



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**TRPM-2 KATYON KANALI ANTAGONİSTİ
2-AMİNOETOKSİDİFENİL BORAT'IN SİSPLATİN
NÖROTOKSİSİTESİNDEKİ ROLÜ**

DOKTORA TEZİ

EZGİ EROĞLU

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kevser EROL

2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ezgi EROĞLU'nun Doktora Tezi olarak hazırladığı “**TRPM-2 katyon kanalı antagonisti 2-Aminoetoksidifenil borat'ın sisplatin nörotoksitesindeki rolü**” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “**KABUL**” edilmiştir.

06.03.2020

Üye : Prof. Dr. Kevser EROL



Üye : Prof. Dr. Fatma Sultan KILIÇ



Üye : Prof. Dr. Emel ULUPINAR



Üye : Prof. Dr. Özge UZUN



Üye : Prof. Dr. Zühal AKTUNA



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.../.../ tarih ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof Dr. Özkan ALATAŞ
Enstitü Müdürü

ÖZET

TRPM-2 katyon kanalı antagonisti 2-Aminoetoksidifenil borat'ın sisplatin nörotoksisitesindeki rolü

Amaç: Bu çalışmada primer sıçan dorsal kök gangliyon (DRG) hücre kültüründe sisplatinin (CIS) sebep olduğu nörotoksisitede ve sisplatinle oluşturulan periferik nöropatide (PN) transient reseptör potansiyel melastatin 2 (TRPM2) iyon kanalı antagonisti 2-aminoetoksidifenil borat'ın (2-APB) potansiyel nöroprotektif ve antihiperalezik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Kapsam: CIS çeşitli tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan platin türevi kemoterapötik bir ajandır. CIS ototoksisite, nefrotoksisite ve PN gibi yan etkilere neden olabilmektedir. TRPM2 eksikliğinin kemoterapiyle indüklenen periferik nöropatide (KİPN) anti-allodinik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. 2-APB'nin DRG nöronlarında TRPM2 kanal inhibitörü olarak davrandığı tespit edilmiştir.

Yöntem: *In vitro* deneylerde toksisite değerlendirmesi MTT testiyle yapılmıştır. CIS'in submaksimal toksik etki oluşturan konsantrasyonu belirlenerek, CIS (200 µM) ile birlikte uygulanan 2-APB'nin (0.5, 1, 2 mM) sitoprotektif etkisi incelenmiştir. *In vivo* deneylerde ise 6-8 haftalık (200-250 g) Sprague Dawley türü sıçanlara 5 hafta süreyle haftada bir kez sisplatin (3 mg/kg) intraperitoneal yolla uygulanarak periferik nöropati geliştirilmiştir. İlk aşamada 2-APB (2, 4, 8 mg/kg) CIS ile eş zamanlı uygulanmıştır. Nöropati mekanik allodini, termal hiperalezi, kuyruk sıkıştırma testi ve soğuk plaka testleriyle değerlendirilmiştir. Motor koordinasyonu değerlendirmek için rotarod ve ayak izi analizi, lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için ise aktivitemetre testi uygulanmıştır. İkinci aşamada CIS yine 5 hafta süreyle haftada bir kez 3 mg/kg dozda uygulanırken; 2-APB'nin etkili bulunan dozu (4mg/kg) ve TRPM2 kanalının farklı bir inhibitörü olan flufenamik asid (FFA) haftada 3 kez uygulanmış, yine aynı davranış testleriyle değerlendirme yapılmıştır. DRG, siyatik sinir, karaciğer ve böbrekler izole edilip, histolojik değerlendirme yapılmıştır. NGF, BDNF, TNF-α, GSH, MDA ve LDH düzeyleri sıçanlardan alınan DRG doku homojenatlarında

ELISA yöntemiyle çalışılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi, çift yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis testleri kullanılmıştır.

Bulgular: CIS mekanik allodini ve soğuk allodiniye, ayrıca akut spinal düzeyde ağrı duyarlılığının artmasına neden olmuştur. Termal hiperaljezi testinde anlamlı bir değişim saptanmamıştır. CIS'in sıçanlarda motor koordinasyonu bozduğu ve lokomotor aktiviteyi azalttığı görülmüştür. 2-APB (4 mg/kg), CIS'in allodinik etkilerini anlamlı olarak düzeltmiştir. Ayrıca lokomotor aktiviteyi artırmış ve motor koordinasyonu iyileştirmiştir. CIS'in yol açtığı periferik dokulardaki yapısal toksisiteyi 2-APB anlamlı ölçüde azaltmıştır. CIS uygulaması sonucu azalan NGF ve BDNF düzeyleri 2-APB ile artmıştır. 2-APB, TNF- α , MDA ve LDH düzeylerini azaltırken; GSH seviyesini artırmıştır.

Sonuç: 2-APB, CIS'in neden olduğu PN ve nörotoksistide sitoprotektif ve antiallodinik etkiler göstermiştir. Ayrıca periferik dokularda yapılan histolojik incelemelerde ve antioksidan parametreler üzerinde 2-APB'nin olumlu etkileri belirlenmiştir. 2-APB'nin CIS'e bağlı gelişen PN'nin tedavisinde tek başına ya da diğer tedavi seçenekleriyle birlikte kullanılabilir potansiyel bir ajan olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: 2-APB, nörotoksistite, periferik nöropati, sisplatin.

SUMMARY

The role of TRPM-2 cation channel antagonist 2-Aminoethoxydiphenyl borate in cisplatin neurotoxicity

Aim: It is aimed to investigate the potential neuroprotective and antihyperalgesic effects of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) ion channel antagonist 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) in primary rat dorsal root ganglion (DRG) cell culture and peripheral neuropathy (PN) induced by cisplatin (CIS).

Content: CIS is a platinum-derived chemotherapeutic agent commonly used in the treatment of various tumors. CIS can cause side effects such as ototoxicity, nephrotoxicity, and PN. TRPM2 deficiency has been shown to have anti-allodynic effects in chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN). It has been found that 2-APB acts as a TRPM2 channel inhibitor in DRG neurons.

Method: Toxicity was evaluated by MTT test in *in vitro* experiments. By determining the submaximal toxic effect concentration of CIS, the cytoprotective effect of 2-APB (0.5, 1, 2 mM) applied together with CIS (200 μ M) was examined. In *in vivo* experiments, peripheral neuropathy was developed by administering cisplatin (3 mg/kg) intraperitoneally to Sprague Dawley rats of 6-8 weeks (200-250 g) once a week for 5 weeks. In the first stage, 2-APB (2, 4, 8 mg/kg) was administered simultaneously with CIS. Neuropathy was evaluated by mechanical allodynia, thermal hyperalgesia, tail compression and cold plate tests. Rotarod and footprint analysis were used to evaluate motor coordination, and an activity meter test was used to evaluate locomotor activity. In the second stage, CIS is administered once a week at a dose of 3 mg / kg for 5 weeks; the effective dose of 2-APB (4 mg/kg) and flufenamic acid (FFA), which is a different inhibitor of TRPM2 channel, were applied 3 times a week and evaluated with the same behavior tests. DRG, sciatic nerve, liver and kidneys were isolated and histological evaluation was performed. NGF, BDNF, TNF- α , GSH, MDA and LDH levels were studied by ELISA method in DRG tissue homogenates taken from rats. One-way analysis of variance, two-way analysis of variance and Kruskal-Wallis tests were used to evaluate the data.

Results: CIS caused mechanical allodynia and cold allodynia, as well as increased pain sensitivity in the acute spinal level. There was no significant change in the thermal hyperalgesia test. CIS has been shown to impair motor coordination and decrease locomotor activity in rats. 2-APB (4 mg / kg) significantly altered the allodynic effects of CIS. It also increased locomotor activity and improved motor coordination. 2-APB significantly reduced structural toxicity in peripheral tissues caused by CIS. As a result of CIS administration, reduced levels of NGF and BDNF increased following 2-APB administration. While 2-APB decreased TNF- α , MDA and LDH levels and it increased GSH level.

Conclusion: 2-APB showed cytoprotective and antiallodynic effects in PN and neurotoxicity caused by CIS. In addition, positive effects of 2-APB were determined on histological examinations and antioxidant parameters in peripheral tissues. 2-APB is thought to be a potential agent that may be used alone or in combination with other treatment options in the treatment of PN developed due to CIS administration.

Key words: 2-APB, neurotoxicity, peripheral neuropathy, cisplatin.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
SUMMARY.....	v
TABLO DİZİNİ.....	ix
ŞEKİL DİZİNİ.....	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemoterapiye Bağlı Gelişen Periferik Nöropati	3
2.1.1. <i>Sisplatin</i>	5
2.1.1. <i>Sisplatin kaynaklı periferik nöropati</i>	6
2.1.1.2. <i>Sisplatin kaynaklı periferik nöropatinin patofizyolojisi</i>	7
2.1.1.3. <i>Sisplatin kaynaklı KİPN profilaksisi ve tedavisi</i>	10
2.2. Transient Reseptör Potansiyel (TRP) Kanalları.....	10
2.2.1. <i>TRPM alt ailesi</i>	12
2.2.1.1. <i>TRPM2 kanalı</i>	13
2.3. 2- Aminoetoksidifenil borat (2-APB)	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Deney Hayvanları	17
3.2. 2-APB'nin Sitoprotektif Etkisinin Değerlendirilmesi	17
3.2.1. <i>DRG hücre kültürü</i>	17
3.2.2. <i>MTT sitotoksosite testi</i>	18
3.3. Deney Protokolü.....	19
3.4. İlaçlar.....	20
3.5. Davranış Testleri	20
3.5.1. <i>Mekanik allodininin değerlendirilmesi</i>	20
3.5.2. <i>Termal hiperaljezinin değerlendirilmesi</i>	21
3.5.3. <i>Soğuk allodininin değerlendirilmesi</i>	22
3.5.4. <i>Akut spinal ağrının değerlendirilmesi</i>	23
3.5.5. <i>Lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi</i>	23
3.5.6. <i>Motor koordinasyonun değerlendirilmesi</i>	24
3.5.6.1. <i>Rotarod testi</i>	24
3.5.6.2. <i>Ayak izi (Footprint) testi</i>	24
3.6. Morfolojik Analizler	25

3.6.1. Vücut ağırlıklarının değerlendirilmesi	25
3.6.2. İntrakardiyak perfüzyon ve periferik dokuların toplanması.....	25
3.6.3. DRG ve siyatik sinirlerin histopatolojik değerlendirmeleri.....	26
3.6.4. Böbrek ve karaciğer dokularının değerlendirilmesi	26
3.7. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi.....	27
3.7.1. DRG izolasyonu ve homojenatların elde edilmesi.....	27
3.7.2. ELISA yöntemiyle biyokimyasal parametrelerin analizi.....	27
3.8. İstatistiksel Analizler	28
4. BULGULAR	29
4.1. İn vitro Deney Bulguları	29
4.1.1. MTT testi bulguları.....	29
4.2. Davranış Testleri Bulguları.....	30
4.2.1. Mekanik allodini bulguları	30
4.2.2. Termal hiperaljezi bulguları	31
4.2.3. Kuyruk sıkıştırma (tail clip) testi bulguları.....	31
4.2.4. Soğuk allodini bulguları.....	32
4.2.5. Rotarod testi bulguları.....	33
4.2.6. Aktivitemetre testi bulguları.....	34
4.2.7. Ayakizi (footprint) analizi bulguları	38
4.3. Morfolojik Analiz Bulguları	39
4.3.1. Hayvanların genel fiziksel görünümleri ve ağırlık değişimleri.....	39
4.3.2. DRG'lerde histopatolojik değerlendirme bulguları.....	40
4.3.3. Siyatik sinirlerde histopatolojik değerlendirme bulguları	43
4.3.4. Karaciğer kesitlerinde histopatolojik değerlendirme bulguları.....	44
4.3.5. Böbrek kesitlerinde histopatolojik değerlendirme bulguları	45
4.4. Biyokimyasal Değerlendirmeler.....	47
5. TARTIŞMA.....	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	59
ÖZGEÇMİŞ	75

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1 Periferik nöropatiye neden olan kemoterapötik ajanlar.....	3
Tablo 2.2 Kemoterapötik ilaç kaynaklı periferik nöropati modelleri.....	5
Tablo 2.3 Nöronal hücrelerde TRPM2 blokerlerinin etkileri.....	14



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1 Tipik "eldiven-çorap" tarzı duyu kaybına neden olan kemoterapötiklerin nörotoksisite oluşturdıkları etki yerleri.....	4
Şekil 2.2 Sisplatinin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.3 TRP kanalı yapısı.....	11
Şekil 2.4 TRP kanal ailesi.....	11
Şekil 2.5 TRPM2 kanal yapısı.....	13
Şekil 2.6 2-APB'nin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 3.1 Deney protokolü.....	19
Şekil 3.2 Dinamik plantar test düzeneği.....	20
Şekil 3.3 Termal plantar test düzeneği.....	21
Şekil 3.4 Soğuk plaka testi düzeneği.....	21
Şekil 3.5 Kuyruk sıkıştırma testi düzeneği.....	22
Şekil 3.6 Aktivitemetre testi düzeneği.....	23
Şekil 3.7 Rotarod testi düzeneği.....	23
Şekil 3.8 Ayak izi test düzeneği ve ölçüm örneği.....	24
Şekil 3.9 İntrakardiyak perfüzyon.....	25
Şekil 4.1 MTT testi ile CIS'in hücre canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesi..	28
Şekil 4.2 MTT testi ile CIS nörotoksisitesinde 2-APB'nin hücre canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesi.....	28
Şekil 4.3 0. Günden 35. Güne kadar haftalık mekanik allodini testi bulguları.....	29
Şekil 4.4 Mekanik allodini bazal-28.gün-35.gün bulgularının kıyaslanması.....	29
Şekil 4.5 0. Günden 35. Güne kadar haftalık termal hiperaljezi testi bulguları...30	
Şekil 4.6 0. Günden 35. Güne kadar haftalık tail clip testi bulguları.....	30
Şekil 4.7 Tail clip testi bazal-28.gün-35.gün bulgularının kıyaslanması.....	31
Şekil 4.8 0. Günden 35. Güne kadar haftalık cold plate testi bulguları.....	31

Şekil 4.9 Cold plate testi bazal-28.gün-35.gün bulgularının kıyaslanması.....	32
Şekil 4.10 0. Günden 35. Güne kadar haftalık rotarod testi bulguları.....	32
Şekil 4.11 Rotarod testi bazal-35.gün bulgularının kıyaslanması.....	33
Şekil 4.12 0. Günden 35. Güne kadar aktivitemetre testine göre kat edilen toplam mesafe bulguları.....	34
Şekil 4.13 Aktivitemetre testine göre bazal-28.gün-35.gün kat edilen toplam mesafe bulgularının kıyaslanması.....	34
Şekil 4.14 0. Günden 35. Güne kadar aktivitemetre testine göre deney hayvanlarının stereotipik hareket bulguları.....	35
Şekil 4.15 0. Günden 35. Güne kadar aktivitemetre testine göre deney hayvanlarının ambulatuvar hareket bulguları.....	35
Şekil 4.16 Aktivitemetre testine göre bazal-35.gün ambulatuvar hareket bulgularının kıyaslanması.....	36
Şekil 4.17 0. Günden 35. Güne kadar aktivitemetre testine göre deney hayvanlarının dikey hareket bulguları.....	36
Şekil 4.18 0. Günden 35. Güne kadar aktivitemetre testine göre deney hayvanlarının yatay hareket bulguları.....	37
Şekil 4.19 Aktivitemetre testine göre bazal-35.gün yatay hareket bulgularının kıyaslanması.....	37
Şekil 4.20 Footprint testine göre 7.gün-21.gün-35.gün arka pençe adım uzunluğu bulgularının kıyaslanması.....	38
Şekil 4.21 Deney hayvanlarının 0. Gün – 35. Günlerde kaydedilen vücut ağırlıkları arasındaki değişim.....	39
Şekil 4.22 DRG'lerin histopatolojik değerlendirmesi.....	40
Şekil 4.23 DRG nöron soma alanı - % DRG frekans histogramı.....	41
Şekil 4.24 DRG nöron soma alanı - % DRG frekans histogramı kontrol, CIS ve CIS+2APB4 kıyaslaması.....	41
Şekil 4.25 Siyatik sinirlerin histopatolojik değerlendirmesi.....	42

Şekil 4.26 Hemotoksilen-eozin ile boyanan karaciğer kesitlerinin histopatolojik bulguları.....	43
Şekil 4.27 Mason trikrom ile boyanan karaciğer kesitlerinin histopatolojik bulguları.....	44
Şekil 4.28 Hemotoksilen-eozin ile boyanan böbrek kesitlerinin histopatolojik bulguları.....	45
Şekil 4.29 Böbrek kesitlerinde patolojik skorlama bulguları.....	46
Şekil 4.30 DRG doku homojenatında NGF düzeyleri	47
Şekil 4.31 DRG doku homojenatında BDNF düzeyleri	47
Şekil 4.32 DRG doku homojenatında TNF- α düzeyleri	47
Şekil 4.33 DRG doku homojenatında MDA düzeyleri	48
Şekil 4.34 DRG doku homojenatında GSH düzeyleri	48
Şekil 4.35 DRG doku homojenatında LDH düzeyleri	48

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACA	N- (p-Amilcinnamoil) antranilik asit
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
Ca⁺²	Kalsiyum
cADPR	Siklik ADPR
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptid
CIS	Sisplatin
cm	Santimetre
DRG	Dorsal kök gangliyonu
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzim-bağlı immünosorbent analizi
ESOGÜ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FFA	Flufenamik asid
GSH	Glutasyon
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HBSS	Hank's dengeli çözeltisi
I/R	İskemi reperfüzyon
IP₃R	İnositol 1,4,5-trisfosfat reseptörü
i.p	İntraperitoneal
KİPN	Kemoterapinin indüklediği periferik nöropati
LDH	Laktat dehidrogenaz

MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mDNA	Mitokondriyal DNA
mM	Milimolar
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
N	Normal
NAD⁺	Nikotinamid adanin dinükleotid
NGF	Nerve growth factor
PBS	Phosphate buffered saline
PN	Periferik nöropati
ROS	Reaktif oksijen türleri
s	Saniye
SOCCs	Store operated kalsiyum kanalları
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TG	Trigeminal gangliyon
TICAM	Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
TNF-α	Tümör nekroz-alfa
TRP	Transient Reseptor Potential
TRPC	TRP conancial
TRPV	TRP vanilloid
TRPM	TRP melastatin
TRPP	TRP polisistein
TRPML	TRP mukolipin
TRPA	TRP ankrin

μM Mikromolar

2-APB 2-Aminoetoksidifenil borat



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser günümüzde dünya çapında başlıca mortalite nedenlerinden biridir (American Society of Clinical, 2014). Son yıllarda, kanser hastalarında erken teşhis, hassas alt tip karakterizasyonu ve yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesiyle birlikte uzun süreli sağkalım oranında önemli bir artış olmuştur (Jemal, Center, DeSantis, & Ward, 2010). Kanser tedavisi kaynaklı en yaygın bildirilen semptomlardan biri, taksanlar, platin bileşikleri, vinka alkaloidleri, epotilonlar, proteaz inhibitörleri ve talidomidin neden olduğu kemoterapinin indüklediği periferik nöropatidir (KİPN) (Miltenburg & Boogerd, 2014). Sisplatin (CIS), çeşitli tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik bir ajandır. Anti-tümör aktivitesine ek olarak, CIS normal hücreleri etkilemekte ve ototoksisite, nefrotoksisite ve KİPN gibi yan etkilere neden olabilmektedir (Oh vd., 2014). CIS'in periferik duyuşal nöronlar ve dorsal kök gangliyon (DRG) hücrelerinde biriktiği ve mitokondriyal DNA replikasyonunu inhibe edip DRG nöronlarında vakuolizasyon ve degradasyona neden olabileceği belirtilmektedir (Donertas vd., 2018). Günümüzde CIS'in neden olduğu nöropatinin farmakolojik tedavisinde etkili bir çözüm bulunmamakta olup, kalsiyum ve magnezyum infüzyonları, amifostin ve antioksidanlar (glutatyon, E vitamini, α -lipoik asit ve N-asetilsistein) kemoterapi alan hastalarda test edilmiştir. Ancak klinik sonuçlar tatmin edici değildir (M. Shahid, Subhan, Ahmad, & Sewell, 2017). Transient Reseptor Potential (TRP) kanalları; nosiseptif duyuşal sinir sonlanmalarında bulunan ve termal, kimyasal veya mekanik uyaranlarla aktive olan, seçici olmayan özel bir katyon kanalı ailesidir. TRP ailesinin altı alt üyesi bulunmaktadır: TRP conancial (TRPC), TRP vanilloid (TRPV), TRP melastatin (TRPM), TRP polisistein (TRPP), TRP mukolipin (TRPML) ve TRP ankrin (TRPA) (Samanta, Hughes, & Moiseenkova-Bell, 2018). TRP kanallarının periferik nöropatideki rolü, TRPA1, TRPM8, TRPV1 ve TRPV4 kanalları üzerinden fare ve sıçanlarda araştırılmıştır (Naziroglu & Braidı, 2017). TRPM kanallarının bir alt ailesi olan TRPM2 kanalı ilk olarak 1998 yılında tespit edilmiştir (Clapham, 2003). TRPM2 kanalları başta beyin ve kemik iliği olmak üzere böbrek, barsak, karaciğer, akciğer, testis, prostat pankreas, iskelet kası gibi pek çok farklı dokuda bulunmaktadır (Hecquet & Malik, 2009).

TRPM2 kanallarının DRG ve hipokampal nöronlarda da yüksek oranda eksprese edildiği tespit edilmiştir (Demirdas, Naziroglu, & Ovey, 2017). TRPM2 eksikliğinin akut ve kronik ağrı, kemoterapiye bağlı periferik nöropati ve diyabetik nöropatinin yanı sıra klasik inflamatuvar ağrı ve periferik sinir hasarı kaynaklı nöropatik ağrıda antiallodinik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (So vd., 2015). Son zamanlardaki kanıtlar, spinal kord hasarı ve nöropatik ağrıda TRPM2 kanalının rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Belrose & Jackson, 2018). CIS, oksaliplatin ve paklitaksel'e bağlı nöropati modellerinde yapılan çalışmalarda bu ajanların TRPA1, TRPM8 ve TRPV1 kanallarıyla ilişkilerinin DRG nöronlarında değerlendirildiği, ancak TRPM2 kanalı ve kemoterapötik ajanlar arasındaki etkileşmeye dair bir çalışma bulunmadığı tespit edilmiştir (Naziroglu & Braidy, 2017). 2-Aminoetoksidifenil borat (2-APB), ilk olarak inositol 1,4,5-trisfosfat reseptörünün (IP₃R) bir antagonisti olarak bildirilmiştir ve nispeten düşük konsantrasyonlarda bu reseptörü inhibe ettiği belirtilmiştir (Bootman vd., 2002). 2-APB hücre dışından Ca⁺² girişini etkilemeyen ilk IP₃ modülatörüdür. Bu maddenin, aynı zamanda depolanmış Ca⁺² miktarına duyarlı Ca⁺² kanallarını (store operated kalsiyum kanalları (SOCCs) ve sarko/endoplazmik retikulum Ca⁺²-ATPaz pompasını inhibe ettiği bildirilmiştir (Dobrydneva & Blackmore, 2001). 2-APB'nin TRPM2 kanalını inhibe ettiğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Chen vd., 2012; Togashi, Inada, & Tominaga, 2008). 2-APB'nin ayrıca antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Berridge, Herst, & Tan, 2005). Bor bileşiklerinin CIS nefrotoksisitesindeki inflamasyon ve oksidatif stresi azaltmaları, 2-APB'nin de organobor yapısı nedeniyle bu açıdan da yararlı olabileceğini düşündürmektedir (Hazman, Bozkurt, Fidan, Uysal, & Celik, 2018).

Bu bilgilerden hareketle, çalışmamızda 2-APB'nin potansiyel nöroprotektif ve antihiperaljezik etkileri düşünülerek DRG hücre kültüründe CIS kaynaklı nörotoksisitede ve CIS ile indüklenen periferik nöropatideki rolünün araştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca 2-APB'nin olası antioksidan etkileri göz önüne alınarak CIS nedeniyle oluşan karaciğer ve böbrek toksisitesindeki protektif etkilerinin incelenmesi de amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemoterapiye Bağlı Gelişen Periferik Nöropati

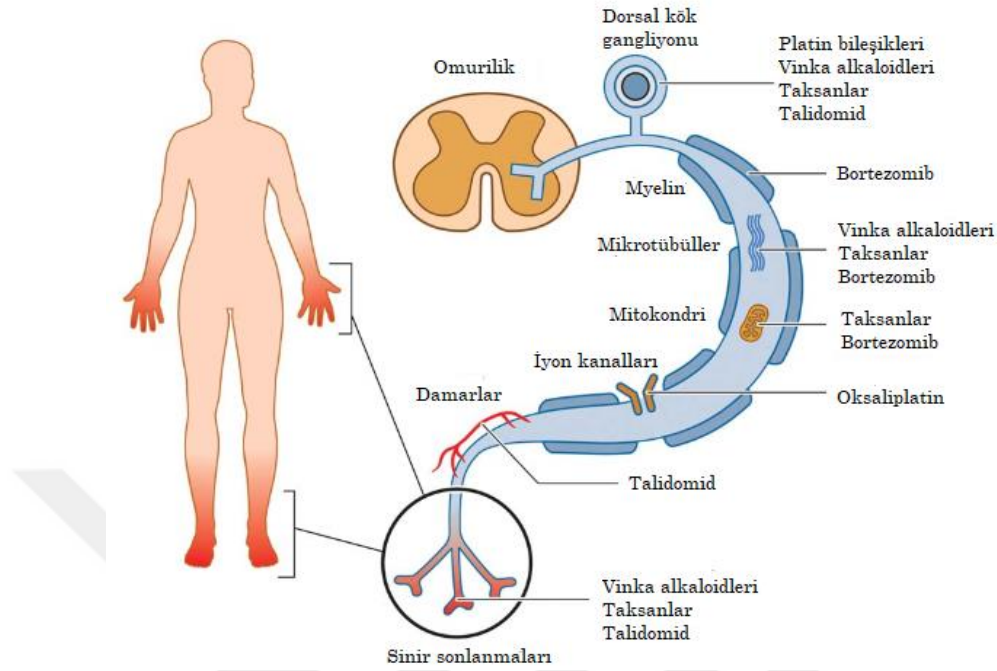
Dünya Sağlık Örgütü Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (WHO-IARC) tarafından sağlanan 2019 verilerine göre, yaklaşık 18 milyon insana kanser teşhisi konmuştur (Cavaletti vd., 2019). Kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlar, kanser hücrelerinin hızla bölünmesini ortadan kaldıracak çok sayıda hedef ve etki mekanizmasına sahip olduklarından kanserin ilerlemesini önlemede son derece etkilidirler. Ancak bu ilaçlar aynı zamanda vücuttaki normal hücreleri de etkileyerek anemi, diyare, bulantı, kusma, enfeksiyonlar, nörolojik değişiklikler, yorgunluk, saç dökülmesi, kısırlık, ağrı ve periferik nöropati gibi yan etkilere neden olmaktadır (Kanzawa-Lee, Knoerl, Donohoe, Bridges, & Smith, 2019). KİPN, bazı kemoterapötik ilaçların sık görülen yan etkilerinden biridir (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. Periferik nöropatiye neden olan kemoterapötik ajanlar (Argyriou, Kyritsis, Makatsoris, & Kalofonos, 2014).

Platin bileşikleri	Vinka alkaloidleri	Taksanlar	Epotilonlar	Diğer ajanlar
Sisplatin Karboplatin Oksaliplatin	Vinkristin Vinblastin	Paklitaksel Doksetaksel	İksabepilon	Bortezomib Talidomid Lenalidomid Suramin

KİPN hem kanser tedavisinin etkinliğini hem de kanser hastalarının yaşam kalitesini etkileyen aynı zamanda terapötik tedavinin kesilmesine neden olan bir durumdur (Boyette-Davis, Walters, & Dougherty, 2015). KİPN semptomları: Allodini (genellikle ağrılı olmayan bir uyarandan üretilen ağrı), hiperaljezi (normal olarak ağrılı bir uyarandan üretilen abartılı bir ağrı), periferik ekstremiteelerde parestezi (ağrılı bir uyarandan olmasa da hissedilen karıncalanma benzeri duyu) ve disestezi (iğne batması ya da yanma gibi algılanan his), uyuşma, karıncalanma ve derin tendon refleksinde azalmadır (Park vd., 2008). Duyusal semptomlar genellikle ilk önce gelişmekte

ve ekstremiteilerin distal kısımlarında tipik bir “eldiven-çorap” tarzı duyu kaybı görülmektedir (Zajackowska vd., 2019) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Tipik "eldiven-çorap" tarzı duyu kaybına neden olan kemoterapötiklerin nörotoksisite oluşturdıkları etki yerleri (Park vd., 2013).

KİPN araştırmalarında, özellikle sıçan ve farelerin kullanıldığı deneysel modeller, nöronal veya aksonal dejenerasyon ile ilgili mekanizmaları araştırma ve nörotoksik ilaçların neden olduğu fonksiyon kaybını hedeflemenin yanı sıra nöropati gelişimini önlemeye yönelik yeni stratejileri test etmek için faydalıdır (Bruna vd., 2019). Bu deneysel modellerde nöropati oluşturmak için belirli ajanlar farklı dozlarda uygulanmaktadır (Tablo 2.2.).

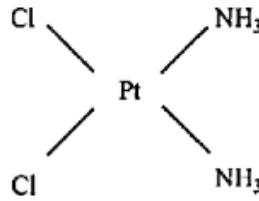
Tablo 2.2. Kemoterapötik ilaç kaynaklı periferik nöropati modelleri (Waseem, Kaushik, Tabassum, & Parvez, 2018).

