

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

DLD-1 İNSAN KOLON KANSERİ  
HÜCRE HATTINDA  
TRP (GEÇİCİ RESEPTÖR POTANSİYEL)  
KANALLARININ ROLÜ VE KARVAKROLÜN  
ETKİLERİ

Ar. Gör. Dr. Ezgi BABAEREN

Fizyoloji Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR  
2021



T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

DLD-1 İNSAN KOLON KANSERİ  
HÜCRE HATTINDA  
TRP (GEÇİCİ RESEPTÖR POTANSİYEL)  
KANALLARININ ROLÜ VE KARVAKROLÜN  
ETKİLERİ

Ar. Gör. Dr. Ezgi BABAEREN

Fizyoloji Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI  
Prof Dr. Yasemin AYDIN

ESKİŞEHİR  
2021

## TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

Dr. Ezgi BABAEREN' e ait "DLD-1 İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattında TRP (Geçici Reseptör Potansiyel" Kanallarının Rolü ve Karvakrolün Etkileri" adlı çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Yasemin Aydın  
Fizyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye

Prof. Dr. Kubilay UZUNER  
Fizyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye

Prof. Dr. Bilge Pehlivanoglu  
Fizyoloji Anabilim Dalı

İmza

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun tarih  
ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Dekan  
Prof. Dr. İ. Özkan ALATAŞ

## TEŞEKKÜR

iv

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren sayın hocalarım Prof. Dr. Yasemin AYDIN'a, Prof. Dr. Kubilay UZUNER'e, Prof. Dr. Nilüfer ERKASAP'a, Prof. Dr. Selda KABADERE'ye, Doç. Dr. Orhan Tansel KORKMAZ'a, Öğretim Görevlisi Dr. Erdem ATALAY'a, Dr. Mete Özkurt'a; bölümümüzde birlikte çalıştığım arkadaşlarım Dr. Cemile Ceren MERAL EVİŐ'e, Dr. Burcu AKINCI'ya ve Dr. BüŐra Durmaz'a yardımları ve destekleri için teşekkür ederim. Eğitim ve öğretim hayatım boyunca maddi ve manevi olarak varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim aileme sonsuz sevgi ve Őükranlarımı sunarım.

Kanser, hücrenin normal işleyen moleküler mekanizmalarındaki bozuklukları ve buna bağlı morfolojik ve fonksiyonel değişiklikleri içeren, bozulmuş ve kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize bir hastalıktır. Kolon kanseri, kanserden ölümlerin önde gelen nedenidir. Son yıllarda, birçok kanserde olduğu gibi, kolorektal kanser ile bozulmuş hücre içi kalsiyum homeostazı arasında yakın ilişkiler bulunmuştur. Hücre içi kalsiyum homeostazının bozulması, hücre proliferasyonundan hücre göçü ve istilası ve hücre ölümüne dirence kadar birçok kanser belirtisinin ortaya çıkmasına katkıda bulunur. TRP kanalları, hücrede kalsiyum dengesinin düzenlenmesinde rol oynayan seçici olmayan katyon kanallarıdır. TRP kanalları kalsiyum, sıcaklık, pH, reaktif oksijen substratları, kimyasal ve mekanik stresler ile uyarılabilir. Çeşitli hücrelerde birçok farklı TRP kanalı vardır ve bunların işlevleri de farklıdır. Kanalların sayı ve aktivitelerindeki değişimler hücre fonksiyonlarında bozulmalara ve birçok hastalığa neden olabilmektedir. TRP kanallarının ifadelerinin ve faaliyetlerinin farklı kanser türlerinde farklılık gösterdiğini kanıtlayan çalışmalar vardır. Son çalışmalar, TRP kanallarının kanserleşme süreci sırasında proliferasyon, tümöral farklılaşma, apoptoz, anjiyogenez, göç ve istila süreçlerinin düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Karvakrol (2-metil-5-(1-metiletil) fenol) Lamiacea ailesi bitkilerinin uçucu yağlarında yüksek miktarda bulunan monoterpenik fenol bileşiğidir. Sentetik olarak üretilir ve satılır. Karvakrolün antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antifungal ve antioksidan etkilerinin yanı sıra, antitümöral etkileri son yıllarda kanser çalışmalarının yoğunlaşmasına neden olmuştur. Bu çalışmada, TRP kanallarının agonisti ve antagonisti olarak görev yapan karvakrolün DLD-1 insan kolorektal kanser hücre dizisi üzerindeki etkilerini ve bu etkilerin TRP kanalları ile bağlantısını açıklamayı amaçladık. Çalışmamızda, insan kolon kanseri hücre hattı DLD-1 kullanılmıştır. Deneyler 4 grupta yapılmıştır. 1.Kontrol Grubu: DLD-1 kolon kanseri hücre hattı, 2.DMSO Grubu: Uygulanacak karvakrol DMSO da çözüldüğü için DMSO verilen grup,3.Karvakrol-100 Grubu: Hücrelere 100 µM/lt karvakrol uygulanan grup,4.Karvakrol-200 Grubu: Hücrelere 200 µM/lt karvakrol uygulanan grup. Gruplardan elde edilen hücrelerde TRPC1, TRPM5, TRPV6, TRPM7 kanalları ve Kaspaz-3, Kaspaz-9 gen ekspresyonlarına PCR yöntemi ile bakıldı ve protein tayini için western blot çalışması yapıldı. 100 µM/lt karvakrol uygulamasında TRPM5 ve TRPV6 kanallarının gen ekspresyonlarında anlamlı azalmalar görülmüştür. Kaspaz 3 gen ekspresyonunun da ise anlamlı artış bulumuştur. Western Blot çalışması iki kez tekrarlanmasına rağmen sonuç alınamamıştır. Karvakrolün TRP kanalları üzerine inhibitör etkileri ile kanser hücrelerinde kalsiyum homeostazını değiştirerek apoptatik yolları aktive ettiği sonucuna varılmıştır. TRP kanallarının karvakrol gibi kimyasal ajanlarla modülasyonu ile kanser tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesi olası görülmektedir ve daha ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal Kanser, Geçici Reseptör Potansiyel Kanalları, Potansiyel (TRP) Kanalları, Karvakrol

Cancer is a disease characterized by impaired and uncontrolled cell growth, which includes disorders in the normal functioning molecular mechanisms of the cell and related morphological and functional changes. Colon cancer is the leading cause of cancer deaths. In recent years, as with many cancers, close associations have been found between colorectal cancer and impaired intracellular calcium homeostasis. Disruption of intracellular calcium homeostasis contributes to the emergence of many cancer symptoms, from cell proliferation to cell migration and invasion, and resistance to cell death. TRP channels are non-selective cation channels that play a role in the regulation of calcium balance in the cell. TRP channels can be stimulated by calcium, temperature, pH, reactive oxygen substrates, chemical and mechanical stresses. There are many different TRP channels in various cells and their functions are also different. Changes in the number and activities of the channels can cause impairment in cell functions and many diseases. There are studies proving that the expressions and activities of TRP channels differ in different types of cancer. Recent studies have shown that TRP channels are associated with the regulation of proliferation, tumoral differentiation, apoptosis, angiogenesis, migration and invasion processes during the cancerous process. is the monoterpenic phenol compound found. It is produced and sold synthetically. In addition to the antimicrobial, anti-inflammatory, antifungal and antioxidant effects of carvacrol, its antitumoral effects have led to the intensification of cancer studies in recent years. In this study, we aimed to explain the effects of carvacrol, which acts as an agonist and antagonist of TRP channels, on the DLD-1 human colorectal cancer cell line and the relationship of these effects with TRP channels. In our study, the human colon cancer cell line DLD-1 was used. Experiments were carried out in 4 groups. 1. Control Group: DLD-1 colon cancer cell line, 2.DMSO Group: The group that was given DMSO because the carvacrol to be applied was dissolved in DMSO, 3.Carvacrol-100 Group: The group where 100  $\mu\text{M}$  / lt carvacrol was applied to the cells, 4.Carvacrol-200 Group: Group in which 200  $\mu\text{M}$  / lt carvacrol is applied to the cells. TRPC1, TRPM5, TRPV6, TRPM7 channels and Caspase-3, Caspase-9 gene expressions in the cells obtained from the groups were examined by PCR method and western blot study was performed for protein determination. Significant decreases were observed in gene expressions of TRPM5 and TRPV6 channels in 100  $\mu\text{M}$  / lt carvacrol application. A significant increase in caspase 3 gene expression was found. Although the Western Blot study was repeated twice, no results were obtained. It was concluded that carvacrol activates apoptotic pathways by changing calcium homeostasis in cancer cells with its inhibitory effects on TRP channels. With the modulation of TRP channels with chemical agents such as carvacrol, it seems possible to develop new strategies in cancer treatment and further molecular studies are needed.

Keywords: Colorectal Cancer, Transient Receptor Potential (TRP) Channels, Carvacrol, CalciumSupporting

Institutions: Eskişehir Osmangazi University ScientificResearchProject Committe

## İÇİNDEKİLER

vii

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser ve Kolon Kanseri	4
2.2. Kanser ve Kalsiyum	10
2.3. TRP Kanalları	13
2.4. Karvakrol	16
2.5. Karvakrolün TRP Kanalları Üzerinden Etkisi ve Kalsiyum ile İlişkisi	19
3.GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Hücre Kültürü	21
3.1.1. Kolon Kanser Hücre Hattı ve Besi Ortamı	21
3.1.2. Hücrelerin Ekimi ve Yaşatılması	21
3.2. Deney Grupları	21
3.3. MTT Yöntemi	22
3.4. Hücrelere Karvakrol Uygulanması	22
3.5. Gen Ekspresyonu	23
3.5.1. RNA İzolasyonu	23
3.5.2. c-DNA Sentezi	24
3.5.3. Primer Dizilerinin Hazırlanması	24
3.5.4. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu	24
3.6. Western Blot	25
3.6.1. Hücrelerin Deneye Alınması	25
3.6.2. Protein İzolasyonu	25
3.6.3. Protein Konsantrasyonu Ölçümü	26
3.6.4. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Elektroforezi	26
3.6.5. Protein Örneklerinin Nitroselüloz Membrana Aktarılması	27
3.6.6. Bloklama ve Antikor Uygulanması	28
3.6.7. Görüntüleme	28
3.7. İstatistiksel Analiz	28
4.BULGULAR	29
4.1. Hücrelere Karvakrol Uygulanması	29
4.2. MTT Sonuçları	29
4.3. PCR Sonuçları	31
4.3.1. Kaspaz-3 Gen Ekspresyon Sonuçları	31
4.3.2. Kaspaz 9 Gen Ekspresyon Sonuçları	33



4.3.3. TRPC1 Gen Ekspresyon Sonuçları	35
4.3.4. TRPM5 Gen Ekspresyon Sonuçları	37
	viii
	Sayfa
4.3.5. TRPM7 Gen Ekspresyon Sonuçları	39
4.3.6. TRPM6 Gen Ekspresyon Sonuçları	41
4.4. WB Sonuçları	43
5. TARTIŞMA	44
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR	52

APC	Adenomatous Polyposis Coli (Adenomatöz Polipozis Koli)
ATP	Adenin Tri Fosfat
c-DNA	Complementer (Tamamlayıcı) Deoksiribo Nükleik Asit
DCC	Deleted Colorectal Cancer
DMH	Dimetil Hidrazon
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Dinükleotittrifosfat
EBV	Ebstein Barr Virüsü
FBS	Fetal Bovine Serum
HBV	Hepatit B Virüs
HCV	Hepatit C Virüs
IP3	İnozitol Trifosfat 3
miRNA	Mikro Ribo Nükleik Asit
µl	Mikro Litre
µmol	Mikro Molar
m-RNA	Messenger Ribonükleik Asit
MTT	3-(4,5-diMetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium bromid
nm	Nanometre
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PBS	Phosphate Buffered Saline
RNA	Ribonükleik Asit
RT	Reverse Transkriptaz
RT-PCR	Real Time PCR
STIM 1	Sensor Stromal Interacting Molecule 1
TRP	Transient Receptor Potential (Geçici Reseptör Potansiyel)
TRPA	Transient Receptor Potential Ankrin
TRPC	Transient Receptor Potential Canonical
TRPM	Transient Receptor Potential Melastin
TRPML	Transient Receptor Potential Mukolipin
TRPP	Transient Receptor Potential Polisistin
TRPV	Transient Receptor Potential Vaniloid
WB	Western Blot

## ŞEKİLLER

x

Sayfa

4.2.1. Karvakrol dozları ile hücre canlılığı ilişkisi	30
4.3.1.a Kaspaz 3 geni kat artışları	31
4.3.2.a Kaspaz 9 geni kat artışları	33
4.3.3.a TRPC1 geni kat artışları	35
4.3.4.a TRPM5 geni kat artışları	37
4.3.5.a TRPM7 geni kat artışları	39
4.3.6.a TRPV6 geni kat artışları	41
4.4.1 Gruplardaki aktin bantları	43

## TABLÖLAR

xi

Sayfa

4.3.1.a Kaspaz 3 gen ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırılması	32
4.3.2.a Kaspaz 9 gen ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırılması	34
4.3.3.a TRPC1 gen ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırılması	36
4.3.4.a TRPM5gen ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırılması	38
4.3.5.a TRPM7gen ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırılması	40
4.3.6.a TRPV6 gen ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırılması	42

## 1. GİRİŞ

Kanserleri normal hücrelerden ayıran bir dizi özellik bulunmaktadır. Bu özelliklerin ortak noktası normal hücrelerin uydukları fizyolojik ilkelere uymadan hareket etmekte olduklarıdır. Kanser deoksiribonükleik asit (DNA) mutasyonlarının neden olduğu genetik bir hastalıktır. Bu mutasyonlara yol açan hasarlanmalar, kalıtsal olarak kendiliğinden gerçekleşmekte veya çevresel etkenlere bağlı olarak oluşmaktadır.

Kanserler; hücrelerin yaşama ve çoğalma düzenlerindeki moleküler seviyede olan çeşitli bozukluklardan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle kansere yol açan sebepler bu mekanizmalar üzerinden aranacak olursa tedavi açısından anlamlı çözümler elde edilebilir.

Kanserlerin moleküler temeli yani karsinogenezin belli başlı ilkeleri vardır. Genetik kanser hipotezinde; kanserin hasara uğramış tek bir hücreden benzer şekilde hücreleri oluşturmak sureti ile meydana geldiği kabul edilmektedir ki buna da klon denilmektedir. Genetik hasar; hücre büyümesini arttıran proto onkogenlerde, hücre büyümesini inhibe eden tümör baskılayıcı genlerde, programlanmış hücre ölümü olan apoptozisi düzenleyen genlerde ve DNA onarımında rolü olan genlerde meydana gelmektedir.

Gastrointestinal kanalda en sık görülen malignite kolon adenokarsinomudur Akciğer kanseri, kanser nedeni ölümlerin ilk sırasında yer alırken, kolorektal kanser ikinci sırada gelmektedir. En çok 60-70 yaş arasında ve erkeklerde kadınlara oranla daha sık gözlenmektedir. Ülke bazında en sık Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Avustralya, Yeni Zelanda, Danimarka ve İsveç'de görülmektedir.

Kolorektal adenokarsinoma yol açan moleküler olaylar çok çeşitlidir ve hem genetik hem epigenetik kökeni vardır.

Kolorektal karsinogenezde suçlanan genetik yollar APC/B katenin yolağı ve mikrosatellit instabilitesidir.

APC/B katenin yolağında sporadik olan kolon tümörlerinin çoğunda, APC tümör supresör geninin her iki kopyasında da mutasyon veya epigenetik süreçlerle inaktivasyon gerçekleştiği bulunmuştur.

DNA yanlış eşleşme tamir sistemi genlerinde olan mutasyonlarda mikrosatellit adı verilen hasarlı DNA dizileri birikir ve buna mikrosatellit instabilitesi adı verilir.

Kolorektal kanserin özelliklerine daha yakından bakacak olursak kanserin etyolojisi ne olursa olsun moleküler patogeneze bazında, prototip lezyonun adenomatöz polip olduğunu görürüz. Mukozada kabarık görülen bu poliplerin çeşitleri nonneoplastik hamartom hiperplastik mukozal polip ve adenomatöz poliplerdir. Malignite oluşturma potansiyeli en yüksek olan adenomatöz poliplerdir. Orta yaşlı her üç insandan birinin ve yaşlı popülasyonda da her iki insandan birinin kalın bağırsağında adenomatöz polipler bulunmaktadır. Bu poliplerin kanserleşme oranı ise her yüz polipte birdir. Kalsiyum; hücrelerde çeşitli görevlerde yer alan hayati role sahip bir iyondur. Enerji metabolizması, hücre hareket, hücreler arası sinyalleşme ve ikincil haberci kimliği kalsiyumun görev aldığı hücresel süreçlerden sadece birkaçıdır.

Kalsiyumun hücre içi miktarı çeşitli iyon kanal ve pompalarının çalışmaları

sonucu düzenlenmektedir. Bu iyon kanalı ve pompalarından bazıları inozitol-1, 4,5- trifosfat reseptörü, Ryanodin reseptörü, sarkoplazmik retikulum ve plazma membran kalsiyum ATPazları, depo ve reseptör aracılı kalsiyum kanalları, geçici reseptör potansiyel kanalları (TRP), voltaj kapılı kalsiyum kanalları, pürinerjik iyonotropik reseptörler, kalsiyum salınımı ile aktifleşen kalsiyum kanalları, sodyum-kalsiyum değiştiricileri ve mitokondriyel kalsiyum kanallarıdır.

Hücre içi kalsiyum miktarındaki küçük değişmeler ile çeşitli hücre içi aktiviteler gerçekleştirilir. Hücre içi kalsiyum yükselmeleri kısa süreli olmak ve tekrar eski haline döndürölmek zorundadır yoksa toksisite gösterip hücreyi ölüme götürebilir.

Kalsiyumun kompartımanlar arasındaki dağılımı ve bunun zamansal düzenlenmesinin, hücrenel döngünün yaşam veya ölüm yoluna sapacağını belirlemesi açısından önemlidir.

Hücre zarlarındaki kalsiyum kanallarının artmış ekspresyonunun, kalsiyum bağımlı proliferatif yollarını aktifleştirdiği ve böylelikle azalmış apoptozis ve tümöröenezise yol açtığı bilinmektedir.

Hücre ve hücredeki çeşitli organellerin içindeki kalsiyum yükselmelerindeki sıklık, şiddet ve süre çeşitli değişik kodlar oluşturarak transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile hücrenel çoğalma, gen transkripsiyonu ve migrasyon gibi süreçleri aktive eder.

Kanser hücreleri normal hücrelerde olan kalsiyum homeostazisini değiştirirler bunu da kalsiyum kanalları ve pompalarının hem işleyişini hem de sayısını düzenleyerek yaparlar.

Kanser hücrelerinin yeniden programlanması ve immün sistemden kaçışı gibi ana düzenleyici yollarda kalsiyum önemli rol oynamaktadır. Kanser hücreleri bu yollar üzerinden; kendilerine proliferasyon süreçlerinde daha fazla invaziv özellik kazandırmış olurlar.

Kanser hücrelerinin migrasyon süreçlerinde hücrenel hareketi sağlayan kontraktıl proteinlerin hareketlerinde, göç edilen yerlere adhezyonun sağlanmasında ve doku yıkımını sağlayan matriks metalloproteinazlarının aktivasyonlarında kalsiyumun görevleri vardır.

Kanserlerde bazı özel kalsiyuma geçiren iyon kanallarının veya pompalarının artmış olduğu bulunmuş ve bu da kanser tedavisinde kalsiyum sinyal ve proteinlerinin ve kalsiyuma geçiren kanalların hedeflenebileceğini düşündürmüştür. TRP kanalları da bu kanallardan biridir. TRP kanalları büyük oranda birbirleriyle yapısal benzerlikler gösteren ve hemen hemen vücudun her yerinde bulunan kanallardandır. Altı adet transmembranel segmentli alt ünitelerden oluşmuşlardır. 28 tanımlanmış TRP kanal ailesi vardır ve benzer özelliklerine göre alt gruplara ayrılmışlardır. Örnekeleyecek olursak TRPC (Canonical), TRPV (Vaniloid), TRPM (Mastatin), TRPML (Mukolipin), TRPA (Ankrin) ve TRPP (Polisistin) alt grupları bunlara örnektir.

TRP kanalları kimyasal, mekanik veya fiziksel stimuluslarla uyarılabilir

TRP kanal aktivitesi ile genel olarak hücrede depolarizasyon oluşmaktadır.

Bu depolarizasyon; ekstrasellüler kalsiyum girişi veya hücre içi kaynaklardan hücre sitoplazmasına kalsiyum salınımı ile olmaktadır. Bu depolarizasyon ile de proliferasyon, apoptozis ve çeşitli genlerin transkripsiyonu gibi önemli hücrenel süreçler tetiklenmektedir.

Çoğu TRP kanalı kalsiyuma geçirendir ve bu sebeple de kalsiyumun düzenleyici

olarak rol aldığı çoğu yolda rol alırlar. TRP aktivitesine bağlı kanserojen değişikliklerin; TRP kanalları genlerindeki mutajenik değişikliklerden çok, etkilenmiş TRP kanallarının değişmiş ekspresyon seviyeleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

Vücutta gerçekleşen çeşitli fizyolojik ve fizyopatolojik süreçler vardır ve yapılan çalışmalarda; TRP kanallarının her iki süreçte de rol oynadığı saptanmıştır. TRP kanalları reseptör aracılı, sekonder mesajcı aracılı ve depo aracılı katyon kanalları olarak iş görmektedirler. Bu işlevleri ile de membran depolarizasyonunu ve kalsiyum bağımlı hücresel mekanizmaların aktivasyonunu sağlarlar.

