

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

ARI POLENİ VE PROPOLİSİNİN METASTATİK İNSAN PROSTAT
KANSERİ HÜCRE SERİLERİNDE VOLTAJ KAPILI SODYUM
KANALLARI EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Meltem ÇOLAK

TRABZON – 2009

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

ARI POLENİ VE PROPOLİSİNİN METASTATİK İNSAN PROSTAT KANSERİ
HÜCRE SERİLERİNDE VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALLARI
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Meltem ÇOLAK

Tezin Enstitüye Veriliş Tarihi : 23.07.2009

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 10.08.2009

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ekin ÖNDER

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Asım ÖREM

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Nuri BAKAN

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Orhan DEĞER

AĞUSTOS 2009

TRABZON

ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmada, değerli katkılarından dolayı tez danışman hocam Prof. Dr. Orhan DEĞER'e, çalışmalarından ilham aldığım Prof. Dr. Mustafa B. A. CAMGÖZ'e, Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü'nden Prof.Dr. Mithat BOZDAYI, Ersin Karataylı ve Özlem Erkan Esin'e, PC-3 ve MCF-7 kanser hücre serilerini bana ve çalışma arkadaşlarıma temin eden G.A.T.A. Hematoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ali UĞUR URAL'a, kimyasal malzeme ve her türlü laboratuvar araç gereçlerini hizmetimize sunan K.T.Ü. Hematoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ercüment OVALI'ya, Doç. Dr. Mehmet SÖNMEZ'e ve laboratuvar deneyimlerini bizimle paylaşan Münür İNAN'a, her zaman yanımda olan Yaşam BARLAK ve Sevil CENGİZ'e, sıkıştığımız anlarda sürekli başvurduğumuz Doç. Dr. Birgül KURAL ve Doç. Dr. Ahmet ALVER'e, Sağlık Bilimleri Enstitüsüne, Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm kıymetli hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma, ayrıca benden desteklerini esirgemeyen değerli eşime ve aileme, varlığıyla canıma can katan kızım Rüyam Sır ÇOLAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Meltem ÇOLAK

Bu alışma K.T.Ü. B.A.P. 2007.114.0012 kod numaralı
proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Polen	2
2.1.1. Polenin Fiziksel Özellikleri	3
2.1.2. Polenin Kimyasal Bileşimi	3
2.1.3. Polenin Antibiyotik Aktivitesi	7
2.1.4. Polenin Anti-Aterosklerotik Aktivitesi	8
2.1.5. Polenin Antineoplastik Aktivitesi	8
2.1.6. Polenin Antioksidan Özellikleri	9
2.2. Propolis	11
2.2.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri	12
2.2.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği	12
2.2.2.1. Flavonoidler	13
2.2.2.2. Arı Mumu ve Yağ Asitleri	15
2.2.2.3. Esansiyel Yağlar	15
2.2.3. Propolisin Biyolojik Aktiviteleri	16
2.3. Prostat Kanseri	17
2.4. Voltaj-kapılı Sodyum Kanal Proteini	19

2.4.1. VGSC'lerinin Yapısı ve VGSC Hastalıkları	19
2.4.2. VGSC'lerinin Çalışma Şekli	24
2.4.3. VGSC Toksinleri	26
2.4.4. VGSC'lerinin Regülasyonu	27
2.4.4.1. Transkripsiyonel kontrol	28
2.4.4.2. Translasyonel Kontrol	29
2.4.4.3. Protein-Protein Etkileşimleri	31
2.5. CELEX Hipotezi	35
3. MATERYAL VE METOD	36
3.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	36
3.1.1. Cihaz ve Malzemeler	36
3.1.2. Kimyasal Malzemeler	36
3.2. Metodlar	37
3.2.1. Polen ve Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması	37
3.2.1.1. Propolisin DMSO ve Su Ekstraktlarının Hazırlanması	37
3.2.1.2. Polenin DMSO ve Su Ekstraktlarının Hazırlanması	37
3.2.2. Hücre Kültürü	38
3.2.2.1. PC-3 Hücre Serilerinin Çoğaltılması	38
3.2.2.2. PC-3 Hücre Serilerinin Pasajlanması	38
3.2.2.3. PC-3 Hücre Serilerinin Sayımı	38
3.2.2.4. PC-3 Hücre Serileri için Hücre Canlılığının Belirlenmesi	39
3.2.2.5. Hücrelerin Ekstraktlarla Muamele Edilmesi	39
3.2.3. Total RNA Ekstraksiyonu	40
3.2.4. Primerlerin Sentezlenmesi	41
3.2.5. cDNA Elde Edilmesi	42
3.2.6. RTPCR	43
3.2.6.1. Test Prensipleri	43
3.2.6.2. RTPCR Protokolü	43
4. BULGULAR	46
4.1. MTT Çalışma Sonuçları ile Uygun Polen, Propolis Konsantrasyonlarının Seçilmesi	46
4.2. RTPCR Ön Çalışmaları	47
4.3. PC-3 Hücre Serilerinin RTPCR Çalışma Sonuçları	48

4.3.1. PC-3 Hücre Serilerinde β -aktin İçin Yapılan RTPCR Çalışmasından Elde Edilen Sonuçlar	48
4.3.2. PC-3 Hücre Serilerinde VGSC Na _v 1.5 α İzofomu İçin Yapılan RTPCR Çalışmasından Elde Edilen Sonuçlar	54
4.3.3. PC-3 Hücre Serilerinde VGSC Na _v 1.7 α İzofomu İçin Yapılan RTPCR Çalışmasından Elde Edilen Sonuçlar	61
4.3.4. RTPCR Çalışmaları İçin Standart Grafiği Oluşturma	69
4.3.5. Standart Grafiği Kullanılarak Yapılan Hesaplamalara Elde Edilen Veriler	71
5. TARTIŞMA	74
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
7. ÖZET	87
8. SUMMARY	88
9. KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ	

TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Polenin ortalama kimyasal bileşimi ve besinsel değeri	5
Tablo 2. Polenin çeşitli yiyeceklerle besinsel yönden karşılaştırılması	6
Tablo 3. Propolis bileşenlerinin sınıfları ve grupları	13
Tablo 4. Propoliste bulunan bazı flavonoidler ve fenolik bileşikler	14
Tablo 5: Biyolojik aktivitesi bilinen bazı propolis bileşenleri	16
Tablo 6: Kalıtsal sodyum kanal hastalıkları	24
Tablo 7. VGSC toksinleri ve ilaçları	26
Tablo 8. PC-3 prostat kanseri hücre serilerine ilave edilen polen ve propolis ekstraktları	40
Tablo 9. Na _v 1.5, Na _v 1.7 ve β-Aktin'in forward ve reverse primer dizileri	42
Tablo 10. Na _v 1.5, Na _v 1.7 ve β-Aktin cDNA'sı elde etmek için yapılması gereken pipetlemeler	42
Tablo 11. RTPCR için kapillere yapılan pipetlemeler	44
Tablo 12. RTPCR çalışmasında Light Cycler 2.0 System PCR Run cihazında kullanılan PCR parametreleri	45
Tablo 13. PC-3 prostat kanseri hücre serilerinde polenin sulu ve DMSO'lu ekstraktlarıyla yapılan MTT çalışma sonuçları (n=16)	46
Tablo 14. PC-3 prostat kanseri hücre serilerinde propolisin sulu ve DMSO'lu ekstraktlarıyla yapılan MTT çalışma sonuçları (n=16)	46
Tablo 15. Polen ve propolis ekstraktları ile muamele edilmiş ve edilmemiş (kontrol) PC-3 prostat kanseri hücre serilerinin flask numaraları	48
Tablo 16. Çeşitli flaklardan elde edilen total RNA'lar ile yapılan RTPCR çalışmalarının β-Aktin için ön sonuçları	49
Tablo 17. VGSC Na _v 1.5 α izoformu için RTPCR çalışmalarında elde edilen ön Sonuçlar	55
Tablo 18. VGSC Na _v 1.7α izoformu için RTPCR ön çalışma sonuçları	62

Tablo 19. VGSC Na _v 1.5, Na _v 1.7 α izoformu ve β -Aktin için yapılan dilüsyonlu çalışmada elde edilen sonuçlar	70
Tablo 20. Kontrol hücrelerine göre polen ve propolis ekstraktları ile muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde VGSC Na _v 1.5 ve Na _v 1.7 α izoformlarının ekspresyon seviyeleri	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Çalışmamızda kullandığımız polen pelletleri	4
Şekil 2. Çalışmamızda kullandığımız propolis örnekleri	12
Şekil 3. Propolis'te bulunan tipik flavonoidlerin ve fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları	14
Şekil 4. VGSC alt birimlerinin şematik gösterimi	22
Şekil 5. Voltaj-kapılı sodyum kanal proteinlerinin üç boyutlu şematik yapısı	22
Şekil 6. İnsan VGSC'lerinin genomik lokasyonu	23
Şekil 7. VGNC'den sodyum akışını gösteren model	25
Şekil 8. VGSC α - alt birimlerine toksin ve ilaçların bağlanma bölgeleri	26
Şekil 9. İnsan VGSC genlerindeki mutasyonlar	27
Şekil 10. PC-3 hücre serilerinde polen ve propolisin sulu ve DMSO'lu ekstraktlarıyla yapılan MTT çalışma sonuçları	47
Şekil 11. Hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş PC-3 hücre serilerinde (10 numaralı örnek) β -Aktin primerlerinin negatif kontrol ile erime eğrisi analiz sonucu	50
Şekil 12. Polen-DMSO ve polen-su ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücre serilerindeki (3 ve 4 numaralı örnek) β -Aktin primerlerinin negatif kontrol ile RTPCR analiz sonucu	51
Şekil 13. Polen-DMSO ve polen-su ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücre serilerindeki (3 ve 4 numaralı örnek) β -Aktin primerlerinin negatif kontrol ile erime eğrisi analiz sonucu	52
Şekil 14. Propolis-DMSO ekstraktı ile muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde (2 numaralı örnek) β -Aktin primerinin negatif kontrol ile erime eğrisi (melting curve) analiz sonucu	53

- Şekil 15. Propolis-su, polen-DMSO ve polen-su ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde (2, 3 ve 4 numaralı örnek) β -Aktin primerinin negatif kontrol ile erime eğrisi analiz sonucu 54
- Şekil 16. Polen-DMSO ve polen-su ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde (3 ve 4 numaralı örnek) tekrarlı çalışılan VGSC Na_v 1.5 α izoformlarının ve negatif kontrolün RTPCR analiz sonucu 56
- Şekil 17. Polen-DMSO ve polen-su ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde (3 ve 4 numaralı örnek) tekrarlı çalışılan VGSC Na_v 1.5 α izoformlarının ve negatif kontrolün erime eğrisi analiz sonucu 57
- Şekil 18. Propolis-DMSO ekstraktı ile muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde (2 numaralı örnek) VGSC Na_v 1.5 α izoformunun negatif kontrol ile erime eğrisi analiz sonucu 58
- Şekil 19. Propolis su ekstraktları ile muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde (1 numaralı örnek) VGSC Na_v 1.5 α izoformu, β -Aktin ve negatif kontrollerinin RTPCR analiz sonucu 59
- Şekil 20. Propolis-DMSO, polen-su, polen-DMSO ekstraktları ile muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde (2, 3 ve 4 numaralı örnekler) tekrarlı çalışılan VGSC Na_v 1.5 α izoformu, β -Aktin ve negatif kontrollerinin RTPCR analiz sonucu 60
- Şekil 21. Propolis-su, polen-su, polen-DMSO ekstraktları ile muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde (2, 3 ve 4 numaralı örnekler) tekrarlı çalışılan VGSC Na_v 1.5 α izoformu ve negatif kontrollerinin erime eğrisi analiz sonucu 61
- Şekil 22. Hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş kontrol PC-3 hücre serilerinde (10 numaralı örnek) VGSC Na_v 1.7 α izoformu ve negatif kontrolün erime eğrisi analiz sonucu 63
- Şekil 23. Polen-DMSO ve polen-su ekstraktlarıyla muamele edilmiş ve hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş PC-3 hücre serilerinde (3,4 ve 5 numaralı örnek) VGSC Na_v 1.7 α izoformu ve negatif kontrolün RTPCR analiz sonucu 64
- Şekil 24. Polen-DMSO ekstraktı ile muamele edilmiş ve hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş PC-3 hücre serilerinde (3 ve 5 numaralı örnek) VGSC Na_v 1.7 α izoformu ve negatif kontrolün erime eğrisi analiz sonucu 65
- Şekil 25. Polen-su ekstraktı ile muamele edilmiş ve hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş PC-3 hücre serilerinde (4 ve 5 numaralı örnek) VGSC Na_v 1.7 α izoformu ve negatif kontrolün erime eğrisi analiz sonucu 66

- Şekil 26. Propolis-DMSO ekstraktı ile muamele edilmiş ve hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş PC-3 hücre serilerinde (1 ve 5 numaralı örnek) VGSC Na_v 1.7 α izoformu ve negatif kontrolün erime eğrisi analiz sonucu 67
- Şekil 27. Propolis-su, propolis-DMSO ekstraktları ile muamele edilmiş ve edilmemiş kontrol PC-3 hücre serilerinde (6, 7 ve 10 numaralı örnekler) VGSC Na_v 1.7 α izoformu, β -Aktin ve negatif kontrollerinin RTPCR analiz sonucu 68
- Şekil 28. Propolis-su, propolis-DMSO, polen-DMSO ekstraktları ile muamele edilmiş ve edilmemiş kontrol PC-3 hücre serilerinde (1, 2, 3 ve 5 numaralı örnekler) tekrarlı çalışılan VGSC Na_v 1.7 α izoformu ve negatif kontrollerinin erime eğrisi analiz sonucu 69
- Şekil 29. Hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş PC-3 hücre serilerinde (10 numaralı örnek) VGSC Na_v 1.5 α izoformu ve β -Aktin için dilüsyonlu (1, 1/10, 1/100, 1/1000) yapılan erime eğrisi analiz sonucu 70
- Şekil 30. X ekseninde dilüsyon oranları ve y ekseninde β -Aktin, Na_v 1.5, Na_v 1.7 için elde edilen sonuçlar ile oluşturulan standart grafiği 71
- Şekil 31. Çeşitli polen ve propolis ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücrelerinin kontrol PC-3 hücrelerine göre VGSC Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 α izoformlarının gen ekspresyonundaki % azalma 72

KISALTMALAR LİSTESİ

AKAP	: Kardiyak Çapa Proteini
AMV	: Avian Myeloblastosis Virus
BLC	: İnsan Akciğer Kanser Hücreleri
CaM	: Kalmodulin
CaM kinaz II	: Kalmodulin Kinaz II
cAMP	: Siklik Adenozin Mono Fosfat
CAPE	: Kafeik Asit Fenil Esteri
CDK	: Cyclin Bağımlı Kinaz
CELEX	: Hücreyel Uyanılma
Colon 26	: Fare Kolon Karsinoma Hücreleri
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DRG	: Dorsal-Root Ganglion
EDA	: Esansiyel Günlük Kullanım Miktarı
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EPA	: Eikosanpenoik Asit
ERK	: Ekstraselüler Sinyal Regüle Edici Kinaz
GEFS	: Febril Nöbetli Epilepsi
G α	: G-Protein Sitümülator α -Altbirimi
FHF1B	: Fibroblast Büyüme Faktörü Ailesi
HEC	: İnsan Gastrik Karsinoma Hücreleri
HyperPP	: Hiperkalemik Periodik Felç
IFM	: İzolösin-Fenilalanin-Metiyonin
ISO	: İzoproterenol
IVF	: İdiyopatik Ventriküler Fibrilizasyon
LQT3	: Uzun QT sendrom tip 3
MMP-2	: Matriks Metaloproteinaz-2

MMP-9	: Matriks Metaloproteinaz-9
MTT	: 3-(4,5-dimetilthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NGF	: Nöronal Büyüme Faktörü
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PAM	: Potasyum-Uyarımlı Miyotoni
PC	: Paramiotonia Konjenital
PC-3	: İnsan Prostat Kanser Hücre Serisi
PKA	: Protein Kinaz A
PKC	: Protein Kinaz C
PUFA	: Poliansatüre Yağ Asidi
RDA	: Tavsiye Edilen Günlük Kullanım Miktarı
RTPCR	: Real Time PCR
RTPP β	: Reseptör Benzeri Tirozin Fosfataz β
TTX	: tetrodotoksin
VGPC	: Voltaj Kapılı Potasyum Kanal Proteini
VGSC	: Voltaj Kapılı Sodyum Kanal Proteini

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Polen ve propolis bal arıları tarafından çeşitli çiçeklerden ve çeşitli bitki ve ağaç reçinelerinden toplanarak oluşturulan arı ürünleridir (1, 2). Polen ve propolisin kompozisyonu ve rengi toplandığı bölgenin iklimine ve coğrafik alanına bağlı olarak değişiklik gösterir (3, 4). Polen ve propolis kimyasal yapısında flavonoidler, fenolik bileşikler, çeşitli aromatik bileşikler, vitaminleri, önemli mineralleri ve eser elementleri barındırır (5, 6). Polen ve propolis antioksidan, antimikrobial, antiaterosklerotik, anti-neoplastik, antiinflamatuvar, immünostimülatör ve karsinostatik aktiviteye sahiptir (7, 8, 9). Daha önce yaptığımız çalışmalarda Trabzon bölgesinden toplanan propolis ve Türkiye polenin çeşitli ekstraktlarının antioksidan aktiviteleriyle konsantrasyona bağlı olarak HL-60 myeloid hücre serilerini apoptoza sürüklediği, KML-562 hücre serilerinde solunumsal patlamayı inhibe ettiğini ortaya koyduk (5, 10, 11).

Yapılan birçok çalışmada metastatik insan ve rat prostat kanseri hücrelerinin Voltaj Kapılı Sodyum Kanal (VGSC) proteinini fazlaca eksprese ettiği bildirilmiştir (12, 13). VGSC proteini glikozillenmiş bir membran proteini olup milisaniyeler içerisinde membran depolarizasyonuna bağlı olarak hücre içine Na⁺ akışını sağlar (14). CELEX (HücreSEL Uyarılma) hipotezine göre kanser hücrelerinin metastatik aktivitesinin VGSC proteinlerinin up-regülasyonu ile kolaylaştığı ve bu kanal proteinlerini bloke edebilecek bileşiklerin anti-metastatik aktiviteye sahip olabileceği öne sürülmektedir. Djamgoz ve arkadaşları çeşitli sebze ve meyvelerde bulunan Resveratrol, Curcimin, Capsaicin, Genistein gibi bileşiklerin CELEX hipotezine uygun olarak VGSC aktivitesinin doza bağlı olarak inhibe edebileceğini savunmaktadır (15).

CELEX hipotezine dayanarak gerçekleştirdiğimiz çalışmada Trabzon bölgesinden toplanan, flavonoid ve fenolik bileşiklerden zengin olan propolis ve Türkiye'nin çeşitli illerinden (Balıkesir(Beydağ), Bayburt(Demirözü), Erzurum(Arıbahçe) ve Trabzon) toplanan karışık polen ekstraktlarının PC-3 prostat kanseri hücre serilerinde VGSC ekspresyonu üzerine etkisini inceledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polen

Arı poleni arıların çeşitli çiçeklerden topladıkları çiçek özünü kısmen sindirilmiş bal ile yoğurması sonucu oluşturulan renkli pelletlerdir. Pelletler haline getirilen polenler oğul arılar tarafından yiyecek olarak tüketilebildiği gibi arı ekmeği ve arı sütü yapımında da kullanılabilir (1,7). Polenin arı tarafından yoğrulması esnasında glukoz oksidaz enzimi polene geçer (5).

İslamik İspanya'da arap ve yahudi doktorların kitaplarında polenin tıptaki kullanım alanlarına yer verilmiştir. 1200 yıllarında Mısır Sultanı'nın doktoru olan Maimonides poleni kanama durdurucu, ağrı kesici sedatif bir tonik olarak kullanır. 1200'den önce Ibn el-Beithar poleni afrodisyak olarak tanımlar aynı zamanda mideye, bağırsak ve kalbe yararlı etkileri olduğunu, kandaki ateşi düşürdüğü ve bazı yiyecekler yendiği zaman oluşan ödemi azalttığını öne sürmüştür (16). Polen yüzyıllar önce, soğuk algınlığı, grip, ülser, anemi, kolit, enterit ve alerjik reaksiyonların giderilmesi için halk hekimleri tarafından kullanılmıştır (17).

İyi bir besin olması ve tıbbi özellikleri nedeniyle antik çağdan beri kullanılan polenin yaşlanmayı geciktirici etkisi yanı sıra sağlığı geliştirici ve vital enerjiyi artırıcı aktiviteye sahip olduğu öne sürülmektedir. Sadece polenden yapılan arı sütü ile beslenen kraliçe arının beş veya altı yıl yaşadığı, diğer arılarına ise ömürlerinin yalnızca ilk iki gününde arı sütü ile beslendikleri ve birkaç hafta yaşadıkları bilinmektedir (7).

Günümüzde de yiyecek olarak kullanımı dışında, tıpta ve kozmetik alanda da kullanılmaktadır. Kozmetik alanda cildi gençleştirdiği ve beslediği için kullanılırken alerjik reaksiyonların da olabileceği göz ardı edilmemelidir (5). Polende bulunan polifenolik bir bileşik olan sinamik asit türevlerinin vücudu yenileyip, yaşlanmayı geciktirdiği öne sürülmektedir (7).

2.1.1. Polenin Fiziksel Özellikleri

Polen tanecikleri 6-200µm çapında, pek çok farklı renk ve şekilde olabilirler. Genellikle sarı, kırmızı, turuncu, mor, yeşil, siyah vb. renklerde görülür. Her bir arı polenindeki aktif madde içeriği ile fiziksel özellikleri, bitki türüne, yetiştirme koşullarına, yer ve toplar karakterine göre değişir. Ancak arılar en değerli polenleri toplar (5, 7).

Polenin besin değerini kaybetmemesi için güneş ışığından korunması gerekmektedir. Özellikle kuru, karanlık ve soğuk yerlerde muhafaza edilmelidir. Polen oda sıcaklığında aylarca, -15C⁰ de yıllarca bozulmadan muhafaza edilebilir (5). Depolanmış polenlerin vitamin içeriğini dört yıla kadar koruduğu da rapor edilmiştir (7).

2.1.2. Polenin Kimyasal Bileşimi

Çiçek poleni ve arı salgılarının bir karışımı olan polenin, protein ve amino asit içeriği yanı sıra B-grup vitaminleri yönünden de oldukça zengin olduğu bilinmektedir. Polen % 25-30 protein, % 30-55 karbohidrat, % 1-20 yağ asitleri ve steroller gibi lipitleri, vitamin (Vitamin A, K ve B₁₂ hariç) ve minerallerden oluştuğu rapor edilmiştir (1,7). Diyetel fiber, potasyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor, demir, sodyum ve silica gibi mineraller açısından ve esansiyel yağ asitlerinden olan linoleik ve linolenik asit içeriği bakımından zengin olduğu için diyet ek olarak kullanılabilir (18). Feraboli F. yaptığı analiz sonucu polenin % 12.28 su, % 5.59 lipit, % 17.04 protein, %2.05 kül, %63.04 azatsuz ekstraktlarından oluştuğunu bildirerek, poleni yağsız bir hamburge benzediğini ve vejeteryan olanlar için ideal bir yiyecek olduğunu savunmuştur (19). Polen ayrıca çeşitli enzimleri, antibiyotikleri ve bioflavonoidleri yapısında barındırır (18). Polen polifenoller ve diğer sağlıklı bileşikleri içerdiği için Almanya Federal Sağlık Komisyonu tarafından ilaç olarak kabul edilmiştir (1). Şekil 1'de çalışmamızda kullandığımız polen pelletlerinin fotoğrafı gösterilmektedir.

Güney Afrika'nın tek bir polen türü ile yapılan çalışmada taze elle ve arı tarafından toplanmış ve depolanmış polen su, karbohidrat, ham protein, lipit içeriği bakımından karşılaştırdı. Elle toplanmış ve arı tarafından depolanmış polende su içeriğinin kuru ağırlığa oranla (% 13-21) ve karbohidrat içeriğinin (%35-61)daha yüksek olduğu, ham protein miktarının (%51-28) ve lipid içeriğinin (%10-8) daha az olduğu tespit edildi (20). Tablo 1'de polenin ortalama kimyasal bileşimi %RDA/EDI değeri ile verilmiştir(RDA: Tavsiye Edilen Günlük Kullanım Miktarı, EDI: Esansiyel Günlük Kullanım Miktarı). RDA

ve EDI değeri günlük 2200 kcal'lik, diyet uygulanan 25-50 yaş aralığındaki Amerikalı kadınlar için verilmiştir (4).

Polen tek başına mkemmел bir yiyecek sayılamaz. Yalnızca polen tüketimi faydalı olmaz. Mutlaka yiyeceklerle desteklenmelidir (5). Bell, Schimdt ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, farelere sadece polen diyeti uygulayarak hayvanları bir yıldan fazla yaşattıklarını rapor ettiler (4).

Tablo 2'de polenin 1000 kcal'lik enerji veren çeşitli miktardaki yiyeceklerle (domates, lahana, tavuk, fasülye, elma, ekmek, biftek) karşılaştırılması verilmiştir. Domates, kabak, elma taze ve çiğ, kızarmış tavuğun budu ve göğüs eti, pişmiş fasulye, tam buğday ekmeği, ızgara sığır eti olarak seçildi. Polen demir, tiamin, riboflavin, niasin bakımından sekiz besin arasında birinci, protein, potasyum, kalsiyum ve vitamin A içeriği yönünden ikinci, vitamin C ve yağ yönünden ise üçüncü ve sodyum içeriği yönünden beşinci sırada yer almıştır. Genel değerlendirmede ise polen en yüksek besin değerine sahip olmuştur (4).



şekil 1: Çalışmamızda kullandığımız polen pelletler

Tablo 1. Polen'in ortalama kimyasal bileşimi ve besinsel değeri^a (4)

Kimyasal	Bileşim	%RDA/EDI ^b
Enerji	2.46 kcal/g ^c	
Protein	% 23.7	420
Karbohidrat	% 27	83
Lipitler	% 4.8	59 ^d
Kolesterol	0	0 ^d
Fosfor	% 0.53	590
Potasyum	% 0.58	190
Kalsiyum	% 0.225	250
Mağnezyum	% 0.148	470
Sodyum	% 0.044	27 ^d
Demir	140 ppm	830
Mangan	100 ppm	2500
Çinko	78 ppm	580
Bakır	14 ppm	560
Nikel	4.5 ppm	e
Bor	Az	e
Krom	?	?
Molibden	?	?
İyot	?	?
Flor	?	?
Selenyum	?	?
Tiyamin	9.4 ppm	760
Niasin	157 ppm	940
Riboflavin	18.6 ppm	1300
Piridoksin	9 ppm	500
Pantotenat	28 ppm	450
Folik Asit	5.2 ppm	2600
Biotin	0.32 ppm	440
Vitamin B ₁₂	0	0
Vitamin C	350 ppm	520
Vitamin A	0	0 ^f
Karotenler	95 ppm	900 ^f
Vitamin D	0	0
Vitamin E	14 ppm	160
Vitamin K	0	0

a: Polen için veriler

b: 2200 kcal'lik diyet uygulanan Amerikalı kadınlarda RDA, tavsiye edilen günlük kullanım miktarını, EDI esansiyel günlük kullanım miktarını göstermektedir.

c: Protein ve karbohidratlar için 4 kcal/g ve yağlar için 9 kcal/g baz alınarak hesaplandı

d: Maksimum kullanım sınırı, bu sınırın üzeri zararlıdır

e: İnsanlar için besinsel gereksinim

f: Polen vit.A içermez ancak karotenler dönüştürülebilir. 6µg β-karoten=1 Vit.A ve polen karotenlerinin yansı β-karoten kabul edilebilir

Tablo 2. Polenin çeşitli yiyeceklerle besinsel yönden karşılaştırılması (4)

Yiyecekler	Protein (g)	Yağ (g)	Potasyum (g)	Kalsiyum (mg)	Sodyum (mg)	Demir (mg)	Vit.A (Int.U)	Tiamin (mg)	Riboflavin (mg)	Niasin (mg)	Vit.C (mg)	Ortalama Skor
Polen	96.3	19.5	2.4	915	179	57	14500	3.82	7.56	63.8	142	62
Domates	50.0	8.8	11.0	588	138	22	41000	2.75	1.88	31.2	1050	60
Lahana	54.1	8.3	2.4	2037	835	16	5410	2.11	2.75	12.8	1950	58
Tavuk	152.8	35.9	2.0	60	484	8.9	484	0.28	1.29	57.7	0	31
Fasulye	40.1	6.5	1.7	443	3800	15	1070	0.65	0.25	4.9	16	30
Elma	3.4	10.3	1.9	122	19	5.3	1560	0.53	0.34	1.9	68	27
Ekmek	43.2	12.3	1.1	407	2200	12	Az	1.06	0.49	11.5	Az	23
Biftek	59.4	82.7	0.7	26	145	7.5	143	0.17	0.46	12.2	0	17

Bir çorba kaşığı polenin (yaklaşık 15 g) insan vücudunun ihtiyaç duyduğu amino asit miktarını minimum seviyede karşıladığı bildirilmiştir. Polenin % 40'ını çeşitli şekerler oluşturur. Huidobro ve arkadaşları polenin % 61'ini sadece indirgen şekerler(fruktoz, glukoz), maltoz, sukroz ve polisakkaritler değil nişasta ve diğer sindirilemeyen selüloz, hemselüloz ve lignin gibi polisakkaritlerin oluşturduğunu rapor etti. Lipitlerin polenin % 5'ini ve mineraller ise % 3'ünü oluşturmaktadır. Yağ asitlerinin % 60'ı serbest şekilde bulunur. Serbest olmayan yağ asitlerinin % 70'ini α -linolenik asit ve daha düşük seviyede linoleik ve oleik asit oluşturur. En çok bulunan doymuş yağ asidi ise palmitik asittir. Polen içeriğinin bitki örtüsüne ve toplandığı mevsime göre oldukça değiştiği unutulmamalıdır (7).

Çin'de polenin anne ratların beslenmesi ve fetus gelişimi üzerine yapılan bir çalışmada, polen tüketen gebe ratların vücut ağırlığının daha çok arttığı, hemoglobin, total protein, serum demiri ve albumininin daha yüksek olduğu, fetus ağırlığının daha fazla arttığı ve ölüm oranının azaldığı saptanmıştır. Fetüslerdeki ağırlık artışı aşırı yüksek olmamakla birlikte viseral veya iskelet yapısında herhangi bir malformasyon gözlenmedi ve polenin anne beslenmesini geliştirirken, fetusün normal gelişimine bir etki yapmayacağı savunulmuştur (7).

2.1.3. Polenin Antibiyotik Aktivitesi

Çeşitli polen örneklerinden 148 tane küf izole edilmiştir. Mikroorganizmaların fermantasyondan ve polendeki çeşitli kimyasal değişikliklerden sorumlu olması durumunda bu mikroorganizmalar arasında küflerin de var olacağı ileri sürülmektedir. Mikroplar endüstride kullanılan antibiotikler, organik asitler ve enzimeler gibi ürünleri üretirler. Polen küfleri protein, lipit, ve karbohidrat metabolizmasında yer alan enzimi üretmek zorundadır. Örneğin kaprilat esteraz-lipaz, lösin, aminopeptidaz, asit fosfataz, fosfoamidaz, β -glukozidaz ve N-asetil- β -glukozamidaz ürettiği tespit edilmiştir. Polenin toplanması esnasında arının kattığı balda bulunan glukoz oksidaz enzimi güçlü antibakteriyel aktiviteye sahiptir (7).

Chauvin ve Lavie'nin yaptıkları çalışmada polenin *S.pullorum*, *S.gallinarum*, *S. Dublin*, *E. Coli*, *Proteus vulgaris*, *S.subtilis* Caron ve *B.pyocyaneus* bakterilerine karşı antibiyotik aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Chauvin ve Lavie farklı floralara sahip bölgelerden topladıkları polenleri bakterilere karşı farklı aktivitelerle cevap verdiklerini

rapor etmişlerdir. Antibiyotik aktiviteden sorumlu olabilecek olan bileşiklerin propoliste olduğu gibi flavonoidlerin olabileceği ve flavonoid içeriğininde floraya bağlı olarak değiştiği vurgulanmıştır (7).

2.1.4. Polenin Anti-Aterosklerotik Aktivitesi

Polen ekstraktlarının yağ seviyesini ve aterosklerotik plak yoğunluğunu azalttığı, trombosit agregasyonunu ise in vivo ve in vitro olarak inhibe ettiği rapor edilmiştir. Bu bulguların insanlar için de geçerli olduğu yapılan ayrı çalışmalarla da ortaya konmuştur. Kardiyovasküler hastalığa sahip insanlarda yapılan çalışmalarda diyetle alınan ve polenin yapısında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA), kan viskozitesini düşürdüğü, trigliserit ve kolesterol seviyelerini azalttığı tespit edilmiştir (7). Polenin sulu ve etanolik ekstraktlarının kullanıldığı başka bir çalışmada ise ekstraktların antioksidan aktiviteleri ile süperoksit radikal, hidroksil radikal vb. reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyerek, lipit peroksidasyonunu engellediği rapor edilmiştir (8). Ratlara bir ay boyunca polen diyetinin uygulandığı ayrı bir çalışmada ise ratların eritrosit redoks sistemleri incelenmiş ve kontrol grubuna göre polenle beslenen ratlarda glutatyon seviyesi (total SH grupları), glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz aktivitelerinin arttığı, eritrositlerde de malondialdehit ve dien konjugasyonunun da azaldığı tespit edilmiştir (7).

Platelet agregasyonunu azaltan Eikosanpentenoik asidin (20:5n-3, EPA) prekürsörü olan α -linolenik asit dolaylı olarak yararlı etkiler göstermektedir. EPA platelet fosfolipitlerine dahil olduğu için araşidonik asitle yer değiştirebilir ve lipooksijenaz ve siklooksijenaz için araşidonik asitle yarışarak veya daha az proagregatör Prostoglandin H_3 ve Tromboksan A_3 'e dönüşerek antitrombotik etki gösterebilir. Polen de α -linolenik asit yönünden zengin olduğu için bu etkilere dolaylı olarak katılabileceği düşünülmektedir (7). Tüm bu özellikleri ile polen kanser, kardiyovasküler ve diabet gibi çeşitli hastalıklardan korunmada yardımcı olabileceği savunulmaktadır (8).

2.1.5. Polenin Antineoplastik Aktivitesi

Polen ekstraktlarından izole edilen siklik hidroksamik asit (2,4-dihidroksi-sH-1,4-Benzoksazin-3(4H)-one) 'nın in vitro olarak kanser hücrelerini öldürdüğü rapor edilmiştir. Polenin aktif bileşeni olan hidroksamik asidin benign prostat hiperplazili hastalarda

semptomların giderilmesinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bu hastalığı taşıyan, 62-89 yaş arasında olan, seksen dokuz kişiye polen ekstraktları verilerek yapılan çalışmada prostat hacmi ile idrara çıkma kabiliyetlerinde orta düzeyde iyileşme görüldüğü rapor edildi. Eski uygarlıklarda da prostatit polen kullanılarak iyileştirilmekteydi (7).

2.1.6.Polenin Antioksidan Özellikleri

Polenin serbest radikal ve antioksidan aktiviteleri ile ilgili yapılan analizler sonucunda sadece fenolik bileşiklerin aktif olduğu ortaya konmuştur. Cinnamik asit türevlerinin en etkin fenoliklerden olduğu ve eksikliklerinde antioksidan aktivitenin çarpıcı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir. Cinnamik asidin bu antioksidan aktivitesi ile polen tüketen kişilerin vücutlarını yenilediği ve ömür uzattığı iddia edilmektedir. Campos ve arkadaşları farklı floralardan toplanan polenlerin serbest radikal temizleme aktivitesini inceleyerek fenolik asit türevlerinden zengin olan polen türlerinin sadece flavonoid içeren türlere göre çok daha etkin radikal temizleyici aktivite gösterdiğini rapor etti (7). Üç yıl bekletilmiş ve taze polenlerle yapılmış bir çalışmada ise yüksek flavonoid ve fenolik asit içermesine rağmen serbest radikal yok etme özelliğinin %50 oranına kadar azaldığı tespit edilmiştir (21).

