

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**OLEUROPEİNİN VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALI ARACILI
KANSER HÜCRE HAREKETİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
HİPOKSİK KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI**

Şilan GÖZENOĞLU ÜCAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2022**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Kanserin özellikleri ve kanser metabolizması	5
2.2. Metastaz	10
2.3. İyon kanalları	12
2.3.1. Voltaj kapılı iyon kanal ailesi	12
2.3.1.1. Voltaj kapılı sodyum kanalı	13
2.3.1.2. Voltaj kapılı kalsiyum kanalı	15
2.3.1.3. Voltaj kapılı potasyum kanalı	17
2.4. Hipoksi	18
2.4.1. Hipoksiyle indüklenen faktör (HIF)	18
2.4.1.1. HIF ve anjiyogenez	20
2.4.1.2. HIF ve hücre proliferasyonu	20
2.4.1.3. HIF ve glikoz metabolizması	21
2.4.1.4. HIF ve ekstraselüler matriks	23
2.4.1.5. HIF ve çoklu ilaç direnci ilişkisi	24
2.4.2. Hipoksi ve kanser	24
2.4.3. Hipoksi ve İyon Kanalları	26
2.5. Oleuropein	28
3. MATERYAL ve YÖNTEM	30
3.1. Materyal	30
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Hücre kültürü	31
3.2.2. Hipoksik koşulların oluşturulması	31
3.2.3. Bileşiklerin hazırlanması	32
3.2.4. Hücre proliferasyon analizi	33
3.2.5. Toksisite analizi	34
3.2.6. Motilite indeksinin belirlenmesi (yara kapanma analizi)	34
3.2.7. İstatistiksel değerlendirme	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	36
4.1. Hücre proliferasyonu	36
4.1.1. Hücre sayısının belirlenmesi	36
4.1.2. Oleuropeinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi	37
4.2. Toksisite analiz sonuçları	40
4.3. Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etki	42
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	62

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

OLEUROPEİNİN VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALI ARACILI KANSER HÜCRE HAREKETİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HİPOKSİK KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI

Şilan GÖZENOĞLU ÜCAN

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hatice AKTAŞ
Yıl: 2022, Sayfa: 62

Kanser, kalp hastalığından sonra dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Kanserde başlıca ölüm nedeni metastazdır. Voltaj kapılı sodyum kanalları, metastatik sürecin tüm adımlarında rol oynar. Tümör dokusu büyüdükçe hipoksik bir ortama sahip olacaktır. Hipoksik koşullar hücre metabolizmasını kanser hücresi lehine düzenler. Hipoksik koşullarda aktive olan hipoksi ile indüklenebilir faktör HIF, fonksiyonel VGSC'nin ekspresyonunu artırır, böylece metastatik süreci destekler. Antikanser ve antimetastatik tedavilerin in vitro çalışmaları genellikle normal oksijen seviyelerinde gerçekleştirilir. Bileşiklerin aktivitelerinin hipoksik koşullarda değerlendirilmesi daha gerçekçi sonuçlar sağlayacaktır. Antioksidan, antiviral, antimikrobiyal ve antikanser aktivitelere sahip olduğu bildirilen oleuropeinin, normoksik koşullar altında VGSC ekspresyonunu baskılayarak sıçan prostat kanseri hücrelerinin hareketini engelleyebildiği de gösterilmiştir. Ancak literatürde hipoksik koşullarda oleuropeinin insan prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkisine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada oleuropein hem normoksik hem de hipoksik koşullarda 48 saat boyunca VGSC'yi eksprese eden ve metastatik yeteneği VGSC'lerle ilişkili olan yüksek düzeyde metastatik bir insan prostat kanseri PC-3 hücre hattına uygulandı. Öncelikle hücre proliferasyonunu etkilemeyen ve hücreler üzerinde toksik etkisi olmayan oleuropein konsantrasyonu her iki durumda da belirlendi. Daha sonra bu konsantrasyondaki oleuropeinin hücre migrasyonu üzerindeki etkisi araştırıldı. Normoksik koşullarda 200 µM, hipoksik koşullarda 300 µM ve üzerindeki oleuropein konsantrasyonlarının doza bağlı olarak PC-3 hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, ancak 150 µM oleuropeinin hücre proliferasyonunu etkilemediği ve hücreler için toksik olmadığı belirlenmiştir. Hücre proliferasyonu üzerindeki etkiyi dışlamak için 150 µM oleuropeinin hücre migrasyonu üzerindeki etkisi incelenmiş ve bu konsantrasyonda hücrelerin motilite indeksinde önemli bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize oleuropeinin olası etkisinin farklı konsantrasyonlarda veya diğer bileşiklerle kombinasyonlarda ve daha uzun uygulama sürelerinde tekrar test edilmesi gerektiğini göstermektedir. Ayrıca oleuropeinin PC-3 hücre proliferasyonu üzerindeki inhibisyon aktivitesi değerlendirilmeli ve etki mekanizması araştırılmalıdır.

ANAHTAR KELİMELELER: Oleuropein, Hipoksi, Metastatik hücre davranışı, Voltaj kapılı sodyum kanalları, prostat kanseri

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECT ON VOLTAGE GATED SODIUM CHANNEL MEDIATED CANCER CELL MOTILITY OF OLEUROPEIN, AT HYPOXIC CONDITIONS

Şilan GÖZENOĞLU ÜCAN

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Hatice AKTAŞ, Ph.D.

Year: 2022, Page: 62

Cancer is the second leading cause of death worldwide after heart disease. The main cause of death in cancer is metastasis. Voltage-gated sodium channels play a role in all steps of the metastatic process. As the tumor tissue grows, it will have a hypoxic environment. Hypoxic conditions regulate cell metabolism in favor of the cancer cell. The hypoxia-inducible factor HIF, activated in hypoxic conditions, increases the expression of functional VGSC, thus promoting the metastatic process. In vitro studies of anticancer and antimetastatic therapies are generally performed at normal oxygen levels. Evaluation of the activities of the compounds in hypoxic conditions will provide more realistic results. It has also been shown that oleuropein, which has been reported to have antioxidant, antiviral, antimicrobial, and anticancer activities, can inhibit the movement of rat prostate cancer cells by suppressing the expression of VGSC under normoxic conditions. However, no study has been found in the literature on the effect of oleuropein on human prostate cancer cells in hypoxic conditions. In this study, oleuropein was applied to a highly metastatic human prostate cancer PC-3 cell line, which expresses VGSC and whose metastatic ability is associated with VGSCs, for 48 hours in both normoxic and hypoxic conditions. First, the concentration of oleuropein, which does not affect cell proliferation and does not have a toxic effect on cells, was determined in both conditions. Then the effect of oleuropein at this concentration on cell migration was investigated. It has been determined that oleuropein concentrations of 200 μ M in normoxic conditions and 300 μ M and higher in hypoxic conditions inhibit PC-3 cell proliferation depending on the dose, but 150 μ M oleuropein does not affect cell proliferation and is not toxic to cells. To exclude the effect on cell proliferation, the effect of 150 μ M oleuropein on cell migration was examined, and it was found that there was no significant change in the motility index of the cells at this concentration. These results show us that the possible effect of oleuropein should be tested again with different concentrations or combinations with other compounds and longer application times. In addition, the inhibition activity of oleuropein on PC-3 cell proliferation should be evaluated, and its mechanism of action should be investigated.

KEYWORDS: Oleuropein, Hypoxia, Metastatic cell behaviour, Voltage gated sodium channels, prostate cancer

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Hatice AKTAŞ'a; laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Zeynep ÇELİK, Büşra TOSUN ve Melike TANRIVERDİ'ye teşekkür etmeyi borç bilirim.

Ayrıca daima beni destekleyen anneme, babama, kardeşlerime ve eşime teşekkürlerimi sunarım.



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. 2019 yılı verilerine göre dünyada ölüm nedenleri.....	4
Şekil 2.2. Kanser istatistikleri. A,C,E: İnsidans; B,D,F: Mortalite oranları	4
Şekil 2.3. Kanser hücrelerinin sahip olduğu özellikler.....	5
Şekil 2.4. Voltaj kapılı sodyum kanalının yapısı.....	14
Şekil 2.5. HIF alt üniteleri.....	19
Şekil 2.6. Oleuropeinin kimyasal yapısı.....	29
Şekil 3.1. (a) Normoksik ve (b) hipoksik inkübatör	31
Şekil 3.2. Oleuropein ticari ambalajı ve kimyasal yapısı	32
Şekil 3.3. Tetradotoksinin ticari ambalajı ve kimyasal yapısı.....	32
Şekil 4.1. Farklı sayılarda ekilmiş PC-3 hücrelerinde 24, 48, 72 ve 96 saatlik sürelerin sonunda tespit edilen canlılık oranları (%)	37
Şekil 4.2. PC-3 hücrelerinde normoksik koşullarda ve farklı konsantrasyonlarda oleuropein uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ($\pm$ standard hata).....	38
Şekil 4.3. PC-3 hücrelerinde hipoksik koşullarda ve farklı konsantrasyonlarda oleuropein uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ($\pm$ standard hata).....	39
Şekil 4.4. Toksisite grafiği: (A) Normoksik, (B) Hipoksik koşul.	42
Şekil 4.5. PC-3 hücrelerinde normoksik koşullarda 150 μ M oleuropein uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksi (MoI) değerleri ($\pm$ standart hata).....	44
Şekil 4.6. PC-3 hücrelerinde hipoksik koşullarda 150 μ M oleuropein uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksi (MoI) değerleri ($\pm$ standart hata).....	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Organlarda ve ilgili tümörlerde oksijenasyonun karşılaştırılması	26
Çizelge 2.2. Sürekli hipoksinin voltaj kapılı iyon kanalları üzerindeki etkileri	27
Çizelge 4.1. PC-3 hücrelerinde (a) normoksik (b) hipoksik koşullarda ve farklı konsantrasyonlarda oleuropein uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ($\pm$ standart hata)... 38	
Çizelge 4.2. PC-3 hücreleri üzerine oleuropein (OL) uygulaması sonucunda elde edilen canlı ve ölü hücre sayıları (%).....	41
Çizelge 4.3. PC-3 hücrelerinde normoksik ve hipoksik koşullarda oleuropein uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre oranları ($\pm$ standart hata).....	43



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

HIF	Hipoksiyle indüklenabilir faktör
VGSC	Voltaj kapılı sodyum kanalı
OL	Oleuropein
TTX	Tetrodotoksin



1. GİRİŞ

Kanser, dünyada ikinci sıradaki ölüm nedeni olmayı sürdürmektedir (Ourworldindata, 2022). Kanser hastasını ölüme götüren asıl nedenin metastaz yani diğer dokulara yayılarak sekonder tümör odaklarının oluşumu olduğu bildirilmektedir (Nandana ve Chung, 2014). Son yıllarda yapılan çalışmalarla voltaj kapılı sodyum kanallarının metastatik süreci oluşturan bütün adımlarda görev aldığı ortaya çıkarılmıştır (Onkal ve Djamgoz, 2009). Bu bulgu, voltaj kapılı sodyum kanallarının bloklanmasıyla metastazın durdurulabileceği fikrini doğurmuştur. Bu amaçla çeşitli tedavi seçenekleri ile farklı farmakolojik ajanların etkinliklerinin denendiği çalışmalar yapılmaktadır (Gumushan Aktas ve Akgun, 2018; Gumushan Aktas ve Ayan, 2021). Ancak bu çalışmalar çoğunlukla normal oksijen seviyelerine sahip ortamlarda gerçekleştirilmektedir. Düşük oksijen seviyelerini ifade eden hipoksik koşulların hücre metabolizmasını kanser hücresinin lehine düzenlediği bildirilmektedir (Semenza, 2010a; Semenza 2010b). Hipoksik koşullarda aktifleşen HIF'in fonksiyonel VGSC ekspresyonunu arttırdığı, böylece metastatik süreci teşvik edebileceği birkaç çalışma ile gösterilmiştir (Rızaner, 2010; Mokhtar, 2011).

Oleuropeinin, antioksidan, damar genişletici (Duke, 1992), antiviral (Omar, 2010) ve antimikrobiyal (Harborne ve ark., 1999) aktiviteler sergilediği ve kalp sağlığını korumaya yardımcı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca oleuropeinin prostat, mesane, meme kanseri gibi çeşitli hücre hatlarına karşı antikanser aktivite sergilediği de çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Bulotta ve ark., 2011; Acquaviva ve ark., 2012; Elamin ve ark., 2013). Gumushan Aktas ve Ayan (2021), oleuropeinin MAT-LyLu prostat kanseri hücrelerinde VGSC ekspresyonunu baskılayarak hücre hareketini durdurabileceğini göstermişlerdir. Ancak çalışma normoksik koşullarda gerçekleştirilmiş olup literatürde oleuropeinin insan prostat kanseri hücreleri üzerinde hipoksik koşullardaki etkisine dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında amacımız normoksik ve hipoksik koşullarda uygulanan oleuropeinin yüksek metastatik PC-3 hücrelerinin hareketi üzerindeki etkilerini

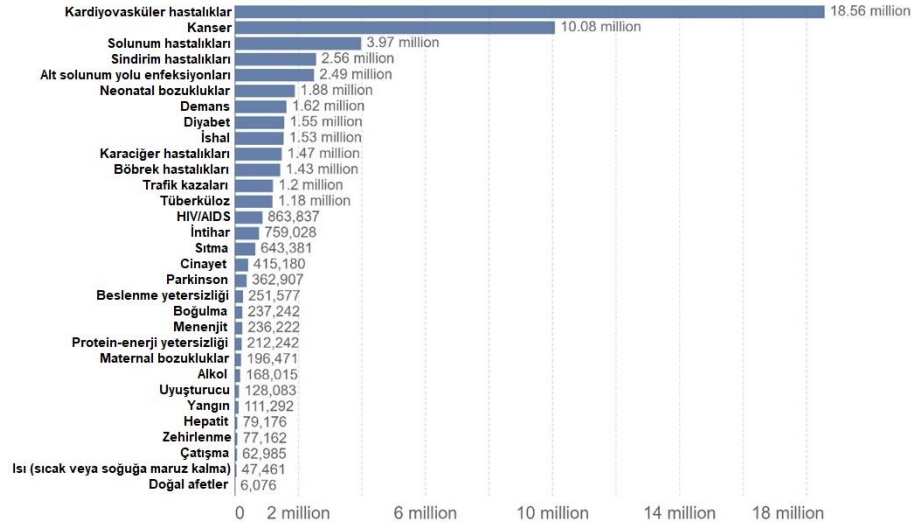
araştırmaktır. Bu amaçla, yüksek metastatik olan ve metastatik yeteneği VGSC'lerle ilişkili olan insan prostat kanseri PC-3 hücre hattına hem normoksik hem de hipoksik koşullarda 48 saat süreyle oleuropein uygulanmıştır. Öncelikle her iki koşulda hücre proliferasyonunu etkilemeyen ve hücrelere toksik etki yapmayan oleuropein konsantrasyonu belirlenmiş ve bu konsantrasyondaki oleuropeinin hücre migrasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1.Kanser

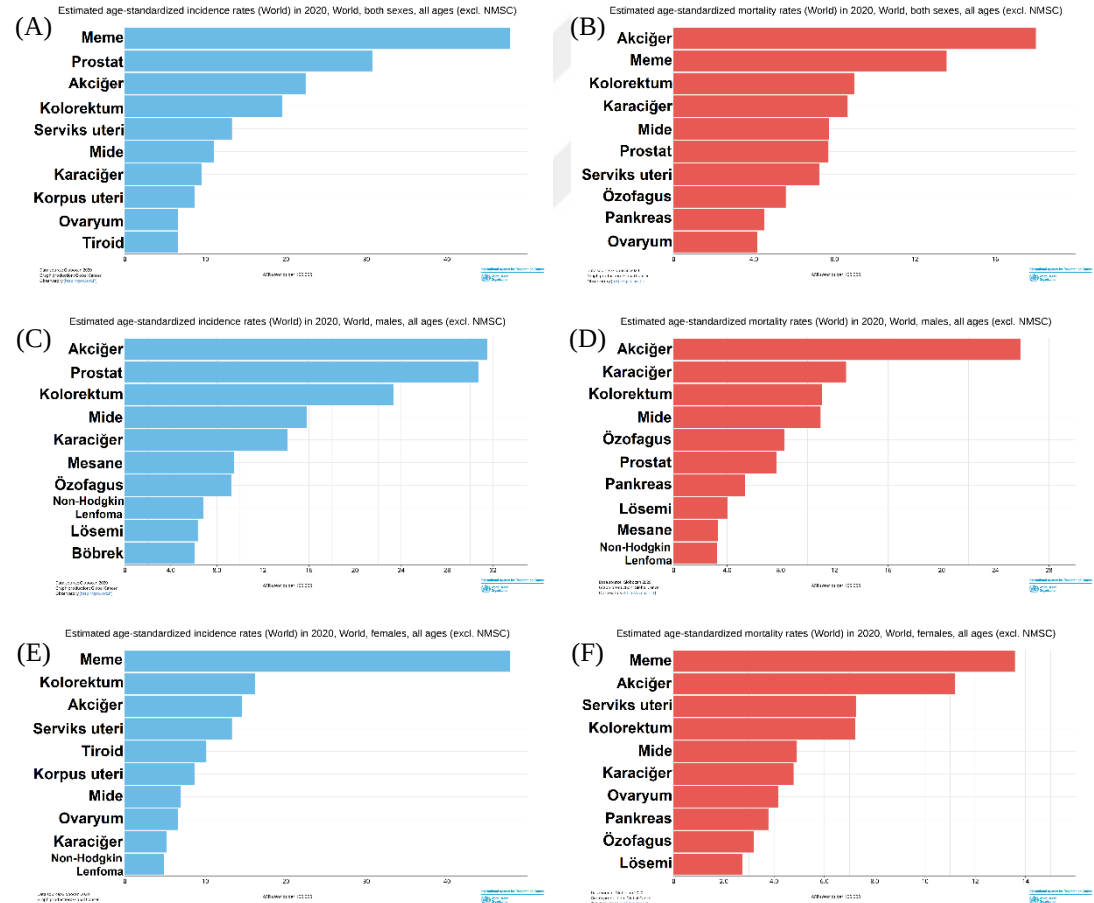
Kanser M.Ö. 460-370 yılları arasında yaşayan tıp bilim insanı Hipokratın kanseri ilk kez “karkinos” terimiyle tanımlamıştır. Vücut üzerinde ortaya çıkan, kırmızı, ağrı hissettiren, büyüyen ve farklı bir şekilde olan şişlikler için, bu şişliklerin neden olduğu ağrı yengeç ısırığından sonra ortaya çıkan ağrıya benzetildiğinden yunanca yengeç anlamında kullanılan “karkinos” kelimesi kullanılmıştır. Daha sonraki süreçlerde tıp doktoru olan Romalı Celsus karkinos kelimesini Latincedeki yengeç anlamına gelen “cancer” terimine çevirmiştir (Karpozilos, 2004; Sudhakar, 2009). Kanser ile ilgili tarihte geçen ilk referans M.Ö. 1500 yıllarında yazılmış Ebers papirüslerinde keşfedilen “meme kanseri” tanımı ve tedavide yakma yöntemi kullanılmasıdır (Breslow, 1977). Başlangıçta bir vücut hastalığı şeklinde görülen kanser, zaman içinde bir doku hastalığı ve bu doku hastalığında hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile ortaya çıkan bir hücre hastalığı şeklinde ele alınmıştır (Sudhakar, 2009). Kanser, tek bir hastalık değil, vücudun herhangi bir bölgesini etkileyen büyük bir hastalık grubudur ve günümüzde genel olarak bütün dünyada en önemli hastalık ve ölüm nedenleri arasında yer alır. Dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra gelen ikinci sıradaki ölüm nedenidir. 2019 yılında 10.08 milyon insanın kanser nedeniyle hayatını kaybettiği bildirilmiştir (Şekil 2.1.) (Ourworldindata, 2022). 2020 yılı verilerine göre en yaygın şekilde görülen kanserler; meme, prostat, akciğer, kolorektal, serviks ve mide kanserleridir (Şekil 2.2). Ölüm nedenleri olarak bakıldığında ise en sık görülenler; akciğer, meme kolorektal, karaciğer, mide ve prostat kanserleridir. Cinsiyete göre ölüm oranları karşılaştırıldığında, erkeklerde; akciğer, karaciğer, kolorektal kanserler ilk üç sırayı oluşturmaktadır. Prostat kanseri, akciğer kanserinden sonra ikinci sırada (%30.7) görülme sıklığına sahipken erken tarama testlerinin yanı sıra teşhis ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi sonucunda ölüm oranı bakımından %7.7 ile 6. sıraya gerilediği görülmektedir. Kadınlarda ise meme, kolorektal, akciğer, serviks ve tiroid en sık görülen beş kanser türüdür. En çok ölüme neden olan kanserler ise sırasıyla meme, akciğer, serviks, kolorektal ve mide kanserleridir (IARC, 2020).



Source: IHME, Global Burden of Disease (2019)

OurWorldInData.org/causes-of-death • CC BY

Şekil 2.1. 2019 yılı verilerine göre dünyada ölüm nedenleri (ourworldindata.org)

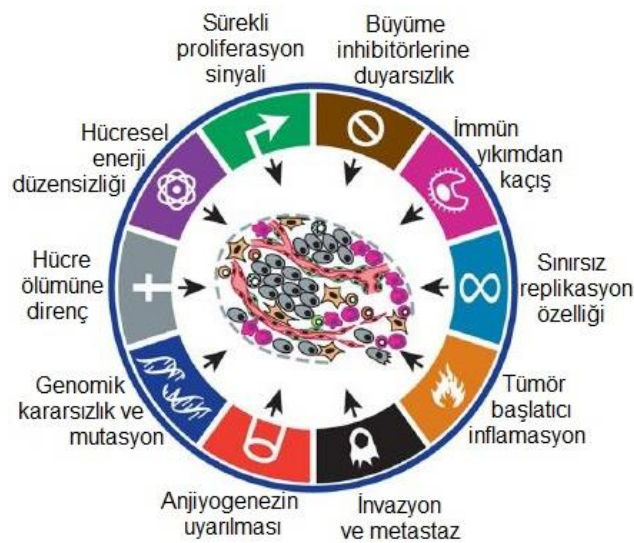


Şekil 2.2. Kanser istatistikleri. A,C,E: İnsidans; B,D,F: Mortalite oranları (IARC, 2020).

