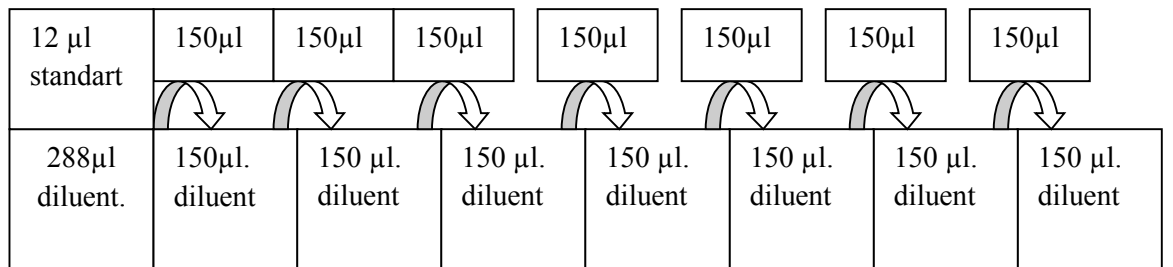
Fare IFN γ ELISA (Biolegend – 430803)

Solüsyon hazırlığı:

Capture Antikor: 1/500 dilüsyon ile kit içerisinde gelen hazır sulandırılmış capture antikor kullanıldı.

Detection Antikor: 1/500 dilüsyon ile kit içerisinde gelen hazır sulandırılmış detection antikor kullanıldı.

Standart: Kit içerisinde toz halinde gelen flakon, 200 µL dilüent ile sulandırıldı. 1. Standart 2000 pg/mL ile başlamaktadır.



Şekil 3.3. Fare IFN γ ELISA standart hazırlama yöntemi

Dilüent: PBS içerisinde %1 BSA

Coating buffer: 8.4 gr NaHCO₃ ve 3.56 gr Na₂CO₃ 1 L distile su içerisinde çözüldü ve pH 9,5 olacak şekilde ayarlandı.

Bloklama çözeltisi: PBS içerisinde %10 FBS

Yıkama solüsyonu: PBS içerisinde %0.05 Tween 20

HRP: 1:1000 oranında dilüent ile hazırlandı.

Substrat: TMB A ve B solüsyonları 1:1 oranında gerekli hacimde karıştırıldı ve ışık görmemesi sağlandı.

Durdurma solüsyonu: 2N H₂SO₄ gerekli hacimde kullanıldı.

Capture antikor gerekli miktarda hazırlanıp her bir kuyucuğa 100 µL hacim olacak şekilde 96 kuyucuklu high binding petriye dağıtıldı ve petrinin üzeri kapatıldı.

- Gece boyu +4°C derecede inkübe edilmesi sağlandı.
- 4 kez yıkama solüsyonuyla yıkama işlemi yapıldı.
- Bloklama çözeltisi her bir kuyucuğa 200 µL dağıtıldı.
- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 2 kez yıkama işlemi yapıldı.
- Standart ve örnekler 100 µL olarak kuyucuklara yüklendi.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama işlemi yapıldı.
- Detection antikoru 100 µL olarak kuyucuklara yüklendi.
- 1,5 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama işlemi yapıldı.
- HRP çözeltisi hazırlanıp 100 µL yüklendi
- 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama işlemi yapıldı.
- Substrat gerekli hacimde hazırlandı ve 100 µL olacak şekilde kuyucuklara dağıtıldı.
- 30 dakika renk değişimine göre karanlıkta oda ısısında inkübe edildi.

- 100 µL durdurma solüsyonu eklendi.
- 450-570 nm dalga boyunda okuma işlemi yapıldı.
- Elde edilen değerler KCjunior programında hesaplandı.

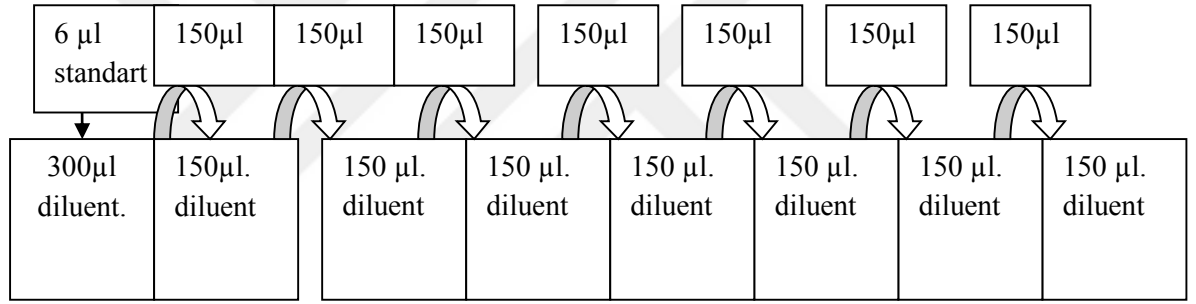
Fare IL-6 ELISA (Biolegend – 431301)

Solüsyon hazırlığı:

Capture Antikor: 1/500 dilüsyon ile kit içerisinde gelen hazır sulandırılmış capture antikor kullanıldı.

Detection Antikor: 1/500 dilüsyon ile kit içerisinde gelen hazır sulandırılmış detection antikor kullanıldı.

Standart: Kit içerisinde toz halinde gelen flakon, 200 µL dilüent ile sulandırıldı. 1. Standart 2000 pg/mL ile başlamaktadır.



Şekil 3.4. Fare IL-6 ELISA standart hazırlama yöntemi

Dilüent: PBS içerisinde %10 FBS

Coating buffer: 8.4 gr NaHCO₃ ve 3.56 gr Na₂CO₃ 1 L distile su içerisinde çözüldü ve pH 9,5 olacak şekilde ayarlandı.

Bloklama çözeltisi: PBS içerisinde %10 FBS

Yıkama solüsyonu: PBS içerisinde %0.05 Tween 20

HRP: 1:1000 oranında dilüent ile hazırlandı.

Substrat: TMB A ve B solüsyonları 1:1 oranında gerekli hacimde karıştırıldı ve ışık görmemesi sağlandı.

Durdurma solüsyonu: 2N H₂SO₄ gerekli hacimde kullanıldı.

Capture antikor gerekli miktarda hazırlanıp her bir kuyucuğa 100 µL hacim olacak şekilde 96 kuyucuklu high binding petriye dağıtıldı ve petrinin üzeri kapatıldı.

- Gece boyu +4°C derecede inkübe edilmesi sağlandı.
- 4 kez yıkama solüsyonuyla yıkama işlemi yapıldı.
- Bloklama çözeltisi her bir kuyucuğa 200 µL dağıtıldı.
- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 2 kez yıkama işlemi yapıldı.
- Standart ve örnekler 100 µL olarak kuyucuklara yüklendi.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama işlemi yapıldı.
- Detection antikoru 100 µL olarak kuyucuklara yüklendi.
- 1,5 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama işlemi yapıldı.
- HRP çözeltisi hazırlanıp 100 µL yüklendi
- 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama işlemi yapıldı.
- Substrat gerekli hacimde hazırlandı ve 100 µL olacak şekilde kuyucuklara dağıtıldı.
- 30 dakika renk değişimine göre karanlıkta oda ısısında inkübe edildi.
- 100 µL durdurma solüsyonu eklendi.
- 450-570 nm dalga boyunda okuma işlemi yapıldı.
- Elde edilen değerler KCjunior programında hesaplandı.

Fare IL-10 ELISA (Biolegend – 431411)

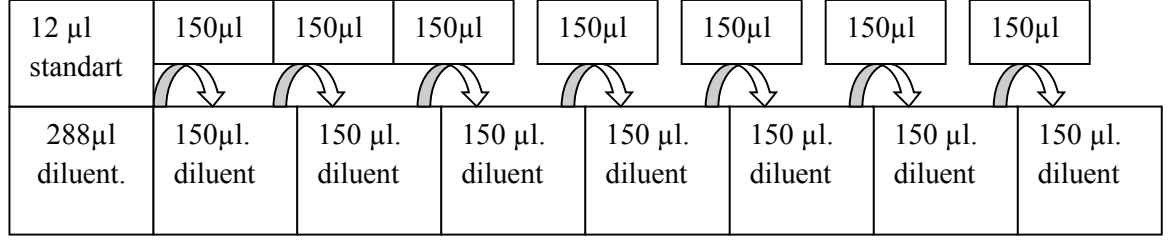
Solüsyon hazırlığı:

Capture Antikor: 1/500 dilüsyon ile kit içerisinde gelen hazır sulandırılmış capture antikor kullanıldı.

Detection Antikor: 1/500 dilüsyon ile kit içerisinde gelen hazır sulandırılmış detection antikor kullanıldı.

Standart: Kit içerisinde toz halinde gelen flakon, 200 µL dilüent ile sulandırıldı. 1. Standart 2000 pg/mL ile başlamaktadır.

Şekil 3.5. Fare IL-10 ELISA standart hazırlama yöntemi



Dilüent: PBS içerisinde %1 BSA

Coating buffer: 8.4 gr NaHCO₃ ve 3.56 gr Na₂CO₃ 1 L distile su içerisinde çözüldü ve pH 9,5 olacak şekilde ayarlandı.

Bloklama çözeltisi: PBS içerisinde %10 FBS

Yıkama solüsyonu: PBS içerisinde %0.05 Tween 20

HRP: 1:1000 oranında dilüent ile hazırlandı.

Substrat: TMB A ve B solüsyonları 1:1 oranında gerekli hacimde karıştırıldı ve ışık görmemesi sağlandı.

Durdurma solüsyonu: 2N H₂SO₄ gerekli hacimde kullanıldı.

Capture antikor gerekli miktarda hazırlanıp her bir kuyucuğa 100 µL hacim olacak şekilde 96 kuyucuklu high binding petriye dağıtıldı ve petrinin üzeri kapatıldı.

- Gece boyu +4°C derecede inkübe edilmesi sağlandı.
- 4 kez yıkama solüsyonuyla yıkama işlemi yapıldı.
- Bloklama çözeltisi her bir kuyucuğa 200 µL dağıtıldı.
- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 2 kez yıkama işlemi yapıldı.
- Standart ve örnekler 100 µL olarak kuyucuklara yüklendi.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama işlemi yapıldı.

- Detection antikorunu 100 µL olarak kuyucuklara yüklendi.
- 1,5 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama işlemi yapıldı.
- HRP çözeltisi hazırlanıp 100 µL yüklendi
- 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama işlemi yapıldı.
- Substrat gerekli hacimde hazırlandı ve 100 µL olacak şekilde kuyucuklara dağıtıldı.
- 30 dakika renk değişimine göre karanlıkta oda ısısında inkübe edildi.
- 100 µL durdurma solüsyonu eklendi.
- 450-570 nm dalga boyunda okuma işlemi yapıldı.
- Elde edilen değerler KCjunior programında hesaplandı.

3.6. Akış Sitometrisi

Hücre yüzeyinde eksprese edilen belirteçleri antikorlar ile işaretleyerek hücrelerin fenotipleri akış sitometri yöntemi ile belirlenmiştir. Farelerden elde edilen immün dokuların parçalanması ile elde edilen hücreler akış sitometrisi için kullanılan hazır alınmış “cell wash” (BD – 349524) tampon çözeltisi ile sulandırılmıştır. Hazırlanan lizatlar dalak, lenf nodu ve tümör olarak üç gruba ayrılmış ve tüplere (100 µL) dağıtıldıktan sonra 5'er µL antikor eklenmiştir. Kullanılan antikorlar şu şekildedir;

- CD4: Yardımcı T hücrelerin yüzeyinde eksprese edilir ve sınıf II MHC molekülüne bağlanmayı sağlar (PerCP/Cy5.5 antimouse CD4 (Biolegend – 116012)).
- CD8a: Sitotoksik T hücrelerin yüzeyinde eksprese edilir ve sınıf I MHC molekülüne bağlanmayı sağlar (FITC antimouse CD8a (Biolegend – 100706)).
- CD11b: Lökositler üzerinde yaygın olarak eksprese edilir ve adhezyon moleküllerine tutunmayı sağlar (PerCP/Cy5.5 antimouse CD11b (Biolegend – 101228))
- Gr1: Granülositler ve makrofajlar üzerinde eksprese edilmektedir (FITC antimouse Gr1 (Biolegend – 108406))

- TRPV1: Hücrelerin yüzeylerinde eksprese edilen Ca^{+2} kanalıdır (PE antibiotin (Biolegend – 409004))

Akış sitometrisinde TRPV1 antikoruna doğrudan işaretlenememiştir. Bunun yerine biotin bağlı TRPV1 (Bioss – bs1931R) antikoruna önce kullanılmış, inkübasyondan sonra biotine bağlanması için antibiotin antikoruna kullanılmıştır. Kullandığımız Sysmex Cube 6 cihazı 488 nm mavi lazer kullandığından dolayı üç farklı boya kullanılmıştır. Akış sitometrisi için belirlenen protokol izlenmiştir;

- Dokular lizat haline getirilir.
- Her bir tüpe 100 µL dağıtılır.
- Belirlenen antikorlardan 3 µL eklenir.
- 30 dakika karanlıkta oda ısısında inkübe edilir.
- 2 defa 1 mL cell wash tampon çözeltisi ile yıkama işlemi yapılır (1G, 3 dakika)
- Son yıkamadan sonra %1 PFA içeren cell wash ile 1 mL hacme tamamlanır.

3.6.1 %8 Paraformaldehit Hazırlanması

- 150 mL distile su 55-60C sıcaklığa getirilir ve 65C'yi aşmaması sağlanır.
- 16 gr PFA (Paraformaldehit) tartılır (Electron Microscopy Science – 19200) ve su ile karıştırılır.
- 1 saat karıştıktan sonra 10-15 damla sodyum hidroksit (NaOH – Fisher (SS225-1)) eklenir, çözelti berraklaşana kadar karıştırılır.
- Çözelti berrak bir hale geldikten sonra son hacim 200 mL'ye tamamlanır.
- İstenilen miktardaki hacim sulandırılarak elde edilir.

3.7. Genel İstatistiksel Analizler

Deney gruplarına göre Student's t-testi ve tek yönlü ANOVA testleri kullanıldı. Hayvan deneylerinde her bir grupta 4'er fare kullanıldı ve hücre kültürü deneyleri kendi içlerinde 4'er tekrarlı gerçekleştirildi. Akış sitometrisi deneyleri ise 3'er tekrarlı gerçekleştirildi. $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi. Analizler GraphPad Prism 8 yazılımı kullanılarak yapıldı.

3.8. Kullanılan TRPV1 Ajanlarının Hazırlığı

Capsaicin (Sigma – M2028): 10 mg, 818,6 µl DMSO ile çözüldü. Kullanılmak üzere 40 mM stok solüsyon hazırlandı. 1 µM doz için gereken miktar stok solüsyondan alınarak sulandırıldı. -20°C derecede saklandı.

Olvanil (Tocris – 0934):10 mg, 2.4 mL DMSO ile çözüldü, kullanılmak üzere 10 mM stok solüsyon hazırlandı. 1 µM doz için gereken miktar stok solüsyondan alınarak sulandırıldı. -20°C derecede saklandı.

Capsazepine (Santa Cruz- 138977-28-3): 10 mg, 2,65 mL DMSO ile çözüldü, kullanılmak üzere 10 mM stok solüsyon hazırlandı. 1 µM doz için gereken miktar stok solüsyondan alınarak sulandırıldı. -20°C derecede saklandı.

3.9. Çalışmalarda Kullanılan Sarf Malzemeler, Kimyasallar, Kitler ve Cihazlar

Bu çalışmada tüm gereçler Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi laboratuvarında sağlandı ve tüm deneyler bu araştırma laboratuvarında yürütüldü. Hayvan deneyleri için Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi laboratuvarı kullanıldı.

3.9.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

- Hücre kültür petrisi, 100 mm (Corning)
- 6 kuyucuklu hücre kültür petrisi (Corning)
- 96 kuyucuklu hücre kültür pleyti (Corning)
- Santrifüj tüpleri (15 mL ve 50 mL – BD)
- Steril pipetler (BD)
- Pipet uçları (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) (Thermo scientific)
- Akış sitometrisi tüpleri (3,5 mL Sarstedt)
- 1,5 ml'lik deney tüpü (Axygen)
- Enjektör
- Hemasitometre (Thoma Lamı, Marienfeld- C964730)

3.9.2 Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

- Fare IFN γ ELISA Kit (Biolegend – 430803)
- Fare IL-6 ELISA Kit (Biolegend – 431301)
- Fare IL-10 ELISA Kit (Biolegend – 431411)
- Fare TNF α ELISA Kit (Biolegend – 430901)
- TMB Substrat (Biolegend – 421101)
- PerCP/Cy5.5 antimouse CD4 (Biolegend – 116012)
- FITC antimouse CD8a (Biolegend – 100706)
- PerCP/Cy5.5 antimouse CD11b (Biolegend – 101228)
- FITC antimouse Gr1 (Biolegend – 108406)
- PE antibiotin (Biolegend – 409004)
- FITC antimouse CD45 (Biolegend – 103108)
- FITC antimouse CD3e (Biolegend – 100306)
- Biotin bağlı TRPV1 Antikoru (Bioss- bs1931R)
- FBS (Fetal Dana Serumu – Gibco, 10270106)
- Gentamisin (Nzytech MB16601)
- DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Biochrom F4815)
- RPMI-1640 (Gibco – 21875-034)
- Non-essential amino asid (Biochrom – K0293)
- Tyrpsin-EDTA %0.25 (Sigma – T4049)
- Sodyum pirüvat 100 mM (Santa Cruz)
- Cell Wash tampon çözeltisi (BD – 349524)
- Capsaicin (Sigma – M2028)

- Olvanil (Tocris – 0934)
- Capsazepine (Santa Cruz – 138977-28-3)
- Lipopolisakkarit (Sigma – L8274)
- Concanavalin A (Sigma (L7647)
- Rekombinant IL-10 protein (Biolegend – 575802)
- Rekombinant IFng protein (Biolegend – 575306)

3.9.3 Kullanılan Aletler ve Gereçler

- Inverted mikroskop (Olympus)
- Class II Lamin AİR (Esco)
- CO2 inkübatörü (Thermo)
- Buzdolabı (+4C ve -20C – Beko)
- Santrifüj (Eppendorf)
- Mikro santrifüj (Eppendorf)
- Derin dondurucu (-80C – Thermo)
- Sıvı azot tankı
- Vorteks karıştırıcı (Velp)
- Su banyosu (Memmert)
- Otoklav (Nüve)
- Akış sitometrisi Cihazı (Sysmex Cube 6)
- Spektrofotometre (Thermo)
- Hassas Terazi (Denver Instrument)
- Çeker ocak
- pH metre

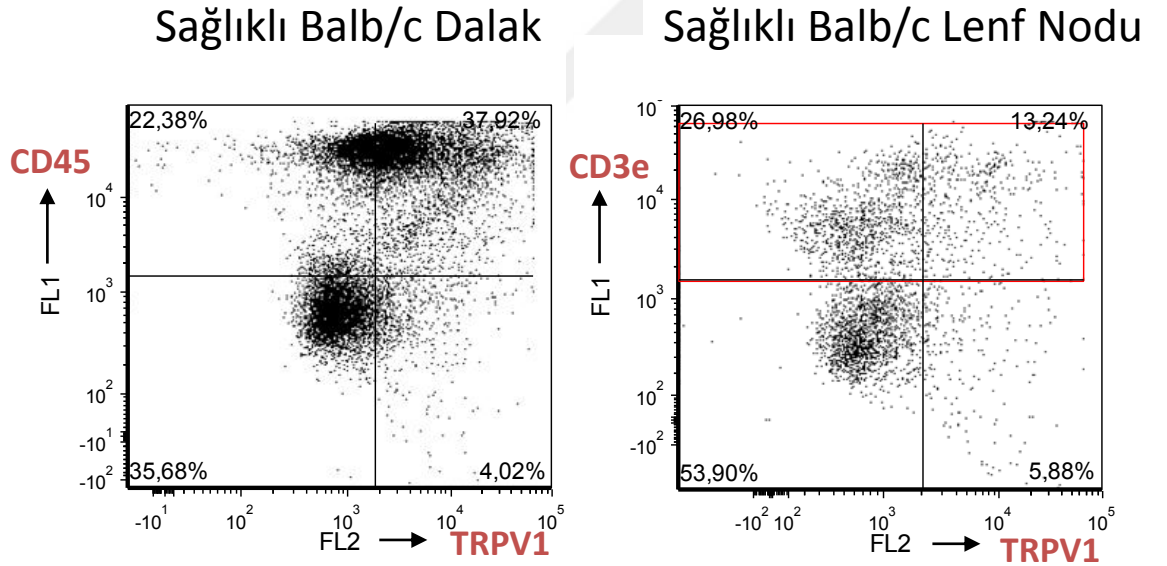
- Pipetler
- Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı
- Distile su cihazı (GFL)
- Buz Makinası (Uğur)



4. BULGULAR

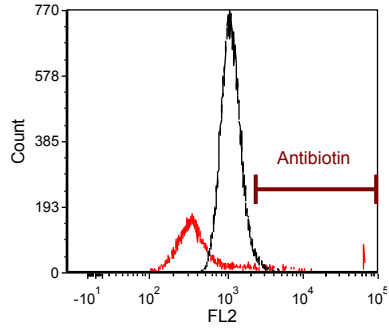
4.1. Sağlıklı Fareler ile 4TBM ve 4TLM Taşıyan Farelerin İmmün Hücrelerindeki TRPV1 Ekspresyonlarındaki Değişimler

Beyine metastaz yapan 4TBM meme karsinom ve karaciğere metastaz yapan 4TLM meme karsinom varlığında immün hücrelerde TRPV1 ekspresyonlarındaki değişiklikler araştırıldı. Farelere 4TBM ve 4TLM metastatik meme karsinom hücreleri enjekte edildikten 14 gün sonrasında fareler sakrifiye edildi ve dalak, lenf nodları ve tümör dokuları toplandı. İmmün hücrelerin fenotiplerini ve TRPV1 ekspresyonlarını görmek için gereken antikorlarla işaretleme yapıldıktan sonra akış sitometresinde örnekler analiz edildi. Primer tümör dokusunda CD4 ve CD8a eksprese eden hücrelerin sayısı oldukça düşük olduğu gözlemlendi ve anlamlı bir değişiklik görülmedi. Gözlemlenen değişiklikler şekil altlarında belirtilmiştir.

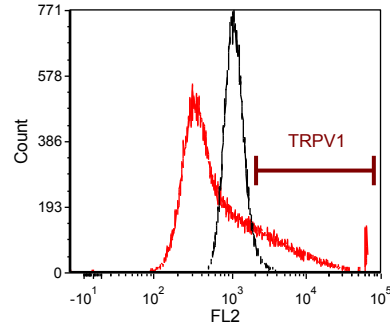


Şekil 4.1. Sağlıklı hayvanlarda CD45 ve CD3e eksprese eden hücrelerde TRPV1 ekspresyonu. İlk olarak TRPV1 işaretlemesi denenmiştir. Sağlıklı hayvanlarda CD45 eksprese eden hücrelerin yaklaşık %38'i, CD3e eksprese eden hücrelerin ise %13'ünün TRPV1 eksprese ettiği görülmüştür. Kullanılacak antikor miktarı belirlendikten sonra deneylere devam edilmiştir.

