



Cilt 14 Sayı 3 (Suppl. 1) 2017
Vol Issue

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi

Journal of Harran University Medical Faculty

1. Uluslararası Kanser ve İyon Kanalları
Kongresi (IONCC 2017)
Özel Sayısı

EDİTÖR
Editor-in- Chief
Prof. Dr. Ercan YENİ

EDİTÖRLER - YAYIN
KURULU
Editors- Publication Board
Prof. Dr. Fuat DİLMEC
Doç. Dr. M. Emre ERKUŞ
Doç. Dr. Feridun AKKAFA
Yrd.Doç.Dr.Evren BÜYÜKFIRAT

Citation Abbreviation: J Harran Univ Med Fac
Yılda üç kez yayınlanır/Published three times a year



Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi

Journal of Harran University Medical Faculty

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi - HARRAN UNIV TIP FAK DERG

Journal of Harran University Medical Faculty - J HARRAN UNIV MED FAC

SAHİBİ / Owner

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi adına
DEKAN / Dean
Prof. Dr. Ercan YENİ

e- ISSN 1309-4025

tipdergisi.harran.edu.tr

BAŞ EDITÖR / Editor-in- Chief

Prof. Dr. Ercan YENİ

EDİTÖRLER / Editors

Prof.Dr.Fuat DİLMEÇ
Doç.Dr.M.Emre ERKUŞ
Doç.Dr. Feridun AKKAFİ
Yrd.Doç.Dr. Evren BÜYÜKFİRAT

EDİTÖR KURULU

Prof.Dr. Mehmet BAYRAKTAR
Prof.Dr. M.Emin GÜLDÜR
Prof.Dr. Zehra YILMAZ
Doç.Dr. Abdurrahim DUSAK
Doç.Dr. İsmail İYNEN
Doç.Dr. Mehmet Akif ALTAY

Doç.Dr. Mehmet Ali EREN
Doç.Dr. Muhammed Erdal SAK
Yrd.Doç.Dr. Ataman GÖNEL
Yrd.Doç.Dr. Ahmet GÜZELÇİÇEK
Yrd.Doç.Dr. Dursun ÇADIRCI
Yrd.Doç.Dr. Fatih GÜNGÖREN

Yrd.Doç.Dr. Hüseyin Cahit YALÇIN
Yrd.Doç.Dr. M.Reşat CEYLAN
Yrd.Doç.Dr. Nuray ALTAY
Yrd.Doç.Dr. Özlem ETHEMOĞLU
Yrd.Doç.Dr.İsmail YAĞMUR
Yrd.Doç.Dr. Zafer Hasan Ali SAK

İSTATİSTİK EDİTÖRÜ

Yrd.Doç.Dr.Hakim ÇELİK

DİL EDİTÖRÜ

Yrd.Doç.Dr.Eyüp Sabri PELİT

DERGİ YAZIŞMA ADRESİ/CONTACT

Yrd.Doç.Dr.Hakim ÇELİK

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Şanlıurfa

Tel: 0.414.318 30 31, Fax:0.414. 318 31 92

E-mail:tipdergisi@harran.edu.tr

Harran Tıp Dergisi yılda üç sayı (Nisan, Ağustos, Aralık) yayınlanan "çift hakemli" dergidir.

Harran Medical Journal is a quarterly (April, August, December), peer-reviewed journal.

"Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi"nin içeriği güncel olarak aşağıdaki kuruluşlar tarafından taranmaktadır; Google Scholar, Open-J-Gate, Scirus, Medical-Journals, Elektronische Zeitschriften bibliothek, Researchgate, Journal Seek, Türkiye Atif Dizini, Index Copernicus, Socholar.

The content of the "Journal of Harran University Medical Faculty" is currently indexed by; Google Scholar, Open-J-Gate, Scirus, Medical-Journals, Elektronische Zeitschriften bibliothek, Researchgate, JournalSeek, Türkiye Atif Dizini, Index Copernicus and Scholar.

Yazarlara Açıklama

Dergi Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin yayın organıdır. Dergimize yazı hazırlanırken aşağıdaki açıklamaları lütfen bütünüyle okuyunuz. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi tıp bilimine ve akademik çalışmalara katkısı olan, klinik ve deneysel çalışmaları, editöryal yazıları, klinik olgu bildirimlerini, teknik ve eğitici derlemelerini, tıp konusundaki son gelişmeler ile orijinal görüntüleri, görüntülü hastalık tanımlama sorularını ve editöre mektupları yayınlar. Ayrıca daha önce yayınlanmış makale ve deneysel çalışmalarla ilgili okuyucu soru ve katkıları kısaca yayınlanır.

Yayına kabul edilme, editöryal komite ile en az iki hakem kararı ile alınır. Yayına kabul edilen yazıların her türlü yayın hakkı dergiye aittir. Bu hak özel düzenlenmiş yayın hakkı devir formu ile bütün yazarların imzası ile tespit edilir. Dergi 4 ayda bir, yılda 3 kez yayınlanır. Derginin yayın dili Türkçe ve/veya İngilizcedir. Gönderilen yazılar daha önce herhangi bir dergide yayınlanmamış olmalıdır (Bilimsel kongrelerde sunulan sözlü bildiri ve posterler bildirmek kaydı ile hariçtir). Dergide yayımlanan yazıların her türlü sorumluluğu (etik, bilimsel, yasal vb.) yazarlara aittir. Yayına kabul edilmeyen yazılar ve her türlü ekler (fotoğraf, tablo, şekil ve disket vb.) iade edilmeyecektir. Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmamış olan yazıların incelenmeye alınıp alınmaması Yayın Kurulu'nun insiyatifindedir.

YAZIM KURALLARI

Yayına gönderilen yazılar Microsoft Word programında yazılmalıdır. Yazı, şekil ve grafilerin tamamı elektronik ortamda gönderilmelidir. Kapak sayfası hariç yazının hiçbir yerinde çalışmanın yapıldığı kurum ve yazarların ismi geçmemelidir.

Tüm yazılar:

1. Başlık sayfası,
2. Türkçe özet,
3. İngilizce özet,
4. Makale kısmı,
5. Kaynaklar,
6. Tablolar,
7. Şekiller ve resimler,
8. Alt yazılar şeklinde dizilmelidir.

Araştırma inceleme yazılarının makale kısmı (özet, referanslar, tablo, şekil ve alt yazılar hariç) toplam 4000 kelimeyi, özet kısmı 400 kelimeyi, referanslar 40'ı, tablo ve şekil sayısı 10'u geçmemelidir. Limitler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir. Olgu bildirimleri şu bölümlerden oluşmalıdır: Başlık, İngilizce başlık, Türkçe ve İngilizce özet, giriş, olgunun/olguların sunumu, tartışma ve kaynaklar. Olgu sunumları toplam 8 sayfayı geçmemelidir. Teknik ve tıp alanındaki gelişmelere ait yazılar ve orijinal konulara ait görüntü

sunumları 2 sayfayı geçmemelidir.

Tip	Kelime limiti	Özet kelime limiti	Tablo ve şekil sayısı limiti	Referans limiti
Orijinal makale	4000*	400	10	40
Vaka sunumu	2000*	200	2	10
Editöre mektup	500		2	5
Görüntü sunumları	300		2	3
Derleme**	-	-	-	-

* özet, referanslar, tablo, şekil ve altyazılar hariç

**herhangi bir limit uygulanmamaktadır

YAZILARIN HAZIRLANMASI

Başlık Sayfası

Yazının başlığı araştırma yazılarında 100 karakteri (harf), olgu sunumlarında 80 karakteri geçmemelidir. Başlık hem İngilizce hem de Türkçe olarak yazılmalıdır. Yazıda çalışmaya katkısı olan yazarların ad ve soyadları açık olarak yazılmalı, Yazar sayısı, multidisipliner çalışmalar dışında, araştırma ve inceleme yazılarında ve derlemelerde 8'i , olgu sunumlarında 6'yı, editöre mektuplarda, görüntü sunumlarında 2'yi geçmemelidir. Yazıların altına çalışmanın yapıldığı kurumun açık adresi yazılmalıdır. Çalışma daha önce herhangi bir kongrede sunulmuş ise kongre adı, zamanı (gün-ay-yıl olarak) belirtilmelidir. Başlık sayfasının en altına iletişim kurulacak yazarın adı, soyadı, açık adresi, posta kodu, telefon ve faks numaraları ile e-posta adresi yazılmalıdır.

Özetler

Ayrı bir sayfa olarak verilmelidir. İngilizce özetin başında İngilizce başlık bulunmalıdır. Türkçe özetlerde başlık kullanılmamalıdır. Araştırma inceleme yazılarında 400, olgu sunumlarında 200 kelimeyi geçmemelidir. Özetler, Türkçe araştırma yazılarında Amaç, Materyal ve metod, Bulgular, Sonuç; İngilizce araştırma yazılarında Background, Methods, Results, Conclusions bölümlerinden oluşmalıdır. Olgu sunumları yazılarında bu bölümlere gerek yoktur. Araştırma ve inceleme yazılarında özetlerden sonra Türkçe ve İngilizce anahtar kelimeler verilmelidir. Anahtar kelime sayısı 5'i geçmemelidir. Anahtar Kelimelerin İngilizcesi Index Medicus'daki Medical Subjects Headings'e uygun olmalı, Türkçe Anahtar kelimeler ise Türkiye Bilim Terimleri'nden (<http://www.bilimterimleri.com>) seçilmelidir. Özetlerde kısaltma olmamalıdır.

Makale

Yazı Giriş, Materyal ve metod, Bulgular ve Tartışma bölümlerinden oluşur.

Giriş: Konuyu ve çalışmanın amacını açıklayacak bilgilere yer verilir.

Materyal ve metod: Çalışmanın gerçekleştirildiği yer, zaman ve çalışmanın planlanması ile kullanılan elemanlar ve yöntemler bildirilmelidir. Verilerin derlenmesi, hasta ve bireylerin özellikleri, deneysel çalışmanın özellikleri ve istatistiksel metotlar detaylı olarak açıklanmalıdır.

Bulgular: Elde edilen veriler istatistiksel sonuçları ile beraber verilmelidir.

Tartışma: Çalışmanın sonuçları literatür verileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmelidir.

Tüm yazımlar Türkçe yazım kurallarına uymalı, noktalama işaretlerine uygun olmalıdır. Kısaltmalardan mümkün olduğunca kaçınılmalı, eğer kısaltma kullanılacaksa ilk geçtiği yerde () içerisinde açıklanmalıdır. Kaynaklar, şekil tablo ve resimler yazı içerisinde geçiş sırasına göre numaralandırılmalıdır. Metin içerisindeki tüm ölçüm birimleri uluslararası standartlara uygun biçimde verilmelidir.

Kaynaklar

Kaynaklar iki satır aralıklı olarak ayrı bir sayfaya yazılmalıdır. Kaynak numaraları cümle sonuna nokta konmadan () içinde verilmeli, nokta daha sonra konulmalıdır. Birden fazla kaynak numarası veriliyorsa arasına ",", ikiden daha fazla ardışık kaynak numarası veriliyor ise rakamları arasına "-" konmalıdır [ör. (1,2), (1-3) gibi]. Kaynak olarak dergi kullanılıyorsa: yıl, cilt, başlangıç ve bitiş sayfaları verilir. Kaynak olarak kitap kullanılıyorsa: sadece yıl, başlangıç ve bitiş sayfaları verilir. Kaynaklarda yazarların soyadları ile adlarının baş harfleri yazılmalıdır. Dergi isimleri Index Medicus'a göre kısaltılmalıdır. Kaynak yazılma şekli aşağıdaki örnekler gibi olmalıdır.

Dergiler için

1) Kocakuşak A, Yücel A.F, Arıkan S. Karına nazif delici-kesici alet yaralanmalarında rutin abdominal eksplorasyon yönteminin retrospektif analizi. Van Tıp Dergisi 2006; 13(3): 90-96.

2) Goldstein PJ. The drugs/violence nexus: A tripartite conceptual framework. J Drug Issues 1985; 15(4): 493-506.

Kitaplar için

1) Krogman WM, İşcan MY. The Human Skeleton in Forensic Medicine. Second ed. Springfield Illinois: Charles Thomas Publisher, 1986: 189-243.

2) Beard SD. Gaines PA, eds. Vascular and Endovascular Surgery. London : WB Saunders, 1998: 319-29.

Kitaptan Bölüm İçin

1) Soysal Z, Albek E, Eke M. Fetüs hakları. Soysal Z, Çakalır C, ed. Adli Tıp, Cilt III, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul, 1999: 1635-1650.

2) Freidman WF. The intrinsic properties of the developing heart. In: Sonneck E, Leschi M, Friedman WF, eds. Neonatal Heart Disease. New York: Grunestratton, 1999: 21-50.

Tablolar

Tablolar ayrı sayfaya iki satır aralıklı yazılmalı, her tablonun üzerinde numara ve açıklayıcı ismi olmalıdır. Tabloda kısaltmalar varsa tablonun altında alfabetik sıraya göre açılımları yazılmalıdır. Örnekler: PS: pulmoner stenoz, VSD: ventriküler septal defekt. Tablolar yazı içindeki bilgilerin tekrarı olmamalıdır. Tablo içerisindeki çizgiler enlemesine ve boylamasına olmamalı, yalnız üst ve altında düz çizgiler olmalıdır.

Şekil ve Resimler

Şekil ve resimler mutlaka isimlendirilmeli ve numaralandırılmalıdır. Resimler minimum 300 dots per inch (dpi) çözünürlüğünde ve net olmalıdır. Resimler makaleden ayrı bir şekilde makale gönderimi esnasında elektronik olarak JPEG formatında gönderilmelidir. Makale içerisinde geçen resimler kabul edilmeyecektir. Renkli resimlerin basımı ancak yazarın basım ücretini kabul etmesi ve bu ücreti ödemesi halinde mümkün olacaktır. Aksi takdirde resim siyah-beyaz olarak basılır. Şekil ve resim altlarında kısaltmalar kullanılmış ise, kısaltmaların açılımı alfabetik sıraya göre alt yazının altında belirtilmelidir. Mikroskobik resimlerde büyütme oranı ve tekniği açıklanmalıdır.

Yayın kurulu, yazının özünü değiştirmeden gerekli gördüğü değişiklikleri yapabilir.

HAKEM RAPORU SONRASINDA DEĞERLENDİRME

Yazarlar hakem raporunda belirtilen düzeltme istenen konuları maddelendirerek bir cevap olarak kendilerine ayrılan cevap bölümüne (<http://tip.harran.edu.tr/tipdergisi>) yazmalıdırlar. Ayrıca makale içerisinde de gerekli değişiklikleri yapmalı ve bunları makale içerisinde belirterek (boyayarak) online olarak tekrar göndermelidirler.

YAYIN ETİĞİNE UYUM

Yazarların araştırma ve yayın etiğine uygun olarak hazırlanması bir zorunluluktur. Yazarlar, insan ile ilgili tüm klinik araştırmalarda etik ilkeleri kabul ettiklerini, araştırmayı bu ilkelere uygun olarak yaptıklarını belirtmelidirler. Bununla ilgili olarak Gereç ve Yöntem bölümünde: klinik araştırmanın yapıldığı kurumdaki etik kuruldan prospektif her çalışma için onay aldıklarını ve çalışmaya katılmış kişilerden veya bu kişilerin vasilerinden bilgilendirilmiş onam aldıklarını; hayvanlar ile ilgili deneysel çalışmalarda ise hayvan haklarını koruduklarını, ilgili deney hayvanları etik kurulundan onay aldıklarını belirtmek zorundadırlar. İnsan veya deney hayvanı üzerinde yapılan deneysel çalışmaların sonuçları ile ilgili olarak, dergiye yapılan başvuru esnasında, etik kurul onay belgesinin sunulması zorunludur.

SON KONTROL

- 1.Yayın hakkı devir ve yazarlarla ilgili bildirilmesi gereken konular formu gereğince doldurulup imzalanmış,
 2. Özet makalede 400, olgu sunumunda 200 kelimeyi aşmamış,
 3. Başlık Türkçe ve İngilizce olarak yazılmış,
 4. Kaynaklar kurallara uygun olarak yazılmış,
 - 5.Tablo, resim ve şekillerde bütün kısaltmalar açıklanmış olmalıdır.
- Kılavuzun en güncel versiyonuna www.icmje.org adresinden ulaşılabilir.

Instructions to Authors

The journal is a scientific publication of Harran University Faculty of Medicine. Please entirely read the instructions discussed below before submitting your manuscript to the journal. The Journal of Harran University Medical Faculty publishes original articles on clinical or experimental work, case histories reporting unusual syndromes or diseases, technical and educative reviews, recent advancement of knowledge of the medical sciences with original images, questionnaires of defining disease, and letters to the editor.

Final recommendation for publication is made by the editorial board and at least two independent reviewers. The copyrights of articles accepted for publication is belonged to journal. This is determined by the assignment of copyright statement, signed by all authors. The journal is published three times in a year. The language of the journal is Turkish and/or English. Manuscripts submitted to the journal should not be published before or not under consideration elsewhere (in the case of previous oral or poster presentation of the paper at scientific meetings author should inform the journal). The full responsibility of the articles (ethic, scientific, legal, etc.) published in the journal belong to the authors. If the article is rejected, the manuscript and any related supplements (photographs, tables, figures, diskette etc.) will not be returned. If the paper is not prepared in conformity with the writing instructions, decision for its evaluation will be made by the members of the editorial board.

WRITING INSTRUCTIONS

Submitted manuscripts should be prepared using Microsoft Word program. All manuscripts, figures and pictures must be submitted electronically. Authors should ensure that (apart from the title page) the manuscript should contain no clues about the identity of authors and institution where the study was performed.

All papers should be arranged on the basis of following sequence:

1. Title page,
2. Turkish abstract,
3. English abstract,
4. Text of the article,
5. References,
6. Table(s),
7. Figure(s) and illustration(s),
8. Figure legend(s).

In the original articles number of words should not exceed 4000 (except abstract, references, tables, figures and legends) for the text of article and 400 for the abstract. Upper limit for reference number is 40, and this limit is 10 for tables and figures. Limits are summarized in the table below. Case reports should be composed of Turkish title, English title, Turkish and English abstracts, introduction, case report, discussion and references. The number of typewritten pages should not exceed 8 in case reports. Advancements in technical and medical topics and questionnaires of original issues should not exceed 2 typewritten pages

* except abstract, table, figure and legends

**no limitation

PREPARATION OF MANUSCRIPT

Title Page

Title of the article should not exceed 100 characters in original articles and 80

Type	Word limit	Abstract word limit	Tables and figures limit	Reference limit
Original article	4000*	400	10	40
Case report	2000*	200	2	10
Letter to editor	500		2	5
Image presentations	300		2	3
Review**	-	-	-	-

characters in case reports. Title should be written both in English and Turkish. The first and last names for all contributors designated as author should be written clearly. Apart from multidisciplinary studies, number of authors should not be more than 8 in original articles, 6 in case reports, 2 in letters to editor. Subsequently, address of the institution where the study was performed should be written clearly. If the study was previously presented in any scientific meeting, name and date (as day-month-year) of the organization should be written. The name and mailing address of the corresponding author, accompanied by telephone and fax numbers, and e-mail should be written at the bottom of title page.

Abstracts

Abstracts should be given in separate sheets. English title should be used for English abstracts. No title is required for Turkish abstracts. The abstracts should not exceed 400 words in original articles and 200 words in case reports. The abstracts should be composed of "Amaç, Gereç-yöntem, Bulgular, Sonuç" in Turkish original articles, and of "Back-ground, Methods, Results, Conclusion" in English original articles. There is no requirement to these sections in case reports. Turkish and English key words should be listed at the bottom of the abstract page in original articles and should not be more than 5 words. In selecting key words, authors should strictly refer to the Medical Subject Headings (MeSH) list of the Index Medicus. Turkish key words should be selected from Turkish Science Term ((HYPERLINK "http://www.bilimterimleri.com/") The abbreviations should not be used in the abstract.

Text

Text is composed of Introduction, Materials and methods, Results and Discussion.

Introduction: The matter and purpose of the study is clearly defined.

Materials and methods: This should include the date and design of the study, the setting, type of participants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons, and the statistical analysis.

Results: Collected data and results of statistical analysis should be outlined in this section.

Discussion: The discussion section should include interpretation of study findings and results should be considered in the context of results in other trials reported in the literature.

All written content should be prepared in conformity with grammar and punctuation rules. Avoid abbreviations whenever possible; in case of necessary, it should be given in parentheses when they are first used. References, figures, tables and illustrations should be consecutively numbered in the order in which they have been cited in the text. All measurement units in the text should be used in accordance with international standards for units of measurement.

References

References should be given in a separate sheet with double spaced. References should be consecutively numbered in the order in which they are first mentioned in the text using Arabic numerals (in parentheses). Reference number should be placed at the end of sentence before the period. If there are multiple references number use “,” between them and “-” should be inserted between digits when three or more consecutive references are used [e.g. (1,2), (1-3)]. Journal references should include the following information: year, volume, first and last pages of article. Book references should include only year and first and last pages of the article. Authors in the references should be cited with last names and first initials. Journal's title should be abbreviated in conformity with the Index Medicus system. References should be cited as per the examples below.

Journal references:

1) Kocakuşak A, Yücel A.F, Arıkan S. Karına nafiz delici-kesici alet yaralanmalarında rutin abdominal eksplorasyon yönteminin retrospektif analizi. Van Tıp Dergisi 2006; 13(3): 90-96.

2) Goldstein PJ. The drugs/violence nexus: A tripartite conceptual framework. J Drug Issues 1985; 15(4): 493-506.

Book references:

1) Krogman WM, İşcan MY. The Human Skeleton in Forensic Medicine. Second ed. Springfield Illinois: Charles Thomas Publisher, 1986: 189-243.

2) Beard SD. Gaines PA, eds. Vascular and Endovascular Surgery. London : WB Saunders, 1998: 319-29.

Chapter in book references:

1) Soysal Z, Albek E, Eke M. Fetüs hakları. Soysal Z, Çakalır C, ed. Adli Tıp, Cilt III, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul, 1999: 1635-1650.

2) Freidman WF. The intrinsic properties of the developing heart. In: Sonneblick E, Leschi M, Friedman WF, eds. Neonatal Heart Disease. New York: Grunestratton, 1999: 21-50.

Tables

Tables should be printed on a separate sheet with

double spaced. Each table should contain a table number in the order in which they are first mentioned in the text and title that summarizes the whole table. All abbreviations used in the table should be alphabetically arranged and defined under the table (e.g., PS; pulmonary stenosis, VSD: ventricular septal defect). Tables should not duplicate information given in the text. Apart from upper and lower margins, vertical and horizontal rules should not be used in the tables.

Figures and Illustrations

Figures and illustrations should be named and numbered. Figures should be provided with a minimum of 300 dots per inch (dpi) in JPEG format and should be clear. Figures must be submitted online during manuscript submission. Figures embedded into article will not be accepted. If authors accept to charge extra cost, colored publication of the illustrations is possible; otherwise all illustrations will be published as black and white. All abbreviations used in the figures and illustrations should be alphabetically arranged and defined under the footnote. Technique and ratio of magnification for photomicrographs should be indicated.

The editorial board has the right to make any revisions on the manuscript unless such changes interfere with the scientific data presented.

ETHICAL CONSIDERATIONS

Manuscripts submitted for publication must contain a statement indicated that all prospective human studies have been approved by the ethics Committee, have therefore been performed in accordance with the ethical standards of 2008 Declaration of Helsinki. It should also be clearly stated that all persons gave informed consent prior to their inclusion in the study. Studies involving animals must have the animal ethics committee approval and be conducted in accordance with the care and use of laboratory animals standards.

REVISIONAFTER REFEREE REPORT

Authors should point by point reply the items on which revision is demanded via referee report to the reserved box in the online system (<http://tip.harran.edu.tr/tipdergisi>). Additionally they should do necessary changes in article and highlight them and submit online again.

FINAL CHECKING

1. All pages have been numbered beginning from first page of the text.
2. Assignment of copyright form has been properly filled and signed.
3. The abstract should not exceed 400 words in original articles and 200 words in case reports.
4. The title has been separately written in Turkish and in English.
5. References is in conformity with the instructions.
6. All abbreviations used in tables, figures and illustrations have been defined.

The most up-to-date version of the guide in question is available at www.icmje.org.

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi

Yayın hakkı devir ve yazarlarla ilgili bildirilmesi gereken konular formu

Bu form bütün yazarlar tarafından imzalanarak "Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi" ne (Journal of Harran University Medical Faculty) (<http://tip.harran.edu.tr/tipdergisi>) makale gönderimi esnasında online olarak gönderilmelidir.

