

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

RANOLAZİNE VE FLECAİNİDE'İN ÜÇLÜ NEGATİF
MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
ANTİ-METASTATİK ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Meltem DEMİREL
1102060023

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seyhan ALTUN

EKİM 2023

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

RANOLAZİNE VE FLECAİNİDE'İN ÜÇLÜ NEGATİF
MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
ANTİ-METASTATİK ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Meltem DEMİREL
1102060023

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seyhan ALTUN

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Engin KAPTAN

Dr. Öğr. Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ

EKİM 2023

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca tecrübesini ve bilgi birikimini benden asla esirgemeyen, hiç tereddüt etmeden danışmanlığımı üstlenip beni her zaman motive eden ve cesaretlendiren danışmanım Prof. Dr. Seyhan ALTUN'a,

Yardımları için yüksek lisans arkadaşlarıma,

Bana olan inançlarını hiçbir zaman yitirmeyen ve bu zorlu süreci atlatmamı sağlayan kıymetli aileme teşekkür ederim.

Ekim, 2023

Meltem DEMİREL

Bu çalışma BAP-2204 ile T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi tarafından desteklenmiştir

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ	x
KISALTMALAR	xi
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. KANSER	5
2.2. KANSERİN SINIFLANDIRMASI.....	7
2.2.1. Karsinomalar	8
2.2.2. Sarkomalar	8
2.2.3. Lenfomalar	8
2.3. KANSERİN EPİDEMİYOLOJİSİ.....	9
2.4. MEME KANSERİ.....	12
2.4.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi.....	13

2.4.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri	15
2.4.3. Meme Kanserinin Sınıflandırması	21
2.4.4. Prognostik Biyobelirteçler	27
2.4.5. Meme Kanseri Hücre Soyları.....	32
2.5. METASTAZ	36
2.6. İYON KANALLARI.....	38
2.6.1. Kanalopati.....	41
2.7. VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALLARI	42
2.7.1. VGSC'lerin Yapısı ve İşlevi	43
2.7.2. VGSC ve Kanser	46
2.7.3. VGSC İyon Kanal Blokerleri.....	47
2.8. RANOLAZİNE.....	49
2.9. FLECAİNİDE.....	51
3. MATERYAL VE METOD	54
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	54
3.2. FARMAKOLOJİK AJANLAR	54
3.2.1. Ranolazine (RNL)	54
3.2.2. Flecainide (FLC)	54
3.2.3. Tetrodotoksin (TTX).....	54
3.3. HÜCREDE BÜYÜME	55
3.4. TOKSİSİTE	55
3.5. HÜCRE PROLİFERASYONU.....	56
3.6. KOLONİ OLUŞUMU	56
3.7. LATERAL HÜCRE HAREKETİ (MİGRASYON=MOTİLİTE)	57
3.8. TRANSVERS HAREKET	57

3.9. WESTERN BLOT ANALİZİ	58
3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	59
4. BULGULAR	60
4.1. HÜCRELERDE BÜYÜME	60
4.2. TOKSİSİTE	62
4.3. HÜCRE PROLİFERASYONU	64
4.4. KOLONİ OLUŞUMU	68
4.5. MİGRASYON (MOTİLİTE)	71
4.6. TRANSVERS HAREKET	76
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	81
KAYNAKÇA	89

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Kanserin özellikleri.....	6
Şekil 2.2.	2020 yılı için Dünya'daki tahmini kanser vaka sayısı (GLOBOCAN).....	10
Şekil 2.3.	2020 yılı için Türkiye'deki tahmini kanser vaka sayısı (GLOBOCAN)...	10
Şekil 2.4.	2020 yılı ülke bazlı kanser mortalitesi (GLOBOCAN).....	11
Şekil 2.5.	2020 yılı Dünya'da yaşa göre standardize edilmiş tahmini kanser insidans ve ölüm oranları (GLOBOCAN).	11
Şekil 2.6.	Farklı meme kanseri türleri (Scientia.global)	13
Şekil 2.7.	2020'de tahmin yaşa göre standardize edilmiş ülke bazlı en yüksek kanser insidans oranları, her iki cinsiyet, her yaştan (NMSC hariç) (GLOBOCAN, 2020).	14
Şekil 2.8.	2020 yılı Dünya'da ve Türkiye'de yaşa göre standardize edilmiş tahmini kanser insidans ve ölüm oranları (GLOBOCAN, 2020).....	14
Şekil 2.9.	Meme Kanserinin histolojik ve moleküler sınıflandırması (Ross vd., 2008).	22
Şekil 2.10.	Luminal Benzeri İnvazif meme kanseri histolojisi (Erber &Hartmann, 2020). A: Hematoksilen-eosin boyama (H&E) 100x. B: (H&E) 400x. C: ER immünohistokimyası 200x. D: Glikojen birikimine bağlı, ağırlıklı olarak berrak sitoplazmaya sahip IBC'nin glikojen açısından zengin şeffaf hücre modeli) (H&E) 400x. E ve F: Bol ve vakuollü sitoplazmalı sebasöz hücrelerin tipik özelliklerine sahip IBC'nin sebasöz modeli 100x ve 400x.	24
Şekil 2.11.	HER2 pozitif hücre (drozdogan.com).....	25
Şekil 2.12.	Claudin-low türü meme kanserinin gelişim aşamaları (Pommier et al., 2020).	27
Şekil 2.13.	Kültür ortamında MDA-MB-231 hücreleri.	35
Şekil 2.14.	Kültür ortamında MCF-7 hücreleri.....	36
Şekil 2.15.	Metastaz oluşum basamakları (Özkara vd., 2020).....	37
Şekil 2.16.	İyon kanalı türleri (www.shutterstock.com).....	39
Şekil 2.17.	Aksiyon potansiyeli (Knapp,2020).....	40

Şekil 2.18. Bir nöronun aksonunda meydana gelen aksiyon potansiyeli (Bean, 2007).	40
Şekil 2.19. Voltaj kapılı sodyum kanalının temel görünüşü, aktivasyon ve inaktivasyon durumu (Thornber & Shaw, 1977).	43
Şekil 2.20. Voltaj kapılı sodyum kanalının yapısı (Mao vd., 2019).	44
Şekil 2.21. Ranolazine'in kimyasal yapısı (Patil vd., 2014).	49
Şekil 2.22. RNL'nin etki mekanizması	50
Şekil 2.23. Flecainide'in kimyasal yapısı (Jiang et al., 2020).	51
Şekil 2.24. rNaV1.5C ve Flecainide kompleksinin Cryo-EM yapısı (Jiang et al., 2020).	52
Şekil 4.1. Üçlü negatif meme kanseri MDA-MB-231 hücre hattının zamana bağlı büyümesi.	61
Şekil 4.2. Üçlü negatif meme kanseri MCF-7 hücre hattının zamana bağlı büyümesi	62
Şekil 4.3. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerinde RNL toksisitesi ($\pm$ SE).	63
Şekil 4.4. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerinde FLC toksisitesi ($\pm$ SE).	64
Şekil 4.5. RNL'nin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi ($\pm$ SE).	65
Şekil 4.6. RNL'nin MCF-7 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi ($\pm$ SE).	66
Şekil 4.7. FLC'nin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi ($\pm$ SE).	67
Şekil 4.8. FLC'nin MCF-7 hücreleri üzerindeki zamana bağlı anti-proliferatif etkisi ($\pm$ SE).	67
Şekil 4.9. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin koloni sayıları üzerine RNL etkisi (* $P<0.05$).	69
Şekil 4.10. MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşumu üzerine RNL ve FLC'nin etkisi (4x).	69
Şekil 4.11. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin koloni sayıları üzerine FLC etkisi (* $P<0.05$).	70
Şekil 4.12. MCF-7 hücrelerinin koloni oluşumu üzerine RNL ve FLC'nin etkisi (4x).	71
Şekil 4.13. RNL'nin MDA-MB-231 hücrelerinin lateral hareketi üzerine etkisi (* $P<0,05$).	73
Şekil 4.14. RNL'nin MCF-7 hücrelerinin lateral hareketi üzerine etkisi (* $P<0,05$). ..	74

Şekil 4.15. FLC'nin MDA-MB-231 hücrelerinin lateral hareketi üzerine etkisi (*P<0,05).....	75
Şekil 4.16. FLC'nin MCF-7 hücrelerinin lateral hareketi üzerine etkisi (*P<0,05)...	76
Şekil 4.17. RNL'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin invazyonu üzerine etkisi.	78
Şekil 4.18. FLC'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin invazyonu üzerine etkisi.	79
Şekil 4.19. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerindeki NaV1.5 üzerine RNL ve FLC etkisi.	80
Şekil 4.20. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerindeki NaV1.5 seviyelerine RNL ve FLC etkisi (MDA-MB-231; koyu renk bar, MCF-7; açık renk bar).....	80

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Meme kanserinin dört moleküler alt tipi ve hormonal durumları (Song & Zhang, 2019)	23
Tablo 2.2. Anti-aritmik ajanların sınıflandırması.....	48
Tablo 4.1. RNL ve FLC'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin koloni oluşumu üzerindeki etkisi (* $P<0.05$).	68
Tablo 4.2. MDA-MB-231 hücrelerine RNL ve FLC uygulanması ile elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri ($\pm$ SE).	72
Tablo 4.3. MCF-7 hücrelerine RNL ve FLC uygulanması ile elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri ($\pm$ SE).....	74
Tablo 4.4. RNL ve FLC'nin göç eden hücre sayısı (%) üzerindeki etkisi (* $P<0.05$).	77

KISALTMALAR

BL	: Bazal Benzeri
BMI	: Vücut Kitle Endeksi
CaV	: Kalsiyum Kanalı
CDK	: Sikline Bağımlı Kinaz
CL	: Claudin-Low
EMT	: Epitel Mezenkimal Geçiş
ER	: Östrojen Reseptörü
FLC	: Flecainide
HER-2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma ajansı
IBC	: Luminal Benzer İnvazif Meme Kanseri
IG	: İmmonoglobulin
IL	: İnterlökin
Kca	: Kalsiyumla Aktive Olan Potasyum Kanalı
KV	: Potasyum Kanalı
LAR	: Lümen Androjen Reesepör
LMR	: Lenfosit Monosit Oranı
MSCL	: Mekanosensitif Kanalı
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MTT	: 3-4,5-Dimetil-Tiyazolil-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
NaV	: Sodyum Kanalı
NLR	: Nötrofil Lenfosit Oranı
PR	: Progesteron Reseptörü
PRL	: Trombosit Lenfosit Oranı
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
RNL	: Ranolazine
TAM	: Tümörle İlgili Makrofaj

TCGA	: Kanser Genom Atlası Projesi
TNBC	: Üçlü Negatif Meme Kanseri
TRP	: Termal Kapılı Kanal
TTX	: Tetrodotoksin
VGSC	: Voltaj Kapılı Sodyum Kanalı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü



ÖZET

RANOLAZİNE VE FLECANİDE'İN ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİ-METASTATİK ETKİSİ

Küresel ölçekteki istatistiklere göre meme kanseri tüm kanserler içinde insidansı en yüksek olanıdır ve kadınlarda kanserden kaynaklanan ölümlerin başında gelmektedir. Meme kanserinden kaynaklı ölümler ise, sıklıkla metastaz nedeniyledir. Metastatik kanser hastalığının tedavi başarısı düşüktür ve metastazın altında yatan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamadığından yeni moleküler hedefli anti-metastatik tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Hücre membranında bulunan voltaj kapılı sodyum kanallarının (VGSC'ler) yüksek ekspresyonu, yakın geçmişte patofizyolojik olarak metastatik karsinoma ile ilişkilendirilmiştir. Çeşitli kanserlerde VGSC'lerin alfa ve beta alt birimlerinin ekspresyonunda artış görüldüğü saptanmıştır. Alfa alt birimleri tarafından taşınan sodyum akımları ve beta alt birimleri tarafından düzenlenen yapışma etkileşimi yoluyla VGSC'lerin istila, göç, endositoz ve gen ekspresyonu dahil olmak üzere invazyon ve migrasyonu dolayısıyla metastazı artırdıkları bulunmuştur. VGSC'ler den SCN5A tarafından kodlanan alfa alt birim NaV1.5'in metastatik meme kanseri hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği ortaya konulmuş ve ekspresyonu artan NaV1.5 meme kanserinin teşhis ve tedavisinde umut verici bir hedef olarak kabul edilmiştir. Çalışmanın amacı, anti-aritmik olarak kullanılan ve etki mekanizması VGSC'ler üzerine olan Ranolazine ve Flecainide'in, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin invazyon ve migrasyonu üzerindeki etki potansiyellerini in vitro ve moleküler yöntemlerle araştırmaktır.

Hücreler DMEM ile %5 CO₂, 37 °C de yetiştirilmiştir. VGSC blokeri tetrodotoksin (TTX), 600 nM olarak kullanılmıştır. Hücre proliferasyonu MTT testi ile, migrasyon,

wound healing ve invazyon matrigel aracılı transvers migrasyon yolu ile belirlenmiştir.

Deneyler, hücre proliferasyonu üzerinde herhangi bir etki göstermeyen 2,5 μ M ve 5 μ M RNL ile 0,5 μ M ve 1 μ M FLC konsantrasyonları ile sürdürülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinin motilite indeksini VGSC blokeri TTX, 24. saatte 24,6%, 48. saatte ise, 26,0% oranında azaltmaktadır. İyon kanal blokerlerinden RNL, 2.5 μ M uygulandığında her iki saatte de hücrelerin motilitesinde sırasıyla, 6.7% ve 16.2% azalma meydana getirirken, 5 μ M RNL, 13.8% ve 20.8% (sırasıyla) inhibisyon oluşturmuştur. 0.5 μ M FLC sadece 48. saatte 8.1%, 1 μ M FLC, her iki saatte hücrelerin motilitesini sırasıyla, 5.1% ve 17.6% oranında baskılamıştır. Yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonlarını TTX, 63.9% ile önemli derecede, 5 μ M RNL de, 65.6% ile TTX'e benzer bir inhibisyon meydana getirmiştir. 1 μ M FLC ise, hücrelerin invazyonunu 42.6% oranında azaltmıştır.

İyon kanal blokeri olan RNL'nin, yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu FLC'ye oranla daha yüksek oranda inhibe ettiği saptanmıştır. NaV 1.5 ekspresyonu yüksek olan MDA-MB-231 hücrelerinin hareketlerini bloke ederek, meme kanseri metastazının baskılanmasında etkin rol alabileceği in vitro olarak ortaya konmuş olup, in vivo olarak da araştırılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Ranolazine, Flecainide, Üçlü negatif meme kanseri (MDA-MB-231, MCF-7), Metastaz, VGSC, Nav1,5.

ABSTRACT

THE ANTI-METASTATIC EFFECT OF RANOLAZINE AND FLECAINIDE ON TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER CELLS

According to global statistics, breast cancer has the highest incidence among all cancers and ranks first in terms of cancer-related deaths in women. Deaths attributable to breast cancer are often due to metastasis. The treatment success of metastatic cancer is low, and the underlying molecular mechanisms of metastasis have not yet been fully elucidated. Therefore, there is a need for the development of new molecularly targeted anti-metastatic therapies.

The high expression of voltage-gated sodium channels (VGSCs) located in the cell membrane has recently been associated with the pathophysiology of metastatic carcinoma. VGSCs are involved in the processes of metastatic invasion and cell migration. The NaV1.5 channel observed in breast cancer is the alpha subunit encoded by SCN5A of VGSC. An increase in the expression of both alpha and beta subunits of VGSCs has been observed in various cancers. It has been found that VGSCs enhance invasion and migration, including invasion, migration, endocytosis, and gene expression, through sodium currents carried by alpha subunits and adhesion interactions regulated by beta subunits, thus promoting metastasis. It has been demonstrated that VGSCs, particularly NaV1.5, are highly expressed in metastatic breast cancer cells, and the increased expression of NaV1.5 is considered a promising target for the diagnosis and treatment of breast cancer. The aim of this study is to investigate the potential effects of Ranolazine and Flecaïnide, which are used as anti-arrhythmics and act on VGSCs, on the invasion and migration of MDA-MB-231 and MCF-7 cells in vitro and through molecular methods.

Cells were cultured in DMEM with 5% CO₂ at 37°C. The VGSC blocker tetrodotoxin (TTX) was used at 600 nM. Cell proliferation was determined using the MTT assay, and migration was determined through wound healing and invasion matrigel-mediated transwell migration.

Experiments were conducted with 2.5 μ M and 5 μ M RNL, which did not show any effect on cell proliferation. TTX reduced the motility index of MDA-MB-231 cells by 24.6% at 24 hours and 26.0% at 48 hours. When RNL was applied at 2.5 μ M, it resulted in 6.7% and 16.2% reductions in cell motility at both time points, respectively, while 5 μ M RNL inhibited by 13.8% and 20.8% (respectively). 0.5 μ M FLC suppressed motility by 8.1% only at 48 hours, and 1 μ M FLC suppressed motility by 5.1% and 17.6% at both time points, respectively. TTX significantly inhibited the invasions of highly metastatic MDA-MB-231 cells by 63.9%, and 5 μ M RNL produced a similar inhibition to TTX with 65.6%. 1 μ M FLC reduced cell invasion by 42.6%.

It was observed that RNL, an ion channel blocker, inhibited the migration and invasion of highly metastatic MDA-MB-231 cells to a higher extent compared to FLC. By blocking the movements of MDA-MB-231 cells with high NaV 1.5 expression, it has been demonstrated in vitro that RNL may play an effective role in suppressing breast cancer metastasis.

Keywords: Ranolazine, Flecainide, Triple negative breast cancer (MDA-MB-231, MCF-7) Metastasis, VGSC, NaV1.5.

1. GİRİŞ

Meme kanseri tüm kanserler içinde insidansı en yüksek olanıdır ve kadınlarda kanserden kaynaklanan ölümlerin başında gelmektedir (Ribeiro vd., 2020) Diğer kanserlerde olduğu gibi, meme kanserinde de ölümler sıklıkla metastaz nedeniyledir (Fraser vd., 2014; Liu vd., 2015). Metastaz, kanser hücrelerinin birincil tümörden ayrılmasını, çevre dokulara lokal invazyonunu ve uzak bölgelere/dokulara yayılmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Metastatik kanser hastalığının tedavideki başarısı düşüktür ve metastazın altında yatan moleküler mekanizmaların henüz tam olarak aydınlatılamadığı görülmektedir. Bu nedenle, yeni moleküler hedefli anti-metastatik tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Kas hücreleri nöronlar gibi hücrelerin membranlarında bulunan ve iyonların hücreye giriş/çıkışı ile görevli iyon kanallarının meme, prostat, akciğer, kolon gibi kanser hücrelerinin membranlarında da bulunduğu tespit edilmiştir (Fraser vd. 1999; Fraser vd., 2003; Brackenbury & Djamgoz, 2006). Özellikle, voltaj kapılı sodyum kanallarının (VGSC'ler) yüksek ekspresyonu, yakın geçmişte patofizyolojik olarak metastatik karsinoma ile ilişkilendirilmiştir (Onkal & Djamgoz, 2009). VGSC ekspresyonunun metastatik ilerlemenin erken aşamalarında meydana geldiği ve kanser hücrelerinin oldukça invazif bir kimlik kazanmalarında gerekli ve yeterli bir "anahtar" olduğu öne sürülmüştür (Onkal & Djamgoz, 2009).

VGSC ekspresyonunun meme tümörlerinde araştırılması, NaV1.5 kanalının SCN5A tarafından kodlanan VGSC alfa alt birimi olduğunu ortaya koymuştur (Brackenbury, 2012). Çeşitli kanserlerde de VGSC'lerin alfa ve beta alt birimlerinin ekspresyonunda artış görüldüğü saptanmıştır. Meme kanserinde görülen alfa alt birimleri tarafından taşınan sodyum akımları ve beta alt birimleri tarafından düzenlenen adhezyon/yapışma etkileşimi yoluyla VGSC'lerin istila, göç, endositoz ve gen ekspresyonu dahil olmak üzere invazyon ve migrasyonu dolayısıyla metatazı arttırdıkları bulunmuştur (Guo vd., 2016; Dutta vd., 2018; Luo vd., 2020).

Dolayısıyla, VGSC'lerden NaV1.5'in metastatik meme kanseri hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği ve ekspresyonu artan NaV1.5'in meme kanserinin teşhis ve tedavisinde umut verici bir hedef olabileceği kabul edilmiştir.

Farklı hastalıkların tedavisinde kullanılan bazı ilaçlar, iyon kanallarını bloke etme özelliğine sahiptirler ve iyon kanal blokerleri olarak adlandırılmaktadırlar. Epilepsi, aritmi, Long-QT, Short-QT hastalıklarında kullanılan bu ilaçların büyük çoğunluğunun etki mekanizması iyon kanalları üzerinedir. Ayrıca yapılan retrospektif çalışmalarda epilepsi gibi önceden var olan endikasyonlar için VGSC blokeri kullanan kişilerden kanser hastası olanların, bu ilaçları kullanmayan kanser hastalarına oranla, özellikle metastaz açısından olumlu etkileri olduğuna dair dikkat çekici sonuçlar bulunmaktadır (Fairhurst vd., 2014). Bu yönde pek çok araştırma da sürdürülmektedir.

NaV1.5 miyokardiyal hücrelerde ifade edilen baskın sodyum kanalıdır (Rogart vd., 1989; Fozzard & Hanck, 1996). Diğer voltaj kapılı sodyum kanalı alt tipleri kalpte ifade edilse de, NaV1.5'in disfonksiyonunu kompanse edemezler, bu durum sodyum kanalının kardiyak fizyoloji ve patofizyolojideki önemini ortaya koyar. Voltaj kapılı sodyum kanallarının hızlı aktivasyonu, aksiyon potansiyelinin yükselme hızını belirler. Bu da aksiyon potansiyelinin kalp dokusunda nasıl yayıldığını ve ne kadar homojen olduğunu kontrol eder (Chen-Izu vd., 2015). NaV1.5'de mutasyon veya patofizyolojik koşullar nedeniyle meydana gelen işlev bozukluğu yaşamı tehdit eden kardiyak aritmilere neden olmakta ve antiaritmik ilaçlarla yapılan tedavi ile önlenilmektedir (Seibert vd., 2003).

Roger ve arkadaşları (2003) ilk kez, yüksek invaziv meme kanseri MDA-MB-231 hücrelerinde benzersiz, hızlı, içe doğru bir sodyum akımı saptarken, zayıf invaziv MCF-7 ve MDA-MB-468 hücrelerinde böyle bir akımın bulunmadığını bildirmiştir. Daha sonraki araştırmalar, normal meme dokusuna kıyasla metastatik meme kanseri hücrelerinde NaV1.5'in protein seviyelerinin up regüle olduğunu ortaya koymuştur (Fraser vd., 2005; Brackenbury vd., 2007; Gradek vd., 2019), NaV1.5'in down regülasyonunun, tümör büyümesini, istilasını ve metastazların karaciğer, akciğer gibi organlara yayılmasını önemli ölçüde azaltmıştır (Nelson vd., 2015).

Günümüzde ekspresyonu artan NaV1.5 kanallarını bloke ederek meme kanseri hücrelerinin metastazını azaltmak üzere spesifik antikorlar, doğal toksinler ve farmakolojik ajanlar üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır (Fraser vd., 2014; Martin vd., 2015). Epilepsi tedavisinde kullanılan Fenitoin, inaktif durumda metastatik meme kanseri hücre membranındaki NaV1.5'e yüksek afinite gösterir ve Na⁺ akımlarını azaltan anti-aritmik ve antiepileptik bir ajandır. Nelson ve arkadaşları (2015) fenitoin'in metastatik meme kanseri MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı ve in vivo tümör büyümesini yavaşlattığını belirtmişlerdir. Yine Yang ve arkadaşlarının (2012) yaptığı bir diğer çalışmada Fenitoin'in, güçlü metastatik MDA-MB-231 hücrelerinde kaydedilen geçici ve ısrarlı Na⁺ akımını inhibe ettiğini bu nedenle, tipik olarak depolarize membran potansiyellerine sahip olan kanser hücrelerinde etkili bir VGSC bloke edici ilaç olabileceğini belirtmişlerdir.

Klinikte anjina pectoris tedavisinde kullanılan antiaritmik ilaç olan Ranolazine (Ranexa)'in, meme kanseri hücrelerindeki NaV1.5 VGSC akımını inhibe ettiği ve kanser hücrelerinin istilasını in vitro olarak azalttığı gösterilmiştir. İn vivo çalışmalarda da Ranolazine, farelerde, NaV1.5'i eksprese eden MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri tarafından meydana getirilen akciğer kolonizasyonunu önemli ölçüde inhibe etmiştir (Driffort vd., 2014). Ayrıca Ranolazine'in NaV1.7 kanal ekspresyonu yüksek olan prostat kanserinde metastazı da azalttığı in vivo olarak saptanmıştır (Budan vd., 2016).

Günümüzde klinikte ventriküler taşikardi gibi, kalp aritmilerinde kullanılan bir diğer ilaç ise, Flecainide (Tombacor) dir. Flecainide'in etki mekanizması da kalpteki Nav 1.5 kanalını bloke ederek, aksiyon potansiyelini dolayısıyla kalp hızını düşürmektedir. Bu etkiyi NaV1.5 kanalına yüksek afinite ile bağlanarak gerçekleştirir (Jiang vd., 2020). IC sınıfı anti-aritmik ilaçlardan olan Flecainide NaV1.5 kanalına bağlanarak, sodyum geçirgenliğini doğrudan engellemektedir. Flecainide'in yüksek afinite ve yavaş bağlanma özelliğiyle IA ve IB sınıfı anti-aritmiklere ve tetrodotoksine (TTX) oranla daha başarılı olacağı ifade edilmektedir (Luo vd., 2020). Flecainide'in bu özelliği aynı zamanda kanser metastazında etkili olan ve ekspresyonu artan NaV1.5 kanalını bloke ederek metastaz potansiyeli

zerinde de etkili olabileceği düşüncesini ortaya çıkarmaktadır. Literatürde Flecainide'in kanser üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, meme kanseri hücrelerindeki NaV1.5 VGSC'nin metastazlardan sorumlu olduğuna odaklanılmış ve klinikte antiaritmik olarak kullanılan Ranolazine ve Flecainide ilaçlarının bu VGSC'nin aktivitesini inhibe ederek metastazın oluşumuna neden olan invazyon ve migrasyon üzerindeki etkileri in vitro olarak moleküler yöntemlerle değerlendirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

Kanser, normal hücresel büyüme ve bölünme mekanizmalarının düzensizleşmesi sonucu oluşan, genellikle genetik mutasyonlarla tetiklenen bir hastalıktır. Bu mutasyonlar, hücrelerin DNA'sındaki genlerin normal fonksiyonlarını kaybetmesine ve anormal bir şekilde çoğalmalarına yol açar. Kontrolsüz büyüyen hücreler, tümör veya neoplazma adı verilen bir doku kitlesi oluşturur. Bu tümör, çevresel dokulara veya uzak bölgelere yayıldığında, metastaz olarak adlandırılır ve kanserin agresif bir formunu temsil eder. Kanser, vücudun farklı organ ve dokularında ortaya çıkabilir ve bu nedenle çeşitli histolojik tiplere sahip olabilir. (Hausman, 2019).

Kanser hücrelerinin en temel özelliği, hücre proliferasyonunu sürdürme yetenekleridir. Normal dokulardaki hücre büyümesi ve bölünmesi siklusal özellik taşımakta, süreç boyunca ilerlemeyi yönlendiren, büyümeyi teşvik eden sinyallerin üretimini ve salınmasını kontrollü bir şekilde sürdürmektedir. Böylece hücre sayısında bir homeostaza ulaşır ve doku yapısının ve işlevinin korunmasını sağlar. Kanser hücreleri ise normal hücrelerden farklı olarak kendi büyüme ve çoğalma süreçlerini kontrol etmek için genetik değişikliklere uğrarlar. Bu değişiklikler, genellikle hücre içi tirozin kinaz alanlarını içeren yüzey reseptörlerini etkileyen büyüme faktörleri tarafından iletilen etkinleştirme sinyalleri aracılığıyla gerçekleşir. Bu, kanser hücrelerinin normal hücrelerden farklı bir büyüme ve çoğalma kontrol mekanizması geliştirdiği ve bu nedenle kontrolsüz bir şekilde büyüdüğünü ortaya koyar (Aydın, 2021).

Kanserin çok yönlü ve karmaşık doğasını anlamak üzere 2000 yılında kanserin temel özellikleri altı temel ilkede toplanmıştır ve 2011 yılında iki ilke daha eklenmiştir (Şekil 2.1). Günümüzde fenotipik plastisite ve bozulmuş hücre farklılaşmasının ayrı bir belirleyici yetenek olduğu, mutasyon dışı epigenetik yeniden programlama ve polimorfik mikrobiyomların da ayırt edici özellikler olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca, farklı kökene sahip hücrelerin de, tümör mikroçevresinde işlevsel olarak önemli hücre tipleri arasına eklenebileceği belirtilmektedir. Kanserin özelliklerinin ortaya konmasının, bu karmaşıklığı gidererek daha mantıklı bir bilime indirgemeye

yardımcı olduğunu ifade eden ve bu perspektifte sunulan geçici yeni boyutlar da bu çabaya değer katmaktadır. Böylece kanser gelişiminin ve malign ilerlemesinin mekanizmalarının daha iyi anlaşılacağı, bu bilginin kanser tıbbına uygulanmasının mümkün olacağını belirtmektedirler (Hanahan, 2022).



Şekil 2.1 Kanser özellikleri

Kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri:

Proliferatif sinyal sürdürme: Normal hücrelerden farklı olarak kanser hücreleri, büyüme faktörlerine ve diğer sinyallere bağımlı olmadan bölünmeye devam ederler. Kendi büyüme faktörlerini üretebilir, büyüme faktörü reseptörlerini aşırı düzeyde ifade edebilir veya sinyal yolağını mutasyonlarla aktive edebilirler (Hanahan vd., 2000).

Büyüme baskılayıcılarından kaçınma: Kanser hücreleri, normal hücrelerin bölünmesini durdurmaya veya programlı ölüme zorlayan mekanizmaları da devre dışı bırakırlar. Örneğin, p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonu kaybolur veya retinoblastoma (Rb) gibi sitokinetik frenleri inhibe ederler (Hanahan vd., 2000).

Hücre ölümüne direnç: Kanser hücreleri, apoptozis veya otofaji gibi programlı hücre ölümü yollarına karşı direnç kazanırlar. Bunu yapmak için, pro-apoptotik proteinleri bastırır, anti-apoptotik proteinleri artırır veya mitokondriyal membran bütünlüğünü korur (Hanahan vd., 2000).

Replikatif ölümsüzlük sağlama: Kanser hücreleri, telomeraz enzimini aktive ederek veya alternatif mekanizmalarla telomer uzunluğunu koruyarak sonsuz bölünme kapasitesine sahip olurlar. Böylece, normal hücrelerde görülen replikatif senesens veya kriz durumlarını aşarlar (Hanahan vd., 2000).

Anjiyogenezi indükleyebilme: Tümörü oluşturan kanser hücrelerinin, tümör beslenmesi ve metastaz için gerekli olan yeni kan damarlarının oluşumunu tetikleyebilirler. Bunu yapmak için, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi anjiyogenik faktörleri salgılar veya hipoksiye yanıt veren transkripsiyon faktörleri (HIF) gibi oksijen seviyesini algılayan molekülleri modifiye ederler (Hanahan vd., 2000).

İnvazyon ve metastazı aktive etme: Kanser hücreleri, primer tümörden ayrılıp kan veya lenf yoluyla vücudun başka bölgelerine yayılabilirler. Bunun için hücreler, epitel-mezankimal geçiş (EMT) gibi fenotipik değişimler yaşar, ekstraselüler matriksi (ECM) parçalayan enzimler salgılar ve yeni mikroçevrelere adapte olur (Hanahan vd., 2000).

2011 yılında bu altı temel özelliğin yanında, kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri kavramına eklenen iki yeni özellik daha bulunmaktadır:

Enerji metabolizmasını yeniden programlama: Kanser hücreleri, enerji ihtiyaçlarını karşılamak için normal hücrelere göre farklı metabolik yollar kullanırlar. Örneğin, glikolizi oksijen varlığında bile arttırarak laktat üretir (Warburg etkisi) veya glutaminolizi uyararak amino asit sentezler (Hanahan & Weinberg, 2011).

Bağışıklık sisteminden kaçınma: Kanser hücreleri, bağışıklık sisteminin tanıma ve yok etme mekanizmalarından kaçınmayı başarırlar. Bunu yapmak için, antijen sunumunu engeller, immünsüpresif moleküller salgılar, bağışıklık hücrelerini manipüle eder veya bağışıklık kaçıışı mutasyonları geliştirir (Hanahan & Weinberg, 2011).

2.2. KANSERİN SINIFLANDIRMASI

Kanser sınıflandırması, kaynaklandığı doku tipine göre yapılabilmekte ve bu sınıflandırmada, hematolojik kanserler, katı tümörlerden ayrılmaktadır. Hematolojik

kanserler damar sistemi içerisindeki kanser hücrelerinden oluşan sıvı özellik gösteren yapıdır. Katı tümörler ise, hücrelerin bir doku içerisinde birliktelik gösterdiği tümör olarak adlandırılan katı bir kitlenin varlığı ile tanımlanırlar.

2.2.1. Karsinomalar

Deri, gastrointestinal sistem, iç organlar ve diğer anatomik bölgelerdeki epitel hücrelerinden kaynaklanan kanserler karsinoma olarak adlandırılır (Carbone, 2020). Karsinomalar hızlı hücre bölünmelerinin görüldüğü kanserler olup, tüm kanser vakalarının yaklaşık %80-90'ını oluşturur (Xia vd., 2020). Karsinomlar kendi içinde de farklı tiplere ayrılabilir. Örneğin, skuamöz hücreli karsinoma, epidermis veya mukozal epitelden, adenokarsinoma bez epitelinden, bazal hücreli karsinoma derinin bazal tabakasından kaynaklanırken; geçiş hücreli karsinoma, mesane veya böbrek pelvisi gibi geçiş epiteli bulunan yerlerden meydana gelmektedir (Cuppen, 2022).

2.2.2. Sarkomalar

Kas, yağ, kemik veya kan damarları gibi mezenkimal dokulardan kaynaklanan kanserlerdir (Carbone, 2020). Sarkomalar hücre bölünmelerinin daha yavaş olduğu kanser tipidir ve tüm kanser vakalarının yaklaşık %1'ini oluşturur (Xia vd., 2020). Sarkomalar da kendi içinde de farklı tiplere ayrılırlar. Örneğin, osteosarkoma kemik dokusundan, liposarkoma yağ dokusundan, rabdomiyosarkoma kas dokusundan ve angiosarkoma, kan damarı dokusundan kaynaklanır (Cuppen, 2022).

2.2.3. Lenfomalar

Lenfoid dokudan kaynaklanan kanserlerdir (Carbone, 2020). Lenfoid doku lenf düğümleri, dalak, timus ve kemik iliği gibi bağışıklık sisteminin bir parçası olan organ ve dokuları içerir. Lenfomalar kendi içinde de farklı tiplere ayrılabilir. Örneğin, Hodgkin lenfoma ve non-Hodgkin lenfoma en yaygın iki lenfoma tipidir. Hodgkin lenfoma Reed-Sternberg hücreleri adı verilen büyük anormal lenfositleri içerirken; non-Hodgkin lenfoma B-lenfosit veya T-lenfosit gibi normal lenfositlerin anormal çoğalmasıyla oluşur.

Yukarıdaki üç ana gruba girmeyen kanser türleri de vardır. Örneğin, beyin ve merkezi sinir sistemi kanserleri nöroektodermal dokudan kaynaklanırken melanoma derinin pigment hücreleri olan melanositlerden meydana gelmektedir. Lösemi kan hücrelerinden veya kemik iliğinden, mezotelyoma plevra veya periton gibi seröz

zarlardan kaynaklanmaktadır (Cuppen, 2022). Bu şekilde dokulara göre kanser sınıflandırması yapılabilmesine karşın, bu sınıflandırma her zaman net ve sınırları kesin değildir. Bazı kanser türleri birden fazla doku tipinden kaynaklanabilir veya farklı doku tiplerine metastaz yapabilir. Ayrıca moleküler düzeydeki farklılıklar da kanser sınıflandırmasında önemli rol oynamaktadır (Carbone, 2020).

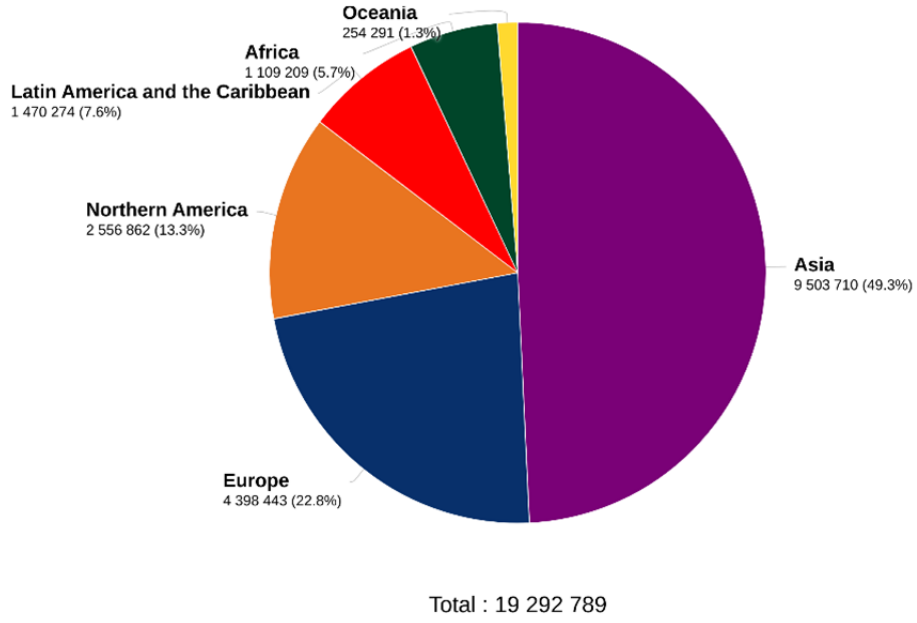
2.3. KANSERİN EPİDEMİYOLOJİSİ

Kanser insidansı, belirli bir zaman diliminde belirli bir nüfus içinde yeni tanı alan kanser vakalarının sayısını, mortalite ise, belirli bir zaman diliminde belirli bir nüfus içinde kansere bağlı olarak yaşamını yitiren kişilerin sayısını ifade eder. Kanser insidansı ve mortalitesi arasındaki farklılık, kanserin erken teşhisi ve tedavisinin etkinliğini yansıtır (Sung vd., 2021).