Flavonoid ve fenolik bileşiklerin insan vücudunda antioksidan/radikal temizleyici aktivitelere sahip olduğu ve bazı hastalıkları engelleyebilmek veya tedavi edebilmek için kullanılabilecekleri ile ilgili pek çok çalışma literatürde yer almıştır. Aktif serbest radikallerin diğer faktörler eşliğinde hücre yaşlanmasına ve biyolojik dengesizliğe sebep olduğu hatta prematüre doğumlardan sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (7). Ayvaz ve Değer polen ve propolis ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri ile eritrositlerde lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini rapor ettiler (22). Olimpik atletler ek besin olarak polen tükettikleri zaman performanslarının daha çok geliştiği ve verimliliklerinin arttığı ve atletlerin bunu polenin antioksidan özelliklerine borçlu olduğu savunulmaktadır (7).

Dudov ve arkadaşları ratlara arı poleni enjeksiyonu uygulayarak rat eritrositlerinde lipid oksidasyon ürünlerinin(malondialdehit ve konjuge dienler) seviyesini azalttığı bunu da polenin antioksidan özelliğine borçlu olduğu savunulmuştur(23). Dudov ve arkadaşları yaptıkları başka bir çalışmada tavşanları 1 ay boyunca polen içeren diyet uygulayarak İmmün Globulin M ve İmmün Globulin E'nin primer ve sekonder seviyeleri üzerine immunostimülatör aktivitenin var olduğunu tespit ettiler (24).

Brassica campestris L.türündeki polen Çin'de kanser gibi hastalıklara karşı vücut direncini artırmak için tüketilir. Wu ve arkadaşları bu türdeki polenin kloroform ekstraktlarının steroid fraksiyonu ile farklı orjinli çeşitli (PC-3, LNCaP, MCF-7, Hela, BEL-7402, BCG-823, KB, A549, HO8910) kanser hücrelerinde sitotoksik aktivitelerini inceledi. Polenin en güçlü sitotoksik aktivitesi PC-3 prostat kanser hücre serilerinde gözlemlendiği ve kaspaz-3 aktivitesini artırması yanı sıra anti-apoptotik Bcl-2 protein ekspresyonunu doza bağlı olarak azaltarak PC-3 hücrelerini apoptoza sürüklediği bildirilmiş ve prostat kanserinin tedavisinde *Brassica campestris* L. polenin kloroform ekstraktının steroid fraksiyonunun kullanılabilirliğini savundu (25).

Hepatik, anemik ve dislipidemik problemleri olan kişilere 6 aylık ve 1 yıllık uyguladığı polen diyeti sonucu hastaların hematolojik test sonuçlarının tamamen normal değerlere ulaştığını bildirmiştir (19).

Polen ve polen ürünlerinin benign prostatitli hastalarda ve polen alerjisi olan çocuklarda oral olarak kullanılarak tedavide başarılı olunabileceği Schmidt tarafından savunulmaktadır (4). Shoskes ve arkadaşları ise akut prostatitli hastalara polen tüketmeleri önerilmezken, kronik pelvik ağrı sendromuna (prostatit 3. kategori)sahip hastalarda anti inflamasyon ve anti androjenik etkisinden dolayı polen tüketiminin semptomları azalttığını için önerilmektedir (26).

Ratların polenin etanolik ve sulu ekstraktlarının oral verilmesiyle femoral-diaphyseal ve metaphyseal dokulardaki kalsiyum miktarının arttığı dolayısıyla kemik kalsifikasyonunda anabolik bir etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur. Benzer sonuçlar propolis ve arı sütü ile de elde edilmiştir. Yine başka bir çalışmada ratlarda oral olarak ve rat kemik doku kültüründe polenin sulu ekstraktlarının kullanımının alkalen fosfataz aktivitesini ve hücrelerin DNA içeriğini artırdığı tespit edilmiştir(27).

Çinlilerin kullandığı içinde polen ve çeşitli bitkilerin bulunduğu NaO Li Su Kürü ile yaşlı insanlarda yapılan bir çalışmada üç aylık uygulama sonucunda eritrosit ve serum kreatinin miktarının arttığı ancak hafıza gelişiminde beklenen sonucun elde edilemediği bildirildi (28).

1991'de Dr. Mavrice M. Tinterow'un Kansas'daki Wichita Biyo-İletişimler Araştırma Enstitüsünde Bee All Free polen tabletleri kullanılarak, alerjileri, astımı, saman nezlesi, kronik sinüsü ve kronik engelleyici akciğer hastalığı olan 195 kişi üzerinde yapılan çalışmalarda dört hasta dışında tümünde tatmin edici sonuçlar alınmıştır. Arı polenini kullanmadan önce herhangi bir alerjinin olup olmadığını test etmek için düşük dozlarda

polen alınmalıdır. Eğer alerjik reaksiyonlar (örneğin ciltte kızarma, baş ağrısı ya da hırıltılı nefes alma) gözlenmezse bu doz yavaş yavaş artırılmalıdır (29).

2.2. Propolis

Propolis bal arıları tarafından çeşitli bitkilerden, ağaç reçinelerinden toplanan yapışkanımı, koyu renkli, kompleks kimyasal kompozisyona sahip bir materyaldir (2) Diğer adı bee glue olan propolis pro- ve -polis köklerinden oluşarak kovanın (şehrin) savunması anlamını taşır (30). Bal arıları reçineyi toplarken çiğneyip tükürük enzimleri ile karıştırarak kısmen sindirirler. Toplama esnasında polenle karışan reçine daha sonra arı mumu ile karıştırılarak kullanılır (2, 31). Tükürük enzimleriyle karışan propolisin kimyasal yapısında meydana gelen değişikliklerle propolisin standardize edilmesinde güçlükler oluşur (2). Propolisin toplandığı coğrafik bölge ve iklime bağlı olarak da içeriği değiştii için standardize edilmesi pek mümkün değildir (3). İşçi arılar propolisi kovani tamir etmek ve istilacılardan korumak için antiseptik olarak kullanırlar. Tüm kovan arılar tarafından propolis-mum karışımı ile sıvanır (6). Şekil 2'de çalışmamızda kullandığımız propolis örnekleri gösterilmiştir.

Propolis antik çağdan beri halk hekimleri tarafından anti-inflamatuar özelliğinden dolayı (32), göz, boğaz, üriner enfeksiyonlardan korunmak için, (30,33) ve ekzama, ülser, kötü nefes gibi rahatsızlıkları giderebilmek için kullanılmıştır. Bu tip rahatsızlığı olan insanlara bala %10 oranında propolis katılarak hazırlanan karışım ilaç olarak veriliyordu (30).

Propolis antiseptik, antimikotik, bakteriyostatik, astirgent, antiviral, spazmolitik, antiinflamatuar, anestezik, antioksidan gibi özelliklere sahip olduğu için son yıllarda ilaç ve kozmetik endüstrisinde ve yiyecek teknolojisinde oldukça ilgi görmektedir (2). Cildi nemlendirme, yenileme, kırışıklıkları giderme ve antibakteriyel özelliklerinden dolayı güzellik kremlerinde, çeşitli losyonlarda kullanılarak kozmetik endüstrisinde yer alır (34). Ayrıca propolis dişeti, dudak ve ağız iltihaplarını iyileştirebilmek için diş macunları ile ağız yıkama solüsyonlarında da kullanılmaktadır (2). Yiyecek teknolojisinde de önemli bir yere sahip olan propolis, kimyasal koruyucu olarak konservecilikte (2) ve insan vücuduna yararlı bileşenler içermesi nedeniyle de mineral destekli diyetetik ürünlerde yer almaktadır (35). Propolis içeren meşrubat ve yiyecekler kanserden, diyabetten, enflamasyondan ve çeşitli kalp hastalıklarından korunmak isteyen tüketiciler tarafından kullanılmaktadır

(3,31). Propolisin tablet, toz ve sakız ürünleri marketlerde tüketici hizmetine sunulmuştur (2).



Şekil 2. Çalışmamızda kullandığımız propolis örnekleri

2.2.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis yaşına ve toplandığı alanın coğrafik yapısına, iklimine bağlı olarak koyu sarı, yeşil ve koyu kahverengi gibi değişik renklerde olabilir (3,31). Genel olarak 60-69 C⁰ arasında erime noktasına sahiptir (36). Düşük sıcaklıklarda sert, donmuş halde bulunabilir ve 0 C⁰'de kırılgan özelliğe sahiptir. Propolis yaşlandıkça rengi koyulaşabilir ve kırılganlaşabilir (2).

Propolis su ve hidrokarbon çözücülerde düşük, alkollerde ise yüksek oranda çözünürlük gösterir (7).

2.2.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika, Asya ve Afrika'dan toplanan propolisler kimyasal içerikleri bakımından incelendiği zaman farklılıkların olduğu rapor edilmiştir (3, 7). Propolislerin farklı bölgelerden toplanmasına ve farklı kimyasal içeriklere sahip olmasına rağmen, genelde aktif oldukları ve benzer biyolojik özellikler gösterdikleri savunulmuştur (31).

Propolis genel olarak % 50 reçine ve bitki balsamı, %30 arı mumu, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen, % 5 çeşitli organik kalıntılardan oluşur (2). Propolisdeki

temel kimyasal sınıflar; flavonoidler, fenolik ve çeşitli aromatik bileşiklerdir. Bu sınıflar dışında birçok B-kompleks vitamini, önemli mineralleri ve eser elementleri de içerir (6). Tablo 3’de propolis bileşenlerinin sınıfları ve grupları oranları ile birlikte verilmiştir (10).

Tablo 3. Propolis bileşenlerinin sınıfları ve grupları (10).

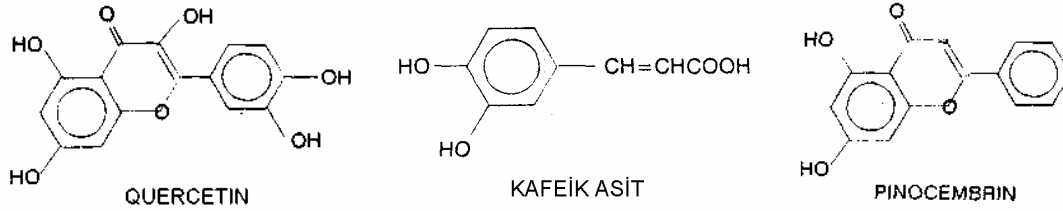
Propolis Bileşenlerinin Sınıfları	Propolis Bileşenlerinin Grupları
Reçine	%45-55 Flavonoidler, Fenolik asitler ve esterleri
Mum ve Yağ Asitleri	%25-35 arı mumu, bitki kaynaklı mum, bitki kaynaklı yağ asitler
Esansiyel Yağlar	%10 Uçucu bileşenler
Polen	%5 Polen kaynaklı proteinler, serbest aminoasitler (Yaygın olarak Prolin ve Arginin)
Organik asitler ve mineraller	%5 14 eser mineraller (Yaygın olarak Fe, Zn ayrıca Au, Ag, Cs, Hg, Ca, Sb ve diğerleri), Ketonlar, laktonlar, kinonlar, steroidler, benzoikasit ve esterleri, vitaminler, şekerler

Farklı propolis örneklerinden bugüne kadar 200’den fazla bileşik izole edildi. Genel olarak birçok örnekte yağ, fenolik asitler ve esterleri, fenolik esterler, flavonoidler (flavonlar, flavanonlar, flavonoller, dihidroflavonoller, chalconler), terpenler, β -steroidler, aromatik aldehytler ve alkoller, sesquiterpenler, naftalin ve stilbene türevleri ortak olarak bulunmuştur (2,37).

2.2.2.1. Flavonoidler

Bugüne kadar propolisten 38’den fazla flavonoid izole edilmiştir. Bunlar arasında başlıca galangin, kaempferol, quercetin, pinocembrin, pinostobin ve pinobanksin örnek verilebilir. Propolisin fenolik bileşikler arasında başlıca sinnamil alkol, sinnamik asit, vanillin, benzil alkol, benzoik asit, kafeik asit ve esterleri, ferulik asit yer almaktadır (6). Şekil 3’de propolisteki tipik flavonoidlerin ve fenolik bileşiklerin kimyasal yapısı

gösterilmiştir (7) Tablo 4’de ise propoliste bulunan bazı flavonoidler ve fenolik bileşikler verilmiştir (38).



Şekil 3. Propolis’te bulunan tipik flavonoidlerin ve fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları (7).

Tablo 4. Propoliste bulunan bazı flavonoidler ve fenolik bileşikler (38).

Flavonlar	Flavonoller	Flavononlar	Dihidro Flavoneller	Sinnamik asit türevleri	Diğerleri
Apigenin	Kaempferol	Pinocembrin	Pinobanksin	Ferulik asit	11-Farnesol (sesquiterpene)
Asasetin	Kaempferid	Sakuranetin	Pinobanksin-3-asetate	Kafeik asit	β -Caryophyllene (terpenoid)
Baisetin	Galangin	İsosakuranetin	Pinobanksin-7-metil ether	p-Kumarik asit	Terpincol (terpenoid)
Krisin	İsohamnetin				Benzoik asit
Luteolin	Rhamnetin				Syngaldehyt (diterpenikasit)
Tektokrisin	Myrisetin				Protocate huikasit (benzoik asit türevi)
	Fisetin				Vanillin (benzaldehyt türevi)
	Rutin				

Flavonoidler meyvelerde, sebzelerde, çay, şarap, meyve suyu gibi içeceklerde doğal olarak bulunan polifenolik bileşiklerdir (39). Flavan, flavonol, flavon, flavonon ve flavanol gibi pek çok flavonoid sınıfı var olup bugüne kadar 4000’den fazla flavonoid tanımlanmıştır (40). Farklı kimyasal yapıya sahip olan flavonoidler farklı biyolojik özellikler gösterirler. Genel olarak toksik olmayan flavonoidler antiallerjik, antiinflamatuvar, antioksidan, antimutagenik ve çeşitli enzim aktivitelerini düzenleme

özelliğine sahiptirler. Sağlık üzerine yararlı etkilere sahip olduğundan dolayı flavonoidler kalp hastalıklarına ve kansere karşı kimyasal koruyucu olarak kullanılabilirler (2, 40).

Flavonoidler biyolojik aktivitesini ağır metal iyonlarını, biyolojik polimerleri bağlayarak, elektron transportunu katalizleyerek ve serbest radikalleri yok ederek dört farklı şekilde gösterir (2). Flavonoidler alkilleyici ajanlara, polisiklik aromatik hidrokarbonlara radyoaktif kimyasallara ve diğer mutajenlere/karsinojenlere karşı antigenotoksik aktiviteye sahiptir (40).

Diyetle alınan flavonoidlerin kanser hücrelerinin apoptozisinde, farklılaşmasında ve çoğalmasında kanser önleyici ajan olarak önemli etkileri vardır. Günümüzde flavonoidlerin kanser önleme mekanizması tam açıklanamamakla birlikte, bazı flavonoidlerin tirozine spesifik protein kinazları inhibe ettiği bilinmektedir. Örneğin quercetin'in protein kinaz C'yi inhibe ettiği rapor edilmiştir. Yine bir flavone olan 2-fenil-4H-1-benzopyran-4-one'nin insan kolon karsinoma hücrelerinde apoptozisi ve farklılanmayı indükleyerek hücre çoğalmasını engellediği bildirilmiştir (40).

Flavonoidler antioksidan özelliğini yapılarındaki karbonil ve hidroksil gruplar, çift bağlar ve 3'-4'-dihidroksi katekol konfigürasyonları ile kazanır (40,41).

2.2.2.2. Arı Mumu ve Yağ Asitleri

Propoliste bulunan arı mumu ve yağ asitleri propolisin yaklaşık %30'unu oluşturur (10). Arı mumu başlıca mono esterler, diesterler, uzun zincirli hidrokarbonlar, hidroksiesterler, poliesterler, uzun zincirli yağ asitleri, triesterler ve asit esterlerinden oluşur (7).

2.2.2.3. Esansiyel Yağlar

Propolisteki uçucu bileşenler propolisin yaklaşık % 10'unu oluşturur (10). Uçucu bileşenlerden asit ve ester başlığı altında miristik asit, sinnamik asit, palmitik asit, dihidrosinamik asit, izovalerianik asit örnek verilebilir. Alkol, fenol ve aldehit başlığı altında 2-feniletanol, benzil alkol, etilfenol, benzaldehit sayılabilir. Monoterpen başlığı altında α -pinene, terpinen-4-ol ve p-Cimene, sesquiterpen başlığı altında is spatulenol ve nerolidol örnek verilebilir. C₈-C₂₅ arasındaki hidrokarbonlar ve aromatik hidrokarbonlarda uçucu bileşenler arasında yer alır (42,43). Ancak Schmidt ve arkadaşlarına göre propoliste

bulunan uçucu yağlar, terpenler ve arı mumu propolisin etkisini ve kimyasal özelliklerini anlamlı bir şekilde etkilememektedir (7).

2.2.3. Propolisin Biyolojik Aktiviteleri

Propolis antibakteriyel, antiviral, antifungal, antiinflamatuvar, antihistamin, antioksidan, lokal anestezik, kapiller güçlendirici, ülser iyileştirici, tümör sitotoksik gibi çeşitli aktivitelere sahiptir. Tablo 5’de biyolojik aktiviteleri bilinen propolis bileşenleri verilmiştir (7).

Çeşitli mevsimlerde toplanan propolislerin antibakteriyel aktivitesi incelendiğinde anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (44). Gram pozitif ve gram-negatif bakterilerle yapılan bir çalışmada ise propolisin gram-pozitiflere karşı daha güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (45). Ağız bakterilerine karşı da oldukça etkili olan propolisin plak oluşumunu ve oral patojenlerin hücrelere yapışmasını engellediği ayrıca klinikte kullanılan antibiyotiklerle kıyaslandığı zaman propolisin daha etkin olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (33,46). Ülser iyileştirici özelliğe de sahip olan propolis bileşeni pinocembrinin bu etkisini *Helicobacter pylori*’ye karşı antibakteriyel aktivite göstermesi ile gerçekleştirdiği belirtilmiştir (47).

Tablo 5: Biyolojik aktivitesi bilinen bazı propolis bileşenleri (7).

Propolis bileşeni	Farmakolojik Aktivite
Quercetin	Antiviral Antihistaminik Ülser iyileştirici Kapiller güçlendirici
Pinocembrin	Antibakteriyel Antifungal Antiküf Lokal anestezik
Kafeik Asit	Antibakteriyel Antifungal Antiviral Antiinflamatuvar
Kafeik asit fenil ester(CAPE)	Tümör sitotoksitesi
Asasetin	Antiinflamatuvar
Pinostrobin	Lokal anestezik

Propolisin in vitro olarak herpes simplex tip1, herpes simplex tip 2, adenovirüs tip 2, vezüküler stomatitis virüs, poliovirüs tip 2 gibi birçok DNA ve RNA virüslerine karşı antiviral özelliğe sahiptir (2). Propolisde bulunan flavonların HIV-I proteaz inhibitörü olduğu ve licorice fenolik türevlerinin anti-HIV-I aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir (48).

Propolis sulu ekstraktlarının makrofajları aktifleştirdiği, IL-1 (interlökin-1) ve TNF (tümör nekrozis faktör) gibi pek çok aracının ve fungus öldürücü oksijen ve nitrojen metabolitlerinin salınmasını artırarak anti-fungal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (49).

Propolisin antioksidan olması ve lipooksijenazların inhibitörü olması nedeniyle antiinflamatuvar aktiviteyi kontrol ettiği savunulmaktadır (9). Propolisden izole edilen Artepillin C'nin (3,5-diprenil-4-hidroksi sinamik asit) güçlü antimikrobiyal aktivitesi dışında sitotoksik etkisinin de var olduğu tespit edilmiştir. İnsan gastrik karsinoma hücrelerine (HEC), insan akciğer kanser hücrelerine (BLC) ve fare kolon karsinoma hücrelerine (Colon 26) Artepillin C eklenince bu hücrelerin büyümesinin inhibe edildiği açıkça görülmüştür. Artepillin C pek çok karsinoma hücresinde gen sentezini S-fazında durdurarak, hücre membranlarının özelliklerini değiştirerek ve hücrenin iyonik geçirgenliğini bozarak ölüme sebep olmuştur (47). Propolis bileşenlerinden feniletıl-3-metil kafeik asidin ve bazı kafeik asit esterlerinde azoksimetanın sebep olduğu rat kolon kanserlerini inhibe ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca Quercetin'in 7,12-dimetil benzaanthracen'in sebep olduğu meme bezi tümörlerini ve azoksi metanın sebep olduğu kolon kanserlerini inhibe ettiği tespit edilmiştir (32).

2.3. Prostat Kanseri

Prostat kanseri Kuzey Amerika'da erkeklerde en çok malignansi gösteren, her yıl yaklaşık 200.000 kişide teşhis edilen ve 45.000 erkeğin ölümüne sebep olan kanser türüdür (50). Elli yaş üstü tüm erkeklerin % 20'sinde mikroskobik seviyelerde prostat kanseri görüldüğü ancak sadece % 5'inde bunun bir anlam taşıdığı ve ortalama altmış beş yaşlarında 1 cc'den büyük kansere sahip olunabileceği ileri sürülmektedir (51). Prostat kanserinin patogenezi hala tam olarak anlaşılamamıştır. Ana risk faktörleri arasında yaş, etnik köken, ailesel hikâye ve steroid hormonlar yer almaktadır. Prostat kanseri pek çok ülkede paralel insidans oranı gösterdiği ve benzer diyet faktörlerinden (ör: yağ tüketimi) etkilendiği öne sürülmektedir (50). Siyah ırkta daha sık görülen prostat kanserinden

fruktozdan zengin, kalsiyumdan fakir diyet uygulanmasıyla D vitamini hidroksilasyonunun uyarılması sonucu korunmanın mümkün olacağı ileri sürülmektedir (52). Tedavi olarak cerrahi müdahaleler, erkeklerde androjen baskılayıcı ilaç tedavileri, kemoterapiler ve radyoterapiler kullanılmaktadır (50).

Prostat kanseri tedavisi için gerekenler yapılsa bile tekrarlayabilme ve metastaz yapabilme ihtimali terapide en büyük problemlerdendir (53). Prostat kanseri nedeni ile oluşan kemik metastazları sıklıkla artmış kemik formasyonları(Osteoblastik lezyonlar) şeklinde görülse de bu metastazlarda aynı zamanda önemli bir oranda artmış osteoklastik aktivite ile giden osteolizis olduğu bildirilmektedir (54). Primer tümörün alınmasına rağmen yıllar sonra bu hastalarda metastaz gelişebilir. Metastazın hangi mekanizma ile geliştiğine dair kesin bir bilgi bulunmasada hastanın immünitesi veya maruz kaldığı bir travma ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir (51). Günümüzde uygulanan tedavilerin idrarı tutamama, osteoporoz, anemi, sıcak basmaları ve ereksiyon bozuklukları gibi yan etkileri vardır (53, 54). Kanserli yenebilen etkin bir tedavi olmamakla birlikte zamanla hormon tedavisine verilen cevap zayıflamaktadır. Son yıllarda korunma stratejileri önem kazanmıştır. Soya fasulyesi, sarımsak, yeşil çay ve Vitamin D3 gibi ek besinlerin kullanımındaki artış antikanser terapilere destek arz etmektedir (53).

Plazma membranı iyon kanalları farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz gibi doku homeostazının devamlılığı için elzem olan pek çok hücresel prosesinde rol almaktadır. Artmış proliferasyon, anormal farklılaşma ve programlanmış ölüme gitmeme anormal doku büyümesinin ana sebepleridir ki bu daha sonra kanser karakteristiği olan kontrolsüz büyüme ve invazyona dönüşebilir. Prostat kanser hücreleri çeşitli plazma membranı iyon kanallarını eksprese etmektedir. Esansiyel sinyal iyonlarının akımı, intraselüler iyon konsantrasyonunun bozulması, hücre hacminin regüle edilmesi ve membran potansiyelinin sürdürülmesi ile prostat kanser hücreleri proliferasyona, farklılaşmaya ve apoptoza uğrarken metastatik kabiliyetleri iyon kanalı karakteristiğine göre değişebilmektedir. Androjenden bağımsız prostat kanser hücrelerinin artmış malignansi ve invazyon kabiliyeti genellikle daha uyarılabilen fenotipli plazma membranı ile ilişkilidir. Bu ilişki Ca^{+2} akışını düzenleyen depoların downregülasyonu ile apoptoza karşı yüksek direnç gösterme, farklı K^+ kanalları ve Transient Resöptör Potansiyel kanal ailesinin ekspresyonundaki değişiklikler ve sabit hücre hacminin sürdürülebilmesini sağlama gibi çeşitli olaylara sebep olan voltaj kapılı Na^+ ve Ca^{+2} kanallarının varlığı ile ortaya konmuştur (55).

Yüksek malignansiye sahip prostat kanseri hücrelerinde K^+ geçirgenliği azalırken, Na^+ ve Ca^{+2} iyonları akışı da artmaktadır (55, 56). Bazı prostat kanseri epitel hücrelerinde Voltaj kapılı sodyum kanal proteini (VGSC) ekspresyonunun, fonksiyonel protein varlığının ve mRNA seviyelerinin arttığı ortaya konmuştur. Yapılan araştırmalarda VGSC aktivitesinin hücrenin metastatik kabiliyetini ve proliferasyonunu artırdığı tespit edilmiştir (12, 55, 56).

Çeşitli prostat kanseri hücre serileriyle yapılan çalışmalara göre metastatik hızı yüksek olanlarda VGSC aktivitesi yüksek, metastaz hızı düşük olanlarda ise aktivite düşük tespit edildi (57, 58).

2.4. Voltaj-kapılı Sodyum Kanal Proteini

VGSC glikozillenmiş membran proteini olup, membran depolarizasyonuna cevap olarak hızlıca Na geçişine izin verir (14). Voltaj-kapılı sodyum kanalları nöronlarda aksiyon potansiyelinin başlaması ve ilerlemesinde ayrıca diğer elektriksel olarak uyarılabilen miyosit ve endokrin hücreleri gibi hücrelerde oldukça önemli role sahiptir. Hücre membranı küçük milivoltlarla depolarize olduğu zaman, sodyum kanalları milisaniyeler içinde aktive ve inaktive olur. Sodyum iyonunun integral membran proteinlerine akışı ile membran ileri derecede depolarize olur ve aksiyon potansiyelinin (rising) yükselme fazını başlatır (59). Merkezi sinir sistemi, periferik sinir sistemi ve kas hücrelerinden gelişime bağlı olarak farklı seviyelerde eksprese edilir ve aksiyon potansiyelinin üretilmesi ve iletilmesi gibi önemli pek çok fonksiyonu düzenler. Uyarılabilen dokular yanı sıra uyarılmayan hücrelerden de (lenfositler, fibroblastlar, osteoblastlar, endotelial hücreler ve epitelyum orjinli metastatik kanser hücreleri) eksprese edilmesi VGSC'lerinin sanıldığından daha büyük öneme sahip olduğunu ve henüz tespit edilmemiş hücre rollere sahip olabileceğine işaret etmektedir (14, 60).

2.4.1. VGSC'lerinin Yapısı ve VGSC Hastalıkları

VGSC kanal merkezi olarak nitelendirilen alfa ünitesinden (260 kDa) ve kanal fonksiyonunu modifiye eden aksesuar beta 1-4 (33-38 kDa) alt ünitesinden oluşur. Beta alt üniteleri hücre iskeleti ve ekstraselüler matriks proteinleri ile etkileşerek fonksiyonel aktiviteleri modüle eder. α altbirimi birbirine benzeyen ve her biri altı α -heliks

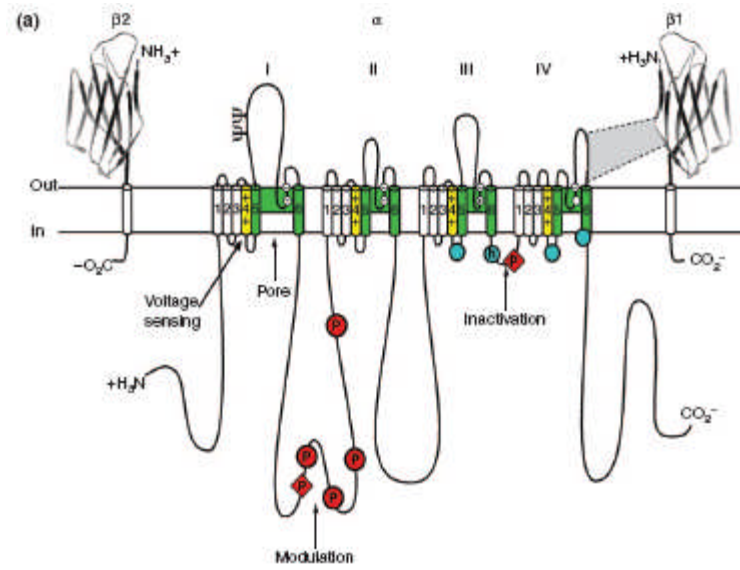
transmembran parçası (S1-S6) içeren dört domainden (I-IV) oluşur. VGSC alfa altbirimi bir veya birkaç aksesuar beta altbirimi ile birleşerek heterodimer oluşturur (14). İnsan ve farelerde VGSC'nin alfa altbirimini kodlayan farklı kromozomal lokasyona sahip, on gen mevcuttur. Alfa altbiriminin dokuz izoformu (Na_v 1.1-1.9) fonksiyonel olarak karakterize edildi, onuncusu ise ilişkili izoformun (Na_x) Na kanalı olarak fonksiyon gösterebileceği öne sürüldü (61). Na_v 1.1, Na_v 1.2, Na_v 1.3 ve Na_v 1.7 kromozom 2 üzerinde, Na_v 1.4 kromozom 17, Na_v 1.6 kromozom 12, Na_x kromozom 2, Na_v 1.5, Na_v 1.8 ve Na_v 1.9 kromozom 3, β 1 alt birimi kromozom 19, β 2, β 3 ve β 4 alt birimi kromozom 11 üzerinde lokalize olmuştur. β alt birimleri hücrel lokalizasyona, fonksiyonel ekspresyona, kinetiğe ve voltaj bağımlı kanalın açılmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir (62).

Şekil 4'de insan VGSC'lerinin yapısı ve Şekil 5'de VGSC'lerinin üç boyutlu yapısı gösterilmiştir (59, 63). VGSC membranın dışarı bakan yüzeyinde kanalın merkezine açılan Na^+ nun giriş yaptığı 4 küçük giriş kapısını ve kanal merkezinden sitoplazmaya açılan 4 geniş çıkış kapısını yapısında barındırır. Şekil 5'de de görüldüğü gibi 4 dar porun yanı sıra iki de periferel por (b) vardır. Periferel porların voltaj duyarlılığında voltaj ayırımında rol alabileceği öne sürülmektedir. Sato ve arkadaşlarına göre periferel porlar hidrofilik bir çevre oluşturarak S4 voltaj sensörünün dışa taşınmasına yardımcı olmaktadır (63). Şekil 4'de görüldüğü gibi her domain S4 segmentinde lokalize olan, primer amino asit dizisinin her üçüncü pozisyonda pozitif yüklü amino asit tekrarları içeren voltaj sensörüne sahiptir. S5 ve S6 heliksleri arasındaki girintili loop transmembran bölgesine gömülüp porun ekstraselüler ucunda iyon seçici filtre olarak dar bir yapı oluşturur. Geniş intraselüler por ucu ise dört tane S6 parçası tarafından oluşturulur. Küçük ekstraselüler looplar transmembran parçaları ile bağlantılı olup en genişleri S5-S6 parçasının membran girintili lopuna bağlanmasını sağlar. Daha geniş intraselüler looplar dört homolog domaini birbirine bağlar. Geniş amino-terminal ve karboksi terminal kuyruk domainleri sodyum kanalının iç yüzünün oluşumuna katkıda bulunur. Bu yapı biyokimyasal, elektrofizyolojik ve yapısal deneyler sonucu ortaya konmuştur. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) çalışmaları sonucu İzolösin-Fenilalanin-Metiyonin (IFM) motifinin hidrofobik karakteri ile porun ağzını açıp kapayarak anahtar rolü üstlendiğini ortaya konmuştur (59).

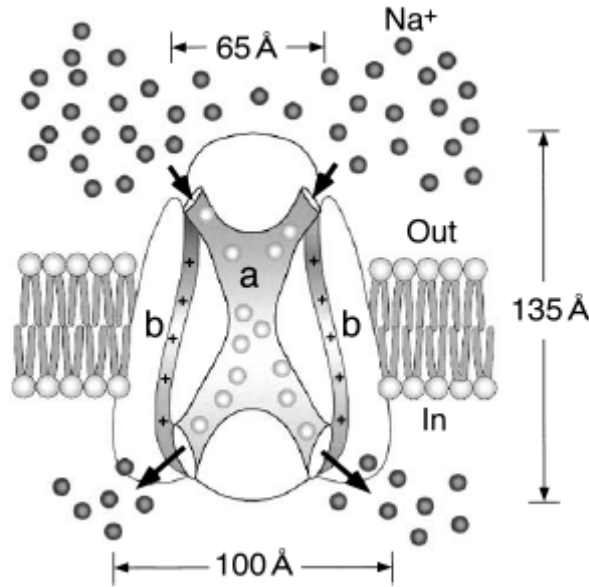
VGSC'lerinin transmembran ve ekstraselüler domainlerdeki amino asit dizileri en az % 50 homoloji göstermektedir. Dokuz sodyum kanalı α alt biriminin her biri en az 20 ekzon kodlamaktadır. Buldukları kromozoma göre grublandırılan Na_v izoformları arasında birinci grub olarak kabul edilen Na_v 1.1, Na_v 1.2, Na_v 1.3 ve Na_v 1.7'nin, dizilimleri,

biyofiziksel özellikleri, bir nörotoksin olan tetrodotoksince (TTX) nonomolar konsantrasyonlarda bloke olabilme yetenekleri benzerlik göstermektedir. İkinci grubun olan $Na_v1.5$, $Na_v1.8$ ve $Na_v1.9$ 'un amino asit dizileri %75 homoloji göstermesine rağmen amino asit değişikliklerine ve farklı TTX rezistansına sahiptirler. $Na_v1.5$ en önemli kardiyak izoform olup por bölgesindeki domain I'deki amino asit dizisindeki tek değişiklik (fenilalanin→sistein) TTX sensitivitesinde 200 katlık azalışa sebep olmaktadır. Pozisyona bağlı olarak $Na_v1.8$ ve $Na_v1.9$ daki serin rezidüsündeki değişiklik TTX'e karşı rezistansda artışa sebep olmaktadır. $Na_v1.8$ ve $Na_v1.9$ periferik sensory nöronlarda ekspresyon edilmektedir. $Na_v1.4$ iskelet kasında bulunurken $Na_v1.6$ merkezi sinir sisteminde bolca bulunmaktadır. $Na_v1.4$ ve $Na_v1.6$ 2. kromozom üzerinde ekspresyon edilen diğer alt birimlerle kıyaslandığı zaman % 85'den fazla homolojiye sahip oldukları, benzer fonksiyonel özellikler gösterdikleri ve benzer nanomolar konsantrasyonlarda TTX'e karşı hassas oldukları tespit edilmiştir. Onuncu sodyum kanalı Na_x 'in amino asit dizilimi farklıdır. Fonksiyonel olarak önemli olan voltaj sensörü ve inaktivasyon kapısındaki farklılıklara ve farklı hücrelerdeki ekspresyonun eksikliğine bakıldığı zaman bazı bilim adamları tarafından Na_x 'in voltaja bağlı sodyum kanalı olarak fonksiyon göstermeyeceği öne sürülmüştür. Ancak Na_x geni çıkarılmış farelerin hipotalamusu ile yapılan deneylerde ekstraselüler tuz seviyelerine karşı verilen cevapta eksiklik olduğu tespit edilmiştir. Buna dayanarak araştırmacılar Na_x 'in voltaj- kanalından ziyade tuz-sensörü olarak rol aldığını savunmuşlardır (59).