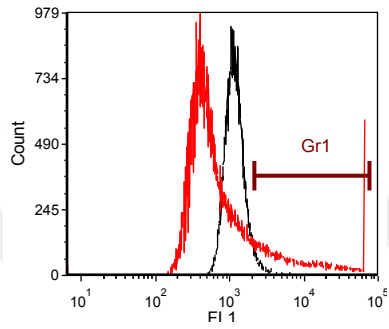
PE Antibiotin Marker (Dalak)



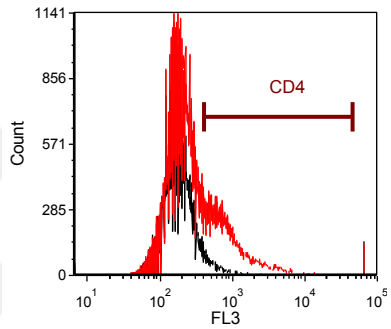
TRPV1+PE Antibiotin Marker (Dalak)



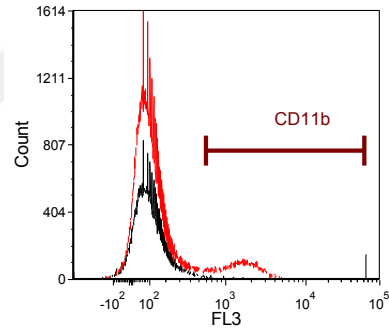
FITC Gr1 Marker (Dalak)



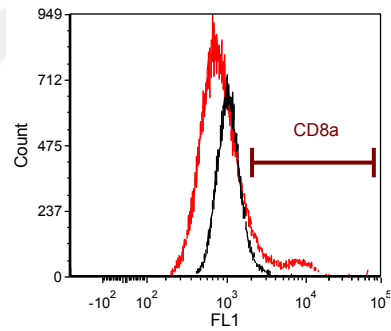
PerCP/Cy5.5 CD4 Marker (Lenf Nodu)



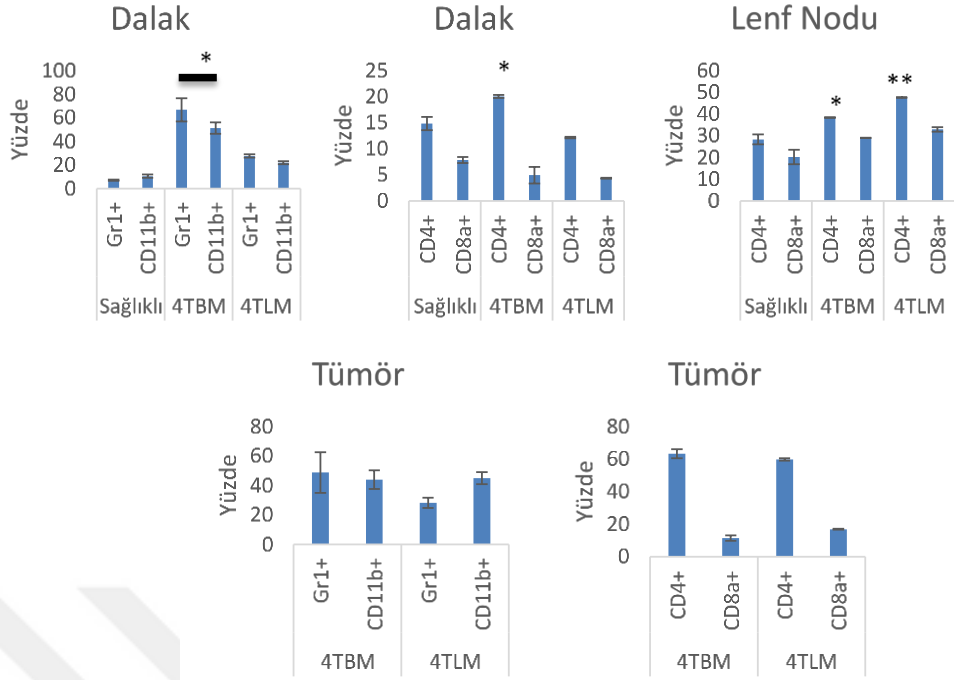
PerCP/Cy5.5 CD11b Marker (Dalak)



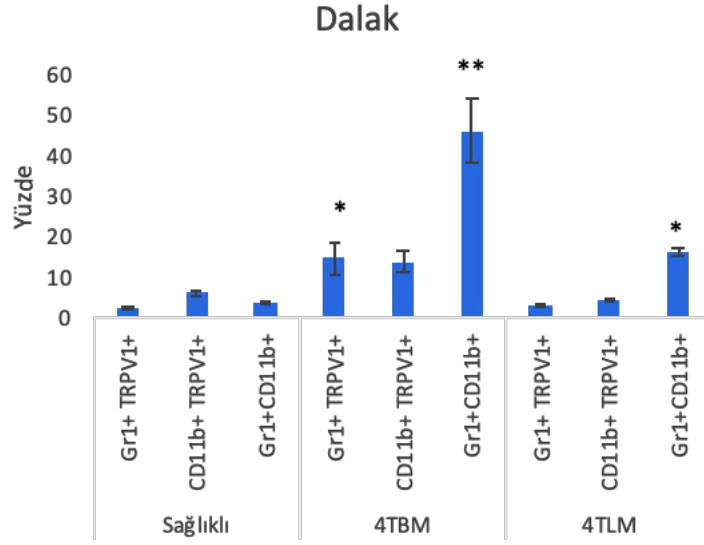
FITC CD8a Marker (Lenf Nodu)



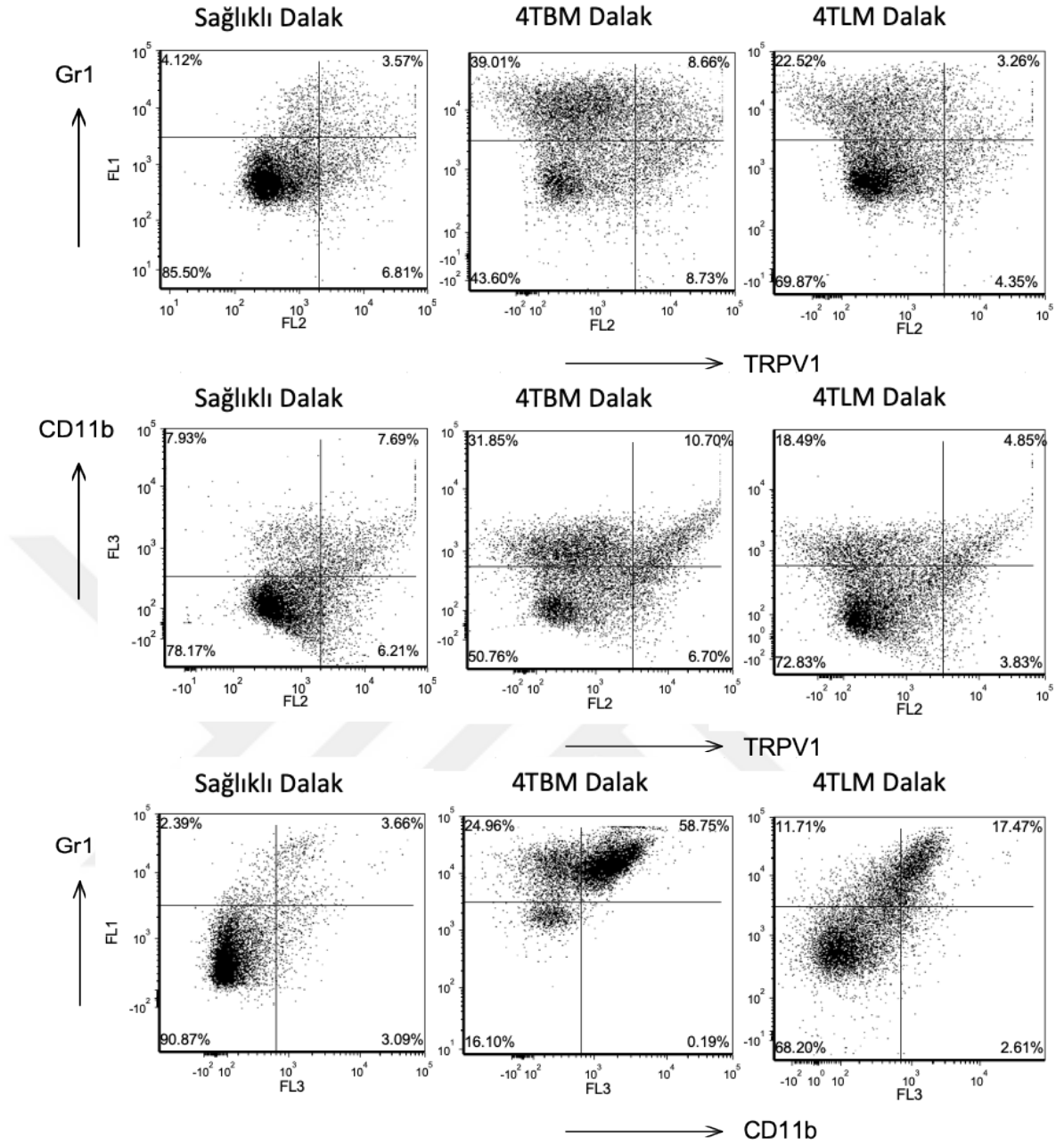
Şekil 4.2. Kullanılan antikorların kesim noktaları. Histogram üzerinde kırmızı renkli pikler kullanılan PE, FITC, PerCP/Cy5.5 IgG izotip kontrol işaretlemelerini gösterirken, siyah renkli pikler ise işaretlenen yüzey belirteçlerini göstermektedir.



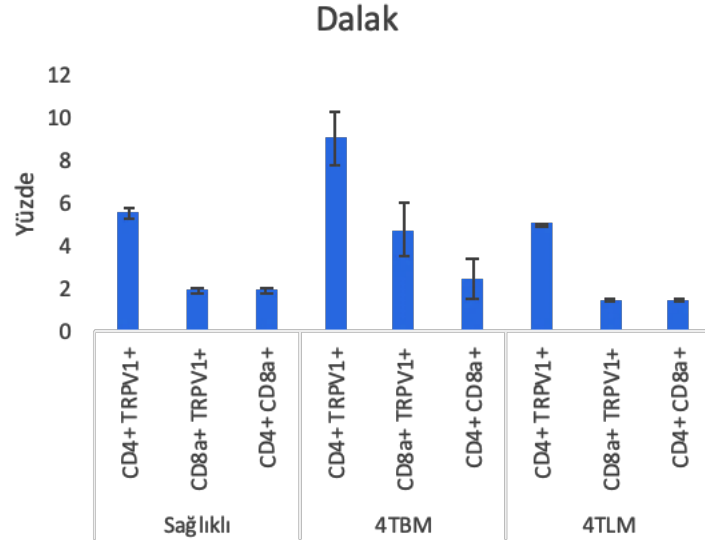
Şekil 4.3. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerde CD4, CD8a, CD11b ve Gr1 eksprese eden immün hücrelerin oranları. 4TBM taşıyan farelerin dalaklarında Gr1, CD11b ve CD4 eksprese eden hücrelerin sayısı sağlıklı ve 4TLM taşıyan farelere göre artmıştır. Lenf nodlarında ise CD4+ hücrelerin sayısı 4TBM varlığında sağlıklı hayvanlara göre artmış; 4TLM varlığında ise daha da artmıştır. *p<0.05, **p<0.05.



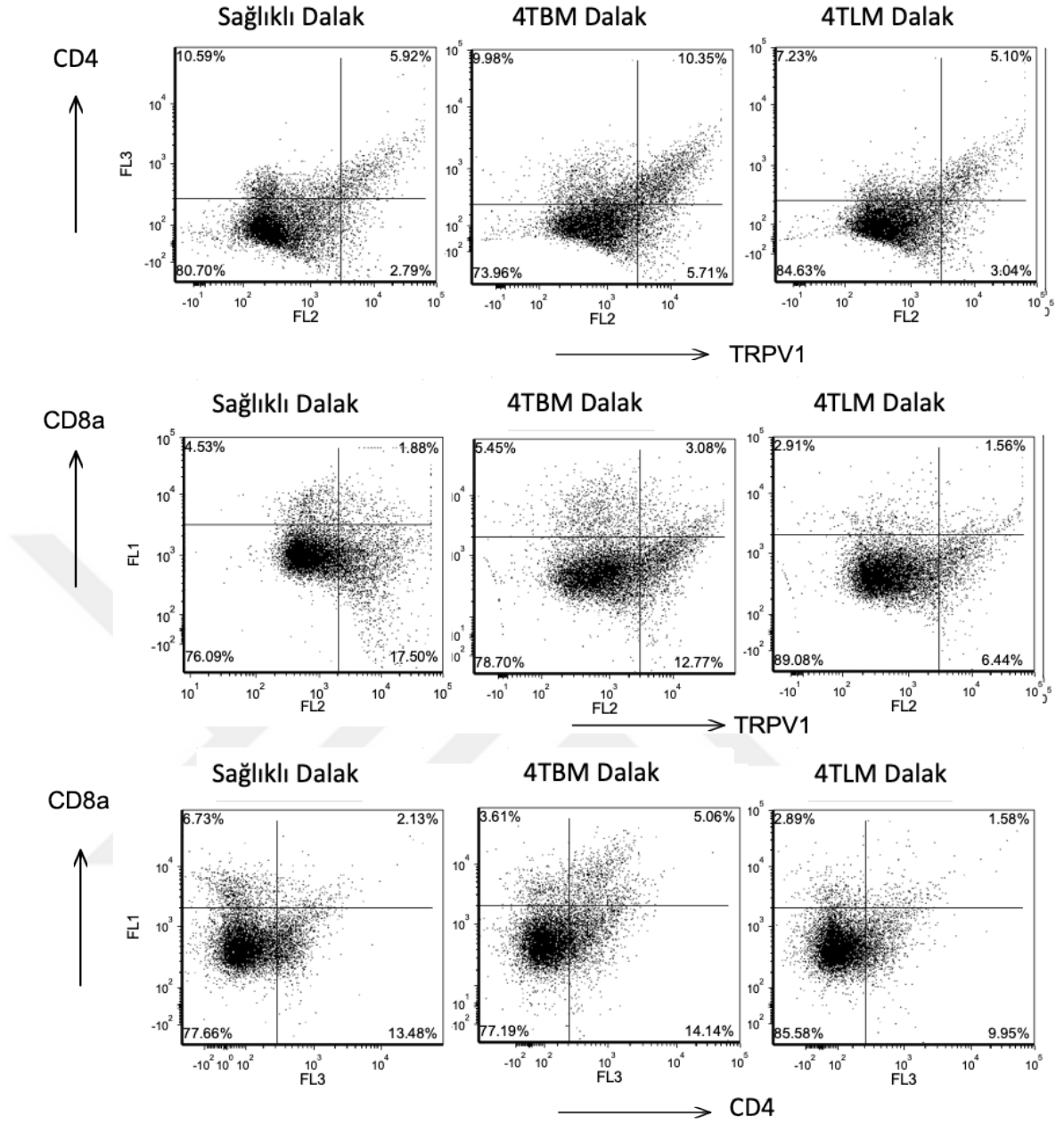
Şekil 4.4. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin dalaklarında CD11b ve Gr1 ile TRPV1 eksprese eden hücrelerin oranları. 4TBM taşıyan farelerin dalaklarında Gr1+ eksprese eden hücrelerde TRPV1 ekspresyonu sağlıklı ve 4TLM farelerinde göre anlamlı olarak artmıştır. 4TBM ve 4TLM farelerin dalaklarındaki Gr1+ CD11b+ eksprese eden myeloid kökenli baskılayıcı hücrelerin sayısı sağlıklı farelere göre artmıştır. Bunun yanında 4TBM farelerdeki Gr1+ CD11b+ hücrelerinin sayısındaki artışı, 4TLM'den de fazladır. * $p < 0.05$



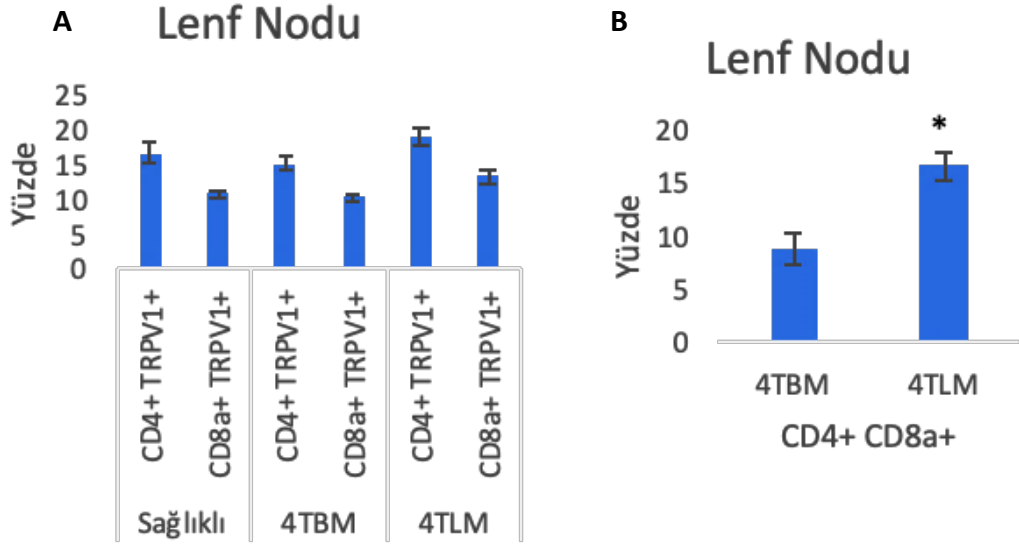
Şekil 4.5. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin dalaklarından elde edilen Gr1, CD11b ve TRPV1 eksprese eden hücrelerin dot plot görüntüsü. 4TBM taşıyan farelerin dalaklarında Gr1+ eksprese eden hücrelerde TRPV1 ekspresyonu sağlıklı ve 4TLM farelerinde göre anlamlı olarak artmıştır. 4TBM ve 4TLM farelerin dalaklarındaki Gr1+ CD11b+ eksprese eden myeloid kökenli baskılayıcı hücrelerin sayısı sağlıklı farelere göre artmıştır. Bunun yanında 4TBM farelerdeki Gr1+ CD11b+ hücrelerinin sayısındaki artış, 4TLM'den de fazladır.



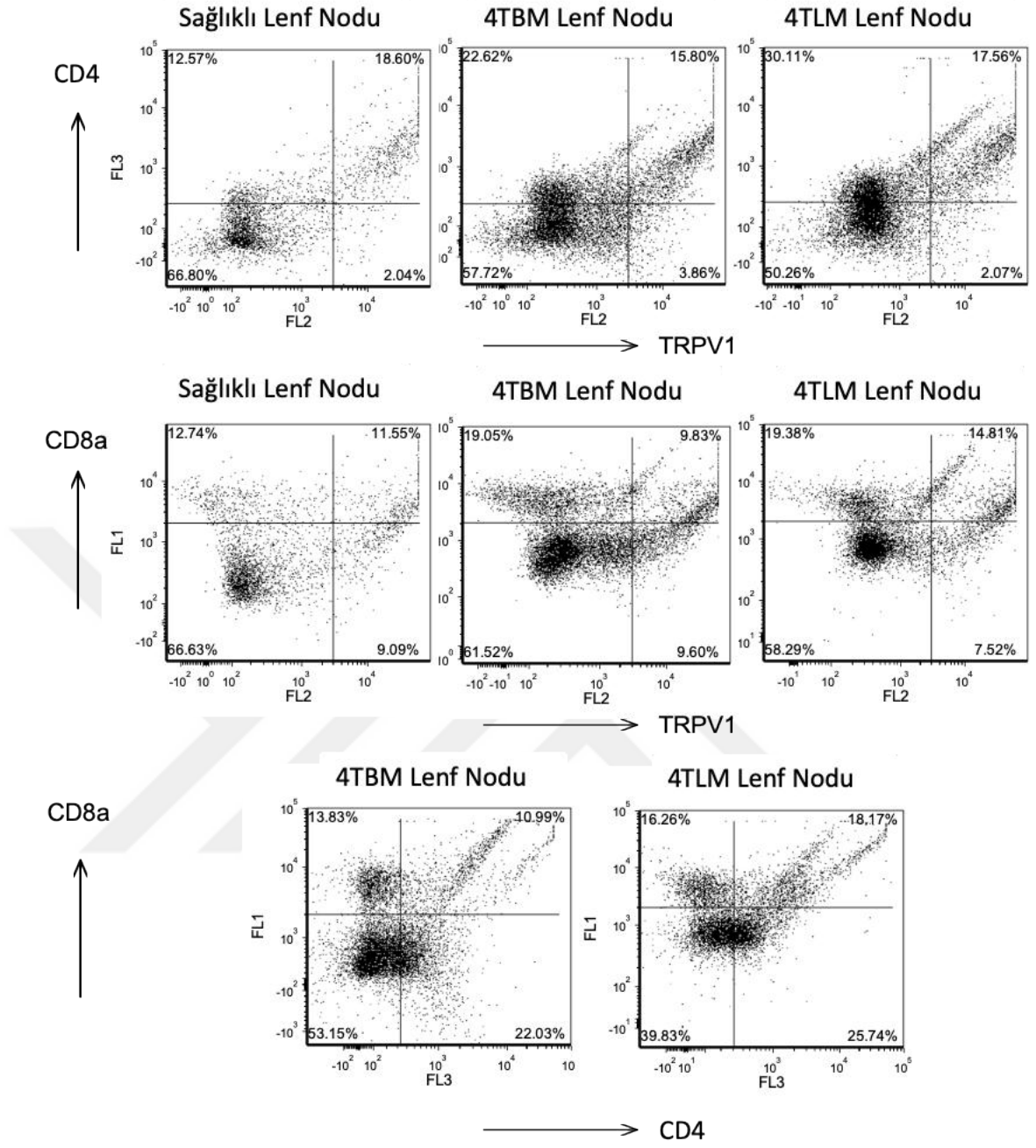
Şekil 4.6. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin dalaklarından elde edilen CD4 ve CD8a ile TRPV1 eksprese eden hücrelerin oranları. Hücre sayılarında anlamlı bir değişiklik olmamıştır.



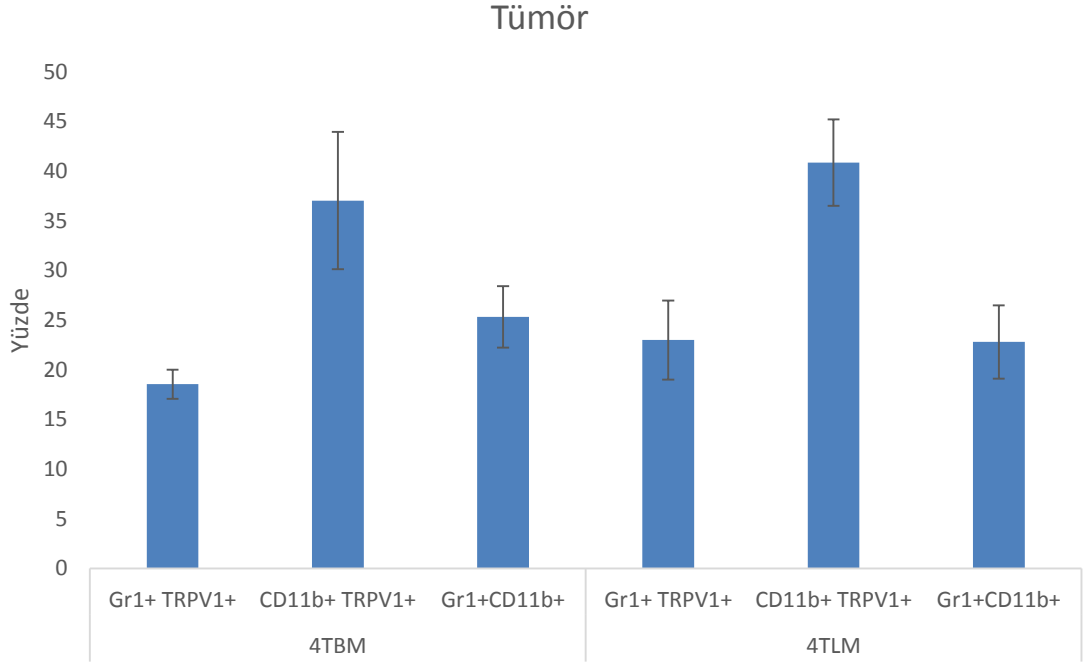
Şekil 4.7. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin dalaklarından elde edilen CD4, CD8a ve TRPV1 eksprese eden hücrelerin dot plot görüntüleri. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin dalaklarından elde edilen CD4, CD8a ve TRPV1 eksprese eden hücrelerin sayılarında anlamlı bir değişiklik olmamıştır.