Makale Adı

Makale Numarası:

Bu form ile yazar(lar) bildirir ki:

1. Biz aşağıda isim ve imzaları bulunan yazarlar, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi'nde yayınlanmak üzere gönderdiğimiz yazımızın orijinal olduğunu; eşzamanlı olarak herhangi bir başka dergiye değerlendirilmek üzere sunulmadığını; daha önce yayınlanmadığını; gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkımızı, yazı yayına kabul edildiği takdirde Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi'ne devrettiğimizi kabul ederiz,
2. Yayın hakları yazının sınırsız olarak basılmasını, çoğaltılmasını ve dağıtılmasını ve mikrofilm, elektronik form (offline, online) veya başka benzer reproduksiyonlarını kapsamaktadır.
3. Ben (biz) makale ile ilgili herhangi bir konuda ortaya çıkabilecek herhangi bir çıkar çatışması veya ilişkisi olduğu durumlarda, makale yayınlanmadan önce Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi editörünü bilgilendirmeyi taahhüt ediyorum(z). Bu ilişki ilaç firmaları, biyomedikal alet üreticileri veya ürün veya hizmetleri makalede geçen konular ile ilgili olabilecek veya çalışmayı destekleyen diğer kuruluşları kapsamaktadır.
4. Yazar(lar) makaleyi herhangi bir dağıtım amacı ile herhangi bir şekilde çoğaltmak istediğinde Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi'nden izin almak zorundadır.

Yazarın Adı Soyadı	İmza	Tarih
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		

Journal of Harran University Medical Faculty

Copyright transfer and conflict of interest statement

This statement should be signed and submitted online with the signs of all authors to the “Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi” (Journal of Harran University Medical Faculty) (<http://tip.harran.edu.tr/tipdergisi>) during manuscript submission.

Article Title

Manuscript Number:

With this form all author(s) certify and accept that:

1. This manuscript submitted for publication in the Journal of Harran University Medical Faculty is original; has not previously been published elsewhere nor is it under review by any other journal; and agree to transfer all copyright ownership to the “Journal of Harran University Medical Faculty” effective upon acceptance of the manuscript for publication with all necessary revisions.
2. The copyright covers unlimited rights to publish, reproduce and distribute the article in any form of reproduction including microfilm electronic form (online, offline) and any other forms.
3. We grant to inform the editor of the Journal of Harran University Medical Faculty about real or apparent conflict(s) of interest that may have a direct bearing on the subject matter of the article before the article is published. This pertains to relationships with pharmaceutical companies, biomedical device manufacturers or other corporation whose products or services may be related to the subject matter of the article or who have sponsored the study.
4. Author(s) must obtain permission from the Journal of Harran University Medical Faculty to reproduce the article in any medium for distribution purposes.

Author Name Surname	Sign	Date
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		



Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi

Journal of Harran University Medical Faculty

Cilt 14, Sayı 3
IONCC2017 Özel Sayısı
(Suppl 1), 2017



1. Uluslararası Kanser ve İyon Kanalları Kongresi (IONCC2017) 21 – 23 Eylül 2017, Şanlıurfa, Türkiye



İçindekiler / Index

Editöre Mektup / Letter to Editor

1. Uluslararası Kanser ve İyon Kanalları Kongresi (IONCC2017) Sonuç Bildirgesi
Sayfa: 1-2
Hatice GUMUSHAN AKTAS, Mustafa B.A. DJAMGOZ

Davetli Konuşmacı Özetleri / Speakers' Abstracts

- 1- Ion Channel Blockers and Prostate Cancer Metastasis
Sayfa: 3
Seyhan ALTUN
- 2- Functional Effects of Matrix Metalloproteinase-9 on Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5 and β 1 Regulation in Human Breast Cancer Cells
Sayfa: 4
Gülğün OKTAY
- 3- Voltage Gated and the Oxidative Stress-Induced Ionic Currents in the Neurones of the Ventral Cochlear Nucleus
Sayfa: 5
Ramazan BAL
- 4- Natural Products and Ion Channels
Sayfa: 6
Hatice GUMUSHAN AKTAS
- 5- Environmental Factors and their Mechanisms of Action in Carcinogenesis
Sayfa: 7
Abdurrahim KOÇYİĞİT
- 6- Thiol Disulfide Homeostasis
Sayfa: 8
Özcan EREL
- 7- Integration of Transcriptomics and Functional Genomics to Study Drug Resistance and Metastasis in Cancer
Sayfa: 9
Özgür ŞAHİN

8- Specifically Targeting Cancer Cells for Theranostic Applications through Glycobiology, Metabolic glycoengineering, and nanotechnology
Sayfa: 10
Hafiz AHMED

9- The Place and Importance of CFSE Method in Determining Cell Cytotoxicity
Sayfa: 11
Faruk SÜZERGÖZ

10- Oncology Nursing: Breast Cancer and Social Support
Sayfa: 12
Fatma ERSİN

11- Recent Developments in Targeting Carbonic Anhydrase IX for Cancer Therapeutics
Sayfa: 13
İsmail KOYUNCU

Araştırma Makalesi / Original Article

1- Finite Element Analysis Of Electric Field For In-Vitro Electropermeabilization
In-Vitro Elektropermabilizasyon İçin Elektrik Alanın Sonlu Elemanlar Analizi
Sayfa: 14-22
Serdal ARSLAN, Meric Arda ESMEKAYA, Ayse G. CANSEVEN

2- Şanlıurfa'daki Prostat Kanseri Hastalarında VGSC'lerin İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi
An Immunohistochemical Investigation of VGSCs in Prostate Cancer Patients in Sanliurfa
Sayfa: 23-30
Hatice GUMUSHAN AKTAS, Cemal CAVUS, Ulaş ALABALIK

3- Stage II Kolon kanseri dokularında Onkogenik microRNA olan miR-92, miR-21, miR-155'in qRT-PCR'da Ekspresyonu
Expression of miR-92, miR-21, miR-155, Oncogenic miRNAs using qRT-PCR in Colon Cancer stage II Tissues
Sayfa: 31-39
Çiğdem GÜNGÖRMEZ, Hatice GUMUSHAN AKTAS, Ersin BORAZAN

4- Expression of miR-143, miR-145, miR-192, Tumor Suppressor miRNAs using qPCR in Colon Cancer stage II
Stage II Kolon Kanserinde Tümör Süpressör miRNA olan miR-143, miR-145 ve miR-192'nin Ekspresyonu
Sayfa: 40-45
Çiğdem GÜNGÖRMEZ, Hatice GUMUSHAN AKTAS, Ersin BORAZAN

5- Hyperthermia and Plasma Membrane Ca ATPase: Is There Any Effect of HT on PMCA?
Hipertermi ve Plazma membranı Ca ATPaz: HT'nin PMCA Üzerinde Herhangi Bir Etkisi Var mı?
Sayfa: 46-59
Armağan CANER, Müge Gülcihan ÖNAL

1. ULUSLARARASI KANSER VE İYON KANALLARI KONGRESİ (IONCC2017)

SONUÇ BİLDİRGESİ

Hatice GUMUSHAN AKTAS¹, Mustafa B.A. DJAMGOZ^{2,3}

e-mail: haticeaktas@harran.edu.tr

1Harran University, Faculty of Arts & Science, Biology Department, Sanliurfa, TURKEY

2 Imperial College London, Department of Life Sciences, Sir Alexander Fleming Building, South Kensington Campus, London, UK

3 Cyprus International University, Biotechnology Research Centre, Haspolat, North Cyprus

Harran Üniversitesi (Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Sağlık Hizmetleri MYO, Tıp Fakültesi) ve Imperial College (London) işbirliğiyle düzenlenen **I. Uluslararası Kanser ve İyon Kanalları Kongresi (IONCC2017)**, 21-23 Eylül 2017 tarihlerinde Şanlıurfa Harran Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Amfisi'nde gerçekleştirildi. Yurt içinden ve yurt dışından yaklaşık 200 kişinin katıldığı IONCC2017'nin başkanlığını Prof. Dr. Mustafa B.A. DJAMGOZ (Imperial College, London, UK), Yrd. Doç. Dr. Hatice GÜMÜŞHAN AKTAŞ (Harran Ü. Fen-Edb. Fakültesi, Biyoloji Bölümü) ve Yrd. Doç. Dr. İsmail KOYUNCU (Harran Ü. Sağlık Hizmetleri MYO, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı) yaptılar.

IONCC2017, kongre düzenleme komitesi başkanlarının yanı sıra onursal başkan Harran Üniversitesi Rektörü Prof. Dr. Ramazan TAŞALTIN, Büyükşehir Belediyesi Başkan vekili Dr. Ahmet İNAN ile kongreye maddi olarak da katkı sağlayan Karaköprü Belediye Başkanı Metin BAYDİLLİ ve Eyyübiye Belediye Başkanı Mehmet EKİNCİ'nin konuşmaları ile açıldı.

Kongrede 15 çağrılı konuşmacı [Dr. Şebnem TERCAN (Şanlıurfa Halk Sağlığı Kanser Dairesi), Prof. Dr. Mustafa B.A. DJAMGOZ (Imperial College, London, UK), Prof. Dr. Seyhan ALTUN (İstanbul Üniversitesi), Prof. Dr. Gülgün OKTAY (Dokuz Eylül Üniversitesi), Prof. Dr. Ramazan BAL (Gaziantep Üniversitesi), Yrd. Doç. Dr. Hatice G. AKTAŞ (Harran Üniversitesi), Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT (Bezmialem Üniversitesi), Prof. Dr. Özcan EREL (Yıldırım Beyazıt Üniversitesi), Prof. Dr. İhsan GÜRSEL (Bilkent Üniversitesi), Yrd. Doç. Dr. Özgür ŞAHİN (Bilkent Üniversitesi), Asst.

Prof. Hafız AHMED (University of Maryland, USA), Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ (Harran Üniversitesi), Prof. Dr. Tülay ORTABAĞ (Hasan Kalyoncu Üniversitesi), Yrd. Doç. Dr. Fatma ERSİN (Harran Üniversitesi), Yrd. Doç. Dr. İsmail KOYUNCU (Harran Üniversitesi)] sunumları ile iyon kanalları ve kanser konusuna ışık tuttular. Kongrede 120 (sözlü ve poster) bildiri sunuldu.

Ana teması "**İyon kanalları: Kanser ve metastaz tedavisi için yeni bir terapötik hedef**" olarak belirlenen IONCC2017 kapsamında temaya ilişkin sunumların ardından bir yuvarlak masa toplantısı gerçekleştirilerek "**İYON KANALLARI KANSER METASTAZI İÇİN YENİ BİR TERAPÖTİK HEDEF MİDİR?**" sorusuna yanıt arandı. Toplantıda, iyon kanallarının kanser hücrelerine daha fazla uyarılabilir fenotip kazandırdığı ve hücrelerin hiperaktifleştiği; bu hiperaktivitenin metastazları ortaya çıkardığı belirtildi. Prostat ve meme kanseri modelleri ile yapılan çalışmalarda, iyon kanallarını hedef alan ilaçlar veya doğal bileşiklerin, kanseri ve metastazları önlemek amacıyla kullanımının hem yaşam kalitesini arttırabileceği hem de yeni ve etkili bir tedavi seçeneği olarak son derece heyecan uyandırdığı ifade edildi. Böylece, kanser teşhisi konulmuş hastaların, kanserin yayılmasını önleyecek ilaçlar kullanarak bu hastalıkla birlikte yaşayabilmesinin yeni bir strateji olarak değerlendirilebileceği bildirildi.

Kongre çağrılı konuşmacıları kanser aşılmasının geliştirilmesi ve kanser tedavisinde ortaya çıkan ilaç direnci mekanizmaları ile hücre yüzeyi glikan molekülerinin hedeflendiği yeni tedavi stratejileri konularında yaptıkları çalışmaları da paylaştılar.

Kanserli hastaların kendi eksozomları (hücre dışı nanokesecekleri) kullanılarak geliştirilecek olan kişiye özgü aşılarda farklı kanser tiplerinin önlenebileceği vurgulandı. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direnç gelişimi ve metastazların düzenlenmesinde anahtar rolü oynayan mekanizmanın aydınlatılması amacıyla yapılan çalışmaların sonuçları ortaya kondu. Hücre yüzeyinde bulunan glikan zincirlerinin, kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalma ve metastaz gibi malignant davranışlarının baskılanması için hedef olabileceğini gösteren çalışmalar ile bu yöndeki metodolojik stratejiler tartışıldı. Ayrıca, kanser oluşumunda çevresel faktörlerin etki mekanizmaları, tiyol disülfid dengesinin önemi vurgulanarak, sitotoksikite belirlemede kullanılan yeni yöntemler tanıtıldı. Kanserde erken teşhisin önemi belirtilerek onkoloji hemşireliğinin hasta sağaltımındaki rolünün altı çizildi.

Yoğun geçen bilimsel programın ardından katılımcılar, Sıra Gecesi etkinliğinde, Şanlıurfa'ya özgü yemekleri

ve müzikleri tanıyarak yorgunluklarını attılar. Ayrıca sosyal program kapsamında kazı başkanı Prof. Dr. Mehmet ÖNAL (Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Arkeoloji Bölüm Başkanı) rehberliğinde Harran ören yeri gezildi. Harran Kalesi, Kültür evi tanıtımlarının yanı sıra, Şanlıurfa Arkeoloji ve Mozaik Müzesi gezileri ile sosyal program tamamlandı.

Harran Üniversitesi Rektörlüğü, Fen-Edebiyat Fakültesi ve Tıp Fakültesi Dekanlıkları ile Sağlık Hizmetleri MYO Müdürlüğü, GAP Bölge Kalkınma İdaresi Başkanlığı, Sağlık Bakanlığı Şanlıurfa Halk Sağlığı Müdürlüğü, Özel Metrolife Hastanesi, Şanlıurfa Ticaret Borsası, 27. Bölge Şanlıurfa Eczacı Odası ile Medsantek ve Ant Teknik firmalarının da destekleriyle düzenlenen kongre sonundaki genel değerlendirilmede, Türk İyon Kanalları ve Kanser Araştırma Ağı (TICAN) olarak bir sonraki kongrenin, 2019 yılında İzmir, Dokuz Eylül Üniversitesi ev sahipliğinde düzenlenmesi kararlaştırıldı.

Ion Channel Blockers and Prostate Cancer Metastasis

Seyhan ALTUN

e-mail: altuns@istanbul.edu.tr

Istanbul University, Faculty of Science, Biology Department, Istanbul, TÜRKİYE

Abstract

Ion channels are transmembrane proteins in the plasma membrane of cells that cause a change in the membrane potential by regulating the ion passage between the inside and outside of the cell. The passage of ions through the membrane is ensured when they open and close. When the ion channels are open, they enable the passive passage of specific ions such as Na⁺, K⁺, Ca²⁺ and Cl⁻ through the membrane. Voltage-gated ion channels play a role in the formation and transmission of the action potential. This change in the ion channel activity increases the proliferation of a tumour and/or affects its metastasis. Voltage-gated Na⁺ channels (VGSCs) are functionally upregulated in several human carcinomas, including prostate cancer. Prostate cancer is the second most commonly diagnosed male cancer in the world and a leading cause of cancer-related death. It is known that the incidence of prostate cancer is gradually increasing and the deaths that occur result from metastases as in other types of cancer. Studies have focused on the presence of the excess Na⁺ ion channels in the membranes of cells with the metastatic capability and on the drugs/agents blocking these channels. The hypothesis that VGSCs play a strengthening role in the metastatic potential of prostate cancer and the metastatic advancement can

be repressed by blocking the channels with ion channel blockers was evaluated *in vitro* and *in vivo*. We investigated the effect of VGSC blockers such as tetrodotoxin, lidocaine, gabapentin, ranolazine and riluzole on lung metastases and the migration and invasion of highly metastatic Mat-LyLu and low metastatic AT-2 cells, in the Dunning model.

According to the data obtained; *i*) Experiments conducted with tetrodotoxin proved that the Na_v 1.7 channel activity increases metastasis. *ii*) The fact that this role of the Na⁺ channel is related to the persistent current was determined with ranolazine experiments. *iii*) It should be noted that drugs such as gabapentin administered for cancer pain are also effective on cancer, and they should be used with care. *iv*) It is necessary to determine the therapeutic effects of lidocaine and riluzole that are effective on Na_v 1.7 by investigating them *in vivo*.

It is necessary to deepen the studies on the effects of VGSC blockers that increase survival by decreasing metastasis on human cells/xenograft models.

Keywords: Prostate cancer, Ion channel blockers, Metastases, Invasion, Migration.

Acknowledgements: This study was supported by TUBITAK, project number: 104T890.

Functional Effects of Matrix Metalloproteinase-9 on Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5 and β 1 Regulation in Human Breast Cancer Cells

Gülgün OKTAY

e-mail: gulgun.oktay@deu.edu.tr

Dokuz Eylül University, School of Medicine, Department of Medical Biochemistry, İzmir, TÜRKİYE

Abstract

Voltage-gated sodium channels (VGSC) are glycosylated transmembrane proteins transmitting fast (transient- I_{NaT}) and prolonged (persistent- I_{NaP}) currents enabling Na^+ flow into cells in order to create action potentials. VGSCs are expressed in conventionally 'excitable' cells, such as neurons and muscle cells, as well as 'non-excitable' cells such as endothelial cells, lymphocytes, osteoblasts, fibroblasts, and renal tubular epithelial cells. In recent years, *in vitro* and *in vivo* studies have shown that VGSCs are overexpressed in a variety of human cancers of *epithelial* origin, including breast, prostate, ovary, cervix, colon, lung and skin cancer, where expression is associated positively with metastatic potential. However, the mechanisms responsible for the functional VGSC expression in cancer cells are not clear. Voltage-gated Na^+ channels exist as pore-forming alpha subunits ('VGSC α 's) which are responsible for the ionic permeation and smaller non-pore-forming beta subunits ('VGSC β 's) which are responsible for structural interactions and adhesiveness. It has been suggested that VGSC α subunits are upregulated in parallel with metastatic potential, whereas VGSC β subunits are expressed more in weakly metastatic cancer cells which are relatively more adhesive.

Breast cancer is the most common type of cancer after lung cancer in women. Metastasis is the major cause of death in breast cancer patients. In tumor metastasis, the degradation and modulation of extracellular matrix by proteolytic enzymes is a critical step. Among these proteolytic enzymes, matrix metalloproteinases (MMPs) play a key role in the digestion of extracellular matrix components

(proteolytic activity) and in signal transduction pathways (non-proteolytic effect).

The main aim of our project is to examine mechanistically mutual functional interactions involving matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), the VGSC subtype $Na_v1.5$ (gene: *SCN5A*), and the VGSC β subtype, β 1 (gene: *SCN1B*). Mainly the metastatic human breast cancer MDA-MB-231 cells will be used as a model to shed light on the metastatic process. Thus the following approaches will be adopted:

1. MMP-9 silencing and overexpression; effects on Nav1.5 and β 1 expression and activity;
2. *SCN5A* silencing and pharmacological inhibition with tetrodotoxin (general VGSC inhibitor) and Ranolazine (specific I_{NaP} inhibitor); effects on MMP-9 expression and activity and *SCN1B* expression; and
3. *SCN1B* overexpression; effects on MMP-9 and $Na_v1.5$ expression and activity.

4. The effects of all these treatments on the following metastatic cell behaviors will be determined: adhesion, lateral migration and matrigel invasion).

In this project, we shall determine for the first time how MMP-9, which is in the upstream of VGSC, affects alpha ve beta subunit expression and how these effects contribute to the process of invasion and metastasis. In this manner, this *in vitro* study will enlighten further the role of VGSC/ I_{NaP} in cancer progression.

Keywords: Voltage-gated sodium channels, Matrix Metalloproteinase-9, Breast cancer cells.

Acknowledgements: This research was supported in by a grant (no. 115S504) from The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK).

Voltage Gated and the Oxidative Stress-Induced Ionic Currents in the Neurones of the Ventral Cochlear Nucleus

Ramazan BAL

e-mail: ramazanbal1969@gmail.com

Gaziantep University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Gaziantep, TURKEY

Abstract

The fibers of the auditory nerve project to the cochlear nucleus (CN). The CN divide into two region, the dorsal cochlear nucleus (DCN) and the ventral cochlear nucleus (VCN). The VCN has three cell types, octopus, bushy and stellate cells. Octopus cells are populated caudally in the posterioventral CN (PVCN). The other two cell types are found intermingledly in the anterior part of the ventral CN (AVCN).

Synaptic responses and the firing pattern of these three cells are mainly governed by their unusual biophysical characteristics. In vitro recordings, both bushy and octopus cells respond to DC current pulses at the onset of the stimulus with a single action potential. Whereas, stellate cells responded with a train of action potentials.

Onset responses were found to be resulted from the large resting conductances of, mixed-cation conductance (g_h) and low-voltage activated potassium conductance (g_{KL}). These two conductances are the largest current amplitude recorded in the mammalian CNS neurons. Amplitudes of maximum mixed-cation conductance

and low-voltage activated potassium conductance were 150 nS and 512 nS. Even though stellate cells had these ion channels, they are relatively small in amplitude. These cells had calcium channels as well. Furthermore, ventral cochlear nucleus (VCN) neurons had two ion channels induced by oxidative stress, TRPM2 current and ATP-sensitive potassium (KATP) current. The amplitude of the TRPM2 conductance was 5.1 nS, which is induced by intracellular ADPR application. amplitude of the ATP-sensitive potassium maximum conductance in octopus cells was 17.2 nS.

In conclusion, voltage gated ion channels govern the action potentials. Whereas, oxidative stress induced conductances, TRPM2 and KATP, are relatively small, they can change the resting membrane potential and neurons excitability of the neurons with high input resistance such as stellate cells. Small modulatory currents mediated by TRPM2 or K_{ATP} in stellate cells cause large changes in the firing rate, due to their relative high input resistance and low firing thresholds.

Natural Products and Ion Channels

Hatice GUMUSHAN AKTAS

e-mail: haticegumushan@gmail.com, haticeaktas@harran.edu.tr

Harran University, Faculty of Arts & Science, Biology Department, Sanliurfa, TURKEY

Abstract

Ion channels are transmembrane proteins found in the cell and organelle membranes of all living organisms. These proteins allow the transport of ions such as sodium, potassium, calcium, hydrogen, chlorine between inner and outer sides of the cellular membranes. Each channel carries specific ions. Some like potassium leakage channels are constantly open. Others are switched on and off in response to voltage changes or the attaching of a ligand. Also in another group, there are connexins forming gap junctions which allow the transport of various ions and molecules from the cell to the cell, and channels like Piezo which are opened as a response to mechanical stimulation. Ion channels have important roles in all cellular processes such as stimulation of nerve and muscle cells, maintenance of resting potential, transfer of ions and various metabolites between cells, hormone release, sensory conduction, learning, memory, regulation of blood flow, protection of homeostasis, control of cell cycle, apoptosis, and cell movement. Therefore, mutations or the changings of functions that occur in genes encoding these channels play a role in many disorders such migraine, diarrhea, hypertension, depression, and cancer and metastases as.

The medicines which acting on ion channels are used long in the treatment of many diseases such as epilepsy, because of the ion channels play roles in many cellular processes. These drugs have synthetic or natural origin. Natural compounds are small molecules with a biological activity and chemical structure that are produced as a primer or secondary

metabolite in any organism. Today, there is an increasing trend towards natural nutrition, which we can called as "return to nature". In this trend, herbal or animal products are consumed for preventive purposes or for treatment.

Natural compounds may be obtained from bacteria or fungi, as well as animal or herbal origin. The most studied Tetrodotoxin (TTX) is a specific blocker for voltage-gated sodium channels (VGSCs). TTX can be isolated from poisonous *Fugu sp.* fish, various amphibians and molluscs. Grayanotoxins, which increase ionic current in VGSCs, are of plant origin. Margatoxin, isolated from a scorpion species, blocks voltage-gated potassium channels. Dehydrosaponin I, which activates the calcium-activated potassium channel, is a secondary metabolite of a plant from the Leguminosae family. Avermectin b1a, which increases the opening of the voltage-gated chlorine channel, is a toxin of *Streptomyces sp.* bacterium. Chlorotoxin, a chlorine channel blocker, is isolated from a scorpion. The muscimol, which exhibits agonist activity on the GABA-A receptor, which is a kind of ligand-gated ion channels, is obtained from *Amanitha muscaria* fungi. Conotoxin is used as local anesthetic, and it is a toxin obtained from sea snail.

In conclusion, the novel natural compounds may have important biological activities on ion channels. Therefore it is necessary to investigate deeply the effects of them.