TRP kanalları hücre kalsiyum düzenlenmesi ile yakın ilişkili olduğundan ve de son yıllarda kanser etyolojisinde TRP kanalları ile ilgili birtakım çalışmalar bulunduğu; TRP kanallarının kalsiyum üzerinden olan etkisi ile kanserlerde hem etyoloji hem tedavi açısından önemli olabileceğini düşünüp çalışmamızı bu temel üstüne inşa ettik.

Fitokimyasallar son yıllarda giderek artan şekilde kanserin de dahil olduğu çeşitli hastalıklara karşı kullanılmaktadır.

Karvakrol monoterpeneoid-fenolik yapıda bir kimyasaldır. Origanum ve Thymus türlerini içeren bitkilerde bulunmaktadır. Karvakrol ile yapılan çalışmalarda çeşitli özellikleri keşfedilmiştir. Bu özelliklerden birkaçı analjezik etki, antiinflamatuvar etki, antianjiogenik etki, antioksidant etki, antielastaz etki, antiinteksidal etki, asetilkolin esteraz inhibitörü etkisi ve de antikanserojen etkisidir.

Sitoplazmada kalsiyumun çeşitli hücresel süreçleri kontrol eden sinyal yollarında anahtar bir iyon olduğu bilinmektedir. Değişik hücre tiplerinde yapılan çalışmalarda karvakrolün kalsiyum homeostazisini düzenlemede önemli bir iyon olduğu gösterilmiştir.

Karvakrolün son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı kanser türlerinde apoptozisi TRP kanalları üzerinden hücre içi kalsiyumu değiştirerek uyardığı bildirilmiştir. Bu sebeple hücre içi kalsiyum homeostazisi ve kanser mekanizmaları arasındaki yakın ilişkiler nedeni ile kolon kanser hücrelerinde, kalsiyum akışını düzenleyen TRP kanalları ve çeşitli TRP kanallarının agonisti ve antagonisti olarak davranan karvakrol ilişkisini araştırmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser ve Kolon Kanseri

Kanser deoksiribonükleik asit (DNA) mutasyonlarının neden olduğu genetik bir hastalıktır. Bu mutasyonlara yol açan hasarlanmalar, kalıtsal olarak kendiliğinden gerçekleşmekte veya çevresel etkenlere bağlı olarak oluşmaktadır. Genetik değişikliklerin yanısıra çeşitli epigenetik değişiklikler de kanserleşmeye katkı sağlamaktadır. DNA metilasyonundaki bölgesel artışları, histon modifikasyonlarındaki değişiklikleri kontrol eden epigenetik düzenleme açısından kilit noktalarda bulunan çeşitli genlerdeki mutasyonlar bu değişikliklere örnektir. (1)

Kanseri normal hücrelerden ayıran bir dizi özellik bulunmaktadır. Bu özelliklerin ortak noktası normal hücrelerin uydukları fizyolojik ilkelere uymadan hareket etmekte olduklarıdır. Kanseri hücrelerinin özelliklerinden bazıları otonom olarak büyüyüp gelişebilmeleri, büyümeyi durdurucu sinyallere yanıt vermemeleri, apoptozise direnme, normal bir dokuya oranla daha fazla damar geliştirebilme yetenekleri yani fazla anjiogenez, dokuları invaze edebilme ve böylelikle de uzak yerlere yayılma özelliği yani metastaz kabiliyeti, metabolik yolları normal hücrelerden farklı şekilde programlayabilmeleri ve bağışıklık hücrelerinden kurtulabilme yetenekleri bunlardan birkaçıdır. (2)

Sonuç olarak yukarıda saydığımız özellikleri sayesinde büyüme, hayatta kalma, yaşlanma gibi temel süreçleri çeşitli mutasyonlarla değişikliğe uğramış olan kanser hücreleri büyür ve gelişirler. Darwin'in doğal seleksiyon teorisine göre normal hücrelere göre avantajlı duruma geçmiş olan kanser hücrelerinin hayatta kalma ve özelliklerini koruma şansları da artmış olur. (1,2)

Kanseri; hücrelerin yaşama ve çoğalma düzenlerindeki moleküler seviyede olan çeşitli bozukluklardan kaynaklanmaktadır bu sebeple kansere yol açan sebepler bu mekanizmalar üzerinden aranacak olursa tedavi açısından anlamlı çözümler elde edilebilir. Epidemiyolojik çalışmalar, kanser nedenlerini göstermeleri açısından bu sebeple önemli araştırmalardır. Sigara ile akciğer kanseri arasındaki nedensellik ilişkisi veya kolon kanseri ile diyet profilleri arasındaki ilişkiler bu araştırmalar sonucu saptanabilmiştir. (2)

Kanseri insidansına bakacak olursak erkeklerde en çok prostat kanserine rastlanırken, kadınlarda ise meme kanserine rastlanılmaktadır. Kanseri mortalite oranına bakacak olursak erkeklerde de kadınlarda da en çok akciğer ve bronş kökenli kanserlerde ölüm oranlarının yüksek olduğunu görürüz. (1)

Epidemiyolojik faktörlere baktığımızda insidansın yaş, ırk, yaşanılan yerin coğrafi özellikleri ve kişinin genetik kökenine bağlı olarak değiştiği gözlenmektedir. Kanseri geneli sporadiktir ve az bir kısmı aileseldir. Ailesel kanserlere yatkınlık oranı, otozomal dominant veya otozomal resesif genlerin geçiş oranlarından etkilenmektedir. Yapılan araştırmalarda ailesel kanserlerde kanser supresor gen mutasyonlarının otozomal dominant olarak geçtiği gözlenirken, DNA onarımındaki kalıtsal



kusurların ise otozomal resesif paternde geçerek ailesel kanserlere zemin oluşturduğu bilinmektedir. Kanserlerin moleküler temeli yani karsinogenezin belli başlı ilkeleri vardır. Genetik kanser hipotezinde; kanserin hasara uğramış tek bir hücreden benzer şekilde hücreleri oluşturmak sureti ile meydana geldiği kabul edilmektedir ki buna da klon denilmektedir. (1)

Genetik hasar; hücre büyümesini arttıran protoonkogenlerde, hücre büyümesini inhibe eden tümör baskılayıcı genlerde, programlanmış hücre ölümü olan apoptozisi düzenleyen genlerde ve DNA onarımında rolü olan genlerde meydana gelmektedir. Onkogenler transkripsiyon faktörlerini, büyüme düzenleyici proteinleri ve hücrenin diğer hücreler ve matriks arasında etkileşime geçtiği proteinlerin üretiminden sorumludur. Tümör baskılayıcı genler, denetimsiz hücre büyümesini önleyen genlerdir ve mutasyona uğradıklarında normal hücrelerin fenotipik olarak kanserojen hale gelmesine neden olan genlerdir. (1)

Tümör baskılayıcı genler iki tiptir; yöneticiler ve muhafızlar. Yönetici tümör baskılayıcı genlerin hasara uğraması ile hücre büyümesindeki durdurucu sistem ortadan kalkar ve normal hücreler transformasyona uğrayarak kanserleşirler yani kontrolsüz şekilde çoğalmaya başlarlar. Muhafız tümör baskılayıcı genlerin görevi genomik hasarı algılamak ve hasarın derecesine göre hücresel büyüme durdurmak veya hücreyi apoptoz yoluna sokmaktır. Muhafız genlerde bir mutasyon olacak olursa, hücreler transformasyona uğramaz çünkü bu genlerin hücrelerin büyümesini sağlayacak veya apoptozise girmelerini sağlayacak yollar üzerinde etkisi yoktur. Bu muhafız genlerin hasarı ile onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde olabilecek mutasyonlar kolaylaşmakta ve böylelikle de kanser gelişme oranı yükselmektedir. Kanserlerdeki genetik lezyonlara bakacak olursak onkogenleri aktive eden veya tümör baskılayıcı genleri inaktive eden genetik lezyonlar; nokta mutasyonları, eklenmeler veya silinmeler şeklinde gizli veya karyotipi değiştirebilecek kadar büyük çaplı olabilmektedir. (2)

Bazı kanserlerde gizli mutasyonlarda normal bir karyotip gözlenebilirken, diğerlerinde anoploidi denen tüm bir kromozomun, kromozom kollarının kaybı veya eklenmesi olabilmektedir. Tümör hücrelerinde başlıca yapısal anormallik olarak dengeli translokasyonlar, delesyonlar ve gen amplifikasyonlarını sayabiliriz. Dengeli translokasyonlarda; protoonkogenler iki şekilde aktifledebilmektedirler. İlk aktifleme şeklinde; protoonkogenleri normal düzenleyici elementleri yerine aktif bir promotörün denetimi altına aldırıp, bu protoonkogenleri aşırı ekspresyonlarına yol açılmasıdır. (1)

Diğer bir dengeli onkojenik translokasyon şekli ise şimerik yani füzyon proteinleri kodlayan füzyon genlerinin oluşturulmasıdır. İki farklı kromozom arası olan dengeli translokasyon sonucu yeni bir füzyon geni oluşur ve bu füzyon geni de; normal genin ürünü olan normal proteine kıyasla daha farklı özelliğe sahip olan bir füzyon proteini oluşumuna ve kanserleşmeye yol açar. Kanser hücrelerinde görülen diğer bir tip karyotip anormalliği ise kromozom delesyonlarıdır. Kromozom delesyonu eğer tümör baskılayıcı genlerin bulunduğu bölgedeki her iki alleli de etkilemişse

anlam kazanır yani tümör baskılayıcı gen iki allelin de etkilenmesi sonucu görevini yapamaz hale gelir ve kanserleşme sürecine zemin hazırlanmış olur. (1)

Gen amplifikasyonları da karyotip değişikliğine sebep olan diğer bir mekanizmadır. Protoonkogenler, normal proteinlerin amplifikasyonu yani çoğalması ve aşırı eksprese edilmesi ile onkogenlere dönüşebilmektedir. Bu dönüşüm süreci ile de kanser hücresinde protoonkogenler çok fazla miktarda bulunur ve kanserleşmeye sebep olur. Anöploidi de bir karyotip değişikliği mekanizmasıdır ve hücrenin kromozom sayısının haploid olması gerekirken bu sayının katlarından daha az veya daha çok sayıda kromozoma sahip olması durumudur. Anöploidiler genelde hücresel siklusun mitoz bölünme safhasında kromozomların hatalı bölünmesi durumundaki denetleyici mekanizmalardaki bozukluktan kaynaklanmaktadır. (1,2)

Bu bozukluk sonucunda, kromozomlardaki hatalı bölünme ile hücrenin hızlıca kendi kendini öldürmesi ile sonuçlanmaktadır. Karsinogenezde diğer bir aydınlatılmış mekanizma da mikro ribonükleik asit(miRNA)lardır bunlar 22 nükleotid uzunlukta, tek şeritli, kodlama yapmayan ve genlerin negatif düzenleyicileri olarak işlev gören RNA'lardır. Hücrenin çoğalmasında, farklılaşmasında ve yaşamını sürdürebilmesinde önemli fonksiyonları vardır. Karsinogenez sürecine miRNAlar ;onkogen ekspresyonunu artırarak veya tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu azaltarak katkı sağlarlar.Çeşitli tümörlerde miRNA profilleri çıkarılmış ve görülmüştür ki bir miRNA bir onkogenin translasyonunu inhibe ederse, miRNA miktarında veya fonksiyonundaki azalma,onkogen ürününün aşırı üretimine yol açar veya miRNA'nin hedefi tümör baskılayıcı bir gense, bu miRNA'nın aşırı aktivitesi ile tümör baskılayıcı proteini azaltabilir.Gen ekspresyonlarında mutasyon olmaksızın gerçekleşen kalıtsal ve reversibl değişikliklere epigenetik değişiklikler denmektedir. Epigenetikte histonlarda ve DNA metilasyonunda meydana gelen değişiklikler ile translasyon sonrası modifikasyonlar meydana gelerek gen ekspresyonlarında değişikliklere sebep olurlar. (1)

Bu işlemlerle genomun bazı bölgeleri susar yani eksprese edilmez. Kanser hücreleri genel olarak DNA hipometilasyonu ve promotor yerleşimi histon modifikasyonlarını içerir. Bazı tümör baskılayıcı genlerde, mutasyon yerinde promotor bölgelerindeki aminoasitlerin hipermetilasyonu ile işlevlerini yitirebildiği, çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Kanserlerde genomda gerçekleşen belirli değişiklikler, kanserin büyüebilmesi ve canlılığını devam ettirebilmesi için etkili epigenom değişikliklerine yol açar. (1)

Bu değişiklikler de hücrelerin çeşitli sinyallere verdiği yanıtları değiştirerek kanserleşmeye katkı sağlar. Kanserlerin etyolojisine bakacak olursa ana başlıkları kimyasal ajanlar, radyasyon ve mikrobik ajanlar olarak sayabiliriz. Kimyasal karsinojenler doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki çeşittir ki doğrudan olanlar vücutta herhangi bir kimyasal reaksiyona uğramadan yani metabolizma edilmeden kanserojen etkileri görülürken; dolaylı etkili kanserojen ajanların etkileri vücutta metabolizma edildikten sonraki süreçte kazandıkları görülmektedir. (1,2)

Doğrudan etkili kanserojen ajanlara örnek bazı alkilleştirici kemoterapotik ajanlar verilebilir. Dolaylı etkili kanserojen ajanlara örnek olarak ise çeşitli yakıtlarda, sigarada, hayvansal yağlarda, tütsülenmiş yiyeceklerde bulunan polisiklik hidrokarbonlardır. Aromatik amin gruplu bileşikler, aflotoksin B1, vinil klorür, arsenik, nikel, krom, intektisidler, fungusidler, besin koruyucu nitritler de günlük hayatta ev ve işyerlerinde karşımıza çıkabilecek çeşitli kimyasal karsinojen ajanlardır. Kimyasal karsinojenler DNA, RNA ve proteinlerde taşıdıkları elektrofil gruplar ile kimyasal katılma ürünleri oluşturarak etki ederler. (2)

Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler; karsinojen ajanların elektrofil grupları ile yaptıkları yeni kimyasal ürünlerden en çok etkilenen genlerdir. Radyasyon da kanser etyolojisinde suçlanan bir ajandır. Güneş, ultraviyole ışınları, x ışınları, nükleer füzyon, radyoaktif izotoplar bilinen karsinojenlerdir. Radyasyon esasen iyonlaştırıcı etki göstererek çeşitli kromozom kırıklarına, tranlokasyonlara ve de nokta mutasyonlarına sebep olur. İyonlaştırıcı radyasyon ajanların yol açtıkları zararlar içinde de mutajenite özelliği en yüksek olan çift sarmal DNA kırıklarıdır. Ultraviyole ajanlar da mutajenitesini pirimidin dimerleri oluşturup DNA'yı hasarlayarak verirler. (1,2)

Karsinogenez sürecinde diğer bir suçlanılan mekanizma viral ve mikrobiyal ajanlara bağlı oluşan onkogenezdır. Onkogenik RNA virüslerinden insan T lenfotrofik virüslerinin, T hücreli lösemiye yol açtığı kanıtlanmıştır. Bu virüs; T hücrelerini enfekte eder ve T hücrelerinin genomunda TAX proteinini kodlatır. Bu TAX proteini de T hücrelerinde çeşitli sitokinlerin salgılanmasını ve reseptörlerin üretilmesini sağlar ve böylelikle de T hücrelerinin proliferasyonu ve kanserleşmesi sağlanmış olur. Onkogenik DNA virüsleri çeşitli benign lezyonlardan servikal kanserlere kadar geniş bir yelpazede mutajen etki gösterebilmektedirler. Bu virüslerden olan insan papilloma virüsü, E6 ve E7 denen iki adet proteini ile tümör baskılayıcı genlere bağlanıp bunların foksasyonlarını inhibe etmek sureti ile kanserojen etki oluştururlar. Epstein Barr virüsü(EBV) üretmiş olduğu çeşitli proteinlerle B hücrelerini proliferate ederek ve bu proliferasyonu da vücudun bağışıklığı tarafından engellenememesi sonucu lenfomaya sebep olmaktadır. (1)

Karsinogeneze katkı sağlayan diğer virüsler ise Hepatit B (HBV) ve Hepatit C (HCV) virüsleridir. Bu virüslerin onkogenik aktiviteleri multifaktöriyeldir fakat esas hasar verici etkileri hepatosellüler zedelenme ile olan, hepatosit proliferasyonunun uyarılmasıyla ve DNAda hasar meydana getiren aktif oksijen türevlerinin üretilmesi ile ve de bağışıklık sisteminin de aracı olduğu kronik inflamasyon zemininde gerçekleşmektedir. Ayrıca HBVnin Hbx ve ve HCVnin de çekirdek proteini denilen proteinleri karsinogeneze katkıda bulunmaktadır. Karsinogeneze katkı yapan bakterilere örnek olarak da Helikobakter Pyloriyi söyleyebiliriz. Helikobakter Pylori öncelikle enfeksiyon zemininde gelişerek mide adenokarsinomu ve mide lenfomasının patogenezinde yer almaktadır. (1)

Gastrointestinal kanalda en sık görülen malignite kolon adenokarsinomudur Akciğer kanseri, kanser nedenli ölümlerin ilk sırasında

yer alırken, kolorektal kanser ikinci sırada gelmektedir. En çok 60-70 yaş arasında ve erkeklerde kadınlara oranla daha sık gözlenmektedir. Ülke bazında en sık Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Avustralya, Yeni Zelanda, Danimarka ve İsveç'de görülmektedir. Kolorektal kanser ile diyet arasında çok güçlü bir ilişki vardır. Kanser riskini arttıran diyet faktörleri arasında absorbe edilemeyen sebze liflerinden fakir, işlenmiş karbonhidrat ve yağdan zengin besinler yer almaktadır. Kolorektal adenokarsinoma yol açan moleküler olaylar çok çeşitlidir ve hem genetik hem epigenetik kökeni vardır. (2)

Kolorektal karsinogenezde suçlanan genetik yollar APC/B katenin yolağı ve mikrosatellit instabilitesidir. APC/B katenin yolağında sporadik olan kolon tümörlerinin çoğunda, APC tümör supresör geninin her iki kopyasında da mutasyon veya epigenetik süreçlerle inaktivasyon gerçekleştiği bulunmuştur. APC, WNT sinyal yolağında görevli bir bileşik olan B kateninin negatif bir düzenleyicisidir. APC proteini normalde B katenin proteinini yıkar fakat APC fonksiyonunu yitirse B katenin birikir ve nükleusa geçer, nükleusta ise proliferatif genler olan MYC, Siklin D1, KRAS gibi transkripsiyon genlerini aktifler. Ayrıca antiproliferatif yollardan olan TGF- $\beta$  sinyalizasyonunda da problem olduğu ve tümör supresör gen olan TP53'ün de mutasyona uğradığı yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. DNA yanlış eşleşme tamir sistemi genlerinde olan mutasyonlarda mikrosatellit adı verilen hasarlı DNA dizileri birikir ve buna mikrosatellit instabilitesi adı verilir. (1,2)

Bazı mikrosatellitler antiproliferatif olan TGFB reseptöründe mutant tipini oluşturan kontrolsüz hücre artışına yol açarlar. Mutant mikrosatellit dizileri, proapoptotik BAX proteininin kaybı ile de anormal klonların oluşmasını sağlar. Mikrosatellit instabilitesi ile BRAF onkogeni mutasyonu ve MLH1 gen metilasyonu da karsinogeneze katkı sağlar. Kolorektal kanserin özelliklerine daha yakından bakacak olursak kanserin etyolojisi ne olursa olsun moleküler patogeneze bazında, prototip lezyonun adenomatöz polip olduğunu görürüz. Mukozada kabarık görülen bu poliplerin çeşitleri nonneoplastik hamartom hiperplastik mukozal polip ve adenomatöz poliplerdir. (1,2)

Malignite oluşturma potansiyeli en yüksek olan adenomatöz poliplerdir. Orta yaşlı her üç insandan birinin ve yaşlı popülasyonda da her iki insandan birinin kalın bağırsağında adenomatöz polipler bulunmaktadır. Bu poliplerin kanserleşme oranı ise her yüz polipte birdir. Poliplerin karsinogenez süresince geçirdiği değişikliklerden bahsedecek olursak, KRAS protoonkogenindeki nokta mutasyonlar, çeşitli genleri aktive eden DNA hipometilasyonu, 5. kromozom uzun kolunda bulunan tümör baskılayıcı gen olan Adenomatöz Polipozis Koli (APC) geninin bazı bölgelerinde kayıplar, 18. kromozomdaki tümör baskılayıcı gen olan Kolorektal Kanser (DCC) geninde allel kaybı ve 17. kromozomdaki tümör baskılayıcı gen olan p53 mutasyonlarını sayabiliriz. Adenomatöz bir polibin kansere dönüşmesi çeşitli faktörlere bağlıdır ki bunlar lezyonun görünüşü, histolojik özellikleri ve boyutudur. Polipler saplı ve sapsız olabilir ve kanser daha çok sapsız poliplerde gelişmektedir. (2)

Histolojik açıdan polipler tübüler, villöz veya tübülövillöz olabilirler. Villöz

adenomların kanserleşme oranı daha yüksektir. Polipler çeşitli boyutlarda olabilirler ve boyut arttıkça da kanserleşme olasılığı artmaktadır. Kolorektal kanserle ilgili risk faktörlerine daha detaylı değinecek olursak yüksek sosyoekonomik sınıfa ait populasyonlarda daha sık görülmektedir. (1)

Diyette tüketilen et, besinlerle alınan hayvansal yağlar, kalori miktarı arttıkça kanserin görülme sıklığı artmaktadır. Ayrıca serum kan kolesterol düzeylerinde yükseklik ve koroner arter hastalığı da eşlik ettikçe kanserin mortalitesi artmaktadır. İnsülin direncine sahip bireylerde de, yüksek insülin ile bağırsak mukozasındaki polip büyümesi uyarıldığından kanser sıklığında artış bildirilmiştir. (2)