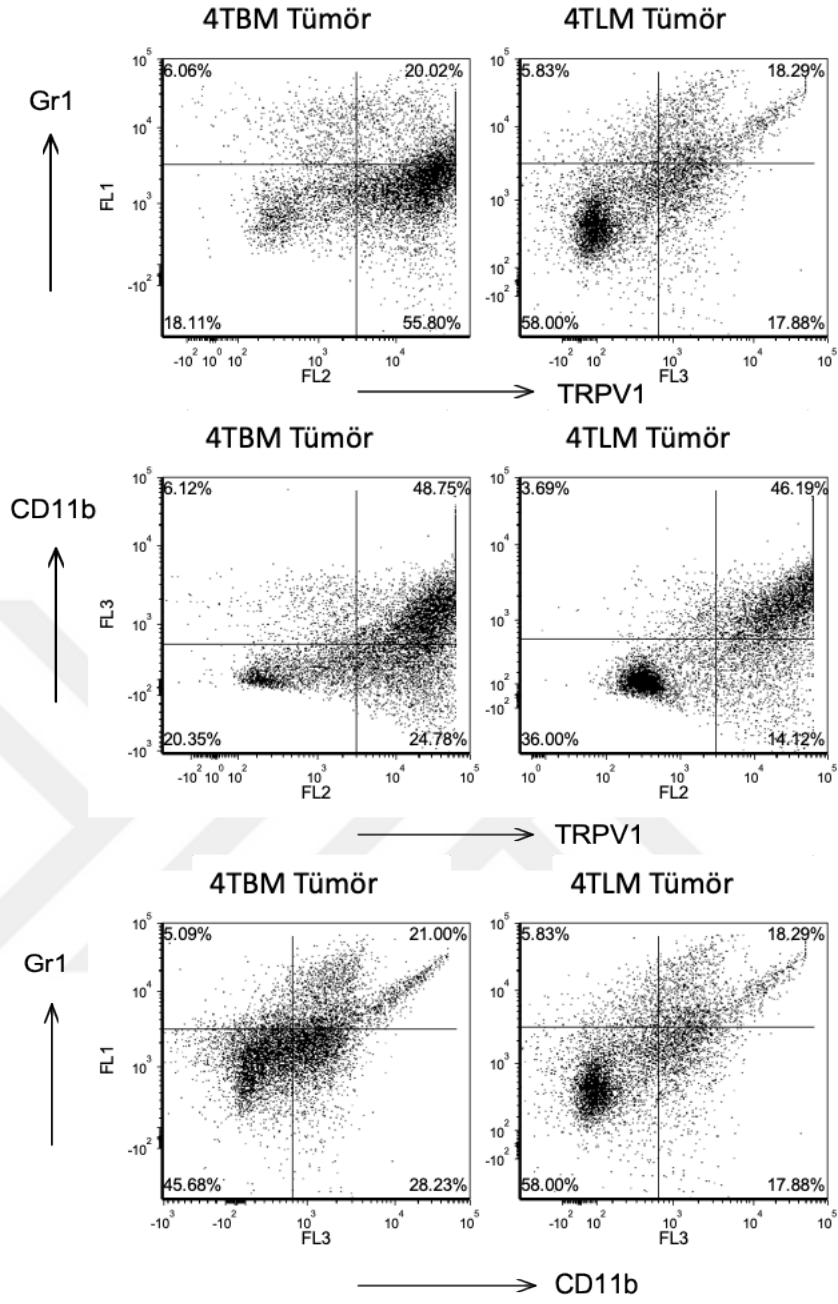
Şekil 4.8. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin lenf nodlarından elde edilen CD4, CD8a ve TRPV1 eksprese eden hücrelerin oranları. Hücrelerin sayısında anlamlı bir değişiklik olmamıştır (Panel A). Fakat 4TLM farelerde CD4+ CD8a+ hücrelerin sayısı 4TBM farelere göre anlamlı ölçüde artmıştır (Panel B). *p<0.05



Şekil 4.9. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin lenf nodlarından elde edilen CD4, CD8a ve TRPV1 eksprese eden hücrelerin dot plot görüntüleri. 4TLM farelerde CD4+ CD8a+ hücrelerin sayısı 4TBM farelere göre anlamlı ölçüde arttığı görülmektedir.



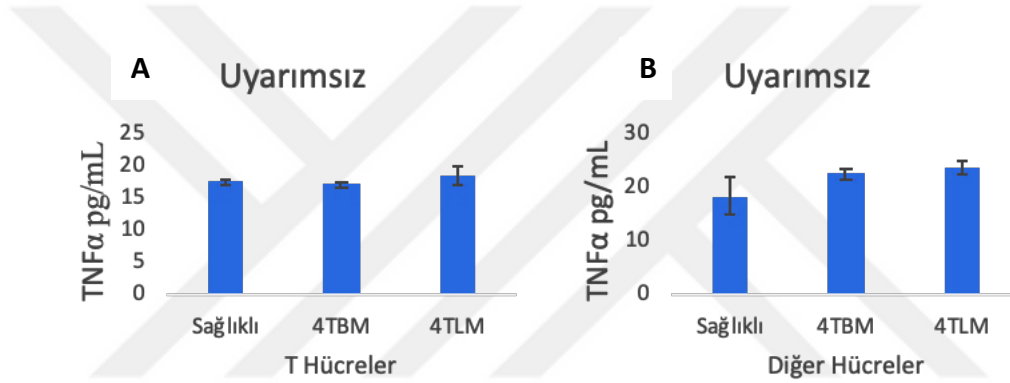
Şekil 4.10. 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin tümör dokusunda Gr1 ve CD11b ile TRPV1 ekspres eden hücrelerin oranları. Tümör dokularında Gr1+TRPV1+, CD11b+ TRPV1+ ve Gr1+ CD11b+ hücrelerin sayılarında anlamlı bir değişiklik olmamıştır.



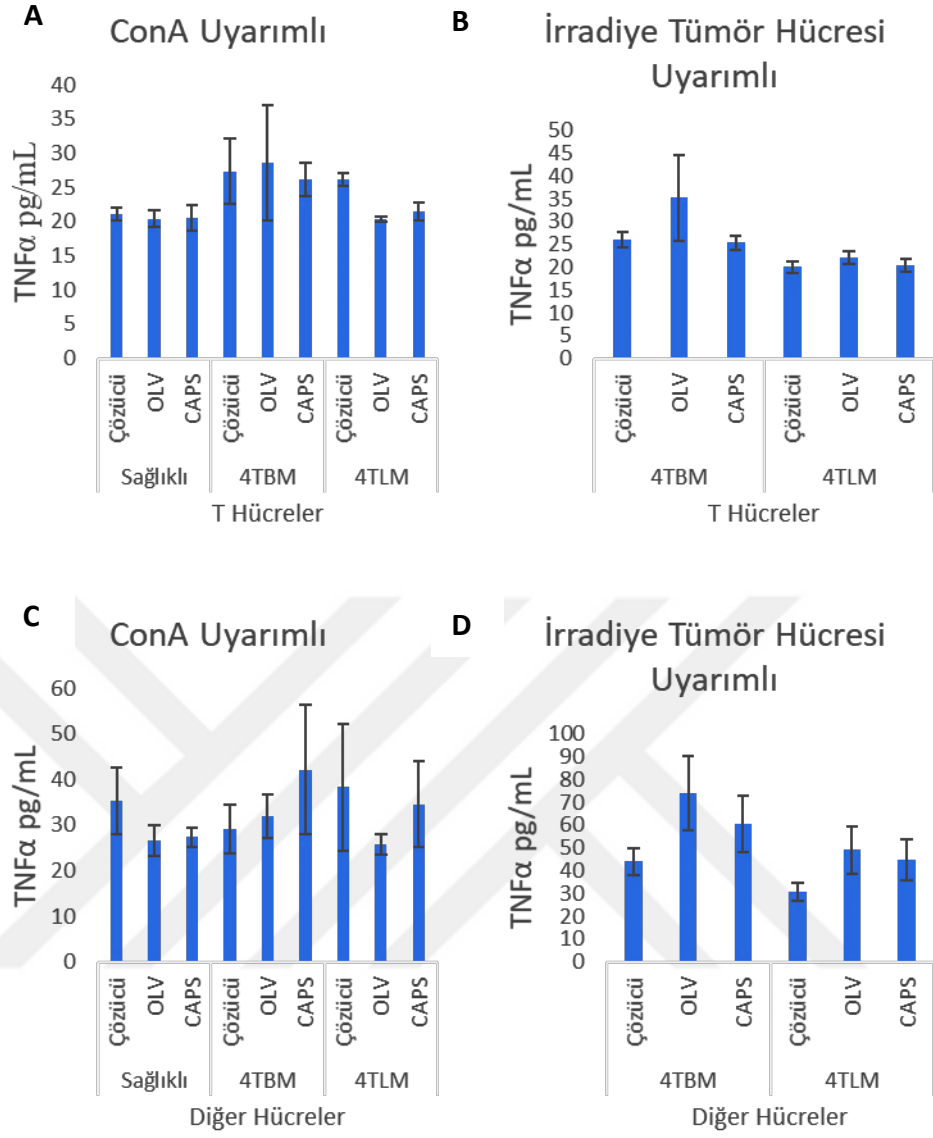
Şekil 4.11. 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin tümör dokusunda Gr1 ve CD11b ile TRPV1 ekspres eden hücrelerin dot plot görüntüleri. 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin tümör dokusunda Gr1+TRPV1+, CD11b+ TRPV1+ ve Gr1+ CD11b+ hücrelerin dot plot görüntüsü verilmiştir. Hücre sayılarında anlamlı bir değişiklik olmamıştır.

4.2. Sağlıklı Fareler ile 4TBM ve 4TLM Taşıyan Farelerin İmmün Hücrelerinin In Vivo Sitokin Salınımlarına TRPV1 Agonisti Olvanil ve Capsaicin'in Etkisi

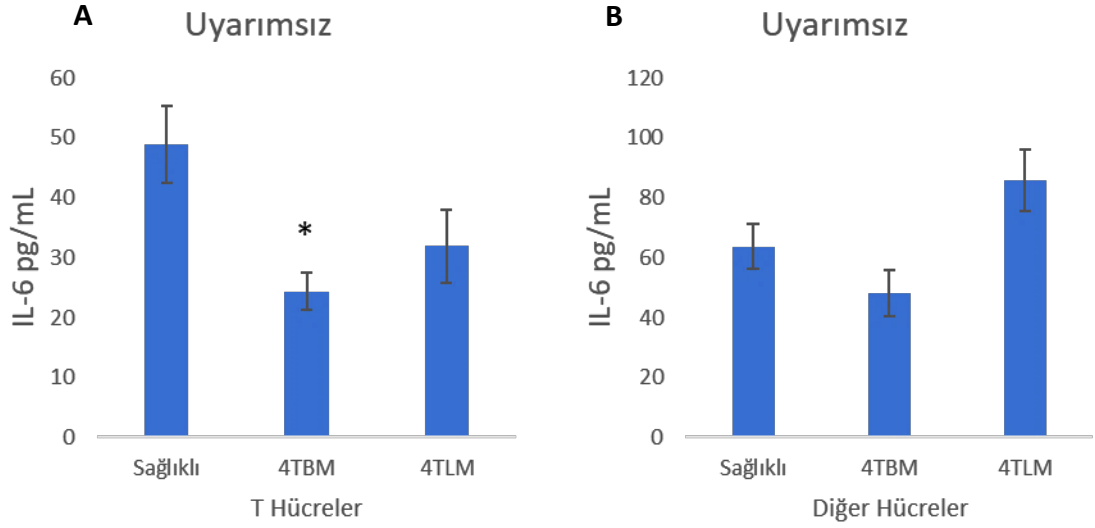
Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin tümör varlığında sitokin salınımlarındaki değişiklikler ile Concanavalin A ve irradie edilmiş tümör hücreleriyle uyarıldıklarında oluşan sitokin değişimleri ELISA yöntemi ile belirlendi. 4TBM ve 4TLM hücreleri enjekte edilen fareler enjeksiyondan 14 gün sonra sakrifiye edildi ve dalak ve lenf nodları toplandı. Bu dokulardan hücreler elde edildikten sonra karıştırıldı ve T hücreler negatif manyetik izolasyonla ayrıştırıldı ve hücre kültürüne alındı. Kalan hücreler de diğer hücreler adı altında hücre kültürüne alındı. Hücreler uyarıların yanında Capsaicin ve Olvanil ile ex vivo tedavi edildi. Sitokin salınımları üzerine değişiklikler araştırıldı.



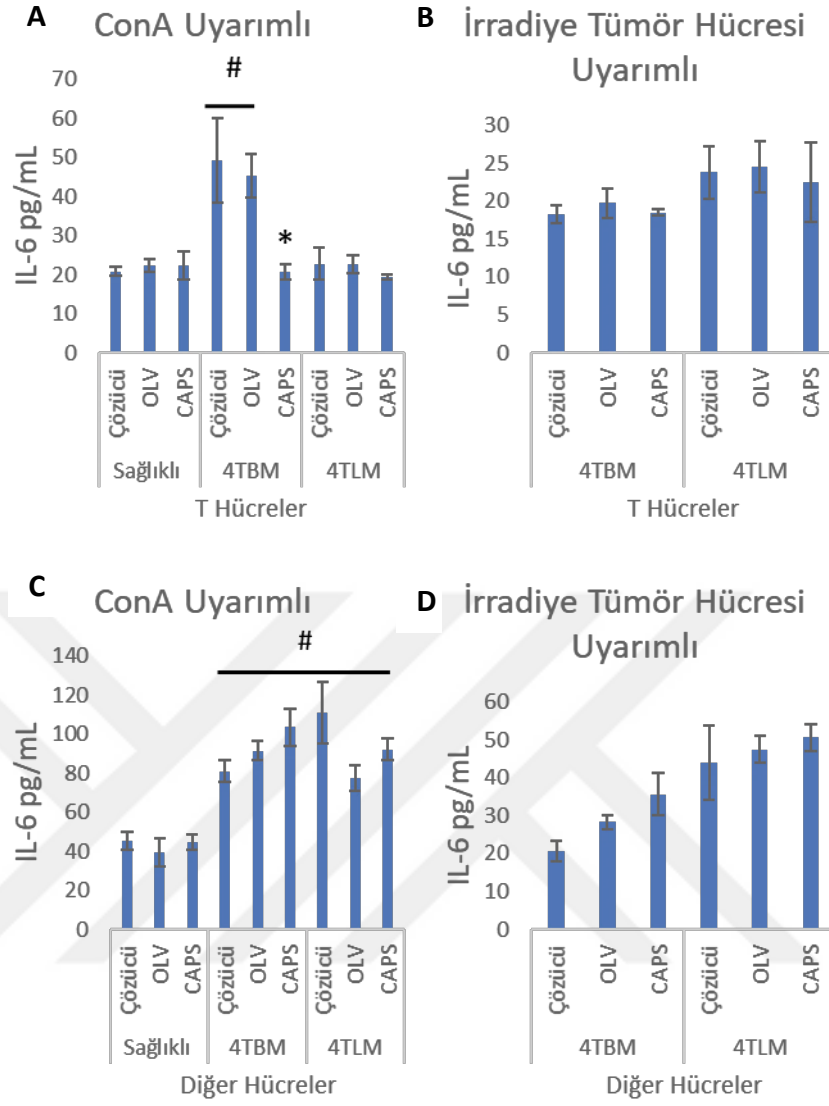
Şekil 4.12. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerden elde edilen T hücreler ve diğer hücrelerin TNFα seviyelerindeki değişiklikler. Herhangi bir uyarım olmadığında elde edilen hücrelerin TNFα salınımlarında anlamlı bir değişiklik olmamıştır (Panel A ve B).



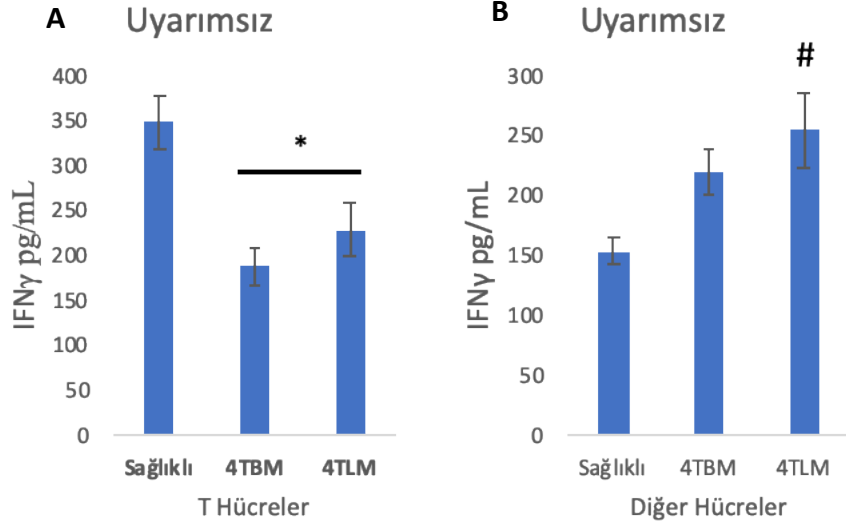
Şekil 4.13. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerden elde edilen T hücreler ve diğer hücrelerin uyarım varlığında TNF α seviyelerindeki değişiklikler. T hücreler ve diğer hücreler Concanavalin A (Panel A ve C) ve irradie tümör hücresi (Panel B ve D) ile uyarılmış, ex vivo TRPV1 agonisti Olvanil (OLV) ve Capsaicin (CAPS) uygulandığında hücrelerin TNF α salınımlarında anlamlı bir değişiklik olmamıştır.



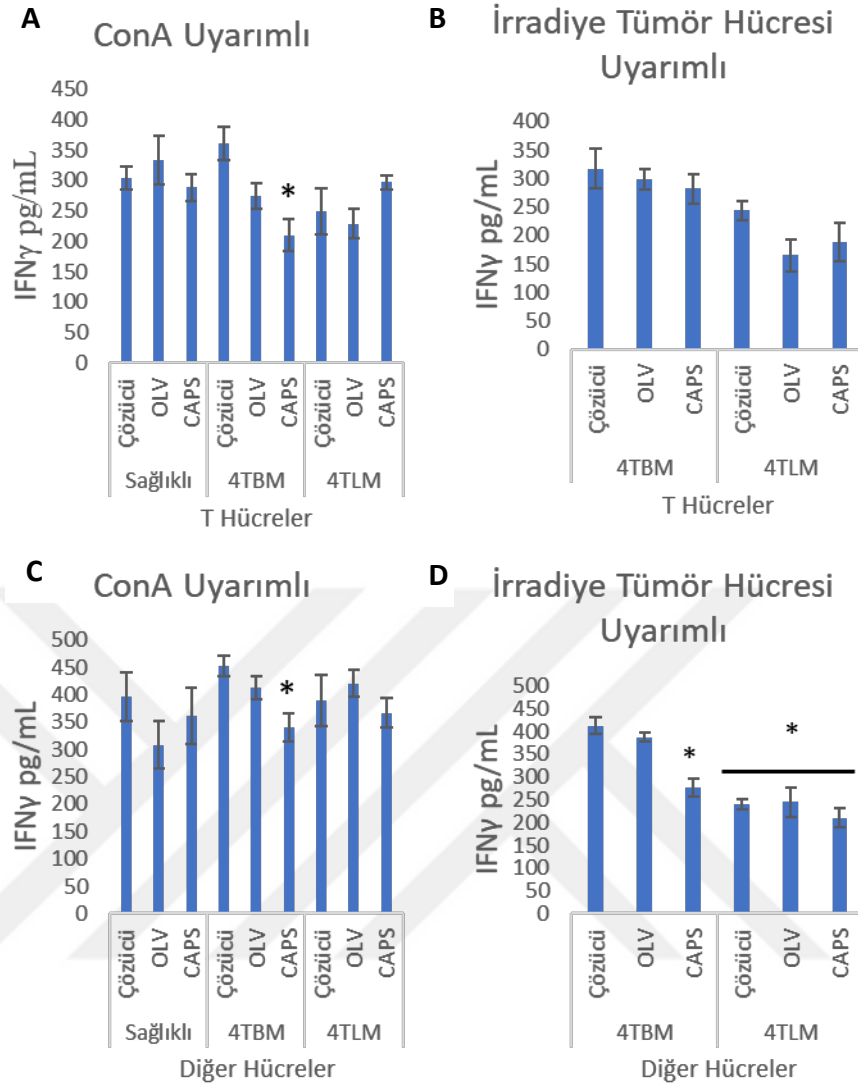
Şekil 4.14. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerden elde edilen T hücreler ve diğer hücrelerin IL-6 seviyelerindeki değişiklikler. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin immün dokularından elde edilen T hücreler herhangi bir uyarım olmadığında IL-6 salınımı 4TBM taşıyan farelerin hücrelerinde anlamlı olarak azalmıştır (Panel A). Diğer hücrelerde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Panel B). * $p < 0.05$.



Şekil 4.15. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerden elde edilen T hücreler ve diğer hücrelerin uyarım varlığında IL-6 seviyelerindeki değişiklikler. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin immün dokularından elde edilen T hücreler ConA ile uyarılmış, artan IL-6 salınımı capsaicin uygulamasıyla IL-6 azalmıştır (Panel A). Diğer hücrelerde ConA ile uyarıldığında tümör taşıyan farelerden elde edilen diğer hücrelerin IL-6 salınımları sağlıklı farelere göre artmış, ilaçlar ise etkilememiştir (Panel C). İrradiye tümör hücresiyle uyarılan T hücreler ile diğer hücrelerin IL-6 seviyeleri değişmemiştir. # $p < 0.05$, * $p < 0.05$.



Şekil 4.16. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerden elde edilen T hücreler ve diğer hücrelerin IFN γ seviyelerindeki değişiklikler. Tümör taşıyan farelerin T hücrelerinde IFN γ salınımı sağlıklı farelere göre anlamlı ölçüde azalmıştır (Panel A). 4TLM'den elde edilen diğer hücrelerin IFN γ salınımı sağlıklı farelere ve 4TBM taşıyan farelere göre anlamlı ölçüde artmıştır (Panel B). * $p < 0.05$, # $p < 0.05$.