2.1.1. Kanserin özellikleri ve kanser metabolizması

Kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelere kıyasla adezyon kabiliyeti daha azdır. Bu durum, epitelium hücrelerin yüzeylerinde bulunan E-kaderin molekülü ekspresyonunun azalmasının bir sonucudur (Christofori, 1999). Yapışma kabiliyeti az olan tümör hücrelerinin motilite, invazyon ve metastaz potansiyeli artmaktadır. Sağlıklı hücrelerde birbirine veya dokuya dokunma kapasitelerinin tümör hücrelerine kıyasla daha fazla olur ve hücre morfolojileri çeşitlilik gösterir. Tümör hücreleri, tutunma yetenekleri düşük olduğu için genellikle yuvarlak morfolojiye sahipler. Sağlıklı hücrelerde hücre-hücre etkileşiminden dolayı büyüyen hücrelerin diğer hücre teması ile büyümeleri engellenmektedir. Hücrelerin kontrollü bir şekilde çoğalmasının sağlayan bu önemli bir düzenleme mekanizmasıdır (Cooper ve ark., 2009).

Kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerle kıyaslandığında ayırt edici özellikleri olarak sürekli büyüme sinyali aktivasyonu, hücresel enerji metabolizmasının bozulması, hücresel ölüme karşı direnç, genomda kararsızlık ve mutasyonlar, Farklı doku istilası ve göç, sınırsız replikasyon, bağışıklık cevaptan kaçma, hücre döngüsünün kontrol noktasından kaçma, yeni damar oluşumu ve oluşan damarların artması, tümör tetikleyici kronik yangı (inflamasyon) şeklinde özellikleri bulunmaktadır (Hanahan ve ark., 2011; Beretta ve ark., 2010; Granot ve ark., 2015).



Şekil 2.3. Kanser hücrelerinin sahip olduğu özellikler (Hanahan ve Weinberg, 2011)

Tümör hücreleri farklı dokulara gidip metastaz yapabilmek için yeni kan damarlarına ihtiyaç duyar. Bu sebeple yeni damar oluşumu yani anjiyogenez süreci başlar. Tümör hücreleri de sağlıklı hücreler gibi hayatta kalmak, metabolik artıklarını uzaklaştırmak, besin ve oksijen ihtiyacını gidermek için yeni kan damarlarıyla gerçekleştirir (Bergers ve ark., 2003). Anjiyogenez sürecinde en önemli faktörler vasküler büyüme faktörü (VEGF), plasenta büyüme faktörü (PIGF) ve bunların bağlı olduğu tirozin kinaz reseptörleridir (Liu ve ark.,2009). VEGF ailesine ait VEGF-A ve bağlı olduğu VEGF-2 reseptörüne ait sinyal yolları tümör anjiyogenezinde en önemli büyüme faktörleri olup aynı zamanda en iyi tanımlanan yollarıdır (Hoeben ve ark., 2004). Bu sinyal yolağı, damar geçirgenliği ve endotel hücrelerde proliferasyonları ile direk ilişkilidir. Damar geçirgenliğini artıran VEGF-A faktörü tümör dokusundaki seviyesi artınca kan damarlarını kanı sızdıran bir duruma getirip ödemi de artırmaktadır (Dvorak, 2002). Damarlar kan akışını yeterince sağlayamaz ve hipoksik ortam oluşur ise oksijen yetersizliğinden VEGF'nin devamlı salgılanması, tümör hücrelerinin daha fazla büyümesi ve hastalığın ilerlemesi durumunu gerçekleştirir (Dvorak ve ark., 1999). Tümör anjiyogenezindeki diğer önemli büyüme faktörlerinden biride fibroblast büyüme faktörü (FGF), hem yalnız başına tümör anjiyogenezi uyarabilir, hemde tümör hücrelerinin hayatta kalmalarını sağlamaktadır. Bundan dolayı tümör dokusunun büyümesinde önemli bir etkisi vardır (Collet ve ark., 2014).

Hücre döngüsü kontrolünde oluşan bozukluklar ile kanser oluşumu arasındaki bağlantılar her geçen gün yeni bağlantıları ortaya çıkarmaktadır (Diaz-Moralli ve ark., 2013). Tümör hücrelerinin en temel özellikleri kontrolsüz çoğalma olduğu için tümör hücrelerinde hücre döngüsü kontrolünden sorumlu anahtar mekanizmalarda bozulmalar meydana gelir. Bu durum, araştırmacıların hücre döngüsü kontrol mekanizmasında rol oynayan molekülleri, tümör karşıtı hedefler şeklinde değerlendirip test yapılmasına ve farklı derecelerde başarı sağlamalarına neden olmuştur (Malumbres, 2011). Yapılan çalışmalar sonucunda, insan kanserlerinin çoğunda hücre döngüsünün G₁/S geçişi kontrol noktasında bozukluk olduğunu göstermiştir. Kanserlerin %80-90'ında bu geçişte görev alan siklin bağımlı kinazlar Cdk-4, Cdk-6 ve Cdk-2 aktivitelerinin kontrolünde gerçekleşen bir aksaklık olduğu

tespit edilmiştir (Malumbers, 2011; Tetsu ve ark., 2003). Kanser hücrelerinin büyük çoğunluğunda, siklin bağımlı kinaz aktivite kontrolünde oluşan bozuklukların olması, kanser tedavisinde direkt olarak bu proteinleri hedef alan stratejilerin geliştirilmesi sağlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda yapılan klinik öncesi çalışmalarla siklin-D aktivitenin baskılanmasının kanser tedavilerinde etkili olabileceği gösterilmiştir (Graf ve ark., 2009; Landis ve ark., 2006).

Apoptoz, hücrelerde belirlenen biyolojik görevleri yerine getirip daha sonra ortamdaki kaldırılmasını sağlayan genetik regülasyonu olan programlı hücre ölümüdür (Kerr ve ark., 1972). Homeostaziyi düzenleyen mekanizmalar apoptoz ile ilişkili olduğundan mekanizmada oluşan herhangi bir aksaklıkta apoptoz gerçekleşmez. Bu durumda neoplastik hücreler kontrolsüz şekilde çoğalabilir ve tümör hücreleri immün sistemin cevabından kaçabilir. Aynı zamanda radyoterapi ve kemoterapinin apoptozu tetiklemesiyle etki ettiği için apoptoza yönelmeyen tümör hücreleri terapiye de cevap vermezler. Bundan dolayı hangi yollarla hücrelerin hücre ölümüne karşı direnç gösterdiği ve apoptoz aşamasındaki problemlerin kanseri nasıl tetiklediğinin araştırılması, var olan tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve apoptoz ile ilgili yeni terapilerin gelişmesi yönünde katkı sağlayacaktır (Igney ve ark., 2002).

Büyüme faktörleri hücre farklılaşmasını, yara iyileşmesini, hücre çoğalmasını uyaran doğal moleküllerdir. Protein veya steroid hormon yapılıdır ve reseptör aracılı aktivite gösterirler. Hücre oluşumu, büyüme ve ihtiyaç duyduğu fizyolojik süreçlerde belirli bir dengede işlev görürler. Tümör hücrelerinde büyüme faktörleri olmadan reseptörün devamlı uyarılması sonucu hücre sürekli olarak bölünür (Huany ve ark., 2015). Bir büyüme faktörü olan “Epidermal büyüme faktörü reseptörü” (EGFR) kanser tedavilerinde önemli bir rol oynar. EGFR, sitoplazma zarına yerleşip, tirozin kinaz özelliği gösterir (Appert ve ark., 2015). Hücre zarının, iç ve dış yüzeyinde bulunduğu için transmembran reseptör olarak bilinir. EGFR’nin aktive olması için, MAPK ve PI3K-Akt sinyal yollarını aktiveleştirir ve bunların aktivasyonu da hücre çoğalmasının uyarılması, apoptoz baskılanma, anjiyogenez ve invazyon oluşumuna ortam hazırlanır. Tümörde EGFR’de oluşan bozukluk mutasyon, delesyon ve amplifikasyon ile tanımlanır (Wolff ve ark., 2014). Baş-boyun kanseri, kolorektal

kanseri gibi çoğu kanserde, büyüme faktörlerinde bağımsız aktive olduğu saptanan EGFR'ye karşı hedefe yönelik monoklonal antikor temeli ilaç geliştirme başarıya ulaşmış, günümüzde diğer tedavilerle beraber kullanıma geçmiştir. Geliştirilen ajanlar EGFR'ye bağlanarak homodimerizasyonu önler. Böylece tirozin kinaz aktivitesinin durması, reseptörün sitoplazmaya alınıp parçalanması, reseptör ligand bağlanmasının önlenmesi, sinyal yollarının aktivasyonunun durdurması; bunların sonucunda büyüme sinyali alamayan hücrenin hücre döngüsünü G_0/G_1 aşamasında durdurması ve çoğalmanın engellenmesi hedeflenmektedir (Appert-Collin ve ark., 2015).

Hücre bölünme potansiyelinin sınırlı olması telomerlerle ilişkilidir. Tümör baskılayıcı olan bu durum canlıların hücre bölünmeleri için sınırlıdır ve kontrolsüz hücre çoğalmalarını engelleyebilir. Sınırsız bölünme potansiyeli olan tümör hücreleri bu özelliklerini telomerase enziminin aktivasyonu ile kazanırlar. Tümör hücrelerinin geneline bakıldığında görülen telomerase aktivitesi kanser hücrelerinin ölümsüzlük potansiyeli için önemlidir (Shay ve ark., 1997). İnsan kanserlerinin yaklaşık olarak %85-90'ı telomerase aktiviteleri pozitifdir (Siddiqua ve ark., 2006).

Tümör hücresinde, hücreye glikoz alımı ve glikozun aerobik glikoz yoluyla kullanımındaki artış, oksidatif fosforilasyonda azalmaya, hipoksi alanın artmasına, proteotoksik düzey artmasına ve mikro çevrede asidoz tümör hücrelerinin sağkalımı için ihtiyaç duyduğu adaptif değişiklik olarak sıralanırlar (Berretta, 2010; Valko ve ark., 2006; Dejeans ve ark., 2014). Tümör hücreleri ile normal hücreler karşılaştırıldığında kanser hücreleri kandan glikozu 5 ile 10 kat daha fazla alır. Yapılan çalışmalar ile kanser hücrelerinin, ağırlığının %30'u kadar glikozu yaklaşık 1 saatte tüketebildiği gösterilmiştir (Hamanaka ve ark., 2012). Tümör dokusunda hücre içinde oksijen az, glikoz bol olduğu için, temel metabolik yolak anaerobik glikolizdir ve yoğun miktarda pirüvattan laktat sentezi Warburg etkisi ile gerçekleşir (Arora ve ark., 2015). Tümör hücreleri oksijen varlığına ihtiyaç duymadan pirüvatın çoğunluğunu laktata dönüştürür. Ayrıca pirüvat kinaz (PK) basamağında normal dokularda bulunan baskın form M1PK iken kanser hücresinde M2PK baskın hale geçmiştir. M2 izorform aktivitesi M1'e göre çok düşüktür; çünkü tirozin rezidülerinden fosforillenmiştir. Bu

izoformun düşük aktivitesi pirüvatın asetil koenzim A'ya dönüşümünü azaltır. Pirüvatın sitrat döngüsüne girişi engellenir ve laktat oluşumu artar (Kim ve ark., 2006).

Hücre bölünmesi sırasında S fazında sentrozomlar duplike olur ve mitoz başlangıcında sentrozomlar kutuplara çekilir, iğ iplikleri oluşmaktadır. Artan sentrozomlar mitoz aşamasında anormal kromozom ayrılması gerçekleşir, bu durumda hücrenin malign forma dönüşümü ile sonuçlanır. Anormallikler, meme, kolon, over ve prostat gibi çoğu solid tümörlerde görülmektedir. Birçok kanser türünde kromozom sayılarının artışı prognoz ve lenf nodu metastazı ile ilişkilidir (Godinho ve ark., 2014). Kanser hücrelerinde, DNA tamir mekanizmalarının etkili çalışması durumunda kromozomal kararsızlık olur. Bundan dolayı, birçok tümör çeşidinde kromozom translokasyonu ve duplikasyon görülür (Mao ve ark., 1994). Tümör hücrelerinde, DNA replikasyon basamağındaki hatalar, nokta mutasyonları, yeniden kromozomal düzenlenmeler ile beraber DNA'daki değişimler ve kromozomlar arası translokasyon sonucu protein ifadesinde artış gerçekleşebilir (Rowley, 2001).

Tümör, dokuların çoğunda, tümör büyümesine etki eden veya inhibe eden inflamatuvar hücreler tarafından istila edilir. Çoğu kanserde, tümör ilişkili makrofajlardan (TAM) inflamasyon oluşumu gerçekleşir. İmmun savunma mekanizmasının aktive olması, kan damarlarının büyümesini sağlayan TAM'lar M2 makrofajlardan oluşur. Makrofajlar aktivasyon durumuna göre kanser hücrelerin büyüme ve yayılmalarını başlatma ve ilerletme özelliğine sahiptirler (Gajewski ve ark., 2013). Tümör hücrelerine karşı gelişen uyarlayıcı immün cevapta CD8+ sitotoksik T hücrelerinin rolü önemlidir. Sitotoksik T hücreleri tümör antijenini içeren MHC1 molekülünü belirten hücreleri tanır ve öldürür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kanser hücresinde bulunan CD8+ T hücrelerinin dağılım ve işlevselliklerinin Th17 hücreleri ile artışları belirlenmiştir (Mantovani ve ark., 2008).

2.2. Metastaz

Metastaz, tümör hücresinin ilk oluştuğu yerden yani birincil tümör bölgesinden ayrılıp dolaşım sistemini kullanarak birincil tümörden uzaklaşıp başka bir organ ve dokuya yerleşmesiyle oluşan ikincil tümör oluşturma sürecidir. Metastaz oldukça karmaşık ve aşamalı bir süreçtir. Kanser sonucu gerçekleşen ölüm oranlarının en önde gelen neden metastazdır (Chaffer ve Weinberg, 2011). Kanser sonucu ölümlerde, esas neden, çoğu zaman birincil tümör değil, ikincil tümörün vucuttaki diğer organlara yerleşmesiyle gerçekleşen metastazdır (Hunter ve ark., 2008).

Tümör hücrelerinin hızla çoğalmasıyla metabolik aktiviteleri de hızla gerçekleşir. Dolayısıyla oksijen ve besin ihtiyacı daha fazla olur ve daha fazla kullanılır. Bu sebeple tümör hücreleri hem ihtiyacı olan molekülleri almak hem de toksik metabolitleri atmak için yoğun kan damarlarına gereksinim duyar ve bu aşamada yeni kan damarları oluşur. Ama yeni oluşan tümör kan damarları tümör hücrelerinin ihtiyacını tam olarak karşılayamaz ve tümör merkezinde asidik ve hipoksik bir tümör ortamı oluşur (Ferrara ve ark., 2003).

Tümörün dokusu, yapı bakımından heterojendir ve fenotip, genotip olarak farklı yapılarda tümör hücreleri ve işlevsel yapısı bozulmuş stromal hücrelerinden oluşur. Tümör dokusundaki bu heterojen yapısı içinde bulunan kanser hücrelerin çoğu mikro çevrenin de desteği sonucu zaman içinde hareket yeteneğini kazanır ve bulunduğu ortamdan veya dokudan ayrılarak dolaşıma geçerler. Kanserli bölgenin tedavisinde hastanın iyileşmesini olanaksız kılan ilk gelişme invazyon basamağıdır. Hücre hareket yeteneği normalde kontrol altında tutulur, fakat kontrol bozulduğunda oluşan en önemli patolojik durum kanser hücrelerin invazyon ve metastaz yapmasıdır (Vanharanta ve Massague, 2013).

Epitelyal Mezenkimal dönüşüm (EMT), kanser ilerlemesinde önemli bir aşamadır. Epitelyal mezenkimal dönüşüm fizyolojik bakımdan embriyonik gelişim ve yara iyileşmesi için gerekli olup hücresel süreç için de önemli bir aşamadır (Thiery ve ark., 2009; Kalluri ve Weinberg, 2009). Tümör hücrelerinde gözlenen EMT patolojik bir durumdur ve hücre arasındaki bağların bozulması ile karakterize edilir. EMT gerçekleştiğinde her basamakta farklı genler rol oynar ve mezenkimal geçişte farklı

fenotipik durumlar gözlemlenebilir (Gandalovicova ve ark., 2016). Dolayısıyla tümör hücreleri farklı formları kullanıp göç edebilir. Epitelyal mezenkimal dönüşümdeki önemli bazı değişimler görülür. İlki kaderin değişimidir. E- kaderinin yerine N-kaderin geçmesidir. N-kaderinin hücre migrasyonunu, hücre sağkalımını ve invazyonu artıran hücre aktivasyonunda rol aldığı bilinmektedir (Bacac ve Stamenkovic, 2008). İkincisi ara filament değişimidir. Ara filament beş sınıfa ayrılır, bunlar ekstraselüler matriksle nükleus arasındaki ilişkiyi sağlar. Ayrıca hücre dışındaki bilgiler doğrultusunda hücrenin iskelet yapısındaki değişiklikleri kontrol eder (Chang ve Goldman, 2004).

Ekstraselüler Matriks (ECM) dokunun bütünlüğünü ve organogenez gibi temel olayların gerçekleşmesinde görev alır. Farklı makromoleküllerin oluşturmuş olduğu üç boyutlu kompleks bir yapıya sahiptir (Leitinger ve Hohenester, 2007; Xian ve ark., 2010). Ekstraselüler matriks dokunun bütünlüğünü, büyüme faktörlerini, sitokin depolama ve lokal pH düzenlenmesinde önemli işlevleri vardır. Tümör hücresi, ekstraselüler matriksin yapı ve içeriğini yeni proteinleri sentezledikten sonra mevcut yapıyı parçalar ve matrikste çapraz bağları oluşturarak değiştirebilir (Lu ve ark., 2012; Cheung ve Ewald, 2014). Tümör hücresinin davranışlarını belirleme noktasında tümörle ilişkili ECM'nin önemli bir rolü vardır (Levental ve ark., 2009; Provenzano ve ark., 2008). Kanser hücreleri kendi ECM proteinlerini sentezledikleri zaman tümör hücrelerinin daha agresif davrandığını ve metastazı oluşturdukları görülmüştür (Stratman ve ark., 2009). Kanser ECM'si biyomekanik özellik bakımından normal dokunun ECM'sine göre değişir. Bu değişiklik kanser ECM'sinin daha yoğun ve katı olmasıdır (Levental ve ark., 2009; Lu ve ark., 2012).

Hem prostat kanseri hem de diğer kanser türlerinin tanı ve tedavilerine ilişkin temel problem karşısında “iyon kanallarının kanserin gelişimi ve ilerlemesindeki etkileri” kapsamındaki araştırmalar son yıllarda çözüme dair umut vaat ediyor. Voltaj kapılı sodyum kanalları (VGSC) ile yapılan in vitro çalışmalar sonucunda, VGSC fonksiyonunun metastaz ile ilişkili olduğu ve bu kanalın fonksiyonu baskılandığında metastaz aktivitesinde de inhibisyonun gerçekleştiği gösterilmiştir (Grimes ve ark., 1995; Laniado ve ark., 1997; Roger ve ark., 2003; Bennett ve ark., 2004; Fraser ve ark., 2005; Onganer ve Djamgoz, 2005; Fulgenzi ve ark., 2006; Brackenbury ve ark.,

2007; Roger ve ark.,2007; Gao ve ark., 2009, 2010; Nakajima ve ark., 2009; House ve ark.,2010; Hernandez-Plata ve ark., 2011).

2.3. İyon kanalları

İyon kanalları elektrokimyasal gradyanlara ve konsantrasyona göre gözenek oluşturan, iyon geçişlerine izin veren zar proteinleridir. Hücreler yaşam boyunca her bölgeye dağılırlar. Hücrelerin bilgi girişlerinde yanıt vermedeki mekanizmalardan biri de iyon kanallarıdır. Fizyolojik koşullarda bu kanallar, iyonların hücre membranı boyunca düzenli bir şekilde hareketine izin verir ve hücrel sinyalleşme süreçlerine, hücrel homeostazın korunmasında da etkisi vardır. Patolojik koşullardaki iyon kanalları ise, akalazya, kalbin ritmik çalışmasındaki bozukluk sonucu aritmiler, xerostomia (ağız kuruluğu) ve baş dönmesine kadar birçok hastalık süreçlerinde rol oynar ya da onları yönlendirir (Triggle ve ark., 2006).

İyon kanalları, voltaj gradyanları, mekanik gerilim, eksojen ve endojen kimyasal sinyallerde dahil çeşitli bilgi girdilerine cevap olarak önemli konformasyonel geçitlerden geçen allosterik proteinlerdir. Şu anda anestezi, epilepsi, anksiyete, hipertansiyon, uykusuzluk, alerji bozuklukları, otoimmün hastalıkları, inkontinans, felç gibi hastalıklarda iyon kanalı terapötik modülasyonu için fırsatlar mevcuttur. İyon kanalları ilaç dizaynı için kusursuz hedeflerdir. Çünkü entegre hücrel iletişim için, çoğu hücre membran potansiyelinin seviyesini uyarılma ya da inhibisyon derecesini kontrol eder. Birden çok kanal ve alt türü vardır. Her kanal karakteristik olarak, kanalın geçit ve geçirgenlik mekanizmasına allosterik seklinde bağlanan ayrı ligand bağlanma alanına sahiptir. Hücre membran potansiyeli veya kanal fosforilasyonu gibi faktörlerle hem niteliksel hemde niceliksel olarak modüle edilebilir (Triggle ve ark., 2006).