Her dört kolorektal kanserli hastanın bir tanesinde ailede de benzer hastalık bulunmaktadır. Ailesel bazda ise polipozis sendromları ve daha sık olarak da nonpolipozis sendromları görülmektedir. Polipozis koli ya da ailevi kolon polipozisinde, otozomal dominant bir kalıtım ile kolonda binlerce adenomatoz polip bulunan nadir bir durumdur. Adenomatöz polipozis koli genini içeren 5. kromozomun uzun kolunda bir delesyon bulunmaktadır. Bu delesyon tümör baskılayıcı genlerin kaybı ile sonuçlanır. Çeşitli başka doku tümörlerinin de eşlik ettiği Gardner ve Turcot Sendromu gibi varyantları da mevcuttur. Bu sendroma sahip bireylerde 40 yaşına kadar kolorektal kanser geliştiği gözlenmektedir. Kolon mukozasındaki anormal bir çoğalma paterni ve DNA tamir mekanizmasında bozulma esas sebeptir. (1,2)

Non polipozis kolon kanserine bakacak olursak polipozis koliden farklı olarak, proksimal kolonda fazla miktarda ortaya çıkan kanserler ile kendini gösterir. Ailede 50 yaş öncesi bir veya daha çok kolorektal kanser tanısı konulur ve en az iki nesli etkiler. 2. kromozomda bulunan hMSH2 ve 3. kromozomda bulunan hMLH1 genlerindeki germ mutasyonları ile bağlantılıdır. Bu mutasyonların DNA replikasyonlarındaki hatalara yol açtığı ve yanlış DNA eşleşmelerinin kusurlu tamiri ile DNA instabilitesine sebep olduğu düşünülmektedir. Ailesinde kolorektal kanser ya da endometrial kanser öyküsü bulunan 50 yaş altı kolorektal kanser hastalarında mikrosatellit instabilitesini saptayan birtakım testler ile ailesek non polipozis sendromları araştırılır. (2)

## 2.2. Kanser ve Kalsiyum

Ökaryotik hücrelerde, kalsiyum tüm yaşamsal süreçlerde önemli bir iyon olarak görev almaktadır. Enerji metabolizması, hücre hareket, hücreler arası sinyalleşme ve ikincil haberci kimliği kalsiyumun görev aldığı çeşitli hücresel süreçlerden sadece birkaçıdır. (3)

Önemli hücresel görevler üstlendiğinden hücre bazda kalsiyum homeostazisinin düzenlenmesi hayati önem taşır. Hücresel kalsiyum miktarı; endoplazmik retikulum, mitokondri, nükleus gibi çeşitli organellerin içinde ve dışındaki dağılımlarına ve çeşitli iyon kanal ve pompalarının çalışmaları sonucu düzenlenmektedir. (4)

Kalsiyumun düzenlenmesinde görevli proteinler inozitol 1,4,5 trifosfat reseptörü, Ryanodin reseptörü, sarkoplazmik retikulum ve plazma membran kalsiyum ATPazları, depo ve reseptör aracılı kalsiyum kanalları, geçici reseptör potansiyel kanalları (TRP), voltaj kapılı kalsiyum kanalları, pürinerjik iyonotropik reseptörler, kalsiyum salınımı ile aktifleşen kalsiyum kanalları, sodyum-kalsiyum değiştiricileri ve mitokondriyel kalsiyum kanallarıdır. (5,6)

Çeşitli çalışmalar göstermiştir ki kalsiyum iyonunun hücresel döngüsünün bozulması kanser de dahil çeşitli hastalıklara yol açabilir.

Kanserdeki ana patolojilerin metabolik yeniden programlanma ve immün sistemden kaçış olduğu bilinmektedir. Bu patolojilerin ana düzenleyici yollarında da kalsiyumun anahtar rol oynamaktadır. Kanser hücreleri normal hücrelerde olan kalsiyum homeostazisini değiştirir bunu da kalsiyum kanalları ve pompalarının hem işleyişini hem de sayısını düzenleyerek yaparlar. (3)

Hücre içindeki kalsiyumun miktarlarına bakacak olursak bunun  $10^{-7}$  mol/litredir. İntrasellüler organellerden salınarak veya ekstrasellüler rezervden kalsiyum hücre içine gönderilerek; hücre içi kalsiyum miktarındaki küçük değişmeler ile çeşitli hücre içi aktiviteler gerçekleştirilir. Hücre içi kalsiyum yükselmeleri kısa süreli olmak ve tekrar eski haline döndürölmek zorundadır yoksa toksisite gösterip hücreyi ölüme götürebilir.

Hücresel kalsiyum yükselmelerindeki sıklık, şiddet ve süre kalsiyuma bağlı çeşitli değişik kodlar oluşturarak transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile hücresel çoğalma, gen transkripsiyonu ve migrasyon gibi süreçleri aktive eder. Bu sebeple de tümörejenik yolların, kalsiyum kanalları ve taşıyıcılarının değişmiş ekspresyonları veya anormal aktivasyonları ile bağlantılı olduğu tespit edilmiş ve bunlar üzerinden çeşitli kanser terapilerine ulaşılması amaçlanmıştır. (7)

Kalsiyum sinyalinin çeşitli hücresel süreçlerde önemli bir düzenleyici olduğu bilinmektedir. Kanser hücrelerinde özellikle proliferasyon ve invaziv özellikler kazandırması açısından kalsiyum önemli bir iyondur. (4,8)

Hücre siklus basamaklarından G1'in erken evrelerinde kalsiyum; Fos, Jun ve Myc gibi genlerin indüksiyonunu sağlamaktadır. (8)

Kalsiyumun kanser hücrelerinin önemli özelliklerinden olan migrasyonda

ve daha invaziv yayılıma sahip olma gibi süreçlerde önemli görevleri vardır. (9) Kanser hücrelerinin migrasyon süreçlerinde hücre hareketi sağlayan kontraktıl proteinlerin fosforilasyonunda, yeni göç edilen yerde adhezyonun sağlanmasında, periferal ve lokal doku yıkımını sağlayan matriks metalloproteinazlarının aktivasyonlarında kalsiyumun görevleri vardır. (9)

Kalsiyum sinyali, hücrede endoplazmik retikulum ATPaz proteinini akifleyerek hücre ölümünü başlattığı bilinmektedir. (10)

Tümör supresör gen olan PTEN geninin kaybolduğu çeşitli kanserlerde; İnozitol trifosfat(IP3) reseptörlerinin bozulması ve kalsiyum aracılıklı apoptozis yollarının sekteye uğraması gözlenebilmektedir. (11)

Çeşitli kanserlerde bazı özel kalsiyuma geçirgen iyon kanallarının veya pompalarının artmış ekspresyonu gözlenmiştir. Bu durum da gelecekte çeşitli kanserlerin tedavisi açısından hem kalsiyum sinyal ve proteinlerinin hem de çeşitli kalsiyum geçirgen kanalların potansiyel tedavi hedefi olabileceğini göstermesi açısından umut vericidir. (7)

Sitoplazmik kalsiyumun yükselmesinde çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Plazma membranında bulunan kalsiyum kanallarının açılması ile kolaylaştırılmış difüzyonla kalsiyum hücre içine girebilir. Sarkoplazmik retikulumda bulunan İnozitol tri fosfat reseptörlerinin, G proteinli reseptörler veya fosfolipaz C bağımlı tirozin kinaz reseptörleri ile uyarılması sitoplazmik kalsiyum miktarını yükseltebilir. (7)

Son çalışmalarda hücre içinde kalsiyum depolarında olan düşüşün Orai1 ve kalsiyum depo seviyeleri sensorü (STIM1) adı verilen iyon kanallarının aktivitesiyle birlikte, hücreye kalsiyum girişinin olabileceği gösterilmiştir. (12)

Kalsiyumun hücre içine girişini sağlayan L tipi kalsiyum kanalları gibi voltaj kapılı iyon kanalları ve TRP kanallarıdır. (13)

Kanser hücrelerinin de normal hücrelerle aynı kalsiyum kanalı, pompa ve değiştiricileri kullandığı düşünülmektedir.

Fakat her kanser türüne özgü bir kalsiyum kanalının aşırı eksprese olduğu yapılan çalışmalarla gözlenmiştir. (14)

Kalsiyuma geçirgen iyon kanallarından olan T tipi kalsiyum kanal blokörleri, glioblastoma multiforme de potansiyel ajan olarak çalışılmaktadır ve depo aracılı kalsiyum kanal girişinin blokasyonu amaçlanmaktadır. (15)

Plasmalemmal kalsiyuma geçirgen iyon kanallarının bloke edilmesi ile kanser hücrelerinin ölümlerinin arttığı bulunmuştur. İyon kanal blokajı ile kalsiyum miktarının hücrede artmasının apoptozisi başlatıcı direkt etkisinden ziyade, kalsiyuma bağımlı çeşitli yolların aktiflenerek bu yolların da başka birçok yolağı tetiklemesi sonucu hücrelerin apoptozise girdiği gözlenmiştir. (16)

Bu mekanizmaya örnek verecek olursak T tipi kalsiyum kanal inhibisyonu ile HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde p38-MAPK aktivasyonu üzerinden apoptozisin indüklenmesini verebiliriz. (16)

Hücre içi organellerdeki kalsiyum kanallarından son yıllarda daha iyi tanımlanır hale gelmiştir. Bu kanalların etkisiz hale getirilmesi ile de, tümör gelişiminde önemli yollar inhibe edilmiştir. (16)

5-Fluorourasil ajanının, HCT-116 kolon kanseri hücre hattındaki etkisine bakacak olursak, bu ajan hücre içi kalsiyumunda bir artış meydana getirerek kalsiyum kalmodulin bağımlı bir yolağı aktiflemede ve P53 tümör supresor genini aktive etmektedir. (17)

Başka bir örnek Hela servikal kanser hücre hattında, sisplatin ajanının sitoplazmadaki ve mitokondrideki kalsiyum seviyelerinde yükselme yaparak sisplatinin kendi sitotoksik etkilerini arttırdığı bulunmuştur. (18)

Akut lenfoblastik lösemide kullanılan deksametazon tedavisinin hücre içi kalsiyum girişini arttırdığı ve bunun da deksametazona olan duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir. (19)

HCT-116 kolon kanser hücre hattında, doksurubisin tedavisinin endoplazmik retikulumda kalsiyum geri alınımı üzerinde etkili olduğu ve antikanserojen etkinliği arttırdığı gösterilmiştir. (20)

Bcl-2 gen ailesi üyeleri, endoplazmik retikulum kalsiyum depolarından inozitol 3 fosfat reseptörleri aracılığı ile ve mitokondride voltaj bağımlı anyon kanalları aracılığı ile kalsiyum salınımının düzenleyicileri oldukları bulunmuştur. (21)

Bcl-2 gen ailesi inhibisyonu ile de meme kanseri hücrelerinde kalsiyum sinyalinin değiştirilmesi üzerinden antikanserojen etki gösterilmiştir. (22)

HepG2 hepatokarsinoma hücre hattında, Orai 1 kanallarının inhibisyonu ile 5-fluorourasil ajanının antikanserojen etkilerinde artış saptanmıştır. (23)



### 2.3. TRP Kanalları

Geçici reseptör potansiyel (TRP) kanal ailesi, büyük oranda birbirleriyle yapısal benzerlikler gösteren ve hemen hemen vücudun her yerinde bulunan kanallardır. Altı adet transmembranel segmentli alt ünitelerden oluşmuşlardır. Tanımlanmış olanlar tetramer yapıdadır. 28 tanımlanmış TRP kanal ailesi vardır ve benzer özelliklerine göre alt gruplara ayrılmışlardır. TRPC (Canonical), TRPV (Vaniloid), TRPM (Mastatin), TRPML (Mukolipin), TRPA (Ankrin) ve TRPP (Polisistin) alt grupları bunlara örnektir. (24)

TRP kanalları, çeşitli uyarılarla aktifleşebilmektedir. Bu uyarılar kimyasal, mekanik veya fiziksel uyarılar olabilir. Çoğu TRP kanalı kalsiyuma geçirgendir ve bu sebeple de kalsiyumun düzenleyici olarak rol aldığı çoğu yolakta rol alırlar. (24)

TRP kanal aktivitesi ile genel olarak hücrede depolarizasyon oluşmaktadır. Bu depolarizasyon; ekstrasellüler kalsiyum girişi veya hücre içi kaynaklardan hücre sitoplazmasına kalsiyum salınımı ile olmaktadır. Bu depolarizasyon ile de proliferasyon, apoptozis ve çeşitli genlerin transkripsiyonu gibi önemli hücresel süreçler tetiklenmektedir. (25)

Kalsiyum iyonunun hücrelerin döngüsünü düzenlemede önemli olduğu bilinmekteydi. Son yıllardaki çalışmalarla kalsiyumun kompartımanlar arasındaki dağılımı ve bunun zamansal düzenlenmesinin, hücresel döngünün yaşam veya ölüm yoluna sapacağını belirlemesi açısından son derece önemli olduğu saptanmıştır. Bu da bize hücrelerdeki kalsiyum kanallarının artan önemini vurgulamaktadır. (26,27)

Hücre zarlarındaki kalsiyum kanallarının artmış ekspresyonunun, kalsiyum bağımlı proliferatif yollarını aktifleştirdiği ve böylelikle azalmış apoptozis ve tümörögenezise yol açtığı bildirilmektedir. (25,26,28)

İntrasellüler kalsiyum değişimleri, sadece hücre zarındaki kalsiyum kanallarından kaynaklanmamakta aynı zamanda hücre içindeki organellerin zarlarında bulunan TRP kanalları aracılığı ile de meydana gelmektedir.

Endojen TRP aktivitesine bağlı kanserojen değişikliklerin; TRP kanalları genlerindeki mutajenik değişikliklerden çok, etkilenmiş TRP kanallarının değişmiş ekspresyon seviyeleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. (24)

TRP kanalları mayalardan memelilere kadar tüm canlılarda bulunur. Bu kanallar selektif olmayan katyon kanallarıdır. TRP kanal proteinlerinin oluşturduğu iyon kanalları hem +1 hem +2 değerlikli katyonlara geçirgen iken, TRPM4 ve TRPM5 +1 değerlikli katyonlara seçici ve TRPV5 ve TRPV6 ise +2 değerlikli olan kalsiyuma selektiftir. (29)

Vücutta gerçekleşen çeşitli fizyolojik ve fizyopatolojik süreçler vardır ve yapılan çalışmalarda; TRP kanallarının her iki süreçte de rol oynadığı saptanmıştır. TRP kanalları reseptör aracılı, sekonder mesajcı aracılı ve depo aracılı katyon kanalları olarak iş görmektedirler. Bu işlevleri ile de membran depolarizasyonunu ve kalsiyum bağımlı hücresel mekanizmaların aktivasyonunu sağlarlar. TRP kanallarının etkilediği ve hücresel siklusu düzenleyen kalsiyum bağımlı çeşitli yollar vardır. Bu yollardan birisi kalsiyum-kalmodulin bağımlı kinaz-2 yolağıdır. Bu yolak üzerinden iki adet protein kontrol edilir. (30,12) Bu proteinler kalsiyum kalmodulin ve B

hücrelerinin nükleer faktör kappa hafif zincir aktifleyicisi proteindir. Bu iki protein üzerinden hücreye olan zararlı uyarın sonrasında hücrenin ölümü mi gideceği yoksa yaşamaya devam mı edeceği; DNA'nın transkripsiyon yanıtı üzerinden kontrol edilir.

Hücreye olan herhangi bir stres durumunda çeşitli yollarla sitoplazma, endoplazmik retikulum veya mitokondri üzerinden kalsiyum homeostazisi değiştirilerek yine hücrenin apoptozise mi gireceği ya da yaşamını mı sürdüreceği kontrol edilmektedir. (31)

Tümör hücreleri kalsiyum sinyalinde çeşitli değişiklikler görülmektedir. Tümör hücrelerinin normal hücrelerden daha değişken davranmasının sebeplerinden birisi de budur. Kanser hücrelerinde hücrelerel migrasyon, adhezyon, proliferasyon, invazyon ve metastaz gibi çeşitli yayılmayı ve çoğalmayı kolaylaştıran özellikler bulunmaktadır. Bu özelliklerin kazanılmasında çeşitli proteinler ve çeşitli yollar görev alır. Bu protein ve yollar içinde kalsiyuma bağımlı çok çeşitli proteinler vardır. Örnek verecek olursak hücrelerel proliferasyonu artırıcı kalmodulin, kalsiyum-kalmodulin bağımlı protein kinaz-2, kalsinörin, protein kinaz-C gibi. Bu proteinler çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktive ederek hücrelerel proliferasyonu uyarıcı etki gösterir. (32)

Bazı TRP kanalları termal ve mekanik uyarıları alan duyu reseptörleri gibi işlev görürler. (33)

Bu kanalların çeşitli kanserlerde tümörün ilerlemesini arttırdığı yönünde yapılan çalışmalar sonucu çeşitli bilgiler elde edilmiştir. (34,35)

TRPA1, TRPC1, TRPC6, TRPM7 ve TRPV4 kanallarının bu şekilde davranan çeşitli mekanosensitif kanallar olduğu ve kanser tedavilerinin bu kanalların üzerinden denenebilecek olması açısından bu konudaki bilgiler önemlidir. (32)

TRPA1 kanal geninin baskılanması sonucu, Lewis akciğer karsinomu hücre hattında yüksek proliferasyon ve hücre surveyinde artış saptanmıştır. (36)

TRPA1 kanalının çeşitli tümörlerde, malign hücrelerin reaktif oksijen türevlerine olan toleranslarını arttırdığı görülmüştür. (37)

TRPC1 kanalının meme kanserinde, hipoksik koşullarda ekspresyonunu arttırdığı ve normal epitel hücrelerinin anormal mezenşimal hücre formlarına dönüşümünü hızlandırdığı saptanmıştır. (38)

İnvaziv duktal meme karsinomunda da, transforme edici büyüme faktörü-B (TGF-B) nın artan salınımı ile epitelyal hücrelerin mezenşimal hücrelere dönüşümünün arttığı bulunmuştur. (39)

Başka bir çalışmada TRPC1 kanalı üzerinden TGF-B nın pankreas kanseri hücrelerel hareketini arttırdığı ve TRPC1 geninin baskılandığı zaman bu sürecin ortadan kalktığı gösterilmiştir. (40)

TRPC1 gen baskılanması ile MCF-7 meme kanseri hücre hattında, G0/G1 hücre siklusu basamağında hücrelerel proliferasyonun sekteye uğradığı görülmüştür. (41)

Nazofarenks karsinomunda, TRPC1 kanalı üzerinden hücrelerel invazyonun ve matriks metalloproteinaz-2 ve matriks metalloproteinaz-9 üretiminin düzenlendiği gösterilmiştir. (42)

Glioblastoma ve tiroid kanserinde, TRPC1 kanalının hücrelerel migrasyon ve kemotaksiz ile ilgili olduğu gösterilmiştir. (43,44) TRPC1 kanalı transforme

olmuş epitel hücrelerinde migrasyonda rol oynamaktadır. TRPC1 geni baskılandığında ise hücrenin hareket kabiliyeti için gerekli dokunsal mekanik uyarıları alamadığı ve hücrenel hareketi sağlayan lamellopodal aktivitenin bozulmuş olduğu gözlenmiştir. (45,46)

TRPC6 kanalının glioblastoma hücrelerinde, hipoksik dokularda aşırı eksprese edildiği gözlenmiştir ve bunun da kanserin progresyonunu sağlayan angiogenezin gerçekleşebilmesi yönünden önemli olduğu sonucuna varılmıştır. (47)

TRPC6 aşırı ekspresyonunun, benign prostat hiperplazisi, malign prostat tümörlerinde ve de prostat kanseri hücre hatlarında bir belirteç olduğu gösterilmiştir. (48)

Skuamöz hücreli özefagus kanserlerinde, TRPC6 geninin aşırı ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. (49)

TRPV4 kanalının hücrenin sitoplazmasının hacimsel kontrolünü sağlamada ve hücrenin osmotik basıncındaki değişimlerini algılamada görev yaptığı düşünülmektedir. (50)

Tümörlerde endotel hücrelerinde, hücrenel mekanosensitif algının kaybolmuş olduğu görülmektedir. Bu patoloji de tümör hücrelerinin göç edip damarlanması sürecinde neden normal hücrelerden farklı davrandıklarını açıklamaktadır. (51)

Gastrik kanserde; TRPV4 kanalının çeşitli ajanlarla inhibisyonunun, hücrelerin proliferasyonu ve invaziv davranışlarında artışa yol açtığı ve bunu da kalsiyum/AKT/B-katenin yolu üzerinden yaptığı saptanmıştır. (52) Meme kanserlerinde yapılan çalışmalarda da TRPV4 kanalının hücrenel şekli ve hücrenin ekstrasvazasyonunu düzenleyerek metastaz sürecini etkilediği gösterilmiştir. (53)

Bazı çalışmalarda TRPV4 kanal ailesinin fibroziste de önemli olabileceği sonucuna varılmıştır. (54,55)

TRPM7 kanalı ile ilgili yapılmış birçok çalışma vardır. Meme kanserinde epitelial hücrelerin mezenşimal hücrelere dönüşümünün, transkripsiyon faktörü STAT-3 ün fosforilasyonu ile TRPM7 kanalına bağımlı şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir. (56)

Meme kanseri hastalarında TRPM7 kanalının artmış ekspresyonu ile hastalardaki kötü prognoz arasında ilişki kurulmuş ve kanal geninin inhibisyonu ile kanser hücrelerinin göç etmesi arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. TRPM7 kanal geni inhibe edildiğinde kanser hücrelerinin göç etme kabiliyeti azalmıştır. (57)

TRPM7 kanal ekspresyonu ile hücre göçü ve invazyon arasındaki bağlantının da MAPK sinyal yolağının aktivasyonu üzerinden olabileceği öne sürülmüştür. (58)

Over kanseri hücrelerinde TRPM7 kanalının hücrenel göçü ve hücrenel proliferasyonu kolaylaştırdığı bulunmuştur. (59)

Bu bilgiler ışığında; TRP kanallarının modulasyonunu sağlayan ajanların keşfedilmesi ve üzerinde çalışılması, kanser ve diğer birçok patolojik olayın tedavisi açısından önem arz etmektedir.

