

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

RANOLAZİNE VE FLECAİNİDE KOMBİNASYONUNUN METASTATİK MEME
KANSERİNDEKİ NAV 1.5 VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALINA (VGSC) ETKİSİ:
MOLEKÜLER DEĞERLENDİRMELER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gunel MAMMADOVA
2300004931

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

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seyhan ALTUN

TEMMUZ 2025

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**RANOLAZİNE VE FLECAİNİDE KOMBİNASYONUNUN METASTATİK MEME
KANSERİNDEKİ NAV 1.5 VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALINA (VGSC) ETKİSİ:
MOLEKÜLER DEĞERLENDİRMELER**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gunel MAMMADOVA

2300004931

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

TEMMUZ 2025

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmamı sabırla ve titizlikle yönlendiren, takip eden, bilgi ve tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve bana rehberlik eden, her daima olumlu tutumu ve nazik eğilimiyle bu süreçteki stresimi hafifleten, desteği ve yönlendirmeleriyle her zaman yolumu aydınlatan danışman hocam Prof. Dr. Seyhan ALTUN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar sürecinde birlikte çalıştığım ve bu yoğun süreçte bana her zaman destek olan yüksek lisans arkadaşlarım Hatice DURAL, Hanadi LABABIDI, Nasma ELABBADY'ya gönülden teşekkür ederim.

Zorlu ve yoğun geçen bu akademik yolculukta, bana inançlarını hiç kaybetmeyen, her zaman yanımda olan, sabır ve sevgileriyle bana güç veren sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

En zor anlarımda yanımda olup beni sabırla destekleyen, sevgisiyle moral kaynağım olan nişanlım Ali'ye kalpten teşekkür ederim.

Bu çalışmayı, İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü çatısı altında gerçekleştirmiş olmaktan büyük bir mutluluk ve gurur duymaktayım.

Temmuz, 2025

GUNEL MAMMADOVA

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
KISALTMALAR.....	v
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. KANSER.....	4
2.2.Meme Kanseri.....	8
2.2.1.Meme Kanseri Epidemiyolojisi.....	9
2.2.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	16
2.2.2.1. Değiştirilemeyen Risk Faktörleri.....	17
2.2.2.2. Değiştirilebilir Faktörler.....	18
2.2.3. Meme Kanserinin Sınıflandırması.....	19
2.2.4. Meme Kanseri Tanısında Kullanılan Yöntemler.....	30
2.2.5. Meme Kanseri Evreleri.....	32
2.3. Metastaz ve Kansere İlişkisi.....	36
2.4 Deneyisel olarak kullanılan TNB hücre soyu MDA-MB-231.....	39

2.5. Hipoksi ve Kanser İlişkisi	41
2.6. İyon Kanalları.....	44
2.7.Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları (VGSC).....	46
2.7.1. VGSC : α alt birimi	48
2.7.2. NaV1.5: Özellikleri ve Önemi.....	51
2.7.3. VGSC İyon Kanal Blokerleri.....	54
2.8. RANOLAZİNE.....	55
2.9. FLECAİNİDE.....	59
3.MATERYAL VE METOT.....	63
3.1. Hücrelerin Kültürlenmesi.....	63
3.2. Farmakolojik Ajanların Hazırlanması.....	63
3.3. Hücre Proliferasyonunun.....	64
3.4. NaV1.5 için Moleküler Analizler.....	65
3.4.1 İmmunblotlama ile Protein Ekspresyonu.....	65
3.4.2. Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) ile Gen Ekspresyonu.....	66
3.5. İstatistiksel Analiz.....	67
4.BULGULAR.....	68
4.1. Hücre Canlılığı ve Proliferasyon Değerlendirmesi.....	68
4.2. Nav 1.5 protein miktarı.....	69
4.2.1. Normoksi Koşulları.....	69
4.2.2. Hipoksi Koşulları.....	71
4.3. Nav1.5 mRNA miktarı.....	72
4.3.1. Normoksi Koşulları.....	72

4.3.2. Hipoksi Koşulları.....	73
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	75
KAYNAKLAR.....	81



KISALTMALAR

AP	: Aksiyon Potansiyeli
BRCA1	: Meme kanseri A1 geni
BRCA2	: Meme kanseri A2 geni
CaV	: Kalsiyum Kanalı
CSC	: Kanser kök hücreleri
DCIS	: Duktal karsinom in situ
EMT	: Epitel-mezankimal geçiş
ER	: Östrojen reseptörü
FLC	: Flecainide
GluR	: Ligand kapılı glutamat reseptörleri
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HIF	: Hipoksiye yanıt veren Transkripsiyon Faktörleri
HPV	: İnsan papilloma virüsü
IDC	: Invaziv duktal karsinom
ILC	: İnvaziv Lobüler Karsinom
KV	: Potasyum Kanalı
LCIS	: Lobüler Karsinoma in Situ
LQT3	: Long QT sendromu tip 3
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
nAChR	: Ligand kapılı nikotinik asetilkolin reseptörler
NaV	: Sodyum Kanalı
PR	: Progesteron reseptörü
Rb	: Retinoblastoma
RNL	: Ranolazine
TNBC	: Üçlü negatif meme kanseri
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VGSC	: Voltaj kapılı sodyum kanalları