Candenas ve arkadaşları 20 farklı dokuda VGSC izoformlarının ekspresyon seviyesini incelemiştir. Bu çalışmada alfa altbirimin $Na_v1.5$ izoformunun pek çok dokudan ekspresyon edildiği ancak en güçlü ekspresyonu kalpte daha sonra sırasıyla yetişkin ve fetal beyin, testis, prostat, tükrük, adrenal ve tiroid bezleri, iskelet kası, akciğer, trachea, placenta, uterusda gözlemlendiği rapor edildi. İlginç olarak fetal karaciğerinde anlamlı ekspresyon gözlenirken, yetişkin karaciğerinde ekspresyon gözlenmediği belirtildi. Ayrıca cerebellum da $Na_v1.5$ izoform ekspresyonunun gözlenmemesi dikkat çekici bulundu. $Na_v1.7$ izoform ekspresyonu ise yine pek çok dokuda gözlemlendi ancak en fazla testis, yetişkin ve fetal whole beyin ve plasentada tespit edildi. Cerebellumda $Na_v1.7$ izoform ekspresyonunun tespit edilememesi yine ilginç olarak yorumlandı (62).

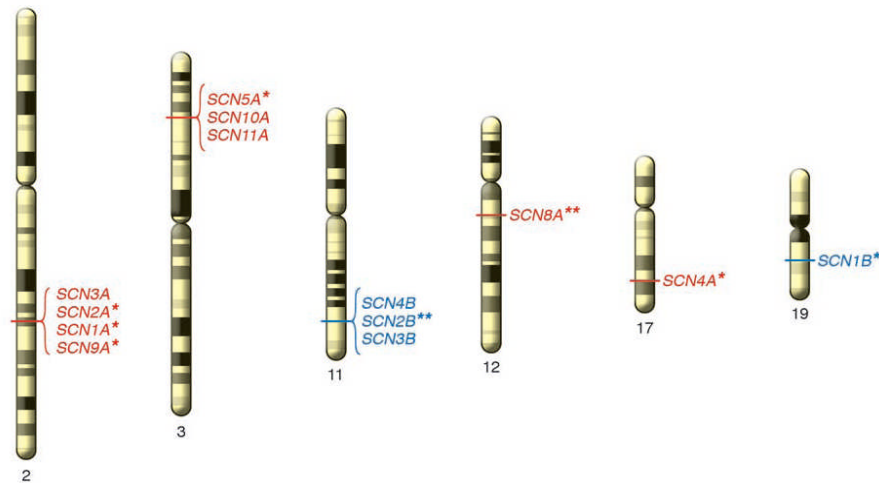


Şekil 4. VGSC alt birimlerinin şematik gösterimi. Na_v 1.2 kanalının α altbiriminin immunoglobulin benzeri katlanmalar gösteren $\beta 1$ ve $\beta 2$ altbirimleri ile birlikte kolokalizasyonu ve etkileşimi. Roman rakamları α alt biriminin domainlerini gösterir. yeşil renkteki segment 5 ve 6 por oluşumuna katılırken sarı renkteki S4 heliksi ise voltaj sensör özelliğini taşır. Domain III ve IV'ün intraselüler loplardaki mavi küreler kanalın inaktivasyonunu sağlayan IFM motifini ve reseptörünü (h inaktivasyon kapısı), P fosforilasyon bölgelerini (kırmızı küreler Protein Kinaz A(PKA), kırmızı kareler ise protein kinaz C (PKC) için) $-\psi$, N-linked glikozilasyon bölgelerini göstermektedir. Her domain lopunun girişinde bulunan amino asitlerle kanal iyon seçici özelliğe kavuşur. Dış yüzey EEDD, iç yüzey DEKA amino asit dizisine sahiptir (59).



Şekil 5. Voltaj-kapılı sodyum kanal proteinlerinin üç boyutlu şematik yapısı a: merkezi iyon geçirgenlik poru, b: por girişi veya kapı poru (63).

Şekil 6’da VGSC’lerinin genomik lokasyonu gösterilmiştir (64). VGSC protein genlerindeki mutasyonlar veya kanal gen ekspresyonundaki regülasyon bozuklukları insanlarda kanalopatiler olarak adlandırılan çeşitli hastalıklara yol açar. Örneğin genetik mutasyonlar sonucu periyodik kas paralisis, uzun QT sendromu ve epilepsi veya gen ekspresyonundaki regülasyon bozuklukları sonucu kronik ağrılar, multiple skleroz ve kanser gözlenebilir (14). İskelet kası kasılmalarını, kardiyak ritmi veya nöronal fonksiyonu etkileyen ve hayatı tehdit edici seviyeden hayatı kısıtlayan düzeye kadar çeşitlilik gösteren insan VGSC genlerindeki mutasyonlarla bağlantılı en az 20 hastalık bu güne kadar tespit edilmiştir. İlgili hastalıklar Tablo 6’da verilmiştir. Pek çok kanal hastalığı dominant geçişli olup bazıları resesif geçişli veya sporadik olabilir. Ek olarak, bazı parmogenetik sendromlar VGSC genlerinin çeşitliliği ile ilişkili olabilir. Bu hastalıkların klinik belirtileri temel olarak mutant genlerin dokudaki ekspresyon seviyesi ve moleküler seviyede VGSC’nin biyofiziksel karakterindeki fonksiyonel bozukluk ile ilgilidir (64).



SCN1A:Na_v1.1, SCN2A:Na_v1.2, SCN3A:Na_v1.3, SCN4A:Na_v1.4, SCN5A:Na_v1.5, SCN8A:Na_v1.6, SCN9A:Na_v1.7, SCN10A:Na_v1.8, SCN11A:Na_v1.9, SCN6A (SCN7A):Nax, SCN1B:β1, SCN2B:β2, SCN3B:β3, SCN4B:β4 alt birimi.

Şekil 6: İnsan VGSC’lerinin genomik lokasyonu. VGSC α (kırmızı) ve β (mavi) altbirimlerinin insandaki kromozomal lokasyonu. Tek yıldızlı olanlar kalıtsal hastalıklarla ilişkili olanlara, çift yıldızlı olanlar ise fare fenotipi ile ilgili olanlara işaret etmektedir (64).

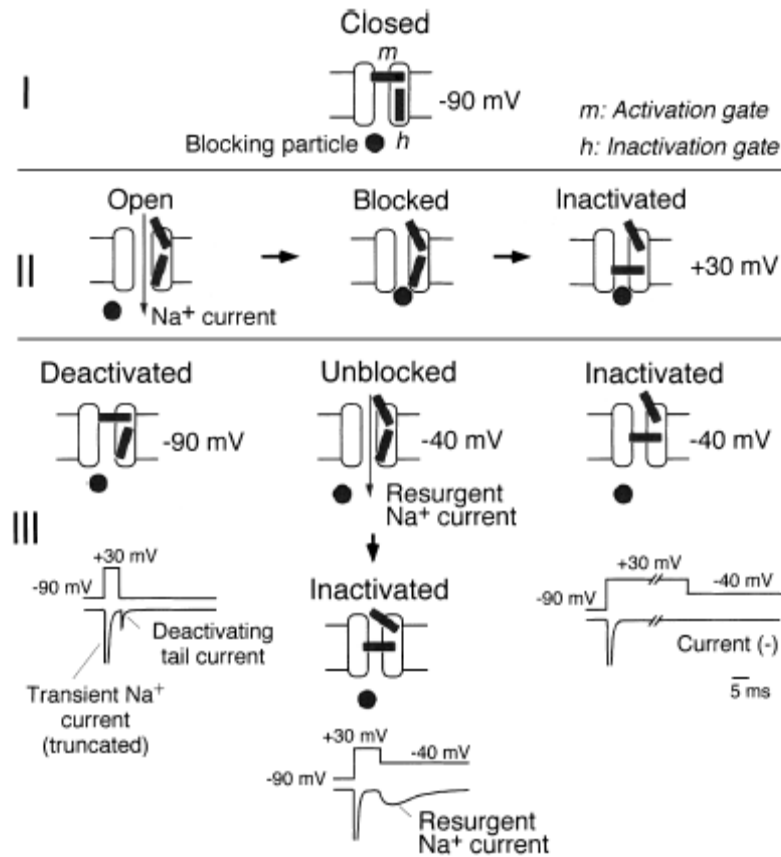
Tablo 6. Kalıtsal sodyum kanal hastalıkları (64).

Kas Sodyum Kanal Hastalıkları (Nav1.4)	Kardiyak Sodyum Kanal Hastalıkları (Nav1.5)	Beyin Sodyum Kanal Hastalıkları (Nav1.1, Nav1.2, β1)	Peripheral nevre sodyum Kanal Hastalıkları (Nav1.7)
Hiperkalemik periyodik felç(HyperPP)	Konjenital uzun QT sendromu tip3(LQT3)	Febril nöbetli epilepsi(GEFS)	Ailesel primer eritemalgia
Paramyotonia konjenital(PC)	İdiyopatik ventriküler fibrilasyon (Brugada sendromu,IVF)	Bebeklik dönemindeki şiddetli miyoklonik epilepsi (Dravet sendromu)	
Potasyum-uyarımlı miyotoni(PAM)	İzole kalp iletim sistem hastalığı	Sık nöbetli çocuk epilepsisi	
Ağrılı konjenital miyotoni	Atrial standsill	Benign ailesel neonatal-çocuk nöbet	
Myasteni sendromu	Konjenital hasta sinüs sendromu		
Hipokalemik periyodik paralizi tip 2	Ani bebek ölümü sendromu		
Malign hipertermiye duyarlılık	Dilate kardiyomiyopati,iletim bozukluğu, aritmi		

2.4.2. VGSC'lerinin Çalışma Şekli

Membran polarizasyonuna, depolarizasyonuna ve repolarizasyonuna göre aktivitesini değiştiren VGSC'lerinin çalışma şekli Şekil 7'de özetlenmiştir (61).

Sodyum kanallarının üç anahtar özelliği: voltaja-bağlı aktivasyon, hızlı inaktivasyon ve seçici iyon geçirgenliğidir. Kanalın girişi her bir domainde bulunan S5-S6 adlı transmembran kısımları arasındaki loop tarafından oluşturulur. Dört domainde de benzer pozisyonlarda bulunan iki önemli amino asit kanalın içini ve dışını negatif yüklü kılarak kanala bloklayıcıları için bir reseptör bağlanma bölgesi ve seçici filtre özelliğini kazandırır. Bu rezidülerdeki mutasyonlar tetrodotoksin ve saxitoxinin bağlanmasını ve organik veya inorganik tek yüklü katyonların sodyum kanalından geçmesini anlamlı derecede etkiler. Sodyum kanalının inaktivasyonu kanal açılımının akabinde milisaniyeler içerisinde gerçekleşir. Hidrofobik IFM motifi ile kanal inaktive olur ve bu motifdeki mutasyonlar kanalın inaktivasyon derecesini anlamlı derecede etkiler (59).



Şekil 7. VGNC'den sodyum akışını gösteren model. I: -90 mV 'da kapalı form, II: $+30\text{ mV}$ 'a depolarize olması ile kanalın açık hali, hipotetik tıkaçıcı partikülün bağlanmasıyla bloke olmuş hal ve inaktive olmuş. Zamana bağlı olarak kanalın açık hali inaktif hale döner. $+30\text{ mV}$ 'a depolarizasyonun akabinde repolarizasyon gerçekleşir. III: Membran depolarizasyonunun hemen akabinde -90 mV 'a repolarize olduğu zaman açık haldeki kanal deaktive edici kuyruk akımının oluşumuna yol açar (solda). Membran, kanalın bloke halde bulunduğu daha uzun bir depolarizasyona maruz kaldığı zaman -40 mV 'a repolarize olursa, bloke edici partikül kanaldan ayrılır ve kanalın yeniden açılarak şeklin ortasında görüldüğü gibi tekrar Na⁺ akışı gerçekleşir. Yeniden gerçekleşen Na⁺ akımı zamanla azalır ve normal inaktivasyon süreci gerçekleşir. Bütün kanalların inaktif halde bulunduğu uzun bir depolarizasyonun akabinde -40 mV 'a repolarizasyon gerçekleşirse herhangi bir Na⁺ akışı gerçekleşmez (sağda) (61).

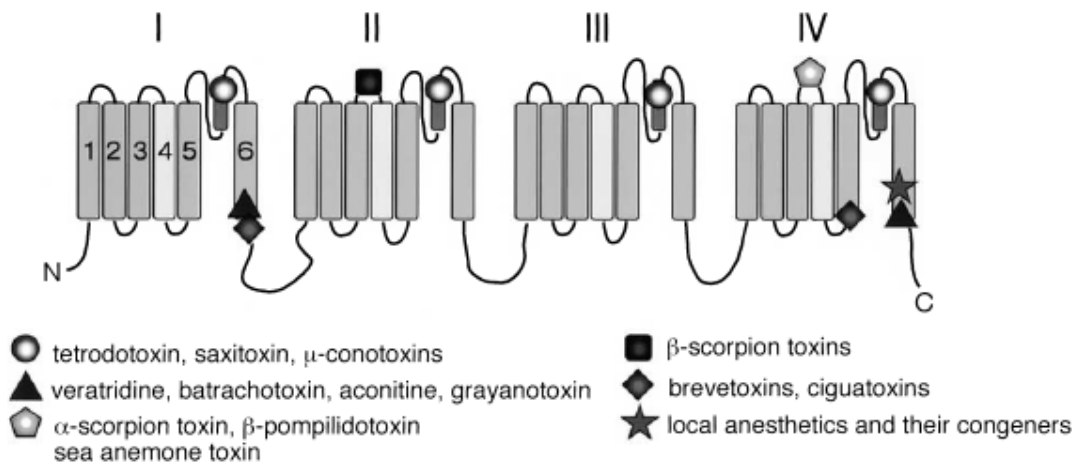
VGSC'leri kendi aralarında farklı aktivasyon ve inaktivasyon kinetiklerine sahiptirler. Örneğin Na_v1.1-1.4, Na_v 1.6, Na_v1.7 -40 mV civarında aktive olur ve hızlı inaktivasyon kinetiğine sahiptirler. Na_v1.5, Na_v1.8, Na_v 1.9 ise daha hiperpolarize potansiyelde (-60 mV veya daha negatif) aktive olur ve daha yavaş inaktivasyon kinetiğine sahiptirler (14).

2.4.3. VGSC Toksinleri

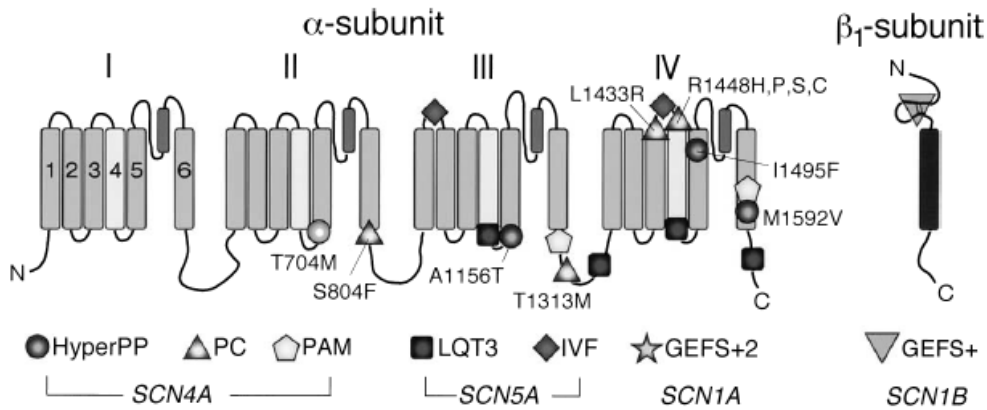
Toksinler VGSC α -alt birimlerinde bağlandığı bölgelerine göre 5 sınıfa ayrılmaktadır. Bu sınıflar Tablo 7’de özetlenmiştir. Kanalin ağzını kapayan tetrodotoksin ve türevleri hariç pek çok toksin aktivasyon ve inaktivasyon ile ilgili bölgelere bağlanır. Çeşitli ilaçların ve toksinlerin VGSC üzerindeki bağlanma bölgeleri Şekil 8’de gösterilmiştir. Bu bölgelerin bazıları kalıtsal Na⁺ kanal hastalıklarında görülen mutasyona uğramış bölgeleridir (Şekil 9). Bu yüzden bazı toksinler kalıtsal Na⁺ kanal hastalıklarında görülen anaormal kanal kinetikleri oluştururlar. Lokal anestezik, analjezik ve anti epileptik gibi bazı ilaçlar kanal porunun iç yüzeyine (domain IV S6 kısmı) bağlanır ve kanalı dinlenme ve kullanıma bağlı bloke olduğu hale dönüştürür (61).

Tablo 7. VGSC toksinleri ve ilaçları (61).

Toksin ve ilaçlar	Etki Mekanizması	Bağlanma Bölgeleri
Tetrodotoksin, saxitonin, μ -conotoxins, veratridine, batrachotoxin, aconitine, grayanotoxin	Por tıkanmasıyla geçişin engellenmesi m’deki negatif değişiklikten dolayı sürekli aktivasyon	SS1-SS2 I-S6 ve IV-S6
α - scorpion toxin, β -pompilidotoxin, sea anemone toxin	IV-S4 voltaj sensörünün dışa çıkışının engellenmesi	IV-S3-S4 loop
β -scorpion toxins	II-S4 voltaj sensörünün dışarı pozisyonunda kalması	II-S3-S4 loop
Brevetoxins, ciguatoxins	m’deki negatif değişiklikten dolayı sürekli aktivasyon	I-S6-IV-S5
Lokal anestezikler ve türevleri	Dinlenmeye ve kullanıma bağlı kanalın bloklanması	IV-S6



Şekil 8: VGSC α - alt birimlerine toksin ve ilaçların bağlanma bölgeleri (61).



Şekil 9: İnsan VGSC genlerindeki mutasyonlar. Her bir sembol bir hastalığı göstermektedir. HyperPP: hiperkalemik periodik felç, PC: paramiotonia konjenital, PAM: potasyum-uyarımlı miyotoni, LQT3: uzun QT sendrom tip 3, IVF: idiyopatik ventriküler fibrilizasyon, GEFS: febril nöbetli epilepsi (61).

2.4.4. VGSC'lerinin Regülasyonu

Memeli sodyum kanalları çeşitli hücre ve dokulardan farklı oranlarda eksprese edilirken bu seviye gelişime bağlı olarak değişebilmekte ve kanal proteininin hücre içi yerleşimi farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca bu kanalların her biri memeli fizyolojisinde farklı rollere sahip olabilmektedir (59).

İyon kanalı protein ekspresyonunun regülasyonu gen transkripsiyonu, RNA prosesi, protein sentezi, toplanma ve post-translasyonel modifikasyonlar, hücre yüzeyine taşınması, hücre iskeletine tutulması, endositozunun regülasyonu ve proteinin kontrollü yıkımı gibi bir çok işlemin kontrollü dengesi ile sağlanır (65).

Tam fonksiyonlu bir VGSC'inin oluşması için VGSC'lerinin transkripsiyonel ve translasyonel seviyede modülasyonuna uğrar. Transkripsiyonel seviyede birçok gen birçok alt tip üretir. Alt tiplerin splicinge uğraması sonucu birçok izoform oluşur. Farklı alt tiplerin ve/veya farklı izoformların ekspresyonu ile VGSC'leri oluşur. Domain 1 (D1:S3) adult ve neonatal izoformlar ($Na_v1.2, Na_v1.3, Na_v1.5, Na_v1.6$ ve $Na_v1.7$ için), Interdomain 1-2 (ID1-2) izoformları ($Na_v1.1, Na_v1.3, Na_v1.6, Na_v1.7$ için), Interdomain 2-3 (ID2-3) izoformları ($Na_v1.5$ ve $Na_v1.8$ için), Domain 3 (D3) izoformları ($Na_v1.6$ ve $Na_v1.1$ için) ve Domain 4:segment 3 (D3:S4) izoformları ($Na_v1.9$ ve $Na_v1.5$ için) bugüne kadar çeşitli fare ve insan dokularında tespit edilmiştir. Alternatif splice mekanizması ile farklı büyüklükte VGSC alt tipleri oluşmuştur. Günümüzde VGSC genlerinin splicingini

kontrol eden mekanizmalar bilinmiyor ancak membran potansiyeli, büyüme faktörleri ve fosforilasyonun etkili olabileceği düşünülmektedir (14).

Translasyonel seviyede ise fosforilasyon, glikozilasyon, VGSC- β ile birleşme ve hücre iskeleti gibi diğer intraselüler proteinlerle etkileşim sonucu tam fonksiyonlu VGSC'lerinin oluşumu tamamlanır (14).

2.4.4.1. Transkripsiyonel Kontrol

VGSC'lerinin transkripsiyonu hasar, elektriksel aktivite, Nöronal Büyüme Faktörü (NGF) gibi büyüme hormonları ve androjen gibi hormonlarla etkilenir (14). Bunların yanı sıra VGSC'nin fibroblast büyüme faktörü, sinir büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerince regüle edildiği insan ve rat hücre serilerinde ortaya konmuştur. Ayrıca büyüme faktörlerinin prostat kanseri prognozunda büyük role sahip olabileceği vurgulanmaktadır (13). Bu etkiler hem hücre tipine hem de VGSC α alt tipine spesifik olarak değişmektedir. Örneğin NGF, PC12 hücrelerinde Na_v1.7'nin ekspresyonunu artırırken Dorsal-Root Ganglion (DRG) nöronlarında Na_v1.3'ün ekspresyonunu azaltır (14). *In vivo* olarak insan prostat kanserinde Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ekspresyonunun arttığı tespit edilmiş ve olası (Prostat Kanseri-EGF-VGSC) üçgen ilişkisi öne sürülmüştür. Bu ilişkiye göre EGF'nin prostat kanseri hücrelerinde VGSC upregülasyonundan sorumlu olabileceği belirtilmiştir. Camgöz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bu ilişkiyi incelemek için fonksiyonel VGSC ve EGF reseptörü eksprese eden güçlü metastatik prostat epitelyal hücrelerini kullanmıştır. Bu çalışma sonucu 1- EGF'nin VGSC (özellikle Na_v 1.7) mRNA ve protein ekspresyonun artırdığı ve plazma membranına yönlendirdiği 2-eksojen EGF'nin endojen EGF'e benzer şekilde *invitro* olarak migrasyon, endositoz ve invazyon gibi metastatik davranışları artırdığı ve tetrodotoksin uygulamasıyla üç davranışın da baskılandığı 3-EGF'nin artırdığı bu davranışları VGSC aktivitesi aracılıklı yaptığı, 4-VGSC ekspresyonunun EGF etkisi altında pozitif feed back mekanizma (VGSC aktivitesi→EGF salınımı→VGSC upregülasyonu) ile otheregülasyona uğradığı sonucuna varılmıştır (13).

β -adrenerjik sitümüstasyon aracılıklı Na⁺ akışının nörohormonal regülasyonunda Na⁺ akışının PKA-bağımlı (indirekt) ve PKA bağımsız (direkt) en az iki mekanizma ile arttığı bildirilmiştir. (β)-adrenerjik reseptörün 10 μ M izoproterenol (ISO) ile sitümüstasyonunda rat ventriküler miyositlerinde Na⁺ akışı % 68 iken, ISO sitümüstasyonu

PKA inhibitörü varlığında yapıldığında Na^+ akışında %31'lik bir artışın olduğu bildirilmiştir (65).

Gen ekspresyonunda önemli olan transkripsiyonel faktörlerden REST'in ise rat dokularında Na_v 1.2'nin ekspresyonunu baskıladığı bulunmuş diğer transkripsiyonel faktörlerle (Sp1, MyoD, ve brn-2, brn-3 gibi POU-aile homebox proteinleri) ilgili çalışmaların da sürdüğü bildirilmiştir (14). Na_v 1.5 mRNA ekspresyonunun ve fonksiyonel seviyede Na_v 1.5 miktarının kronik olarak sınıf I anti-aritmik ilaçların verilmesiyle arttığı tespit edilmiştir. Na_v 1.7 izoformunu eksprese ettiği ve MAPkinaz ERK1 ve ERK2'nin inhibisyonuna bağlı olarak mRNA stabilitesinin ve fonksiyonel Na^+ kanalının plazma membranı üzerine ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Na^+ kanal mRNA miktarındaki değişiklikler intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Ca^{+2} miktarını artıran Ca^{+2} ionophore A23187 uygulamasının Na^+ kanal ekspresyonunu 5 kat azalttığı, kalsiyum şelatörü BAPTA-AM uygulamasının ise ters etki yaptığı rapor edilmiştir (65).

2.4.4.2. Translasyonel Kontrol

Glikozilasyon

D1 ve D3 üzerinde pek çok glikozilasyon bölgesine sahip olan VGSC'lerinin daha çok sialik asit olmak üzere karbohidratlarca glikozillendiği ve bu sayede VGSC yapısının ve lokalizasyon/hücre yüzey ekspresyonunda önemli olduğu hipotez edilmektedir. Na_v 1.1- Na_v 1.4 % 15-30 oranında glikozillenirken, Na_v 1.5 ve Na_v 1.9 sadece %5 oranında glikozillenir. Glikozilasyonun modülasyonu kanal proteinlerinin elektrofizyolojik özelliklerini ayrı ayrı etkiler. Örneğin Na_v 1.4'den sialik asit grublarının uzaklaştırılması aktivasyon ve inaktivasyon voltajlarını depolarize eder. Gelişime bağlı olarak normal şartlarda glikozilasyon düzeyi değişen VGSC'lerinin sahip olduğu glikozilasyon grubları deneysel olarak değiştirildiğinde fonksiyonunun da değiştiği rapor edilmiştir (14).

Fosforilasyon

VGSC'nin D1-2 ve D3-4 loopları üzerinden PKA ve PKC'ce fosforillenir (59). VGSC α alt birimlerinin fosforilasyonu alt tipe spesifik olarak gerçekleşir. Örneğin

Na_v1.2'nin PKA tarafından fosforillenmesi rahat akışı kısıtlarken, Na_v1.5'in fosforillenmesi kanalın iletkenliğini artırır. Ayrıca Na_v1.5'in PKAca fosforillenmesi kanalın iyonik seçiciliğini de etkileyebileceği Na⁺ yanında Ca⁺²'nin de geçişine izin verebileceği öne sürülmüştür (14). PKA'nın tersine PKC tüm VGSC'lerinin fonksiyonunu değiştirir (65). D3-4 deki Serin rezidüsü üzerinden gerçekleşen fosforilasyonla kanal inaktivasyonu hızlanır. CAM kinaz II inhibitörü KN-62'nin Na⁺ akışını azalttığı cerebellar granüle hücrelerinde gözlenirken Na_v 1.2 üzerine CHO hücrelerinde bir etki yapmadığı tespit edilmiştir. VGSC'leri üzerine Protein kinaz etkisinin tersi protein fosfatazlarca gerçekleştirilmektedir. Reseptör benzeri tirozin fosfataz β (RPTPβ) ve Ca⁺²/kalmodulin bağımlı protein fosfataz 2B olan calcineurinin inaktivasyonu yavaşlatarak Na⁺ akışını artırdığı bildirilmiştir. VGSC'leri diğer proteinlerin fosforilasyonunun indirekt etkisi ile de modüle edilebileceği öne sürülmektedir. Sığır adrenal kromafin hücrelerinde Na_v1.7 ekspresyonunun fosforillenmiş/aktive edilmiş ekstraselüler sinyal regüle edici kinaz (ERK) tarafından downregülasyona uğradığı rapor edilmiştir. Benzer şekilde kinaz anchoring protein-15 (AKAP-145)in de VGSC'leri ile etkileşebileceği ve bu sayede PKA ile etkileşmesinin kolaylaşabileceği vurgulanmıştır (14).

Na⁺ kanalının fosforilasyonunun proteinin Endoplazmik Retikulum(ER)'dan taşınmasını ve kaveole içerisinde Na kanal havuzunda toplanmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca PKA bağımlı olmayan mekanizmalarda ligandın β-adrenerjik resöptöre bağlanmasıyla G-protein sitümülator α-altbiriminin (Gα) dahil olduğu bir dizi sinyalizasyonun gerçekleştiği ortaya konmuştur. Gα dan türetilen küçük bir peptidin rat beyinde intraselüler uygulamasının sağlam hücrelerin Na⁺ akışını 10 dakikada % 45 artırdığı ortaya konmuştur. Na kanal proteinlerinin hızlıca taşınabilmesi ve toplanabilmesi için caveolae lar lokal bir depo olarak fonksiyon görür. Anti kaveloin-3 antikoruyla yapılan immunoprespitasyon çalışmalarında ise Na⁺ kanal proteinlerinin Gα proteini ile birlikte bulunduğu rapor edilmiştir (65).

Beta Alt Birimlerle Birleşme

Beta (β)1 β3 ile β2 β4 ile %43 ve % 35 oranında homoloji gösterir. Beta 2 geni çıkarılmış farelerde VGSC ekspresyonunun azaldığı, kanal inaktivasyonunun değiştiği ve felce yatkınlığı artırdığı tespit edilmiştir. Na_v1.2 nin β1, β 2 ve/veya β3 ile birlikte, Na_v 1.1'in β1 ve/veya β2 ile birlikte eksprese edildiği saptanmıştır. Beta alt birimlerinin

ekstraselüler matriks veya hücre iskeleti ile etkileşerek hücrel migrasyonu ve bir araya gelmeyi regüle ettiği bilinmektedir. Beta altbirimlerin ankyrin, tenascin-C ve neurofascin ile etkileşerek VGSC α alt birimlerinin subselüler yerleşmesini kolaylaştırmaktadır. Na_v 1.5 β 1 ile intraselüler ve ekstraselüler bölgelerden, Na_v 1.2 ise sadece ekstraselüler bölgeden etkileşmektedir. Beta 1 alt biriminin β 1.2 ve β 1A adlı iki alternatif splice formu mevcuttur. Bu formların fonksiyonel etkisi henüz bilinmemektedir (14).

2.4.4.3. Protein-Protein Etkileşimleri

VGSC'nin C-terminal domaini inaktivasyon olayında ve içerdiği bir dizi amino asit ile protein-protein etkileşimini sağlayan önemli bir domaindir. Protein etkileşim bölgeleri; kalmodulin (CaM) bağlayan IQ motifi (I1908-R1918), PY motifi (P1974-1977) ve postsynaptic density protein-95 large/zona occludens-1 (PZD)-bağlayan domain son üç aminoasit dizisinde (serin-izolösin-valin) bulunmaktadır. Proksimal kısmı ise FHF1B proteini ile etkileşir. Etkileştiği bu proteinlerin kanal aktivitesinin regülasyonunda, doğru hücrel lokalizasyonunda ve biyosentezle yıkım olaylarında etkili olduğu düşünülmektedir (14).

Ankirin Proteinleri

Ankirin proteinleri membran proteinlerini hücre iskeletine bağlayan adaptör proteinlerdir. Memeli genomunda ankirin-G, ankirin-B ve ankirin-R genleri mevcuttur. VGSC'lerinin II-III bağlayıcı kısmında bulunan 9 amino asit dizisinin (1047-VPIAVAESD-1055) ankirin-G ile etkileştiği tespit edilmiştir. Na_v1.5 de meydana gelen E1053K mutasyonu ile ankirin-G'ye bağlanmanın gerçekleşmediği rapor edilmiştir. Ankirin-B ANK2 genince kodlanır ve Fransız bir ailenin ANK2 geninde tespit edilen bir mutasyonun LQTS'na sebep olduğu bildirilmiştir. Aritmik bozukluklara sahip hastalarda ve ani ölümlerin görüldüğü kişilerde yapılan incelemelerde fonksiyon kaybına sebep olan dört ayrı ANK2 mutasyon tespit edilmiştir (66). Homozigot ankyrinB^{-/-} neonatal farelerin miyositlerinde yapılan çalışmalarda uzun QT-3 sendromuna(LQT-3) sebep olan mutantlı kanallarda olduğu gibi kardiyak kanalların geç açıldığı tespit edilmiştir (65).

FHF1B (Fibroblast Büyüme Faktörü Ailesi)

Nöronal Na_v kanallarının FHF1B ile direkt etkileştiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır. HEK293 hücrelerinde FHF1B ve $Na_v1.5$ ko-ekspresyonunun hiperpolarizasyona rağmen kararlı inaktivasyona sebep olduğu bildirilmiştir. LQT-3 ve BrS mutasyonlarının FHF1B ile etkileşim bölgelerinde meydana geldiği ve LQT-3 mutasyonunun (D1790G) proteinin $Na_v 1.5$ 'e bağlanmasını etkilediği, bu sayede ise FHF1B indüklü kararlı inaktivasyonun kaybolduğu bildirilmiştir (66).

Kalmodülin (CaM)

$Na_v1.5$ gibi diğer 8 Na_v α -izofomu C-terminal bölgesinde CaM-bağlayıcı IQmotifini (IQxxxRxxxxR) içermektedir. Bazı çalışmalarda CaM'nin $Na_v1.5$ ile direkt etkileştiği gösterilmiştir. Yapılan ayrı çalışmalarda ise Ca^{+2} 'nin direkt olarak $Na_v 1.5$ 'in C-terminalindeki ilk iki EF-el motifine bağlanmasıyla Ca^{+2} regülasyonuna alternatif modların bulunduğu vurgulanmıştır. Aynı çalışmada Ca^{+2} 'nin CaM aracılığı ile $Na_v1.5$ ile etkileşerek IQ motifine bağlanabileceği belirtilmiştir. CaM nin $Na_v1.5$ 'in voltaja bağımlı olmasına ve kinetiğine direkt bir etkisinin olmadığını savunan çalışmaların yanı sıra $Na_v1.5$ 'in yavaş inaktivasyona girişini artırdığı da savunulmaktadır. IQ motifindeki A1924T mutasyonu ile CaM'nin bu etkisinin bozulduğu tespit edilmiştir (66). $Na_v1.4$ ve $Na_v 1.6$ 'nın Kalmodülin ile etkileşmesi sonucu Na^+ akışını azaltan etkileşimlerin bozulduğu rapor edilmiştir (14).

Nedd4/Nedd4 Benzeri Ailesinin Ubiquitin Protein Ligazları

Hedef proteinlerin ubiquitinasyonu ubiquitin-protein ligaz enzimlerinin (E3) katalitik aktivitesi ile gerçekleşmektedir. E3 PY motifi (PPxY) içeren hedef proteinlere spesifik olarak bağlanır (66). Nedd4/Nedd4 benzeri proteinler PY motifi ile etkileşecek olan 2 ile 4 arasında WW domainine sahiptirler (65). $Na_v1.4$, $Na_v1.9$ ve Nax hariç tüm VGSC'lerinde PY motifi mevcuttur. Na_v ların membran turnoverları/stabiliteyi *in vivo* olarak ubiquitinasyon ile sağlandığı öne sürülmektedir. Yapılan ayrı bir çalışmada ise Nedd4-2'nin HEK 293 hücrelerinde $Na_v1.5$ kanallarının internalizasyon hızını artırdığı rapor edilmiştir (66).

Syntrophin Proteinleri

Syntrophin proteinleri intraselüler adaptör protein ailesinden olup iskelet ve kardiyak kaslarının geniş dystrophin ilişkili protein komplekslerinin bir bileşenidir. Farklı genlerden kodlanan ve farklı olarak eksprese edilen bu güne kadar aydınlatılmış 5 syntrophin izoformu mevcuttur ($-\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$). Syntrophin proteinlerinin ana görevi farklı protein tiplerini (protein kinazlar, NO-sentazlar ve iyon kanalları gibi membran proteinleri) kas proteini dystrophine yaklaştırmak, adapte etmektir (66). Bütün syntrophinler PZD domainine sahiptir ve bu domainle PZD bağlayıcı domaine sahip proteinlerle etkileşir. Bu etkileşim $Na_v 1.4$ ve $Na_v 1.5$ de tespit edilmiştir (14). Kardiyak hücrelerinde $Na_v 1.5$, syntrophin ve dystrophin komplekslerinin $Na_v 1.5$ 'in membranda stabilize olmasında rol alabileceği öne sürülmektedir (65).