## 2.4. Karvakrol

Bitkilerden elde edilen ve çeşitli amaçlarla kullanılan kimyasal maddelere fitokimyasal denilmektedir. Fitokimyasallar son yıllarda giderek artan şekilde kanserin de dahil olduğu çeşitli hastalıklara karşı kullanılmaktadır.

(60)

Günümüzde bitkilerden elde edilen doğal fitokimyasalların tümör hücrelerini çeşitli mekanizmalar üzerinden apoptozise götüren etkileri olduğu bilinmektedir. (61)

Sebze ve meyvelerde bulunan çeşitli polifenol bileşiklerinin, serbest oksijen radikallerinin üretimini azaltarak karsinogenezis sürecini yavaşlattığı görülmüştür. (62)

Karvakrol monoterpenoid-fenolik yapıda bir kimyasaldır ve Lamiaceae familyasından bitkilerin içerisinde bulunmaktadır. Özellikle oreganum ve thymus türlerinde bol bulunmaktadır. (63)

Karvakrol ile yapılan çalışmalarda çok çeşitli özellikleri keşfedilmiştir. Bu özelliklerden birkaçı analjezik etki, antienflamatuar etki, antianjiogenik etki, antioksidat etki, antielastaz etki, antiinteksidal etki, asetilkolin esteraz inhibitörü etkisi ve de antikanserojen etkisidir. (64,65)

Karvakrolün kimyasal bileşik adı 2-metil-5-(1- metiletil) -fenoldür. (66)

Karvakrol, Lamiaceae denilen ve nanegil ailesinden olan bitkilerde bulunan esansiyel yağların ana bileşenidir. (67)

Karvakrolün insan, hayvan ve çeşitli bitkisel patojenlere karşı biyolojik aktivitesi bulunmaktadır. Patojenlere karşı biyolojik aktivitesinin temelini membran hasarı yapması oluşturmaktadır. Membran hasarı yapma mekanizması ise; hücre membranının protonlara olan geçirgenliğini arttırıp, intrasellüler ATP miktarında azalma meydana getirmesidir. (68)

Sitoplazmada kalsiyumun çeşitli hücresel süreçleri kontrol eden sinyal yollarında anahtar bir iyon olduğu bilinmektedir. Değişik hücre tiplerinde yapılan çalışmalarda karvakrolün kalsiyum homeostazisini düzenlemede önemli bir ajan olduğu gösterilmiştir. T yardımcı hücre-1 tipi monositik hücrelerde ve Jurkat T hücrelerinde karvakrolün doza bağımlı olarak intrasellüler kalsiyum mobilizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. (69) Karvakrolün prostat kanseri hücrelerinin yaşayabilirlik oranını düşürdüğü gözlemlenmiştir. (70)

Dai ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada karvakrolün, insan oral skuamoz hücreli karsinom hücre hatları olan Tca 8113 ve SCC-25 hücrelerinin üremelerini doza bağlı şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda karvakrolün hücresel göçü ve invazyonu da azalttığı gözlemlenmiştir. (71)

Karvakrolün; askorbik asit ve vitamin E benzeri güçlü antioksidan özellikleri olduğu da Mastelic ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir. (72)

Karvakrolün kemoterapiye dirençli insan over adenokarsinomu hücrelerinde proliferasyona engel olduğu Ait Mubarek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir. (73)

Koparal ve arkadaşlarının çalışmasında da karvakrolün karsinogenezisi yavaşlatan etkisi akciğerin küçük hücreli olmayan kanserinde saptanmıştır. (74).

Karvakrolün; insan servikal kanser hücre hatlarında (Hela ve Siha), insan kolon karsinomu hücre hatlarında (CaCo-2, HCT-116, LoVo), insan hepatoma hücre hattı olan HepG2de, insan akciğer kanseri hücre hattı H1299da, insan meme kanseri hücre hattı MCF-7de, insan akut promyelositik lösemi hücre hattı HL-60da da yapılan çalışmalarla anti kanserojen etkinlikleri gösterilmiştir. (75,76,77,78,79,80,81,82,83)

Aydın ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hidrojen dioksit ile indüklenmiş oksidatif lenfosit hasarının; karvakrolün antioksidan etkisi ile düşük dozlarında koruyucu olduğu saptanmıştır. Çalışmada insan lenfositlerinde karvakrolün düşük dozlarında DNA hasarı gözlenmez iken, daha yüksek dozlarda karvakrolün DNA zincir kırıklarında artışa sebep olduğu saptanmıştır. (84)

Siklofosfamid verilmiş sıçanlarda karvakrolü içeren bir yağ karışımının siklofosfamidle oluşturulmuş DNA hasarını arttırdığı gösterilmiştir. (85)

Özkan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada karvakrolün hidrojen dioksit ile indüklenmiş DNA hasarını önlediği gösterilmiştir. (86)

Çeşitli çalışmalarda; insan lenfositlerinde D galaktozamin ve ultraviyole B ışını ile indüklenmiş DNA hasarının karvakrol uygulanması ile azaldığı gösterilmiştir. (87,88)

Quintero ve arkadaşları karvakrolün; ultraviyole ışını ile indüklenmiş DNA hasarına karşı antigenoltoksik etkisi olduğunu yaptıkları çalışmada ispatlamışlardır. (89)

Güneş-Bayır ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada insan gastrik adenokarsinom hücre hattı olan CRL-1739'da karvakrolün hücrelerin yaşamları üzerine inhibe edici etkileri olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada karvakrolün; gastrik adenokarsinom hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu arttırdıkları gözlenmiştir. (90)

Mahtaj ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kronik obstrüktif akciğer hastalığının hayvan modelinde karvakrolün akciğer, trakeada verilen patolojik yanıtları ve sistemik inflamasyonu, nötrofil ve eozinofil sayılarını azaltarak olumlu yönde etkilediği bulunmuştur. (91)

Andersen'in yaptığı çalışmada karvakrolün farelere olan intraperitoneal uygulamalarında doz bağımlı olarak ölümden önce ataksi, spontan motor aktivitede artış, somnolans ve ölüm gibi etkileri gözlenmiştir. (92)

Karvakrolün Baranauskaite ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada antioksidan aktivitesi üzerinden antikanserojen etkileri olduğu gösterilmiştir. (93)

Giannenes ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada karvakrolün antioksidan savunmada artışa sebep olarak daha güçlü bir immün sistem cevabına yol açtığı gösterilmiştir. (94)

1,2-dimetilhidrazon (DMH) kolona özgü bir karsinojendir. (95)

DMH bileşiğinin karsinogenez sürecinde etkilediği ana yer DNAdır ve bunu metil oluşumunu arttırarak DNA bazlarına ekleyerek ve nokta mutasyonlar oluşturarak gerçekleştirir. (96)

Belirgin kript odakları kolorektal karsinomlarda sık görülen lezyonlardandır ve deneysel kolon kanseri modellerinde DMH ajanı ile bu lezyonlar oluşturulmaktadır.

Sivaranjani ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada DMH ajanı ile oluşturulmuş kolon kanserinde, karvakrol lipid peroksidasyonunu önleyici

özellikleri ile antioksidan olarak kript odaklarını önlemiş ve çalışmanın sonucunda karvakrol uygulanan sıçan grubunda tümör insidansında azalma saptanmıştır.

Aynı çalışmada karvakrolün sıçanlarda lipid peroksidasyon ürünlerini, kolonik dokuda belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir.

Karvakrol verilen sıçanlarda antioksidan enzimler olan katalaz ve superoksit dismutaz aktivitelerinin ve de glutatyon bağımlı enzimlerin hem seviyelerinin hem de aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir.

Yine aynı çalışmada karvakrol alan sıçanların kolonik mukozalarında bakteriyel enzim aktivitelerinde düşüş gösterilmiştir. (97)

İnsan kolorektal hücre hatları olan HCT116 ve LoVo hücreleri ile yapılan çalışmada; karvakrolün kanser hücrelerinin büyümelerini ve migrasyonlarını inhibe ettiği gösterilmiştir.

Aynı çalışmada hücreleri apoptozise uğradığı gözlenmiştir. Bcl-2 proteininde azalma ve Bax proteininde yükselme gözlenip mitokondriyal apoptotik yollar üzerinden bu etkiyi ortaya çıkarmış olabileceği düşünülmüştür.

Hüresel büyüme ve gelişmede önemli olan PI3K/Akt sinyal yolağındaki, p-Akt protein seviyesinde düşme yaparak hücreleri apoptozise doğru götürmüş olabileceği sonucuna varılmıştır. (82)

Altuntaş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kimyasal içeriğinin yarıdan fazlasının karvakrolün oluşturduğu uçucu bir yağın insan kolorektal karsinom hücre hattı olan HT-29 hücrelerine karşı üremeyi engelleyici etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. (98)

Spyridopoulou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Origanum onites bitkisinden elde edilen ve karvakrolün büyük miktarda bulunduğu bir yağın insan kolorektal hücre hattı HT-29 hücrelerinin büyümelerini inhibe ettiği görülmüştür. (99)

Karvakrolün çeşitli kanserlerde hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu değiştirerek kanser hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu baskıladığı ve apoptozisi indüklediği gösterilmiştir

Karvakrolün kanser hücrelerindeki bu inhibe edici etkileri çeşitli mekanizmalar üzerinden açıklanmaya çalışılmıştır. Ancak tek bir etki değil çoklu etkilerin toplamı sonucu antikanser etkisini göstermesi daha olasıdır. Son yıllarda karvakrolün çok çeşitli etkilerini TRP kanalları üzerinden bu kanalları module ederek yaptığı ortaya konmuş ve dikkatler bu noktaya çekilmiştir.

## 2.5. Karvakrolün TRP Kanalları Üzerinden Etkisi ve Kalsiyum İlişkisi

Karvakrolün birçok etkisini hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu değiştirerek bunu da hem TRP kanalları üzerinden hem de hücre içi organellerden salınımı kontrol ederek yaptığı bilinmektedir.

Karvakrolün iyonik kanallarda nasıl bir etki yaptığına dair çeşitli çalışmalar mevcuttur.

İzole köpek ve insan ventriküler kardiyomyositlerinde ve sıçan mezenter hücrelerinde; karvakrolün nöronal voltaj kapılı sodyum akım kanallarında ve kardiyak L tipi kalsiyum akım kanallarında geri dönüşümlü inhibitör etkisi olduğu gösterilmiştir. (100,101,102)

Ayrıca karvakrolün insan atriyal kardiyomyosit hücrelerinde, fare hipokampus nöronlarında, sıçan mezenter arterlerinde TRPM7 kanallarının akımlarını inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. (103,104,102)

Karvakrolün etkilediği TRP kanalları arasında TRPV3, TRPA1, TRPC1, TRPC3 ve TRPC6 da vardır. (105,102)

Isıya hassas ve ligand kapılı TRP reseptörleri vücutta çeşitli dokularda sentezlenen katyon kanallarıdır. TRPA1 ve TRPV1'in ağrıya hassas nosiseptif duyuşal nöronlarda bulunduğu çalışmalarda gösterilmiştir. (106,107)

Çeşitli başka çalışmalarda da TRPA1 ve TRPV1'in aynı zamanda nöronal olmayan dokularda da sentez edilip, hücrenin yaşamsal süreçlerinde ve hücre içi kalsiyum dengesinin düzenlenmesinde de önemli roller oynadığı gözlenmiştir. (106,107,108,109)

Karvakrolün TRPV1 ve TRPA1 kanalları üzerinde aktifleyici bir etkisi bulunduğu ve bu kanalların aktiflenmesi ile de kalsiyuma geçirgen hale geldikleri tespit edilmiştir. (110,111)

TRPV1'in aktiflenmesi ile bulunduğu kanser hücrelerini ölüme götürdüğü çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. (112,113)

TRPV1 kanalının yol açtığı sitotoksitenin esas kaynağının intrasellüler kalsiyumda bir artış olduğu çeşitli çalışmalarda ileri sürülmüştür.

Bazı çalışmalarda ise kalsiyuma bağımlı bir apoptozis olabileceği üzerinde durulmuştur. (114,115)

Başka bir çalışmada da endoplazmik retikulumda bulunan TRPV1 kanallarının da, endoplazmik retikulumdaki stresi yöneterek hücrenin yaşam süresini uzatıp kısaltabildiği gösterilmiştir. (116)

Başka çalışmalarda da TRPV1 aracılı hücre ölümünün mitokondrilerin disfonksiyonu ile gerçekleşen hücreye kalsiyum akışı ile ilgili olabileceği öne sürülmüştür. (117,118)

Yapılan bir çalışmada TRPA1 kanalının, kalsiyumun hücre içine girişini kontrol ederek iskemi aracılı myelin hasarında rol oynadığı gösterilmiştir. (119)

Başka bir çalışmada TRPA1 geni susturulmuş farenin, Multiple Skleroz modeli bir demyelinizasyon hastalığından korunduğu gözlenmiştir. (120)

Karvakrolün bir çok etkisini hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu değiştirerek, bunu da gerek TRP kanallarını etkileyerek gerek hücre içi organellerden salınımı modüle ederek yaptığı bildirilmektedir.

Çalışmamızda, hücre içi kalsiyum homeostasisi ve kanser mekanizmaları

arasındaki yakın ilişkiler nedeni ile kolon kanser hücrelerinde, kalsiyum akışını düzenleyen TRP kanalları ve çeşitli TRP kanallarının agonisti ve antagonisti olarak davranan karvakrol ilişkisini araştırmayı amaçladık.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Hücre Kültürü

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 24 Temmuz 2019 tarihli ve 18 karar sayısı ile onay alınmıştır.

##### 3.1.1. Kolon Kanser Hücre Hattı ve Besi Ortamı

Deneyimizde ticari olarak satılan DLD-1 adlı insan kolorektal kanser hücre hattı kullanıldı.

Hücreler deney boyunca %5 oranında karbondioksit, %95 steril distile sudan sağlanan nem ve de 37 santigrat derece sıcaklıkta steril inkübatör içinde yaşatıldı.

Hücrelerin besiyeri; medium olarak RPMI-1640 (%85), Fetal Bovine Serum (FBS) (%10) ve 10000 ünite/ml Penisilin-Streptomisin (%5) olacak şekilde hazırlandı.

##### 3.1.2. Hücrelerin Ekimi ve Yaşatılması

Hücreler deney aşamasında steril koşullar altında canlandırılarak kültür flaskı içine aktarıldı. İnkübatöre bulunan flasklar, ilk iki gün yerinden oynatılmamak koşuluyla, kuluçka süresince inverted mikroskop (Olympus) ile kontrol edilerek hücrelerin çoğalmaları gözlemlendi.

Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra pasajlama işlemi yapıldı.

Pasajlama işleminde hücreler 75'lik flask için 3 ml %0,05 Tripsin+EDTA ile yüzeyden sökülerek, besiyeri içeren 15lik falcon tüpe alınıp 5000 devir /dakika ile 5 dakika ve 4 santigrat derecede santrifüj işlemi uygulandı. Üstteki medium atılarak dipteki hücreler, içerisinde besiyeri bulunan flasklara tekrar ekilerek pasaj işlemi uygulandı. 75'lik flasklara 10 ml besiyeri konuldu.

Hücreler inverted mikroskop altında her gün düzenli kontrol edildi.

Eskiyen besiyerleri pipet yardımıyla boşaltılarak 1-3 günde bir besiyeri yenilendi.

#### 3.2. Deney Grupları

**Kontrol Grubu:** DLD-1 kolon kanseri hücre hattına hiçbir madde katılmaksızın yaşatılmıştır.

**Dmsö Grubu:** Hücrelere uygulanacak olan karvakrol DMSO çözücüsü ile çözüldüğünden, gruplara DMSO grubu da ilave edilmiştir.

**Karvakrol-100 Grubu:** DLD-1 kolon kanser hücre hattına 100 µmol/lt karvakrol uygulanan gruptur.

**Karvakrol-200 Grubu:** DLD-1 kolon kanser hücre hattına 200 µmol/lt karvakrol uygulanan gruptur.

### 3.3. MTT Yöntemi

MTT yöntemi hücre canlılığının belirlenmesi için sık kullanılan kalorimetrik, spektrofotometrik bir yöntemdir. MTT hücelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen, formozana indirgenen bir maddedir. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile orantı gösterir. 96 kuyucuklu kapların her bir kuyucuğuna flasklardaki %85-90 yoğunluktaki hücrelerin sayısı gözönünde bulundurularak ilgili hesaplamalar yapılarak yaklaşık 15.000 hücre 100 µl besiyeri içinde ekildi ve yaklaşık 24 saat sonra hücrelerin %85-90 doluluk oranlarına ulaştığı gözlemlendi.

Sonrasında her bir 96'lı bölmeli kapların, 3 sırasına ve her sırada 8 adet kuyucuk olduğundan 24 kuyucuğa 100-200-400-600-900 µmol/lt olacak şekilde 5 ayrı doz karvakrol uygulaması yapıldı.

Kontrol ve DMSO grubu da aynı şekilde hazırlanıp inkübatöre konuldu.

Her doz karvakrol için ayrı 96'lı kap seçilmesinin sebebi karvakrolün uçucu bir bileşik olması ve dozların birbirine karışabilme olasılığı idi.

Ayrı ayrı kaplar aliminyum folyo ile kapatılıp inkübatör içine birbirinden uzak şekilde yerleştirildi ve 24 saat boyunca karvakrole maruz bırakıldı.

24 saatin sonunda hücrelerin canlılığı kontrol edildi ve her kuyucuğa 10 µl olacak şekilde MTT ajanı uygulandı ve 4 saat boyunca inkübe MTT ajanı ile inkübe edildi.

İnkübasyon süresinin ardından her bir kuyucuktaki besiyeri pipetle çekilerek 100 µl DMSO eklendi ve kaplar çalkalayıcıda 5-8 dk çalkalandı. Oluşan formazan boya absorbansı çok kuyucuklu kap okuyucusu bir spektrofotometri ile 550 nm dalga boyunda okutuldu. Kuyucuklardan okunan optik yoğunluk, kontrole karşı yaşayan hücrelerin yüzdesine dönüştürüldü ve elde edilen veriler analiz edildi.

Deneyimizde karvakrol verilen hücrelerdeki optik yoğunluk, kontrole karşı yaşayan hücrelerin yüzdesine dönüştürülmüş ve böylelikle karvakrolün kolon kanseri hücre hattındaki proliferasyona olan etkileri görülmüştür.

Böylelikle DLD-1 kolon kanseri hücre hattına uyguladığımız karvakrol dozlarına karar verilmiştir.

### 3.4. Hücelere Karvakrol Uygulanması

Karvakrol uygulanması için hücreler tripsin ile kaldırılıp hücre sayıları hesaplanıp, 6'lı bölmeli kaplara alınmış ve her bir bölmeye yaklaşık 500.000 hücre ekilmiştir.

Sonrasında hücrelerin 24 saat çoğalması beklenip inverted mikroskop altında kontrol edilmiş ve her bir bölmede %85-90 yoğunlukta hücre olduğu görülüp Karvakrol-100 grubuna 100 µmol/lt ve Karvakrol-200 grubuna 200 µmol/lt dozlarında karvakrol uygulaması yapılmıştır.

Kontrol ve Dmsso gruplarına karvakrol uygulanmamıştır. Karvakrol-100 ve Karvakrol-200 grupları 24 saat boyunca karvakrol uygulamasına maruz bırakılmıştır. Sonrasında tüm gruplara RNA izolasyon protokolü uygulanmıştır.

### **3.5. Gen Ekspresyonu**

#### **3.5.1. RNA İzolasyonu**

- 1.** İzolasyon için lizis buffer ile B-merkaptöetanol karışımı hazırlandı.
- 2.** Karışımı hazırlarken her 1 ml lizis bufferına; 14,3 molar B-merkaptöetanol'den 20 µl olacak şekilde eklendi.
- 3.** Sonrasında 6'lı kuyucuklarda bulunan hücrelerimizi PBS ile yıkamanın ardından her kuyucuğa 600 µl olacak şekilde lizis buffer-B merkaptöetanol karışımından eklendi ve birkaç kez pipetaj yaparak karıştırıldı.
- 4.** Her kuyucuktan hücreler pipetle çekilir ve ayrı tüplere aktarıldı.
- 5.** Tüplerin içine metal boncuk konur ve yatay homojenizatörde 3 dk boyunca 30/dk frekansta çalkalandı. Tüplerdeki karışım çekildi ve mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- 6.** Her tüpe 360 µl saf etanol eklenip birkaç kez pipetaj yapıldı.
- 7.** Tüpler 1 dk boyunca +4 santigrat derecede 12000 devirde santrifüj edildi. Tüplerdeki altta kalan kısım atıldı ve üstte kalan RNA içeren süpernatant korundu.
- 8.** Sonrasında her tüpe Wash Buffer-1'den 700 µl kondu ve 1 dk boyunca +4 santigrat derecede 12000 devirde santrifüj edildi.
- 9.** Altta kalan kısım atılıp üstte kalan süpernatanta; Wash Buffer-2'den 600 µl kondu ve 1 dk boyunca +4 santigrat derecede 12000 devirde santrifüj edildi.
- 10.** Altta kalan kısım atıldı ve Wash Buffer-2'den 250 µl konulup, 2 dk boyunca +4 santigrat derecede 12000 devirde santrifüj edildi.
- 11.** Altta kalan kısım atılıp, üstte kalan süpernatanta 100 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve 1 dk boyunca +4 santigrat derecede 12000 devirde santrifüj edildi.
- 12.** Süpernatanda bulunan RNAlarımızı ölçüldü ve c-DNA sentezine kadar -80 santigrat dereceye kaldırıldı.