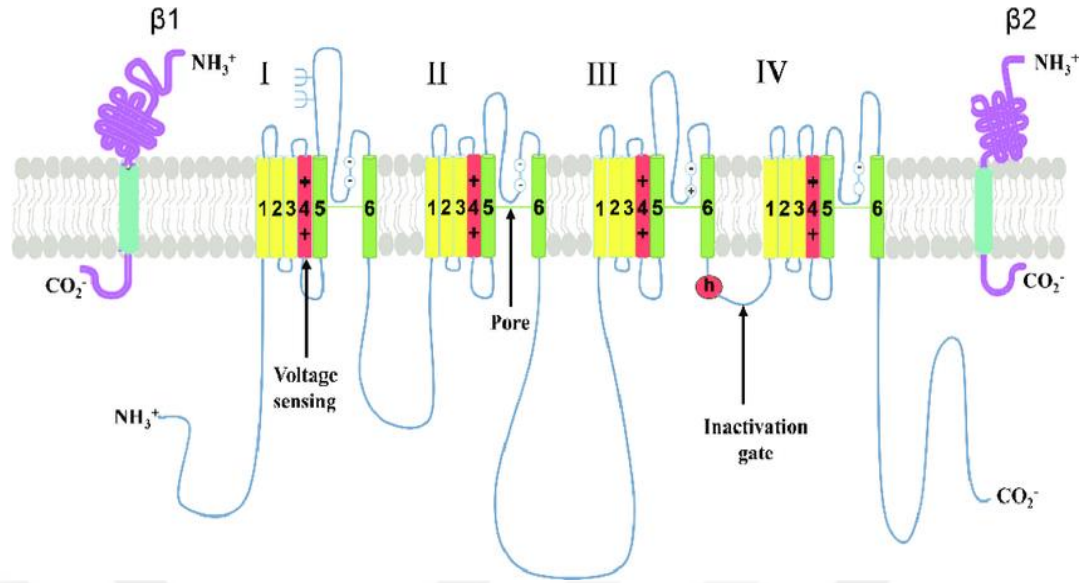
2.3.1. Voltaj kapılı iyon kanal ailesi

Elektrik sinyalleri, çevrenin hissini, hormon salgılanmasını, kas kasılmasını, beyindeki bilgilerin işlenmesini ve beyinden diğer çevre dokulara çıkışı kontrol eder. Uyarılabilir hücrelerdeki elektrik sinyalleri ise gen ekspresyonu, protein sentezi, hedeflenmesi ve protein bozunması, hücre iç metabolizma ve sinyal iletimi üzerinde

önemli bir etkiye sahiptir. Elektrik sinyalleri, 140'tan fazla yapısal olarak gözenek oluşturan proteinden oluşan iyon kanalı protein süper ailesinin üyeleri tarafından yürütülür. Ayrıca bu protein süper aile üyeleri, birçok farklı hücre tiplerinde iyon homeostazını sürdürmede önemli bir rol oynar (Triggle ve ark., 2006).

2.3.1.1. Voltaj kapılı sodyum kanalı

Voltaj kapılı sodyum kanalları, kas, sinir ve endokrin hücrelerindeki aksiyon potansiyelinin yükselen fazın altında yatan sodyum iyonlarının hızlı akışından sorumludur. Memeli beyninden gelen sodyum kanallarının 220 ile 260 kDa'lık bir α alt birimden oluşur. Yaklaşık olarak 33 ile 36 kDa'lık bir veya iki yardımcı β alt biriminden oluşan tek bir protein kompleksinde voltaj algılama ve gözenek oluşturuçu öğeler içerdiğini gösterdi (Catterall, 1984; Catterall, 2000). Sodyum kanallarının α alt birimlerinin her biri altı hidrofobik transmembran segment içeren dört homolog alan içerir. Beş ve altı (S5 ve S6) transmembran segmentleri arasındaki bir membran reentran döngüsü, gözenek kısmının dar ve hücre dışı ucunu oluştururken, S6 segmentleri hücre içi uç kısmını oluşturur. Gözenek dört bölgenin bir psödosimetrik dizisinin merkezinde oluşur ve dört bölgede tek bir α alt birimi voltaj sinyallerini alabilir aynı zamanda iç gözeneğini etkinleştirebilir. Kanal pozitif yüklü amino asit kalıntısının tekrarlanan motiflerin ve iki hidrofobik kalıntı içeren S4 segmentleri ile voltaja cevap verir ve membranın elektrik alan etkisi ile dışarıya doğru hareket ederek gözeneği açan konformasyonel bir değişiklik başlatır (Ragsdale ve ark., 1994; Catterall, 2000).



Şekil 2.4. Voltaj kapılı sodyum kanalının yapısı (Zhang ve ark., 2019)

VGSCα alt birimi: VGSC α alt birimi (220-260 kDa) gözenek oluşturan bu alt birim 19-27 amino asitten oluşur. Bu amino asitler altı α sarmal transmembran segmenti (S1-S6) içerir ve yapısal olarak dört homolog bölgeden (D1-D4) oluşur (Yu ve Catterall, 2003). Her üç pozisyonda pozitif yüklü aminoasit kalıntıları (Arg –Lys) içeren dört bölgenin her birinde bulunan S4 segmentleri aktivasyon için voltaj sensörleri gibi rol oynar (Swartz, 2008). S5 ve S6 sarmalları arasında hücre dışından tekrar hücre içine giren gözenek döngüleri (P-döngüleri), Na⁺ iyonu ileten gözenek dar girişini oluşturup, aynı zamanda aminoasit dizisi içeren bir iyon seçici filtresi görevi de görür (Catterall, 2000). S6 bölgesi gözenek daha geniş hücreler arası ucunu oluşturur (Goldin ve ark., 2000; Catterall, 2010).

Tetrodotoksin (TTX), çeşitli bölgelerde VGSCα'ya bağlanır ve farklı etkiler ile aktivitesini değiştirir (Cestèle ve Catterall, 2000; Catterall ve diğerleri, 2007). Şimdiye kadar değişken amino asit dizilerine bağlı olarak her biri önemli farmakolojik ve elektrofizyolojik değişkenliğe sahip 10 VGSCα alt birimi (Nav1.1-Nav1.9 ve Nax) tanımlanmıştır (Plummer ve Meisler, 1999; Catterall, 2000; Diss ve ark., 2004). Farklı özellikteki VGSCα'ların ifadeleri dokuya özgü ve gelişimsel olarak düzenlenebilir (Plummer ve Meisler, 1999; Catterall 2000). Örneğin, Nav1.1, Nav1.2 ve Nav1.6, genellikle merkezi sinir sisteminde ifade edilir. Esas olarak Nav1.2 miyelinli akson, miyelinsiz aksonlar ve akson başlangıç segmentlerinde ifade edilir. Nav 1.6 ise ranvier

düğümlelerinde ve akson başlangıç segmentlerinde mevcuttur (Trimmer ve Rhodes, 2004; Mantegazza ve ark., 2010). Merkezi sinir sisteminde ve dorsal kök ganglion nöronlarında Nav1.3 ifade edilir (Waxman ve ark., 1994; Black ve ark., 1999; Whitaker ve ark., 2001). Nav1.4 yetişkin iskelet kasında (Kraner ve ark., 1989), Nav1.5 kardiyak kasta (Gellens ve ark., 1992). Nav1.7, Nav1.8 ve Nav1.9 periferik sinir sisteminde lokalize olur (Toledo-Aral ve ark., 1997; Dib-Hajj ve ark., 1998; England, 2008; Clare, 2010).

VGSC β alt birimi: Yapılan çalışmalar sonucu günümüze kadar dört VGSC β izoformu tanımlanmıştır. β 1, β 2, β 3, β 4 33-45 kDa'dur. β 2 ve β 4 alt birimleri α alt biriminin hücre dışı bir bağlayıcı üzerindeki sisteine kovalent olarak bağlanır. β 1- β 3 alt birimleride, α alt birimiyle nonkovalent bir şekilde birleşir (Isom ve ark., 1992; Isom ve ark., 1995; Morgan ve ark., 2000; Yu ve ark., 2003). VGSC β alt birimi farklı geçit mekanizması sağlar. Örneğin, beyin gelişimini etkiler, hücreyel uyarılabilirliği düzenler, farklı kanal farmakolojisi verir. α alt birimlerinden bağımsız olarak işlev görür (Isom ve ark., 1994). β alt birimleri hem hücre yapışma yeteneğine sahiptir hem de VGSC α alt birimleriyle etkileşimi sağlar (Brackenbury ve Isom 2011).

2.3.1.2. Voltaj kapılı kalsiyum kanalı

Kalsiyum iyonları hücre döngüsünün temel düzenleyicilerinden biridir ve hücre proliferasyonu için vazgeçilmezdir. Kalsiyum iyonlarının hücre içine akışı, çok sayıda hücre içi olaya aracılık eder. İskelet kasının kasılması ve kalpte uyarma-kasılma durumu için kalsiyum gereklidir. Aksiyon potansiyellerine cevap olarak sinir terminallerine kalsiyum akışı, vezikül füzyonuna ve nörotransmitterlerin salınmasına izin verir. Uyarılamayan dokularda bağışıklık tepkilerine ve hormon salınımına izin vermek için kalsiyum sinyali gereklidir. Hücre ölümü de kalsiyuma bağlı kaskadlar aracılığıyla indüklenebilir. Ayrıca kalsiyum iyonları, sinyal kaskadları ve protein kinazlar gibi çeşitli enzimleri aktive ederken hücre içi haberciler olarak da görev alırlar (Doering ve Zamponi, 2006). Fatt ve Katz (1953) çalışmalarında kas hücrelerine voltaja bağlı kalsiyum iyonların girişinin, sodyum ve potasyum iyonlarına benzer şekilde kalsiyum iyonları için seçici olan proteinli gözenekler aracılığıyla gerçekleştiği tespit edilmiştir (Tsien ve ark., 1991).

Voltaj kapılı kalsiyum kanalları (VGCC), hücre membranının depolarizasyonu, salgılama, nörotransmisyon, büzülme ve diğer hücre içi düzenleyici olayları başlatır. Voltaj kapılı kalsiyum kanalları birçok omurgalıların düz kaslarında ve omurgasız kaslarda voltaj kapılı depolarizasyonun tamamında görev alır (Bezanilla, 2000). Voltaj kapılı kalsiyum kanalları, $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , δ ve γ alt birimlerinden oluşur (Catterall ve ark., 1987; Glossmann ve ark., 1990). $\alpha 1$ alt ünitesi 200-250 kDa'lık geçiş poru, kapı aygıtı ve voltaj sensörü içeren en büyük alt ünedir. Bu alt ünite, ilaçlar, toksinler ve ikincil haberciler tarafından kanalın etkilendiği kısımdır (Dolphin, 1998). β alt ünitesi hücre içi periferel zar proteinidir (Catterall, 2011). β alt ünitesi protein kinazlar aracılığıyla düzenlenir. β alt birimi önemli fonksiyonlarda görev alır. Kalsiyum kanal alt ünite kompleksinin doğru hedeflenmesinde önemli bir rolü vardır. $\alpha 1$ alt ünitelerinin kapı açma ve farmakolojik özelliklerini ayarlayıp düzenlerler (Birnbaumer, 1994). 175 kDa'lık hücre dışı yardımcı alt birimi olan $\alpha 2$ ve δ alt birim çifti kanal içinden Ca^{2+} geçişlerini büyük oranda etkilediği gösterilmiştir (Ellis ve ark., 1988; Klugbauer ve ark., 1999). γ alt birimi ilk defa iskelet kasından izole edilmiştir ve 222 aminoasitten oluşur (Bosse ve ark., 1990; Black ve ark., 1999).

Voltaj kapılı kalsiyum kanalları, ilk defa Reuter tarafından purkinje liflerindeki çalışmayla tanımlanmıştır (Reuter, 1967). Voltaj kapılı kalsiyum kanalları düşük voltaj aktivite (LVA) ve yüksek voltajla aktivite (HVA) olarak iki gruba ayrılmıştır. İlerleyen zamanlarda kanal iletkenliği, kanal kapı aygıtı, iyon özellikleri, iletim, voltaj ve zaman bağımlılığı, hücresel dağılım, toksin ve ilaç duyarlılığı, aktivasyon ve inaktivasyon kinetikleri gibi özellikler göz önüne alınarak farmakolojik ve elektrobiyofizik olarak farklı özelliklere sahip voltaj kapılı Ca^{2+} kanalları tanımlanmıştır. Bu özellikler, L-tip, T-tip, N-tip, P/Q ve R tip şeklindedir. L- tip (uzun süreli), T-tip (kısa süreli), N-tip (sinirsel) olarak genel sınıflandırılmıştır (Tsien ve ark., 1987; Llinas ve ark., 1992). $\text{Cav}1$ L tip voltaj kapılı kalsiyum kanalı, dihidropiridine duyarlı olup yüksek afiniteli ilaçların varlığıyla iyi tanımlanmıştır (Chang ve ark., 1988). L tip kanallar, damar, kalp ve uterus gibi çeşitli düz kasların kasılmasında, duyuşal nöronlarda ve endokrin hücrelerden transmitter madde salımının kontrolünde görev almaktadır (Rane ve ark., 1987). Kalsiyum kanal antagonisti olan verapamil ve diltiazem gibi ilaçların temel

hedefi olan L-tip kanallar, aynı zamanda endojen bileşiklere de cevap vermektedir (Janis ve ark., 1988). Cav2.1 P/Q tip kanallar, hipofiz, sinir sistemi ve beyicikte bulunan purkinje hücrelerde tanımlanmıştır. Ama mide, iskelet kası ve böbrek gibi dokularda saptanamamıştır. Beyindeki Ca^{2+} kanallarının çoğu bu tip kanallardır (Llinas ve ark., 1989; Yousef ve ark., 2005). Cav2.2 N-tip voltaj kapılı kalsiyum kanalının işlevleri G-proteinleri gibi reseptörlere bağlı ikincil haberciler tarafından değiştirilebilir (Williams ve ark., 1992). Cav2.3 R-tip voltaj kapılı kalsiyum kanalı serebeller granül hücrelerdeki HVA akımının %15'ini oluşturur (Perez, 2003). Cav3 /T-tip voltaj kapılı kalsiyum kanalı aktivasyon ve inaktivasyon için düşük voltaja ihtiyaç duymaktadır. Çoğu dokuda bulunur fakat sinoatriol düğüm, atrioventriküler düğüm, kalp, düz kas, plasenta ve nöronal hücrelerde daha fazla yoğunlaştığı gösterilmiştir (Gribkoff, 2006).

2.3.1.3. Voltaj kapılı potasyum kanalı

Vücuttaki her hareket, düşünce, algı ve kalp atışı iyon kanallarının aktivitesiyle üretilen sinyallere bağlıdır (Hodgkin ve ark., 1952). Potasyum kanalları elektrokimyasal gradyanlara bağlı şekilde hücre membranının dışına veya içine potasyum iyonlarını ileten ve her bölgede bulunan zar proteini grubudur. Potasyum iyon kanalları, elektrokimyasal gradyanı boyunca hücre membranında yaklaşık olarak 106-108 s-1 oranında potasyum iyonlarını iletmede görev alır (Hille, 2001). Hücre membranı dışında kalan potasyum iyonlarının konsantrasyonu, hücre içindeki sıvıdan yaklaşık olarak 25 kat daha azdır. Sonuç olarak aktivasyon, potasyum kanallarının açılmasıyla pozitif yüklü iyon akışının hücre dışına gitmesi ve hücre dışına doğru kıvrılma meydana gelmesine neden olur. Bu nedenle potasyum kanallarının açılması, katyon (+) akışı (Na^{+} ve Ca^{2+}) veya bir anyon (-) akışı (Cl^{-}) aracılığıyla tetiklenen depolarize edici aktiviteye karşı koyma, azalma ya da kısıtlama için bir mekanizma sunar. Potasyum kanalları hücrenin uyarılabilirliğini sınırlar iken, kanal inhibisyonun ters etkisi vardır. Bu sebeple potasyum kanalları, membran potansiyelinin ayarlanmasını sağlayan, etki potansiyelinin süresini ya da sıklığını, kas kasılmasını, hacim düzenlenmesi, kas kasılması ve hücre çoğalmasını belirleyen bir dizi fonksiyon düzenlenmesinde görev alır (Papazian ve ark., 1987).

2.4. Hipoksi

Hipoksi, hücrelerde, kanda ve dokularda oksijen eksikliğine bağlı olarak gelişen fonksiyon bozukluklarıdır. Bazı fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda gen seviyesindeki düzenlenmeler, alyuvar üretiminde artma, hücrelerin oksijenden yoksun olduğu ortamda oksijeni sağlayacak yeni damar oluşturulması ve anaerobik glikoliz dahil olmak üzere metabolizmadaki birçok değişiklik hipoksi ile düzenlenmektedir (Avni ve ark., 2011). Hipoksinin gerçekleştiği durumlarda, oksijen konsantrasyonu %6'nın altına düşer. Bu durumda hücre, doku ve organların fonksiyonları bozulup durur. Hipoksi, embriyonik gelişimde ve egzersizde fizyolojik olarak görülürken, patofizyolojik durumlarda inflamasyon, miyokard enfaktüsü ve katı tümör oluşumu olarak ortaya çıkar (Semenza, 2000). Hipoksiye cevap olarak hücre sağ kalımı, hücre çoğalması ve anjiyogenezi destekleyen anahtar moleküler programlar uyarılır (Berra ve ark., 2003).

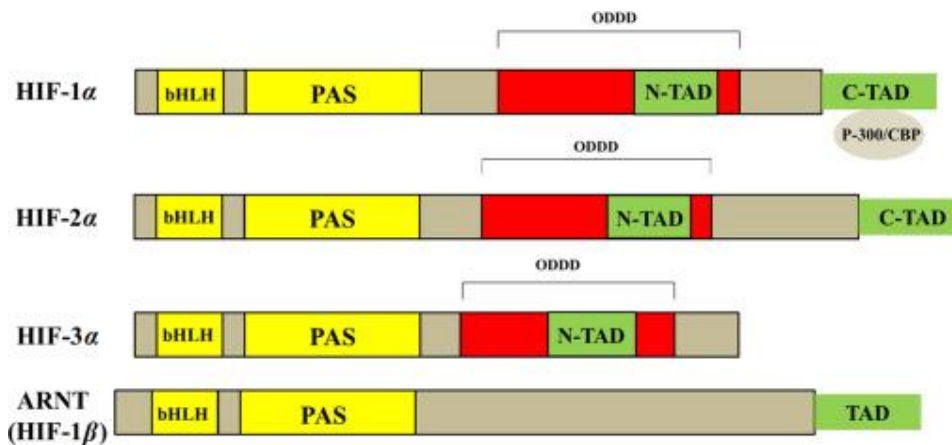
Hipoksinin glukoz metabolizması, demir metabolizması, hücre proliferasyonu ve anjiyogenez üzerinde etkili olduğu 100'den fazla genin transkripsiyonel uyarımını başlattığı çoğu çalışmada gösterilmiştir (Semenza, 2003). Oksijenle düzenlenen gen ifadelerinin temel düzenleyicisi HIF-1'dir (Semenza, 2010). Yapılan çalışmalarla HIF-1 proteininin hücre proliferasyonu, hücre sağ kalımı, apoptoz, hücre hareketi, hücre iskeleti, adezyon, eritrosit oluşum süreci, yeni kan damarlarının oluşturulması, demir, glukoz enerji vb. hücresel metabolik olaylar, hücresel homeostazın düzenlenmesi ve sürdürülmesi, transkripsiyonel düzenlenme gibi pek çok hücresel olayda görevli hedef genler ile etkileştiği gösterilmiştir (Masoud ve Li, 2015).

2.4.1. Hipoksiyle indüklenen faktör (HIF)

Bir transkripsiyon faktörü olan “hipoksi ile indüklenen faktör-1” (HIF-1) hipoksik koşullarda sentezlenir. HIF, oksijene duyarlı bir α alt biriminden (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) ve yapısal olarak eksprese edilmiş bir β alt biriminden [HIF-1 β /Aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokator (ARNT)] oluşan bir heterodimerik

proteindir (Hu ve ark. 2003). HIF-1 α 'nın hidroksilasyonu hipoksi koşulları altında baskılanır, bu da HIF-1 α alt biriminin stabilize hale gelmesine ve bir hücre yeterli oksijen kaynağından yoksun kaldığında sitoplazma içinde birikmesine neden olur. Birikmiş HIF-1 α daha sonra çekirdeğe yer değiştirir ve burada HIF-1 β /ARNT ile dimerize olur (Wang ve ark. 1995). HIF heterodimerinin, hedef genlerin promotör/arttırıcı bölgeleri içindeki hipoksiye duyarlı elementlere (HRE) bağlanması, hipoksiye adaptasyonu destekleyen genlerin transkripsiyonunu başlatır (Wang ve ark. 1995; Semenza, 2011).

HIF- α 'nın üç izoformundan HIF-1 α ile HIF-2 α yapısal olarak %48 oranında birbirine benzer. HIF-1 α bütün dokularda hipoksiye karşı kısa sürede oluşturulan (akut) hızlı cevabı koordine eder. HIF-2 α ise endotel ve akciğer gibi dokularda eksprese edilir ve kronik cevabın oluşturulmasını sağlar. HIF-3 α , yapısal olarak daha farklıdır. HIF-1 α 'nın baskın negatif inhibitörüdür (Koh ve Powis, 2012). HIF-1, bütün ökaryotik hücre tiplerinde eksprese edilen ve heterodimerik yapıya sahip bir transkripsiyon faktörüdür (Şekil 2.5.). HIF- α ve HIF- β bölgelerinde Nükleer lokalizasyon sinyali (NLS), heliks-loop-heliks (bHLH) ve A PAS B DNA bağlanma ve dimerizasyon bölgeleri bulunur. Karboksil terminal transaktivasyon domeyni (C-TAD) ve amino terminal transaktivasyon domeyni (N-TAD) transkripsiyonel aktivitenin olduğu bölgedir. Oksijen bağımlı degradasyon bölge (ODDD) ve C-TAD protein stabilite bölgesidir. ODDD oksijene bağımlı bozunma alanını temsil eder. HIF- β oksijen seviyelerinden etkilenmez çünkü ODDD bölgesi içermez (Semenza, 2000).



Şekil 2.5. HIF alt üniteleri (Masoud ve Li, 2015)

2.4.1.1. HIF ve anjiyogenez

Hipoksik koşullarda öncelikle hücre ölümü yollarının inhibisyonu veya kaybı ortaya çıkar. Sonraki aşama hücrelerin oksijenlenmeyi arttırmak için anjiyogenezi uyarmaları gerekmektedir. Anjiyogenez mevcut damarlardan yeni kan damarlarının oluşması durumudur. Fizyolojik veya patolojik bir durumda, stroma veya avasküler tümör hücreleri düşük oksijen basıncı nedeniyle çeşitli proanjiogenik genleri indükler ve oksijen algılama mekanizmalarının sonucu olarak anjiyogenezi tetikler (Semenza, 2002). Endotele özgü mitojen olan Damar Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) en önemli bir hedef genidir. Bu büyüme faktörünün reseptörü (VEGFR) genelde endotel hücrelerinde eksprese edilir. Etkileşime girmesiyle hipoksik ve damarsız alandaki öncül endotel hücrelerinin çoğalması stimüle edilir. Anjiyogenenin uyarılması damar yoğunluğunda artışa neden olur ve oksijen difüzyon mesafesi azalır (Melillo ve ark., 1995). Dolayısıyla HIF-1, damar olgunlaşmasında yer alan hedef genleri, VEGF indüksiyonuna göre daha kompleks bir mekanizma ile kontrol ederek anjiyogeneze katkıda bulunabilir. Hipoksi durumunda aktif olan HIF-1 anjiyogenenin oluşumunu sağlar ve anjiyogenez durumunda etkili olan efektör VEGF'dir. Anjiyogenez hipoksiyle indüklenir, HIF ile düzeltilir (Wenger, 2002).