VGSC α alt birimlerinin aktin hücre iskeleti ve ekstraselüler matrikse PZD domaini aracılığı ile bağlanabileceği bildirilmiştir (14). Yapılan deneysel çalışmalarda kardiyak Çapa proteinlerinin (AKAP) $Na_v 1.5$ 'e bağlandığı ortaya koyulmuştur (66).

İn vitro VGSC aktivitesinin direkt olarak sekretuar membran aktivitesi (67), morfolojiksel artış (68), yönsel motilite (56, 69), adezyon (13), otoresülasyonun dahil olduğu gen ekspresyonu (70) ve invazyon (57, 71, 72) gibi metastatik kaskatta dahil olan olaylara katılabileceği bildirilmiştir. Metastatik olmayan insan prostat kanseri hücrelerinde VGSC'lerinin overeksprese olduğu zaman tek başına invazyon için yeterli ve gerekli olduğu öne sürülmüştür (13). VGSC α alt birimlerinin fonksiyonel aktiviteden sorumlu olduğu ve $Na_v 1.7$ mRNA seviyesi güçlü ve zayıf metastatik rat ve insan prostat kanseri hücrelerinde 1000 katdan fazla up-regülasyona uğramaktadır (12). Ayrıca İnsan prostat kanseri hücrelerinde in vivo olarak VGSC α proteininin ve $Na_v 1.7$ mRNA ekspresyonunun kayda değer biçimde up-regülasyona uğradığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada $Na_v 1.7$ 'nin prostat kanseri için etkili fonksiyonel diagnostik marker olabileceği öne sürülmüştür (13).

VGSC aktivitesi hücrel motilitede rol alan intraselüler yolları regüle edebilir. Örneğin PKC, Src, Btk aile kinazları, Ras süper ailesinden GTPazlar, MAPK kinazlar. Fraser ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada fonksiyonel VGSC ekspresyonunun güçlü metastatik prostat kanseri hücrelerinde yansal (lateral) motiliteyi artırdığı rapor edilmiştir (56).

Metastatik rat prostat kanser hücrelerinde sekretuar membran aktivitesindeki artışın fonksiyonel VGSC ekspresyonundaki artışın sonucunda oluştuğu öne sürülmüştür. Özet

olarak VGSC'lerinin iki mekanizma ile sekretuar membran aktivitesini artırdığı düşünülmektedir (67).

1- Na⁺ akışının intraselüler Ca⁺² seviyesini artırdığı, bunu da intraselüler depolara lokal etkisiyle ve Na⁺/H⁺ değişim proteininin aktivitesindeki değişikliklerle intraselüler pH'yı bozarak gerçekleştirdiği bilinmektedir. Depolardan salınan Ca⁺² PKC ve/veya CaM kinaz II'yi aktive eder ve aktin hücre iskeletinin fosforillenmesine yol açarak sekresyon ve endositozun oluşumuna izin verir.

2-Na⁺ adenilat siklaza direkt etki yaparak PKA'yı aktifleştirir ve PKA da veziküler mekanizmada yer alan bazı bileşenleri fosforilleyerek etki gösterir (67).

Krasowska ve arkadaşları endositik veziküllerle ilgili yaptığı bir çalışmada endositik/veziküler aktivitenin güçlü metastatik Mat-LyLu hücrelerinde zayıf metastatik AT-2 hücrelerine göre daha yaygın gözlendiğini ve tetrodotoksin uygulamasıyla Mat-LyLu hücrelerinde endositozun baskılandığını rapor etmiştir. Ayrıca Na⁺'nun intraselüler Ca⁺² seviyelerini artırabileceğini ve protein kinaz C ve/veya CaM kinaz II'yi aktifleştirebileceği, aktin hücre iskeletini fosforilleyebileceğini bunlarında sekresyon ve endositozun oluşumuna izin verebileceğini bildirmiştir. Bunların yanı sıra Na⁺'nun adenilat siklaza direkt etkisi ile siklik adenozin mono fosfat (cAMP), protein kinaz A seviyelerini değiştirebileceği ve bu sayede veziküler olaylarda rol alan bazı bileşenlerin fosforillenebileceğini belirtmiştir (73).

MDA-MB-231, MCF-7 insan meme karsinoma hücre serileriyle yapılan çalışmalarda VGSC Na_v1.5 ve 1.7 izoformlarının mRNA ekspresyonunun MCF-7 hücrelerine göre sırasıyla %82 ve %18 oranında arttığı ve fonksiyonel VGSC aktivitesinin Na⁺'un hücre istilasını artırdığı tespit edildi. Aynı çalışmada meme kanser hücrelerinde ve dokularında Na_v1.5'in neonatal splice formu bulundu. Neonatal Na_v1.5'in upregülasyonunun meme kanserinin metastazında etkili olup metastatik fenotipin yeni bir marker olabileceği ve ilaç çalışmaları için yeni bir aday olduğu öne sürülmüştür (58). Metastaz hızı yüksek olan PC-3 ve düşük olan LNCaP insan prostat kanser hücreleri ile yapılan çalışmalarda Na_v 1.7 izoformu mRNA ekspresyonunun PC-3 hücrelerinde yaklaşık 1000 kat daha yüksek olduğu tespit edildi (12).

2.5. CELEX Hipotezi

VGSC ile ilgili yapacağımız çalışmaların temeli kanser ilerlemesinin CELEX(Hücreyel Uyarılma) hipotezine dayanmaktadır. CELEX hipotezine göre ikinci tümörigenezin (metastaz) fonksiyonel VGSC upregülasyonu ile kolaylaştığı ve VGSC bloklayıcılarının anti-metastatik aktiviteye sahip olduğu ileri sürülmektedir. Djamgoz ve arkadaşlarının çeşitli sebze ve meyvelerde bulunan Resveratrol, Curcimin, Capsaicin, Genistein'nin CELEX hipotezine uygun olarak VGSC aktivitesini doza bağlı olarak baskılayıp inhibe edebileceğini savunmaktadır. CELEX hipotezine göre kanser hücrelerinin metastatik aktivitesinin VGSC proteinlerinin up-regülasyonu ile kolaylaştığı ve bu kanal proteinlerini bloklayabilecek bileşiklerin anti-metastatik aktiviteye sahip olabileceği öne sürülmüştür (15).

CELEX hipotezine göre;

1- Primer tümörigenezde kanser hücrelerin kontrolsüz bölünmeye uğradığı yerde bu işlemin K^+ kanal aktivitesiyle kolaylaştığı ve bazı bileşiklerin K^+ kanallarını bloklayarak anti-proliferatif/anti-kanser etki gösterdiği,

2- İkinci tümörigenez (metastaz), fonksiyonel VGSC'lerinin upregülasyonu ile kolaylaştığı ve VGSC bloklayıcılarının anti-metastatik aktiviteye sahip olduğu ileri sürülmektedir. Metastatik potansiyeldeki artış normalde VGSC fonksiyonunun antagonisti olan Voltaj Kapılı Potasyum Kanal Proteini(VGPC) down-regülasyonu ile birlikte gerçekleştiği böylece VGPC bloklayıcıları pro-kanser etki gösterebileceği savunulmaktadır. CELEX hipotezine göre ideal anti-metastatik bileşiğin VGPC aktivitesini artırırken, VGSC aktivitesini baskılaması gerekmektedir (15).

3. MATERYAL VE METOD

3.1.Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

3.1.1. Cihaz ve Malzemeler

Hücre kültür kabini(Faster BH 2004 Air Flow), ışık mikroskobu(LEICA Gallen), faz kontrast mikroskobu(LEICA DMIRB, LEICA DC 300F), Thermalcyler cihazı (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems USA), LightCycler 2.0 System cihazı(Roche), CO₂ inkübatör(SANYO Model MCO-17AIC), santrifüj(ABBOTT), santrifüj(Rotina 35 R Hettich Zentrifugen Typ 1710), mikrosantrifüj(Sigma Loberzentrifugen CE 1-15), hassas terazi(Oertling NA 164), elisa okuyucu(Tunable VERSAmax microplate reader,US), çalkalayıcı inkübatör(Shelleb/Sheldon Mod:514,USA), öğütücü(Retsch ZM 200, Germany), aspiratörlü pipet(Vitlap,pipet controller), membran filtreleri(SCH Schleicher&Schuell FB 030/3 0.2µm/7bar max), semiotomatik pipetler (0.5-10 µl, 10-100µl, 100-1000µl), 96'lı hücre kültürü kuyucukları(elisa pleyt)(Orange Scientific), standart T-25, T-75, T-150 hücre kültür flaskları, 15ml'lik ve 50 ml'lik steril falcon tüpler, steril cam pipet (HBG W-GERMANY), 25ml,10ml ve 2ml'lik steril disposable pipetler, steril pipet uçları(Sorenson Bioscience, inc Muti Fit Guard Filter Tips), mikrosantrifüj tüpü, steril PCR ependorf tüp, beher, baget, balon joje, cam şişe gibi çeşitli cam malzemeler, 20, 50 ml'lik steril enjektör, steril cerrahi eldiven, UV lamba.

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Dimetil sülfoksit (DMSO, Merck), RPMI 1640 (1x + L-Glutamine) (GIBCO), DMEM/Ham's F12 + L-glutamine(Sigma), Penisilin + Streptomisin (Sigma), Foetal Bovine Serum(GIBCO), PBS-Dulbecco (1x) (Katalog No: L1825 Biochrom AG),

Trypsin/EDTA Solüsyonu(Katalog No: L2143 Biochrom AG), Trypan Blue (Biochrom AG), etanol(Carlo Erba), β -merkaptotanol(Sigma), 3-(4,5-dimetilthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)(Sigma), dNTP ler (100 mM, Fermentas Life Sciences), Na_v1.5, Na_v1.7 ve β -actin için forward ve reverse primerleri(Ocimum Biosolution B.V., Hollanda), AMV(avian myeloblastosis virus) Reverse Transcriptase enzimi (Roche Diagnostics, GmbH,Mannheim, Germany), Roche Applied Science LightCycler DNA Mater SYBR Green I kiti(Katalog No: 12 015 099 001), total RNA izolasyon kiti (QIAGEN QIAamp RNA Blood Mini Kit, Katalog No: 52304).

3.2. Metodlar

3.2.1. Polen ve Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması

Polen ve Propolis numuneleri S.S. Trabzon Merkez Tarımsal Kalkınma Kooperatifi tarafından temin edildi. Propolis numuneleri Trabzon'dan, polen numuneleri ise Türkiye'nin çeşitli yörelerinden karışık olarak toplanarak hazırlanmıştır.

3.2.1.1. Propolisin DMSO ve Su Ekstraktlarının Hazırlanması

-80 C^ode dondurulmuş olan Trabzon-Vakfıkebir ilçesinden toplanan propolis örnekleri rendelenip tekrar -80 C^ode donduruldu. Rendelenen propolis blenderde toz haline getirildi. 5'er gram toz propolis 20 mL saf DMSO veya su ile çözüldü. İyice vortekslelendikten sonra 60 C^o 'de 150 rpm'de sürekli çalkalanarak 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 4000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatanı tam çökmeyen partikül içeren propolisin sulu ekstraktları tekrar 10000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar daha sonra kullanılmak üzere aligotlanıp +4C^o,de, karanlıkta saklandı.

3.2.1.2. Polenin DMSO ve Su Ekstraktlarının Hazırlanması

Türkiyenin çeşitli illerinden (Balıkesir(Beydağ), Bayburt(Demirözü), Erzurum(Arıbahçe) ve Trabzon) toplanan karışık polen değirmende(öğütücü) öğütüldü. 5'er gram toz polen 20 mL saf DMSO ve su ile çözüldü. İyice vortekslelendikten sonra 60 C^o 'de 150 rpm'de sürekli çalkalanarak 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 4000

rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatantlar daha sonra kullanılmak üzere alıgotlanıp +4C⁰'de, karanlıkta saklandı.

3.2.2. Hücre Kültürü

Bütün hücre kültür çalışmaları hücre kültür kabininde (air flow kabin) steril ortamda gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. PC-3 Hücre Serilerinin Çoğaltılması

PC-3 prostat kanseri hücre serileri GATA Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalından temin edildi. PC-3 hücreleri L-Glutaminli, % 10 FBS, % 1 penisilin + streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde %5 CO₂ ortamında 37C⁰ de T-25 ve T-75 lik flasklarda inkübatörde çoğaltıldı.

3.2.2.2. PC-3 Hücre Serilerinin Pasajlanması

Büyütülen hücreler flask yüzeyinin % 70-80'lik kısmını kapladıktan sonra hücre pasajlaması yapıldı. Pasajlama için öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyer uzaklaştırıldı. 5 ml PBS ile hücreler yıkandıktan sonra üzerlerine 1-2 ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. Eklenen tripsin 30 s hücre üzerinde gezdirildikten sonra uzaklaştırıldı ve flasklar inkübatörde 2 dk bekletildi. İnkübasyon sonrası 5'er ml RPMI-1640 ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı. Hücre sayımı yapıldıktan sonra T-25 flasklara uygun sayıda(1.5 X10⁵) hücre aktarıldı ve toplam besiyer hacmide 10 ml'ye tamamlandı.

3.2.2.3. PC-3 Hücre Serilerinin Sayımı

Tripsinizasyon sonrası falkon tüplere toplanan hücrelerin 12 µl'si 12 µl tripan blue ile karıştırılarak hematositometre camına aktarıldı. Işık mikroskobu altında canlı hücreler sayıldı.

3.2.2.4. PC-3 Hücre Serileri için Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücre canlılığı için kullanılan MTT testi(74) yapacağımız ileriki çalışmalarda hangi ekstrakt konsantrasyonlarını kullanacağımıza karar vermek için yapıldı.

T-75 lik flaskı kaplayan PC-3 hücreleri, tripsinizasyon ile kaldırıldı. 400 g de 6 dak santrifüjlenerek, çöken pellet, 5 mL RPMI-1640 ile çözümlenerek, 0,2 mL si hücre sayımı için ayrıldı.

100 µL tripan blue ile 100 µL hücre süspansiyonu karıştırılarak, thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Hücre sayısı 1.04×10^6 /ml olarak bulundu. Hücre karışımı 10 mL'ye RPMI-1640 ile tamamlanarak, Steril 96 kuyucuklu pleytlere kör kuyucukları hariç kuyucuk başına 20 µL hücre süspansiyonu yani 1×10^4 hücre eklendi. Kör kuyucuklarına sadece 200 µL DMEM/F:12 konulurken, diğer kuyucuklara hücre süspansiyonu ile birlikte 170µL DMEM/F:12 eklendi. Pleytler, hücrelerin yapışması için 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon bitiminde, kontrol hücreleri ve kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara uygun ekstraktlardan (0, 5, 10, 20 µg propolis-su/ml, 0, 5, 10, 20 µg propolis-DMSO/ml, 0, 100, 150, 200 µg polen-su/ml, 0, 100, 150, 200 polen-DMSO/ml) 10 ar µL eklendi ve tekrar 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. 0 konsantrasyonlar kontrol hücreleri olarak kabul edildi ve ekstrakt yerine kuyucuklara 10µl DMAM/F:12 eklendi. 24 saatlik inkübasyonun bitmesine 4 saat kala her kuyucuğa 10 ar µL 3-(4,5-dimetilthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) eklenerek inkübasyona devam edildi. 24 saatlik inkübasyonun bitiminde kuyucuklara 200 er µL DMSO:Etanol (1:1) karışımı eklendi. Pleytler oda ısısında bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde 570 nm de absorbansları belirlendi.

Hesaplama: (74)

% Canlılık: $[(A \text{ örnek} - A \text{ kör}) / (A \text{ kontrol} - A \text{ kör})] \times 100$ formülü ile hesaplandı.

3.2.2.5. Hücrelerin ekstraktlarla muamele edilmesi

1.5×10^5 hücre T-25 flasklara ekildi ve 24 saat inkübatörde çoğaltıldı. Hücreler, Propolis ve polenin sulu ve DMSO'li ekstraktlarını içeren besiyerlerle Tablo8'de görüldüğü gibi muamele edildi ve 24 saat %5 CO₂ 37C⁰ inkübasyona bırakıldı. Her örnek için çift çalışma yapıldı.

Tablo 8. PC-3 prostat kanseri hücre serilerine ilave edilen polen ve propolis ekstraktları

Şişe No	Propolis-Su (20µg/ml)	Propolis-DMSO (20µg/ml)	Polen-Su (150µg/ml)	Polen-DMSO (150µg/ml)	RPMI-1640	FBS
1, 6	0.5ml	-	-	-	8.5ml	1ml
2, 7	-	0.5ml	-	-	8.5ml	1ml
3, 8	-	-	0.5ml	-	8.5ml	1ml
4, 9	-	-	-	0.5ml	8.5ml	1ml
5, 10	-	-	-	-	9ml	1ml

3.2.3. Total RNA Ekstraksiyonu

Total RNA ekstraksiyonu için QIAGEN (GmbH, Hilden, Germany) firmasının QIAamp RNA Blood Mini Kit (Cat.No. 52304) kullanıldı. Üretici firma tarafından önerilen protokol ile ekstraksiyon aşağıdaki gibi yapıldı.

Total RNA Ekstraksiyon Protokolü

Tüm basamaklardaki santrifüj ve protokol işlemleri oda ısısında (15-25 C⁰) hızlıca çalışılarak yapıldı.

1-Hücreleri Toplamak

Monolayer olarak büyüyen hücreler tripsin ile muamele edilerek kaldırıldı ve toplandı.

1a-Tripsin ile muamele: Flasktaki hücre mediumu aspire edilerek atıldı ve hücreler PBS ile yıkayıp tekrar aspirasyon yapılarak PBS uzaklaştırıldı. Hücrelere tripsin eklenerek tüm flask yüzeyinde tripsin gezdirildi. Flasktan kaldırılan hücrelere medium eklendi ve hücreler 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Falkon tüp 300xg 'de 5 dk santrifüj edilerek pelletin dibine çökmesi sağlandı. Süpernatant tamamen aspire edildi. Süpernatant tamamen aspire edilmezse lizis aşaması inhibe olacak ve hücre lizatını seyreletecektir. Aspirasyon sonrası 2. basamağa geçildi.

2-Ekstraksiyon Tamponu eklenerek Hücrelerin Parçalanması

Ekstraksiyon tamponu (RLT tamponu) kullanılmadan hemen önce 1ml'sine 10µl β-merkaptotanol eklendi. Pellet halindeki hücreler için hücre sayısına bağlı olarak 350µl RLT-βmerkaptotanol karışımı eklendi.

Hafifçe vortekslenen hücre pelletlerinin tamamen kaybolması sağlandı. Basamak 3'e geçmeden önce herhangi bir hücre pelletinin görülmemesi gereklidir.

3-Hücre lizatları 2ml'lik toplama tüpleri içerisindeki QIAshredder spin column içine aktarıldı ve 2 dk maksimum hızda santrifüj edildi. QIAshredder spin column'lar atılarak homojenize olmuş lizatlar saklandı ve 4. basamağa geçildi. Eğer çok fazla hücre kullanılmışsa lizatlar oldukça viskoz bir hal alacaktır.

4-% 70'lik etanolden hücre lizatına eş hacimde çekildi (genelde 350-600µl) ve homojenize olmuş hücre lizatına eklendi, pipetle iyice karıştırıldı. Bu basamakta santrifüj yapılmaz.

5-Örnekler 2ml'lik toplama tüpleri içerisindeki QIAamp spin column'a dikkatlice pipetlendi. 15 sn 8000xg'de santrifüj yapıldı. Maksimum yükleme hacmi 700µl'dir.

6-QIAamp spin column'u yeni 2ml'lik toplama tüperine transfer edildi. QIAamp spin column üzerine 700 µl RW1Tamponu yıkama işlemi için eklendi ve 15s \geq 8000xg 'de santrifüj edildi.

7- QIAamp spin column'u yeni 2ml'lik toplama tüperine transfer edildi. Spin column üzerine yıkama işlemi için 500µl RPE Tamponu pipetlendi ve \geq 8000xg'de 15 sn santrifüjlendi. Kit içerisindeki konsantre RPE tamponuna kullanmadan önce 4 hacim (%96-100)etanol eklendi.

8-QIAamp spin column dikkatlice açıldı ve 500µl RPE Tamponu eklendi. Başlık kapatıldı ve 20000xg'de 3 dakika santrifüj edildi. Bu aşamadan hemen sonra basamak 9'a geçildi.

9-QIAamp spin column 1.5 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı ve 30-50µl RNAaz-free su QIAamp membran üzerine pipetlendi. Elüe etmek için 1 dakika boyunca \geq 8000xg 'de santrifüj edildi.

3.2.4. Primerlerin Sentezlenmesi

Tablo 9'da verilmiş olan primer dizileri Hollanda'da Ocimum Biosolution B.V. firmasına sentezlettilerildi.

Tablo 9. Na_v1.5, Na_v1.7 ve β-Aktin'in forward ve reverse primer dizileri

VGSCα izoformu	Primer Adı	Dizi	T _A (C ⁰)	Ürün boyutu(nt)
Na _v 1.5	hH1	5'-CAT CCT CAC CAA CTG CGT GT-3'(570-589)	55	509
Na _v 1.5	hH2	5'-CAC TGA GGT AAA GGT CCA GG-3'(1059-1078)	55	
Na _v 1.7	HNE1	5'-TAT GAC CAT GAA TAA CCC GC-3'(474-493)	50	389
Na _v 1.7	HNE3	5'-TCA GGT TTC CCA TGA ACA GC-3'(843-862)	50	
β-Aktin	Hb-actinF	5'-CAC TGA GGT AAA GGT CCA GG-3'		
β-Aktin	Hb-actinR	5'TGT CAA AGT TGA TCT TCA CG-3'		

3.2.5. cDNA Elde Edilmesi

Katalog No: 10109 118 001 olan Roche Diagnostics (GmbH, Mannheim, Germany) firmasına ait AMV(avian myeloblastosis virus) Reverse Transcriptase enzimi kullanıldı. Tablo 10'daki gibi gerekli pipetlemeler PCR ependorf tüplerine yapıldı. Reaksiyon için toplam hacim 20 µl'ye ayarlandı. cDNA oluşumu için 42C⁰'de Thermalcyler cihazında (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems USA) 40 dk inkübe edildi. cDNA örnekleri kullanılabildiği kadar +4C⁰ 'de muhafaza edildi.

Tablo 10. Na_v1.5, Na_v1.7 ve β-Aktin cDNA'sı elde etmek için yapılması gereken pipetlemeler.

	Konsantrasyon	Hacim (Örnek Başına)
Tampon	5x	4µl
dNTP	2mM	5µl
Reverse Primer	10 pmol	2.5µl
Enzim(AMV)	10 U/µl	0.5µl
Su		3µl
RNA	-	5µl

dNTP ler Fermentas Life Sciences firmasından 100 mM'lık konsantrasyonlar halinde temin edildi.

3.2.6. RTPCR(Real Time PCR)

RT-PCR çalışması için Katalog No: 12 015 099 001 olan Roche Applied Science LightCycler DNA Master SYBR Green I kiti kullanıldı. LightCycler DNA Master SYBR Green I PCR reaksiyon karışımı olarak kullanıma hazırdır. Bu ürün LightCycler 2.0 System de SYBR Green I tayin formatının kullanıldığı 20µl'lik cam kapillerler içinde RT-PCR çalışmalarına spesifik olarak dizayn edilmiştir. Güvenilir, üstün performanslı, verimliliği yüksek, kontaminasyon riski minimum olan bu kitle çalışırken ek olarak cDNA, PCR primerleri ve ihtiyaç halinde ek MgCl₂'e ihtiyaç duyulmaktadır.

3.2.6.1. Test Prensibi

PCR ürünlerinin üretimi SYBR Green I floresans sinyalinin ölçülmesi ile tayin edilebilir. SYBR Green I DNA çift heliksindeki büyük ve küçük oyuklara girer. Solüsyondaki bağlanmamış boya çok düşük floresans yapar ancak 530 nm dalga boyunda floresans DNA'ya bağlanma yükseldikçe çarpıcı bir şekilde artmaktadır. PCR süresince SYBR Green I floresansındaki artış direkt olarak üretilen çift zincirli DNA oranına bağlı olarak artmaktadır. SYBR Green I boyası çok stabil olduğu(30 amplifikasyon döngüsünde sadece %6'sının aktivitesi kaybolur) ve LightCycler cihazı optical filtresi uyarım ve emisyon dalga boylarını karşılaştırabildiği için total DNA ölçüleceği zaman seçilen bir reaktiftir.

3.2.6.2. RTPCR Protokolü

LightCycler 2.0 System cihazında SYBR Green I ile real time PCR yaparken DNA tayininin ana basamakları:

1- Amplifikasyonun(Büyütme) başlangıcında, reaksiyon karışımı denatüre DNA, primerleri ve boyayı içerir. Bağlanmamış boya molekülleri bilgisayar analizi sırasında egale edilecek düzeyde floresans yapar.

2- Primerlerin annealingi(PCR'da DNA'ların çoğaltılması aşamasında kullanılan termo cycle'daki birinci aşama). Bu aşamada primerlerin ortamda bulunan hedef DNA komponenti ile birleşme ve tekrar ayrıştırma olayı sonrasında, çok az boya molekülü çift

zincire bağlanabilir. DNA'ya bağlanma sonucunda uyarıma bağlı olarak SYBR GreenI moleküllerinin ışığı yaymasında çarpıcı bir artış olur.

3- Elongasyon(Uzama) sürecinde, daha çok boya yeni sentezlenen DNA'ya bağlanır. Reaksiyon monitörden sürekli izlenirse flouresandaki artış real time süresince gözlenebilir. Gelecek ısıtma döngüsü için DNA denatürasyonuna bağlı olarak boya molekülleri salınırlar ve flouresans sinyali düşer.

4- Her PCR döngüsünün elongasyon basamağının sonunda flouresans ölçümü amplifiye olmuş DNA'nın miktarındaki artışı monitörden izleyebilmek için yapılır. Sadece istenen PCR ürününün amplifiye olduğundan emin olmak için melting curve analizinin PCR'dan sonra yapılabilir. Melting curve(Erime eğrisi) analizinde reaksiyon karışımı yavaşça 95C⁰'ye kadar ısıtarak çift zincirli DNA eritilir ve SYBR Green I flouresansındaki sürekli azalış tespit edilir. Flouresandaki bu azalış erime (melting) piki olarak monitörden görülebilir. Her bir erime piki DNA ürün partikülünün karakteristik erime sıcaklığını(Tm) gösterir. Tm sıcaklığında DNA'nın %50'si çift zincirli %50'si tek zincirlidir. dsDNA'nın Tm derecesini belirlemedeki en önemli faktör fragmentin uzunluğu ve GC içeriğidir. PCR tek bir amplikasyon yaparsa melting curve analizi tek bir erime piki verir. Eğer primer-dimer veya diğer non-spesifik ürünler varsa ek erime pikleri görülecektir.

cDNA'ları oluşturulan her bir örnek için Tablo11'deki gibi pipetlemeler (LightCycler Capillaries) kapiller uçlara yapıldı. 5 s'lik spindown işlemi gerçekleştirildikten sonra Light Cycler 2.0 (Roche, Germany) cihazında Tablo 12'deki program eşliğinde RTPCR yapıldı. Negatif Kontrol her örnek için çalışıldı. Negatif Kontroller için Tablo 11'deki pipetlemeler cDNA hariç aynen yapıldı. cDNA yerine kit içerisinden çıkan PCR-grade sudan 5 µl kullanıldı.

Tablo 11. RTPCR için kapillere yapılan pipetlemeler

	Konsantrasyon	Hacim (Örnek Başına)	Negatif Kontrol
Forward Primer	10 pmol	1µl	1µl
Reverse Primer	10 pmol	1µl	1µl
SYBR Gren (LightCycler DNA Master SYBR Green I)	10X	2µl	2µl
cDNA	-	5µl	-
Su	-	8.6µl	8.6 + 5µl
MgCl ₂	3mM	2.4µl	2.4µl

Tablo 12. RTPCR çalışmasında Light Cycler 2.0 System PCR Run cihazında kullanılan PCR parametreleri

Analiz Modu	Döngüler	Segment	Hedef Sıcaklık	Süre	Elde Etme Modu
Denatürasyon					
-	1	1	95C ⁰	30s	-
Amplifikasyon					
Kantitasyon	45	Denatürasyon	95C ⁰	0 s	-
		Annealing	Na _v 1.5 için 55 C ⁰ , Na _v 1.7 için 50C ⁰	15s	-
		Uzama	72C ⁰	20s	Tek
Erime Eğrisi					
Erime Eğrisi	1	Denatürasyon	95C ⁰	0s	-
		Annealing	60C ⁰	15s	-
		Erime	95C ⁰	0s	Devamlı
Soğuma					
-	1		40C ⁰	30s	-

4. BULGULAR

4.1. MTT Çalışma Sonuçları ile Uygun Polen, Propolis Konsantrasyonlarının Seçilmesi

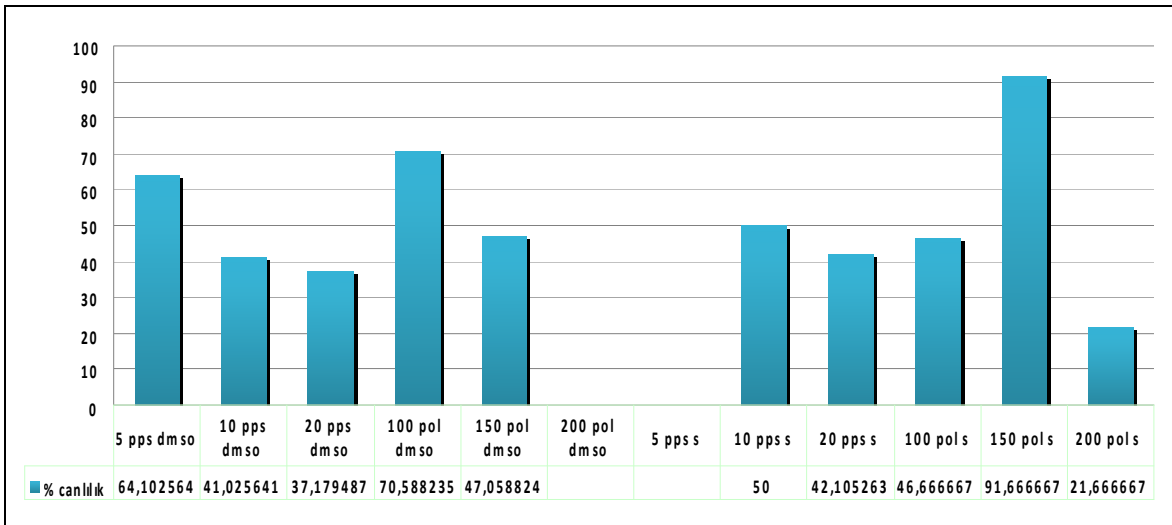
PC-3 hücre serileri MTT çalışmasında çeşitli konsantrasyonlardaki polen ve propolisin sulu ve DMSO'lu ekstraktlarıyla muamele edildikten sonra 570 nm'de yapılan absorbans okumaları sonucunda (her bir konsantrasyonda örnek, kör ve kontrol okumaları 16'şar kere tekrarlanarak ortalamaları alındı) Tablo 13 ve Tablo 14'deki sonuçlar elde edilerek Şekil 10'daki %canlılık ve ekstrakt grafiği çizildi. 250 mg/ml stok polen ve propolis ekstraktlarında dilisyonlar DMEMF12 ve RPMI 1640 hücre besiyerleri ile yapıldı ve DMSO'lu örneklerde son %DMSO oranı hücrelere toksik olmaması için %1'in altına indirildi.

Tablo 13. PC-3 prostat kanseri hücre serilerinde polenin sulu ve DMSO'lu ekstraktlarıyla yapılan MTT çalışma sonuçları (n=16)

Polenin sulu ve DMSO ekstraktları	100µg/ml polen-su	150µg/ml polen- su	200µg/ml polen- su	100µg/ml polen-DMSO	150µg/ml polen-DMSO	200µg/ml polen-DMSO
%Canlılık	46.67	91.67	21.67	70.59	47.06	-

Tablo 14. PC-3 prostat kanseri hücre serilerinde propolisin sulu ve DMSO'lu ekstraktlarıyla yapılan MTT çalışma sonuçları (n=16)

Propolisin sulu ve DMSO ekstraktları	5µg/ml propolis-su	10µg/ml propolis- su	20µg/ml propolis- su	5µg/ml propolis-DMSO	10µg/ml propolis-DMSO	20µg/ml propolis-DMSO
% Canlılık	-	50.00	42.10	64.10	41.02	37.18



Şekil 10. PC-3 hücre serilerinde polen ve propolisın sulu ve DMSO’lu ekstraktlarıyla yapılan MTT çalışma sonuçları.

Tablo 13 ve Şekil 10’den da görüldüğü gibi polenin 150 µg/ml’lik polenin su ve DMSO ekstraktları sırasıyla % 91.67 ve % 47.06 oranında canlılığı etkiledi. Tablo 14 ve Şekil 10’a bakıldığı zaman ise propolisın 20 µg/l’lik sulu ve DMSO ekstraktlarının canlılığı sırasıyla % 42.10 ve %37.18 oranında etkiledi. Genel olarak % canlılık % 50’nin altında olduğu için bu konsantrasyonlarla muamele edilmiş PC-3 prostat kanser hücre serilerinde VGSC Na_v1.5 ve Na_v1.7 α izoformlarının RT-PCR çalışmaları için kullanıldı.

4.2. RTPCR Ön Çalışmaları

PC-3 prostat kanser hücrelerinden T-25 flask başına yaklaşık 1.5×10^5 hücre sayılıp ekildikten sonra 24 saat büyümeye bırakılıp MTT çalışmaları sonucu seçilen propolis DMSO 20µg/ml, propolis-su 20µg/ml, polen DMSO 150µg/ml, polen-su 150µg/ml ekstraktlarından 500’er µl son hacim 10ml olacak şekilde hücre besiyerlerine eklendi. Kontrol hücresi olarak hiçbir polen ve propolis ekstraktı ile muamele edilmemiş PC-3 prostat kanser hücresi kullanıldı. Tablo 15’de görüldüğü gibi kontrol, polen ve propolis ekstraktları ile muamele edilmiş PC-3 hücre serileri çift çalışılarak toplamda 10 T-25 hücre kültür flaskı kullanıldı. 24 saatlik inkübasyonun sonunda total RNA’lar QIAGEN (GmbH, Hilden, Germany)firmasının QIAamp RNA Blood Mini Kit (Cat.No. 52304) kit prosedürüne uygun olarak izole edildi. Total RNA’lardan VGSC Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 α izoformları ve normalizasyon işlemi için kontrol olarak β-Aktin’in cDNA’ları AMV

Reverse Transcriptase enzimi ile kit prosedürüne uygun olarak Thermalcyler cihazında üretildi. cDNA'ları elde edilen örnekler sırasıyla negatif kontrol(su), β -Aktin ve VGSC $Na_v1.5$ ve $Na_v1.7$ izoformlarının yurt dışında sentez ettirilmiş olan forward ve reverse primerleriyle RTPCR çalışması için ön denemeler yapıp optimizasyon sağlandı. Materyal ve Metod kısmında belirtilen çalışma prosedürü ile RTPCR çalışmaları Roche Applied Science LightCycler DNA Mater SYBR Green I kiti kullanılarak LightCycler 2.0 System, Roche cihazında çalışıldı.

Tablo 15. Polen ve propolis ekstraktları ile muamele edilmiş ve edilmemiş (kontrol) PC-3 prostat kanseri hücre serilerinin flask numaraları

Flask No	Muamele Edildiği Ekstrakt	Flask No	Muamele Edildiği Ekstrakt
1	20 μ g/ml propolis-su	6	20 μ g/ml propolis-su
2	20 μ g/ml propolis-DMSO	7	20 μ g/ml propolis-DMSO
3	150 μ g/ml polen-su	8	150 μ g/ml polen-su
4	150 μ g/ml polen-DMSO	9	150 μ g/ml polen-DMSO
5(Kontrol)	-	10(Kontrol)	-

4.3. PC-3 Hücre Serilerinin RTPCR Çalışma Sonuçları

Yapılan tüm denemelerde negatif kontrol kullanıldı. Beklendiği gibi tüm çalışmalarda negatif kontrolün cycle no'su çalışılan VGSC $Na_v1.5$ ve $Na_v1.7$ α izoformlardan ve β -Aktin'den daha geç çıkmıştır.