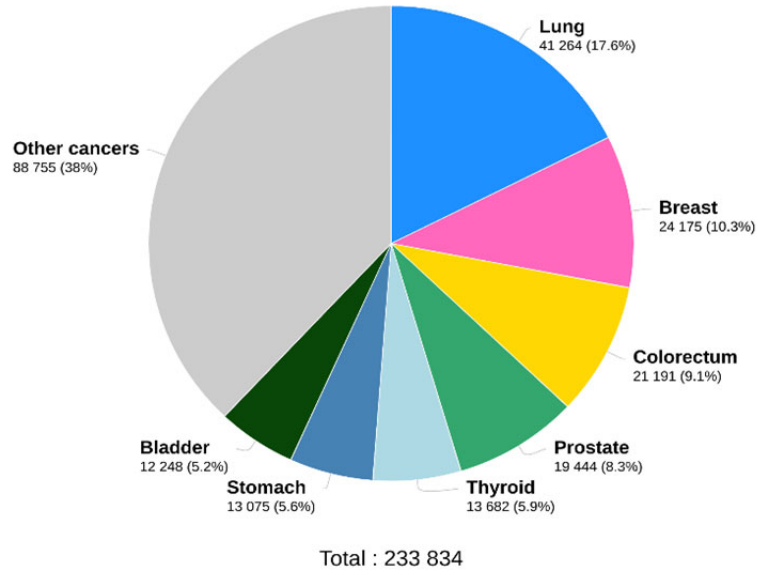
Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan küresel kanser verilerini içeren bir veri tabanı olan GLOBOCAN 2020 verilerine göre (Şekil 2.2.), dünyada 19,3 milyon kanser vakası, Türkiye'de ise; 233.834 yeni kanser vakası ve 126.335 ölüm vakası bildirilmiştir (Şekil 2.3.). Dünyada 10 milyon kanserden kaynaklı ölüm olduğu tahmin edilmektedir (Şekil 2.4.). Dünyada en sık görülen beş kanser türü; akciğer, meme, kolorektal, prostat ve mide kanseri iken, en sık ölüme neden olanlar; akciğer, kolorektal, mide, karaciğer ve meme kanseridir (Şekil 2.5.).

Ülkemizde en sık görülen beş kanser türü akciğer, meme, kolorektal, prostat ve tiroid kanseridir. Türkiye'de en sık ölüme neden olan beş kanser türü ise akciğer, kolorektal, mide, karaciğer ve pankreas kanseridir. Kanser taraması ve tedavisi ile ilgili tıbbi uygulamalardaki değişikliklere bağlı olarak meme ve prostat kanserleri için ilerleme hızının durduğu, ancak akciğer kanseri için arttığı ifade edilmektedir (Siegel vd., 2022).

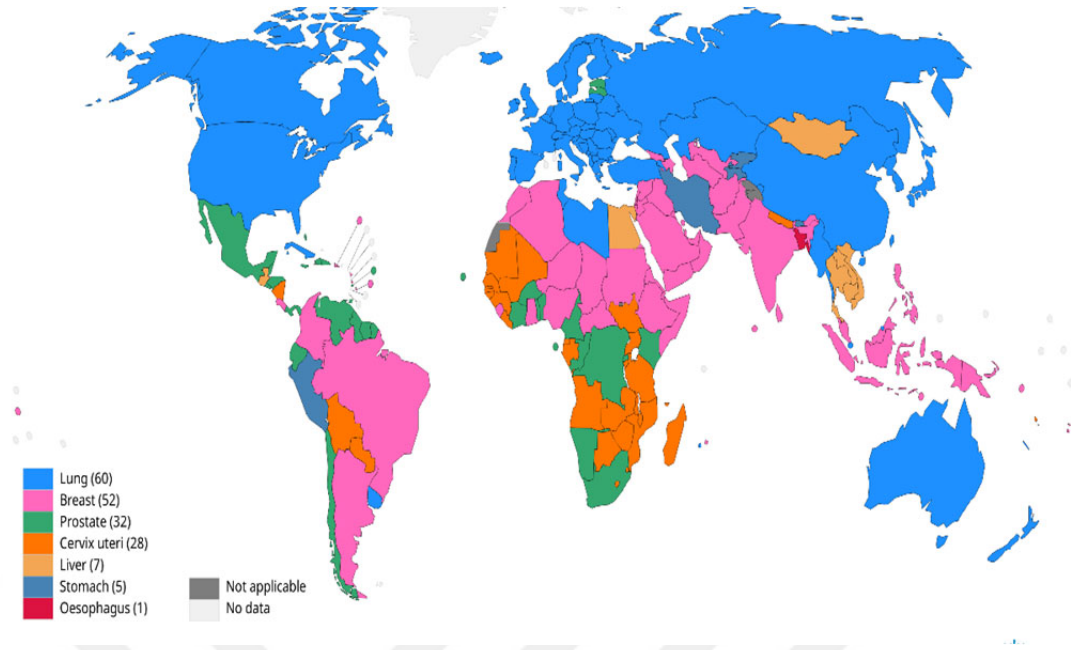
Meme Kanseri dünya çapında en yaygın kanserdir ve 2020'de teşhis edilen toplam yeni vaka sayısının %12,5'ini oluşturur.



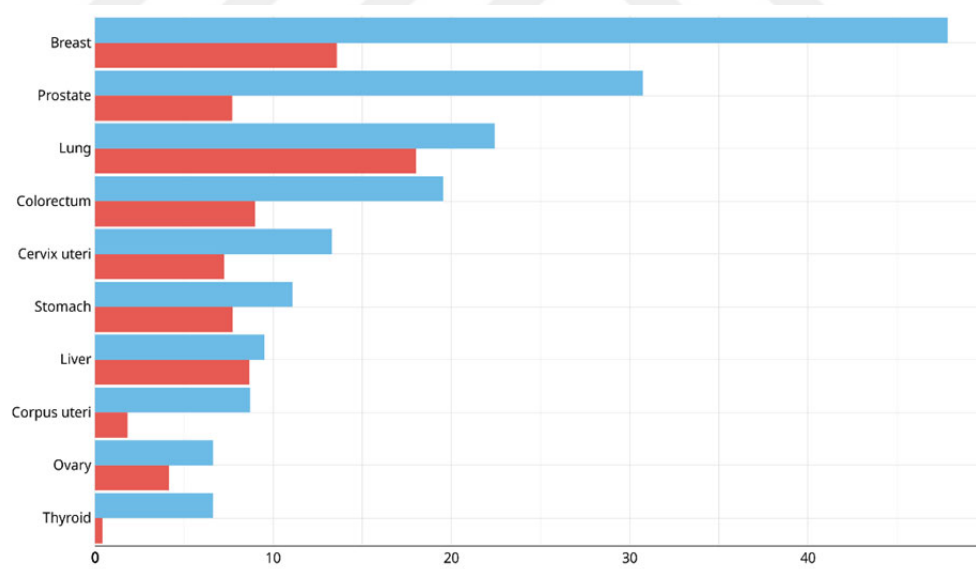
Şekil 2.2. 2020 yılı için Dünya'daki tahmini kanser vaka sayısı (GLOBOCAN).



Şekil 2.3. 2020 yılı için Türkiye'deki tahmini kanser vaka sayısı (GLOBOCAN).



Şekil 2.4. 2020 yılı ülke bazlı kanser mortalitesi (GLOBOCAN).

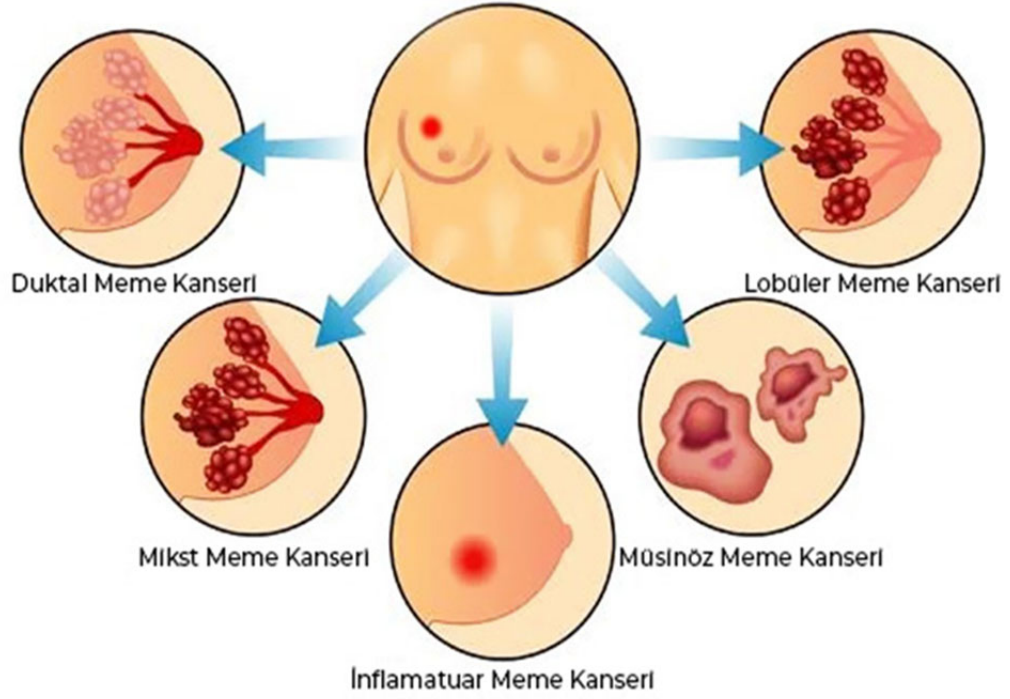


Şekil 2.5. 2020 yılı Dünya’da yaşa göre standardize edilmiş tahmini kanser insidans ve ölüm oranları (GLOBOCAN).

2.4. MEME KANSERİ

Meme kanseri, genellikle meme dokularında başlayan, kontrolsüz bir şekilde hücrelerin anormal olarak çoğalması sonucu oluşan bir kanser türüdür. Bu durum, meme dokusundaki hücrelerin normal sınırlarını aşarak çevre dokulara yayılabilir. Meme kanseri, yaygın olarak kadınlarda görülse de, nadiren erkeklerde de meydana gelebilir. Kanser hücreleri, vücudun farklı bölgelerine yayılarak uzak organlarda (örneğin kemikler, akciğerler) metastaz oluşturabilir.

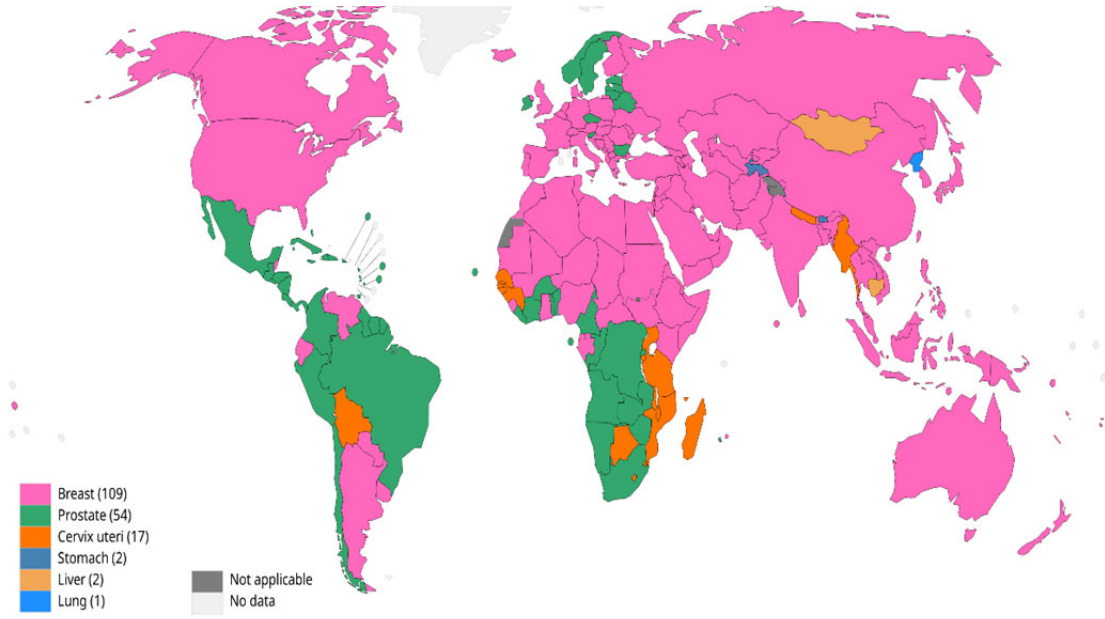
Meme kanseri, 2020'de 2 milyondan fazla yeni vaka ile dünya çapında kadınlarda en sık teşhis edilen kanserdir. Meme kanserinin nedenleri tam olarak bilinmemekle birlikte değiştirilebilir veya değiştirilemeyen birçok risk faktörü vardır. Değiştirilebilir risk faktörleri arasında obezite, alkol kullanımı, sigara kullanımı ve menopoz sonrası hormon tedavisi sayılabilir. Değiştirilemeyen risk faktörleri arasında ise yaş, BRCA1/BRCA2 mutasyonları, östrojen seviyeleri, klinefelter sendromu, aile öyküsü ve radyasyon maruziyeti sayılabilir. Meme kanseri temel olarak invazif meme kanserleri ve in situ meme kanserleri olmak üzere iki ana gruba ayrılır. İnvazif meme kanserleri, meme dokusunun dışına yayılan tümörlerdir. İn situ meme kanserleri ise, meme ile sınırlı kalmış tümörlerdir (Şekil 2.6.). Meme kanseri mRNA gen ekspresyon seviyelerine göre moleküler alt tiplere (Luminal A, Luminal B, HER2-zenginleştirilmiş ve bazal benzeri) ayrılabilir. Moleküler alt tipler, yeni tedavi stratejileri ve hasta stratejileri hakkında fikir verir ve meme kanseri hastalarının tedavi yöntemlerini etkiler. Meme kanseri tedavisi cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormonal tedavi veya biyolojik tedaviler gibi farklı yöntemlerin çeşitli kombinasyonlarını içerir (Stanisławek, 2021).



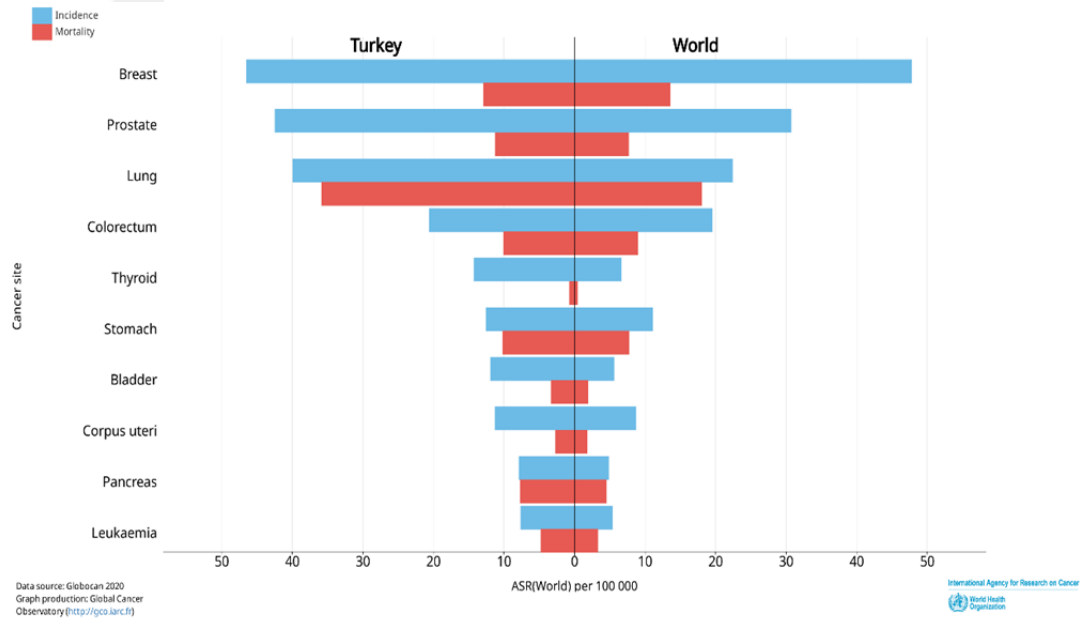
Şekil 2.6. Farklı meme kanseri türleri (Scientia.global)

2.4.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Globocan 2020 verilerine göre, meme kanseri dünyada en sık görülen ikinci kanser türü ve kadınlar arasında en sık görülen ilk kanser türüdür. Ayrıca meme kanseri, dünyada en sık ölüme neden olan beşinci kanser türü ve kadınlar arasında en sık ölüme neden olan ikinci kanser türüdür. Dünyada 2020 yılında 2,3 milyon yeni meme kanseri vakası ve 685 bin mortalite görülmüştür (Şekil 2.7.). Meme kanseri insidansı her 100 bin kadında ortalama 47.9 iken, mortalitesi her 100 bin kadında 13.1'dir (Şekil 2.8.). Türkiye'de ise 2020 yılında 24 bin yeni meme kanseri vakası ve 7 bin meme kanseri ölümü olmuştur. Meme kanseri insidansı her 100 bin kadında 28.6 iken, mortalitesi her 100 bin kadında 8.4'tür. Türkiye'de meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen ve ölüme neden olan ilk kanser türüdür.



Şekil 2.7. 2020'de tahmin yaşa göre standardize edilmiş ülke bazlı en yüksek kanser insidans oranları, her iki cinsiyet, her yaştan (NMSC hariç) (GLOBOCAN, 2020).



Şekil 2.8. 2020 yılı Dünya'da ve Türkiye'de yaşa göre standardize edilmiş tahmini kanser insidans ve ölüm oranları (GLOBOCAN, 2020).

2.4.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri

2.4.2.1. Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

Cinsiyet

Hormonal stimülasyon meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkili ana faktörlerden birini oluşturmaktadır. Önemsiz östrojen seviyeleri içeren erkeklerin aksine, kadınların meme hücreleri hormon (özellikle östrojen ve progesteron) dengelerindeki herhangi bir bozulmaya karşı çok hassastır. Dolaşım sistemindeki östrojen ve androjen, meme kanseri riskinin artmasıyla pozitif olarak ilişkilidir (Folkerd & Dowsett, 2013). Seks hormonlarının endojen seviyelerinin fizyolojik düzeylerindeki değişimler, menopoz öncesi ve menopoz sonrası kadınlarda daha yüksek meme kanseri riskine neden olmaktadır (Folkerd & Dowsett, 2013). Bir erkeğin meme kanseri riskini artıran önemli faktörler ise; ileri yaş, BRCA1/BRCA2 mutasyonları, artmış östrojen seviyeleri, klinefelter sendromu, ailede meme kanseri öyküsü ve radyasyona maruz kalma olarak tanımlanır (Giordano, 2018).

Yaş

Meme kanseri hastalarının yaklaşık %80'i 50 yaş üstü, %40'tan fazlası 65 yaşın üzerindeki kişilerdir. Meme kanseri gelişme riski; 40 yaşında %1,5 50 yaşında %3 ve 70 yaşında %4'ten fazladır. İlginç bir şekilde, kanserin belirli bir moleküler alt tipi ile hasta yaşı arasında bir ilişki gözlemlenmiştir. Agresif ve dirençli olan üçlü negatif meme kanseri alt tipi en sık 40 yaşın altındaki gruplarda teşhis edilirken 70 yaşın üzerindeki hastalarda lüminal A alt tipine rastlanır. Genellikle ileri yaşlarda kanser görülmesi sadece meme kanseri ile sınırlı değildir; yıllar içerisinde çok sayıda hücresel değişimin birikmesi ve potansiyel karsinojenlere maruz kalma, zamanla karsinogenezin artmasına neden olur (Mcguire vd., 2015).

Aile Öyküsü

Ailede meme kanseri öyküsü, meme kanseri riskinin artmasına en önemli bir başka faktörü oluşturur. Meme kanseri teşhisi konan hastaların yaklaşık %13-19'u birinci derece akrabalarında aynı durumdan etkilendiğini bildirmektedir. Ayrıca, etkilenen birinci derece akraba sayısı arttıkça meme kanseri riski önemli ölçüde artmaktadır; etkilenen akrabalar 50 yaşın altında olduğunda risk daha da yüksek olabilir. Bu ilişki, potansiyel tetikleyiciler olarak hareket eden çevresel faktörlerin yanı sıra epigenetik

değişiklikler tarafından yönlendirilir. Ailede yumurtalık kanseri öyküsünün bulunması, özellikle BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları ile karakterize olanlar, meme kanseri riskini de artırabilir (Wu vd., 2018).

Genetik Mutasyonlar

Yüksek penetrasyon ile karakterize edilen iki ana gen, 17. kromozom üzerinde bulunan BRCA1 ve 13. kromozom üzerinde bulunan BRCA2 artan meme kanseri riski ile birincil olarak bağlantılıdır. Bu genlerdeki mutasyonlar esas olarak otozomal dominant olarak kalıtılır, ancak sporadik mutasyonlar da yaygın olarak görülmektedir. Diğer meme kanseri genleri arasında TP53, CDH1, PTEN ve STK11 bulunur. Meme kanseri riskinin artmasının yanı sıra, bu tür mutasyonların taşıyıcıları yumurtalık kanserine daha yatkındır. ATM, PALB2, BRIP1 veya CHEK2 dahil olmak üzere BRCA genleri ile etkileşime girebilen önemli sayıda DNA onarım geninin meme kanseri oluşumunun indüklenmesinde yer aldığı rapor edilmiştir; ancak bunlar, BRCA1 veya BRCA2'ye kıyasla daha düşük penetrasyon (orta derece) ile karakterize edilir. XRCC2 genindeki mutasyonlar da potansiyel olarak artan meme kanseri riski ile ilişkili olabilir (Koboldt vd., 2012; Mavaddat vd., 2013, Li vd., 2022).

İrk/Etnisite

İrk ve etnik kökene ilişkin eşitsizlikler, meme kanserinden etkilenen bireyler arasında yaygın olarak gözlemlenmeye devam etmektedir ve bu mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Genel olarak meme kanseri insidans oranı, Hispanik olmayan beyaz kadınlar arasında en yüksek düzeyde devam etmektedir. Bunun aksine, maligniteye bağlı ölüm oranı ise siyahi kadınlar arasında önemli ölçüde daha yüksektir (Id vd., 2019).

Üreme

Çok sayıda çalışma, endojen hormonlara maruz kalma (özellikle östrojen ve progesteron) ile kadınlarda meme kanseri riski arasında kesin bir ilişki olduğunu doğrulamıştır. Bu nedenle, gebelik, emzirme, ilk adet görme ve menopoz gibi spesifik olayların meydana gelişi, bunların süresi ve beraberindeki hormonal dengesizlik, meme mikroçevresinde potansiyel karsinojenik olayların indüksiyonu

açısından çok önemlidir. Erken yaşta (özellikle yirmili yaşların başında) ilk tam süreli hamilelik ve ardından artan doğum sayısı meme kanseri riskinde azalma ile ilişkilidir (Bernstein, 2002). Ayrıca hamileliğin kendisi potansiyel olarak kansere karşı koruyucu etkiler sağlar. Gebelik sırasında preeklampsi öyküsü olan kadınlar veya preeklampitik gebelikten doğan çocuklarda meme kanseri gelişme riski daha düşüktür (Innes, 2023). İnsülin, kortizol, insülin benzeri büyüme faktörü-1, androjenler, insan koryonik gonadotropin, kortikotropin salıcı faktör ve fizyolojik aralıklardan sapan IGF-1 bağlayıcı protein ile birlikte artmış progesteron ve azalmış östrojen seviyeleri dahil olmak üzere preeklampsi sırasında düzensiz hormon seviyeleri, meme karsinogenezini önleyici koruyucu etki gösterdiği belirtilmektedir. Emzirme süresinin uzun olması da hem ER/PR-pozitif hem de negatif kanserlerin riskini azaltır (Ursin vd., 2005). Ayrıca, ilk adetin erken yaşta olması, genel olarak daha kötü bir prognozla sonuçlanabilir. Aksine, ister doğal ister cerrahi olsun, erken menopoza meme kanseri riskini azaltmaktadır (Dehesh vd., 2023).

Meme Dokusunun Yoğunluğu

Meme dokusunun yoğunluğu yaşam boyu değişkendir, klinik uygulamada düşük yoğunluklu, yüksek yoğunluklu ve yağlı memeler dahil olmak üzere birkaç kategori oluşturulmuştur. Genç yaştaki ve vücut kitle indeksi düşük (BMI) olan kadınlarda, hamile olan veya emzirme döneminde ve ayrıca hormon replasman tedavisi alırken memelerde daha fazla yoğunluk gözlenir (Checka vd., 2012) . Genel olarak, meme dokusu yoğunluğunun fazla olması artan meme kanseri riski ile ilişkilidir; bu eğilim hem menopoza öncesi hem de menopoza sonrası kadınlarda gözlenmektedir.

Meme Kanseri ve Benign Meme Hastalıkları

Meme kanseri geçmişi olan bireylerde, meme dokusunda tekrarlayan kanserli lezyonların ortaya çıkma riski artar. Bununla birlikte, kanserle ilişkilendirilmeyen iyi huylu lezyonların varlığı da riski önemli ölçüde artırabilir. Ayrıca, histolojik sınıflandırma ile belirlenen iyi huylu lezyonların tipi ve ailede meme kanseri öyküsü, meme kanseri riski ile güçlü bir şekilde bağlantılıdır (Degnim vd., 2005).

Radyasyon Tedavisi

Radyoterapi tedavisinden sonra sekonder malignite riski, klinik endişe uyandıran, oldukça sık görülen bir durumdur. Radyasyon tedavisinin neden olduğu kanser

kesinlikle bireyin yaşıyla ilişkilidir; 30 yaşından önce radyasyon tedavisi alan hastalarda meme kanseri riski daha fazladır (Ng & Shuryak, 2014). Uygun radyoterapi tekniğinin seçimi, ikincil kanser riski açısından çok önemlidir. Ayrıca, radyoterapi alan hastalarda ailede meme kanseri öyküsü olması, ek olarak kanser oluşum riskini artırır (Ng vd., 2009).

3.4.1.2 Değiştirilebilir Faktörler

Fiziksel Aktivite

Düzenli fiziksel aktivitenin meme kanseri insidansında koruyucu bir faktör olduğu düşünülmektedir. Fiziksel aktivitenin meme kanseri insidansı üzerindeki koruyucu rolünü açıklayan hipotezlerden birincisi; fiziksel aktivite, endojen seks hormonlarına maruz kalmayı azaltarak, bağışıklık sistemi tepkilerini veya insülin benzeri büyüme faktörü-1 seviyelerini değiştirerek kanseri önleyebilir (Delrieu vd., 2021).

Vücut Kitle İndeksi

Epidemiyolojik araştırmalara göre, obezite yüksek meme kanseri olasılığı ile ilişkilidir. Bu ilişki çoğunlukla östrojen reseptörü pozitif meme kanseri geliştirme eğiliminde olan menopoz sonrası obez kadınlarda artar. Yine de, menopoz durumundan bağımsız olarak, obez kadınlar daha kötü klinik sonuçlara ulaşmaktadır (Kolb & Zhang, 2020). Wang ve ark. BMI daha yüksek olan 50 yaşın üzerindeki kadınların, düşük BMI'ye sahip olanlara kıyasla daha yüksek kanser riski altında olduğunu göstermiştir (Wang vd., 2019). Artan vücut yağı, enflamatuvar durumu artırabilir ve pro-karsinojenik olayları kolaylaştıran dolaşımdaki hormonların seviyelerini etkiler. Bu nedenle de, daha kötü klinik sonuçlar öncelikle BMI ≥ 25 kg/m² olan kadınlarda gözlemlendiği dikkat çeker (Iyengar vd., 2019).

Alkol Alımı

Çok sayıdaki kanıt, aşırı alkol tüketiminin gastrointestinal sistemdeki malignite riskini artırabilecek bir faktör olduğunu doğrulamaktadır; ancak meme kanseri riski ile de bağlantılı olduğu kanıtlanmıştır. Bu ilişkinin açıklaması, alkol alımının neden olduğu artan östrojen seviyeleri ve dolayısıyla kadınlarda karsinogenez riskini etkileyen hormonal dengesizliktir (Erol vd., 2019). Ayrıca, alkol alımı genellikle

daha yüksek BMI seviyeleri ile aşırı yağ alımına neden olur ve bu durumda ek risk oluşturur. Bir diğer hipotez de alkol metabolitlerinin doğrudan ve dolaylı kanserojen etkilerini içerir. Alkol tüketiminin özellikle östrojen pozitif meme kanseri riskini arttırdığı gözlemlenmiştir (Zeinomar vd., 2019). İlk hamilelikten önce alkol tüketilmesi, meme dokusunda morfolojik değişikliklerin indüklenmesine önemli ölçüde katkıda bulunur ve onu daha ileri kanserojen olaylara yatkın hale getirir (Liu vd., 2015).

Sigara

Tütünde bulunan karsinojenler, meme dokusuna taşınırlar ve onkogenler ile kanser baskılayıcı genler özellikle p53 mutasyonlarını arttıırırlar. Bu nedenle, sadece aktif değil, aynı zamanda pasif içiciliğin de pro-karsinojenik olayların indüklenmesine önemli ölçüde katkıda bulunduğu belirtilmektedir (Russo, 2002).

Yetersiz Vitamin Takviyesi

Vitaminler, meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli malignitelerin önlenmesinde potansiyel fayda sağlayabilecek antikanser özellikler gösterir, ancak mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Meme kanseri açısından, çoğu çalışma potansiyel olarak koruyucu etkilerini doğrulayan D vitamini takviyesine odaklanmaktadır. Yüksek serum 25-hidroksivitamin D seviyeleri, menopoz öncesi ve menopoz sonrası kadınlarda daha düşük meme kanseri insidansı oranı ile ilişkilidir (Atoum & Alzoughool, 2017). Ayrıca, D vitamini reseptörlerinin yoğunlaştırılmış ekspresyonunun, meme kanserine bağlı daha düşük ölüm oranları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Huss vd., 2019).

Yapay Işığa Maruz Kalma

Son zamanlarda geceleri yapay ışığa maruz kalma meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Muhtemelen bozulmuş bir melatonin ritmi ve takiben epigenetik değişikliklerden kaynaklanabilir. Yapılan çalışmalara göre, yapay ışığa daha fazla maruz kalanlar, daha az maruz kalan bireyler ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek meme kanseri riski taşıdıkları ifade edilmektedir (Johns vd., 2018).

Diyet

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, yüksek oranda işlenmiş et, yalnızca gastrointestinal maligniteler değil aynı zamanda meme kanseri riskini artırabilecek Grup 1 kanserojen olarak sınıflandırılmıştır. Aşırı doymuş yağ alımı açısından da aynı sonuçlara varılmıştır. İşlenmiş gıdalar, meme kanseri riskinin başka bir faktörü olan obeziteye de zemin hazırlayan sodyum, yağ ve şeker açısından zengindir. Diyetle ultra-işlenmiş gıdaların %10 artmasının, %11 daha fazla meme kanseri riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Fiolet vd., 2018). Sebzeler, meyveler, baklagiller, kepekli tahıllar ve yağsız protein açısından yüksek bir diyet, meme kanseri riskinin azalmasıyla ilişkilidir (Paper, 2014). Genel olarak, yüksek miktarda n-3 PUFA, D vitamini, lif, folat ve fitoöstrojen içeren gıdaları içeren bir diyet, meme kanserini önlenmesinde faydalı olabilir (Kotepui, 2016). Ayrıca, daha az n-6 PUFA ve doymuş yağ alımı önerilir. Yeşil çayda bulunan spesifik bileşiklerin, meme kanseri ile ilgili olarak anti-kanser etkileri olabileceği bazı çalışmalar ile gösterilmiştir. Yine zerdeçaldan türetilen kurkuminoidler ve sülforafanda da benzer özelliklere rastlanmıştır (Kunwar vd., 2012).

Kimyasala Maruz Kalma

Kimyasallara kronik olarak maruz kalma, prokarsinojenik olayların tetiklenmesiyle birlikte epigenetik değişiklikler meydana getirerek meme karsinogenezini teşvik edebilir (Casey vd., 2015). Kimyasala kronik maruz kalma ile sahip dişilerde meme kanseri olasılığı önemli ölçüde yüksektir ve bu durum, etki süresiyle pozitif bir şekilde ilişkilidir (Videnros vd., 2020). Meme karsinogenezine neden olduğu iddia edilen kimyasalların sayısı da önemlidir; şu ana kadar, diklorodifeniltrikloroetan (DDT) ve poliklorlu bifenil (PCB), bu tür kimyasallara erken maruz kalma, meme bezlerinin gelişimini olumsuz etkileyebileceği için genellikle meme kanseri açısından araştırılmıştır (Eve vd., 2020). Polisiklik aromatik hidrokarbonlara (PAH), sentetik liflere, organik çözücülere, yağ buharına ve insektisitlere artan maruz kalma durumunda da potansiyel bir ilişki gözlemlenmiştir (Leso vd., 2019).

İlaçlar

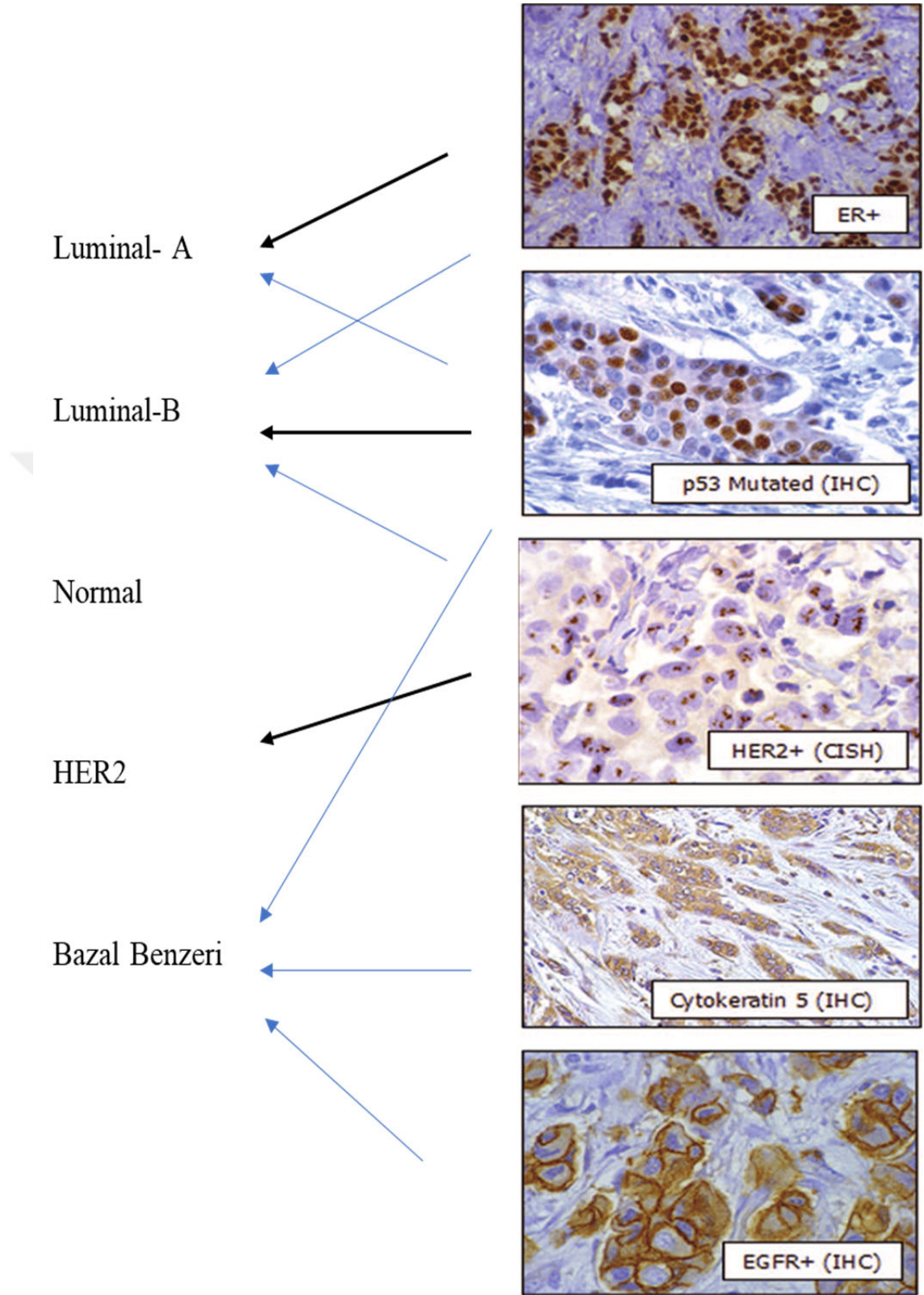
Meme kanseri için potansiyel risk faktörleri oluşturabilecek ilaçlar arasında antibiyotikler, antidepresanlar, statinler, antihipertansif ilaçlar ve ayrıca NSAID'ler (aspirin, ibuprofen dahil) yer almaktadır (Brandes vd., 1992; Zhang vd., 2008).

2.4.3. Meme Kanserinin Sınıflandırması

Histolojik Sınıflandırma

İnvaziv meme kanserleri (IBC), klinik vakaları, davranışları ve morfolojileri ile ilgili olarak çeşitlilik gösteren geniş spektrumlu tümörleri içerir. WHO en az 18 farklı invaziv histolojik meme kanseri türünü ayırt etmektedir (Rakha vd., 2023). Rutin patolojik belirteçler ER, PR ve HER2'nin kombinasyonu, tümörleri intrinsik alt tiplere sınıflandırmak için kullanılır (Şekil 2.9.). Ki-67 ve PR'nin yarı kantitatif değerlendirmesi, Luminal alt tipin daha fazla tiplendirilmesi için yararlıdır. Ayrıca, TNBC arasında bazal benzeri meme kanserini tanımlamak için sitokeratin 5/6 ve epidermal büyüme faktörü reseptörünün değerlendirilmesinden yararlanılmaktadır (Cheang vd., 2008). Eskiden invazif duktal karsinoma olarak bilinen, özel bir tipi olmayan (NST) invaziv meme kanserinin en sık görülen alt tipidir (%40-80) (Weigelt vd., 2008). İnvaziv meme kanserlerinin yaklaşık %25'i belirgin büyüme paternleri ve sitolojik özellikler gösterir, bu nedenle de spesifik alt tipler olarak tanınırlar (örn. invaziv lobüler karsinoma, tübüler, müsinöz A, müsinöz B, nöroendokrin) (Erber & Hartmann, 2020).

İnvaziv meme kanseri, mRNA gen ekspresyon seviyelerine göre moleküler alt tiplere ayrılabilir. 2000 yılında Perou ve ark. 38 meme kanseri örneğinde, mikrodizi gen ekspresyon verilerinden dört moleküler alt tip tanımlamışlardır (Tablo 2.1.). Histolojik alt tiplerden bağımsız olarak; luminal, HER2 ile zenginleştirilmiş, bazal benzeri ve normal meme benzeri olarak moleküler sınıflandırma yapılmaktadır. Luminal grubu Luminal A ve B olarak iki alt gruba ayrılır (Prat & Perou, 2011). Kanser Genom Atlası Projesi'nde (TCGA) 300'den fazla birincil tümörün DNA, RNA ve protein seviyelerinde profili çıkarılmış konsensüs kümelemesi, yalnızca mRNA gen ekspresyon seviyelerine (Luminal A, Luminal B, HER2 ile zenginleştirilmiş ve bazal benzeri) dayanan dört ana meme kanseri (Tablo 2.1.) intrinsik alt tipinin ayrımını doğrulamıştır (Pommier vd., 2020) . Bunlara Ek olarak, 5. içsel alt tip claudin-low meme kanseri, 2007'de insan ve murin meme tümörlerinin entegre bir analizinde keşfedilmiştir (Herschkowitz vd., 2007).