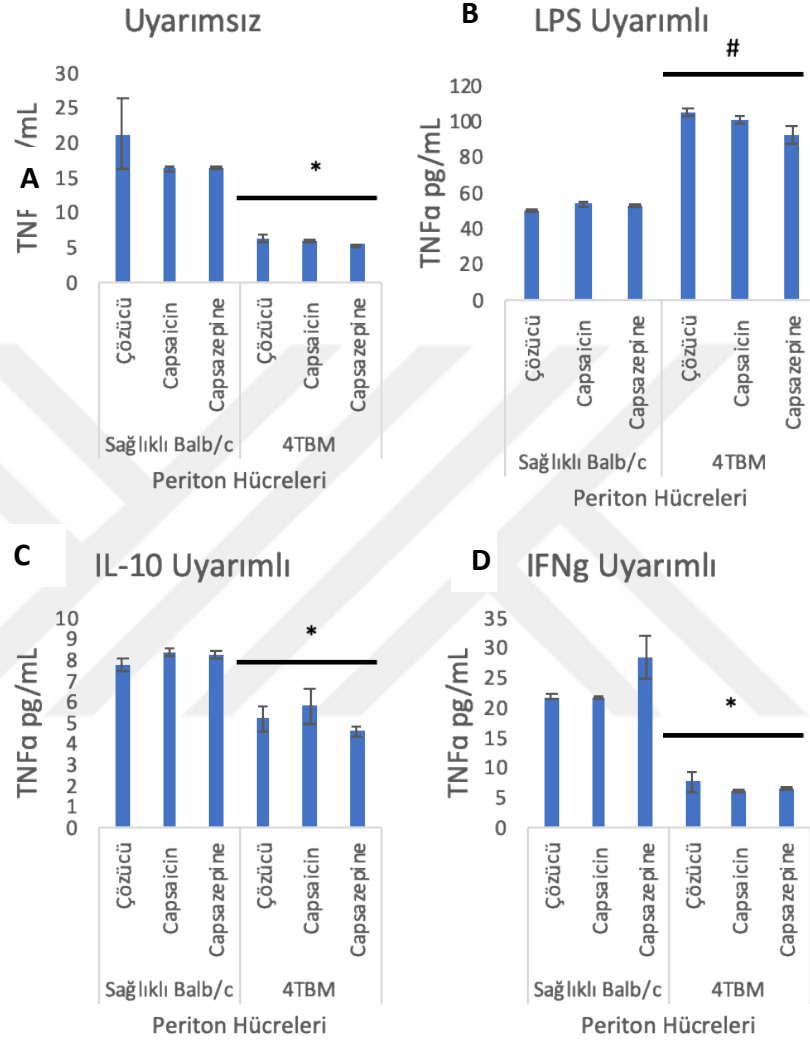


Şekil 4.17. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerden elde edilen T hücreler ve diğer hücrelerin uyarım varlığında IFN γ seviyelerindeki değişiklikler. ConA uyarımı varlığında 4TBM taşıyan farelerden elde edilen T hücreler (Panel A) ve diğer hücrelerin (Panel C) IFN γ salınımı capsaisin uygulamasıyla azalmıştır. İrradiye tümör hücresi uyarımı T hücrelerin IFN γ yanıtını değiştirmemiştir (Panel B). 4TBM taşıyan farelerden elde edilen diğer hücrelerin IFN γ salınımı capsaisin uygulamasıyla azalmıştır, 4TBM'ye göre ise 4TLM'den elde edilen diğer hücrelerin IFN γ salınımı anlamlı ölçüde azalmıştır (Panel D). * $p < 0.05$, # $p < 0.05$

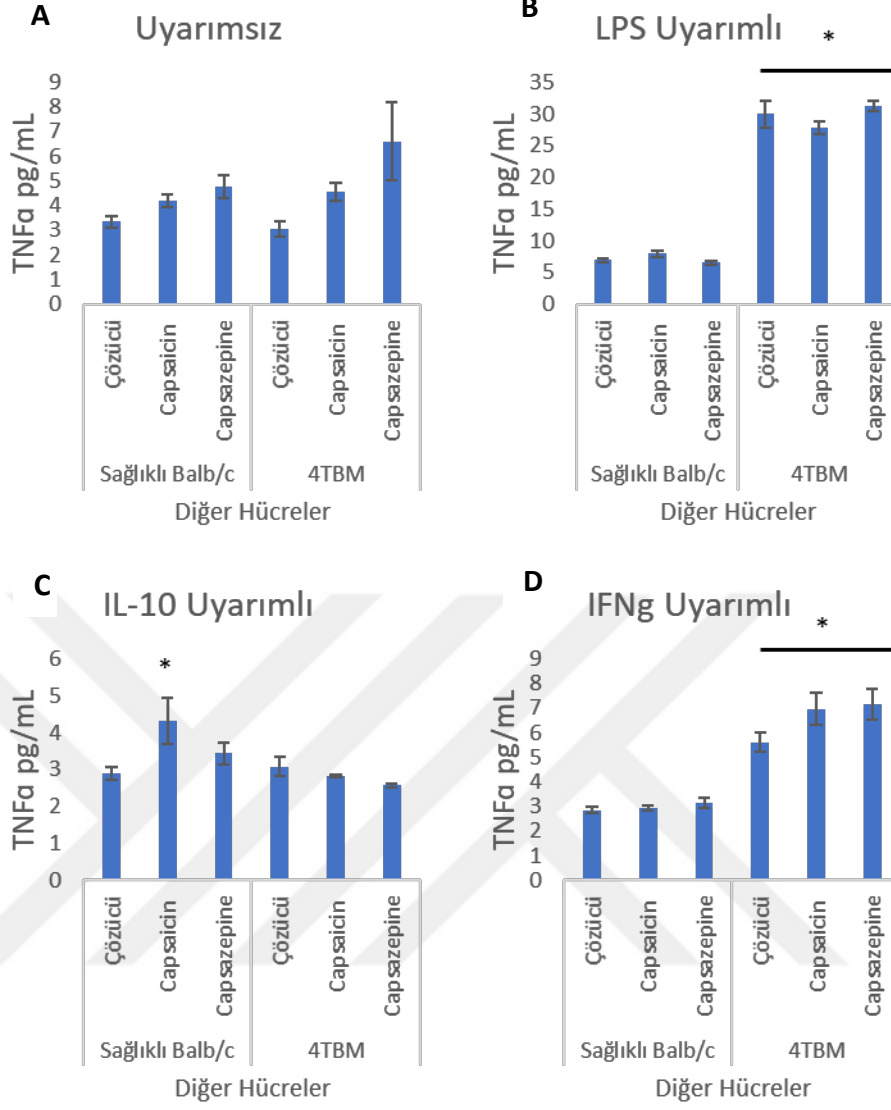
4.3. Sağlıklı Fareler ile 4TBM Taşıyan Farelerin In Vivo Sitokin Salınımları ve TRPV1 Agonisti Capsaicin ve TRPV1 Antagonisti Capsazepine Etkisi

Sağlıklı ve 4TBM taşıyan farelerin in vivo sitokin salınımlarına ex vivo TRPV1 agonisti Capsaicin ve TRPV1 antagonisti Capsazepine'in etkileri ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. Farelere 4TBM enjekte edildikten 14 gün sonrasında yine dalak ve lenf nodları toplanmıştır. Ayrıca fareler sakrifiye edilmeden önce peritona %3 FBS içeren serum fizyolojik enjekte edilmiş ve 5 dakika sonra sıvı toplanmıştır. Bu sıvıda ağırlıklı makrofajlar bulunmaktadır. Peritondan toplanan hücreler de ayrı bir platte hücre

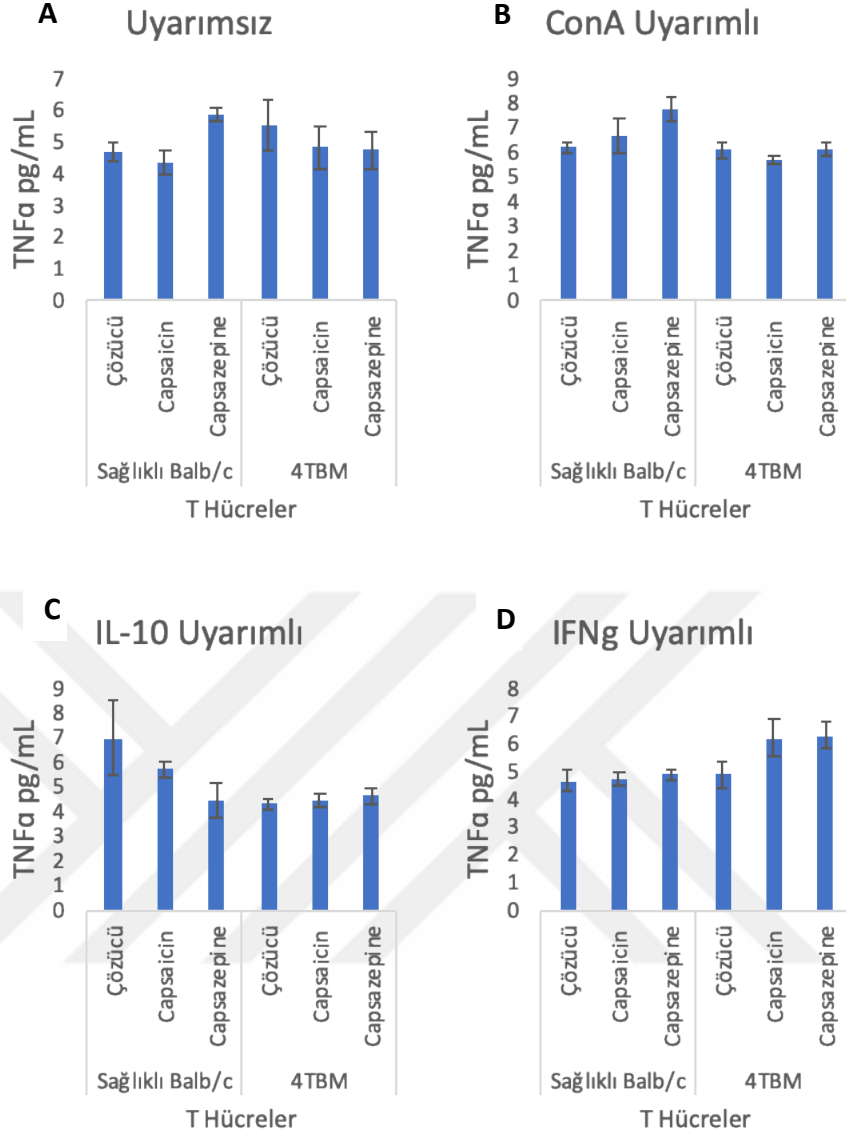
kültürüne alınmıştır. Toplanan immün dokulardan hücreler elde edilmiş ve T hücreler negatif manyetik izole edildikten sonra hücre kültürüne alınmıştır. Kalan hücreler ise diğer hücreler olarak isimlendirilmiş ve ayrıca hücre kültürüne alınmıştır. Hücreler ayrıca LPS, rekombinant IL-10 ve rekombinant IFN γ proteinleri ile uyarılmıştır.



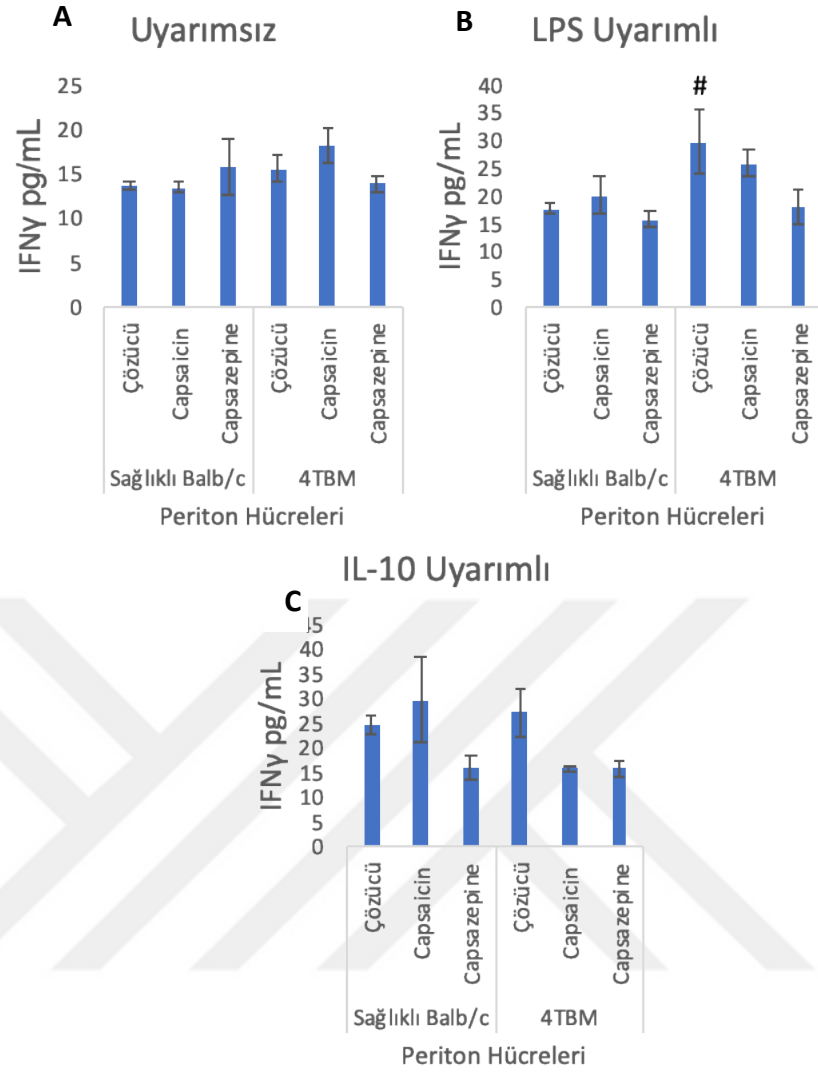
Şekil 4.18. Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen periton hücrelerinin TNF α seviyelerindeki değişiklikler. Hücreler uyarılmadığında 4TBM taşıyan farelerden elde edilen periton hücreleri sağlıklı farelere göre TNF α seviyeleri azalmıştır (Panel A). LPS varlığında sağlıklı farelere göre TNF α seviyeleri artmış (Panel B) ancak rekombinant IL-10 ve IFN γ ile uyarıldıklarında TNF α seviyeleri yine anlamlı ölçüde azalmıştır (Panel C ve D). *p<0.05, #p<0.05



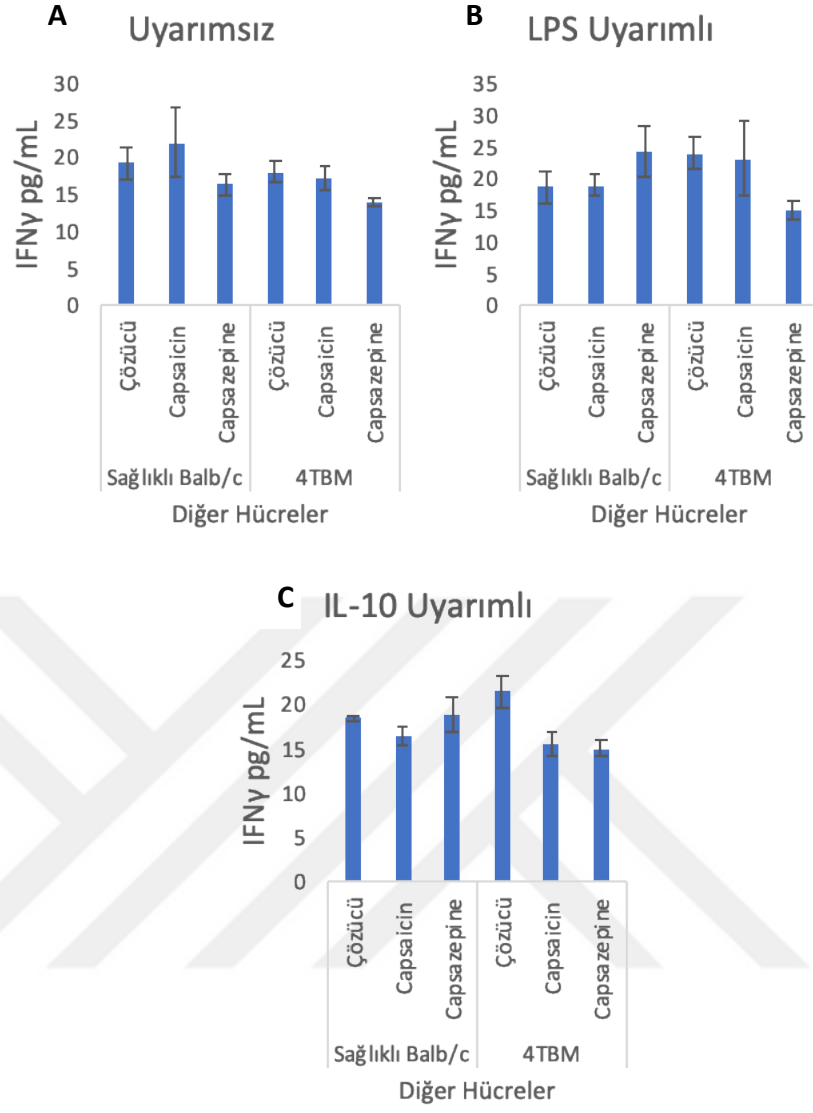
Şekil 4.19. Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen diğer hücrelerinin TNF α seviyelerindeki değişiklikler. Uyarım olmadığında hücrelerin TNF α seviyeleri değişmemiştir (Panel A). 4TBM taşıyan farelerden elde edilen diğer hücreler LPS (Panel B) ve IFN γ ile uyarıldıklarında (Panel D) TNF α salınımları artmıştır. İlginç olarak sağlıklı farelerden elde edilen hücrelere rekombinant IL-10 uyarımında capsaicin uygulandığında TNF α salınımları artmıştır (Panel C). * $p < 0.05$



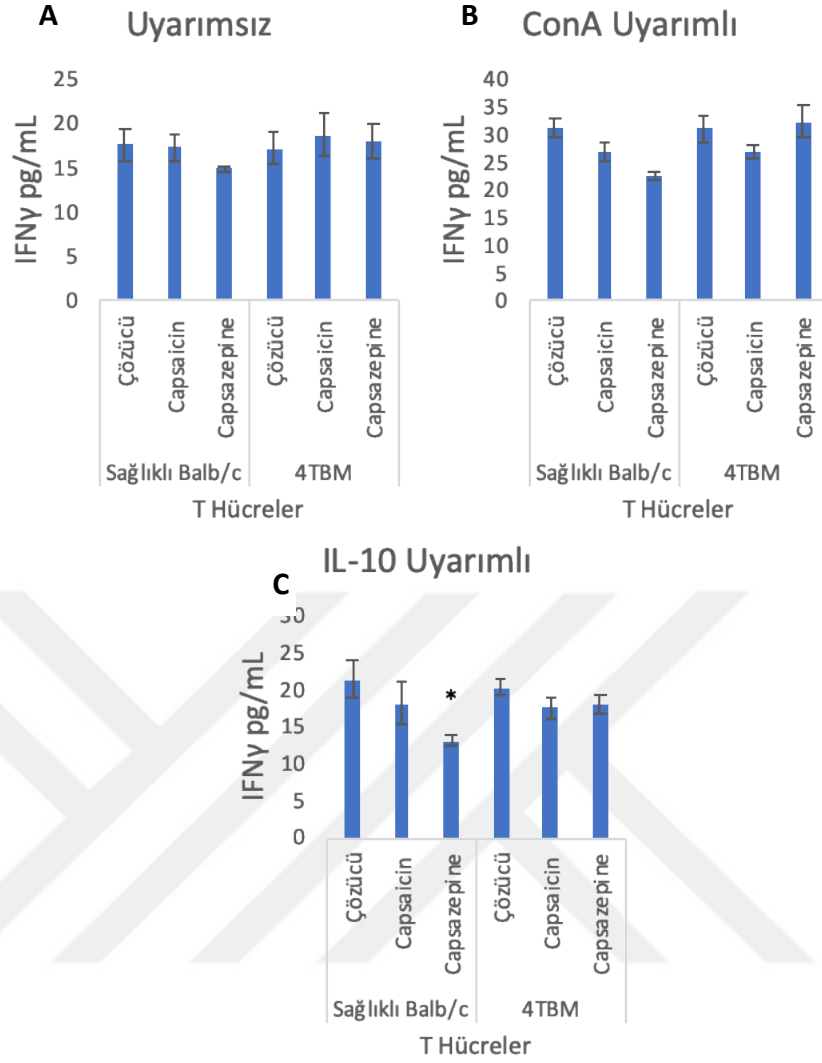
Şekil 4.20. Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen T hücrelerinin TNF α seviyelerindeki değişiklikler. Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen T hücrelerinin TNF α salınımlarında bir değişiklik gözlenmemiştir (Panel A-D).



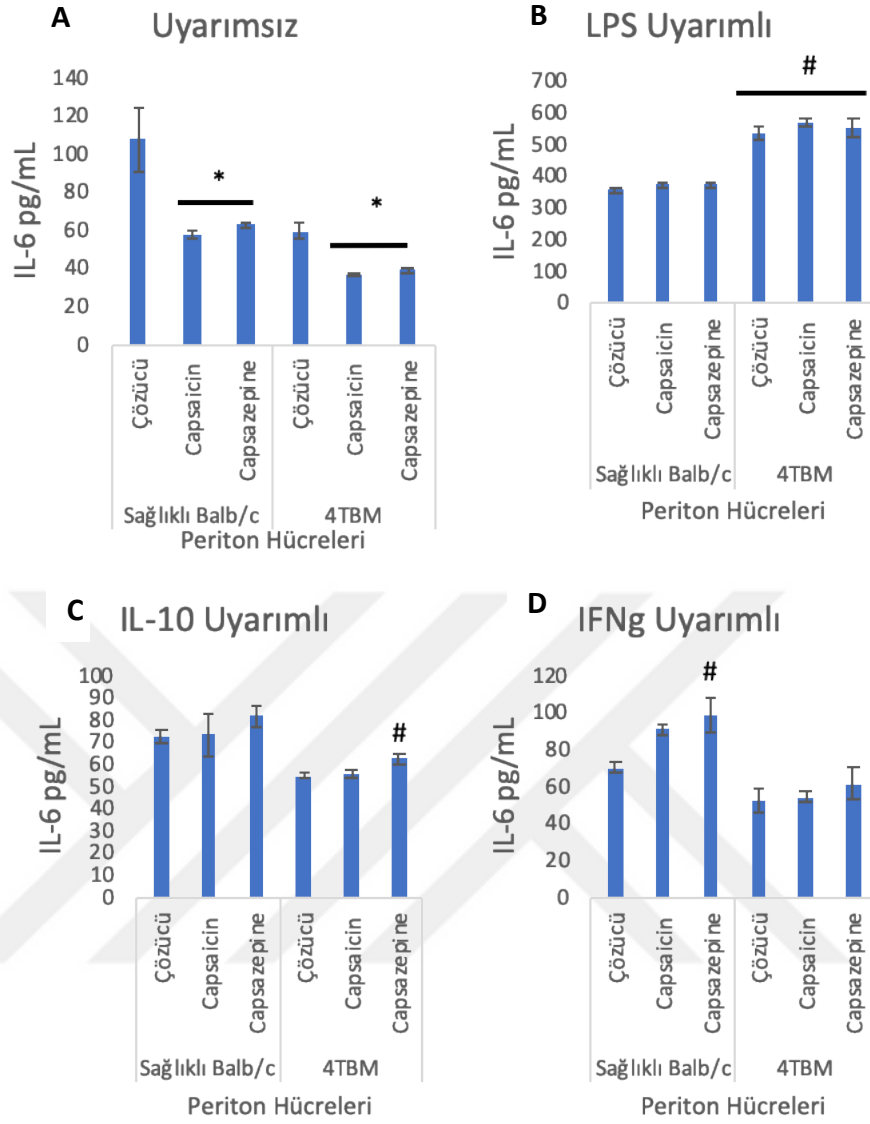
Şekil 4.21. Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen periton hücrelerinin IFN γ seviyelerindeki değişiklikler. 4TBM taşıyan farelerden elde edilen periton hücreler LPS ile uyarıldıklarında IFN γ salımı sağlıklı farelere göre artmıştır fakat ex vivo ilaç uygulaması etkili olmamıştır (Panel B). Rekombinant IL-10 protein ile uyarım veya herhangi bir uyarım olmadığında IFN γ salınımlarında bir değişiklik gözlenmemiştir (Panel A ve C). # $p < 0.05$.



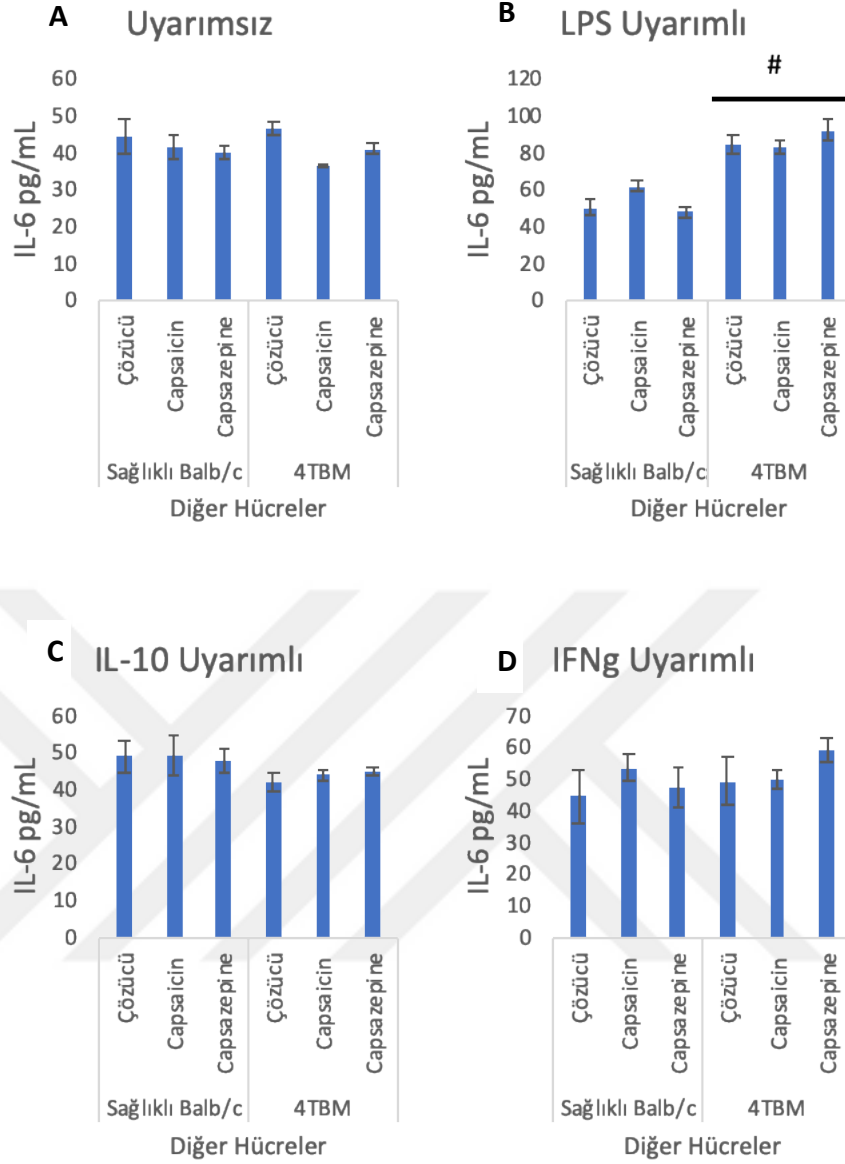
Şekil 4.22. Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen diğer hücrelerin IFN γ seviyelerindeki değişiklikler. Diğer hücrelerin IFN γ salınımlarında bir değişiklik gözlenmemiştir (Panel A-C).