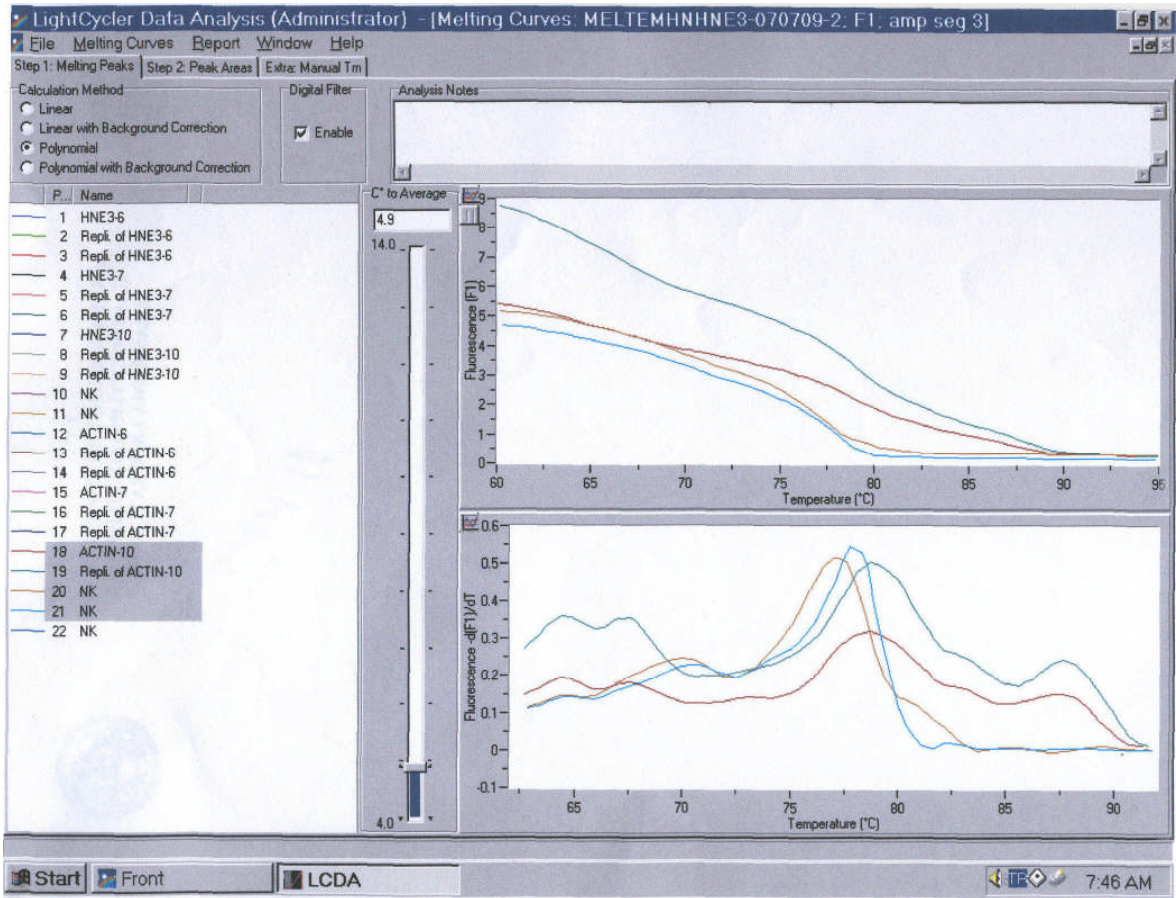
4.3.1. PC-3 Hücre Serilerinde β -Aktin İçin Yapılan RTPCR Çalışmasından Elde Edilen Sonuçlar

Tablo 16'da her flaskın kendi hücre sayısına bağlı olarak ürettiği β -Aktin ile elde edilen RTPCR ön sonuçları verilmiştir. Standart sapmaları oldukça düşük saptanan, normalizasyon için yapılan bu çalışma bir kontrol niteliğinde olup β -Aktin'lerin cycle no ortalamalarına bakıldığı zaman hepsinin farklı olduğu görülmektedir. Anormal olmayan bu farklılıklar hücre sayısına bağlı olarak değişmektedir. Diğer çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada örnekler 3'den fazla çalışılmıştır. Şekil 11'de hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş PC-3 hücre serilerinde (10 numaralı örnek) β -Aktin primerlerinin negatif

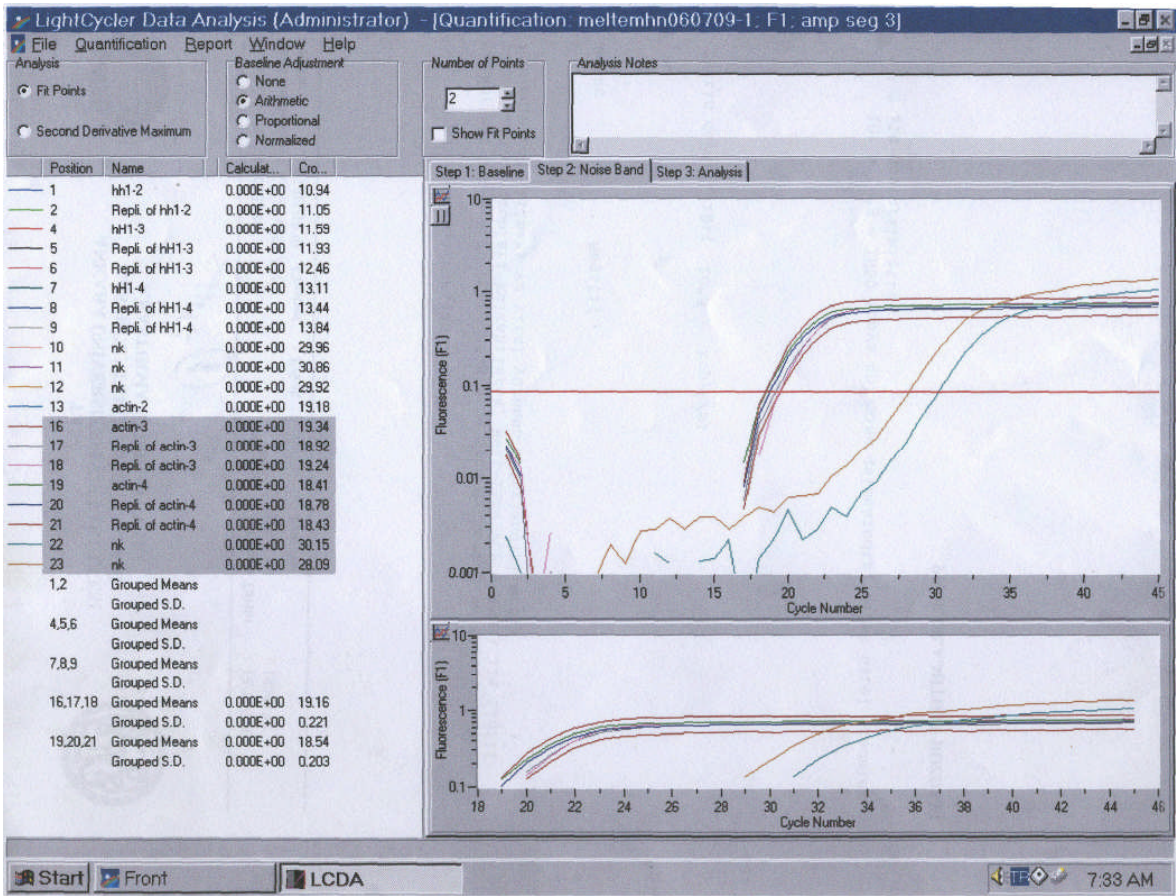
kontrol ile erime eğrisi analiz sonucu gösterilmiştir. Şekil 12 ve 13’de polen-DMSO ve polen-su ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücre serilerindeki (3 ve 4 numaralı örnek) β -Aktin primerlerinin negatif kontrol ile RTPCR analiz sonucu ve erime eğrisi analiz sonucu gösterilmiştir. Şekil 14 ve Şekil 15’de ise polen ve propolis ekstraktları ile muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde β -Aktin ve negatif kontrol ile ilgili yaptığımız RTPCR çalışması sonucu elde edilen erime eğrisi analiz grafiği gösterilmiştir.

Tablo 16. Çeşitli flasklardan elde edilen total RNA’lar ile yapılan RTPCR çalışmalarının β -Aktin için ön sonuçları

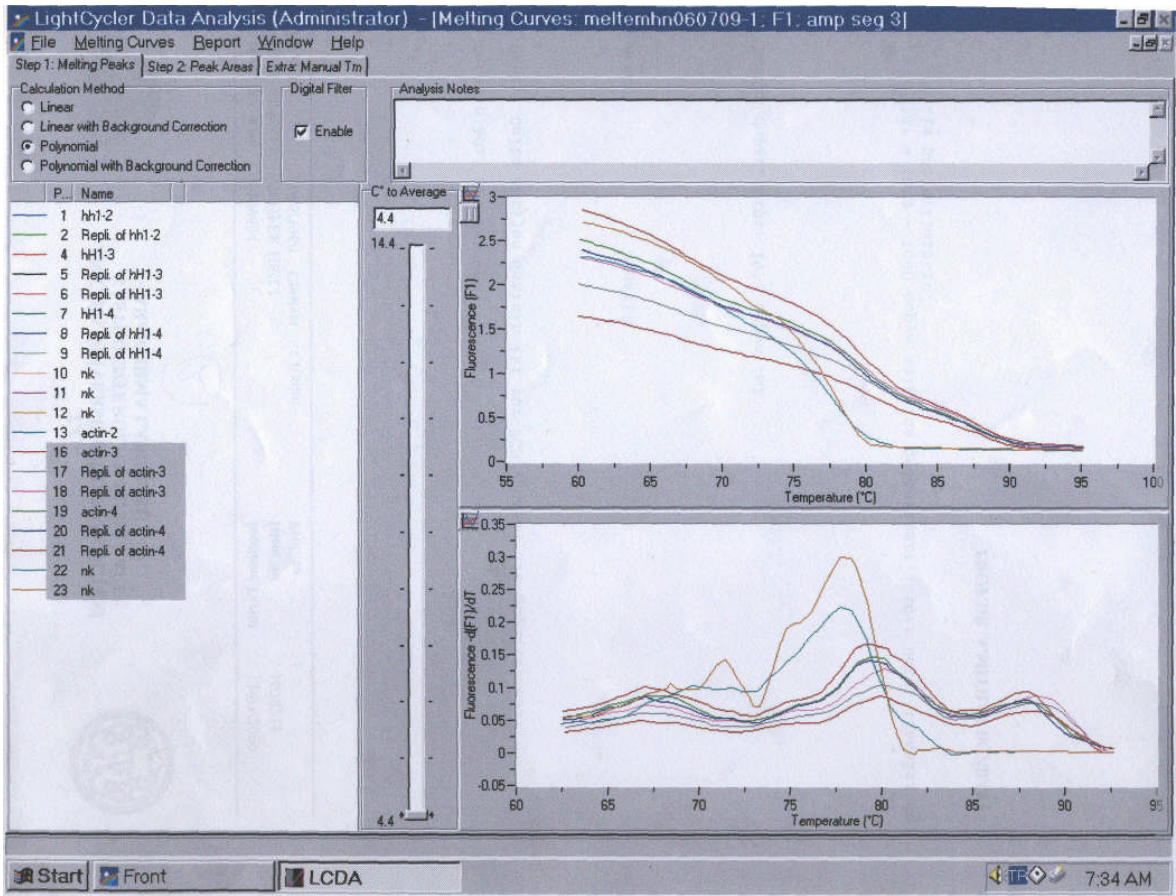
<u>Cycle No</u>			
Beta-Aktin	<u>Örnek NO: 5 ve 10 (Kontrol)</u>	Ortalama	Standart Sapma
	18,66	18,96	0,70
	18,97		
	18,97		
	19,45		
	17,97		
	19,83		
	18,09		
	19,74		
	<u>Örnek NO: 1 ve 6</u>		
	17,85		
	17,87		
	17,03	16,45	0,23
	<u>Örnek NO: 2 ve 7</u>		
	16,55		
	16,19	17,22	0,07
	16,61		
	<u>Örnek NO: 3 ve 8</u>		
	17,25	15,69	0,21
	17,27		
	17,14		
	<u>Örnek NO: 4 ve 9</u>	15,69	0,21
	15,49		
	15,68		
	15,9		



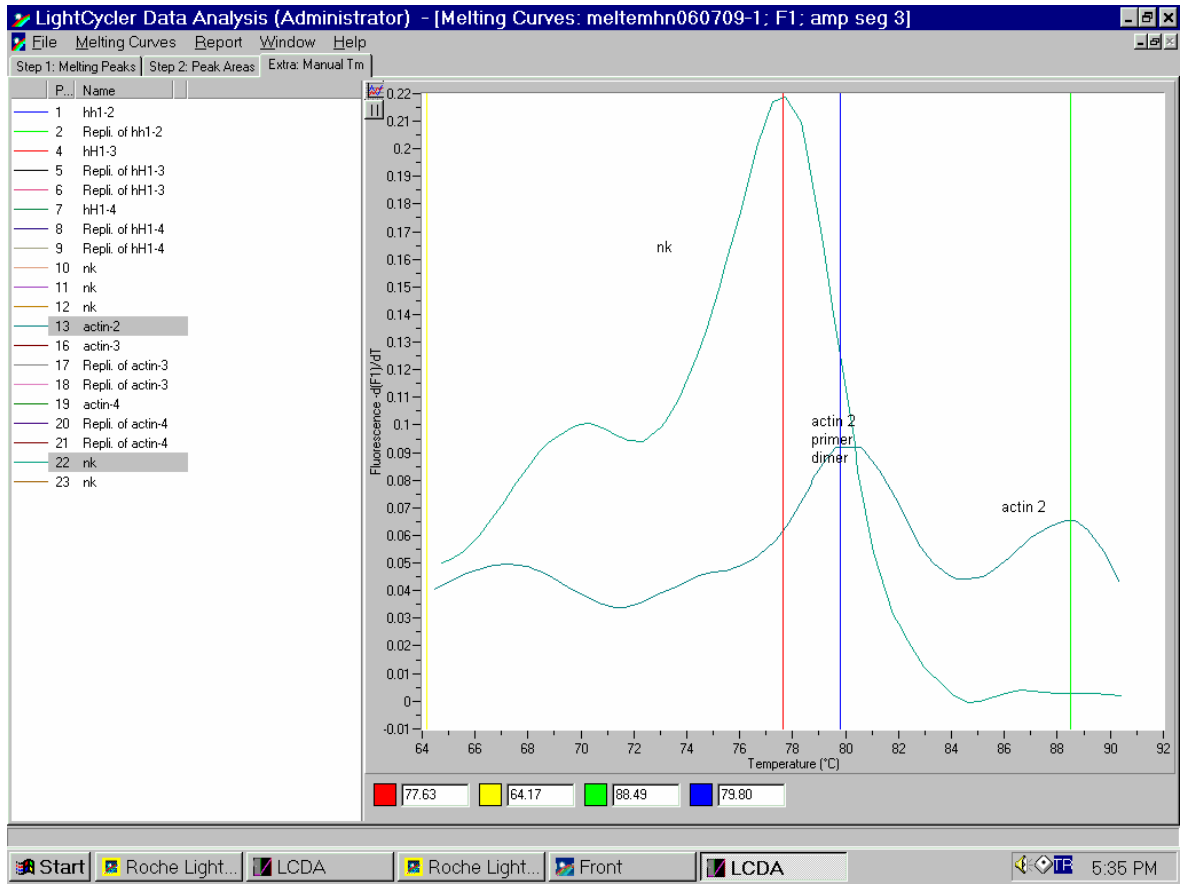
Şekil 11. Hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş PC-3 hücre serilerinde (10 numaralı örnek) β -Aktin primerlerinin negatif kontrol ile erime eğrisi analiz sonucu



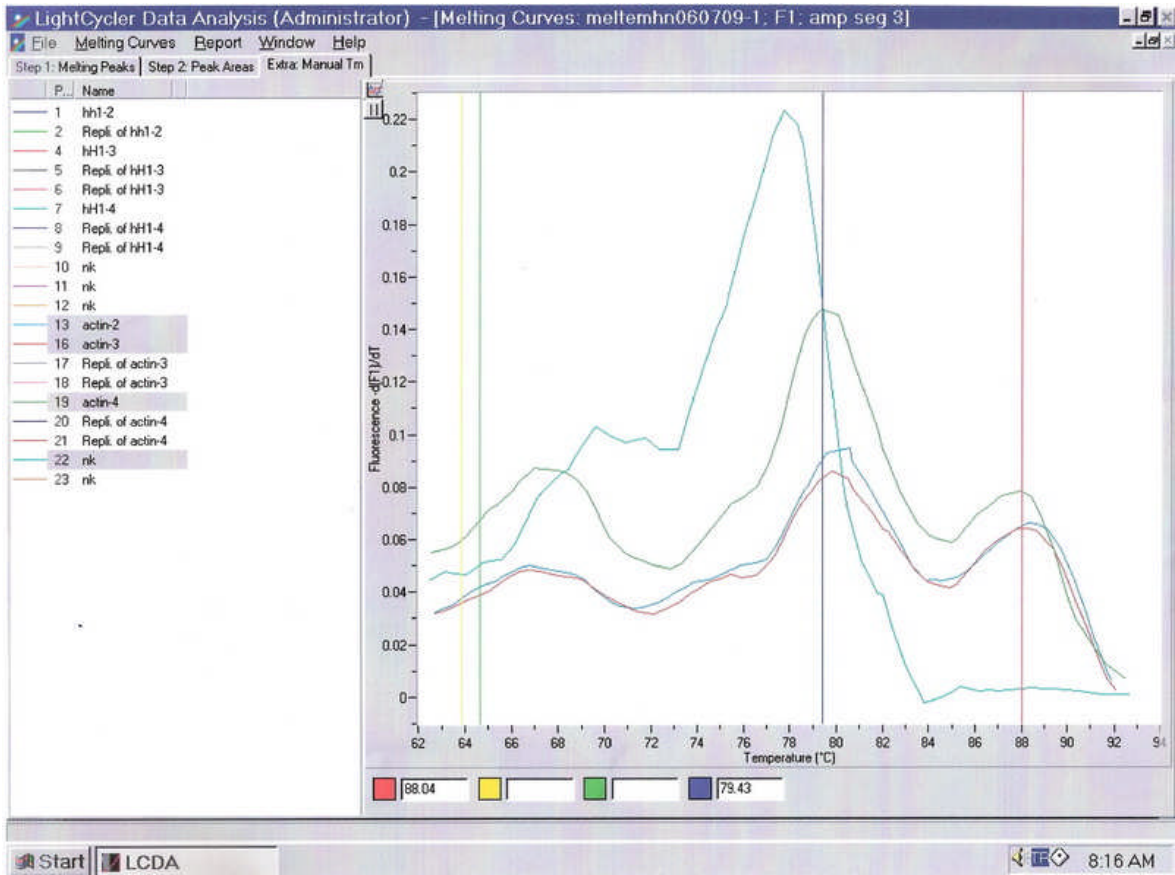
Şekil 12. Polen-DMSO ve polen-su ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücre serilerindeki (3 ve 4 numaralı örnek) β -Aktin primerlerinin negatif kontrol ile RTPCR analiz sonucu



Şekil 13. Polen-DMSO ve polen-su ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücre serilerindeki (3 ve 4 numaralı örnek) β -Aktin primerlerinin negatif kontrol ile erime eğrisi analiz sonucu



Şekil 14. Propolis-DMSO ekstraktı ile muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde(2 numaralı örnek) β -Aktin primerinin negatif kontrol ile erime eğrisi (melting curve) analiz sonucu



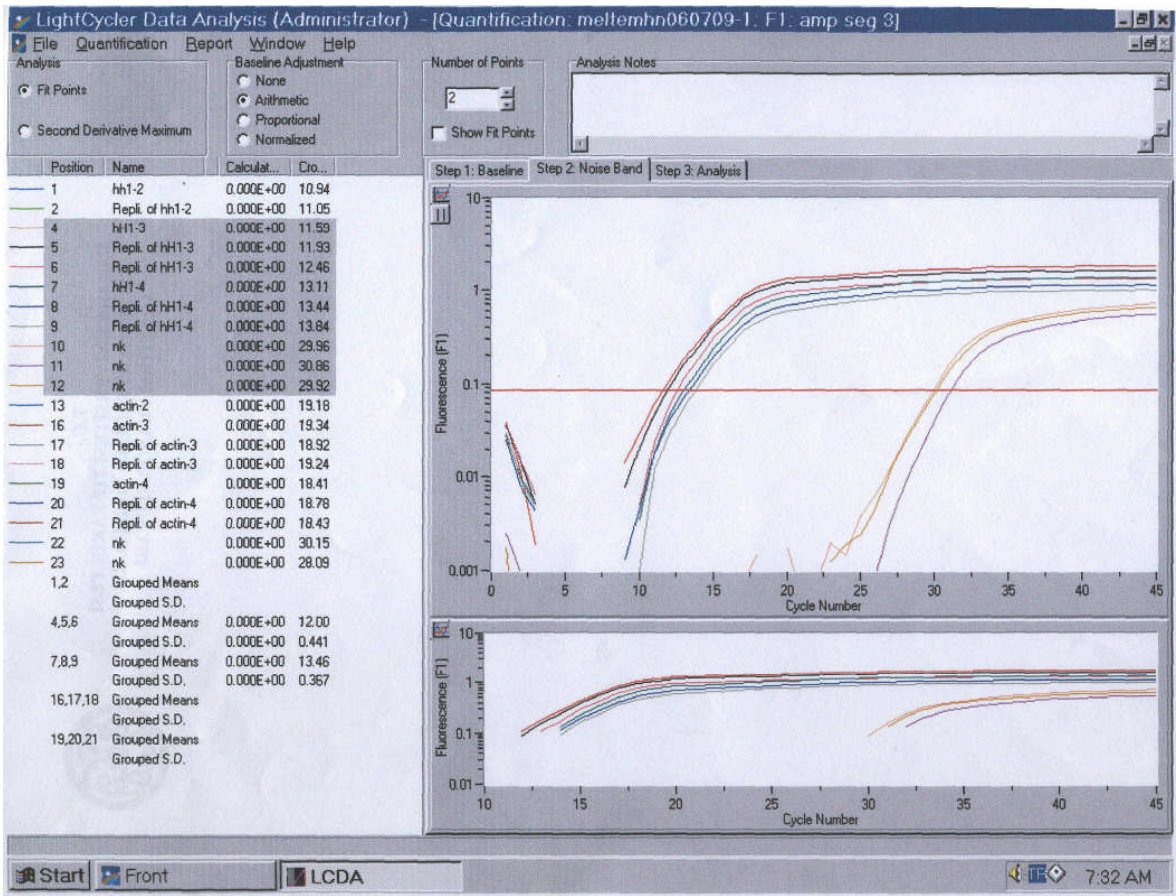
Şekil 15. Propolis-su, polen-DMSO ve polen-su ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde (2, 3 ve 4 numaralı örnek) β -Aktin primerinin negatif kontrol ile erime eğrisi analiz sonucu

4.3.2. PC-3 Hücre Serilerinde VGSC $Na_v 1.5 \alpha$ İzofomu İçin Yapılan RTPCR Çalışmasından Elde Edilen Sonuçlar

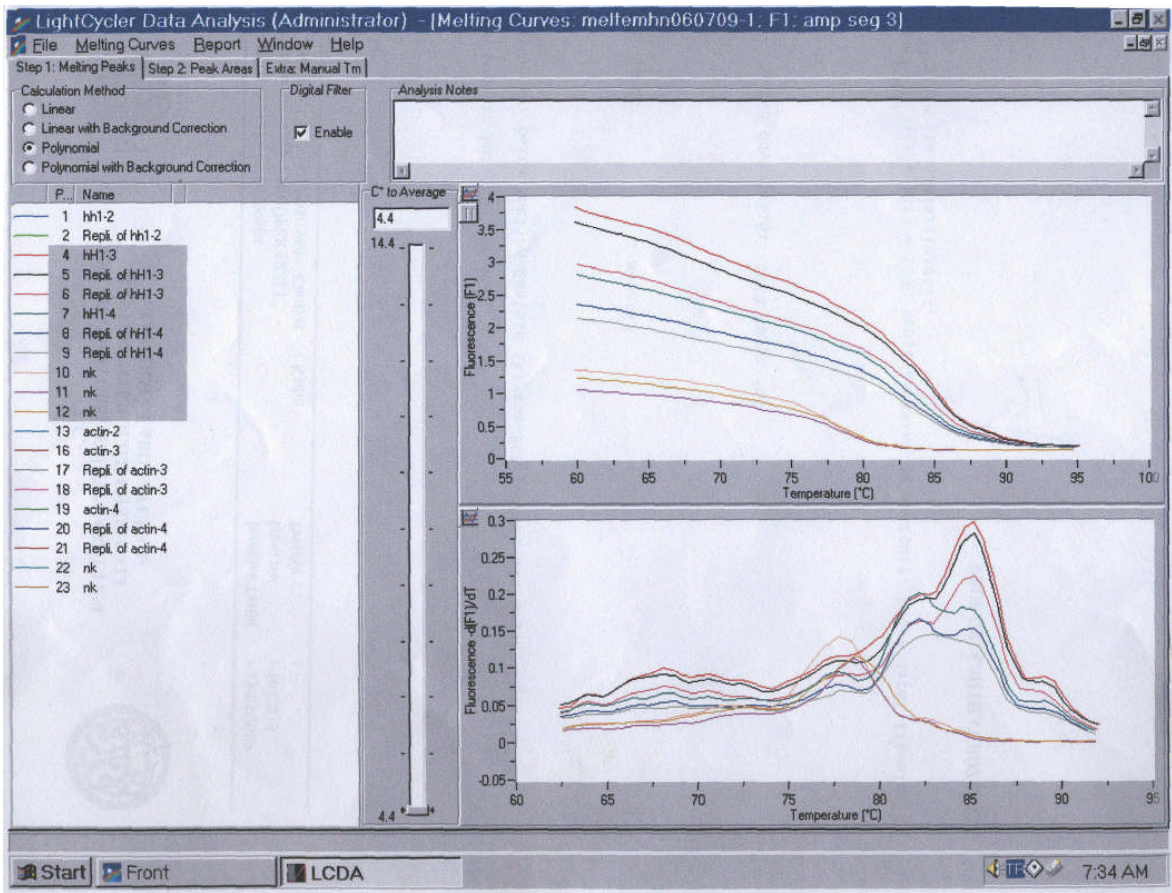
VGSC RTPCR çalışmalarında elde edilen piklerin çıkış anları(cycle no) $Na_v 1.5 \alpha$ izofomu için ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 17’de verilmiştir. 1 ile 6, 2 ile 7, 3 ile 8 ve 4 ile 9 aynı örnekleri içeren farklı flaslardan elde edilmiş sonuçlardır. Normalizasyonlar β -Aktin ile yapılmıştır. Şekil 16, 17, 18, 19, 20 ve 21’de polen ve propolis ekstraktları ile muamele edilmiş PC-3 hücrelerinde VGSC $Na_v 1.5 \alpha$ izofomu, β -Aktin ve negatif kontrollerle ilgili yapılan erime eğrisi ve RTPCR analizlerinin sonuçları gösterildi.

Tablo 17. VGSC Na_v 1.5 α izoformu için RTPCR çalışmalarında elde edilen ön sonuçlar

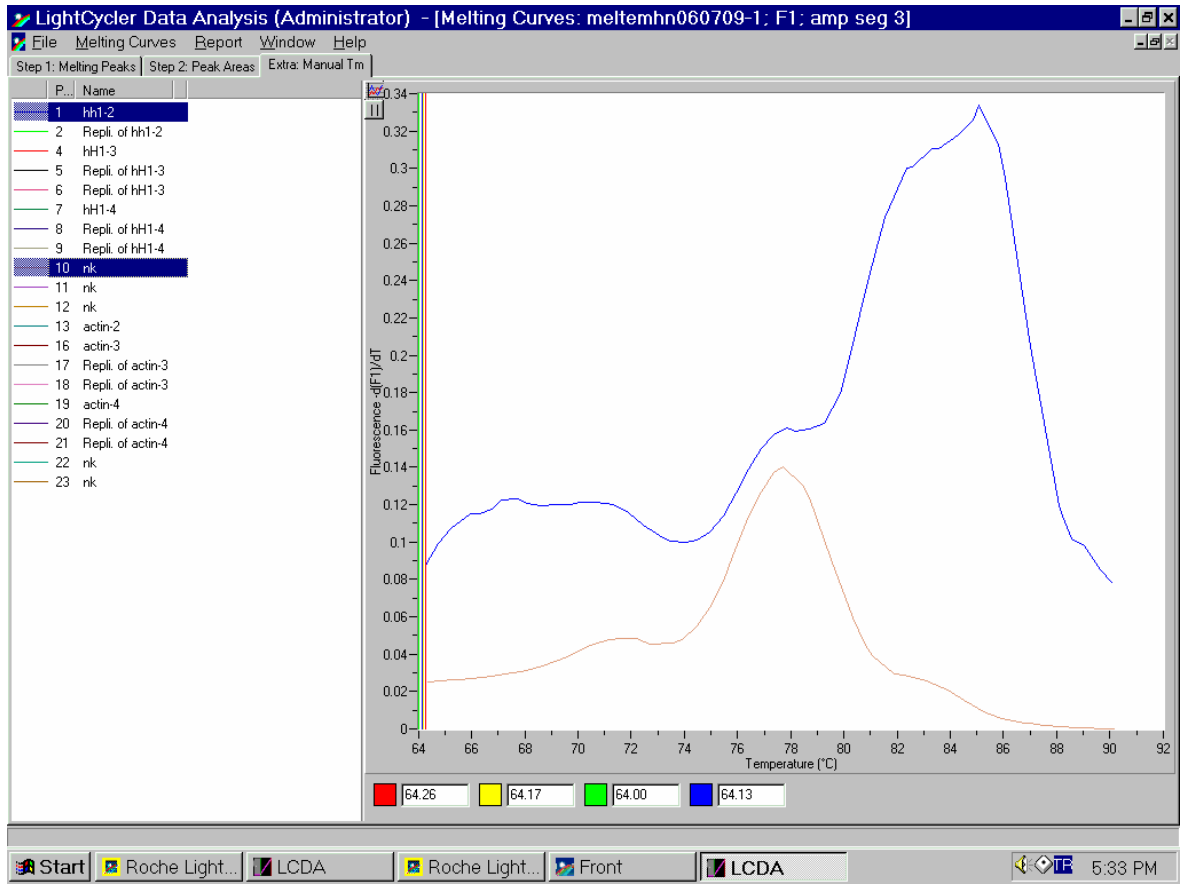
	<i>Cycle No</i>	Ortalama	Standart Sapma
Na _v 1.5	<u>Örnek NO: 1 ve 6</u>		
	14,4	12,24	1,88
	11		
	11,31		
	<u>Örnek NO: 2 ve 7</u>		
	10,39	10,50	0,15
	10,6		
	<u>Örnek NO: 3 ve 8</u>		
	10,95	11,35	0,41
	11,34		
	11,76		
	<u>Örnek NO: 4 ve 9</u>		
	12,35	12,78	0,44
	12,75		
	13,23		



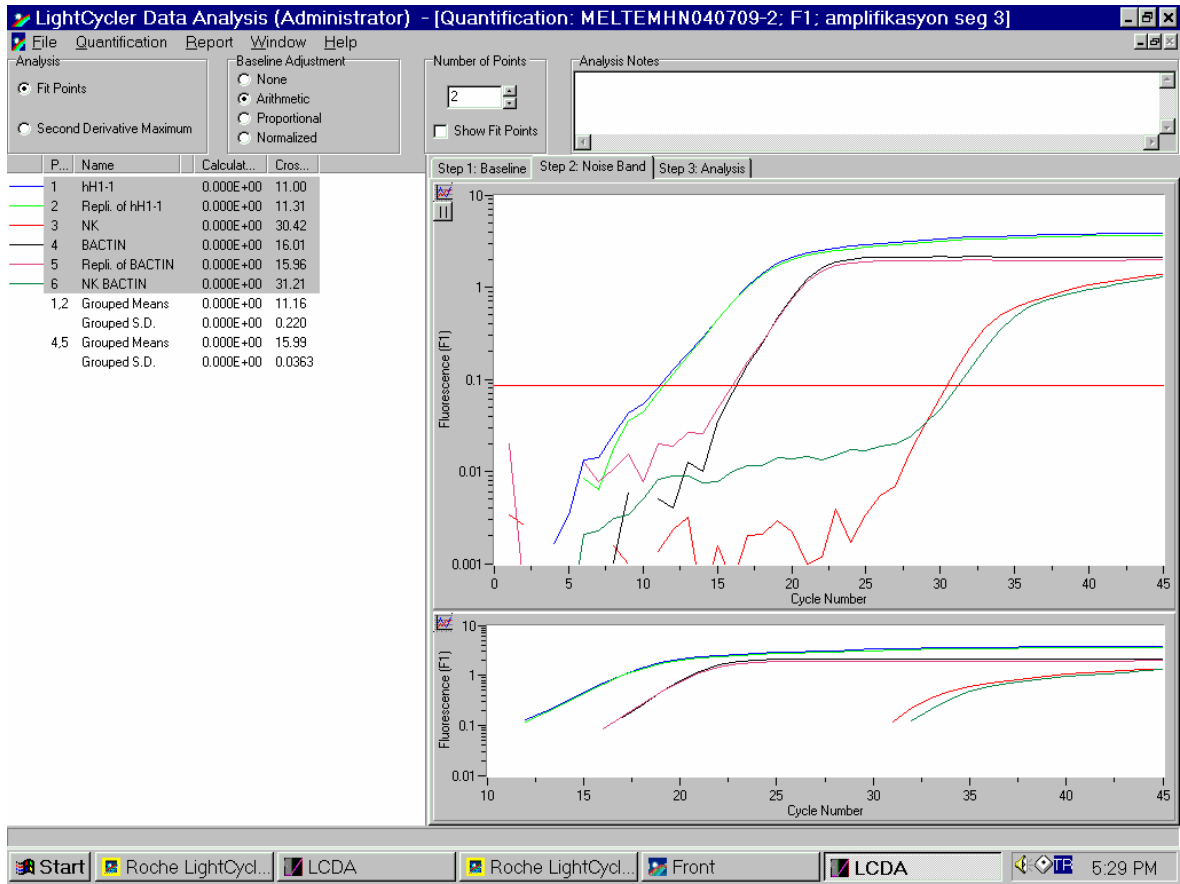
Şekil 16. Polen-DMSO ve polen-su ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde (3 ve 4 numaralı örnek) tekrarlı çalışılan VGSC Na_v 1.5 α izoformlarının ve negatif kontrolün RTPCR analiz sonucu