Keywords: Ion channels, natural compounds, ion channel blockers and openers, cancer, metastases

Environmental Factors and their Mechanisms of Action in Carcinogenesis

Abdurrahim KOCYIGIT

e-mail: abdurrahimkocyigit@yahoo.com

*Bezmialem Vakif University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry,
Istanbul, TURKEY*

Abstract

Cancer is a genetic disorder in which both internal factors (inherited mutations, hormones and immune conditions) and environmental /acquired factors (like tobacco, diet, radiation and infectious organisms) are caused. It has been estimated that only 5–10% of all cancers are due to an inherited gene defects, the others are due to environmental factors. These factors modulate some of the important cellular elements, including genes such as proto-oncogenes, tumor suppressor genes and DNA repair genes, via cellular intermediates. One of the most important cellular intermediates is the reactive oxygen species (ROS) produced in all aerobic organisms and environmental factors such tobacco smoking, irradiation and inflammation. Chronic and cumulative ROS causes harmful changes in various macromolecular components such as DNA, lipids and proteins. ROS can also indirectly mediate indirect attack on DNA and cause DNA damages. The formation DNA damage is located at the center of the carcinogenic process, because if such adducts are confused with cellular repair mechanisms and persistence, they can lead to misspellings and eventual mutations and cancer. It has been shown that there is an 80-90% association between DNA damage and cancer. Major environmental factors that cause

cancer by making DNA damage; physical factors (ionizing radiation, ultraviolet rays, asbestos), biological factors (bacteria, viruses and inflammatory diseases), chemical agents (tobacco, alcohol, foods, factors, chemotherapeutics and insecticides) and others (stress, obesity, immune deficiency). These factors usually cause DNA damage by increasing ROS production either directly or indirectly. We can show the DNA damage level by alkaline single cell gel electrophoresis (Comet Assay) which is a sensitive and sensitive test. Thus, we can predict the risk of cancer by environmental factors. People can avoid some cancer-causing exposures, such as tobacco smoke and the sun's rays. But others are harder to avoid, especially if they are in the air we breathe, the water we drink, the food we eat, or the materials we use to do our jobs. Scientists are studying which exposures may cause or contribute to the development of cancer. Understanding which exposures are harmful, and where they are found, may help people to avoid them. As a result, environmental risk factors that cause DNA damage play an important role in the development of cancer, successful management of lifestyle and environmental pollution can reduce cancer risk.

Keywords: Cancer, environmental risk factors, reactive oxygen species, DNA damage

Thiol Disulfide Homeostasis

Özcan EREL

e-mail: erelozcan@gmail.com

*Ankara Yıldırım Beyazıt Univ. Med Fac. Medical Biochem. Dept. Atatürk Hospital,
Ankara, TURKEY*

Abstract

Thiols (mercaptan) are functional sulfhydryl (R-S-H) groups containing a sulfur atom attached to a carbon atom and a hydrogen atom bound to the sulfur atom. The vast majority of the plasma / serum thiol pool consists mainly of albumin and other proteins, while a small portion consists of low molecular weight thiols such as cysteine, cysteinyl glycine, glutathione, homocysteine, and γ -glutamylcysteine.

Thiol groups are oxidized by oxidant molecules under physiological conditions to form a reversible disulfide bond structure. The resulting disulfide bond is also a covalent bond and is also referred to as the -S-S bond or the disulfide bridge. These disulfide bonds can be reduced again to the thiol groups so that the dynamic thiol / disulfide balance is maintained.

The dynamic thiol / disulfide balance has important roles in the regulation of antioxidative protection,

detoxification, signal transduction, apoptosis, enzymatic activity, transcription factors and cellular signaling mechanisms. Changes in thiol / disulfide balance are involved in the pathogenetic mechanisms of many diseases such as multiple sclerosis, diabetes mellitus, cardiovascular diseases, cancer, rheumatoid arthritis, chronic kidney disease, FMF, CCHD, tonsillitis, appendicitis, brucella, schizophrenia, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and liver diseases.

Thiol disulfide homeostasis can be measured in the laboratory by spectrophotometer and automatic analyzer. This test profile has a high potential to generate new information and has potential to be included in routine test profiles in the near future.

Integration of Transcriptomics and Functional Genomics to Study Drug Resistance and Metastasis in Cancer

Özgür ŞAHİN

e-mail: osahin@fen.bilkent.edu.tr

*Bilkent University, Faculty of Science, Department of Molecular Biology and Genetics,
Ankara, TURKEY*

Breast cancer (BC) is one of the most common cancers with >1,300,000 cases and 450,000 deaths each year worldwide. Two most aggressive subtypes of BC are HER2-overexpressing and triple negative breast cancers (TNBCs). As most cancer-related deaths occur due to resistance to therapies and metastasis, it is crucial to elucidate the molecular mechanisms underlying these processes. In this respect, systems level approaches combining Next Generation Sequencing, network modeling, functional genomics and cancer cell biology provide new avenues for targeting protein or non-coding RNA networks in an efficient way which may lead to blockage of by-pass mechanisms or metastasis spread of the cells.

In my talk, I will first present how we (1) use HER2-overexpressing transgenic mouse models and breast cancer cell lines to develop drug resistant models for HER2-targeting agents, and (2) integrate data from cancer patients' expression profiling, TCGA and RPPA to identify biomarkers of drug response, and (3) perform targeted RNAi screening to identify drug

combinations or order of treatments to overcome therapy resistance in this highly aggressive subtype of breast cancer.

In the second part, I will present how we integrate Next Generation Sequencing (RNA-Seq, miR-Seq) data obtained from our mouse models representing chemotherapy resistant or metastatic TNBCs to build 'miRNA-mRNA' or 'miRNA-mRNA-lncRNA' interaction networks. I will then show how we identify key components of these networks using several computational tools to identify novel drug targets, simulate their loss-of-functions and experimentally validate them in order to overcome chemotherapy resistance or block metastasis in TNBCs.

Keywords: breast cancer, drug resistance, metastasis, next generation sequencing, noncoding RNAs

Acknowledgements: These projects are supported by TUBITAK with the grant numbers: 214Z130 and 214S364.

Specifically Targeting Cancer Cells for Theranostic Applications through Glycobiology, Metabolic Glycoengineering, and Nanotechnology

Hafiz Ahmed, Ph.D.

e-mail: hfzahmed86@gmail.com

*GlycoMantra, Biotechnology Center at the University of Maryland Baltimore County,
Baltimore, Maryland, USA*

Abstract

Cell-cell interactions are essential for the survival of the cell. Cell-cell interactions play crucial role in communicating with each other in response to changes in their microenvironment and the loss of this communication between cells can lead to uncontrollable cell growth and cancer. To specifically target cancer cells for both diagnostic and therapeutic (theranostic) applications, we are employing multiple approaches such as glycobiology, metabolic glycoengineering, and nanotechnology. For example, cell surfaces of more than 90% epithelial cancers contain exposed TF-disaccharide (TFD) in their *O*-glycosylated proteins. In tumors, galectin-3 (gal3) interacts with TFD containing glycoproteins such as MUC2 and plays a significant role in promoting cancer progression and metastasis. In normal cells, TFD is masked by sialic acid and cannot bind with the gal3 and so TFD-gal3 interaction is specific to cancer cells. To prevent

cancer metastasis, we have developed a very high affinity gal3 antagonist (GM101) that specifically blocks gal3-TFD interactions. GM101 blocks gal3-mediated angiogenesis, tumor-endothelial cells interactions, and prevents metastasis in mice.

In another approach, we are exploiting cancer cells' abnormal energy metabolism to target cancer cells. We have recently shown that nutrient-deprived cancer cells when supplemented with sialic acid utilize negligible amounts of this sugar for energy compared to their non-malignant counterparts. Instead, malignant cells use sialic acid to maintain cell surface glycosylation through complementary mechanisms. We have determined the nature of sialylation and developed tools to specifically target the cancer cells. Moreover, theranostic nanoparticles are being developed for simultaneous diagnosis of diseases and targeted drug delivery with minimal toxicity.

The Place and Importance of CFSE Method in Determining Cell Cytotoxicity

Faruk SÜZERGÖZ

e-mail: suzergoz@yahoo.com

Harran University, Faculty of Arts and Sciences, Biology Department, Şanlıurfa, TURKEY

Introduction/Aim: Although many advanced molecular biological methods have been tried for cancer treatment; chemotherapy is still one of the preferential method in cancer treatment as a method that maintains its validity. One of the most important parts of the chemotherapeutic agent research is the determination of the ability of herbal or chemical compound to kill or inhibit proliferation of the of cancer cells *in vitro*. Mostly in studies; the cytotoxic or antiproliferative effects of the tested compounds on cancer cells are investigated by similar test methods and the results are jointly evaluated. In recent studies; these two situations are trying to be separated from each other to develop more sophisticated methods for each one. In methods used to determine cell proliferation: based on following of DNA synthesis rate, ATP amount, metabolic activity, change in dyeing properties, specific markers.

Materials and Methods: The technique for analysing cell division using serial dilution of the fluorescein-based dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), described by Lyons and Parish in 1994. CFSE consists of a fluorescein molecule containing two acetate moieties and a succinimidyl ester functional group. In this form, it is membrane permeant and non-fluorescent. After diffusion into the intracellular environment; endogenous esterases remove the acetate groups,

rendering the molecule highly fluorescent and non-permeant to the cell membrane. In addition, the succinimidyl ester reacts with free amine groups of intracellular proteins, forming dye-protein adducts. CFSE is membrane-permeant fluorescent molecules that are retained within the cells through subsequent rounds of cell division, with each daughter cell receiving approximately half of the fluorescence of the parent. CFSE dye enters the cell and trapped there. Upon division, the fluorescence intensity of each daughter cell is halved which allows for the simple detection of the number of cell divisions by flow cytometry.

Results: CFSE stains cells at high fluorescence intensities (in the FL-1 histogram 103 -104) and CFSE has low toxicity for cells. These properties make CFSE ideal for long-term cell proliferation monitoring. CFSE has very bright fluorescence; therefore location of cells in sections can be determined using confocal or fluorescence microscopy.

Conclusion: CFSE can be used without affecting morphology or physiology to trace generations *in vivo* or *in vitro*.

Keywords: CFSE, Cell proliferation, Flow cytometry

Oncology Nursing: Breast Cancer and Social Support

Fatma ERSİN

e-mail: fatmaersin1@gmail.com

Harran University, Faculty of Health Science, Nursing Department, Sanliurfa, Turkey

Abstract

The studies on breast cancer which is frequently discussed in the field of oncology nursing have gained momentum. A total of 8,2 million cancer-related deaths and 14,1 million new cases of cancer occurred worldwide in the year of 2012 while breast cancer (11.9%) is the second most prevalent cancer in the world. Breast cancer is also the leading cancer in the women in Turkey. Nowadays, cancer is perceived as a life-threatening disease, and it remains a very feared disease in spite of significant improvements in its treatment. It is stated in literature that women with breast cancer experience many problems in the physical, social, psychological, and spiritual fields. Because of this reason, women's daily life activities and quality of life deteriorate. In addition, it was determined that there were some psychosocial problems in these patients when the studies on the women with breast cancer were examined. Anxiety, the thought of self-destruction,

social isolation, depression, decrease in self-esteem, hopelessness, sexual dysfunction are frequently mentioned problems in the literature. These problems that arise in the women require the use of supportive approaches in the treatment and care of the patients. At this stage, many women need social support. Social support is important in the recovery process, this condition is independent from the success of the treatment in survival. It is stated in the literature that your social support is very effective in the diagnosis, treatment and rehabilitation of women with breast cancer. At this stage, nursing services come to the forefront, because nurses support the women by identifying the social support needs of the women, and offer the services in this regard. This review was designed to show the effect of social support on the women with breast cancer.

Keywords: Oncology Nursing; Breast Cancer; Social Support, Nurse

Abstract

The major factor that limits success in cancer therapy is the nonselectivity of the anticancer agents towards tumor cells and tissues. Therefore new studies are conducted for detection of specific novel molecules for cancer cells. Specifically the expression pattern of Carbonic Anhydrase IX (CAIX) in solid tumors has led to the use of CAIX as a biomarker, since it can provide evidence about tumor identification and prognosis. Sulfonamides possess many types of biological activities and have recently been reported to show substantial antitumor activity *in vitro* and/or *in vivo*. There are a variety of mechanisms for the anticancer activity and the most prominent of these is through the inhibition of carbonic anhydrase isozymes.

The aim of this study was to evaluate the effects of CAIX inhibitors, namely amine and imine sulfonamides derivatives newly synthesized aromatic sulfonamides with high affinity for CA IX, on cell proliferation and apoptosis in CAIX-positive and CAIX-negative cell lines and correlate these findings with CAIX expression. We sought to investigate the molecular mechanisms underlying the potential apoptotic effect of CAIX inhibitors. Effect of sulfonamides on cell viability was determined by WST-1 assay and then IC₅₀ value of each component was determined. Apoptosis or necrosis induction was

determined by flow cytometric annexin V analyse, intracellular free radical induction will be determined by ROS analyse, intracellular pH induction was determined by fluorescens prob analyses; Antiproliferative effects of compounds was determined by BrdU elisa assay, cellular mitochondrial membrane potential was determined by JC-1 assay, CAIX and apoptosis (cleaved caspase 3,8 and 9) was investigated using level at protein level using Western blotting method, respectively.

At the end of the study it was recognized that 4 of the 16 sulfonamide derivative compounds have high cytotoxic and antiproliferative effects on HeLa cells. It was decided that cytotoxic effect was occurred by apoptosis and CAIX expression and partial increases in pH would be due to inhibition of those effects with CA-IX. The results of data derived from this study will inspire the projects in which those materials are used and which are on hypoxia, 3-D cell culture medium and consecutively animal cells and especially will serve distinctive research areas in cancer treatment.

Keywords: Sulfonamide, Carbonic Anhydrase-IX, Cancer, Cytotoxicity,

Acknowledgements: This study was supported by TUBITAK, project number: 115Z684

Finite Element Analysis Of Electric Field For In-Vitro Electropermeabilization

*In-Vitro Elektropemabilizasyon İçin Elektrik Alanın Sonlu Elemanlar Analizi*Serdal Arslan¹, Meric Arda Esmekaya², Ayse G. Canseven^{2,3}

1 Electric Department in Vocational School of Birecik, Harran University, Sanliurfa, Turkey.

2 Department of Biophysics, Faculty of Medicine, Gazi University, Ankara, Turkey.

3 Department of Biophysics, Faculty of Medicine, Gazi University, Ankara, Turkey.

Corresponding author:

Serdal Arslan, Electric Department in Vocational School of Birecik, Harran University, Sanliurfa,

e-mail:serdalarслан@harran.edu.tr

IONCC kongresinde sözlü sunum olarak sunulmuştur.

Geliş tarihi / Received: 29.09.2017**Kabul tarihi / Accepted:** 22.11.2017**Abstract****Background:** The aim of this study was to investigate the electric field distribution inside the cell solution for different electric pulse amplitudes.**Materials and Methods:** Breast cancer cells were loaded into a BTX 640 model cuvette with parallel aluminum plate electrodes and the cuvette were placed in the electroporation chamber which was connected to electroporator. Eight square pulses of duration 100µs (having repetition frequency of 1Hz) with 400V and 800V were applied to the electrodes. Since electroporation involves electrostatic properties, its analysis is performed using Ansys-Maxwell 3D Electrostatic transient module. In this direction, it is different from other studies in the literature. Firstly, the capacitance of the cuvette is calculated analytically by the parallel plate capacitor approach. Secondly; the capacitance value is calculated numerically by the software. The accuracy of the model is tested with analytical and numerical analysis. Thirdly, the electric field (E) distribution inside the cell solution was examined.**Results:** The capacitance (C) was calculated as 0.5461125pF by using the Formula. C value in the numerical analysis was found to be 0.54387pF. The electric field distribution was found around 1998.7-2001,3V/cm. If E is too low, the potential value for electroporation can not be reached. Increasing E at the corners of the cell solution is an expected result. Because electrical charges accumulate at corner points. While the applied voltage is 400V, E value on the solution is around $5.66 \times 10^4 - 8.13 \times 10^4$ V/m. Thus,the membrane potential is calculated at about 0.56-0.81V. While the applied voltage is 800V, E is around $1.035 \times 10^5 - 1.82 \times 10^5$ V/m on the solution. Thus, the membrane potential is calculated at about 1.03 - 1.82 V.**Conclusion:** The capacitance value error ratio between analytical and numerical analysis was 0.047%. It is expected that the actual model will be compatible with the model in the simulation. As the amount of the cell solution increased, a linear increase in the capacitance value was observed. For this reason, the charging time for electroporation of the cells is affected. In analyzes performed with solution, when 400V is applied, the permeability of the cells in the electric field values (1000 V/cm) is low. However, increasing the voltage value from 400V to 800V could significantly increase the permeability of the cells.**Key Words:** Electropermeabilization, Electroporation, Electric Transient, In-Vitro, Finite Element Analysis.**Öz****Amaç:** Farklı elektrik puls değerliklerinde hücre solüsyonundaki elektrik alan değişimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır.**Materyal ve Metod:** Meme kanseri hücreleri, paralel alüminyum plak elektrotlu 4 milimetre (mm) boşluklu elektroporasyon kuvvetlerine yerleştirildi. Kuvvetler, elektroporasyon cihazına bağlanan elektroporasyon odasına alındı. Hücrelere, 0-800 V aralığında genlik ile 8 karesel titreşim (tekrarlama frekansı 1 Hz'lik) uygulanmıştır. Her bir elektrik darbesinin süresi 100

µs idi. Elektroporasyon işlemi elektrostatik özellikler içerdiğinden dolayı Ansys Maxwell 3D Elektrostatik ve Elektrostatik transient modülü kullanılarak analiz işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu özelliğiyle literatürde yeralan diğer çalışmalardan farklıdır. İlk olarak, kuvvet içinde bulunan elektrotlar paralel plakalı kondansatör yaklaşımı ile kapasitans değeri analitik olarak hesaplanmıştır. İkinci olarak, yazılım ile kapasitans değeri nümerik olarak hesaplatılmıştır. Analitik ve nümerik analiz ile modelin doğruluğu test edilmiştir. Üçüncü olarak, hücre solüsyonundaki elektrik alan değişimi incelenmiştir.

Bulgular: Kapasitans (C) formül kullanılarak; 0.5461125 pF olarak hesaplanmıştır. Nümerik analizi neticesinde kapasitans değeri 0.54387 pF olarak bulunmuştur. Elektrik alan değişimi 1998.7-2001,3 V/cm aralığında görülmüştür. Eğer elektrik alan şiddeti çok düşükse, hücrelerde por için gerekli potansiyel değerine (0.7-1V) ulaşamaz. Solüsyonun köşe kısımlarında elektrik alan değerinin artması beklenen bir sonuçtur. Çünkü yükler köşe noktalarında birikir. 400V uygulandığında, solüsyondaki E değeri

$5.66 \times 10^4 - 8.13 \times 10^4$ V/m civarındadır. Böylece membran potansiyeli 0.56-0.81 V'tur. 800V uygulandığında ise, E değeri $1.035 \times 10^5 - 1.82 \times 10^5$ V/m civarındadır. Böylece membran potansiyeli 1.03-1.82 V'tur.

Sonuç: Analitik ve nümerik analiz arasındaki kapasitans değeri hata oranı %0.047 olarak görülmüştür. Benzetim çalışmasındaki model ile uygulamadaki gerçek model uyuşması beklenmektedir. Solüsyon miktarı arttıkça kapasitans doğrusal olarak değişmektedir. 400V uygulandığında yada 1000 V/cm elektrik alan değerlerinde solüsyondaki hücrelerin geçirgenliği azdır. Ancak gerilim 800V değerine yükseltildiğinde hücrelerin geçirgenliğinde önemli bir artış beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Elektroporasyon, Elektroporasyon, Elektrik Geçici Hal Analizi, In Vitro, Sonlu Elemanlar Analizi

INTRODUCTION

'Electropermeabilization' or 'Electroporation'; a phenomenon that is defined by an additional voltage component along the cell membrane through exposure of the cell to an external electric field (1). Electroporation in terms of electrical properties; applied in the form of short pulses (5KHz or 1Hz) of high voltage value (2). The permeability of the cell membrane is significantly increased and nano-sized pores are formed. These electropores enable the transport of deoxyribonucleic acid (DNA), ribonucleic acid (RNA), proteins, fluorescent markers, peptides, polar and charged molecules, plasmids and cancer drugs into the interior of the cell. Electroporation may be reversible or irreversible depending on pulse parameters such as; amplitude, duration

time, number of pulses, repetition frequency, polarity and etc. The most important electroporation parameters to be optimized are amplitude of electrical pulses. For instance, at low amplitude voltage values, the cell permeability level is not affected, but DNA transfer is facilitated (2). This method has been used in the last decade for in vitro application of genetic material to the cell (3). This approach was first applied in vitro. But it retained its validity in vivo (4). Theoretical and practical studies; the level of cellular granular permeability has been shown to depend on the electric field, cell size, shape and interaction with the surrounding cells. Some factors related to cell permeability are, for example, cellular tiny particles, ambient conductance, cell position, critical transmembrane

voltage (TMP) affect effective tissue conductivity. In addition, the local electric field intensity at a site is the key parameter for permeability (2). The electroporation process is carried out by means of an electropulsor or a capacitor discharge. The electrodes, which consist of two rectangular, flat and stainless steel materials, are arranged in parallel to form a regular electric field. Electric field parameters can be adjusted by controlling the square wave (pulse) from the electropuls source (4). Castiello et al. (5) have performed tests of different in vitro models. They argued that the new device had faster and homogenous voltage pulses than standard electropuls sources. In addition, the Electropuls system can be used to treat tumors by taking cancer drugs into cells. This system is known as electrochemotherapy which the effect of anticancer drugs can be increased and the side effects of drugs can be reduced (6). For example, Low dose Cisplatin can be used in the treatment of neuroblastoma with electroporation, but when used in combination with tamoxifen electroporation, it is effective in breast cancer treatment (7,8).

Tumor and healthy tissue can be determined by solving the electric field changes the electrostatic-based programs. The solution of the solution methodology included in some commercially available programs (finite element method, finite difference method, etc.) does not change the basic field rules used for the solution. However, the

electrical conditions required for the application require the same characteristics of the simulated conditions. In short, the electroporation system should be considered as a transient electrostatic problem because of the electrostatic problems in the field of electrical parameters and pulse source. Sreet al. (9) has shown that the electric field distribution of ductal carcinoma is 11.5% higher than that of normal touch in Maxwell 3D simulation program. Different geometries have been created for a number of new large needle array configurations required for electroporation of larger areas for alternative cancer treatments (1,10-11). Miklavčič et al. (12) have studied the change of electric field with the needle diameters for in vivo application of electroporation.

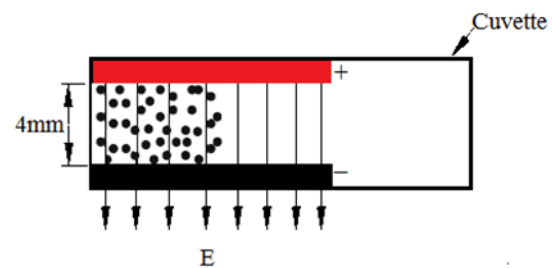


Figure 1. Two-dimensional appearance of DMEM solution with Cuvette

In this study, the electric field change of the BTX 640 model 4 mm cavity cuvette, which is currently produced for in vitro application, was investigated by the finite element method. A train of 8 square pulses (having repetition frequency of 1 Hz) with amplitude ranging from 0 to 800 V were applied to 100 μ L DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's

Medium) cells placed in the cuvette. The duration of each electric pulse was taken as 100 μ s. Since electroporation involves electrostatic properties, its analysis is performed using Ansys-Maxwell 3D Electric transient module. In this direction, it is different from other studies in the literature. Firstly, the capacitance of the cuvette is calculated

analytically by the parallel plate capacitor approach. Secondly; the capacitance value is calculated numerically by the software. The accuracy of the model is tested with analytical and numerical analysis. Thirdly, the electric field (E) distribution inside the cell solution was examined.

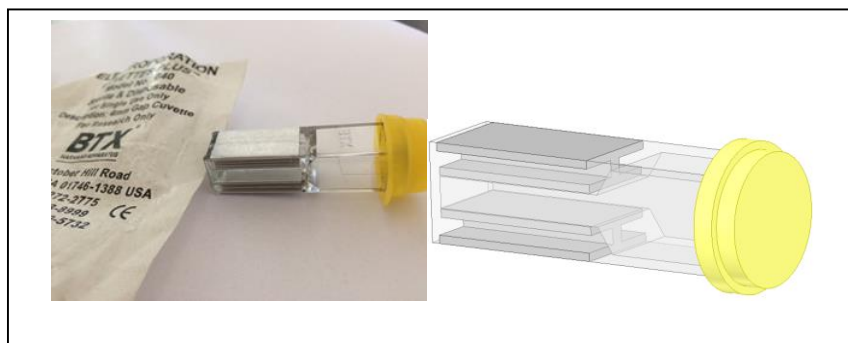


Figure 2. a) Harvard BTX 640 model cuvette, b) Simulation Model

MATERIALS AND METHODS

The size of the field distribution of an electrode system depends on the magnitude of the voltage, the electrode gap. Numerical calculation methods are usually used to find the maximum electric field in mixed electrode systems that require long calculation processes. In Figure 1 a two-dimensional view of the cuvette system is given.