Kemoterapötik	Tür	Tedavi (mg/kg)	Total doz	İnsan doz eşdeğeri (mg/kg)	Semptomlar
Sisplatin	Sıçan	0.5-3.0	1.5-18.0	0.24-2.9	Mekanik allodini, soğuk allodini
	Fare	2.3-6.0	23.0-40.0	1.9-3.3	Mekanik allodini, soğuk allodini
Oxaliplatin	Sıçan	2.0-6.0	2.0- 16.0	0.32-2.6	Mekanik allodini, mekanik hiperaljezi, soğuk allodini, termal allodini, ısı allodini, ısı hiperaljezi
	Fare	0.04-10	3.0-30.0	0.24-2.4	Mekanik allodini, soğuk allodini
Vinkristin	Sıçan	0.05-0.1	0.5-1.4	0.08-0.23	Mekanik allodini, mekanik hiperaljezi, ısı hiperaljezi
	Fare	0.1-1.7	0.1-34.0	0.01-2.8	Mekanik allodini, soğuk allodini, termal allodini, mekanik hiperaljezi, ısı hiperaljezi
Bortezomib	Sıçan	0.15-0.2	2.4-4.8	0.39-0.77	Mekanik allodini, mekanik hiperaljezi, soğuk allodini
	Fare	0.4-0.8	4.8-6.4	0.39-0.52	Mekanik allodini, mekanik hiperaljezi, soğuk allodini

2.1.1. Sisplatin

İlk platin türevi bileşik olan sisplatin ilk kez 1845 yılında keşfedilmiştir (Wiltshaw, 1979). Başlangıçta araştırmacılar, *Escherichia coli*'nin büyüme özelliklerini incelerken bu maddenin antibakteriyel özellikler sergilediğini gözlemlemişler ve daha sonra antineoplastik özelliklerini de keşfetmişlerdir (Rosenberg, Vancamp, & Krigas, 1965; Rosenberg, VanCamp, Trosko, & Mansour, 1969). 1971'de Ulusal Kanser Enstitüsü CIS ile ilk klinik denemeye başlamış, 1978'de ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) bazı solid tümörlerin

tedavisinde kullanımını onaylamıştır (Dyson & Sava, 2006). O zamandan beri CIS meme, yumurtalık ve prostat gibi kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaya devam eden bir ilaçtır (Kelland, 2007). CIS'in moleküler yapısı, bir cis konfigürasyonunda iki klor atomu ve iki amonyak grubu ile çevrili merkezi bir platin atomu içermektedir (Şekil 2.2). DNA'ya bağlanıp replikasyon, transkripsiyon ve hücre döngüsünü bozarak kanser hücresinin ölümüne neden olmaktadır (Starobova, Mueller, Deuis, Carter, & Vetter, 2019). Klinik kullanımı, hepatotoksisite, nefrotoksisite, gastrointestinal toksisite, ototoksisite, merkezi ve periferik nöropati (PN) gibi istenmeyen bazı yan etkiler ile sınırlıdır (Salih & Al-Baggou, 2019). CIS organik katyon taşıyıcılar, organik katyon/karnitin taşıyıcılar ve bakır taşıyıcılar gibi bazı metal taşıyıcılar vasıtasıyla tümör ve normal hücelere aktif olarak girebilmektedir (Avan vd., 2015). CIS kan- beyin bariyerini geçememekte ancak DRG nöronları da dahil olmak üzere birçok periferik dokuya kolayca yayılmaktadır (Uhelski, Khasabova, & Simone, 2015). CIS için yapılan postmortem çalışmalar platinin DRG'lerde tutulduğunu göstermektedir (Miltenburg & Boogerd, 2014).



Şekil 2.2 Sisplatinin kimyasal yapısı (V. A. Carozzi, Canta, & Chiorazzi, 2015).

2.1.1. Sisplatin kaynaklı periferik nöropati

CIS ile tedavi edilen hastaların yaklaşık %30-40'ında PN görülmektedir (Cataldo vd., 2019). CIS kullanıldığında, PN genellikle 250-350 mg/m² kümülatif dozdan sonra başlamakta ve kümülatif dozu 500-600 mg/m² olan hastaların yaklaşık % 10'unun tedavi dışında kalmalarına neden olmaktadır (Otsuka vd., 2019). CIS nöropatisi ilacın kesilmesinden uzun süre sonra bile ortaya çıkabilmekte veya şiddetlenebilmektedir (coasting fenomeni) (Beijers, Jongen, & Vreugdenhil, 2012). Strumberg ve ark. CIS tedavisinden yıllar sonra

(ortalama 15 yıl) uzun süreli toksisiteyi değerlendirmiş ve hastaların %38'inde semptomatik olmayan nöropati, %28'inde semptomatik nöropati ve %6'sında polinöropati saptamıştır (Strumberg vd., 2002). CIS nöropatisi semptomları diğer KİPN ile benzerdir: Karıncalanma ve uyuşma, derin tendon refleksi kaybı, eldiven-çorap tarzı hipoestezi (LoMonaco vd., 1992).

2.1.1.2. Sisplatin kaynaklı periferik nöropatinin patofizyolojisi

CIS ile indüklenen periferik nöropati, DRG ve trigeminal gangliyon (TG) nöronlarında platin eklentilerinin birikmesiyle başlamaktadır (Jaggi & Singh, 2012). Etkili bir kan-beyin bariyeri içermeyen DRG'ler, nörotoksik hasara karşı özellikle savunmasızdır (Berta, Qadri, Tan, & Ji, 2017). Platin eklentilerinin oluşumu yoluyla DNA hasarını indükleyen CIS, DRG duyuşal nöronlarının nükleollerinde toksik değişikliklere neden olarak transkripsiyon mekanizmasında bozukluklara yol açmaktadırlar (Strumberg vd., 2002). İnsanlarda CIS nörotoksitesinin kesin mekanizması hala tartışılmaktadır; ancak deneysel ve klinik öncesi çalışmalar nöropati patogenezinde en olası süreçler hakkında fikir vermektedir (McWhinney, Goldberg, & McLeod, 2009). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre önerilen patogenez mekanizmalarının başlıcaları şunlardır:

Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres: DRG nöronlarındaki mitokondriyal disfonksiyon platin türevi ilaçların nörotoksitesini için potansiyel bir mekanizma olarak ilk kez Podratz ve ark. tarafından tanımlanmıştır (Podratz vd., 2011). CIS, nöronal ve nöronal olmayan hücrelere girdikten sonra mitokondriyal DNA'ya (mDNA) bağlanmakta ve mDNA eklentileri oluşturmaktadır. Bu patolojik ürünler mitokondride DNA onarım sistemi olmadığından onarılamamaktadır (Starobova & Vetter, 2017). Platin-mDNA eklentileri, anormal proteinlerin sentezine yol açabilen ve mitokondride solunum zincirinin bozulmasına neden olabilecek mDNA'nın fizyolojik replikasyonunu ve transkripsiyonunu bozmaktadır (Jaggi & Singh, 2012). Mitokondriyal fizyolojik fonksiyonun bozulması, hücre metabolizmasının azalmasına, artan ROS (reaktif oksijen türleri) üretimine ve oksidatif strese yol açmaktadır (Valko, Morris, & Cronin, 2005). Hücre içi yüksek ROS seviyesi

enzim, protein ve lipitlere zarar verebilmektedir bu da periferik sinirlerde yapısal değişikliklere neden olabilmektedir (Waseem vd., 2018). ROS ayrıca kaspaz aktivasyonu ve kalsiyum homeostazının düzensizliği dahil olmak üzere mitokondriyal yolların uyarılması yoluyla nöronlardaki apoptotik yolları aktive edebilmektedir; bu da atrofi ve DRG nöronlarının kaybına neden olmaktadır (Jamieson, Liu, Connor, & McKeage, 2005). Ayrıca bazı çalışmalar, CIS'in periferik sinirlerde mitokondriyal şekli, boyutu ve sayıyı düzenleyen mitokondriyal füzyon ve füzyon proteinlerinin ekspresyonunu değiştirebileceğini de göstermiştir (Bobylev, Joshi, Barham, Neiss, & Lehmann, 2018). Bobylev ve ark. CIS ile tedavi edilen farelerin DRG ve tibial sinirlerinde mitokondriyal füzyon proteini mitofusin 2 ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir düşüş saptamış ve bu da mitokondriyal şişme ve vakuolizasyon ile sonuçlanmıştır.

İyon kanalları ve kalsiyum homeostazının rolü: CIS, nöronal sodyum veya potasyum kanalı fonksiyonu üzerinde belirgin bir etkiye sahip görünmemektedir. Ancak ilk patch-clamp çalışmaları CIS'in özellikle sıçan DRG'sinin küçük çaplı nöronlarında kalsiyum kanal akımlarını azalttığını göstermektedir (Tomaszewski & Busselberg, 2007). Bununla birlikte, diğer bir çalışma, CIS'e maruz kalan DRG nöronlarında N-tipi kalsiyum kanallarından kalsiyum akışında bir artış olduğunu göstermiştir (Leo vd., 2017). Bu, temel olarak N tipi kalsiyum kanallarının up-regülasyonundan kaynaklanmış; artan hücre içi kalsiyum seviyeleri kaspaz-3 aktivasyonuna ve apoptoz indüksiyonuna yol açmıştır. Duyu nöronları, hepsi inflamatuvar ve nöropatik ağrının oluşumunda önemli rol oynayan TRPA1, TRPM8 ve TRVP1 gibi çeşitli TRP kanallarını eksprese etmektedir (Kanat, Ertas, & Caner, 2017). Çalışmalar CIS kaynaklı nörotoksisitede bu kanalların da etkili olduğunu düşündürmektedir. Nassini ve ark. sıçanlarda CIS kaynaklı mekanik ve soğuk hiperaljeziye TRPA1 kanalının aracılık ettiğini ve TRPA1 aktivasyonuna büyük olasılıkla glutatyon duyarlı moleküllerin neden olduğunu göstermişlerdir (Nassini vd., 2011). Ta ve ark. CIS ile tedavi edilen fare DRG nöronlarının TRPV1, TRPA1 ve TRMP8 mRNA ekspresyonunda bir artış gösterdiğini saptamışlardır. CIS ile tedavi edilen hayvanların trigeminal ganglion nöronlarda TRPV1 ve TRPA1 mRNA

ekspresyonu artmış ve bu artış ısı ve mekanik aşırı duyarlılık ile ilişkilendirilmiştir (Ta vd., 2010). Mitokondri ve endoplazmik retikulum bütünlüğü Ca^{+2} homeostazı için çok önemlidir, çünkü hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişiklikler membran uyarılabilirliğini, nörotransmitter salıverilmesini ve nöronal ve glial hücrelerin gen ekspresyonunu etkileyebilmektedir (V. A. Carozzi vd., 2015). Ca^{+2} homeostazı ve Ca^{+2} sinyali düzensizliğinin CIS kaynaklı KIPN gelişimine katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir.

Glial aktivasyon: Son zamanlarda yapılan çalışmalar, glial hücrelerin platin bazlı ajanların neden olduğu periferik nöropatiye katkıda bulunabileceğini göstermektedir (Di Cesare Mannelli vd., 2014; Zheng, Xiao, & Bennett, 2011). Farelerde yapılan bir çalışma ilk CIS uygulaması sonrasında beşinci haftaya kadar, omurilikteki mikrogliaların devamlı şekilde aktive olduğunu göstermiştir (Hu vd., 2018). Imai ve ark. yaptıkları bir çalışmada, CISin Schwann hücrelerinde mitokondriyal disfonksiyona neden olabileceğini ve bunu takiben moleküler fonksiyonda ve periferik nöropatiye katkıda bulunan hücre yapılıarda çeşitli bozukluklara yol açabileceğini göstermişlerdir (Imai vd., 2017).

Akson dejenerasyonu: Deneysel çalışmalarda kronik CIS uygulamasının, spinal dorsal kök ganglionlarında ciddi hasara neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca aksonopati (aksonal dejenerasyon) özellikleri ile birlikte siyatik ve peroneal sinirlerde de değişiklikler olmaktadır (Cavaletti vd. 1992). CIS nöropatisinin histolojik incelemesi, dorsal kökün ikincil atrofisi sonucu akson kaybını ortaya koymaktadır. Nöropatinin ileri bir aşamasında DRG kaybının sonucunda dorsal kolonun reaktif gliozisi gelişmektedir (Quasthoff & Hartung, 2002). CIS uygulanan hastaların periferik sinirlerinin elektron mikroskopik görüntüleri büyük ve miyelinli sinir liflerinde dejenerasyonu ve vibrasyon duyarlılığında azalmayı göstermektedir (Boehmerle, Huehnchen, Peruzzaro, Balkaya, & Endres, 2014).

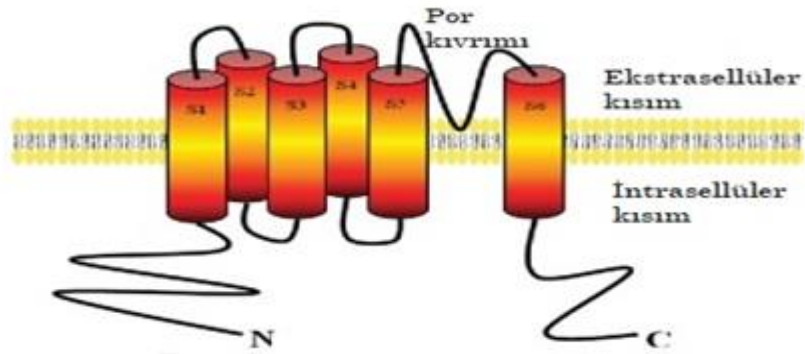
2.1.1.3. Sisplatin kaynaklı KIPN profilaksisi ve tedavisi

CIS kaynaklı nörotoksisitenin kesin mekanizması bilinmemekle birlikte, periferik sinir sistemini bu nörotoksisiteden korumak için çeşitli maddeler araştırılmıştır ve araştırılmaya devam etmektedir. Serbest oksijen radikallerini kovucu görevi gören organik bir tiyofosfat olan amifostinin antitümör etkilerini etkilemeden platin bileşiklerinin neden olduğu toksisitelere karşı sitoprotektif etki gösterdiği tespit edilmiştir (Planting vd., 1999). Glutasyonun (GSH), muhtemelen dorsal kök gangliyonlarında platin eklentilerinin ilk birikimini önleyerek nörotoksisiteyi azalttığı da bildirilmiştir (Cascinu vd., 2002; Cascinu, Cordella, Del Ferro, Fronzoni, & Catalano, 1995). E vitamini, Asetil-L-karnitin ve eritropoetin de CIS kaynaklı nörotoksisiteye karşı protektif etkileri gösterilmiştir (Orhan, Yalcin, Nurlu, Zeybek, & Muftuoglu, 2004; Pace vd., 2003; Pisano vd., 2003).

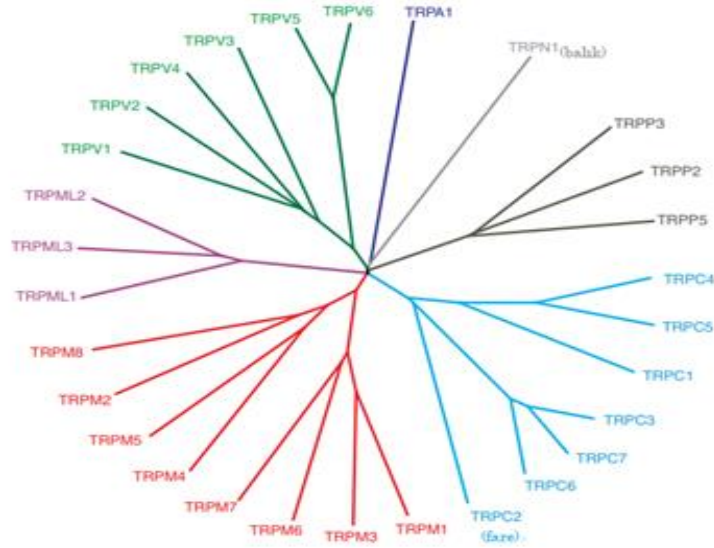
2.2. Transient Reseptör Potansiyel (TRP) Kanalları

TRP kanalları; nosiseptif duyuşal sinir sonlanmalarında konumlanan, termal, mekanik veya kimyasal uyanlarla aktive olan ve seçici olmayan özel bir katyon kanalı ailesidir (Yazgan, Yazgan, & Nazirođlu, 2016). TRP kanalları ilk olarak 1998 yılında *Drosophila melanogaster* türü sirke sineklerinin göz hücrelerinde keşfedilmiştir (Montell & Rubin, 1989). *Trp* mutasyonuna sahip olan fotoreseptörler devamlı olarak ışığa maruz bırakıldıklarında transient voltaj değişikliğine yol açtıkları için bu isim verilmiştir (Pak, Grossfield, & Arnold, 1970). TRP kanalları katyonlara karşı seçici olmamakla birlikte Ca^{+2} a karşı duyarlılığı oldukça yüksektir (Pedersen, Owsianik, & Nilius, 2005). TRP'ler uyarılabilen ve uyarılamayan hemen hemen her hücre tipinde, nükleer zarf ve mitokondri hariç, tüm hücreşel zarlarda bulunmaktadır (Nilius & Owsianik, 2011). TRP protein yapısı, beşinci ve altıncı segmentler arasında yer alan bir gözenek bölgesi olan, altı transmembranal segmentten ve sitoplazmik N ve C uçlarından oluşmaktadır (Şekil 2.3). Bugüne kadar, 28 memeli TRP kanalı tanımlanmış ve sekans homolojilerine göre 6 alt aileye ayrılmışlardır: Kanonik ya da klasik (TRPC), vanilloid (TRPV), melastatin (TRPM), polikistin (TRPP), mukolipin (TRPML) ve ankirin (TRPA) (Hung & Tan, 2018). Bu

kanalların her biri kendi içinde alt gruplara ayrılmaktadır (Şekil 2.4). TRP üst familyasının üyeleri nosisepsiyonda kilit rol oynamaktadır. (Julius, 2013). Ayrıca, duyuşal nöronlar, Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) ve P maddesi gibi nöropeptitlerin, periferik vazodilatasyon, vasküler sızıntı ve immün hücreler üzerindeki etkilere yol açan duyuşal liflerin periferik terminallerinden salıverildiği bir süreç olan nörojenik inflamasyonda da rolleri vardır (Durham, 2006). Bunun yanı sıra, inflamatuvar mediyatörler TRP kanallarının eşiğini değiştirebilmekte ya da duyarlılaştırabilmektedir. Bu da termal hiperaljezi, mekanik allodini ve spontan ağrı gibi ağrı davranışlarına yol açmaktadır (Julius, 2013). TRP kanalları, pulmoner hipertansiyon, astım, Parkinsonizm ve prostat kanseri gibi farklı fizyolojik ve patolojik durumlarda yer alan iyon kanalı ailesi üyeleridir (Nilius, Voets, & Peters, 2005). TRP kanallarının, nöropatik ağrı tedavisi için potansiyel terapötik hedef olarak araştırlılabileceği öne sürülmektedir (Marwaha vd., 2016). Çalışmalar TRPV ailesi üyelerinin, özellikle TRPV1 ve TRPV4'ün nöropatik ağrı etiyolojisine katkıda bulduklarını göstermektedir (Nilius, Owsianik, Voets, & Peters, 2007).



Şekil 2.3 TRP kanalı yapısı (Poletini, Moraes, Ramos, Jeronimo, & Castrucci, 2015).



Şekil 2.4 TRP kanal ailesi (Nilius & Owsianik, 2011).

2.2.1. TRPM alt ailesi

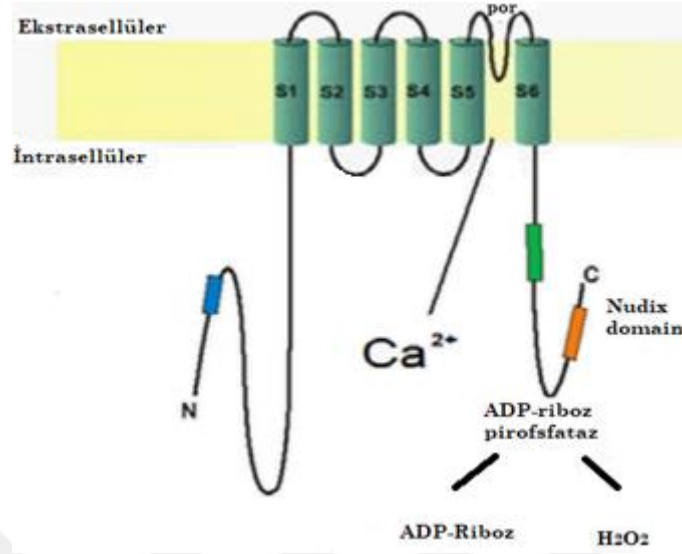
TRPM ailesi, insan vücudundaki fizyolojik ve patofizyolojik süreçlere katılan hemen hemen tüm hücre tiplerinde eksprese edilen TRP süper familyasının en büyük ve en çeşitli alt ailesidir (Fleig & Penner, 2004). 1998'de TRPM ailesinin ilk geni TRPM1'de tanımlanmıştır (Duncan vd., 1998). O zamandan beri TRPM1'den TRPM8'e kadar ailenin fizyolojik ve biyofiziksel özelliklerine göre birbirinden farklı sekiz üyesi daha olduğu tespit edilmiştir. TRPM4 ve TRPM5 hariç hepsi Ca^{+2} geçirgen katyon kanallarıdır (Clapham, Runnels, & Strubing, 2001). TRPM kanalları, TRP süperfamilyasının diğer üyelerine göre sınırlı bir homoloji (benzerlik) göstermektedirler. TRPM monomerlerinin N terminal (TRPM homoloji) bölgesi, transmembran bölgesi ve C terminali olmak üzere 3 ana bölgesi bulunmaktadır ve ailenin tüm üyelerinde bu homoloji bölgesi değişkenlik göstermemektedir (Saygın & Nazıroğlu, 2012).

Bu ailenin üyeleri, son on yılda nörodejeneratif bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar, tip II diyabet, inflamasyon ve inflamatuvar ağrı tedavisi için umut verici ilaç hedefleri olarak dikkat çekmeye başlamışlardır (Huang, Fliegert, Guse, Lu, & Du, 2020).

2.2.1.1. TRPM2 kanalı

Daha önceleri TRPC2 ve LTRPC2 olarak bilinen TRPM2 kanalları ilk olarak 1998 yılında kanser (melastatin) hücrelerinde tespit edilmiş, daha sonra TRPM2 ailesinin bir üyesi olarak kabul edilmiştir (Clapham, 2003). TRPM2 kanalı altı transmembranal segment (S1-S6) içermektedir; N ve C olmak üzere iki ucu bulunmaktadır. N-terminal bölgeyi kapsayan bir düzenleyici alan, C ucuna nudix domain denilmektedir. Bu uçta adenosin di-fosfat riboz (ADPR)'dan adenosin mono fosfat (AMP) ve riboz-5-fosfat oluşumunu katalizleyen ADPR pirofosfataz enzimi bulunmaktadır. TRPM2 kanallarında iyon akışı 5. ve 6. segmentler arasında gerçekleşmektedir (Şekil 2.5) (Saygın & Nazıroğlu, 2010). Bu segmentler arasındaki yapı Ca^{+2} , Na^{+} ve K^{+} geçirgendir (Xia vd., 2008). ADPR, TRPM2'nin en güçlü aktivatörüdür. Hidrojen peroksit (H_2O_2), nikotinamid adanın dinükleotid (NAD^{+}) ve siklik ADPR (cADPR) içermektedir. NAD^{+} ve H_2O_2 ADPR'nin hücre içi düzeyini arttırmakta ve TRPM2 kanallarının direkt ya da dolaylı olarak açılmasına neden olmaktadır (Hara vd., 2002). TRPM2 kanalları esas olarak beyinde eksprese edilmektedir. Ancak kemik, dalak, kalp, lökositler, karaciğer ve akciğer dahil olmak üzere diğer birçok dokuda da tespit edilmişlerdir (Uemura, Kudoh, Noda, Kanba, & Shimizu, 2005). TRP kanalları arasında merkezi sinir sisteminde (MSS) en fazla bulunanı TRPM2 mRNA'dır (Fonfria vd., 2006). Bu kanal özellikle makrofaj hücreleri, periferik kan monositleri ve nötrofillerde aynı zamanda mikrogliyalarda eksprese edilmektedir (Hantute-Ghesquier, Haustrate, Prevarskaya, & Lehen'kyi, 2018). Periferik somatosensoryel sistemde, TRPM2 DRG ve TG afferent nöronlarında her zaman eksprese edilmektedir (Vandewauw, Owsianik, & Voets, 2013). TRPM2 katyon kanalları oksidatif stres, ADPR/ NAD^{+} metabolizması ve tümör nekroz faktörü alfa ile aktive olmaktadır (Hara vd., 2002). TRPM2 dolaylı kanal blokerleri olarak [mikonazol, klotrimazol, flufenamik asid (FFA), N- (p-Amilcinnamoil) antranilik asit (ACA)] ve 2- Aminoetoksidifenil borat (2-APB) bilinmektedir (Tablo 2.3). TRPM2 eksikliğinin akut inflamatuvar ağrılar, osteoartrit ağrısı, multipl sklerozdaki kronik ağrı ve diyabetik nöropatinin yanı sıra klasik inflamatuvar ağrı ve periferik sinir hasarı kaynaklı nöropatik ağrıda antiallodinik etkilerinin olduğu

gösterilmiştir. Son zamanlardaki kanıtlar, KİPN'de TRPM2 kanalının rol oynayabileceğini düşündürmektedir (So vd., 2015).



Şekil 2.5 TRPM2 kanal yapısı (Cemil Özgül, 2010).

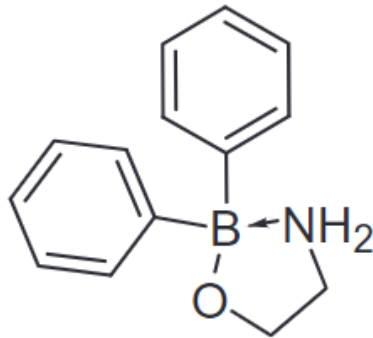
Tablo 2.3 Nöronal hücrelerde TRPM2 blokerlerinin etkileri (Naziroglu, 2011).

Blokörler	Hücreler	Etki	Kaynak
FFA	Sıçan mikroglia kültürü	Blokör	(Kraft vd., 2004)
ACA	Sıçan primer striatal hücreler	Blokör	(Olah vd., 2009)
Kotrimazol	Sıçan primer striatal hücreler	Blokör	(Olah vd., 2009)
FFA	Sıçan primer striatal hücreler	Blokör	(Olah vd., 2009)
FFA	Substantia nigra	Etki yok	(Freestone vd., 2009)
ACA	Substantia nigra	Blokör	(Freestone vd., 2009)
FFA	Hipokampal hücreler	Etki yok	(Bai & Lipski, 2010)
ACA	Hipokampal hücreler	Etki yok	(Bai & Lipski, 2010)
FFA	Fare DRG kültürü	Blokör	(Naziroglu, 2011)
2-APB	Fare DRG kültürü	Blokör	(Julius, 2013)

2.3. 2- Aminoetoksidifenil borat (2-APB)

2-Aminoetoksidifenil borat (2-APB), lipofilik bir organobor bileşiğidir (Şekil 2.6) (Bilmen & Michelangeli, 2002). Bu bileşik başlangıçta inositol 1,4,5-

trifosfat (IP₃) reseptörlerinin bir inhibitörü olarak gösterilmiştir (Maruyama, Kanaji, Nakade, Kanno, & Mikoshiba, 1997), ancak daha sonra depo-kontrollü Ca⁺² kanalları ve sarko/endoplazmik retikulum Ca⁺²-ATPaz pompasını da inhibe ettiği belirlenmiştir (Prakriya & Lewis, 2001). 2-APB'nin trombositler, ventriküler kardiyomiyositler, pankreas β hücreleri, hipokampal nöronlar, nötrofiller, çeşitli düz kas hücreleri ve endotel hücrelerde IP₃ ile indüklenen Ca⁺² salıverilmesine inhibisyon yaptığı tespit edilmiştir (Bootman vd., 2002). Ayrıca, 2-APB çeşitli TRP kanallarını da seçici olarak aktive veya inhibe etmektedir. TRPC1, TRPC3, TRPC5, TRPC6, TRPV6, TRPM3, TRPM7 ve TRPM8 kanallarını inhibe ettiği; bunun aksine TRPV1, TRPV2 ve TRPV3 kanallarını ise aktive ettiği gösterilmiştir (Kovacs vd., 2012; Togashi vd., 2008). Yapılan çalışmalar 2-APB'nin aynı zamanda TRPM2 kanal blokajı yaptığını da göstermektedir (Chen vd., 2012; Togashi vd., 2008). 2-APB'nin DRG nöronlarında ADPR ve rotenonun indüklediği TRPM2 akımlarını tamamen bloke ettiği ve TRPM2 kanal inhibitörü olarak davrandığı tespit edilmiştir (Naziroglu, Ozgul, Celik, Cig, & Sozbir, 2011). 2-APB'nin ayrıca antioksidan özelliklere sahip olduğu ve farelerde reaktif oksijen ürünlerini azaltarak kardiyak ve karaciğer iskemi reperfüzyon (I/R) hasarını azalttığı da gösterilmiştir (Nicoud vd., 2007).



Şekil 2.6 2-APB'nin kimyasal yapısı (Hofer vd., 2013).

Tüm bu bilgilerin ışığında, CIS'in neden olduğu nörotoksisite ve PN, CIS kemoterapisinin doz sınırlayıcı önemli bir yan etkisi olduğu bilinmektedir ve son yıllarda kemoterapiyle indüklenen periferik nöropatide TRP kanallarının rolü araştırılmaktadır. Biz de çalışmamızda TRPM2 kanal blokörü 2-APB'nin

potansiyel sitoprotektif etkilerini primer sıçan DRG hücre kültüründe, potansiyel antiallodinik ve antihiperaljezik etkilerini ise CIS'le indüklenen periferik nöropatide değerlendirmeyi amaçladık.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

In vitro deneyler için 10 adet Sprague Dawley cinsi gebe sıçandan alınan 1 günlük yenidoğan yavrular ve *in vivo* deneyler için 56 adet 6-8 haftalık erkek Sprague Dawley sıçan (200-250 g) 24.07.2018 tarihli 676 karar numaralı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınarak ESOĞÜ TICAM (Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi)'dan temin edilmiştir ve araştırma süresince ESOĞÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı hayvan odasında 20-22°C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık periyotlarına ayarlı şekilde pellet cinsi yem ve yeterli miktarda su ile beslenerek, her grupta 8 hayvan olacak şekilde 7 kafeste barındırılmışlardır. Sıçanların kuyrukları kalıcı bir boya kalemi ile işaretlenerek tüm deneylerin sonuçlarını bireysel olarak gözlemleyebilmek için bu işaretler kaydedilmiştir.