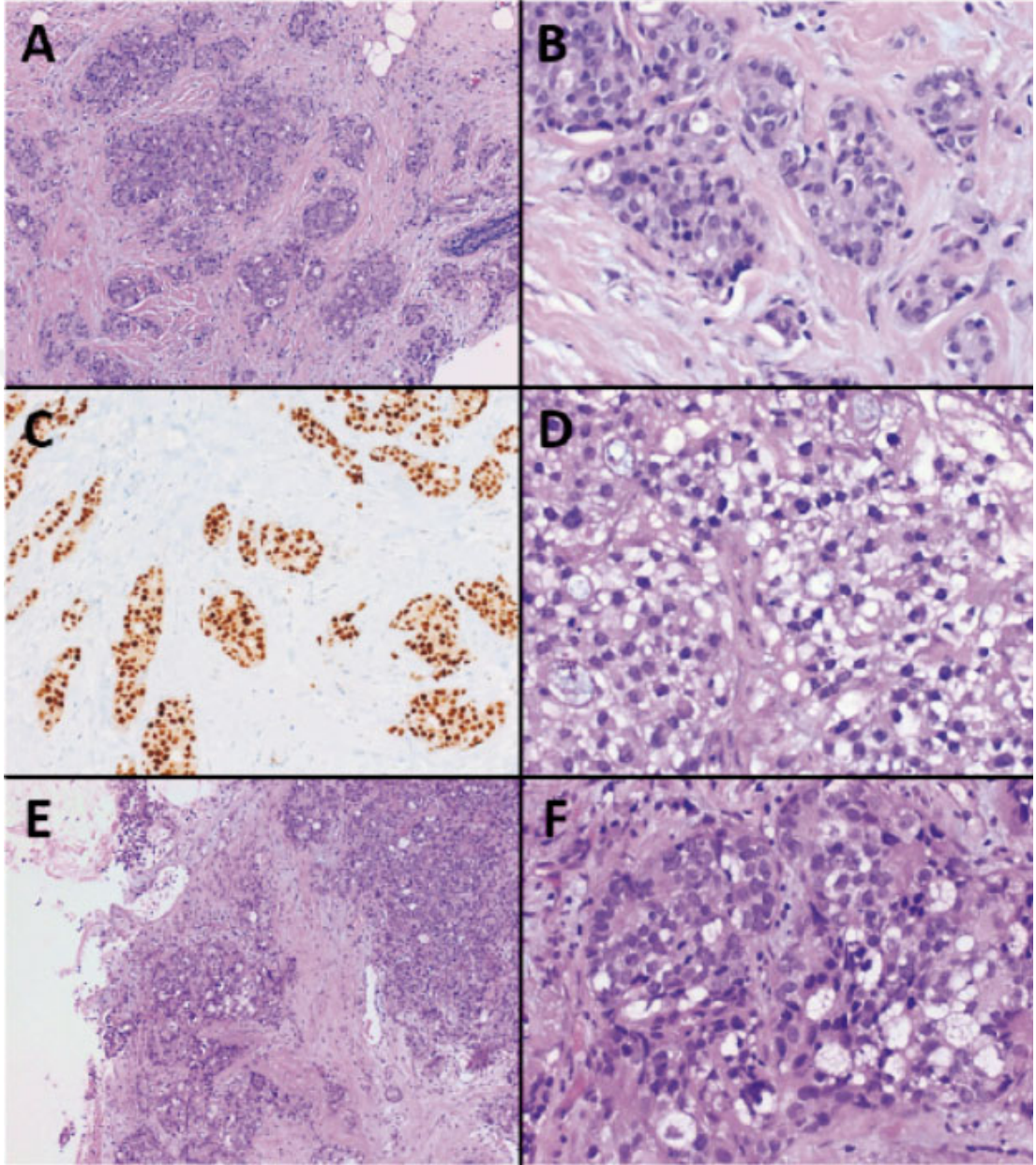
Şekil 2.9. Meme Kanserinin histolojik ve moleküler sınıflandırması (Ross vd., 2008).

Tablo 2.1. Meme kanserinin dört moleküler alt tipi ve hormonal durumları (Song & Zhang, 2019).

Subtypes	ER	PR	HER2	Ki-67
Luminal A	+	+/-	-	<14%
Luminal B	+	+/-	+/-	≥14%
HER2+	-	-	+	≥14%
TNBC	-	-	-	≥14%

2.4.3.1. Luminal Meme Kanseri

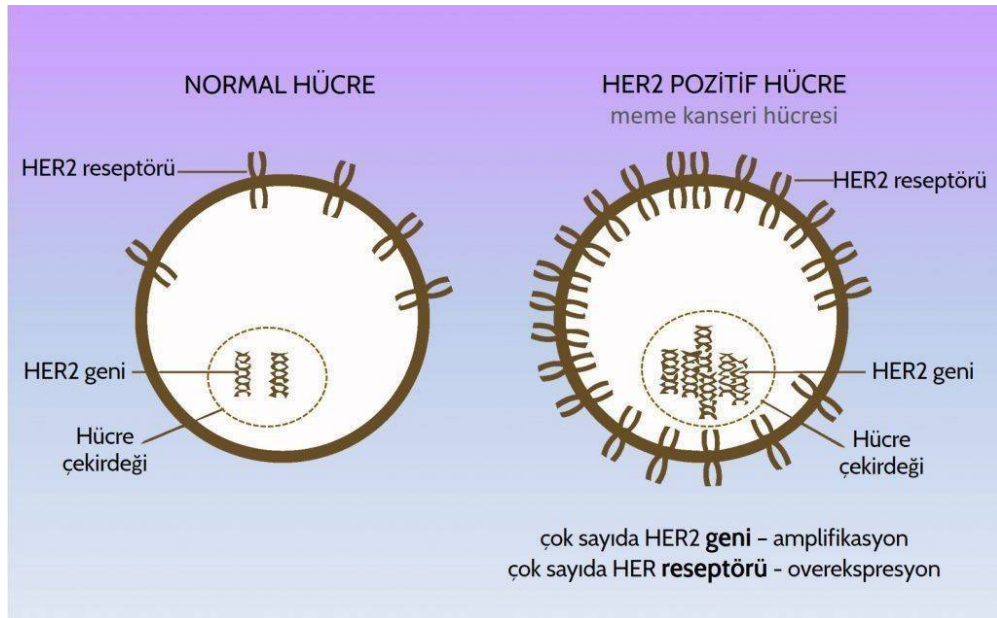
Luminal meme kanserleri, batıdaki tüm meme kanseri vakalarının neredeyse %70'ini oluşturan ER-pozitif tümörlerdir. En yaygın olarak Luminal benzeri kanserler, özel bir alt tipi olmayan IBC olarak ortaya çıkar (Şekil 2.10.), ancak nadiren invazif lobüler, tübüler, invazif kribriform, müsinöz ve invazif mikropapiller karsinomlara farklılaşabilirler. İki temel biyolojik süreç olan hücre çoğalması ile ilişkili yollar ve lümen tarafından düzenlenen mekanizmalar, meme kanserini daha iyi anlamamıza yardımcı olur. Bu süreçler, meme kanserlerini Luminal A ve B gibi alt tiplere ayırmamıza olanak tanır. Bu alt tipler, farklı klinik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir. Luminal A tümörleri, ER veya PR varlığı ve HER2'nin yokluğu ile karakterize edilir. Bu alt tipte, ER transkripsiyon faktörleri, ekspresyonu, meme kanallarını kaplayan lümen epiteli için karakteristik olan genleri aktive eder (Prat vd., 2013). Proliferasyon ile ilişkili genlerin düşük ekspresyonuna sahiptir. Klinik olarak düşük derecelidirler, yavaş büyürler ve en iyi prognoza sahip olma eğilimindedirler. Alt tip A'nın aksine, Luminal B tümörleri daha yüksek derecelidir ve daha kötü prognoza sahiptir. ER pozitifler ve PR negatif ve/veya HER2 pozitif olabilirler. Ek olarak, proliferasyonla ilişkili genlerin (örn. MKI67 ve AURKA) yüksek ekspresyonuna sahiptir. Bu alt tip, PR ve FOXA1 gibi lümen epiteli için tipik olan genlerin veya proteinlerin daha düşük ekspresyonuna sahiptir. ER, hem A hem de B alt tiplerinde benzer şekilde eksprese edilir ve luminal tip ile luminal olmayan tipi ayırt etmek için kullanılır (Prat vd., 2013).



Şekil 2.10. Luminal Benzeri İnvazif meme kanseri histolojisi (Erber &Hartmann, 2020). A: Hematoksilen-eosin boyama (H&E) 100x. B: (H&E) 400x. C: ER immünohistokimyası 200x. D: Glikojen birikimine bağlı, ağırlıklı olarak berrak sitoplazmaya sahip IBC'nin glikojen açısından zengin şeffaf hücre modeli) (H&E) 400x. E ve F: Bol ve vakuollü sitoplazmalı sebasöz hücrelerin tipik özelliklerine sahip IBC'nin sebasöz modeli 100x ve 400x.

2.4.3.2. HER2 ile Zenginleştirilmiş Grup

Meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturur. ER ve PR yokluğu ve HER2'nin yüksek ekspresyonu ile karakterize edilirler. Bu alt tip, luminal ve bazal gen ile protein kümelerinden daha çok proliferasyonla ilişkili genleri ve proteinleri (örneğin, ERBB2/HER2 ve GRB7) ifade eder. HER2 ile zenginleştirilmiş alt tipte, APOBEC3B'nin aracılık ettiği bir mutagenез vardır. APOBEC3B, sitozin mutasyon indükleyen ve mutasyon kümelerinin kaynağı olan APOBEC sitidin deaminazların bir alt sınıfıdır. HER2 ile zenginleştirilmiş kanserler daha hızlı büyür ve alt tipler arasında en kötü prognoza sahip olandır (Şekil 2.11.). Daha da önemlisi, HER2 ile zenginleştirilmiş alt tip, klinik olarak HER2-pozitif meme kanseri ile aynı değildir çünkü birçok ER-pozitif/HER2-pozitif tümör, luminal B grubu için uygundur. Ayrıca, HER2 ile zenginleştirilmiş tümörlerin yaklaşık %30'u, immünohistokimya (IHC) ve/veya floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemlerine dayanarak klinik olarak HER2-negatif olarak sınıflandırılır (Plasilova vd., 2016).



Şekil 2.11. HER2 pozitif hücre (drozdogan.com)

2.4.3.3. Bazal Benzeri/Üçlü Negatif Meme Kanseri

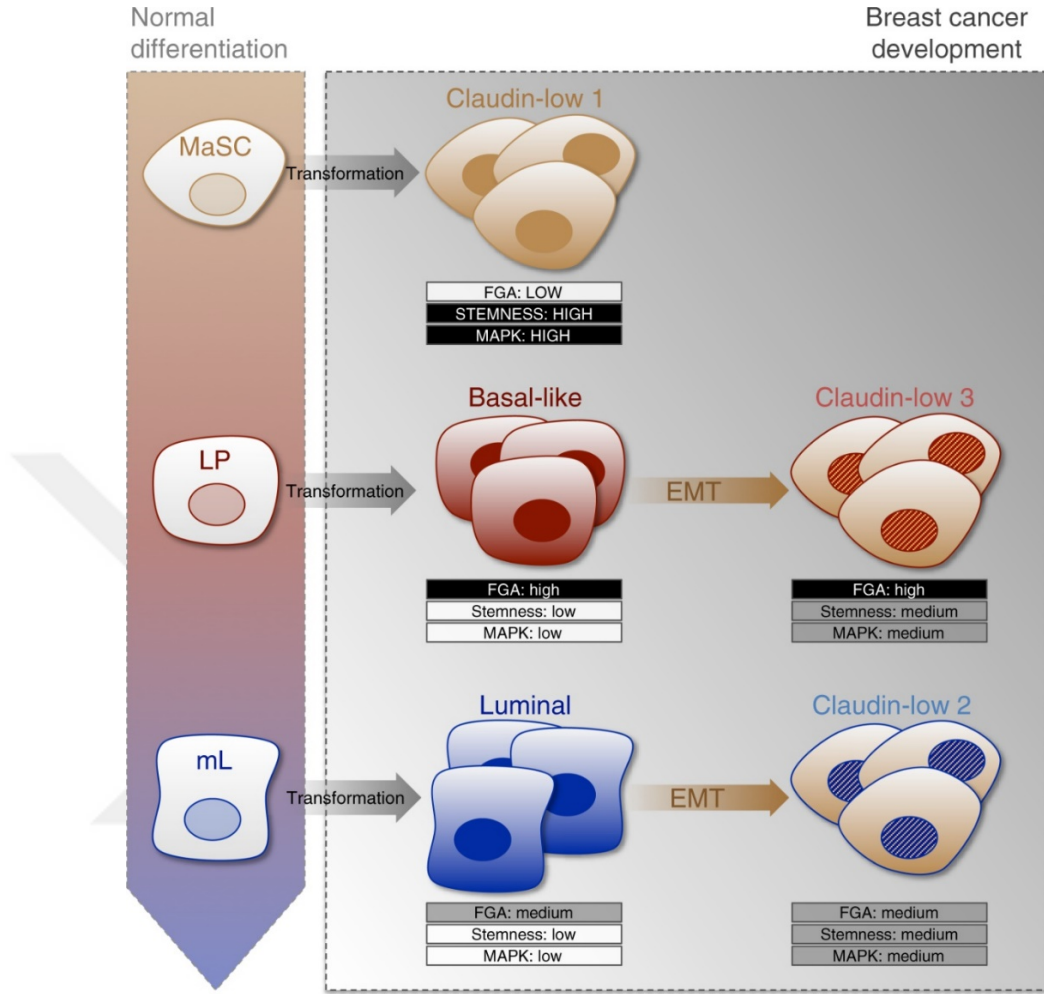
Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC), ER-negatif, PR-negatif ve HER2-negatif olarak karakterize edilen heterojen bir meme kanseri topluluğudur. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluştururlar. TNBC, 40 yaşından küçük kadınlar ve Afrikalı-Amerikalı kadınlar arasında daha yaygındır. TNBC hücreleri, hem ER, hem PR, hem de HER2 taşımadığı için mevcut pek çok tedavi yöntemine yanıt vermez. TNBC hücrelerinin kökeni ve biyolojisi tam olarak anlaşılamamış olmakla beraber, kanser kök hücreleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Arı, 2018).

Kanser kök hücrelerinin eliminasyonu için geliştirilen yeni tedavi yaklaşımlarından biri, gelişimsel sinyal yollarından olan Notch sinyal yolunun inhibisyonudur. Notch sinyal yolu, TNBC hücrelerinde apoptoz, proliferasyon, anjiyogenez ve farklılaşma mekanizmaları üzerinde etkilidir. BRCA1 germ hattı mutasyonundan kaynaklanan meme kanserlerinin yaklaşık %80'i TNBC'dir ve tüm TNBC'lerin %11-16'sı ise BRCA1 veya BRCA2 germ hattı mutasyonlarını barındırır. TNBC biyolojik olarak agresif olma eğilimindedir ve genellikle daha kötü bir prognoz ile ilişkilidir (Newman vd., 2015). TNBC'de görülen en yaygın histoloji, infiltrate edici duktal karsinomdur, ancak belirgin bir lenfositik infiltrat ile medüller benzeri kanserler olarak da ortaya çıkabilir. Bazal benzeri ve TNBC terimleri birbirinin yerine kullanılmıştır; ancak, tüm TNBC'ler bazal tipte değildir. Gen ekspresyon profilinde, TNBC'ler, bazal benzeri (BL1 ve BL2), mezenkimal (M), mezenkimal gövde benzeri (MSL), immünomodülatör (IM) ve lümen androjen reseptörü (LAR) olmak üzere altı alt tipe ayrılabilir (Herschkowitz vd., 2007).

2.4.3.4. Claudin Meme Kanseri

Claudin-low (CL) meme kanserleri, çoğunlukla ER-negatif, PR-negatif ve HER2-negatif olan kötü prognozlu tümörlerdir (Şekil 2.12). CL tümörleri, tüm invazif meme kanserlerinin %7-14'ünü oluşturur. CL alt tipi, claudin 3, 4 ve 7, okludin ve E-kadherin dahil olmak üzere hücre-hücre adhezyonunda yer alan genlerin düşük ekspresyonu ile karakterize edilir. Ayrıca, bu tümörler epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) genlerinin yüksek ekspresyonunu gösterir. CL tümörleri belirgin immün ve stromal hücre infiltrasyonuna sahiptir (Dias vd., 2017). Daha az diferansiye

durumları ve EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörünün önleyici etkisi nedeniyle, ZEB1 CL tümörleri genellikle genomik olarak stabildir (Morel vd., 2017).



Şekil 2.12. Claudin-low türü meme kanserinin gelişim aşamaları (Pommier et al., 2020).

2.4.4. Prognostik Biyobelirteçler

ER, invazif meme karsinomalarıyla ilişkilendirilen bir biyobelirteçtir. Tümörlerin yaklaşık %70-75'i, belirgin bir şekilde yüksek ER ekspresyonu ile karakterize edilir. Bu nedenle de, ER'nin ölçülmesi, hem birincil meme tümörleri hem de tekrarlayan lezyonlar üzerinde gerçekleştirilen değerlendirmelerde önem taşır.

ER'in ifadesindeki değişikliklerin teşhisi, tedavi seçimi açısından büyük önem taşırken, aynı zamanda bir prediktif faktör olarak da hizmet edebilir. Yüksek ER ifadesine sahip hastalar genellikle daha iyi klinik sonuçlar elde etme eğilimindedir.

Ayrıca, ailesinde meme kanseri öyküsü olan kişilerde ER ekspresyonu ile meme kanseri arasında bir ilişki gözlemlenmiştir. Bu nedenle, özellikle ailesel risk durumlarında ER ekspresyonu, meme kanserinin tanısal biyo-belirteci olarak kullanılabilir (Liu vd., 2023).

ER α -36 ekspresyonu konusunda yapılan çalışmalar, bu belirtecin PR-pozitif kanserler için potansiyel bir hedef olduğunu ve aynı zamanda prognostik bir belirteç olarak işlev görebileceğini bildirmiştir. Bu bulgular, meme kanserinde ER'nin önemini ve farklı alt tiplerdeki rolünü vurgulamaktadır (Tse vd., 2015; Konan vd., 2020).

PR, meme kanserinde önemli bir rol oynar. Özellikle ER-pozitif hastalarda yüksek oranda ifade edilirken, ER-negatif meme kanserinde daha nadir görülür. PR ekspresyonu, ER tarafından düzenlenir ve PR seviyeleri, meme kanserinin fizyolojik özellikleri hakkında bilgi verir. Hem ER hem de PR, meme kanseri hücrelerinde yoğun bir şekilde ifade edilir ve bu nedenle meme kanserinin tanı ve prognozunda önemli biyobelirteçler olarak kabul edilirler.

HER2 ise, meme kanserinin diğer bir önemli hedefidir. HER2 ekspresyonu, meme kanserlerinin %15-25'ini oluşturur ve özellikle tedavi seçiminde büyük bir rol oynar. HER2'nin aşırı ekspresyonu, meme karsinogenezinin erken aşamalarında meydana gelir ve HER2 pozitif meme kanseri hastalarında metastaz ve nüks riskini artırır. Serum HER2 düzeyleri, tümörün varlığını veya nüksetmesini belirlemede umut verici bir belirteç olarak kabul edilmektedir. HER2 amplifikasyonu, kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesine yol açarak, kanserli hücrelerde onkojenik sinyal yollarının aşırı aktive olmasına neden olur. Bu durum HER2 pozitif meme kanseri hastalarında daha kötü klinik sonuçlarla ilişkilidir (Won & Spruck, 2020).

Genel olarak, PR ve HER2, meme kanserinde önemli biyo-belirteçlerdir ve hastaların tanı ve tedavi süreçlerinde ve değerlendirilmesinde büyük önem taşırlar. (Iqbal & Iqbal, 2014).

Antijen Ki-67, hücre çoğalmasının bir belirtecidir ve Ki-67 çoğalma indeksi, özellikle meme kanseri durumunda kanserli hücrelerin çoğalması hakkında bilgi

sağlamak için idealdir. Ki-67 tarafından belirlenen bir proliferatif aktivite, tedaviye yanıt ve nüks süresi ile birlikte kanserin agresifliğini yansıtır. Bu nedenle Ki-67, uygun tedavinin seçimi ve nüks nedeniyle olası takipler açısından çok önemlidir. Ki-67, potansiyel bir prognostik faktör olarak da düşünülebilir; 12.155 hastayı içeren 68 çalışmanın meta-analizine göre, Ki-67'nin aşırı ekspresyonu hastaların daha kötü klinik sonuçları ile ilişkilidir. Ki-67'nin yüksek ekspresyonu aynı zamanda meme kanseri hastalarının daha düşük hayatta kalma oranlarının düştüğünü gösterir (Pathmanathan vd., 2014).

Mib1 (Ki-67'ye karşı antikor), proliferasyon indeksi, Ki-67'ye benzer şekilde meme kanseri için güvenilir bir tanısal biyobelirteç olmaya devam etmektedir. Hem Mib1 hem de Ki-67 ekspresyon seviyelerindeki bir azalma, meme kanseri hastalarının ameliyat öncesi tedaviye iyi bir yanıt vermesiyle ilişkilidir. Mib1 seviyeleri, eş zamanlı p53 mutasyonları olan hastalarda anlamlı olarak daha yüksektir. Mib1 değerlendirmesi, mitotik indeks ve S-fazı değerlendirmesi için uygun olmayan, küçük biyopsi örneklerinin olduğu durumlarda fayda sağlamaktadır (Caly vd., 2004).

E-Kadherin, epitelyal-mezenkimal geçişte (EMT) kritik bir proteindir; E-Kadherin ekspresyonunun kaybı, metastaz riskinin artmasıyla daha da ilişkili olan mezenkimal fenotipe kademeli dönüşüme yol açar. Bazı araştırmalar, ekspresyonunun potansiyel olarak tümör boyutu, TNM evresi veya lenf düğümü durumu gibi birkaç meme kanseri özelliği ile ilişkili olduğunu göstermiştir. E-kadherin ekspresyonunun düşük veya tamamen kaybı, meme kanserinin histolojik alt tipinin belirlenmesinde fayda sağlamaktadır. E-kadherin seviyeleri, hastaların sağ kalım oranlarının değerlendirmesi açısından umut verici görünmemekle birlikte yüksek E-kadherin seviyelerinin, invazif meme karsinomalı hastalarda daha kısa sağkalım oranları ile ilişkili olduğunu gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca, azalan E-Kadherin ekspresyonunun lenf nodu metastazı ile pozitif olarak ilişkilendirildiği belirtilmiştir. Bu bulgular, meme kanserinde E-Kadherin ekspresyonunun hastalığın seyri ve prognozunun anlaşılmasında önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.(Borcherding vd., 2018; Yang vd., 2018).

Dolaşımdaki dairesel RNA, (circRNA'lar), kodlamayan RNA grubuna aittir ve yakın zamanda, apoptoz, artmış proliferasyon veya artmış metastatik potansiyel dahil

olmak üzere meme karsinogenezinin çeşitli özellikleri açısından çok önemli oldukları gösterilmiştir (Jahani vd., 2020). Çoğunlukla meme kanserine özgü olan en kapsamlı şekilde tanımlanmış circRNA'lardan biri, üçlü negatif meme kanseri (TNBC) olan hastalar için potansiyel bir tanısal biyobelirteç ve terapötik araç olarak önerilen circFBXW7'nin yanı sıra bol miktarda eksprese edilen hsa_circ_0072309'u içerir. Has_circ_0001785'in meme kanserinde tanısal bir biyobelirteç olarak umut verici olduğu düşünülmektedir (Brown & Chinnaiyan, 2020).TNBC, HER2-pozitif ve ER-pozitif gibi farklı meme kanseri türlerinde spesifik circRNA'lar rapor edilmiştir. Son zamanlarda, circRNA'lar ve mikro-RNA arasındaki bir etkileşimin yanı sıra Cx43/has_circ_0077755/miR-182 post-transkripsiyonel eksen biçimindeki bir etkileşimin, meme kanseri başlangıcını ve ayrıca ileri prognozu tahmin edebileceği gösterildi. Connexin-43 (Cx43), hücreler arası iletişimi kolaylaştıran ve epitelyal homeostazın sürdürülmesinden sorumlu transmembran bir proteindir. Cx43'ün kaybı, meme kanserinin başlangıcında transkripsiyon sonrası işlemleri düzensizleştirir. (Naser Al Deen vd., 2021).

TP53 (P53), genindeki işlev kaybı mutasyonları, osteosarkomlar, lösemi, beyin tümörleri, adrenokortikal karsinomlar ve meme kanserleri dahil olmak üzere çok sayıda kanser türünde bulunmuştur. P53 proteini, hücre döngüsünün durdurulması, apoptoz, DNA onarımı ve hücre yaşlanma dahil olmak üzere hücre stres tepkilerine aracılık ederek normal hücre homeostaz ve genomun korunması için mutlak gereklidir. P53 geninin susturulması mutasyonu, kanser ilerlemesinin erken bir aşamasında belirgindir. Meme kanserinde, TP53 mutasyonlarının prevalansı, TNBC'li hastaların yaklaşık %80'inde ve Luminal A hastalığı olan hastaların %10'unda mevcuttur (Duffy vd., 2018).

MikroRNA'lar (miRNA'lar), 19-25 nükleotit uzunluğunda endojen kodlamayan RNA moleküllerinin ana sınıfı olup, bir dizi düzenleyici rol üstlenir. Bazı miRNA'lar, tümörün gelişimi, ilerlemesi ve tedaviye yanıt ile ilişkilendirilmiştir. Meme kanseri dokularında anormal şekilde ekspresyon gösteren miRNA'lar biyobelirteç olarak incelenmiştir. Adhami ve ekibinin 2018 yılında gerçekleştirdiği meta-analize göre, miRNA-21 ve miRNA-210 sürekli olarak ifadesi artmış, altı miRNA'nın (miRNA-145, miRNA-139-5p, miRNA-195, miRNA-99a, miRNA-497 ve miRNA-205) ise sürekli olarak ifadesi azalmıştır. MiRNA-21'in aşırı ekspresyonu, TNBC dokularında

gözlemlenmiş ve bu durum TNBC hücrelerinin gelişmiş invazyon ve proliferasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde, miRNA-210'un yüksek ekspresyonu, meme kanseri hastalarında tümör proliferasyonu, invazyonu ve hayatta kalma oranlarının düşük olması ile ilişkilendirilmiştir. MiRNA-145, TGF-21 ekspresyonunu düzenleyerek meme kanseri hücrelerinin göçünü ve proliferasyonunu inhibe etme kapasitesine sahip bir anti-kanser ajanı olarak bilinmektedir. Benzer şekilde, miRNA-139-5p ve miRNA-195, çeşitli kanserlerde tümör baskılayıcı aktivite sergileyebilir (Sun vd., 2015; Savari vd., 2020).

Tümörle ilişkili makrofajlar (TAM), immün sistemi düzenleme yetenekleri ile bilinirler ve fenotiplerine göre M1 veya M2 benzeri hücresel durumlara ayrılabilirler. M1 makrofajları, IL-12 ve tümör nekroz faktörü gibi antimikrobiyal ve antitümör etkileri olan sitokinler salgırlar. Öte yandan, M2 makrofajları, IL-10, IL-1 reseptörü antagonisti tip II ve IL-1 tuzak reseptörü gibi çeşitli sitokinler üretirler. Bu fenotip, dokuların yeniden yapılanması, bağışıklık düzenlemesi ve tümör büyümesi gibi süreçlerde önemli bir rol oynar. Bu nedenle, M1 benzeri fenotipe sahip makrofajlar, iyi hastalık seyri ile ilişkilendirilirken, M2 benzeri fenotip, potansiyel olarak immünosupresyon ve anjiyogenez ve tümör hücresi proliferasyonu ve invazyonunun teşvik edilmesi yoluyla ortaya çıkan negatif sonuçlarla alakalıdır (Biswas vd., 2013). Literatürde, TAM tümör büyümesini ve metastazını destekleyen M2 makrofajlarının varlığı belirlenmiştir. Meme kanseri için çalışmalar, TAM'lerin yoğunluğunun hormon reseptör durumu, evre, histolojik derece, lenf nodu metastazı ve vasküler invazyon ile paralellik göstermiştir. Zhao ve ekibinin 2017 yılında gerçekleştirdiği bir meta-analize göre, TAM'lerin yoğunluğunun artışı, genel sağkalım ile pozitif bir ilişki göstermektedir (Zhao vd., 2017).

Enflamasyon Bazlı Modeller, Tümör ve mikroçevresindeki konak inflamatuvar ve immün yanıtları, kanser gelişimi ve ilerlemesinde kritik bileşenlerdir. Tümörün indüklediği sistemik inflamatuvar yanıt, periferik kan lökositlerde değişikliklere yol açar. Bu nedenle, periferik kan inflamatuvar hücreleri arasındaki ilişki, hasta prognozunu tahmin etmede erişilebilir ve erken bir yöntem olarak hizmet edebilir.

Nötrofil-Lenfosit Oranı (NLR), 27.031 kanser hastası üzerinde yapılan kapsamlı bir çalışmada, Proctor ve arkadaşları (2012) NLR'nin prognostik değeri üzerindeki

analizleri ve meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde NLR ile hayatta kalma arasında anlamlı bir ilişki saptamıştır zıt olarak nötrofiller, lenfositlerin sitolitik aktivitesini baskılayarak, artmış anjiyogenez ve tümör büyümesi ve ilerlemesine yol açar. Azab ve ark. (2012) ilk olarak kemoterapi öncesi NLR'nin uzun vadeli mortalite için bağımsız bir faktör olduğunu ve bunu meme kanserinde yaş ve tümör boyutu ile ilişkilendirdiğini bildirmiştir. Guo ve arkadaşları tarafından 17.079 kişi üzerinde gerçekleştirilen yakın tarihli bir meta-analizde, yüksek NLR düzeyi meme kanseri hastalarında düşük genel sağkalım oranları ile ilişkilendirildi. Ayrıca, NLR ile genel sağkalım arasındaki ilişkinin TNBC hastalarında HER2-pozitif olanlardan daha güçlü olduğu bildirilmiştir.

Lenfosit-Monosit Oranı (LMR), hastaların prognozu ile ilişkisi birkaç kanser için bildirilmiştir. Lenfositler, sitotoksik hücre ölümünü indükleyerek ve tümör proliferasyonunu inhibe ederek bir antitümör aktiviteye sahip olduklarından monositler, TAM'lere farklılaşma da dahil olmak üzere tümörjenizde rol oynar. Tümör mikroçevresinde, monositler ve makrofajlar tarafından salgılanan sitokinler ve serbest radikaller, anjiyogenez, tümör hücresi invazyonu ve metastaz ile ilişkilidir.

Trombosit-Lenfosit Oranı (PLR), Yüksek trombosit sayısı, çeşitli kanser türlerinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Trombositler hem proinflatuar molekülleri hem de sitokinleri (P-selektin, CD40L ve interlökin (IL)-1, IL-3 ve IL-6) ve birçok anti-inflatuar sitokini içerir. Tümör anjiyogenezi ve büyümesi, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, vasküler endotelial büyüme faktörü, dönüştürücü büyüme faktörü-beta ve trombosit faktörü 4'ün salgılanmasıyla uyarılabilir. Bir meta-analiz çalışması, 5542 meme kanseri hastasını analiz ederek, PLR'nin prognostik önemi araştırılmıştır. Yüksek PLR düzeyi, kötü prognoz ile ilişkilendirildi, ancak meme kanserinin moleküler alt tipleri için prognostik değeri belirlenmemiştir. Bununla birlikte, PLR ile tümörün evre, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz gibi kliniko-patolojik özellikleri arasında bir ilişki bulunmuştur (Zhang vd., 2017).

2.4.5. Meme Kanseri Hücre Soyları

İnsan meme kanseri hücre soyları araştırmalarda yaygın olarak kullanılır ve farklı özelliklere sahip birçok hücre soyu bulunmaktadır.

MCF-10A: Normal meme hücrelerinin kültüre edilmiş formudur. Meme hücresinin özelliklerini çalışmak ve kanser ile karşılaştırmak amaçlı olarak deneylerde kullanılır.

T-47D: İnvaziv duktal karsinomanın bir örneğidir ve ER ve PR pozitif olarak ifade edilir. Hormon reseptörleri ile ilgili çalışmalarda kullanılır.

BT-474: İnvaziv duktal karsinoma örneğidir ve aşırı miktarda HER2 ifade eder. HER2 pozitif meme kanseri çalışmalarında sıklıkla kullanılır.

ZR-75-1: Bu hücre soyu, ER pozitif duktal karsinoma örneğidir. Hormon reseptörlerinin çalışmalarında ve hormon tedavilerinin etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılır.

ZR-75-30: ER pozitif bir duktal karsinoma örneğidir. Hormon reseptörlerinin çalışmalarında sıkça kullanılır.

SK-BR-3: HER2 pozitif duktal karsinoma örneğidir. HER2 reseptörünün rolünün anlaşılmasında ve ilaçların etkinliğinin test edilmesinde kullanılır.

HCC1937: BRCA1 mutasyonuna sahip olan bir duktal karsinoma örneğidir. Genetik araştırmalar ve BRCA1 ile ilişkili kanser mekanizmalarının çalışmalarında kullanılır.

HS578T: İnvaziv duktal karsinomanın bir örneğidir ve üçlü negatif özellik gösterir. Metastazın ve invaziv büyümenin çalışmalarında kullanılır.

BT-549: Agresif bir üçlü negatif meme kanseri hücre soyudur. TNBC özelliklerinin ve tedavi seçeneklerinin incelenmesinde tercih edilir.

SUM149: TNBC hücre soyudur. İnflamatuvar meme kanserinin araştırılmasında tercih edilir.

MDA-MB-468: ER, PR ve HER2 geni pozitif değildir.

MDA-MB-453: HER2 pozitif bir duktal karsinoma hücre soyudur. HER2 reseptörünün rolünün anlaşılması ve ilaçların etkinliğinin test edilmesi için kullanılır.

MDA-MB-361: HER2 pozitif bir duktal karsinoma örneğidir. HER2 ile ilişkili kanser mekanizmalarının ve ilaçların etkinliğinin çalışılmasında tercih edilir.

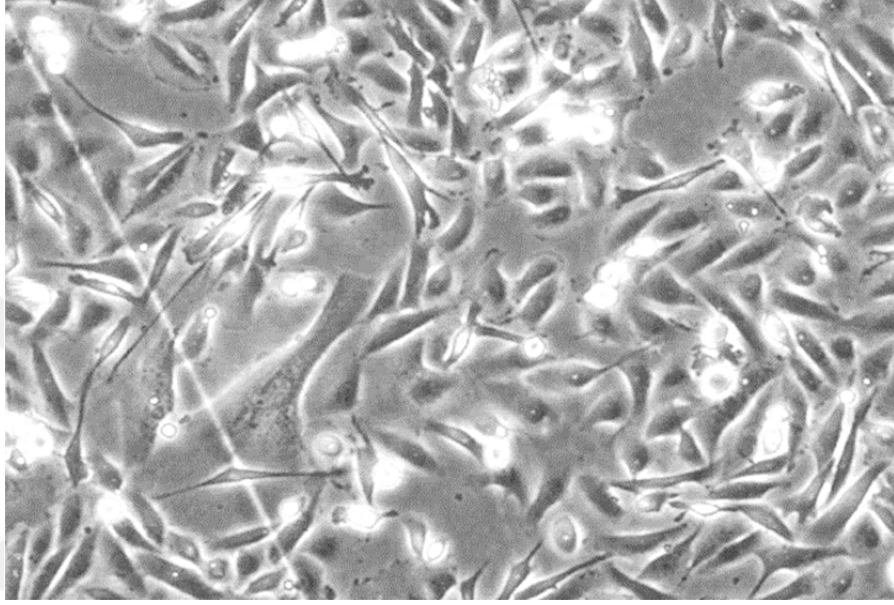
MDA-MB-415: Duktal karsinoma hücre soyudur, meme kanseri çalışmalarında kullanılır.

MDA-MB-231: Çalışmamızda da kullandığımız bu hücre soyu invaziv duktal karsinomanın agresif bir formunu temsil eder. Bu hücreler, metastaz ve invaziv büyüme çalışmalarında yaygın olarak kullanılır. 51 yaşında metastatik meme adenokarsinomu olan Kafkas kökenli bir kadın hastanın plevral efüzyonundan elde edilmiş, epitelyal özelliklere sahip insan meme kanseri hücre hattıdır. Bu hücre hattı, araştırma laboratuvarlarında ve araştırmalarda en yaygın kullanılan meme kanseri hücre hatlarından biri olarak kabul edilir.

MDA-MB-231, ER ve PR ekspresyonu bulunmayan yanı sıra HER2 amplifikasyonu da göstermeyen, oldukça agresif, invaziv ve kötü diferansiye olmuş üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre hattıdır (Chavez vd., 2010). Diğer invaziv kanser hücre hatları gibi, MDA-MB-231 hücrelerinin invazivliği hücre dışı matriksin proteolitik parçalanması yoluyla iletilir.

ER ve PR ekspresyonunun eksikliği ile HER2 amplifikasyonuna sahip olmaması sonucu, bu hücre hattı başlangıçta 'bazal' meme kanseri hücre hattı olarak sınıflandırılmıştır. Ancak günümüzde, claudin-3 ve claudin-4'ün düşük düzeyde ifadesi, Ki-67 proliferasyon belirteci için düşük düzeydeki ifadesi, epitelyal-mezenkimal geçişle ilişkilendirilen işaretleyicilerin zenginleşmesi ve meme kanseri kök hücreleri (CSC'ler) ile ilişkilendirilen özellikleri sergilediğinden, claudin-düşük moleküler alt tipine ait olduğu kabul edilir. Bu özellikler arasında CD44+CD24-/düşük fenotipi de bulunmaktadır. 3D kültürde, hücre hattı endotelyum benzeri morfoloji sergiler (Şekil 2.13.) (Kenny vd., 2007).

Üçlü negatif meme kanseri, sınırlı tedavi seçenekleri olan agresif bir meme kanseri türüdür. Üçlü negatif meme kanserinin moleküler temelini anlamak, etkili yeni tedavi metodları ve ilaçlar geliştirmek üzere potansiyel etkin ajanlarla pek çok çalışma, MDA-MB-231 hücre hattı kullanılarak yapılmaktadır. MDA-MB-231 hücre hattı, kemik metastazı araştırmaları için de iyi bir araç olarak kabul edilmiştir (Simmons vd., 2015).