The solution contained in the cuvette is defined as 1.5 S/m and the dielectric constant 80. Due to the conductivity of the solution, the entire surface of

the plates is coated with insulating material and is produced hollow. The realization of the solution cuvette and the simulation model are given in Figure 2:

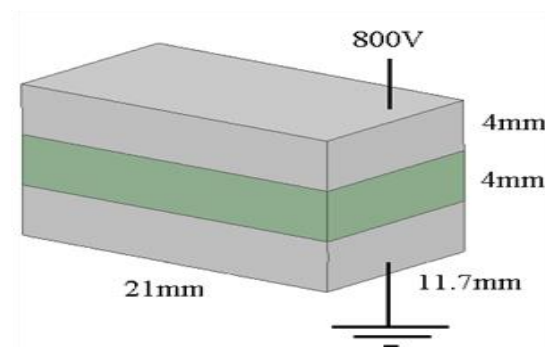


Figure 3. Simulation with parallel plate of Figure 2b

The error rate between analytical and numerical calculation significantly changes the application results. For this reason, calculations like the model parallel plate condenser in Figure 2b have been performed. For this reason, the analysis of the model given in Fig 3.

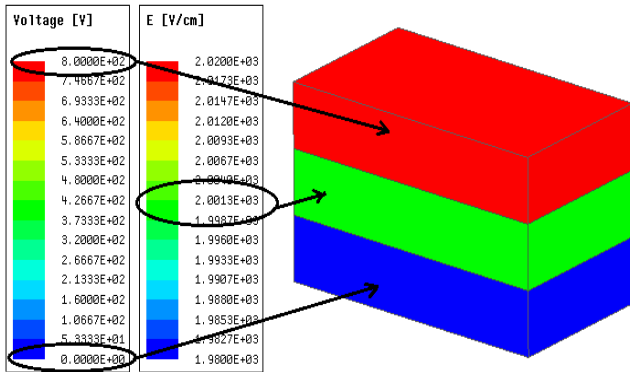


Figure 4. Plate potential and electric field change

It is difficult to investigate on electrical activity of cells, tissues and organs due to measurement and ethical reasons. For this reason, software that uses the finite element method is preferred in literature to investigate the electrical effects. In general, the electrical properties of a biophysical problem can be electromagnetic, electrostatic, or two-domain problems. As the electroporation process contained electrostatic properties, analyzes were performed using the Ansys-Maxwell 3D Electrostatic and Electric transient module.

The electrostatic field simulator computes static electric fields arising from potential differences and charge distributions. The electrostatic solver calculates the value of the electric potential at each

tetrahedron node. To produce the optimal mesh, used an adaptive analysis, in which the mesh is automatically refined in critical regions (13). As the Electric transient solver does not provide adaptive meshing, so we will first solve using Electrostatic solver and import its adaptively refined mesh for use in Electric transient solution. However, the two model geometries must be identical. Electrostatic field computes the static electric field that exists in a structure given a distribution of DC voltages and static charges. A capacitance matrix, force may also be computed from the electric field (14). For electrostatic solver (14):

- It is assumed that all objects are stationary,
- There is no time variation of any of the electromagnetic quantities,
- There is no current flow in conductors,
- All conductors are considered to be perfect,

Electric field (E) is automatically calculated from the scalar potential (φ). φ is represented by the Poisson equation,

$$\nabla^2 \varphi = -\rho / \epsilon_r \epsilon_0 \quad (1)$$

Electrostatic solver solves for the electric field using the general formulation of fields,

$$E = -\nabla \varphi \quad (2)$$

Following the calculation of E, it creates the solution files and performs an error analysis on the solution. Using the adaptive analysis, refining the regions of the mesh in which the largest error exists. Refining the mesh makes it denser in the areas of highest error, continues solving until the stopping criterion is met, and resulting in a more accurate field solution.

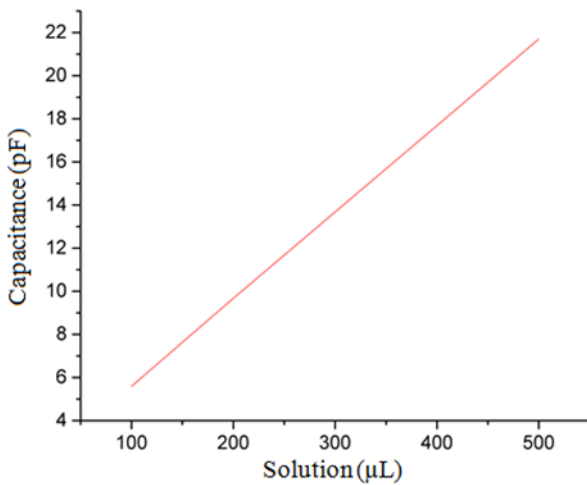


Figure 5. Capacitance change with solution

The Electric transient module can be used to study the field distribution in objects subjected to lightning-induced overvoltage, produced by power transmission line and other applications. The solver uses time-varying applied potentials, total charge and volume charge density, time-varying current excitations. The quantity for which the electric transient field simulator solves is the electric potential; the electric field, the current density and the electric flux density are automatically calculated from the potential.

Derived solution parameters such as the electric energy, ohmic loss, surface charge density; maximum and minimum electric field can be obtained for each solid (14).

$$-\nabla \cdot \left(\epsilon \nabla \frac{\partial \phi}{\partial t} \right) - \nabla \cdot (\sigma \nabla \phi) = 0 \quad (3)$$

The electrostatic model is described by defining the geometry, material properties, voltages, external conditions in the Cartesian coordinate system. Solution process is repeated until energy error value decreases. Unlike an electrostatic solution, an electric transient is drawn to the design data sets of interest voltage graphs. The corresponding voltage value is assigned as pwl (amplitude, time).

For the model in Figure 2b, the fringing of the electric field at the edges in the solution-free cuvette, the electric field is smooth and stable.

Equal to $E = \frac{V}{d}$. Where V is the applied DC voltage (Volt), d is the distance between parallel plates (m). The electrostatic energy density is

$$W_e = \frac{1}{2} \int_V \epsilon E^2 dv \quad (4)$$

Capacitance expression C (F); Equation 6 is obtained when the plate surface area is S (m^2) and the electric field in Equation 4 is written.

$$W_e = \frac{1}{2} \left(\epsilon \frac{S}{d} \right) V^2 \quad (6)$$

The expression given in parentheses here is expressed as the capacitance of the parallel plate model. It should also be noted that the ϵ expression is the dielectric product of the material placed between the gap and the plates. In this case, the relationship between the energy stored in a capacitor model and the capacitance is given in Equation 7.

$$W_e = \frac{1}{2} CV^2 \quad (7)$$

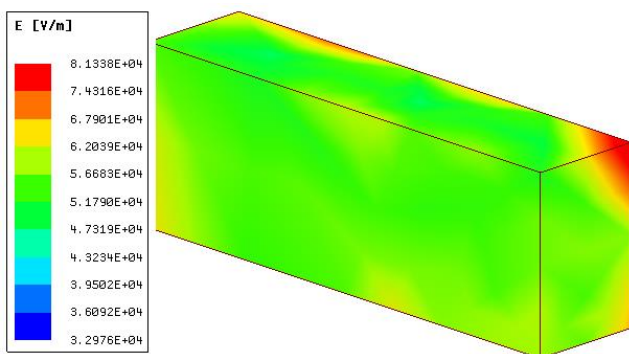


Figure 6. Electric Field Variation in Solution (400V)

$$C = \epsilon \frac{S}{d} \quad (5)$$

RESULTS

The change in electric field of the model in Fig. 2b without solute was investigated by three-dimensional analysis. In addition, parallel plate capacitor calculations were carried out and the capacitance was calculated analytically and compared with the three-dimensional model. The surface area of a plates is equal to $0.2457 m^2$. Distance between two plates are $0.004 m$ and the permittivity of free space is equal to approximately 8.85×10^{-12} (F/m). The capacitance (C) was calculated as 0.5461125 pF by using the Equation 5. The capacitance value in the numerical analysis was found to be 0.54387 pF. The electric field and the potential change are given in the Figure 4.

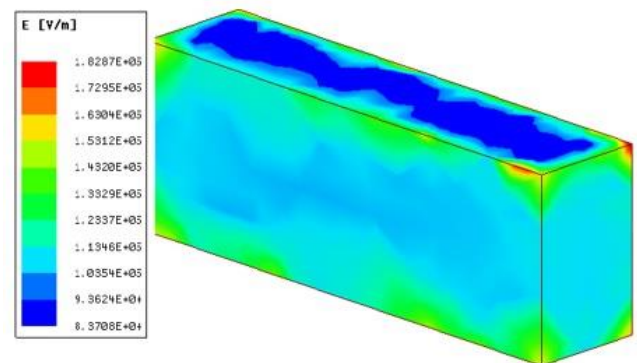


Figure7. Electric Field Variation in Solution (800 V)

The electric field distribution was found around 1998.7-2001.3 V/cm. If the pulse length is too short, the membrane capacitance cannot be charged to the potential value required for the cell (15). For this reason, the capacitance variation with solution is given in Figure 5: If the magnitude of the electric field is too low, the potential value for electroporation can not be reached (15). This potential value is larger for large cells with constant electric field value ($V_{cell} = 1.5rE \cos \theta$) (15). Where E electric field, r cell radius (10-100 μm), θ is given as the angle between the cell surface and the electric field. When 400V and 800V are applied, the distribution of the electric field in the solution between the plates is given in Figures 6 and 7.

Increasing the value of the electric field at the corners of the cell solution is an expected result. Because electrical charges accumulate at corner points. While the applied voltage is 400 V, E value on the solution is around $5.66 \times 10^4 - 8.13 \times 10^4$ V/m. Thus, the membrane potential is calculated at about 0.56-0.81 V. In green areas, the permeability of the cells is very low.

While the applied voltage is 800 V, E is around $1.035 \times 10^5 - 1.82 \times 10^5$ V/m on the solution. Thus, the membrane potential is calculated at about 1.03 -1.82 V. The permeability of the cells

at green and solution corner points is very low. However, the permeability of the cells in the interior of the solution in general and in the areas near the plate surfaces will be very high. Increasing the voltage value from 400V to 800V has been shown to significantly increase the permeability of the cells.

DISCUSSION

In this study, the electric field distribution of the BTX 640 (4mm cavity cuvette) was investigated by the finite element method. Without adding solution into the cuvette is likened to a parallel plate capacitor model. The capacitance value error ratio between analytical and numerical analysis was 0.047% in the Capacitance. It is expected that the actual model will be compatible with the model in the simulation. As the amount of the cell solution increased, a linear increase in the capacitance value was observed. For this reason, the charging time for electroporation of the cells is affected. In analyzes performed with solution, when 400V is applied, the permeability of the cells in the electric field values (1000 V/cm) is low. However, increasing the voltage value from 400V to 800V could significantly increase the permeability of the cells. In the experimental study given in reference (7,8), it has been shown that cell permeability and electric field value change in a similar manner. Besides, the design is because of

solving step by step in the electric transient module, there is an increase in the analysis time. Importing the mesh geometry from the

electrostatic module is crucial in terms of giving correct results.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

Funding

The authors received no financial support for the research and/or authorship of this article. The software was obtained from the Gazi University.

References

1. Ongaro A, Campana LG, De Mattei M, Dughiero F, Forzan M, Pellati A, Rossi CR, Sieni E. Evaluation of the Electroporation Efficiency of a Grid Electrode for Electrochemotherapy From Numerical Model to In Vitro Tests. *Technology in cancer research & treatment* 2015;15(2):296-307.
2. Cukjati D, Batuskaite D, Slivnik T, Mir LM, Miklavčič D. Sequential finite element model of tissue electropermeabilization. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 2005;52(5):816-827.
3. Dev SB, Rabussay DP, Widera G, Hofmann GA. Medical applications of electroporation. *IEEE Transactions on Plasma Science* 2000;28(1):206-23.
4. Rols MP, Golzio M, Gabriel B, Teissié J. Factors controlling electropermeabilisation of cell membranes. *Technology in cancer research & treatment* 2002;1(5):319-27.
5. Castiello M, Dughiero F, Scandola F, Sieni E, Campana LG, Rossi CR, De Mattei M, Pellati A, Ongaro A. A new grid electrode for electrochemotherapy treatment of large skin tumors. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* 2014;21(3):1424-32.
6. Hong Z, Hao Z, Wei H, Zishu W, Qin G, Hong L. An exploration for optimal parameters of electromagnetic impulse on electrochemotherapy (ECT) of tumor. *CEEM Proceedings* 2003;118-121
7. Esmekaya, M. A., Kayhan, H., Coskun, A., & Canseven, A. G. Effects of Cisplatin Electrochemotherapy on Human Neuroblastoma Cells. *The Journal of membrane biology* 2016;249(5):601-610.
8. Esmekaya, M. A., Kayhan, H., Yagci, M., Coskun, A., & Canseven, A. G. Effects of Electroporation on Tamoxifen Delivery in Estrogen Receptor Positive (ER+) Human Breast Carcinoma Cells. *Cell biochemistry and biophysics* 2017;75(1):103-109
9. Sree G, Velvizhi VK, Sundararajan R. Electric field distribution of malignant breast tissue under needle electrode configuration. In *Electrical Insulation and Dielectric Phenomena (CEIDP)* 2012:267-270
10. Campana, L. G., Dughiero, F., Forzan, M., Rossi, C. R., & Sieni, E. A prototype of a flexible grid electrode to treat widespread superficial tumors by means of Electrochemotherapy. *Radiology and oncology* 2016; 50(1): 49-57.
11. Bommakanti S, Agoramurthy P, Campana L, Sundararajan R. A simulation analysis of large multi-electrode needle arrays for efficient electrochemotherapy of cancer tissues. In *Electrical Insulation and Dielectric Phenomena (CEIDP)* 2011: 187-190
12. Miklavčič, D., Šemrov, D., Mekid, H., & Mir, L. M. A validated model of in vivo electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 2000; 1523(1): 73-83.
13. Ansys Maxwell v16 Training Manual Lectures 4,5,6.
14. Ansys Maxwell v16 Help File.
15. Jaroszeski J. M., Heller R., Gilbert R. *Electrochemotherapy, Electrogenotherapy and Transdermal Drug Delivery, Methods in Molecular Medicine, Humana Press, 2000:1-488*

Şanlıurfa'daki Prostat Kanseri Hastalarında VGSC'lerin İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi

An Immunohistochemical Investigation of VGSCs in Prostate Cancer Patients in Sanliurfa

Hatice GUMUSHAN AKTAS¹, Cemal CAVUS², Ulaş ALABALIK³

1 Harran University, Faculty of Arts and Sciences, Biology Department, Sanliurfa, Turkey.

2 Harran University, The Institute for Graduate Studies in Science, Biology Department, Sanliurfa, Turkey.

3 Dicle University, Faculty of Medicine, Pathology Department, Diyarbakir, Turkey..

Sorumlu yazar:

Hatice GUMUSHAN AKTAS

Harran Üniversitesi, Fen – Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 63300, Şanlıurfa, Türkiye +90 414 3183000 / 1192
e-mail: haticeaktas@harran.edu.tr

Bu çalışma, 21 – 23 Eylül 2017 tarihinde Şanlıurfa'da yapılan 1. Uluslararası Kanser ve İyon Kanalları Kongresi'nde poster bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş tarihi / Received: 31.10.2017

Kabul tarihi / Accepted: 28.11.2017

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, genitoüriner sistem rahatsızlıkları nedeniyle Şanlıurfa'daki Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran bazı hastalardan alınmış prostat doku örneklerinde Nav1.7 geni tarafından kodlanan proteinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışmada, tanı konulmuş (benign prostatik hiperplazi, prostatik intraepitelyal neoplazi, metastatik olmayan prostat kanseri ve metastatik prostat kanseri) 20 hastaya ait prostat dokusu örnekleri ve dört normal prostat kullanıldı. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ile Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin Patoloji arşivlerinden alınan bu numuneler 2012–2014 yıllarına aittir. İşaretleme için anti-sodyum kanalı Nav1.7 monoklonal antikor (Millipore, Merck, ABD) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak, üretici firmanın önerisine göre, sıçan beyincik dokusu ile çalışıldı. İmmünohistokimyasal boyama işlemi otomatik immünohistokimya cihazında (Ventana, Roche, ABD) yapıldı.

Bulgular: Primer antikor uygulanmayan negatif kontrol kesitlerinde boyanma olmadı. Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında prostat doku örneklerinde (normal prostat dokusu, benign prostatik hiperplazi, prostatik intraepitelyal neoplazi dokusu, metastatik olmayan prostat kanseri ve metastatik prostat kanseri) dikkate değer bir boyanma gerçekleşmediği gözlemlendi.

Sonuç: Nav1.7 geni tarafından kodlanan VGSC proteini, normal prostat ve benign prostat hiperplazisi yanı sıra prostatik intraepitelyal neoplazi, metastatik olmayan prostat kanseri ve metastatik prostat kanseri gibi farklı derecelerde kanser bulunan hastalarda immünohistokimyasal olarak gösterilememiştir. İncelemeler, diğer genler tarafından kodlanan VGSC'lere karşı üretilmiş çeşitli antikorlarla işaretlenerek sürdürülmelidir. Ayrıca bulgular diğer moleküler tekniklerle de doğrulanmalıdır.

Anahtar kelimeler: Voltaj kapılı sodyum kanalları, Nav1.7 antikor, prostat kanseri, immünohistokimya.

ABSTRACT

Aim: In this study, it was aimed to investigate presence of the protein which encoded by Nav1.7 gene in prostate tissue specimens obtained from some patients consulted to Harran University Medical Faculty Hospital and Mehmet Akif Inan Training and Research Hospital in Sanliurfa owing to genitourinary system disorders.

Materials and Methods: In this study, it was used the prostate tissue samples which belong to 20 diagnosed patients (benign prostatic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia, non-metastatic prostate cancer and metastatic prostate cancer), and four normal prostate. These specimens obtained from Pathology Department archives of Harran University Faculty of Medicine Hospital and Mehmet Akif Inan Training and Research Hospital belong to 2012–2014. For labelling, Anti-Sodium channel Nav1.7 monoclonal antibody (Millipore, Merck, USA) was used. It was studied with rat cerebellum tissue as positive control in accordance with the manufacturer's protocol. The immunohistochemical staining procedure was

performed in automatic immunohistochemistry device (Ventana, Roche, USA).

Results: There was no staining in the negative control sections which non-treated with primer antibody. No remarkable staining was observed in prostate tissue specimens (normal prostate tissue, benign prostatic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia tissue, non-metastatic prostate cancer and metastatic prostate cancer) when compared with the positive control.

Conclusion: The VGSC protein which encoded by Nav1.7 gene was not showed by immunohistochemically in patients with normal prostate, benign prostatic hyperplasia as well as different grades of cancer such as prostatic intraepithelial neoplasia, non-metastatic prostate cancer, and metastatic prostate cancer. Investigations should be continued by marking with various antibodies that produced against VGSCs encoded by other genes. Additionally, the findings should confirm with other molecular techniques.

Keywords: Voltage-gated sodium channels, Nav1.7 antibody, prostate cancer, immunohistochemistry

GİRİŞ

Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından 2014 yılında yayımlanan rapora göre, 2012 yılında dünya çapında yaklaşık 8.2 milyon kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmiş olup 14.1 milyon yeni kanser vakası kaydedilmiştir (1). Kanser, hem kadınlar hem de erkeklerde kalp hastalıklarından sonra gelen en önemli ölüm nedenidir (2,3). Prostat kanseri ise erkeklerde en sık görülen kanserler arasında ülkemizde ve dünyada ikinci sıradadır (3,4). Ayrıca, prostat kanserinin görülme sıklığı, etnik gruplar ve ülkeler arasında da değişiklik göstermektedir. (5). Prostat kanseri için kullanılan cerrahi çıkartım, radyoterapi, hormon tedavisi ve izleyerek bekleme

gibi tedavi yöntemlerinin etkinlikleri farklı olmakla birlikte çoğu bireyde hastalık ilerleyerek metastatik evreye geçmektedir (6). Metastaz, primer tümörden ayrılan bir tümör hücrelerinin dolaşım sistemine girip uzak alanlara göç etmesi ve bu alanlarda yerleşerek ikincil tümörleri oluşturmasıdır. Metastatik süreçte, hücre iskeleti elemanları, hücre dışı matriksi yıkan enzimler ve onların inhibitörleri, hücre adezyon molekülleri vb. yanısıra iyon kanal aktivitesi gibi pek çok faktör rol oynamaktadır (7,8).

İyonların hücre içi ile dışı arasında taşınmasını gerçekleştiren iyon kanalları, sinir ve kas hücrelerinin uyarılması, hücrel homeostazın

sağlanması, hücre proliferasyonu, apoptoz ve hücre siklusunun kontrolü gibi önemli işlevlere sahiptirler (9-11). Bu yüzden kanal aktivitesindeki değişikliklerin birçok hastalıkla ilişkili olabileceği bildirilmektedir (10). Özellikle prostat ve meme kanseri hücreleri ile yapılan çalışmalarla, voltaj kapılı sodyum kanallarının (VGSC) artmış veya değişmiş ekspresyon ya da aktivasyonunun invazyon ve metastaz gibi çeşitli kanser hücre davranışlarını ortaya çıkardığı tespit edilmiştir (12-17). Bennett ve ark. (2004), metastatik olmayan veya orta derecede metastatik olan insan prostat kanseri hücrelerinin invazif potansiyelini arttırmak için VGSC'lerin aşırı ekspresyonunun gerekli ve yeterli olduğunu göstermişlerdir (18).

VGSC'ler iki alt üniteden oluşmaktadır. Kanalın poru meydana getiren kısmı olan α alt ünitesi 260 kDa ağırlığındadır (19). Bir veya daha fazla sayıdaki β alt üniteleri (33 – 36 kDa), düzenleyici proteinlerdir. Hem hücre adezyon molekülü olarak rol oynayabilirler hem de sodyum kanal yoğunluğunu ve hücre uyarılabilirliğini arttırarak VGSC'lerin hücre yüzeyi ekspresyonunu düzenleyebilirler. (20). VGSC'lerin α alt ünitesini kodlayan on (Nav1.1 – Nav1.9, NaX) adet genden Nav1.1, Nav1.2 Nav1.3, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8 ve Nav1.9'un sinir dokusunda, Nav1.4'ün iskelet kasında, Nav1.5'in ise kalp kasında bulunduğu tespit edilmiştir (21).

Fraser ve ark. (2005), yüksek metastatik özellikteki bir meme kanseri hücre soyunda (MDA-MB231) metastazın Nav1.5 geninin yüksek oranda eksprese edilmesiyle bağlantılı olduğunu bulmuşlardır (15). Sıçan prostat kanseri hücre soyu olan güçlü metastatik MAT-LyLu hücrelerinde ise yaklaşık yedi farklı VGSC α alt tipi mRNA bulunduğu ve en yüksek mRNA seviyesinin Nav1.7 alt tipine ait olduğu gösterilmiştir. Farklı metastatik özellikteki insan ve sıçan prostat kanseri hücre soyları üzerinde yapılan moleküler biyolojik analizler, zayıf metastatik hücrelerle karşılaştırıldığında, yüksek metastatik hücrelerde Nav1.7 geninin üç kat daha fazla eksprese edildiğini ortaya çıkarmıştır (22).

Prostat kanserli hasta dokularında VGSC'leri kodlayan Nav1.7 geninin ekspresyonunun artmış olduğu bildirilmektedir. Ex vivo olarak yapılan incelemelerle, Nav1.7 gen ekspresyonunun, ileri evre prostat kanserli hasta dokularında, normal prostat dokusundan yaklaşık 20 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (14). Bu bulgular ve biriken kanıtlar, VGSC'lerin hem metastatik kanserler için bir biyobelirteç hem de yeni ve kullanışlı bir tedavi hedefi olabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak bölgesel ve irksal farklılıkların çeşitli kanserlerin görülme sıklığı ve prognozu ile bağlantılı olduğu göz önüne alındığında Türkiye'de yaşayan prostat kanseri hastalarında VGSC ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi, bu

genin ürünü olan proteinin bir biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelinin ortaya çıkarılmasına katkı sağlayacağından, önem arz etmektedir.