3.2. 2-APB'nin Sitoprotektif Etkisinin Değerlendirilmesi

3.2.1. DRG hücre kültürü

Çalışmada 1 günlük yenidoğan her iki cins Sprague Dawley türü yavru sıçanlar kullanılmıştır. Toplamda 10 adet sıçan kullanılmıştır. Yavru sıçanlar %70'lik alkolle temizlendikten sonra hayatlarına dekapitasyon yöntemiyle son verilmiştir. Sırt derileri penset yardımıyla kaldırılıp DRG'leri steril koşullarda mikrodiseksiyonla çıkartılmıştır. Hücre kültürü işlemine başlamadan önce primer kültür hazırlanacak kültür kaplarını kaplamak için Poly-d-lizin, phosphate buffered saline (PBS) içinde çözülmüştür (0,1 mg/ml). 1 ml'lik çözelti hazırlandıktan sonra bir flaskın içine pipetle verilip tabanına iyice yayılması sağlanmış, flaskın içine konulan solüsyon pipetle alınıp bırakılarak taban iyice kaplanmıştır. Daha sonra flasklar inkübatörde (37°C, nemlendirilmiş %95 hava ve %5 CO₂) 1 gece bekletilmiş ve daha sonra +4°C buzdolabında saklanmıştır. İzole edilen gangliyonlar 5 ml kalsiyum ve magnezyumsuz modifiye Hank's dengeli çözeltisi (HBSS) içinde toplanmıştır. Sonrasında 1000 rpm de 3 dakika santrifüj edildikten sonra iki defa 5 ml modifiye HBSS ile yıkanmıştır. HBSS

içinde bulunan gangliyonlar 2 ml tripsin [%0.25 tripsin - %0.02 Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)] ile 10 dakika 37°C de inkübe edilmiştir. Üzerine 5 ml %10 FBS (Fetal Bovine Serum), 2 mM glutamin, 50 µg/ml penisilin ve streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri eklenerek tripsinin etkisi sonlandırılmıştır. Tekrar santrifüj edilip, süpernatant atıldıktan sonra 5 ml DMEM besiyeri içinde mekanik olarak uçları bek alevinde daraltılmış Pastör pipetleriyle gangliyonlar içinden çıkarılarak pastör pipeti yardımıyla gangliyonların dağılması sağlanmıştır. Sonrasında ise poli-D-lizinle kaplı kültür plaklarına alınmış, 37°C'de % 95 hava %5 CO₂ ile 1-2 gün inkübe edildikten sonra besiyeri boşaltılıp flasklara non-nöronal hücrelerin ürememesi için DMEM içerisinde 10 µM sitozin arabinozid eklenerek 4 saat inkübe edilmiştir. Gün aşırı besi yeri değiştirilmiş ve dorsal kök gangliyon hücreler 10 gün sonra 96 kuyucuklu poli-D-lizinle kaplı steril plaklara kuyucuk başına 5X10³ hücre olacak şekilde ekildikten sonra sitotoksisite testi uygulanmıştır (Donertas vd., 2018).

3.2.2. MTT sitotoksisite testi

MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] yöntemi ilk kez 1983 yılında Mossmann tarafından literatüre kazandırılmıştır (Mosmann, 1983). Bu yöntemin temel ilkesi MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ve canlı hücrelere aktif olarak absorbe olup mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenmesidir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görüldüğünden bu durum hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir (Berridge vd., 2005). Çalışmamızda CISin (100, 200, 300, 400, 500 µM) ve 2-APB'nin (0.5, 1, 2 mM) farklı konsantrasyonları 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücrelere uygulanmıştır. MTT 5 mg/ml konsantrasyon olacak şekilde Hank's dengeli tuz çözeltisinde çözüldükten sonra steril filtreden geçirilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa 10 µl MTT eklenip 37°C'de %5'lik CO₂'li inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. 4 saatin sonunda kuyucuklardaki besiyerleri boşaltıldıktan sonra 150 µl DMSO eklenerek kristaller çözüldükten sonra 96'lık

plaka ELISA Reader (BioTek ELX800) ile 570 nm'de okutulmuştur. Elde edilen verilerin yüzde hücre canlılığı değerleri:

% Hücre canlılığı = (Örneklerin absorbanansı-blank absorbanansı / kontrol hücrelerinin absorbanansı-blank absorbanansı) x 100 denklemine göre hesaplanmıştır.

3.3. Deney Protokolü

Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturulmuş (n=8) ve *in vivo* deneyler 2 aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir.

1. Aşama: 1) *Kontrol grubu*: %5 Dimetil sülfoksit (DMSO) ve serum fizyolojik ile CIS injeksiyonu protokolü uygulanmıştır.

2) *CIS grubu*: 3 mg/kg CIS 5 hafta süreyle haftada bir kez intaperitoneal (i.p) yolla injekte edilmiştir (Han, Wyse, & Smith, 2014)

3) *CIS + 2-APB2 grubu*: 3 mg/kg CIS ve 2 mg/kg dozda %5 DMSO'da çözdürülen 2-APB 5 hafta süreyle haftada 1 kez i.p uygulanmıştır (Nicoud vd., 2007)

4) *CIS + 2-APB4 grubu*: 3 mg/kg CIS ve 4 mg/kg dozda %5 DMSO'da çözdürülen 2-APB 5 hafta süreyle haftada 1 kez i.p uygulanmıştır.

5) *CIS + 2-APB8 grubu*: 3 mg/kg CIS ve 8 mg/kg dozda %5 DMSO'da çözdürülen 2-APB 5 hafta süreyle haftada 1 kez i.p uygulanmıştır.

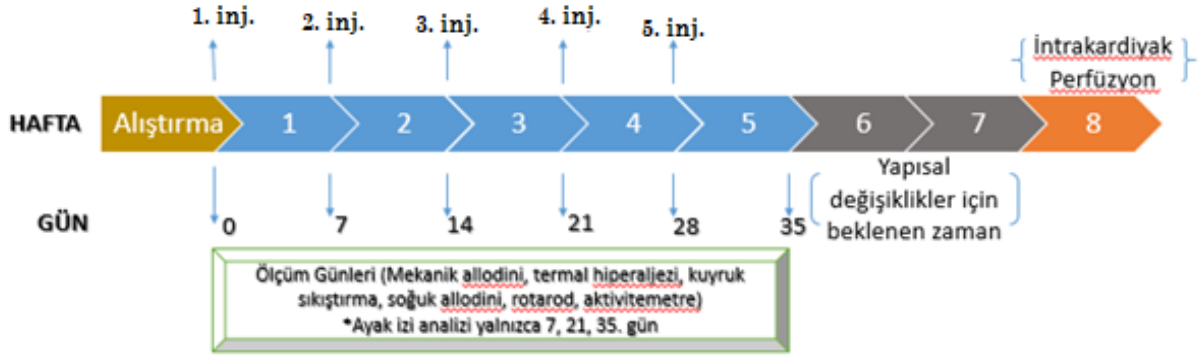
2. Aşama: 1. Aşamadaki 5 haftalık deney süreci sonunda etkin bulunan 2- APB dozu 4 mg/kg olarak belirlenmiş ve 2. aşamaya geçilmiştir.

6) *CIS + 2-APB4K grubu*: 3 mg/kg CIS haftada bir kez ve 4 mg/kg dozda %5 DMSO'da çözdürülen 2-APB 5 hafta süreyle haftada 3 kez i.p uygulanmıştır.

7) *CIS + FFA grubu*: 3 mg/kg CIS haftada bir kez ve 66 mg/kg dozda 1N DMSO'da çözdürülen bir diğer TRPM2 antagonisti olan FFA 2-APB'nin etkisinin kıyaslanması amacıyla 5 hafta süreyle haftada 3 kez i.p uygulanmıştır (Bal, Ustundag, Bulut, Demir, & Bal, 2016). Tüm gruplara nefrotoksisiteyi önlemek için 2 ml serum fizyolojik uygulanmıştır.

Ölçümler her ilaç injeksiyonunu takiben 6.günde saat 09:00-13:00'te ESOGÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Nöropsikofarmakoloji

Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. 5. ve son CIS injeksiyonundan sonra yapısal değişiklikler için 2 hafta süreyle beklenerek intrakardiyak perfüzyon yapıp DRG, siyatik sinir, karaciğer ve böbrek dokuları izole edilmiştir. Ölçümlerde mekanik allodini, termal hiperaljezi, kuyruk çekme, soğuk allodini, rotarod ve aktivitemetre testleri uygulanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Deney protokolü.

3.4. İlaçlar

Çalışmamızda CIS (cisplatin, Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD), 2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl borate, Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD), FFA (Flufenamic acid, Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD), ketamin (Alfamine %10, Alfasan International B.V. Hollanda) ve ksilazin (Xylazinbio %2, Bioveta PLC, Çek Cumhuriyeti) kimyasalları kullanıldı. CIS ve 2-APB %5 DMSO+serum fizyolojik; FFA 1N DMSO+serum fizyolojikte çözülerek i.p olarak uygulandı. ELISA protokolünde Shanghai, YL Biotech Co. Ltd. kitleri kullanıldı.

3.5. Davranış Testleri

3.5.1. Mekanik allodininin değerlendirilmesi

Mekanik allodini, dinamik plantar aesthesiometer cihazı (Ugo-basile, Verase, İtalya) kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.2). Sıçanlar şekilde görülen bölmelere yerleştirilerek ortama alışmaları için 30 dakika süre ile beklendikten sonra cihaz çalıştırılmış, 0.5 mm kalınlığındaki hareketli filament hayvanın pençesinin plantar yüzeyinin altına yerleştirilmiş ve giderek artan bir kuvvet uygulanmıştır. Her pençe çekilişinde cihaz, hayvanın pençeyi çekme süresini ve pençe çekilme refleksindeki kuvveti gram olarak otomatik algılamış

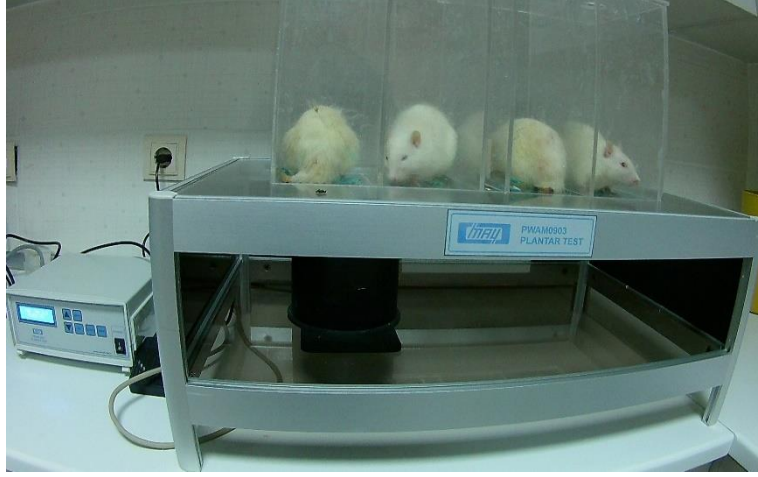
ve bu veriler kaydedilmiştir (Onal vd., 2017). Hayvanların pençe çekme latensleri 5 dakikalık ara ile yapılan üç ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Uygulananan maksimum kuvvet pençe hasarını önlemek amacıyla 50 g olarak belirlenmiştir (Bordet vd., 2008).



Şekil 3.2 Dinamik plantar test düzeneği.

3.5.2. Termal hiperaljezinin değerlendirilmesi

Bu test için termal plantar test cihazı (Ugo-basile, 37370, Verase, İtalya) kullanılmıştır (Şekil 3.3). Cihaz cam zemin üzerine yerleştirilen bölmelerden ve zeminin altında konumlandırılmış mobil bir radyant ısı kaynağından oluşmaktadır. Sıçanların arka pençelerine radyant ısı uygulanmış “pençe çekme” reaksiyonlarının latensleri ölçülmüştür (Hargreaves, Dubner, Brown, Flores, & Joris, 1988). Sıçanlar bölmelere yerleştirilerek ortama alışmaları için 30 dakika süreyle beklenmiş radyant ısı sıçanların arka pençelerinin plantar yüzeylerine uygulanmıştır. Isı kaynağının çalıştırılması ile hayvanın pençesini çekmesi arasındaki süre cihaz tarafından kaydedilmiş; 5 dakikalık ara ile yapılan üç ölçümün ortalaması alınmıştır. Pençelerde doku hasarı oluşmaması için radyant ısı 20 saniyeden daha uzun süre uygulanmamıştır (Xu vd., 2014).



Şekil 3.3 Termal plantar test düzeneği.

3.5.3. Soğuk allodinin değerlendirilmesi

Soğuk plaka (cold plate) testi, 5 ± 0.5 °C'ye ayarlanmış sıcak/soğuk plaka cihazı (Ugo Basile, Verase, İtalya) kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.4). Bu testte, 16X16 cm'lik soğuk bir plakaya yüksekliği 25 cm olan pleksiglas silindir yerleştirilmiş ve sıçanlar plakaya konulmuştur. “Pençelerini çekmeleri, titretmeleri, soğuk yüzeyden uzaklaştırmaları” gibi tepkilerden birini ilk olarak vermesi için geçen süre tespit edilerek pençe çekme latensleri ölçülmüştür (Jasmin, Kohan, Franssen, Janni, & Goff, 1998).



Şekil 3.4 Soğuk plaka testi düzeneği.

3.5.4. Akut spinal ağrının değerlendirilmesi

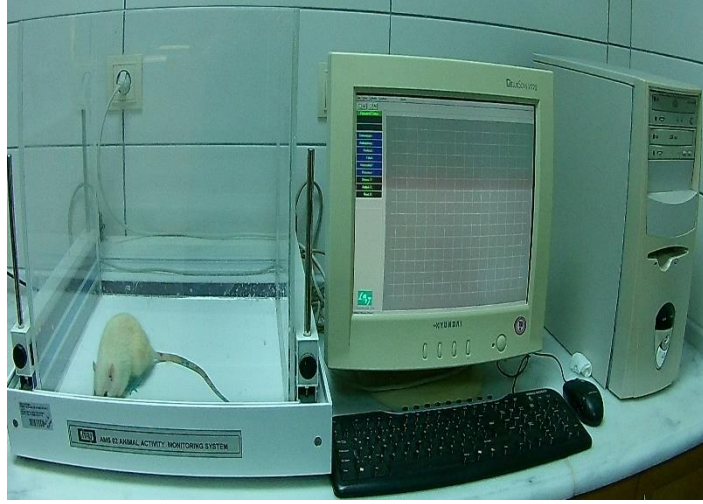
Hayvanların mekanik nosiseptif uyarana karşı gösterdikleri reaksiyonun süresini ölçmek için uygulanan tail clip (kuyruk sıkıştırma) testinde, sıçanların kuyruk ucundan yaklaşık 1-2 cm yukarıya pens takılmış ve hayvanın pensi ısırdığı süre kronometre ile ölçülmüştür (Y. Q. Cao vd., 1998) (Şekil 3.5). Maksimum ölçüm süresi doku hasarını önleme adına 20 saniye ile sınırlandırılmıştır (Chao vd., 2019).



Şekil 3.5 Kuyruk sıkıştırma testi düzeneği.

3.5.5. Lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi

Bu testte sıçanlar, karşılıklı iki dikey kenarında bulunan parçalar kızıl ötesi ışınlar (IR) üreten saydam pleksiglas bir kafesten oluşan aktivite ölçüm sistemine (May-AMS 02 Animal Activity Monitoring System, Commat, Ankara) yerleştirilmiştir (Şekil 3.6). Kafesteki hayvan herhangi bir hareket yaptığında karşılıklı IR ışınlarını kestiği için hayvanın yaptığı hareketin şekline göre aktiviteleri bir bilgisayar programı (MAY 9803 Activity Monitor, Commat May Pentium Computer) ile ve 5 dakika süreyle kaydedilmiştir (Tyrtysnaia, Manzhulo, Sultanov, & Ermolenko, 2017). Test süresi içerisinde deney hayvanının kat ettiği toplam mesafe, stereotipik, ambulatuvar, horizontal (yatay) ve vertikal (dikey) hareketlerinin toplamı değerlendirilmiştir. Her testin sonunda sıçanlar kafesten alındıktan sonra test alanı %10'luk etanol ile silinip kurularak, bir önceki sıçana ait koku, dışkı gibi dış etmenlerin bir sonraki sıçanın davranışlarını etkileme ihtimali en aza indirgenmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.6 Aktivitemetre testi düzeneği.

3.5.6. Motor koordinasyonun değerlendirilmesi

3.5.6.1. Rotarod testi

Bu testte 70 mm çapında döner silindir çubuk, beyaz renkli sert plastikler ile bölünmüş dört bölme ve silindirik çubuğu döndüren bir ana motordan oluşan cihaz (MAY, Commat, Ankara) kullanılmıştır (Şekil 3.7). Silindirin hızı sabit 200 rpm olacak şekilde ayarlanmış, hayvanların döner silindir üzerindeki kalış süreleri kayıt edilmiştir. Test süresi 300 saniye olarak belirlenmiştir (N. Li vd., 2019).

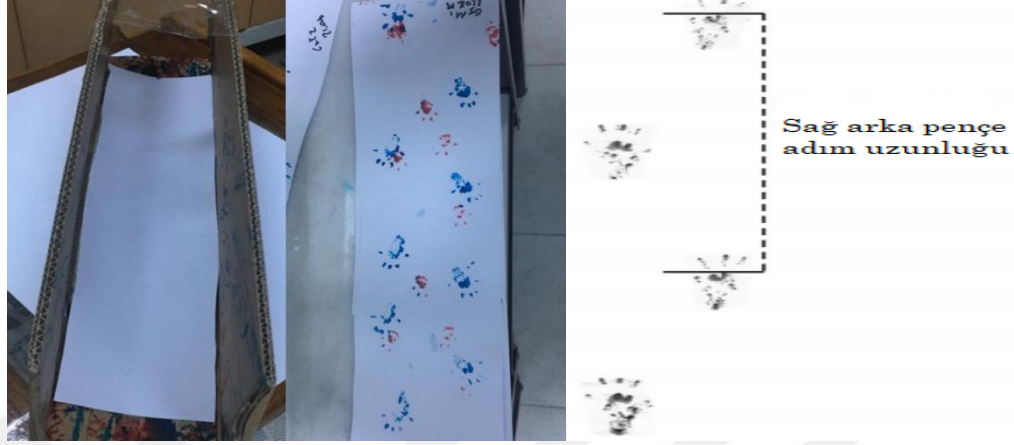


Şekil 3.7 Rotarod testi düzeneği.

3.5.6.2. Ayak izi (Footprint) testi

Bu testte, 9 cm genişliğinde ve 100 cm uzunluğunda bir koridorun tabanına beyaz kağıt yerleştirilmiştir (Şekil 3.8), ön ve arka pençeleri sırasıyla

toksik olmayan kırmızı ve mavi renkteki boyalara batırılarak hazırlanan koridorda yürütülmüştür. Ön ve arka pençeler arasındaki mesafe ve adımları arasındaki mesafe ölçülerek kaydedilmiştir (Nishitani vd., 2019).



Şekil 3.8 Ayak izi test düzeneği ve ölçüm örneği.

3.6. Morfolojik Analizler

3.6.1. Vücut ağırlıklarının değerlendirilmesi

CIS ve tedavi gruplarının hayvanların vücut ağırlıkları üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla deney protokolü boyunca her hafta sıçanlar tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir. Deney bitiminde % Kilo kaybı analizi yapılmıştır.

3.6.2. İntrakardiyak perfüzyon ve periferik dokuların toplanması

İnjesiyon ve ölçümlerin bitiminden 2 hafta sonra her gruptan 3'er hayvan ketamin (60-80 mg/kg) + ksilazin (10-15 mg/kg) anestezisi altında ilk önce PBS solüsyonu, daha sonra %4'lük paraformaldehid (0,1 M fosfat tamponda [pH=7,4] hazırlanan) solüsyonu ile perfüze edilmiştir (Şekil 3.9). Perfüze edilen hayvanlardan DRG, sağ siyatik sinir, böbrek ve karaciğer dokuları izole edilmiştir. Histolojik incelemelere kadar olan sürede DRG ve siyatik sinirler glutaraldehit + PBS solüsyonunda; karaciğer ve böbrek dokuları ise tamponlu formol çözeltisinde bekletilmiştir.



Şekil 3.9 İtrakardiyak perfüzyon.

3.6.3. DRG ve siyatik sinirlerin histopatolojik değerlendirmeleri

İzole edilen sağ siyatik sinir ve DRG dokuları epon-araldit reçineye gömüldükten sonra mikrotom aracılığıyla 3 farklı bölgeden 700 nm kalınlığındaki yarı ince kesitler alınmıştır. Alınan kesitler toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskobu altında incelenmiştir. İncelenen DRG nöronlarının soma alanları Image J (NIH, Bethesda, MD, ABD) programı vasıtasıyla analiz edilerek soma alanı çaplarına göre DRG nöron frekansları yüzde olarak hesaplanmıştır. Siyatik sinir doku örnekleri ise 0.1 M fosfat tamponu içinde %2.5 glutaraldehit solüsyonunda fikse edilmiş ve 4°C'de en az 24 saat muhafaza edilmiştir. Daha sonra fosfat tamponuyla yıkanmıştır. Sonraki 2 saat boyunca 0.1 M fosfat tamponu içinde osmiyum tetroksitle post-fiksasyon yapılmıştır. Doku örnekleri %30, %50, %70, %90, %96 ve %100'lük etil alkol çözeltileri kullanılarak dehidratasyonları sağlanmış sonrasında epon-araldit reçineye gömülmüşlerdir. 700 nm'lik yarı ince kesitler toluidin mavisiyle boyanmıştır. Işık mikroskobu altında histolojik değerlendirmeleri yapılmıştır. Dejenere aksonlar, miyelin birikintileri oluşumu ve aksonlardaki dejenerasyona göre belirlenmiştir. (Özatic O, 2016).

3.6.4. Böbrek ve karaciğer dokularının değerlendirilmesi

İzole edilen böbrek dokuları hemotoksilen-eozin, karaciğer dokuları ise hemotoksilen-eozin ve mason trikrom ile boyanarak histolojik değerlendirmeleri yapılmıştır. Dokulardan rotary mikrotom ile 5 µm

kalınlığında parafin kesitler alınmıştır. Deparafinizasyon için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakılan dokular, 30'ar dakika boyunca iki kez değiştirilen ksilen ile muamele edilmiştir. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akan su altında yıkanmıştır. Kesitler 3 dakika hematoksilen ile boyanmalarının ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akan su altından yıkanmış; yıkanan kesitlerin 30 saniye eozin ile boyanmaları sağlanmıştır. Aynı şekilde 5 dakika akan su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki kez değiştirilen ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatılmışlardır. Kesitler kör 2 histolog tarafından ışık mikroskobu altında semikantitatif olarak değerlendirilmiştir. Böbrek hasarı tübüler nekroz, tübüler vakuoler değişiklikler, hemoraji ve tübüler dilatasyon, şiddet ve yaygınlığı dikkate alınarak incelenmiştir. Her bir kesit 0-4 arasında skorlanmıştır: (0: hasar yok, 1: minimal hasar (\leq %5), 2: orta derecede hasar (%5-25), 3: yaygın hasar (%25-75), 4: şiddetli hasar (\geq %75)).

3.7. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

3.7.1. DRG izolasyonu ve homojenatların elde edilmesi

İnjesiyon ve ölçümlerin bitiminden 2 hafta sonra her gruptan 5'er hayvan ketamin (60-80 mg/kg) + ksilazin (10-15 mg/kg) anestezisi altında sakrifiye edilerek DRG nöronları izole edilmiştir. Buz ile muamele edilen soğuk PBS'e toplanan DRG'ler ultrasonik homojenizatör ile hızla homojenize edilip, 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantları alınarak ELISA testleri yapılana kadar -80 °C'lik buzdolabında muhaza edilmişlerdir.

3.7.2. ELISA yöntemiyle biyokimyasal parametrelerin analizi

-80 °C'de muhafaza edilen doku homojenat süpernatantlarında öncelikle Shanghai YL Biotech Co. Ltd ELISA kitiyle kit protokolü uygulanarak protein tayini yapılmıştır (mg protein). Protein tayini yapılan doku homojenatlarında daha sonra NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), TNF- α (tümör nekroz-alfa), MDA (malondialdehit), GSH (glutatyon) ve LDH (laktat dehidrogenaz) düzeylerinin tayini Shanghai YL Biotech Co. Ltd

ELISA kitleri ile prosedürüne uygun olarak çalışılmış protein miktarlarına göre düzeyler oranlanarak sonuçlar elde edilmiştir.

3.8. İstatistiksel Analizler

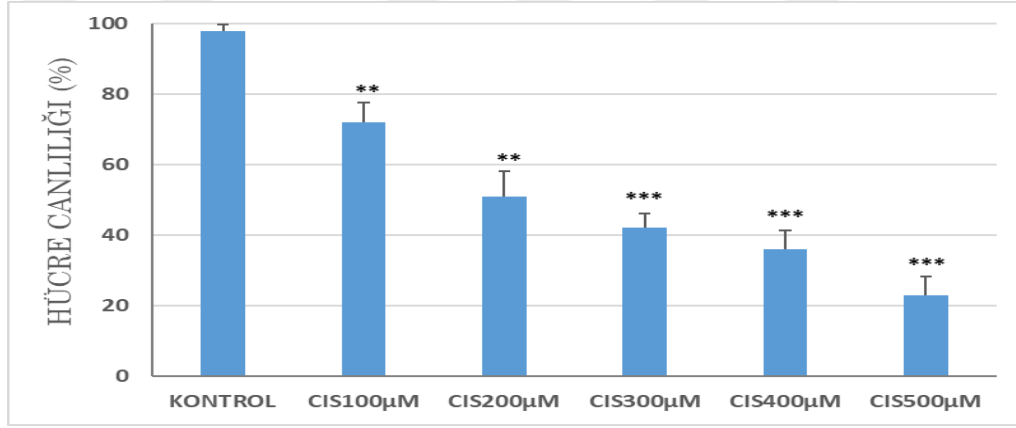
Elde edilen veriler SPSS 22.0 programı kullanılarak analiz edilmiştir. İn vitro testlerden elde edilen verilerin ve % kilo kaybının değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi ve ileri karşılaştırma testi olarak Tukey kullanılmıştır. İn vivo testlerden elde edilen verilerin, DRG nöron soma alanı-frekans histogramının ve böbrek hasarı skorunun değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi ve ileri karşılaştırma testi olarak Tukey testi kullanılmıştır. ELISA testlerinden elde edilen verilerin analizinde iki yönlü varyans analizi ve ileri karşılaştırma testi olarak Tukey kullanılmıştır. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

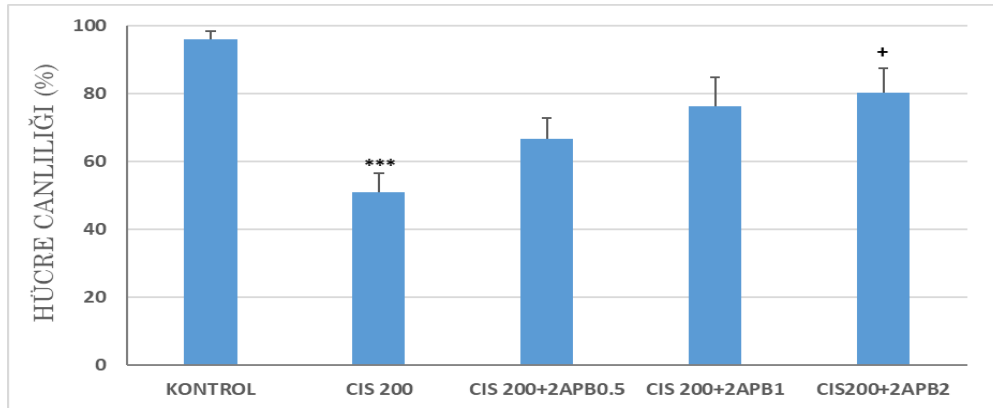
4.1. *In vitro* Deney Bulguları

4.1.1. MTT testi bulguları

CIS 100-500 μ M konsantrasyonlarda DRG hücre kültürüne uygulanmış ve konsantrasyon bağımlı şekilde hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı tespit edilmiştir. CIS'in submaksimum nörotoksik konsantrasyonu 200 μ M olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). CIS (200 μ M) ve 2-APB (0.5, 1, 2 mM), birlikte uygulanmıştır. 2-APB konsantrasyon bağımlı sitoprotektif etki gösterirken 2 mM konsantrasyonu CIS'e göre hücre canlılığını anlamlı şekilde artırmıştır. (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 MTT testi ile CIS'in hücre canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesi. (**:p<0,01, ***:p<0,001 kontrole göre).

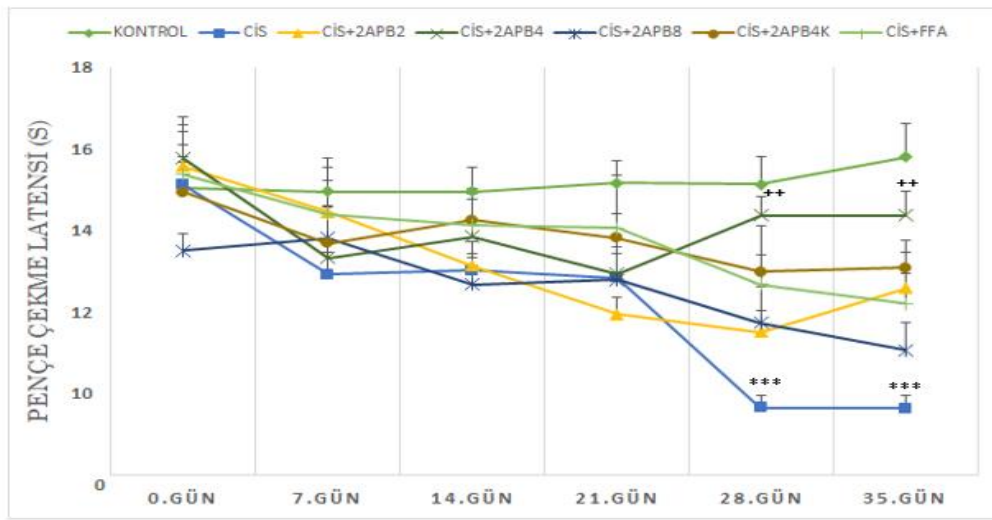


Şekil 4. 2 MTT testi ile CIS nörotoksisitesinde 2-APB'nin hücre canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesi. (***:p<0,001 kontrole göre; +:p<0,05 CIS'e göre).