WHO

: Dünya sağlık örgütü



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tipleri.....	28
Tablo 2.2. TNM sisteminde tümör boyutlarının değerlendirilmesi.....	33
Tablo 2.3. TNM sisteminde lenf nodlarının değerlendirilmesi.....	34
Tablo 2.4. TNM sisteminde metastazın değerlendirilmesi. M0, 0 i+, 1 açılımları.....	35
Tablo 2.5. Meme kanseri evrelendirilmesi.....	35
Tablo 2.6. β Alt Birimlerinin Özellikleri.....	47
Tablo 2.7. NaV Alt Tiplerinin Genel Tablosu.....	48
Tablo 2.8. Antiaritmik ilaçların sınıflandırılması (King v.d., 2022).....	54
Tablo 3.1. Kullanılan primerler.....	67

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Kanserin özellikleri (Hanahan & Weinberg 2011).....	5
Şekil 2.2. Meme Anatomisi (Mayo Clinic).....	9
Şekil 2.3. 2022 yılında dünyadaki kanser insidansı (A) ve mortalitesi (B) (GLOBOCAN).....	10
Şekil 2.4. 2022 yılı Türkiye’de yaşa göre standardize edilmiş tahmini kanser insidans ve mortalite oranları (GLOBOCAN).....	11
Şekil 2.5. 2022 yılı için ülke bazlı Meme kanseri insidansı (GLOBOCAN).....	12
Şekil 2.6. 2022 yılı için ülke bazlı Meme kanseri mortalitesi (GLOBOCAN).....	12
Şekil 2.7. 2022 yılı için Türkiye’de meme kanseri insidans ve mortalitesi (GLOBOCAN).....	13
Şekil 2.8. 2022 yılında Azerbaycan ve Türkiye bazlı meme kanseri insidans ve mortalitesi (GLOBOCAN).....	15
Şekil 2.9. Meme kanseri tipleri (Mai K. Bishr, 2023).....	19
Şekil 2.10. DCIS histolojik görünümü (Oluyemi v.d., 2021).....	20
Şekil 2.11. IDC histolojik görünümü (Oluyemi v.d., 2021).....	20
Şekil 2.12. LCIS histolojik görünümü (Oluyemi v.d., 2021).....	22
Şekil 2.13. ILC histolojik görünümü (Oluyemi v.d., 2021).....	22
Şekil 2.14. Medüller karsinom histolojik görünümü (Zhang, 2021).....	23
Şekil 2.15. Metaplastik karsinomanın histolojik görünümü (Zhang, 2021).....	24
Şekil 2.16. Apokrin karsinoma histolojik görünümü (Kito v.d., 2014).....	24
Şekil 2.17. Müsinöz karsinoma histolojik görünümü (LaBoy ve Siziopikou, 2022).....	25

Şekil 2.18. Kribriform karsinoma histolojik görünümü (Tozbikian, 2022).....	26
Şekil 2.19. Tübüler karsinoma histolojik görünümü (Christgen v.d., 2021).....	26
Şekil 2.20. Nöroendokrin karsinoma histolojik görünümü (Li ve Tse, 2022).....	27
Şekil 2.21. Metastaz süreci (Lambert, Pattabiraman & Weinberg, 2021).....	36
Şekil 2.22. Kültür ortamında MDA-MB-231 hücreleri.....	40
Şekil 2.23. Normal (MCF-10a), düşük (MCF-7) ve yüksek metastatik (MDA-MB-231) meme kanseri hücrelerinde Nav 1.5 miktarı (Gould ve ark., 2018).....	41
Şekil 2.24. Hipoksiye bağlı tümör mikroçevresindeki (TME) değişiklikler (Sergiyant et al., 2020).....	42
Şekil 2.25. Açılıp kapanma mekanizmalarına göre iyon kanal tipleri (Kulbacka v.d., 2017).....	44
Şekil 2.26. VGSC Yapısı (Abd El-Aziz TM, 2021).....	46
Şekil 2.27. NaV1.5 çalışma mekanizması (Marchal GA.,2023).....	52
Şekil 2.28. Ranolazine'in kimyasal yapısı (Patil vd., 2014).....	55
Şekil 2.29. Ranolazinin etki mekanizması (Tamargo, J., & Lopez-Sendon, J.,2021).....	56
Şekil 2.30. Flecainide'in kimyasal yapısı (Jiang et al., 2020).....	59
Şekil 2.31. Flecainide'in etki mekanizması	60
Şekil 4.1. FLC, RNL ve FLC+RNL kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi (24. saat).....	69
Şekil 4.2. FLC, RNL ve FLC+RNL kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi (48. saat).....	69
Şekil 4.3. Normoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin Nav 1.5 protein ekspresyonuna TTX,FLC, RNL ve FLC+RNL kombinasyonunun etkileri ve bant görüntüleri (*P < 0,05).....	70