MATERYAL VE METOD

Doku örneklerinin toplanması:

Bu çalışmada Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ile Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin Patoloji arşivlerinden temin edilen 2012 – 2014 yıllarına ait prostat dokusu örnekleri kullanılmıştır. Tanı konulmuş 20 hastaya ait prostat dokusu örnekleri ve 4 normal prostat çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta örnekleri, benign prostatik hiperplazi (n=6), prostatik intraepitelyal neoplazi (n=4), metastatik olmayan prostat kanseri (n=5) ve metastatik prostat kanseri (n=5) olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Çalışma için gereken etik kurul onayı Harran Üniversitesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 15.04.2014 Sayı: 05/04).

İmmünohistokimyasal boyama:

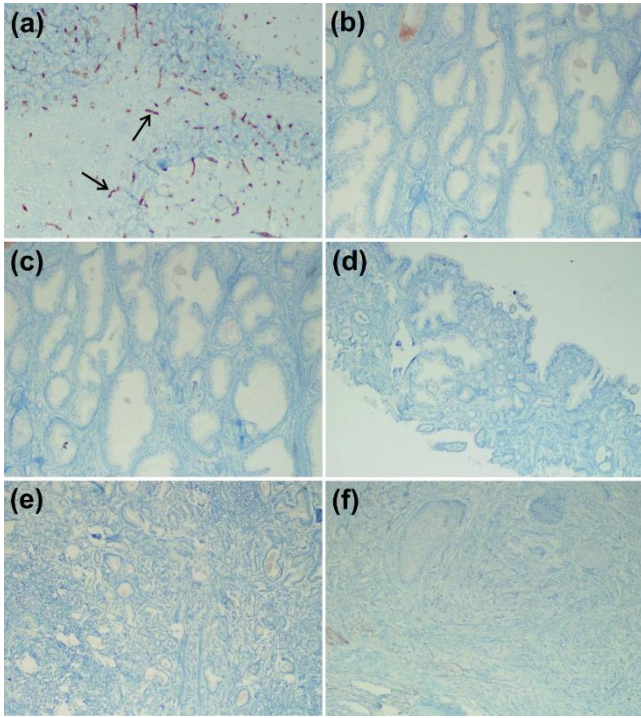
VGSC proteinin belirlenebilmesi amacıyla parafine gömülü doku örneklerinden immünohistokimyasal (IHC) inceleme için 3 – 4 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler pozitif yüklü lamlara yapıştırılmış ve etüve yerleştirilerek bir gece (14 – 16 sa) 56 oC'de bekletilmiştir. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü otomatik immünohistokimya cihazında (Ventana,

Roche, USA) çalışılmıştır. İki aşamalı çalışma sistemine sahip olan cihazda birinci basamakta deparafinizasyon ve antijen geri kazanma işlemleri ikinci basamakta ise; antikor inkübasyonu, kromojen (diamino benzoik asit, DAB) ve zıt boya (Mayer hematoksilin) uygulanması işlemleri yapılmıştır. Antijen geri kazanımı sitrat tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir. Primer antikor inkübasyonu için 1:200 oranında dilüe edilmiş Anti-Sodium channel Nav1.7 monoklonal antikor (Millipore, Merck, USA) kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak üretici firmanın önerisine göre sıçan beyincik dokusu kullanılmıştır. Negatif kontrol kesitlerine primer antikor uygulanmamıştır. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda analiz edilmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

BULGULAR

Normal ve hasta (benign prostatik hiperplazi, prostatik intraepitelyal neoplazi, metastatik olmayan prostat kanseri ve metastatik prostat kanseri) prostat dokusu örneklerinde voltaj kapılı sodyum kanalı varlığı immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. VGSC'leri kodlayan genlerden Nav1.7'ye karşı üretilmiş Anti-sodium channel Nav1.7 primer antikor uygulanmayan negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir işaretlenme gözlenmemiştir. Üretici firmanın önerisine göre pozitif kontrol olarak kullanılan sıçan beyincik dokusunda boyanma Şekil 1a'da

görülmektedir. Normal prostat dokusu (Şekil 1b) ve benign prostat hiperplazili (Şekil 1c) doku örneklerinde pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında dikkat çekici bir boyanma gözlemlenmemiştir. Benzer şekilde prostatik intraepitelyal neoplazili doku (Şekil 1d), nonmetastatik prostat kanseri dokusu (Şekil 1e) ve metastatik prostat kanseri (Şekil 1f) örneklerinde de voltaj kapılı sodyum kanalının varlığı immünohistokimyasal olarak gösterilememiştir.



Şekil 1. Prostat dokusu örneklerinde Nav1.7'nin immünohistokimyasal analizi (ışık mikroskobu, büyütme oranı: 4x). (a) Pozitif kontrol (Sıçan beyincik dokusu) (b) Normal prostat dokusu (c) Benign prostat hiperplazisi (d) Prostatik İntraepitelyal Neoplazi (e) Prostat kanseri (f) Metastatik prostat kanseri

TARTIŞMA

Dünyada kadın ve erkek ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan kanserden kaynaklanan ölümlere bakıldığında, esas etkenin metastaz olduğu göze çarpmaktadır (23,24). Kanser gelişimi ve metastatik sürecin aydınlatılması amacıyla yürütülen in vitro ve in vivo çalışmalar, birçok kanserin ortaya çıkışı, ilerlemesi ve yayılmasında iyon kanallarının önemli rollere sahip olduğunu göstermiştir (25,26). İyon kanallarından özellikle voltaj kapılı sodyum kanallarının, kanser hücrelerinin metastatik potansiyelinde kuvvetlendirici bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Araştırmalardan elde edilen bulgular, hüresel uyarılabilirlik (CELEX) hipotezini ortaya çıkarmıştır. Bu hipotez, metastazın başlamasında VGSC ekspresyonunun arttığını, güçlü metastatik karsinoma hücrelerinin uyarılabilir hale geldiğini, bu membran uyarılabilirliğinin kanser hücrelerini hiperaktif ve invazif yaptığını ve böylece metastazı desteklediğini önermektedir (27).

Spesifik bir VGSC blokeri olan tetrodotoksinin kullanıldığı in vitro (12,18,28) ve in vivo (29) çalışmalarla metastatik prostat kanseri hücrelerinde VGSC ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Diss ve ark. (2001), insan ve sıçan prostat kanseri hücrelerinden yüksek metastatik özellikte olanların (PC-3 ve MAT-LyLu) zayıf metastatik olanlara (LNCaP ve AT-2) oranla daha

fazla VGSC (özellikle Nav1.7) eksprese ettiğini göstermişlerdir (22). Ex vivo olarak yapılan çalışmalarla da benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Araştırmacılar, ileri evre prostat kanseri hastalarına ait prostat dokularındaki Nav1.7 gen ekspresyonunun normal prostat dokusundan yaklaşık 20 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir (14). Bütün bulgular, VGSC'lerin metastazlar için yeni ve önemli bir tedavi seçeneği olabileceğini işaret ederken VGSC'lerin biyobelirteç olarak tarama ve teşhis amacıyla kullanılabilceğini göstermektedir.

Ülkemizde birçok farklı etnik kökenden insanı barındıran Güneydoğu Anadolu Bölgesi Şanlıurfa ilinde bulunan Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ile Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne 2012 – 2014 yılları arasında başvurmuş ve teşhis konulmuş hastalardan alınan prostat dokusu örneklerinde VGSC proteininin varlığı, Nav1.7'ye karşı üretilmiş primer antikor kullanılarak immünohistokimyasal yöntem ile araştırılmıştır. İnceleme sonucunda, normal prostatın yanısıra benign prostat hiperplazisi, prostatik intraepitelyal neoplazi, non-metastatik prostat kanseri ve metastatik prostat kanseri teşhisi konulmuş prostat örneklerinde de voltaj kapılı sodyum kanalının

varlığı immünohistokimyasal olarak gösterilememiştir. Ancak bu sonuçlar, normal prostat dokusunda ve hasta örneklerinde VGSC'lerin bulunmadığını kesin olarak söylemez; çünkü VGSC'lerin α alt ünitesini kodlayan 10 farklı gen bulunmaktadır (21). Suy ve ark. (2012), insan prostat kanseri dokularında VGSC'leri kodlayan başka bir gen olan Nav1.8'in varlığını immünohistokimyasal yöntemle araştırdıkları çalışmalarında; farklı Gleason skoruna sahip örneklerde Nav1.8'e karşı üretilmiş antikor ile işaretleme yapmışlar ve boyanma yoğunluğundaki artışın, artan Gleason skoru ile uyumlu olduğunu bulmuşlardır. Böylece Nav1.8'in bir biyobelirteç adayı ve aynı zamanda yeni bir tedavi hedefi seçeneği olabileceğini önermişlerdir (30). Bölgesel ve ırksal farklılıkları göz önüne aldığımızda çalışmalarımızın, diğer VGSC antikorlarıyla sürdürülmesi ve bulgularımızın diğer moleküler tekniklerle konfirme edilmesi planlanmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü (HÜBAK) 14014 nolu projesi ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Stewart BW. and Wild CP. World Cancer Report 2014. Lyon: World Health Organization; IARC Nonserial Publication, 2014: 632 s.
2. Siegel RL., Miller KD., Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017; 67:7–30.
3. Şencan İ.ve Keskinliç B. Türkiye Kanser İstatistikleri, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara, 2017: 48 s.
4. Staunton L., Tonry C., Lis R., Espina V., Liotta L., Inziatari R., Bowden M., Fabre A., Oleary J., Finn SP., Loda M. and Pennington SR. Pathology-driven comprehensive proteomic profiling of the prostate cancer tumour microenvironment. *Mol Cancer Res* 2016; 15(3): 1–13.
5. Anonymus, 2017. Prostate Cancer Rates by Race and Ethnicity [online], <https://www.cdc.gov/cancer/prostate/statistics/race.htm>, [Ziyaret tarihi: 27/10/2017]. Centers for Disease Control and Prevention.
6. Shelley M., Wilt TJ., Coles B., Mason MD. Cryotherapy for localised prostate cancer. *Cochrane Db Syst Rev* 2007; 18(3): CD005010.
7. Woodhouse EC., Chuaqui RF., Liotta L.. General mechanisms of metastasis. *Cancer Supplement* 1997; 80(8): 1529-37.
8. Fraser SP., Salvador V., Manning EA., Mizal J., Altun S., Raza M., Berridge RJ., Djamgoz MBA. Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility. *J Cell Physiol* 2003; 195: 479-87.
9. Lang F., Föllner M., Lang KS., Lang PA., Ritter M., Gulbins E., Vereninov, A., Huber, SM. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membrane Biol* 2005; 205: 147-57.
10. Ashcroft FM. From molecule to malady. *Nature* 2006; 440 (23): 440-7.
11. Conti M. Targetting ion channels for new strategies in cancer diagnosis and therapy. *Curr Clin Pharmacol* 2007; 2: 135-44.
12. Grimes JA., Fraser SP., Stephens GJ., Downing JEG., Laniado, ME., Foster CS., Abel PD., Djamgoz MBA. Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett* 1995; 369: 290-4.
13. Grimes JA., Djamgoz MBA. Electrophysiological characterization of voltage-gated Na⁺ current expressed in the highly metastatic Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer. *J Cell Physiol* 1998; 175: 50-8.
14. Diss, JKJ., Stewart, D., Pani F., Foster CS., Walker MM., Patel A., Djamgoz MBA. A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vitro. *Prostate Cancer P D* 2005; 8: 266-73.
15. Fraser SP., Diss, JKJ., Chioni, AM., Mycielska ME., Pan H., Yamaci RF., Pani F., Siwy Z., Krasowska M., Grzywna Z., Brackenbury WJ., Theodorou D., Koyuturk M., Kaya H., Battaloğlu E., Tamburo De Bella M., Slade MJ., Tolhurst R., Palmieri C., Jiang J., Latchman DS., Coombes RC., Djamgoz MBA. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2005; 11(15): 5381-9.
16. Onkal L., and Djamgoz, MBA. Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: clinical potential of neonatal Na_v1.5 in breast cancer. *Eur J Pharmacol* 2009; 625: 206–19.
17. Nakajima T., Kubota N., Tsutsumi T., Ogurğ A., Imuta H., Jo T., Oonuma H., Soma M., Meguro K., Takano H., Nagase T., Nagata T. Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells. *Br J Pharmacol* 2009; 156(3): 420- 31.
18. Bennett ES., Smith BA., Harper JM. Voltage-gated Na⁺ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Eur J Physiol* 2004; 447: 908-14.
19. Yu FH., Catterall WA. Overview of voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 2003; 4(3): 207/1-207/7.
20. Patino GA., and Isom LL. Electrophysiology and beyond: multiple roles of Na⁺ channel beta subunits in development and disease. *Neurosci Lett* 2010; 486: 53–9.
21. Goldin AL. Evolution of voltage-gated Na⁺ channels. *J Exp Biol* 2002; 205: 575-84.
22. Diss, JKJ., Archer SN., Hirano J., Fraser SP., Djamgoz MBA. Expression profiles of voltage-gated Na⁺ channel α -subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. *The Prostate*, 2001; 48: 165-78.
23. Nandana S., Chung LWK. Prostate cancer progression and metastasis: potential regulatory pathways for therapeutic targeting. *Am J Clin Exp Urol* 2014; 2(2): 92-101.
24. Nelson M., Yang M., Millican-Slater R., Brackenbury WJ. Na_v1.5 regulates breast tumor growth and metastatic dissemination in vivo. *Oncotarget* 2015; 20: 6(32).
25. Kunzelmann K. Ion channels and cancer. *J Membrane Biol* 2005; 205: 159-73.

26. Fiske JL., Fomin VP., Brown ML., Duncan RL., Sikes RA., Voltage-sensitive ion channels and cancer. *Cancer Metast Rev* 2006; 25: 493-500.
27. Djamgoz MBA. Biophysics of Cancer: Cellular Excitability (“CELEX”) Hypothesis of Metastasis. *J Clin Exp Oncol* 2014; S1:005.
28. Laniado ME., Lalani EN., Fraser SP., Grimes JA., Bhangal G., Djamgoz MBA., Abel PD. Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *Am J Pathol* 1997; 150(4): 1213-21.
29. Yildirim S., Altun S., Gumushan H., Patel A., Djamgoz MBA. Voltage-gated sodium channel activity promotes prostate cancer metastasis in vivo. *Cancer Lett* 2012; 323: 58-61.
30. Suy S., Hansen TP., Auto HD., Kallakury BVS., Dailey V., Danner M., Macarthur L., Zhang Y., Miessau MJ., Collins SP., Brown ML. Expression of voltage-gated sodium channel Na_v1.8 in human prostate cancer is associated with high histological grade. *J Clin Exp Oncol* 2012; 1:1(2).

Stage II Kolon kanseri dokularında Onkogenik microRNA olan miR-92, miR-21, miR-155'in qRT-PCR'da Ekspresyonu

Expression of miR-92, miR-21, miR-155, Oncogenic miRNAs using qRT-PCR in Colon Cancer stage II Tissues

Çiğdem GÜNGÖRMEZ¹, Hatice GUMUSHAN AKTAS², Ersin BORAZAN³

¹ Harran Üniversitesi, Merkezi Laboratuvar Müdürlüğü, Şanlıurfa, Türkiye

² Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye

³ Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Bölümü Gaziantep, Türkiye

Sorumlu yazar:

Çiğdem GÜNGÖRMEZ

Harran Üniversitesi, Merkezi Laboratuvar Müdürlüğü, Şanlıurfa, Tel: 0414 418 30 00 /1684

e-mail:gover.cigdem@harran.edu.tr

Bu çalışma; 1. Uluslararası Kanser ve İyon Kanalları Kongresi'nde (21-23 Eylül 2017) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş tarihi / Received: 30.10.2017

Kabul tarihi / Accepted: 22.11.2017

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada Stage II kolorektal kanserli hastalardan alınmış tümörlü ve normal kolon/rektum dokularında Onkogenik mikroRNA (miRNA) olan miR-92, miR-21 ve miR-155'in ekspresyon seviyelerinin qRT-PCR ile tespit edilmesi ve elde edilen verilerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan laboratuvar ve patolojik bulgular ile klinik değerlendirme sonucunda kolorektal kanser tanısı konmuş 9 hastanın tümörlü ve normal (kontrol-temiz cerrahi sınırları) kolon/rektum dokular ile çalışılmıştır. qRT-PCR uygulaması için miRNeasy mini kit ile izole edilen miRNA'lar kullanıldı. İzole edilen miRNA'lar miScript RT-PCR ticari kit ile cDNA'ya dönüştürüldü. Doku örneklerindeki miRNA ekspresyon seviyeleri ile cDNA örnekleri RT- SYBR Green qPCR kiti kullanılarak Rotor Gene RT-PCR sistemi ile belirlendi. Bulgular: Kolorektal kanser teşhisi konulmuş 9 hastanın ortalama miRNA-21 ekspresyon seviyesi normal doku ve tümörlü doku karşılaştırıldığında 2.09 kat arttığı, miR-155'in ise 2.22 kat arttığı tespit edilmiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$). onkogenik miRNA olmasına rağmen miR-92 ekspresyon miktarı normal ve tümör

dokusu fold change değerleri karşılaştırıldığında 1.37 kat azaldığı tespit edilmiştir. Ancak bu azalmanın istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p > 0.05$).

Sonuç: Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre kolorektal kanserde onkogenik miRNA olan miR-21 ve miR-155'in hastaların tümörlü kolon dokularında ekspresyon seviyeleri artmıştır. Son yıllarda yapılan araştırmaların sonuçları Hücreyel birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev alan miRNA'ların kanserin tanı ve tedavisi için biyobelirteç olarak kullanılabileceği fikrini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: miRNA, onkogenik miRNA, Kolon kanseri, Biyobelirteç.

ABSTRACT

Background: In this study, we aimed to detect the expression levels of miR-92, miR-21 and miR-155 in tumor and normal colon and rectum tissues with oncogenic microRNA (miRNA) obtained from patients with Stage II colorectal cancer using qRT-PCR and to compare the obtained data.

Material and Method: This study was carried out with the clinical, laboratory and pathological findings of the tissues obtained from patients diagnosed with colorectal cancer at Gaziantep University Medical Faculty Research and Training Hospital -General

Surgery Department. miRNeasy mini kit-isolated miRNAs were used for qRT-PCR implementation. The isolated miRNAs were converted into cDNA via the miScript RT-PCR commercial kit. The cDNA samples with miRNA expression levels in tissue samples were identified via Rotor Gene RT-PCR system using RT-SYBR Green qPCR kit.

Result: The mean level of miRNA-21 expression in 9 patients diagnosed with colorectal cancer appears to have increased 2.09 fold compared to normal tissue and tumor tissue, while miR-155 increased 2.22 fold. This increase was considered as statistically significant ($p < 0.05$). When the fold change values of normal and

tumor tissue are compared, despite being oncogenic miRNA, miR-92 appears to have decreased 1.37 fold and was not considered statistically significant ($p > 0.05$).

Conclusion: According to the findings obtained in our study, the expression levels of oncogenic miRNA miR-21 and miR-155 in tumor colon tissues of patients with colorectal cancer have increased. The results of recent studies have shown that miRNAs involved in the regulation of many cellular functions may be used as biomarkers for diagnosis and treatment of cancer.

Key Words: miRNA, oncogenic miRNA, colorectal cancer, biomarker

GİRİŞ

Watson ve Crick tarafından DNA'nın yapısının keşfedilmesinden 50 yılı aşkın bir süre geçmiş olmakla birlikte, geçen bu süreçte moleküler biyoloji alanında çok hızlı gelişmeler kaydedilmiştir. Klinik tıp alanında ilerleme sağlayabilmek için moleküler biyoloji alanındaki gelişmelerin daha iyi anlaşılabilmesi gerekmektedir (1). Araştırmalar geniş ölçüde DNA dizisinin çözümlenmesine ve DNA dizisi tarafından kodlanan proteinlerin belirlenmesine odaklanmıştır. İnsan genomunda yer alan DNA'nın büyük bir bölümü RNA kodlamasına rağmen bu genomun çok küçük bir miktarı (yaklaşık olarak % 1.5) fonksiyonel proteinlerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Yakın zamana kadar genomun geri kalan kısmının çok az öneme sahip olduğu düşünülmekteydi. Fakat bu görüş, küçük RNA moleküllerinin keşfi ile ortadan kalkmış oldu. Bu grup içine giren mikroRNA'lar (miRNA'lar), RNA'ların protein kodlamayan (non-coding) dizileri olarak

adlandırılmaktadır. Araştırmacılar, miRNA'ların hücresel birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev aldığını, dolayısıyla hücrede miRNA seviyelerinin normal koşulların dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olduğunu rapor etmişlerdir (2-5).

Kolorektal kanser, bir dizi moleküler olay sonrası ortaya çıkan ve normal mukozadan tek bir kripte epitelindeki değişikliklere, küçük iyi huylu tümörlerden (adenomatöz polipler) adenokarsinomlara kadar uzanan bir dizi morfolojik değişimle karakterize bir olgudur (6,7). Kolorektal kanserin görülme sıklığı, dünyanın farklı toplumlarına göre değişmekte olup; gelişmekte olan ülkelere nazaran, Türkiye'nin de aralarında bulunduğu gelişmiş ülkelerde daha yüksektir (8). Kolorektal kanser tüm dünyada 3. sıklıkta görülen kanserdir. Siegel ve ark.'nın (2017) araştırmasına göre 2017 yılında görülen 600.920 kansere bağlı ölümün 157.700'ünün kolorektal kanserlerden olduğu bildirilmektedir (9).

Kolorektal kanser dahil olmak üzere bütün kanser çeşitlerinde erken ve ağrısız tanı ile teşhiste kullanılan belirteçlerin duyarlılıkları zayıf kalmaktadır. Son yıllarda yapılan kanser araştırmalarında, kanserin oluşum mekanizmalarında ve tedavi basamaklarında miRNA'ların büyük bir öneme sahip olduğu tespit edilmiştir. miRNA'lar ilk kez 1993 yılında Ambros ve ark., tarafından yapılmış olan *Caenorhabditis elegans*'ta hücrelerin gelişiminin araştırıldığı çalışmalarda keşfedilmiştir. Ambros ve ark. (1993), *C. elegans*'ta gelişimsel süreçte zamanlamayı kontrol eden heterokronik lin-4 ve lin-14 genlerinden lin-4'ün lin-14'ü baskıladığını göstermişlerdir (10,11). Araştırmacılar lin-4 genini klonlarken bu genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA molekülü transkribe ettiğini raporlamışlar ve bunun 22 nükleotidlik kodlanmayan bir dizi olduğunu belirlemişlerdir (11). Ökaryotik hücrelerde bulunup yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen ve gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde görev alan yaklaşık 18-24 nükleotid büyüklüğündeki bu moleküller miRNA olarak tanımlanmaktadır (7,8). Protein kodlamayan bu RNA molekülleri iki mekanizma ile etki gösterirler: i. Kendi nükleotid dizilerinin tamamlayıcısı olan hedef mRNA'lara bağlanıp

translasyonel baskılama yaparlar. ii. mRNA yıkımı ile transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu engellerler.

miRNA'lar, mRNA'nın 3' kodlama yapmayan bölgesinde (3' UTR) baz eşleşmesi yaparak bu bölgede bulunan transkriptlerin translasyonunu baskılamaktadırlar (9,10,13,14). miRNA'lar bu yolağı kullanarak hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması veya hücre ölümü gibi homeostatik süreçlerde önemli roller oynarlar (6,7). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda kontrolsüz hücre bölünmesinin gerçekleştiği kanser hücrelerinde değişikliğe uğramış miRNA ekspresyonu araştırılmıştır. Kanser başlamasında ve ilerlemesinde, miRNA'lar hedefledikleri genin karakterine göre tümör süpresörler veya onkogenler gibi fonksiyon göstermektedirler. Dolayısıyla elde edilecek miRNA profili, kanserin erken teşhisi ve tedavisi için oldukça önemlidir (4,5).

miRNA'ların kanserleşme sürecine katkıda bulunduğu konusunda yapılan ilk çalışma Calin ve ark.'nın (2002) kronik lenfositik lösemi (KLL)'li hastalar ile yaptıkları moleküler bir çalışma ile ortaya konmuştur. Bu çalışma sonucunda birçok hastada miR-15a ve miR-16-1 düzeylerinin azalmış olduğu veya bu miRNA'ların bulunmadığı tespit edilmiştir (15). Calin ve ark. 2004 yılında yaptıkları 245 insan ve fare miRNA probu içeren başka bir miRNA mikroarray çalışmasında ise miR-15a ve miR-16-1'in

ekspresyon düzeylerinin B hücreli KLL hastalarında belirgin şekilde azaldığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, miRNA ekspresyon profilinin, KLL hastalarının klinik ve biyolojik davranışıyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (16). Normal dokularda, bazı miRNA'ların protoonkogenlerin translasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. Fonksiyonları bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan bu tür miRNA'lar "tümör baskılayıcı miRNA'lar" olarak ifade edilmektedir. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olmaktadır. Bunun tersi, "onko-mir" olarak ifade edilen bazı miRNA'ların kanserin gelişimini arttırdığı görülmektedir. Bu miRNA'ların tümör baskılayıcı proteinlerin oluşumunu engellediği tespit edilmiştir. miRNA'lar, onkogen ve tümör baskılayıcı mRNA'ların her ikisini de potansiyel hedef olarak görebilir.

miRNA'ların ekspresyon profilleri birçok kolorektal kanser hücre hattında, normal ve tümörlü dokuda incelenmiş olup kolon karsinomunda miRNA ekspresyonunun diagnostik bir belirteç olarak kullanılabileceği çeşitli çalışmalarla belirtilmiştir (17, 18, 19). İlk olarak 2003 yılında Michael ve ark. yaptıkları çalışmada miR-143 ve miR-145 düzeyinin adenomlu ve kolorektal kanserli hastalarda azaldığını tespit etmişlerdir (20). Farklı

ekspresyon seviyeleri gösteren miRNA'lar ile tümörün evresi, moleküler alt tipi ve klinik özellikleri arasında ilişki kurulmuş böylece kolorektal tümörlerde ekspresyon değişimleri belirlenen miRNA'ların bu kanserin tanı ve tedavisinde birer biyobelirteç olarak kullanılabilecekleri belirtilmiştir (21,22). Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar miRNA'ların kanda ve serumda sirküle halde bulduklarını göstermektedir (22,23). Bununla birlikte miRNA'ların dışkıda da varlıkları tespit edilmiştir. Çalışmalar sonucunda miR-92 ve miR-21 gibi bazı miRNA'ların kan ve dışkıdaki varlıklarına bakılarak kolorektal kanserlerde erken tanı belirteci olarak kullanılabilecekleri rapor edilmiştir (18). Başka bir araştırmada, sporadik gelişen kolorektal kanser hastalarına ait normal ve tümörlü dokuların array çalışması ile miRNA profili çıkartılıp ekspresyon miktarları belirlenmiş ve miRNA'ların diagnostik bir biyobelirteç olacağı öne sürülmüştür (23,24). Ye ve Cao (2014), kolorektal kanserde öne çıkan miRNA'ların hedef genlerinin belirlenip terapide kullanılabileceğini ifade etmişlerdir (24).