4.2. Davranış Testleri Bulguları

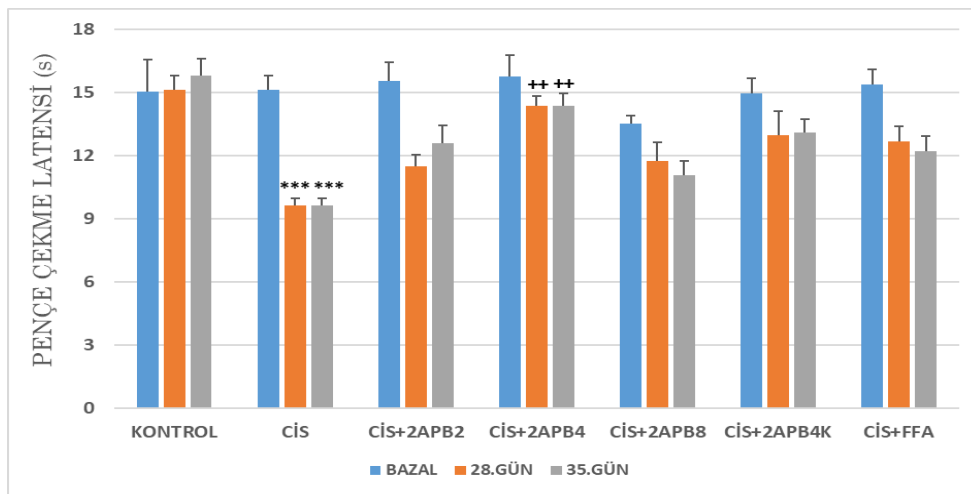
4.2.1. Mekanik allodini bulguları

Mekanik allodini testinin sonuçlarına göre grupların bazal ölçümleri arasında fark yoktur. CIS 28. ve 35. günlerde bazale göre anlamlı şekilde pençe çekme latensini düşürmüştür ($p<0,001$). CIS uygulamasıyla sıçanlarda mekanik allodini gelişirken, CIS ile beraber haftada bir kez verilen 2-APB'nin 4 mg/kg dozu pençe çekme latensini CIS 28. ve 35.güne göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır ($p<0,01$) (Şekil 4.3 ve 4.4).



Şekil 4.3 0. Günden 35. Güne kadar haftalık mekanik allodini testi bulguları

(***: $p<0,001$ kontrole göre; ++: $p<0,01$ CIS'e göre).

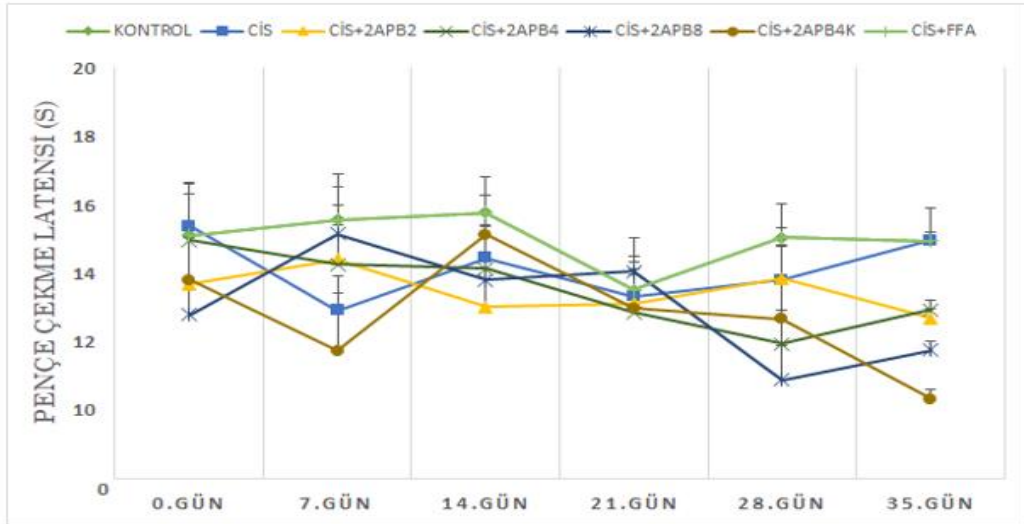


Şekil 4.4 Mekanik allodini bazal-28.gün-35.gün bulgularının kıyaslanması

(***: $p<0,001$ kontrole göre; ++: $p<0,01$ CIS'e göre).

4.2.2. Termal hiperaljezi bulguları

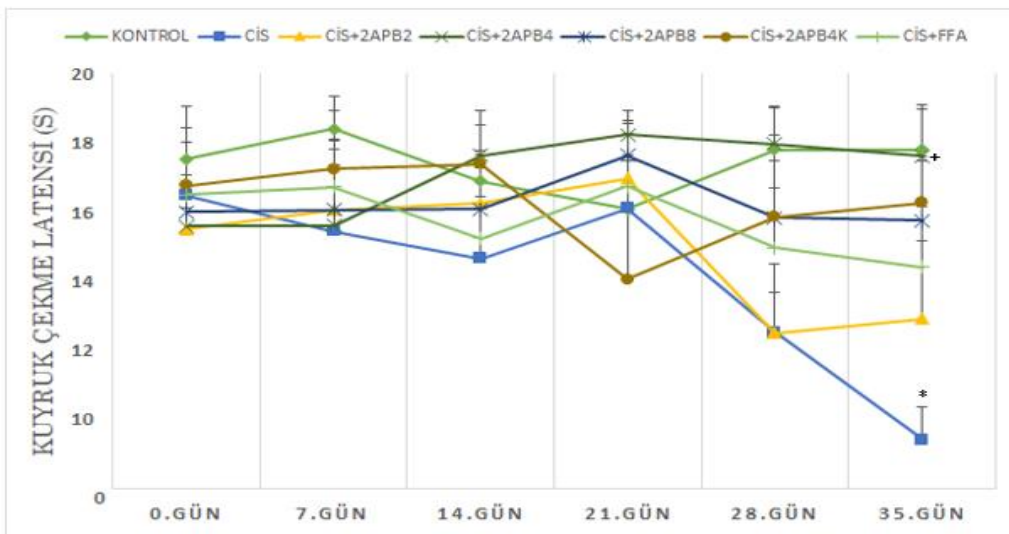
CIS'in termal hiperaljezi oluşturmadığı tespit edilmiştir. Gruplarda 0. günden 35. güne kadar anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 0. Günden 35. Güne kadar haftalık termal hiperaljezi testi bulguları.

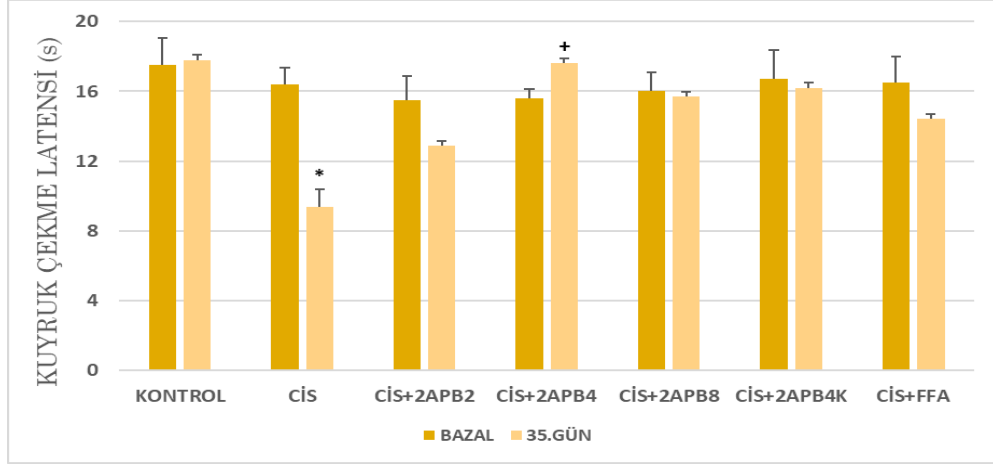
4.2.3. Kuyruk sıkıştırma (tail clip) testi bulguları

CIS'in kuyruk çekme latensini 35. günde anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). CIS ile haftada bir kez beraber verilen 2-APB'nin 4 mg/kg dozu kuyruk çekme latensini CIS 35.güne göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.6 ve 4.7).



Şekil 4.6 0. Günden 35. Güne kadar haftalık tail clip testi bulguları.

(*: $p<0,05$ kontrole göre; +: $p<0,05$ CIS'e göre).

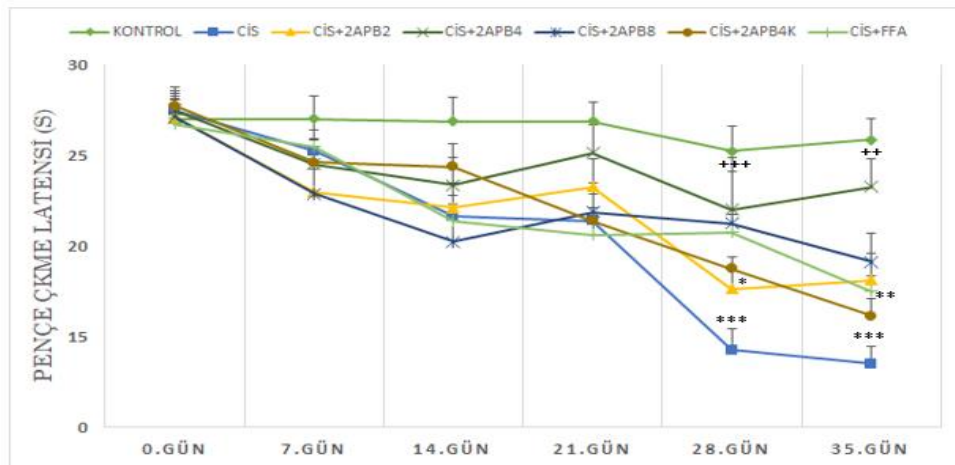


Şekil 4.7 Tail clip testi bazal-28.gün-35.gün bulgularının kıyaslanması.

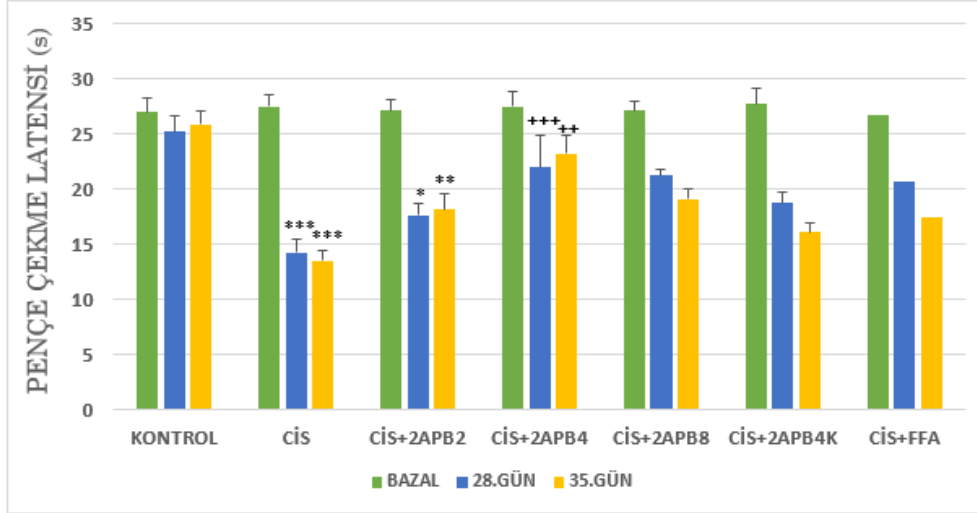
(*: $p < 0,05$ kontrole göre; +: $p < 0,05$ CIS'e göre).

4.2.4. Soğuk allodini bulguları

Soğuk plaka (cold plate) testinde CIS'in 28. ve 35. günlerde pençe çekme latensini bazale göre anlamlı derecede düşürdüğü tespit edilmiştir ($p < 0,001$). CIS'in sıçanlarda soğuk allodiniye neden olduğu belirlenmiş; haftada bir kez uygulanan 2-APB'nin 4 mg/kg dozunun CIS ile düşen pençe çekme latensini artırdığı görülmüştür ($p < 0,001$). Ayrıca 2-APB'nin 2 mg/kg dozunun 28. günde; haftada 3 kez uygulanan 2-APB'nin 4 mg/kg dozunun ise 35. günde kontrole göre pençe çekme latensini anlamlı ölçüde azalttığı da tespit edilmiştir ($p < 0,01$) (Şekil 4.8 ve 4.9).



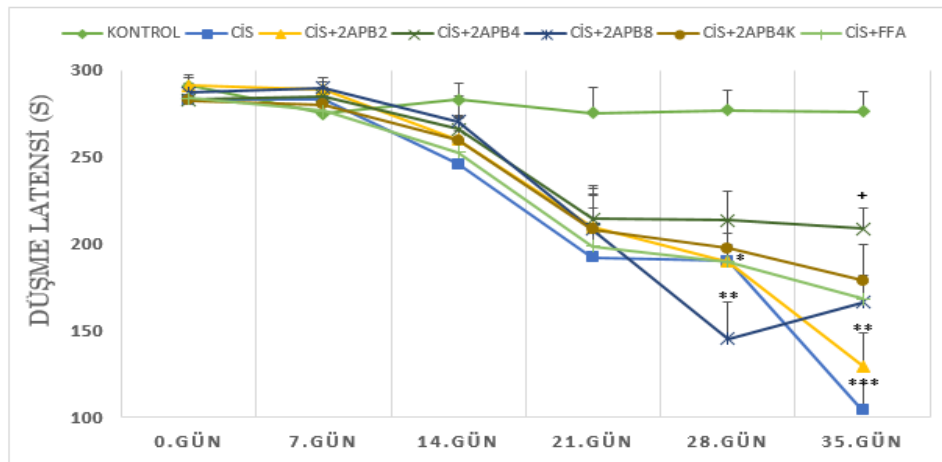
Şekil 4.8 0. Günden 35. Güne kadar haftalık cold plate testi bulguları. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ kontrole göre; ++: $p < 0,01$ +++: $p < 0,001$ CIS'e göre).



Şekil 4.9 Cold plate testi bazal-28.gün-35.gün bulgularının kıyaslanması. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ kontrole göre; ++: $p < 0,01$ +++: $p < 0,001$ CIS'e göre).

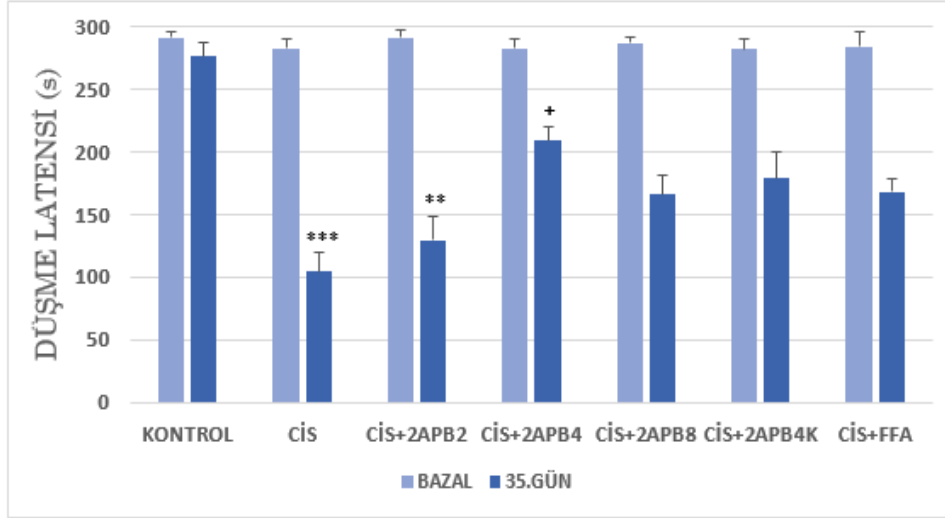
4.2.5. Rotarod testi bulguları

Rotarod testinde CIS'in 28. ve 35. günlerde düşme latensini bazale göre anlamlı derecede düşürdüğü tespit edilmiştir ($p < 0,05$ ve $p < 0,001$). CIS motor koordinasyonu anlamlı olarak bozmuştur. Haftada bir kez CIS ile birlikte uygulanan 2-APB'nin 4 mg/kg dozunun CIS ile azalan düşme latensini 35. Günde artırdığı görülmüştür ($p < 0,05$). Ayrıca 2-APB'nin 2 mg/kg ve 8mg/kg dozunun da 28. ve 35. günlerde kontrole göre düşme latensini anlamlı ölçüde azalttığı da tespit edilmiştir ($p < 0,05$ ve $p < 0,01$) (Şekil 4.10 ve 4.11).



Şekil 4.10 0. Günden 35. Güne kadar haftalık rotarod testi bulguları.

(*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ kontrole göre; +: $p < 0,05$ CIS'e göre).

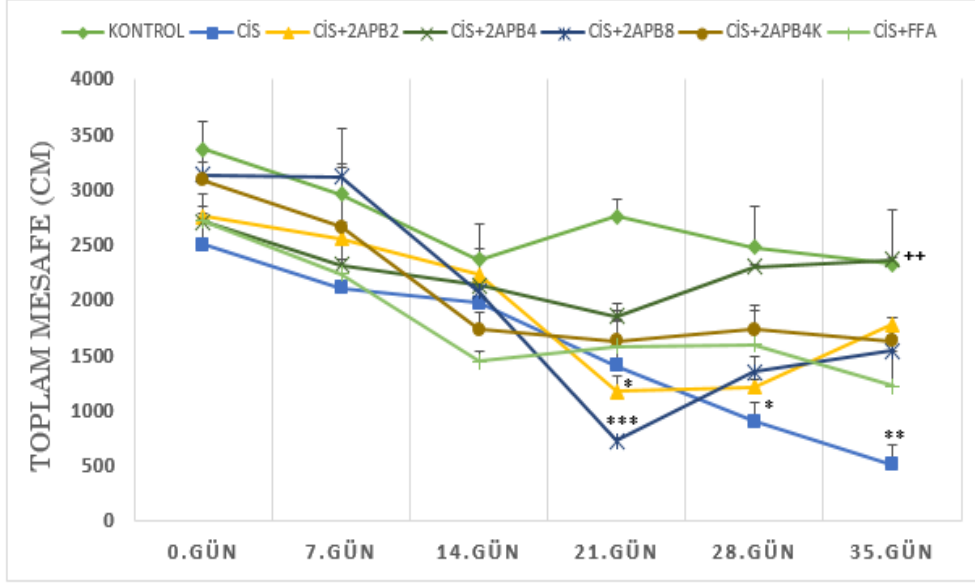


Şekil 4.11 Rotarod testi bazal-35.gün bulgularının kıyaslanması.

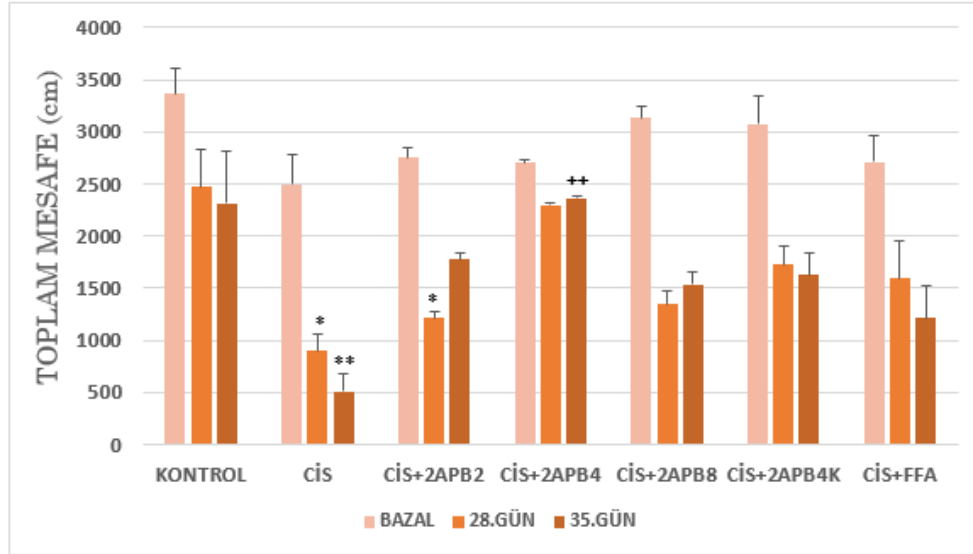
(** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ kontrole göre; + : $p < 0,05$ CIS'e göre;).

4.2.6. Aktivitemetre testi bulguları

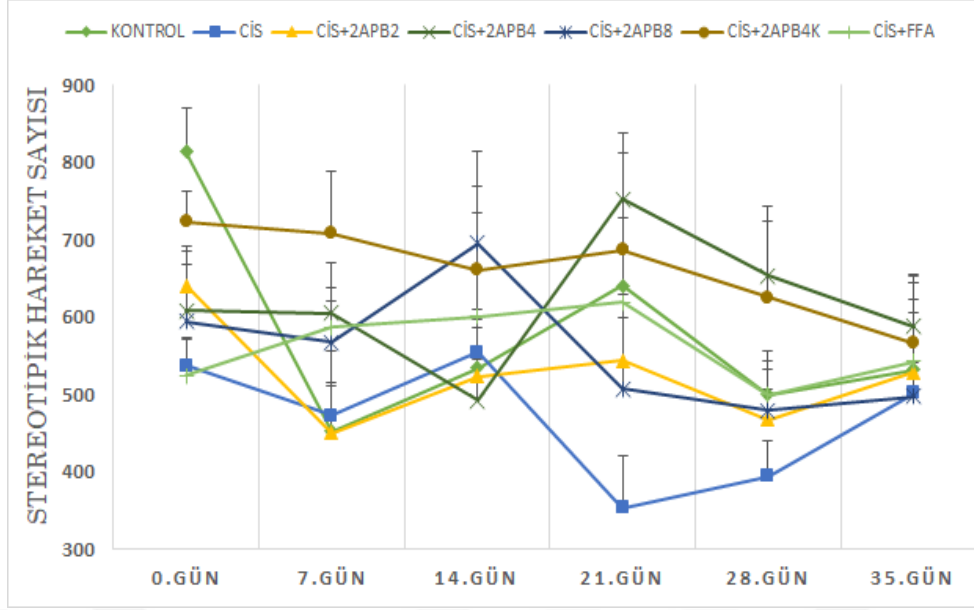
Lokomotor aktivitenin değerlendirilmesinde toplam hareket mesafesi, stereotipik, ambulatuvar, vertikal (dikey) ve horizontal (yatay) hareket mesafeleri analiz edilmiştir. 0. günden 35. güne kadar CIS grubunda katedilen mesafe azalmıştır. CIS+2APB8 grubunda total mesafede 21. günde anlamlı azalma gözlemlenmiştir ($p < 0,001$). 35. gün ölçümlerinde CIS grubunda toplam mesafede anlamlı azalma gözlenirken; CIS+2APB4 grubunda CIS'e göre anlamlı artış tespit edilmiştir ($p < 0,01$) (Şekil 4.12 ve 4.13). Deney hayvanlarının stereotipik ve dikey hareketlerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.14 ve 4.17). Ambulatuvar hareketlerde ve yatay hareketlerde CIS grubunda anlamlı azalma; 2APB4 grubunda ise CIS'e göre anlamlı artış tespit edilmiştir (Şekil 4.15, 4.16, 4.16 ve 4.19).



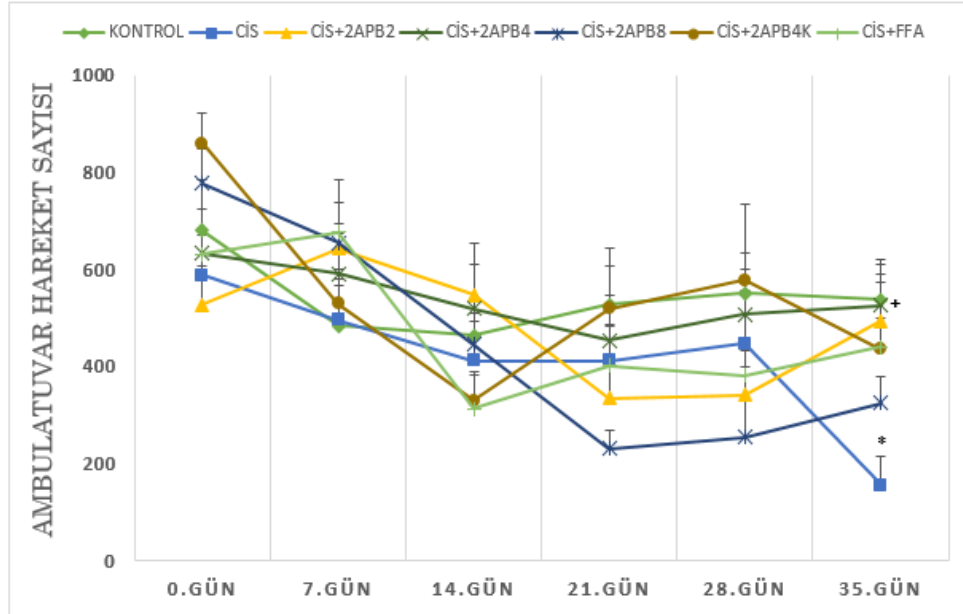
Şekil 4.12 0. Günden 35. Güne kadar aktivitemetre testine göre kat edilen toplam mesafe bulguları. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ kontrole göre; ++: $p < 0,01$ CIS'e göre).



Şekil 4.13 Aktivitemetre testine göre bazal-28.gün-35.gün kat edilen toplam mesafe bulgularının kıyaslanması. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ kontrole göre; ++: $p < 0,01$ CIS'e göre).

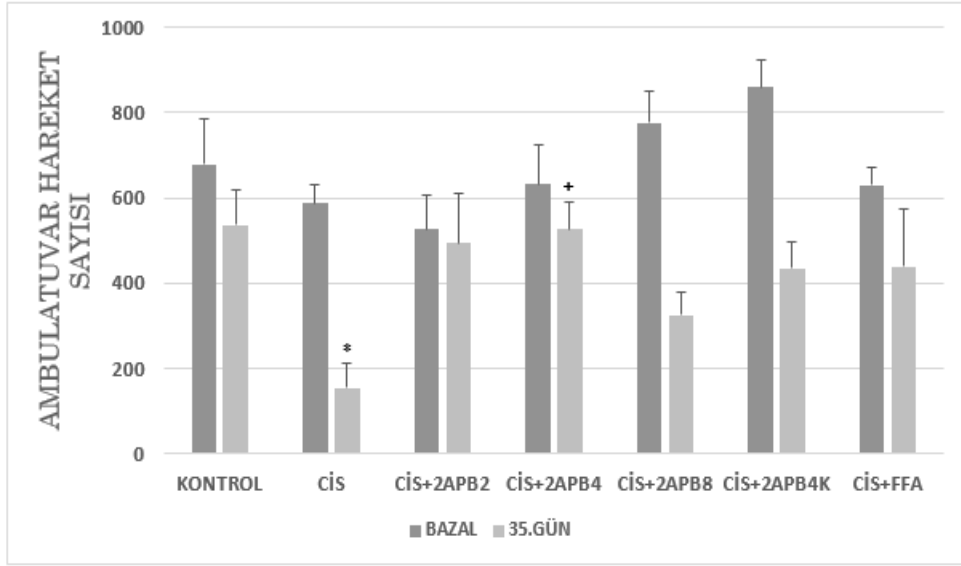


Şekil 4.14 0. Günden 35. Güne kadar aktivitemetre testine göre deney hayvanlarının stereotipik hareket bulguları.

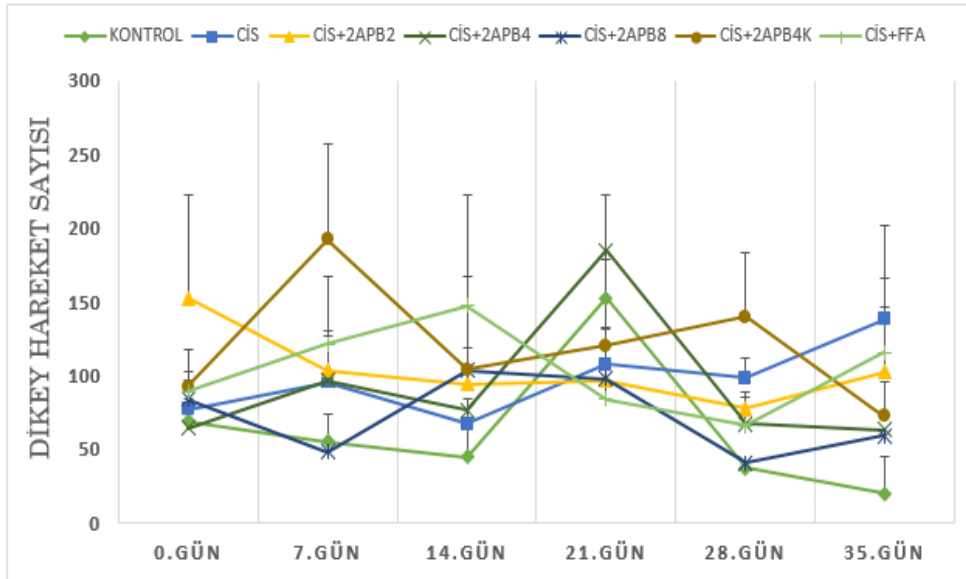


Şekil 4.15 0. Günden 35. Güne kadar aktivitemetre testine göre deney hayvanlarının ambulatuvar hareket bulguları.

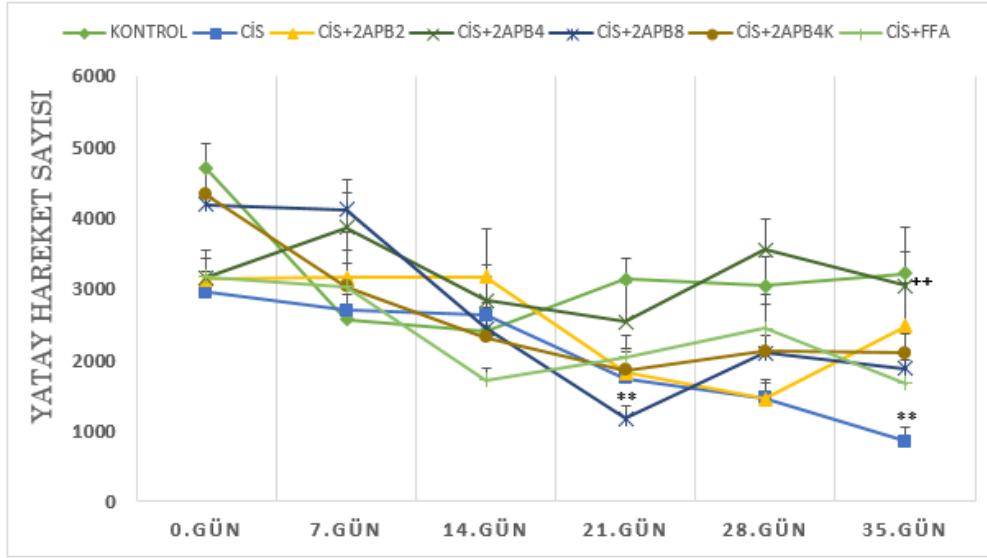
(*: $p < 0,05$ kontrole göre; +: $p < 0,05$ CIS'e göre).