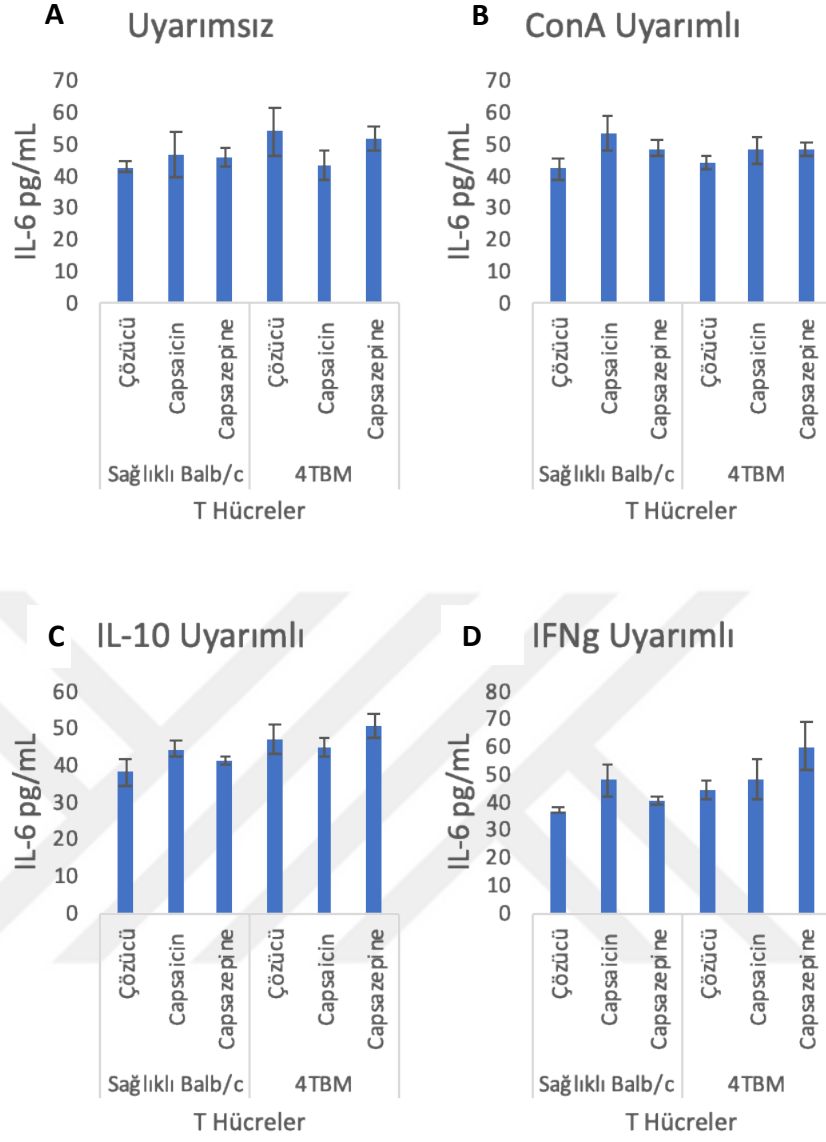
Şekil 4.23. Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen T hücrelerin IFN γ seviyelerindeki değişiklikler. Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen T hücreler uyarılmadığında ve ConA ile uyarıldıklarında IFN γ salınımlarında bir değişiklik görülmemiştir (Panel A ve B). Ancak hücreler IL-10 ile uyarıldıklarında sağlıklı farelerin T hücrelerinin IFN γ salınımları Capsazepine ile azalmıştır. * $p < 0.05$



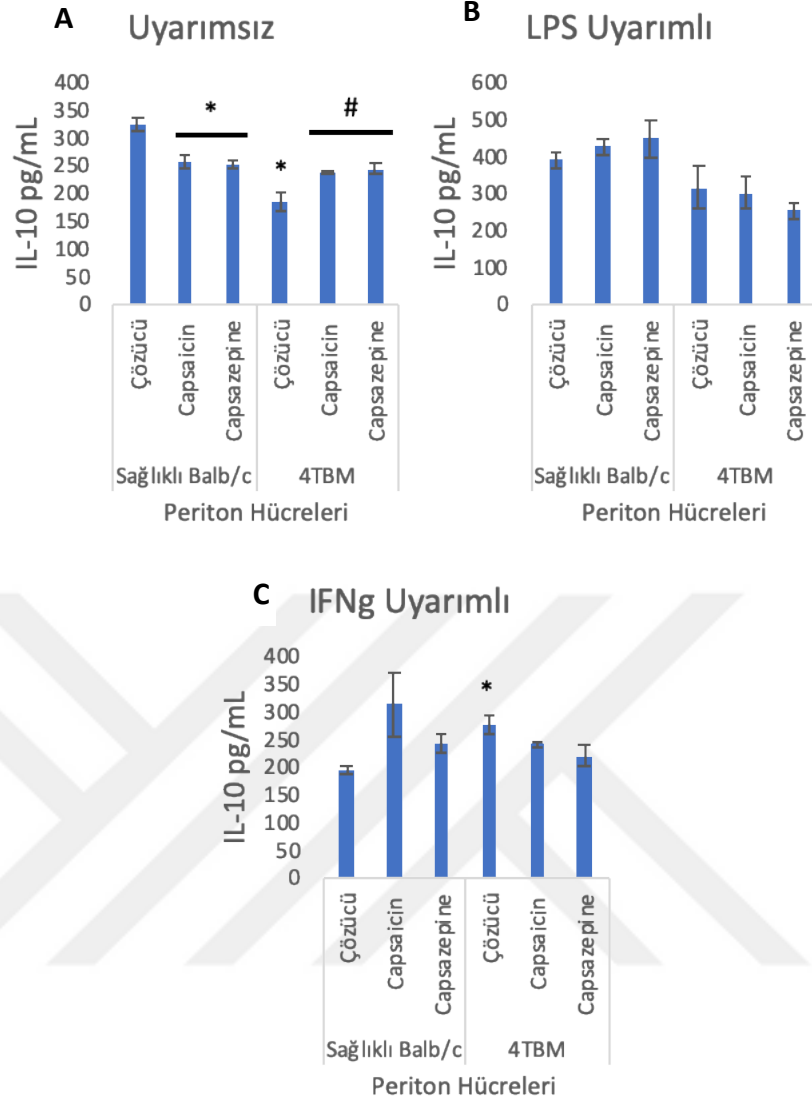
Şekil 4.24. Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen periton hücrelerinin IL-6 seviyelerindeki değişiklikler. Her iki grupta da IL-6 salınımı ortamda uyarım olmadığında hem agonist capsaicin ile hem de antagonist capsazepine ile azalmıştır (Panel A). LPS ile uyarıldıklarında 4TBM taşıyan farelerde IL-6 salınımı artmıştır (Panel B). IL-10 ile uyarıldıklarında ise capsazepine 4TBM taşıyan farelerin peritonlarından IL-6 salınımını arttırmıştır (Panel C). İlginç olarak IFN γ ile uyarılan periton hücrelerinde sağlıklı farelerin IL-6 salınımı capsazepine ile artmışken 4TBM taşıyan farelerin periton hücrelerinde bir değişiklik gözlenmemiştir (Panel D). * $p < 0.05$, # $p < 0.05$.



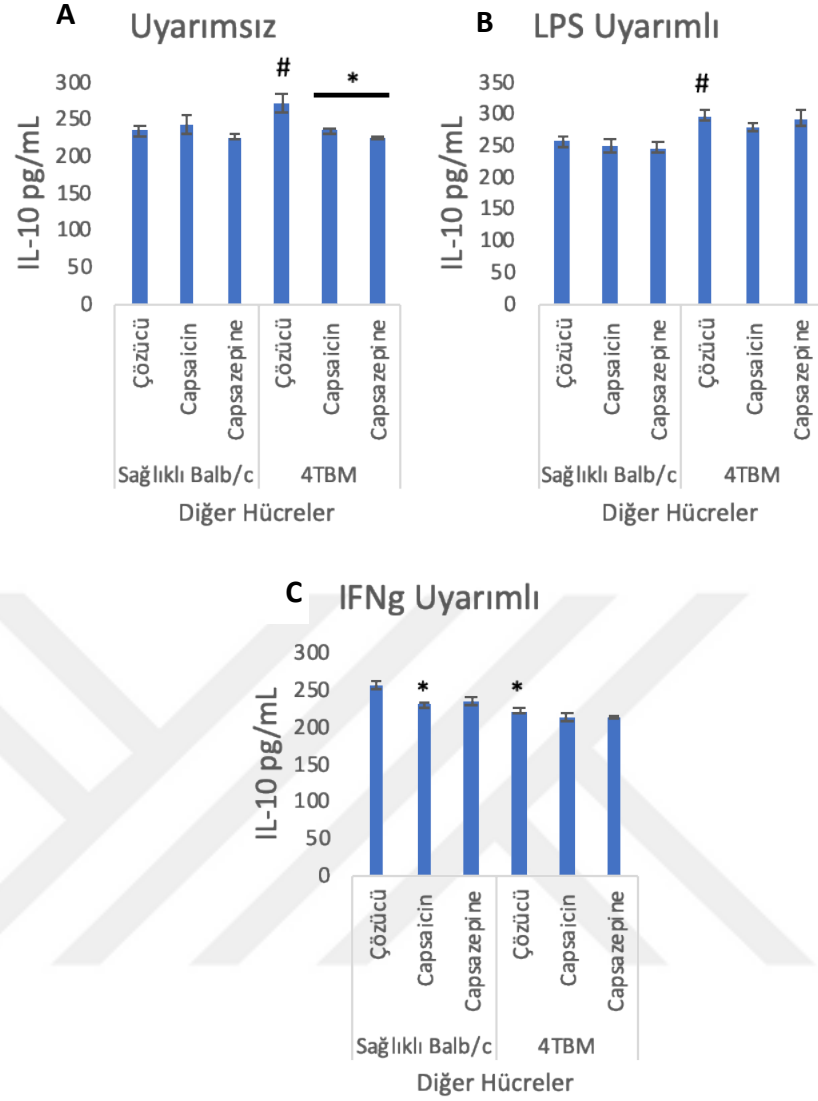
Şekil 4.25. Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen diğer hücrelerin IL-6 seviyelerindeki değişiklikler. Ortamda uyarım olmadığında veya hücreler rekombinant IL-10 ve IFN γ ile uyarıldıklarında IL-6 seviyeleri değişmemiştir (Panel A, C ve D). 4TBM taşıyan farelerden elde edilen diğer hücreler LPS ile uyarıldıklarında IL-6 salınımları artmıştır (Panel B). #p<0.05



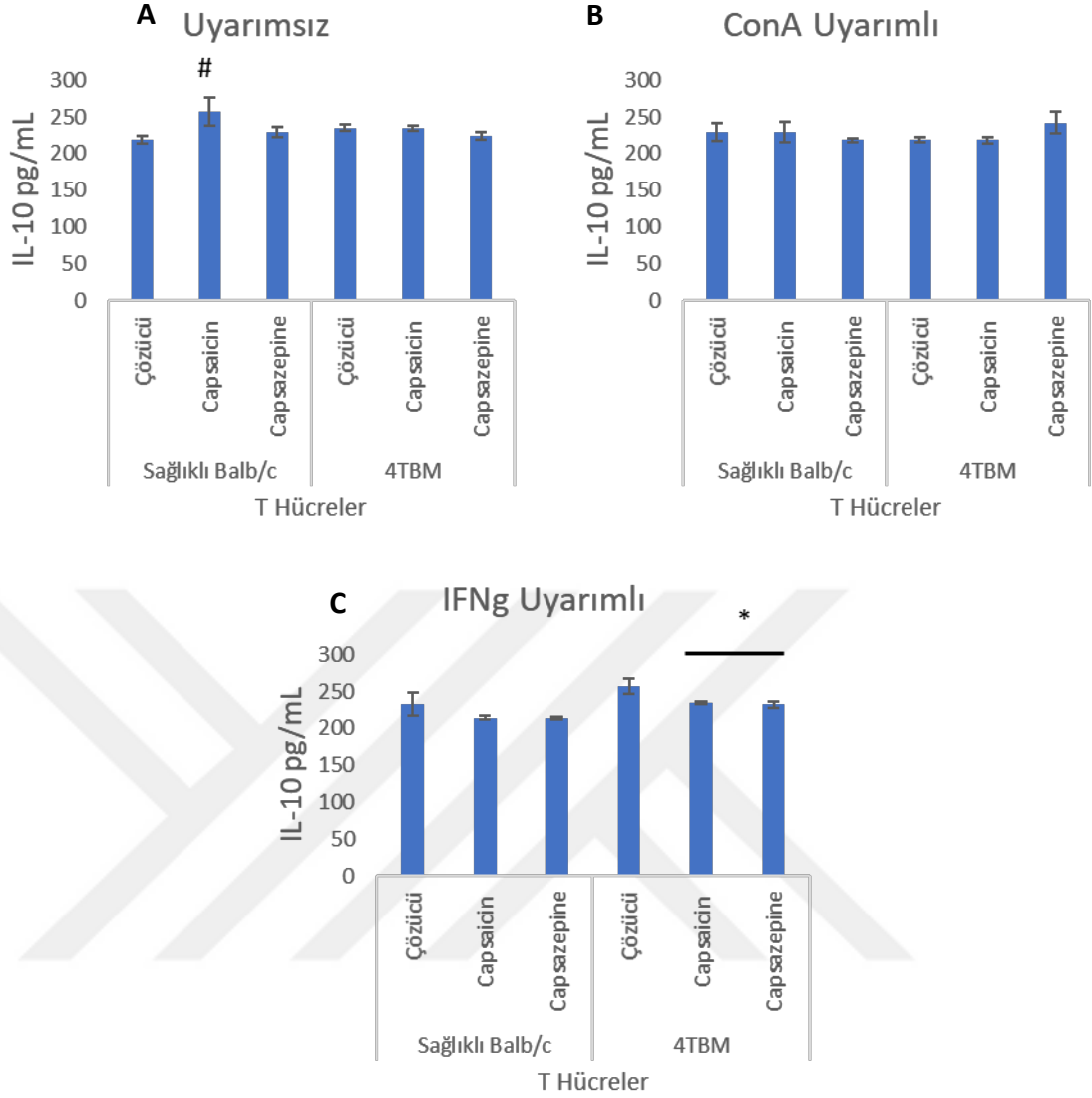
Şekil 4.26. Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen T hücrelerin IL-6 seviyelerindeki değişiklikler. Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen T hücrelerin IL-6 salımlarında bir değişiklik gözlenmemiştir (Panel A-D).



Şekil 4.27. Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen periton hücrelerinin IL-10 seviyelerindeki değişiklikler. Sağlıklı farelerin periton hücrelerinden IL-10 salınımı ile hem agonist capsaicin ile hem de antagonist capsazepine ile azalmıştır ancak sağlıklı farelere göre 4TBM taşıyan farelerin periton hücrelerinde azalmış olan IL-10 seviyeleri hem agonist capsaicin ile hem de antagonist capsazepine ile artmıştır (Panel A). LPS uyarımı herhangi bir etki göstermemişken (Panel B), 4TBM taşıyan farelerin periton hücreleri IFN γ ile uyarıldığında IL-10 seviyeleri artmışken ilaçlar herhangi bir etki göstermemiştir (Panel C). * $p < 0.05$, # $p < 0.05$



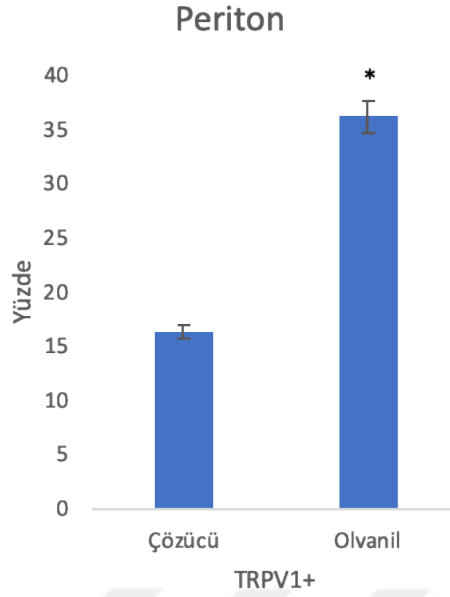
Şekil 4.28. Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen diğer hücrelerin IL-10 seviyelerindeki değişiklikler. 4TBM taşıyan farelerden elde edilen diğer hücrelerin artmış olan IL-10 salınımları hem agonist capsaicin ile hem de antagonist capsazepine ile azalmıştır (Panel A). LPS ile uyarılan 4TBM taşıyan farelerin diğer hücrelerinin IL-10 salınımı artmış ancak ilaçlar etki göstermemiştir (Panel B). Rekombinant IFN γ ile uyarıldıklarında ise capsaicin sağlıklı farelerdeki diğer hücrelerin IL-10 salınımını azaltmıştır, sağlıklı farelere göre 4TBM taşıyan farelerden elde edilen diğer hücrelerin azalmış olan IL-10 salınımı ilaç uygulamasıyla değişmemiştir (Panel C). * $p < 0.05$, # $p < 0.05$



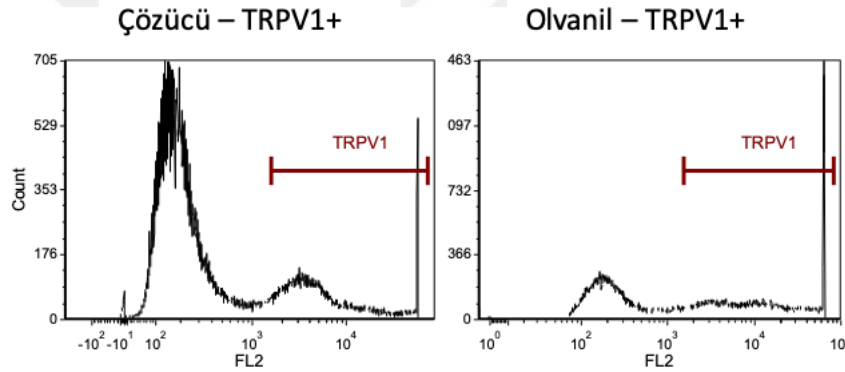
Şekil 4.29. Sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerden elde edilen T hücrelerin IL-10 seviyelerindeki değişiklikler. Sağlıklı farelerin T hücrelerinden IL-10 salınımı capsaicin ile artmıştır (Panel A). ConA uyarımında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Panel B). Rekombinant IFN γ ile uyarıldıklarında ise 4TBM taşıyan farelerin T hücrelerinde IL-10 salınımı hem agonist capsaicin ile hem de antagonist capsazepine ile azalmıştır (Panel C). * $p < 0.05$, # $p < 0.05$

4.4. In vivo Olvanil Tedavisi Alan Farelerin Periton Dokusunda TRPV1 Ekspresyonundaki Değişiklikler

4TBM enjekte edilen fareler iki gruba ayrılmış ve bir gruba %10 DMSO enjekte edilmiş; diğer gruba ise günlük 3 mg/kg Olvanil enjekte edilmiştir. Tümör hücresi enjeksiyonundan 3 gün sonra ilaç tedavisi başlamış ve tümör enjeksiyonundan 14 gün sonrasında farelerin dalak, lenf nodu, tümör dokusu alınmış ve peritonlarından %3 FBS içeren serum fizyolojik ile hücreler toplanmıştır. Peritondan toplanan hücreler akış sitometrisinde aynı hücre sayısına eşitlenerek analiz edildiğinde Olvanil enjekte edilen farelerin hücrelerinde TRPV1 ekspresyonu anlamlı şekilde artmıştır.



Şekil 4.30. Çözücü ve olvanil enjekte edilen farelerin peritonunda TRPV1 ekspresyon oranı. Çözücü ve olvanil enjekte edilen farelerden alınan periton örneklerinde TRPV1 eksprese eden hücrelerin sayısı in vivo Olvanil tedavisi ile artmıştır. * $p < 0.05$.

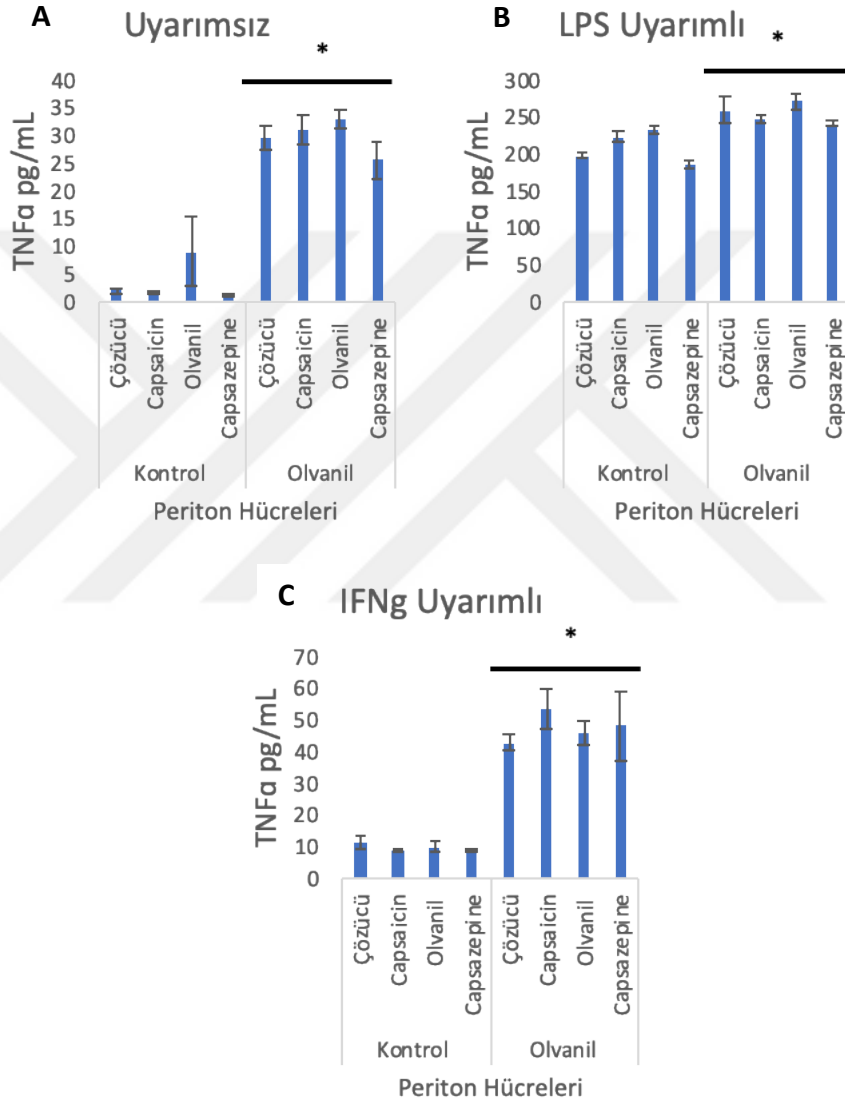


Şekil 4.31. Çözücü ve olvanil enjekte edilen farelerden alınan periton örneklerinde TRPV1 histogramı. Çözücü ve olvanil enjekte edilen farelerden alınan periton örneklerinde TRPV1 eksprese eden hücrelerin akış sitometrisinde histogram görüntüsü görülmektedir. TRPV1 eksprese eden hücrelerin sayısı in vivo Olvanil tedavisi ile artmıştır.