Yapılan birçok çalışma sonucunda miR-92, miR-21 ve miR-155'in kolorektal kanserde onkogenik miRNA oldukları ve bunların kolorektal kanserin erken tanısında biyobelirteç olarak kullanılabilecekleri belirtilmiştir. Literatür incelendiğinde, Türkiye'deki kolorektal kanserli hasta dokularındaki miRNA'lar üzerinde yapılmış

birkaç çalışmanın belirli bir differansiyasyon derecesi dikkate alınmadan genel ekspresyon çalışması şeklinde gerçekleştirildiği dikkati çekmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, metastazın henüz başlamadığı Stage II derece dikkate alınarak hasta seçimi yapılmıştır. Böylece metastatik evreye geçmemiş kolorektal kanser

dokularında onkogenik miRNA'ların varlığı ve miktarının belirlenmesiyle bu miRNA'ların kanser teşhisinde bir biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyelinin test edildiği çalışmalara katkı sağlanabileceği düşünülmektedir.

Tablo 1:Dokuz hastanın klinopatolojik bilgileri

Özellikler (n=9, normal ve tümör dokusu)	Cinsiyet		Yaş ortalaması	Tümörün lokasyonu		Patolojik T sınıflandırma		Patolojik N sınıflandırma			Metastatik Sınıflandırma		AJCC Sınıflandırma
	Erkek	Kadın		Kolon	Rektum	T2	T3	N0	N1	N2	M0	M1	Stage II
Sayı	7	2	47	8	1	0	9	9	0	0	9	0	9

MATERYAL VE METOD

Doku Örneklerinin Toplanması: Bu çalışma, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda laboratuvar ve patolojik bulgular ile klinik değerlendirme sonucunda kolorektal kanser tanısı konmuş 9 hastanın tümürlü ve normal (kontrol-temiz cerrahi sınırları) kolon/rektum dokuları kullanılarak yapılmıştır. Tümör örnekleri için belirli bir differansiyasyon derecesi dikkate alınmış olup Stage II kapsamındaki ilgili kriterlere sahip kolorektal karsinomlar çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalara ait patolojik bulgu raporları ve sınıflandırılması Tablo 1'de verilmiştir.

Çalışma için gerekli olan Etik Kurulu onayı, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 74059997.050.01.04/126 sayısı ile alınmıştır. Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan alınan dokular, içerisinde RNA'nın bozulmasını önleyen RNALater (Qiagen) solüsyonunun bulunduğu vida kapaklı tüplere alınarak çalışma yapıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

miRNA izolasyonu: qPCR uygulaması için RNALater solüsyonunda saklanan yaklaşık 30 mg doku 1-2 ml Qiazol (Qiagen) içerisinde homojenize edildi (Bertin Precell Homojenizatör). miRNA izolasyonu miRNAeasy mini kit (Qiagen) kullanılarak prosedüre uygun şekilde gerçekleştirilerek miRNA'ların miktarı ve kalitesi kontrol edildi (NanoDrop 2000 Spektrometre

Implen). İzole edilen miRNA'ları cDNA'ya dönüştürmek için miScript RT-PCR ticari kit ile miRNA HiSpec Tampon kullanılarak ters transkripsiyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

Real Time PCR: Sentezlenen cDNA'lara RT-SYBR Green qPCR kiti kullanılarak denatürasyon (94 °C' de 15 saniye), hibridizasyon

(55 °C' de 30 saniye) ve polimerizasyon (70 °C' de 30 saniye) basamaklarından oluşan 40 tekrarlık PCR protokolü uygulandı (Rotor-gene Q 5 PLEX HRM Qiagen). Referans gen olarak RNU6 kullanıldı.

Tablo 2: Kullanılan miRNA bilgileri

MicroRNA adı	Ulaşım Numarası	Türü	miRNA'nın Yaygın olarak Kullandığı Yolaklar
Hs-miR-21-2	MS00009079	Onkogen	PDCD4, PTEN, RECK, NFIB,TPM1, SPRY2, RHOB, TIMP3, maspin, CDC25a, TIAM1, MSH2
Hs-miR-92-1	MS00006594	Onkogen	E2F1, HBP1, CDKN1A, NCOA3, ERa, PTEN, MECP2, HOXA5, VPS4B, MYCN, RAB14, DPYSL2, TGFBR2, TSG101, ARHGAP12, BACE1
Hs-miR-155-2	MS00031486	Onkogen	MLH1, MSH2, MSH6
Hs-RNU6-2-11	MS00033740	Referans	

İstatiksel Analiz: Normal ve tümörlü kolorektal dokulardaki onkogenik miRNA'ların ekspresyon farkının belirlenmesi için normal ve tümörlü dokulara ait ΔCt ve fold change değerleri hesaplandı. Sayısal değişkenlerin ortalamalarının karşılaştırılmasında Student-t testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Kolorektal kanserli 9 hastanın normal ve tümörlü dokularında ölçülen ΔCt değerleri kullanılarak fold change hesaplanmış ve Tablo 3'te gösterilmiştir.

miR-21 için ortalama ΔCt değeri normal dokuda 3.03 iken tümörlü dokuda 5.07 olarak tespit

edilmiştir (Şekil 1). miR-21'in normal dokuya göre tümörlü dokuda yaklaşık 2 kat fazla ekspresyon edildiği görülmüştür. Benzer şekilde miR-155'in ortalama ΔCt 'si normal dokuda 6.01 iken tümörlü dokuda ise 7.48 olarak saptanmıştır (Şekil 1). Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$). miR-155'in tümörlü dokuda ekspresyon seviyesinin normal dokudakinden 2.22 fazla olduğu belirlenmiştir. Veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve hem miR-21 hem de miR-155

Tablo 3: miRNA ekspresyon sonucu kat değişim (fold change) değerleri

miRNA	Fold Change	SH(\pm)	p-değeri
miR-92-1	-1,370	1,420	0,820
miR-21-2	2,091*	0,045	0,039
miR-155-2	2,221*	0,630	0,047

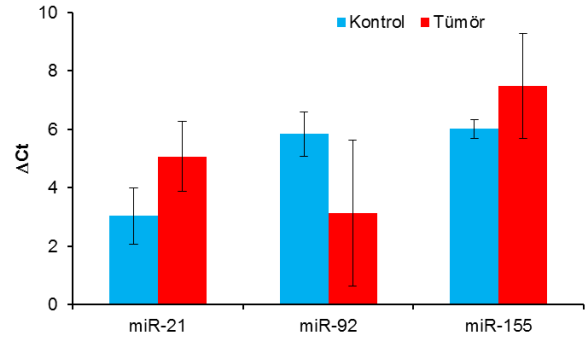
* $p \leq 0.05$

TARTIŞMA

MikroRNA'ların keşfinden sonra, fonksiyonları hakkında yapılan birçok çalışma, miRNA'ların kanser gelişiminde anahtar rol oynadıklarını ortaya çıkarmıştır. MiRNA'lar hedefledikleri mRNA'lara bağlı olarak kanser gelişiminde tümör süpresör veya onkogen olarak fonksiyon göstermektedirler.

için normal ve tümörlü dokular arasındaki farkın anlamlı olduğu ($p \leq 0.05$) tespit edilmiştir.

Onkogenik miRNA olmasına rağmen miR-92'nin normal dokuda 5.48 olan ortalama ekspresyon miktarının tümörlü dokuda azaldığı ve 3.13 olduğu (Şekil 1) görülmekle birlikte yapılan istatistiksel değerlendirmede aradaki farkın (Fold change -1.37) anlamlı olmadığı ($p > 0.05$) bulunmuştur.



Şekil 1: Kontrol ve tümör grupları için ΔCt ortalamalarının göre grafiksel gösterimi.

Kolorektal kanserlerde düzeyleri artan veya azalan çeşitli miRNA'lar tanımlanmış olup bir çok çalışmada miRNA ekspresyonunun diagnostik bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (6,7,13,25).

Slaby ve ark. (2008) yaptığı çalışmada kolorektal kanserli hastalarda plazmada miR-92 düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ve miR-92'nin kolorektal kanser tanısında non-invaziv

biyobelirteç olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir (26). Huang ve ark. (2004) ise yaptıkları çalışmada miR-29a ve 92a düzeylerini anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır (27). Başka bir çalışmada miR-21'in yüksek düzeydeki ekspresyonunun kolorektal kanserli hastalarda

Kolon kanserinde onkogenik miRNA olmasına rağmen miR-92'nin tümörlü dokulardaki ekspresyon miktarının normal dokuya göre azalmakla birlikte aradaki farkın istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı görülmüştür. Çalışma sonucumuzdaki ekspresyon farkındaki azalmanın ameliyat sırasında normal doku ile tümörlü doku ayrımının tam yapılamama ihtimalinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

miRNA tedavi yönteminin uygulanabilmesi için bazı sorular cevaplanmayı beklemektedir. Biyobelirteç olarak kullanılmak istenen miRNA'lar tek bir gen ürününü etkilemekten ziyade bütün gen düzenleyici sistemine etki edebilmektedir. miRNA'ların her biri, çok sayıda hedef genin ekspresyonunu düzenler ve bir miRNA'nın ekspresyonunun değiştirilmesi umulmadık birçok geni hedef alabilir. Bu durumun tersi olarak, tek bir gen birçok miRNA tarafından düzenlenebilir, belirli bir miRNA'nın ekspresyonunun değiştirilmesi spesifik bir gen hedefini verimli şekilde etkileyebilir. miRNA tedavi yönteminin başarılı şekilde uygulanabilmesi için bu türlü problemlerin

lenf nodu metastazı, uzak metastazlar ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (28,29). Kolorektal kanserli 9 hastanın kolon/rektum dokuları ile yaptığımız çalışmada da miR-21 ve miR-155'in normal ve tümörlü dokulardaki ekspresyon seviyesi artmış olup sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

üstesinden gelmeye yönelik yeni araştırma bulgularına ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

- 1) Wijnhoven B.P, Michael M.Z and Watson D.I. MicroRNAs and cancer. BR. Journal Surgery 2007;94:23-30.
- 2) Iorio M.V, Ferracin M, Liu C.G, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res 2005; 65:7065-7070.
- 3) Calin G.A, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. The New England journal of medicine 2005; 353(17):1793-801.
- 4) Lehmann U, Hasemeier B, Römermann D, Müller K, Langer F. and Kreipe H., Epigenetic inactivation of microRNA genes in mammary carcinoma, Verh Dtsch Ges Pathol 200;7 91, 214-220 p.
- 5) Saydam F, Değirmenci İ, Güneş V. MikroRNA'lar ve kanser Dicle Tıp Dergisi, 2011; 38(1), 113-120.
- 6) Michor F, Iwasa Y, et al. Dynamics of colorectal cancer. Semin Cancer Biol. 2005; 15(6), 484-93.
- 7) Hermsen M, Postma C and Baak J. Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. Gastroenterolgy 2002; 123, 1109-1119.
- 8) Corte H, Manceau G, Blons H, Laurent-Puig P. MicroRNA and colorectal cancer. Dig Liver Dis. 2012; 195-200.
- 9) Sigel R.L, Miller K.B, Jemal A. Cncer Statistic, 2017. Cancer Journal for Clinicians 2017; 67: 7-30
- 10) Ambros V. A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in C. elegans. Cell 1989; 57(1):49-57.
- 11) Lee R.C, Feinbaum R.L, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 1993; 75(5):843-54.

- 12) Aiello M, Vella N, Cannavo C, Scalisi A, Spandidos D.A, Toffoli C, Buonadonna A, Libra M, and Stivala F. Role of genetic polymorphisms and mutations in colorectal cancer therapy. *Molecular Medicine Reports* 2011; 4, 203-208.
- 13) Bedeir A and Krasinskas A.M. Molecular Diagnostics of Colorectal Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135, 204-215.
- 14) Pillai R.S, Bhattacharyya S.N, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: How many mechanisms? *Trends in Cell Biology* 2007; 17, 118-126.
- 15) Calin G. A et al. Frequent deletions and downregulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99:15524-15529.
- 16) Calin G.A, Sevignani C, Dumitru C.D, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2999–3004.
- 17) Hayes J, Peruzzi P.P and Lawler S. microRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends in Molecular Medicine* 2014; 20(8).
- 18) Mazeh H, Mizrahi I, Ilyayev N, Halle D, Brücher B, et al. The Diagnostic and Prognostic Role of microRNA in Colorectal Cancer-a Comprehensive review. *J Cancer* 2013; 4: 281-295.
- 19) Shen J, Stass S.A, Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. *Cancer Lett* 2013; 329: 125-136.
- 20) Michael M.Z, Connor S.M, and et al. “Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia”, *Mol Cancer Res* 2003; 1, 882-891
- 21) Baraniskin A, Birkenkap K, and Maghnoui A. “MiR-30a- 5p suppresses tumor growth in colon carcinoma by targeting DTL”, *Carcinogenesis* 2012; 33, 732-739.
- 22) Schetter A.J, Okayama H, Harris C. The Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer. *Cancer J* 2012; 18, 244-252.
- 23) Callari M, Dugo M, Musella V, Marchesi E, Chiorini G, et al. Comparison of Microarray Platforms for Measuring Differential MicroRNA Expression in Paired Normal/Cancer Colon Tissues. *PLoS ONE* 2012; 7(9), e45105.
- 24) Ye J.J, Cao J. MicroRNAs in colorectal cancer as markers and targets: Recent advances. *World J Gastroenterol* 2014 20(15), 4288-4299
- 25) Manne U, Shanmugam C, Bovell L, et al.: miRNAs as biomarkers for management of patients with colorectal cancer. *Biomark Med* 2010; 4:761–770.
- 26) Slaby O, Svoboda M, Fabian P, et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*. 2008; 72(5-6):397–402.
- 27) Huang J, Zheng S, Jin SH, Zhang SZ. Somatic mutations of APC gene in carcinomas from hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 834-836.
- 28) Wang J.C, Zhou Z.G, Wang L, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer. *Disease Markers*. 2009; 26(1):27–34

Expression of miR-143, miR-145, miR-192, Tumor Suppressor miRNAs using qPCR in Colon Cancer stage II

Stage II Kolon Kanserinde Tümör Süpressör miRNA olan miR-143, miR-145 ve miR-192'nin Ekspresyonu

Çiğdem GÜNGÖRMEZ¹, Hatice GUMUSHAN AKTAS², Ersin BORAZAN³

¹Harran University Central Research Laboratory Sanliurfa, Turkey

²Harran University, Faculty of Arts and Sciences, Biology Department, Sanliurfa, Turkey

³Gaziantep University, Medicine Faculty, General Surgery Department, Gaziantep, Turkey.

Corresponding author: Çiğdem GÜNGÖRMEZ

Harran Üniversitesi, Merkezi Laboratuvar Müdürlüğü, Şanlıurfa, Tel: 0414 318 30 00 /1684 e-ail:gover.cigdem@harran.edu.tr

This study was presented at the 1st International Congress on Cancer and Ion Channels (21-23 September 2017) as oral presentation..

Geliş tarihi / Received: 30.10.2017

Kabul tarihi / Accepted: 22.11.2017

ABSTRACT

Background: In this study, it was aimed to determine the expression levels of tumor suppressor microRNAs (miRNA) including miR-143, miR-145 and miR-192 in tumor and normal colon / rectum tissues of Stage II colorectal cancer (CRC) patients by using qPCR and to compare the obtained data.

Materials and Methods: This study was performed on tumor or normal (control-clean surgical margin) colon / rectum tissues of 9 patients diagnosed with colorectal cancer as a result of clinical evaluation with laboratory and pathological findings in Gaziantep University Medical Faculty Research and Practice Hospital General Surgery Department. miRNAs isolated with miRNeasy mini kit were used for qPCR. Isolated miRNAs were converted into cDNA by miScript RT-PCR commercial kit. The miRNA expression levels of tissue samples were determined by using RT- SYBR Green qPCR kit in Rotor Gene Q.

Result: The mean level of miRNA-143 expression in 9 patients diagnosed with colorectal cancer appears to have decreased 0.096 fold compared to normal tissue and tumor tissue, while miR-145, 1.52 fold. This decrease was considered as statistically significant ($p < 0.05$). When the fold change values of normal and

tumor tissue are compared, despite being tumor suppressor miRNA, miR-192 appears to have increased 3.25 fold and was not considered statistically significant ($p > 0.05$).

Conclusion: According to the findings obtained in our study, the expression levels of tumor suppressor miRNA miR-143 and miR-145 in tumor colon tissues of patients with colorectal cancer have decreased. miRNAs have attracted major interest as a means to analyze the molecular pathways involved in cancer development and progression. In addition to their important cellular functions, it is possible that secreted miRNAs may be diagnostic biomarkers for cancer detection.

Keywords: miRNA, Tumor suppressor miRNA, Biomarker, Colorectal cancer

ÖZ.

Amaç: Bu çalışmada Stage II kolorektal kanserli hastalardan alınmış tümörlü ve normal kolon/rektum dokularında Tümör süpressör mikroRNA (miRNA) olan miR-143, miR-145 ve miR-192'in ekspresyon seviyelerinin qRT-PCR ile tespit edilmesi ve elde edilen verilerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda laboratuvar

ve patolojik bulgular ile klinik değerlendirme sonucundakolorektal kanser tanısı konmuş 9 hastanın tümörlü ve normal (kontrol-temiz cerrahi sınırları) kolon/rektum dokuları ile gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR uygulaması için miRNeasy mini kit ile izole edilen miRNA'lar kullanıldı. İzole edilen miRNA'lar miScript RT-PCR ticarikit ile cDNA'yadönüştürüldü. Doku örneklerindeki miRNA ekspresyon seviyeleri RT- SYBR Green qPCR kiti kullanılarak Rotor Gene Q sistemi ile belirlendi. **Bulgular:** Kolorektal kanser teşhisi konulmuş 9 hastanın ortalama miRNA-143 ekspresyon seviyesi normal doku ve tümörlü doku karşılaştırıldığında 0.096 kat azaldığı, miR-145'in ise 1.52 kat azaldığı tespit edilmiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). miR-192 tümör baskılayıcı

miRNA olmasına rağmen ekspresyon miktarının normal ve tümör dokusu fold chancedeğerleri karşılaştırıldığında 3.25 kat arttığı tespit edilip istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). **Sonuç:** Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre kolorektal kanserde tümör süpressör miRNA olan miR-143 ve miR-145'in hastaların tümörlü kolon dokularında ekspresyon seviyeleri azalmıştır. miRNA'lar, kanser gelişimi ve ilerlemesindeki moleküler yollarda önemli etkiler etmektedir. miRNA'lar hücreselbirçok işleve ek olarak, kanser tanı ve tedavisinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. **Anahtar Kelimeler:** miRNA, Tümör baskılayıcı miRNA, Biyobelirteç, Kolon kanseri

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the third leading cause of cancer-related deaths worldwide. Systematic methods for diagnosing pathological conditions might contribute to a high detection rate of patients at early stages of CRC, leading to a reduction in mortality rates. Implementation of the fecal occult blood test and flexible sigmoidoscopy as screening methods has reduced CRC mortality (1-3). However, these techniques have inherent limitations; the sensitivity of detection of the fecal occult blood test is fairly low and flexible sigmoidoscopy is invasive and uncomfortable for patients. Therefore, identification of novel prognostic biomarkers to improve patient outcome and to assess individual prognosis is required. microRNAs are being evaluated for their potential in this area.

Recent studies have demonstrated a link between the aberrant expression of a class of small

noncoding RNAs, termed miRNAs and the pathogenesis of cancer (4).

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs as 18-25 nucleotides in length that downregulate or upregulate gene expression during in various cellular processes such as cell-cycle regulation, differentiation, proliferation, apoptosis and metastasis (4-6).

Bioinformatic data indicate that each miRNA can control hundreds of gene targets, underscoring the potential influence of miRNAs on almost every genetic pathway. miRNAs are RNA molecules that silence gene expression by either cleaving target mRNAs or inhibiting their translation (7,8). There are two main categories of miRNAs that are involved in cancer progression: those that enhance cell growth, survival, and proliferation [oncomicroRNAs (oncomiRs)], and those that suppress these activities [tumor-suppressor (TsmiRNAs)] (8-10). The majority of miRNAs involved in

tumor promotion are TS-miRNAs (11-13). Tumor suppressor miRNAs are downregulated in cancer cells, and would normally inhibit the translation of protooncogenes (12,13).

The expression of miRNAs is reproducibly altered in CRC and their expression patterns are associated with diagnosis, prognosis and therapeutic outcome in CRC (18,19). Studies have begun to examine the association of miRNA

related polymorphisms and their association with CRC incidence and prognosis as well as the possibility of using miRNA expression as non-invasive early detection biomarkers (20,21). These data suggest that miRNAs may be potential molecular classifiers, early detection biomarkers and therapeutic (22,10,3).

Table 1. Clinicopathological data for 9 patients with colorectal cancer

Characteristics (n=9)	Sex		Age (mean)	Location of tumors		Pathologic T classification		Pathologic N classification			Metastatic classification		AJCC Classification Stage II
	Male	Female		Colon	Rectum	T2	T3	N0	N1	N2	M0	M1	
Number	7	2	47	8	1	0	9	9	0	0	9	0	9

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the report of the ethics committee of number 74059997.050.01.04/126 issued by Medical Ethical Committee of the Harran University, Turkey.

For this study, nine CRC tissues and normal colorectal mucosa tissues were taken from patients with stage II CRC who underwent surgical excision the operating Gaziantep University Hospital. Clinicopathological data was collected prospectively and is summarised in Table 1. The biopsy materials were snap frozen in liquid nitrogen in after surgical resection then stored at -80°C temperature in a cryovial and covered with

the RNeasy Lysis Solution (Applied Biosystems) solution until RNA extraction.

In our study we analyzed expression of selected mature tumor suppressor miRNA (miR-143, miR-145 and miR-192) by qPCR (Table 2). To isolate miRNA, approximately 30 mg of tissue samples were homogenized in liquid nitrogen by using homogenizer (Precellys Bertin) in 1-2 mL of Qiazol (Qiagen, UK). Total RNA was extracted by using miRNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and then purity of total RNA was measured by using nanospectrophotometer (Nanodrop Technologies Inc., USA Implen). Isolated miRNAs were

reverse transcribed to cDNA by using Mircrpt II RT kit(Qiagen).