### 3.5.2. c-DNA Sentezi

1. c-DNA sentezi her bir örnek için 20 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirildi.
2. Sentezde 10 µl RNA örneği, 2 µl 10X RT Tamponu, 2 µl 10X RT random primerler, 1 µl 25X d-NTP karışımı, 3,5 µl RNAaz içermeyen su, 0,5 µl RNA inhibitörü ve 1 µl Reverse Transkriptaz enzimi kullanıldı.
3. Her örnek için ayrı hazırlanan PCR karışımları 0,2 ml PCR tüpleri içine konuldu.
4. Sonrasında bu tüpler termal döngü cihazına yerleştirildi.
5. Cihazda 25 santigrat derecede 10 dk ve 37 santigrat derecede 120 dk, 85 santigrat derecede 5 dk olacak şekilde sentez basamakları yürütüldü.
6. Oluşan c-DNA örnekleri -20 santigrat derecede saklandı.

### 3.5.3. Primer Dizilerinin Hazırlanması

Hedef genler olan Kaspaz-3, Kaspaz-9, TRPM7, TRPV6, TRPC1, TRPM5 genleri ve referans gen olan B-Aktin primerleri çalışmada kullanıldı.

### 3.5.4. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Ters transkripsiyon reaksiyonu ile elde edilen c-DNAlar spesifik primer ve problemlerin varlığında RT-PCR ile amplifiye edildi. Protokolde Kaspaz-3, Kaspaz-9, TRPM7, TRPV6, TRPC1, TRPM5 genleri ve referans gen olan B-Aktin primerleri kullanıldı. Primer-prob karışımındaki problemler; SYBR Green kimyasında üretilmiş ve parçalandığı vakit floresan ışık salınımına neden olan ve hedef genlerimizin sekanslarına özgül bağlanma yapabilen oligonükleotidlerdir.

1. RT-PCR protokolünde her bir örnek için 20 µl reaksiyon karışımı hazırlanıldı.
2. Reaksiyon karışımı; 10 µl Master Mix solüsyonu, 1 µl Forward Primer, 1 µl Reverse Primer, 4 µl DNAaz ve RNAaz içermeyen su ve 4 µl c-DNA olmak üzere toplam 20 µl olacak şekilde ayarlandı.
3. Reaksiyon karışımı 96 kuyucuklu PCR plakalarına dağıtıldı ve PCR plakasının üstü optik yapışkan film tabakası ile kapatıldı.
4. Kuyucuklar içerisindeki reaksiyon karışımının tamamen dibe çökmesi için PCR tabakası 1500 devirde, 1 dk boyunca santrifüj edildi.
5. Sonrasında denatürasyon basamağı için 95 santigrat derecede 10 dk,

hibridizasyon basamağı için de toplam 40 döngü olmak üzere; 95 santigrat derece 15 sn ve 60 santigrat derecede 1 dk reaksiyon gerçekleştirildi.

6. Reaksiyon sonrası herbir örnek için CT (Threshold Cycle) değeri elde edildi.

7. Çalışmanın sonuçları LightCycler® Nano Software'den alınan CT değerleri ile  $\Delta\Delta CT$  rölatif kuantifikasyon yöntemiyle değerlendirildi.

### 3.6. Western Blot (WB)

Fosfoinozitol 3 kinaz(PI3K) yolağındaki birtakım değişiklikler ile bu yolağın ürünlerinden olan onkogen proteinlerden protein kinaz B (Akt) ve fosforile protein kinaz B (pAkt) çeşitli kanserlerde ve de kolon kanserinde suçlanan anahtar mekanizmalardandır. Bu sebeple; karvakrolün olası proapoptotik etkisinin PI3K yolağı ve Akt/pAkt onkogen proteinleri üzerinden olup olmadığını test etmek amaçlı WB tekniğini kullandık. WB analizi ile Akt ve p-Akt proteinlerinin göreceli miktarını belirlemeyi amaçladık. Kontrol proteini olarak da b-Aktin kullandık.

#### 3.6.1. Hücrelerin Deneye Alınması

Karvakrol dozları uygulanması için hücreler tripsin ile kaldırılıp hücre sayıları hesaplanıp, 6'lı bölmeli kaplara alınmış ve her bir bölmeye yaklaşık 500.000 hücre ekilmiştir.

Sonrasında hücrelerin 24 saat çoğalması beklenip inverted mikroskop altında kontrol edilmiş ve her bir bölmede %85-90 yoğunlukta hücre olduğu görülüp Karvakrol-100 grubuna 100  $\mu\text{mol/l}$  ve Karvakrol-200 grubuna 200  $\mu\text{mol/l}$  dozlarında karvakrol uygulaması yapılmıştır.

Kontrol ve Dmsö gruplarına karvakrol uygulanmamıştır.

Karvakrol-100 ve Karvakrol-200 grupları 24 saat boyunca karvakrol uygulamasına maruz bırakılmıştır.

Protein izolasyonu öncesi 6'lı bölmeli kaplar içindeki hücreler soğuk PBS uygulaması sonrası cell scraper ile kazanarak her örnek 2 ml'lik ependorf tüplere alınmıştır.

Sonrasında tüm gruplara protein izolasyon protokolü uygulanmıştır.

#### 3.6.2. Protein İzolasyonu

1. WB analizi için protein izolasyon basamağında öncelikle RIPA Lizis Solüsyonu hazırlanmıştır.

2. 1 ml RIPA Lizis Solüsyonu için 960  $\mu\text{l}$  Ripa Lizis Tamponu, 10  $\mu\text{l}$  Sodyum Ortovadanat Solüsyonu, 10  $\mu\text{l}$  Proteinaz İnhibitör Kokteyli, 10  $\mu\text{l}$  Fosfataz İnhibitör Kokteyli ve 10  $\mu\text{l}$  Fenilmetilsülfonil Florid solüsyonu kullanılmıştır.

3. Her örneğe RIPA Lizis Solüsyonu kit prospektüsüne göre hesaplanıp

dağıtıldı ve komojenizatörde 2 dk parçalama işlemi uygulandı.

4. Örnekler 15 dk, 4 santigrat derecede 10000 devirde santrifüje edildi.

5. Santrifüj sonrası süpernatant kısmında bulunan protein karışımı alınıp, yeni tüplere konuldu.

### 3.6.3. Protein Konsantrasyonu Ölçümü

1. Protein miktarının ölçümü Qubit Protein Kiti kullanılarak, Qubit 2.0 Florometre cihazında yapıldı.

2. Ölçüm öncesi kit içinde bulunan Qubit Protein Tamponundan 199 µl ve Qubit Protein Ajanından 1 µl konularak toplamda 200 µl'lik Çalışma Solüsyonu hazırlandı.

3. 0,5 ml'lik tüplerden standart ve örnek miktarı kadar hazırlandı.

4. Her birine 190 µl çalışma solüsyonu eklendi, sonrasında standart ve örneklerden 10 µl eklenip vortekslendi.

5. Örnekler oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakıldı.

6. Florometre cihazında önce standart örnekleri okutularak standart eğrisi çizildi

7. Örnekler okutularak standart eğrisine göre konsantrasyonlar belirlendi ve en düşük örnek konsantrasyonuna göre tüm örnekler 100 µg/ml'ye eşitlendi.

### 3.6.4. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

1. 100 µg/ml protein içeren örnekler; jele yükleme öncesinde denatürasyon yapan ve negatif yük ile yüklenmeyi sağlayan Lityum Dodesil Sülfat tamponu ve Reducing Ajan ile muamele edildi.

2. SDS-PAGE'e yüklenecek karışımın bileşenleri Lityum Dodesil Sülfat tamponu 2,5 µl, Sample Reducing Ajan 1 µl ve protein örneği 6,5 µl ve toplam 10 µl olacak şekilde hazırlandı.

3. Bu karışım ısıtıcı tabla üzerinde 70 santigrat derecede 10 dk inkübe edildi.

4. Hazırlanan örnek tüpleri inkübasyon sonunda buzda veya +4 santigrat derecede bir süre bekletildi.

5. Bolt %4-12 Bis-Tris Plus Jel kullanıldı. Jelin altındaki bant söküldü ve tarağı çıkartıldı. Dikey elektroforez cihazına yerleştirildi.

6. Yürütme işlemi için Running Buffer 9 solüsyonu kullanıldı.

7. Birinci kuyucuğa işaretli markır konuldu.

8. 200 voltta 30-35 dk yürütme işlemi yapıldı.

### **3.6.5. Protein Örneklerinin Nitroselüloz Membrana Aktarılması (Blotlama İşlemi)**

1. Transfer işlemi için Thermo Fisher IBlot 2 Dry Blotting system kullanıldı.

2. IBlot 2 cihazının kendine ait sandviç şeklindeki membran aktarım sistemi (IBlot 2 Transfer Stacks) kullanılarak 20 voltta 7 dk boyunca jelden membrana aktarım işlemi gerçekleştirildi.

#### **IBlot 2 Transfer Stacks**

1. Stack açılınca en üstteki bakır kaplı tel membran altındaki beyaz kağıtla kenara alındı.

2. Jel üzerine koyuldu, üzerine filtre kağıdı ıslatılarak koyuldu. Merdanesiyle hafifçe üzerinden geçildi. Sonra bakır membran koyuldu.

3. Tekrar merdaneyle üzerinden geçildi. Üzerine de I Blot absorband pad konulup, kapak kapatıldı.

#### **Jel**

1. Jeli haznesinden çıkarmak için içi saf su dolu küvette sudan geçirildi. Köşelerinden spatula ile kaldırılarak yavaşça üst kapak çıkarılıp dikkatlice ayrıldı.

2. Üst kapak ayrıldıktan sonra jel, spatula ile dikkatlice kesildi. Üst kısımdaki tarak uzantıları kesilerek atıldı. Alt kısımdaki boşluktan spatula ile nazikçe bastırılarak jel kesildi.

3. Transfer işleminden sonra Blocking solüsyonu hazırlandı. Solüsyon için 40 ml saf su, 10 ml 5X Buffer ve 500 µl Additive solüsyonu konuldu.

4. Transfer işlemi bittikten sonra jel atıldı.

5. Transfer kağıdındaki jel görüntüsü kesilerek alındı. Hazırlanan Blocking solüsyonu içine kondu ve 5 dk bekletildi.

### 3.6.6. Bloklama ve Antikor Uygulanması

1. Blocking solüsyonundan 2'şer ml olmak üzere antikor sayısı kadar 2,5 ml'lik tüplere kondu ve vortekslendi.
2. iBind Flex kartı, 10 ml Blocking solüsyonu ile ıslatıldı. Membranı koyacağınız yere aynı solüsyondan 1 ml daha konuldu Membran karta yerleştirilirken ters koyuldu ve silindire üzerinden geçilip sabitlendi.
3. iBind Flex cihazından 2,5 saat bekletildi.
4. ECL solüsyonu; 1 ml Luminol/ Enhancer solüsyonu ve 1 ml Peroksidaz solüsyonu ile hazırlandı.
5. iBind Flex'ten çıkarılan membran solüsyona yatırıldı.
6. Antikorla iBind Flex cihazına ekenirken 1.kuyuya ilk antikor, 2. kuyuya Block Solüsyonu, 3. Kuyuya 2. antikor ve 4. kuyuya tekrar Block Solüsyon eklendi. Tüm kuyucuklara 6 ml eklenildi.

### 3.6.7. Görüntüleme

1. Görüntüleme için kemilüminesans görüntüleme sistemi kullanıldı.
2. Bu görüntüleme sisteminin temeli kimyasal luminol olduğu için sekonder antikora özgü substrat (ECL) kullanıldı.
3. ECL solüsyon, membran 5 dk boyunca karanlık ortamda inkübe edildi ve görüntüleme işlemine geçildi.
4. Genbox cihazında tabloya yerleştirilen membran resmi PC'de programla çekildi.

### 3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme için GrapPad Prism6 programı kullanılacak. Gruplar önce Shapiro-Wilk Normality Test kullanılarak normal dağılım gösterip göstermediğine göre analiz edilecek. Normal dağılım gösteren veriler tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklar Tukey testi ile değerlendirilecek. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklılıklar Dunn testi ile değerlendirilecek. P değeri 0.05'den küçük olanlar anlamlı kabul edilecek.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Hücrelere Karvakrol Uygulanması

Karvakrol uygulanması için hücreler tripsin ile kaldırılıp hücre sayıları hesaplanıp, 6'lı bölmeli kaplara alınmış ve her bir bölmeye yaklaşık 500.000 hücre ekilmiştir.

Sonrasında hücrelerin 24 saat çoğalması beklenip inverted mikroskop altında kontrol edilmiş ve her bir bölmede %85-90 yoğunlukta hücre olduğu görülüp Karvakrol-100 grubuna 100 µmol/lt ve Karvakrol-200 grubuna 200 µmol/lt dozlarında karvakrol uygulaması yapılmıştır.

Karvakrol uygulamasından sonra 8.-12.-18. ve 20. Saatlerde hücreler indirekt mikroskop altında kontrol edilmiş ve 12. Saatten sonra hücrelerin bir kısmının hem Karvakrol-100 hem Karvakrol-200 gruplarında hücrelerin canlılıklarını kaybetmeye başlayıp, apoptotik hal aldıkları görülmüştür.

Kontrol ve Dms0 gruplarına karvakrol uygulanmamıştır.

24 saatin sonunda tüm gruplara Gen ekspresyonu ve WB işlemleri; gerekli adımlar takip edilerek uygulanmıştır.

### 4.2. MTT Sonuçları

MTT yöntemi hücre canlılığının belirlenmesi için sık kullanılan kalorimetrik, spektrofotometrik bir yöntemdir. MTT hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen, formozana indirgenen bir maddedir. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile orantı gösterir. 96 kuyucuklu kapların her bir kuyucuğuna flasklardaki %85-90 yoğunlukta hücrelerin sayısı gözönünde bulundurularak ilgili hesaplamalar yapılarak yaklaşık 15.000 hücre 100 µl besiyeri içinde ekildi ve yaklaşık 24 saat sonra hücrelerin %85-90 doluluk oranlarına ulaştığı gözlemlendi.

Sonrasında her bir 96'lı bölmeli kapların, 3 sırasına ve her sırada 8 adet kuyucuk olduğundan 24 kuyucuğa 100, 200, 400, 600, 900 µmol/lt olacak şekilde 5 ayrı doz karvakrol uygulaması yapıldı.

Kontrol ve DMSO grubu da aynı şekilde hazırlanıp inkübatöre konuldu.

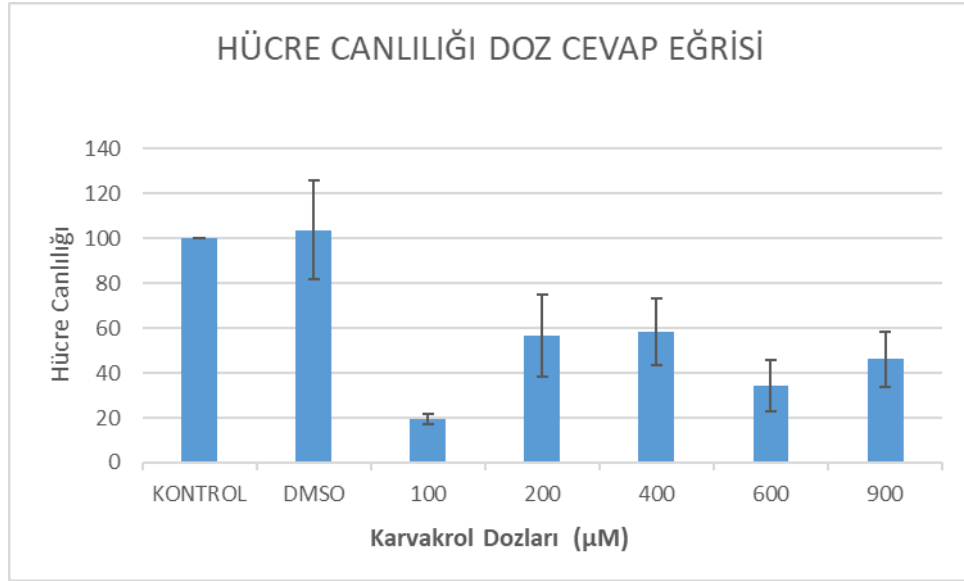
Her doz karvakrol için ayrı 96'lı kap seçilmesinin sebebi karvakrolün uçucu bir bileşik olması ve dozların birbirine karışabilme olasılığı idi.

Ayrı ayrı kaplar aliminyum folyo ile kapatılıp inkübatör içine birbirinden uzak şekilde yerleştirildi ve 24 saat boyunca karvakrole maruz bırakıldı.

24 saatin sonunda hücrelerin canlılığı kontrol edildi ve ölmekte oldukları gözlemlendi, her kuyucuğa 10 µl olacak şekilde MTT ajanı uygulandı ve 4 saat boyunca inkübe MTT ajanı ile inkübe edildi.

İnkübasyon süresinin ardından her bir kuyucuktaki besiyeri pipetle çekilerek 100 µl DMSO eklendi ve kaplar çalkalayıcıda 5-8 dk çalkalandı. Oluşan formazan boya absorbansı çok kuyucuklu kap okuyucusu bir spektrofotometri ile 550 nm dalga boyunda okutuldu. Kuyucuklardan okunan optik yoğunluk, kontrole karşı yaşayan hücrelerin yüzdesine dönüştürüldü ve elde edilen verilerin Excel ile analizi sonucu şekil

4.2.1'deki grafik elde edildi. Karvakrolün hücre canlılığını en çok azalttığı doz olan 100  $\mu\text{M}$ /lt ilk doz ve diğer diğer doz olarak da karvakrolün antikanserojen özelliği ile ilgili makaleler gözününe alınarak 200  $\mu\text{M}$ /lt seçildi.



**Şekil 4.2.1.** Karvakrol dozları ile hücre canlılığı ilişkisi

### 4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları (PCR) Sonuçları

Kontrol ve Dmsö gruplarına karvakrol uygulanmadı

Karvakrol-100 ve Karvakrol-200 grupları 24 saat boyunca karvakrol uygulamasına maruz bırakıldı.

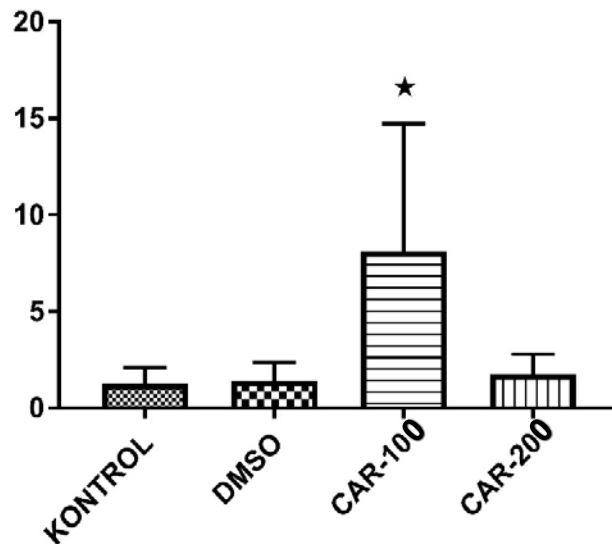
Sonrasında tüm gruplara RNA izolasyon protokolü uygulandı.

Ters transkripsiyon reaksiyonu ile elde edilen c-DNAlar spesifik primer ve problemlerin varlığında RT-PCR ile amplifiye edildi.

Protokolde Kaspaz-3, Kaspaz-9, TRPM7, TRPV6, TRPC1, TRPM5 genleri ve referans gen olan B-Aktin primerleri kullanıldı.

#### 4.3.1. Kaspaz-3 Gen Ekspresyon Sonuçları

##### KASPAZ 3 GENİ KAT ARTIŞLARI



**Şekil 4.3.1.a.** 100 µmol/lit ve 200 µmol/lit karvakrol uygulanmış DLD-1 insan kolon kanseri hücre hattında Kaspaz 3 gen ekspresyon sonuçları (\*p< 0,05)

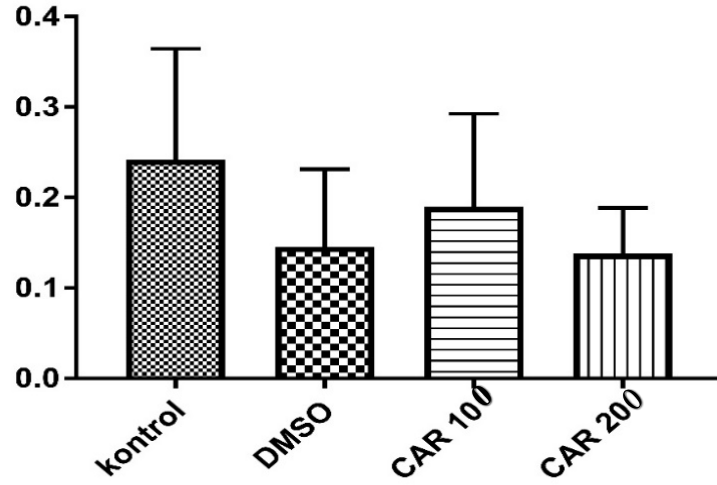
100 µM/lit karvakrol uygulanan grupta Kaspaz 3 gen ekspresyonu kontrol ve DMSO grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. 200 µM/lit karvakrol dozunda ise gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır.