2.4.1.2. HIF ve hücre proliferasyonu

Hipoksik koşulların sonucunda etki gösteren büyüme faktörleri, hücrenin sağ kalımını ve hücre proliferasyonunu geliştirebilmektedir. “İnsülin benzeri büyüme faktörü-2” (IGF-2) ve “Tümör büyüme faktör α ” (TGF- α) gibi birçok büyüme faktörü HIF-1'in hedef genleridir. Büyüme faktörleri reseptörlerine bağlanır ve bunun sonucunda hücre proliferasyonu ile sağ kalımı sağlayan sinyal iletim yolları aktive olur (Li ve ark., 1996). Mitojenle etkileşen protein kinazın (MAPK) HIF-1 α 'yı fosforilleyerek hedef genlerinin transkripsiyon aktivitelerini arttırdığı bildirilmiştir (Berra ve ark., 2000).

Fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K) çoğu tirozin kinaz sinyal yolağının en önemli yollarından biri olup hücrenin çoğalmasını ve apoptoz bastırılmasında düzenleyici faktör olarak rol almaktadır. Hipoksik koşullarda bazı hücrelerde PI3K aktivitesinin

arttığı belirlenmiştir. PI3K yolağın yolunu inhibe eden PTEN'dir. PTEN'deki mutasyonlar, HIF-1'in aktivasyon cevabı geliştirmesine ve böylece karsinogenez için önemli olan otokrin sinyal yoluna katkı yapmasına neden olmaktadır (Zundel ve ark., 2000). Akt, normal koşullarda HIF-1 α 'yı indükler. PTEN inaktivasyonu sonucunda HIF-1 α miktarı hipoksiden bağımsız olarak artış gösterir. Ayrıca Ras ve Src gibi onkogenler HIF-1 α 'yı stabilize edilir. Bütün bu durumlar HIF-1 seviyesinde artışı getirir ve bu durum hipoksiye tolerans gelişir. Hipoksi tümörün ilerlemesini bazı genlerin ifadesini teşvik ederek yapar. Oksijenin yeterli olmadığı durumda HIF-1 aracılığıyla meydana gelen Siklooksijenaz-2 (COX-2) artışı, kısa vadede tümör sağ kalımı üzerine etki gösterirken, uzun vadede anjiyogenezi başlatmaktadır. Ras ve Wnt sinyal yollarında gerçekleşen mutasyonlar normal şartlar altında COX-2'yi uyarır ve prostoglandin E2 (PGE2) düzeyini artırır. Bu durum kanser hücrelerinde büyümeyi, anjiyogenezin uyarılmasını tetikler (Nagy, 2011).

2.4.1.3.HIF ve glikoz metabolizması

Normal hücreler, enerji ihtiyacının % 90'ını mitokondri aracılığıyla oksijenli solunumdan % 10'luk kısmını ise glikolizden sağlamaktadır. Tümörlerde hipoksik koşulda HIF-1 tarafından kontrol edilen şekilde hemen hemen bütün glikolitik enzimlerin ekspresyonları artar. Bunun sonucu olarak normal hücre fonksiyonları tamamen değişir (Semenza, 2010).

Tek bir glikoz molekülünün iki piruvat molekülüne anaerobik dönüşümünü tanımlayan glikoliz, sitoplazmada gerçekleşir. Glikoz metabolizmasında, yaklaşık on metabolik enzim oksijenden bağımsız aktivite sergileyerek adenosin trifosfat (ATP) üretilmesini sağlar. Ayrıca bu yolda eş zamanlı olarak nikotinamid adenosin dinükleotid (NAD) NADH'ye indirgenir ve piruvat oluşur. Yeterli seviyelerde moleküler oksijen varlığında, üretilen piruvat mitokondri içinde ayrıca glikolitik yola giren glikoz molekülü başına 36 ATP molekülü daha üretmek için elektron taşıma zincirine (ETZ) elektron taşıyıcıları sağlayan trikarboksilik asit (TCA) döngüsü tarafından metabolize edilir. Kararlı durumda, glikoliz, TCA döngüsü ve ETZ'nin birleşik aktiviteleri genellikle hücre, doku ve organizmanın biyoenerjetik

gereksinimlerini karşılamak ve böylece homeostazı sürdürmek için yeterli ATP seviyelerinin üretilmesiyle sonuçlanır (Kierans ve Taylor, 2021).

Hipoksi koşullarında, hücreler oksijene bağımlı mitokondriyal oksidatif fosforilasyona olan bağımlılıklarını azaltır ve biyoenerjik gereksinimleri karşılayacak yeterli ATP üretimini sürdürmek için tercihen oksijenden bağımsız glikolitik yolu kullanır. Hipoksiye yanıt olarak bu metabolik geçiş, ATP tarafından glikolitik enzimlerin allosterik kontrolü ile başlatılır. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun inhibe edildiği hipoksik koşullar altında, ATP/AMP (adenosin monofosfat) oranını etkili bir şekilde azaltan düşük seviyede ATP üretilir. Enerji yükündeki bu azalma, ATP'nin glikolitik enzim fosfofruktokinaz (PFK) üzerindeki allosterik inhibisyonunu azaltır (Henderson, 1969). Aktive edilmiş PFK, fruktoz-1,6-bifosfat üretmek ve glikolitik yolun sürdürülmesini teşvik etmek için ATP'yi kullanır. ATP ayrıca, enerji yükü yüksek olduğunda glikoliz oranını azaltmak için piruvat kinazı allosterik olarak inhibe eder. Bu nedenle, hipoksi koşulları altında, enerji yükündeki azalma, ATP'nin piruvat kinaz üzerindeki allosterik inhibisyonunu azaltarak fosfoenolpiruvattan piruvat oluşumuna neden olur. Piruvat kinaz ayrıca fruktoz-1,6-bifosfat (ileri besleme düzenlemesi) tarafından da aktive edilerek glikolitik yol boyunca tam akışı destekler (Kierans ve Taylor, 2021).

Hipoksik koşullar altında glikolizin allosterik düzenlemesinin ardından glikoz taşıyıcıları ve glikolitik enzimler hipoksiyle indüklenebilir faktör (HIF) transkripsiyon faktörü tarafından yukarı yönde regüle edilir (Kierans ve Taylor, 2021). Glikolitik enzimlerin bu yukarı regülasyonu, yol boyunca artan bir akışa izin verir ve bu nedenle hipoksik koşullar altında hücresel ATP üretiminin sürdürülmesinde avantajlıdır. Oksijen dengesi (ve ATP/AMP oranı) geri yüklendiğinde, hücreler genellikle birincil metabolik stratejilerini Pasteur etkisi olarak bilinen bir fenomen olan mitokondriyal oksidatif fosforilasyona geri döndürebilir (Pasteur, 1861). Glikoliz mekanizmalarındaki bu değişimler, yeterli oksijen varlığında bile kanser hücreleri tarafından sağ kalımı sürdürmek için manipüle edilebilir (Warburg etkisi) (Warburg, 1956). Bu nedenle, bu metabolik geçişe aracılık eden merkezi mekanizmalar hem sağlıklı hem de hastalıkta kilit öneme sahiptir (Kierans ve Taylor, 2021).

2.4.1.4.HIF ve ekstraselüler matriks

Ekstrasellüler Matriks (ECM) sentezi ve parçalanması ile ilgili çoğu gen HIF tarafından düzenlenir. Hipoksinin ECM homeostazını direkt HIF aktivitesi ile düzenlemesi mümkündür. Hipoksik fibroblastlarda ECM'nin HIF-1'e bağımlı yeniden düzenlenmesi, meme kanseri hücre morfolojisinde yapışma, değişiklik ve hareketliliği indükler, invazyon ve metastazı teşvik eder. HIF, düşük oksijen geriliminde hücre adaptasyondan sorumlu temel proteindir. Bu transkripsiyon faktörü, kısmi oksijen basıncında % 5 oranındaki oksijenin altındaki hipoksik seviyelere düşme sonucunda aktive olur ve oksijen homeostazının korunmasında görev alan bir gen panelini hedefler. Hipoksi, katı tümörlerde mikro-ortamın ortak özelliğidir ve hipoksinin neden olduğu faktörün aktivasyonu ile kanser hücrelerinin büyüme hareketlerinin merkezinde yer alır. Mikro çevre hipoksinin sebep olduğu faktörleri etkilemenin dışında bu faktör metabolizma, besin varlığını, pH ve hücre dışı matris gibi mikro çevresel özellikleri de etkiler. Bir tümör yalnızca sınırsız sayıda çoğalan tümör hücrelerinin kütlesi değildir. Bunlar olgun kanser hücreleri, kanser kök hücreleri, stromal hücreler, metastatik kanser hücreleri, endotel hücreleri, makrofajlar gibi hepsi hücre dışı bir matrise (ECM) gömülüdür. Birbirleriyle iletişim kurdukları ve lokal mikroçevre ile güçlü etkileştikleri tümör matriksi şeklinde düşünülmelidir (Hockel ve ark., 2001). Dolaylı olarak tüm çevresel özellikleri etkileyen hücre dışı matristir. Besin ve oksijen difüzyonu damar sistemine, stroma yoğunluğuna ve hücresel üç boyutlu organizasyona bağlıdır. Bu fiziksel özelliklerin dışında, stroma kimyasal bileşimi de belirleyici bir özellik olabilir. Örneğin, büyüme faktörleri HIF-1 α protein seviyesini değiştirerek düzenleyebilir. İnsülin benzeri büyüme faktörü 1, epitelyal büyüme faktörü 2'nin ve epitelyal büyüme faktörünün sırasıyla kolon karsinom hücrelerinde (HCT116) (Fukuda ve ark., 2002), prostat kanseri hücrelerinde (DU145, PC-3, PPC-1 ve TSU) (Zhong ve ark., 2000) ve meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) HIF-1 α ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Launghner ve ark., 2001). Bu üç faktör, mTOR'u hedefleyen fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) / Akt yolları yoluyla HIF-1 α protein seviyesini artırır. Ayrıca, ERK yolu da büyüme faktörleri tarafından HIF modülasyonu için bir adaydır; çünkü HIF aktivitesi ERK'ye bağlı sinyallerle uyarılır (Richard ve ark., 1999). İki mekanizma ERK tarafından HIF-1 α yukarı regülasyonunu açıklayabilir: HIF'nin C-TAD'sine bağlanıp HIF aktivitesini artırıp ko-aktivatör p300,

daha uygun bir sonuç veren fosforilasyon ile hedeflenebilir, p300-HIF-TAD etkileşimi (Sang ve ark., 2003) ve HIF hedefli fosforilasyon, HIF-1 α nükleer lokalizasyonunu destekleyebilir (Mylonis ve ark., 2006). Stromal hücreler tarafından salgılanan anjiyotensin II gibi vazoaktif hormonlar da, her iki HIF çevirisini de teşvik edebilir (Page ve ark., 2002).

2.4.1.5. HIF ve çoklu ilaç direnci ilişkisi

Çoklu ilaç direnci (MDR), kemoterapi amaçlı tedavi başarısızlığının ortaya çıkmasının başlıca nedenlerinden biridir. MDR'nin birçok mekanizmasından, insan MDR1 geninin ve MDR1 tarafından kodlanan P-glikoprotein (P-gp) taşıyıcısının yüksek ekspresyonu araştırmaların önemli bir odağıdır (Wu ve ark., 2008). MDR1/ P-gp'yi çok eksprese eden tümör hücreleri genellikle çeşitli kemoterapötiklere direnç gösterir (He ve ark., 2011). Yapılan birçok çalışmada, HIF-1 α protein ekspresyonunun birçok kanser hücre hattında MDR1/P-gp ekspresyonu ile bağıntılı olduğu ve HIF-1 α ve MDR1'in mRNA ekspresyon seviyesinin, normal koşullara göre hipoksik durumlarda arttığı gösterilmiştir. Hipoksi çoğu tümör çeşidinde bir özelliği olduğundan ve bu ortamda bulunan MDR1 gen indüksiyonu gerçekleştiğinden, MDR1'in hipoksiye duyarlı bir geni temsil edebileceği varsayılıyor. Analizler sonucunda, ortam hipoksisinin MDR1 gen ekspresyonunu dönüştürülmüş epitelyumda ve primer kültürlenmiş endotelinde rol oynayan fonksiyonel P-gp ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. Aynı zamanda çalışmalar sonucu elde edilen verilerle MDR1 geninde daha önceki çalışmalarda görülmemiş, fonksiyonel bir HRE'nin varlığı ortaya çıkmıştır. Bu veriler, hipoksinin neden olduğu P-gp ekspresyonunun bazı tümörlerin kemoterapötiklere direnci için bir yolu temsil edebileceğini göstermektedir (Ding ve ark., 2010).

2.4.2. Hipoksi ve kanser

Hipoksi, malign tümörlerin genelinde yaygın olan fenomen bir fizyolojik durum olmayan oksijen seviyesinin gerilimidir. Tümör hipoksisi ilerlemiş fakat işlevsiz vaskülarizasyona, metastaza ve hücre hareketliliği ile sonuçlanan epitelyal-

mezenkimal geçiş fenotipinin gerçekleşmesine yol açar. Hipoksi tümör hücresi metabolizmasını değiştirip, hücre sessizliğini indükleyerek tedavinin direncinde katkıda sağlar. Kanser hücreleri, nispeten hipoksiye maruz kalma süresine bağlı olarak hücre sağ kalımına ya da hücre ölümüne yol açan azalmış oksijenasyona farklı tepki verir. Akut hipoksi genel olarak, birkaç dakikada oluşur ve kısa süreli hipoksiye maruz kalma durumu olarak kabul edilmektedir. Örneğin kanın damar tıkanıklığı bu durumda görülür. Geri dönüşümlüdür ve oksijen dalgalanmalarına yol açar. Akut hipoksidede, hücreler genelde birkaç dakika ile 72 saat arasında sürekli hipoksiye maruz kalırlar (Bayer ve ark., 2012; Vaupel ve Harrison, 2004). Kısa süreli hipoksidede, hücrelerin metabolik adaptasyonu, apoptozis durumu ve otofajiyi aktive ederek hücrelerin bu olumsuz koşullarda hayatta kalmalarına izin verir. Patolojik hipoksidede, tümörlerde tümörün yayılmasını ve hücrenin yaşamını kolaylaştıran yaygın bir mikroçevre faktörüdür. HIF-1 α ve HIF-2 α alt birimlerinin aşırı ekspresyonu sonucu ile tetiklenen hipoksi ve hücresel alt hedeflere yönelik verilen temel hücresel tepkiler, kan damar oluşumunu, agresifliği, metastaz ve tedaviye direncini artırır. Tümör oksijenasyonu tümörün ilerlemesinde kritik bir faktördür ve HIF- α alt birimlerinin tümörlerde ve metastazlarında aşırı ekspresyonu, insan kanserlerinin çoğunda agresiflik ve zayıf sağkalımı ile ilişkilidir. Tümör hücreleri hipoksi cevapta hücre sağkalımı, hücre çoğalması ve anjiyogenez gibi hücresel durumları uyarır. Tümörlerde ve tümörlerin metastazlarında HIF- α 'nın aşırı ekspresyonu, insan kanserlerinin çoğunda saldırganlığıyla ilişkilidir. Hipoksik hücrelerin daha iyi metastaz yapmaları, daha agresif ve istilacı olma kabiliyetlerinin olduğu yapılan çoğu çalışmada gösterilmiştir. Hipoksi durumundaki oksijen seviyesinin değişimi tümörlerin ortak özelliğidir. Hipoksik koşullarda tümör hücreleri daha fazla genişler ve oksijen seviyesinin normale gelmesini engelleyip hipoksi ortamı yaratırlar. Tümörün oksijen seviyesi, dokunun başlangıçtaki oksijenlenmesine, tümörün büyüklüğüne, tümör evresine, oksijen ölçüm yöntemine ve heterojen tümör dokusunun hangi kısmında ölçüm yapıldığına bağlıdır. Tümör oluşumundaki ortama zemin oluşturan durum hipoksi koşulunda değişen oksijen seviyesidir (Çizelge 2.1.) (Muz ve ark., 2014; Semenza, 2010).

Çizelge 2.1. Organlarda ve ilgili tümörlerde oksijenasyonun karşılaştırılması (Muz ve ark., 2014)

Doku - Organ	Normal (% O ₂)	Kanser	Hipoksi (% O ₂)
Beyin	4.6	Beyin tümörü	1.7
Meme	8.5	Meme kanseri	1.5
Serviks	5.5	Rahim ağzı kanseri	1.2
Böbrek korteksi	9.5	Böbrek kanseri	1.3
Karaciğer	4.0-7.3	Karaciğer kanseri	0.8
Akciğer	5.6	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	2.2
Pankreas	7.5	Pankreas kanseri	0.3
Rektal mukoza	3.9	Rektal karsinomu	1.8

2.4.3. Hipoksi ve İyon Kanalları

İyon kanalları, çeşitli iyonların taşınması ile bu işlevi yerine getiren transmembran proteinleridir. İyon kanalları birçok hücrel fonksiyonlarda görev alır. Bunlar; kas hücrelerinin kasılması, kalbin atması, sinir hücrelerinde impuls iletimi, hormon salınması, duyu iletimi, öğrenme ve hafıza, hücre siklusu, apoptoz, hücre göçü, hücrel homeostazın sağlanması gibi hücrel programlarda görev alırlar. Bugüne kadar, aktivasyon modlarında (voltaja bağlı veya bağımsız, ligand kapılı, mekanik duyarlı, pH) ve iyonik geçirgenliklerinde (K⁺, Ca²⁺, Cl⁻, Na⁺) farklılık gösteren 300'den fazla iyon kanalı tespit edilmiştir. (Çizelge 2.2.) Hipoksiye maruz kalan dokularda bir dizi fizyolojik ve patolojik durum gerçekleşir. Bu, iskemi gibi kısa süreli olabileceği gibi kronik hastalıklar veya yüksek irtifada kalma ile oluşan uzun süreli durumlar da olabilir. Bu durumlarda hücreler, kalp ve beyin gibi kritik organlara oksijen iletimini sağlamak için hızla düşük oksijen seviyelerine ayarlanacak şekilde programlanır. Aktivite değişiklikleri ve hipoksik uyarıların etkisiyle sekresyon, kasılma, uyarılabilirlik dahil olmak üzere çoğu hücrel fonksiyonları kontrol eden oksijene duyarlı iyon kanallarının ekspresyonu tabloda gösterilmiştir (Lopez ve ark., 1988).

Çizelge 2.2. Sürekli hipoksinin voltaj kapılı iyon kanalları üzerindeki etkileri (Shimoda ve ark., 2011)

Alt Tür		Etki	Alt Tür
Potasyum iyonu	Kemoreseptörler	↓	
	Nöronlar	↓	K _V 2.1 K _V 1.2
	Kalp	↓	
	Pulmoner vaskülatör	↓	K _V 1.2 K _V 1.5 K _V 2.1
Sodyum iyonu	Nöronlar	↑	
	Kalp	↑	
Kalsiyum iyonu	Kemoreseptörler	↑↓	L tipi
	Nöronlar	↓	L tipi – N tipi
	Kalp	↓	
	Sistemik damar sistemi	↓	L tipi
	Pulmoner damar sistemi	↑	L tipi

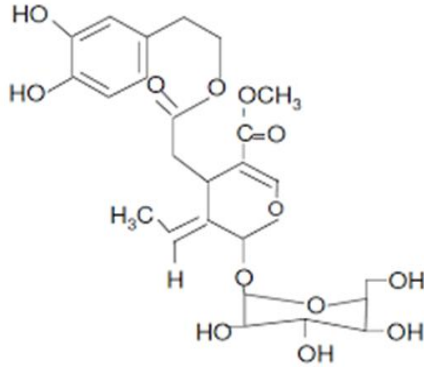
K⁺ iyon kanallarının hipoksi tarafından inhibisyonu, karotis (şahdamarı) cismi hücre içi kalsiyum konsantrasyonu ve duysal yol üzerinde önemli bir etki yapabilir. Glomus hücrelerinde K⁺ kanal aktivitesinin inhibisyonuna neden olan hipoksi, K⁺ akışını ve depolarizasyonu azaltır (Buckler ve Vaughan, 1994). Hipoksinin karotis cisimciklerinde voltaj kapılı potasyum kanalından gelen akıntı sebebiyle artmış duysal aktiviteye ve Ca²⁺ iyon konsantrasyonunda artışa neden olduğu yapılan çalışmalar sonrası gösterilmiştir. Depolarizasyonun glomus hücrelerine uygulanması aşamasında, voltaj kapılı potasyum kanalların ve nörotransmitter salınımı yoluyla Ca²⁺ akışına yol açtığı ve K⁺ kanalı aracılığıyla depolarizasyonun karotis vücut hipoksisinde önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (Montoro ve ark., 1996; Buckler ve Vaughan, 1994). İyon kanalları aşamalı olarak çeşitli insan türlerinde eksprese edilen yeni bir membran protein sınıfı şeklinde ortaya çıkmaktadır. Tümörlerin ve tümör hücresinin davranışlarının farklı yönlerini düzenler. Genellikle değişkenlik gösteren glikoliz ve glutaminoliz oranından oluşan kanser hücrelerinin metabolizması, asidik metabolik ürünlerin aşırı üretimine neden olur. Bu asidik metabolitlerin hücre içindeki varlığı hücre içi asidoz ile sonuçlanır. Bu nedenle hücrelerin hayatta kalmasını ve hücre çoğalmasını engeller. Sonuç olarak tümör hücreleri, hücre içi pH'da yapısal olmayan bir artış, hücre dışı pH'dan daha asidik olan pH kontrol mekanizmalarını aktive eder. Bu durumda mikro ortamda metastazın ilerlemesi için mükemmel bir alan oluşturarak, tümörlerin kazanılmış özelliklerinden bazıları için izin verici olabilir. Yapılan son çalışma analizleri, onkojenik aktivasyon, hipoksi sinyali, iyon kanalları ve kanserde

düzensiz olan metabolik yollar arası karmaşık ara bağlantılar olduğunu ortaya koymuştur (Jessica ve ark., 2019). Farklı iyon kanal tiplerinin ekspresyon ve aktiviteleri işaretlenir ve düzenlenir. Kanserin ilerlemesinin spesifik aşamaları ve neoplastik fenotipe katkıları, hücre proliferasyonu ve apoptozunun kontrolünden, invazivliğin düzenlenmesine kadar değişmektedir (Pedersen ve Stock, 2013).