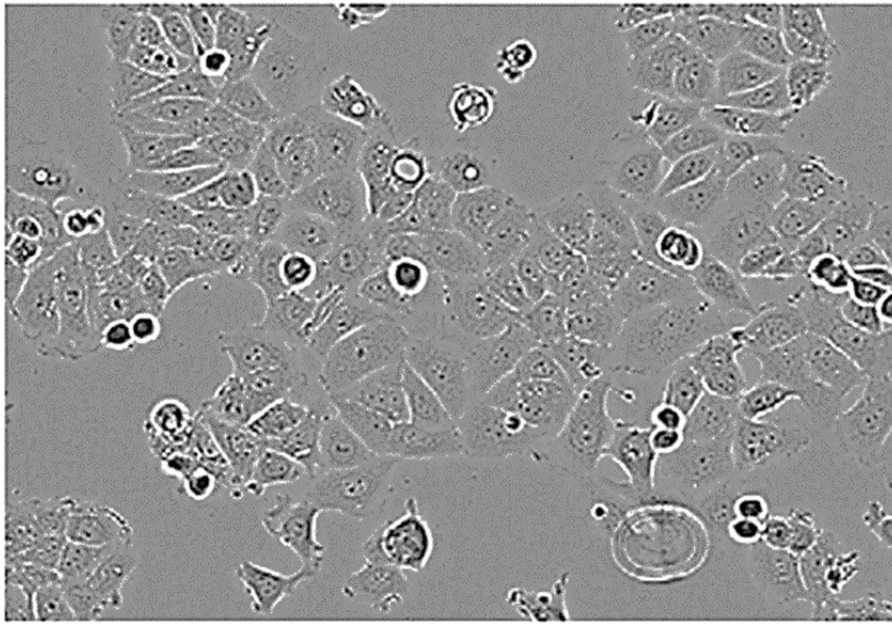
Şekil 2.13. Kültür ortamında MDA-MB-231 hücreleri.

MCF7: ER pozitif bir duktal karsinoma hücre soyudur. Hormon reseptörlerinin rolünün ve hormon tedavilerinin etkilerinin incelenmesinde kullanılır. 69 yaşındaki meme adenokarsinomu taşıyan bir kadının plevral efüzyonundan elde edilmiştir. Michigan Kanseri Vakfı (MCF) adından türetilmiş olup dünyadaki en çok çalışılan insan meme kanseri hücre hattıdır.

Hücre hattının epitel benzeri bir morfolojisi vardır ve tek tabakadır, kültür kabı ile hücre tabakası arasında sıvı birikimi nedeniyle kubbe yapıları oluşturur (Şekil 2.14.). Östrojen reseptörü alfa (ER- α)3-5 ifade eden az sayıdaki meme kanseri hücresinden biridir. Hücreler ayrıca androjen, progesteron ve glukokortikoid reseptörlerini de ifade eder, bu da onları tıbbi araştırmalarda değerli araçlar haline getirmektedir. MCF7'nin östrojenlerle tedavisinin, antiapoptotik bir etkisi olduğu gösterilmiştir oysa

anti-östrojen kemoterapi ilaçları (örneğin tamoksifen) ile tedavi, proliferasyonu inhibe ederek kültürlerin büyümesini azaltabilir ve apoptozu indükleyebilir (Zheng vd., 2007).

Hücre kültür medyumunda yaygın olarak kullanılan fenol kırmızısının zayıf bir östrojen olduğu ve MCF7 hücrelerinde bulunan reseptörlere bağlanabildiği gösterilmiştir (Berthois vd., 1986; Bindal & Katzenellenbogen, 1988). Östrojen aktivitesini inceleyen çalışmalar için fenol kırmızısı içemeyen medyum kullanımı önerilmektedir (Cooper, 2012).



Şekil 2.14. Kültür ortamında MCF-7 hücreleri.

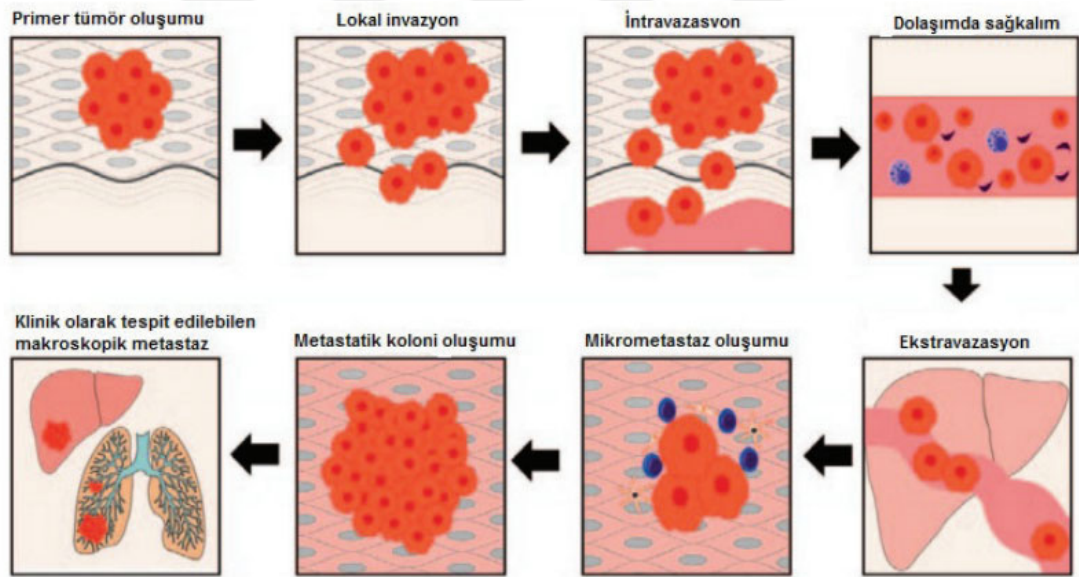
2.5. METASTAZ

Metastaz, kanser hücrelerinin primer tümörden ayrılarak vücudun diğer bölgelerine yayılmasıdır. Bu süreç, kanserin yayılmasını ve sekonder tümörlerin oluşmasını sağlar. Kanser hücrelerinin orijinal tümörden ayrılması, dolaşım sistemine girmesi, dolaşarak vücudun farklı bölgelerine taşınması ve nihayetinde yeni bir bölgede yerleşip çoğalmalarını içerir ve bunlar metastazın aşamalarını oluşturur. Bu aşamaların her biri karmaşık biyokimyasal ve hücresel süreçlerle yönlendirilir. Metastaz, kanser hastalarının hayatta kalma şansını önemli ölçüde etkileyebilir. Bu nedenle,

metastazın önlenmesi veya tedavi edilmesi, kanser tedavisinin temel hedeflerinden biridir. Metastaz süreci temel birkaç aşamadan oluşur (Şekil 2.15.):

Angiogenez: Kanser hücreleri, büyümek ve yayılmak için ihtiyaç duydukları besin ve oksijeni alabilmek adına yeni kan damarlarının oluşumunu teşvik eder. Bu yeni kılcal kan damarlarının oluşumuna "angiogenez" denir. Öncelikle primer tümörde besin ve oksijen bu şekilde tümörün iç kısımlarındaki hücrelere ulaşabilir.

İnvazyon: Metastaz süreci, kanser hücrelerinin ilk olarak orijinal tümörün çevresindeki dokulara yayılma aşaması ile başlar. Bu aşamada kanser hücreleri, çevrelerindeki dokuları ve hücreleri istila etmeye başlar. Bu invazyon sürecinde, kanser hücreleri normal hücrelerin arasından geçebilmek için moleküler sinyaller kullanır.



Şekil 2.15. Metastaz oluşum basamakları (Özkara vd., 2020).

İntravazasyon: İnvazyonun ardından, kanser hücreleri yakın kılcal damarlara doğru hareket eder. Burada, kan dolaşımına girmek için bu damarları geçmelidir. Bu geçiş "intravazasyon" adını alır.

Dolaşım: Kanser hücreleri, dolaşım sistemi içinde kan ve lenf damarları aracılığıyla taşınır. Bu süreçte, kanser hücreleri dolaşımdaki mekanik ve kimyasal etkilere karşı hayatta kalma becerilerini kullanır.

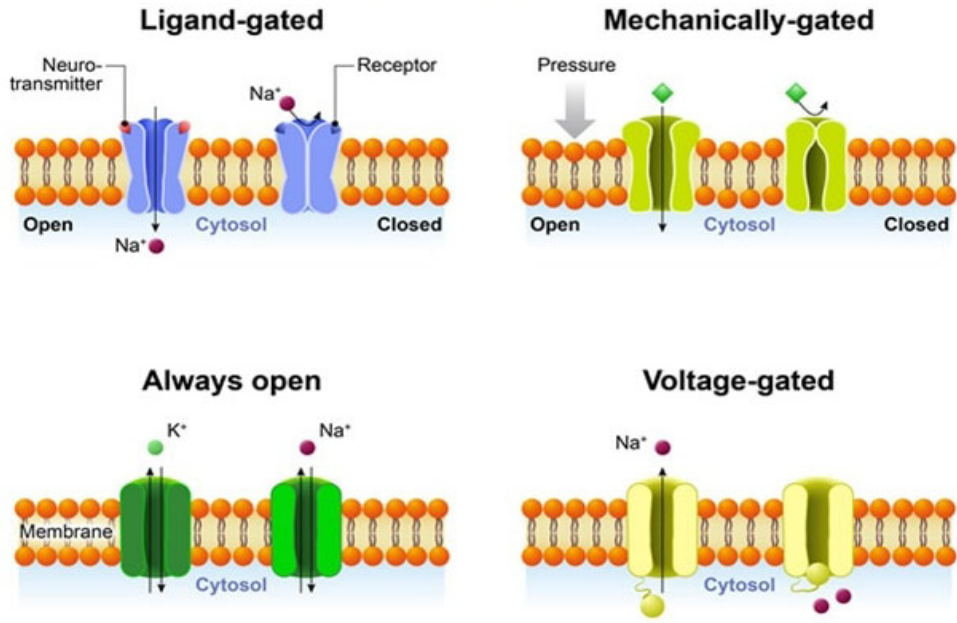
Ekstravazasyon: Kanser hücreleri, dolaşım sisteminden çıkarak bir başka dokuya geçiş yaparlar. Bu geçiş sürecine "ekstravazasyon" denir. Kanser hücrelerinin yeni bir dokuya yerleşmesi ve burada büyümesi için uygun koşullar oluşur.

Koloni Oluşumu: Kanser hücreleri, yeni dokuda çoğalmaya başlar ve bir tümör oluşturur. Bu tümöre sekonder metastatik tümör denir. Kanser hücreleri, çoğalarak orijinal tümör hücrelerinin özelliklerini taşıyan çok sayıdaki hücre ile koloniyi meydana getirir. Koloni az sayıdaki hücreden oluştuğunda mikrometastazı ilerleyen aşamalarda ise çok sayıdaki hücreden oluşan makrometastazı oluşturur.

Metastaz süreci oldukça karmaşık ve çok faktörlüdür. Bu aşamaların her biri, kanser hücrelerinin hayatta kalma, çoğalma ve yeni bölgelere yayılma yeteneklerini içerir. Bu nedenle, metastazın anlaşılması ve metastaz basamaklarının daha başlangıç aşamasında iken tümör hücrelerinin ilerlemesinin engellenmesi, kanser araştırmalarının önemli bir odak noktasıdır. (Sanchez-Sandoval vd., 2023).

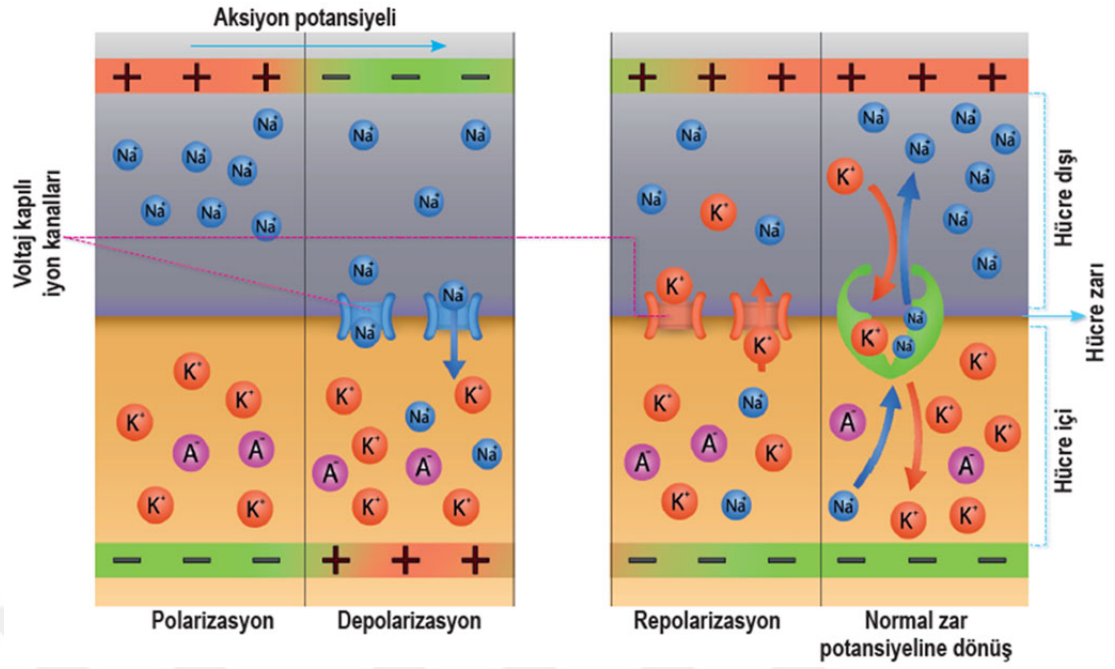
2.6. İYON KANALLARI

Hücre zarında bulunan ve hücre içi ile dışı arasında iyon akışını sağlayan proteinlerdir. İyon kanalları, hücrenin elektriksel özelliklerini, sinyal iletimini, hücre döngüsünü ve ölümünü etkiler. İyon kanalları, ortak bir yapısal motife sahiptir; zar içinden geçen bir alfa sarmalı vardır bu sarmalın hidrofilik amino asitleri suya, hidrofobik amino asitleri ise lipid çift katmanına bakar (Törnroth-Horsefield vd., 2005). İyon kanalları, açılıp kapanma mekanizmalarına göre sınıflandırılabilir, örneğin, voltaj kapılı, ligand kapılı, mekanik kapılı ve termal kapılı iyon kanalları gibi (Şekil 2.16.). İyon kanallarının farklı alt tipleri de bulunmaktadır. Örneğin, voltaj kapılı potasyum kanalları (KV), voltaj kapılı sodyum kanalları (NaV), voltaj kapılı kalsiyum kanalları (CaV), ligand kapılı nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR), ligand kapılı glutamat reseptörleri (GluR), mekanik kapılı bakteriyel büyük iletkenlikli mekanosensitif kanalı (MscL) ve termal kapılı TRP kanalları gibi



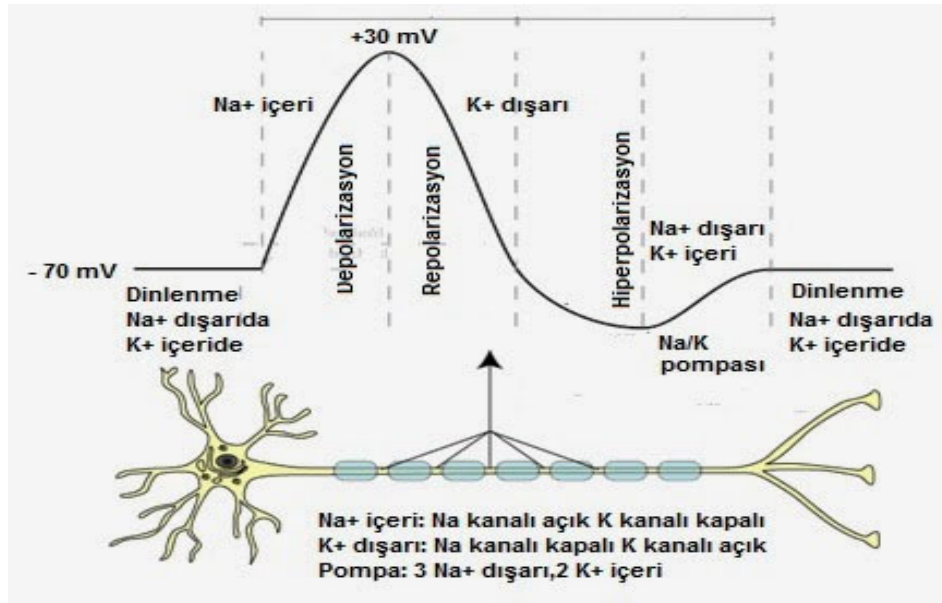
Şekil 2.16. İyon kanalı türleri (www.shutterstock.com).

Voltaj kapılı iyon kanalları, farklı iyon türlerine göre; örneğin, potasyum (K^+), sodyum (Na^+), kalsiyum (Ca^{+2}) ve klor (Cl^-) kanalları olarak ayrılabilir. Bu kanallar, iyonların membranlar arasında pasif taşınması için bir nevi iletkenlik yoludur. Nöronal sinyal, kas kontrolü ve algılama gibi hücrenin biyolojik sistemlerde temel görevlerini yerine getirir. Kardiyak miyositler ve nöronlar gibi uyarılabilir hücrelerde bulunan voltaj kapılı iyon kanallarının aktivitesi, dinlenme membran potansiyelini oluşturur. Epitel hücreler gibi uyarılamayan hücrelerde, iyon kanalları su ve tuz akışını kontrol eder ve hücresel hacmi ve pH'ı düzenler. Hücre zarında, iyon adı verilen yüklü atomlar elektriksel aktiviteye neden olurlar. Elektriksel aktivite uyarıldığında, potansiyel dinlenmeden ayrılarak aksiyon potansiyeli oluşur (Şekil 2.17.). Aksiyon potansiyelleri nöronlar ve kas hücrelerinde özellikle dikkati çeker.



Şekil 2.17. Aksiyon potansiyeli (Knapp,2020).

Akson dinlenme aşamasında iken, K^+ ve Na^+ pompaları sayesinde hücre içi negatif yüklüdür. Bu, Na^+ ve K^+ iyonlarının pompalanmasıyla sağlanır. Uyarın geldiğinde, sodyum kanalları açılır, Na^+ , içeri, aksona girer ve hücre içi pozitif hale gelir (depolarizasyon). Bu seviyeye ulaşıldığında, potasyum kanalları açılır, K^+ aksondan çıkar ve negatif duruma döner. Bu sürecin ardından Na^+ , K^+ pompası tekrar çalışarak hücre orijinal duruma döner. (Şekil 2.18.).



Şekil 2.18. Bir nöronun aksonunda meydana gelen aksiyon potansiyeli (Bean, 2007).

2.6.1. Kanalopati

Kanalopatiler, iyon kanallarındaki genetik veya edinsel mutasyonlar sonucu ortaya çıkan çeşitli hastalıkları tanımlayan bir terimdir. Bu mutasyonlar, iyon kanalının normal işlevini etkileyerek hücrenin iyon dengesini bozabilir. Bu durum, sinirsel iletişim, kas kasılması ve hücrel metabolizma gibi temel biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde bazı problemlere neden olur. Kanalopatiler, kardiyak aritmiler, epilepsi, nöromusküler bozukluklar ve diğer birçok hastalıkta rol oynarlar ve kanalopatik hastalıklar olarak da adlandırılırlar. Bu nedenle, iyon kanalları ve kanalopatiler, birçok farklı tıbbi durumun anlaşılması ve tedavisinde önemli bir odak noktasını oluşturmaktadır.

2.6.1.1. Onko-kanalopati

İyon kanallarını kodlayan genler, kanserle ilişkili genler arasında yer alır (Prevorskaya vd., 2010). Bu membran proteinleri, hücre içi ve hücreler arası sinyal iletiminden, hücre dışındaki olayların hücrel yanıtlarla entegrasyonuna ve hücre içi iyon dengesinin sürdürülmesine kadar pek çok hücrel aktiviteden sorumludur. Her kanser tipinin patofizyolojik özelliklerine, bu proteinlerin çeşitli düzeylerde katkıda bulunduğu dikkati çeker. Bu ayırım, iyon kanalı disfonksiyonunun kanserle sıkı bir ilişkisi olduğu gerçeğinden yola çıkarak, onları özel bir tür olan onko-kanalopatiler olarak sınıflandırmak mümkündür (Prevorskaya vd., 2018).

Birçok iyon kanalı, küçük moleküller tarafından hedef alınarak kanal aktivitesi bloke edilebilir, etkinleştirilebilir veya modüle edilebilir. Bu moleküllerin bazıları önemli terapötik ajanlardır. İyon kanalının yapısal ve işlevsel mekanizmalarının, fizyolojik rollerinin, işlev bozukluklarının hastalığa nasıl yol açtığının, biyosensör olarak potansiyel kullanımlarının ve aktivitelerini modüle etmek için yeni moleküllerin geliştirilmesinin araştırılması önemli ve dikkat çekici bir araştırma alanıdır (Reiß & Koert, 2013).

Bu bağlamda yapılan çalışmalar, kanserin moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını ve daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesini amaçlamaktadır.

2.7. VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALLARI

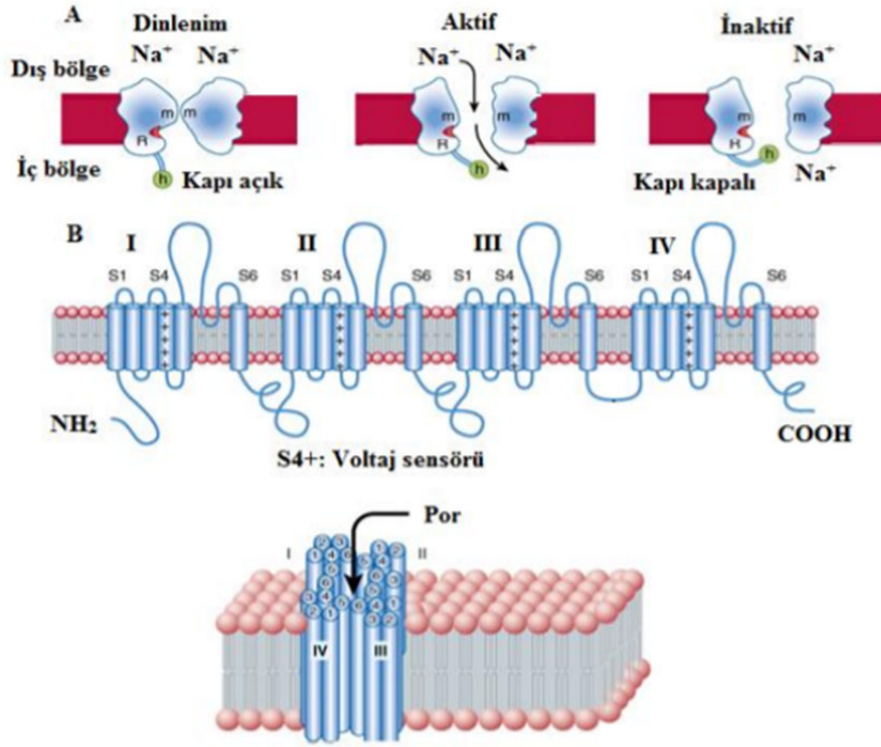
Voltaj kapılı sodyum kanalları (VGSC'ler), hücre zarı boyunca iyon akışını kontrol eden kapılar olarak işlev gören transmembran proteinlerdir. Bu kanallar, hücre zarının geçirgenliğini kontrol eden ve hücre içi ve dışındaki sodyum iyonlarının hareketini düzenleyen önemli bir rol oynarlar. Çoğunlukla uyarılabilir hücrelerin zarında bulunur ve aksiyon potansiyelleri oluştururlar. VGSC'ler, elektriksel sinyallerin başlatılması ve yayılmasında önemli bir rol oynayan voltaja duyarlı sodyum kanallarıdır. İşlevi bozuk VGSC'ler; epilepsi, kardiyak aritmiler ve nöropatik ağrı gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilidir ve bu nedenle antikonvülzan, antiaritmik ve lokal anestezi ilaçlarının geliştirilmesi için çekici terapötik hedefler olarak kabul edilir (Xu vd., 2019).

VGSC'lerin normalin dışındaki işlevi, organların ve dolayısıyla organizmanın fizyolojisini bozabilir ve çeşitli hastalıklara neden olabilir. VGSC, uyarılabilir hücrelerde elektrokimyasal aksiyon potansiyelleri oluşturmada kilit bir rol oynar, homeostazın dengelenmesine yardımcı olur ve kas kasılması, hücre çoğalması ve bilişsel aktiviteler gibi fizyolojik işlevlerin önemli bir parçasıdır.

VGSC'ler, alfa, beta ve gama alt birimleri olmak üzere çeşitli alt birimlerden oluşur. Alfa alt birimleri, kanalın temel yapısını oluşturur ve iyonların geçişini sağlar. Bununla birlikte, VGSC'lerin alt tipleri fibroblastlar gibi uyaranlara yanıt vermeyen hücrelerde, çeşitli bağışıklık hücrelerinde ve glial hücreler olarak bilinen hücrelerde de bulunur. Memelilerde dokuz farklı NaV olarak gösterilen VGSC alt tipi (NaV 1.1 ~ NaV 1.9) bulunur. Her alt tip, kendi özgün işlevlerine sahiptir. Örneğin, NaV 1.1, NaV 1.2, NaV 1.3 ve NaV 1.6 merkezi sinir sisteminde (MSS) rol oynarken, NaV 1.4 iskelet kasında etkilidir. NaV 1.5 ise kalp kasının düzenlenmesinde önemlidir, NaV 1.7 ile NaV 1.9 ise genellikle periferik sinir sisteminin (PSS) işlevini düzenler. VGSC alt tipleri, biyofiziksel ve farmakolojik özellikleri (örneğin, aktivasyon/inaktivasyon kinetiği, toksinlere duyarlılık) ve doku dağılımları bakımından farklılık gösterir. Son araştırmalar ayrıca, VGSC'lerin bireysel alt tiplerinin daha fazla ayırt edici özelliğe sahip olduğunu göstermektedir (Wang vd., 2022).

2.7.1. VGSC'lerin Yapısı ve İşlevi

Genellikle, VGSC'ler bir α alt birimi (220–260 kD) ile bir veya daha fazla β alt birimi (33–36 kD) içerirler. α alt birimi, VGSC'nin fonksiyonel merkezlerini barındırır ve dört benzer transmembran alanı (I-IV) kapsar. Her bir alan, bir α alt birimin altı transmembran segmentini (S1 – S6) içerir (Şekil 2.19).



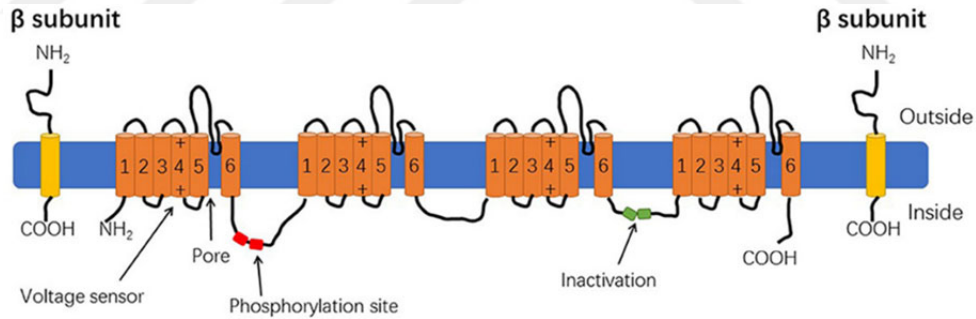
Şekil 2.19. Voltaj kapılı sodyum kanalının temel görünüşü, aktivasyon ve inaktivasyon durumu (Thornber & Shaw, 1977).

S1 ve S2 segmentleri, hücre zarının iç tarafındadır. Bu segmentler, kanalın elektrik yüklü iyonları algılayarak işlevsel değişikliklere yol açmasında önemlidir. S3 ile S4 segmentleri arasında, voltaj sensörü olarak bilinen S4, hücre zarının elektrik alanındaki değişikliklere duyarlıdır. Bu değişiklikler, kanal proteininin konformasyonunu etkileyerek kanalın açılmasını tetikler.

S5 ve S6 segmentleri, hücre zarının dış tarafında konumlanır ve birlikte merkezi por alanını çevreler. Bu segmentler, VGSC'nin iyon seçiciliğini belirleyen seçicilik filtresini oluşturur. Bu filtre, sodyum iyonlarının geçişini düzenleyerek kanalın temel işlevini gerçekleştirir.

Bu yapısal düzenek, VGSC'lerin hücre zarında sodyum iyonlarının geçişini düzenleyen kritik bir role sahip olduğunu belirtir. I ve II alanları arasında çok sayıda protein kinaz fosforilasyon bölgesi vardır. Hızlı depolarizasyon sırasında hücrenin içinden açık kanalları kapatabilen ve kanal inaktivasyonuna neden olan sitoplazmik bölgedeki III ve IV alanlarının kısa zincirleri ilaçlar için önemli bir hedeftir. III alanındaki S6 ile IV alanındaki S1 arasındaki polipeptit bağlantı bölgesinin ortasında inaktif olabilen üç hidrofobik amino asit (1488-IFM – 1490) olduğu bulunmuştur (Şekil 2.20.) (Mao vd., 2019).

β alt birimleri, bir hücre dışı immünoglobulin (Ig) döngüsü, transmembran bölge ve bir hücre içi C terminal bölgesi içeren yapıya sahiptir. β 1B alt birimi, farklı bir C terminal bölgeye sahip olup, bu nedenle çözünür ve salgılanmış bir proteindir. Bu alt birimler, iyon kanalının modülasyonunda, hücre yapışmasında ve transkripsiyon düzenlemesinde rol oynar. β alt birim genlerindeki mutasyonlar nörolojik hastalıklara yol açmaktadır (Bouza vd., 2019).



Şekil 2.20. Voltaj kapılı sodyum kanalının yapısı (Mao vd., 2019).

VGSC'lerin alfa alt birimleri, NaV1.1'den NaV1.9'a kadar olan farklı alt tipleri temsil eder. Bu alt tipler, farklı genler tarafından kodlanır ve çeşitli dokularda ve hücre tiplerinde bulunur.

NaV1.1: SCN1A geni tarafından kodlanır. Merkezi sinir sisteminde (MSS) bulunur ve epilepsi gibi nörolojik hastalıklarla dikkati çeker (Scheffer vd., 2009).

NaV1.2: SCN2A geni tarafından kodlanır. MSS'te bulunur ve epilepsi, otizm ve diğer nörolojik hastalıklarda etken rol alır (Barbieri vd., 2023).

NaV1.3: SCN3A geni tarafından kodlanır. Bu alt tip, MSS'te bulunur ve yine çeşitli nörolojik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (Liao vd., 2023).

NaV1.4: SCN4A geni tarafından kodlanır. İskelet kaslarında bulunur ve hiperkalemi ile bağlantılı nöromusküler hastalıkların bir nedenidir (Ghovanloo vd., 2021).

NaV1.5: SCN5A geni tarafından kodlanır. Kalp kaslarında bulunur ve kardiyak aritmi, anjina pectoris ve diğer kalp hastalıklarıyla ilişkilidir (Han vd., 2018).

NaV1.6: SCN8A geni tarafından kodlanmakta ve MSS'te yer almaktadır. Çeşitli nörolojik bozukluklarda dikkati çeker (Zybura vd., 2021).

NaV1.7: SCN9A geni tarafından kodlanır. Periferik sinir sisteminde (PSS) bulunur ve ağrı algısında rol alır (Wu vd., 2023).

NaV1.8: SCN10A geni tarafından kodlanır. PSS'te bulunur ve yine ağrı algısı ile ilişkilidir (Huang vd., 2022).

NaV1.9: SCN11A geni tarafından kodlanır. PSS'te bulunur ve ağrıda rol üstlenmiştir (Hockley vd., 2016).

Bu NaV alt tipleri, VGSC'lerin farklı hücre tiplerinde ve dokularda farklı biyolojik fonksiyonlarını yerine getirmesini sağlar. Tüm voltaj kapılı sodyum kanalları ortak bir yapısal motifi ve önemli bir homolojiyi paylaşıyor da farklı alt tipler farklı voltaj bağımlılığı ve kinetik ve farmakolojik özellikler gösterir. Yedisi (NaV1.1 – NaV1.3 ve NaV1.6 – NaV1.9) nöronlarda elektrojenezde büyük rol oynar ve genellikle "nöronal" olarak kabul edilirken, NaV1.4, kas hücrelerindeki sodyum kanalıdır. NaV1.5 ise baskın kardiyak miyosit kanalıdır. Bazı hücre tiplerinde, sadece tek bir alt tip tespit edilse de (örneğin, dendritik hücrelerde NaV1.7) diğer hücre türlerinin birden çok alt türü ifade ettiği gösterilmiştir; örneğin, astrositlerin NaV1.2, NaV1.3,

NaV1.5 ve NaV1.6 mikrogliya'nın NaV1.5 ve NaV1.6'yı, insan kırmızı kan hücrelerinin NaV1.4 ve Nav1.7'yi ifade ettiği gösterilmiştir.

2.7.2. VGSC ve Kanser

İnsan karsinoma dokularında VGSC ifadesinin arttığı ve bununla paralel olarak da metastazı arttırma potansiyelinin üzerinde durulmuş özellikle NaV1.5 ve NaV1.7 alt tiplerinin, insan karsinoma dokularında de novo olarak ifade edildiği in vitro çalışmalarla belirlenmiştir. Ayrıca, klinik gözlemler kanserli dokularda doku elektrolit seviyelerinin (özellikle sodyum) kanser hücresi içermeyen normal dokulara göre belirgin derecede yüksek olduğunu göstermiştir. Bu durumda, VGSC ifadesinin klinik (tanısal ve tedavi edici) öneme sahip olabileceğini ve aynı zamanda hem bir prognostik belirteç hem de bir anti-metastatik hedef olarak kullanılabileceğini öne sürülmektedir (Brackenbury & Djamgoz, 2006; Djamgoz & Onkal, 2014; Djamgoz vd., 2019).

Bazı çalışmalar, VGSC'lerin hücre proliferasyon sürecini etkileyebileceğini göstermiş, kanser hücrelerinin hızla çoğalmasında rol aldığını ortaya koymuştur. VGSC'lerin aktivitesi, hücre ölüm süreci olan apoptozisi etkileyebilir. Bu, hücre yaşam döngüsünün düzenlenmesinde önemlidir. Daha önce bahsedildiği gibi, VGSC'lerin aktivitesi metastatik kanser hücrelerinin çevresel dokulara yayılmasında büyük önem taşımaktadır.

Meme, akciğer ve prostat çoğunlukta olmak üzere metastatik kanser hücrelerinde, VGSC'lerin göç ve istila dahil olmak üzere metastazla ilişkili bir dizi hücresel davranışı güçlendirdiği gösterilmiştir (Fraser vd., 2005; Brackenbury & Djamgoz, 2006; Roger vd., 2006; Brackenbury & Isom, 2008; Brackenbury, 2012; Djamgoz & Onkal, 2013; Driffort vd., 2014; Fraser vd., 2014; Mohammed vd., 2016; Djamgoz vd., 2019).

NaV1.5 voltaj kapılı sodyum kanalları meme tümörlerinde anormal bir şekilde ifade edilir ve ekspresyon seviyeleri, metastatik oluşum ve hastaların sağ kalımı ile doğrudan ilişkilidir. Meme kanseri hücrelerinde, NaV1.5 aktivitesi, hücre dışı matrisin proteolitik bozunmasını teşvik eder ve hücre istilasını arttırır. İnsan meme

kanseri hücrelerinde NaV1.5 ekspresyonunun iyon kanal blokeri ile baskılanması sonucu bağışıklık sistemi baskılanmış farelerde (NMRI) akciğer kolonizasyonunu neredeyse tamamen ortadan kaldırdığı in vivo olarak da gösterilmiştir. Ranolazine'nin meme kanseri hücrelerinde NaV 1.5 akımlarını inhibe ettiği ve in vitro olarak NaV 1.5 ile ilişkili kanser hücresi istilasını azalttığı saptanmıştır. Preklinik veriler, VGSC'leri farmakolojik olarak hedeflemenin, fare modellerinde metastazı azaltılabileceğini göstermektedir. (Driffort vd., 2014).

NaV1.5 ekspresyonu normal kolon dokularında çok az veya hiç tespit edilemezken HT29, SW620 ve SW480 kolon kanseri hücrelerinde yüksek düzeylerde görülür. Aynı grup, farmakolojik inhibitörler/aktivatörler ve siRNA interferansı kullanarak insan kolon kanseri hücre hattı SW620'de Rap1'e bağlı sürekli MAPK aktivasyonu ile kanal aktivitesi ilişkilendirilebilir (Peng vd., 2017).

İnsan küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) hücre hattı H510'da NaV1.3, 1.5, 1.6 ve 1.9 eksprese edilmektedir ve tümör hücrelerinin endositoz kapasitesini artırabilir, bu durum da yüksek VGSC ekspresyonunun artan kapasiteden sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Kuvvetli metastatik ovaryum kanseri hücre hatları olan Caov-3 ve SKOV-3'te, zayıf metastatik Anglne hücrelerine kıyasla NaV1.2, NaV1.4, NaV1.5 ve NaV1.7'nin mRNA ekspresyon seviyeleri büyük ölçüde arttığı belirlenmiştir (Onganer & Djamgoz, 2005).

VGSC'lerin invazif kanser hücrelerinde eksprese edilebileceği ve tümör hücrelerinin hareket etme ve istila etme yeteneklerini artırabildiği ortaya konmuştur. Bu nedenle, VGSC'ler kanser gelişiminin önemli düzenleyicileri olarak kabul edilirler. Farklı tümörlerde VGSC'lerin α ve β alt birimlerinin ekspresyonu ve bunların hastalığın ilerlemesindeki rolüne dair araştırmalar her geçen gün artmaktadır.