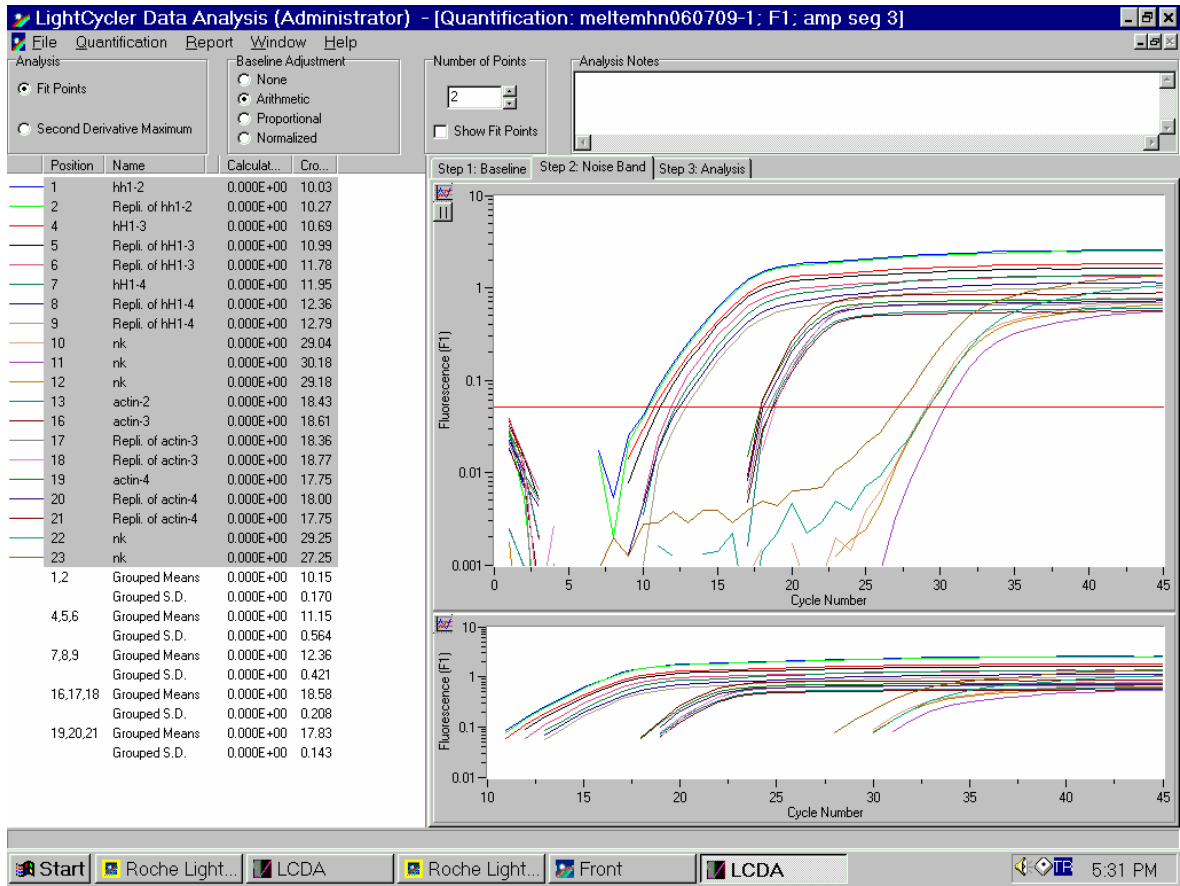
Şekil 17: Polen-DMSO ve polen-su ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde (3 ve 4 numaralı örnek) tekrarlı çalışılan VGSC Na_v 1.5 α izoformlarının ve negatif kontrolün erime eğrisi analiz sonucu



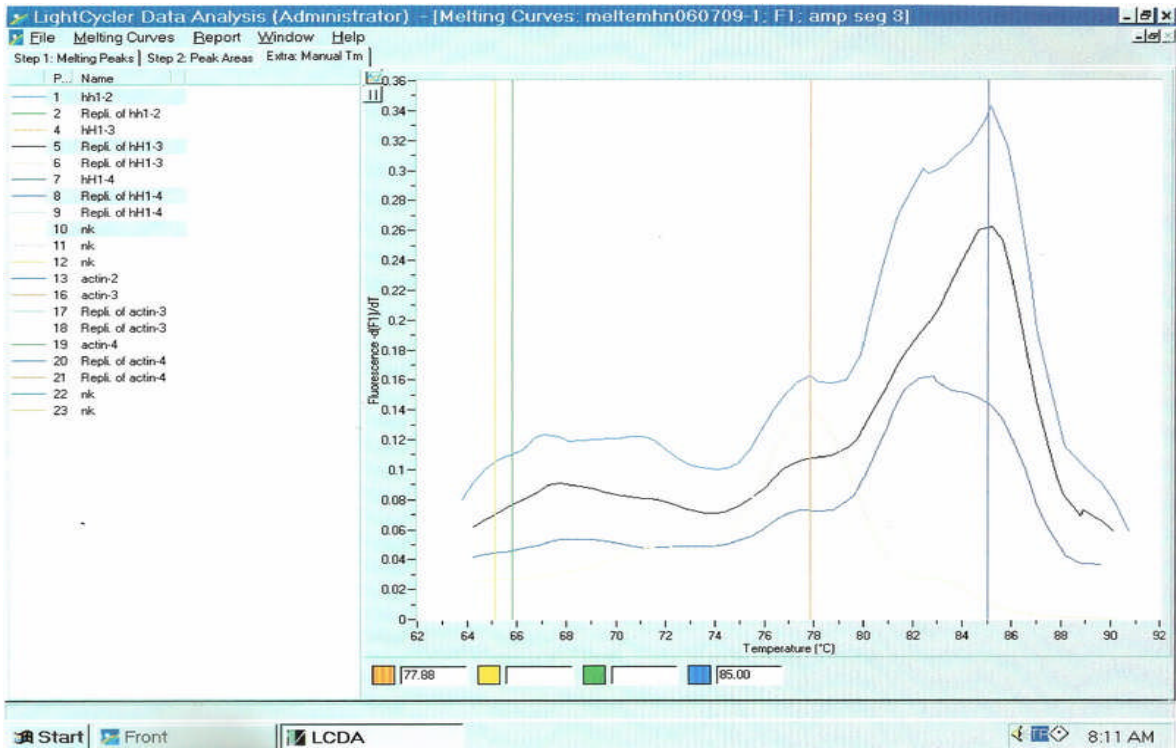
Şekil 18. Propolis-DMSO ekstraktı ile muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde (2 numaralı örnek) VGSC N_{av} 1.5 α izoformunun negatif kontrol ile erime eğrisi analiz sonucu



Şekil 19. Propolis su ekstraktları ile muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde (1 numaralı örnek) VGSC Na_v 1.5 α izoformu, β -Aktin ve negatif kontrollerinin RTPCR analiz sonucu



Şekil 20. Propolis-DMSO, polen-su, polen-DMSO ekstraktları ile muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde (2, 3 ve 4 numaralı örnekler) tekrarlı çalışılan VGSC $\text{Na}_v 1.5 \alpha$ izoformu, β -Aktin ve negatif kontrollerinin RTPCR analiz sonucu



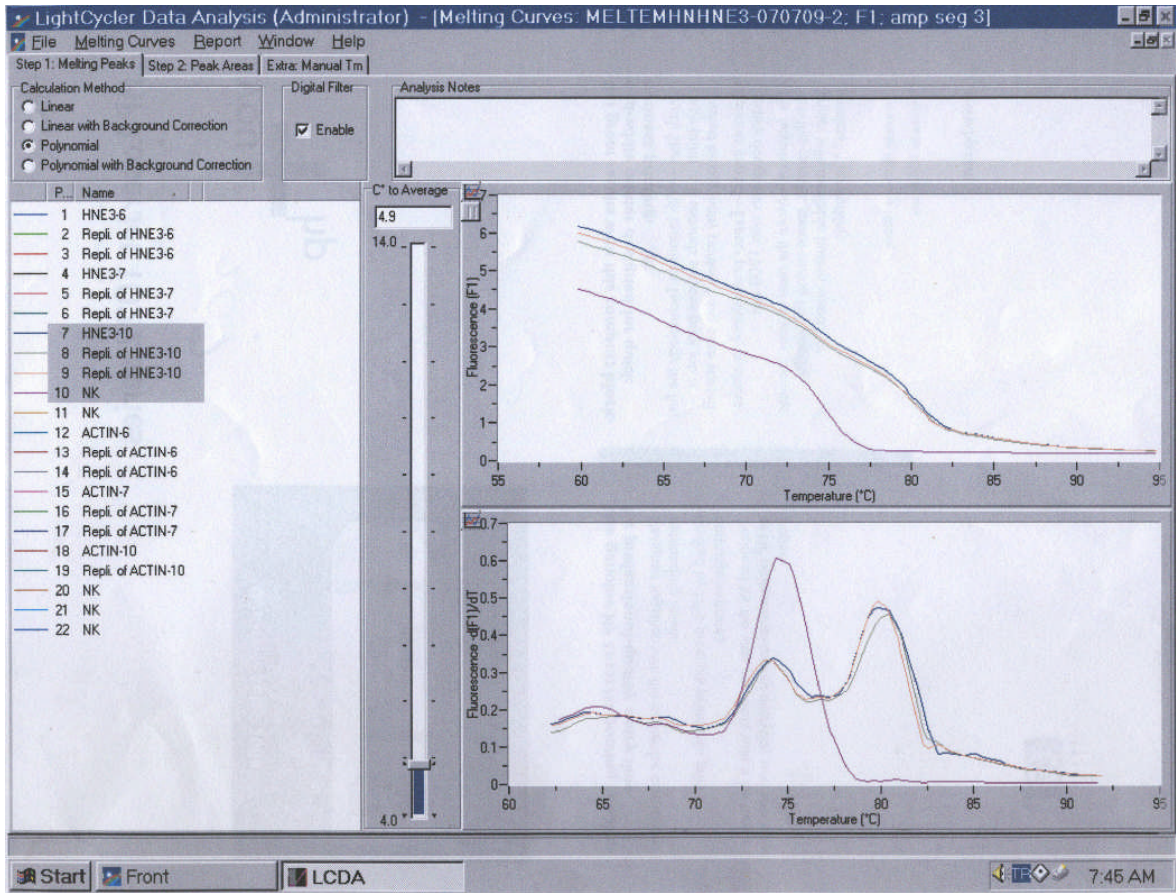
Şekil 21. Propolis-su, polen-su, polen-DMSO ekstraktları ile muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde (2, 3 ve 4 numaralı örnekler) tekrarlı çalışılan VGSC Na_v 1.5 α izoformu ve negatif kontrollerinin erime eğrisi analiz sonucu

4.3.3. PC-3 Hücre Serilerinde VGSC Na_v 1.7 α İzofomu İçin Yapılan RTPCR Çalışmasından Elde Edilen Sonuçlar

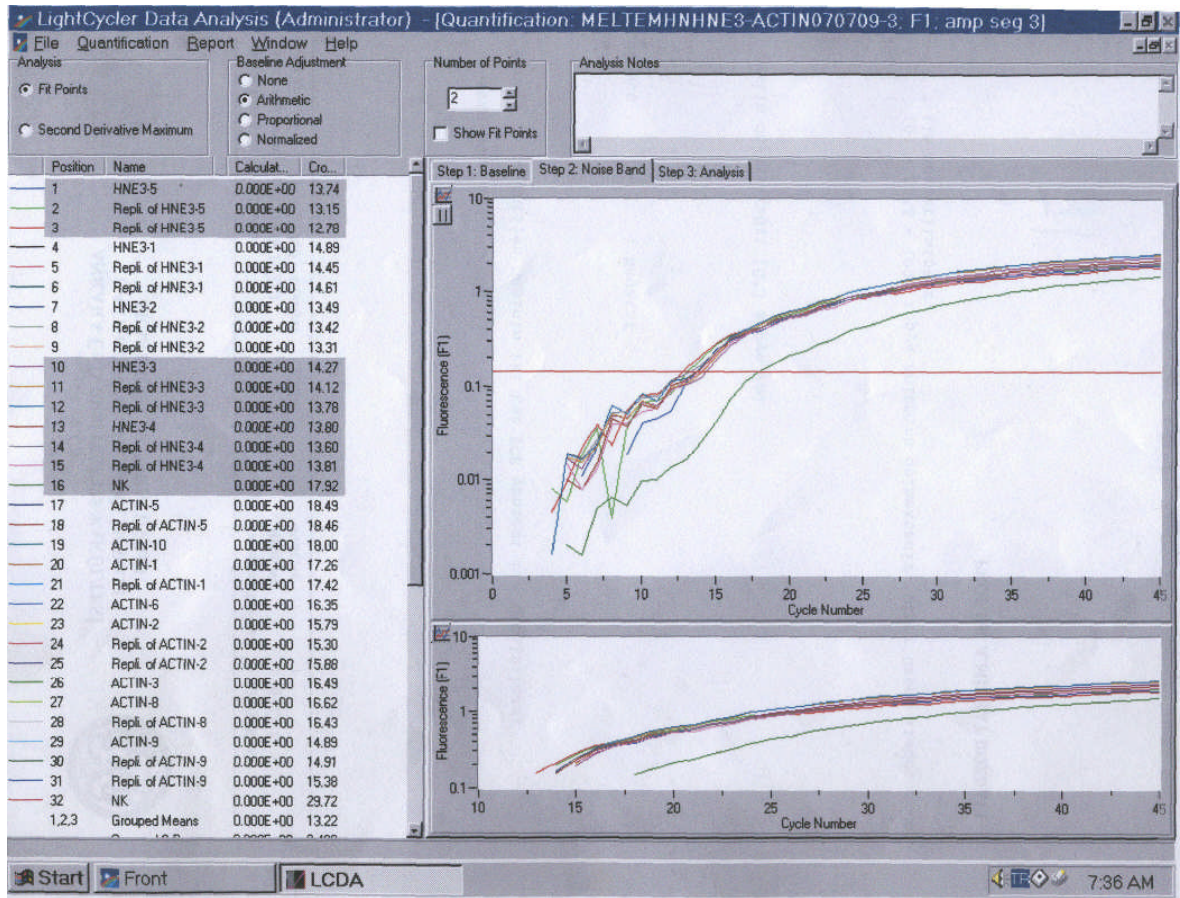
VGSC Na_v1.7 α izoformu için RTPCR çalışmalarında elde edilen piklerin çıkış anları(cycle no) ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 18’de verilmiştir. Şekil 22, 23, 24, 25, 26, 27 ve 28’de polen ve propolis ekstraktları ile muamele edilmiş ve edilmemiş PC-3 hücrelerinde VGSC Na_v 1.7 α izoformu, β -Aktin ve negatif kontrollerle ilgili yapılan erime eğrisi ve RTPCR analizlerinin sonuçları gösterildi.

Tablo 18. VGSC Nav1.7α izoformu için RTPCR ön çalışma sonuçları

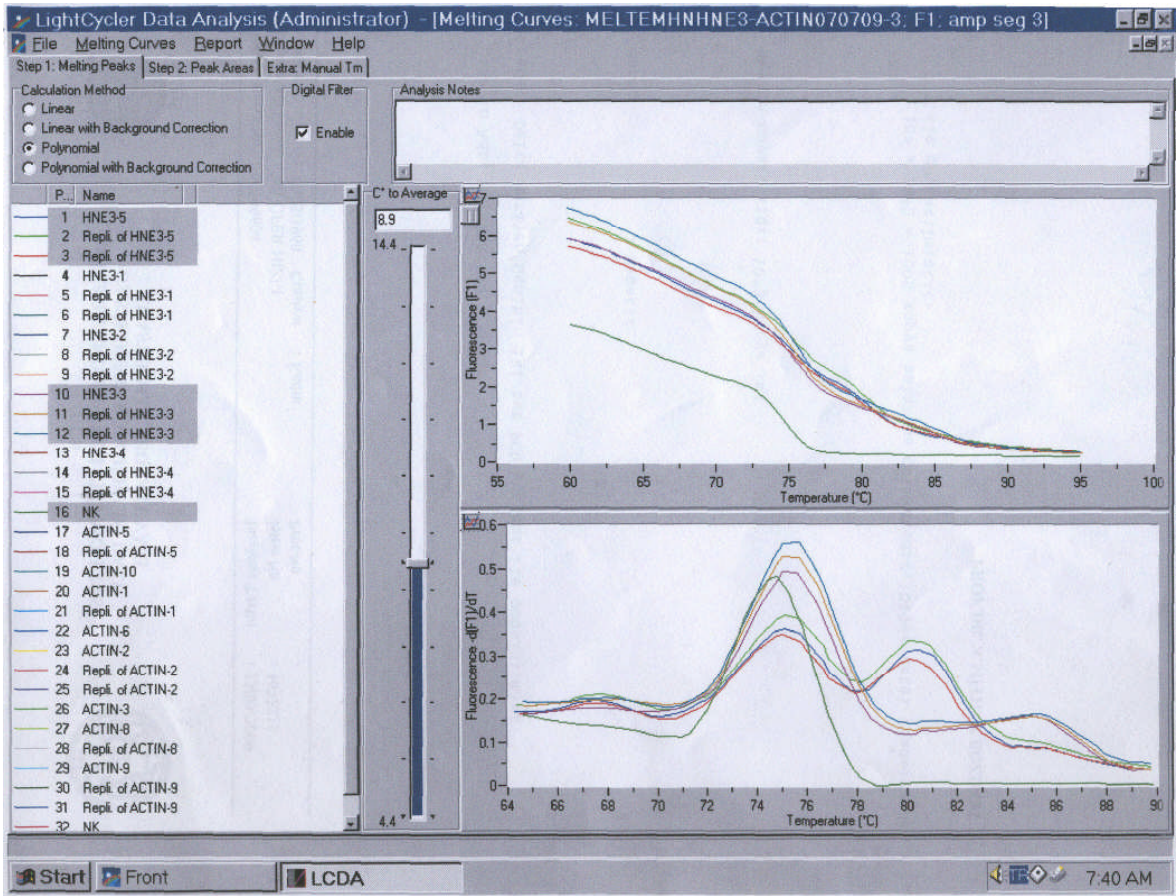
Nav1.7	Cycle No	Ortalama	Standart Sapma
<u>Örnek NO: 1 ve 6</u>			
	15,49	15,29	0,18
	15,18		
	15,19		
<u>Örnek NO: 2 ve 7</u>			
	14,54	14,58	0,15
	14,45		
	14,74		
<u>Örnek NO: 3 ve 8</u>			
	14,72	14,50	0,49
	13,94		
	14,83		
<u>Örnek NO: 4 ve 9</u>			
	14,79	14,77	0,21
	14,55		
	14,96		



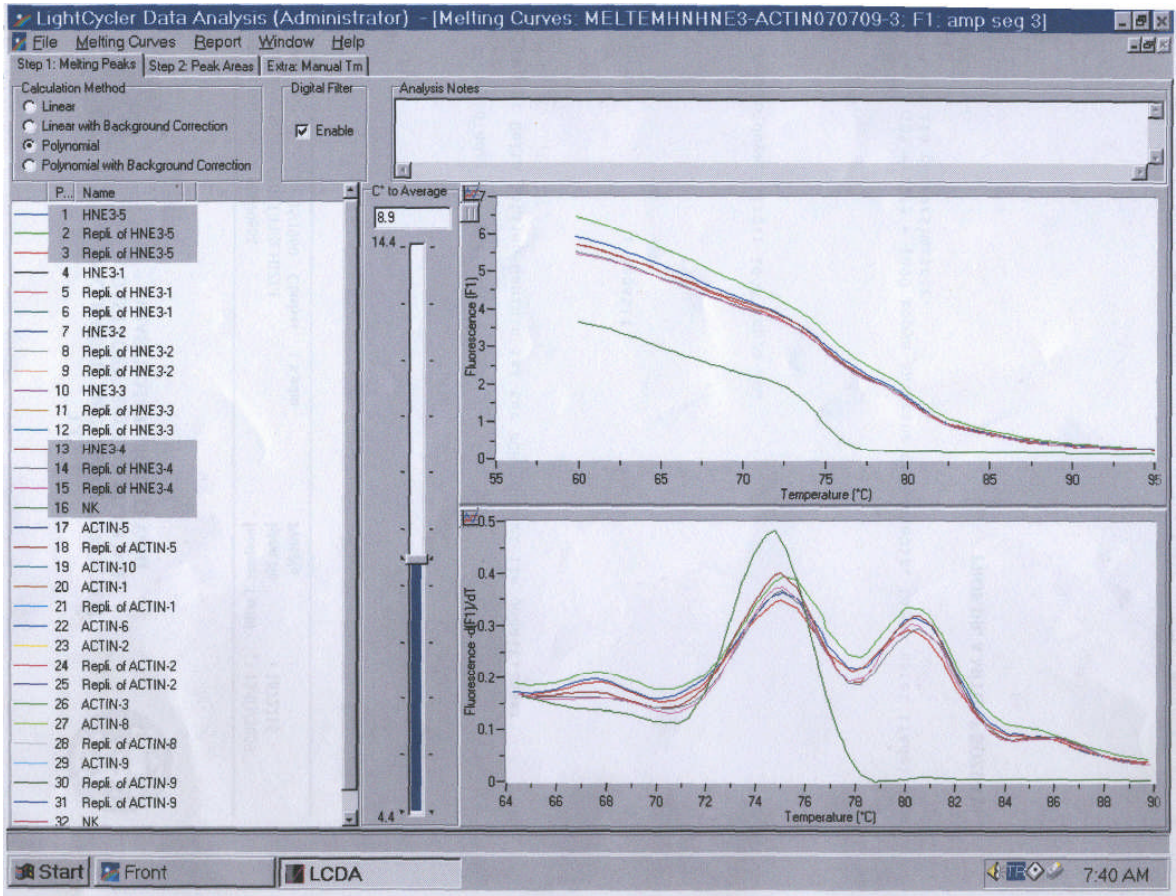
Şekil 22. Hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş kontrol PC-3 hücre serilerinde (10 numaralı örnek) VGSC N_{av} 1.7 α izoformu ve negatif kontrolün erime eğrisi analiz sonucu



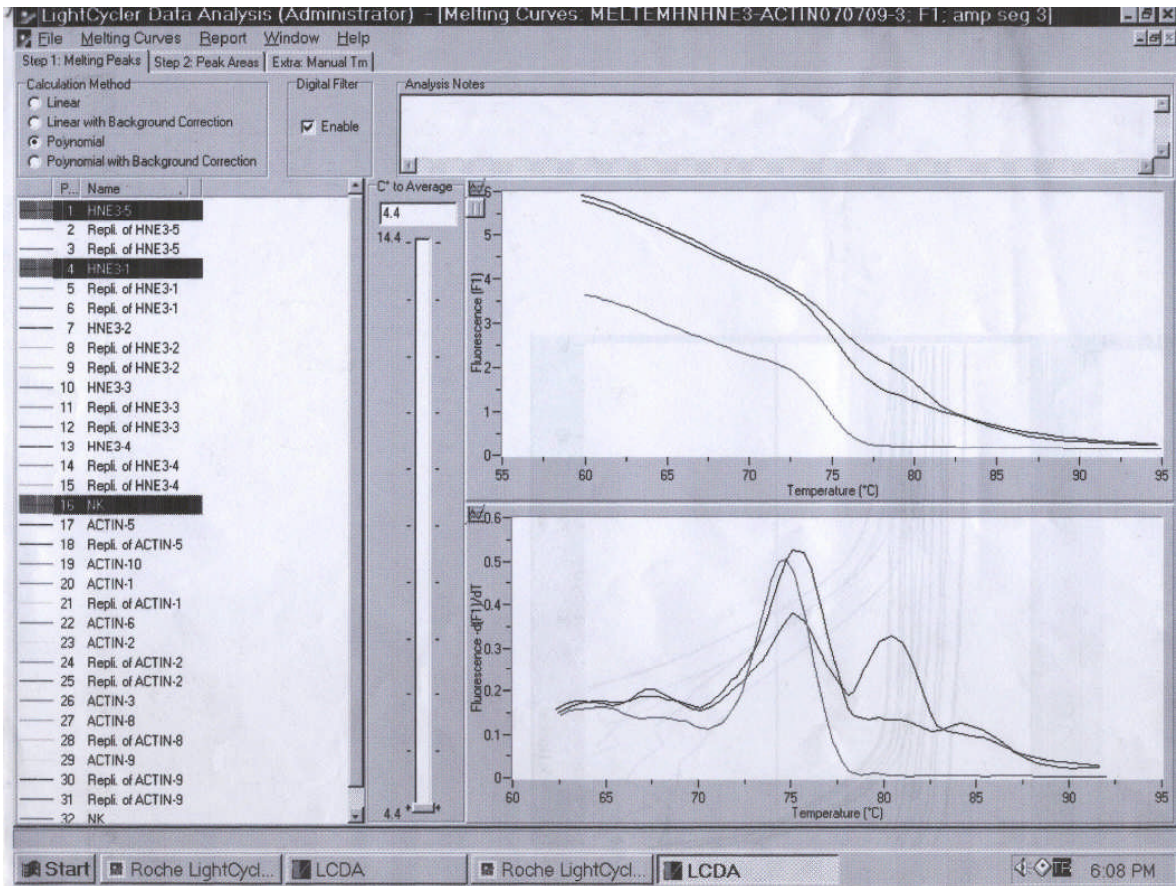
Şekil 23. Polen-DMSO ve polen-su ekstraktlarıyla muamele edilmiş ve hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş PC-3 hücre serilerinde (3,4 ve 5 numaralı örnek) VGSC $Na_v 1.7 \alpha$ izoformu ve negatif kontrolün RTPCR analiz sonucu



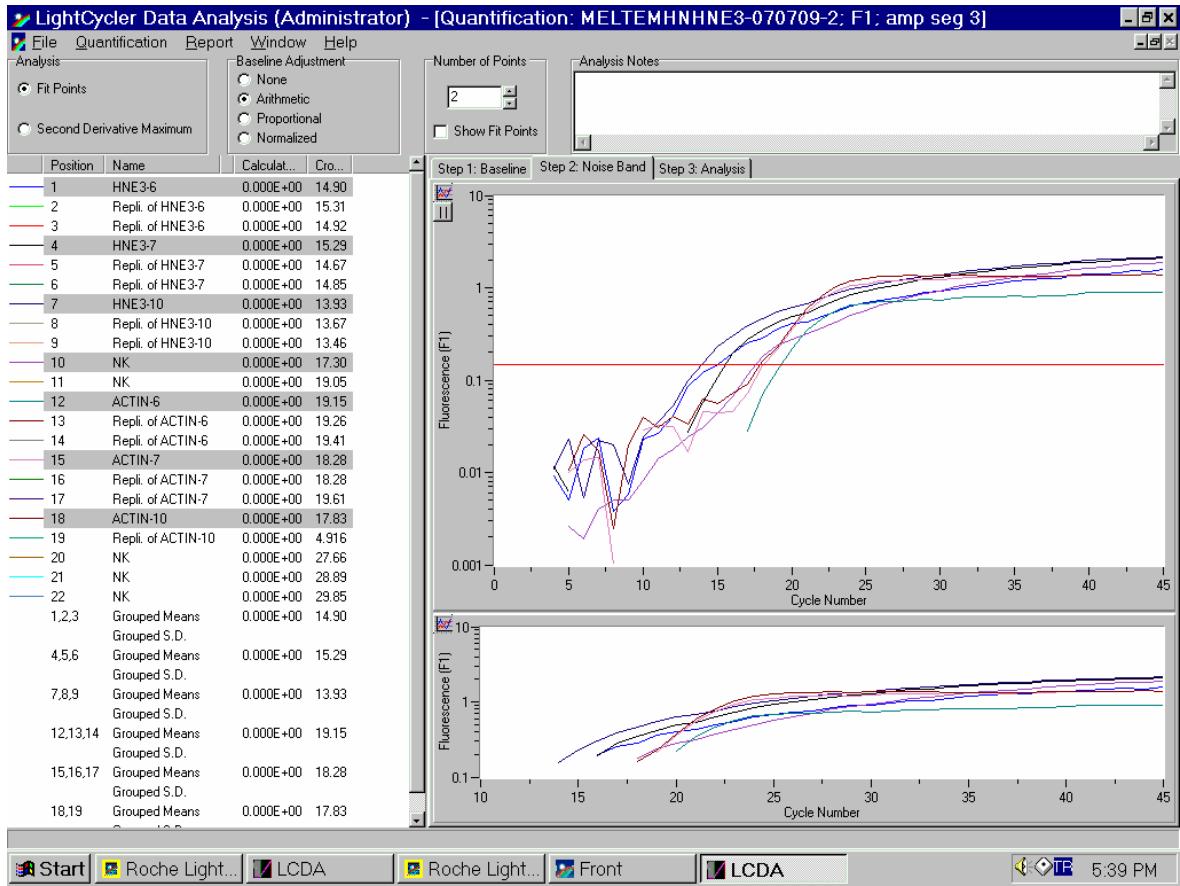
Şekil 24. Polen-DMSO ekstraktı ile muamele edilmiş ve hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş PC-3 hücre serilerinde (3 ve 5 numaralı örnek) VGSC $Na_v 1.7 \alpha$ izoformu ve negatif kontrolün erime eğrisi analiz sonucu



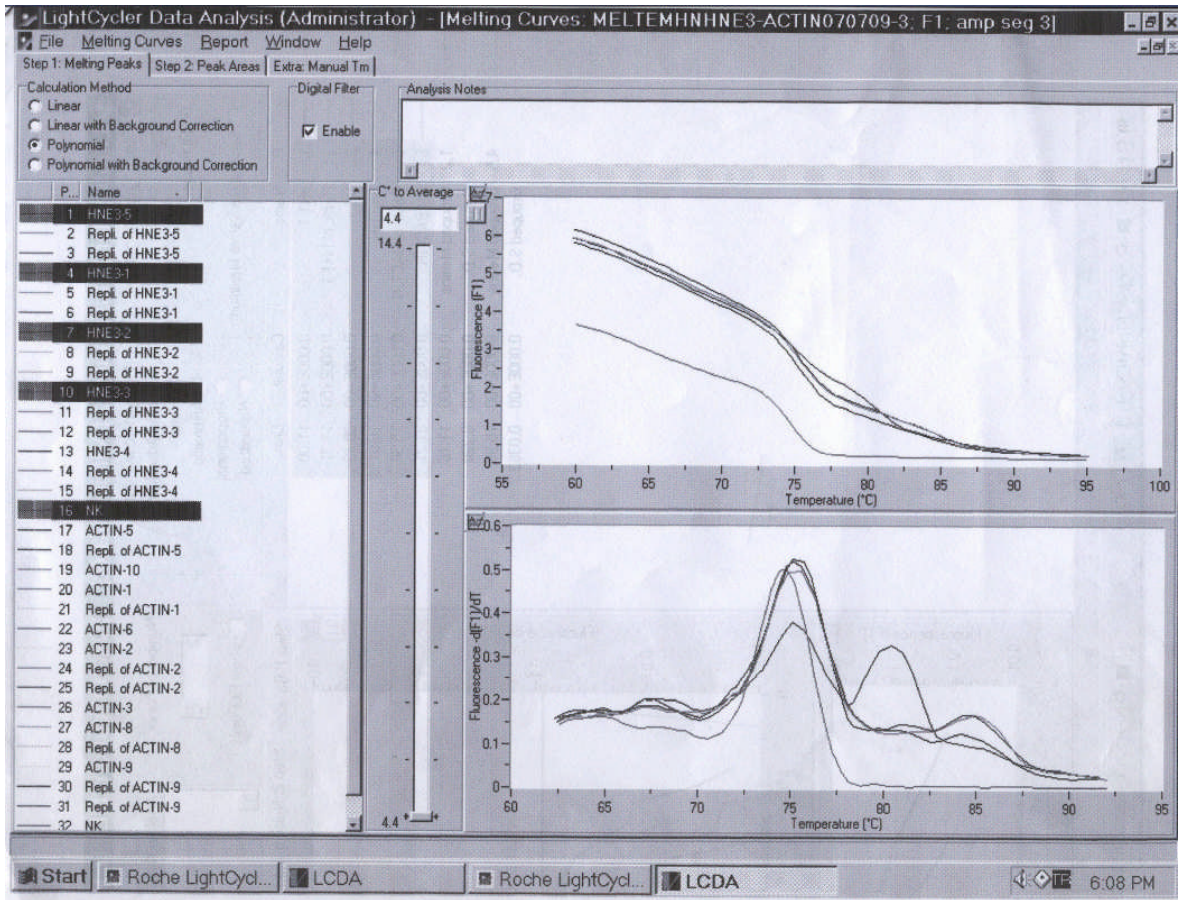
Şekil 25. Polen-su ekstraktı ile muamele edilmiş ve hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş PC-3 hücre serilerinde (4 ve 5 numaralı örnek) VGSC Na_v 1.7 α izoformunun erime eğrisi analiz sonucu



Şekil 26. Propolis-DMSO ekstraktı ile muamele edilmiş ve hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş PC-3 hücre serilerinde (1 ve 5 numaralı örnek) VGSC N_{av} 1.7 α izoformu ve negatif kontrolün erime eğrisi analiz sonucu



Şekil 27. Propolis-su, propolis-DMSO ekstraktları ile muamele edilmiş ve edilmemiş kontrol PC-3 hücre serilerinde (6, 7 ve 10 numaralı örnekler) VGSC $\text{Na}_v 1.7 \alpha$ izoformu, β -Aktin ve negatif kontrollerinin RTPCR analiz sonucu

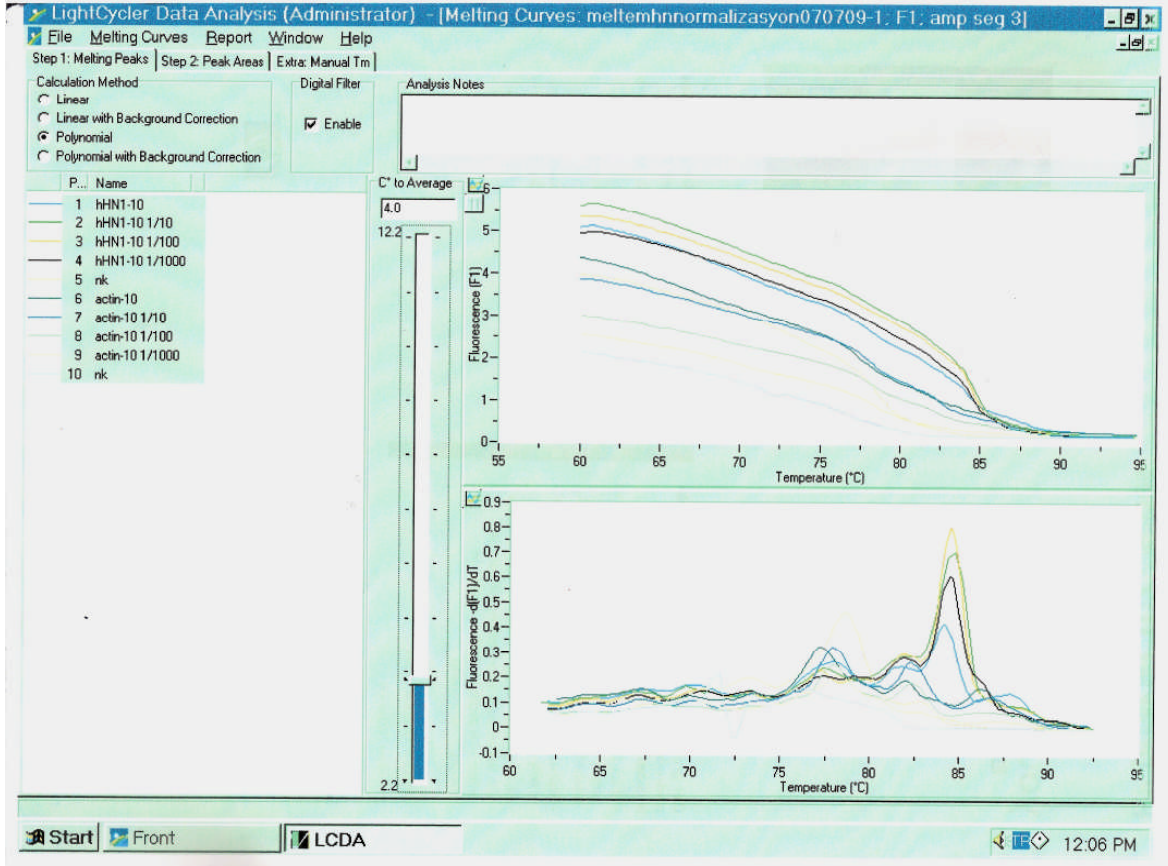


Şekil 28. Propolis-su, propolis-DMSO, polen-DMSO ekstraktları ile muamele edilmiş ve edilmemiş kontrol PC-3 hücre serilerinde (1, 2, 3 ve 5 numaralı örnekler) tekrarlı çalışılan VGSC $Na_v 1.7 \alpha$ izoformu ve negatif kontrollerinin erime eğrisi analiz sonucu

4.3.4. RTPCR Çalışmaları İçin Standart Grafiği Oluşturma

Hiçbir ekstraktla muamele etmediğimiz 5. ve 10. flasklardaki hücrelerden elde edilen cDNA'larla VGSC $Na_v 1.5$, $Na_v 1.7\alpha$ izoformu ve β -Aktin için 3 farklı dilüsyon(1, 1/10, 1/100, 1/1000) yapılarak RTPCR'dan elde edilen sonuçlar ile standart grafiği çizildi. Şekil 29'da hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş PC-3 hücre serilerinde (10 numaralı örnek) VGSC $Na_v 1.5 \alpha$ izoformu ve β -Aktin için dilüsyonlu (1, 1/10, 1/100, 1/1000) yapılan erime eğrisi analiz sonucu gösterilmiştir. Tablo 19'da VGSC $Na_v 1.5$, $Na_v 1.7\alpha$ izoformu ve β -Aktin için elde edilen sonuçlar dilüsyon oranlarıyla birlikte verilmiştir. Şekil 30'da ise dilüsyon katsayıları ve cycle no'lar ile çizilen standart grafiği gösterilmiştir. Bu

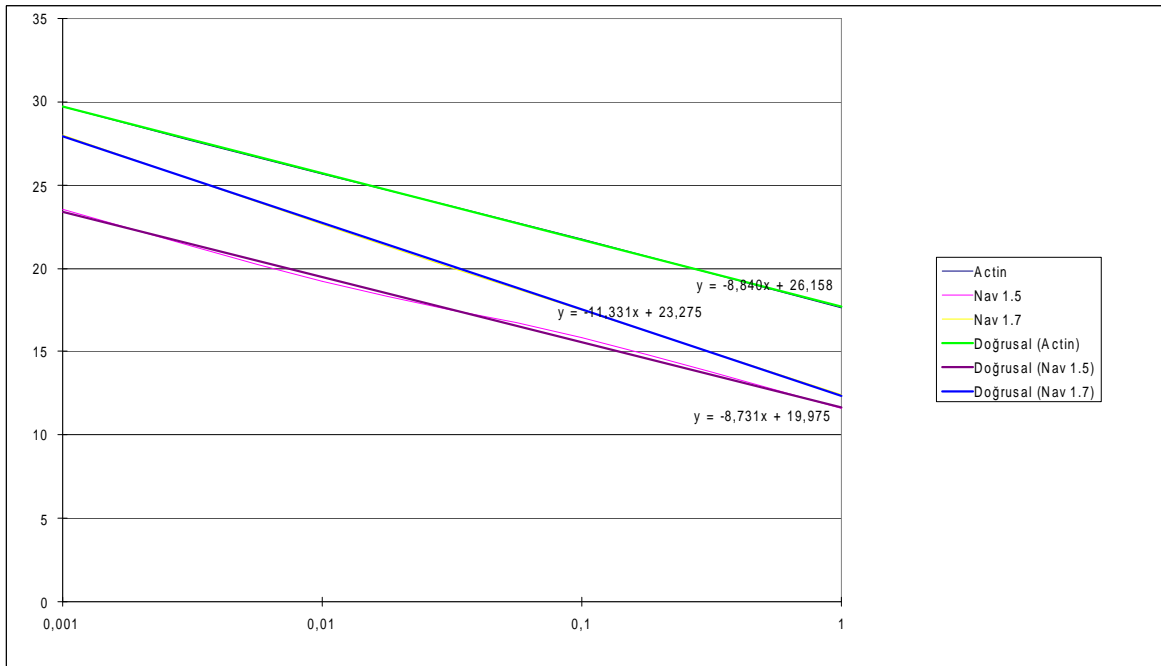
standart grafiği ile çeşitli flasklardaki gen ekspresyon profili kantitatif olarak karşılaştırılarak hesaplandı.