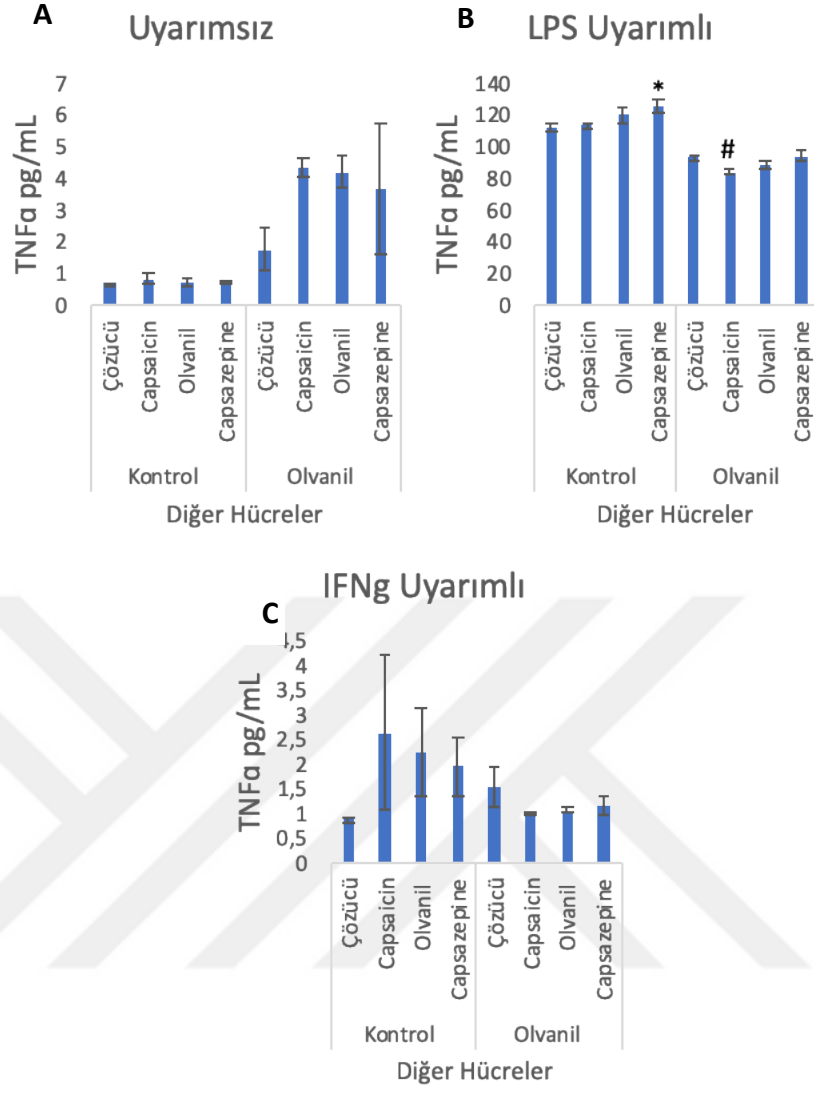
4.5. In Vivo Olvanil Tedavisi Gören Farelerin Sitokin Salımları ve ex vivo TRPV1 Agonisti Capsaicin ve Olvanil ile TRPV1 Antagonisti Capsazepine Uygulamasının Etkisi

4TBM enjekte edilen fareler iki gruba ayrılmış ve bir gruba %10 DMSO enjekte edilmiş (Kontrol grubu olarak adlandırılmıştır); diğer gruba ise günlük 3 mg/kg Olvanil enjekte edilmiştir (Olvanil grubu olarak adlandırılmıştır). Tümör hücresi enjeksiyonundan 3 gün sonra ilaç tedavisi başlamış ve tümör enjeksiyonundan 14 gün sonrasında farelerin dalak, lenf nodu, tümör dokusu alınmış ve peritonlarından %3 FBS içeren serum fizyolojik ile hücreler toplanmıştır. Elde edilen dokulardan hücreler

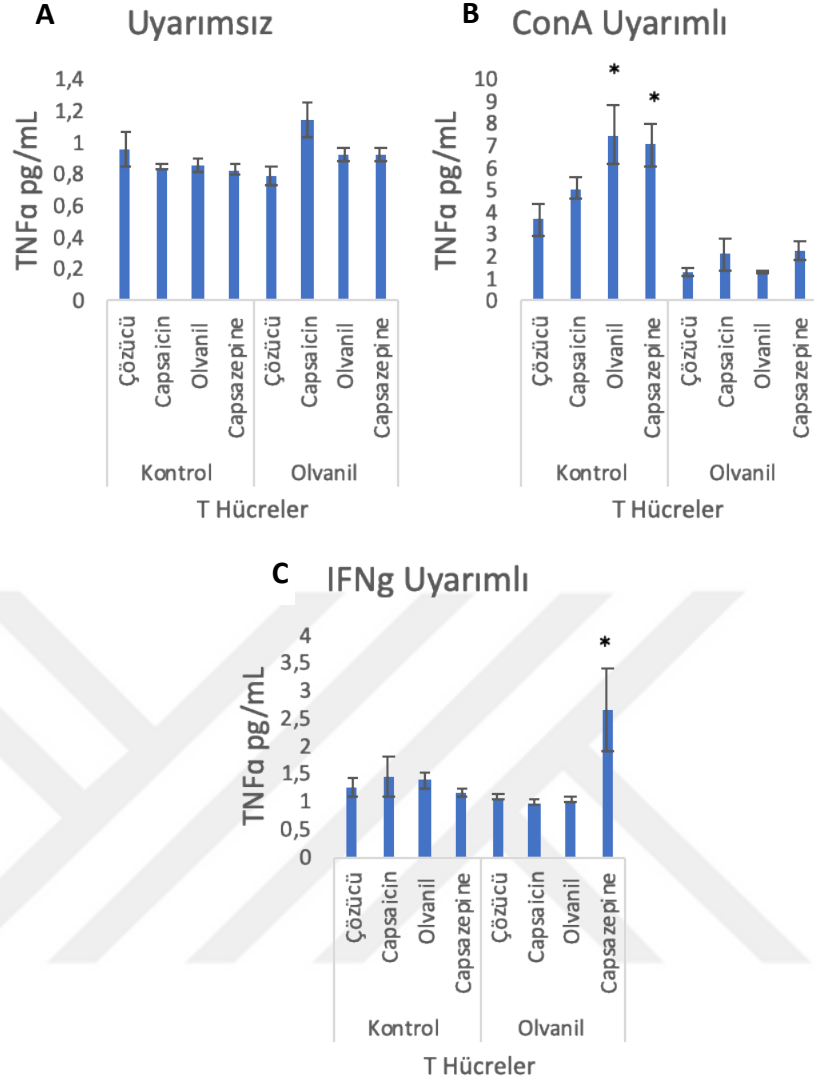
elde edilmiş ve yine T hücre, diğer hücreler ve periton hücreleri olacak şekilde hücre kültürleri hazırlanmıştır. Bu hücre kültürleri LPS ve rekombinant IFN γ ile uyarılmış ve ayrıca ex vivo TRPV1 agonisti capsaicin ve olvanil, TRPV1 antagonisti capsazepine uygulaması yapılarak olası TNF α , IFN γ , IL-10 ve IL-6 sitokin seviyelerindeki değişiklikler ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuçlar şekil altlarında belirtilmiştir.



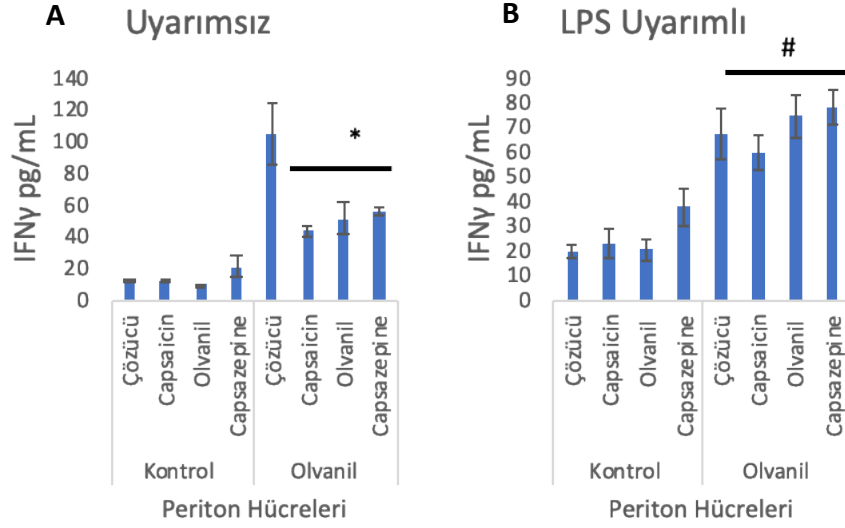
Şekil 4.32. Kontrol ve Olvanil grubu farelerden elde edilen periton hücrelerinin TNF α seviyelerindeki değişiklikler. Olvanil grubundan elde edilen periton hücrelerinin TNF α salımları LPS ve IFN γ uyarımlarıyla veya uyarım yokken kontrol hayvanlarına göre artmıştır (Panel A-C). *p<0.05



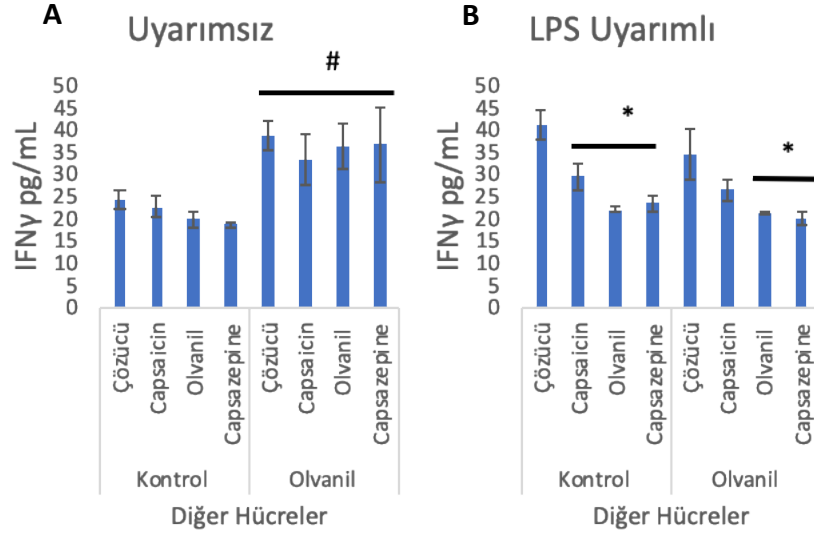
Şekil 4.33. Kontrol ve Olvanil grubu farelerden elde edilen diğer hücrelerin TNF α seviyelerindeki değişiklikler. Olvanil grubundan elde edilen diğer hücreler LPS uyarımı varlığında capsaicin uygulamasıyla TNF α salınımları azalmıştır (Panel B). Ortamda uyarın yokken ve IFN γ uyarımı TNF α salınımını etkilememiştir (Panel A ve C). * $p < 0.05$



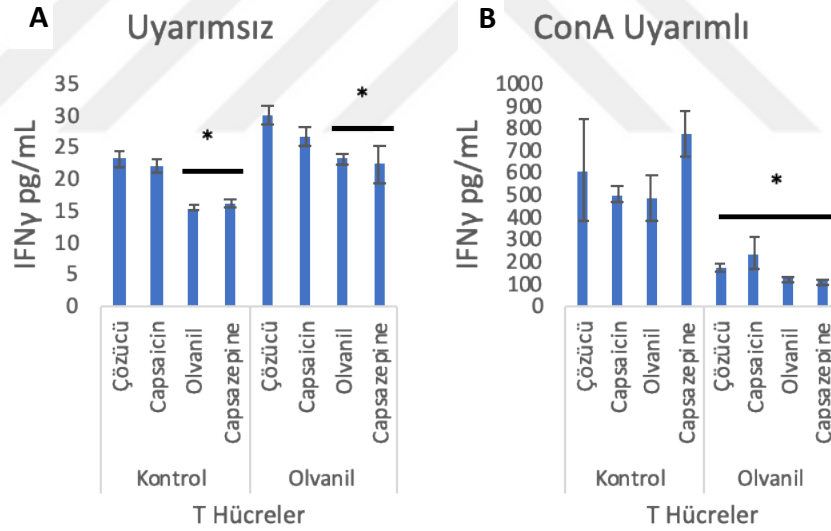
Şekil 4.34. Kontrol ve Olvanil grubu farelerden elde edilen T hücrelerin TNF α seviyelerindeki değişiklikler. Kontrol hayvanlarından elde edilen T hücreler ConA ile uyarıldığında Olvanil ve capsazepine uygulaması TNF α salınımlarını arttırmıştır (Panel B). IFN γ ile uyarılan olvanil grubu kaynaklı T hücrelerinin TNF α salınımı ise capsazepine ile artmıştır (Panel C). Ortamda uyarıcı ajan yokluğunda TNF α salınımları değişmemiştir (Panel A). * $p < 0.05$



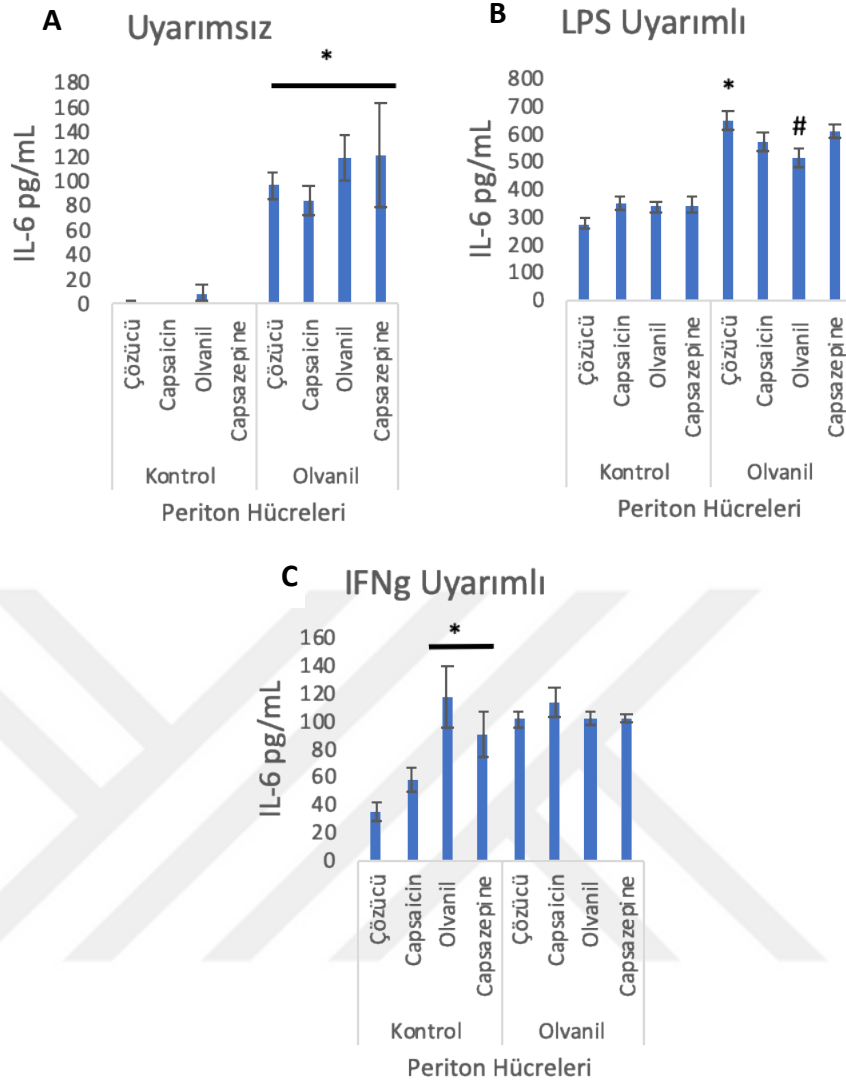
Şekil 4.35. Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen periton hücrelerinin IFN γ seviyelerindeki değişiklikler. Ortamda uyarım bulunmadığında in vivo Olvanil uygulamasıyla kontrol grubuna göre artan IFN γ salınımı ilaç uygulamasıyla azalmıştır (Panel A). LPS ile uyarıldıklarında ise yine kontrol grubuna göre IFN γ salınımı artmıştır (Panel B). * $p < 0.05$, # $p < 0.05$.



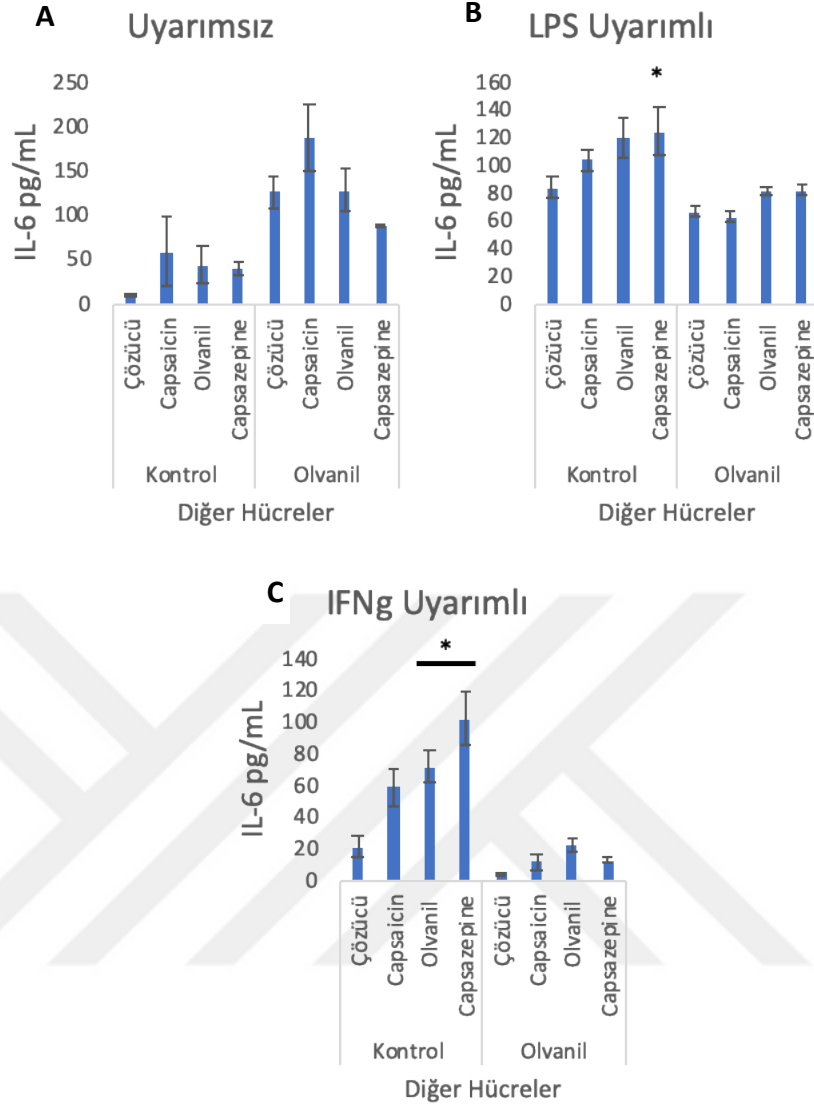
Şekil 4.36. Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen diğer hücrelerin IFN γ seviyelerindeki değişiklikler. Ortamda uyarım bulunmadığında in vivo Olvanil uygulamasıyla kontrol grubuna göre IFN γ salınımı artmıştır (Panel A). LPS ile uyarıldıklarında ise diğer hücrelerin IFN γ salınımı kontrol grubunda ilaç uygulamasıyla azalmış, Olvanil grubunda ise ex vivo Olvanil ve capsazepine uygulaması IFN γ salınımını azaltmıştır (Panel B). * $p < 0.05$, # $p < 0.05$.



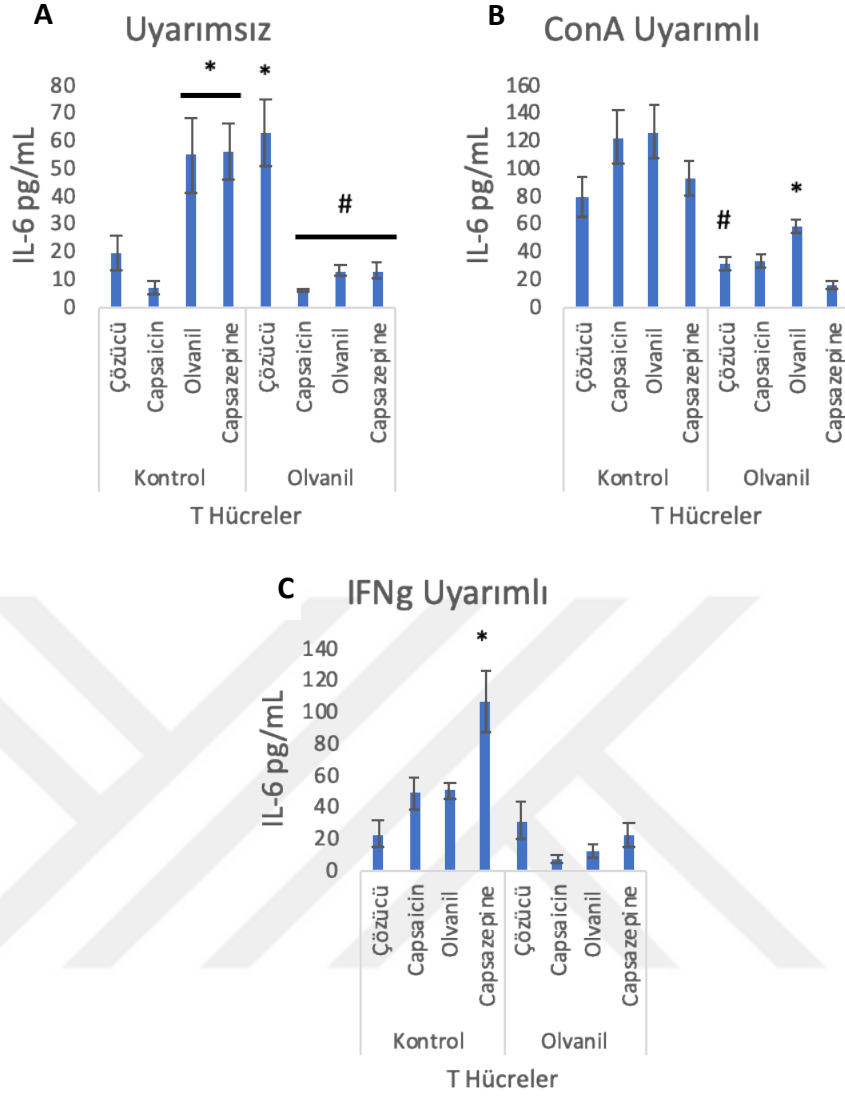
Şekil 4.37. Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen T hücrelerin IFN γ seviyelerindeki değişiklikler. Ortamda uyarım bulunmadığında hem kontrol hem de Olvanil grubundan elde edilen T hücrelerin IFN γ salınımları ex vivo Olvanil ve capsazepine uygulamasıyla azalmıştır (Panel A). Hücreler ConA ile uyarıldıklarında ise Olvanil grubunun T hücrelerinin IFN γ salınımları kontrol grubuna göre azalmıştır (Panel B). * $p < 0.05$.



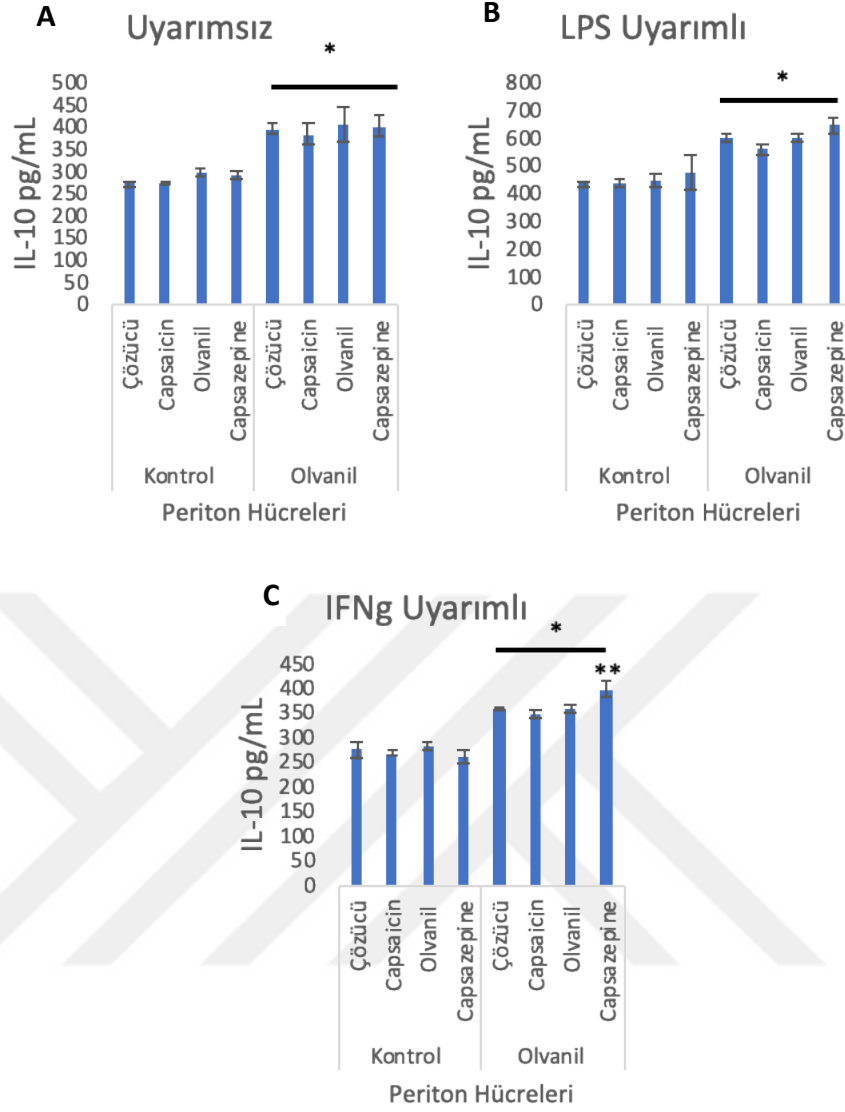
Şekil 4.38. Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen periton hücrelerinin IL-6 seviyelerindeki değişiklikler. Ortamda uyarım bulunmadığında Olvanil grubundan elde edilen periton hücrelerinin IL-6 salınımları kontrol grubuna göre artmıştır (Panel A). Hücreler LPS ile uyarıldığında kontrol grubuna göre Olvanil grubunda artan IL-6 salınımı ex vivo Olvanil uygulamasıyla azalmıştır (Panel B). Ayrıca kontrol grubunda rekombinant IFN γ uyarımı varlığında ex vivo olvanil ve capsazepine uygulaması IL-6 salınımını arttırmıştır (Panel C). * $p < 0.05$, # $p < 0.05$.