2.7.3. VGSC İyon Kanal Blokerleri

Çeşitli toksinlerin ve kimyasalların sodyum kanallarını bloke ettiği veya modüle ettiği bilinmektedir ve bu kanalların fizyolojik özelliklerinin araştırılmasında önemli oldukları kanıtlanmıştır. Blokerler; kanal geçit kinetiğinin modifikasyon

mekanizmalarına ve bağlanma bölgelerine dayalı olarak birkaç gruba ayrılabilir (Tablo 2.2)

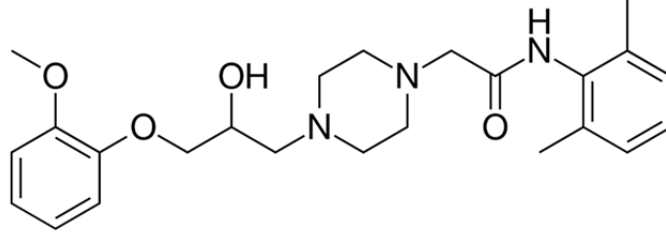
Tablo 2.2. Anti-aritmik ajanların sınıflandırması

Sınıf	Kanal Blokeri
Sınıf I	Na⁺ Kanal Blokeri (Nav)
IA (Yavaş bloke edici)	Quinidine, Procainamide, Disopyramide
IB (Hızlı bloke edici)	Lidocaine, Mexiletine, Phenytoin
IC (En yavaş bloke edici)	Flecainide, Propafenone, Moricine
Sınıf ID	Geç Sodyum Akımı Blokeri (Late Sodium Current Blocker)
Ranolazine	
Sınıf II	Beta Blokerler (Beta- adrenerjik bloklerler)
Propranolol, Metoprolol, Atenolol	
Sınıf III	K⁺ Kanal Blokeri (Kv)
Amiodarone, Sotalol, Dofetilide	
Sınıf IV	Ca²⁺ Kanal Blokeri
Verapamil, Diltiazem	

Sınıf I: Sodyum kanal blokerleri. Bu ilaçlar hücre içine sodyum akışını azaltarak uyarımın iletimini yavaşlatır ve miyokardın eksitabilitesini azaltır. Sınıf IA ilaçlar aksiyon potansiyelini uzatarak etkili refrakter dönemi uzatır ve re-entry durumunu önler. Sınıf IB ilaçlar aksiyon potansiyelini kısaltarak etkili refrakter dönemi kısaltır ve ektopik otomatizmi baskılar. Sınıf IC ilaçlar, sodyum kanal blokajını en güçlü yapan ilaçlardır ve uyarımın iletimini en çok yavaşlatırlar Sınıf ID, Geç sodyum akımını en seçici şekilde bloke eden ilaç, kronik anjina pectoris tedavisi için onaylanmış, ancak anti-aritmik aktiviteye de sahip olabilen bir ilaç olan Ranolazine'dir. Sınıf II Beta blokerler, bu ilaçlar sinir sisteminin anti-sempatik ajanlarıdır ve beta reseptörlerini bloke ederek uyarımın iletimini yavaşlatır ve miyokardın eksitabilitesini azaltır. Metoprolol, nadolol, alprenolol, kordanum, propranolol, asebutolol, pindolol, trazikor, esmolol gibi ilaçlar bu sınıfa girer.

2.8. RANOLAZİNE

Kimyasal yapısı, bir piperazin halkası ve bir asetamid grubu içeren bir piperazin-1-ilasetamid türevidir. Ranolazine'nin kimyasal formülü $C_{24}H_{33}N_3O_4$ ve molekül ağırlığı 427.54 g/mol'dir (Şekil 2.21.).

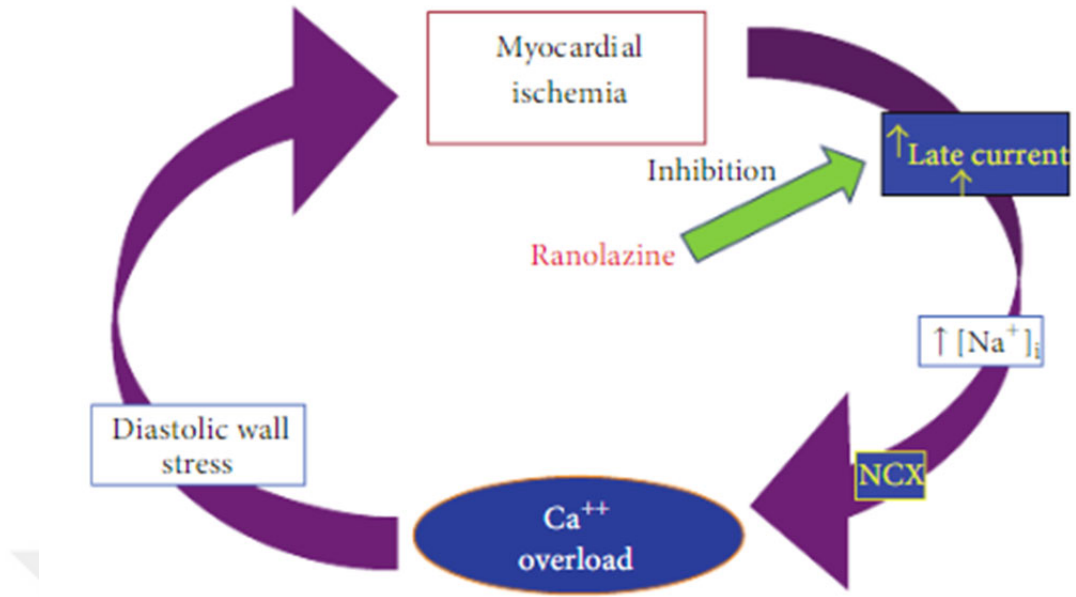


Şekil 2.21. Ranolazine'in kimyasal yapısı (Patil vd., 2014).

Ranolazine, 2006 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından stabil anjinli belirli gruplarda kullanılmak üzere onaylanmış bir anti-anginal ilaçtır. Başlangıçta, Ranolazine'in terapötik etkisi yağ asitleri metabolizmasını inhibe etmesiyle ilişkilendiriliyordu. Ancak, daha sonraki araştırmalar, Ranolazine'in temel faydalarının aslında kalpte geç sodyum akımını baskılamasından kaynaklandığını göstermiştir (Şekil 2.22.). Geç sodyum akımının iskemi, aritmi, sistolik ve diyastolik disfonksiyon gibi çeşitli kalp hastalıklarında rol oynadığı ve bu durumların tümünün kalp yetmezliği ile ilişkili olduğu bilindiğinden, Ranolazine, kalp yetmezliğinde doğrudan veya dolaylı olarak bir dizi deneysel ve klinik çalışmada test edilmiştir (Kaplan vd., 2022).

Ranolazine'in etki mekanizması, farmakolojik olarak geç sodyum akımını azaltıcı etkisine dayanır. Bu, diyastolik duvar stresini azaltarak miyokardiyal diyastolik gevşemede bir düzelme sağlar. Sonuç olarak, bu, segmental miyokardiyal iskemiye iyileştirir. Kalpte geç sodyum akımını inhibe ederek kalp kasılmasını iyileştirmesi ve miyokardiyal oksijen tüketimini azaltmasıdır. Ayrıca Ranolazine, iyon dengesizlikleri,

oksidatif stres, inflamasyon, apoptoz, fibrozis, metabolik bozukluklar ve nörohormonal bozulma gibi kardiyak remodelleme altında yatan mekanizmaların inhibisyonu ile de kalp yetmezliğinde koruyucu rol oynamaktadır (Kaplan vd., 2022).



Şekil 2.22. RNL'nin etki mekanizması

Ranolazine'in DNA metilasyon inhibitörleri olan dezasitabin ve azasitidin ile birlikte kanser hücrelerine karşı antitümör etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Bu ilaçlar, klinik olarak uygun nanomolar dozlarda, sitotoksositeye neden olmadan, kanser kök hücre benzeri alt popülasyonların inhibisyonu dahil antitümör “bellek” yanıtı üretmektedir. Bu etkiler, genom çapında promotör DNA metilasyonunda sürdürülen azalmalar, gen yeniden ekspresyonu ve ana hücrel düzenleyici yollarda antitümör değişiklikler ile birlikte görülmektedir.

Ranolazine, VGSC'leri bloke eden bir ilaçtır. VGSC'ler de kanserli hücrelerin invazivliğini ve metastazını artıran iyon kanallarıdır. VGSC protein ifadesinin kanserli dokuda kansersiz dokuya göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Literatürde Ranolazine ve kanser ilişkisini araştıran pek az çalışma bulunmaktadır.

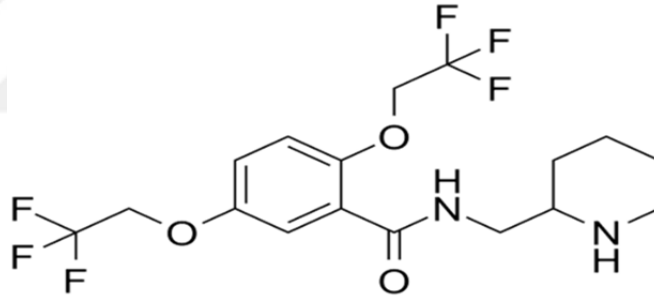
Meme kanseri hücrelerinde, NaV1.5 aktivitesi, hücre invazivliğini artırırken, ekstrasellüler matriksin proteolitik parçalanmasını da teşvik eder. Bir çalışmada, Ranolazin (50 µM) meme kanseri hücrelerinde NaV1.5 akımlarını inhibe etmiş ve in vitro'da NaV1.5 ile ilgili kanser hücre invazivliğini azaltmıştır. İn vivo'da, insan meme kanseri hücrelerinde NaV1.5 ifadesinin yok edilmesinin, immün baskılanmış

farelerde (NMRI çıplak) akciğer kolonizasyonunu neredeyse tamamen ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (Driffort vd., 2014).

Prostat kanserinin in vivo sıçan modelinde Ranolazine'in anti-metastatik etkisinin araştırıldığı bir makalede Ranolazine'in metastazlardaki VGSC alt tipi olan NaV1.7 proteinini ifade eden hücre yüzdesini azalttığı bulunmuştur. Ranolazine metastazı inhibe etmiştir ve bu veriler, daha önceki çalışmalarla genişleterek NaV1.7 ifadesinin metastatik prostat kanserinin fonksiyonel bir biyo-belirteci olabileceği ve VGSC blokerlerinin anti-metastatik ajanlar olarak yararlı olabileceği öne sürülmektedir (Driffort vd., 2014; Bagan vd., 2019).

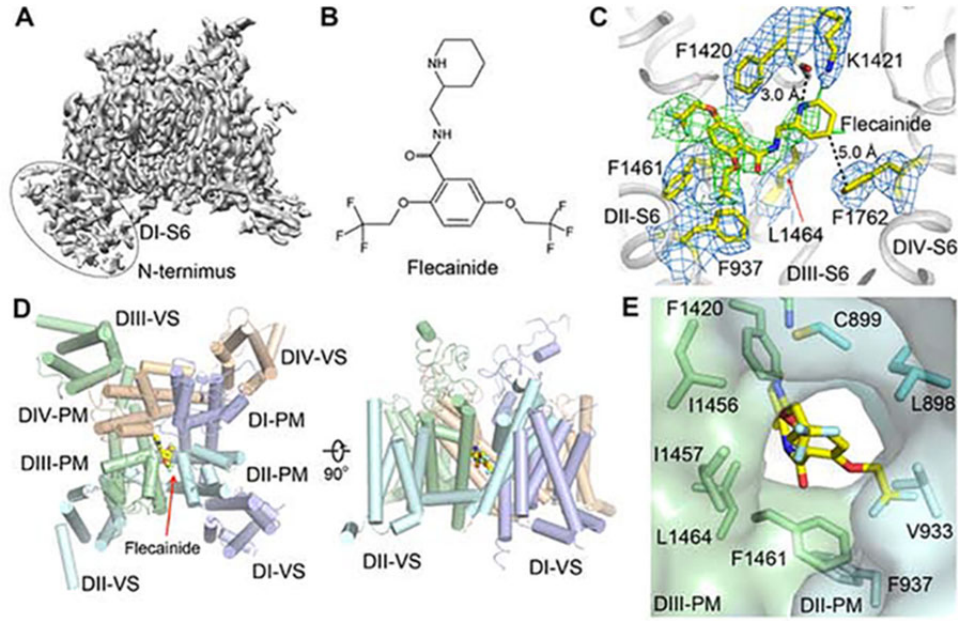
2.9. FLECAİNİDE

Kimyasal yapısı, karbon, hidrojen, flor, nitrojen ve oksijen atomlarını içerir. Molekül ağırlığı ise 414.24 g/mol'dür (Şekil 2.23).



Şekil 2.23. Flecainide'in kimyasal yapısı (Jiang et al., 2020).

Flecainide, kalp ritim bozukluklarını önlemek ve tedavi etmek için kullanılan sınıf Ic antiaritmik ilaçtır. (Reyes vd., 2022). Flecainide toksisitesi nadir görülen, ancak, ciddi bir durumdur ve kalp yetmezliği, ritim bozuklukları veya kardiyojenik şok gibi hayatı tehdit eden komplikasyonlara yol açabilmektedir.



Şekil 2.24. rNav1.5C ve Flecainide kompleksinin Cryo-EM yapısı (Jiang et al., 2020).

Nav1.5'in diğer sodyum kanallarından farklı olarak Nav β alt birimleriyle etkileşim yerlerinde benzersiz bir glikozil yapıya ve disülfid bağlanma yeteneğinin kaybına sahip olduğu belirtilmektedir. Antiaritmik ilaç Flecainide'in, seçicilik filtresinin altında kalan por merkezine özgül olarak bağlandığı ve por içindeki Na^+ iyonlarını bloke ettiği gösterilmiştir. Flecainide'in, Nav1.5'in Phe1760 ve Tyr1767 gibi fenilalanin ve tirozin gibi aromatik amino asitlerle etkileşerek por içindeki iyon geçişini engellediği düşünülmektedir. Flecainide porun bir tarafındaki bir platforma bağlanır ve sodyum geçirgenliğini doğrudan engeller (Şekil 2.24.). Piperidin nitrojeninin SF'nin iç ucundaki Lys1421 yük yer değiştirme kompleksine bağlanması, Na^+ iletkenliğini önleyecektir. Bu platform, çoğu Flecainide'e benzer büyük bir hidrofobik halka yapısına sahip olan diğer IC Sınıfı antiaritmik ilaçların bağlanmasına aracılık edebilir. (Jiang vd., 2020).

Flecainide ile xenopus oositlerinde yapılan in vitro bir çalışmada, fKv1.4 Δ N kanal akımlarını inhibe etmek için 10, 100, 300, 500 ve 1000 $\mu\text{mol/L}$ dozlar kullanılmıştır. Bulgulara göre, Flecainide fKv1.4 Δ N akımlarını inhibe etmede IC_{50} değerleri $512.29 \pm 56.92 \mu\text{mol/L}$ olmuştur (Chen vd., 2013). Başka bir çalışmada, köpek Purkinje liflerine 0.1-10 μM Flecainide uygulaması görülür (Kroemer et al., 1989).

Flecainide'in ağız mukozası üzerinden emilim ve taşınmasını incelemek üzere toksik olmayan 0.1-10 mM arasında değişen dozlar kullanılmıştır (Deneer et al., 2002).

NaV 1.5'in yapısını çözmek için 1 mM, Flecainidin, NaV1.5 üzerindeki etkisini incelemek için 10 μ M, NaV 1.5'in kapılama por akımını nasıl etkilediğini ölçmek için, 100 μ M Flecainide kullanılmıştır. Bunlar, araştırma amaçlı olarak kullanılan dozlardır. Klinik olarak, Flecainide dozu hastanın durumuna ve diğer faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Genel olarak, yetişkinler için başlangıç dozu günde iki kez 50 mg'dır ve günde 300 mg'ı geçmez (Jiang vd., 2020). Flecainide'in terapötik serum düzeyinin 0.20-1.00 μ g/mL arasında olduğu ve 1.50 μ g/mL üzerinde toksik olduğu belirtilmiştir (Newson vd., 2020).

Literatürde Flecainide'in herhangi bir kanser hücresi üzerinde etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

TNBC hücre soyu olarak kullanılan yüksek metastatik MDA-MB-231 ile düşük metastatik MCF-7 hücreleri %10 fetal sıgır serumu (FBS) içeren DMEM içinde %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde yetiştirilmiştir. Hücre morfolojisinde bir değişiklik olasılığına karşı, hücreler inverted faz kontrast mikroskobu kullanılarak izlenmiş ve değerlendirilmiştir.

3.2. FARMAKOLOJİK AJANLAR

3.2.1. Ranolazine (RNL)

Anti-aritmik bir ajan olan RNL, üretici firmanın (Sigma) önerdiği şekilde steril saf suda çözündürülerek, 1000 mM'lık stok solüsyon hazırlanmıştır. Stok solüsyon 100 mM ve 10 mM'lık küçük hacimlere bölünerek -21°C'de saklanmıştır. Kullanımdan önce serum içeren medyumla seyreltilerek deneylerde taze olarak kullanılmıştır.

3.2.2. Flecainide (FLC)

Anti-aritmik bir diğer ajan olan FLC, üretici firmanın (Sigma) önerilerine paralel olarak steril saf suda çözündürülerek, 1000 mM'lık stok solüsyon hazırlanmıştır. Stok solüsyon 100 mM ve 10m M'lık küçük hacimlere bölünerek -21°C'de saklanmıştır. Deney aşamasında serum içeren medyumla seyreltilmiş ve taze olarak kullanılmıştır.

3.2.3. Tetrodotoksin (TTX)

Spesifik bir VGSC blokeri olan TTX, hücrelerin lateral hareketi üzerindeki inhibitör etkisi sebebiyle motilite ve invazyon deneylerinde pozitif kontrol amacıyla kullanılmıştır (Brackenbury, 2012). Toz halindeki 1 mg TTX (Alamone lab.), steril saf suda çözülerek 600 nM'lık stok solüsyon elde edilmiştir. Stok solüsyonlar küçük hacimler halinde -21°C'de saklanmıştır. Kullanımdan önce serum içeren medyumla seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.3. HÜCREDE BÜYÜME

Hücre hatlarının büyüme özelliklerini saptamak üzere hücre büyüme deneyi yapılmıştır. Bu amaçla 96 kuyucuklu pleytlerin her bir kuyucuğuna 2×10^3 , 4×10^3 , 6×10^3 , 8×10^3 , 10×10^3 , 12×10^3 , 14×10^3 hücre ekilmiş, medyum eklenmiştir uygulamadan sonra 24. ve 48. saatte ölçüm yapmak üzere her bir kuyucuktaki medyum çıkarılarak yerine 100 μ l 3- (4,5-Dimetiltiazol-2yl) – 2,5 – Difenil tetrazolyum bromid (MTT) solüsyonu konulmuştur. 4 saat 37 °C’ de, alimünyum folyoya sarılı ışık görmeyecek şekilde bekletildikten sonra kuyucuklardaki MTT solüsyonu çıkarılarak yerine 89 μ l DMSO ve 11 μ l glisin tamponu eklenmiştir. Kolorimetrik MTT spektrofotometre yöntemi kullanılarak mikropleyt okuyucuda her bir kuyucuğun absorbans değeri 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Fraser vd., 2003). MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin ikisi için de, her deneyde en az üç kuyucuk kullanılmış ve en az üç tekrar yapılmıştır.

3.4. TOKSİSİTE

Etkinliği değerlendirilecek farmakolojik ajanlardan RNL ve FLC’nin, insan meme kanseri hücre soylarından MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerinde toksik etkisinin olup olmadığını belirlemek üzere, “Tripın mavisi metodu” kullanılmıştır. Hücreler altı kuyucuklu pleytlere 3×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin ekiminden sonraki 24. Saatte hücreler mikroskop ile kontrol edilmiş, kontrol grubundaki hücrelere normal medyum, deney gruplarındaki hücrelere ise, sırasıyla 0,5 μ M, 1 μ M, 50 μ M FLC ile 2,5 μ M, 5 μ M, 50 μ M RNL konsantrasyonları içeren deney medyumları uygulanmıştır. Hücrelerin medyumları 24 saat sonra taze medyum ile değiştirilmiş ve toplam 48 saatlik inkübasyon sonrasında deney medyumları çıkarılmıştır. Hücreler 0,2 ml tripan mavisi ve 0,8 ml normal medyum ile hazırlanan boya solüsyonunda 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında kuyucuklardaki boya içeren medyum atılarak yerine serum içermeyen normal medyum konulmuştur. İnvrt mikroskopta 40x büyütmele objektifle her petride 40 farklı alandaki boyanmamış canlı ve mavi renk boyanan ölü hücrelerin sayımı yapılmıştır. Deneyler, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin her ikisi için de üç paralel olarak yürütülmüş en az üç tekrar olmak üzere gerçekleştirilmiştir.

3.5. HÜCRE PROLİFERASYONU

Farklı konsantrasyonlardaki RNL ve FLC'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin proliferasyonları üzerindeki etkisi MTT yöntemiyle belirlenmiştir. Bu amaçla 96 kuyucuklu pleytlerin her bir kuyucuğuna 3×10^4 hücre ekilerek 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda kontrol grubuna normal medyum diğer gruplara ise; 0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M FLC ile 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M ve 50 μ M RNL konsantrasyonları içeren deney medyumları eklenmiştir. Bu aşamadan sonraki işlemler Bölüm 3.3'te hücre büyüme deneyinde açıklandığı gibi gerçekleştirilmiş ve 24. ve 48. saatlerde hücrelerin absorbansları 570 nm'de ölçülmüştür. Kontrol grubundan elde edilen değer 1 kabul edilerek deney grupları normalize edilmiş ve istatistik analizleri yapılmıştır. Her deneyde iki hücre soyu için de kontrol ve deney gruplarında en az üç kuyucuk kullanılmış ve en az üç kez tekrar edilmiştir.

3.6. KOLONİ OLUŞUMU

Yüksek metastatik MDA-MB-231 ve düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin koloni oluşumları üzerine RNL ve FLC etkisi koloni testi ile değerlendirilmiştir. Her iki hücre soyu da kuyucuk başına 400 hücre olacak şekilde altı kuyucuklu pleytlere ekilip bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün, medyumları değiştirilmiş kontrol, TTX ve deney medyumları ilave edildikten sonra 24 saatte medyumlar tazeleri ile değiştirilmiş ve 48. saatte tüm medyumlar çıkarılarak normal medya konulmuştur. Tüm gruplardaki hücreler normal kültür medyumunu ile büyümeye bırakılmış ancak her dört günde bir kültür medyumunu tazesini ile değiştirilerek 14 gün koloni oluşum süresi tamamlanmıştır. 15. günde medyumlar çıkarılarak hücreler iki kez PBS ile yıkanmış, hücreler %100 soğutulmuş metanol ile hücreler 15 dk fikse edilmişlerdir. 15 dk sonunda metanol kuyucuklardan çıkarılarak hücreler %0.5'lik kristal viole ile 15 dk boyanmıştır. 15 dk distile suda bekletilerek hassas bir şekilde yıkama işlemi de tamamlanmış ve petriyer kuruması için ağzı açık ve ters bir şekilde karanlıkta bir gece bekletilmiş ve saklanmıştır. Koloni sayımları invert mikroskopta yapılarak koloni yüzdesi tayin edilmiştir.

3.7. LATERAL HÜCRE HAREKETİ (MİGRASYON=MOTİLİTE)

Hücrelerin metastaz yeteneğinde etkin rol alan lateral hücre hareketini (migrasyon/motilite) saptamak amacıyla, yüksek metastatik MDA-MB-231 ve düşük metastatik MCF-7 hücreleri ile ‘wound-healing’ yara iyileşme deneyi yapılmıştır (Fraser vd., 2003). Deneylerde kontrol grubunun yanı sıra, pozitif kontrol olarak VGSC blokeri TTX (600 nM) kullanılmıştır. Başlangıçta her grup için 35 mm’lik petrilerin alt tarafına birbirine paralel üç adet kırmızı ve bu çizgilere dik 15 adet siyah çizgi çizilmiştir. Her bir petriye 30×10^4 MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri ekilmiştir. Hücre ekiminden 24 saat sonra steril 100’lük pipet ucuyla kırmızı çizgiler üzerinde yaralar açılmıştır. Açılan yara genişlikleri mikrometrik oküler ile invert mikroskopta ölçülerek 0. Saat (W0) olarak kaydedilmiştir. Ölçümler sonrasında kontrol gruplarına normal medyum, TTX grubuna 600 nM TTX içeren medyum ile deney gruplarına hücre proliferasyonunu etkilemeyen dozlarda 2,5 μ M ve 5 μ M RNL ile 0,5 μ M ve 1 μ M FLC deney medyumları eklenmiştir. Her grubun medyumları 24 saatte taze ile değiştirilmiş ve yara bölgeleri 24. ve 48. saatlerde invert mikroskopta tekrar ölçülmüştür (Wt). Elde edilen değerler aşağıdaki formülde yerine konularak, her grubun lateral hareketini veren motilite indeksi hesaplanmıştır (Fraser vd., 2003). Analizler için en az üç tekrar sonucu 0, 24 ve 48. saatlerde mikroskoptan görüntü alınarak karşılaştırmaları yapılmıştır.

$$MI \text{ (Motilite İndeksi)} = 1 - (W_t / W_0)^*$$

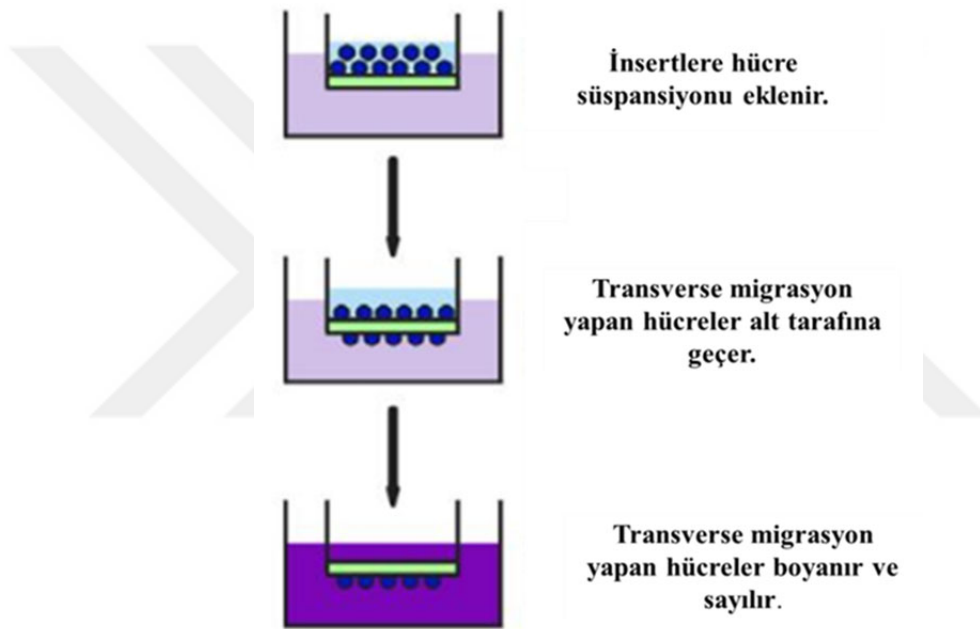
* W0: 0. saatteki yara genişliği

Wt: 24. veya 48. saatteki yara genişliği

3.8. TRANSVERS HAREKET

MDA-MB-231 ve MCF7 hücrelerinin bazal membrandan göç ve invazyon kapasitesi, 8 μ m gözenekli transwell filtreleri insert kullanılarak, boyden-chamber yöntemi ile kontrol, TTX, 2,5 μ M ve 5 μ M RNL ile 0,5 ve 1 FLC grupları şeklinde yürütülmüştür. Bu amaçla pleyt içerisine yerleştirilen steril insertlere 1/8 oranında dilue edilen matrigel (Sigma Aldrich) konularak bir gecelik inkübasyondan sonra L-glutaminli serumsuz soğuk medyum ile 6 saat rehidrate edilmiştir. Her hücre soyu 4×10^4 hücre olarak insert içerisine matrigelin üzerine ekilmiştir. Hücre hareketi için

kemotaktik gradyan oluşturmak üzere insert içerisine %0,1 FBS içeren besiyeri, pleyt içerisine ise, %1 FBS içeren besiyeri eklenmiştir (şekil 3.1.). 48 saat inkübe edildikten sonra medyumlar çıkarılmış ve insert içerisindeki invaze olmamış hücreler matrigel ile birlikte pamuklu çubuk ile çıkarılarak temizlenmiştir. İnsertin alt tarafına invaze olan hücreler -4 °C metanol ile fikse edilmiş, kristal viyole (%0.25 metanol içinde 0.5 g / ml) ile 15 dk boyanmış ve distile suda nazikçe yıkanıp kurutulmuştur. İnvaze hücreler invert mikroskopta 40X 'de insert başına ≥ 12 alanda sayılmış gruplar arasındaki farklar istatistik olarak hesaplanmıştır (Guo vd., 2016; Rızaner vd., 2020). Her grup üç kez tekrarlanmıştır.



şekil 3.1. Transvers hareketin deney şeması

3.9. WESTERN BLOT İLE NAV1.5 PROTEİN ANALİZİ

Ranolazine ve Flecainide ile tedavi edilen MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri RIPA tamponunda ependorfa toplanarak lizis edilmiştir. Hücre lizatları santrifüj edilerek, proteinler PAGE ile ayrıştırılmıştır. Jeller, 10 cm'lik kasetlerde, %10'luk ayırma jeli, %6'luk paketlenme jeli olarak hazırlanmıştır. Elektroforez işlemi 80 V'da 30 dakika, sonrasında 100 V'da 60-75 dakikada tamamlandı. Elektroforez işleminden sonra jel

de ayrıştırılan proteinler nitroselüloz membrana transfer edildi. Transfer işlemi 45 V'da 30 dakika, 90 V'da 60 dakikada gerçekleştirildi. Membranlar 1 saat %5'lik bloklama çözeltisinde (%2 BSA) bekletildi. Sonrasında membran iki gece boyunca primer antikor (NaV1.5 NESO-pAb) etkisinde bırakıldı. Sekonder antikor olarak peroksidaz konjuge anti-mouse kullanılmıştır. Protein bantlarının görüntülenmesi için membran PBS içerisinde seyreltilen Streptavidin Alkalın Fosfataz ile 15 dakika işleme konulmuştur ve protein bantları ImageJ© programı kullanılarak analiz edilerek grafikleri çizimleri yapılmıştır.

3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

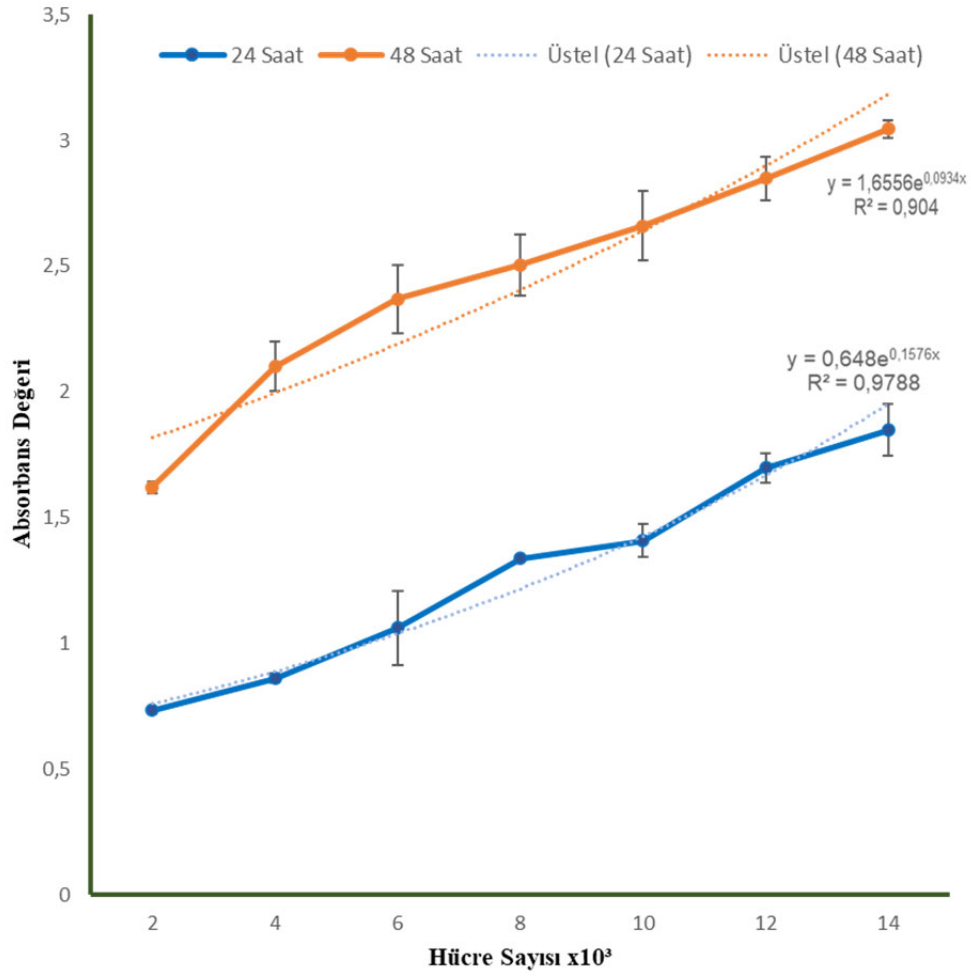
Tüm veriler, deneylerin ortalaması $\pm$ SE olarak sunulmuştur. Gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek üzere paired t-test, student-t-test kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlı fark $P<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, etki mekanizması Na^+ kanal blokeri üzerine olan RNL ve FLC'nin yüksek metastatik MDA-MB-231 ile düşük metastatik MCF-7 hücreleri üzerindeki toksisite, hücre proliferasyonuna etkisinin yanı sıra özellikle hücrelerin metastaza gidişinde rol oynayan migrasyon/lateral hareket ile invazyon/transvers hareket ve koloni oluşumuna etkileri değerlendirilmiş NaV1.5 protein bantları western blot ile analiz edilmiştir. RNL ve FLC'nin anti-metastatik potansiyeli in vitro olarak incelenmiştir.

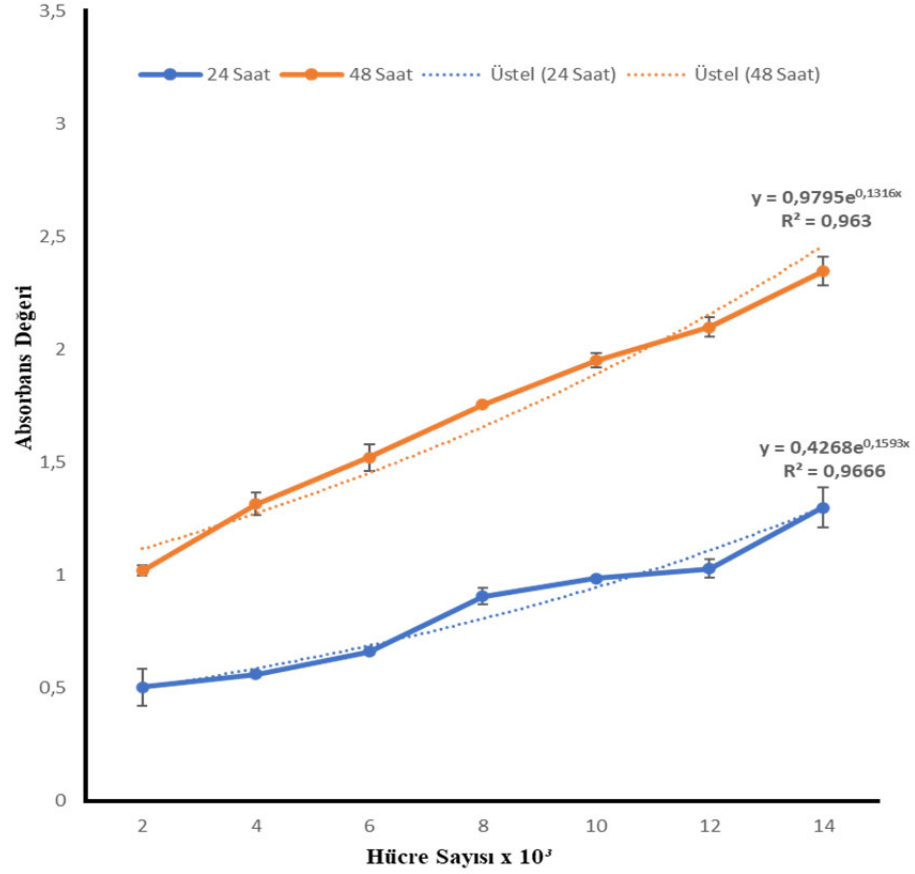
4.1. HÜCRELERDE BÜYÜME

Çalışmanın başlangıcında farklı sayılardaki MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri ile absorbans arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Hücrelerin 24. ve 48. saatlerdeki büyümesi belirlenerek, büyüme eğrisi çizilmiş ve doğru denklemi elde edilmiştir. Şekil 4.1'de verilen büyüme eğrisi incelendiğinde, 24. ve 48. saatlerde, MDA-MB-231 hücre sayılarının artışına paralel olarak absorbansın da arttığı görülmektedir. Hücreler incelenen sürelerde eksponansiyel olarak büyüme göstermekte ve yaklaşık 10.000 hücre seviyelerinden itibaren yavaş yavaş plato fazına girmeye başlamaktadır. Hücre sayısı ile doğru denklemi arasındaki R^2 değerinden anlaşıldığı gibi yüksek korelasyon bulunmaktadır.



Şekil 4.1. Üçlü negatif meme kanseri MDA-MB-231 hücre hattının zamana bağlı büyümesi.

Düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin, 24. ve 48. saatlerdeki hücre sayısı ile absorbans arasındaki ilişkisi araştırılarak Şekil 4.2.'de büyüme eğrileri verilmiştir. Her iki büyüme eğrisi incelendiğinde, 24. ve 48. saatlerde, absorbansın hücre sayısı ile doğru orantılı olarak arttığı gözlemlenmektedir. MDA-MB-231 hücrelerine benzer şekilde, MCF-7 hücreleri de, belirtilen sürelerde önce eksponansiyel bir büyüme göstermekte ve yaklaşık 10.000 hücre sayısı seviyelerinden itibaren plato fazına girmeye başladığı izlenmektedir. Hücre sayısı ile doğru denklemi arasında yüksek korelasyon sırasıyla $R^2=0,9788$ ve $R^2=0,904$ değerlerinden belirlenmektedir.



Şekil 4.2. Üçlü negatif meme kanseri MCF-7 hücre hattının zamana bağlı büyümesi

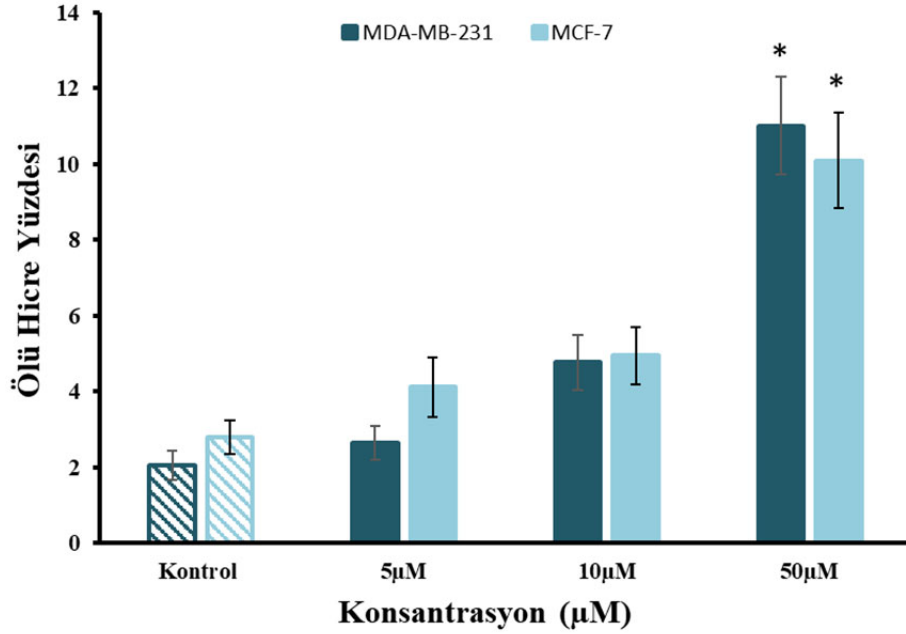
MDA-MB-231 hücrelerine nazaran düşük metastatik olduğu bilinen MCF-7 hücrelerinin 24 ve 48. saatlerde alınan absorbans ölçümleri ile zamana ve hücre sayısına bağlı artış hızının doğru orantılı olarak gerçekleştiği ancak bu artışın MDA-MB-231 hücrelerine göre daha yavaş olduğu eğrinin yatay bir seyir izlemesinden anlaşılmaktadır (Şekil 4.2.).