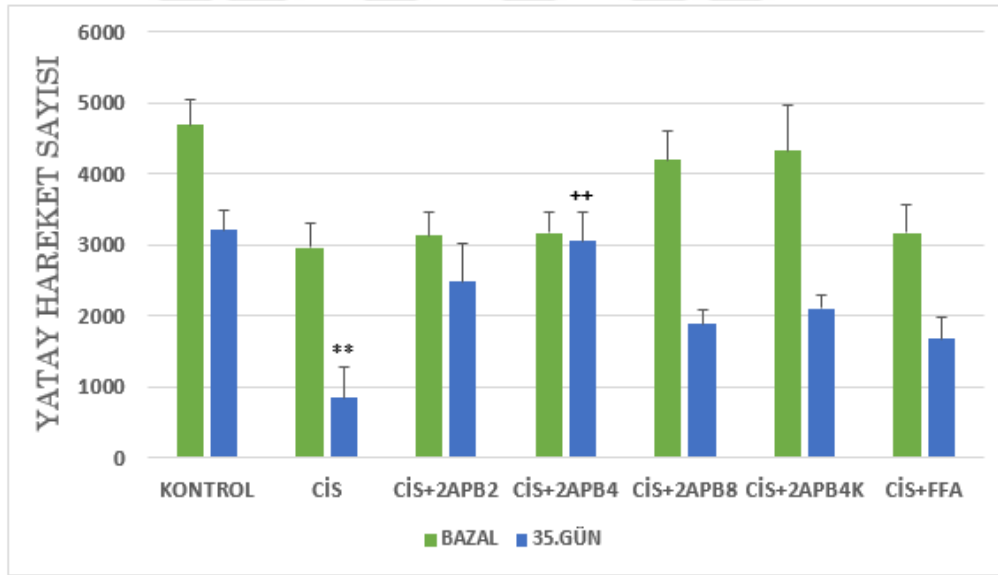
Şekil 4.16 Aktivitemetre testine göre bazal-35.gün ambulatuvar hareket bulgularının kıyaslanması. (*: $p < 0,05$ kontrole göre; +: $p < 0,05$ CIS'e göre).



Şekil 4.17 0. Günden 35. Güne kadar aktivitemetre testine göre deney hayvanlarının dikey hareket bulguları.



Şekil 4.18 0. Günden 35. Güne kadar aktivitemetre testine göre deney hayvanlarının yatay hareket bulguları. (**: $p < 0,01$ kontrole göre; ++: $p < 0,01$ CIS'e göre).

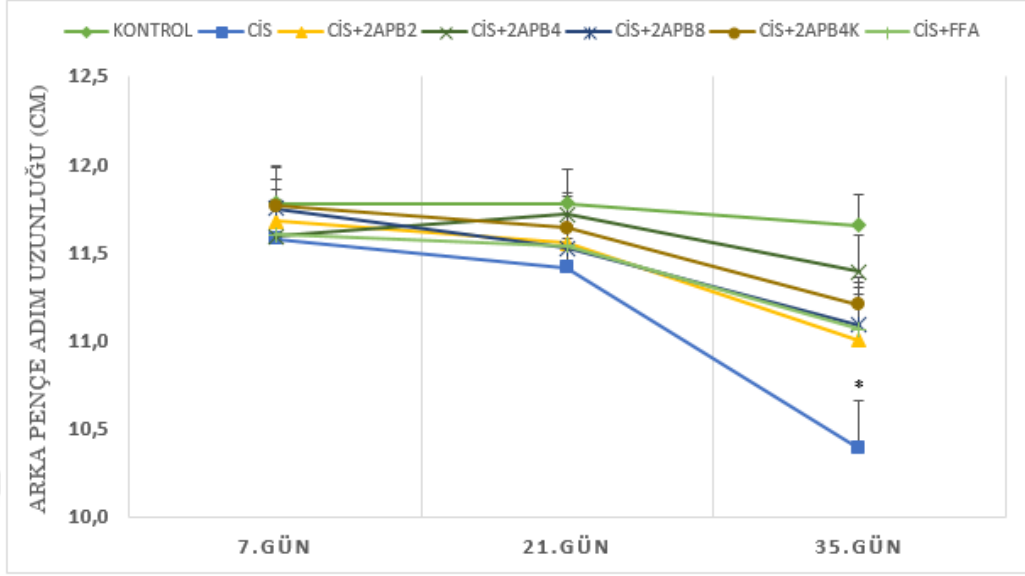


Şekil 4.19 Aktivitemetre testine göre bazal-35.gün yatay hareket bulgularının kıyaslanması. (**: $p < 0,01$ kontrole göre; ++: $p < 0,01$ CIS'e göre).

4.2.7. Ayak izi (footprint) analizi bulguları

Ayak izleri üzerinden yapılan ölçümlere göre, sağ arka pençe adım uzunluğunun CIS 35. günde anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür ($p < 0,05$). CIS+2APB4 grubunda bu değer kontrol grubuna yakın olduğu tespit

edilmiştir. 35. Günde CIS+2APB4 hariç diğer tüm gruplarda arka pençe adım uzunluğunun kontrole göre azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.20).

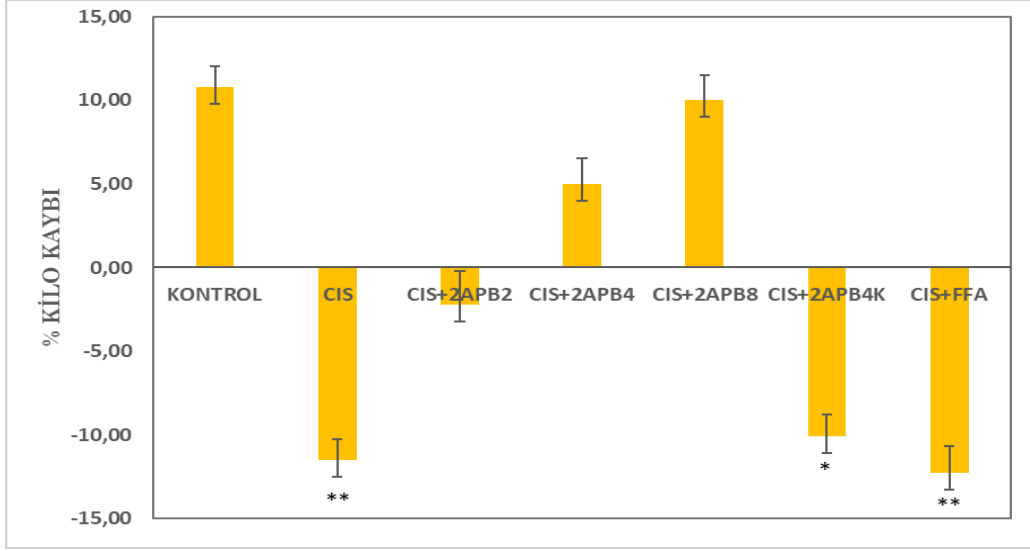


Şekil 4.20 Footprint testine göre 7.gün-21.gün-35.gün arka pençe adım uzunluğu bulgularının kıyaslanması. (*: $p < 0,05$ kontrole göre).

4.3. Morfolojik Analiz Bulguları

4.3.1. Hayvanların genel fiziksel görünüşleri ve ağırlık değişimleri

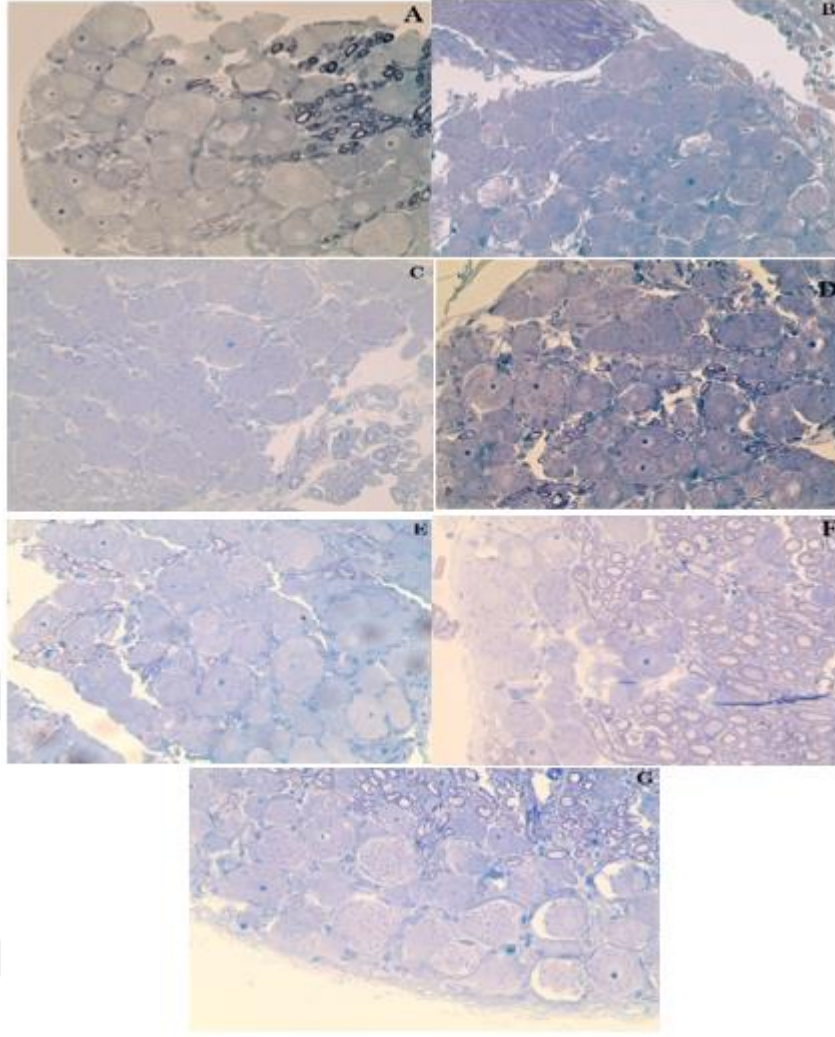
Sıçanlarda CIS uygulamasının özellikle 28. gününden sonra başlayan tüy dökülmesi ve hafif kanlı ishal CIS+2APB4 hariç tüm gruplarda gözlenmiştir. 2-APB'nin 4 mg/kg dozda haftada bir kez uygulandığı sıçanlarda tüy dökülmesi yine görülmekle birlikte kanlı ishal tespit edilmemiştir. CIS+FFA uygulanan grupta hafif kanlı ishal ile birlikte halsizlik ve kıvrınma hareketleri gözlemlenmiştir. Bu durumun FFA'nın asidik bir molekül olmasıyla bağlantılı olabileceği düşünülmüştür. Sıçanların vücut ağırlıklarının değişim yüzdesi hesaplandığında kontrol grubuna göre CIS, CIS ile birlikte haftada 3 kez uygulanan 2-APB4 ve FFA'nın hayvanların ağırlıklarında anlamlı derecede azalmaya yol açtıkları tespit edilmiştir. 2-APB'nin haftada 1 kez uygulanan tüm dozları ağırlıklarda anlamlı bir azalmaya neden olmamıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4.21 Deney hayvanlarının 0. Gün – 35. Günlerde kaydedilen vücut ağırlıkları arasındaki değişim. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ kontrole göre).

4.3.2. DRG'lerde histopatolojik değerlendirme bulguları

Kontrol grubunda nöronların morfolojilerinin normal olduğu ve nükleusların santral yerleşimli olduğu izlenmiştir. CIS grubunda nöron gövdelerinin kontrol grubuna kıyasla daha küçük olduğu ve bazı hücrelerin sitoplazma zarlarında silinmeler tespit edilmiştir. Nükleusların santral yerleşimi ve hücre membranı sınırlarının CIS+2APB4 grubunda CIS grubuna göre daha fazla belirgin olduğu gözlemlenmiştir. CIS+2APB8 ve CIS+ 2APB2 grubunda da CIS+2APB4'e göre daha az olmakla birlikte CIS ile kıyaslandığında daha az patolojik değişiklik gözlemlenmiştir. CIS+2APB4K ve CIS+FFA gruplarında da histolojik tablonun bozulduğu belirlenmiştir (Şekil 4.22).

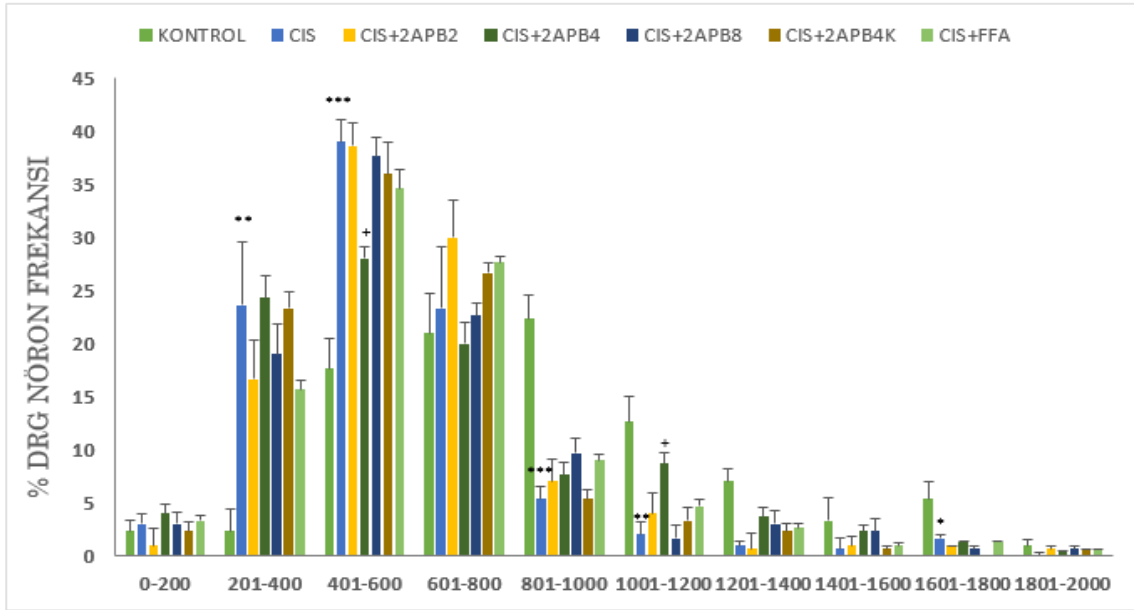


Şekil 4.22 DRG'lerin histopatolojik değerlendirmesi (40X).

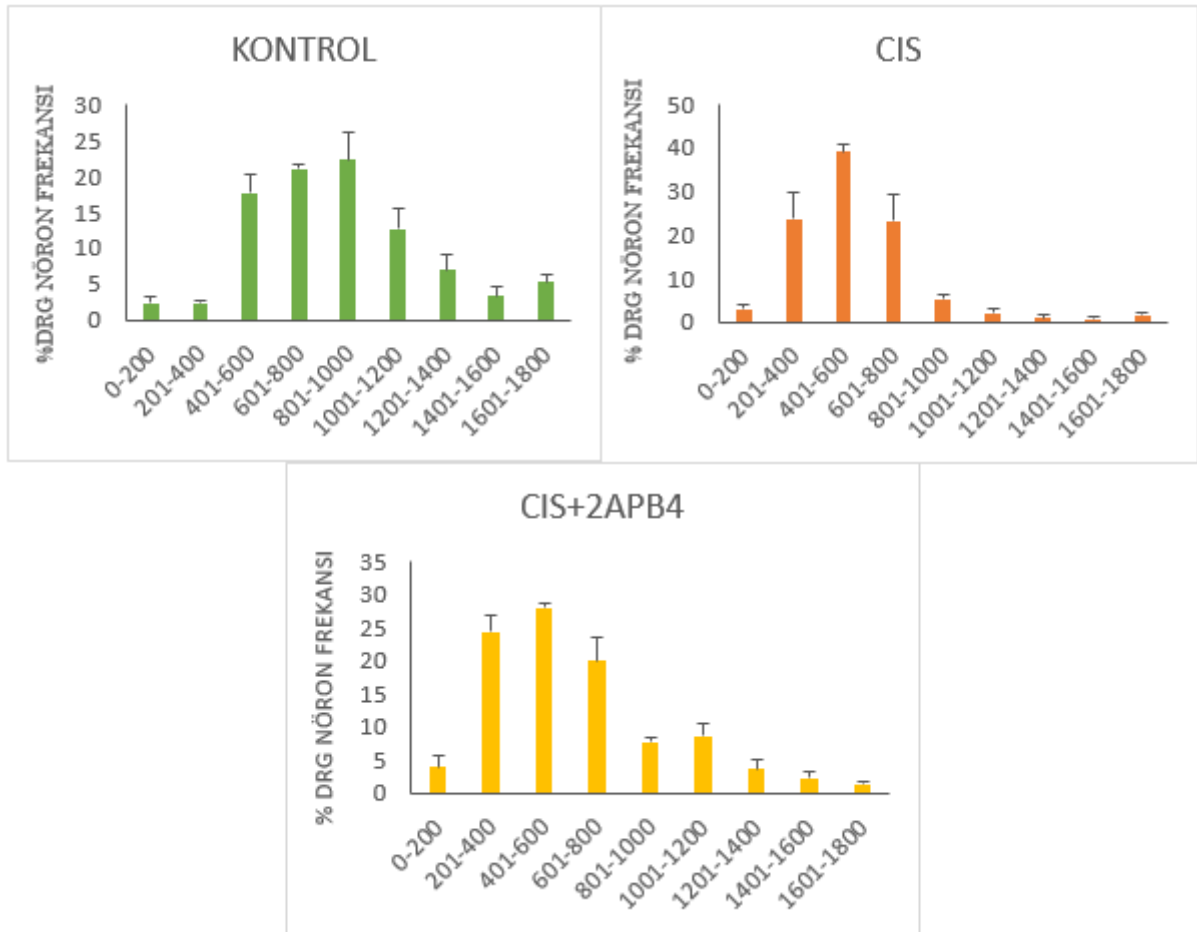
A: Kontrol, **B:** CIS, **C:** CIS+2APB2, **D:** CIS+2APB4, **E:** CIS+2APB8

F: CIS+APB4K, **G:** CIS+FFA.

DRG nöron soma alanı-frekans histogramına bakıldığında genel olarak küçük çaplı nöron frekansının kontrol ve CIS+2APB4 grubu hariç diğer gruplarda daha fazla olduğu görülmektedir. Büyük çaptaki nöronların özellikle CIS gurunda giderek azaldığı gözlemlenmiştir. 401-600 çapındaki nöron frekansında 2APB4'ün CIS'e göre anlamlı olarak daha az olduğu 1001-1200 çapındaki nöron frekansında ise anlamlı olarak daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.23 ve 4.24).



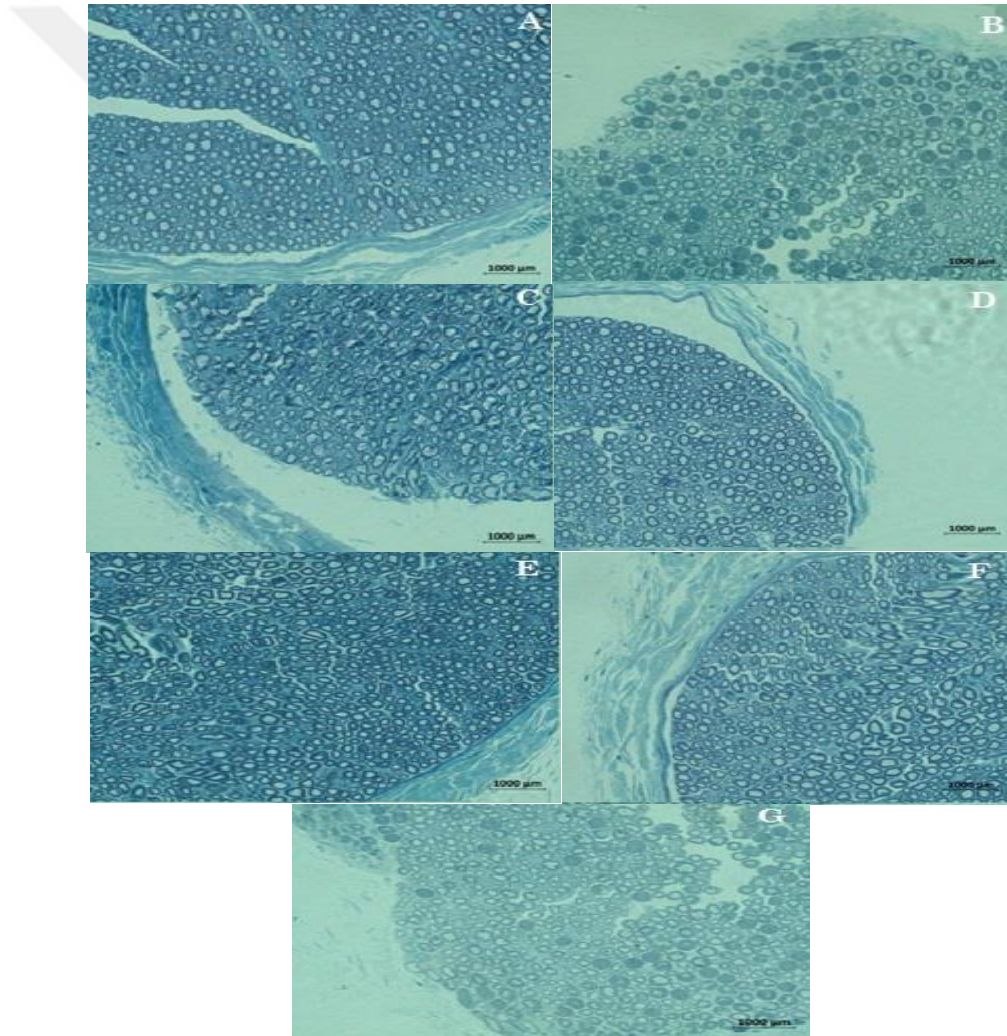
Şekil 4.23 DRG nöron soma alanı - % DRG frekans histogramı. (*: $p<0,05$ **:
 $p<0,01$, ***: $p<0,001$ kontrole göre; +: $p<0,05$ CIS'e göre).



Şekil 4.24 DRG nöron soma alanı - % DRG frekans histogramı kontrol, CIS ve
 CIS+2APB4 kıyaslaması.

4.3.3. Siyatik sinirlerde histopatolojik değerlendirme bulguları

Kontrol grubunda normal morfolojik yapıda izlenirken, CIS grubunda yaygın şekilde myelin kılıf ve myelin sinir dejenerasyonu gözlemlenmiştir. CIS grubu ile kıyaslandığında daha az olmakla birlikte CIS+FFA rubunda da yaygın şekilde bu dejenerasyonlar görülmüştür. CIS+2APB4 grubunda yer yer myelin kılıfı dejenerasyonu izlenmiştir. CIS+2APB8 grubunda da yer yer olmakla birlikte, CIS+2APB4 grubuna göre biraz daha artmış oranda myelin kılıf dejenerasyonu görülmüştür. CIS+2APB2 ve CIS+2APB4K gruplarında da yaygın myelin kılıf dejenerasyonu ve yer yer myelin sinir dejenerasyonu izlenmiştir (Şekil 4.25).



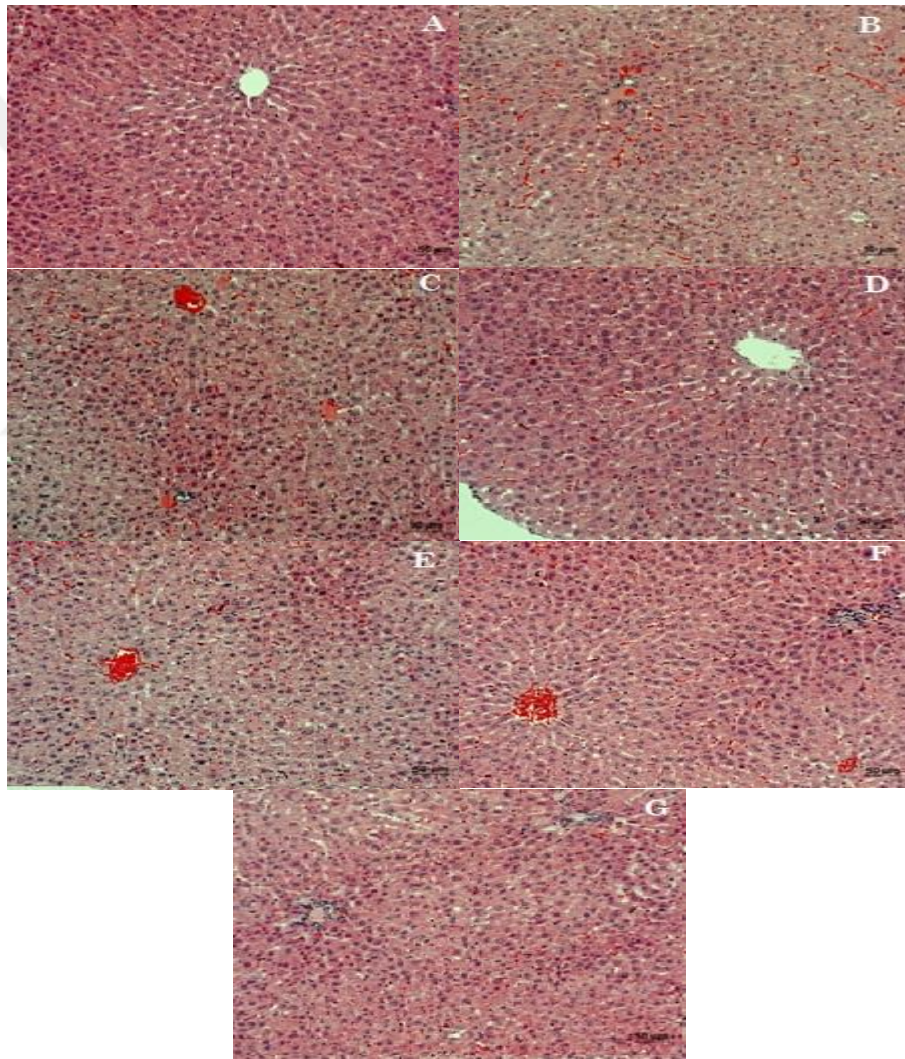
Şekil 4.25 Siyatik sinirlerin histopatolojik değerlendirmesi (3000 µM).

A: Kontrol, B: CIS, C: CIS+2APB2, D: CIS+2APB4, E: CIS+2APB8

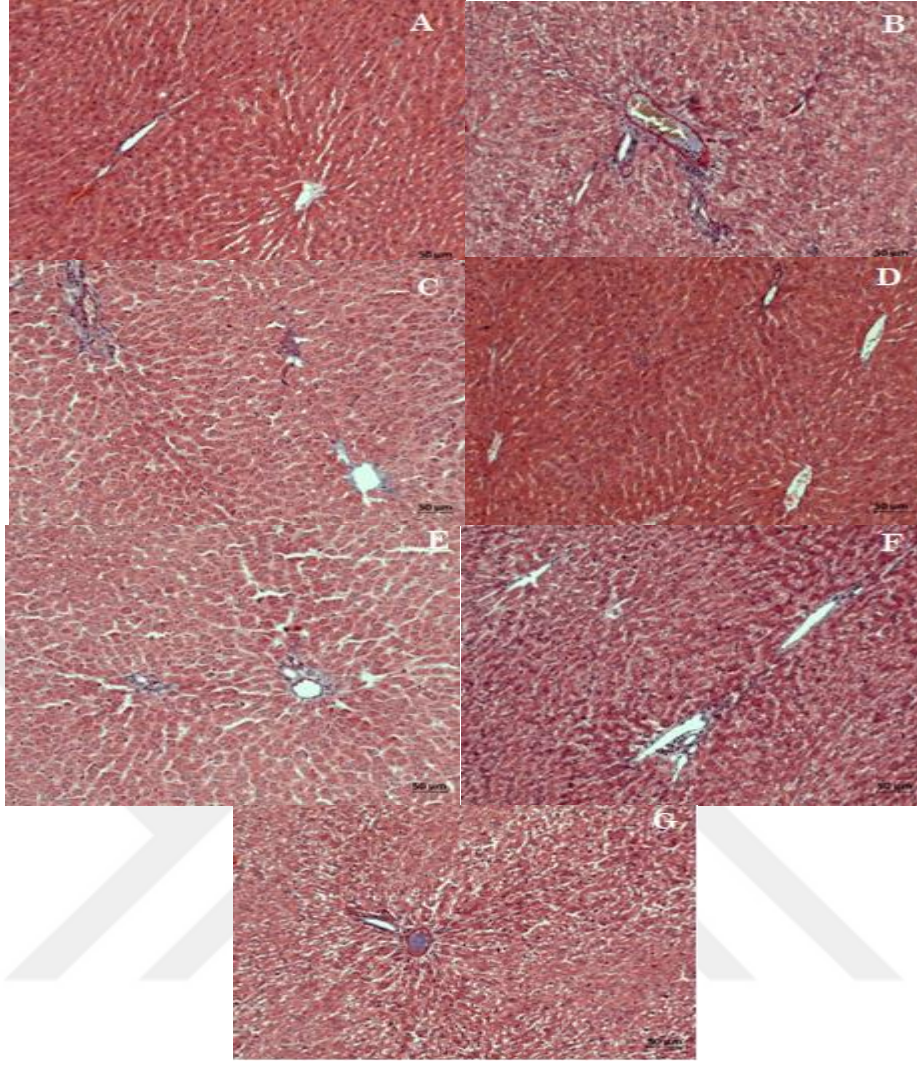
F: CIS+APB4K, G: CIS+FFA.

4.3.4. Karaciğer kesitlerinde histopatolojik değerlendirme bulguları

Karaciğerlerin histolojik değerlendirmesinde hemotoksilen-eozin (Şekil 4.26) ve mason trikrom (Şekil 4.27) boyamaları yapılmıştır. Kontrol gurubunda normal morfolojik yapı gözlenmiştir. CIS Grubunda hepatosit kordon yapısında bozulma, hepatositlerde vakuolizasyon ve piknozis, sinüzoidal dilatasyonda artış, sinüzoidal alan ve v. centraliste hemoraji ve ödem izlenmiştir. CIS+2APB4 grubunda CIS grubuyla kıyaslandığında bariz olarak azalmış sinüzoidal hemoraji görülmüştür. Diğer tüm tedavi gruplarında CIS grubuna benzer oranlarda aynı bulgular izlenmiştir.