For qPCR was used RT- SYBR Green kit. The PCR reaction was carried out via the first step at 95 oC for 15 min followed by 40 cycles with hybridization 15 seconds at 94 oC, annealing 30 second 55 oC and extension 30 seconds at 70 oC. RNU6 was used as endogenous control. The Δ CT method was used for calculating the relative

expression of a given miRs between a paired normal and tumor sample. $\Delta\Delta$ CT results were evaluated using the SABiosciences web based software (Qiagen) fold-change calculated. Difference between groups was compared using student's t-test. P value less than 0.05 was considered as statistically significant.

Table 2. Detail of microRNA with roles in colon cancer and their targets (13-15)

MicroRNA name	Accession number	Tumor Suppressor and Oncogene	Example of experimentally validated microRNA Target
Hs-miR-143-1	MS00003514	Tumor Suppressor	KRAS, DNMT3A, ERK5
Hs-miR-145-1	MS00003528	Tumor Suppressor	IRS-1, c-Myc, YES1, STAT1, OCT4, SOX2, KLF4, FLI1
Hs-miR-192	MS00003689	Tumor Suppressor	No functionally verified targets
Hs-RNU6-2-11	MS00033740	Referans	

RESULT

Fold changes were calculated using the measured Δ Ct values in normal and tumor tissues of 9 patients with colorectal cancer and shown in Table 3.

The mean Δ Ct value for miR-143 was 1.35 in the normal tissue while it was found to be 1.58 in the tumor tissue (Figure 1). The miR-143 was observed to be 0.096 fold less expressed in the tumor tissue compared to the normal tissue. Similarly, the mean Δ Ct value of miR-145 was 2.61 in the normal tissue whereas it was found to be 1.26 in the tumor tissue (Figure 1). This

increase was statistically significant ($p < 0.05$). The expression level of miR-145 in the tumor tissue was determined to be 1.52 fold less than the normal tissue. The data were evaluated statistically and the difference between the normal and tumor tissues was found to be significant for both miR-143 and miR-145 ($p < 0.05$).

Despite it is an oncogenic miRNA, the mean expression amount of miR-192 in the normal tissue, which was 2.80, increased in the tumor tissue and found to be 4.21 (Figure 1). However, the statistical evaluation revealed that the difference between them (Fold change 3.25) was not significant ($p > 0.05$).

Table 3: Mean fold change of th 6 miRNA, on the 9 colon cancer patients and healty individuals.

miRNA	Mean FC	SD (\pm)	p-value
miR-143-1	-0.96*	0.54	0.049
miR-145-1	-1.52*	0.87	0.026
miR-192	3.25	1.78	0.253

DISCUSSION

Colorectal cancer (CRC) is the third leading cause of cancer-related deaths worldwide (23). The sensitivity of markers used in the early and painless diagnosis of various cancers, including CRC, remains low. Consequently, the results of this study will increase our understanding of development, progression and earlier detection and personnel treatment of colon cancer.

Studies have shown that expression of miRNA in colon carcinoma can be used as a diagnostic marker. The first study of biomarkers of miRNAs in patients with adenomas and colorectal cancers has found that miR-143 and miR-145 levels are decreased (11,12,15). In another study, miR-192 levels in plasma were found to be significantly higher in colorectal cancer patients and it could be used as a non-invasive biomarker in the diagnosis of colorectal cancer (16,17).

Recently, miRNAs have attracted major interest as a means to analyze the molecular pathways involved in cancer development and progression. In addition to their important cellular functions, it

is possible that secreted miRNAs may be diagnostic biomarkers for cancer detection. miRNAs have a clear role in the initiation and progression of CRC. Future research will have to specifically address the potential role for miRNA-based classifiers and therapeutics in medicine.

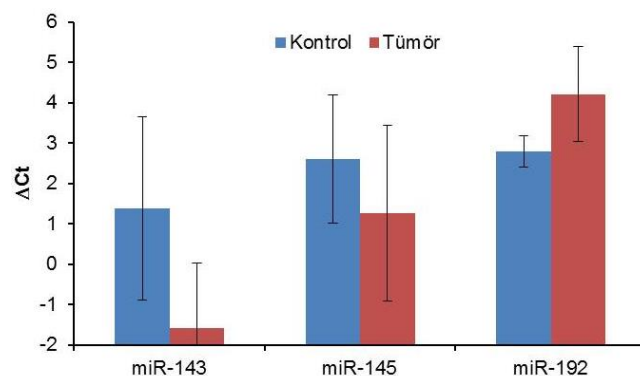


Figure 1: Graphical representation of control and tumor groups according to Δ Ct averages.

The expression levels of miR-143 and miR-145 in the normal and tumor tissues were decreased and the results were found to be statistically significant in our study which was conducted with the colon/rectum tissues of nine patients with colorectal cancer.

Although colon cancer includes tumor-suppressor miRNA, the difference between normal tissue and tumor tissue in terms of the expression level of miR 192 was observed to be not statistically significant. It was considered that the increase in the expression difference in our study result may be due to the fact that the discrimination between normal tissue and tumor tissue during surgery is imperfect.

Some questions remain to be answered in order to be able to administer the miRNA treatment method. The miRNAs that are desired to be used as biomarkers can affect the entire gene regulatory system rather than affecting a single gene product. Each of the miRNAs regulates the expression of numerous target genes and changing the expression of a single miRNA may target many unexpected genes. In contradiction to this condition, a single gene can be regulated by many miRNAs, altering the expression of a specific miRNA can affect a specific gene target productively. In order to apply the miRNA treatment method successfully, new research findings targeting overcoming these kinds of problems are needed.

References

- 1) Atkin W.S, Edwards R, Kralj-Hans I, Wooldrage K, Hart AR, et al.) Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 375: 1624–1633.
- 2) Bretthauer M. Evidence for colorectal cancer screening. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; 24: 417–425
- 3) Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, et al. Circulating Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer . *PLoS ONE* 2014; 9(4): e92921.
- 4) Lee R.C, Feinbaum R.L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5):843–54.
- 5) Pancione M, Remo A, Colantuoni V. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Patholog Res Int* 2012; pp: 1-11.
- 6) Corte H, Manceau G, Blons H, Laurent-Puig P. MicroRNA and colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2012; 44: 195-200.
- 7) Lin S, Gregory R.I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15: 321-333.
- 8) Ren A, Dong Y, Tsoi H, Yu J. Detection of miRNA as non-invasive biomarkers of colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 2810-2823.
- 9) Chang K, Mestdagh P, Vandesompele J, Kerin J.M et al. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2010; 10:173.
- 10) Aaron J. Schetter, Hirokazu Okayama, and Curtis C. Harris. The rol of microRNAs in Colorectal Cancer. *Cancer J.* 2012 ; 18(3): 244–252.
- 11) Zhang J.X, Song W, Chen Z.H, et al. Prognostic and predictive value of a microRNA signature in stage II colon cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 2013; 14:1295-306.
- 12) Michael M.Z, O'Connor S.M, Nicholas G. Reduced Accumulation of Specific MicroRNAs in Colorectal Neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882-891.
- 13) Hayes J, Peruzzi P.P and Lawler S. microRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends in Molecular Medicine* 2014; 20(8).
- 14) Mazeh H, Mizrahi I, Ilyayev N, Halle D, Brücher B, et al. The Diagnostic and Prognostic Role of microRNA in Colorectal Cancer-a Comprehensive review. *J Cancer* 2013; 4: 281-295.
- 15) Shen J, Stass SA, Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. *Cancer Lett* 2013; 329: 125-136
- 16) Wang J.C, Zhou Z.G, Wang L, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer. *Disease Markers.* 2009; 26(1):27–34.
- 17) Slaby O, Svoboda M, Fabian P, et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology.* 2008; 72(5-6):397–402.
- 18) Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2014; 9: 287-314.
- 19) Hayes J, Peruzzi P.P, Lawler S (2014) MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med* 2014; 20: 460-469.
- 20) Hamfjord J, Stangeland A.M, Hughes T, Skrede M.L, Tveit K.M, et al. Differential expression of miRNAs in colorectal cancer: comparison of paired tumor tissue and adjacent normal mucosa using high-throughput sequencing. *PloS one* 2012; 7: e34150
- 21) Ye J.J, Cao J. MicroRNAs in colorectal cancer as markers and targets: Recent advances. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 4288-4299.
- 22) Volinia S, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(7):2257–2261.
- 23) Siegel R.L, Miller K.B, Jemal A. Cncer Statistic, 2017. *Cancer Journal for Clinicians* 2017; 67: 7-30

Hyperthermia and Plasma Membrane Ca ATPase: Is There Any Effect of HT on PMCA?

Hipertermi ve Plazma membranı Ca ATPaz: HT'nin PMCA Üzerinde Herhangi Bir Etkisi Var mı?

Armağan CANER^{1,2}, Müge Gülcihan ÖNAL^{2,3}

1 Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.D. Kayseri/Türkiye
2 Erciyes Üniversitesi Genom Ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri/Türkiye
3 Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.D. Kayseri/Türkiye

Corresponding author:

Armağan CANER

Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Biyofizik A.D. Kayseri / Türkiye
canera@erciyes.edu.tr

Çalışmamız, 1. uluslararası Kanser ve İyon Kanalları (IONCC2017) kongresinde, 21-23 Ekim 2017 tarihinde sunumu kabul edilmiştir.

Geliş tarihi / Received: 23.10.2017

Kabul tarihi / Accepted: 26.12.2017

Abstract:

Introduction and Aim: The idea of treating cancer cells with hyperthermia (HT) is based on at least 5000 years back. Past technologies in cancer research could not deliver effective and homogenous heating to all sites, especially in deep-seeded tumors. This is the main reason for lack of interest in modern cancer research. Also, HT is known to induce apoptosis in cancer cells. On the other hand, Plasma membrane Ca ATPase (PMCA) is an important pump in apoptosis pathways. PMCA pumps Ca ions in the cell to the outside of the cell. The aim of the present study is to evaluate the effect of HT in the kinetic parameters of PMCA.

Materials and Methods: To evaluate the effect of HT in PMCA, we used red blood cells plasma membrane. Human red blood cells which isolated from the healthy donor were heated at control, 37°C, 44°C, 50°C during 30min, 60min, 90min, 120min by using thermomixer. 1,7ml Lysis solution were added to Erythrocytes (39ul) and incubated for 15 minutes. During the incubation, the mix was gently stirred. The mix was centrifuged at 17000xg for 20 minutes at 0°C. They were resuspended in 1,7ml KCl buffer and centrifuged again. Then, hemoglobin removed from erythrocytes. After that, 0.4ml of this empty erythrocytes suspension was mixed with 0.1ml buffer with Indo 1FF-AM. This suspension was incubated for 15min on ice. These empty erythrocytes were resealed by incubation at 37°C for 45 min and stored on ice until use.

Results: According to calcium concentration levels, there are significant differences between 0°C and the other temperatures. Also, there is a significant difference between 37°C and the other temperatures. PMCA did not work very well at the temperatures over 37°C. So we measured high concentration levels of calcium in the erythrocytes.

Conclusion: If the pump worked properly, we had to see decreasing concentration levels of calcium with time. On the contrary, we measured growing concentration levels of calcium in the erythrocytes. Then, HT effects to PMCA and when PMCA does not work, Ca ions cannot go out from the cells. As a result, calcium overloading is one of the consequences of apoptosis.

Key Words: PMCA, Ca imaging, Hyperthermia

Öz.

Giriş ve Amaç: Hipertermi (HT) ile kanser hücrelerini tedavi etme fikri en az 5000 yıl öncesine dayanır. Kanser araştırmalarındaki geçmiş teknolojiler, özellikle derin çekirdekli tümörlerde, tam olarak etkili ve homojen bir ısıtma sağlayamadığından dolayı modern kanser araştırmalarında HT'ye ilgi eksikliğine sebep oldu. Ayrıca, HT'nin kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği bilinmektedir. Öte yandan, plazma membranı Ca ATPaz (PMCA), apoptoz yolaklarında önemli bir pompadır. PMCA, hücredeki Ca iyonlarını hücrenin dışına pompalar. Bu çalışmanın

amacı HT'nin PMCA kinetik parametrelerine etkisini değerlendirmektir.

Yöntem:PMCA üzerinde HT'nin etkisini değerlendirmek için, kırmızı kan hücrelerinin plazma membranını kullandık. Sağlıklı donörden izole edilen insan kırmızı kan hücreleri, termomikser kullanılarak 30 dakika, 60 dakika, 90 dakika, 120 dakika boyunca 37oC, 44oC, 50oC'de ısıtıldı. Eritrositler (39ul) lizis çözeltisi 1,7ml eklendi ve 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında karışım hafifçe karıştırıldı. Karışım 0°C'de 20 dakika için 17000 xg'de santrifüje tabi tutuldu. Bunlar, 1,7 ml KCl tampon içinde yeniden süspansiyona alınmış ve tekrar santrifüje tabi tutulmuştur. Daha sonra, eritrositlerden hemoglobinin çıkarılır. Bundan sonra, 0.4 ml'lik bu boş eritrosit süspansiyonu, Indo 1FF-AM ile 0.1 ml tampon ile karıştırıldı. Bu süspansiyon, buz üzerinde 15 dakika inkübe edildi. Bu boş eritrositler 37°C'de 45 dakika

inkübe edilerek tekrar kapatılmış ve kullanıma kadar buz üzerinde depolanmıştır.

Sonuçlar:Kalsiyum konsantrasyon seviyelerine göre kontrol ile diğer sıcaklık arasında belirgin farklar vardır. Ayrıca, 37oC ile diğer sıcaklık arasında belirgin bir fark vardır. PMCA 37oC üzerindeki sıcaklıklarda çok iyi çalışmadı. Bu nedenle, yüksek kalsiyum konsantrasyonu ölçüldü.

Pompa düzgün bir şekilde çalışıyorsa, kalsiyum konsantrasyon seviyesi zamanla azalacaktır. Aksine, eritrosit keseciklerinde artan kalsiyum konsantrasyon seviyeleri ölçtük. HT'ye maruz kalan PMCA, yüksek sıcaklıktan etkilenir ve PMCA çalışmaz, böylece Ca iyonları hücrelerden dışarı çıkamaz. Hücre ölümü ısının etkisi ile bozulan PMCA kinetiğinden dolayı tetiklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: PMCA, Ca görüntüleme, Hipertermi

INTRODUCTION

One of the factors which induce apoptosis in the cancer cells is Hyperthermia (HT). The history of HT which treats cancer cells is at least 5000 years back. HT could not deliver effective and homogeneous heating to all sites, particularly deep-seeded tumors in the past technologies. This is the main reason about lack of interest in modern cancer research. Recently new techniques are developed (e.g., nanotechnology, computer modeling, and non-invasive thermometry) that controlled and directly applying heat to tissue has stimulated interest in HT again. There is not any significant difference in HT sensitivity between tumor and normal cells. In an in-vivo study, tumor killing effect is achieved at temperatures between 40oC and 44°C. This is related to a characteristic difference in physiology between normal and

tumor cells. The vasculature in solid tumors is complex and includes hypoxic and low-pH regions. These cases are not found in normal tissues under undisturbed conditions (1). If normal tissues were treated for 1 hour at a temperature of up to 44°C, generally they were not damaged in this case (2). HT induces many changes in cells. For example, an increase in temperature causes protein unfolding and aggregation. HT also alters the internal organization of cells including disruption of the cytoskeleton, fragmentation of the Golgi system and ER, and a decrease in the number of mitochondria and lysosomes (1). HT also affects nuclear processes and the cell membrane (3).

The plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) is an ATP-driven Ca²⁺ pump that expressed in the plasma membrane of all eukaryotic cells. Four

separate genes (PMCA1-4) and numerous splice variants that give rise to specific tissue distribution, cellular localization, and functional diversity encode PMCA (4). The PMCA is important for preserving cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) below 300 nM (~ 100 nM), due to its high affinity for Ca^{2+} (K_d , ~ 0.2 μM) and is the major Ca^{2+} efflux pathway in non-excitabile cells. For many years the PMCA was thought to have a housekeeping role in preserving low resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$. However, the importance of PMCA in the spatiotemporal shaping of cytosolic Ca^{2+} signaling has steadily increased. PMCA displays memory of past $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases, suggesting an important role in regulating the frequency of Ca^{2+} oscillations. Moreover, the different PMCA isoforms, and numerous splice variants of PMCA, can be differentially expressed in specific regions of cells and can also be differentially regulated by a sophisticated repertoire of additional signalling pathways (4). Despite the emerging role of the PMCA in dynamic Ca^{2+} signaling, the importance of the housekeeping role of the PMCA should not be underestimated, especially when one considers how important maintaining low resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is for cell survival and the prevention of Ca^{2+} -dependent cell death. In this regard the PMCA can be regarded as the “last gatekeeper” for the maintenance of low resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$; an essential “linchpin” for the delicate

balance between cell survival and cell death. Moreover, the PMCA is inextricably linked to the specific nature of cell death. Not only does PMCA prevent Ca^{2+} overload associated apoptosis, but the PMCA is an ATP-driven pump and since ATP depletion induces necrosis, a decline in PMCA activity will accompany and exacerbate necrosis. Therefore, PMCA activity may act as an important switch between apoptosis and necrotic cell death, a key determinant of numerous disease processes. Thus the maintenance of PMCA activity is critical for cell survival, particularly in the face of modest-to-severe global ATP depletion, whereas inhibition of PMCA even when global ATP is maintained will facilitate Ca^{2+} -dependent apoptosis (4). First, PMCA is worked in red blood cells (5). Erythrocyte has not got any organelles and nucleus so plasma membrane is worked by erythrocytes.

There is not any study which searches relationship between HT and PMCA. In this paper we search whether there is relation between temperature and the kinetic of PMCA. According to our hypothesis, if HT can kill tumor cells, then it can affect PMCA too. Therefore, we incubated erythrocytes with several incubation times at 37oC, 44oC and 50oC temperatures. After incubation, we removed hemoglobin from erythrocytes and loaded Ca^{2+} with Ca^{2+} indicator. We measured fluorescence intensity. Ca^{2+} concentration was calculated by

fluorescence intensity. The kinetic parameters of PMCA were determined from Ca^{2+} concentration.

2. Material and Methods

2.1. Blood, solutions and chemicals

Freshly drawn blood from healthy human donor was used for the experiments. The erythrocytes were washed three times by centrifugation ($2000\times g$, 5 min) at room temperature in physiological salt solution with pH 7.4. Plasma and buffy coat were removed by aspiration. Lysis solution contains 5 mM $MgSO_4$ and 0.4 mM acetic acid, pH 4.2. Loading buffer consist of 1mM ATP, 2,5mM Fosfokeratin, 500U/l Fosfokeratin kinaz, 220 μ M $CaCl_2$, 20mM HEPES, 160mM KCl and 10 μ M Indo1FF-AM.

2.2. Preparation of erythrocyte ghost

After separation of erythrocytes from white blood cells by centrifugation, the erythrocyte suspension was adjusted to a hematocrit of 50%. They were separated four group according to incubation temperatures. Group 1 is control with no incubation, group 2 is incubated at 37°C, group 3 is incubated 44°C and group 4 is incubated 50°C. These temperatures also were separated 4 subgroup according to incubation times, each

groups were incubated 30min, 60min, 90min, and 120min respectively. After carefully pre-cooling of all media and materials to 0°C, lysis was performed on ice. Erythrocytes (0.7 ml) were added to 30 ml of the lysis solution and incubated for 15 min with gentle stirring. Ghosts were then sedimented ($16,000 \times g$ for 20 min at 0°C), resuspended in 30 ml of KCl buffer, again sedimented, and finally resuspended in 1.75 ml of buffer. Then, 0.4 ml of this suspension was mixed with 0.1 ml of loading buffer and incubated for 15 min on ice. Erythrocyte ghosts were resealed by incubation at 37°C for 45 min and stored on ice until use.

2.3. Measurement of intracellular fluorescence intensities by fluorescence microscopy

Before microscopic studies, erythrocyte ghosts were washed twice with KCl buffer. The ghost suspension was added to glass slide surface. The glass slide was scanned under the microscope. A good single erythrocyte ghost was selected. The Ca^{2+} indicator indo-1 FF shows a shift and an increase in the peak of its emission spectra when Ca^{2+} binds, whereas the excitation spectra remain unaltered. Thus, the dye is excited at a single wavelength between 338nm and 350nm and emission is monitored at 400nm and 450nm, the respective peaks of the Ca^{2+} -bound and Ca^{2+} -free spectra. Therefore, An erythrocyte ghost was monitored by DAPI filter for Indo 1 FF with

Ca²⁺-bound and shortly after it was monitored by FITC filter for Indo 1 FF with Ca²⁺-free.

Determination of Km and Vmax

The kinetics of the calcium pump can be approximated by the Michaelis-Menten equation:

$$v = \frac{V_{\max} [Ca^{+2}]}{K_m + [Ca^{+2}]} \quad (1)$$

[Ca²⁺] was detected time dependent from fluorescence intensity.

$$[Ca^{+2}] = K_d \frac{(R - R_{\min}) S_{f2}}{(R_{\max} - R) S_{b2}} \quad (2)$$

$$R_{\min} = \frac{S_{f1}}{S_{f2}} \quad \text{and} \quad R_{\max} = \frac{S_{b1}}{S_{b2}}$$

In the equation 2, S_{f1} is the concentration of free Ca²⁺ in λ₁, S_{f2}, is the concentration of free Ca²⁺ in λ₂, S_{b1} is the concentration of binding Ca²⁺ in λ₁, S_{b2}, is the concentration of binding Ca²⁺ in λ₂. Km and Vmax were calculated by the GraphPad software. Also, all graphs were drawn by GraphPad software. For the statistical analysis, the statistical software of GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used. We used ANOVA to evaluate the differences among groups.

3. RESULTS

3.1 The graph of reaction rate versus [Ca²⁺] Erythrocytes were incubated 30 minutes, 60 minutes, 90 minutes and 120 minutes at 37°C,

44°C and 50°C temperatures separately. [Ca²⁺]-reaction rates of PMCA were measured and their graphs were shown in fig. 3.1-4. These graphs show the kinetic of the pump. Vmax and Km were calculated according to these graphs. Control group erythrocytes were not incubated at any temperature. If the kinetic of the pump is neglected, there is a linear relationship between the rate of Ca²⁺ and the concentration of Ca²⁺.

In the fig 3.1-4, the graphs are linear at 30min, 60min 90min 120min of 44°C and 50°C temperatures. PMCA of erythrocyte ghosts which were incubated at these temperatures during these times doesn't have correct Vmax and Km values. According to linear graphs, reaction rate reaches Vmax at higher values than the control group. But there is usually a hyperbolic relationship between the reaction rate and the concentration of Ca²⁺. In the control group, the graph is hyperbolic. The graphs of all incubation times of 37°C temperature and the graphs of 30min incubation of 44°C and 50°C temperatures are hyperbolic as the control. But the graphs of 60min, 90min and 120min incubations of 44°C and 50°C temperatures are not hyperbolic. Their graphs are linear.

3.2. Km and Vmax between temperatures and incubation time

According to temperatures, the graphs of Km and Vmax were shown in fig. 3.5-7. The Km is the

inverse of the Ca^{2+} affinity of the pump. It changes according to V_{max} . For K_m and V_{max} values, there is not any significant difference between 37°C temperature and the control group. Also, there is not any significant difference among incubation times of 37°C temperature. There is a significant difference between control group and 90min and 120 min incubation times of 44°C temperature ($p < 0,01$). When the incubation times of 44°C temperature are compared, there are significant differences between 30min and 90min, 30min and 120min, 60min and 90min and 60min and 120min ($p < 0,01$).

There is a significant difference between control group and 90min incubation of 50°C temperature in V_{max} values ($p < 0,05$). Also there are significant differences between 30, 60, 120 min and 90min incubation times of 50°C in V_{max} values ($p < 0,05$).

3.3. The Relation Of Temperature Between Each Other

The K_m and V_{max} graphs which show the relationship between temperatures is shown in fig. 3.8-9. When these temperatures are compared with each other, for K_m and V_{max} there are significant differences between 90-120min incubation times of 37°C temperature and 90-120min incubation times of 44°C temperature. There are significant differences between 90-

120min incubation times of 37°C temperature and 90-120min incubation times of 50°C temperature.

4. Discussion

First of all, the important point that we need to emphasize, is that erythrocytes incubated at temperatures before lysis. So while we were evaluating the results, we thought whole erythrocytes. Because hemoglobin and other proteins were affected by incubation temperatures. Some studies show that the tumor cells are killed by temperature when they are incubated a long time at 40°C - 44°C temperatures (1). Erythrocytes which were not lysis were incubated at 37°C, 44°C, and 50°C temperatures. These temperatures affected hemoglobin, proteins and other things inside the erythrocytes. The functions of PMCA were determined by intracellular ion imaging. K_m and V_{max} which are the kinetic parameters of PMCA mean to the Ca^{2+} capacity of PMCA (6). There is not any direct information about a relation between HT and PMCA. Our data shows the relation between HT and PMCA.