şekil 29. Hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş PC-3 hücre serilerinde (10 numaralı rnek) VGSC Na_v 1.5 α izoformu ve β -Aktin için dilüsyonlu (1, 1/10, 1/100, 1/1000) yapılan erime eğrisi analiz sonucu

Tablo 19. VGSC Na_v1.5, Na_v 1.7 α izoformu ve β -Aktin için yapılan dilüsyonlu çalışmada elde edilen sonuçlar

Dilüsyon	β -Aktin	VGSC Na _v 1.5 α izoformu	VGSC Na _v 1.7 α izoformu
0.001	29.69	23.51	27.97
0.01	25.70	19.25	22.65
0.1	21.75	15.87	17.48
1	17.67	11.57	12.41



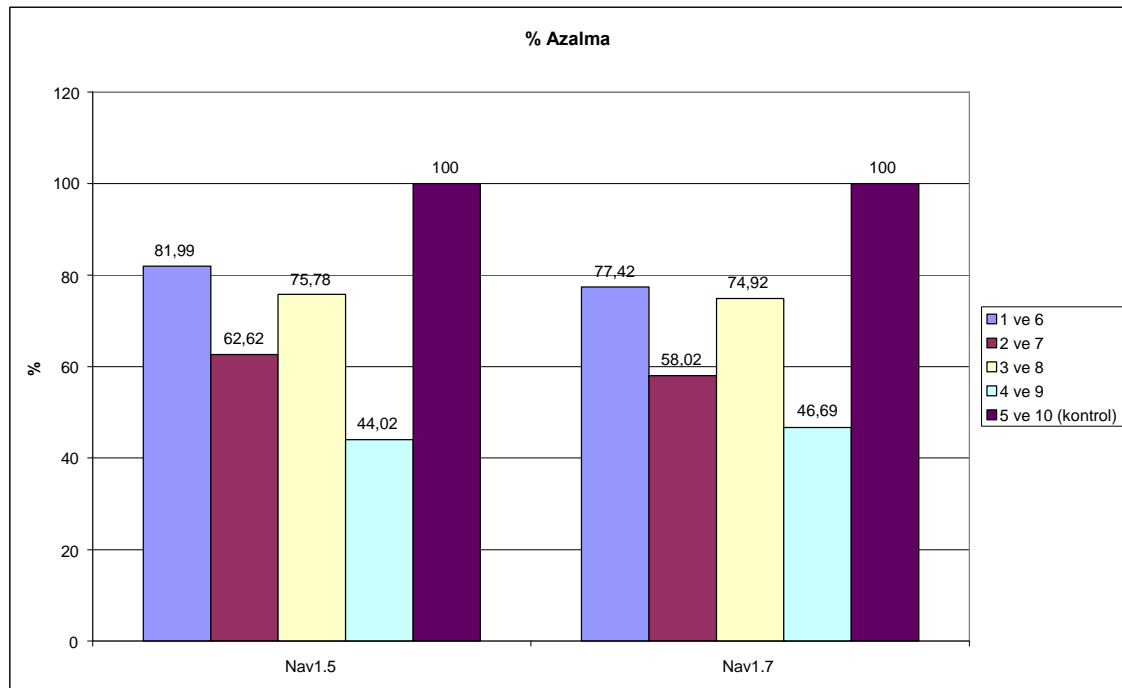
Şekil 30. X ekseninde dilüsyon oranları ve y ekseninde β -Aktin, Nav 1.5, Nav 1.7 için elde edilen sonuçlar ile oluşturulan standart grafiği. Her bir grafik eğrisinin formülü eğri üzerinde verilmiştir

4.3.5. Standart Grafiği Kullanılarak Yapılan Hesaplamalara Elde Edilen Veriler

Kontrol hücrelerinin dilüsyonsuz örneğinde Nav1.5 ve Nav 1.7 ekspresyonu %100 kabul edilerek grafikteki formül yardımı ile daha önce elde ettiğimiz verileri kullanarak Tablo 20'deki sonuçlar elde edildi. Bu sonuçlar yardımı ile Şekil 31'deki grafikler oluşturuldu.

Tablo 20. Kontrol hücrelerine göre polen ve propolis ekstraktları ile muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde VGSC Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 α-izoformlarının ekspresyon seviyeleri

PC-3 Hücreleri ve Flask No'lar	VGSC Na _v 1.5 α izoformunun ekspresyon seviyesi (%)	VGSC Na _v 1.7 α izoformunun ekspresyon seviyesi(%)
PC-3 Kontrol Hücreleri (5. ve 10. flasklar)	100	100
20µg/ml propolis-su ile muamele edilmiş PC-3 Hücreleri (1 ve 6 nolu flasklar)	81.99	77.42
20µg/ml propolis-DMSO ile muamele edilmiş PC-3 Hücreleri (2 ve 7 nolu flasklar)	62.62	58.02
150µg/ml polen-su ile muamele edilmiş PC-3 Hücreleri (3 ve 8 nolu flasklar)	75.78	74.92
150µg/ml polen-DMSO ile muamele edilmiş PC-3 Hücreleri (4 ve 9 nolu flasklar)	44.02	46.69



- 1 ve 6 20µg/ml propolis-su ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücreleri
 2 ve 7 20 µg/ml propolis-DMSO ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücreleri
 3 ve 8 150 µg/ml polen-su ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücreleri
 4 ve 9 150 µg/ml polen-DMSO ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücreleri
 5 ve 10 hiçbir ekstraktla muamele edilmemiş kontrol PC-3 hücreleri

Şekil 31. Çeşitli polen ve propolis ekstraktlarıyla muamele edilmiş PC-3 hücrelerinin kontrol PC-3 hücrelerine göre VGSC Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 α izoformlarının gen ekspresyonundaki % azalma

Şekil 31'deki grafikte görüldüğü gibi polenin DMSO ekstraktları PC-3 hücrelerinde VGSC Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 α izoformu gen ekspresyonunu kontrol hücrelerine göre % 44.02 ve %46.69 oranına çekmiştir. Yani 150 μ g/ml'lik polen-DMSO ekstraktı PC-3 hücrelerinde sırasıyla VGSC Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 α izoformlarının gen ekspresyonunda %55.98 ve %53.31 oranında baskılanma olmuştur. 150 μ g/ml'lik Polen-su ekstraktları ise sırasıyla % 24.22 ve %25.08 oranında Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 gen ekspresyonunu baskıladı. 20 μ g/l'lik propolis-DMSO ekstraktları Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 gen ekspresyonlarını sırasıyla % 37.38 ve % 41.98 baskıladı. Gen ekspresyonunun en düşük baskılanması ise 20 μ g/l'lik propolis-su ekstraktlarında tespit edildi. Propolis-su ekstraktlarınca Na_v 1.5'in gen ekspresyonu % 18.01 ve Na_v 1.7'nin gen ekspresyonu ise % 22.58 baskılandı.

5. TARTIŞMA

İnsanlar arı ürünlerini değişik amaçlar için yüzyıllardır kullanılmaktadır. Arı mumu çeşitli teknolojilerde, bal, yiyecek, ilaç ve dinsel ayinlerde tanrıya bir sunak olarak kullanılmıştır (16). Son yıllarda insan sağlığına verilen önemin artmasıyla doğal yiyeceklerin fizyolojik fonksiyonlarının incelenmesi bilimsel arenada oldukça ilgi toplamıştır.

Doğal yiyecekler arasında bal arılarının ürettiği arı polen ve propolisi gibi apikültürel ürünler yüzyıllardır geleneksel tıp alanında, diyetle yiyecek ve ek besin destekleyicisi olarak kullanılmaktadır (16). Toplandığı coğrafik alana ve iklime bağlı olarak içeriği değişen polen ve propolisin kimyasal yapısı ve özellikleri hakkında pek çok araştırma yapılmıştır. Günümüze kadar bu ürünlerde bulunan yüzlerce kimyasal bileşik tanımlanmıştır. Genel olarak pek çok standart insan yiyeceği ile polen karşılaştırıldığı zaman yağca fakir, protein, vitamin ve mineraller yönünden zengindir. Polen insanlar için gerekli olan pek çok bileşeni vitamin B12 ve yağda çözünen vitaminler arasında bulunan D ve K vitamini hariç tüm vitaminleri yapısında barındıran besinsel değeri oldukça yüksek bir yiyecektir (4). Propolis reçinemsiz bir arı ürünü olup, kovadaki delik ve çatlakları kapatmak ve kovamı istilacılardan korumak için girişin sıvanmasında kullanılır (2). Polen ve propolis yüksek miktarda güçlü antioksidan olan quercetin, kafeik asit ve türevleri, pinocembrin, galangin v.b. polifenolik bileşikler içerir (4, 7, 75, 76). Polifenolik bileşiklerin biyolojik, biyokimyasal, fizyolojik, farmakolojik ve tıbbi özellikleri kapsamlı bir şekilde çalışılmış ve literatürlerde yer almıştır. Yapılan çalışmalarda bu polifenolik bileşiklerin serbest radikal temizleme aktivitesi ve vazodilatör, antikarsinogenik, anti-inflamatuar, antibakteriyel, immünsitimidatör, antialerjik, antiviral, östrojenik etkileri ve bazı spesifik enzimlerin inhibitörü olmaları gibi pek çok biyolojik aktiviteleri çalışılmıştır (77, 78). Bu bileşiklerin yanı sıra polen ve propolisinde anti-inflamatuar (79, 80), immünomodülatör, antikarsinogenik (81, 82), ve antioksidatif veya radikal temizleme aktiviteleri(8, 75, 83) ortaya konmuştur. Literatürde polen ve propolisin ağır metal

iyonlarını bağlayabilme veya elektron transport zincirini katalizleyebilme kabiliyeti ile ilgili herhangi bir çalışma olmamasına rağmen flavonoidlerin bu yeteneğe sahip olduğu ve serbest radikal oluşumunu baskılayabildiğine dair kapsamlı çalışmalar yapılmıştır (84).

Daha önce Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Trabzon ilinden toplanan propolis ve toplanan polen örnekleri ile bazı çalışmalar yapılmıştır. Asuman Yiğit Gerigelmez, Meltem Çolak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda polenin sulu ve PBS'lu ve propolisin DMSO'lu ekstraktlarının HL-60 miyeloid hücre serilerinde kaspaz-3 aktivitesini farklı oranlarda artırarak kanser hücrelerini apoptoza sürüklediği flowsitiometrik analizler sonucu ortaya kondu. Bu çalışmalarda 0.5-0.25 mg/ml'lik propolis DMSO ekstraktlarının HL-60 kanser hücrelerinde hem apoptoza hem differansiasyona sebep olduğu bildirildi. (5, 10). Yüksel Aliyazıcıoğlu ve arkadaşlarının KML-562 kanser hücrelerini kullanarak yaptıkları bir çalışmada ise polen ve propolisin DMSO ekstraktlarının konsantrasyona bağlı olarak solunumsal patlamayı inhibe ettiği flowsitiometrik analizlerle ortaya kondu ve polen ve propolis ekstraktlarının bu etkiyi antioksidan özellikleri ile gerçekleştirdiği savunuldu (85). Yaşam Barlak ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise solunumsal patlama sonrası propolisin DMSO ekstraktlarının PMN lökositlerinden PMN elastaz salınımına etkisi incelendi. Solunumsal patlamanın uyarıldığı PMA'lı örneklerde propolis konsantrasyonu arttıkça hem PMN elastaz salınımı hem de solunumsal patlamanın azaldığı, PMA'sız örneklerde ise PMN elastaz salınımının propolis ekstraktı ilave edilmeyenlere göre bir miktar azaldığı ancak solunumsal patlamada bir farklılık olmadığı tespit edildi ve propolisin anti-inflamatuar aktiviteye sahip olduğu teyit edilmiş oldu (11).

Prostat kanseri Amerika Birleşik Devletlerinde ve Batı ülkelerinde en yaygın erkek kanseri olup Amerika Birleşik Devletlerinde erkekleri ölüme sürükleyen ikinci kanser türüdür. Oldukça yaygın bir kanser türü olmasına rağmen prostat kanserinin etiyojisi ve ilerlemesini tetikleyen faktörler henüz tam anlaşılammıştır (53). Ana risk faktörleri arasında yaş, etnik köken, ailesel hikâye ve steroid hormonlar yer almaktadır. Prostat kanseri pek çok ülkede paralel insidans oranı gösterdiği ve benzer diyet faktörlerinden (ör: yağ tüketimi) etkilendiği öne sürülmektedir. Tedavi olarak cerrahi müdahaleler, erkeklerde androjen baskılayıcı ilaç tedavileri, kemoterapiler ve radyoterapiler kullanılmaktadır (50). Prostat kanseri tedavisi için gerekenler yapılsa bile tekrarlayabilme ve metastaz yapabilme ihtimali terapide en büyük problemlerdendir. Günümüzde uygulanan tedavilerin idrarı tutamama ve ereksiyon bozuklukları gibi yan etkileri vardır. Kanseri yenebilen etkin bir

tedavi olmamakla birlikte zamanla hormon tedavisine verilen cevap zayıflamaktadır. Son yıllarda korunma stratejileri önem kazanmıştır. Soya fasulyesi, sarımsak, yeşil çay ve Vitamin D3 gibi ek besinlerin kullanımındaki artış antikanser terapilere destek arz etmektedir (53).

Carballo ve arkadaşlarının Küba propolisi ile çeşitli hücre serilerinde (kolon, over ve prostat karsinoma, nöroblastoma) yaptıkları çalışmada propolisin 5-23µg/ml'lik konsantrasyonlarda(IC₅₀) kanser hücrelerine sitotoksik etki yaptığını bildirdiler. Küba propolisi PC-3 hücrelerinde 10µg/ml'lik konsantrasyonda, LNCap hücrelerinde 12.3µg/ml'lik konsantrasyonda sitotoksik etki gösterdi. Bu çalışmada kullanılan kanser hücreleri immüniteden bağımsız olduğu için Küba propolisinin anti-tümöral etkisini immünmodüle edici etkisinden ziyade direkt sitotoksik etkisiyle gerçekleştirdiği savunuldu (86). Bizim çalışmamızda kullanılan Trabzon propolisinin PC-3 hücrelerindeki IC₅₀ değerini 20µg/ml yani Küba propolisinin IC₅₀ değerine yakın olarak tayin edildi.

Russo ve arkadaşları insan ağız epidermoid karsinoma (KB), kolon adenokarsinoma (Caco-2) ve androjene duyarlı olmayan prostat kanser hücrelerinde (DU-145) Şili propolisinin etanolik ekstraktlarını kullanarak propolisin antioksidan özelliklerini ve antiproliferatif kapasitesini inceledi. Sonuç olarak Şili propolisinin fenolik içeriğindeki artışa paralel olarak serbest radikalleri temizleme ve tümör hücrelerinin büyümesini inhibe etme kapasitesinin arttığı, normal hücreleri oksidatif hasardan koruduğu halde kanser hücrelerindeki DNA hasarını artırarak kanser hücrelerinin canlılığını azalttığı rapor edildi (87).

Li ve arkadaşları Brezilya'dan topladıkları 500 propolis örneğinin etanolik ekstraktı ile yaptığı çalışmada propolisleri fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre 12 gruba ayırdı ve 3. ve 12. grupların kemiğe metastatik eğilimi olan PC-3, beyine metastatik eğilimi olan DU-145 hücre serileri ile insan prostat hücrelerinden üretilen primer malignan tümörlerin (RC58T/h/SA#4) proliferasyonuna etkisini inceledi. DU-145 ve PC-3 hücrelerinin büyümesi optimal 40µg/ml, RC58T/h/SA#4 hücrelerinde ise 80µg/ml'lik propolis konsantrasyonlarında genisteine benzer şekilde baskılandığı ve metastatik insan prostat kanser hücrelerinin primer insan prostat kanser hücre serilerine göre büyümelerinin daha iyi inhibe edildiği savunuldu. Bu deneyde grup 3 propolis ekstraktlarının hücreleri G2 fazında, grup 12 propolis ekstraktlarının ise S fazında büyümelerini inhibe ettiği ve grup 3 propolis ekstraktlarının grup 12'ye göre daha güçlü bir inhibisyon gösterdiği vurgulandı. Yapılan çalışmada ayrıca grup 12 Brezilya propolis ekstraktlarının insan prostat kanser

hücre serilerinde cyclin D1, B1, cyclin bağımlı kinaz (CDK) ve p21'in protein ekspresyonunu düzenleyerek proliferasyonu inhibe ettikleri ve prostat kanserinden korunmak için kemoterapötik ajan olarak yalnız veya kombine halde kullanılabilecekleri savunuldu. Grup 3 propolisi ise sadece p21 ekspresyonunu indükledi, cyclin D1, B1, CDK ekspresyonlarını herhangi bir şekilde baskılamadı. Li ve arkadaşlarının daha önce yaptıkları çalışmalarda propolis grupları 1, 2, 6 ve 7'nin nazofaringel karsinoma (KB), grup 6 ve 7'nin ileocecal adenokarsinoma (HCT-8), renal karsinoma (CAKE-1) ve meme karsinoma (MCF-7) hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini rapor etti. (53).

Meme karsinoma, melanoma, kolon ve renal karsinoma gibi insan ve hayvan tümör hücrelerine sitotoksik olan propolis bu özelliğini kafeik asit fenil esterine borçlu olduğu savunulmaktadır. Propolisten izole edilmiş sitotoksik olan bileşenler quercetin, kafeik asit, clerodane diterpendoidtir (53). Clerodane diterpendoid özellikle tümör hücrelerine spesifik olarak toksik etki gösterdiği ve Artepillin C adlı propolis bileşeninin insan gastrik karsinoma, insan akciğer kanser hücreleri ve fare kolon karsinoma hücrelerine in vitro olarak sitotoksik olduğu ortaya konmuştur (53, 88, 89). Propolisten izole edilen, biyolojik olarak oldukça aktif olan bir başka bileşik de kafeik asit fenil esteridir (CAPE). CAPE antioksidan, anti-inflamatuar, antiviral, immunositimidatör, antianjuogenik, anit-invaziv, anti-metastatik ve karsinostatik aktivitelere sahiptir. Propolisin metanolik ekstraktlarının konsantrasyona bağlı olarak hepatokarsinoma hücrelerinde (Hep3B), tümör hücrelerinin invazyon ve metastazıyla yakından ilişkili olan matriks metaloproteinaz-9'u (MMP-9) inhibe ettiği bildirilmiştir. Jin ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada MMP-9 inhibisyonundan sorumlu olan propolis bileşeninin CAPE olduğu ve CAPE'nin Hep3B hücrelerine karşı seçici antiproliferatif aktivite gösterdiği normal fare hepatositlerine bir etki yapmadığı rapor edilmiştir (90). Lee ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen benzer bir çalışmada ise insan hepatoselüler karsinoma hücrelerinde (SK-Hep1) CAPE'nin konsantrasyona bağlı olarak invazyonu baskıladığı, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarını baskılayarak ve nükleer kapa B'yi inhibe ederek antimetastatik aktivite gösterdiği savunuldu (91). Hwang ve arkadaşları ise insan fibrosarkoma hücrelerinde (HT1080) CAPE'nin matriks metaloproteinaz ekspresyonlarını down-regülasyona uğratarak kanser hücrelerinin invazyon, hücre göçü, koloni oluşumu gibi metastatik kabiliyetlerini inhibe ettiği bildirildi (92).

Propolisin biyolojik aktivitesinden sorumlu bileşenler; polifenolik bileşenler ve esas olarak flavonoidlerdir (46). Ancak propolisden tek tek izole edilen bileşiklerin genel olarak tek başlarına propolis ekstraktlarından daha güçlü farmakolojik özellik gösteremezler (93). Farklı bölgelerden toplanan propolislerin fenolik bileşikleri azaltıldığında farmakolojik özelliklerinde korele bir şekilde azalmadığı tespit edilmiştir. Bunun üzerine propolisin biyolojik aktivitesini kontrol eden başka bileşenlerin de var olduğu öne sürülmüştür. Sonuç olarak propolisin biyolojik aktivitesi için farklı örneklerde, farklı bileşiklerin kombinasyonu zorunludur (94). Dolayısıyla çalışmamızda propolis bileşenlerini izole edip ekspresyonu incelemek yerine, total propolis ekstraktını kullanmayı tercih ettik.

Prostat kanser hücreleri çeşitli plazma membranı iyon kanallarını eksprese etmektedir. Esansiyel sinyal iyonlarının akımı, intraselüler iyon konsantrasyonunun bozulması, hücre hacminin regüle edilmesi ve membran potansiyelinin sürdürülmesi ile prostat kanser hücreleri proliferasyona, farklılaşmaya ve apoptoza uğrarken metastatik kabiliyetleri iyon kanalı karakteristiğine göre değişebilmektedir. Androjenden bağımsız prostat kanser hücrelerinin artmış malignansi ve invazyon kabiliyeti genellikle daha uyarılabilen fenotipli plazma membranı ile ilişkilidir. Bu ilişki Ca^{+2} akışını düzenleyen depoların downregülasyonu ile apoptoza karşı yüksek direnç gösterme, farklı K^{+} kanalları ve Transient Reseptör Potansiyel (TRP) kanal ailesinin ekspresyonundaki değişiklikler ve sabit hücre hacminin sürdürülebilmesini sağlama gibi çeşitli olaylara sebep olan voltaj kapılı Na^{+} ve Ca^{+2} kanallarının varlığı ile ortaya konmuştur (55).

Yüksek malignansiye sahip prostat kanseri hücrelerinde K^{+} geçirgenliği azalırken, Na^{+} ve Ca^{+2} iyonları akışı da artmaktadır (55, 56). Bazı prostat kanseri epitel hücrelerinde VGSC ekspresyonunun, fonksiyonel protein varlığının ve mRNA seviyelerinin arttığı ortaya konmuştur. Yapılan araştırmalarda VGSC aktivitesinin hücrenin metastatik kabiliyetini ve proliferasyonunu artırdığı tespit edilmiştir (12, 55, 56).

Çeşitli prostat kanseri hücre serileriyle yapılan çalışmalara göre metastatik hızı yüksek olanlarda Voltaj Kapılı Na Kanal (VGSC) aktivitesi yüksek, metastaz hızı düşük olanlarda ise aktivite düşük tespit edildi (57,58).

VGSC ile ilgili yapacağımız çalışmaların temeli kanser ilerlemesinin CELEX (hücresel uyarılma) hipotezine dayanmaktadır. CELEX hipotezine göre ikinci tümörigenezin (metastaz) fonksiyonel VGSC upregülasyonu ile kolaylaştığı ve VGSC bloklayıcılarının anti-metastatik aktiviteye sahip olduğu ileri sürülmektedir. Djamgoz ve arkadaşlarının çeşitli sebze ve meyvelerde bulunan Resveratrol, Curcimin, Capsaicin,

Genisteinin CELEX hipotezine uygun olarak VGSC aktivitesini doza bağılı olarak baskılayıp inhibe edebileceğini ileri sürdü. CELEX hipotezine göre kanser hücrelerinin metastatik aktivitesinin VGSC'lerinin up-regülasyonu ile kolaylaştığı ve bu kanal proteinlerini bloklayabilecek bileşiklerin anti-metastatik aktiviteye sahip olabileceği öne sürülmüştür (15).

CELEX hipotezine göre;

1- Primer tümörigenezde kanser hücrelerin kontrolsüz bölünmeye uğradığı yerde bu işlemin K^+ kanal aktivitesiyle kolaylaştığı ve bazı bileşiklerin K^+ kanallarını(VGPC) bloklayarak anti-proliferatif/anti-kanser etki gösterdiği,

2- İkinci tümörigenez (metastaz), fonksiyonel VGSC'lerinin upregülasyonu ile kolaylaştığı ve VGSC bloklayıcılarının anti-metastatik aktiviteye sahip olduğu ileri sürülmektedir. Metastatik potansiyeldeki artış normalde VGSC fonksiyonunun antagonisti olan Voltaj Kapılı Potasyum Kanal Proteini(VGPC) down-regülasyonu ile birlikte gerçekleştiği böylece VGPC bloklayıcıları pro-kanser etki gösterebileceği savunulmaktadır. CELEX hipotezine göre ideal anti-metastatik bileşiğin VGPC aktivitesini artırırken, VGSC aktivitesini baskılaması gerekmektedir (15).

VGSC açıcı veratrine ile yapılan denemelerde androjene hassas olmayan PC-3 ve DU-145 hücreleri yanı sıra androjene hassas LNCaP ve MDA-PCA-2B hücrelerindedeki(VGSC aktivitesinden yoksun) büyümenin arttığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda VGSC bloke edicileri(flunarizine ve riluzole) ile yapılan denemede doza bağılı olarak büyümenin dört hücre serisinde de azaldığı tespit edilmiştir (55).

RT-PCR analizleri ile tetrodotoksine (TTX) hassas $Na_v1.7$ nin prostat kanser hücrelerinde (yaklaşık 20 kat daha fazla) en çok upregülasyona uğrayan VGSC α alt birimi olduğu ortaya konmuştur (95). Ayrıca TTX'in hücrelerin invazyon kabiliyetini direkt olarak azalttığı rapor edilmiştir (96). Tüm bu çalışmalar VGSC ekspresyonunun ve PC hücrelerinin metastatik davranışının fonksiyonel olarak bağlantılı olduğunu göstermektedir. Ancak VGSC upregülasyonunun ve pro-metastatik eylemin hangi mekanizmalarla gerçekleştiği henüz tam olarak bilinmemektedir. VGSC ekspresyonunun PC epitel hücre membranlarına elektrofizyolojik özellikler kazandırabileceği bu özelliğin de motiliteyi(56) ve/veya salgı aktivitesini(97) ve intraselüler iyonik hemostazı bozabileceği öne sürülmektedir. Ayrıca VGSC bloke edicilerinin(TTX ve fenitoin) insan PC-3 ve rat MAT-LyLu hücrelerinde migrasyonu azaltırken, VGSC açıcılarının (aconitine ve ATX II) migrasyonu artırdığı ancak her iki ilaç grubunun da metastatik kabiliyeti zayıf

olan insan LNCaP ve AT-2 hücrelerinde motiliteyi etkilemediği rapor edilmiştir (56, 97, 98). Metastaz hızı yüksek olan PC-3 ve düşük olan LNCaP insan prostat kanser hücreleri ile yapılan çalışmalarda Na_v 1.7 izoformu mRNA ekspresyonunun PC-3 hücrelerinde yaklaşık 1000 kat daha yüksek olduğu tespit edildi(12).

Grimes ve arkadaşlarının VGSC aktivite baskılayıcı tetrodotoksin ve rat prostat kanser hücreleri ile yaptığı çalışmalarda, metastaz hızı yüksek olan Mat-Ly-Lu hücrelerinde invazyonun kontrol hücrelerine göre in vitro olarak baskılandığı tespit edildi ve bu sonuçların bazı prostat kanserlerinde VGSC proteinlerinin metastazı kontrol edebileceği görüşünü güçlendirdiği öne sürüldü. Aynı çalışmada metastaz hızı düşük olan AT-2 rat prostat hücrelerinin invazyonunda bir değişiklik olmadığı tespit edildi ve bu sonucun sebebinin AT-2 hücrelerinin VGSC proteinlerini içermemesi olduğu savunuldu (57). Fraser ve arkadaşlarının MAT-Ly-Lu, AT-2 hücreleri ve tetrodotoksin ile yaptığı başka bir çalışmada ise MAT-Ly-Lu hücrelerinin VGSC'lerinin tetrodotoksince baskılanması sonucu kontrol hücrelerine göre boy ve çap olarak küçülüp morfolojik değişikliklere uğradığı ve VGSC içermeyen AT-2 hücrelerinin görünümüne sahip olduğu tespit edildi (68). Bennett ve arkadaşlarının metastatik olmayan androjene-bağımlı LNCaP LC prostat hücre serileri ve oldukça tümorojenik androjenden-bağımsız C4,C4-2 prostat hücre serileriyle yaptığı çalışmalarda C4 ve C4-2 hücrelerinin, LC hücrelerine göre invazyona daha yatkın olduğu ve invazyonu daha güçlü olan C4 ve C4-2 hücrelerin VGSC ekspresyonunu daha çok yaptığı, ancak VGSC inhibitörü olan tetrodotoksin ile invazyonların engellendiği rapor edildi. Sonuç olarak artmış VGSC ekspresyon ve fonksiyonunun insan prostat kanser hücrelerinin artmış invazyonu için zorunlu olduğu ve artmış VGSC ekspresyonunun tek başına üç hücre serisinde de invazyon potansiyelini artırmak için yeterli olduğu öne sürüldü(99).

Krasowska ve arkadaşlarının endositik veziküllerle ilgili yaptığı bir çalışmada endositik/veziküler aktivitenin güçlü metastatik Mat-LyLu hücrelerinde zayıf metastatik AT-2 hücrelerine göre daha yaygın gözlemlendiğini ve tetrodotoksin uygulamasıyla Mat-LyLu hücrelerinde endositozun baskılandığını rapor etmiştir. Ayrıca Na^+ 'nin intraselüler Ca^{+2} seviyelerini artırması ile protein kinaz C ve/veya CaM kinaz II'nin aktifleşebileceğini ve bunun da aktin hücre iskeletini fosforilleyebileceğini bunların da sekresyon ve endositozun oluşumuna izin verebileceğini bildirmiştir. Bunların yanı sıra Na^+ 'nin adenilat siklaza direkt etkisi ile cAMP, protein kinaz A seviyelerini değiştirebileceği ve bu sayede veziküler olaylarda rol alan bazı bileşenlerin fosforillenebileceğini belirtmiştir (73).

VGSC→Na⁺akışı→PKA aktivasyonu→fonksiyonel VGSC artışı hipotezini desteklemek için Brackenbury ve Djamgoz'ün Mat-LyLu rat prostat kanser hücreleriyle yaptığı bir çalışmada TTX uygulamasıyla fosforillenmiş PKA seviyelerinin azaldığı, PKA inhibitörü KT5720 uygulamasıyla VGSC akış yoğunluğunun azaldığı, adenilat siklaz aktivatörü forskolin ve Na⁺ ionophore monensin'nin VGSC akış yoğunluğunu artırdığı rapor edilmiştir. TTX uygulamasıyla Na_v 1.7 mRNA seviyesinin ve plazma membranına VGSC ekspresyonunun azaldığı ancak total VGSC protein miktarının değişmediği bildirildi. PKA ca pozitif feed back mekanizmasıyla upregülasyona uğrayan VGSC'lerinin hücrelerin migrasyon potansiyelini artırdığı belirtilmiştir (70). Smith ve arkadaşları Na⁺ kanal proteinlerinin ekspresyonunun ve metastatik prostatik karsinoma hücre davranışlarının bir biri ile fonksiyonel olarak ilişkili olduğu hipotezini kuvvetlendirmiş ve bunu ya hücre membranlarına özelleşmiş elektrofizyolojik özellikler (motilitelerini ve/veya sekretuar aktivitelerini artırma gibi) kazandırarak yada hücrelerdeki iyonik dengenin regülasyon mekanizmalarını bozarak yaptığını savunmuşlardır. İn vitro olarak membran matriksine invaze olan hücrelerin Na⁺ kanal ekspresyonu ile korelasyon gösterdiği ortaya konmuştur. Yedi adet Dunning rat hücre serilerinde bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve hücrelerin % 27'sinin invazyon gösterdiği vurgulanmıştır. İnsan prostat hücrelerinde de bu korelasyon anlamlı bulunmuş ve hücrelerin % 12.4'nün invazyon gösterdiği tespit edilmiştir. Metastatik kabiliyetli Du145 ve PC-3 hücreleri Na⁺ kanal proteinini eksprese ederken LNCaP hücrelerinin ekspresyonunun sifıra yakın düzeyde olduğu ve invazyon göstermediği belirtilmiştir. Diğer bilim adamları gibi Smith ve arkadaşları da prostat kanser hücrelerinde Na⁺ kanal varlığının metastaza yatkınlık için bir marker olabileceğini savunmuştur (72).