2.5. Oleuropein

Zeytin (*Olea europaea*), zeytingiller (Oleaceae) familyasının bir üyesidir. Dünyanın genelinde geniş alana sahip olan bir bitkidir. Akdeniz bölgesinde maki bitki örtüsünde doğal olarak yetişir ve yaz sıcaklıklarının etkili ve kurak olduğu ülkelerde kültürü yapılmaktadır (Baytop, 1999). Yıllar öncesinden beri temel yağ kaynağı olan zeytin ağacı en eski tarımsal ağaçtır (Raina, 1995).

Biyolojik özellikleri bakımından önemli bir değere sahip olan zeytin ağacı fenolik maddelerce zengindir. Bunların en önemlisi oleuropeindir (Japon-Lujan ve ark., 2006; Bouaziz ve ark., 2008). Oleuropein, zeytin meyvesinin oluşumunun başlangıç evresinde daha yeşil olgunlaşmamış döneminde çok yüksek miktarda bulunur. Olgunlaşmanın ilerleyen döneminde ise kademeli olarak miktarı azalır ve en önemli özelliği ise zeytin meyvesine acı tadını veren bir madde olmasıdır (Amiot ve ark.,1989; Esti ve ark., 1998; Ryan ve ark.,1999). Oleuropein kimyasına bakıldığında, Gentianaceae, Cornaleae ve Oleaceae ailelerinde yüksek seviyede bulunan sekoiridoid grubu bir bileşiktir. Oleuropein, 2-(3,4-dihidroksifenil) etanol (hidroksitirosol) ile bir ester birleşmesiyle oluşur. Oleaceae'nin sekoiridoid glukozitlerinde ortak olan oleosidik iskeletine de sahiptir (Soler-Rivas ve ark.,2000).



Şekil 2.6. Oleuropeinin kimyasal yapısı (Winkelhausen ve ark., 2015).

Zeytin meyvesinin gerçekleşmesi üç aşamada oluşur. Bu aşamalar sırasıyla: Oleuropeinin birikmesiyle oluşan bir büyüme fazı, Oleuropein ve klorofil miktarının azalması sonucu yeşil bir olgunlaşma fazı ve son olarak antosiyaninlerin oluşması ile karakterize edilen ve oleuropeinin seviyesinde devam eden azalma sonucu siyah bir olgunlaşma fazı şeklindedir (Amiot ve ark., 1989). Oleuropeinin, anti-inflamatuar (Visioli ve ark., 1998), antioksidan (Visioli ve ark., 2002), anti-kanser (Owen ve ark., 2000), anti-aterojenik (Carluccio ve ark., 2003), anti-mikrobiyal (Tripoli ve ark., 2005) ve anti-viral (Fredrickson ve ark., 2000) gibi farmakolojik özellikleri gösterilmiştir. Anti-kanser etkisine bakıldığında, zeytin yağında çoğu küçük bileşen, karsinogenezin başlaması ve ilerlemesini durdurmada etkili olan maddeler tanımlanmıştır. Hamdi ve Castellon (2005), çalışmalarında, oleuropeinin glioblastoma LN-18 hücre hattında hücre büyümesini engellediğini gösterdiler. Menendez ve ark., (2007) ise oleuropein aglikonun meme kanserinde hücre canlılığını azaltmada en güçlü fenolik bileşik olduğunu ortaya çıkardılar. Son yıllarda yapılan bir diğer çalışmada, Han ve ark. (2009), 200 µg/mL oleuropeinin, hücre proliferasyonunu inhibe edip, apoptozu indükleyerek MCF-7 hücrelerinin sayılarını azalttığını bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

- Tripan mavisi (Sigma Aldrich, ABD)
- Oleuropein (Santa Cruz Biotech, ABD)
- 15 ml ve 50 ml’lik tüpler (Greiner, Almanya)
- Sınıf II güvenlik kabini (Thermo, ABD)
- CO2’li inkübatör (Eppendorf, Almanya)
- Hipoksik inkübatör (Mettler, Almanya)
- İnverted ışık mikroskobu (Olympus, Japonya)
- Santrifüj (Nüve, Türkiye)
- Su banyosu (Isolab, Almanya)
- Spektrofotometre & Mikroplaka okuyucu (Thermo, ABD)
- 100-mm çaplı petri kapları (Greiner, Almanya)
- 96-kuyucuklu mikroplaka (Greiner, Almanya)
- Farklı hacimli otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)
- Steril pipet uçları (Greiner, Almanya)
- Hücre ortamı; RPMI 1640 (Invitrogen, ABD)
- Fetal dana serumu (FBS) (Invitrogen, ABD)
- Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich, ABD)
- L-Glutamine (Invitrogen, ABD)
- Dexamethasone (Sigma Aldrich, ABD)
- Alamar blue (Invitrogen, ABD)
- Tetrodotoksin (Alomone Labs, İsrail)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü

İnsan prostat kanseri hücre hattı olan PC-3, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden getirilmiş olup, laboratuvarımızda seri pasajları yapıp çoğaltılmış ve sıvı azot içerisinde dondurulmuş olarak stokta saklanmaktadır. Deneylerde 15-19 pasaj numarasına sahip hücreler kullanılmıştır. PC-3 hücreleri için yaşama ortamı, Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640, Invitrogen, ABD) medium içerisine %10 fetal dana serumu (FBS) ve 2 mM L-Glutamine ilave edilerek hazırlanmaktadır. Hücreler, %5 CO₂, 37°C sıcaklık ve %100 nem koşullarını sağlayan inkübatörde yaşatılmaktadır.

3.2.2. Hipoksik koşulların oluşturulması

Genel hücre kültürü koşullarının oluşturulması için 37°C sıcaklık, %5 CO₂ ve %95-100 nemin sağlandığı inkübatörler kullanılmaktadır. Bu inkübatörlerde oksijen, atmosfer seviyesi olan %21'dir (normoksik koşul). Çalışmada hipoksik koşulların sağlanması için çok gazlı inkübatör kullanılmıştır (Şekil 3.1.). Çok gazlı inkübatörde standart hücre kültürü koşullarına ek olarak oksijen seviyesini %2'ye düşürmek için azot gazı kullanılmaktadır.



(a)

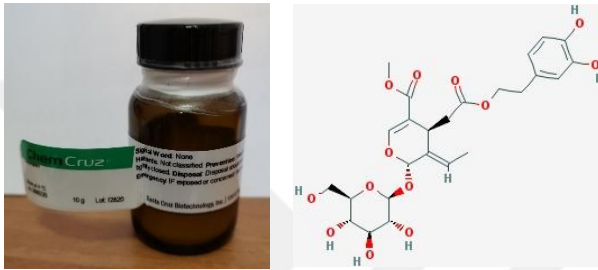


(b)

Şekil 3.1. (a) Normoksik ve (b) hipoksik inkübatör

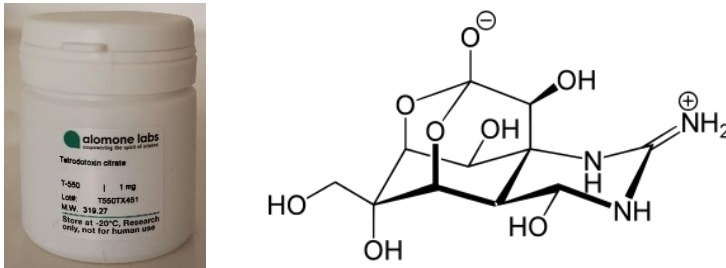
3.2.3. Bileşiklerin hazırlanması

Çalışmada ticari olarak üretilmiş oleuropein bileşiği ($C_{25}H_{32}O_{13}$; ma: 540.51 g/mol) (Santa Cruz Biotechnology, ABD) (Şekil 3.2.) kullanılmıştır. Öncelikle PC-3 hücrelerinin yaşama ortamı olan medium içerisinde 10mM konsantrasyonlu Oleuropein ana stok çözeltisi hazırlanmış ve 0.2µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Ardından deneylerde kullanılmak üzere 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µM konsantrasyonlarda dilüsyonlar hazırlanmıştır.



Şekil 3.2. Oleuropein ticari ambalajı ve kimyasal yapısı (Santa Cruz Biotechnology, 2022)

Voltaj kapılı sodyum kanal blokörü olan tetrodotoksin (TTX) ($C_{11}H_{17}N_3O_8$; ma: 319.27 g/mol) (Alomone Labs, İsrail) (Şekil 3.3.) çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. TTX, üretici firmanın önerisine göre distile su ile çözülerek 10mM konsantrasyonda stok hazırlanmış ve porsiyonlanmış olup -20 °C’de saklanmaktadır. Deneylerde kullanmak üzere medium içerisinde dilüe edilerek 2 µM konsantrasyonda hazırlanmıştır.



Şekil 3.3. Tetrodotoksinin ticari ambalajı ve kimyasal yapısı (Alomone Labs, 2022)

3.2.4. Hücre proliferasyon analizi

Normoksik koşullarda hücre proliferasyon analizi, 96 kuyucuklu mikrolakaların bir kuyucuğuna 3000 hücre ekilmek suretiyle gerçekleştirilmektedir. Deneye toplam 4 gün devam edilmektedir. Hipoksik koşullarda hücre proliferasyon analizi için öncelikle başlangıç hücre sayısı belirlenmiştir. Bu amaçla bir mikrolakanın kuyucuklarına farklı sayılarda (750, 1500, 3000, 6000 ve 12000) hücre ekilmiş; 24 saatte bir medium değiştirilmiş; 24, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyonların sonunda Alamar blue solüsyonu kullanılarak absorbanslar ölçülmüştür (Alamar blue yöntemi aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır). Her grup için 3 kuyucuğa ekim yapılmış ve deneyler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

Oleuropeinin normoksik veya hipoksik koşullarda hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri, Bölüm 3.2.3'te anlatılan şekilde hazırlanan deney mediumları kullanılarak Alamar Blue yöntemiyle tespit edilmiştir. Bunun için 96 kuyucuklu mikrolakaların her bir kuyucuğuna eşit sayıda / 3000 hücre ekilmiştir. Hücre pasajından 24 saat sonra, kontrol grubu kuyucuklarına normal büyüme mediumu; deney grubu kuyucuklarına ise 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 μ M konsantrasyonlarda oleuropein (OL) içeren deney mediumları konulmuştur. Pasajdan 24 ve 48 saat sonra kuyucuklardaki mediumlar taze hazırlananlar ile değiştirilmiş, son medium değişiminden 24 saat sonra üretici firmanın önerisine göre, her kuyucuğa 10 μ l alamar blue solüsyonu ilave edilmiştir. Mikrolakalar alüminyum folyo ile kaplanmış, 37 °C'de, 4 saat süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra, mikrolaka okuyucuda 570 ve 600 nm dalga boylarında absorbans ölçümleri yapılmıştır. Her grup için 3 kuyucuk kullanılmış ve deneyler en az üç kez tekrarlanmıştır. Elde edilen absorbans değerlerinden üretici firmanın belirttiği şekilde canlı hücre yoğunlukları (% indirgenme) hesaplanmıştır (ThermoFisher, 2022). Ardından kontrol grubu canlılık oranı 100 kabul edilerek deney gruplarında hesaplanan canlılık oranları normalize edilmiştir.

3.2.5. Toksisite analizi

Oleuropein bileşiğinin, normoksik veya hipoksik koşullarda, PC-3 hücrelerine karşı toksik etkisi olup olmadığını test etmek için tripan mavisi ile boya dışlama analizi yapılmıştır. Bu analiz kısaca şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Her birisine 3×10^4 hücre ekilen 35 mm çaplı steril petrilere 24 saat sonra mikroskopta incelenmiş ve kontrol grubu petrilere normal büyüme mediumu, deney grubu petrilere ise 150 μ M oleuropein ile 2 μ M tetrodotoksin (TTX) içeren medium eklenmiştir. Mediumlar taze hazırlanmış olanlar ile değiştirilmiş, bu işlem 2 gün süreyle ve hergün aynı saatte gerçekleştirilmiştir. Deney süresinin sonunda petrilere bulunan medium uzaklaştırılmış, petrilere 800 μ l medium ile 200 μ l % 4'lük tripan mavisi eklenip 10 dk inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda petrilere tripan mavisi içeren medium atılarak yerine taze medium konulmuştur. İnverted mikroskopta, 40x objektifle her petride 40 mikroskop alanı fotoğraflanmıştır. Kaydedilen fotoğraflardan Image J programında canlı ve ölü hücreler sayılmıştır. Bu deney üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.6. Motilite indeksinin belirlenmesi (yara kapanma analizi)

Normoksi ve hipoksi şartları altında, oleuropeinin PC-3 insan prostat kanser hücrelerinin yanal yönde hareketi üzerindeki etkisini araştırmak üzere, 150 μ M OL 48 saat boyunca uygulanmış ve yara kapanma analizi yapılmıştır. Bunun için 35 mm'lik petri kaplarının alt yüzeyine 3 dikey 15 yatay çizgi çizilmiş ve bu petrilere 15×10^4 PC-3 hücresi ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından petrinin taban yüzeyini kaplayan ve 3 dikey çizgi hizasında bulunan hücre tabakası, steril pipet ucuyla kazınarak yara izi oluşturulmuştur. Yara izlerinin oluşturulduğu zaman 0. saat olarak kabul edilmiş; yatay ve dikey çizgilerin kesiştiği 45 noktadaki yara genişlikleri 0., 24. ve 48. saatlerde inverted mikroskoba entegre edilmiş kamera ile fotoğraflanarak kaydedilmiştir (büyütme oranı: 10x). Ayrıca 0. ve 24. saatlerde medium değişimi gerçekleştirilmiştir. Kaydedilen fotoğraflardaki yara genişlikleri Image J analiz programıyla ölçülmüş ve elde edilen verilerden hücrenin yanal yönde hareket ettiği mesafeyi ifade eden motilite indeksi (MoI) aşağıdaki formülle (3.1) hesaplanmıştır (Bahar ve Yoon, 2021).

Deneylerde TTX (2 µM) pozitif kontrol olarak uygulanmıştır. Normoksi ve hipoksi koşulları altında, her grup için üçer petri kullanılmış ve her deney üç kez tekrarlanmıştır.

$$MoI = 1 - (W_t/W_0) \quad (3.1)$$

MoI: Motilite İndeksi

W_0 : Hücre ekiminden 24 saat sonra, medium değişimi yapılmadan önce ölçülen yara genişlikleri

W_t : Deney mediumları ile 24 ve 48 saat inkübasyonun ardından ölçülen yara genişlikleri

3.2.7. İstatistiksel değerlendirme

Deneylerden elde edilen bulgular, aritmetik ortalamalar ve her bir ortalama değer için standart hatası (ortalama $\pm$ standart hata) şeklinde verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığı; Excel (Office 2019) ve SPSS 16.0 programlarında ONE WAY ANOVA varyans analizi, student *t*-testi kullanılarak değerlendirilmiş; anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

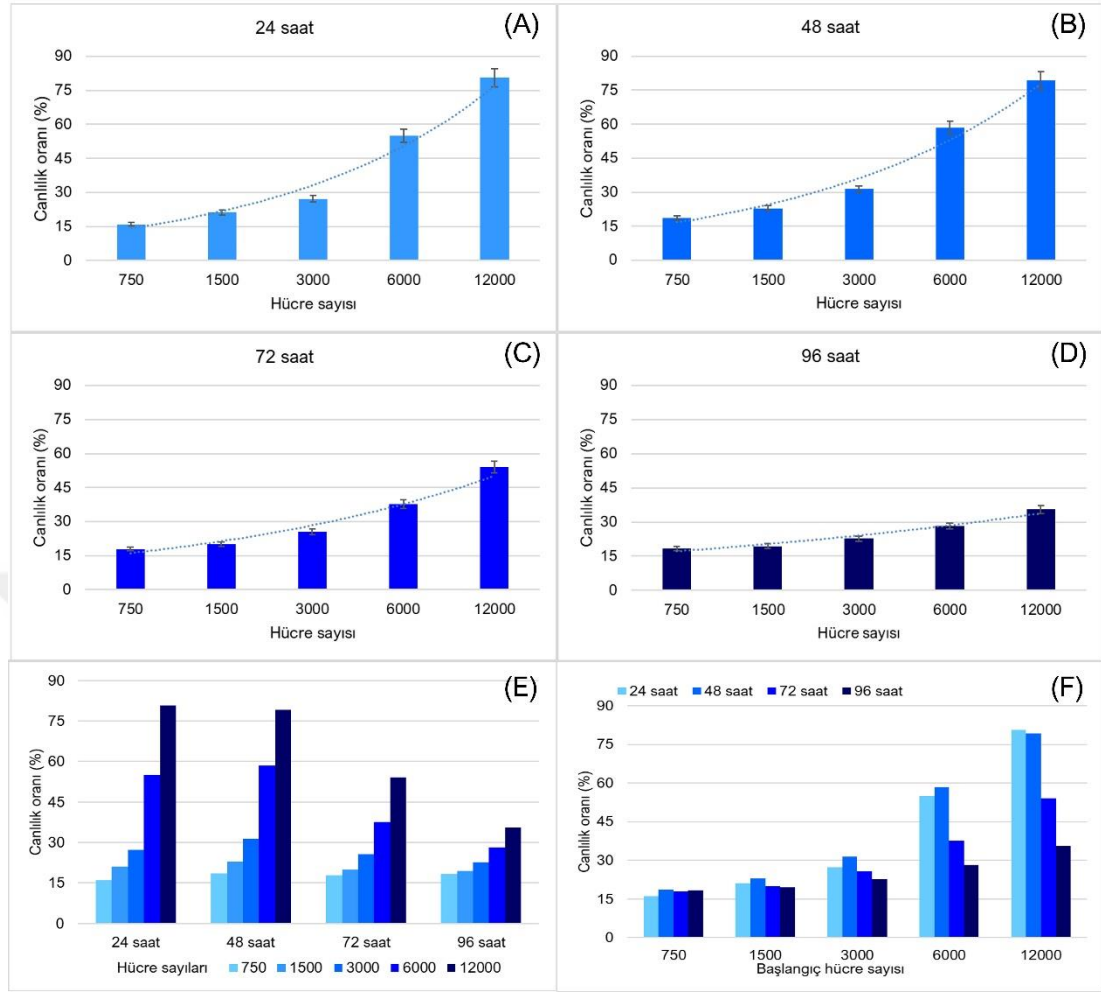
4. ARASTIRMA BULGULARI ve TARTISMA

Bu çalışmada, ileri metastatik olan ve metastaz yeteneği voltaj kapılı sodyum kanalları ile ilişkili olan PC-3 hücrelerine normoksik ve hipoksik koşullarda uygulanan oleuropeinin hücre hareketi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle hücre proliferasyonunu etkilemeyen ve hücrelere toksik etki yapmayan bileşik konsantrasyonu belirlenmiş, ardından bu konsantrasyondaki oleuropeinin hücre hareketi üzerindeki etkisi fenotipik olarak analiz edilmiştir. Hücre proliferasyonu üzerindeki etkiyi belirlemek için Alamar Blue solüsyonu kullanılmış, toksisite analizi tripan mavisini kullanılarak boya dışlama analiziyle gerçekleştirilmiştir. Hücre hareketi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için hücrelerin yanal yöndeki hareketlerinin değerlendirildiği yara iyileşme analizi yapılarak motilite indeksi hesaplanmıştır.

4.1. Hücre proliferasyonu

4.1.1. Hücre sayısının belirlenmesi

Hipoksik koşullarda 24 ve 48 saat sürelerle yapılacak hücre proliferasyon analizinde PC-3 hücreleri için optimum başlangıç hücre sayısı Bölüm 3.2.4.'te anlatılan şekilde belirlenmiştir. Bu amaçla hücreler farklı sayılarda pasajlanmış; ardından 24, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda Alamar Blue eklenerek canlı hücre sayısını ifade eden absorbans değerleri, 570nm ve 600nm dalga boylarında kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Buna göre 24 ve 48 saatlik uygulamalar için hipoksik koşullarda optimum başlangıç hücre sayısı 750, 1500 ve 3×10^3 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.). Normoksi çalışmaları ile uyumlu olarak devam edebilmek için proliferasyon deneylerinde 96 kuyucuklu mikrolakaların her bir kuyucuğuna 3×10^3 hücre ekilerek deneylerin gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı sayılarda ekilmiş PC-3 hücrelerinde 24, 48, 72 ve 96 saatlik sürelerin sonunda tespit edilen canlılık oranları (%)

4.1.2. Oleuropeinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi

Oleuropeinin normoksik ve hipoksik koşullarda PC-3 hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini tespit etmek için hücrelere Bölüm 3.2.4'te anlatılan şekilde farklı konsantrasyonlarda oleuropein, 48 saat süreyle uygulanmış ve Alamar Blue solüsyonu kullanılarak canlı hücre yoğunluğu (%) spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

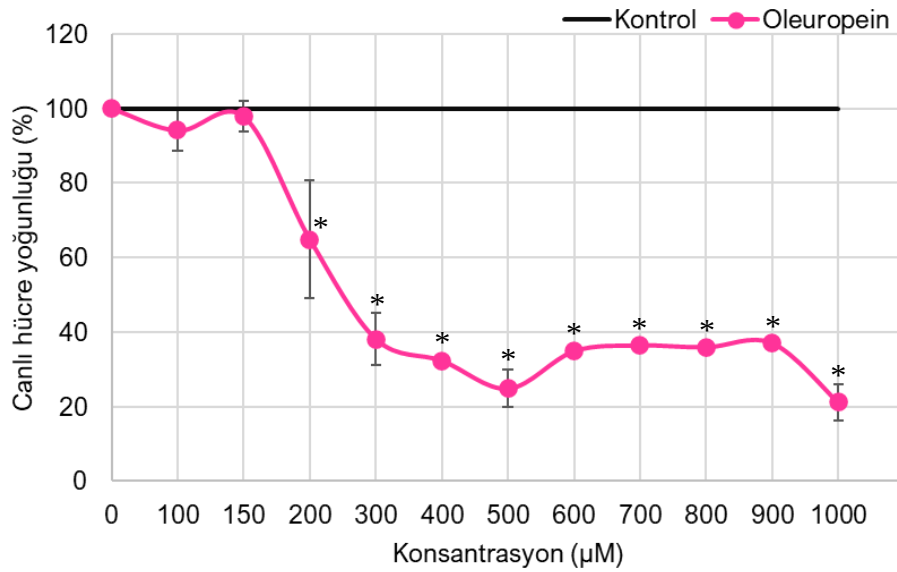
Normoksik koşullarda 200 μ M ve daha yüksek oleuropein konsantrasyonunun hücre proliferasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.1., Şekil 4.2.). Oleuropein, 100 ve 150 μ M konsantrasyonlarda hücre proliferasyonu üzerinde herhangi bir değişiklik oluşturmamış, ancak 200 μ M'dan itibaren hücre canlılık

oranları düşüş eğilimine girmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede bu azalmanın anlamlı ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. PC-3 hücrelerinde (a) normoksik (b) hipoksik koşullarda ve farklı konsantrasyonlarda oleuropein uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ($\pm$ standart hata).