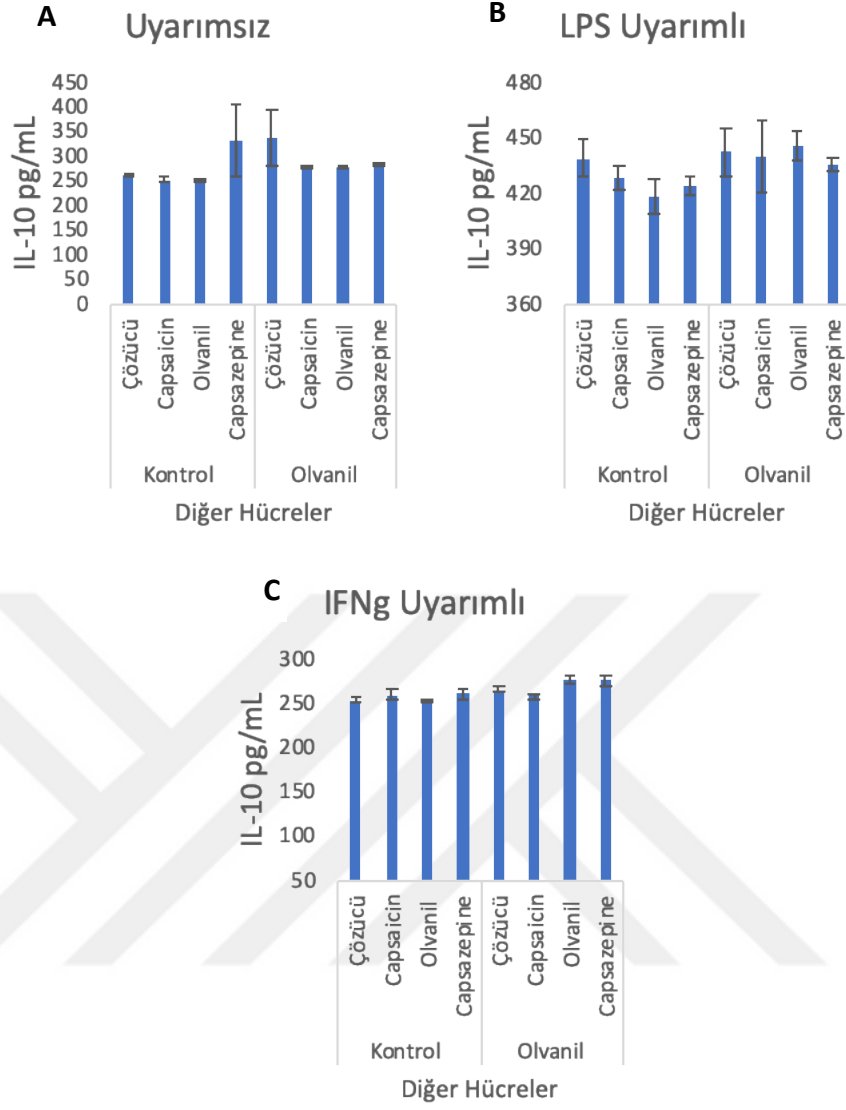
Şekil 4.39. Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen diğer hücrelerin IL-6 seviyelerindeki değişiklikler. Hücreler LPS ile uyarıldığında kontrol grubundan elde edilen diğer hücrelerin IL-6 salınımı capsazepine uygulaması ile artmıştır (Panel B). Ayrıca IFN γ ile uyarılan kontrol grubu diğer hücrelerin IL-6 salınımı olvanil ve capsazepine uygulaması ile artmıştır (Panel C). Uyarım yokluğunda diğer hücrelerin IL-6 seviyeleri değişmemiştir (Panel A). * $p < 0.05$.



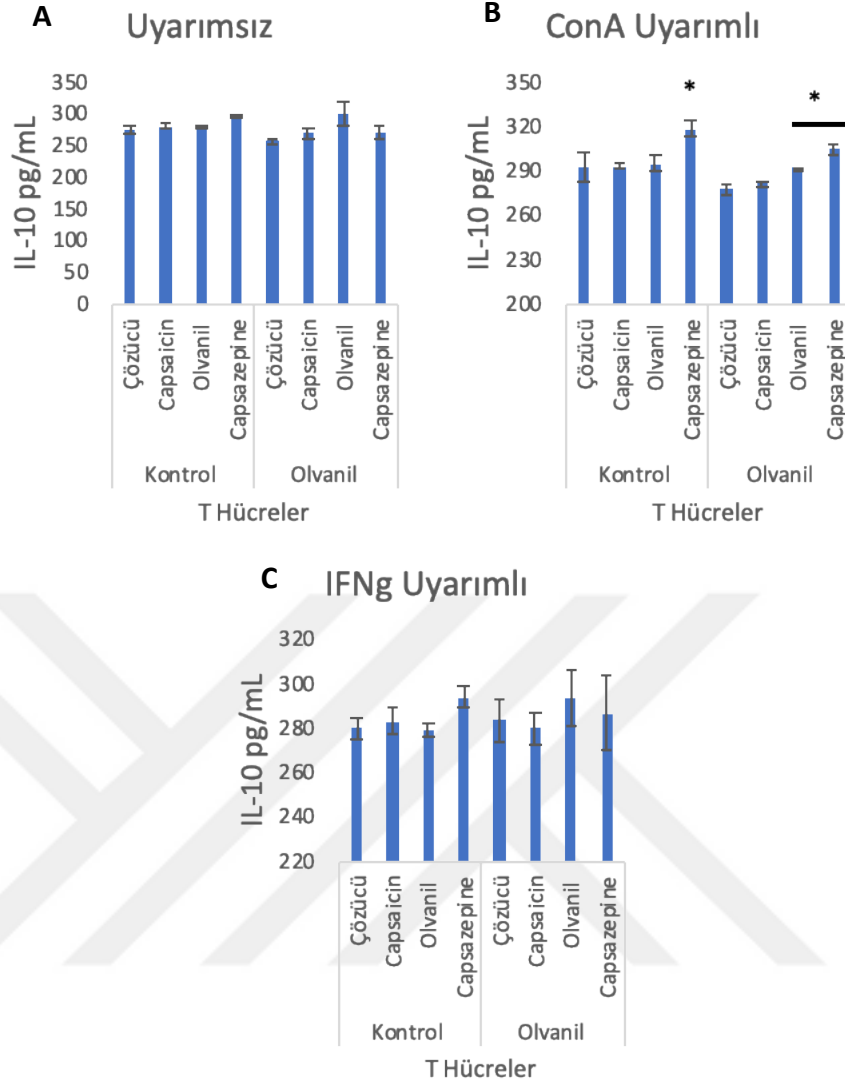
Şekil 4.40. Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen T hücrelerin IL-6 seviyelerindeki değişiklikler. Ortamda uyarım olmadığında kontrol grubu T hücrelerinin IL-6 salınımı olvanil ve capsazepine uygulamasıyla artarken, in vivo olvanil tedavisi gören grupta artmış olan IL-6 salınımı ilaç uygulamasıyla azalmıştır (Panel A). Hücreler ConA ile uyarıldıklarında olvanil grubunun kontrol grubuna göre azalmış olan IL-6 seviyeleri ex vivo olvanil uygulaması ile artmıştır (Panel B). Kontrol grubundan elde edilen T hücrelerin IL-6 salınımı IFN γ uyarımı varlığında capsazepine ile anlamlı şekilde artmıştır (Panel C). * $p < 0.05$, # $p < 0.05$.



Şekil 4.41. Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen periton hücrelerinin IL-10 seviyelerindeki değişiklikler. Ortamda uyarım olduğunda veya hücreler LPS ve IFN γ ile uyarıldıklarında in vivo olvanil uygulanmış grubun IL-10 salınımları artmıştır (Panel A-C). Ayrıca Olvanil grubu periton hücrelerinin IL-10 salınımları IFN γ uyarımı varlığında ise capsazepine ile artmıştır (Panel C). *p<0.05, **p<0.05.



Şekil 4.42. Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen diğer hücrelerinin IL-10 seviyelerindeki değişiklikler. Diğer hücrelerin IL-10 salınımlarında bir değişiklik gözlenmemiştir (Panel A-C).



Şekil 4.43. Kontrol ve Olvanil grubundan elde edilen T hücrelerinin IL-10 seviyelerindeki değişiklikler. Ortamda uyarım olmadığında veya hücreler IFN γ ile uyarıldıklarında T hücrelerin IL-10 yanıtları değişmemiştir (Panel A ve C). Ortamda ConA varlığında kontrol grubunun T hücrelerinden IL-10 salınımı capsazepine ile artmış, Olvanil grubu T hücrelerinin ise IL-10 yanıtı olvanil ve capsazepine ile artmıştır (Panel B). * $p < 0.05$.

5. TARTIŞMA

Kanser günümüzde halen en önemli morbidite ve mortalite sebeplerinden biridir. Her yıl milyonlarca kişiye kanser tanısı konmakta ve yine milyonlarca kişi kanser ya da kansere bağlı komplikasyonlardan dolayı hayatını kaybetmektedir. Kadınlarda en sık görülen meme kanserine karşı yeni terapi seçenekleri ve tanı-tedavi olanakları ortaya çıkmışsa da meme kanserine bağlı ölümlerin %90'ını oluşturan metastatik meme kanseri halen önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Suva ve ark., 2009). Bu sebeple metastatik meme kanserini tanı ve tedavide yeni hedeflerin keşfi büyük önem arz etmektedir.

Kanser gelişimi üzerine yapılan araştırmalar sonuçlarına bakıldığında iyon kanallarının rolü dikkat çekmektedir. Meme kanserinde potasyum (K^+) ve sodyum (Na^+) kanallarının proliferasyon, migrasyon ve invazyondaki rolü iyi araştırılmıştır ancak kalsiyum (Ca^{+2}) kanallarının rolü son yıllarda anlaşılmaya başlamıştır. Ca^{+2} , hücre içinde birçok kritik işlemde görev almaktadır. Hücre içine alınan Ca^{+2} 'in en çok kullanılan yolağı voltaj-bağımsız Ca^{+2} adı verilen kanallar vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Hücre içerisine alınan Ca^{+2} gen transkripsiyonu, hücre döngüsü, apoptoz ve kontraksiyon fonksiyonları bu görevlerinden bazılarıdır. Meme kanseri, prostat kanseri gibi bazı kanser türlerinin de Ca^{+2} yolağını kullanarak hücre proliferasyonlarını arttırdığını ve apoptoza karşı direnç geliştirdiklerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Ouadid-Ahidouch ve ark., 2013; Deliot ve Constantin, 2015). TRP kanalları bu araştırmalar sırasında dikkatleri üzerine çekmiştir. TRP ailesinin bir üyesi olan TRPV1'in ağrı ve nörojenik enflamasyondaki rolü iyi tanımlanmıştır. Ancak son yıllarda araştırmacılar TRPV1'in kanser gelişiminde rol oynadığını bildirmişlerdir (Shapovalov ve ark., 2016; Weber ve ark., 2016).

Bu çalışmada metastatik meme kanseri varlığında sağlıklı duruma göre tümör taşıyan farelerde TRPV1 eksprese eden immün hücre tiplerindeki değişiklikler ile TRPV1 aktivasyonunun bu hücrelerin sitokin profillerine olan etkileri in vivo'da ilk defa araştırılmıştır.

Çalışmada amaçlarımızdan ilki tümör varlığında farelerin dalak ve lenf nodlarından elde edilen immün hücrelerde TRPV1 ekspresyonundaki olası değişiklikleri belirlemek ve bu hücrelerin immünofenotiplendirilmesinin yapılması idi. Bu amaçla

ilk olarak TRPV1 ekspresyonunun 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerdeki immün hücreler ve tümör dokusundaki ekspresyonuna bakıldı. Bulgularımıza göre 4TBM ve 4TLM meme karsinom varlığında immün hücrelerin sayısında değişiklikler görülmüştür. 4TBM taşıyan farelerin dalak dokularında Gr1, CD11b ve CD4 eksprese eden hücrelerin sayısının sağlıklı ve 4TLM taşıyan farelere göre oldukça arttığı görülmüştür. Lenf nodlarında ise iki tümör tipinde de sağlıklı farelere göre CD4+ hücre sayısında artış olduğu ancak 4TLM'deki artışın 4TBM taşıyan farelere göre daha da yüksek olduğu dikkat çekmiştir. İlginç olarak lenf nodlarında CD4 ile CD8'i aynı anda eksprese eden T hücrelerinin sayısı 4TBM taşıyan farelere göre 4TLM taşıyan farelerde anlamlı ölçüde artmıştır. Literatürde belirtildiği üzere timusta T hücre gelişimi sırasında hücreler aynı anda CD4 ve CD8 belirteçlerini aynı anda eksprese etmektedir fakat gelişimin son fazında hücreler ya CD4 ya da CD8 eksprese eder hale gelmektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar bu iki belirteci aynı anda eksprese eden T hücrelerinin varlığını göstermiştir. Meme kanserinde arttığı bildirilen bu hücrelerin rolü halen tam olarak anlaşılamamışsa da CD4+ CD8+ hücrelerin sitotoksik immüniteyi arttırabileceğini gösteren yayınlar bulunmaktadır (Desfrancois ve ark., 2009; Overgaard ve ark., 2015). Çalışmamızda bu hücrelerin sayısında artış gözlenmesi, immün sistemin kanser hücrelerine verdiği anti-tümöral yanıt olabilir fakat bu konuda daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

İmmün hücrelerde TRPV1 ekspresyonlarına bakıldığında 4TBM taşıyan farelerin dalak dokularında Gr1+ TRPV1+ hücre sayısının sağlıklı ve 4TLM taşıyan farelere göre anlamlı ölçüde arttığı görülmüştür. İlginç olarak tümör dokusunda TRPV1 eksprese eden Gr1+, CD11b+, CD4+ ve CD8+ hücrelerin sayısında bir fark görülmemiştir. Elde edilen bu veriler ile TRPV1 ekspresyonu, 4T1 meme kanser hattının alt tipleri olan 4TBM ve 4TLM hücre hatlarındaki ekspresyonları ilk defa gösterilmiştir.

Bir diğer amacımız ise immün dokulardan elde edilen hücrelerin izole edilerek TRPV1 aktivasyonu ile ortaya çıkan immün yanıtların değerlendirilmesiydi. Çalışmamızda *in vivo* ve *ex vivo* çalışmalar ile bu amaç ele alınmıştır. Sağlıklı fareler ile 4TBM ve 4TLM taşıyan farelerin immün dokularından elde edilen hücrelerden steril koşullar altında T hücreler izole edilmiş ve kalan hücreler ile birlikte ayrı pleytlerde hücre kültürüne alınarak ConA ve irradiye tümör hücreleri ile uyurum altında TRPV1 agonistleri ile aktivasyonu sağlanarak sitokin seviyelerindeki değişiklikler

belirlenmiştir. TRPV1'in immün hücrelerin fonksiyonlarına katıldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. CD4+ T hücrelerinin ve makrofajların sitokin salınımına ve dendritik hücrelerin antijen sunma fonksiyonuna ve olgunlaşmasına aracılık ettiği bildirilmiştir (Basu ve Srivastava, 2005; Bertin ve ark., 2014; Ninomiya ve ark., 2017). Bulgularımıza göre TNF α seviyelerinde anlamlı bir değişme görülmezken, ConA ile uyarılan T hücrelerde IL-6 seviyesinin 4TBM taşıyan farelerde arttığı ve capsaicin uygulaması ile IL-6 salınımının azaldığı görülmüştür. Capsaicin, T hücrelerde ve diğer hücrelerde IFN γ salınımını 4TBM taşıyan farelerde azaltmıştır.

IL-6 ve IFN γ sitokinlerinin tümör mikroçevresindeki rolleri karmaşıktır. IFN γ normal şartlarda vücuda giren patojenlere karşı yanıt oluşturulması için T hücreleri yardımcı tip 1 T hücrelere farklılaştırıp, makrofajları aktive etmektedir; IL-6 ise hem pro- hem de anti-enflamatuvar bir sitokin olup, T hücre yanıtlarının ortaya çıkması için kritik öneme sahip bir sitokindir, T hücrelerinin immün yanıt sırasında aktivasyonunu, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemesinin yanında enflamasyonu da desteklemektedir. IL-6 ve IFN γ , TNF α ile birlikte kronik enflamasyon oluşması halinde immün sistemi baskılayarak tümör hücrelerinin sağkalımını sağlarlar ve anjiyogenezi desteklerler (Fisher ve ark., 2014; Abbas ve ark., 2015a; Mojic ve ark., 2017). Ortamda herhangi bir uyarım bulunmazken 4TBM grubunda IL-6 ve IFN γ yanıtı düşük iken ConA uygulamasıyla bu yanıtın artması T hücrelerinin akut enflamasyon benzeri yanıt oluşturmaya sebep olmuş olabilir. Literatürde capsaicin'in doza bağlı anti-enflamatuvar etkisinin olduğu belirtilmiştir (Jolayemi ve Ojewole, 2013). Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak 4TBM grubundan elde edilen T hücrelerde enflamatuvar sitokinlerin capsaicin ile baskılanmıştır.

Akış sitometrisi ve hücre kültürü deneylerinden yola çıkarak 4TBM metastatik meme kanseri hücreleri ile ileri çalışmalar yapılmıştır. Literatürde fare peritonunda bulunan makrofajların çeşitli uyarılara karşı gösterdiği yanıtlarda TRPV1 kanalının rolü bildirilmiştir (Joe ve Lokesh, 1994; Ninomiya ve ark., 2017). Çalışmamızda 4TBM taşıyan fareler ile birlikte sağlıklı farelerin peritonlarından makrofajlar toplanmıştır. Yine immün dokulardan T hücreler ayrılmış ve kalan hücreler "diğer hücreler" adıyla hücre kültürüne alınmıştır. Periton makrofajlarının TNF α , IFN γ , IL-6 seviyelerinin LPS uyarımıyla arttığı görülmüştür ancak capsaicin uygulaması anlamlı bir etki oluşturmamıştır. Yapılan çalışmalarda capsaicin'in makrofajlarda doza bağımlı

olarak, özellikle de 10 μ M dozda LPS ile indüklenen pro-enflamatuvar yanıtları baskıladığı vurgulanmıştır (Tang ve ark., 2015; Walker ve ark., 2017). İlginç olarak ortamda herhangi bir uyarım bulunmadığında sağlıklı fareler ile 4TBM taşıyan farelerin periton makrofajlarından salgılanan IL-6 salınımı hem capsaicin hem de capsazepine ile azalmıştır, IL-10 salınımı ise sağlıklı farelerde azalırken 4TBM taşıyan farelerde artmıştır. Ortamda uyarım olduğunda capsaicin ve capsazepine'in bu etkileri gözlenmedi. LPS'nin aktive ettiği yolaklar TRPV1 sinyal yolağının etkinliğini düşürmüş olabilir.

İmmün hücrelere TRPV1 ajanlarının ex vivo uygulanmasının yanı sıra in vivo uygulanmasının immün hücrelerin yanıtını nasıl değiştirdiği de değerlendirildi. Bu amaçla farelere 4TBM meme karsinom hücreleri enjekte edildikten sonra bir gruba çözücü (%10 DMSO), diğer gruba ise günlük 3 mg/kg dozda TRPV1 agonisti olvanil enjekte edildi. Tümör enjeksiyonundan 14 gün sonrasında fareler sakrifiye edilerek immün dokuları, periton hücreleri toplanarak hücre kültürüne alındı.

Literatürde TRPV1 ekspresyonunun sinir hücrelerinde kronik ağrı, sinir hasarı ve enflamasyon sonucunda arttığını gösteren çalışmaların yanı sıra son seviye böbrek hastalarıyla yapılan bir çalışmada kanda dolaşan mononükleer hücrelerde TRPV1 mRNA düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (Hudson ve ark., 2001; Yiangou ve ark., 2001; Anand ve ark., 2006; Saunders ve ark., 2009). Literatür ile uyumlu olarak in vivo olvanil tedavisi gören farelerin periton hücrelerinde TRPV1 eksprese eden hücre sayısı, çözücü enjekte edilen kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde artmıştır.

In vivo Olvanil uygulaması sonucu ortaya çıkan sitokin yanıtlarına bakıldığında periton hücrelerinde TNF α yanıtı olvanil uygulanan grupta kontrole göre artmışsa da ilaç uygulaması etkili olmamıştır. Ancak ortamda uyarım bulunmadığında in vivo olvanil uygulanan grupta IFN γ yanıtı kontrol grubuna göre capsaicin, olvanil ve capsazepine uygulaması ile azalmıştır. İlginç olarak periton hücreleri LPS ile uyarıldığında kontrol grubuna göre olvanil grubunda artan IL-6 salınımı, ex vivo olvanil uygulaması ile azalmıştır. Antitümör yanıt gösteren makrofajlar, pro-enflamatuvar sitokinlerden TNF α ve IL-6 ile tümör destekleyen makrofajlar ise yüksek miktarda IL-10 salgılaması ile karakterize edilir (Ramanathan ve Jagannathan, 2014; Williams ve ark., 2016). In vivo olvanil uygulanan grubun periton makrofajlarında kontrol grubuna göre IL-6 ve TNF α sitokinlerinin salınımının artması

da hücrelerin antitümör özellik gösterecek şekilde farklılaştığını göstermektedir. Bu makrofajların polarizasyon fenotiplerini belirlemek için detaylı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Çalışmamızda ilk defa 4T1 meme kanser hattının alt tipleri olan 4TBM ve 4TLM metastatik meme kanserinde TRPV1 ekspresyonunun immün hücrelerde arttığı ve bu artışın anti-tümöral immüniteyi destekler nitelikte olduğu gösterilmiştir. Ex vivo TRPV1 ajanlarının uygulaması kısıtlı seviyede kalmış ancak TRPV1 agonisti Olvanil'in in vivo uygulanması makrofajların antitümör yanıt gösterecek şekilde farklılaşmasını indüklediği belirlenmiştir. Elimizdeki sonuçlar ile TRPV1'in kanserdeki rolü hakkında literatüre yeni bilgiler sağlanmıştır. Ancak tam olarak TRPV1 meme kanserindeki rolünü ortaya koyabilmek için daha geniş çaplı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. 4TBM meme karsinom taşıyan farelerde Gr1, CD11b ve CD4 eksprese eden immün hücrelerin sayısı sağlıklı farelere göre anlamlı derecede artmıştır. 4TLM taşıyan farelerde ise CD4 ve CD8'i aynı anda eksprese eden T hücrelerinin sayısı 4TBM taşıyan farelere göre önemli ölçüde artmıştır.
2. 4TBM taşıyan farelerin dalak dokularında Gr1+ TRPV1+ hücrelerin sayısı sağlıklı ve 4TLM taşıyan farelere göre artışı anlamlıdır. Elde edilen akış sitometrisi verileriyle 4T1 meme kanser hattının alt tipleri olan 4TBM ve 4TLM hücre hatlarında TRPV1 ekspresyonları ilk defa gösterilmiştir.
3. Sağlıklı farelere göre 4TBM taşıyan farelerin T hücrelerinde IL-6 ve IFN γ yanıtı düşük iken ConA uyarımı varlığında sitokin yanıtı belirgin ölçüde artmış ve 1 μ M capsaicin uygulamasıyla bu etki baskılanmıştır.
4. 4TBM taşıyan farelerden izole edilen periton makrofajlarında sağlıklı farelere göre TNF α , IFN γ , IL-6 seviyeleri LPS uyarımıyla artmıştır ancak capsaicin uygulaması belirgin bir etki oluşturmamıştır.
5. Ortamda herhangi bir uyarım bulunmadığında sağlıklı ve 4TBM taşıyan farelerin periton makrofajlarından salgılanan IL-6 salınımı hem capsaicin hem de capsazepine ile azalmıştır.
6. Ortamda herhangi bir uyarım bulunmadığında periton makrofajlarından salgılanan IL-10 sitokini miktarı sağlıklı farelerde azalırken 4TBM taşıyan farelerde artmıştır.
7. In vivo olvanil uygulanması sonucunda tedavi gören farelerin periton hücrelerinde TRPV1 eksprese eden hücre sayısı, çözücü enjekte edilen gruba göre belirgin ölçüde artmıştır.
8. In vivo olvanil uygulanan gruptan elde edilen periton makrofajlarında TNF α yanıtı artmış, ex vivo ilaç uygulaması etkili olmamıştır.