Şekil 4.26 Hemotoksilen-eozin ile boyanan karaciğer kesitlerinin histopatolojik bulguları (50 μ M). **A:** Kontrol, **B:** CIS, **C:** CIS+2APB2, **D:** CIS+2APB4, **E:** CIS+2APB8 **F:** CIS+APB4K, **G:** CIS+FFA

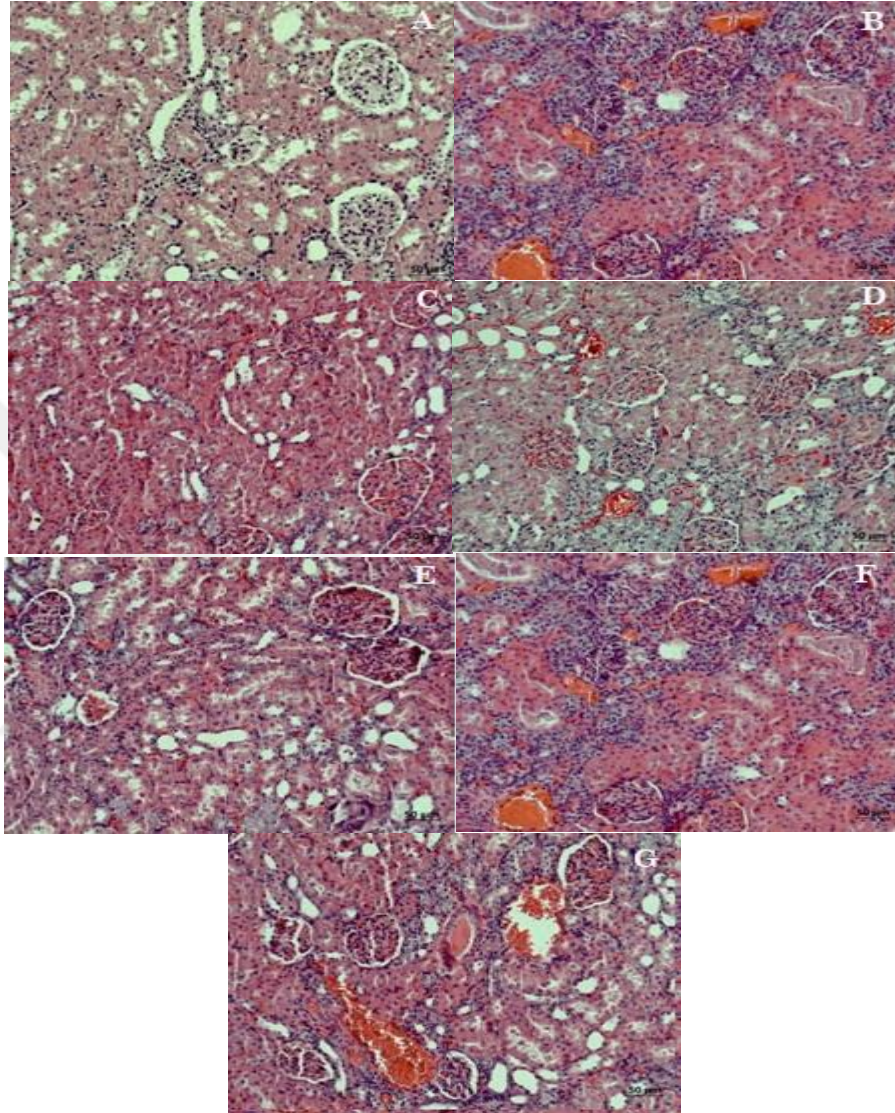


Şekil 4.27 Mason trikrom ile boyanan karaciğer kesitlerinin histopatolojik bulguları (50 μ M). **A:** Kontrol, **B:** CIS, **C:** CIS+2APB2, **D:** CIS+2APB4, **E:** CIS+2APB8
F: CIS+APB4K, **G:** CIS+FFA.

4.3.5. Böbrek kesitlerinde histopatolojik değerlendirme bulguları

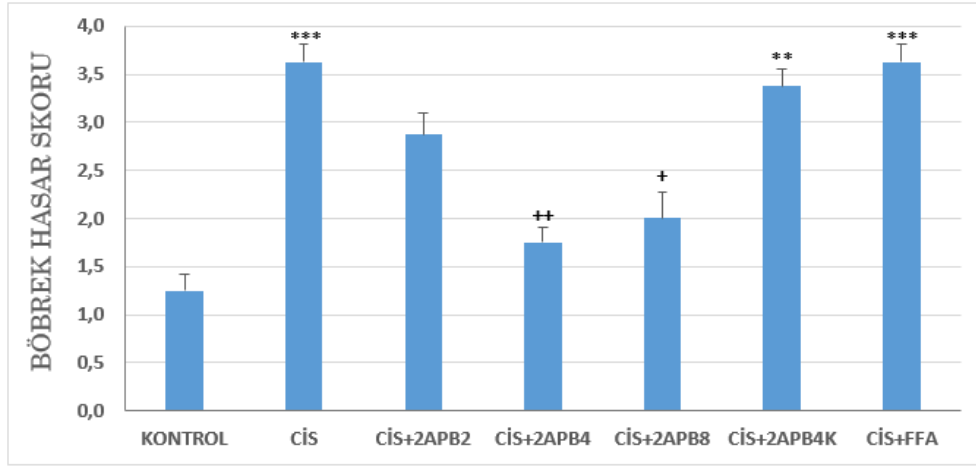
Böbreklerin histolojik değerlendirmesinde kontrol grubunun normal morfolojik yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. CIS grubunda yer yer tübül epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve hemoraji görülmüştür. CIS+2APB2, CIS+2APB8, CIS+2APB4K, CIS+FFA gruplarında benzer oranlarda yaygın hemoraji, tübül epitel hücrelerinde yaygın vakuolizasyon ve lümeneye dökülme, tübüler nekroz ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlemlenmiştir. CIS+2APB4 grubunda ise bu gruplara göre nisbeten daha az hemoraji ve vakuolizasyon

tespit edilmiştir (Şekil 4.28). Böbrek hasar skorlamasına göre CIS grubunda ciddi hasar meydana geldiği, diğer gruplarda da hasar görülmekle beraber özellikle CIS+2APB4 ve CIS+2APB8 gruplarında CIS'a göre daha az olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.28 Hemotoksilen-eozin ile boyanan böbrek kesitlerinin histopatolojik bulguları (50 µM). **A:** Kontrol, **B:** CIS, **C:** CIS+2APB2, **D:** CIS+2APB4, **E:** CIS+2APB8

F: CIS+APB4K, **G:** CIS+FFA

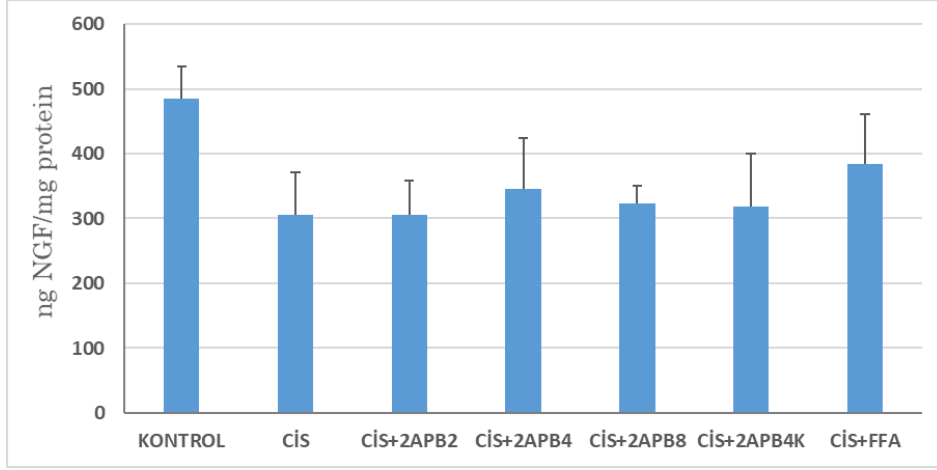


Şekil 4.29 Böbrek kesitlerinde patolojik skorlama bulguları.

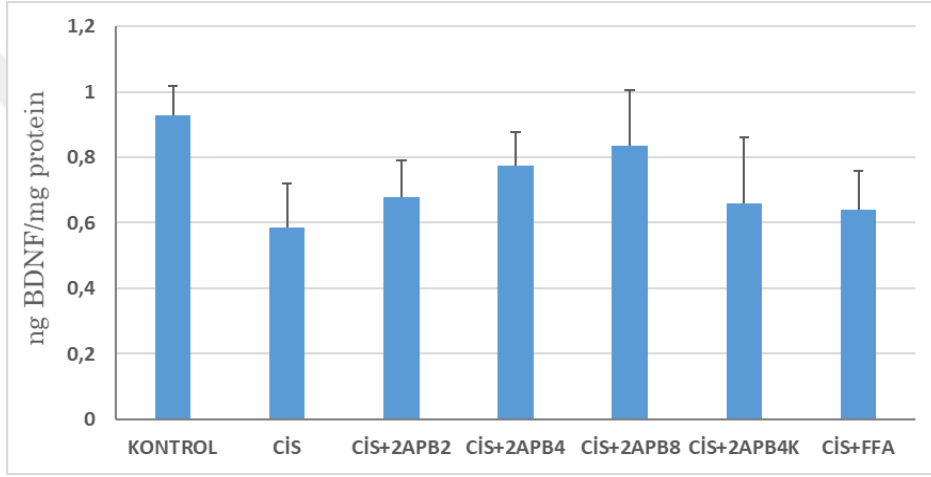
(** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ kontrole göre; + : $p < 0,05$, ++ : $p < 0,01$ CIS'e göre).

4.4. Biyokimyasal Değerlendirmeler

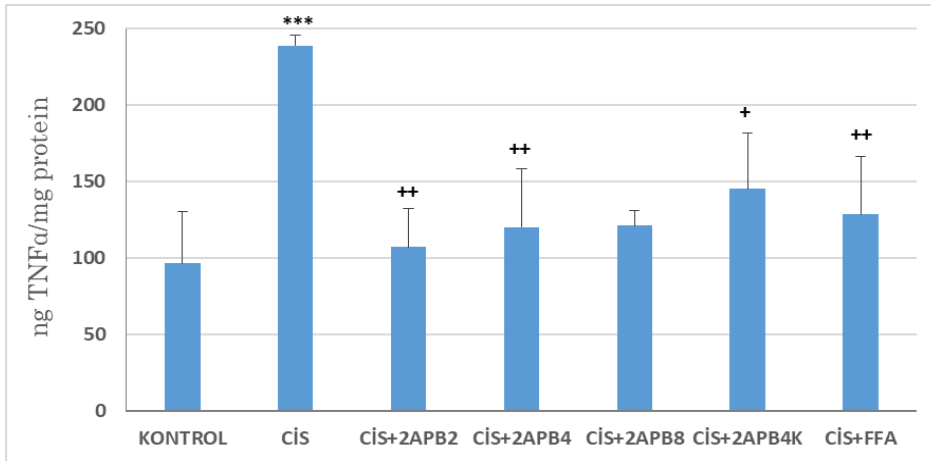
Biyokimyasal değerlendirmelerde DRG'lerde NGF, BDNF, TNF- α , MDA, GSH ve LDH düzeyleri saptanmıştır. NGF ve BDNF düzeyleri kontrol grubuna göre CIS grubunda azalma gösterirken, NGF düzeyleri CIS+2APB2 hariç diğer tüm tedavi gruplarında; BDNF düzeyleri ise tüm tedavi gruplarında CIS'e göre artmıştır ancak bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (Şekil 4.30 ve 4.31). TNF- α düzeylerine bakıldığında CIS grubunda kontrole göre oldukça anlamlı bir artış saptanmıştır. CIS+2APB8 hariç diğer tüm gruplarda ise TNF- α düzeylerinde CIS'e göre anlamlı azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.32). MDA ve LDH düzeylerinde CIS grubunda kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlenirken; CIS+2APB4 grubunun bu düzeyleri anlamlı olarak azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.33 ve 4.35). Son olarak GSH düzeylerinde CIS kontrole göre anlamlı olarak bu değeri azaltmış ancak tedavi gruplarında anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.30 DRG doku homojenatında NGF düzeyleri (ng NGF/mg protein).

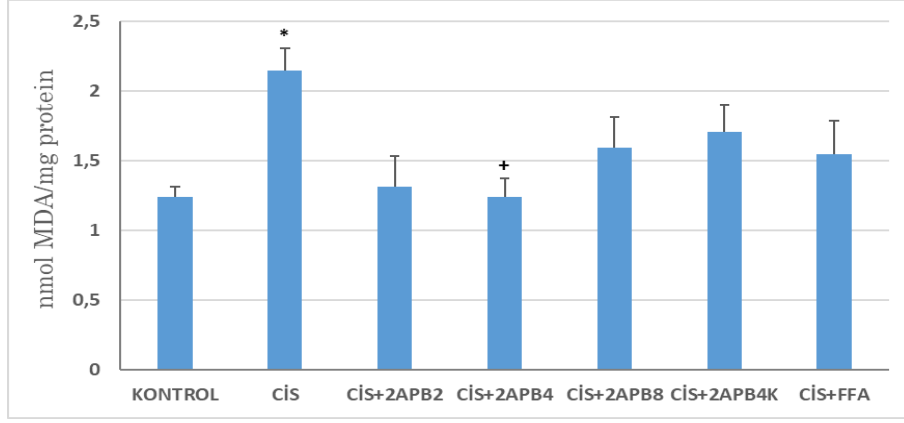


Şekil 4.31 DRG doku homojenatında BDNF düzeyleri (ng BDNF/mg protein).



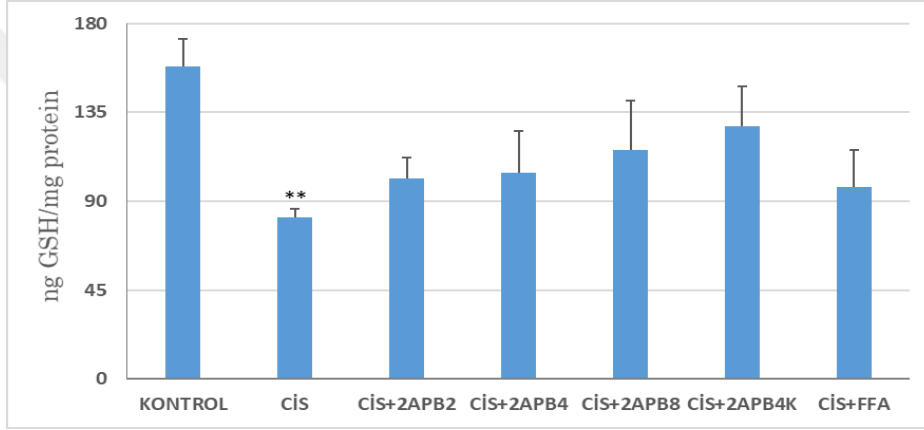
Şekil 4.32 DRG doku homojenatında TNF-α düzeyleri (ng TNF-α/mg protein).

(***: $p < 0,001$ Kontrolle göre CIS; +: $p < 0,05$, ++: $p < 0,01$ CIS'e göre).



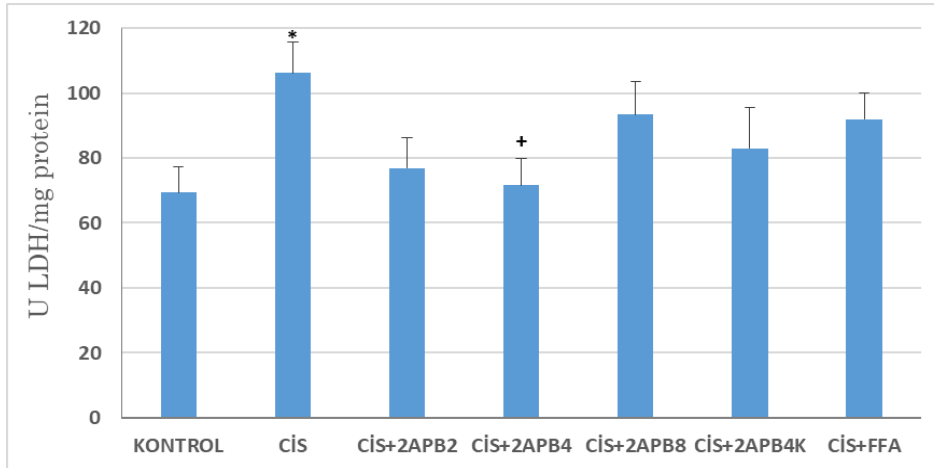
Şekil 4.33 DRG doku homojenatında MDA düzeyleri (nmol MDA/mg protein).

(*: $p < 0,05$ kontrole göre CIS; +: $p < 0,05$ CIS'e göre)



Şekil 4.34 DRG doku homojenatında GSH düzeyleri (ng GSH/mg protein).

(**): $p < 0,01$ Kontrole göre CIS).



Şekil 4.35 DRG doku homojenatında LDH düzeyleri (U LDH/mg protein).

(*: $p < 0,05$ kontrole göre CIS; +: $p < 0,05$ CIS'e göre).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda CIS kaynaklı nörotoksisite ve PN'de 2-APB'nin olası sitoprotektif, antihiperalezik ve antiallodinik etkilerini araştırdık. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız TRPM2 kanalı ve blokörü 2-APB'nin CIS ile indüklenen periferik nöropatideki olası etkilerinin araştırılması açısından bir ilktir. CIS'le indüklenen nöropatik ağrı modellerinde farklı TRP kanallarının etkileri daha önce gösterilmiştir (Hori, Ozaki, Suzuki, & Sugiura, 2010).

CIS yaygın olarak kullanılan ve etkili bir antikanser ilaçtır, ancak periferik nörotoksisite CIS tedavisinin önemli bir doz sınırlayıcı faktörü olmakla birlikte kanser tedavisi açısından ciddi bir kısıtlamaya neden olmaktadır (Krarup-Hansen vd, 1993). Çalışmamızın in vitro bölümünde 1 günlük yavru sıçanlardan elde ettiğimiz DRG hücre kültüründe CIS ile indüklenen nörotoksisitede 2-APB'nin konsantrasyon bağımlı sitoprotektif etki gösterdiğini saptadık. Çalışmamız 2-APB'nin nöroprotektif açıdan değerlendirildiği ilk çalışmadır. Daha önce kalp, karaciğer ve yumurtalık hasarında protektif etkiler gösterdiği saptanmıştır (Moriyama vd., 2017; Nicoud vd., 2007; Taskin vd., 2014). Çalışmamızın in vivo kısmında, periferik nöropati modeli oluşturabilmek için CIS'i beş hafta boyunca haftada bir kez 3 mg/kg dozda uyguladık. Bu deney protokolü, farklı çalışmalarda bilateral arka pençelerde mekanik allodini oluşması için gereken optimum süre ve dozu sağladığı gösterilmiş bir protokoldü (Han vd., 2014; M. Shahid, Subhan, Ahmad, & Sewell, 2019). Elde ettiğimiz bulgulara göre CIS mekanik allodini ve soğuk allodiniye neden olurken termal hiperalezi oluşturmamıştır. CIS kaynaklı nöropatik ağrı modellerinde, mekanik allodini ve soğuk allodini gibi karakteristik belirtilerin kolayca ortaya çıktığı birçok kez gösterilmiştir (Deng vd., 2012; Seto, Takase, Tsuji, & To, 2017). Termal hiperalezi oluşmaması önceki çalışmamızın bulgularıyla göstermiştir (Donertas vd., 2018). CIS ile indüklenen nöropati modelinde CIS'in termal hiperalezi oluşturmadığı gözlemlenen benzer bir çalışma, bu durumun nedeninin doz ve uygulama süresi olabileceğini ileri sürmüştür (Lin, Heo, & Yoon, 2015). Hayvan modellerinde kronik CIS tedavisini takiben ısı uyarılarına verilen nöroseptif yanıtlar konusundaki bu tutarsızlıkların farklı

türler, cinsiyet ve ağrı testi tipi de dahil olmak üzere birçok faktörün bu durumu etkileyebileceği düşünülmektedir (Ta, Low, & Windebank, 2009). Çalışmamızda kullandığımız dinamik plantar test deneysel nöropatik ağrı modellerinde araştırılan mekanik allodinin; soğuk plaka testi ise soğuk allodinin tespit edilmesinde tercih edilen testlerdir (Allchorne, Broom, & Woolf, 2005; Furgala, Salat, & Salat, 2018; Turan Yucel, Can, & Demir Ozkay, 2020). CIS ile birlikte uygulanan 2-APB'nin haftada bir kez uygulanan 4 mg/kg dozu mekanik ve soğuk allodinin etkisini önemli ölçüde azaltmıştır (Şekil 4.4 ve 4.9). CIS ile tedavi edilen farelerde TRPV1 mRNA'nın up-regülasyonunun mekanik allodininin moleküler mekanizmalarına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Ta vd., 2010). Bu nedenle daha önce TRPV1 aktivasyonuna yol açtığı belirtilen 2-APB'nin (Gao vd., 2016) antiallodinin etkisinin daha çok TRPM2 kanalı blokajı yoluyla olduğu düşünülebilir. Ayrıca soğuk allodini oluşmasında etkili olan TRPM8 kanalının blokajı da 2-APB'nin etkisinde rol oynamış olabilir.

Akut spinal ağrıyı değerlendirmek için kullandığımız kuyruk sıkıştırma testinde 35. günde CIS'in kuyruk çekme latensini anlamlı ölçüde artırdığını tespit ettik (Şekil 4.7). Önceki çalışmalarımızda bir anlamlılık bulamadığımız bu testte, kemoterapötik etki mekanizmalarından bağımsız olarak KİPN'e neden olan kemoterapötiklerin, glial yanıt ve pro-inflamatuvar sitokinlerin salıverilmesini içeren nöroinflamatuvar süreçler sonucunda omurilikte patofizyolojik değişikliklerin gelişmesine bağlı olarak mekanik hassasiyet oluşturabilecekleri görüşü bulgularımızı destekleyebilir (Janes vd., 2015). 2-APB'nin haftada bir kez 4 mg/kg uygulanan dozunun kuyruk çekme latensini artırarak bu hassasiyeti anlamlı ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. TRPM2 nakavt hayvanlarda yapılan bir çalışmada proinflamatuvar sitokinlerin üretiminin önemli ölçüde baskılandığı bulunmuştur (Miyano-hara vd., 2018). 2-APB'nin de TRPM2 blokajı ile bu sitokinleri azaltarak mekanoduyarlılığı azaltmış olabileceği söylenebilir.

Çalışmamızda hayvanların motor koordinasyonunu değerlendirmek için rotarod testi ve ayak izi analizini kullandık. Rotarod modeli, sıçanlarda motor koordinasyonunu gözlemlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır ve özellikle serebellar hasarın ortaya çıkmasında hassas bir testtir (Ding, Weng, Fan, Cao,

& Lu, 2017). Bu testlerden elde edilen sonuçlara göre CIS'in motor koordinasyonu anlamlı şekilde bozduğu ve CIS ile birlikte haftada bir kez uygulanan 2-APB'nin 4 mg/kg dozunun bu durumu iyileştirdiği belirlenmiştir (Şekil 4.11 ve 4.20). Literatürde CIS'in motor koordinasyonu bozduğunu destekleyen çalışmalar bulunmaktadır (Li, Zheng, Sah, Mishra, & Singh, 2019; M. Shahid vd., 2019).

Aktivitemetre testi ile değerlendirilen lokomotor aktivite bulgularına göre sıçanların kat ettikleri toplam mesafe, stereotipik, ambulatuvar, vertikal (dikey) ve horizontal (yatay) hareketleri değerlendirilmiştir. CIS grubunda toplam mesafe, ambulatuvar ve yatay hareketlerde anlamlı azalma gözlenirken (Şekil 4.13, 4.16 ve 4.19); stereotipik ve dikey hareketlerde anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir (Şekil 4.14 ve 4.17). CIS'in motor performansı bozarak lokomotor aktivitede azalmaya yol açtığı daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (Boehmerle vd., 2014; N, Mohamad, & Razdan, 2019). Ambulatuvar hareketler, test kafesi içerisinde kat edilen mesafe ile doğru orantılı olduğundan her ikisinde de azalma görülmesi normalde beklenebilir. Deney hayvanlarının anksiyete seviyeleri stereotipik hareketler ile çevreyi keşfetme davranışları ise dikey hareketlerin sayısı ile doğru orantılı olarak değerlendirilebilmektedir (Söztutar, 2013). Bu bilgiler ışığında CIS'in hayvanların anksiyete düzeyini ya da keşfetme davranışlarını etkilemediği söylenebilir, ancak literatürde CIS'in bu iki duruma etkisini gösteren bir çalışma saptayamadık.

Sıçanların fiziksel görünüşleri ve ağırlık değişimleri bulgularımıza bakıldığında CIS'in kanlı diyareye yol açtığını aynı zamanda da hayvanların vücut ağırlığını azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.21). Kanlı diyare, CIS'in gastrointestinal sistemde yol açtığı hasar ile ilişkilendirilebilir (F. Shahid, Farooqui, & Khan, 2018). Kemoterapinin vücut ağırlığı üzerindeki etkisi, uygulanan ajanın türüne ve doza bağlı olarak değişmektedir. Kemoterapötikler ile tedavi edilen sıçanların tedavi süresi boyunca kilo almadığı, aksine çoğu zaman kilo verdiklerini gösterilmiştir (Cavaletti, Fabbrica, Minoia, Frattola, & Tredici, 1998; Weng, Cordella, & Dougherty, 2003). 2-APB'nin haftada bir kez CIS ile verilmesi CIS'in bu etkisini önemli ölçüde azaltmıştır; özellikle 4 mg/kg

dozu kontrole yakın bir ağırlık artışı sağlamıştır. Bu da maddemizin CIS'in yol açtığı sistemik toksisiteyi önemli ölçüde azalttığını gösteren bir kanıttır.

CIS ağırlıklı olarak DRG'lerde bulunan duyuşal sinir gövdelerini etkilemektedir. Bu durum daha çok sinir sisteminin bu bölümünde kan-beyin bariyerinin olmaması ve bu nedenle CIS'in duyuşal sinir gövdesinde daha fazla birikmesinden kaynaklanmaktadır (Bansode VJ, 2014). DRG nöronlarında CIS maruziyetini takiben zamana bağılı bir şekilde yüksek seviyelerde platin-DNA eklentileri biriktiğı ve bu birikmenin sonucunda nöronlarda morfolojik değışiklikler oluşturduğı birçok çalışmada gösterilmiştir (McDonald, Randon, Knight, & Windebank, 2005; Ta, Espeset, Podratz, & Windebank, 2006). DRG'lerde yapılan histolojik incelemelerden elde ettiğimiz bulgular CIS'in nöron gövdelerini küçülttüğünü ve bazı hücrelerin sitoplazma zarlarında silinmelere neden olduğunu göstermektedir. CIS'in CIS-mtDNA (mitokondriyal DNA) eklentileri oluşturarak mtDNA replikasyonunu engellemesi ve mtDNA transkripsiyonunu bozmasının DRG mitokondrilerinde morfolojik değışikliklere neden olduğı düşünölmektedir (Podratz vd., 2011). 2-APB 4 mg/kg grubunda CIS grubuna göre DRG hücre membranı sınırının daha fazla belirgin olduğı ve yapısal toksisiteden daha az zarar gördükleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.22). DRG nöronlarının soma alanlarının ölçümleri sonucunda elde ettiğimiz %frekans histogramı (Şekil 4.23) kontrol grubuna ait DRG'lerin normal dağılımını; CIS uygulanan grupta ise DRG nöronlarının büyük çoğunluğunun küçük boyutlu nöronlara denk gelen aralıkta kümelendiklerini göstermektedir. Bu veri, CIS'in neden olduğı nöropatinin büyük miyelinli aksonlara sahip hücrelerin somatik ve nükleer boyutlarında azalma ile karakterize olmasıyla uyumludur (Ozturk, Erdogan, Anlar, Kosem, & Taspınar, 2005). 2-APB'nin 4 mg/kg dozu somatik büyüklüğün dağılımında orta büyüklükteki nöronların oranını önemli ölçüde değıştirmezken, büyük boyutlu nöronların oranını önemli ölçüde artırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.24). Ancak nöronların fenotiplerinin yorumlanmasında detaylı immünohistokimyasal çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Siyatik sinir dokularında CIS'in yaygın şekilde myelin kılıf ve myelin sinir dejenerasyonuna neden olduğı belirlenmiştir. CIS uygulanan

hayvanlarda, koyulaşmış ve vakuolize aksoplazma ve miyelin sinir dejenerasyonu görüldüğü ve siyatik sinir dokusunun ciddi şekilde etkilendiği birçok çalışmada sunulmuştur (V. Carozzi vd., 2009; Cavaletti vd., 1992). CIS ile birlikte haftada bir kez 2-APB uygulanan hayvanların siyatik sinirlerinde daha az myelin kılıf dejenerasyonu görülmüştür (Şekil 4.25).

Karaciğer dokularının histolojik bulgularına bakıldığında CIS'in ciddi derecede hemoraji ve morfolojik bozulmaya yol açtığı belirlenmiştir (Şekil 4.26 ve 4.27). CIS'in karaciğer dokusuna önemli ölçüde uptake edildiği ve ilacın yüksek dozlarının hepatotoksisiteye neden olduğu bilinmektedir (Cersosimo, 1993). CIS kaynaklı karaciğer hasarının mekanizması hakkında çok az şey bilinmesine rağmen, apoptotik lezyonlar hasarlı karaciğer parankimini karakterize ediyor gibi görünmektedir (Iseri, Ercan, Gedik, Yuksel, & Alican, 2007). 2-APB'nin antioksidan özellikleri ile hepatik hasarda protektif rol oynayabileceği Nicoud ve ark. tarafından gösterilmiştir (Nicoud vd., 2007).

Böbreklerin histopatolojik incelemelerinden elde edilen bulgular ve böbrek hasarı skorlaması CIS'in böbrek dokularında ciddi hasar oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 4.28 ve 4.29). CIS renal hemodinamikleri bozarak vasküler hasara yol açmaktadır ve patogeneğinde inflamasyon, proksimal tübüler, oksidatif stres ve vasküler hasar görülmektedir. Proksimal tübüllerde, ağırlıklı olarak sadece akut tübüler nekroz değil, aynı zamanda apoptoz da vardır (Ozkok & Edelstein, 2014). Araştırmacılar CIS nefrotoksisitesinin doza bağlı ve kümülatif olduğunu göstermişlerdir (Perse & Veceric-Haler, 2018).