Grup	Canlı hücre yoğunluğu (%)	
	Normoksik koşul	Hipoksik koşul
Kontrol	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0
Oleuropein (100 μ M)	94.1 $\pm$ 5.56	97.1 $\pm$ 5.84
Oleuropein (150 μ M)	97.8 $\pm$ 4.21	97.8 $\pm$ 12.5
Oleuropein (200 μ M)	64.8 $\pm$ 15.7*	91.8 $\pm$ 8.63
Oleuropein (300 μ M)	38.1 $\pm$ 7.02*	84.9 $\pm$ 2.67*
Oleuropein (400 μ M)	32.3 $\pm$ 1.13*	72.1 $\pm$ 14.0*
Oleuropein (500 μ M)	24.8 $\pm$ 5.09*	34.5 $\pm$ 8.10*
Oleuropein (600 μ M)	34.9 $\pm$ 0.65*	27.1 $\pm$ 1.18*
Oleuropein (700 μ M)	36.4 $\pm$ 0.73*	28.6 $\pm$ 0.77*
Oleuropein (800 μ M)	35.9 $\pm$ 0.49*	29.6 $\pm$ 1.30*
Oleuropein (900 μ M)	37.1 $\pm$ 0.26*	30.4 $\pm$ 0.16*
Oleuropein (1000 μ M)	21.1 $\pm$ 4.77*	32.5 $\pm$ 1.57*

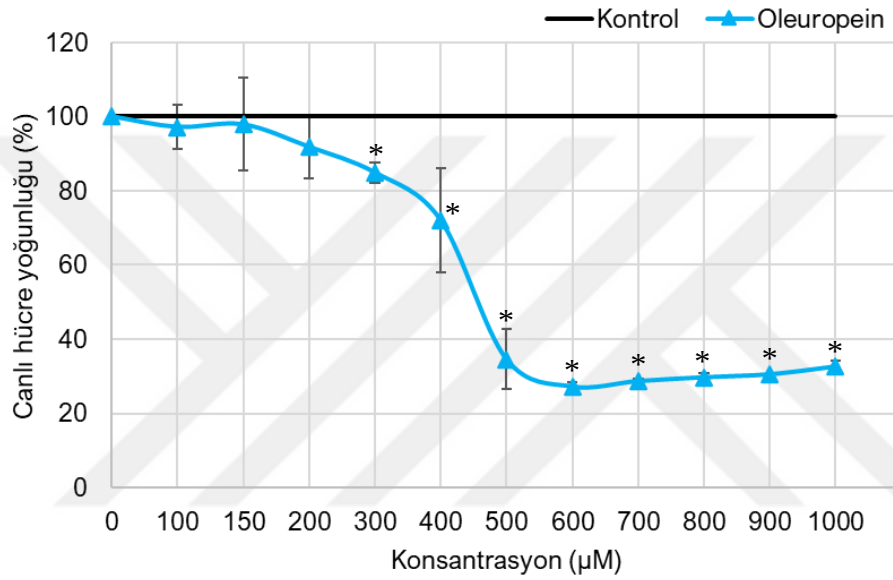
*: İstatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).



Şekil 4.2. PC-3 hücrelerinde normoksik koşullarda ve farklı konsantrasyonlarda oleuropein uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ($\pm$ standard hata)

*: Kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

Oleuropeinin hipoksik koşullarda 48 saat süreyle uygulanması sonucunda hücre canlılık oranlarının normoksik koşullardakine benzer şekilde 200 μ M ve üzeri konsantrasyonlarda azaldığı, ancak bu düşüşün 300 μ M ve daha yüksek konsantrasyonlarda istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir. Çizelge 4.1.'deki verilerle oluşturulan grafik Şekil 4.3.'te izlenmektedir.



Şekil 4.3. PC-3 hücrelerinde hipoksik koşullarda ve farklı konsantrasyonlarda oleuropein uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ($\pm$ standard hata)

*: Kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

Literatürde, oleuropeinin prostat, meme, kolon, tiroid, akciğer kanserleri, melanoma, glioblastoma, nöroblastoma, seminoma, hepatokarsinoma hücrelerine karşı antikanser aktivite sergilediği pek çok çalışma ile gösterilmiştir (Rishmawi ve ark., 2022). Acquaviva ve ark. (2012), prostat kanseri LNCaP ve DU-145 hücreleri ile benign prostat hiperplazisi BPH-1 hücrelerine oleuropein uygulamışlar ve bileşiğin BPH-1 hücrelerine karşı antioksidan, kanser hücrelerine karşı ise prooksidan etki gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır. Gumushan Aktas ve Ayan (2021), MAT-LyLu sıçan prostat kanseri hücrelerine 250 μ g/ml ve daha yüksek konsantrasyonda uygulanan zeytin yaprağı sulu ekstraktının hücre çoğalmasını baskımlarken hücre morfolojisinde bozulmalara yol açtığını göstermişlerdir. Araştırmacılar, aynı hücrelerde saf oleuropeinin 25 μ M ve üzeri konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu inhibe

ettiğini, 100µM ve daha yüksek konsantrasyonlarda ise hücrelere toksik etki yaptığını belirlemişlerdir (Gumushan Aktas ve Ayan, 2021). Oleuropeinin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bileşiğin hücre çoğalmasını azalttığı, hücrelerde DNA hasarı oluşturduğu rapor edilmiştir (Liman ve ark., 2017). Liu ve ark. (2019), oleuropeinin, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını MCF-7 hücrelerine göre daha yüksek oranda baskılayabildiğini ve NF-κB yolağını modüle ederek apoptozu düzenleyebileceğini ileri sürmüşlerdir. Bir çalışmada, oleuropeinin HT-29 ve SW620 kolon kanseri hücrelerine karşı antiproliferatif ve proapoptotik etki yaptığı; SW620 hücrelerinde yağ asidi sentaz (FAS) ekspresyonunu inhibe ederek bu etkiyi ortaya çıkardığı; ancak HT-29 hücrelerinde proapoptotik etkinin FAS'tan başka bir mekanizma ile meydana geldiği bildirilmiştir (Notarnicola ve ark., 2011). Cardeno ve ark., (2013), oleuropeinin (400 µM) HT-29 kolon kanseri hücrelerine karşı sergilediği proliferasyonu inhibe edici ve apoptozu teşvik edici etkileri HIF1-α aracılığıyla p53'ü aktive ederek başardığını ileri sürmüşlerdir (Cardeno ve ark., 2013). Genel olarak çalışmaların normoksik koşullarda yapıldığı dikkati çekmektedir.

Bu tez çalışmasında oleuropein, PC-3 hücrelerine hem normal (%21) hem de düşük (%2) oksijen seviyelerinin sağlandığı koşullarda uygulanmıştır. Normoksik koşullarda uygulanan oleuropeinin, hücre proliferasyonunu 200 – 1000 µM aralığında ve konsantrasyon artışıyla uyumlu şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.2.). Hipoksik koşullarda ise hücre çoğalması üzerindeki inhibisyon 300 – 1000 µM aralığında ve yine konsantrasyona bağlı olarak artan şekilde gözlemlenmiştir (Şekil 4.3.). Hücre proliferasyon analizlerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda hem normoksik hem de hipoksik koşulda canlı hücre yoğunluğunu etkilemeyen 150 µM oleuropein konsantrasyonu ile hücre hareketi deneylerine devam edilmesine karar verilmiştir.

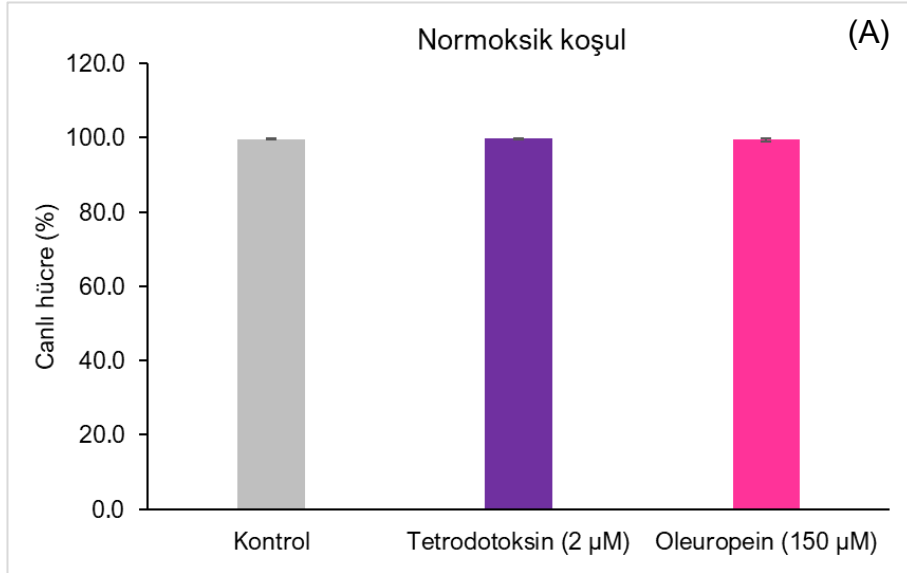
4.2. Toksisite analiz sonuçları

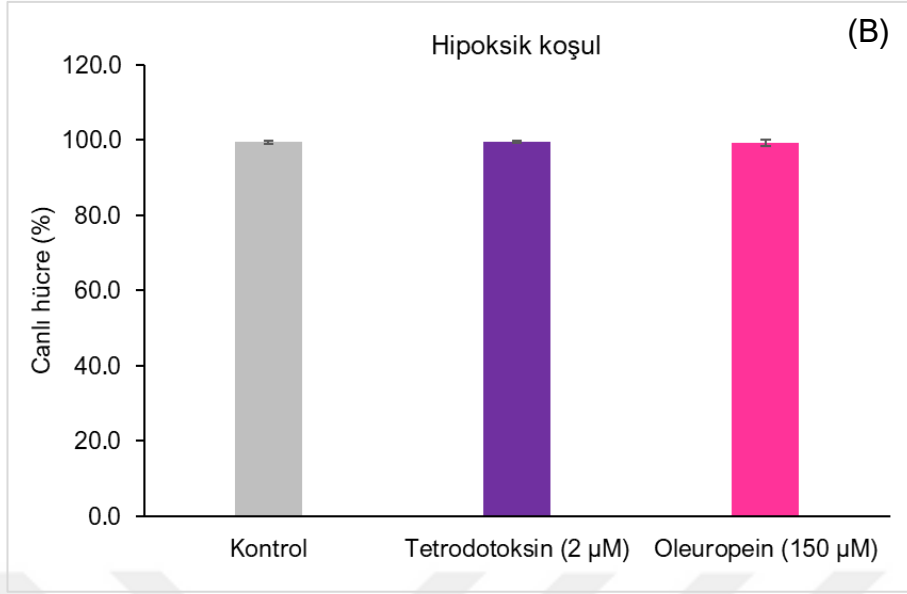
Deneylerde pozitif kontrol olarak kullanılan tetrodotoksin (TTX, 2 µM) ile Oleuropeinin hücre hareketi ile ilgili deneylerde kullanılan konsantrasyonunun (150 µM) insan prostat kanseri hücreleri olan yüksek metastatik PC-3 hücrelerine karşı

toksik etki gösterip göstermediğini belirlemek için Bölüm 3.2.5.'te anlatılan şekilde tripan mavisi ile boya dışlama analizi yapılmıştır. Elde edilen veriler, Çizelge 4.2.'de gösterilmiş olup, bu verilerle çizilen grafik Şekil 4.4.'te izlenmektedir. Buna göre normal oksijen seviyelerinde canlı hücre oranı kontrol grubunda 99.64 ± 0.13 iken TTX grubunda 99.69 ± 0.16 , OL uygulanan grupta 99.4 ± 0.31 olarak tespit edilmiştir. Düşük oksijen seviyelerinde ise PC-3 hücrelerinin canlılık oranı kontrol grubunda 99.36 ± 0.39 ; TTX grubunda 99.34 ± 0.28 ; oleuropein uygulanan grupta ise 99.14 ± 0.75 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2., Şekil 4.4.). Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiş; TTX'in ($2 \mu\text{M}$) ve oleuropeinin ($150 \mu\text{M}$) kontrol grubuna göre anlamlı bir fark oluşturmadığı ($p > 0.05$), yani uygulanan konsantrasyonlarda PC-3 hücrelerine karşı toksik etki yapmadığı gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. PC-3 hücreleri üzerine oleuropein (OL) uygulaması sonucunda elde edilen canlı ve ölü hücre sayıları (%)

	Canlı hücre sayısı (%)	
	Normoksik koşul	Hipoksik koşul
Kontrol	99.64 ± 0.13	99.36 ± 0.39
Tetrodotoksin ($2 \mu\text{M}$)	99.69 ± 0.16	99.34 ± 0.28
Oleuropein ($150 \mu\text{M}$)	99.40 ± 0.31	99.14 ± 0.75





Şekil 4.4. Toksisite grafiği: (A) Normoksik, (B) Hipoksik koşul.

Literatürde, farelerle yapılan bir çalışmada toksik dozu belirlenemediği için güvenli madde olarak sınıflandırılan (Alonso, 2004) oleuropeinin, sıçan prostat kanseri MAT-LyLu hücrelerine karşı 100 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarda toksik etki yaptığı bildirilmiştir (Gumushan Aktas ve Ayan, 2021). PC-3, insan prostat kanseri hücre hattıdır. Aynı kanser türü olmakla birlikte farklı canlı gruplarında farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu çalışmada, oleuropeinin normoksik ve hipoksik koşullarda 150 µM konsantrasyonda PC-3 hücrelerine karşı toksik etki yapmadığı tespit edilmiştir.

4.3. Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etki

Normoksi ve hipoksi şartları altında oleuropeinin PC-3 insan prostat kanser hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkisini araştırmak üzere, hücre proliferasyonunu etkilemeyen ve hücrelere toksik etki yapmayan 150 µM konsantrasyonu 48 saat boyunca uygulanmış ve Bölüm 3.2.6.'da anlatılan şekilde yara iyileşme analizi yapılmıştır. Elde edilen verilerden hücrenin yanal yönde hareket ettiği mesafeyi ifade eden motilite indeksi (MoI) formül (3.1) ile hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan TTX ise 2 µM konsantrasyonda uygulanmıştır. Yapılan ön denemeler

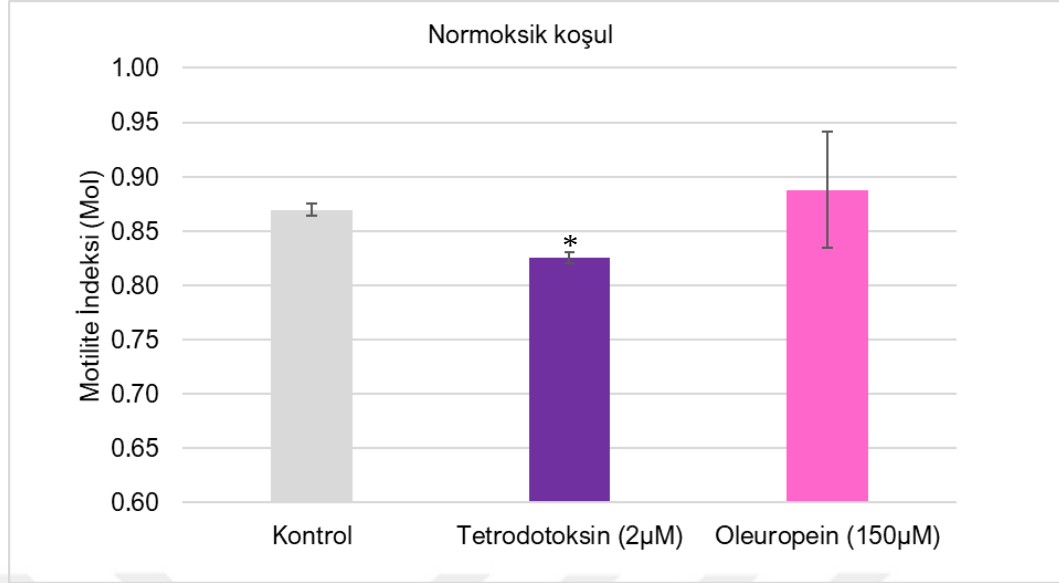
neticesinde TTX'in 2 µM konsantrasyonda optimum etkinliğe sahip olduğu saptandığından, bu konsantrasyon pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Madde uygulaması sonrasında yapılan migrasyon test sonuçlarına göre, normoksik şartlar altında uygulanan TTX'in PC-3 hücre hareketini baskılayarak, kontrol grubunda 0.87 ± 0.006 olan motilite indeksini %5.04 oranında anlamlı ($p < 0.05$) şekilde azalttığı tespit edilmiştir. Oleuropein uygulaması sonucunda ise motilite indeksi 0.89 ± 0.05 olarak ölçülmüş, ancak kontrol grubu ile aradaki farkın istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı ($p > 0.05$) belirlenmiştir. Elde edilen motilite indeksi değerleri Çizelge 4.3.'te verilmiştir. Veriler kullanılarak çizilen grafik ise Şekil 4.5.'te izlenmektedir.

Çizelge 4.3. PC-3 hücrelerinde normoksik ve hipoksik koşullarda oleuropein uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre oranları ($\pm$ standart hata)

Grup	Normoksik koşul		Hipoksik koşul	
	Motilite İndeksi (MoI)	Hareket mesafesindeki değişim (%)	Motilite İndeksi (MoI)	Hareket mesafesindeki değişim (%)
KONTROL	0.87 ± 0.006	-	0.70 ± 0.022	-
Tetrodotoksin (2 µM)	$0.83 \pm 0.005^*$	5.04 (↓)*	$0.65 \pm 0.019^*$	7.83 (↓)*
Oleuropein (150 µM)	0.89 ± 0.05	2.11 (↑)	0.72 ± 0.027	2.68 (↑)

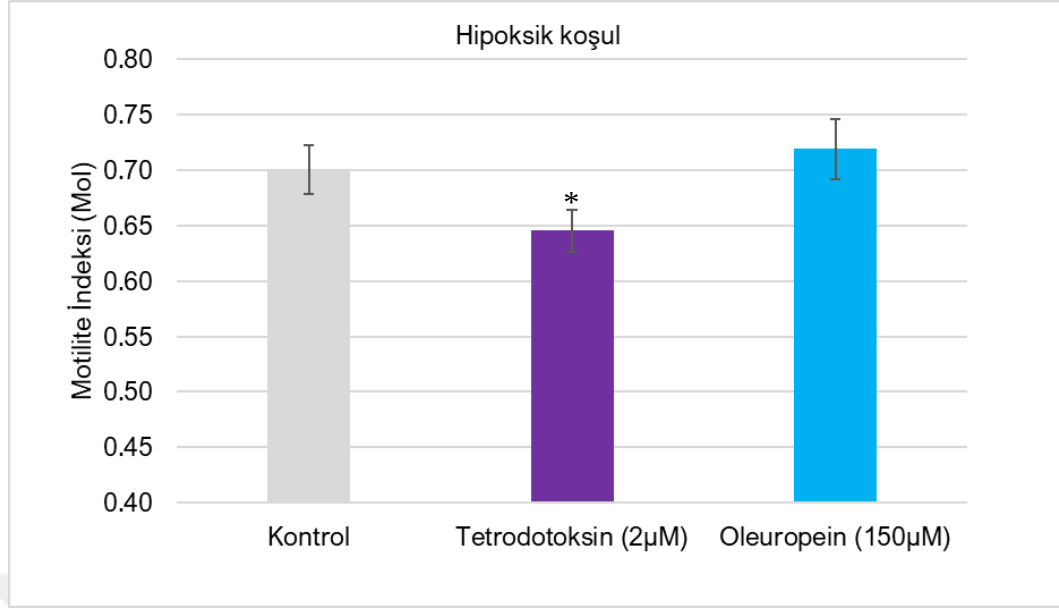
*: Kontrol grubuna göre istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p < 0.05$).



Şekil 4.5. PC-3 hücrelerinde normoksik koşullarda 150µM oleuropein uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksi (Mol) değerleri (± standart hata)

*: Kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p < 0.05$)

Yüksek metastatik PC-3 hücrelerine hipoksik koşullarda 48 saat oleuropein uygulaması sonucunda kontrol grubu motilite indeksi 0.70 ± 0.022 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3., Şekil 4.6.). Tetrodotoksinin (2 µM), hücre hareketini %7.83 oranında baskıladığı ve motilite indeksini 0.65 ± 0.019 'a düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu azalma istatistiksel bakımdan anlamlı ($p < 0.05$) bulunmuştur. Ancak oleuropeinin hipoksik koşullarda da hücrelerin yanal yöndeki hareket mesafesinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı ($p > 0.05$) ve motilite indeksinin 0.72 ± 0.027 olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.6. PC-3 hücrelerinde hipoksik koşullarda 150µM oleuropein uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksi (MoI) değerleri (± standart hata)

*: Kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p < 0.05$).