Çalışmamızda PC-3 hücre serilerini çeşitli konsantrasyondaki polen-su, polen-DMSO ve propolis-su, propolis-DMSO ekstraktlarıyla muamele edilip yapılan canlılık (MTT) testinde her bir konsantrasyon 16 kez çalışıldı. Canlılık testi PC-3 hücrelerine etki eden polen-su, polen-DMSO ve propolis-su, propolis-DMSO ekstraktlarının IC₅₀ değerini saptamak ve PC-3 hücre serilerinde VGSC Na_v1.5 ve Na_v 1.7a izoformlarının gen ekspresyonlarını incelemek için yapılacak RTPCR çalışmalarında kullanılacak ekstrakt konsantrasyonunu seçmek için yapıldı. PC-3 hücre serilerinin canlılık testi için polen-su ve polen-DMSO ekstraktlarının sırasıyla 200, 150 ve 100µg/ml, propolis-su ve propolis-DMSO ekstraktlarının 20, 10, 5µg/ml'lik konsantrasyonları kullanıldı. PC-3 hücre serilerinde polen-su ekstraktları için % canlılık sonuçları sırasıyla 21.67, 91.67 ve 46.67,

polen-DMSO ekstraktları için % canlılık sonuçları 200µg/ml'lik konsantrasyon için tayin edilemedi ancak 150µg/ml için % 47.06 ve 100µg/ml'lik konsantrasyon için % 70.59 saptandı. Bu konsantrasyonların % canlılık sonuçları incelendiğinde polen-su ve polen-DMSO ekstraktları için ileriki çalışmalarda kullanılacak en uygun konsantrasyonun 150µg/ml olduğuna karar verildi. PC-3 hücre serilerinde propolis-su ve propolis-DMSO konsantrasyonlarının (20, 10, 5µg/ml) % canlılık sonuçları incelendiğinde 5µg/ml propolis-su konsantrasyonu hariç 20µg/ml'lik propolis-su ekstraktı için % 42.10, 10µg/ml'lik propolis-su ekstraktı için ise % 50.00 olarak tespit edildi. 20, 10 ve 5µg/ml'lik konsantrasyonlardaki propolis-DMSO ekstraktları için % canlılık sırasıyla 37.18, 41.02 ve 64.10 olarak tespit edildi. Bu sonuçlar incelendiğinde propolis-DMSO ekstraktları için 20µg/ml'lik konsantrasyon daha sonra yapılan RTPCR çalışmaları için PC-3 hücrelerinde kullanılmak üzere seçildi.

VGSC Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 α izofomlarının PC-3 hücre serilerindeki gen ekspresyon seviyesini incelemek için propolis-su, propolis-DMSO ekstraktlarının 20µg/ml'lik konsantrasyonu, polen-su, polen-DMSO ekstraktlarından 150µg/ml'lik konsantrasyon ve hiçbir ekstrakt ile muamele edilmemiş (0µg/ml konsantrasyon) PC-3 hücre serileri kontrol amaçlı kullanılarak 24 saatlik inkübasyon sürelerinin bitiminde ayrı ayrı 6 flasktan total RNA'lar QIAamp RNA Blood Mini Kit ile izole edildi. Her bir primer için cDNA AMV Reverse Transcriptase enzimi ile kit prosedürüne uygun olarak üretildi. cDNA'sı üretilen β-Aktin, VGSC Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 α izofomları Negatif Kontrol ile birlikte Roche Applied Science LightCycler DNA Mater SYBR Green I kiti ile LightCycler 2.0 System cihazında çalışıldı. RTPCR çalışmalarında kullanılan her bir flasktaki hücre sayısı farklı olduğundan dolayı β-Aktin gen ekspresyon seviyesi VGSC Na_v1.5 ve Na_v 1.7 α izofomları ile birlikte normalizasyon işlemi için kullanılmak üzere çalışıldı. Her bir RTPCR çalışmasında β-Aktin ile birlikte cDNA yerine suyun kullanıldığı negatif kontrol çalışmalara eklendi. RTPCR çalışmaları sonucunda 0µg/ml konsantrasyon Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 gen ekspresyonu % 100 kabul edilerek gerekli hesaplar yapıldı ve 150µg/ml'lik polen-DMSO ekstraktı ile muamele edilmiş 2 ve 7 nolu flasklarda Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 gen ekspresyonu en yüksek oranda (% 55.98 ve % 53.31) baskılandığı tespit edildi. Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 gen ekspresyonundaki ikinci en yüksek baskılanma 20µg/ml'lik propolis-DMSO ekstraktlarının kullanıldığı 3 ve 8 nolu flasklarda % 37.38 ve % 41.98 olarak bulundu. Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 gen ekspresyonu 150µg/ml polen-su ekstraktlarıyla muamele edilmiş olan 3 ve 8 nolu flasklarda % 24.22 ve % 25.08 baskılanırken en düşük oranda baskılanma %

18.01 ve %22.58 olarak 20µg/ml'lik propolis-su ekstraktları ile muamele edilmiş PC-3 hücre serilerinde tespit edildi.

Literatürde polen ve propolis ekstraktlarının PC-3 hücre serileri veya diğer kanser hücre serilerindeki VGSC gen ekspresyonlarına etkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yüzden elde edilen sonuçlar direkt olarak herhangi bir literatürle karşılaştırılmadı. Ancak Wu ve arkadaşlarının kırmızı şarap polifenollerininin dorsal root ganglionik nöronal hücrelerde voltaj kapılı iyon kanallarına etkisini patch-clamp tekniği ile incelediği çalışmada kırmızı şarap polifenollerinin 2.5µg/ml'lik konsantrasyonda VGSC'den Na⁺ akışının % 50 oranında baskıladığını, kırmızı şarap polifenollerin sinir sistemi üzerine anesteziik veya sedatif etkisinin olduğu ve 100ml kırmızı şarabın tüketilmesiyle 50 dk'da plazma polifenolik konsantrasyonun 2.5µg/ml'ye ulaşarak nöronal iyon kanallarının baskılandığı savunuldu (100). Antioksidan ve antikanser ajan olan polifenollerin hücre kinaz aktivitelerini inhibe ettikleri savunulmaktadır (101). Önemli polifenoller arasında bulunan quercetin, resveratol, D,L-catechin ve D,L-epicatechin pek çok hücre fonksiyonda rol aldığı gibi iyon kanallarını aktive edebilecekleri de savunulmaktadır. Örneğin quercetin iskelet kası sarkoplazmik retikulumdaki Ca⁺²-salabilen kanalları aktive ettiği, catechinlerin chromaffin hücrelerinde voltaj kapılı Ca⁺² kanallarındaki akışı artırdığı bildirilmiştir (100). Dolayısıyla polifenoller yönünden zengin olan polen ve propolis ekstraktlarının VGSC aktivitesine etki edebileceği ve VGSC Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 α izoformlarının gen ekspresyonlarını baskılama mekanizmasının bu yolla olabileceği kanaatine varıldı.

Çalışmamıza literatürdeki en benzeyen çalışmada CELEX hipotezi İşbilen ve arkadaşları tarafından DHA (dokosahekzaenoik asit)nın MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde sınanmıştır (102). Omega-3 serisi poliansatüre yağ asidi serisindeki DHAnın iyon kanallarını etkileyebileceği Jude ve arkadaşları(103) tarafından bildirildiğinden, bu çalışmada kanserli hücrelerde denenmiştir. 0.5µM konsantrasyondaki DHAnın 48 saat inkübasyon sonunda Na_v1.5 mRNA ekspresyonunu kontrollere göre % 67 azalttığı rapor edilmiştir (102). CELEX hipotezini test etmede standart olarak kullanılan TTX iyon kanallarının aktivitesini ve mRNA ekspresyonunu % 80 'e yakın baskılamakla birlikte oldukça lethaldir. Günümüzde düşük dozlarda analjezik olarak kullanımına dair klinik çalışmalar vardır. Dolayısıyla doğal bileşikler olan polen ve propolisin kanserlerin baskılanmasında kullanılmasının daha mantıklı olduğunu düşünüyoruz. Nitekim Li ve arkadaşları(53) da prostat kanser hücreleri ile muamele ettikleri Brezilya propolisini

antiproliferatif ve antimetastatik etkilerini gösterdikten sonra propolisin prostat kanseri kemoterapisinde tek başına veya antikanser ajanlarla kombine olarak kullanılabilceğini önermişlerdir. Bu konudaki çalışmalar oldukça yenidir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

1- Türkiye'nin çeşitli illerinden (Balıkesir(Beydağ), Bayburt(Demirözü), Erzurum(Arıbahçe) ve Trabzon) toplanan polen ve Trabzon'dan toplanan propolis örnekleri DMSO ve suda çözülüp çeşitli konsantrasyonlarda (200, 150, 100µg/ml polen su, polen DMSO ve 20, 10, 5µg/ml propolis su, propolis DMSO) ekstraktlar hazırlandı.

2- Metastatik kabiliyeti yüksek olan PC-3 prostat kanseri hücre serileri üretildi ve canlılık testi(MTT) sonuçlarına göre DMSO ve sulu polen ekstraktlarından 150µg/ml ve DMSO ve sulu propolis ekstraktlarından 20µg/ml'lik konsantrasyonlarla PC-3 kanser hücre serilerinin inkübe edildmesine karar verildi.

3- Metastatik kabiliyeti yüksek olan MCF-7 meme kanser hücre serileri istenilen oranda çoğaltılamadığı için çalışmaya katılmadı.

4- Seçilen konsantrasyonlardaki polen ve propolis ekstraktları ile PC-3 prostat kanseri hücreleri 24 saat inkübe edildi. Hiçbir ekstrakt ile muamele edilmeyen PC-3 hücre serisi çalışmamızda kontrol olarak kullanıldı.

5- İnkübasyon süresi dolan hücre serilerinden total RNA'ları izole edildi ve β-Aktin ile metastatik kanser hücrelerinde ekspresyonu artan VGSC Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 α izoformlarının cDNA'sı üretildikten sonra gen ekspresyon seviyeleri RTPCR çalışmalarıyla belirlendi. β-Aktin her bir RTPCR çalışmasında kontrol olarak kullanıldı.

6- Polen ve propolis ekstraktları ile muamele edilen bütün PC-3 kanser hücre serilerinde VGSC Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 α izoformlarının gen ekspresyonu hiçbir ekstraktla muamele edilmeyen kontrol hücrelerine göre çeşitli oranlarda baskılandı.

7- PC-3 kanser hücre serilerinde VGSC Na_v 1.5 α izoformunun gen ekspresyonu kontrol hücrelerine göre en yüksek 150µg/ml'lik polen DMSO ekstraktınca, en düşük 20µg/ml'lik propolis su ekstraktınca sırasıyla % 55.98 ve % 18.01 oranında baskılandı.

8- PC-3 kanser hücre serilerinde VGSC Na_v 1.7 α izoformunun gen ekspresyonu kontrol hücrelerine göre en yüksek 150µg/ml'lik polen DMSO ekstraktınca, en düşük 20µg/ml'lik propolis su ekstraktınca sırasıyla % 53.31 ve % 22.58 oranında baskılandı.

9- Daha yüksek konsantrasyonlardaki propolis DMSO, propolis su ekstraktları ve farklı çözücüler kullanılarak çeşitli konsantrasyonlardaki polen ve propolis ekstraktlarıyla bu çalışma PC-3 dışında farklı kanser hücre serilerinde de çalışılabilir.

10- Çeşitli polen ve propolis ekstraktlarının VGSC'nin farklı α ve β izoformlarının ve VGPC gibi diğer kanal proteinlerinin gen ekspresyon seviyesi üzerine etkisinin incelenmesi yanı sıra kanal proteinlerinin aktivitesi ve protein seviyesi üzerine etkisi gelecekte patch clamp tekniği, northern blot ve western blot analizleri yapılarak çalışılabilir.

11- Polen ve propolis ekstraktları, insanlara lethal olan tetrodotoksin adlı balık zehiri yerine alternatif doğal ürünler olarak VGSC'nin baskılanmasını amaçlayan çeşitli antimetastatik çalışmalarda kullanılabilir.

12- Polen ve propolis prostat kanseri kemoterapisinde tek başına veya antikanser ajanlarla kombine olarak kullanılabilir.

ÖZET

Polen ve propolis anti-inflamatuar, antioksidan, antitümöral gibi özelliklere sahip olan, toplandığı bölgenin coğrafyasına ve iklimine bağlı olarak kompozisyonu değişen, flavonoidler ve polifenolik bileşiklerce zengin arı ürünleridir. Voltaj kapılı sodyum kanal proteini(VGSC) hücrelere Na^+ akışını sağlayan, metastatik kanser hücrelerinde ekspresyonu ve aktivitesi oldukça artan, α ve β izoformlarından oluşan bir membran proteindir. Bu çalışmada, canlılık testi sonucu belirlenen Türkiye poleni ve Trabzon propolisinin DMSO ve sulu ekstraktlarının sırasıyla 150 $\mu\text{g/ml}$ 'lik ve 20 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarının metastatik PC-3 prostat kanser hücrelerinde VGSC'nin Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 α izoformları ekspresyonu üzerine etkisi RTPCR(Real Time PCR) çalışmalarıyla incelendi. PC-3 kanser hücreleriyle polen ve propolis ekstraktları 24 saat inkübe edildi. 0mg/ml ekstraktlı PC-3 hücrelerinde VGSC ekspresyonu %100 kabul edildi. RTPCR çalışmaları sonucunda kontrol hücrelerine göre Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 izoformlarının gen ekspresyonundaki en yüksek baskılanma 150 $\mu\text{g/ml}$ 'lik polen DMSO ekstraktlarınca sırasıyla %55.98 ve %53.31 oranında, en düşük baskılanma ise 20 $\mu\text{g/ml}$ 'lik propolisin sulu ekstraktlarınca sırasıyla %18.01 ve %22.58 oranında olduğu saptandı. Sonuç olarak polen ve propolisin DMSO ve sulu ekstraktlarının PC-3 prostat kanseri hücre serilerinde VGSC Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 α izoformlarının mRNA ekspresyonlarını değişik oranlarda baskıladığı ve anti-metastatik aktiviteye sahip olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Polen, Propolis, Voltaj Kapılı Sodyum Kanal Proteini, PC-3 Prostat Kanser Hücre Serisi.

SUMMARY

Effects of Bee Pollen and Propolis Extracts on Expression of Voltage-Gated Sodium Channels in Metastatic Human Prostate Cancer Cell Lines

Pollen and propolis are bee products, rich in flavonoids and phenolic compounds, which have anti-inflammatory, antioxidant, antitumoral properties. Their compositions vary with geographical area and climate where they are collected. Voltage-Gated Sodium Channel Protein (VGSC) is a membrane protein which composed of α and β isoforms and allows influx of Na^+ through the cell and its expression and activity are increased in metastatic cancer cells. In this study, DMSO and water extracts of Turkey pollen and Trabzon propolis respectively of 150 $\mu\text{g/ml}$ and 20 $\mu\text{g/ml}$ concentrations which were chosen according to the viability experiments were used to determinate their effects on expression of VGSC $\text{Na}_v 1.5$ and $\text{Na}_v 1.7 \alpha$ isoforms in PC-3 prostate cancer cell lines. PC-3 cancer cells were incubated with extracts of pollen and propolis for 24 hours. Expressions of VGSC were suggested to be 100 % in PC-3 cells incubated with 0 mg/ml extracts. At the end of the RTPCR studies, the highest inhibitions of $\text{Na}_v 1.5$ and $\text{Na}_v 1.7 \alpha$ isoforms were observed as respectively 55.98 % and 55.31 % in PC-3 cells incubated with 150 $\mu\text{g/ml}$ DMSO extracts of pollen. In conclusion, mRNA expressions of VGSC $\text{Na}_v 1.5$ and $\text{Na}_v 1.7 \alpha$ isoforms are inhibited by DMSO and water extracts of pollen and propolis in different ratios. It was concluded that DMSO and water extracts of pollen and propolis may have anti-metastatic activity in PC-3 prostate cancer cell lines.

Key Words: Pollen, Propolis, Voltage-Gated Sodium Channel Protein, PC-3 Prostate Cancer Cell Lines.

KAYNAKLAR

1. Gonzalez, G., Hinojo, M.J., Mateo, R., Medina, A., Jimenez, M.: Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee polen. *International Journal of Food Microbiology*, 105: 1-9, 2005.
2. Burdock, G.A.: Review of the biological propenties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36:347-363, 1998.
3. Banskota, A. H., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A. A. G., kadota, S.: Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and Chine. *Journal of Etnopharmacology*, 72: 239-246, 2000.
4. Schmidt, J.O.: Bee Products Chemical Composition and Application in Mizrahi, A., Lensky, Y.(Eds), *Bee Products Properties, Applications, and Apitherapy*, Plenum Press, New York, 1997, pp. 15-26.
5. Gerigelmez, A.Y.: Miyeloid kanser hücre serilerinde polen ekstraktlarının kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkileri, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2003.
6. Kolankaya, D., Selmanoğlu, G., Sorkun, K., Salih, B.: Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chemistry*, 78: 213-217, 2002.
7. Campos, M.G., Cunha, A., Markham, K.R.: Bee Products Chemical Composition and Application in Mizrahi, A., Lensky, Y.(Eds), *Bee-Pollen Composition, Properties, and Applications*, Plenum Press, New York, 1997, pp. 93-100.
8. Nagai, T., Inoue, R., Inoue, H., Suzuki, N.: Scavenging capacities of pollen extracts from *cistus iadaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals, and DPPH radicals. *Nutrition Research*, 22: 519-526, 2002.
9. Öztürk, F., Kurt, E., İnan, Ü.Ü., Emiroğlu, L., İlker, S. S., Sobaci, G.: Effects of propolis on endotoxin-induced uveitis in rabbits. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 43: 285-289, 1999.
10. Çolak, M.: Miyeloid kanser hücre serilerinde propolis ekstraktlarının kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2003.

11. Barlak, Y.: Türk propolisi ekstraktlarının solunumsal patlama sonrası PMN lökositlerden PMN elastaz salınımına etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2003.
12. Diss, J.K., Archier, S.N., Hirano, J., Fraser, S.P., Djamgoz, M.B.: Expression profiles of voltage-gated Na⁺ channel α -subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. *The Prostate*, 48:165-178, 2001.
13. Onganer, P.U. and Djamgoz, M.B.A.: Epidermal growth factor potentiates in vitro metastatic behavior of human prostate cancer PC-3M cells: involvement of voltage-gated sodium channel, *Molecular cancer*, 6:76(1-12), 2007.
14. Diss, J.K.J, Fraser, S.P., Djamgoz, M.B.A.: Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects. *European Biophysics Journal*, 33: 180–193, 2004.
15. Djamgoz, M.B.A. and Isbilen, B.: Dietary Compounds As Anti-cancer Agents: A Preliminary Evaluation of Ion Channels And Membrane Excitability As Possible Target Mechanisms. *Türk Biyokimya Dergisi*, 31(2);57-68, 2006.
16. Crane, E.: Bee Products Chemical Composition and Application in Mizrahi, A., Lensky, Y.(Eds), *The Past and Present Importance of Bee Products to Man*, Plenum Press, New York, 1997, pp. 1-13.
17. Ishikawa, Y., Tokura, T., Nakano, N., Hara, M., Niyonsaba, F., Ushio, H., Yamamoto, Y., Tadokoro, T., Okumura, K., Ogawa, H.: Inhibitory effect of honeybee-collected pollen on mast cell degranulation in vivo and in vitro. *Journal of Medicinal Food*, 11(1):14-20, 2008
18. Haro, A., Aliaga, I.L., Lisbona, F., Barrionuevo, M., Alferez, M.J.M., Campos, M.S.: Beneficial effect of pollen and/or propolis on the metabolism of iron. Calcium. Phosphorus, and magnesium in rats with nutritional ferropenic anemia. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48:5715-5722, 2000.
19. Feraboli, F.: Bee Products Chemical Composition and Application in Mizrahi, A., Lensky, Y.(Eds), *Apitherapy in Orthopaedic Diseases*, Plenum Press, New York, 1997, pp. 231-225.
20. Human, H. and Nicolson, S.W.: Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry* 67:1486-1492, 2006.
21. Campos, M.G., Webby, R.F., Markham, K.R., Mitchell, K.A., Cunha, A.P.D.: Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:742-745, 2003.

22. Değer, O. and Tahmaz, A.M.: The effects of polen and propolis extracts on erythrocyte lipid peroxidation. 1st International Congress on the Chemistry of Natural Products, Program&Abstaracts, P-68, 16-19 October 2002-Trabzon/Türkiye.
23. Dudov, I.A., and Starodub, N.F.: Antioxidant system of rat erythrocytes under conditions of prolonged intake of honeybee flower polen load. Ukr. Biokhim. Zh., 66(6): 94-96, 1994.
24. Dudov, I.A., Morenets, A.A., Artinkh, V.P., Starobub, N.F.: Immunomodulatory effect of honeybee flower pollen load. Ukr. Biokhim. Zh., 66(6): 91-93, 1994.
25. Wu, Y.D. and Lou, Y.J.: A steroid fraction of chloroform extract from bee pollen of *Brassica campestris* induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Phytotherapy Research*, 21:1087-1091, 2007.
26. Shoskes, D.A. and Manickam, K.: Herbal and complementary medicine in chronic prostatitis. *World Journal of Urology*, 21:109-113, 2003.
27. Yamaguchi, M.: Regulatory mechanism of food factors in bone metabolism and prevention of osteoporosis. *The Pharmaceutical Society of Japan*, 126(11):1117-1137, 2006.
28. Iversen, T., Fiirgaard, K.M., Schriver, P., Rasmussen, O., Andreasen, F.: The effect of NaO Li Su on memory functions and blood chemistry in elderly people. *Journal of Ethnopharmacology*, 56:109-116, 1997.
29. Carper, J.: *Mucize İlaçlar (Çev.J.G. Gürsoy, Z.Apaydın)*. Akaşa Yayınları, 2001.
30. Costa, C.C., Pereina, R.G.: The influence of propolis on the rheological behaviour of pure honey. *Food Chemistry*, 76: 417-421, 2002.
31. Banskota, A.H., Nagaoka, T., Sumioka, L.Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S.: Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 80:67-73, 2002.
32. Kimoto, N., Hirose, M., Kawabe, M., Satoh, T., Miyataka, H., Shirai, T.: Post-initiation effects of a super critical extracts of propolis in a rat two-stage carcinogenesis model in female F344 rats. *Cancer Letters*, 147: 221-227, 1999.
33. Santos, F.A., Bastos, E.M.A., Uzeda, M., Carvalho, M.A.R., Farias, L.M., Moreira, E.S.A., Braga, F.C.: Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 80: 1-7, 2002.
34. Park, J. S. and Woo, K. S.: The usage and composition of propolis added cosmetics in Korea. In Mizrahi, A., Lensky, Y. (Eds.), *Bee Products Properties, Applications, and Apitherapy*. Plenum Press, New York, 1997, p. 121-124.

35. Rodriguez, E.G., Abellan, G.B., Villanueva, M.T.: Macroelements in dietetic products containing propolis. *Food Chemistry*, 66: 15-19, 1999.
36. Woo, K. S., Park, J. S.: Eucalyptus propolis beverages with their composition and effects. In Mizrahi, A., Lensky, Y. (Eds), *Bee Products Properties, Applications and Apitherapy*. Plenum Press, New York, 1997, p. 125-128.
37. Marcucci, M.C., Ferreres, F., Viguera, C.G., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H.M., Paulino, N.: Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74: 105-112, 2001.
38. Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y. K., Bowen, W. H.: Effects of compounds found in Propolis on *Streptococcus Mutans* growth and on Glucosyltransferase activity. *Antimicrobial Agents Chemother*, 46:1302-1309, 2002.
39. Lairon, D. and Amiot, M.J.: Flavonoids in food and natural antioxidants in wine. *Current Opinion in Lipidology*, 10: 23-28, 1999.
40. Heo, MY., Sohn, S.J., Av, WW.: Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutation Research*, 448:135-150, 2001.
41. Metodiewa, D., Kochman, A., Karolczak, S.: Evidence For antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N-diethylaminoethyl ethers of flavanone oximes: A comparison with natural polyphenolic flavonoid (Rutin) action. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 41:1067-1075,1997.
42. Bankova, V.S., Christov, R.S., Tejera, A.D.: Ligands and other constituents of propolis from the Carany Islands. *Phytochemistry*, 49:1411-1415, 1998.
43. Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Marcucci, M.C., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A.: Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia*, 70: 190-193, 1999.
44. Sforcin, J.M., Jr, A.F., Lopes, C.A.M., Bankova, V., Funari, S. R. C.: Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 73: 243-249, 2000.
45. Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Cudmani, N.G., Vattuone, M.A., Sampietro, A.R.: Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucuman, Argentina) propolis. *Journal of Etnopharmacology*, 68: 97-102, 1999.
46. Koo, H., Gomes, B.P.F.A., Rosalen, P.L., Ambrosano, G.M.B., Park, Y.K.: Invitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Archives of Oral Biology*, 45: 141-148, 2000.
47. Yamamoto, T.: Presentation of Basic Studies on Propolis in Japan. In Mizrahi, A., Lensky, Y. (Eds), *Bee Products Properties, Applications, and Apitherapy*, Plenum Press, New York, 1997, pp. 107-120.

48. Harsh, Z., Rubinstein, A., Golondner, M., Elmaliyah, M., Mizrachi, Y.: Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. *Drugs Experimental and Clinical Research*, 23: 89-96, 1997.
49. Murad, J.M., Calvi, S.A., Soares, A.M.V.C., Bankova, V., Sforcin, J.M.: Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 331-334, 2002.
50. Lo'pez-Oti'n, C. and Diamandis, E.P.: Breast and Prostate Cancer: An Analysis of Common Epidemiological, Genetic, and Biochemical Features. *Endocrine Reviews*, 19(4): 365-396, 1998.
51. Coptcoat, M.J.: The Management of Advanced Prostate Cancer, Chapter 1 Natural History, Blackwell Science Ltd., The UK Copyright, İngiltere, 1996, pp.1-10.
52. Yörükoğlu, K.: Prostat Kanseri Tanı ve Tedavi, Prostat Kanseri Patolojisi, Üroonkoloji Derneği Yayınları-2, İstanbul, 2004, pp. 7-34.
53. Li, H., Kapur, A., Yang, J.X., Srivastava, S., Mcleod, D.G., Guzman, J.F.P., Dausch, A., Park, Y.K., Rhim J.S.: Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *International Journal of Oncology*, 31: 601-606, 2007.
54. Çevik, İ., Özveri, H., Dillioğlugil, İ.: Prostat Kanseri Tanı ve Tedavi, Metastatik Prostat Kanserinde Androjen Hormmon Ablasyonu ve Yan Etkilerinin Tedavisi, Üroonkoloji Derneği Yayınları-2, İstanbul, 2004, pp. 153-185.
55. Prevarskaya, N., Skryma, R., Bidaux, G., Flourakis, M., Shuba, Y.: Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells. *Cell Death and Differentiation*, 14:1295-1304, 2007.
56. Fraser, S.P., Salvador, V., Manning, E.A., Mizal, J., Altun, S., Raza, M., Berridge, R.J.: Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility. *Journal of Cellular Physiology*, 195:479-487, 2003.
57. Grimes, J.A., Fraser, S.P., Stephens, G.J., Downing, J.E.G., Laniado, M.E., Foster, C.S., Abel, P.D., Djamgoz, M.B.A.: Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Letters*, 369:290-294, 1995.
58. Fraser, S.P., Diss, J.K., Chioni, A.M., Mycielska, M.E., Pan, H., Yamaci, R.F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., Brackenbury, W.J., Theodorou, D., Koyuturk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, M.T., Slade, M.J., Tolhurst, R., Palmieri, C., Jiang, J., Latchman, D.S., Coombes, R.C., Djamgoz, M.B.: Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical Cancer Research*, 11(15):5381-9, 2005.

59. Yu, F.H. and Catterall, W.A.: Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, 4:207(1-7), 2003.
60. Grimes, J.A. and Djamgoz, M.B.A.: Electrophysiological characterization of voltage-gated Na⁺ current expressed in the highly metastatic Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer, *Journal of Cellular Physiology*, 175:50-58, 1998.
61. Ogata, N. and Ohishi, Y.: Molecular Diversity of Structure and Function of the Voltage-Gated Na⁺ Channels. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 88: 365 – 377, 2002.
62. Candenas, L., Seda, M., Noheda, P., Buschmann, H., Cintado, C.G., Martin, J.D., Pinto, F.M.: Molecular diversity of voltage-gated sodium channel α and β subunit mRNAs in human tissues. *European Journal of Pharmacology* 541:9-16, 2006.
63. Sato, C., Ueno, Y., Asai, K., Takahashi, K., Sato, M., Engel, A., Fujiyoshi, Y.: The voltage-sensitive sodium channel is a bell shaped molecule with several cavities. *Nature* 409: 1047-1051, 2001.
64. Alfred, L. and George, Jr.: Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *The Journal of Clinical Investigation*. 8(115):1990-1999, 2005.
65. Herfst LJ., Rook MB., JongasmaHJ.: Trafficking and functional expression of cardiac Na⁺ channels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 36:185-193, 2004.
66. Abriel, H. and Kass, R.S.: Regulation of the voltage-gated cardiac sodium channel Nav1.5 by interacting proteins. *Trends in Cardiovascular Medicine*, (15)1:35-40, 2005.
67. Mycielska, M.E., Fraser, S.P., Szatkowski, M., Djamgoz, M.B.A.: Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: II. secretory membrane activity. *Journal of Cellular Physiology*, 195:461-469, 2003.
68. Fraser, S.P., Ding, Y., Liu, A., Foster, C.S., Djamgoz, M.B.A.: Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastatic MAT-LyLu rat prostate cancer cell line. *Cell and Tissue Research*, 295:505-512, 1999.
69. Djamgoz, M.B.A., Mycieiska, M., Madeja, Z., Fraser, S.P., Korohoda, W.: Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltage gated Na⁺ channel activity. *Journal of Cell Science*, 114:2697-2705, 2001.
70. Barckenbury, W.J. and Djamgoz, M.B.A.: Activity-dependent regulation of voltage-gated Na⁺ channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line. *The Journal of Physiology*, 573.2:343-356, 2006.

71. Fraser, S.P., Diss, J.K.L., Lloyd, L.J., Pani, F., Chioni, A.M., George, A.J.T., Djamgoz, M.B.A.: T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na⁺ channel activity. *FEBS Letters*, 569:191-194, 2004.
72. Smith, P., Rhodes, N.P., Shortland, A.P., Fraser, S.P., Djamgoz, M.B.A., Ke, Y., Foster, C.S.: Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells. *FEBS Letters*, 423:19-24, 1998.
73. Krasowska, M, Grzywna, Z.J., Mycielska, M.E., Djamgoz, M.B.A.: Patterning of endocytic vesicles and its control by voltage-gated Na⁺ channel activity in rat prostate cancer cells: fractal analyses. *European Biophysics Journal*, 33:535-542, 2004.
74. Lee, K.S., Lee, H.J., Ahn, K.S., Kim, S.H., Nam, D., Kim, D.K., Choi, D.Y., Ahn, K.S., Lu, J., Kim, S.H.: Cyclooxygenase-2/prostaglandin E₂ pathway mediates icariside II induced apoptosis in human PC-3 prostate cancer cells. *Cancer Letters*, 280:93-100, 2009.
75. Nagai, T, Sakai, M, Inoue, R, Inoue, H, Suzuki, N.: Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry*, 75:237–40, 2001.
76. Castaldo, S. and Capasso, F.: Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 1:S1–6, 2002.
77. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganda, G.: Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20:933– 56, 2006.
78. Havsteen, B.H.: The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96:67-202, 2002.
79. Borrelli, F., Maffia, P., Pinto, L., Ianaro, A., Russo, A., Capasso, F., Ialenti, A.: Phytochemical compounds involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, 1:S53–63, 2002.
80. Popova, M., Silici, S., Kaftanoglu, O., Bankova, V.: Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 12:221–8, 2005.
81. Orsolich, N., Knezevic, A.H., Sver, L., Terzic, S.: Basic I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 94:307– 15,2004.
82. Sa-Nunes, A., Faccioli, L.H., Sforcin, J.M.: Propolis: lymphocyte proliferation and IFN-g production. *Journal of Ethnopharmacology*, 7:93– 7, 2003.
83. Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A.: Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71:109– 14, 2000.

84. Havsteen, B.: Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32:1142–8, 1983.
85. Aliyazıçioğlu, Y., Deger, O., Ovalı, E., Barlak, Y., Hosver, I., Tekelioglu, Y., Karahan, S.C.: Effects of turkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K-562 cell lines. *International Immunopharmacology*, 5:1652-1657, 2005.
86. Carballo, D.D., Malak, S., Bardenheuer, W., Freistuehler, M., Reusch, H.P.: The contribution of plukenetione A to the anti-tumoral activity of Cuban propolis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(22): 9635-9643, 2008.
87. Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Troncoso, N., Vanella, A., Garbarino, J.A.: Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences*, 76: 545-558, 2004.
88. Kimoto, T., Aga, M., Hino, K., Koya-Miyata, S., Yamamoto, Y., Micallef, M.J., Hanaya, T., Arai, S., Ikedia, M., Kurimoto, M.: Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. *Anticancer Research*, 21: 221-228, 2001.
89. Kimoto, T., Arai, S., Kohguchi, M., Aga, M., Nomura, Y., Macallef, M., Kurimoto, M., Mito, K.: Apoptosis and suppression of tumor growth by Artepillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detection and Prevention*, 22:506-515, 1998.
90. Jin, U.H., Chung, T.W., Kang, S.K., Suh, S.J., Kim, J.K., Chung, K.H., Gu, Y.H., Suzuki, I., Kim, C.H.: Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification. *Clinica Chimica Acta*, 362:57-64, 2005.
91. Lee, K.W., Kang, N.J., Kim, J.H., Lee, K.M., Lee, D.E., Hur, H.J., Lee, H.J.: Caffeic acid phenethyl ester inhibits invasion and expression of matrix metalloproteinase in SK-Hep 1 human hepatocellular carcinoma cells by targeting nuclear factor kappa B. *Genes & Nutrition*, 2:319-322, 2008.
92. Hwang, H.J., Park, H.J., Chung, H.J., Min, H.Y., Park, E.J.: Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1090 fibrosarcoma cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17:356-362, 2006.
93. Velikova, M., Bankova, V., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., Marcucci, M.C.: Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia*, 71: 693-696, 2000.
94. Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankava, V., Christov, R., Popov, S.: Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 235-240, 1999.

95. Diss, J.I.K., Stewart, D., Pani, F., Foster, C.S., Walker, M.M., Patel, A., Djamgoz, M.B.: A potential novel marker for human prostate cancer; voltage-gated sodium channel expression in vivo. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 8:266-273,2005.
96. Anderson, J.D., Hansen, T.P., Lenkowski, P.W., Walls, A.M., Choudhury, I.M., Schenck, H.A., Friehling, M., Höll, G.M., Patel, M.K., Sikes, R.A., Brown, M.L.: Voltage-gated sodium channel blockers as cytostatic inhibitors of the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2:1149-1154,2003.
97. Mycielska, M.K., Fraser, S.P., Szatkowski, M., Djamgoz, M.B.: Contribution of functionall voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer; II. Secretory membrane activity. *Journal of Cellular Physiology*, 195:461-469, 2003.
98. Scorey, N., Fraser, S.P., Patel, P., Pridgeon, C., Dallman, M.J., Djamgoz, M.B.: Notch signalling and voltage-gated Na⁺ channel activity in human prostate cancer cells: independent modulation of in vitro motility. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* , 9:399-406, 2006.
99. Bennett, E.S., Smith, B.A., Harper, J.M.: Voltage-gated Na⁺ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* , 447: 908–914,2004.
100. Wu, Y.L., Ohsaga, A., Oshiro, T., Iinuma, K., Kondo, Y., Ebihara, S., Sasaki, H., Maruyuma, Y.: Suppressive effects of red wine polyphenols on valtage-gated ion chanelns in dorsal root ganglionic neuronal cells. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 206:141-150, 2005.
101. Soleras, G.J., Grass, I., Josephy, P.D., Goldberg, D.M., Diamandis, E.P.: A comparison of the anticarcinogenic properties of for red wine polyphrnols. *Clinical Biochemistry*, 35:119-124, 2002.
102. Isbilen, B., Fraser, S.P., Djamgoz, M.B.A.: Docosahexaenoic acid (omega-3) blocks voltage-gated sodium channel activity and migration of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38:2173-2182, 2006.
103. Jude, S., Roger, S., Martel, E., Besson, P., Richard, S., Bougnoux, P., Champeroux, P., Le Guennec, J.Y.: Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin: A comparison of their protective effects on coronary heart disease and breast cancers. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 90:299-325, 2006.

ÖZGEÇMİŞ

Meltem Çolak, 1978 Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti Lefke beldesine bağlı Yeşilyurt köyünde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde tamamladı. Yüksek öğrenimi için 1995 yılında Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nü kazandı. 1999 yılında K.T.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden mezun oldu. 2000 yılında K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı ve 2003 yılında mezun oldu. Aynı yıl K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora öğrencisi olarak halen sürmekte olan çalışmalarına başladı. Evli ve bir çocuk annesidir.