4.2. TOKSİSİTE

Farmakolojik ajanlar RNL ve FLC'nin yüksek metastatik MDA-MB-231 ve düşük metastatik MCF-7 hücre hatları üzerindeki toksik etkisi Tripan mavisi yöntemi ile incelenerek ölü hücre yüzdeleri saptanmıştır.

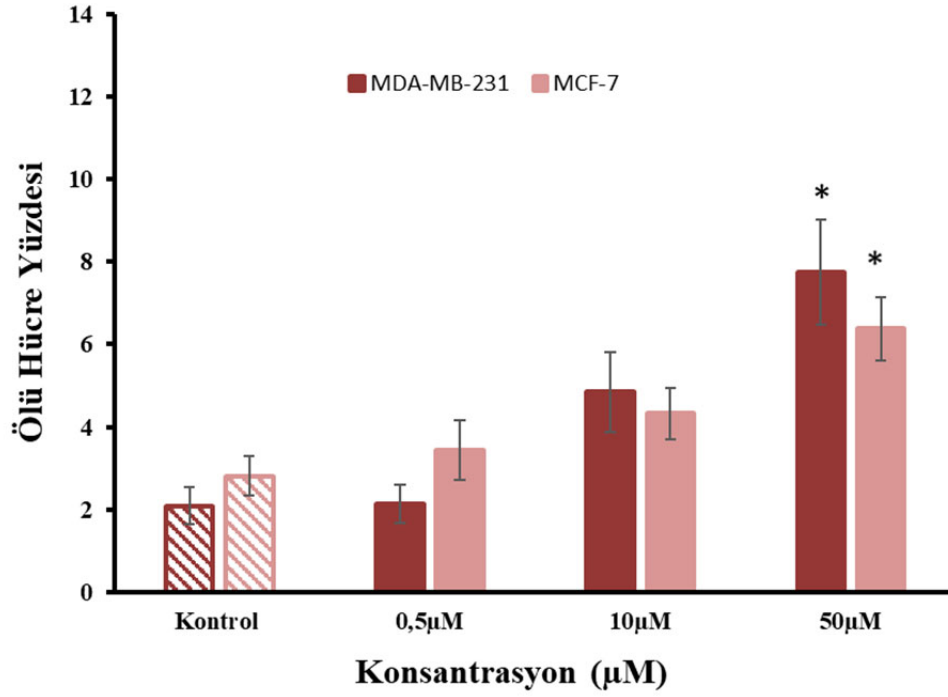
Hem MDA-MB-231 hem de MCF-7 hücrelerinde 5 µM ve 10 µM konsantrasyonlarının toksik etki meydana getirmediği belirlenmiştir (Şekil 4.3.). Ölü hücre yüzdeleri kontrol grubuna oranla MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde

özellikle 50 μ M RNL grubunda artış göstermekte ve bu artış her iki hücrede anlamlı ($P<0,05$) olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.3. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerinde RNL toksisitesi ($\pm$ SE).

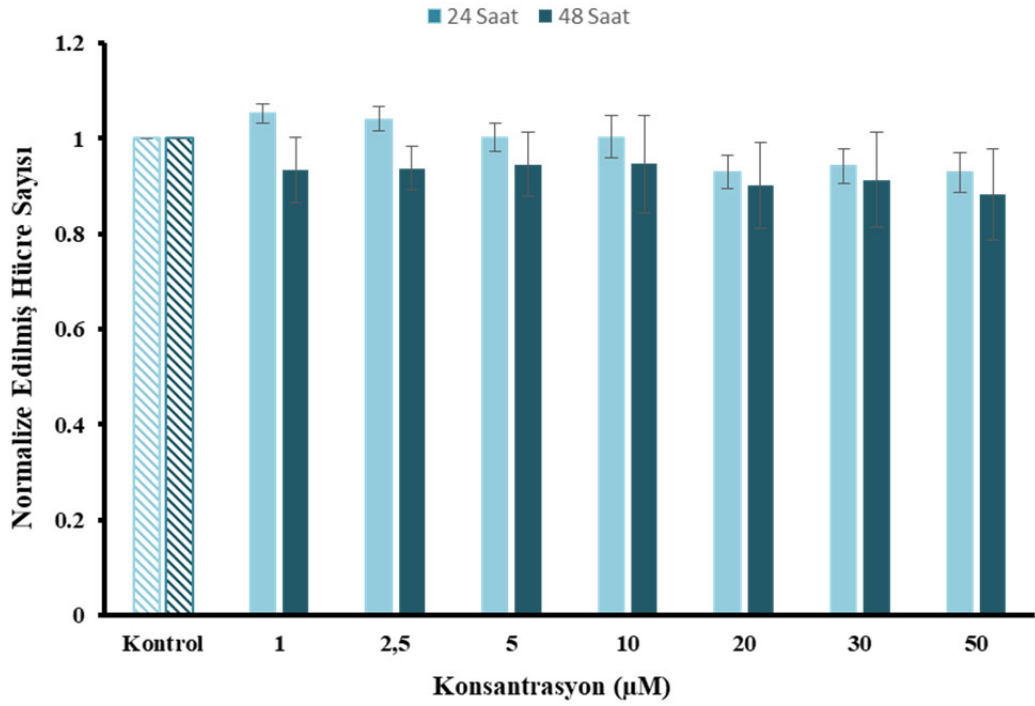
Çalışmada kullanılan diğer farmakolojik ajan FLC konsantrasyonlarından (Şekil 4.4.) 0,5 μ M FLC dozunda toksik bir etki meydana gelmediği belirlenmiştir. Ölü hücre yüzdeleri kontrol grubu ile hem MDA-MB-231 hem de MCF-7 hücrelerinde benzerlik göstermektedir. 50 μ M FLC uygulanan gruplarda ise ölü hücre yüzdelерinin yüksek metastatik MDA-MB-231 hücre hattında MCF-7 hücre hattına oranla daha yüksek olduğu dikkati çekmekte ve kontrol grubundan anlamlı fark ($P<0,05$) gösterdiği belirlenmiştir. Doza bağlı olarak ölü hücre yüzdesi artış göstermiştir. 10 μ M'dan daha düşük dozlarda, ilaçların hücreler üzerinde toksik bir etkisinin bulunmadığı saptanmıştır.



Şekil 4.4. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerinde FLC toksisitesi ($\pm$ SE).

4.3. HÜCRE PROLİFERASYONU

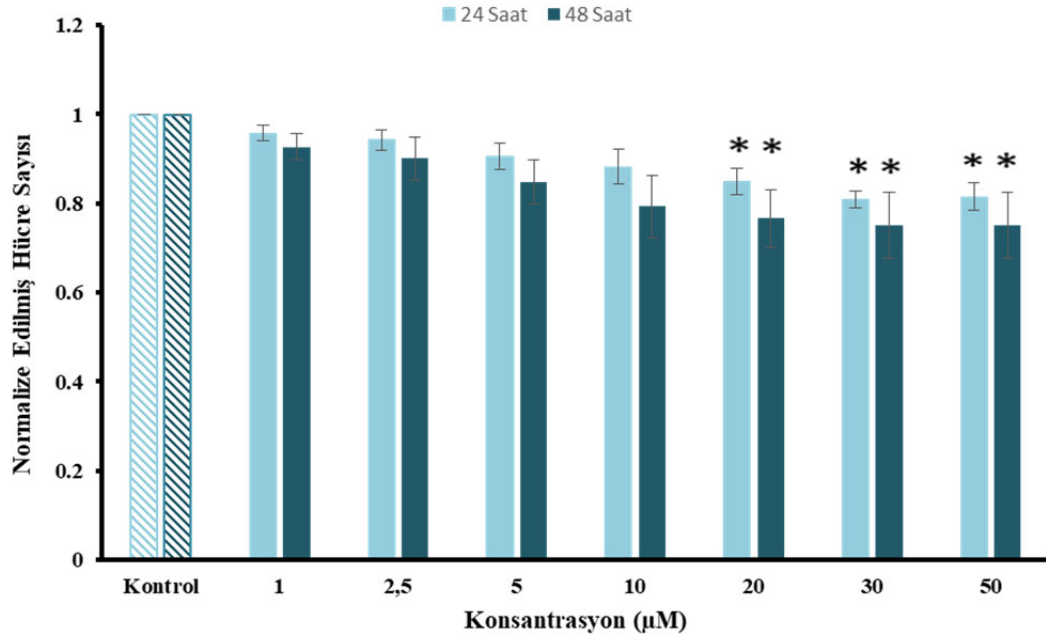
Yüksek metastatik karakterli üçlü negatif meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM ve 50 µM RNL uygulaması ile elde edilen veriler, normalize edilmiş hücre sayılarının zamana bağlı grafiği olarak Şekil 4.5'te verilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda 24 saat süreyle uygulanan RNL, hücrelerin proliferasyonları üzerinde anlamlı bir etki ($P>0,05$) oluşturmamıştır. 48 saat süreyle RNL uygulanması sonucu MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonlarında RNL konsantrasyonunun artışına paralel bir azalma görülmekle beraber, bu azalmanın istatistik bakımdan anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($P>0,05$).



Şekil 4.5. RNL'nin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi ($\pm$ SE).

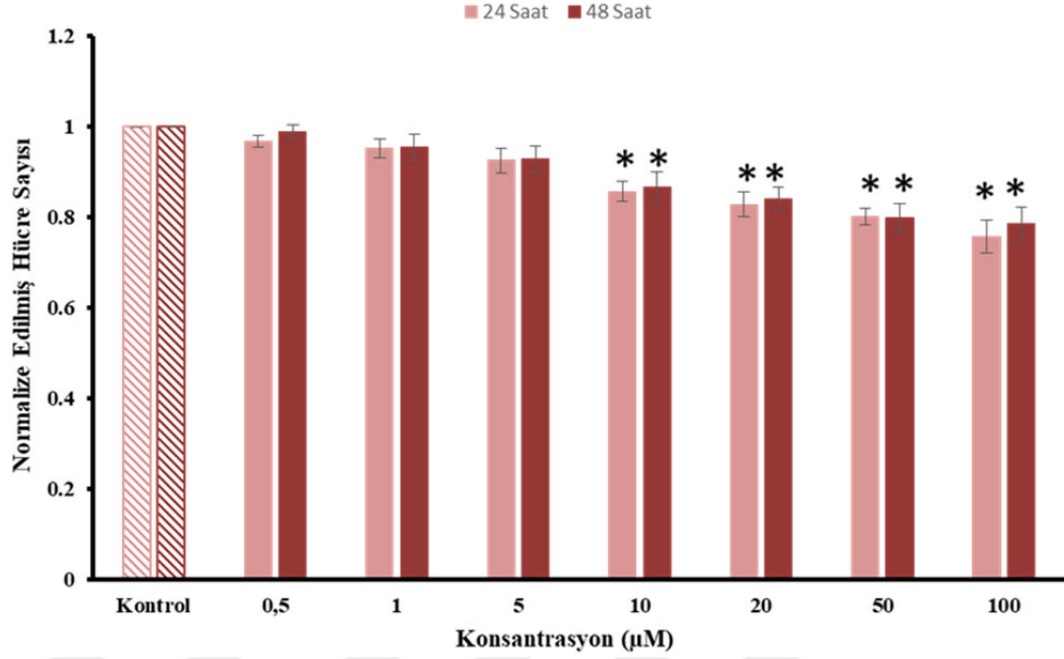
Düşük metastatik karakterli MCF-7 hücreleri üzerinde ise 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM ve 50 µM RNL uygulaması sonucu elde edilen veriler Şekil 4.6'da grafik ile gösterilmiştir. Elde edilen değerler incelendiğinde RNL konsantrasyonunun artışı ile birlikte hücre proliferasyonunun azaldığı görülmüştür. Artan RNL konsantrasyonu ile görülen bu azalma, 20 µM ve üzerindeki RNL konsantrasyonlarında kontrol grubuna oranla istatistik bakımından anlamlı ($P < 0,05$) bir fark gösterdiği saptanmıştır.

RNL uygulama süresi uzadığında (48 saat) MCF-7 hücrelerinin proliferasyonlarında önemli bir değişiklik olmadığı ve elde edilen sonuçların 24 saat sonuçlarına paralel olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.6.). 20 µM ve daha yüksek konsantrasyonlarda deney grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı ($P < 0,05$) bir fark tespit edilmektedir.



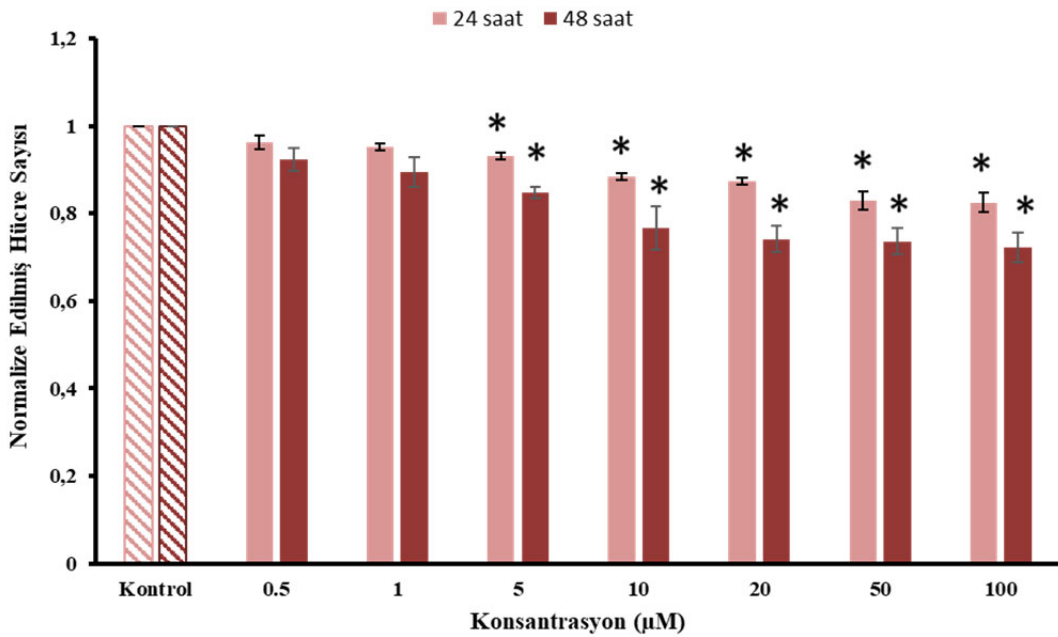
Şekil 4.6. RNL'nin MCF-7 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi ($\pm$ SE).

Değerlendirilen diğer anti-aritmik ajan FLC'nin yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle 0,5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM ve 100 µM olarak uygulaması sonucu normalize edilmiş hücre sayıları Şekil 4.7.'de verilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen verilere göre 24. saatte 0,5 µM, 1 µM ve 5 µM FLC uygulanan deney gruplarında kontrol grubuna oranla istatistik bakımdan anlamlı bir fark görülmediği ($P > 0,05$) buna karşın 10 µM, 20 µM, 50 µM ve 100 µM FLC uygulanan gruplarda ise, hücre proliferasyonunun giderek azaldığı ve bu azalmanın istatistik olarak anlamlı ($P < 0,05$) olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.7. FLC'nin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi (±SE).

Düşük metastatik MCF-7 hücrelerine 24 ve 48 saat süre ile aynı konsantrasyonlarda FLC uygulanması sonucu elde edilen normalize hücre sayıları Şekil 4.8'de verilmiştir. Elde edilen değerlere göre; 5µM ve üzerindeki FLC konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunun kontrol grubuna oranla anlamlı ($P < 0,05$) bir fark gösterdiği bulunmuştur.



Şekil 4.8. FLC'nin MCF-7 hücreleri üzerindeki zamana bağlı anti-proliferatif etkisi (±SE).

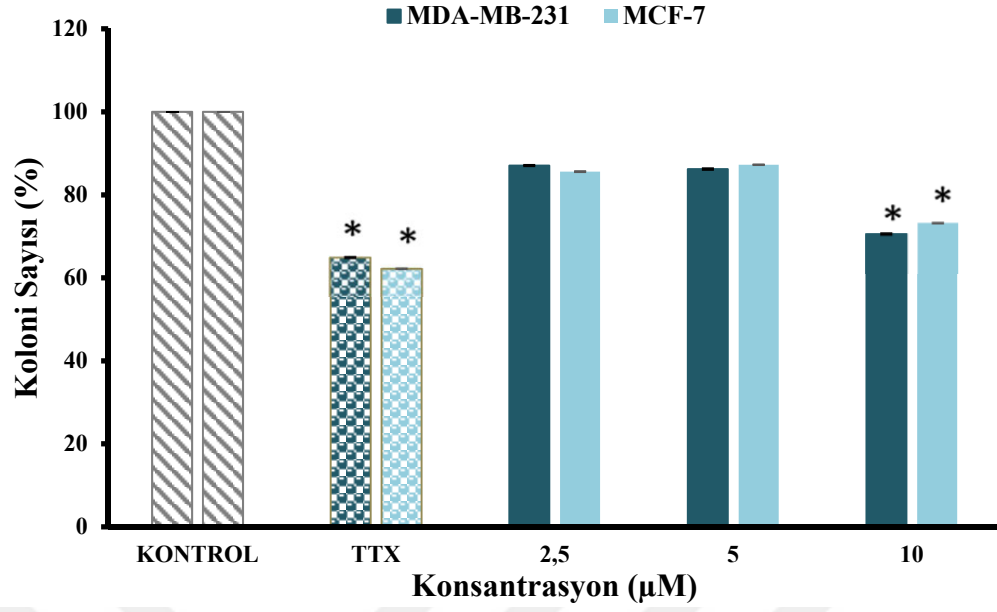
4.4. KOLONİ OLUŞUMU

MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarının koloni oluşumları üzerine RNL ve FLC'nin etkileri değerlendirilmiştir. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerine 48 saat süre ile TTX, RNL ve FLC uygulaması sonucunda minimum 50 veya daha fazla hücre içeren kolonilerin sayılması sonucu elde edilen koloni sayıları Tablo 4.1. ve Şekil 4.9.'da verilmiştir.

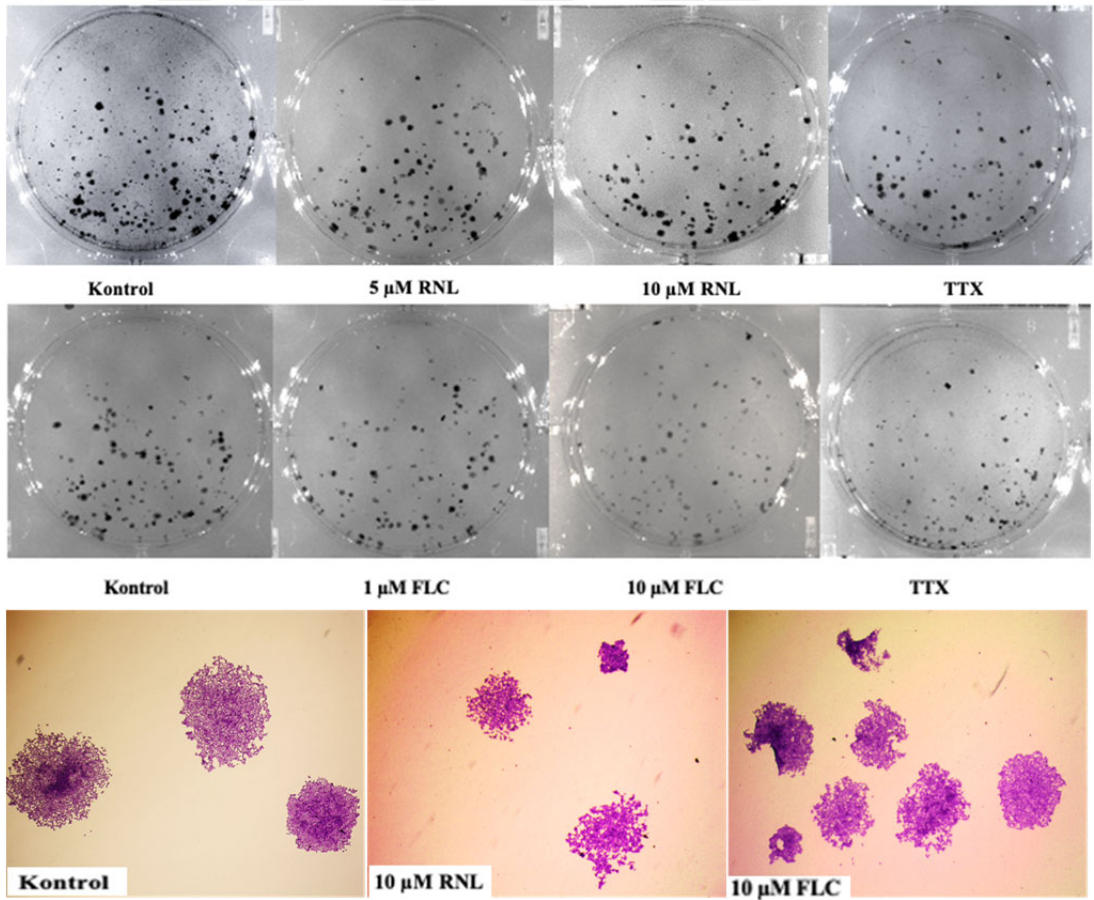
MDA-MB-231 hücrelerinin koloni sayıları sodyum kanal blokeri TTX uygulanması ile oldukça azalmış ve bu azalma %64,85 ile kontrol grubuna oranla anlamlı ($P<0.05$) bulunmuştur (Şekil 4.10.). RNL uygulamasına bağlı olarak artan konsantrasyon ile koloni sayısında azalma görülmüş ve 10 μ M RNL de bu oran %70,63'e düşerek anlamlı bir fark ($P<0.05$) meydana gelmiştir (Şekil 4.10.). RNL, düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin koloni sayıları üzerinde de benzer bir etki göstermiştir.

Tablo 4.1. RNL ve FLC'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin koloni oluşumu üzerindeki etkisi (* $P<0.05$).

		Hücre Hattı	
		MDA-MB-231	MCF-7
Koloni Sayısı (%)	Kontrol	100	100
	TTX	64,85 $\pm$ 0,15*	62,17 $\pm$ 0,1*
	RNL 2,5 μ M	87,06 $\pm$ 0,16	85,6 $\pm$ 0,12
	RNL 5 μ M	86,2 $\pm$ 0,19	87,25 $\pm$ 0,09
	RNL 10 μ M	70,63 $\pm$ 0,18*	73,24 $\pm$ 0,10*
	FLC 0,5 μ M	89,01 $\pm$ 0,14	86,66 $\pm$ 0,09
	FLC 1 μ M	85,57 $\pm$ 0,19	85,75 $\pm$ 0,10
	FLC 10 μ M	75,4 $\pm$ 0,14*	71,34 $\pm$ 0,11*

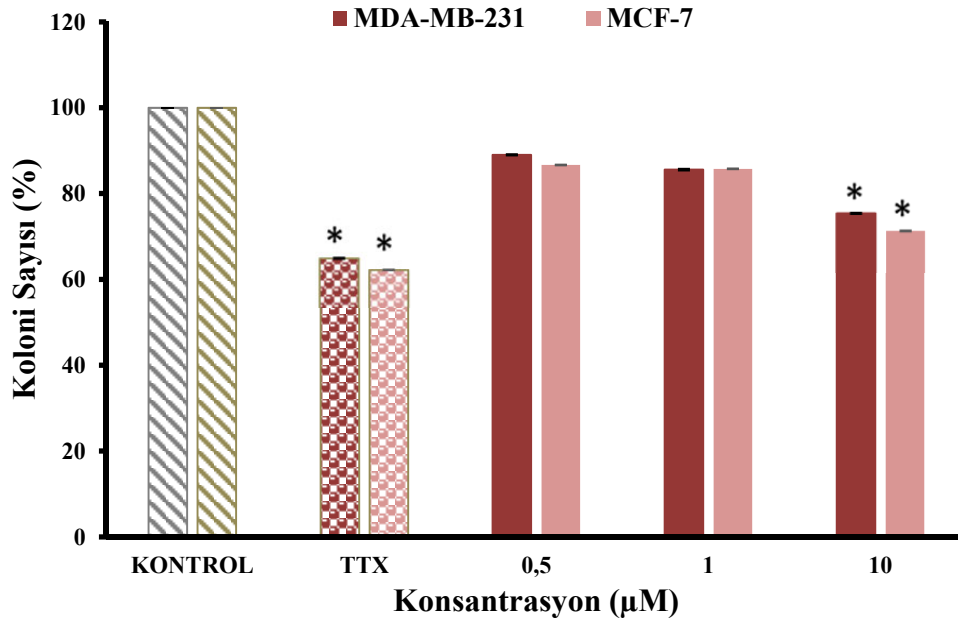


Şekil 4.9. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin koloni sayıları üzerine RNL etkisi (* P<0.05).

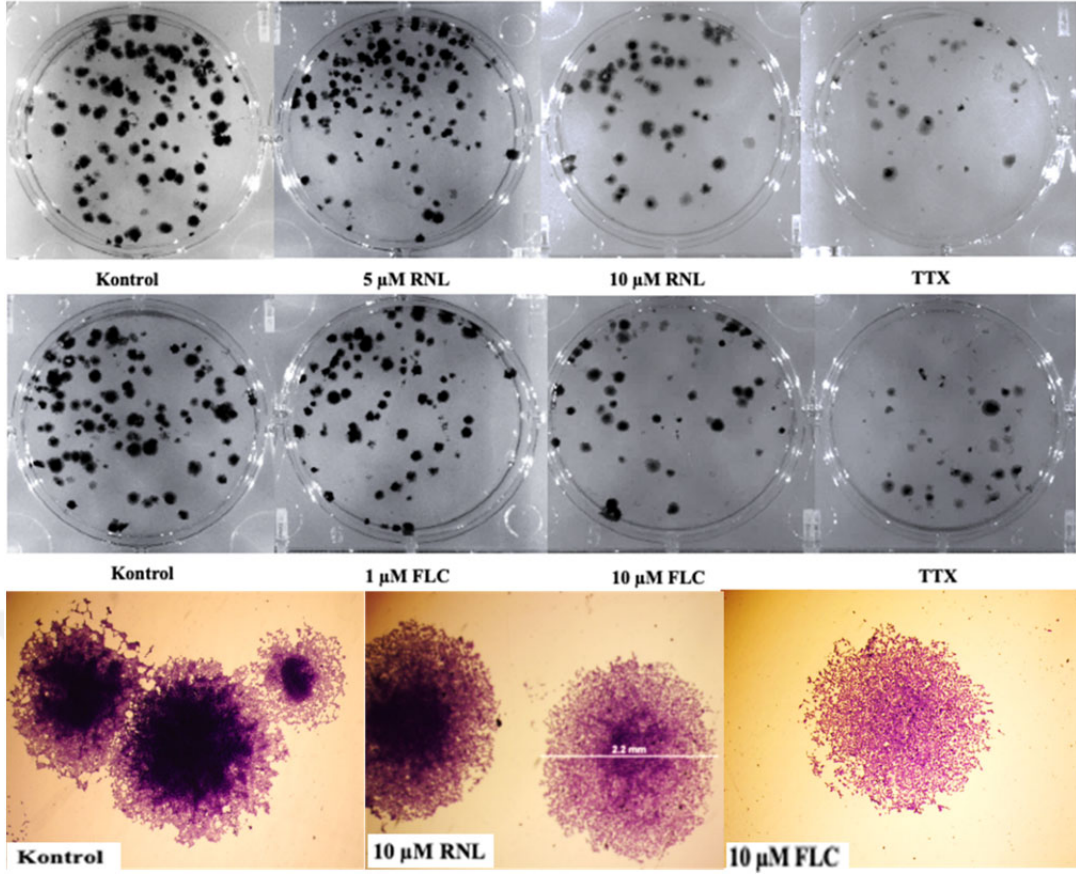


Şekil 4.10. MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşumu üzerine RNL ve FLC'nin etkisi (4x).

Diğer anti-aritmik ajan FLC ise hem MDA-MB-231 hem de MCF-7 hücrelerinin koloni sayısını konsantrasyon artışına bağlı olarak azaltmış ve 10 μ M FLC’de bu azalmanın anlamlı ($P<0.05$) olduğu görülmüştür (Tablo 4.1., Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.).



Şekil 4.11. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin koloni sayıları üzerine FLC etkisi (* $P<0.05$).



Şekil 4.12. MCF-7 hücrelerinin koloni oluşumu üzerine RNL ve FLC'nin etkisi (4x).

4.5. MİGRASYON (MOTİLİTE)

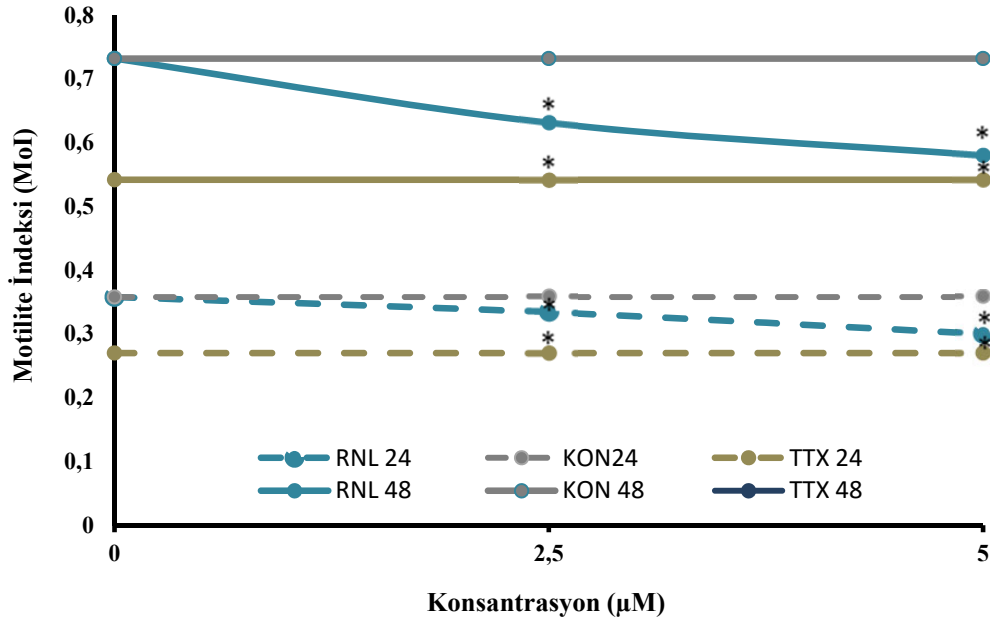
RNL'nin, yüksek metastatik ve yüksek oranda VGSC ekspresyonu yapan MDA-MB-231 ve düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin lateral hareketi üzerindeki etkilerini belirlemek üzere, RNL'nin hücre proliferasyonu üzerinde etki göstermediği saptanan 2,5 µM ve 5 µM konsantrasyonlar her iki hücre soyuna 24 ve 48 saat süreler ile uygulanmıştır. Elde edilen değerler MI (Motilite İndeksi) = $1 - (W_t / W_0)$ formülünde yerine konularak hücrelerin motilite indeksi hesaplanmıştır. Yüksek metastatik MDA-MB-231 ve düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin lateral hareketi üzerine RNL uygulanması sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 4.2'de verilmiş ve Şekil 4.13.'de grafiği çizilmiştir.

Kontrol grubunda, $0,358 \pm 0,004$ olarak belirlenen motilite indeksi 48. saatte $0,732 \pm 0,006$ olarak saptanmıştır. VGSC blokeri olan ve çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan TTX grubunda ise, 24. saatte $0,270 \pm 0,004$ iken, 48. saatte $0,542 \pm 0,009$ motilite indeksi ile kontrol grubuna oranla hücrelerin motilitesini sırasıyla %24,58 ve %25,95 anlamlı olarak ($P < 0,05$) azaltmıştır (Şekil 4.13.). Deney gruplarından elde edilen motilite indeksleri 2,5 μM ve 5 μM RNL uygulanan hücrelerde 24. saatte sırasıyla $0,334 \pm 0,005$ ve $0,300 \pm 0,024$, 48 saatte ise, $0,631 \pm 0,010$ ve $0,580 \pm 0,07$ olmuştur (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. MDA-MB-231 hücrelerine RNL ve FLC uygulanması ile elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri ($\pm\text{SE}$).

	Motilite İndeksi (Mol)		Motilite İndeksindeki Değişim (%)		İstatistiksel Değerlendirme (*)
	24. saat	48. saat	24. saat	48. saat	
Kontrol	$0,358 \pm 0,004$	$0,732 \pm 0,006$	-	-	-
TTX (600nM)	$0,270 \pm 0,004$	$0,542 \pm 0,009$	24,58*	25,95*	$P < 0,05$
RNL 2,5 μM	$0,334 \pm 0,005$	$0,631 \pm 0,010$	6,70*	13,79*	$P < 0,05$
RNL 5 μM	$0,300 \pm 0,024$	$0,580 \pm 0,007$	16,20*	20,76*	$P < 0,05$
FLC 0,5 μM	$0,341 \pm 0,015$	$0,695 \pm 0,006$	4,74	5,05*	$P < 0,05$
FLC 1 μM	$0,329 \pm 0,004$	$0,603 \pm 0,006$	8,10*	17,62*	$P < 0,05$

Yapılan istatistik değerlendirmelere göre; 2,5 μM ve 5 μM RNL uygulanmış deney gruplarından elde edilen değerlerin kontrol grubuna oranla hücrelerin hem 24 hem de 48. saatteki lateral motilitesini anlamlı olarak azalttığı ($P < 0,05$) belirlenmiştir. Motilite % değerlerine bakıldığında, özellikle 48. saatte 5 μM RNL grubunda %20,76 ile sodyum kanal blokeri TTX'e yakın seviyede hücrelerin lateral hareketini inhibe ettiği ortaya konmuştur (Şekil 4.13.).

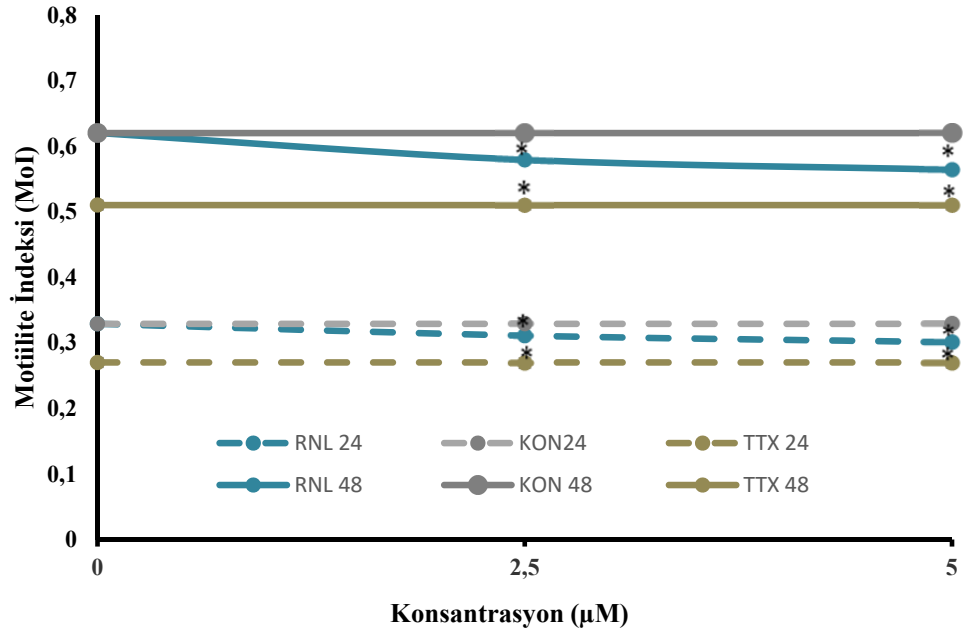


Şekil 4.13. RNL'nin MDA-MB-231 hücrelerinin lateral hareketi üzerine etkisi (*P<0,05).

RNL uygulanan düşük metastatik karakterli ve zayıf VGSC ekspresyonuna sahip MCF-7 hücreleri, kontrol grubunda, 24. saatte $0,329 \pm 0,005$ olarak belirlenen motilite indeksi 48. saatte $0,620 \pm 0,006$ olarak saptanmıştır (Tablo 4.3.). TTX kontrol grubuna oranla MCF-7 hücrelerinin motilitesini sırasıyla %17,93 ve %17,74 olarak anlamlı ($P < 0,05$) azaltmıştır. Deney grubunda 2,5 µM RNL uygulanan hücrelerde motilite indeksi 24. saatte %5,47 ve 48. saatte %6,61 iken, 5 µM RNL uygulandığında sırasıyla %8,51 ve %9,03 olmuştur. Hem TTX hem de, uygulanan iki farklı RNL konsantrasyonu sonucunda MCF-7 hücrelerinin motilitesi kontrol grubunun motilitesinden istatistik bakımından anlamlı bir ($P < 0,05$) fark gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.14.).

Tablo 4.3. MCF-7 hücrelerine RNL ve FLC uygulanması ile elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri ($\pm$ SE).