NGF ve BDNF sinir sistemindeki gelişimsel süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynayan nöronal büyüme faktörleridir (Tredici vd., 1999). Bu nöronal büyüme faktörleri (nörotrofinler) ile nöronopatiji indükleyen ilk platin türevli ilaç olan CIS'in toksik etkisi arasında bir ilişki olduğu önerilmektedir (Cavaletti vd., 2002). Yapılan çalışmalar, NGF'nin dolaşım seviyesindeki değişikliklerin, CIS'in neden olduğu DRG nöron hasarı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Hayakawa, Itoh, Niwa, Mutoh, & Sobue, 1998; Malgrange, Delree, Rigo, Baron, & Moonen, 1994). Ayrıca NGF ve BDNF uygulanmasının sıçanlarda CIS tarafından indüklenen nörotoksisiteyi önemli ölçüde önlediği

gösterilmiştir (Gabaizadeh, Staecker, Liu, & Van De Water, 1997; Hayakawa vd., 1999). Biyokimyasal değerlendirmelerde ise CIS uygulamasıyla azalan NGF ve BDNF düzeylerini 2-APB'nin artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.30 ve 4.31). NGF'nin DRG nöronları üzerindeki nöroprotektif etkisinin, BDNF gibi diğer nörotrofik faktörlerin ekspresyonunu düzenleyebilmesi olduğu ileri sürülmektedir (Tredici vd., 1999).

CIS uygulamasıyla artan TNF- α , MDA, ve LDH'ı 2-APB'nin 4 mg/kg dozunun anlamlı ölçüde azalttığı; CIS uygulaması ile azalan GSH seviyelerini ise 2-APB'nin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.32, 4.33, 4.34 ve 4.35). Elde ettiğimiz bulgular literatürle uyumludur (Abdelsameea & Kabil, 2018; Akman vd., 2015). İnflamatuvar yolaklar CIS kaynaklı nörotoksisitede rol oynamaktadır. TNF- α , lipid peroksidasyon ve antioksidan kapasite için önemli bir inflamasyon belirteçidir (Gupta vd., 2013). GSH, serbest radikalleri kovucu görevi görmekte ve oksidatif hasara karşı korunmada önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte, serbest oksijen radikallerindeki aşırı artış hücre zarı lipid peroksidasyonunu indükleyerek lipid peroksidasyonunun ürünlerinden biri olan MDA seviyelerinde artışa yol açmaktadır (Parlakpınar vd., 2005). Bu bilgiler ışığında, 2-APB'nin CIS kaynaklı nöropatideki protektif etkisinin TNF- α üretimi ve lipid peroksidasyonunu baskılaması ile olabileceği düşünülmektedir.

Bor, lipid peroksidasyonunu ve DNA hasarını önleme, doku antioksidan savunmalarını güçlendirme ve ağır metallerin genotoksik etkilerini azaltma üzerinde bazı yararlı etkilere sahiptir (Ince, Kucukkurt, Cigerci, Fatih Fidan, & Eryavuz, 2010). Bor, anti-inflamatuvar süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır (J. Cao vd., 2008). Bor bileşiklerinin antioksidan rolü daha önce çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Hunt, 1998; Turkez & Geyikoglu, 2010). 2-APB'nin bor bileşiği olması ve bu nedenle gösterdiği antioksidan özellikler daha önceki bir çalışmada gösterilmiştir (Yazici, Aksit, Korkut, Sunay, & Celik, 2014). Ancak literatürde 2-APB hakkında çok az sayıda çalışma vardır; antioksidan özelliklerinin aydınlatılması için daha fazla sayıda araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda 2-APB'nin farklı dozları çalışılmıştır. Deneylerimizin ilk aşamasında en etkili doz 4 mg/kg bulunmuştur. 2 mg/kg dozda yeterli etki görülmemiştir. 8 mg/kg dozda ise, 4 mg/kg dozda görülen olumlu etkiler azalmıştır. Bu bize maddemizin etkisinin bifazik olabileceğini düşündürmüştür. İlk aşamada etkili bulduğumuz 4 mg/kg dozu sıçanlara haftada bir kez yerine, üç kez vererek etkisini gözlemledik. Fakat haftada üç kez uyguladığımız doz davranış testlerinde ve morfolojik bulgularda beklenen etkileri göstermemiştir. Bu durum ilacımızın dokularda birikme göstererek toksik etkiler oluşturabileceğini veya yarılanma ömrünün uzun olabileceğini düşündürmektedir. Ancak literatürde bu görüşlerimizi destekleyecek, 2-APB'nin farmakokinetik profili ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda, düşük dozlarda antioksidan özellik gösteren ajanların, yüksek dozlarında prooksidan özellikler gösterebileceği belirtilmiştir. Prooksidan veya antioksidan aktivitelerinin büyük ölçüde konsantrasyonlarına bağlı olduğu düşünülmektedir (Bouayed & Bohn, 2010). Bu bağlamda yapılan son çalışmalar, quercetin, epikateşin ve epigallokateşin-3-gallat (EGCG) ve gallik asit gibi antioksidan özellik gösterdiği bilinen birkaç polifenolün prooksidan aktivitesini vurgulamaktadır (Galati & O'Brien, 2004; Watjen vd., 2005).

Çalışmamızda diğer TRPM2 antagonisti FFA'in etkilerini de gözlemledik. Deneylerimizin ikinci aşamasında 2-APB'nin etkin bulunan 4 mg/kg dozu ve FFA haftada 3 kez uygulanarak etkileri birbiriyle ve haftada bir kez uygulanmasının oluşturduğu etkilerle kıyaslanmıştır. Ancak FFA, davranış testlerinde antiallodinik ve antihiperalejik etki; periferik dokularda da sitoprotektif etkiler göstermemiştir. Asidik yapısıyla sıçanlarda CIS'in oluşturduğu gastrointestinal yan etkileri artırmıştır. FFA haftada bir kez uygulanmasının nasıl sonuçlar göstereceği çalışmamızda değerlendirilmemiştir.

Platin bileşiklerinin nöropatik ağrı mekanizmalarının moleküler karmaşıklığı göz önüne alındığında (TRP kanalları, oksidatif stres ve inflamasyon dahil olmak üzere ligand- ve voltaj kapılı iyon kanallarının artan aktivitesi) çeşitli mekanizmaların 2-APB'nin etkisinde rol oynadığı

düşünülebilir. 2-APB, TRP kanalı süper ailesinin üyelerinden CIS ile indüklenen nöropatik ağrı modellerinde özellikle araştırılan TRPM2'yi ve TRPM8'i inhibe edebilir. TRPV1'in CIS nöropatisindeki aracılık etkisi tartışmalıdır (Hori vd., 2010). 2-APB'nin etki mekanizmaları detaylı immünohistokimya testleri ile aydınlatılmalıdır.

Antineoplastik ajanların neden olduğu nöropatide TRP kanal antagonistlerinin antiallodinik ve antihiperaljezik özelliklerini değerlendirmek için yapılan birçok çalışma vardır (Materazzi vd., 2012; Salat & Filipek, 2015). Ancak yaptığımız literatür taramasına göre KIPN araştırmalarında TRPM2 kanalı antagonistleriyle ilgili yapılmış bir çalışma yoktur. Bu açıdan çalışmamız literatüre yeni bir bakış açısı getirecektir.

Sonuç olarak 2-APB'nin, CİSe bağlı gelişen nöropatik ağrının azaltılmasında tek başına veya diğer etkili tedavilerle kombine olarak kullanılabilir potansiyel bir ajan olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamıza genel olarak baktığımızda sonuç olarak, 2-APB'nin 4 mg/kg dozunun, CIS ile indüklenen PN'de mekanik allodini ve soğuk allodiniyi azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca bozulan lokomotor aktivite ve motor koordinasyonda iyileşme sağlamıştır. Periferik dokularda meydana gelen hasarı azaltmış protektif ve antioksidan özellikleriyle CIS kaynaklı PN'de iyileştirici özellikler göstermiştir. CIS'in artırdığı oksidatif parametreleri azaltmış, PN'de protektif etkiler sağlayan ve CIS'in azalmalarına yol açtığı nörotrofinlerin seviyesini artırmıştır. Ancak 2-APB'nin bu etkilerini hangi mekanizma ile gerçekleştirdiği çalışmamızda aydınlatılamamıştır. 2-APB, TRPM2 kanal blokajının yanı sıra farklı TRP kanallarını aktive ya da inhibe edebilmektedir. İmmünohistokimyasal testlerle kanal ekspresyonlarını belirlemek 2-APB'nin mekanizmalarını aydınlatmak açısından çok önemlidir. Çalışmamızda kullandığımız diğer TRPM2 blokörü FFA, haftada üç kez uygulanarak etkisi 2-APB ile kıyaslanmak istemiştir, ancak haftada bir kez uygulama yolu denenmemiştir. Sonraki çalışmalarımızda bu uygulamayı denemek 2-APB'nin etkilerini TRPM2 üzerinden yaptığını göstermek açısından daha değerli olabilir.

Bu kısıtlılıklara karşın çalışmamız literatüre çok önemli katkılarda bulunmuştur. TRP kanallarının büyük çoğunluğunun KİPN ile ilişkisi araştırılmış olmasına rağmen, bildiğimiz kadarıyla KİPN'de TRPM2'nin rolü ile ilgili yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız bu role işaret eden ilk çalışmadır. Aynı zamanda 2-APB'nin nöroprotektif etkilerinin gösterildiği ilk çalışma olma özelliği de taşımaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdelsameea, A. A., & Kabil, S. L. (2018). Mitigation of cisplatin-induced peripheral neuropathy by canagliflozin in rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, *391*(9), 945-952. doi:10.1007/s00210-018-1521-5
- Akman, T., Akman, L., Erbas, O., Terek, M. C., Taskiran, D., & Ozsaran, A. (2015). The preventive effect of oxytocin to Cisplatin-induced neurotoxicity: an experimental rat model. *Biomed Res Int*, *2015*, 167235. doi:10.1155/2015/167235
- Allchorne, A. J., Broom, D. C., & Woolf, C. J. (2005). Detection of cold pain, cold allodynia and cold hyperalgesia in freely behaving rats. *Mol Pain*, *1*, 36. doi:10.1186/1744-8069-1-36
- American Society of Clinical, O. (2014). The state of cancer care in America, 2014: a report by the American Society of Clinical Oncology. *J Oncol Pract*, *10*(2), 119-142. doi:10.1200/JOP.2014.001386
- Argyriou, A. A., Kyritsis, A. P., Makatsoris, T., & Kalofonos, H. P. (2014). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in adults: a comprehensive update of the literature. *Cancer Manag Res*, *6*, 135-147. doi:10.2147/CMAR.S44261
- Avan, A., Postma, T. J., Ceresa, C., Avan, A., Cavaletti, G., Giovannetti, E., & Peters, G. J. (2015). Platinum-induced neurotoxicity and preventive strategies: past, present, and future. *Oncologist*, *20*(4), 411-432. doi:10.1634/theoncologist.2014-0044
- Bai, J. Z., & Lipski, J. (2010). Differential expression of TRPM2 and TRPV4 channels and their potential role in oxidative stress-induced cell death in organotypic hippocampal culture. *Neurotoxicology*, *31*(2), 204-214. doi:10.1016/j.neuro.2010.01.001
- Bal, R., Ustundag, Y., Bulut, F., Demir, C. F., & Bal, A. (2016). Flufenamic acid prevents behavioral manifestations of salicylate-induced tinnitus in the rat. *Arch Med Sci*, *12*(1), 208-215. doi:10.5114/aoms.2016.57597
- Bansode VJ, V. N., Munjal NB, Gore PN, Amrutkar PS, Sontakke SR. (2014). Neuroprotective effect of ethyl pyruvate in vincristine and cisplatin induced neuropathic pain. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, *4*(4).
- Beijers, A. J., Jongen, J. L., & Vreugdenhil, G. (2012). Chemotherapy-induced neurotoxicity: the value of neuroprotective strategies. *Neth J Med*, *70*(1), 18-25. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271810>
- Belrose, J. C., & Jackson, M. F. (2018). TRPM2: a candidate therapeutic target for treating neurological diseases. *Acta Pharmacol Sin*, *39*(5), 722-732. doi:10.1038/aps.2018.31
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*, *11*, 127-152. doi:10.1016/S1387-2656(05)11004-7

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Berta, T., Qadri, Y., Tan, P. H., & Ji, R. R. (2017). Targeting dorsal root ganglia and primary sensory neurons for the treatment of chronic pain. *Expert Opin Ther Targets*, 21(7), 695-703. doi:10.1080/14728222.2017.1328057
- Bilmen, J. G., & Michelangeli, F. (2002). Inhibition of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by 2-aminoethoxydiphenylborate. *Cell Signal*, 14(11), 955-960. doi:10.1016/s0898-6568(02)00042-6
- Bobylev, I., Joshi, A. R., Barham, M., Neiss, W. F., & Lehmann, H. C. (2018). Depletion of Mitofusin-2 Causes Mitochondrial Damage in Cisplatin-Induced Neuropathy. *Mol Neurobiol*, 55(2), 1227-1235. doi:10.1007/s12035-016-0364-7
- Boehmerle, W., Huehnchen, P., Peruzzaro, S., Balkaya, M., & Endres, M. (2014). Electrophysiological, behavioral and histological characterization of paclitaxel, cisplatin, vincristine and bortezomib-induced neuropathy in C57Bl/6 mice. *Sci Rep*, 4, 6370. doi:10.1038/srep06370
- Bootman, M. D., Collins, T. J., Mackenzie, L., Roderick, H. L., Berridge, M. J., & Peppiatt, C. M. (2002). 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. *FASEB J*, 16(10), 1145-1150. doi:10.1096/fj.02-0037rev
- Bordet, T., Buisson, B., Michaud, M., Abitbol, J. L., Marchand, F., Grist, J., . . . Pruss, R. M. (2008). Specific antinociceptive activity of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622) in experimental models of painful diabetic and chemotherapy-induced neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther*, 326(2), 623-632. doi:10.1124/jpet.108.139410
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev*, 3(4), 228-237. doi:10.4161/oxim.3.4.12858
- Boyette-Davis, J. A., Walters, E. T., & Dougherty, P. M. (2015). Mechanisms involved in the development of chemotherapy-induced neuropathy. *Pain Manag*, 5(4), 285-296. doi:10.2217/pmt.15.19
- Bruna, J., Alberti, P., Calls-Cobos, A., Caillaud, M., Damaj, M. I., & Navarro, X. (2019). Methods for in vivo studies in rodents of chemotherapy induced peripheral neuropathy. *Exp Neurol*, 113154. doi:10.1016/j.expneurol.2019.113154
- Cao, J., Jiang, L., Zhang, X., Yao, X., Geng, C., Xue, X., & Zhong, L. (2008). Boric acid inhibits LPS-induced TNF- α formation through a thiol-dependent mechanism in THP-1 cells. *J Trace Elem Med Biol*, 22(3), 189-195. doi:10.1016/j.jtemb.2008.03.005

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Cao, Y. Q., Mantyh, P. W., Carlson, E. J., Gillespie, A. M., Epstein, C. J., & Basbaum, A. I. (1998). Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature*, *392*(6674), 390-394. doi:10.1038/32897
- Carozzi, V., Chiorazzi, A., Canta, A., Oggioni, N., Gilardini, A., Rodriguez-Menendez, V., . . . Cavaletti, G. (2009). Effect of the chronic combined administration of cisplatin and paclitaxel in a rat model of peripheral neurotoxicity. *Eur J Cancer*, *45*(4), 656-665. doi:10.1016/j.ejca.2008.10.038
- Carozzi, V. A., Canta, A., & Chiorazzi, A. (2015). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? *Neurosci Lett*, *596*, 90-107. doi:10.1016/j.neulet.2014.10.014
- Cascinu, S., Catalano, V., Cordella, L., Labianca, R., Giordani, P., Baldelli, A. M., . . . Catalano, G. (2002). Neuroprotective effect of reduced glutathione on oxaliplatin-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*, *20*(16), 3478-3483. doi:10.1200/JCO.2002.07.061
- Cascinu, S., Cordella, L., Del Ferro, E., Fronzoni, M., & Catalano, G. (1995). Neuroprotective effect of reduced glutathione on cisplatin-based chemotherapy in advanced gastric cancer: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*, *13*(1), 26-32. doi:10.1200/JCO.1995.13.1.26
- Cataldo, G., Erb, S. J., Lunzer, M. M., Luong, N., Akgun, E., Portoghese, P. S., . . . Simone, D. A. (2019). The bivalent ligand MCC22 potently attenuates hyperalgesia in a mouse model of cisplatin-evoked neuropathic pain without tolerance or reward. *Neuropharmacology*, 107598. doi:10.1016/j.neuropharm.2019.04.004
- Cavaletti, G., Alberti, P., Argyriou, A. A., Lustberg, M., Staff, N. P., Tamburin, S., & Toxic Neuropathy Consortium of the Peripheral Nerve, S. (2019). Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: A multifaceted, still unsolved issue. *J Peripher Nerv Syst*, *24 Suppl 2*, S6-S12. doi:10.1111/jns.12337
- Cavaletti, G., Fabbrica, D., Minoia, C., Frattola, L., & Tredici, G. (1998). Carboplatin toxic effects on the peripheral nervous system of the rat. *Ann Oncol*, *9*(4), 443-447. doi:10.1023/a:1008231925889
- Cavaletti, G., Pezzoni, G., Pisano, C., Oggioni, N., Sala, F., Zoia, C., . . . Tredici, G. (2002). Cisplatin-induced peripheral neurotoxicity in rats reduces the circulating levels of nerve growth factor. *Neurosci Lett*, *322*(2), 103-106. doi:10.1016/s0304-3940(02)00091-5

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Cavaletti, G., Tredici, G., Marmioli, P., Petruccioli, M. G., Barajon, I., & Fabbrica, D. (1992). Morphometric study of the sensory neuron and peripheral nerve changes induced by chronic cisplatin (DDP) administration in rats. *Acta Neuropathol*, *84*(4), 364-371. doi:10.1007/bf00227662
- Cemil Özgül, M. N. (2010). Nörolojik hücrelerde TRPM2 katyon kanallarının moleküler mekanizmalardaki rolleri. *J. Exp. Clin. Med*, *27*, 144-151.
- Cersosimo, R. J. (1993). Hepatotoxicity associated with cisplatin chemotherapy. *Ann Pharmacother*, *27*(4), 438-441. doi:10.1177/106002809302700408
- Chao, P. K., Chang, H. F., Chang, W. T., Yeh, T. K., Ou, L. C., Chuang, J. Y., . . . Yeh, S. H. (2019). BPR1M97, a dual mu opioid receptor/nociceptin-orphanin FQ peptide receptor agonist, produces potent antinociceptive effects with safer properties than morphine. *Neuropharmacology*, 107678. doi:10.1016/j.neuropharm.2019.107678
- Chen, G. L., Zeng, B., Eastmond, S., Elsenussi, S. E., Boa, A. N., & Xu, S. Z. (2012). Pharmacological comparison of novel synthetic fenamate analogues with econazole and 2-APB on the inhibition of TRPM2 channels. *Br J Pharmacol*, *167*(6), 1232-1243. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02058.x
- Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, *426*(6966), 517-524. doi:10.1038/nature02196
- Clapham, D. E., Runnels, L. W., & Strubing, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*, *2*(6), 387-396. doi:10.1038/35077544
- Demirdas, A., Naziroglu, M., & Ovey, I. S. (2017). Short-Term Ketamine Treatment Decreases Oxidative Stress Without Influencing TRPM2 and TRPV1 Channel Gating in the Hippocampus and Dorsal Root Ganglion of Rats. *Cell Mol Neurobiol*, *37*(1), 133-144. doi:10.1007/s10571-016-0353-4
- Deng, L., Guindon, J., Vemuri, V. K., Thakur, G. A., White, F. A., Makriyannis, A., & Hohmann, A. G. (2012). The maintenance of cisplatin- and paclitaxel-induced mechanical and cold allodynia is suppressed by cannabinoid CB(2) receptor activation and independent of CXCR4 signaling in models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Mol Pain*, *8*, 71. doi:10.1186/1744-8069-8-71
- Di Cesare Mannelli, L., Pacini, A., Micheli, L., Tani, A., Zanardelli, M., & Ghelardini, C. (2014). Glial role in oxaliplatin-induced neuropathic pain. *Exp Neurol*, *261*, 22-33. doi:10.1016/j.expneurol.2014.06.016
- Ding, M., Weng, C., Fan, S., Cao, Q., & Lu, Z. (2017). Purkinje Cell Degeneration and Motor Coordination Deficits in a New Mouse Model of Autosomal Recessive Spastic Ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Front Mol Neurosci*, *10*, 121. doi:10.3389/fnmol.2017.00121

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Dobrydneva, Y., & Blackmore, P. (2001). 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly inhibits store-operated calcium entry channels in human platelets. *Mol Pharmacol*, 60(3), 541-552. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11502886>
- Donertas, B., Cengelli Unel, C., Aydin, S., Ulupinar, E., Ozatik, O., Kaygisiz, B., . . . Erol, K. (2018). Agmatine co-treatment attenuates allodynia and structural abnormalities in cisplatin-induced neuropathy in rats. *Fundam Clin Pharmacol*, 32(3), 288-296. doi:10.1111/fcp.12351
- Duncan, L. M., Deeds, J., Hunter, J., Shao, J., Holmgren, L. M., Woolf, E. A., . . . Shyjan, A. W. (1998). Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res*, 58(7), 1515-1520. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9537257>
- Durham, P. L. (2006). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and migraine. *Headache*, 46 Suppl 1, S3-8. doi:10.1111/j.1526-4610.2006.00483.x
- Dyson, P. J., & Sava, G. (2006). Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. *Dalton Trans*(16), 1929-1933. doi:10.1039/b601840h
- Fleig, A., & Penner, R. (2004). The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol Sci*, 25(12), 633-639. doi:10.1016/j.tips.2004.10.004
- Fonfria, E., Murdock, P. R., Cusdin, F. S., Benham, C. D., Kellsell, R. E., & McNulty, S. (2006). Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res*, 26(3), 159-178. doi:10.1080/10799890600637506
- Freestone, P. S., Chung, K. K., Guatteo, E., Mercuri, N. B., Nicholson, L. F., & Lipski, J. (2009). Acute action of rotenone on nigral dopaminergic neurons--involvement of reactive oxygen species and disruption of Ca²⁺ homeostasis. *Eur J Neurosci*, 30(10), 1849-1859. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06990.x
- Furgala, A., Salat, R., & Salat, K. (2018). Acute cold allodynia induced by oxaliplatin is attenuated by amitriptyline. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 78(4), 315-321. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30624430>
- Gabaizadeh, R., Staecker, H., Liu, W., & Van De Water, T. R. (1997). BDNF protection of auditory neurons from cisplatin involves changes in intracellular levels of both reactive oxygen species and glutathione. *Brain Res Mol Brain Res*, 50(1-2), 71-78. doi:10.1016/s0169-328x(97)00173-3
- Galati, G., & O'Brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med*, 37(3), 287-303. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Gao, L., Yang, P., Qin, P., Lu, Y., Li, X., Tian, Q., . . . Yao, J. (2016). Selective potentiation of 2-APB-induced activation of TRPV1-3 channels by acid. *Sci Rep*, 6, 20791. doi:10.1038/srep20791
- Gupta, S., Gambhir, J. K., Kalra, O., Gautam, A., Shukla, K., Mehndiratta, M., . . . Shukla, R. (2013). Association of biomarkers of inflammation and oxidative stress with the risk of chronic kidney disease in Type 2 diabetes mellitus in North Indian population. *J Diabetes Complications*, 27(6), 548-552. doi:10.1016/j.jdiacomp.2013.07.005
- Han, F. Y., Wyse, B. D., & Smith, M. T. (2014). Optimization and pharmacological characterization of a refined cisplatin-induced rat model of peripheral neuropathic pain. *Behav Pharmacol*, 25(8), 732-740. doi:10.1097/FBP.0000000000000090
- Hantute-Ghesquier, A., Haustrate, A., Prevarskaya, N., & Lehen'kyi, V. (2018). TRPM Family Channels in Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*, 11(2). doi:10.3390/ph11020058
- Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., . . . Mori, Y. (2002). LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell*, 9(1), 163-173. doi:10.1016/s1097-2765(01)00438-5
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., & Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 32(1), 77-88. doi:10.1016/0304-3959(88)90026-7
- Hayakawa, K., Itoh, T., Niwa, H., Mutoh, T., & Sobue, G. (1998). NGF prevention of neurotoxicity induced by cisplatin, vincristine and taxol depends on toxicity of each drug and NGF treatment schedule: in vitro study of adult rat sympathetic ganglion explants. *Brain Res*, 794(2), 313-319. doi:10.1016/s0006-8993(98)00305-9
- Hayakawa, K., Itoh, T., Niwa, H., Yamamoto, M., Liang, Y., Doyu, M., & Sobue, G. (1999). Nerve growth factor prevention of aged-rat sympathetic neuron injury by cisplatin, vincristine and taxol--in vitro explant study. *Neurosci Lett*, 274(2), 103-106. doi:10.1016/s0304-3940(99)00689-8
- Hazman, O., Bozkurt, M. F., Fidan, A. F., Uysal, F. E., & Celik, S. (2018). The Effect of Boric Acid and Borax on Oxidative Stress, Inflammation, ER Stress and Apoptosis in Cisplatin Toxication and Nephrotoxicity Developing as a Result of Toxication. *Inflammation*, 41(3), 1032-1048. doi:10.1007/s10753-018-0756-0
- Hecquet, C. M., & Malik, A. B. (2009). Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thromb Haemost*, 101(4), 619-625. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19350103>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Hofer, A., Kovacs, G., Zappatini, A., Leuenberger, M., Hediger, M. A., & Lochner, M. (2013). Design, synthesis and pharmacological characterization of analogs of 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB), a known store-operated calcium channel blocker, for inhibition of TRPV6-mediated calcium transport. *Bioorg Med Chem*, *21*(11), 3202-3213. doi:10.1016/j.bmc.2013.03.037
- Hori, K., Ozaki, N., Suzuki, S., & Sugiura, Y. (2010). Upregulations of P2X(3) and ASIC3 involve in hyperalgesia induced by cisplatin administration in rats. *Pain*, *149*(2), 393-405. doi:10.1016/j.pain.2010.03.005
- Hu, L. Y., Zhou, Y., Cui, W. Q., Hu, X. M., Du, L. X., Mi, W. L., . . . Mao-Ying, Q. L. (2018). Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) dependent microglial activation promotes cisplatin-induced peripheral neuropathy in mice. *Brain Behav Immun*, *68*, 132-145. doi:10.1016/j.bbi.2017.10.011
- Huang, Y., Fliegert, R., Guse, A. H., Lu, W., & Du, J. (2020). A structural overview of the ion channels of the TRPM family. *Cell Calcium*, *85*, 102111. doi:10.1016/j.ceca.2019.102111
- Hung, C. Y., & Tan, C. H. (2018). TRP Channels in Nociception and Pathological Pain. *Adv Exp Med Biol*, *1099*, 13-27. doi:10.1007/978-981-13-1756-9_2
- Hunt, C. D. (1998). Regulation of enzymatic activity: one possible role of dietary boron in higher animals and humans. *Biol Trace Elem Res*, *66*(1-3), 205-225. doi:10.1007/BF02783139
- Imai, S., Koyanagi, M., Azimi, Z., Nakazato, Y., Matsumoto, M., Ogihara, T., . . . Matsubara, K. (2017). Taxanes and platinum derivatives impair Schwann cells via distinct mechanisms. *Sci Rep*, *7*(1), 5947. doi:10.1038/s41598-017-05784-1
- Ince, S., Kucukkurt, I., Cigerci, I. H., Fatih Fidan, A., & Eryavuz, A. (2010). The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *J Trace Elem Med Biol*, *24*(3), 161-164. doi:10.1016/j.jtemb.2010.01.003
- Iseri, S., Ercan, F., Gedik, N., Yuksel, M., & Alican, I. (2007). Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. *Toxicology*, *230*(2-3), 256-264. doi:10.1016/j.tox.2006.11.073
- Jaggi, A. S., & Singh, N. (2012). Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. *Toxicology*, *291*(1-3), 1-9. doi:10.1016/j.tox.2011.10.019
- Jamieson, S. M., Liu, J., Connor, B., & McKeage, M. J. (2005). Oxaliplatin causes selective atrophy of a subpopulation of dorsal root ganglion neurons without inducing cell loss. *Cancer Chemother Pharmacol*, *56*(4), 391-399. doi:10.1007/s00280-004-0953-4

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Janes, K., Wahlman, C., Little, J. W., Doyle, T., Tosh, D. K., Jacobson, K. A., & Salvemini, D. (2015). Spinal neuroimmune activation is independent of T-cell infiltration and attenuated by A3 adenosine receptor agonists in a model of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Brain Behav Immun*, *44*, 91-99. doi:10.1016/j.bbi.2014.08.010
- Jasmin, L., Kohan, L., Franssen, M., Janni, G., & Goff, J. R. (1998). The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. *Pain*, *75*(2-3), 367-382. doi:10.1016/s0304-3959(98)00017-7
- Jemal, A., Center, M. M., DeSantis, C., & Ward, E. M. (2010). Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *19*(8), 1893-1907. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0437
- Julius, D. (2013). TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *29*, 355-384. doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155833
- Kanat, O., Ertas, H., & Caner, B. (2017). Platinum-induced neurotoxicity: A review of possible mechanisms. *World J Clin Oncol*, *8*(4), 329-335. doi:10.5306/wjco.v8.i4.329
- Kanzawa-Lee, G. A., Knoerl, R., Donohoe, C., Bridges, C. M., & Smith, E. M. L. (2019). Mechanisms, Predictors, and Challenges in Assessing and Managing Painful Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Semin Oncol Nurs*, *35*(3), 253-260. doi:10.1016/j.soncn.2019.04.006
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, *7*(8), 573-584. doi:10.1038/nrc2167
- Kovacs, G., Montalbetti, N., Simonin, A., Danko, T., Balazs, B., Zsembery, A., & Hediger, M. A. (2012). Inhibition of the human epithelial calcium channel TRPV6 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Cell Calcium*, *52*(6), 468-480. doi:10.1016/j.ceca.2012.08.005
- Kraft, R., Grimm, C., Grosse, K., Hoffmann, A., Sauerbruch, S., Kettenmann, H., . . . Harteneck, C. (2004). Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol*, *286*(1), C129-137. doi:10.1152/ajpcell.00331.2003
- Leo, M., Schmitt, L. I., Erkel, M., Melnikova, M., Thomale, J., & Hagenacker, T. (2017). Cisplatin-induced neuropathic pain is mediated by upregulation of N-type voltage-gated calcium channels in dorsal root ganglion neurons. *Exp Neurol*, *288*, 62-74. doi:10.1016/j.expneurol.2016.11.003
- Li, N., Li, C., Han, R., Wang, Y., Yang, M., Wang, H., & Tian, J. (2019). LPM580098, a Novel Triple Reuptake Inhibitor of Serotonin, Noradrenaline, and Dopamine, Attenuates Neuropathic Pain. *Front Pharmacol*, *10*, 53. doi:10.3389/fphar.2019.00053