TTX'in hem normoksik hem de hipoksik koşullarda hücre hareketini kontrole göre anlamlı şekilde baskıladığı yönündeki bulgularımız, PC-3 hücrelerinin deneylerimiz sırasında VGSC'leri eksprese ettiğini göstermektedir. 150 µM oleuropein ise her iki oksijen koşulunda da benzer sonuçlar göstermiş ve hücre hareketinde anlamlı bir değişiklik meydana getirmemiştir.

Yapılan literatür incelemesinde oleuropeinin çeşitli kanser hücrelerinde migrasyon ve invazyonu azaltarak metastazı inhibe edebileceğine dair bulgulara rastlanmıştır. Hamdi ve Castellon (2005), oleuropeini normal ve kanser hücrelerine uygulamışlar ve bileşiğin kanser hücrelerinde aktin filamentlerini geri dönüşsüz olarak bozduğunu göstermişlerdir. Böylece, oleuropeinin kanser hücre invazyonunu engelleyebileceğini öne sürmüşlerdir (Hamdi ve Castellon, 2005). Bir çalışmada oleuropeinin TGF-β1 sinyal yolağına müdahale ederek baş ve boyunun skuamöz hücreli karsinomunun büyümesini ve metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir (Xu ve Liu, 2022). Başka bir araştırmacı grubu ise ER(-) MDA-MB-231 ile ER(+) MCF-7 ve T47D hücrelerine uygulanan oleuropeinin otofajiyi aktifleştirerek migrasyon ve invazyonu azalttığını bildirmişlerdir (Lu ve ark., 2019; Lu ve ark., 2021). U251 ve A172 glioma hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada oleuropeinin AKT sinyal

yolağını inhibe ederek tümör büyümesi ve invazyonu baskıladığı tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2016).

Bu çalışmaların genellikle normoksik koşullarda yapıldığı dikkati çekmektedir. Oleuropeinin VGSC'leri bloklayarak migrasyon ve invazyonun inhibe edebildiğine dair bir çalışma Gumushan Aktas ve Ayan (2021), tarafından yapılmıştır. Çalışmada, normoksik koşullarda uygulanan oleuropeinin MAT-LyLu sıçan prostat kanseri hücrelerinde VGSC'leri kodlayan SCN9A geninin ekspresyonunu baskılayarak migrasyon ve invazyonu azalttığı gösterilmiştir (Gumushan Aktas ve Ayan, 2021). Bu tez çalışmasında kullanılan insan prostat kanseri PC-3 hücreleri yüksek metastatiktir ve metastatik yetenekleri VGSC'ler ile ilişkilidir. Bu hücrelerde baskın şekilde eksprese edilen VGSC alt tipi Na_v1.6 olup SCN8A tarafından kodlanmaktadır (Shan ve ark., 2014). Deneylerimizde kullandığımız oleuropeinin PC-3 hücre çoğalmasını etkilemeyen ve toksik olmayan 150 µM konsantrasyonu hücrelerin yanal yöndeki hareketlerini etkilemediği tespit edilmiştir. Kanser türü aynı olmakla birlikte hücreler farklı kökenden gelmektedir: MAT-LyLu sıçan, PC-3 insan prostat kanseri hücresidir. Ayrıca bu hücrelerde farklı tipte VGSC ekspresyonu gerçekleşmektedir. Hücre orijin ve kanal alt tipi farklılıklarının sonuçlarımızın literatürden farklı olmasına neden olabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, voltaj kapılı sodyum kanallarını eksprese eden ve metastatik yeteneği bu kanallarla ilişkili olan yüksek metastatik özellikteki insan prostat kanseri PC-3 hücrelerine normoksik ve hipoksik koşullarda 48 saat boyunca oleuropein uygulamasının hücre hareketi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Deneylerden elde edilen veriler değerlendirilmiş ve aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

- Oleuropein, PC-3 hücre proliferasyonunu normoksik koşullarda 200 μ M; hipoksik koşullarda ise 300 μ M ve daha yüksek konsantrasyonlarda inhibe etmektedir.
- 150 μ M oleuropein normoksik ve hipoksik koşullarda PC-3 hücre proliferasyonunu etkilememektedir ve bu hücrelere toksik değildir.
- 150 μ M oleuropein, normoksi ve hipoksik PC-3 hücrelerinin yanal yöndeki hareketini etkilememiştir.

Elde edilen bulgular değerlendirilmiş ve oleuropeinin çalışılan konsantrasyonda ve uygulama süresinde insan prostat kanseri PC-3 hücrelerinin VGSC'lerle ilişkili hareketini etkilemediği görülmüştür. İleri çalışmalarda farklı konsantrasyon veya başka bileşiklerle kombinasyonların değerlendirilmesi faydalı olacaktır. Ayrıca oleuropeinin PC-3 hücre proliferasyonu üzerindeki inhibisyon aktivitesi değerlendirilerek etki mekanizması araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- ABATE SHEN, C.A. and SHEN, M.M., 2000. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev*;14(19);2410-34.
- ACQUAVIVA, R., DI GIACOMO, C., SORRENTI, V., GALVANO, F., SANTANGELO, R., CARDILE, V., GANGIA, S., D'ORAZIO, N., ABRAHAM, N.G. and VANELLA, L., 2012. Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *Int J Oncol*. Jul;41(1):31-8. doi: 10.3892/ijo.2012.1428
- ALOMONE LABS., 2022. <https://www.alomone.com/p/tetrodotoxin-citrate/T-550>. Erişim Tarihi: 14.12.2022.
- ALONSO, J., 2004. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Barcelona: Corpus, p: 822
- AMiot, M.J., FLEURITE, A. and MACHEIX, J.J., 1989. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry* . 28:67-69.
- APPERT-COLLIN, A., HUBERT, P., CREMAL, G. and BENNASROUNE, A., 2015. Role of ErbB receptors in cancer cell migration and invasion. *Front Pharmacol*. 6:283.
- ARORA, R., SCHMITT, D., KARANAM, B., TAN, M., YATES, C. and DEAN-COLOMB, W., 2015. Inhibition of the Warburg effect with a natural compound reveals a novel measurement for determining the metastatic potential of breast cancers. *Oncotarget*. 6(2): 662-78.
- AVNI, R., COHEN, B. and NEEMAN, M., 2011. Hypoxia stres and cancer Imaging the axis of evilin tumor metastasis. *NMR Biomed* ,24:569-582.
- BACAC, M. and STAMENKOVIC, I., 2008. Metastatic cancer cell. *Annu. Rev. Pathol*.3:221-247.
- BAHAR, E., and YOON, H., 2021. Modeling and Predicting the Cell Migration Properties from Scratch Wound Healing Assay on Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer Cell Lines Using Artificial Neural Network. *Healthcare*. 9(7): 911-924.
- BAYER, C. and VAUPEL, P., 2012. Acute versus chronic hypoxia in tumors: Controversial data concerning time frames and biological consequences. *Strahlenther Onkol*, 188(7):616–627.
- BENNETT, E.S., SMITH, B.A. and HARPER, J.M., 2004. Voltage-gated Na⁺ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Pflugers Arch-Eur Physiol*.447:908-914.
- BERGERS, G. and BENJAMIN, L.E., 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*. 3(6):401-410.
- BERRA, E., BENIZRI, E., GINOUVES, A., VOLMAT, V., ROUX, D., and POUYSSEGUR, J., 2003. HIF prolyhydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady state levels of HIF-1 α in normoxia. *Embo J* ,22:4082-4090.
- BERRA, E., MILANINI, J., RICHARD, D.E., LE GALL, M., VINALS, F. and GOTHIE, E., et al. , 2000. Signaling angiogenesis viap42-p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem pharmacol*, 60: 1171-8.
- BERRETTA, R. and MOSCATO, P., 2010. Cancer biomarker discovery: the entropic hallmark. *Plos ONE*. 5(8) : 1-44.
- BAYTOP, T.,1999. Türkiye’de bitkiler ile tedavi geçmişte ve bugün (2. Baskı) sayfa ;369. Nobel Tıp kitapevi İstanbul .

- BEZANILLA, F., 2000. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev.* 80:555-592.
- BIRNBAUMER, L., CAMPBELL, K.P., CATTERALL, W.A., HARPOLD, M.M., HOFMANN, F. and HORNE, W.A. et al. 1994. The naming of voltage gated calcium channels. *Neuron* .13(3):505-6.
- BLACK, J.A., CUMMINS, T.R., PLUMPTON, C., CHEN, Y.H., HORMUZDIAR, W., CLARE, J.J. and WAXMAN, S.G.,1999. Upregulation of a silent sodium channel after peripheral, but not central, nerve injury in DRG neurons. *J Neurophysiol* 82, 2776-2785.
- BLACK, J.L. and LENNON, V.A., 1999. Identification and cloning of putative human neuronal voltage gated calcium channel gamma-2 and gamma-3 subunits: neurologic implications. *Mayo Clin Proc.* 74:357-61.
- BOSSE, E., REGULLA, S., BIEL, M., RUTH, P., MEYER, H.E., FLOCKERZI, V., Et al. 1990. The cDNA and deduced amino acid sequence of the γ subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett.* 267(1):153-6.
- BOUAZIZ, M., HAMMAMI, H., BOUALLAGUI, Z., JEMAI, H. and SAYADI, S., 2008. Production of antioxidants from olive processing by products. *Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry.* 7(8): 3231-3236.
- BRACKENBURY, W.J. and ISOM, L.L., 2011. Na^+ channel β subunits: overachievers of the ion channel family. *Frontiers in pharmacology.*2:53.
- BRESLOW, L., 1977. A history of cancer. Control in the United States 1946-1971. Bethesda.
- BUCKLER, K.J. and VAUGHAN –JONES, R.D., 1994. Effects of hypoxia on membrane potential and intracellular calcium in rat neonatal carotid body type I cells. *J Physiol*, 476: 423–428.
- BULOTTA, S., CORRADINO, R., CELANO, M., D'AGOSTINO, M., MAIUOLO, J., OLIVERIO, M., PROCOPIO, A., IANNONE, M., ROTIROTI, D., and RUSSO, D., 2011. Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. *Food Chemistry*, 127: 1609-1614.
- CÁRDENO, A., SÁNCHEZ-HIDALGO, M., ROSILLO, M.A., ALARCÓN, DE LA LASTRA, C., 2013. Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1 α . *Nutr Cancer.* 65(1):147-56. doi: 10.1080/01635581.2013.741758.
- CARLUCCIO, M.A., SICULELLA, L., ANCORA, M.A., MASSARO, M., SCODITTI, E., STORELLI, C., VÍSIOLI, F., DISTANTE, A. and DE CATERÌNA, R., 2003. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 23:622–629.
- CATTERALL, W.A., 1984. The molecular basis of neuronal excitability. *Science* 223:653-661.
- CATTERALL, W.A. and CURTIS, B.M., 1987. Molecular properties of voltage sensitive calcium channels. *Soc. Gen Physiol*;47: 201-13.
- CATTERALL, W.A., CESTELE, S., YAROV-YAROVY, V., YU, F.H., KONOKI, K. and SCHEUER, T., 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 49, 124-141.

- CATTERALL, W.A., 2010. Ion Channel Voltage Sensors: Structure, Function, and Pathophysiology. *Neuron* 67, 915-928.
- CATTERALL, W.A., 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1;3(8):a003947.
- CESTELE, S. and CATTERALL W.A., 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82, 883-892.
- CHAFFER, C.L. and WEINBERG, R.A., 2011. A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* 331(6024):1559-1564.
- CHANG, F.C. and HOSEY, M.M., 1988. Dihydropyridine and phenylalkylamine receptors associated with cardiac and skeletal muscle calcium channels are structurally different. *J Biol Chem.* 263:18929-37.
- CHANG, L. and GOLDMAN, R.D., 2004. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5(8): 601-613.
- CHEUNG, K.J. and EWALD, A.J., 2014. Illuminating breast cancer invasion: diverse roles for cell-cell interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 30:99-111.
- CHRISTOFORI, G. and SEMB, H., 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends in biochemical sciences.* 24(2):73-76.
- CLARE, J.J., 2010. Targeting voltage-gated sodium channels for pain therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 19, 45-62.
- COLLET, G., LAMERANT FAYEL, N., TERTIL M. Et al., 2014. Hypoxia-regulated overexpression of soluble VEGFR2 controls angiogenesis and inhibits tumor growth. *Mol Cancer Ther.* 13(1):165-178.
- DEJEANS, N., MANIE, S., HETZ, C., et al., 2014. Addicted to secrete-novel concepts and targets in cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine.* 20 (5) :242-250.
- DIAZ-MORALLI, S., TARRADO-CASTELLARNAU, M., MIRANDA, A. and CASCANTE, M., 2013. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 138(2): 255-271.
- DIB-HAJJ, S.D., TYRRELL, L., BLACK, J.A. and WAXMAN, S.G., 1998. Na_v1, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 8963-8968.
- DING, Z., YANG, L., XIE, X., XIE, F., PAN, F., et al., 2010. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 136: 1697–1707
- DOERING, C. and ZAMPONI, G., 2006. Overview of voltage gated calcium channels. *s* 65.
- DOLPHIN, A., 1998. Mechanism of modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *J Physiol.* 506:3-11.
- DOMENE, C. and IIIINGWORTH, C.J.R., 2012. Effects of point mutations in pVHL on the binding of HIF-1 α . *Proteins*, 80:7333-746
- DONG, C.U. and SEMENZA, G.L., 1999. Oncogenic alterations of metabolism *Trends Biochem Sci*, 24: 68-72.
- DUKE, J. A., 1992. Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants. Boca Raton, FL. CRC Press.

- DVORAK, H.F., NAGY, J.A., FENG, D., BROWN, L.F. and DVORAK, A.M.,1999. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 237: 97-132.
- DVORAK, H.F.,2002. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 20(12): 4368-4380.
- ELAMIN, M. H., DAGHESTANI, M. H., OMER, S. A., ELOBEID, M. A., VIRK, P., AL-OLAYAN, E. M., HASSAN, Z. K., MOHAMMED, O. B., and ABOUSSEKHRA, A., 2013. Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells. *Food and Chemical Toxicology*, 53: 310-316.
- ELLIS, S.B., WILLIAMS, M.E., WAYS, N.R., BRENNER, R., SHARP, A.H., LEUNG A.T. et al. 1988. Sequence and expression of mRNAs encoding the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits of a DHP-Sensitive calcium channel. *Science* . 241:1661-4.
- ENGLAND, S., 2008. Voltage-gated sodium channels: the search for subtype-selective analgesics. *Expert Opin Investig Drugs* 17, 1849-1864.
- ESTI, M., CINQUENTO, L. and LA NOTTE, E.,1998. Phenolic compounds in different olive varieties. *J. Agric Food Chem.*, 46:32-35.
- FATT, P. and KATZ, B., 1953. The electrical properties of crustacean muscle fibers. *J. Physiol.*120,171-204.
- FERRARA, N., GERBER, H.P. and LECOUTER, J., 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.*9(6):669-76.
- FRASER, S.P., DISS, J.K.J., 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., BELLA, M.T., SLADE, M.J., TOLHURST, R., PALMIERI, C., JIANG, J., LATCHMAN, D.S., COOMBES, R.C. and DJAMGOZ M.B.A., 2005. Voltage –gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical Cancer Research.*11:5381-5389.
- FUKUDA, R., HIROTA, K., FAN, F., JUNG, YD., ELLIS, LM. and SEMENZA, GL., 2002. Insulin like growth factor 1 induces hypoxia inducible factor -1 mediated vascular endothelial growth factor expression which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3 kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* ,277: 38205-38211.
- FULGENZI, G., GRACIOTTI, L., FARONATO, M., SOLDOVIERI, M.V., MICELI, F., AMOROSOC, S., ANNUNZIATO, L., PROCOPIO, A. and TAGLIALATELA, M., 2006. Human neoplastic mesothelial cells Express voltage-gated sodium channels involved in cell motility. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 38:1146-1159.
- GAJEWSKI, T.F., SCHREIBER, H. and FU, Y.X., 2013. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunol.* 14:1014-22.
- GANDALOVICOVA, A., VOMASTEK, T., ROSEL, D. and BRABEK, J., 2016. Cell polarity signaling in the plasticity of cancer cell invasiveness. *Oncotarget* . 7214.

- GAO, R., WANG, J., SHEN, Y., LEI, M. and WANG, Z., 2009. Functional expression of voltage-gated sodium channels nav1.5 in human breast cancer cell line MDA-MB-231. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci.*29(1):64-67.
- GELLENS, M.E., GEORGE, AL, J.R., CHEN, L.Q., CHAHINE, M., HOM, R., BARCHI, R.L. and KALLEN, R.G., 1992. Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 554-558.
- GLOSMANN, H., STRIESSNIG, J., HYMEL, L. and SCHINDLER, H.,1987. Purified L-type calcium channels :only one single polypeptide ($\alpha 1$ -subunit) carries the drug receptor domains and is regulated by protein kinases. *Biomed Biochim Acta.*;46(8-9):351-6.
- GLOSSMANN, H. and STRIESSNIG, J.,1990. Molecular properties of calcium channels. *Rev. Physiol Biochem Pharmacol*;114:1-105.
- GODINHO, S.A. and PELLMAN, D., 2014. Causes and consequences of centrosome abnormalities in cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 369(1650): 1-13.
- GOLDIN, A.L., BARCHI, R.L., CALDWEE, J.H., HOFMANN, F., HOWE, J.R., HUNTER, J.C., KALLEN, R.G., MANDEL, G., MEISLER, M.H., NETTER, Y.B., NODA, M., TAMKUN, M.M., WAXMAN, S.G., WOOD, J.N. and CATTERALL, WA., 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28, 365-368.
- GRAF, F., KOEHLER, L., KNISS, T., WUEST, F., MOSCH, B. and PIETZSCH J., 2009. Cell cycle regulalating kinase Cdk4 as a potential target for tumor cell treatment and tumor imaging. *Joneol.* 2009:106378.
- GRANOT, Z. and FRIDLENDER, Z.G., 2015. Plasticity beyond cancer cells and the “immunosuppressive switch”. *Cancer Research.* 75(21): 4441-4445.
- GRIMES, J.A., FRASER, S.P., STEPHENS, G.J., DOWNING, J.E.G., LANIADO, M.E., FOSTER, C.S., ABEL, P.D. and DJAMGOZ, M.B.A., 1995. Differential expression of voltage-activied Na⁺ currents in two prostatic tomour cell lines: contribution to invasiveness in vitro, *FEBS Letters*, 369:290-294.
- GRIBKOFF, V.K., 2006. The role of voltage gated calcium channels in pain and nociception. *Semin Cell Dev Biol.* 17:555-64.
- GUMUSHAN AKTAS, H., AKGUN, T., 2018. Naringenin inhibits prostate cancer metastasis by blocking voltage-gated sodium channels. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106: 770-775.
- GUMUSHAN AKTAS, H., AYAN, H. Oleuropein: A Potential Inhibitor for Prostate Cancer Cell Motility by Blocking Voltage-Gated Sodium Channels. *Nutr Cancer.* 2021;73(9):1758-1767. doi: 10.1080/01635581.2020.1807575.
- HAMANAKA, R.B. and CHANDEL, N.S., 2012. Targeting glucose metabolism for cancer therapy. *J Exp. Med.* 209 (2): 211-5.
- HAMDI, H.K. and CASTELLON, R.,2005. Oleuropein a non-toxic olive iridoid is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 334(3): 769-78.
- HANAHAN, D. and WEINBERG, R.A., 2011. Hallmarks of cancer : the next generation. *Cell.* 144(5):646-674.
- HARBORNE, J. B., BAXTER, H., and MOSS, G. P. (eds.), 1999. *Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants.* CRC Press, 2nd edition. 976 pp.