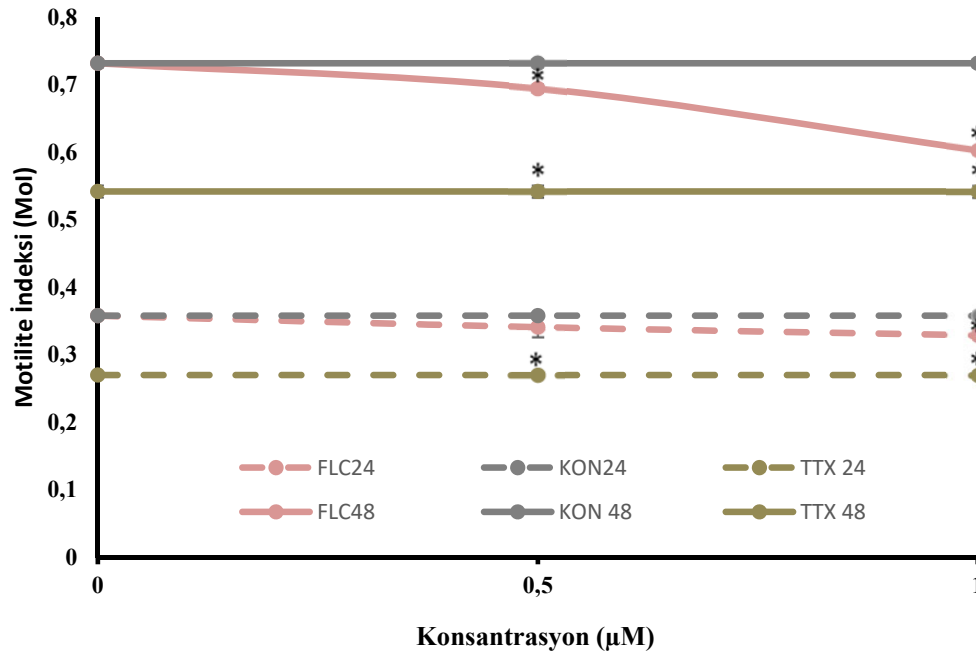
	Motilite İndeksi (Mol)		Motilite İndeksindeki Değişim (%)		İstatistiksel Değerlendirme (*)
	24. saat	48. saat	24. saat	48. saat	
Kontrol	0,329 $\pm$ 0,005	0,620 $\pm$ 0,006	-	-	-
TTX (600 nM)	0,270 $\pm$ 0,007	0,510 $\pm$ 0,007	17,93*	17,74*	P<0,05
RNL 2,5 μM	0,311 $\pm$ 0,005	0,579 $\pm$ 0,004	5,47*	6,61*	P<0,05
RNL 5 μM	0,301 $\pm$ 0,005	0,564 $\pm$ 0,004	8,51*	9,03*	P<0,05
FLC 0,5 μM	0,318 $\pm$ 0,017	0,604 $\pm$ 0,005	3,34	3,38	P>0,05
FLC 1 μM	0,316 $\pm$ 0,004	0,583 $\pm$ 0,004	3,95	5,96*	P<0,05



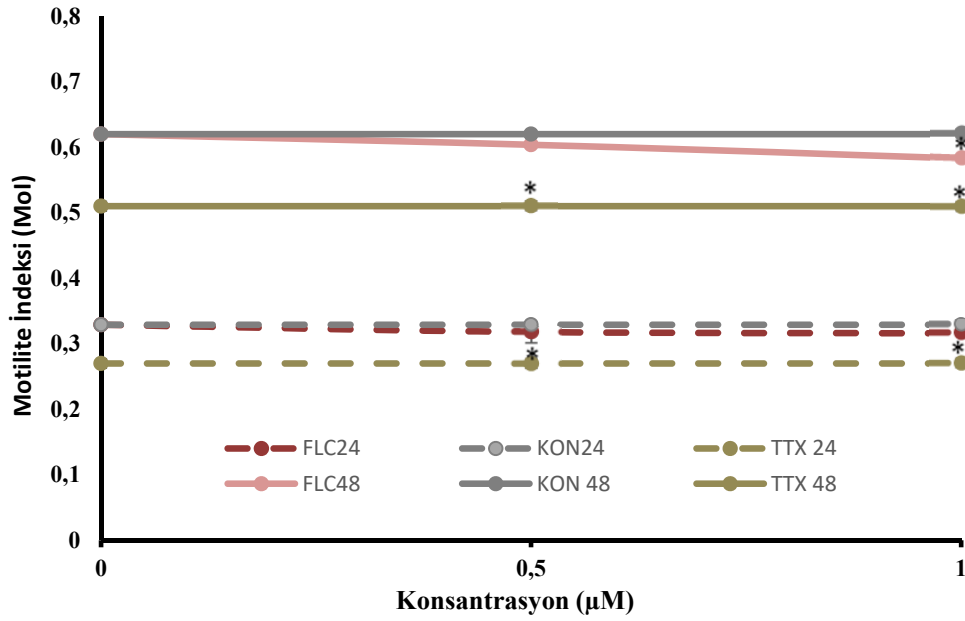
Şekil 4.14. RNL'nin MCF-7 hücrelerinin lateral hareketi üzerine etkisi (*P<0,05).

Çalışmada kullanılan anti-aritmiklerden FLC'nin yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinin lateral hareketi üzerine etkisini ortaya koyan sonuçlar Tablo 4.2 ve Şekil 4.15'te gösterilmiştir. 0,5 μ M FLC, MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonu üzerinde 24. saatte kontrol grubuna oranla anlamlı bir fark göstermemiştir ($P>0,05$). 48 saat deney sonuçlarına göre ise; 0,5 μ M FLC %5,05 ve 1 μ M FLC %17,62 oranında hücrelerin motilitesini baskılamış ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark ($P<0,05$) meydana gelmiştir.

FLC'nin MCF-7 hücrelerine 0,5 μ M ve 1 μ M konsantrasyonlarda uygulanması ile hücrelerin motilite indeksleri 24. saatte $0,318\pm0,017$ ve $0,316\pm0,004$ olarak bulunmuştur (Tablo 4.3.). Elde edilen 24. saatteki sonuçlar kontrol grubuna oranla anlamlı bir fark göstermemiştir ($P>0,05$). 48. saatteki deney sonuçlarına göre ise, MCF-7 hücrelerinin motiliteleri %3,38 ve %5,96' oranında azalmış ve FLC 1 μ M'da görülen azalma istatistik bakımdan anlamlı ($P<0,05$) bulunmuştur (Tablo 4.3., Şekil 4.16.).



Şekil 4.15. FLC'nin MDA-MB-231 hücrelerinin lateral hareketi üzerine etkisi (* $P<0,05$).



Şekil 4.16. FLC'nin MCF-7 hücrelerinin lateral hareketi üzerine etkisi (*P<0,05).

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde 48. saatte MDA-MB-231 hücrelerine hem RNL hem de, FLC uygulaması sonucunda tüm konsantrasyonlarda hücrelerin motilitesi üzerinde farklı oranlarda inhibe edici bir etki meydana geldiği belirlenmiştir. En yüksek inhibisyon 5 µM RNL konsantrasyonunda izlenmekle beraber bu azalmanın VGSC blokeri olan TTX'in inhibisyon oranının biraz altında kaldığı görülmüştür. MCF-7 hücrelerinde ise; 48. saatte, her iki RNL konsantrasyonu ve 1 µM FLC uygulanması ile hücrelerin motilitesi üzerinde inhibisyon meydana geldiği ancak, bu inhibisyon oranlarının MDA-MB-231 hücrelerindeki kadar düşük olduğu dikkati çekmektedir.

4.6. TRANSVERS HAREKET

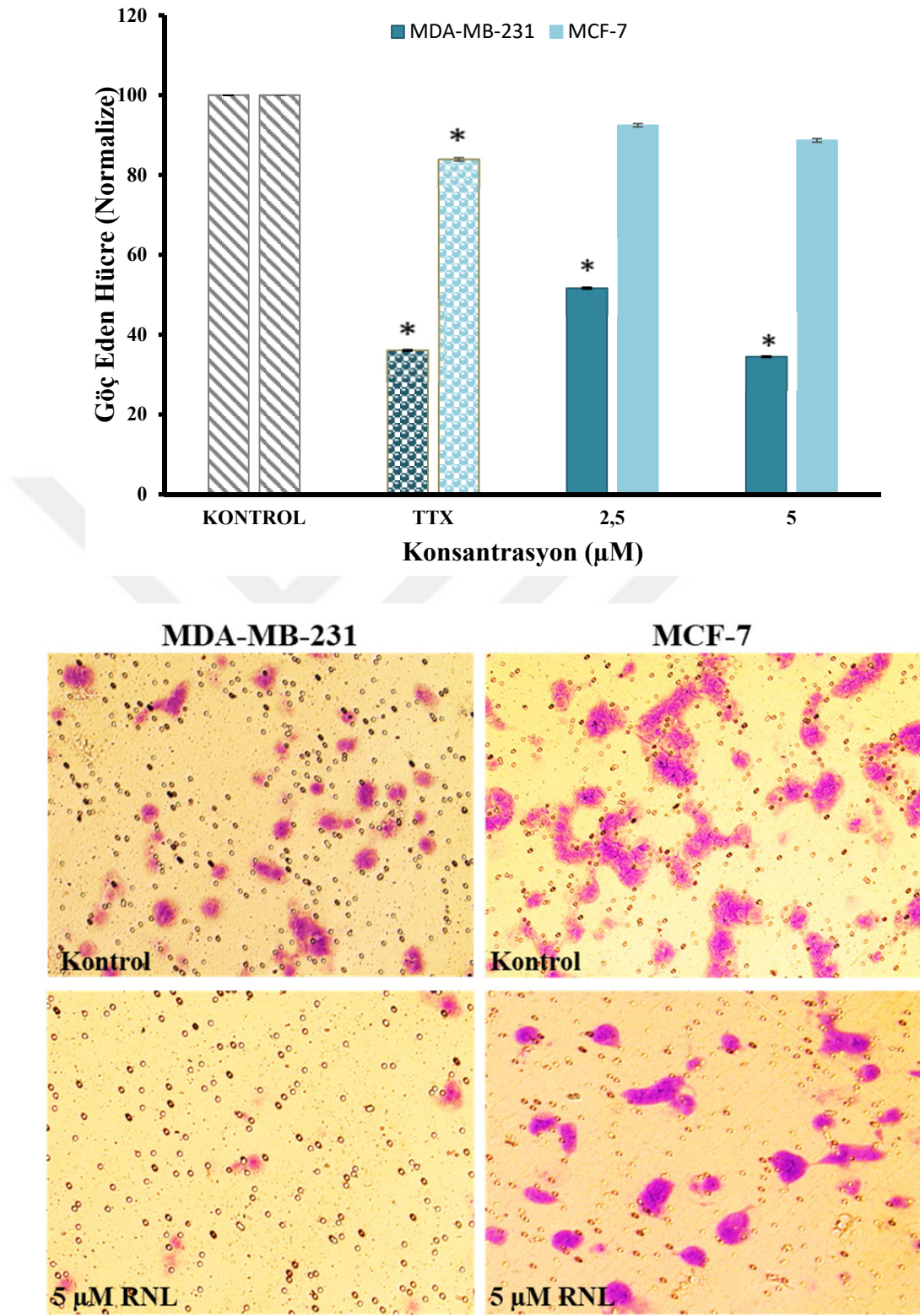
NaV1.5 ekspresyonu yüksek olan MDA-MB-231 ve NaV1.5 ekspresyonu düşük olan MCF-7 hücrelerinin transvers migrasyonu üzerinde RNL ve FLC'nin etkisini değerlendirmek üzere, hücrelerin bazal membrandan invaze olma kapasiteleri değerlendirilmiş ve göç eden hücre sayısı (%) Tablo 4.4'te verilmiş ve grafikleri çizilmiştir. Yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonu üzerine RNL'nin etkileri Şekil 4.17'te gösterilmiştir.

Standart VGSC blokeri olan TTX, MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonunu kontrol grubuna göre %63,94 oranında ($P<0.05$) inhibe etmiştir. RNL'nin 2,5 μM olarak uygulanması sonucu hücrelerin invazyonunu %48,31 oranında azaltırken, 5 μM konsantrasyonda uygulanması sonucu ise, MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonunu %65,62 ile en yüksek oranda inhibisyon meydana getirmiştir (Şekil 4.17.). Düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin transvers hareketi üzerinde TTX %21,39 oranında ($P<0.05$) inhibe etmiştir (Tablo 4.4.). RNL'nin her iki konsantrasyonu da MCF-7 hücrelerinin invazyonu üzerinde anlamlı bir etki göstermemiştir ($P>0,05$).

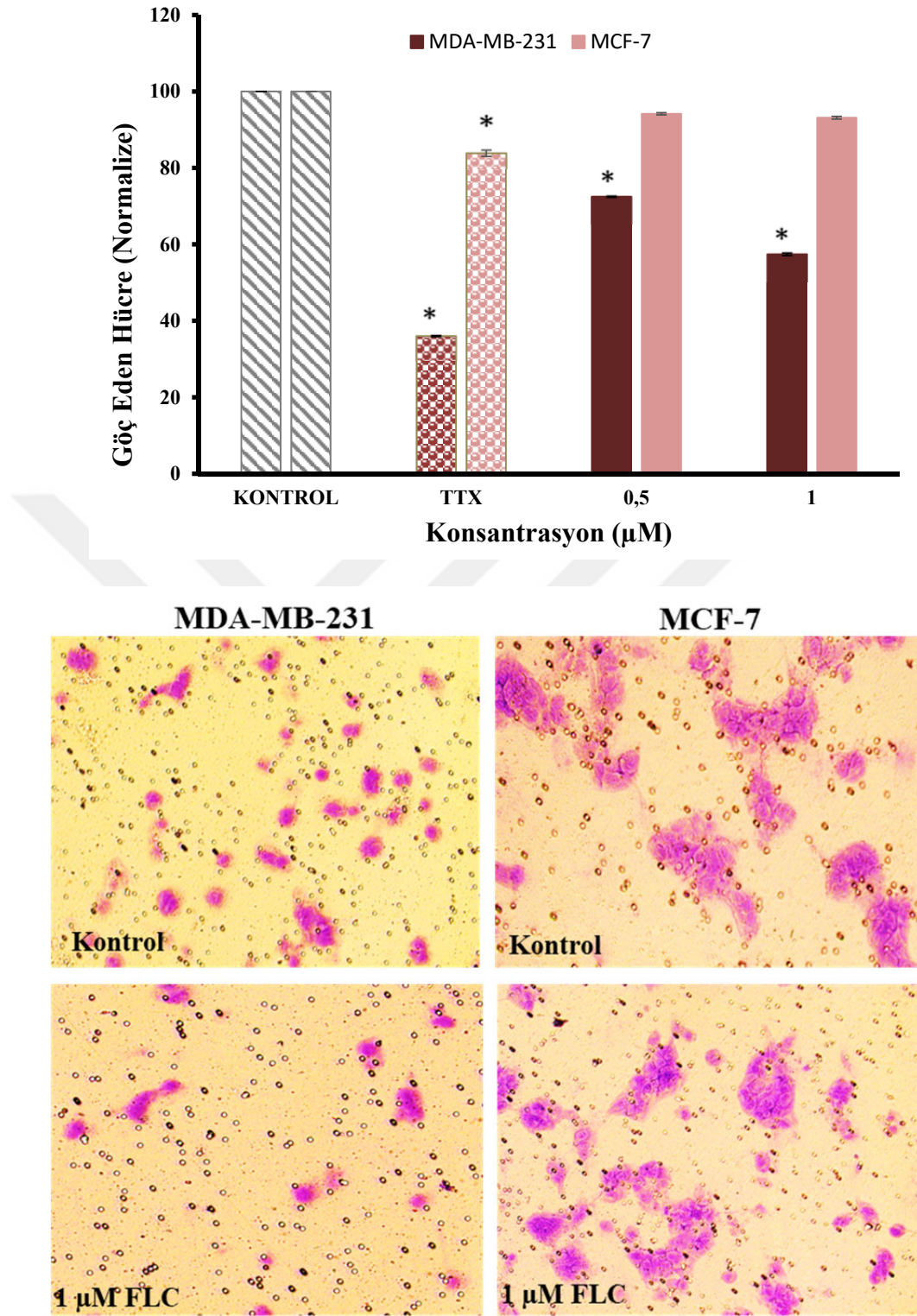
Tablo 4.4. RNL ve FLC'nin göç eden hücre sayısı (%) üzerindeki etkisi (* $P<0.05$).

	MDA-MB-231	MCF-7
Kontrol	100	100
TTX	36,06 $\pm$ 0,13*	78,60 $\pm$ 0,47*
RNL 2,5 μM	51,68 $\pm$ 0,22*	94,79 $\pm$ 0,80
RNL 5 μM	34,37 $\pm$ 0,15*	93,62 $\pm$ 1,06
FLC 0,5 μM	72,46 $\pm$ 0,27	95,43 $\pm$ 1,02
FLC 1 μM	57,34 $\pm$ 0,33	94,30 $\pm$ 0,69

Anti-aritmik ajan FLC, MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonunu sırasıyla, %27,53 %42,65 ($P<0.05$) oranında inhibe etmiştir (Tablo 4.4., Şekil 4.18.) Düşük metastatik MCF-7 hücreleri üzerinde ise, sırasıyla %4,56 ve 5,69 oranlarıyla invaze olan hücre sayısı üzerinde anlamlı bir etki göstermemiştir ($P<0.05$) (Tablo 4.4., Şekil 4.18).



Şekil 4.17. RNL'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin invazyonu üzerine etkisi.

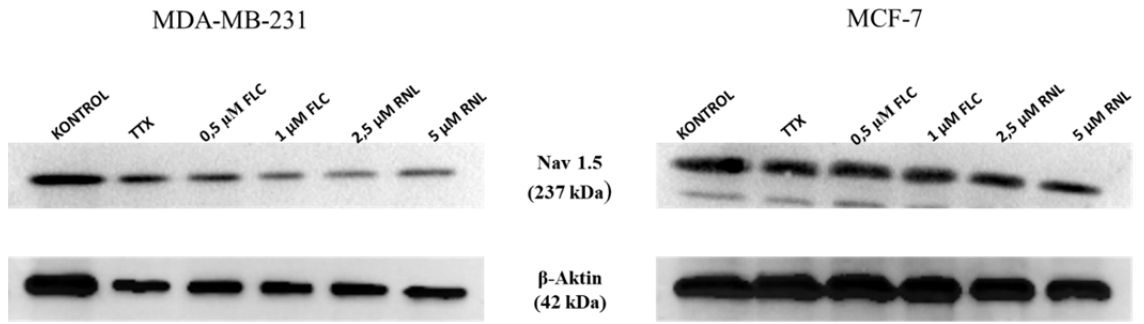


Şekil 4.18. FLC'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin invazyonu üzerine etkisi.

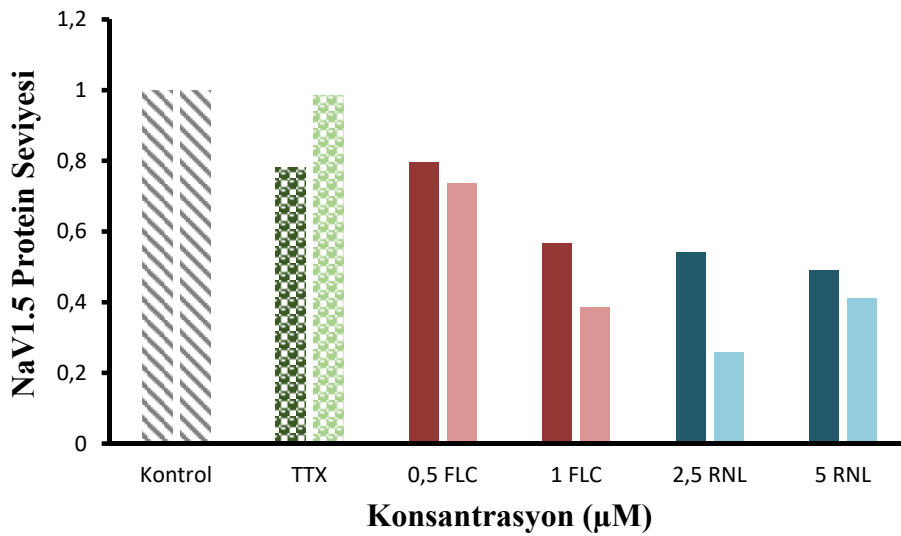
4.7. NAV1.5 PROTEİN MİKTAR TAYİNİ

Meme kanseri hücrelerinde metastatik yayılım ile ilişkili olduğu bilinen VGSC NaV1.5 protein ifadesi, immunoblotlama yöntemi ile incelenmiştir. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır ve normalizasyon β -aktin ifadesine göre gerçekleştirilmiştir. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde yapılan immunoblotlama sonuçlarına göre artan konsantrasyonlarda NaV1.5 seviyesinde RNL ile tedavi sonucu kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.19., Şekil 4.20.).

FLC'nin artan konsantrasyonlarının da, NaV 1.5 proteininin aktivitesini inhibe etme eğiliminde olduğunu ifade etmek mümkündür (Şekil 4.19. ve Şekil 4.20.).



Şekil 4.19. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerindeki NaV1.5 üzerine RNL ve FLC etkisi.



Şekil 4.20. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerindeki NaV1.5 seviyelerine RNL ve FLC etkisi (MDA-MB-231; koyu renk bar, MCF-7; açık renk bar).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Metastatik meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türlerinden biridir ve tedavi stratejilerinde genellikle hormon reseptörleri pozitif olanlarına odaklanılmıştır. Bununla birlikte, üçlü negatif meme kanseri, özellikle agresif doğası ve sınırlı tedavi seçenekleri nedeniyle halen önemli bir klinik problemi oluşturmaktadır. TNBC, östrojen, progesteron ve HER2 reseptörlerine negatif yanıt verir, bu durum hormon terapilerinin ve hedefe yönelik tedavilerin etkisiz kalmasına, metastaz gelişimine ve sonucunda bireylerin kaybedilmesine neden olur. Metastaza yönelik alternatif tedavi stratejilerinden biri de iyon kanal blokerleri kullanılarak tümör hücrelerinin metastaza gidişini engellemektir. Çalışma, anti-aritmik RNL ve FLC'nin TNBC'deki anti-metastatik potansiyelini değerlendirmek amacıyla tasarlanmıştır. Anti-aritmik ajanlardan; RNL, göğüs ağrısı olarak bilinen anjina pektorisin tedavisinde, FLC ise, taşikardi gibi aritmilerin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ilaçlar iyon kanallarını bloke edici etki mekanizmaya sahiptirler ve hücreye giren Na^+ iyonlarının azaltılmasında etkili olurlar (Burashnikov vd., 2013; Salvage vd., 2018).

Çalışmalar kanserden kaynaklanan ölümlerin primer tümörden çok metastaz sebebiyle olduğunu göstermektedir (Djamgoz & Onkal, 2013; Fairhurst vd., 2015; Koltai, 2015). Bu çerçevede kanser tedavisinde öncelik verilmesi gereken temel konunun metastaz olduğu gerçeği ortaya çıkar. Bu çalışmada da klinikte anti-aritmik olarak kullanılan RNL ve FLC'nin farklı metastatik karaktere ve farklı NaV1.5 ekspresyonuna sahip MDA-MB-231 ile MCF-7 TNBC hücreleri üzerindeki VGSC aracılı rolü değerlendirilmiştir. Kullanılan anti-aritmiklerden FLC'nin ilk kez bir kanser hücresi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bu tez çalışması in vitro olarak gerçekleştirilmiş ve;

- RNL ve FLC'nin hücre poliferasyonları üzerindeki etkileri,
- Metastatik potansiyeli oluşturan hücre motilite ve invazyonu üzerine RNL ve FLC'nin etkileri ile,
- NaV 1.5 ekspresyonu ortaya konmuştur.

Yüksek metastatik MDA-MB-231 ve düşük metastatik MCF-7 hücreleri üzerinde RNL ve FLC'nin sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle araştırılmış ve çalışmada

seçtiğimiz konsantrasyonların hücre canlılığı üzerinde toksik bir etkisi olmadığı bulunmuştur. Hücrelerin proliferasyonuna RNL ve FLC'nin etkilerinin araştırılması sonucu elde ettiğimiz verilere göre; RNL'nin 1 μ M-50 μ M konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyon yetenekleri üzerinde bir inhibisyon meydana getirmediği ancak, MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu 20 μ M'dan itibaren inhibe ettiği ortaya konmuştur. MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunu 10 μ M ve üzeri konsantrasyonlardaki FLC baskımlarken, MCF-7 hücrelerinde inhibitör etki 5 μ M ve üzerindeki konsantrasyonlarda görülmüştür.

Literatürde, MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna RNL etkilerini inceleyen birkaç çalışma bulunmaktadır. RNL ile meme kanseri arasındaki ilişkinin in vitro ve in vivo olarak araştırıldığı ve Nav1.5 kanalını hedefleyen bir çalışmada Driffort vd. (2014) RNL'nin sitotoksik etkisini değerlendirmiş ve 0,1-100 μ M konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir. Ayrıca NMRI nude farelerde MDA-MB-231 hücreleriyle oluşturdukları meme kanseri üzerine 50 mg/kg/gün olarak 8 hafta süresince uygulanan RNL'nin farelerin akciğerinde meydana gelen kolonizasyonu inhibe ettiğini belirtmişlerdir (Driffort vd., 2014). MDA-MB-231 hücrelerinde, 0.625 μ M, 1.25 μ M, 2,5 μ M ve 5 μ M RNL ile yapılan başka bir in vitro çalışmada; 5 μ M RNL konsantrasyonunun hücrelerin normoksik (normal oksijen seviyeleri) veya hipoksik (düşük oksijen seviyeleri) koşullarda 48 saat boyunca hücre canlılığı veya çoğalması üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı ortaya konmuştur (Qiu vd., 2022).

Nav1.7 kanal ekspresyonu yüksek olan sıçan prostat kanseri ile çalışan Rızaner ve arkadaşlarının nöro-koruyucu bir ilaç olan riluzol ve RNL'nin Mat-LyLu hücreleri üzerindeki anti-invaziv etkilerinin in vitro toksik olmayan konsantrasyonlarda hem normoksik hem de hipoksik koşullar da gerçekleştirdiği çalışmada, hipoksinin hücre canlılığı üzerinde bir etkisi olmadığı ancak 48 saatte büyümeyi azalttığı ve 20 μ M RNL'nin, 24 saat boyunca normoksi veya hipoksi altında hücre canlılığı veya büyümesi üzerinde etki göstermediğini ifade etmişlerdir (Rızaner vd., 2020).

Bu çalışmalardan farklı olarak 30 mg/kg RNL günde iki kez mutant APC (min/+) farelere intraperitoneal olarak, 30 gün gibi uzun süreli uygulandığında 40. günden itibaren barsakta tümör lezyonları oluştuğu ve in situ, invaziv karsinomaların

geliştiği Suckow ve arkadaşları (2004) tarafından ileri sürölmüştür. Driffort vd. (2014) nin kullandığından daha düşük RNL konsantrasyonlarında elde ettiğimiz sonuçlar, MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonu üzerinde bir inhibisyon meydana getirmemiştir ve bu bulgular literatürle uyumluluk içerisinde dir.

Literatürde, FLC'nin kanser tedavisindeki etkinliğini değ erlendiren bir çalışma henüz bulunmamakta olup, genellikle anti-aritmik etkileri üzerine odaklanılmış tır. Bir çalışmada, FLC'nin kalp hücrelerindeki iyon kanallarına olan etkileri, elektrofizyolojik testler kullanılarak incelenmiştir (Holle vd., 2016). Baş ka bir makalede FLC'nin hızlı sodyum akımını inhibe ettiği ve aksiyon potansiyel süresini kısalttığı bulunmuştur (Salvage vd., 2015). 1 µM ve 5 µM FLC ile yapılan bir diğ er çalışmada; FLC konsantrasyonunun 5 µM'a arttırılması ile sodyum akımlarının azaldığı na işaret edilmiştir (Salvage vd., 2018). FLC ve verapamil ile yapılan bir çalışmada, NaV 1.5'in yapısını çözmek için 1 mM, FLC, NaV 1.5 üzerindeki etkisini incelemek için 10 µM, NaV 1.5'in kapılama por akımını nasıl etkilediğini ölçmek için, 100 µM FLC kullanılmış tır aynı zamanda FLC'nin konsantrasyona bağ lı bir şekilde fKv1.4ΔN akımlarını inhibe ettiği de gösterilmiştir (Chen vd., 2012).

Yapmış olduğumuz deneylerle, MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre soylarının koloni oluş umları üzerinde RNL ve FLC'nin etkileri değ erlendirilmiştir. Her iki hücre soyunda da, tüm konsantrasyon seviyelerinde koloni sayısının azaldığı gözlemlenmiştir. Özellikle TTX ve 10 µM RNL ve 10 µM FLC konsantrasyonlarında bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (P<0.05). Bu sonuçlar, RNL ve FLC'nin meme kanseri hücrelerinin koloni oluş umunu baskıladığı nı ortaya koymaktadır. Koloniformasyon yeteneği, kanser hücrelerinin büyü me ve yayılma kapasitesini yansıtan önemli bir parametredir. Dolayısıyla, bu bulgular, RNL ve FLC'nin potansiyel anti-kanser etkilerini desteklemektedir.

Kanser hücrelerinin en temel özelliklerinden biri kontrol edilemeyen hücre çoğ alması, diğ eri ise farklı doku veya organlara yayılması yani metastaz yapmasıdır. Metastatik davranış , hücrelerin hareketi migrasyon ve invazyon yoluyla gerçekleş mektedir. Metastatik davranış , in vitro olarak migrasyon ve invazyon deneyleri ile belirlenmektedir.

Çalışmamızda RNL'nin hücre proliferasyonu üzerinde etki göstermediği belirlenen 2,5 µM ve 5 µM konsantrasyonları, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin lateral hareketini araştırma amacıyla kullanılmıştır. Hücrelerde sitostatik veya sitotoksik etki göstermeyen konsantrasyonlar 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Elde edilen verilere göre; kontrol grubunda, motilite indeksi 24 saate oranla 48. saatte artmıştır. VGSC blokeri TTX ise, MDA-MB-231 hücrelerin motilitesini hem 24 hem de 48. saatte sırasıyla %24,6 ve %26 oranında anlamlı olarak azaltmıştır. 2,5 µM ve 5 µM RNL uygulanan deney gruplarından elde edilen değerler kontrol grubuna oranla, hücrelerin 48. saatteki lateral motilitesini anlamlı ($P<0.05$) olarak azalttığı gözlemlenmiştir. Bu oranın sırasıyla 48 saatte %13,8 ve %20,7 olduğu belirlenmiştir. MCF-7 hücrelerinde ise 48. saatte motilite indeksine 2,5 µM ve 5 µM RNL konsantrasyonlarının etkisi sırasıyla %6,6 ve %9 oranlarıyla anlamlı olarak tespit edilmiştir ($P<0.05$).

Hücrelerin metastatik davranışlarından bazal membrandan invaze olma kapasiteleri yani invazyonu (göç eden hücre sayıları) tespit edilmiştir. Sodyum kanal blokeri olan TTX, yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonunu 48. saatte %63,9 oranında ($P<0.05$) inhibe etmiştir. 2,5 µM RNL %48,9; 5 µM RNL ise %65,6 oranında ($P<0.05$) TTX'den biraz daha yüksek bir inhibisyon göstermiştir ($P<0.05$). Düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin invazyonu üzerinde TTX, %21,4 inhibisyon ($P<0.05$) meydana getirirken, RNL düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin invazyonu üzerinde anlamlı bir etki göstermemiştir ($P>0.05$).

FLC'nin yüksek metastatik MDA-MB-231 ve düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin lateral hareketi üzerindeki etkisi de incelenmiştir. FLC'nin hücre proliferasyonunu etkilemediği saptanan konsantrasyonlardaki dozları, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerine 24 ve 48 saat süreler ile uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, 0,5 µM ve 1 µM dozlarda FLC uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin motilite indeksleri 48. saatte sırasıyla %5 ve %17,6 ile anlamlı olarak saptanmıştır ($P<0.05$). 1 µM FLC MCF-7 hücrelerinin motilite indeksini ise, sadece %6 anlamlı ($P<0.05$) olarak inhibe ettiği belirlenmiştir.

FLC, MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonunu 0,5 μ M konsantrasyonda %27,5 azaltırken, 1 μ M konsantrasyonda inhibisyonun %42 anlamlı ($P < 0.05$) inhibe olduğu tespit edilmiştir. FLC, her iki konsantrasyonda da MCF-7 hücrelerinin invazyonu üzerinde etkisi saptanamamıştır ($P > 0.05$).

Driffort ve arkadaşları, 2014 yılında MDA-MB-231 hücreleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, 50 μ M konsantrasyonunda kullanılan RNL'nin, matrigel kaplı filtrelerle yapılan 24 saatlik invazyon deneyinde shCTL hücrelerinde etkili olduğunu göstermişlerdir. shCTL hücrelerinde, NaV1.5 akımlarının tamamen inhibisyonu ile 30 μ M TTX kullanımı hücre invazyonunu 35 ± 4 azaltırken, RNL kullanımıyla bu azalma 18 ± 3 olarak tespit edilmiştir. NaV1.5 ifadesi olmayan shNaV1.5 kanser hücrelerinde ise invazyon 33 ± 10 oranında azalmıştır. shNaV1.5 hücrelerinde, hem TTX hem de RNL'nin hücre invazyonunu daha fazla azaltma etkisi göstermemesi, RNL'nin NaV1.5 ile ilişkili invazyonu inhibe etmede özgün olduğunu ortaya koymaktadır. Driffort'un 2014 yılındaki çalışmasında RNL'nin in vivo olarak da incelendiği, meme kanseri hücrelerinde NaV1.5 kanal aktivitesini inhibe ederek akciğer kolonizasyonunu azalttığı bulunmuştur. NaV1.5 ekspresyonunun yok edilmesinin, immunodepressed (NMRI nude) farelerde akciğer kolonizasyonunu neredeyse tamamen ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, NaV1.5 ifadesi olan insan meme kanseri hücrelerinin akciğer kolonizasyonu, RNL enjeksiyonu (50 mg/kg/gün) ile anlamlı derecede azalmıştır. RNL'nin lateral motilite ve matrigel invazyonu üzerindeki etkilerinin hipoksik koşullar altında MDA-MB-231 hücrelerinde gerçekleştirildiği bir başka çalışmada, 5 μ M RNL'nin lateral motiliteyi ve invazyonu inhibe ettiği bildirilmiştir (Lee vd., 2019).

Qui ve arkadaşları 2022 yılında MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 TNBC hücrelerinde anti-anjina ilacı RNL'nin, in vitro invazivliği önemli ölçüde inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Çalışmalarında kullandıkları konsantrasyonlardan, 5 μ M RNL'nin invazivliği inhibe ettiğini, 2.5 μ M RNL'nin invazyonu %36, 1,25 μ M RNL'nin %32, 0.625 μ M RNL'nin %24 oranında önemli ölçüde azaltırken RNL'nin (2.5 μ M), hipoksi altında invazyonu %30 oranında önemli ölçüde azalttığını paylaşmışlardır ($P < 0.05$). Hipoksi altında invazyonu inhibe etmede RNL'nin etkinliğinin doza bağımlı olduğu ve 0.625 μ M'a kadar düşük konsantrasyonlarda bile belirgin olduğu bilinmektedir. Buradaki in vitro etkinin hipoksik koşullar altında

görölmüş olması muhtemelen RNL'nin seçici olarak VGSC/nNav1.5 akımının kalıcı bileşenini (INaP) inhibe ettiğı ve INaP'ın hipoksi tarafından teşvik edildiğı fikri ile uyumludur (Guzel vd., 2019). Bu sonuçlar genel olarak, MDA-MB-231 hücrelerindeki yanal hareketliliğın VGSC aktivitesi ile güçlendirildiğini göstermiştir aynı zamanda MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığı ve proliferatif aktivitesinin hipoksik koşullardan (çoğunlukla 24 saat uygulanan %2 oksijen) etkilenmediğini göstermektedir.

Djamgoz ve Onkal'ın (2013) MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin %2 oksijen içeren akut hipoksik ortamda yetiştirildiğı in vitro ortamda gerçekleştirilen çalışmalarında, hipoksik ortamda hücrelerin artan invazyonu incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, 10 µM TTX ve 300 µM RNL'nin artan invazyonu baskıladığını göstermiştir. Özellikle, bu baskılamanın hücre proliferasyonunu etkilemeden Na⁺ kanallarını bloke ederek gerçekleştiğı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, RNL'nin meme kanseri hücrelerinin invazyonunu etkili bir şekilde kontrol etme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Karsinomalarda VGSC ekspresyonu ile metastaz arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, Ranolazine dozu arttıkça, VGSC ifadesi ve metastatik hücre davranışlarının baskılandığı belirtilmiştir. RNL'nin invazyonu etkileme mekanizması tam olarak bilinmese de yazarlar; Ranolazine, VGSC'nin ısrarlı/persistent akımı bloke ederek hücre hareketliliğini ve invazyonunu azaltabileceğı; Ranolazine, VGSC'nin hipoksi altında geliştirdiğı ısrarlı akımı bloke ederek tümör büyümesini ve metastazı azaltabileceğı kanısına varmışlardır (Djamgoz vd., 2019).

Karagöz'ün (2015) çalışmasında, yüksek metastatik Mat-LyLu hücreleri ile oluşturulan Dunning model prostat kanserli sıçanlara farklı dozlarda RNL uygulanarak, primer tümör, akciğer metastaz sayısı ve boyutları ile sağ kalım üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, kullanılan tüm konsantrasyonlarda RNL'nin primer tümör üzerinde anlamlı bir etki göstermediğı ancak, 5 µM RNL'nin akciğerdeki metastazı %46,56 oranında inhibe ettiğı belirlenmiştir. 2,5 µM ve 5 µM RNL'nin 0,1-1 mm çapa sahip küçük metastaz sayısını yaklaşık %55 oranında inhibe ettiğı bununla birlikte, 10 µM RNL'nin stimölasyona neden olduğunu ifade etmiştir. 5 µM RNL aynı zamanda prostat

kanserli sıçanların sağ kalımını arttırdığı da ortaya konmuştur. Bu sonuçlar, RNL'nin sıçanlarda prostat kanseri metastazını inhibe ettiğini ve sağ kalımı artırabileceğini göstermektedir. Bir diğer in vivo çalışmada Mat-LyLu hücrelerinin Kopenhag sıçanları deri altı inkübasyonu takiben primer tümörlerin ve metastazların gelişimi incelenmiştir, 2.5 ve 5 μ M RNL konsantrasyonunun NaV1.7 kanal aktivitesini inhibe ettiği ve NaV1.7 ile ilişkili hücre migrasyon ve invazyonunu in vitro da azalttığı gösterilmiş ve akciğer metastazlarının sayısını %63'e kadar azalttığı rapor edilmiştir (Bugan vd., 2019). Literatürde FLC'nin hücre motilitesi ve invazivliği üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

RNL ve FLC'nin, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin NaV.1.5 protein seviyeleri üzerindeki etkisini de değerlendirdiğimiz çalışmamızda her iki hücre soyunda da RNL ve FLC'nin NaV1.5 proteininin artan konsantrasyonlarıyla birlikte inhibe etme potansiyeli gözlemlenmiştir. Çalışmamızla paralel olarak literatürde, Sprague Dawley sıçanlarında iskemi/reperfüzyon sonrası Nav1.5 ekspresyonunda RNL'nin rollerinin araştırıldığı bir çalışmada, NaV1.5 protein seviyeleri Western blotlama ile belirlenmiş ve Nav1.5'in protein düzeyinin iskemi/reperfüzyon sonrasında %31,63 oranında azaldığı belirtilmiştir (Wei vd., 2016). FLC ile NaV 1.5 protein seviyeleri arasındaki ilişkinin irdelendiği bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

VGSC blokeri olan RNL ve FLC'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerinde yapılan bu çalışmada, hücre migrasyonu ve invazyonu ile metastatik potansiyel üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. 2,5 ve 5 μ M RNL'nin NaV1.5 ekspresyonu yüksek MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonunu inhibe ettiği ve bu inhibisyonun konsantrasyon ile ilişkili olduğu saptanmıştır. FLC ile kanser ve özellikle metastatik potansiyel arasındaki ilişkinin araştırıldığı ilk çalışmadır ve etki göstermekle birlikte bu etki, RNL'den biraz daha düşüktür. Burada verilmemiş olmakla birlikte, çalışmanın hipoksik ortamda yürütülmesi sonucu elde ettiğimiz sonuçlarımız, her iki ilacın da etkisinin arttığını ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, iyon kanal blokeri olan RNL'nin, yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu FLC'ye oranla daha yüksek oranda inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, NaV 1.5 ekspresyonu yüksek olan MDA-MB-231 hücrelerinin invaziv hareketlerini bloke ederek, meme kanseri metastazının

baskılanmasında etkin bir rol oynayabileceği in vitro olarak gösterilmiştir. Bu sonuçlar, VGSC blokerlerinin invazyon üzerindeki etkilerini gösteren önceki çalışmalarla paralel olup, özellikle RNL'nin yüksek metastatik hücrelerdeki invazyonu inhibe etme potansiyeli ve FLC'nin de benzer bir etki göstermesi, bu ilaçların kanser metastazının tedavisinde kullanılma ihtimalini kuvvetlendirmekte ve daha ayrıntılı araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.