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Li, Y., Zheng, M., Sah, S. K., Mishra, A., & Singh, Y. (2019). Neuroprotective influence of sitagliptin against cisplatin-induced neurotoxicity, biochemical and behavioral alterations in Wistar rats. *Mol Cell Biochem*, 455(1-2), 91-97. doi:10.1007/s11010-018-3472-z
- Lin, H., Heo, B. H., & Yoon, M. H. (2015). A New Rat Model of Cisplatin-induced Neuropathic Pain. *Korean J Pain*, 28(4), 236-243. doi:10.3344/kjp.2015.28.4.236
- Lo Monaco, M., Milone, M., Batocchi, A. P., Padua, L., Restuccia, D., & Tonali, P. (1992). Cisplatin neuropathy: clinical course and neurophysiological findings. *J Neurol*, 239(4), 199-204. doi:10.1007/bf00839140
- Malgrange, B., Delree, P., Rigo, J. M., Baron, H., & Moonen, G. (1994). Image analysis of neuritic regeneration by adult rat dorsal root ganglion neurons in culture: quantification of the neurotoxicity of anticancer agents and of its prevention by nerve growth factor or basic fibroblast growth factor but not brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-3. *J Neurosci Methods*, 53(1), 111-122. doi:10.1016/0165-0270(94)90151-1
- Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T., & Mikoshiba, K. (1997). 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem*, 122(3), 498-505. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021780
- Marwaha, L., Bansal, Y., Singh, R., Saroj, P., Bhandari, R., & Kuhad, A. (2016). TRP channels: potential drug target for neuropathic pain. *Inflammopharmacology*, 24(6), 305-317. doi:10.1007/s10787-016-0288-x
- Materazzi, S., Fusi, C., Benemei, S., Pedretti, P., Patacchini, R., Nilius, B., . . . Nassini, R. (2012). TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. *Pflugers Arch*, 463(4), 561-569. doi:10.1007/s00424-011-1071-x
- McDonald, E. S., Randon, K. R., Knight, A., & Windebank, A. J. (2005). Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: a potential mechanism for neurotoxicity. *Neurobiol Dis*, 18(2), 305-313. doi:10.1016/j.nbd.2004.09.013
- McWhinney, S. R., Goldberg, R. M., & McLeod, H. L. (2009). Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Mol Cancer Ther*, 8(1), 10-16. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0840
- Miltenburg, N. C., & Booger, W. (2014). Chemotherapy-induced neuropathy: A comprehensive survey. *Cancer Treat Rev*, 40(7), 872-882. doi:10.1016/j.ctrv.2014.04.004
- Miyanohara, J., Kakae, M., Nagayasu, K., Nakagawa, T., Mori, Y., Arai, K., . . . Kaneko, S. (2018). TRPM2 Channel Aggravates CNS Inflammation and Cognitive Impairment via Activation of Microglia in Chronic Cerebral Hypoperfusion. *J Neurosci*, 38(14), 3520-3533. doi:10.1523/JNEUROSCI.2451-17.2018

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Montell, C., & Rubin, G. M. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2(4), 1313-1323. doi:10.1016/0896-6273(89)90069-x
- Morihara, H., Obana, M., Tanaka, S., Kawakatsu, I., Tsuchiyama, D., Mori, S., . . . Nakayama, H. (2017). 2-aminoethoxydiphenyl borate provides an anti-oxidative effect and mediates cardioprotection during ischemia reperfusion in mice. *PLoS One*, 12(12), e0189948. doi:10.1371/journal.pone.0189948
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- N, S. V., Mohamad, A., & Razdan, R. (2019). Allantoin attenuates deficits of behavioural and motor nerve conduction in an animal model of cisplatin-induced neurotoxicity in rats. *Animal Model Exp Med*, 2(2), 114-120. doi:10.1002/ame2.12070
- Nassini, R., Gees, M., Harrison, S., De Siena, G., Materazzi, S., Moretto, N., . . . Geppetti, P. (2011). Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *Pain*, 152(7), 1621-1631. doi:10.1016/j.pain.2011.02.051
- Naziroglu, M. (2011). TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochem Res*, 36(3), 355-366. doi:10.1007/s11064-010-0347-4
- Naziroglu, M., & Braidy, N. (2017). Thermo-Sensitive TRP Channels: Novel Targets for Treating Chemotherapy-Induced Peripheral Pain. *Front Physiol*, 8, 1040. doi:10.3389/fphys.2017.01040
- Naziroglu, M., Ozgul, C., Celik, O., Cig, B., & Sozbir, E. (2011). Aminoethoxydiphenyl borate and flufenamic acid inhibit Ca²⁺ influx through TRPM2 channels in rat dorsal root ganglion neurons activated by ADP-ribose and rotenone. *J Membr Biol*, 241(2), 69-75. doi:10.1007/s00232-011-9363-9
- Nicoud, I. B., Knox, C. D., Jones, C. M., Anderson, C. D., Pierce, J. M., Belous, A. E., . . . Chari, R. S. (2007). 2-APB protects against liver ischemia-reperfusion injury by reducing cellular and mitochondrial calcium uptake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293(3), G623-630. doi:10.1152/ajpgi.00521.2006
- Nilius, B., & Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol*, 12(3), 218. doi:10.1186/gb-2011-12-3-218
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., & Peters, J. A. (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev*, 87(1), 165-217. doi:10.1152/physrev.00021.2006

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Nilius, B., Voets, T., & Peters, J. (2005). TRP channels in disease. *Sci STKE*, 2005(295), re8. doi:10.1126/stke.2952005re8
- Nishitani, A., Yoshihara, T., Tanaka, M., Kuwamura, M., Asano, M., Tsubota, Y., & Kuramoto, T. (2019). Muscle weakness and impaired motor coordination in Hcn1-deficient rats. *Exp Anim*. doi:10.1538/expanim.19-0067
- Oh, G. S., Kim, H. J., Choi, J. H., Shen, A., Choe, S. K., Karna, A., . . . So, H. S. (2014). Pharmacological activation of NQO1 increases NAD(+) levels and attenuates cisplatin-mediated acute kidney injury in mice. *Kidney Int*, 85(3), 547-560. doi:10.1038/ki.2013.330
- Olah, M. E., Jackson, M. F., Li, H., Perez, Y., Sun, H. S., Kiyonaka, S., . . . MacDonald, J. F. (2009). Ca²⁺-dependent induction of TRPM2 currents in hippocampal neurons. *J Physiol*, 587(Pt 5), 965-979. doi:10.1113/jphysiol.2008.162289
- Onal, A., Coskunsever, D., Celenk, F. G., Senturk, R. S., Nalbant, S., & Ulker Goksel, S. (2017). Effect of Ceftiofur on Hyperalgesia and Allodynia in a Rat Neuropathic Pain Model: The Role of Immune Processes. *Neuroimmunomodulation*, 24(1), 21-28. doi:10.1159/000475757
- Orhan, B., Yalcin, S., Nurlu, G., Zeybek, D., & Muftuoglu, S. (2004). Erythropoietin against cisplatin-induced peripheral neurotoxicity in rats. *Med Oncol*, 21(2), 197-203. doi:10.1385/MO:21:2:197
- Otsuka, R., Iwasa, S., Yanai, T., Hirano, H., Shoji, H., Honma, Y., . . . Yamaguchi, M. (2019). Impact of peripheral neuropathy induced by platinum in first-line chemotherapy on second-line chemotherapy with paclitaxel for advanced gastric cancer. *Int J Clin Oncol*. doi:10.1007/s10147-019-01598-5
- Ozkok, A., & Edelstein, C. L. (2014). Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *Biomed Res Int*, 2014, 967826. doi:10.1155/2014/967826
- Ozturk, G., Erdogan, E., Anlar, O., Kosem, M., & Taspinar, M. (2005). Effect of leukemia inhibitory factor in experimental cisplatin neuropathy in mice. *Cytokine*, 29(1), 31-41. doi:10.1016/j.cyto.2004.09.006
- Özatic O, K. A., Dağ İ, Köse AA, Musmul A, Şengel T. . (2016). The Effect of Decompression on the Treatment of Chronic Constriction Injury in Peripheral Nerve. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*(22 (4)), 597-604. doi:10.9775/kvfd.2016.15126
- Pace, A., Savarese, A., Picardo, M., Maresca, V., Pacetti, U., Del Monte, G., . . . Bove, L. (2003). Neuroprotective effect of vitamin E supplementation in patients treated with cisplatin chemotherapy. *J Clin Oncol*, 21(5), 927-931. doi:10.1200/JCO.2003.05.139

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Pak, W. L., Grossfield, J., & Arnold, K. S. (1970). Mutants of the visual pathway of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 227(5257), 518-520. doi:10.1038/227518b0
- Park, S. B., Goldstein, D., Krishnan, A. V., Lin, C. S., Friedlander, M. L., Cassidy, J., . . . Kiernan, M. C. (2013). Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: a critical analysis. *CA Cancer J Clin*, 63(6), 419-437. doi:10.3322/caac.21204
- Park, S. B., Krishnan, A. V., Lin, C. S., Goldstein, D., Friedlander, M., & Kiernan, M. C. (2008). Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies. *Curr Med Chem*, 15(29), 3081-3094. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19075655>
- Parlakpınar, H., Tasdemir, S., Polat, A., Bay-Karabulut, A., Vardi, N., Ucar, M., & Acet, A. (2005). Protective role of caffeic acid phenethyl ester (cape) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Toxicology*, 207(2), 169-177. doi:10.1016/j.tox.2004.08.024
- Pedersen, S. F., Owsianik, G., & Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium*, 38(3-4), 233-252. doi:10.1016/j.ceca.2005.06.028
- Perse, M., & Veceric-Haler, Z. (2018). Cisplatin-Induced Rodent Model of Kidney Injury: Characteristics and Challenges. *Biomed Res Int*, 2018, 1462802. doi:10.1155/2018/1462802
- Pisano, C., Pratesi, G., Laccabue, D., Zunino, F., Lo Giudice, P., Bellucci, A., . . . Cavaletti, G. (2003). Paclitaxel and Cisplatin-induced neurotoxicity: a protective role of acetyl-L-carnitine. *Clin Cancer Res*, 9(15), 5756-5767. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14654561>
- Planting, A. S., Catimel, G., de Mulder, P. H., de Graeff, A., Hoppener, F., Verweij, J., . . . Vermorcken, J. B. (1999). Randomized study of a short course of weekly cisplatin with or without amifostine in advanced head and neck cancer. EORTC Head and Neck Cooperative Group. *Ann Oncol*, 10(6), 693-700. doi:10.1023/a:1008353505916
- Podratz, J. L., Knight, A. M., Ta, L. E., Staff, N. P., Gass, J. M., Genelin, K., . . . Windebank, A. J. (2011). Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. *Neurobiol Dis*, 41(3), 661-668. doi:10.1016/j.nbd.2010.11.017
- Poletini, M. O., Moraes, M. N., Ramos, B. C., Jeronimo, R., & Castrucci, A. M. (2015). TRP channels: a missing bond in the entrainment mechanism of peripheral clocks throughout evolution. *Temperature (Austin)*, 2(4), 522-534. doi:10.1080/23328940.2015.1115803
- Prakriya, M., & Lewis, R. S. (2001). Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors. *J Physiol*, 536(Pt 1), 3-19. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00003.x

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Rosenberg, B., Vancamp, L., & Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*, 205, 698-699. doi:10.1038/205698a0
- Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J. E., & Mansour, V. H. (1969). Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, 222(5191), 385-386. doi:10.1038/222385a0
- Salat, K., & Filipek, B. (2015). Antinociceptive activity of transient receptor potential channel TRPV1, TRPA1, and TRPM8 antagonists in neurogenic and neuropathic pain models in mice. *J Zhejiang Univ Sci B*, 16(3), 167-178. doi:10.1631/jzus.B1400189
- Salih, N. A., & Al-Baggou, B. K. (2019). Effect of memantine hydrochloride on cisplatin-induced neurobehavioral toxicity in mice. *Acta Neurol Belg*. doi:10.1007/s13760-019-01161-z
- Samanta, A., Hughes, T. E. T., & Moiseenkova-Bell, V. Y. (2018). Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell Biochem*, 87, 141-165. doi:10.1007/978-981-10-7757-9_6
- Saygın, M., & Nazıroğlu, M. (2010). TRPM2 Katyon kanallarının aktivasyonunda rol oynayan moleküler mekanizmalardaki son gelişmeler. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 27 (2010), 42-45.
- Saygın, M., & Nazıroğlu, M. (2012). Kalpteki moleküler Ca²⁺ sinyali üzerinde TRPM katyon kanallarının rolü. *J. Exp. Clin. Med.*, 29, 83-90.
- Seto, Y., Takase, M., Tsuji, Y., & To, H. (2017). Pregabalin reduces cisplatin-induced mechanical allodynia in rats. *J Pharmacol Sci*, 134(3), 175-180. doi:10.1016/j.jphs.2017.06.003
- Shahid, F., Farooqui, Z., & Khan, F. (2018). Cisplatin-induced gastrointestinal toxicity: An update on possible mechanisms and on available gastroprotective strategies. *Eur J Pharmacol*, 827, 49-57. doi:10.1016/j.ejphar.2018.03.009
- Shahid, M., Subhan, F., Ahmad, N., & Sewell, R. D. E. (2017). The flavonoid 6-methoxyflavone allays cisplatin-induced neuropathic allodynia and hypoalgesia. *Biomed Pharmacother*, 95, 1725-1733. doi:10.1016/j.biopha.2017.09.108
- Shahid, M., Subhan, F., Ahmad, N., & Sewell, R. D. E. (2019). Efficacy of a topical gabapentin gel in a cisplatin paradigm of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *BMC Pharmacol Toxicol*, 20(1), 51. doi:10.1186/s40360-019-0329-3
- So, K., Haraguchi, K., Asakura, K., Isami, K., Sakimoto, S., Shirakawa, H., . . . Kaneko, S. (2015). Involvement of TRPM2 in a wide range of inflammatory and neuropathic pain mouse models. *J Pharmacol Sci*, 127(3), 237-243. doi:10.1016/j.jphs.2014.10.003

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Söztutar, E. (2013). *Pre- ve postnatal dönemde strese maruz kalan yüksek veya düşük anksiyeteli sıçanlarda, prefrontal korteksteki nöronların morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması*. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir.
- Starobova, H., Mueller, A., Deuis, J. R., Carter, D. A., & Vetter, I. (2019). Inflammatory and Neuropathic Gene Expression Signatures of Chemotherapy-Induced Neuropathy Induced by Vincristine, Cisplatin, and Oxaliplatin in C57BL/6J Mice. *J Pain*. doi:10.1016/j.jpain.2019.06.008
- Starobova, H., & Vetter, I. (2017). Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Front Mol Neurosci*, 10, 174. doi:10.3389/fnmol.2017.00174
- Strumberg, D., Brugge, S., Korn, M. W., Koeppen, S., Ranft, J., Scheiber, G., . . . Scheulen, M. E. (2002). Evaluation of long-term toxicity in patients after cisplatin-based chemotherapy for non-seminomatous testicular cancer. *Ann Oncol*, 13(2), 229-236. doi:10.1093/annonc/mdf058
- Ta, L. E., Bieber, A. J., Carlton, S. M., Loprinzi, C. L., Low, P. A., & Windebank, A. J. (2010). Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. *Mol Pain*, 6, 15. doi:10.1186/1744-8069-6-15
- Ta, L. E., Espeset, L., Podratz, J., & Windebank, A. J. (2006). Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding. *Neurotoxicology*, 27(6), 992-1002. doi:10.1016/j.neuro.2006.04.010
- Ta, L. E., Low, P. A., & Windebank, A. J. (2009). Mice with cisplatin and oxaliplatin-induced painful neuropathy develop distinct early responses to thermal stimuli. *Mol Pain*, 5, 9. doi:10.1186/1744-8069-5-9
- Taskin, M. I., Hismiogullari, A. A., Yay, A., Adali, E., Gungor, A. C., Korkmaz, G. O., & Inceboz, U. (2014). Effect of 2-aminoethoxydiphenyl borate on ischemia-reperfusion injury in a rat ovary model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 178, 74-79. doi:10.1016/j.ejogrb.2014.03.049
- Togashi, K., Inada, H., & Tominaga, M. (2008). Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Br J Pharmacol*, 153(6), 1324-1330. doi:10.1038/sj.bjp.0707675
- Tomaszewski, A., & Busselberg, D. (2007). Cisplatin modulates voltage gated channel currents of dorsal root ganglion neurons of rats. *Neurotoxicology*, 28(1), 49-58. doi:10.1016/j.neuro.2006.07.005
- Tredici, G., Braga, M., Nicolini, G., Miloso, M., Marmioli, P., Schenone, A., . . . Cavaletti, G. (1999). Effect of recombinant human nerve growth factor on cisplatin neurotoxicity in rats. *Exp Neurol*, 159(2), 551-558. doi:10.1006/exnr.1999.7174

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Turan Yucel, N., Can, O. D., & Demir Ozkay, U. (2020). Catecholaminergic and opioidergic system mediated effects of reboxetine on diabetic neuropathic pain. *Psychopharmacology (Berl)*. doi:10.1007/s00213-019-05443-5
- Turkez, H., & Geyikoglu, F. (2010). Boric acid: a potential chemoprotective agent against aflatoxin b(1) toxicity in human blood. *Cytotechnology*, *62*(2), 157-165. doi:10.1007/s10616-010-9272-2
- Tyrtysnaia, A. A., Manzhulo, I. V., Sultanov, R. M., & Ermolenko, E. V. (2017). Adult hippocampal neurogenesis in neuropathic pain and alkyl glycerol ethers treatment. *Acta Histochem*, *119*(8), 812-821. doi:10.1016/j.acthis.2017.10.007
- Uemura, T., Kudoh, J., Noda, S., Kanba, S., & Shimizu, N. (2005). Characterization of human and mouse TRPM2 genes: identification of a novel N-terminal truncated protein specifically expressed in human striatum. *Biochem Biophys Res Commun*, *328*(4), 1232-1243. doi:10.1016/j.bbrc.2005.01.086
- Uhelski, M. L., Khasabova, I. A., & Simone, D. A. (2015). Inhibition of anandamide hydrolysis attenuates nociceptor sensitization in a murine model of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J Neurophysiol*, *113*(5), 1501-1510. doi:10.1152/jn.00692.2014
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, *12*(10), 1161-1208. doi:10.2174/0929867053764635
- Vandewauw, I., Owsianik, G., & Voets, T. (2013). Systematic and quantitative mRNA expression analysis of TRP channel genes at the single trigeminal and dorsal root ganglion level in mouse. *BMC Neurosci*, *14*, 21. doi:10.1186/1471-2202-14-21
- Waseem, M., Kaushik, P., Tabassum, H., & Parvez, S. (2018). Role of Mitochondrial Mechanism in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Curr Drug Metab*, *19*(1), 47-54. doi:10.2174/1389200219666171207121313
- Watjen, W., Michels, G., Steffan, B., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkotter, A., . . . Kahl, R. (2005). Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *J Nutr*, *135*(3), 525-531. doi:10.1093/jn/135.3.525
- Weng, H. R., Cordella, J. V., & Dougherty, P. M. (2003). Changes in sensory processing in the spinal dorsal horn accompany vincristine-induced hyperalgesia and allodynia. *Pain*, *103*(1-2), 131-138. doi:10.1016/s0304-3959(02)00445-1
- Wiltshaw, E. (1979). Cisplatin in the Treatment of Cancer. *Platinum Metals Rev.*, *23* (3), 90.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Xia, R., Mei, Z. Z., Mao, H. J., Yang, W., Dong, L., Bradley, H., . . . Jiang, L. H. (2008). Identification of pore residues engaged in determining divalent cationic permeation in transient receptor potential melastatin subtype channel 2. *J Biol Chem*, 283(41), 27426-27432. doi:10.1074/jbc.M801049200
- Xu, X., Chen, H., Ling, B. Y., Xu, L., Cao, H., & Zhang, Y. Q. (2014). Extracellular signal-regulated protein kinase activation in spinal cord contributes to pain hypersensitivity in a mouse model of type 2 diabetes. *Neurosci Bull*, 30(1), 53-66. doi:10.1007/s12264-013-1387-y
- Yazgan, B., Yazgan, Y., & Nazirođlu, M. (2016). Ağrı Moleküler Yolaklarında TRPV1 Katyon Kanalı'nın Önemi. *Firat Tıp Derg/Firat Med J*, 21, 1-10.
- Yazici, S., Aksit, H., Korkut, O., Sunay, B., & Celik, T. (2014). Effects of boric acid and 2-aminoethoxydiphenyl borate on necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 58(1), 61-67. doi:10.1097/MPG.0b013e3182a7e02b
- Zajaczkowska, R., Kocot-Kepska, M., Leppert, W., Wrzosek, A., Mika, J., & Wordliczek, J. (2019). Mechanisms of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Int J Mol Sci*, 20(6). doi:10.3390/ijms20061451
- Zheng, F. Y., Xiao, W. H., & Bennett, G. J. (2011). The response of spinal microglia to chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies is distinct from that evoked by traumatic nerve injuries. *Neuroscience*, 176, 447-454. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.12.052

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler:

Adı-Soyadı: Ezgi EROĞLU (BOZKURT)

Doğum tarihi ve yeri: 15.06.1988-ÇANKAYA

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

İletişim adresleri: ESOĞÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı 26480

Meşelik/ESKİŞEHİR

Eğitim Durumu:

1994-1999: İstiklal İlköğretim Okulu, İlköğretim

1999-2002: Sarar İlköğretim Okulu, Ortaöğretim

2002-2006: Ankara Anadolu Lisesi, Lise

2007-2012: Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Lisans

2013-2016: Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji, Tezli Yüksek Lisans

2016-halen: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji, Doktora

Mesleki Deneyim:

2013-2016: Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji AbD - Araştırma Görevlisi

2019 (3 ay): İspanya Cantabria Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji ve Farmakoloji AbD - Misafir Araştırmacı

2016-halen: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji AbD - Araştırma Görevlisi

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

Türk Farmakoloji Derneği, Üye, 2016

European Association For Cancer Research (EACR), Üye, 2016

Moleküler Kanser Araştırma Derneği (MOKAD), Üye, 2016

Hücre Ölümü Araştırma Derneği, Üye, 2016

Yayınlar:

Ulusal-Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Ezgi BOZKURT, Özge UZUN, Recep BAYRAM. The effect of metformin alone and in combination with 5-fluorouracil and oxaliplatin on human HT-29 colon cancer cell line. 7.Avrupa Farmakoloji Kongresi (EPHAR2016), 2016, İstanbul.

Selcen Koca YILDIZ, Kevser EROL, Ezgi BOZKURT, H. Buğra KOCA. H₂S, CO ve NO'nin deneysel ülser modelleri üzerindeki olası koruyucu etkilerinin sıçanlarda değerlendirilmesi. 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 2017, Trabzon.

Zühal KALTUŞ, Nurullah Cihan ŞÖHRET, Ezgi BOZKURT, Kürşat Bora ÇARMAN, Coşkun YARAR, Hülya ÖZEN, Nuşin HARMANCI, Semra YİĞİTASLAN. Çocuklarda yaş ve eşzamanlı antiepileptik kullanımını n levetirasetam farmakokinetiğine etkisinin değerlendirilmesi. 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 2017, Trabzon.

Ezgi BOZKURT, Selcen KOCA YILDIZ, Kevser EROL, H. Buğra KOCA. Evaluation of potential gastroprotective effects of H₂S, CO and NO on experimental ulcer models in rats. 18. Dünya Temel ve Klinik Farmakoloji Kongresi (WCP2018), 2018, Japonya.

Cigdem CENGELLI UNEL, Ezgi BOZKURT, Kevser EROL. The acute effects of chlorogenic acid in cisplatin-induced peripheral neuropathy. 18. Dünya Temel ve Klinik Farmakoloji Kongresi (WCP2018), 2018, Japonya.

Ezgi BOZKURT, Nusin Harmanci, Engin Yildirim, Basar Sirmagul. A 1-year evaluation of analysis results of abused substances in a university hospital. 3. Bölgesel TIAFT Toplantısı, 2018, Nevşehir.

Nusin Harmanci, Ezgi BOZKURT, Engin Yildirim, Basar Sirmagul. A 1-year experience of therapeutic drug monitoring (TDM) in a university hospital. 3. Bölgesel TIAFT Toplantısı, 2018, Nevşehir.

Cigdem CENGELLI UNEL, Ezgi BOZKURT, Kevser EROL. Effects of chlorogenic acid on cisplatin induced peripheral neuropathy and neurotoxicity. FENS Regional Meeting, Belgrade, Serbia, 2019.

Nuşin HARMANCI, Ezgi BOZKURT, Çiğdem ÇENGELLİ ÜNEL, Zuhall KALTUŞ, Cansu KILIÇ, Rabiye ALTINBAŞ, Hatice DOĞAN, Kevser EROL. Pentilentetrazol ile oluşturulan deneysel epilepsi modelinde Karbon Monoksit, Nitrik Oksit Ve Hidrojen Sülfürün etkilerinin araştırılması. 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 2019, Kuşadası.

Nuşin HARMANCI, Çiğdem ÇENGELLİ ÜNEL, Zuhall KALTUŞ, Cansu KILIÇ, Ezgi BOZKURT, Kevser EROL. Karbon Monoksit, Nitrik Oksit ve Hidrojen Sülfürün deneysel psikoz ve parkinson modeli üzerindeki etkilerinin farelerde karşılaştırılması. 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 2019, Kuşadası.

Çiğdem ÇENGELLİ ÜNEL, Ezgi BOZKURT, Kevser EROL, Orhan ÖZATİK. Sisplatine bağı gelişen periferik nöropati ve nörotoksisitede klorojenik asitin etkileri. 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 2019, Kuşadası.

Veysel BASKIN, Ezgi BOZKURT, Nuşin HARMANCI, Kevser EROL Hidrojen Sülfür, Nitrik Oksit ve Karbon Monoksitin Ağrı, Anksiyete ve Depresyon Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması. 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 2019, Kuşadası.

Ezgi BOZKURT EROĞLU, Çiğdem Çengelli Ünel, Nuşin Harmancı, Kevser Erol. TRPM2 kanal antagonisti 2-Aminoetoksidifenil borat'ın sisplatin nörotoksisitesindeki etkileri. 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 2019, Kuşadası.

Kitap Çevirileri:

Trevor AJ, Katzung BG, Masters SB. Katzung&Trevor Farmakoloji Sınav ve Gözden Geçirme. Bölüm 15: Diüretikler ve Böbrekleri Etkileyen Diğer ilaçlar. Çeviren: Ezgi Bozkurt (11. Baskı, Güneş Tıp Kitapevleri, 2019).

Trevor AJ, Katzung BG, Masters SB. Katzung&Trevor Farmakoloji Sınav ve Gözden Geçirme. Bölüm 61: İlaç Etkileşmeleri. Çeviren: Ezgi Bozkurt (11. Baskı, Güneş Tıp Kitapevleri, 2019).

Trevor AJ, Katzung BG, Masters SB. Katzung&Trevor Farmakoloji Sınav ve Gözden Geçirme. Bölüm 62: Ek 1: Test Performansınızı Geliştirmek İçin Stratejiler Çeviren: Ezgi Bozkurt (11. Baskı, Güneş Tıp Kitapevleri, 2019).

Trevor AJ, Katzung BG, Masters SB. Katzung&Trevor Farmakoloji Sınav ve Gözden Geçirme. Bölüm 63: Ek 2: Anahtar İlaçlar İçin Anahtar Sözcükler. Çeviren: Ezgi Bozkurt (11. Baskı, Güneş Tıp Kitapevleri, 2019).

Trevor AJ, Katzung BG, Masters SB. Katzung&Trevor Farmakoloji Sınav ve Gözden Geçirme. Bölüm 66: İndeks. Çeviren: Ezgi Bozkurt (11. Baskı, Güneş Tıp Kitapevleri, 2019).

Bilimsel Etkinlikler:

Türk Farmakoloji Derneği, 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 2015, Ankara.

7.Avrupa Farmakoloji Kongresi (EPHAR2016), 2016, İstanbul.

6. Kök Hücre Sempozyumu, 2017, İstanbul.

Türk Farmakoloji Derneği, 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 2017, Trabzon.

18. Dünya Temel ve Klinik Farmakoloji Kongresi (WCP2018), 2018, Japonya.

3.Bölgesel TIAFT Toplantısı, 2018, Nevşehir.

Türk Farmakoloji Derneği, 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 2019, Aydın.

Projeler:

Fibroblast Hücre Kültüründe ve Ratlarda Artan Dozlarda Trombositten Zengin Plazma Uygulanmasının Etkilerinin İncelenmesi, 2014.08.18.800. Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, 2014, Araştırmacı.

Metforminin kolon kanseri hücre hattında tek başına, 5-florourasil ve oksaliplatin ile kombinasyonunun etkilerinin araştırılması, 2015.08.36.829. Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, 2015, Araştırmacı.

Sisplatinle oluşturulan in vivo ve in vitro nörotoksitede klorojenik asitin rolü, ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri, 2016, Araştırmacı.

TRPM-2 kasyon kanalı antagonisti 2-Aminoetoksidifenil borat'ın sisplatin nörotoksisitesindeki rolü, ESOĞÜ Bilimsel Araştırma Projeleri, 2018, Araştırmacı

Kurslar ve Eğitim Programları:

Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Yabancı Dil Sertifikası (İngilizce) (Ankara-2013)

Temel Hücre Kültürü ve Hücre Ölümü Analiz Yöntemleri Uygulamalı Kursu-II-HÖAD (İzmir-2014)

Proje Hazırlama Eğitimi-KASEM-PHE-3/003 (Bolu-2015)

Araştırmacılar için Deney Hayvanları Kullanımı ile İlgili Sertifikalı Eğitim Kursu (ESOGÜ-2016)

Klinik Toksikoloji Kursu (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi-2017)

Türk Farmakoloji Derneği IX. Prof. Dr. M. Oğuz Güç Farmakoloji Yaz Okulu (Ankara-Temmuz 2017)

Klinik Araştırmalara Giriş ve İyi Klinik Uygulamalar Temel Eğitimi (Ankara-2018)