**Tablo 4.3.1.a** Kaspaz 3 gen ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırması

Tukey'in Çoklu Karşılaştırma Testi	Ortalama Fark	Ortalamlar Arasındaki Farkın Güven Aralığı	Anlamlılık	Özet	P Değeri
KONTROL ile DMSO	-0,1653	-6,085-5,754	(-)	Fark yok	0,9998
KONTROL ile CAR-100	-6,864	-12,78-0,9446	(+)	Fark var*	0,0197
KONTROL ile CAR-200	-0,4925	-6,412-5,427	(-)	Fark yok	0,9953
DMSO ile CAR-100	-6,699	-12,34-1,055	(+)	Fark var*	0,0167
DMSO ile CAR-200	-0,3272	-5,971-5,317	(-)	Fark yok	0,9984
CAR-100 ile CAR-200	6,372	0,7276-12,02	(+)	Fark var*	0,0236

#### 4.3.2. Kaspaz-9 Gen Ekspresyon Sonuçları

##### KASPAZ 9 GENİ KAT ARTIŞLARI



Şekil 4.3.2.a.100  $\mu\text{mol/l}$  ve 200  $\mu\text{mol/l}$  karvakrol uygulanmış DLD-1 insan kolon kanseri hücre hattında Kaspaz 9 gen ekspresyon sonuçları

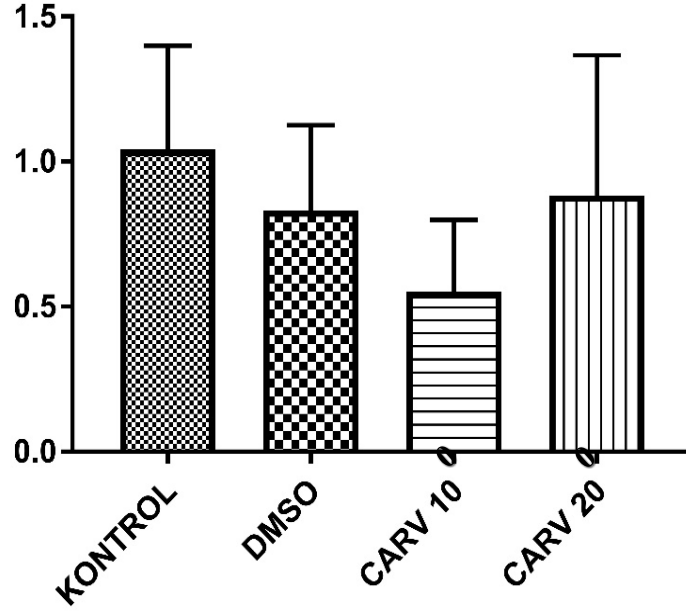
Kaspaz 9 gen ekspresyonunun istatistiksel analizinde gruplar arası anlamlı farklılık saptanmamıştır.

**Tablo 4.3.2.a.** Kaspaz 9 gen ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırması

Tukey'in Çoklu Karşılaştırma Testi	Ortalama Fark	Ortalamalar Arasındaki Farkın Güven Aralığı	Anlamlılık	Özet	P Değeri
Kontrol ile DMSO	0,09647	-0,08134-0,2743	(-)	Fark yok	0,4271
Kontrol ile CAR 100	0,05231	-0,1255-0,2301	(-)	Fark yok	0,8309
Kontrol ile CAR 200	0,104	-0,07378-0,2818	(-)	Fark yok	0,3643
DMSO ile CAR 100	-0,04416	-0,2118-0,1235	(-)	Fark yok	0,8714
DMSO ile CAR 200	0,007558	-0,1601-0,1752	(-)	Fark yok	0,9992
CAR 100 ile CAR 200	0,05172	-0,1159-0,2194	(-)	Fark yok	0,8105

### 4.3.3. TRPC1 Gen Ekspresyon Sonuçları

#### TRPC1 GENİ KAT ARTIŞLARI



**Şekil4.3.3.a.** 100µmol/lit ve 200 µmol/lit karvakrol uygulanmış DLD-1 insan kolon kanseri hücre hattında TRPC1 gen ekspresyon sonuçları

TRPC1 gen ekspresyonunun gruplar arası analizi sonucu istatistiksel açıdan anlamlı fark görülmemiştir.

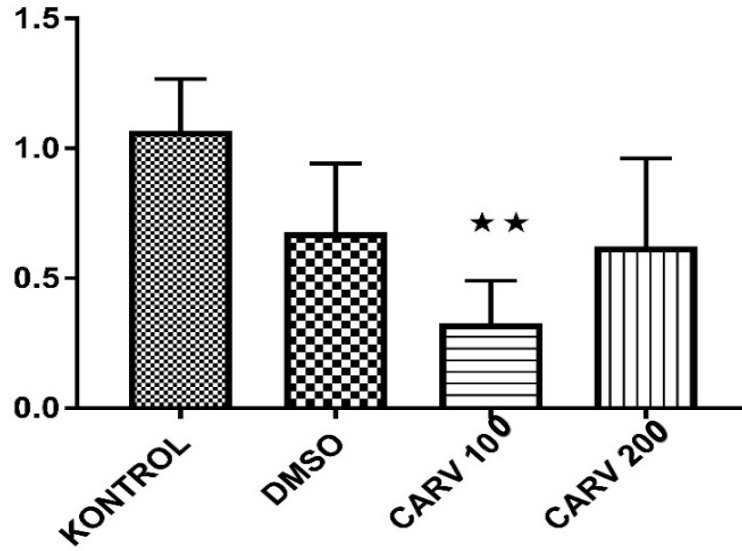
**Tablo 4.3.3.a** TRPC1 gen ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırması

Tukey'in Çoklu Karşılaştırma Testi	Ortalama Fark	Ortalamalar Arasındaki Farkın Güven Aralığı	Anlamlılık	Özet	P Değeri
KONTROL ile DMSO	0,2101	-0,3668-0,7871	(-)	Fark yok	0,7402
KONTROL ile CARV 100	0,4921	-0,08483-1,069	(-)	Fark yok	0,1120
KONTROL ile CARV 200	0,1596	-0,4174-0,7365	(-)	Fark yok	0,8652
DMSO ile CARV 100	0,282	-0,295-0,8589	(-)	Fark yok	0,5327
DMSO ile CARV 200	-0,05057	-0,6275-0,5264	(-)	Fark yok	0,9946
CARV 100 ile CARV 200	-0,3326	-0,9095-0,2444	(-)	Fark yok	0,3940



#### 4.3.4. TRPM5 Gen Ekspresyon Sonuçları

##### TRPM5 GENİ KAT ARTIŞLARI



**Şekil 4.3.4.a.** 100  $\mu\text{mol/l}$  ve 200  $\mu\text{mol/l}$  karvakrol uygulanmış DLD-1 insan kolon kanseri hücre hattında TRPM 5 gen ekspresyon sonuçları (\*\* $p < 0,01$ )

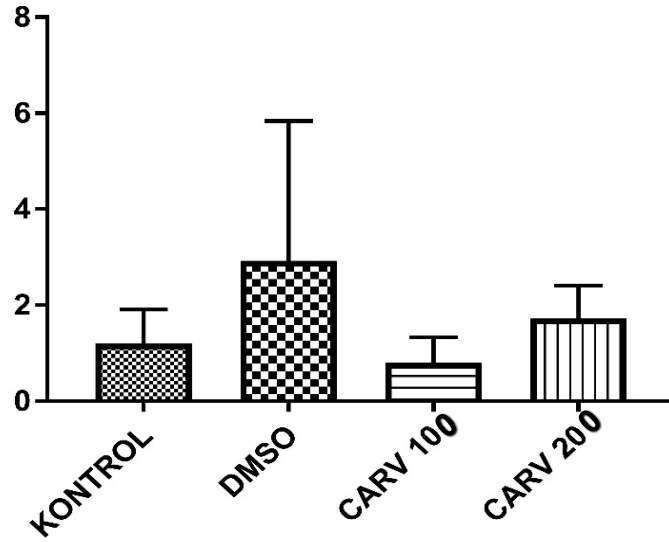
100  $\mu\text{M/l}$  karvakrol uygulanan grupta TRPM5 gen ekspresyonu kontrol ve DMSO grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşük bulunmuştur. 200  $\mu\text{M/l}$  karvakrol dozunda ise anlamlı fark görülmemiştir. Bu karvakrolün doza bağlı etki yaptığını düşündürmektedir.

**Tablo 4.3.4.a.** TRPM5 gen ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırması

Tukey'in Çoklu Karşılaştırma Testi	Ortalama Fark	Ortalamlar Arasındaki Farkın Güven Aralığı	Anlamlılık	Özet	P Değeri
KONTROL ile DMSO	0,3902	-0,04311-0,8234	(-)	Fark yok	0,0858
KONTROL ile CARV 100	0,7413	0,2887-1,194	(+)	Fark var**	0,0012
KONTROL ile CARV 200	0,4453	-0,007234-0,8978	(-)	Fark yok	0,0546
DMSO ile CARV 100	0,3511	-0,08216-0,7844	(-)	Fark yok	0,1364
DMSO ile CARV 200	0,05514	-0,3781-0,4884	(-)	Fark yok	0,9832
CARV 100 ile CARV 200	-0,296	-0,7485-0,1566	(-)	Fark yok	0,2816

#### 4.3.5. TRPM7 Gen Ekspresyon Sonuçları

##### TRPM7 GENİ KAT ARTIŞLARI



Şekil 4.3.5.a. 100  $\mu\text{mol/l}$  ve 200  $\mu\text{mol/l}$  karvakrol uygulanmış DLD-1 insan kolon kanseri hücre hattında TRPM 7 gen ekspresyon sonuçları

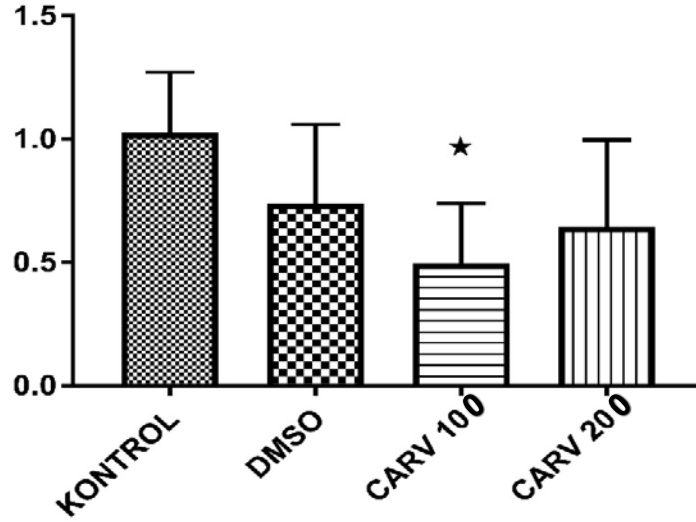
TRPM7 gen ekspresyonunun istatistiksel analizinde gruplar arası anlamlı farklılık saptanmamıştır.

**Tablo 4.3.5.a.** TRPM7 gen ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırması

Tukey'in Çoklu Karşılaştırma Testi	Ortalama Fark	Ortalamlar Arasındaki Farkın Güven Aralığı	Anlamlılık	Özet	P Değeri
KONTROL ile DMSO	-1,724	-4,544-1,097	(-)	Fark yok	0,3327
KONTROL ile CARV 100	0,3958	-2,425-3,216	(-)	Fark yok	0,9774
KONTROL ile CARV 200	-0,5195	-3,34-2,301	(-)	Fark yok	0,9513
DMSO ile CARV 100	2,12	-0,7011-4,94	(-)	Fark yok	0,1798
DMSO ile CARV 200	1,204	-1,617-4,025	(-)	Fark yok	0,6228
CARV 100 ile CARV 200	-0,9154	-3,736-1,905	(-)	Fark yok	0,7902

#### 4.3.6. TRPV6 Gen Ekspresyon Sonuçları

##### TRPV6 GENİ KAT ARTIŞLARI



**Şekil 4.3.6.a.** 100  $\mu\text{mol/l}$  ve 200  $\mu\text{mol/l}$  karvakrol uygulanmış DLD-1 insan kolon kanseri hücre hattında TRPV 6 gen ekspresyon sonuçları (\* $p < 0,05$ )

100  $\mu\text{M/l}$  karvakrol uygulanan grupta TRPV6 gen ekspresyonu kontrol ve DMSO grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşük bulunmuştur. 200  $\mu\text{M/l}$  karvakrol dozunda ise gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır.

**Tablo 4.3.6.a.** TRPV6 gen ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırması

Tukey'in Çoklu Karşılaştırma Testi	Ortalama Fark	Ortalamalar Arasındaki Farkın Güven Aralığı	Anlamlılık	Özet	P Değeri
KONTROL ile DMSO	0,2854	-0,214-0,7849	(-)	Fark yok	0,3985
KONTROL ile CARV 100	0,5283	0,05211-1,005	(+)	Fark var*	0,0265
KONTROL ile CARV 200	0,3802	-0,09602-0,8564	(-)	Fark yok	0,1471
DMSO ile CARV 100	0,2429	-0,2566-0,7423	(-)	Fark yok	0,5337
DMSO ile CARV 200	0,09476	-0,4047-0,5942	(-)	Fark yok	0,9498
CARV 100 ile CARV 200	-0,1481	-0,6243-0,3281	(-)	Fark yok	0,8178

#### 4.4. Western Blot Sonuçları

Karvakrol dozları uygulanması için hücreler tripsin ile kaldırılıp hücre sayıları hesaplanıp, 6'lı bölmeli kaplara alındı ve her bir bölmeye yaklaşık 500.000 hücre ekildi.

Sonrasında hücrelerin 24 saat çoğalması beklenip inverted mikroskop altında kontrol edildi ve her bir bölmede %85-90 yoğunlukta hücre olduğu görüldü.

Kontrol ve Dmsö gruplarına karvakrol uygulanmadı.

Karvakrol-100 ve Karvakrol-200 grupları 24 saat boyunca karvakrol uygulamasına maruz bırakıldı.

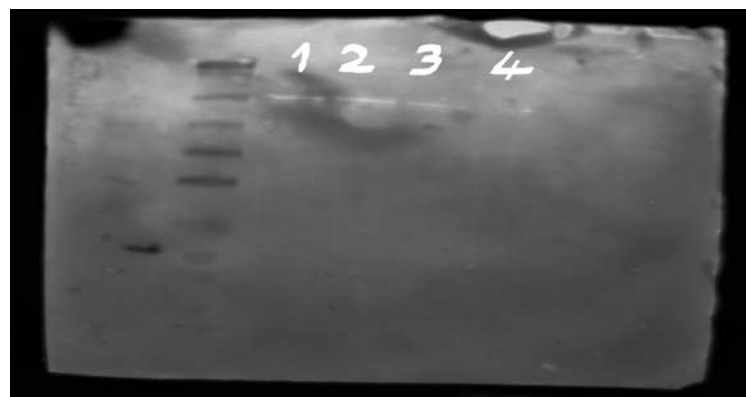
Karvakrol uygulanmasının 10. saatinde inverted mikroskopta incelendiğinde hücrelerin apoptotik hal almaya başladıkları görüldü ve 24 saatin sonunda hücrelerin büyük kısmının apoptozise gittiği gözlemlendi.

Protein izolasyonu öncesi 6'lı bölmeli kaplar içindeki hücreler soğuk PBS uygulaması sonrası cell scraper ile kazınarak her örnek 2 ml'lik ependorf tüplere alındı.

Sonrasında tüm gruplara protein izolasyon protokolü uygulandı.

Protein izolasyonu sonrası uygulanan Western Blot yöntemi ile gruplarda elde edilen sonuçlar şu şekilde gözlemlendi: Referans proteinimiz olan B-aktin bantları ilk sırada Kontrol grubu ve ikinci sırada Dmsö grubunda gözlenirken Karvakrol 100 grubunda az ve Karvakrol 200 grubunda ise neredeyse hiç bant gözlenmedi. Referans proteinimiz deney için yapmış olduğumuz manipülasyondan etkilendiği için Western Blot yöntemi kullanılmadı.

Benzer literatürlerde Western Blot yönteminde kullanılan protein B-aktin olduğundan referans protein olarak çalışmamızda B-aktin tercih edilmiştir. Mevcut zaman ve bütçe kısıtlılığından dolayı bu çalışmada yapılamamış olsa bile ileriki çalışmalarda karvakrol verilen hücrelerde referans protein olarak başka herhangi bir protein seçilebilmesi Western Blot yönteminin daha efektif şekilde yapılabilmesi açısından önem arz edebilir.



**Şekil 4.4.1** Gruplardaki Aktin Bantları

1. Kontrol Grubu 2. Dmsö Grubu 3. Karvakrol 100 Grubu 4. Karvakrol 200 Grubu

## 5. TARTIŞMA

Gastrointestinal sistemde en sık görülen malignite kolon adenokarsinomudur. Akciğer kanserinden sonra kanser nedenli ölümlerin ikinci sırasında kolorektal kanserler gelmektedir. En çok 60-70 yaş arasında ve erkeklerde kadınlara oranla daha sık gözlenmektedir. Kolorektal adenokarsinoma yol açan moleküler olaylar çok çeşitlidir ve hem genetik hem epigenetik kökeni vardır.

Çeşitli çalışmalar göstermiştir ki kalsiyum iyonunun hücrel döngüsünün bozulması kanser de dahil çeşitli hastalıklara yol açabilir.

Kanserdeki ana patolojilerin metabolik yeniden programlanma ve immün sistemden kaçış olduğu bilinmektedir. Bu patolojilerin ana düzenleyici yollarında da kalsiyum anahtar rol oynamaktadır. Kanser hücreleri normal hücrelerde olan kalsiyum homeostazisini değiştirir bunu da kalsiyum kanalları ve pompalarının hem işleyişini hem de sayısını düzenleyerek yaparlar. (3)

Hücrel kalsiyum yükselmelerindeki sıklık, şiddet ve süre kalsiyuma bağlı çeşitli değişik kodlar oluşturarak transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile hücrel çoğalma, gen transkripsiyonu ve migrasyon gibi süreçleri aktive eder. Bu sebeple de tümörejenik yolların, kalsiyum kanalları ve taşıyıcılarının değişmiş ekspresyonları veya anormal aktivasyonları ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. (7) . Kanser hücrelerinde özellikle proliferasyon ve invaziv özellikler kazandırması açısından kalsiyum önemli bir iyondur. (4,8)

Çeşitli kanserlerde bazı özel kalsiyuma geçirgen iyon kanallarının veya pompalarının artmış ekspresyonu gözlenmiştir. (7)

Kanser hücrelerinin de normal hücrelerle aynı kalsiyum kanalı, pompa ve değiştiricileri kullandığı düşünülmektedir. (14)

Kalsiyumun hücre içine girişini sağlayan L tipi kalsiyum kanalları, voltaj kapılı iyon kanalları ve TRP kanallarıdır. (13)

TRP kanalları mayalardan memelilere kadar tüm canlılarda bulunur evrimsel açıdan çok eski kanallardır. Bu kanallar selektif olmayan katyon kanallarıdır. Vücutta gerçekleşen çeşitli fizyolojik ve fizyopatolojik süreçlerde TRP kanallarının önemli rolleri her geçen gün artan çalışmalarla ortaya konmaktadır. TRP kanalları, çeşitli uyarılarla aktifleşebilmektedir. Bu uyarılar kimyasal, mekanik veya fiziksel uyarılar olabilir. Çoğu TRP kanalı kalsiyuma geçirgendir ve bu sebeple de kalsiyumun düzenleyici olarak rol aldığı çoğu yolda rol alırlar. (24)

TRP kanal aktivitesi ile genel olarak hücrede depolarizasyon oluşmaktadır. Bu depolarizasyon; ekstrasellüler kalsiyum girişi veya hücre içi kaynaklardan hücre sitoplazmasına kalsiyum salınımı ile olmaktadır. Bu depolarizasyon ile de proliferasyon, apoptozis ve çeşitli genlerin transkripsiyonu gibi önemli hücrel süreçler tetiklenmektedir. (25)

Hücre zarlarındaki kalsiyum kanallarının artmış ekspresyonunun, kalsiyum bağımlı proliferatif yollarını aktifleştirdiği ve böylelikle azalmış apoptozis ve tümörögenezise yol açtığı çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir (25,26,28) Son yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli kanser türlerinde TRP



kanal ekspresyonundaki artışlar sıklıkla bildirilmektedir. Bu bağlamda DLD-1 insan kolon kanseri hücre hattında TRP kanal aktiviteleri ve TRP kanallarının çok iyi bir modülatörü monoterpenik fenolik bileşen olan karvakrol arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık. Bu hücre hattında bu konuda yeterince çalışma olmaması da bu konuda çalışma isteğimizi artırdı. Çalışmamızda karvakrol etkisi altında TRPC1, TRPM7, TRPV6, TRPM5 gibi 4 farklı kanalın, kaspaz 9 ve kaspaz 3 proteinlerinin gen ekspresyonları yapmayı hedefledik.

Yaptığımız MTT sonuçlarına göre iki karvakrol dozu belirledik. Bu konuda literatürde çok geniş bir aralık olmasına karşın bizim hücre hattımızda etkili olacak dozu belirlemeye çalıştık. MTT sonuçlarına göre 100  $\mu\text{M}/\text{lt}$  ve 200  $\mu\text{M}/\text{lt}$  dozları seçtik.