KAYNAKÇA

- Arı, S. (2018). Meme Kanseri Kök Hücrelerinde Notch Sinyal Yolağının İnhibisyonunda Güncel Yaklaşımlar. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 235–245. <https://doi.org/10.7240/marufbd.336015>
- Atoum, M., & Alzoughool, F. (2017). Vitamin D and Breast Cancer: Latest Evidence and Future Steps. <https://doi.org/10.1177/1178223417749816>, 11. <https://doi.org/10.1177/1178223417749816>
- Ayd, U. (2021). *Kanser Hücrelerinin Genetik Yapısı ve Mekanizmaları*. October.
- Barbieri, R., Nizzari, M., Zanardi, I., Pusch, M., & Gavazzo, P. (2023). Voltage-Gated Sodium Channel Dysfunctions in Neurological Disorders. *Life*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/LIFE13051191>
- Bernstein, L. (2002). Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(1), 3–15. <https://doi.org/10.1023/A:1015714305420/METRICS>
- Berthois, Y., Katzenellenbogen, J. A., & Katzenellenbogen, B. S. (1986). *Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: Implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture*. 83(April), 2496–2500. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2496>
- Bindal, R. D., & Katzenellenbogen, J. A. (1988). Bis(4-hydroxyphenyl)[2-(phenoxy-sulfonyl)phenyl]methane: isolation and structure elucidation of a novel estrogen from commercial preparations of phenol red (phenolsulfonphthalein). *Journal of medicinal chemistry*, 31(10), 1978–1983. <https://doi.org/10.1021/JM00118A020>
- Biswas, S. K., Allavena, P., & Mantovani, A. (2013). Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in Immunopathology* 2013 35:5, 35(5), 585–600. <https://doi.org/10.1007/S00281-013-0367-7>
- Borcherding, N., Cole, K., Kluz, P., Jorgensen, M., Kolb, R., Bellizzi, A., & Zhang, W. (2018). Re-Evaluating E-Cadherin and β -Catenin: A Pan-Cancer Proteomic Approach with an Emphasis on Breast Cancer. *American Journal of Pathology*, 188(8), 1910–1920. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.05.003>
- Brackenbury, W. J. (2012). Voltage-gated sodium channels and metastatic disease.

- İçinde *Channels* (C. 6, Sayı 5, ss. 352–361). Taylor and Francis Inc.
<https://doi.org/10.4161/chan.21910>
- Brackenbury, W. J., Chioni, A. M., Diss, J. K. J., & Djamgoz, M. B. A. (2007). The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 101(2), 149–160. <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9281-1>
- Brackenbury, W. J., & Djamgoz, M. B. A. (2006). Activity-dependent regulation of voltage-gated Na⁺ channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line. *The Journal of physiology*, 573(Pt 2), 343–356. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2006.106906>
- Brackenbury, W. J., & Isom, L. L. (2008). Voltage-gated Na⁺ channels: potential for beta subunits as therapeutic targets. *Expert opinion on therapeutic targets*, 12(9), 1191–1203. <https://doi.org/10.1517/14728222.12.9.1191>
- Brandes, L. J., Arron, R. J., Bogdanovic, R. P., Tong, J., Zaborniak, C. L. F., Hogg, G. R., Warrington, R. C., Fang, W., & Labella, F. S. (1992). *Advances in Brief Stimulation of Malignant Growth in Rodents by Antidepressant Drugs at Clinically Relevant Doses I*.
- Brown, J. R., & Chinnaiyan, A. M. (2020). The potential of circular RNAs as cancer biomarkers. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 29(12), 2541–2555. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-20-0796>
- Bugan, I., Karagoz, Z., Altun, S., & Djamgoz, M. B. A. (2016). Gabapentin, an Analgesic Used Against Cancer-Associated Neuropathic Pain: Effects on Prostate Cancer Progression in an In Vivo Rat Model. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 118(3), 200–207. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12484>
- Bugan, I., Kucuk, S., Karagoz, Z., Fraser, S. P., Kaya, H., Dodson, A., Foster, C. S., Altun, S., & Djamgoz, M. B. A. (2019). Anti-metastatic effect of ranolazine in an in vivo rat model of prostate cancer, and expression of voltage-gated sodium channel protein in human prostate. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 22(4), 569–579. <https://doi.org/10.1038/S41391-019-0128-3>
- Caly, M., Genin, P., Al Ghuzlan, A., Elie, C., Fréneaux, P., Klijanienkol, J., Rosty, C., Sigal-Zafrani, B., Vincent-Salomon, A., Dougaz, A., Zidane, M., & Sastre-Garau, X. (2004). Analysis of correlation between mitotic index, MIB1 store and S-phase fraction as proliferation markers in invasive breast carcinoma.

- Methodological aspects and prognostic value in a series of 257 cases. *Anticancer Research*, 24(5 B), 3283–3288.
- Carbone, A. (2020). *Cancer Classification at the Crossroads. I*, 10–15.
- Chavez, K. J., Garimella, S. V., & Lipkowitz, S. (2010). Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast disease*, 32(1–2), 35–48. <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>
- Cheang, M. C. U., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S. K., Perou, C. M., & Nielsen, T. O. (2008). Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1368–1376. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1658>
- Checka, C. M., Chun, J. E., Schnabel, F. R., Lee, J., & Toth, H. (2012). The Relationship of Mammographic Density and Age: Implications for Breast Cancer Screening. <http://dx.doi.org/10.2214/AJR.10.6049>, 198(3). <https://doi.org/10.2214/AJR.10.6049>
- Chen-Izu, Y., Shaw, R. M., Pitt, G. S., Yarov-Yarovoy, V., Sack, J. T., Abriel, H., Aldrich, R. W., Belardinelli, L., Cannell, M. B., Catterall, W. A., Chazin, W. J., Chiamvimonvat, N., Deschenes, I., Grandi, E., Hund, T. J., Izu, L. T., Maier, L. S., Maltsev, V. A., Marionneau, C., ... Bers, D. M. (2015). Na⁺ channel function, regulation, structure, trafficking and sequestration. *Journal of Physiology*, 593(6), 1347–1360. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.281428>
- Chen, H., Zhang, D., Chao, S. P., Ren, J. H., Xu, L., Jiang, X. J., & Wang, S. M. (2012). Comparison of the effects of antiarrhythmic drugs flecainide and verapamil on fKv1.4ΔN channel currents in *Xenopus* oocytes. *Acta Pharmacologica Sinica* 2013 34:2, 34(2), 221–230. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.157>
- Chen, H., Zhang, D., Chao, S., Ren, J., Xu, L., Jiang, X., & Wang, S. (2013). Comparison of the effects of antiarrhythmic drugs flecainide and verapamil on fKv1 . 4ΔN channel currents in *Xenopus* oocytes. *Acta Pharmacologica Sinica*, 221–230. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.157>
- Cooper, J. (2012). Cell line profile A549. *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, 7(86012803), 1–2.
- Cuppen, E. (2022). Machine learning-based tissue of origin classification for cancer

- of unknown primary diagnostics using genome-wide mutation features. *cuppen*, 2022, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31666-w>
- Degnim, A. C., Ghosh, K., Vierkant, R. A., Maloney, S. D., Pankratz, V. S., Ph, D., Hillman, D. W., Suman, V. J., Ph, D., Johnson, J., Blake, C., Tlsty, T., Ph, D., Vachon, C. M., Ph, D., Iii, L. J. M., & Visscher, D. W. (2005). *new england journal*. 229–237.
- Dehesh, T., Fadaghi, S., Seyedi, M., Abolhadi, E., Ilaghi, M., Shams, P., Ajam, F., Mosleh-Shirazi, M. A., & Dehesh, P. (2023). The relation between obesity and breast cancer risk in women by considering menstruation status and geographical variations: a systematic review and meta-analysis. *BMC Women's Health*, 23(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12905-023-02543-5/TABLES/2>
- Delrieu, L., Touillaud, M., Pérol, O., Morelle, M., Martin, A., Friedenreich, C. M., Mury, P., Dufresne, A., Bachelot, T., Heudel, P. E., Fervers, B., Trédan, O., & Pialoux, V. (2021). Impact of Physical Activity on Oxidative Stress Markers in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6694594>
- Dias, K., Dvorkin-Gheva, A., Hallett, R. M., Wu, Y., Hassell, J., Pond, G. R., Levine, M., Whelan, T., & Bane, A. L. (2017). Claudin-low breast cancer; clinical & pathological characteristics. *PLoS ONE*, 12(1), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168669>
- Djamgoz, M., & Onkal, R. (2013). Persistent current blockers of voltage-gated sodium channels: a clinical opportunity for controlling metastatic disease. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 8(1), 66–84. <https://doi.org/10.2174/15748928130107>
- Djamgoz, M. B. A., Fraser, S. P., & Brackenbury, W. J. (2019). In Vivo Evidence for Voltage-Gated Sodium Channel Expression in Carcinomas and Potentiation of Metastasis. *Cancers*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/cancers11111675>
- Driffort, V., Gillet, L., Bon, E., Marionneau-Lambot, S., Oullier, T., Joulin, V., Collin, C., Pagès, J. C., Jourdan, M. L., Chevalier, S., Bougnoux, P., Le Guennec, J. Y., Besson, P., & Roger, S. (2014). Ranolazine inhibits NaV1.5-mediated breast cancer cell invasiveness and lung colonization. *Molecular Cancer*, 13(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-264>
- Duffy, M. J., Synnott, N. C., & Crown, J. (2018). Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. *Breast Cancer Research and*

- Treatment*, 170(2), 213–219. <https://doi.org/10.1007/S10549-018-4753-7/METRICS>
- Dutta, S., Lopez Charcas, O., Tanner, S., Gradek, F., Driffort, V., Roger, S., Selander, K., Velu, S. E., & Brouillette, W. (2018). Discovery and evaluation of nNa v 1.5 sodium channel blockers with potent cell invasion inhibitory activity in breast cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26(9), 2428–2436. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2018.04.003>
- Erber, R., & Hartmann, A. (2020). Histology of Luminal Breast Cancer. *Breast Care*, 15(4), 327–336. <https://doi.org/10.1159/000509025>
- Erol, A., Ho, A. M. C., Winham, S. J., & Karpyak, V. M. (2019). Sex hormones in alcohol consumption: a systematic review of evidence. *Addiction Biology*, 24(2), 157–169. <https://doi.org/10.1111/ADB.12589>
- Fairhurst, C., Watt, I., Martin, F., Bland, M., & Brackenbury, W. J. (2014). Exposure to sodium channel-inhibiting drugs and cancer survival: Protocol for a cohort study using the QResearch primary care database. *BMJ Open*, 4(11). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-006604>
- Fairhurst, C., Watt, I., Martin, F., Bland, M., & Brackenbury, W. J. (2015). Sodium channel-inhibiting drugs and survival of breast, colon and prostate cancer: a population-based study. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/SREP16758>
- Fiolet, T., Srour, B., Sellem, L., Kesse-guyot, E., Allès, B., Méjean, C., Deschasaux, M., Fassier, P., Latino-martel, P., Beslay, M., Hercberg, S., Lavalette, C., Monteiro, C. A., Julia, C., & Touvier, M. (2018). *Consumption of ultra-processed foods and cancer risk: results from NutriNet-Santé prospective cohort*. <https://doi.org/10.1136/bmj.k322>
- Folkerd, E., & Dowsett, M. (2013). Sex hormones and breast cancer risk and prognosis. *Elizabeth Folkerd*, Mitch Dowsett*, 22(2013), S38–S43. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.007>
- Fozzard, H. A., & Hanck, D. A. (1996). Structure and function of voltage-dependent sodium channels: Comparison of brain II and cardiac isoforms. *İçinde Physiological Reviews* (C. 76, Sayı 3, ss. 887–926). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.3.887>
- Fraser, I. D. C., & Scott, J. D. (1999). Modulation of Ion Channels: A “Current” View of AKAPs. *Neuron*, 23(3), 423–426. <https://doi.org/10.1016/S0896->

- Fraser, S. P., Salvador, V., Manning, E. A., Mizal, J., Altun, S., Raza, M., Berridge, R. J., & Djamgoz, M. B. A. (2003). Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility. *Journal of cellular physiology*, 195(3), 479–487. <https://doi.org/10.1002/JCP.10312>
- Fraser, Scott 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., Koyutürk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, M. T., Slade, M. J., Tolhurst, R., Palmieri, C., ... Djamgoz, M. B. A. (2005). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(15), 5381–5389. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0327>
- Fraser, Scott P., Ozerlat-Gunduz, I., Brackenbury, W. J., Fitzgerald, E. M., Campbell, T. M., Coombes, R. C., & Djamgoz, M. B. A. (2014). Regulation of voltage-gated sodium channel expression in cancer: Hormones, growth factors and auto-regulation. İçinde *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (C. 369, Sayı 1638). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0105>
- Ghovanloo, M. R., Choudhury, K., Bandaru, T. S., Fouda, M. A., Rayani, K., Rusinova, R., Phaterpekar, T., Nelkenbrecher, K., Watkins, A. R., Poburko, D., Thewalt, J., Andersen, O. S., Delemotte, L., Goodchild, S. J., & Ruben, P. C. (2021). Cannabidiol inhibits the skeletal muscle Nav1.4 by blocking its pore and by altering membrane elasticity. *The Journal of general physiology*, 153(5). <https://doi.org/10.1085/JGP.202012701>
- Giordano, S. H. (2018). Breast Cancer in Men. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1707939>, 378(24), 2311–2320. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA1707939>
- Gradek, F., Lopez-Charcas, O., Chadet, S., Poisson, L., Ouldamer, L., Goupille, C., Jourdan, M. L., Chevalier, S., Moussata, D., Besson, P., & Roger, S. (2019). Sodium Channel Na v 1.5 Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Invasiveness in Breast Cancer Cells Through its Regulation by the Salt-Inducible Kinase-1. *Scientific reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598->

- Guo, G., Cui, Y., Chen, H., Zhang, L., Zhao, M., Chen, B., Zhang, J., & Liu, Y. (2016). Analgesic-antitumor peptide inhibits the migration and invasion of HepG2 cells by an upregulated VGSC $\beta 1$ subunit. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(3), 3033–3041. <https://doi.org/10.1007/S13277-015-4067-X>
- Guzel, R. M., Ogmen, K., Ilieva, K. M., Fraser, S. P., & Djamgoz, M. B. A. (2019). Colorectal cancer invasiveness in vitro: Predominant contribution of neonatal Nav1.5 under normoxia and hypoxia. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 6582–6593. <https://doi.org/10.1002/JCP.27399>
- Han, D., Tan, H., Sun, C., & Li, G. (2018). Dysfunctional Nav1.5 channels due to SCN5A mutations. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 243(10), 852–863. <https://doi.org/10.1177/1535370218777972>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013/ATTACHMENT/68024D79-3A9C-46C4-930B-640934F11E2E/MMC1.PDF>
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., & Francisco, S. (2000). *The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco*. 100, 57–70.
- Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K. E., Jones, L. P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., Backlund, M. G., Yin, Y., Khramtsov, A. I., Bastein, R., Quackenbush, J., Glazer, R. I., Brown, P. H., Green, J. E., Kopelovich, L., ... Perou, C. M. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biology*, 8(5), 1–17. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-r76>
- Hockley, J. R. F., Winchester, W. J., & Bulmer, D. C. (2016). The voltage-gated sodium channel NaV 1.9 in visceral pain. *Neurogastroenterology and motility*, 28(3), 316–326. <https://doi.org/10.1111/NMO.12698>
- Holle, A. W., Young, J. L., & Spatz, J. P. (2016). In vitro cancer cell – ECM interactions inform in vivo cancer treatment ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.10.007>
- Huang, X., Jin, X., Huang, G., Huang, J., Wu, T., Li, Z., Chen, J., Kong, F., Pan, X., & Yan, N. (2022). Structural basis for high-voltage activation and subtype-

- specific inhibition of human Nav1.8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(30).
<https://doi.org/10.1073/PNAS.2208211119/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Huss, L., Butt, S. T., Borgquist, S., Elebro, K., Sandsveden, M., Rosendahl, A., & Manjer, J. (2019). Vitamin D receptor expression in invasive breast tumors and breast cancer survival. *Breast Cancer Research*, 21(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1186/S13058-019-1169-1/TABLES/3>
- Id, I., Id, E. R. P., Id, M. R., & Nibbe, A. (2019). *Temporal trends in breast cancer survival by race and ethnicity : A population-based cohort study*. 1–14.
- Innes K. (2023). *Innes K*.
https://journals.lww.com/epidem/Abstract/1999/11000/Preeclampsia_and_Breast_Cancer_Risk.13.aspx
- Iqbal, N., & Iqbal, N. (2014). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Molecular Biology International*, 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/852748>
- Iyengar, N. M., Arthur, R., Manson, J. E., Chlebowski, R. T., Kroenke, C. H., Peterson, L., Cheng, T. Y. D., Feliciano, E. C., Lane, D., Luo, J., Nassir, R., Pan, K., Wassertheil-Smoller, S., Kamensky, V., Rohan, T. E., & Dannenberg, A. J. (2019). Association of Body Fat and Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women With Normal Body Mass Index: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial and Observational Study. *JAMA Oncology*, 5(2), 155–163. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2018.5327>
- Jahani, S., Nazeri, E., Majidzadeh-A, K., Jahani, M., & Esmaeili, R. (2020). Circular RNA; a new biomarker for breast cancer: A systematic review. *Journal of cellular physiology*, 235(7–8), 5501–5510. <https://doi.org/10.1002/JCP.29558>
- Jiang, D., Shi, H., Tonggu, L., Gamal El-Din, T. M., Lenaeus, M. J., Zhao, Y., Yoshioka, C., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2020). Structure of the Cardiac Sodium Channel. *Cell*, 180(1), 122–134.e10.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.041>
- Johns, L. E., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., McFadden, E., Ashworth, A., & Swerdlow, A. J. (2018). Domestic light at night and breast cancer risk: a prospective analysis of 105 000 UK women in the Generations Study. *British Journal of Cancer* 2018 118:4, 118(4), 600–606.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2017.359>

- Kaplan, A., Amin, G., Abidi, E., Altara, R., Booz, G. W., & Zouein, F. A. (2022). Role of ranolazine in heart failure: From cellular to clinic perspective. *European Journal of Pharmacology*, 919, 174787. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2022.174787>
- Kenny, P. A., Lee, G. Y., Myers, C. A., Neve, R. M., Semeiks, J. R., Spellman, P. T., Lorenz, K., Lee, E. H., Barcellos-Hoff, M. H., Petersen, O. W., Gray, J. W., & Bissell, M. J. (2007). The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Molecular Oncology*, 1(1), 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.02.004>
- Koboldt, D. C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., McMichael, J. F., Fulton, L. L., Dooling, D. J., Ding, L., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Ally, A., Balasundaram, M., Butterfield, Y. S. N., Carlsen, R., Carter, C., Chu, A., Chuah, E., Chun, H. J. E., ... Palchik, J. D. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012 490:7418, 490(7418), 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Kolb, R., & Zhang, W. (2020). Obesity and Breast Cancer: A Case of Inflamed Adipose Tissue. *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 1686, 12(6), 1686. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12061686>
- Koltai, T. (2015). Voltage-gated sodium channel as a target for metastatic risk reduction with re-purposed drugs. *F1000Research*, 4, 297. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6789.1>
- Kotepui, M. (2016). *Diet and risk of breast cancer*. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.40560>
- Kunwar, A., Jayakumar, S., Srivastava, A. K., & Priyadarsini, K. I. (2012). Dimethoxycurcumin-induced cell death in human breast carcinoma MCF7 cells: Evidence for pro-oxidant activity, mitochondrial dysfunction, and apoptosis. *Archives of Toxicology*, 86(4), 603–614. <https://doi.org/10.1007/S00204-011-0786-Y/METRICS>
- Lee, A., Fraser, S. P., & Djamgoz, M. B. A. (2019). Propranolol inhibits neonatal Nav1.5 activity and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells: Effects of combination with ranolazine. *Journal of Cellular Physiology*, 234(12), 23066–23081. <https://doi.org/10.1002/JCP.28868>
- Li, S., Silvestri, V., Leslie, G., Rebbeck, T. R., Neuhausen, S. L., Hopper, J. L., Nielsen, H. R., Lee, A., Yang, X., McGuffog, L., Parsons, M. T., Andrulis, I. L.,

- Arnold, N., Belotti, M., Borg, Å., Buecher, B., Buys, S. S., Caputo, S. M., Chung, W. K., ... Antoniou, A. C. (2022). Cancer Risks Associated With BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants. *Journal of Clinical Oncology*, 40(14), 1529–1541. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02112>
- Liao, S., Liu, T., Yang, R., Tan, W., Gu, J., & Deng, M. (2023). Structure and Function of Sodium Channel Nav1.3 in Neurological Disorders. *Cellular and molecular neurobiology*, 43(2), 575–584. <https://doi.org/10.1007/S10571-022-01211-W>
- Liu, S., Ye, Z., Xue, V. W., Sun, Q., Li, H., & Lu, D. (2023). KIF2C is a prognostic biomarker associated with immune cell infiltration in breast cancer. *BMC Cancer*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-023-10788-4>
- Liu, Y., Nguyen, N., & Colditz, G. A. (2015). Links between Alcohol Consumption and Breast Cancer: A Look at the Evidence. <http://dx.doi.org/10.2217/WHE.14.62>, 11(1), 65–77. <https://doi.org/10.2217/WHE.14.62>
- Luo, Q., Wu, T., Wu, W., Chen, G., Luo, X., Jiang, L., Tao, H., Rong, M., Kang, S., & Deng, M. (2020). The Functional Role of Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5 in Metastatic Breast Cancer. İçinde *Frontiers in Pharmacology* (C. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01111>
- Mao, W., Zhang, J., Körner, H., Jiang, Y., & Ying, S. (2019). The emerging role of voltage-gated sodium channels in tumor biology. *Frontiers in Oncology*, 9(MAR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00124>
- Martin, F., Ufodiama, C., Watt, I., Bland, M., & Brackenbury, W. J. (2015). Therapeutic Value of Voltage-Gated Sodium Channel Inhibitors in Breast, Colorectal, and Prostate Cancer: A Systematic Review. *Frontiers in pharmacology*, 6(NOV). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2015.00273>
- Mavaddat, N., Peock, S., Frost, D., Ellis, S., Platte, R., Fineberg, E., Evans, D. G., Izatt, L., Eeles, R. A., Adlard, J., Davidson, R., Eccles, D., Cole, T., Cook, J., Brewer, C., Tischkowitz, M., Douglas, F., Hodgson, S., Walker, L., ... Easton, D. F. (2013). Cancer Risks for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Results From Prospective Analysis of EMBRACE. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 105(11), 812–822. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJT095>
- Mcguire, A., Brown, J. A. L., Malone, C., & McLaughlin, R. (2015). *Effects of Age on the Detection and Management of Breast Cancer*. 908–929.

<https://doi.org/10.3390/cancers7020815>

- Mohammed, F. H., Khajah, M. A., Yang, M., Brackenbury, W. J., & Luqmani, Y. A. (2016). Blockade of voltage-gated sodium channels inhibits invasion of endocrine-resistant breast cancer cells. *International journal of oncology*, 48(1), 73–83. <https://doi.org/10.3892/IJO.2015.3239>
- Morel, A. P., Ginestier, C., Pommier, R. M., Cabaud, O., Ruiz, E., Wicinski, J., Devouassoux-Shisheboran, M., Combaret, V., Finetti, P., Chassot, C., Pinatel, C., Fauvet, F., Saintigny, P., Thomas, E., Moyret-Lalle, C., Lachuer, J., Despras, E., Jauffret, J. L., Bertucci, F., ... Puisieux, A. (2017). A stemness-related ZEB1–MSRB3 axis governs cellular pliancy and breast cancer genome stability. *Nature Medicine* 2017 23:5, 23(5), 568–578. <https://doi.org/10.1038/nm.4323>
- Naser Al Deen, N., Atallah Lanman, N., Chittiboyina, S., Lelièvre, S., Nasr, R., Nassar, F., Zu Dohna, H., AbouHaidar, M., & Talhouk, R. (2021). A risk progression breast epithelial 3D culture model reveals Cx43/hsa_circ_0077755/miR-182 as a biomarker axis for heightened risk of breast cancer initiation. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82057-y>
- Nelson, M., Yang, M., Millican-Slater, R., & Brackenbury, W. J. (2015). Nav1.5 regulates breast tumor growth and metastatic dissemination in vivo. *Oncotarget*, 6(32), 32914–32929. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5441>
- Newman, L. A., Reis-Filho, J. S., Morrow, M., Carey, L. A., & King, T. A. (2015). The 2014 Society of Surgical Oncology Susan G. Komen for the Cure Symposium: Triple-Negative Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 22(3), 874–882. <https://doi.org/10.1245/S10434-014-4279-0/METRICS>
- Newson, J. M., Santos, C. D., Walters, B. L., & Todd, B. R. (2020). The Case of Flecainide Toxicity: What to Look for and How to Treat. *The Journal of emergency medicine*, 59(2), e43–e47. <https://doi.org/10.1016/J.JEMERMED.2020.04.052>
- Ng, A. K., Travis, L. B., Boston, R., & York, N. (2009). Radiation Therapy and Breast Cancer Risk. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 7(10), 1121–1128. <https://doi.org/10.6004/JNCCN.2009.0073>
- Ng, J., & Shuryak, I. (2014). Minimizing second cancer risk following radiotherapy: current perspectives. *Cancer Management and Research*, 7, 1–11.

<https://doi.org/10.2147/CMAR.S47220>

- Onganer, P. U., & 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(2), 67–75. <https://doi.org/10.1007/S00232-005-0747-6/METRICS>
- 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. İçinde *European Journal of Pharmacology* (C. 625, Sayılar 1–3, ss. 206–219). Eur J Pharmacol. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.08.040>
- Özkara, G., Öztürk, O., & Yılmaz Aydoğan, H. (2020). Kanser ve Metastaz: Hücre Adezyon Molekülleri ve Hücreler Arası Bağlantıların Önemi. *Experimed*, 10(1), 38–48. <https://doi.org/10.26650/experimed.2020.0003>
- Paper, F. (2014). *Spanish Mediterranean diet and other dietary patterns and breast cancer risk: case – control EpiGEICAM study*. April, 1454–1462. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.434>
- Pathmanathan, N., Balleine, R. L., Jayasinghe, U. W., Bilinski, K. L., Provan, P. J., Byth, K., Bilous, A. M., Salisbury, E. L., & Boyages, J. (2014). The prognostic value of Ki67 in systemically untreated patients with node-negative breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 67(3), 222–228. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2013-201793>
- Peng, J., Ou, Q., Wu, X., Zhang, R., Zhao, Q., Jiang, W., Lu, Z., Wan, D., Pan, Z., & Fang, Y. (2017). Expression of voltage-gated sodium channel Nav1.5 in non-metastatic colon cancer and its associations with estrogen receptor (ER)- β expression and clinical outcomes. *Chinese Journal of Cancer* 2017 36:1, 36(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S40880-017-0253-0>
- Plasilova, M. L., Hayse, B., Killelea, B. K., Horowitz, N. R., Chagpar, A. B., & Lannin, D. R. (2016). Features of triple-negative breast cancer Analysis of 38,813 cases from the national cancer database. *Medicine (United States)*, 95(35). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000004614>
- Pommier, R. M., Sanlaville, A., Tonon, L., Kielbassa, J., Thomas, E., Ferrari, A., Sertier, A. S., Hollande, F., Martinez, P., Tissier, A., Morel, A. P., Ouzounova, M., & Puisieux, A. (2020). Comprehensive characterization of claudin-low breast tumors reflects the impact of the cell-of-origin on cancer evolution.

- Nature Communications*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17249-7>
- Prat, A., Cheang, M. C. U., Martín, M., Parker, J. S., Carrasco, E., Caballero, R., Tyldesley, S., Gelmon, K., Bernard, P. S., Nielsen, T. O., & Perou, C. M. (2013). Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal a breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 31(2), 203–209. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.4134>
- Prat, A., & Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*, 5(1), 5–23. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.11.003>
- Qiu, S., Fraser, S. P., Pires, W., & Djamgoz, M. B. A. (2022). Anti-invasive effects of minoxidil on human breast cancer cells: combination with ranolazine. *Clinical & Experimental Metastasis*, 39(4), 679. <https://doi.org/10.1007/S10585-022-10166-7>
- Rakha, E. A., Tse, G. M., & Quinn, C. M. (2023). *An update on the pathological classification of breast cancer*. 5–16. <https://doi.org/10.1111/his.14786>
- Reyes, C., León-muñoz, L. M., Pistillo, A., Alba, S., Schmidt, J., Kristensen, K. B., Puente, D., Llorente-garcía, A., Huerta-álvarez, C., Pottegård, A., & Duarte-salles, T. (2022). *Flecainide and risk of skin neoplasms : Results of a large nested case – control study in Spain and Denmark*. December. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1002451>
- Ribeiro, M., Elghajiji, A., Fraser, S. P., Burke, Z. D., Tosh, D., Djamgoz, M. B. A., & Rocha, P. R. F. (2020). Human Breast Cancer Cells Demonstrate Electrical Excitability. *Frontiers in neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2020.00404>
- Rizaner, N., Uzun, S., Fraser, S. P., Djamgoz, M. B. A., & Altun, S. (2020). Riluzole: Anti-invasive effects on rat prostate cancer cells under normoxic and hypoxic conditions. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 127(4), 254–264. <https://doi.org/10.1111/BCPT.13417>
- Rogart, R. B., Cribbs, L. L., Muglia, L. K., Kephart, D. D., & Kaiser, M. W. (1989). Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant rat heart Na⁺ channel isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(20), 8170–8174. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.20.8170>
- Roger, S., Potier, M., Vandier, C., Besson, P., & Le Guennec, J.-Y. (2006). Voltage-

- Gated Sodium Channels: New Targets in Cancer Therapy? *Current Pharmaceutical Design*, 12(28), 3681–3695.
<https://doi.org/10.2174/138161206778522047>
- Russo, I. H. (2002). Cigarette smoking and risk of breast cancer in women. *Lancet*, 360(9339), 1033–1034. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11174-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11174-3)
- Salvage, S. C., King, J. H., Chandrasekharan, K. H., Jafferji, D. I. G., Guzadhur, L., Matthews, H. R., Huang, C. L. H., & Fraser, J. A. (2015). Flecainide exerts paradoxical effects on sodium currents and atrial arrhythmia in murine RyR2-P2328S hearts. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 214(3), 361. <https://doi.org/10.1111/APHA.12505>
- Salvage, Samantha C., Chandrasekharan, K. H., Jeevaratnam, K., Dulhunty, A. F., Thompson, A. J., Jackson, A. P., & Huang, C. L. H. (2018). Multiple targets for flecainide action: implications for cardiac arrhythmogenesis. *British Journal of Pharmacology*, 175(8), 1260–1278. <https://doi.org/10.1111/BPH.13807>
- Sanchez-Sandoval, A. L., Hernández-Plata, E., & Gomora, J. C. (2023). Voltage-gated sodium channels: from roles and mechanisms in the metastatic cell behavior to clinical potential as therapeutic targets. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2023.1206136>
- Savari, B., Boozarpour, S., Tahmasebi-Birgani, M., Sabouri, H., & Hosseini, S. M. (2020). Overexpression of microRNA-21 in the Serum of Breast Cancer Patients. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)*, 9(1), 58–63. <https://doi.org/10.2174/2211536608666190318105757>
- Scheffer, I. E., Zhang, Y. H., Jansen, F. E., & Dibbens, L. (2009). Dravet syndrome or genetic (generalized) epilepsy with febrile seizures plus? *Brain and Development*, 31(5), 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2009.01.001>
- Seibert, A. L., Liu, J., Hanck, D. A., & Blumenthal, K. M. (2003). Arg-14 Loop of Site 3 Anemone Toxins: Effects of Glycine Replacement on Toxin Affinity. *Biochemistry*, 42(49), 14515–14521. <https://doi.org/10.1021/bi035291d>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- Simmons, J. K., Hildreth, B. E., Supsavhad, W., Elshafae, S. M., Hassan, B. B., Dirksen, W. P., Toribio, R. E., & Rosol, T. J. (2015). Animal Models of Bone Metastasis. *Veterinary pathology*, 52(5), 827.

<https://doi.org/10.1177/0300985815586223>

- Stanisławek, A. (2021). *Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies— An Updated Review*. 1–30.
- Suckow MA, Gutierrez LS, Risatti CA, Wolter WR, Taylor RE, Pollard M, Navari RM, Castellino FJ, Paoni NF. The anti-ischemia agent ranolazine promotes the development of intestinal tumors in APC(Min/+) mice. *Cancer Lett.* 2004 Jun 25;209(2):165-9. doi: 10.1016/j.canlet.2004.01.007. PMID: 15159018.
- Sun, C., Sang, M., Li, S., Sun, X., Yang, C., Xi, Y., Wang, L., Zhang, F., Bi, Y., Fu, Y., & Li, D. (2015). Hsa-miR-139-5p inhibits proliferation and causes apoptosis associated with down-regulation of c-Met. *Oncotarget*, 6(37), 39756–39792. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5476>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Törnroth-Horsefield, S., Wang, Y., Hedfalk, K., Johanson, U., Karlsson, M., Tajkhorshid, E., Neutze, R., & Kjellbom, P. (2005). Structural mechanism of plant aquaporin gating. *İçinde Nature* (C. 439, Sayı 7077, ss. 688–694). *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature04316>
- Ursin, G., Bernstein, L., Lord, S. J., Karim, R., Deapen, D., Press, M. F., Daling, J. R., Norman, S. A., Liff, J. M., Marchbanks, P. A., Folger, S. G., Simon, M. S., Strom, B. L., Burkman, R. T., Weiss, L. K., & Spirtas, R. (2005). Reproductive factors and subtypes of breast cancer defined by hormone receptor and histology. *British Journal of Cancer* 2005 93:3, 93(3), 364–371. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602712>
- Wang, X., Hui, T. L., Wang, M. Q., Liu, H., Li, R. Y., & Song, Z. C. (2019). Body Mass Index at Diagnosis as a Prognostic Factor for Early-Stage Invasive Breast Cancer after Surgical Resection. *Oncology Research and Treatment*, 42(4), 190–196. <https://doi.org/10.1159/000496548>
- Wei, X., Zhu, A., Zhang, Y., Yao, S., & Mao, W. (2016). Pre-and Delayed Treatments with Ranolazine Ameliorate Ventricular Arrhythmias and Nav1.5 Downregulation in Ischemic/Reperfused Rat Hearts. *Journal of Cardiovascular*

<https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000412>

- Weigelt, B., Horlings, H. M., Kreike, B., Hayes, M. M., Hauptmann, M., Wessels, L. F. A., De Jong, D., Van De Vijver, M. J., Van't Veer, L. J., & Peterse, J. L. (2008). Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *The Journal of Pathology*, 216(2), 141–150. <https://doi.org/10.1002/PATH.2407>
- Won, K. A., & Spruck, C. (2020). Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *International Journal of Oncology*, 57(6), 1245. <https://doi.org/10.3892/IJO.2020.5135>
- Wu, H., Do, C., Andrulis, I. L., John, E. M., Mary, B., Buys, S. S., Chung, W. K., Knight, J. A., Bradbury, A. R., Keegan, T. H. M., Schwartz, L., Krupska, I., Miller, R. L., Santella, R. M., Tycko, B., Terry, M. B., Do, C., Andrulis, I. L., John, E. M., ... Tycko, B. (2018). Breast cancer family history and allele-specific DNA methylation in the legacy girls study. *Epigenetics*, 13(3), 240–250. <https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1435243>
- Wu, Q., Huang, J., Fan, X., Wang, K., Jin, X., Huang, G., Li, J., Pan, X., & Yan, N. (2023). Structural mapping of Nav1.7 antagonists. *Nature communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-023-38942-3>
- Xia, D., Jose, A., Michael, L., John, T., Ming, P., Tsao, S., Rath, P., Siu, L. L., Yu, C., Lucien, P., Frances, B., Shepherd, A., Zadeh, G., Chetty, R., & Aldape, K. (2020). Minimalist approaches to cancer tissue-of-origin classification by DNA methylation. *Modern Pathology*, 33(10), 1874–1888. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0547-7>
- Xu, L., Ding, X., Wang, T., Mou, S., Sun, H., & Hou, T. (2019). Voltage-gated sodium channels: structures, functions, and molecular modeling. *Drug discovery today*, 24(7), 1389–1397. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2019.05.014>
- Yang, L., Wang, X. W., Zhu, L. P., Wang, H. L., Wang, B., Zhao, Q., & Wang, X. Y. (2018). Significance and prognosis of epithelial-cadherin expression in invasive breast carcinoma. *Oncology Letters*, 16(2), 1659–1665. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8836>
- Zeinomar, N., Knight, J. A., Genkinger, J. M., Phillips, K. A., Daly, M. B., Milne, R. L., Dite, G. S., Kehm, R. D., Liao, Y., Southey, M. C., Chung, W. K., Giles, G. G., McLachlan, S. A., Friedlander, M. L., Weideman, P. C., Glendon, G., Nesci,

- S., Andrulis, I. L., Buys, S. S., ... Terry, M. B. (2019). Alcohol consumption, cigarette smoking, and familial breast cancer risk: Findings from the Prospective Family Study Cohort (ProF-SC). *Breast Cancer Research*, 21(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13058-019-1213-1/FIGURES/3>
- Zhang, M., Huang, X. Z., Song, Y. X., Gao, P., Sun, J. X., & Wang, Z. N. (2017). High Platelet-to-Lymphocyte Ratio Predicts Poor Prognosis and Clinicopathological Characteristics in Patients with Breast Cancer: A Meta-Analysis. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9503025>
- Zhang, S. M., Cook, N. R., Manson, J. E., Lee, I., & Buring, J. E. (2008). *Low-dose aspirin and breast cancer risk: results by tumour characteristics from a randomised trial*. 989–991. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604240>
- Zhao, X., Qu, J., Sun, Y., Wang, J., Liu, X., Wang, F., Zhang, H., Wang, W., Ma, X., Gao, X., & Zhang, S. (2017). PZhao, X., Qu, J., Sun, Y., Wang, J., Liu, X., Wang, F., Zhang, H., Wang, W., Ma, X., Gao, X., & Zhang, S. (2017). Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. *Oncotarget*, 8(18), 30576. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.15736>
- Zheng, A., Kallio, A., & Härkönen, P. (2007). Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. *Endocrinology*, 148(6), 2764–2777. <https://doi.org/10.1210/EN.2006-1269>
- Zybura, A., Hudmon, A., & Cummins, T. R. (2021). Distinctive Properties and Powerful Neuromodulation of Nav1.6 Sodium Channels Regulates Neuronal Excitability. *Cells*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/CELLS10071595>