9. In vivo olvanil uygulanan gruptan elde edilen periton makrofajlarında IFN γ yanıtı kontrol grubuna göre ex vivo capsaicin, olvanil ve capsazepine uygulaması ile azalmıştır.

10. In vivo olvanil uygulanan gruptan elde edilen periton makrofajları LPS ile uyarıldığında IL-6 salınımı kontrol grubuna göre artmış, ex vivo olvanil uygulaması ile azalmıştır.

Vücudun birçok yerinde eksprese edilen ve önemli fizyolojik olaylara katılan TRPV1'in kanserde hedef olabileceği bildirilmiştir ve çalışmalar bu yönde devam etmektedir. Çalışmamızda TRPV1'in 4T1 metastatik meme kanser hattının alt tipleri olan 4TBM ve 4TLM hücre hatlarındaki ekspresyonu ilk defa gösterilmiştir. Elde edilen veriler TRPV1'in literatürde de belirtildiği gibi immün yanıtta katıldığını göstermektedir. Elimizdeki sonuçlar meme kanseri varlığında TRPV1 aktivasyonunun makrofajların antitümöral yanıtını desteklediğini, T hücrelerin enflamatuvar fonksiyonlarını baskıladığını işaret etmektedir. Sonuçlarımız literatüre yeni bilgiler sağlamaktadır ancak TRPV1'in bu etkilerini tam olarak ortaya koyabilmek için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

Abbas, A. K., H., L. A., & S., P. Ana sitokinler. Çeviren: Camcıoğlu Y. & Deniz G. Temel immünoloji immün sistemin işlevler ve bozuklukları. 4. Baskı, İstanbul, Türkiye: Elsevier; 2015a, s: 283-286

Abbas, A. K., H., L. A., & S., P. Antijenin toplanması ve lenfositlere sunumu. Çeviren: Camcıoğlu Y. & Deniz G. Temel immünoloji immün sistemin işlevler ve bozuklukları. 4. Baskı, İstanbul, Türkiye: Elsevier. İstanbul, Türkiye: Elsevier; 2015b, s: 49-69

Abbas, A. K., H., L. A., & S., P. Tümörlere ve nakil dokularına karşı immün yanıtlar. Çeviren: Camcıoğlu Y. & Deniz G. Temel immünoloji immün sistemin işlevler ve bozuklukları. 4. Baskı, İstanbul, Türkiye: Elsevier; 2015c, s: 189-205

Acharyya, S., Matrisian, L., Welch, D. R., & Maasaguéi, J. Invasion and metastasis. In: J. Mendelsohn, J. W. Gray, P. M. Howley, M. A. Israel, & C. B. Thompson (Eds.), The molecular basis of cancer 4th ed. ABD: Elsevier Saunders; 2015, 269-284

Alsalem, M., Millns, P., Altarifi, A., El-Salem, K., Chapman, V., & Kendall, D. A. Anti-nociceptive and desensitizing effects of olvanil on capsaicin-induced thermal hyperalgesia in the rat. BMC Pharmacol Toxicol. 2016; 17 (1): 31.

Amadesi, S., Nie, J., Vergnolle, N., Cottrell, G. S., Grady, E. F., Trevisani, M., . . . Bunnett, N. W. Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. J Neurosci. 2004; 24 (18): 4300-4312.

Amantini, C., Mosca, M., Lucciarini, R., Perfumi, M., Morrone, S., Piccoli, M., & Santoni, G. Distinct thymocyte subsets express the vanilloid receptor vr1 that mediates capsaicin-induced apoptotic cell death. Cell Death Differ. 2004; 11 (12): 1342-1356.

Amantini, C., Mosca, M., Nabissi, M., Lucciarini, R., Caprodossi, S., Arcella, A., . . . Santoni, G. Capsaicin-induced apoptosis of glioma cells is mediated by trpv1 vanilloid receptor and requires p38 mapk activation. J Neurochem. 2007; 102 (3): 977-990.

Anand, U., Otto, W. R., Casula, M. A., Day, N. C., Davis, J. B., Bountra, C., . . . Anand, P. The effect of neurotrophic factors on morphology, trpv1 expression and

capsaicin responses of cultured human drg sensory neurons. *Neurosci Lett.* 2006; 399 (1-2): 51-56.

Assas, B. M., Wakid, M. H., Zakai, H. A., Miyan, J. A., & Pennock, J. L. Transient receptor potential vanilloid 1 expression and function in splenic dendritic cells: A potential role in immune homeostasis. *Immunology.* 2016; 147 (3): 292-304.

Basu, S., & Srivastava, P. Immunological role of neuronal receptor vanilloid receptor 1 expressed on dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102 (14): 5120-5125.

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

Bhave, G., Hu, H. J., Glauner, K. S., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D. J., . . . Gereau, R. W. t. Protein kinase c phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (trpv1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100 (21): 12480-12485.

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

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

Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J., & Julius, D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature.* 1999; 398 (6726): 436-441.

Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997; 389 (6653): 816-824.

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

Chen, C. W., Lee, S. T., Wu, W. T., Fu, W. M., Ho, F. M., & Lin, W. W. Signal transduction for inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction by capsaicin and related analogs in macrophages. *Br J Pharmacol.* 2003; 140 (6): 1077-1087.

Chu, C. J., Huang, S. M., De Petrocellis, L., Bisogno, T., Ewing, S. A., Miller, J. D., . . . Walker, J. M. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem.* 2003; 278 (16): 13633-13639.

Chuang, H. H., Prescott, E. D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S. E., Basbaum, A. I., . . . Julius, D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from ptdins(4,5)p2-mediated inhibition. *Nature.* 2001; 411 (6840): 957-962.

Clapham, D. E. Trp channels as cellular sensors. *Nature.* 2003; 426 (6966): 517-524.

Cortright, D. N., & Szallasi, A. Trp channels and pain. *Curr Pharm Des.* 2009; 15 (15): 1736-1749.

Davoodzadeh Gholami, M., Kardar, G. A., Saeedi, Y., Heydari, S., Garssen, J., & Falak, R. Exhaustion of t lymphocytes in the tumor microenvironment: Significance and effective mechanisms. *Cell Immunol.* 2017; 322: 1-14.

Deliot, N., & Constantin, B. Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1848 (10 Pt B): 2512-2522.

Dembic, Z. The cytokines of the immune system the role of cytokines in disease related to immune response. *Amerika Birleşik Devletleri;* 2015, p:1-310

DeNardo, D. G., & Coussens, L. M. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: Crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2007; 9 (4): 212.

Desfrancois, J., Derre, L., Corvaisier, M., Le Mevel, B., Catros, V., Jotereau, F., & Gervois, N. Increased frequency of nonconventional double positive cd4cd8 alphabeta t cells in human breast pleural effusions. *Int J Cancer.* 2009; 125 (2): 374-380.

Dvorakova, M., & Kummer, W. Transient expression of vanilloid receptor subtype 1 in rat cardiomyocytes during development. *Histochem Cell Biol.* 2001; 116 (3): 223-225.

Fernandes, E. S., Fernandes, M. A., & Keeble, J. E. The functions of trpa1 and trpv1: Moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol.* 2012; 166 (2): 510-521.

Fisher, D. T., Appenheimer, M. M., & Evans, S. S. The two faces of il-6 in the tumor microenvironment. *Semin Immunol.* 2014; 26 (1): 38-47.

Forman, D., & Ferlay, J. The global and regional burden of cancer. In B. W. Stewart & C. P. Wild (Eds.), *World cancer report 2014*. İsviçre: International Agency for Research on Cancer; 2014, s: 16-53

Grycova, L., Holendova, B., Bumba, L., Bily, J., Jirku, M., Lansky, Z., & Teisinger, J. Integrative binding sites within intracellular termini of trpv1 receptor. *PLoS One.* 2012; 7 (10): e48437.

Gunthorpe, M. J., Benham, C. D., Randall, A., & Davis, J. B. The diversity in the vanilloid (trpv) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23 (4): 183-191.

Hacıkamiloğlu, E., Gültekin, M., Boztaş, G., & Dündar, S. (2017). Türkiye kanser istatistikleri. Retrieved from <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/495-2014-yılı-türkiye-kanser-istatistikleri.html>

Hahn, W. C., & Weinberg, R. A. Cancer: A genetic disorder. In J. Mendelsohn, J. W. Gray, P. M. Howley, M. A. Israel, & C. B. Thompson (Eds.), *The molecular basis of cancer* 4th ed. ABD: Elsevier Saunders; 2015, s: 3-18

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

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

Hardie, R. C. A brief history of trp: Commentary and personal perspective. *Pflugers Arch.* 2011; 461 (5): 493-498.

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

Hashmi, A. A., Aijaz, S., Khan, S. M., Mahboob, R., Irfan, M., Zafar, N. I., . . . Khan, A. Prognostic parameters of luminal a and luminal b intrinsic breast cancer subtypes of pakistani patients. *World J Surg Oncol*. 2018; 16 (1): 1.

Helliwell, R. J., McLatchie, L. M., Clarke, M., Winter, J., Bevan, S., & McIntyre, P. Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (vr1) mrna in adult rat sensory ganglia. *Neurosci Lett*. 1998; 250 (3): 177-180.

Hirbod-Mobarakeh, A., Amirzargar, A. A., Nikbin, B., Nicknam, M. H., A., K., & Rezaei, N. Immunogenetics of cancer. In R. N. (Ed.), *Cancer immunology a translational medicine context*. Almany: Springer; 2015, s: 295-341

Huang, S. M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., De Petrocellis, L., Fezza, F., . . . Di Marzo, V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid vr1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99 (12): 8400-8405.

Huang, Y., Ma, C., Zhang, Q., Ye, J., Wang, F., Zhang, Y., . . . Peng, G. Cd4+ and cd8+ t cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*. 2015; 6 (19): 17462-17478.

Hudson, L. J., Bevan, S., Wotherspoon, G., Gentry, C., Fox, A., & Winter, J. Vr1 protein expression increases in undamaged drg neurons after partial nerve injury. *Eur J Neurosci*. 2001; 13 (11): 2105-2114.

Hwang, S. W., Cho, H., Kwak, J., Lee, S. Y., Kang, C. J., Jung, J., . . . Oh, U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: Endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97 (11): 6155-6160.

Inoue, R., Morita, H., & Ito, Y. Newly emerging ca²⁺ entry channel molecules that regulate the vascular tone. *Expert Opin Ther Targets*. 2004; 8 (4): 321-334.

Jin, J., Desai, B. N., Navarro, B., Donovan, A., Andrews, N. C., & Clapham, D. E. Deletion of *trpm7* disrupts embryonic development and thymopoiesis without altering mg^{2+} homeostasis. *Science*. 2008; 322 (5902): 756-760.

Joe, B., & Lokesh, B. R. Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1224 (2): 255-263.

Jolayemi, A. T., & Ojewole, J. A. Comparative anti-inflammatory properties of capsaicin and ethyl-acetate extract of *capsicum frutescens* linn [solanaceae] in rats. *Afr Health Sci*. 2013; 13 (2): 357-361.

Jung, J., Hwang, S. W., Kwak, J., Lee, S. Y., Kang, C. J., Kim, W. B., . . . Oh, U. Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J Neurosci*. 1999; 19 (2): 529-538.

Jung, J., Shin, J. S., Lee, S. Y., Hwang, S. W., Koo, J., Cho, H., & Oh, U. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase ii regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem*. 2004; 279 (8): 7048-7054.

Kozłowski, J., Kozłowska, A., & Kocki, J. Breast cancer metastasis - insight into selected molecular mechanisms of the phenomenon. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015; 69: 447-451.

Launay, P., Cheng, H., Srivatsan, S., Penner, R., Fleig, A., & Kinet, J. P. *Trpm4* regulates calcium oscillations after t cell activation. *Science*. 2004; 306 (5700): 1374-1377.

Lazzeri, M., Vannucchi, M. G., Spinelli, M., Bizzoco, E., Beneforti, P., Turini, D., & Fausone-Pellegrini, M. S. Transient receptor potential vanilloid type 1 (*trpv1*) expression changes from normal urothelium to transitional cell carcinoma of human bladder. *Eur Urol*. 2005; 48 (4): 691-698.

Li, H. Trp channel classification. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 976: 1-8.

Lim, B., & Hortobagyi, G. N. Current challenges of metastatic breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2016; 35 (4): 495-514.

Link, T. M., Park, U., Vonakis, B. M., Raben, D. M., Soloski, M. J., & Caterina, M. J. Trpv2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis. *Nat Immunol.* 2010; 11 (3): 232-239.

Loibl, S., & Gianni, L. Her2-positive breast cancer. *Lancet.* 2017; 389 (10087): 2415-2429.

McKemy, D. D., Neuhausser, W. M., & Julius, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for trp channels in thermosensation. *Nature.* 2002; 416 (6876): 52-58.

Mohapatra, D. P., & Nau, C. Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor trpv1 is decreased by the cyclic amp-dependent protein kinase pathway. *J Biol Chem.* 2003; 278 (50): 50080-50090.

Mojic, M., Takeda, K., & Hayakawa, Y. The dark side of ifn-gamma: Its role in promoting cancer immunoevasion. *Int J Mol Sci.* 2017; 19 (1).

Montell, C. The history of trp channels, a commentary and reflection. *Pflugers Arch.* 2011; 461 (5): 499-506.

Nilius, B., & Owsianik, G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* 2011; 12 (3): 218.

Ninomiya, Y., Tanuma, S. I., & Tsukimoto, M. Differences in the effects of four trpv1 channel antagonists on lipopolysaccharide-induced cytokine production and cox-2 expression in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 484 (3): 668-674.

Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H., & Tominaga, M. Direct phosphorylation of capsaicin receptor vr1 by protein kinase cepsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem.* 2002; 277 (16): 13375-13378.

Ouadid-Ahidouch, H., Dhennin-Duthille, I., Gautier, M., Sevestre, H., & Ahidouch, A. Trp channels: Diagnostic markers and therapeutic targets for breast cancer? *Trends Mol Med.* 2013; 19 (2): 117-124.

Overgaard, N. H., Jung, J. W., Steptoe, R. J., & Wells, J. W. Cd4+/cd8+ double-positive t cells: More than just a developmental stage? *J Leukoc Biol.* 2015; 97 (1): 31-38.

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

Perez, C. A., Huang, L., Rong, M., Kozak, J. A., Preuss, A. K., Zhang, H., . . . Margolskee, R. F. A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci.* 2002; 5 (11): 1169-1176.

Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., Morenilla-Palao, C., & Ferrer-Montiel, A. Functional aspects and mechanisms of trpv1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflugers Arch.* 2005; 451 (1): 151-159.

Ramanathan, S., & Jagannathan, N. Tumor associated macrophage: A review on the phenotypes, traits and functions. *Iran J Cancer Prev.* 2014; 7 (1): 1-8.

Rezaei, N., Aalaei-Andabili, S. H., & Kaufman, H. L. Introduction on cancer immunology and immunotherapy. In R. N. (Ed.), *Cancer immunology a translational medicine context.* Almany: Springer; 2015, s: 1-8

Roberts, J. C., Davis, J. B., & Benham, C. D. [3h]resiniferatoxin autoradiography in the cns of wild-type and trpv1 null mice defines trpv1 (vr-1) protein distribution. *Brain Res.* 2004; 995 (2): 176-183.

Santoni, G., Amantini, C., Lucciarini, R., Perfumi, M., Pompei, P., & Piccoli, M. Neonatal capsaicin treatment affects rat thymocyte proliferation and cell death by modulating substance p and neurokinin-1 receptor expression. *Neuroimmunomodulation.* 2004; 11 (3): 160-172.

Saunders, C. I., Fassett, R. G., & Geraghty, D. P. Up-regulation of trpv1 in mononuclear cells of end-stage kidney disease patients increases susceptibility to n-arachidonoyl-dopamine (nada)-induced cell death. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1792 (10): 1019-1026.

Scully, O. J., Bay, B. H., Yip, G., & Yu, Y. Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics*. 2012; 9 (5): 311-320.

Shapovalov, G., Ritaine, A., Skryma, R., & Prevarskaya, N. Role of trp ion channels in cancer and tumorigenesis. *Semin Immunopathol*. 2016; 38 (3): 357-369.

Southall, M. D., Li, T., Gharibova, L. S., Pei, Y., Nicol, G. D., & Travers, J. B. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 304 (1): 217-222.

Stander, S., Moormann, C., Schumacher, M., Buddenkotte, J., Artuc, M., Shpacovitch, V., . . . Steinhoff, M. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol*. 2004; 13 (3): 129-139.

Stovgaard, E. S., Nielsen, D., Hogdall, E., & Balslev, E. Triple negative breast cancer - prognostic role of immune-related factors: A systematic review. *Acta Oncol*. 2018; 57 (1): 74-82.

Suh, Y. G., & Oh, U. Activation and activators of trpv1 and their pharmaceutical implication. *Curr Pharm Des*. 2005; 11 (21): 2687-2698.

Sumoza-Toledo, A., Lange, I., Cortado, H., Bhagat, H., Mori, Y., Fleig, A., . . . Partida-Sanchez, S. Dendritic cell maturation and chemotaxis is regulated by trpm2-mediated lysosomal ca²⁺ release. *FASEB J*. 2011; 25 (10): 3529-3542.

Suva, L. J., Griffin, R. J., & Makhoul, I. Mechanisms of bone metastases of breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2009; 16 (3): 703-713.

Tang, J., Luo, K., Li, Y., Chen, Q., Tang, D., Wang, D., & Xiao, J. Capsaicin attenuates lps-induced inflammatory cytokine production by upregulation of lxr α . *Int Immunopharmacol*. 2015; 28 (1): 264-269.

Tominaga, M., & Tominaga, T. Structure and function of trpv1. *Pflugers Arch*. 2005; 451 (1): 143-150.

Toth, B. I., Benko, S., Szollosi, A. G., Kovacs, L., Rajnavolgyi, E., & Biro, T. Transient receptor potential vanilloid-1 signaling inhibits differentiation and activation of human dendritic cells. *FEBS Lett.* 2009; 583 (10): 1619-1624.

Venkatachalam, K., & Montell, C. Trp channels. *Annu Rev Biochem.* 2007; 76: 387-417.

Vennekens, R., Menigoz, A., & Nilius, B. Trps in the brain. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2012; 163: 27-64.

Walker, J., Ley, J. P., Schwerzler, J., Lieder, B., Beltran, L., Ziemba, P. M., . . . Somoza, V. Nonivamide, a capsaicin analogue, exhibits anti-inflammatory properties in peripheral blood mononuclear cells and u-937 macrophages. *Mol Nutr Food Res.* 2017; 61 (2).

Weber, L. V., Al-Refae, K., Wolk, G., Bonatz, G., Altmuller, J., Becker, C., . . . Hatt, H. Expression and functionality of trpv1 in breast cancer cells. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2016; 8: 243-252.

Welch, D. R., & Hurst, D. R. Defining the hallmarks of metastasis. *Cancer Res.* 2019. Williams, C. B., Yeh, E. S., & Soloff, A. C. Tumor-associated macrophages: Unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *NPJ Breast Cancer.* 2016; 2.

Yee, C. Tumor immunity and immunotherapy. In K. M. Pelengaris S (Ed.), *The molecular biology of cancer.* 1 ed. UK; 2006, s: 389-411.

Yiangou, Y., Facer, P., Dyer, N. H., Chan, C. L., Knowles, C., Williams, N. S., & Anand, P. Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *Lancet.* 2001; 357 (9265): 1338-1339.

Zhu, J., & Paul, W. E. Cd4 t cells: Fates, functions, and faults. *Blood.* 2008; 112 (5): 1557-1569.

Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., . . . Hogestatt, E. D. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature.* 1999; 400 (6743): 452-457.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Muhlis	Uyruğu	T.C.
Soyadı	Akman	Tel no	05444583524
Doğum tarihi	16.01.1992	e-posta	muhlisakman@windowlisve.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Kütahya Anadolu Öğretmen Lisesi	2010
Lisans	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2015
Yüksek Lisans		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
-	-	-

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS (Yabancı Dil Sınavı)	82,5

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
TRPV1 iyon kanallarının anti-tümöral immünitedeki rollerinin metastatik meme kanseri modelinde araştırılması.	TÜBİTAK-COST	2016-2018
Meme Kanserine Karşı Oluşan İmmün Yanıtta TRPV1 Eksprese Eden İmmün Hücrelerin Fenotiplerindeki Değişikliklerin Belirlenmesi	Akdeniz Üniversitesi BAP	2017-2019
Meme Kanserinin TRPV1 Eksprese Eden İmmün Hücrelerden Salınan Sitokinler Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	Akdeniz Üniversitesi BAP	2017-2019

Burslar-Ödüller:

7th World Congress Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels (20-23 Nisan 2018-Alanya/Türkiye) kongresinde poster 3.'lük ödülü

6th International Conference Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring (29 Nisan – 2 Mayıs 2019-Tiflis/Gürcistan) kongresinde “Outstanding Abstract and Abstract Presentation” ödülü

Yayınlar ve Bildiriler:

Uluslararası Dergide Yayınlanan Makale:

Erin N, Tanrıöver G, Curry A, **Akman M**, Duymuş Ö, Gorczynski R, *CD200fc enhances anti-tumoral immune response and inhibits visceral metastasis of breast carcinoma*, *Oncotarget*, 2018;9(27);19147-19158.

Ulusal ve Uluslararası Kongrelerde Sunulan ve Kongre Kitapçığında Yayınlanan Bildiriler:

1. **Akman M**, Erin N. “*TRPV1 and TrkA agonists alter cytokine secretions of mix leukocyte cultures obtained from tumor-bearing mice*”, 14th CIMT Annual Meeting 2016, 10-12 Mayıs 2016, Mainz, Almanya.
2. **Akman M**, Erin N. “*Effects of TRPV1 Agonists and Antagonists on Proliferation of Liver Metastatic Breast Carcinoma Cells*”, 3. Congress of the Serbian Association for Cancer Research, 6-7 Ekim 2017, Belgrad, Sırbistan.
3. **Akman M**, Erin N. “*TRPV1 expression changes on immune cells in tumor bearing animals*” and “*Effects of TRPV1 antagonist AMG-9810 on proliferation of breast carcinoma cells*” 7th World Congress Oxidative Stress, Calcium Signaling And TRP Channels, 20-23 Nisan 2018, Alanya, Antalya, Türkiye.
4. **Akman M**, Nizam E, Haksever S, Erin N. “Activation of TRPV1 with Olvanil restores functions of immune cells in tumor-bearing mice” Oral presentation, Sixth International Conference Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring, 29 Nisan – 2 Mayıs 2019, Tiflis, Gürcistan.
5. **Akman M**, Erin N. “Type of immune response evoked by TRPV1 agonists depends on the sub-type of metastatic breast cancer cells: IFN98g levels were altered in brain metastatic but not in liver metastatic cells” Sixth International Conference Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring, 29 Nisan – 2 Mayıs 2019, Tiflis, Gürcistan.

6. **Akman M**, Erin N. “Effects of co-treatment with TRPV1 and TrkA agonist on immune response of tumor-bearing and tumor-free mice” Sixth International Conference Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring, 29 Nisan – 2 Mayıs 2019, Tiflis, Gürcistan.
7. **Akman M**, Erin N. “*Effects of TRPV1 agonists and antagonists on proliferation of metastatic breast carcinoma cells*” 6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 27-30 Ekim 2016, Konya, Türkiye.
8. **Akman M**, Erin N. “*TRPV1 (Transient receptor potential vanilloid 1) Agonist ve antagonistlerinin karaciğere metastatik meme karsinom hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri*” 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 17-20 Ekim 2017, Trabzon, Türkiye.
9. **Akman M**, Erin N. “*Tümör taşıyan hayvanların immün hücrelerindeki TRPV1 ekspresyon değişiklikleri*” 1. Temel Onkoloji Sempozyumu, 9-11 Mayıs 2018, İzmir, Türkiye.