PMCA has a critical role in cell death. If PMCA is inhibited, Ca^{2+} accumulates and cell undergoes apoptosis. But, if PMCA is induced, more Ca^{2+} can come out from cell than normal situation. In this case, the cell undergoes necrosis (4).

V_{max} of PMCA is higher at the temperatures of 44°C and above. V_{max} means that the reaction rate of PMCA is maxed and stable. Ca^{2+}

concentration can change but V_{max} remains at the stable value. K_m value of PMCA is the Ca^{2+} concentration in the half of V_{max} . The higher K_m value of the pump, the lower the Ca^{2+} removal capacity. In our results, there are significant differences between incubation times 90min-120min at 44oC and control group in K_m and V_{max} of PMCA. Also, there are significant differences between incubation times 90min-120min at 44oC and 37oC in K_m and V_{max} of PMCA. According to these results, PMCA may cause cell death with temperature.

When a cell is exposed to high temperatures for a long time, intracellular proteins accumulate and fold in the cell. These proteins lose their biological activities. At the same time, they damage plasma membrane because the balance of protein decays (1). In this case, Hemoglobin may be affected by temperature because hemoglobin is a protein in the red blood cells. Also, it binds to the plasma membrane with a weak binding (7).

Structurally, PMCA consists of ten transmembrane domains, two cytosolic loops with both N- and C-terminal cytosolic tails. The most functionally important structural domain is the C-terminal tail which contains the autoinhibitory calmodulin (CaM)-binding motif (8). At low resting $[Ca^{2+}]_i$, the autoinhibitory CaM-binding motif interacts with the catalytic site (first and second cytosolic loops) thereby inhibiting the PMCA (4). In another study, there is a relation

between CaM and hemoglobin. CaM may be affected by temperature so CaM-binding motif of PMCA may not work as before (8).

Consequently, this study shows that PMCA is affected by temperature. Incubation times of temperatures are very important. HT causes cell death. A great possibility, the one reason of cell death associated with HT is that the kinetic parameters of PMCA change more than normal situation. The function of PMCA damaged with temperature. The Ca^{2+} affinity of PMCA is changed. We showed that K_m and V_{max} values of PMCA are different with 44oC and 50oC temperatures. For more clear results, more molecular studies have to be performed.

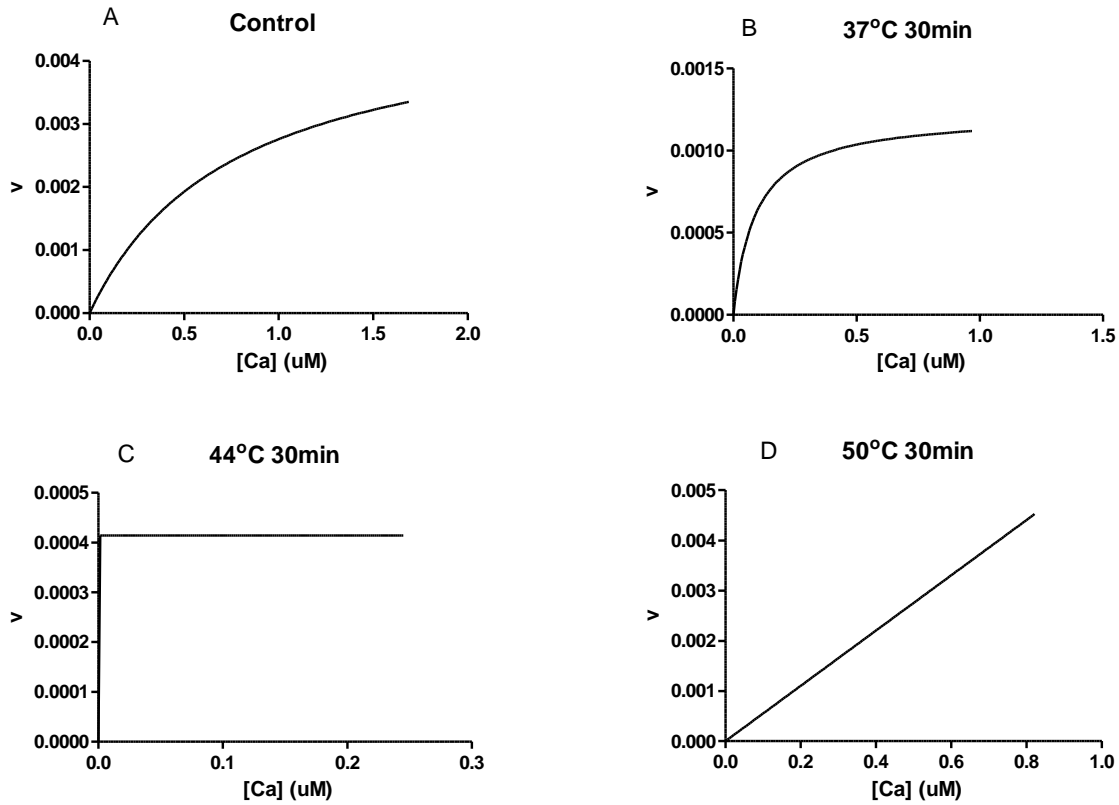


Figure 3.1. The graph of reaction rate versus $[Ca^{2+}]$. A. Erythrocytes were not incubated at any temperatures. B. Erythrocytes were incubated 30min at 37°C temperature. C. Erythrocytes were incubated 30min at 44°C temperature. D. Erythrocytes were incubated 30min at 50°C temperature.

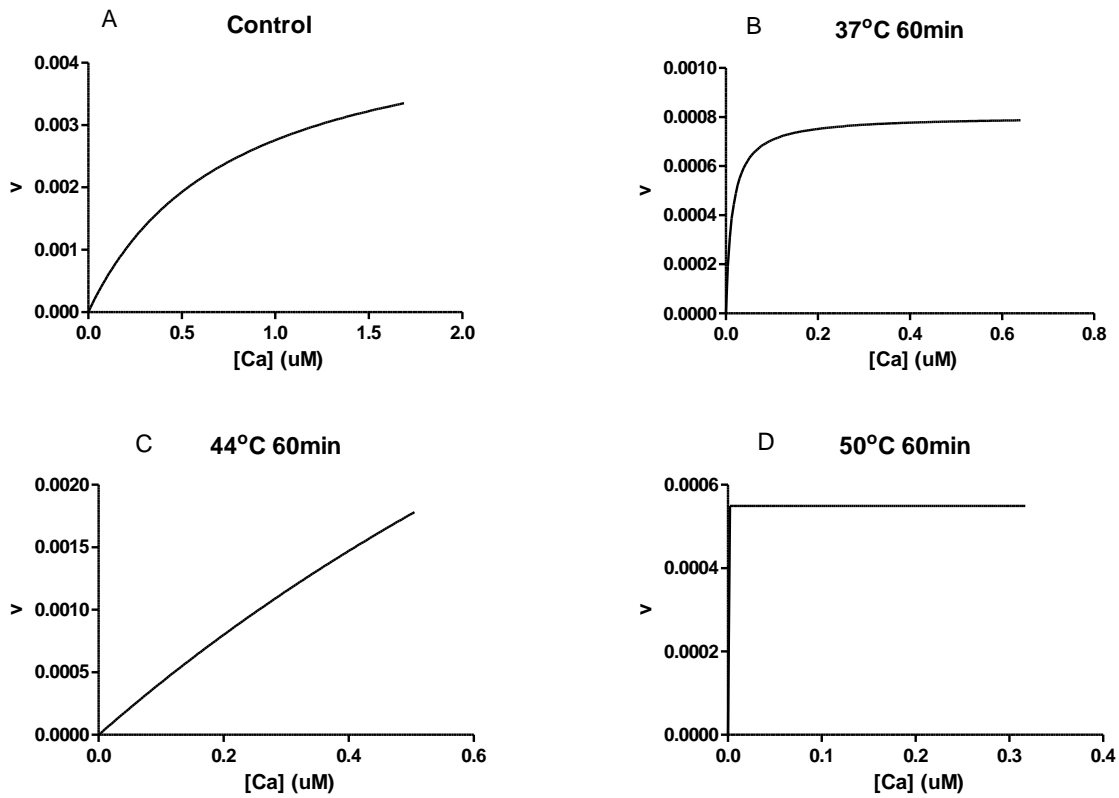


Figure3.2. The graph of reaction rate versus $[\text{Ca}^{2+}]$. A. Erythrocytes were not incubated at any temperatures. B. Erythrocytes were incubated 60min at 37°C temperature. C. Erythrocytes were incubated 60min at 44°C temperature. D. Erythrocytes were incubated 60min at 50°C temperature.

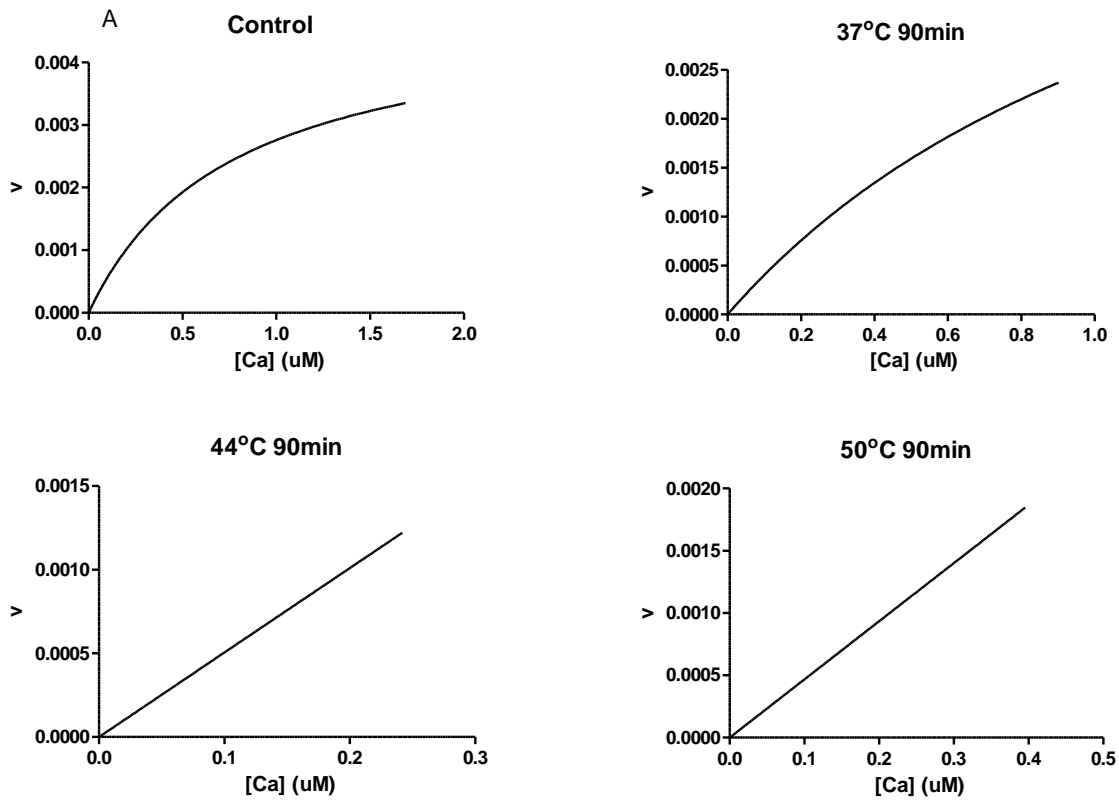


Figure3.3. The graph of reaction rate versus $[Ca^{2+}]$. A. Erythrocytes were not incubated at any temperatures. B. Erythrocytes were incubated 90min at $37^{\circ}C$ temperature. C. Erythrocytes were incubated 90min at $44^{\circ}C$ temperature. D. Erythrocytes were incubated 90min at $50^{\circ}C$ temperature.

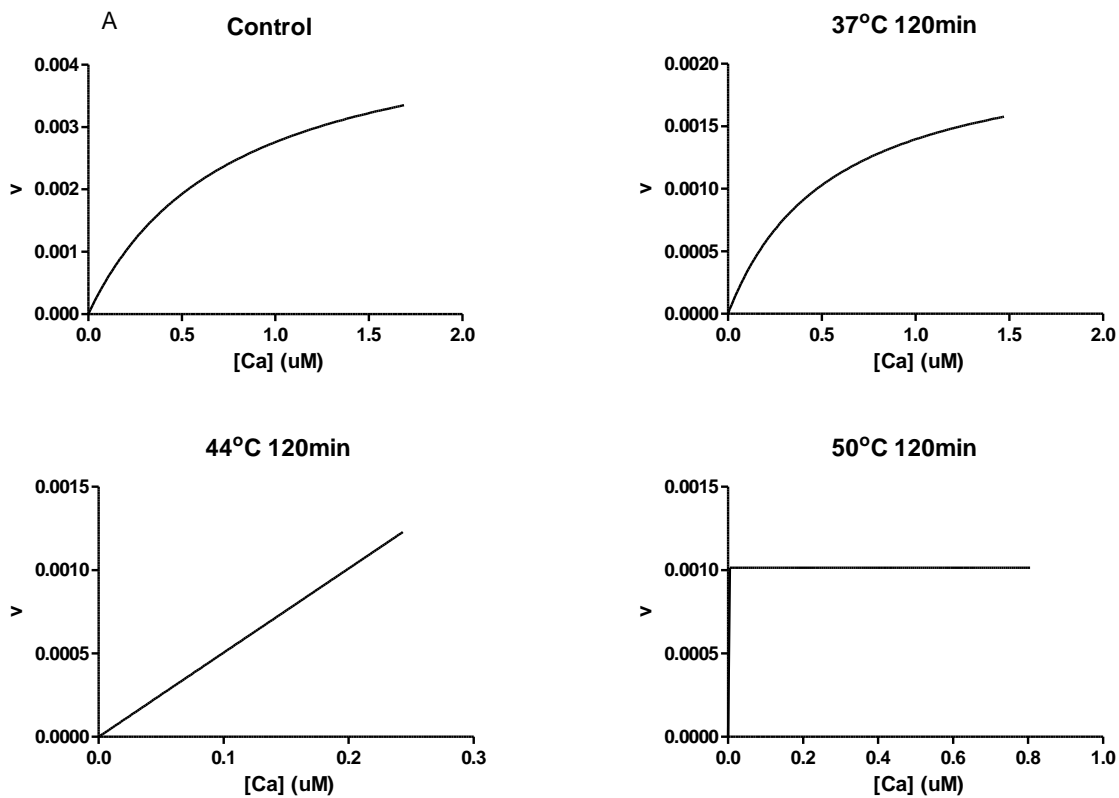


Figure 3.4. The graph of reaction rate versus [Ca²⁺]. A. Erythrocytes were not incubated at any temperatures. B. Erythrocytes were incubated 120min at 37°C temperature. C. Erythrocytes were incubated 120min at 44°C temperature. D. Erythrocytes were incubated 120min at 50°C temperature.

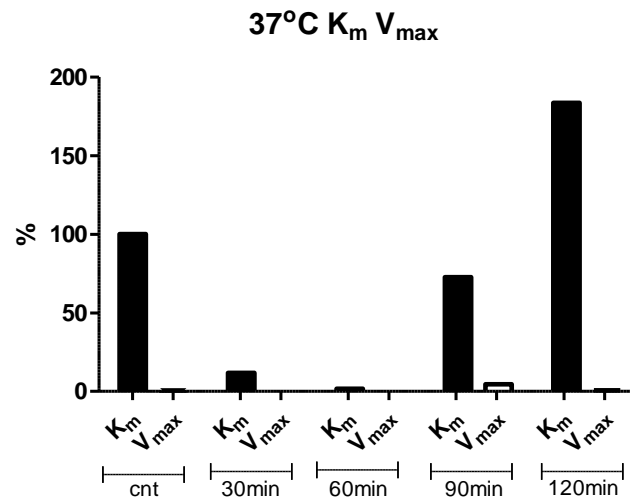


Figure3.5. K_m and V_{max} of PMCA in 37°C temperature

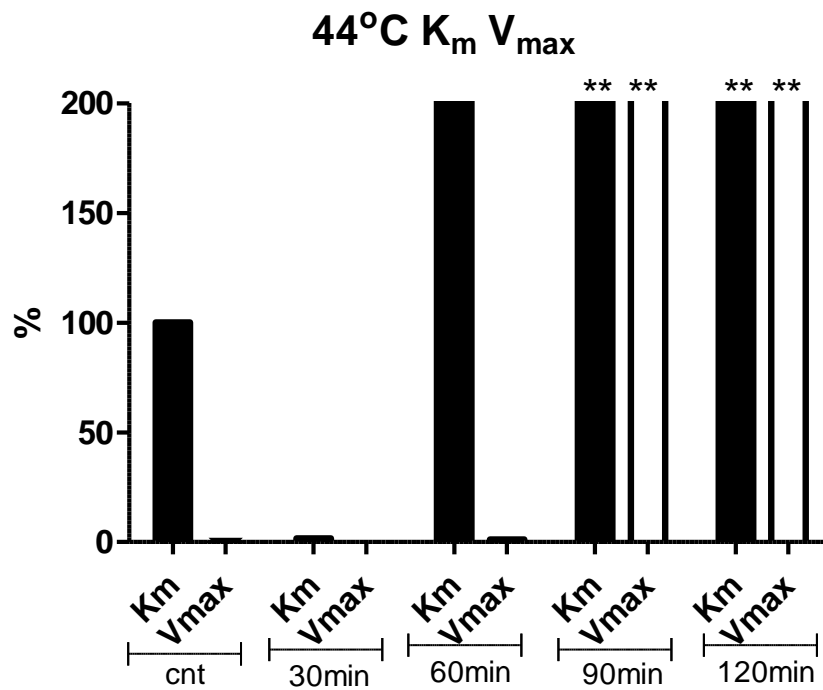


Figure3.6. K_m and V_{max} of PMCA in 44°C temperature

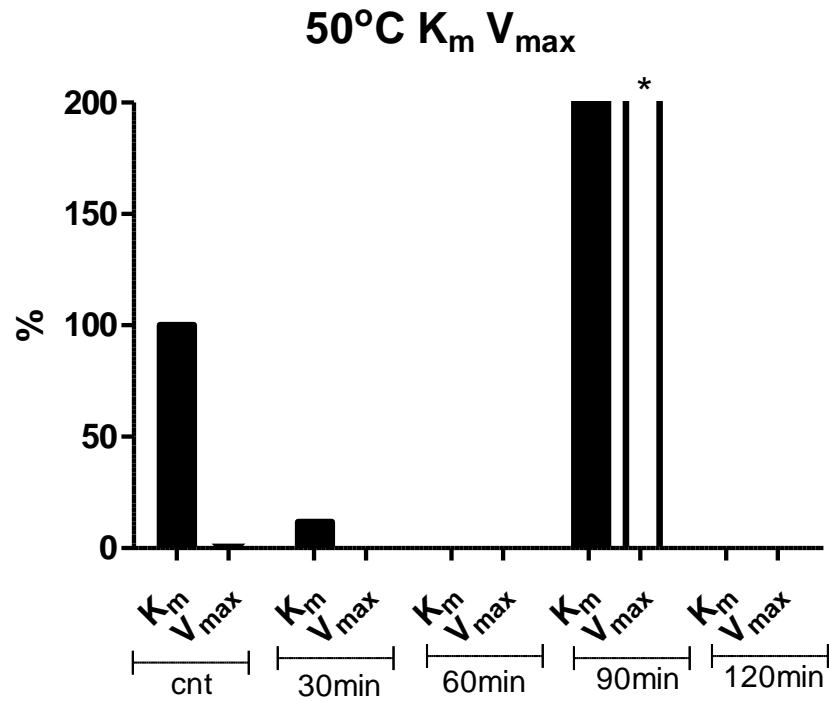


Figure3.7. K_m and V_{max} of PMCA in 50°C temperature

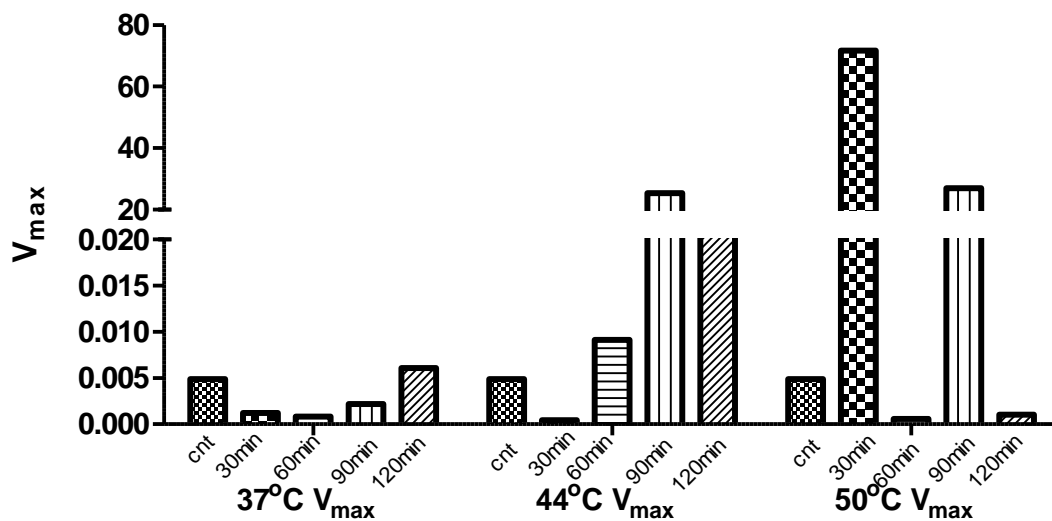


Figure3.8. The graphs of V_{max} of 37oC, 44oC and 50oC

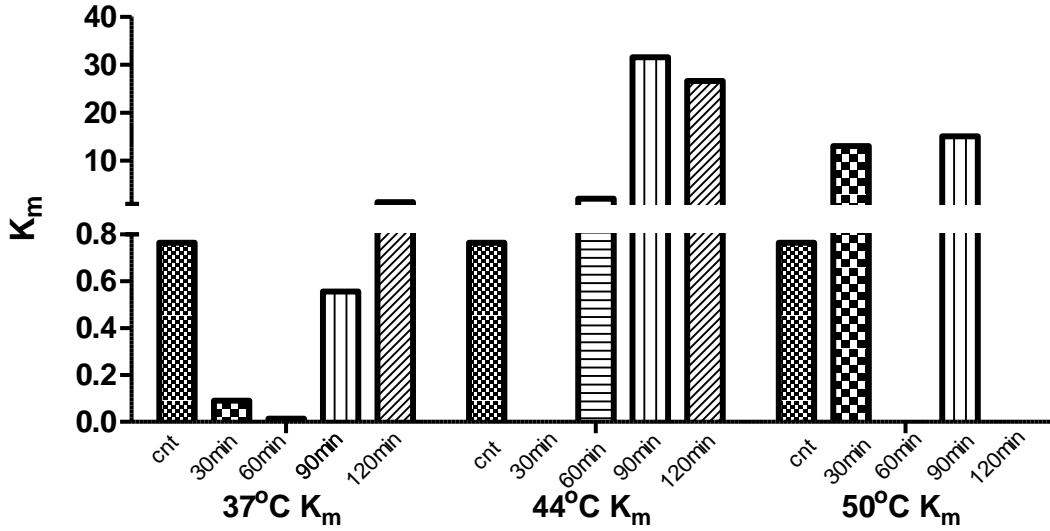


Figure3.9. The graph of K_m of 37°C, 44°C and 50°C

References

- Ahmed K, Tabuchi Y, Kondo T. Hyperthermia: an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Apoptosis*. 01 Kasım 2015;20(11):1411–9.
- L-G LFF. Pathological Effects of Hyperthermia in Normal Tissues. *Cancer Res*. 01 Ekim 1984;44(10 Supplement):4826s–4835s.
- Richter K, Haslbeck M, Buchner J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Mol Cell*. 22 Ekim 2010;40(2):253–66.
- Bruce JIE. Metabolic regulation of the PMCA: Role in cell death and survival. *Cell Calcium*. 08 Haziran 2017;
- Lew VL, Daw N, Perdomo D, Etzion Z, Bookchin RM, Tiffert T. Distribution of plasma membrane Ca²⁺ pump activity in normal human red blood cells. *Blood*. 01 Aralık 2003;102(12):4206–13.
- Kubitscheck U, Pratsch L, Passow H, Peters R. Calcium pump kinetics determined in single erythrocyte ghosts by microphotolysis and confocal imaging. *Biophys J*. Temmuz 1995;69(1):30–41.
- Shaklai N, Yguerabide J, Ranney HM. Interaction of hemoglobin with red blood cell membranes as shown by a fluorescent chromophore. *Biochemistry (Mosc)*. 13 Aralık 1977;16(25):5585–92.
- Strehler EE, Zacharias DA. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev*. Ocak 2001;81(1):21–50.