- HE, Q., ZHANG, G., HOU, D., LENG, A., XU, M., PENG, J. and LIU, T., 2011. Overexpression of sorcin results in multidrug resistance in gastric cancer cells with up-regulation of P-gp. *Oncol Rep*, 25: 237–243.
- HENDERSON, A.R., 1969. Biochemistry of hypoxia: current concepts. I. An introduction to biochemical pathways and their control. *Br J Anaesth*. 41: 245–250.
- HERNANDEZ-PLATA, E., ORTIZ, C.S., MARQUINIA-CASTILLO, B., MEDINA-MARTINEZ, I., ALFARO, I., BERUMEN, J., RIVERA, M. and GOMORA, J.C., 2011. Over expression of Nav1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *Inter Jour of Cancer*. Doi:10.1002/ijc.26210.
- HILLE, B., 2001. Ionic channels of excitable membranes (third edition). Sinauer Associates Inc., Sunderland (Massachusetts), USA.
- HOCKEL, M. and VAUPEL, P., 2001. Tumor hypoxia definitions and current clinical biologic and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*, 93: 266-276.
- HODGKIN, A.L. and HUXLEY, A.F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol* . 117(4): 500-544.
- HOEBEN, A., LANDUYT, B., HIGHLEY, M.S., WILDIERS, H., VAN OOSTEROM, A.T. and DE BRUIJN, E.A., 2004. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*. 56(4): 549-580.
- HOUMAN, K., GERALD, W.Z., 2006. Voltage –gated calcium channels and idiopathic generalized epilepsies. *Physiol Rev*. 86:941-66.
- HOUSE, C.D., VASKE, C.D., SCHWARTZ, A.M, OBIAS, V., FRANK, B., LUU, T., SARVAZYAN, N., IRBY, R., STRAUSBERG, R.L., HALES, T.G., STUART, J.M. and LEE, N.H., 2010. Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res*. 70(17): 6957-6967.
- HSIAO, PC., CHAN, MK., SU, SC., UENG, KC., CHEN, YC., HSIEH, YH., LIU, YF., TSAI, HT. and YANG, SY., 2010. Hypoxia inducible factor -1 α gene polymorphism G1790A and its interaction with tobacco and alcohol consumptions increase susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Journal of Surgical onc* ,102:163-169.
- HU, C.J., WANG, L.Y., CHODOSH, L.A., KEITH, B., SIMON, M.C., 2003. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 23: 9361– 9374.
- HUANY, L. and FU, L., 2015. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta. Pharm. Sin. B*. 5 (5) : 390-401.
- HUNTER, K.W., CRAWFORD, N.P. and ALSARRAJ, J., 2008. Mechanisms of metastasis, *Breast Cancer Research*. 10,1:S2.
- HUPP, T.R., HAYWORD, RC. and VOJTOSEK B., 2012. Strategies for p53 reactivation in human sarcoma. *Cancer Cell*, 22(3):283-5.
- IARC, 2020. Cancer today. [online], <http://gco.iarc.fr/today/home>. [Ziyaret tarihi: 10 Ocak 2019].
- IGNEY, F.H. and KRAMMER, P.H., 2002. Death and anti-death: Tumor resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*. 2(4) : 277-288.
- ILLINGWORTH, C.J., LOENARZ, C., SCHOFIELD, C.J. and DOMENE, C. 2010. Chemical basis for the selectivity of the von Hippel Lindau tumor suppressor

- pVHL for prolyl-hydroxylated HIF-1 α . *Biochemistry*, 49(32):6936-44. doi: 10.1021/bi100358t.
- ISOM, L.L., DE JONGH, K.S., PATTON, D.E., REBER, B.F., OFFORD, J., CHARBONNEAU, H., WALSH, K., GOLDIN, A.L. and CATTERALL, W.A. 1992. Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science*. 256(5058):839-42. doi: 10.1126/science.1375395.
- ISOM, L.L., DE JONGH, K.S. and CATTERALL, W.A., 1994. Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron*.12(6):1183–1194.
- ISOM, L.L., RAGSDALE, D.S., DE JONGH, K.S., WESTENBROEK, R.E., REBER, B.F., SCHEUER, T. and CATTERALL, W.A., 1995. Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* 83, 433-442.
- JAAKKOLA, P., MOLE, DR., TIAN, YM., WILSON, MI., GIELBERT, J., GASKELL, SJ., VON KRIEGSHEIM, A., HEBESTREIT, H.F., MUKHERJI, M., SCHOFIELD, C.J., MAXWELL, P.H., PUGH, C.W. and RATCLIFFE, P.J. , 2001. Targeting of HIF- α to the von hippel lindau ubiquitylation complex by O2 regulated prolylhydroxylation. *Science*, 292(5516): 468-72.
- JANIS, R.A., SHRIKHANDE, A.V., MCCARTHY, R.T., HOWARD, A.D., GREGUSKI, R. and SRIABINE, A., 1988. Isolation and characterization of a fraction from brain that inhibits 1,4-[3h] dihydroopyridine binding and L-type calcium channel current. *FEBS Lett.* 239:233-6.
- JAPON- LUJAN, R., LUQUE-RODRIGUEZ, J.M. and LUQUE DE CASTRO, M.,2006. Dynamic ultrasoundassisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J. Chromatograhty A. Cilt 1108, sayı 1, sayfa 76-82.*
- JESSICA IORIO., GIULIA PETRONI., CLAUDIA DURANTI. and ELENA LASTRAIOLI. ,2019.Potassium and Sodium Channels and the Warburg Effect: Biophysical Regulation of Cancer Metabolism. *BIOELECTRICITY* Volume 1, Number 3. Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence, Florence, Italy.
- KALLURI, R. and WEINBERG, R.A. 2009. The basics of epithelial–mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119: 1420–1428.
- KARPOZILOS, A. and PAVLIDIS, N., 2004. The treatment of cancer in Greek antiquity. *European Journal of Cancer*. 40(14):2033-2040.
- KARPOZILOS, A. and PAVLIDIS, N.,2004. The treatment of cancer in Greek antiquity. *European Journal of Cancer*. 40(14):2033-2040.
- KERR, J.F., WYLLIC, A.H. and CURRIE, A.R., 1972. Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J. Cancer*. 26(4):239-257.
- KIERANS, S.J., TAYLOR, C.T., 2021. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J Physiol*, 599: 23-37.
- KIM, J.W., TCHERNYSHYOV, I., SEMENZA, G.L. and DANG, C.V., 2006. HIF-1 mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3(3): 177-85.

- KLUGBAUER, N., LACINOVA, L., MARAIS, E., HOBOM, M. and HOFMANN, F.,1999. Molecular diversity of the calcium channel alpha 2 delta subunit. *J Neurosci.*19;684-91.
- KOH, MY. and POWIS, G., 2012. Possing the button the HIF switch. *Trends in Biochemical Sciences* ,37(9): 364-72.
- KRANER, S., YANG, J. and BARCHI, R.,1989. Structural inferences for the native skeletal muscle sodium channel as derived from patterns of endogenous proteolysis. *J Biol Chem* 264, 13273-13280.
- LANDIS, M.W., PAWLYK, B.S., LI, T., SICINSKI, P. and HINDS, P.W., 2006. Cyclin D1- dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer Cell.* 9 (1) :13-22.
- LANIADO, M.E., LALANI, E.N., FRASER, S.P., GRIMES, J.A., BHANGAL, G., DJAMGOZ, M.B. and ABEL, P.D., 1997. Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contrubition to invasion in vitro. *Am J Pathol.*150(4):1213-1221.
- LAUGHNER, E., TAGHAVI, P., CHILES, K., MOHAN, P.C. and SEMENZA, G.L., 2001. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 21:3995–4004
- LEITINGER, B. and HOHENESTER, E., 2007. Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol.* 26:146-155.
- LEVENTAL, K.P., YU, H. and KASS, L., ve ark., 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* .139:891-906.
- LEVINE, A.J. and KUTER, A.M., 2010. The control of the metabolic switch in cancer by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science*, 330:1340-4.
- LİMAN, R., ÇOBAN, F., CİĞERCİ, İ., BULDUK, İ. ve BOZKURT, S., 2017 “Antiangiogenic and Apoptotic Effects of Oleuropein on Breast Cancer Cells”, *Journal of Pharmaceutical Research International*, 16(4), pp. 1-10. doi: 10.9734/BJPR/2017/33403.
- LIU, L., AHN, K.S., SHANMUGAM, M.K., WANG, H., SHEN, H., ARFUSO, F., ... TANG, F. R. (2019). Oleuropein induces apoptosis via abrogating NF-κB activation cascade in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(3): 4504-4513. doi:10.1002/jcb.27738
- LIU, M., WANG, J., HUANG, B., CHEN, A., and Lİ, X. 2016. Oleuropein inhibits the proliferation and invasion of glioma cells via suppression of the AKT signaling pathway. *Oncology Reports*, 36, 2009-2016. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4978>
- LIU, W., SHEN, SM., ZHAO, X.Y. and CHEN, G.Q., 2012. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor -1 . *Int J Biochem Mol Biol*, 3(2):165-78.
- LIU, Y., SANOFF, H.K., CHO, H. et al.,2009. Expression of p16INK4a in peripherol blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell.* 8(4) :439 -448.
- LLINAS, R., SUGIMORI, J.W. and CHERKSEY, B., 1989. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel –web spider poison. *Proc Natl Acad Sci. USA.*86:1689-93.

- LLINAS, R., SUGIMORI, M., HILLMAN, D.E. and CHERKSEY, B., 1992. Distribution and functional significance of the P-type, voltage- dependent Ca²⁺ channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci.* 15:351-5.
- LOPEZ –BARNEO, J., LOPEZ –LOPEZ, J.R., URENA, J. and GONZALEZ, C., 1988. Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science*, 241: 580–582.
- LU, H.Y., ZHU, J.S., ZHANG, Z., SHEN, W.J., JIANG, S., LONG, Y.F., WU, B., DING, T., HUAN, F. and WANG, S.L., 2019. Hydroxytyrosol and Oleuropein Inhibit Migration and Invasion of MDA-MB-231 Triple-Negative Breast Cancer Cell via Induction of Autophagy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 19(16):1983-1990.
- LU, H.Y., ZHU, J.S., XIE, J., ZHANG, Z., ZHU, J., JIANG, S., SHEN, W.J., WU, B., DING, T. and WANG, S.L., 2021. Hydroxytyrosol and Oleuropein Inhibit Migration and Invasion via Induction of Autophagy in ER-Positive Breast Cancer Cell Lines (MCF7 and T47D), *Nutrition and Cancer*, 73:2, 350-360, DOI: 10.1080/01635581.2020.1750661
- LU, P., WEAVER, V.M. and WERB, Z., 2012. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* 196:395-406.
- MALUMBRES, M., 2011. Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol Rev.* 91(3): 973-1007.
- MANTEGAZZA, M., CURIA, G., BIAGINI, G., RAGSDALE, D.S. and AVOLI, M. 2010. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol* 9, 413-424.
- MANTOVANI, A., ALLEVNA, P., SICA, A. and BALKWILL, F., 2008. Cancer related inflammation *Nature*. 454: 436-44.
- MAO, L., LEE, D.J., TOCKMAN, M.S., EROZAN, Y.S., ASKIN, F. and SIDRANSKY, D., 1994. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(21): 9871-9875.
- MASOUD, G.N., LI, W., 2015. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5):378-389
- MELILLO, G., MUSSO, T., SICA, A., TAYLOR, L.S., COX, G.W. and VARESI, L., 1995. A hypoxia responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med*, 182: 1683-93.
- MENENDEZ, J.A., VAZQUEZ-MARTIN, A., COLOMER, R., BRUNET, J., CARRASCO-PANCORBO, A., GARCIA-VILLALBA, R., FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. and SEGURA-CARRETERO, A., 2007. Olive oils bitter principle reverses acquired auto resistance to trastuzumab (Herceptin) in HER2. Overexpressing breast cancer cells. *BMC cancer* . 7:80.
- MOKHTAR, N.F., 2011. Pharmacological studies of voltage-gated sodium channel expression in human breast cancer cells: Control of metastatic cell behaviours. PhD. Thesis, Imperial College London.
- MONTORO, R.J., URENA, J., FERNANDEZ –CHACON, R., ALVAREZ, D.E., TOLEDO, G. and LOPEZ –BARNEO, J., 1996. Oxygen sensing by ion channels and chemotransduction in single glomus cells. *J Gen Physiol*, 107: 133–143.

- MORGAN, K., STEVENS, E.B., SHAH, B., COX, P.J., DIXON, A.K., LEE, K., PINNOCK, R.D., HUGHES, J., RICHARDSON, P.J. and MIZUGUCHI, K., 2000. $\beta 3$: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(5):2308–2313.
- MUZ, B., DE LA PUENTE, P., AZAB, F., LUDERER, M. and AZAB, A.K., 2014. The role of hypoxia and exploitation of the hypoxic environment in hematologic malignancies. *Mol Cancer Res*, 12(10):1347–1354.
- MYLONIS, I., CHACHAMI, G., SAMIOTAKI, M., PANAYOTOU, G., PARASKEVA, E., KALOUSHI, A., GEORGATSAU, E., BONANOOU, S. and SIMOS, G., 2006. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem* 281:33095–33106
- NAKAJIMA, T., KUBOTA, N., TSUTSUMI, T., OGURI, A., IMUTA, H., JO, T., OONUMA, H., SOMA, M., MEGURO, K., TAKANO, H., NAGASE, T. and NAGATA, T., 2009. Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells. *Br J Pharmacol*. 156(3): 420-431.
- NANDANA, S. and CHUNG, L. W. K., 2014. Prostate cancer progression and metastasis: potential regulatory pathways for therapeutic targeting. *Am J Clin Exp Urol.*, 2(2): 92-101.
- NAGY, M.A., 2011. HIF-1 is the commander of gateways to cancer. *J cancer Science Ther*, 3(2): 35-40.
- NOTARNICOLA, M., PISANTI, S., TUTINO, V. et al. 2011. Effects of olive oil polyphenols on fatty acid synthase gene expression and activity in human colorectal cancer cells. *Genes Nutr* 6, 63–69 <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0177-7>
- OMAR, S.H., 2010. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm*. 78(2):133-54.
- ONGANER, P.U. and DJAMGOZ, M.B.A., 2005. Small-cell lung cancer (human): Potentiation of endocytic membrane activity by voltage gated Na⁺ channel expression in vitro. *Journal of Membrane Biology*. 204:67-75.
- ONKAL, R., DJAMGOZ, M.B.A., 2009. Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: Clinical potential of neonatal Nav1.5 in breast cancer. *European Journal of Pharmacology*, 625(1–3): 206-219.
- OURWORLDINDATA, 2018, <https://ourworldindata.org/causes-of-death>, Erişim Tarihi:01.11.2022
- OWEN, R.W., GIACOSA A., HULL, W.E., HAUBNER R., WURTELE G., SPIEGELHALDER B. and BARTSCH H., 2000. Olive oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet. Oncol*. 21:107–112.
- PAGE, EL., ROBITAILLE, GA., POUYSSEGUR, J. and RICHARD, D.E., 2002. Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem*, 277:48403–48409
- PAPAZIAN, D.M., et al., 1987. Cloning of genomic and complementary DNA from shaker a putative potassium channel gene from drosophila. *Science* . 237: 749-753.

- PASTEUR, L., 1861. Expériences et vues nouvelles sur la nature des fermentations. C R Acad Sci 52, 1260– 1264.
- PEDERSEN, S.F. and STOCK, C., 2013. Ion channels and transporters in cancer: Pathophysiology, regulation, and clinical potential. *Cancer Res*, 73:1658–1661.
- PEREZ-REYES, E., 2003. Molecular physiology of low voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev*. 83(1):117-61.
- PIENTA, K.J. and ESPER, P.S., 1993. Risk factors for prostate cancer. *Ann Intern Med*. 118(10):793-803.
- PLUMMER, N.W. and MEISLER, M.H., 1999. Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics* 57, 323-331.
- PROVENZANO, P., INMAN, D.R., ELICEIRI K.W., ve ark., 2008. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC. Med.* 6:11.
- RAGSDALE, D.S., MCPHEE, J.C., SCHEUER, T. and CATTERALL, W.A., 1994. Molecular determinants of state dependent block of sodium channels by local anesthetics. *Science* 265, 1724-1728.
- RAINA, B., 1995. Olive in handbook of fruit science and technology. CKC Press p.481-490.
- RANE, S.G., HOLZ, G.G. and DUNLAP, K., 1987. Dihydropyridine inhibition of neuronal calcium current and substance P release. *Pflugers Arch.* 409(4-5):361-6.
- REUTER, H., 1967. The dependence of slow inward current in purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration. *J Physiol.* 192:479-92.
- RICHARD, D.E., BERRA, E., GOTHIE, E., ROUX, D. and POUYSSEGUR J., 1999. p42/p44 mitogenactivated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem.* 274:32631–32637
- RISHMAWI, S., HADDAD, F., DOKMAK, G., KARAMAN, R., 2022. A Comprehensive Review on the Anti-Cancer Effects of Oleuropein. *Life.* 12:1140.
- RIZANER, N., 2010. Studies of ionic mechanisms in model cell lines of prostate cancer. PhD. Thesis. Imperial College London.
- ROGER, S., BESSON, P. and GUENNEC, J., 2003. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1616:107-111.
- ROGER, S., ROLLIN, J., BARASCU, A., BESSON, P., RAYNAL, P., IOCHMAN, S., LEI, M., BOUGNOUX, P., GRUEL, Y. and LU GUENNEC, J.Y., 2007. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *Internnatioal Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39:774-786.
- ROWLEY, J.D., 2001. Chromosome translocations dangerous liaisons revisited. *Nature Reviews Cancer.* 1(3): 245-250.
- RYAN, D., ROBARDS, K. and LAVEE, S., 1999. Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science Technology.* 34(3):265-274.
- SANG, N., STIEHL, DP., BOHENSKY, J., LESHCHINSKY, I., SRINIVAS, V. and CARO, J., 2003. MAPK signaling upregulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem,* 278:14013–14019

- SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, 2022. <https://www.scbt.com/p/oleuropein-32619-42-4?requestFrom=search>, Erişim Tarihi: 14.12.2022
- SEMENZA, G.L., 2000. HIF-1 mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiological*, 88:1474-80.
- SEMENZA, G.L., 2002. HIF- 1 and tumor progression pathophysiology and therapeutics . *Trends Mol Med*, 8: 62-7.
- SEMENZA, G.L., 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* ,3: 721-32.
- SEMENZA, G.L., 2010. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*, 29(5):625–634.
- SEMENZA, G.L., 2011. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med* 365, 537– 547.
- SHAN, B., DONG, M., TANG, H., WANG, N., ZHANG, J., YAN, C., JIAO, X., ZHANG, H. and WANG, C., 2014. Voltage-gated sodium channels were differentially expressed in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia and prostate cancer cells. *Oncology Letters*, 8: 345-350.
- SHAY, J.W. and BACCCHETTI, S., 1997. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 33(5): 787-791.
- SHIMODA, L.A., POLAK, J., 2011. Hypoxia. 4. Hypoxia and ion channel function. *Am J Physiol Cell Physiol*. 300(5):C951-67.
- SİDDİQA, A., CAVAZOS, D. and MARCINIAK R., 2006. Targeting telomerase. *Rejuvenation Res*. 9(3) :378-390.
- SOLER-RIVAS, C., ESPIN, J.C. and WICHES, H.J., 2000. Oleuropein and related compounds. *J Sci. Food Agric*. 80:1013-1023.
- STRATMAN, A.N., MALOTTE, K.M., MAHAN, R.D., DAVIS, M.J. and DAVIS, G.E., 2009. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood* . 114:5091-5101.
- SUDHAKAR, A., 2009. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*. 1(2):1-4.
- SWARTZ, KJ., 2008. Sensing voltage across lipid membranes. *Nature* 456, 891-897.
- TETSU, O. and MCCORMICK, F., 2003. Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer Cell* . 3(3) :233-245.
- THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2022. <https://www.thermofisher.com/tr/>. Erişim Tarihi: 03.03.2022
- THIERY, J.P., ACLOQUE, H., HUANG, YJ. and NIETO, M.A., 2009. Epithelial – mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* .139:871-890.
- TOLEDO-ARAL, J.J., MOSS, B.L., HE, Z.J., KOSZOWSKI, A.G., WHISENAND, T., LEVINSON, S.R., WOLF, J.J., SILOS-SANTIAGO, I., HALEGOUA, S. and MANDEL, G., 1997. Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 1527-1532.
- TRIGGLE, D.J., GOPALAKRISHNAN, M., RAMPE, D., and ZHENG, W., 2006. *Voltage-Gated Ion Channels as Drug Targets*. 479pp. Wiley/VCH, Weinheim, Germany. ISBN 3-527-31258-7
- TRIMMER, J.S. and RHODES, K.J., 2004. Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu Rev Physiol* 66, 477-519
- TRIPOLI, E., GIAMMANCO, M., TABACCHI, G., DI MAJO D., GIAMMANCO S. and LA GURDIA, M.,. 2005. The phenolic composition of olive oil: structure,

- biological activity, and beneficial effects on human health. *Nutr. Res. Rev.* 18:98–112.
- TSIEN, R.W., ELLINOR, P.T. and HORNE, W.A., 1991. Molecular diversity of voltage dependent Ca^{2+} channels. *Trends pharmacol. Sci.* 12(9):349-354.
- TSIEN, R.W., FOX, A.P., HESS, P., MCCLESKEY, E.W., NILIUS, B., NOWYCKY M.C. et al. 1987. Multiple types of calcium channel in excitable cells. *Soc. Gen Physiol.* 41:167-87.
- VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico- Biological Interactions.* 160 (1) :1-40.
- VANHARANTA, S. and MASSAGUE, J., 2013. Origins of metastatic traits. *Cancer Cell.* 24(4):410-421.
- VAUPEL, P. and HARRISON, L., 2004. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist*, 9(Suppl 5):4–9.
- VISIOLI, F., BELLOSTA, S. and GALLI, C., 1998. Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci.* 62:541-546.
- VISIOLI, F., POLI, A. and GALLI, C., 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.* 22:65–75.
- WANG, G.L., JIANG, B.H., RUE, E.A., SEMENZA, G.L., 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O_2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5510– 5514.
- WARBURG, O., 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269–270.
- WAXMAN, S.G., KOCSIS, J.D. and BLACK, J.A., 1994. Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol* 72, 466-470.
- WENGER, R.H., 2002. Cellular adaptation to hypoxia O_2 sensing protein hydroxylases hypoxia inducible transcription factors and O_2 regulated gene expression. *Faseb J*, 16: 1151-62.
- WHITAKER, W.R., FAULL, R.L., WALDVOGEL, H.J., PLUMPTON, C.J., EMSON, P.C. and CLARE, J.J., 2001. Comparative distribution of voltage-gated sodium channel proteins in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 88, 37-53.
- WILLIAMS, M.E., BRUST, P.F., FELDMAN, D.H., PATTHI, S., SIMERSONS, MAROUFI, A. et al. 1992. Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science* 257:389-95.
- WINKELHAUSEN, E., POSPIECH, R. and LAUFENBERG, G., 2015. Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. *Bull. Chem. Techn. Macedonia* . 24(1): 41-46.
- WOLFF, A.C., HAMMOND, E., HICKS, D., et al., 2014. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer American society of clinical oncology / college of American pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med.* 138 (2) :241-56.
- WU, C.P., CALCAGNO, A.M. and AMBUDKAR, S.V., 2008. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. *Curr Mol Pharmacol*, 1: 93–105.

- XIAN, X., GOPAL, S., COUCHMAN, J.R., 2010. Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell Tissue Res.*339:31-46.
- XU, T. and LIU, X. 2022. Oleuropein inhibits invasion of squamous cell carcinoma of the head and neck through TGF- β 1 signaling pathway. *BMC Cancer.* 1;22(1):942. doi: 10.1186/s12885-022-09979-2.
- YOUSEF, M.F., OMAR, A.H., MORSY, M.D., ABD EL-WAHED, M.M., GHANAYEM, N.M.,2005. The mechanism of action of calcium channel blockers in the treatment of diabetic nephropathy. *Int J Diabetes Metab.*13:76-82.
- YU, F.H., WESTENBROEK, R.E., SILOS –SANTIAGO, I., MCCORMICK, K.A., LAWSON, D., GE, P., FERRIERA, H., LILLY, J., DISTEFANO, P.S. and CATTERALL, W.A.,2003. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience.*23(20):7577–7585.
- ZHONG, H., CHILES, K., FELDSE, D., LAUGHNER, E., HANRAHAN, C., GEORGESCU, M.M., SIMONS, J.W. and SEMENZA, G.L., 2000.Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res,* 60:1541–1545
- ZUNDEL, W., SCHINDLER, C., HAAS-KOGAN, D., KOONG, A., KAPER, F., CHEN, E., GOTTSCHALK, A.R., RYAN, H.E., JOHNSON, R.S., JEFFERSON, A.B., STOKOE, D. and GIACCIA, A.J. , 2000. Loss of PTEN facilitates HIF -1 mediated gene expression . *Genes Dev,* 14: 391-6.