Yaptığımız PCR analizlerinde, çalıştığımız bütün TRP kanallarının gen ekspresyonlarında 100  $\mu\text{M}/\text{lt}$  karvakrol dozunda azalma gördük. TRPM5 ve TRPV6 kanallarında bu azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma iken, TRPC ve TRPM7 kanallarında gözle görülür azalma şeklindedir, istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir. 200  $\mu\text{M}/\text{lt}$  karvakrol dozunda TRP kanal gen ekspresyonları 100  $\mu\text{M}/\text{lt}$  doz kadar azalma göstermemiş ve istatistiksel anlamlılık görülmemiştir. Çok farklı çalışmalarda karvakrolun etkilerini doza bağımlı olarak gösterdiği bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda da doza bağımlı bir sonuç görülmektedir. Karvakrolun etki mekanizmasını aydınlatmak üzere veriler elde etmek için yaptığımız kaspaz analiz sonuçları yine 100  $\mu\text{M}/\text{lt}$  dozda anlamlı sonuçlar vermiştir. Proapoptatik bir protein olan Kaspaz 3 100  $\mu\text{M}/\text{lt}$  dozda anlamlı dercede yükselmiştir. Kaspaz 9 da gözle görülür bir yükselme olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı sonuç vermemiştir. 200  $\mu\text{M}/\text{lt}$  doz karvakrol de kaspaz gen ekspresyonları TRP kanal sonuçlarına benzer şekilde anlamlı çıkmamıştır. Bu veriler sınırlı olmasına rağmen TRP kanallarının DLD-1 insan kolon kanseri hücre hattında etkili olabileceği ve karvakrol ile bu etkilerin modüle edilebileceği anlaşılmıştır.

TRPM4 ve TRPM5 kanalları intrasellüler kalsiyum ile aktive edilebilen seçici iyon kanallarıdır. (121) Vücudun çoğu yerinde TRPM5 kanalının kalsiyum aktivasyonlu ve selektif olmayan katyonik iyon akışlarından sorumlu olan kanallar arasında olduğu bulunmuştur. TRPM5 aktifleşmesi ile membran depolarize olmakta ve voltaj kapılı kanalların aktiviteleri ve iyon geçişini sağlayan çeşitli etkenler düzenlenmektedir. (122)

Yapılan bir çalışmada TRPM5 kanalının, intrasellüler kalsiyum konsantrasyonundaki değişim oranını algılayabildiği ve böylelikle de sitoplazma membran iletkenliğini etkileyebildiği bulunmuştur. (123) TRPM5 kanalının kalsiyuma olan duyarlılığının diğer TRP kanallarından daha yüksek olması intrasellüler kalsiyum artımı ile daha çok yönlü cevapların hücre içinde oluşmasını sağlar. (124,125)

TRPM5 mRNA'sının insan sindirim sisteminde bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. (126)

TRPM5 kanalının çeşitli çalışmalarda mide, ince bağırsak ve kolonda, fırçamsı kenar hücrelerinde ve duodonal bezlerin endokrin hücrelerinde bulunduğu bildirilmiştir. (127,128,129,130,131)

Yapılan çeşitli kanser araştırmalarında TRPM5 kanal gen ekspresyon

artışlarından söz edilmektedir.

Shapovalov ve arkadaşları TRPM5 kanalının çeşitli kanser türlerinde arttığını yaptıkları çalışmada göstermişlerdir. (24)

Yapılan çalışmada TRPM5 kanalı ekspresyonunun genetik olarak tümörigenezisi desteklediği yönünde kanıtlar mevcuttur. Wilms' tümörlü ve rabdomyosarkomlu hastalarda TRPM5 mRNA'sının yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir. (123)

TRPM5 kanalının deneysel olarak oluşturulmuş akciğer kanser metastazında ekspresyonunun artmış olduğu gözlenmiştir. Metastaz sürecinde gerekli olan metalloproteinaz sentezini arttırdığı bildirilmektedir. TRPM5 kanal inhibitörü verilmesi ile de tümör taşıyan farelerin akciğer metastazlarında belirgin azalma gözlenmiştir. (132) TRPM5 kanalının CD5 bulunan B hücreli lenfoma hastalarında da yüksek oranda eksprese edildiği bulunmuştur. (132)

TRPM5 kanalını diğer kanallardan ayıran bir özellik de diğer TRP kanalları kalsiyuma geçirgen iken, TRPM5 kanalı membranın potansiyeli etkilemek sureti ile membranın kalsiyuma olan geçirgenliği arttırıp azaltmaktadır. (133)

Yukarıdaki literatür bilgileri ışığında, TRP kanal ailesinden olan TRPM5 kanallarının kanser gelişim süreçlerinde önemli rolleri olduğu anlaşılmaktadır. Karvakrolün bizim çalışmamızda TRPM5 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltması en sevindirici bulgularımızdan olmuştur. Kaspaz seviyesindeki artışlarda bu inhibisyon ile apoptaza gidişte artış arasındaki ilişkiyi kuvvetlendirmektedir. TRPM5 kanallarının kanser süreçlerindeki rolleri ve karvakrol gibi çeşitli ajanlarla modülasyonları ile tedaviye katkıları kapsamlı çalışmalarla araştırılmalıdır. TRPC1 kanalları, TRP kanallarının memelilerde ilk keşfedilen türüdür ve beyin, düz kas, kalp, karaciğer, akciğer, dalak, börek, testis, over, endotel hücreleri ve salgı bezleri gibi birçok dokuda bulunmaktadır. Dokularda farklı aktivasyon mekanizmasına ve fizyolojik role sahip olduğu öne sürülmektedir (134;135).

TRPC1 kanalları depo kontrollü Ca<sup>2+</sup> kanalları arasında yer almakta ve aktivasyonuna deponun boşalması neden olsa da bu konudaki moleküler mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir (135).

TRP kanal modülatörü olan karvakrol, TRPC1 kanalı inhibisyonuna neden olan bir kimyasaldır (136).

TRPC1'in inhibisyonu ise [Ca<sup>2+</sup>] deki azalmaya neden olarak kaspaz-3 aktivasyonuna yol açmakta ve proapoptotik yolları aktive ederek apoptozisi tetikleyebilmektedir. (137)

TRPC1 kanallarının kanser ile ilişkileri birçok araştırmanın konusu olmuştur.

TRPC1 kanalının meme kanserinde, hipoksik koşullarda ekspresyonunu arttırdığı ve normal epitel hücrelerinin anormal mezenşimal hücre formlarına dönüşümünü hızlandırdığı saptanmıştır. (38)

İnvaziv duktal meme karsinomunda transforme edici büyüme faktörü-B (TGF-B) nın artan salınımı ile epitelyal hücrelerin mezenşimal hücrelere dönüşümünün arttığı bulunmuştur. (39)

Başka bir çalışmada TRPC1 kanalı üzerinden TGF-B'nın pankreas kanseri

hücrel hareketini arttırdığı ve TRPC1 geninin baskılandığı zaman bu sürecin ortadan kalktığı gösterilmiştir. (40)

TRPC1 gen baskılanması ile MCF-7 meme kanseri hücre hattında, G0/G1 hücre siklusu basamağında hücrel proliferasyonun sekteye uğradığı görülmüştür. (41)

Nazofarenks karsinomunda, TRPC1 kanalı üzerinden hücrel invazyonun ve matriks metalloproteinaz-2 ve matriks metalloproteinaz-9 üretiminin düzenlendiği gösterilmiştir. (42)

Glioblastoma ve tiroid kanserinde, TRPC1 kanalının hücrel migrasyon ve kemotaksi ile ilgili olduğu gösterilmiştir. (43,44) TRPC1 kanalı transforme olmuş epitel hücrelerinde migrasyonda rol oynamaktadır. TRPC1 geni baskılandığında ise hücrenin hareket kabiliyeti için gerekli dokusal mekanik uyarıları alamadığı ve hücrel hareketi sağlayan lamellopodal aktivitenin bozulmuş olduğu gözlenmiştir. (45,46)

Bizim çalışmamızda TRPC1 gen ekspresyonunda 100 µM/lit dozda kontrole göre gözle görülen belirgin bir azalma görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Bu çarpıcı azalma belki tekrarlanan deneyler ve farklı dozlarda anlamlı sonuçlar verebilir. Bu konuda ileri çalışmalar umut verici olabilecektir.

TRPV6 kanalları kalsiyum ve sodyuma karşı seçici geçirgen özellikleri ile diğer TRP kanallarından farklı kanallardır çünkü diğer TRP kanalları genelde iki değerlikli tüm katyonlara karşı geçirgendir. (138)

TRPV6 kanalının sodyum ile karşılaştırıldığında kalsiyuma daha çok selektif olduğu gösterilmiştir. (138)

TRPV6 kanalı ile kalsiyum girişinin hem ekstrasellüler hem intrasellüler kalsiyum ile regüle edilebildiği gösterilmiştir. (139,140)

TRPV6 iyon kanalının depo aracılı kalsiyum iyon girişinden sorumlu olan kanallar arasında olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. (141,142,143,144)

TRPV6 kanalının biyolojik fonksiyonlarından bazılarının bağırsak, böbrek ve plesentada bulunan epitelyal hücrelerinden transellüler kalsiyum geçisini düzenlemek olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. (138,125,145)

Yapılan bir çalışmada vaniloid ailesinden TRPV1 den TRPV6 ya kadar altı katyonik kanal olduğu ve kolon hücrelerinde TRPV1, TRPV3 ve TRPV6'nın eksprese edildiği bulunmuştur. TRPV1 ve TRPV3 ün kolon ve kolorektal hücrelerde sentez miktarları aynı iken TRPV6 ın kolorektal hücrelerdeki sentez miktarının normal kolonik hücrelerden daha çok olduğu bildirilmiştir. (146)

TRPV6 kanalı aktif bir kanaldır ve kanalın fonksiyonu ekspresyon seviyesi ile bağlantılıdır ve ekspresyonu da sıkı şekilde kontrol edilmektedir. Normal dokularda TRPV6 apikal membranda eksprese edilir ve hücreye kalsiyum girişinde anahtar bir rol oynar. (147)

TRPV6 kanalının ekspresyonunun kanser gelişimi olan dokularda artmış olduğunu bildiren çok sayıda çalışma mevcuttur. LNCaP ve PC-3 gibi prostat kanser hücre hatlarında, SW-480 kolorektal kanser hücre hattında ve K-562 kronik myeloid lösemi hücre hatlarında TRPV6 kanal ekspresyonlarında artış gözlenmiştir. (138)

Meme kanseri dokusunda, kolon, tiroid ve over karsinomlarında

karsinomlarında TRPV6 mRNA seviyelerinde normal dokuya oranla kat artışları bildirilmiştir. (148,149,150,144,151,152)

HEK293 hücre hattında da TRPV6 kanallarının hücre proliferasyon hızını arttırdığı gözlenmiştir. (153)

Prostat kanserinde TRPV6 kanal ekspresyonunun tümör derece ve invazivliği ile korele olduğu da insanlarda alınan biyopsi materyallerinde gösterilmiştir. (138,144)

Yapılan çalışmalarda immunohistokimyasal yöntemlerle kolon, meme, over ve pankreas karsinomlarında normal dokuya oranla TRPV6 kanal ekspresyonunun yükseldiği gözlenmiştir ve TRPV6 kanal aracılı kalsiyum girişinin, kalsiyuma bağımlı tümöral proliferasyonu arttırdığı bulunmuştur. (154)

Östrojen reseptör antagonisti tamoksifenin TRPV6 kanal inhibisyonu ile TRPV6 kalsiyum transportunu azaltarak meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu baskılayıcı etkisi olduğu gösterilmiştir. (149)

TRPV6 kanal ekspresyonu ile kalsiyum kanalının prostat kanseri ve diğer tümör hücreli dokularda proliferasyonu arttırdığı ve apoptozise direnç sağladığı öngörülmüştür. (155)

TRPV6 kanalının bu sebeple onkogen olabileceği ve de tümör takibinde tümörün invazivliğini gösterebilecek önemli ve tanısal bir belirteç olabileceği düşünülmüştür. (155)

Yapılan çalışmalarda TRPV6'nın meme kanserinde migrasyon ve kemotaksi ile ilgili olduğu ve invaziv bölgelerde ekspresyonunun yüksek olduğu bulunmuştur. (156)

Yapılan çeşitli çalışmalarda; skuamoz hücreli akciğer kanseri, prostat kanseri ve pankreas kanserlerinde, TRPV6 inhibisyonu yapan ajanlar ile kalsiyum aracılı kanser proliferasyonu ve metaztasında baskılanma olup olmadığı test edilmeye çalışılmıştır. (157,158,159)

Mevcut literatürler ışığında TRPV6 kanalının diğer TRP kanallarına göre vücutta daha sınırlı yerlerde bulunduğu, bu yerlerde de hormonal kontrole açık yerler olduğu ve kontrolünün de muhtemel hormonlar aracılığı ile olabileceği varsayımında bulunabiliriz.

TRPV6 kanalının aktivasyonu ile de hücrede kalsiyum girişinin arttığı ve kalsiyum ile tetiklenen hücresel süreçlerin başladığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızda, Karvakrol 100  $\mu$ M /lt dozunda TRPV6 ekspresyonunun, kontrol grubuna oranla önemli dercede azaldığı bulunmuştur, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma söz konusudur. Karvakrolun TRPV 6 kanallarını inhibe etmesi ve proapoptotik belirteçlerin yükselmesi literatürle uyumlu bilgilerdir. Karvakrol verilen kolon kanseri hücrelerinde TRPV6 kanal inhibisyonu ile proapoptotik etkilerin görüldüğü ve bunun da muhtemelen kalsiyumun hücre içine girişinin kısıtlanması ile birtakım hücresel yolların inhibe olması ve hücrelerin apoptozise gitmesi üzerinden gerçekleştiği varsayımında bulunabiliriz.

TRPM7 kanalı ve pek çok patolojik olay arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışma vardır. Meme kanserinde epitelyal hücrelerin mezenşimal hücrelere dönüşümünün, transkripsiyon faktörü STAT-3'ün fosforilasyonu ile TRPM7 kanalına bağımlı şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir. (56)

Meme kanseri hastalarında TRPM7 kanalının artmış ekspresyonu ile

hastalardaki kötü prognoz arasında ilişki kurulmuş ve kanal geninin inhibisyonu ile kanser hücrelerinin göç etmesi arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. TRPM7 kanal geni inhibe edildiğinde kanser hücrelerinin göç etme kabiliyeti azalmıştır. (57)

TRPM7 kanal ekspresyonu ile hücre göçü ve invazyon arasındaki bağlantının da MAPK sinyal yolağının aktivasyonu üzerinden olabileceği öne sürülmüştür. (58)

Over kanseri hücrelerinde TRPM7 kanalının hücresele göçü ve hücresele proliferasyonu kolaylaştırdığı bulunmuştur. (59)

Kanser süreçleri ile yakından ilişkilendirilen TRPM7 kanallarının bizim çalışmamızda her iki karvakrol dozunda da gen ekspresyonunda azalmalar görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Bu konuda daha fazla çalışma yapmakta fayda vardır.

Karvakrolun farklı olaylarda doza ve koşullara göre farklı mekanizmaları harekete geçirebildiği çalışmalarda bildirilmektedir. Karvakrolun birçok patolojik olayda farklı mekanizmalarla iyileşme sağladığı, hücre korumasını artırmak, proliferatif ve antiproliferatif mekanizmaları harekete geçirmek, oksijen varlığı ve yokluğuna göre apoptatik veya antiapoptatik yolları harekete geçirmek gibi özellikleri bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada oral kanser hücrelerine 200  $\mu\text{M}/\text{lt}$  ile 600  $\mu\text{M}/\text{lt}$  arası karvakrol tedavisi uygulanmış ve hücrelerin apoptozise gittiği görülmüştür. Karvakrolün doz bağımlı şekilde Kaspaz 3 miktarında artışa neden olduğu gözlenmiştir. (160)

Yapılan başka bir çalışmada ise glioblastoma hücrelerine 200  $\mu\text{M}/\text{lt}$  ile 600/ $\text{lt}$   $\mu\text{M}$  arası verilen karvakrol ile Kaspaz 3 aktivitesi ile korele şekilde hücrelerin apoptozise gittikleri bulunmuştur. (161)

Meme kanseri hücrelerine ana bileşeni karvakrol olan bir ajan verildiğinde Kaspaz 3 aktivitesi de eş zamanlı ölçülmüş ve aktivitedeki artışla paralel hücrelerin apoptozise gittikleri gözlenmiştir. (162)

Promyelositik ve Jurkat T lenfoma hücreleri ile yapılmış başka bir çalışmada da karvakrolün Kaspaz 3 aktivasyonunu arttırarak hücreleri apoptozise götürdüğü bildirilmiştir. (163)

Karvakrolün, kemoterapiye dirençli akciğer karsinomu hücrelerinde Kaspaz 3 miktarını yükselterek apoptozisi indüklediği bulunmuştur. (164)

Yapılan başka bir çalışmada da karvakrol uygulanan prostat kanseri hücrelerinde eş zamanlı Kaspaz 3 artışı ile hücrelerin apoptozise gittiği görülmüştür. (165)

Kaspaz 3 proteininin proapoptotik bir protein olduğu ve yapılan çalışmalarda da karvakrolün çeşitli kanser türlerinde Kaspaz 3 miktarını arttırarak, kanser hücrelerini apoptozise götürdüğü saptanmıştır.

Biz de çalışmamızda karvakrol 100  $\mu\text{M}/\text{lt}$  grubunda hücrelerin apoptozise gittiğini gözlemledik ve kontrol grubuna oranla Kaspaz 3 gen ekspresyonunda anlamlı artış saptadık. Kaspaz 9 gen ekspresyonunda da artış olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık çıkmamıştır.

Literatürlerde yer alan bilgilerle uyumlu olarak karvakrolün çeşitli kanser türlerinde apoptozise giden yolları uyararak kontrolsüz hücre çoğalmasını engellediğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, İlk kez DLD-1 insan kanser hücre hattında 4 farklı TRP

kanalının gen ekspresyonundaki değişimler, karvakrolun TRP kanalları üzerine yaptığı inhibitör etki ve paralel olarak kaspaz düzeylerinde yükselmeler gösterilmiştir. TRP kanallarının çeşitli kanser gelişim süreçlerinde oynadıkları rolü ve karvakrol gibi modülatör kimyasal ajanlar etkisinde hücrel fonksiyon değişimlerini moleküler mekanizmalarıyla açıklayabilecek araştırmaların artırılması gerektiği düşüncesindeyiz.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Gastrointestinal sistemde en sık görülen malignite kolon adenokarsinomudur. Kolorektal adenokarsinoma yol açan moleküler olaylar çok çeşitlidir ve hem genetik hem epigenetik kökeni vardır.

Çeşitli çalışmalar göstermiştir ki kalsiyum homeostazisinin bozulması kanser dahil çeşitli hastalıklara yol açabilir. Kanser hücreleri normal hücrelerde olan kalsiyum homeostazisini değiştirirler bunu da kalsiyum kanalları ve pompalarının hem işleyişini hem de sayısını düzenleyerek yaparlar. Kolorektal kanserin hücresel düzeydeki etyopatogenezinde kalsiyumun hem miktar hem işlev ile önemli olduğu pek çok araştırmanın konusu olmuştur. Bu bilgiler ışığında DLD-1 insan kolorektal hücre hattında hücrenin kalsiyum girişi ve kalsiyum üzerinden düzenlenen mekanizmalarda önemli rol oynayan TRP kanallarının rolünü ve bu kanalların en iyi modulatörü olan monoterpenik fenolik bir bileşik olan karvakrolun etkilerini araştırmayı amaçladık.

100 ve 200  $\mu\text{mol/l}$ t dozlarda kullandığımız karvakrolün mikroskopik bakıda 24 saatten kısa bir süre içinde kolorektal kanser hücrelerini apoptozise götürdüğünü gördük.

Çeşitli kanser türlerinde tümörejenik özellikleri ve gen ekspresyonlarında artışlar olduğu bildirilen TRPM5 ve TRPV6 kanallarının 100  $\mu\text{mol/l}$ t doz karvakrol uygulaması ile anlamlı bir şekilde inhibe olduğunu, gen ekspresyonlarının azaldığını saptadık. Karvakrol 100  $\mu\text{mol/l}$ t grubumuzda, kontrol grubumuza göre proapoptotik olarak bilinen Kaspaz 3 gen ekspresyonunun artışı da bulgularımızın birbirini desteklediğini göstermesi açısından önemlidir. TRPM5, TRPV6 kanallarındaki istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon azalması TRPC1 ve TRPM7 gen ekspresyonlarındaki anlamlı olmayan ama çarpıcı gözle görülen azalmaların karvakrolun TRP kanallarını modüle ederek hücrelerin kalsiyum bağımlı yollarını etkilediği ve apoptozisi aktive ettiği hipotezimizi desteklemektedir. Western Blot çalışmalarımızı iki kez tekrarlamamıza rağmen başarılı sonuçlar alamayışımız ve sürenin kısıtlı olması bu konuda daha destekleyici bilgilere ulaşmamızı engellemiştir. TRP kanallarının kanser patogenezindeki rollerini anlamak ve bunları modüle edebilen ajanlarla yeni tedavi stratejileri geliştirebilmek konusunda bir bakış açısı oluşturan çalışmamızın ileri moleküler tekniklerle sürdürülmesinde fayda olacağı kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Kumar, V. Robbins Temel Patoloji. İstanbul: Nobel Kitabevleri;2013.
2. T. R. Harrison Harrison's Principles of Internal Medicine Türkiye. İstanbul: Nobel Kitabevleri;2013.
3. Rodrigues T.Na/Ca exchangers: Unexploited oppurtunities for cancer therapy? *Biochemical Pharmacology*.2019;163:357-61.
4. Berridge M J.The versatility and universalitiy of calcium signaling, *National Review Molecular Cell Biology*.2000;1:11-21.
5. Pozzan T.Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores, *Physiology Review* 1994;74:595-636.
6. Capiod T.Cell proliferation, calcium influx and calcium channels. *Biochimie*.2011;93:2075-79.
7. Cui C.Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharmeceutica Sinica B* .2017;7:3-17.
8. Csordas G.Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Molecular Cell*.2010;39:121–32.
9. Parkash J.Calcium wave signaling in cancer cells. *Life Sciences* .2010;87:587–95.
10. McConkey DJ.The role of calcium in the regulation of apoptosis.



Biochemical and Biophysical Research Communications. 1997; 239:357–66.

11. Baudouin-Legros M. Effect of ouabain on CFTR gene expression in human Calu-3 cells. *American Journal of Cell Physiology*. 2003;284:C620–6.

12. Kondratskyi A. Calcium-permeable ion channels in control of autophagy and cancer. *Frontiers Physiology*. 2013;4:1-12.

13. Vandewalle B. Vitamin-D3 derivatives and breast-tumor cell growth: effect on intracellular calcium and apoptosis. *International Journal of Cancer*. 1995;61:806–11.

14. Liu LH. Squamous cell tumors in mice heterozygous for a null allele of *Atp2a2*, encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform 2 Ca<sup>2+</sup> pump. *Journal of Biology and Chemistry*. 2001;276:26737–40.

15. Krebs J. The plethora of PMCA isoforms: alternative splicing and differential expression. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015;1853:2018–24.

16. Dellis O. Modulation of B-cell endoplasmic reticulum calcium homeostasis by Epstein–Barr virus latent membrane protein-1. *Molecular Cancer*. 2009;8:59.

17. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annual Review Cell and Developmental Biology*. 2000;16:521–55.

18. Dziegielewska B. T-type calcium channels blockers as new tools in cancer therapies. *Pflugers Archives*. 2014;466:801–10.

19. Ohkubo T. T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *International Journal of Oncology*.2012;41:267–75.
20. Latour I.Expression of T-type calcium channel splice variants in human glioma. *Glia*. 2004; 48:112–9.
21. Prevarskaya N.TRP channels in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*.2007;1772:937–46.
22. Ouadid-Ahidouch H.TRP channels: diagnostic markers and therapeutic targets for breast cancer? *Trends Molecular Medicine*.2013;19:117–24.
23. Ding X.Targeting TRPC6 channels in oesophageal carcinoma growth. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*.2010;14:513–27.
24. Shapovalov G.TRP channels in cell survival and cell death in normal and transformed cells. *Cell Calcium*.2011;50:295-302
25. Roderick H L.Ca<sup>2+</sup> signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival. *Nature Reviews of Cancer*.2008;8:361-75.
26. M.J. Berridge M J.Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.2003;4:517–29.
27. Rizzuto R.Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene*.2003; 22:8619- 27.

28. Monteith G R. D. McAndrew. Calcium and cancer: targeting Ca<sup>2+</sup> transport, *Nature Reviews of Cancer*.2007;7:519–30.

29. Smani T. Functional and physiopathological implications of TRP channels. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*.2015;1853: 1772–82.

30. Kondratskyi A. Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*.2015;1848: 2532–46.

31. Fliniaux I. TRPs and Ca in cell death and survival. *Cell Calcium*.2018;69:4-18.

32. Petho Z. Mechanosensitive ion channels push cancer progression. *Cell Calcium*.2019;80:79-90.

33. Ranade S S. Mechanically activated ion channels. *Neuron*. 2015; 87:1162-79.

34. Prevarskaya N. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Molecular Medicine*.2010;16:107–21.

35. Nielsen N. TRP channels and STIM/ORAI proteins: sensors and effectors of cancer and stroma cell migration. *British Journal of Pharmacology*.2014;171:5524–40.

36. Du G J. The combination of TRPM8 and TRPA1 expression causes an invasive phenotype in lung cancer. *Tumour Biology*.2014;35:1251–61.

37. N. Takahashi N. Cancer cells Co-opt the neuronal redox-sensing channel TRPA1 to promote oxidative-stress tolerance. *Cancer Cell*.2018;33:985–1003e1007.

38. Azimi I. TRPC1 is a differential regulator of hypoxia-mediated events and Akt signalling in PTEN-deficient breast cancer cells. *Journal of Cellular Science*.2017;130:2292–2305.

39. Schaar A. TRPC1-STIM1 activation modulates transforming growth factor beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncotarget*.2016;7:80554–67.

40. Dong H. Molecular mechanisms underlying Ca<sup>2+</sup>-mediated motility of human pancreatic duct cells. *American Journal of Physiology Cell Physiology*.2010;299:1493–1503.

41. Faouzi M. Functional cooperation between KCa<sub>3.1</sub> and TRPC1 channels in human breast cancer: Role in cell proliferation and patient prognosis. *Oncotarget*.2016;7:36419–35.

42. He B. Silencing TRPC1 expression inhibits invasion of CNE2 nasopharyngeal tumor cells. *Oncology Report*.2012;27:1548–54.

43. Asghar M Y. Transient Receptor Potential Canonical 1 (TRPC1) Channels as Regulators of Sphingolipid and VEGF Receptor Expression: implications for thyroid cancer cell migration and proliferation. *Journal Biology and Chemistry*.2015;290:16116–31.

44. Lepannetier S. Sphingosine-1-phosphate-activated TRPC1 channel controls chemotaxis of glioblastoma cells. *Cell Calcium*.2016;60:373–83.

45. Fabian A. Transient receptor potential canonical channel 1 impacts on mechanosignaling during cell migration. *Pflugers Archives*.2012;464:623–30.
46. Fabian A. TRPC1 channels regulate directionality of migrating cells. *Pflugers Archives*.2008;457:475–84.
47. Chigurupati S. Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness. *Cancer Research*.2010;70:418–27.
48. Yue D. Expression of TRPC6 in benign and malignant human prostate tissues. *Asian Journal of Andrology*.2009;11:541–547.
49. Zhang S S. High expression of transient potential receptor C6 correlated with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Medical Oncology*.2013;30:607.
50. Bavi N. Principles of mechanosensing at the membrane interface, in: R.M. Epanand, J.-M. Ruysschaert (Eds.), *The Biophysics of Cell Membranes: Biological Consequences*. Springer, Singapore,2017;85–119.
51. Adapala R K. Activation of mechanosensitive ion channel TRPV4 normalizes tumor vasculature and improves cancer therapy. *Oncogene*.2016;35:314-22.
52. Xie R. Calcium promotes human gastric Cancer via a novel coupling of calcium-sensing receptor and TRPV4 channel. *Cancer Researches*.2017;77:6499–6512.
53. Lee W H. TRPV4 regulates breast Cancer cell extravasation, stiffness and actin cortex. *Scientific Reports*.2016;6:27903.

54. Okada Y. Loss of TRPV4 function suppresses inflammatory fibrosis induced by Alkali-Burning mouse corneas. *PLoS One*.2016;11:e0167200.
55. Zhan L. The role of TRPV4 in fibrosis. *Gene*; 2018;642:1–8
56. Davis F M. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene*.2014;33:2307–16.
57. Middelbeek J. TRPM7 is required for breast tumor cell metastasis. *Cancer Researches*.2012;72:4250–61.
58. Meng X. TRPM7 mediates breast cancer cell migration and invasion through the MAPK pathway. *Cancer Letters*.2013;333:96–102.
59. Wang J. TRPM7 is required for ovarian cancer cell growth, migration and invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.2014;454:547–53.
60. Lai P K. Antimicrobial and Chemopreventive Properties of Herbs and Spices. *Current Medicinal Chemistry*.2004;11:1451-60.
61. Khan n. Apoptosis by dietary factors; the suicide solution for delaying cancer growth. *Carcinogenesis*.2007;28:233-39.
62. Khan H Y. A prooxidant mechanism for anticancer and chemopreventive properties of plant polyphenols. *Current Drug Targets*.2012;13:1738-49.
63. DeVincenzi M. Constituents of aromatic plants. *Fitoterapia*.2004;75:801-4.

64. Basen KH. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*. 2008 ;14:3106-19.
65. Sokmen M. In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *Food Chemistry*. 2004;52:3309-12.
66. Rodrigues MR. Chemical composition and extraction yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub and supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52:3042-7.
67. Ramasubramania RR. Medicinally potential plants of labiate family; an overview. *Research Journal of Medicinal Plant*. 2012;6:203-13.
68. Ultee A. Mechanism of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied Environmental Microbiology*. 1999;65:4606-10.
69. Chan AS. Carvacrol and eugenol differentially stimulate intracellular Ca mobilization and mitogen-activated protein kinases in Jurkat T cells and monocytic THP-1 cells. *Plant Medicine*. 2005;71:634-9.
70. Luo Y. Carvacrol alleviates prostate cancer cell proliferation, migration, and invasion through regulation of PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*. 2016;5:1-11.
71. Dai W. Carvacrol suppresses proliferation and invasion in human oral squamous cell carcinoma. *Oncotargets*. 2016;9:2297-2304
72. Mastelic J. Comparative study on the antioxidant and biological

activities of carvacrol, thymol and eugenol derivatives. *Journal Agricultural Food and Chemistry*.2008;56:3989-96.

73. Ait-Mubarek L.Cytotoxic effect of essential oil of thyme on the IGR-OV1 tumor cells resistant to chemotherapy. *Brazilia Journal of Medical Biology Researches*.2007;40:1537-44.

74. Koparal A T.Effects of carvacrol on a Human Non-Small Cell Lun Cancer (NSCLC) cell line. *Cytotechnology*.2003;43:149-54

75. Horvathova E.Study of cytotoxic, genotoxic and DNA protective effects of selected plant essential oils on human cells cultured in vitro. *Neuro Endocrinologic Letters*.2006;27:44-47.

76. Arunasree KM.Antiproliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line. *Phytomedicine*.2010;17:581-88.

77. Mehdi SJ.Cytotoxic effect of carvacrol on human cervical cancer cells. *Biology and Medicine*.2011;3:307-12.

78. Ozkan A. A comparative study of the antioxidant prooxidant effects of carvacrol and thymol at various concentrations on membrane and DNA of parentaşdrug resistant H1299 cells. *National Product Communications*.2012;7:1557-60.

80. Yin QH.Antiproliferative and proapoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG2.*Cytotechnology*.2012;64:43-51.

81. Al-Fatlawi AA.Cytotoxicity and preapoptotic activity of carvacrol on human breast cancer cell line MCF-7.*World Journal of Pharmalogical Sciences*.2014;2:1218-23.

82. Fan K.Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis



in human colon cancer cells. *Anticancer Drugs*.2015;26:813-23.

83. Bhakkiyalakshmi E. Carvacrol induces mitochondria mediated apoptosis in HL-660 promyelocytic and Jurkat T Lymphoma cells. *European Journal of Pharmacology*.2016;772:92-8.

84. Aydın S. Modulating effects of thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*.2005;53:1299-1305.

85. Rezvanfar M. Protection of cyclophosphamide induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free radical toxic stress. *Human and Experimental Toxicology*.2008;27:901-10.

86. Özkan A. A comparative study of the antioxidant, prooxidant effects of carvacrol and thymol at various concentrations on membrane and DNA of parental and drug resistant H1299 cells. *National Product Community* 2012; 7:1557-60.

87. Aristatile B. Pharmacological effects of carvacrol on D galactosamine induced mitochondrial enzymes and DNA damage by single cell gel electrophoresis. *Journal National Medicine*.2011;65:568-77.

88. Aristatile B. Protective effect of carvacrol on oxidative stress and cellular DNA damage induced by UVB irradiation in human peripheral lymphocytes. *Journal of Biochemistry Molecular Toxicology*.2015;29:497-507.

89. Quintero R. Antigenotoxic effect against ultraviolet radiation induced DNA damage of the essential oils from *Lippia* species. *Photochemistry Photobiology*.2017;93;1063-72.

90. Güneş-Bayır A. Effects of natural phenolic compound carvacrol on the human gastric adenocarcinoma (AGS) cells in vitro. *Anticancer Drugs*.2017;28:522-30.

91. Mahtaj LG. The effect of carvacrol on systemic inflammation in guinea pigs model of COPD induced by cigarette smoke exposure. *Pharmacological Reports*.2015;67:140-5.

92. Andersen A. Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol-p-cresol-isopropyl-cresols-thymol-o-cymen-5-ol, and carvacrol. *International Journal of Toxicology*.2005;25:29-127.

93. Baranauskaite J. The influence of different *Oregano* species on the antioxidant activity determined using HPLC postcolumn DPPH method and anticancer activity of carvacrol and rosmarinic acid. *Biomedicine Research International*.2017;1681392.

94. Giannenas I. Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout. *Aquaculture*.2012;350:26-32.

95. Klaunig JE. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review Pharmacology and Toxicology*.2004;44:239-67.

96. Jackson PE. Associations between tissue specific DNA alkylation, DNA repair and cell proliferation in the colon and colon tumour yield in mice treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis*.2003;24:527-33.

97. Sivaranjani A. Chemopreventive effect of carvacrol on 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*.2016;12:755-62.

98. Altuntaş F. Real time cell analysis of the cytotoxicity of *Origanum acutidens* essential oil on HT-29 and HeLa cell lines. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*.2017;14:29-33.

99. Spyridopoulou K. Extraction, chemical composition and anticancer potential of *origanum onites* L. Essential oil. *Molecules*.2019;24:2612.

100. Joca HC. Carvacrol modulates voltage-gated sodium channels kinetics in dorsal root ganglia. *European Journal of Pharmacology*.2015;756:22-29.

101. Magyar J. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *European Journal of Pharmacology*.2004;487:29-36.

102. Dantas BPV. Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvacrol in normotensive rat. *Vascular Pharmacology*.2015;67-69:48-58.

103. Macianskiene R. Characterization of Mg regulated TRPM7-like current in human atrial myocytes. *Journal of Biomedical Sciences*.2012;19:75.

104. Chen W. TRPM7 inhibitor carvacrol protects brain from neonatal hypoxic-ischemic injury. *Molecular Brain*.2015;8:11.

105. Xu H. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nature Neuroscience*.2006;9:628-35.

106. Zygmunt PM. TRPA1 Handbook of Experimental Pharmacology.2014;222:583-630.

107. Jardin I. TRPs in pain sensation. *Frontiers Physiology*; 2017;8:392.
108. Basbaum A I. Cellular and molecular mechanism of pain. *Cell*.2009;139:267-84.
109. Zhao R. Versatile roles of intracellularly located TRPV1 channel. *Journal of Cellular Physiology*.2017;232:1957-65.
110. Caterina M J. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*.1999;398:436-41.
111. Wang Y Y. The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. *Journal of Biology and Chemistry*.2008;283:32691-703.
112. Stock K. Neurotrophin precursor cells induce cell death of high grade astrocytomas through stimulation of TRPV1. *National Medicine*.2012;18:1232-38.
113. Pecze L. Molecular Surgery concept from bench to bedside: a focus on TRPV1 positive pain sensing neurons. *Frontiers Physiology*.2017;8:378.
114. Davies J W. Pharmacology of capsaicin-anandamide-N-arachidonoyl-dopamine-evoked cell death in a homogeneous transient receptor potential vanilloid subtype 1 receptor population. *British Journal of Anaesthesia*.2010;104:596-602.
115. Kim S R. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vivo and in vitro via calcium mediated mitochondrial damage and cytochrome c release. *Journal of Immunology*.2006;177:4322-29.

116. Gallego-Sandin S. The endoplasmic reticulum of dorsal root ganglion neurons contains functional TRPV1 channels. *Journal of Biology and Chemistry*. 2009;284:32591-601.

117. Dedov V N. Capsaicin induced depolarisation of mitochondria in dorsal root ganglion neurons is enhanced by vanilloid receptors. *Neuroscience*. 2001;103:219-26.

118. Dedov V N. Mitochondrial calcium accumulation following activation of vanilloid (VR1) receptors by capsaicin in dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*. 2000;95:183-88.

119. Hamilton N B. Proton gated Ca permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia. *Nature*. 2016;529:523-27.

120. Saghy E. TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination-A new target against oligodendrocyte apoptosis. *Glia*. 2016;64:2166-80

121. Guinemard R. The Non Selective Monovalent Cationic Channels TRPM4 and TRPM5. *Transient Receptor Potential Channels*. 2010;704:147-171

122. Liedtke WB. *The Ca<sup>2+</sup>-Activated TRP Channels: TRPM4 and TRPM5*. United Kingdom: CRC Press/Taylor and Francis; 2007.

123. Prawitt, D. Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression. *Human Molecular Genetics*. 2000;9:203-16.

124. Yue L. CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature*.2001;410:705–9.

125. Bianco S. Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the TRPV6 calcium channel gene. *Journal of Bone and Mineral Research*.2007;22:274–85.

126. Fonfria, E. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*.2006;26:159-78.

127. Bezençon C. Murine intestinal cells expressing Trpm5 are mostly brush cells and express markers of neuronal and inflammatory cells. *Journal of Comparative Neurology*.2008;509:514–25.

128. Kaske S. TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC Neuroscience*.2007;8:49.

129. Kokrashvili Z. Release of endogenous opioids from duodenal enteroendocrine cells requires Trpm5. *Gastroenterology*.2009;137:598–606.

130. Young R. Expression of taste molecules in the upper gastrointestinal tract in humans with and without type 2 diabetes. *Gut*.2009;58:337–346.

131. Suguro M. Expression profiling analysis of the CD5+ diffuse large B-cell lymphoma subgroup: development of a CD5 signature, *Cancer Sciences*.2006;97:868–74.

132. Maeda T. TRPM5 mediates acidic extracellular pH signaling and TRPM5 inhibition reduces spontaneous metastasis in mouse B16-BL6

melanoma cells. *Oncotarget*.2017;8:78312–26.

133. Fleig A. *Trends Pharmacologic Sciences*.2004;25:633.

134. Minke B. TRP channel proteins and signal transduction. *Physiologic Review*.2002;82:429-72.

135. Eraç Y. Kalsiyumun çok yönlü işlevselliğinde TRPC iyon kanallarının rolü. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*.2009;28:161-83.

136. Parnas M. Carvacrol is a novel inhibitor of *Drosophila* TPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell Calcium*.2009;45:300-9.

137. Morah J. Caspase 3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *Journal of Neurochemistry*.1999;73:568-77.

138. Wissenbach U. Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *The Journal of Biological Chemistry*.2001;276: 19461–8.

139. Bodding M. Ca<sup>2+</sup> dependence of the Ca<sup>2+</sup>-selective TRPV6 Channel. *The Journal of Biological Chemistry*.2004;279:36546–52.

140. Peng J. B. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *The Journal of Biological Chemistry*.1999;274:22739–46.

141. Vanden Abeele F. Store operated  $\text{Ca}^{2+}$  current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  transporter type 1. *The Journal of Biological Chemistry*.2003;278:15381–9.

142. Kahr H.R. CaT1 knock-down strategies fail to affect CRAC channels in mucosal-type mast cells. *The Journal of Physiology*.2004;557:121–132.

143. Vanden Abeele F. Two types of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*.2004;279:30326–37.

144. L. Zhuang. *Laboratory Investigations*.2002.82;12:1755.

145. Bowen CV. In vivo detection of human TRPV6-rich tumors with anti-cancer peptides derived from sorbicidin. *Plos ONE*.2013;8: e58866.

146. Abel M. The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: regulation and implications for disease. *Archives of Pharmacology*. 2005;371:295–306.

147. Liberati S. Oncogenic and anti-oncogenic effects of transient receptor potential channels. *Current Topics of Medicinal Chemistry*.2013;13:344–66.

148. Peng J. B. CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.2001;282:729-34.

149. Bolanz K. A. The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Molecular Cancer Therapeutics*.2008;7:271-9.



150. Fixemer J. T. Expression of the Ca<sup>2+</sup> selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene*.2013;22:7858–61.

151. Wissenbach U. TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca<sup>2+</sup> channel expression, *Biochemical and Biophysical Research Communications*.2004;322:1359–63.

152. V. Lehenkyi. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca<sup>2+</sup> /NFAT-dependent pathways. *Oncogene*.2007;26:7380–5.

153. Bodding M. The recombinant human TRPV6 channel functions as Ca<sup>2+</sup> sensor in human embryonic kidney and rat basophilic leukemia cells. *The Journal of Biological Chemistry*.2002;277:36656–64.

154. Song, H. Expression and prognostic significance of TRPV6 in the development and progression of pancreatic cancer. *Oncology Reports*.2018;39:1432–40.

155. Bodding M. Store-operated Ca<sup>2+</sup> current and TRPV6 channels in lymph node prostate cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*.2003;278:50872–9.

156. Dhennin-Duthille I. High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: Correlation with pathological parameters. *Cellular Physiology and Biochemistry*.2011;28:813–22.

157. Lau, J.K. Capsaicin induces apoptosis in human small cell lung cancer via the TRPV6 receptor and the calpain pathway. *Apoptosis*.2014;19:1190–

1201.

158. Schwarz E. TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation. *Cell Calcium*.2006;39:163–73.

159. Yelshanskaya V. Structure and function of the calcium-selective TRP channel TRPV6. *Journal of Physiology*.2020;1–25.

160. ZheLiang W. The mechanism of carvacrol-evoked  $[Ca^{2+}]_i$  rises and non- $Ca^{2+}$ -triggered cell death in OC2 human oral cancer cells. *Toxicology*.2013;303:152–161.

161. Liang W. Z. Carvacrol-induced  $[Ca^{2+}]_i$  rise and apoptosis in human glioblastoma cells. *Life Sciences*.2012;90:703–11.

162. Dhennin-Duthille I. High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: Correlation with pathological parameters. *Cellular Physiology and Biochemistry*.2011;28:813–22.

163. Bhakkiyalakshmi E. Carvacrol induces mitochondria-mediated apoptosis in HL-60 promyelocytic and Jurkat T lymphoma cells. *European Journal of Pharmacology*.2016;772:92–8.

164. Khan I. Carvacrol nanoemulsion evokes cell cycle arrest apoptosis induction and autophagy inhibition in doxorubicin resistant-A549 cell line. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*.2018;46:664-75.

165. Khan F. Carvacrol Induces Reactive Oxygen Species (ROS)-mediated Apoptosis Along with Cell Cycle Arrest at G0/G1 in Human Prostate Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*.2017;69:1075–87.