Şekil 4.4. Hipoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin Nav 1.5 protein ekspresyonuna FLC, RNL ve FLC+RNL kombinasyonunun etkileri ve bant görüntüleri (*P < 0,05).....	71
Şekil 4.5. Normoksi koşullarında FLC, RNL ve kombinasyonun MDA-MB-231 hücrelerindeki SCN5A ifadesine etkisi (* P<0,05).....	72
Şekil 4.6. Hipoksi koşullarında FLC, RNL ve kombinasyonun MDA-MB-231 hücrelerindeki SCN5A ifadesine etkisi (* P<0,05).....	73



SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

A	: Amper
Cl	: Klor
kDA	: Kilodalton
L	: Litre
M	: Molar
mA	: Miliamper
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Na ⁺	: Sodyum
K ⁺	: Potasyum
rcf	: Bağlı santrifüj kuvveti
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
V	: Volt
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar

ÖZET

Üçlü negatif meme kanseri (TNBC), yüksek invazivite ve metastaz potansiyeliyle bilinen, tedavisi zor bir kanser türüdür. Bu hastalarda ölüm oranlarının en önemli nedenlerinden biri metastazdır ve metastazın engellenmesi, hastaların yaşam süresini ve yaşam kalitesini artırmada kritik bir rol oynar. Son yıllarda yapılan çalışmalar, voltaj kapılı sodyum kanallarının (VGSC'ler), özellikle alfa alt birimi Nav1.5'in, meme kanser metastazının oluşmasında önemli bir etkisi olduğunu göstermiştir. Nav1.5'in aşırı ekspresyonu, hücrelerin göç ve invazyon yeteneğini artırmakta ve bu durum, kanserin yayılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle, VGSC'ler metastatik meme kanserinde umut vaadeden bir tedavi hedefi olarak ortaya çıkmaktadır.

Kalp hastalıklarında yaygın olarak kullanılan ve VGSC'leri bloke eden Ranolazine (RNL) ve Flecainide (FLC) gibi anti-aritmik ilaçların, kanser hücrelerinde de metastatik aktiviteyi azaltma potansiyeli araştırılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, yüksek metastatik özellik gösteren MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde Nav1.5 sodyum kanalına ait gen/mRNA ekspresyonu ve proliferasyon düzeylerini, normoksi ve hipoksi koşulları altında flekainid (FLC) ve ranolazin (RNL) tekli ve kombinasyon tedavileriyle değerlendirmektir. Hücre proliferasyonu MTT testiyle moleküler düzeyde ise Nav1.5 gen ve protein ekspresyonları sırasıyla Western blot ve qRT-PCR ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ilaçların, uygulanan dozlarda hücre proliferasyonunu etkilemediği saptanmıştır. Nav1.5 ekspresyonu analizlerinde, hem tekli hem de kombinasyon tedavilerinin proteini anlamlı oranda azalttığı belirlenmiştir. Özellikle FLC ve RNL'nin kombinasyon şeklinde kullanımı, Nav1.5 protein ve mRNA seviyelerinde daha belirgin bir azalma sağlamıştır, bu da ilaçların sinerjik bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, VGSC'lerin bloke edilmesinin meme kanserinde metastazın moleküler mekanizmalarını hedeflemede etkili olabileceğine işaret etmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, antiaritmik ajanlar RNL ve FLC'nin, MDA-MB-231 TNBC hücrelerinde Nav1.5 VGSC'yi hedef alarak, i) hem FLC hem de RNL'nin ayrı ayrı Nav1.5 VGSC ekspresyonunu inhibe ettiğini ve RNL'nin FLC'ye oranla daha etkili olduğunu, ii) Ayrı ayrı kullanıma oranla, FLC+RNL kombinasyonunun daha etkili olduğu, dolayısıyla da ilaçların sinerjik bir etki gösterdiklerini iii) İlaçların hipoksik koşullarda VGSC ekspresyonunu daha yüksek seviyede inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Böylece, anti-aritmik FLC+RNL kombinasyonu ile kanal ekspresyonunun hipoksik koşullarda daha yüksek oranda inhibe edilebileceğine dair ilk veriler saptanmış olup, metastatik aktiviteye karşı, bu terapötik potansiyelin daha ayrıntılı olarak ve in vivo da araştırılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri hücreleri (MDA MB 231), VGSC, Nav1.5, Flekainid (FLC), Ranolazin (RNL), Kombine Tedavi (FLC+RNL) , Normoksi , Hipoksi

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer (TNBC) is a highly aggressive and metastatic subtype of breast cancer, known for its poor prognosis and limited treatment options. One of the leading causes of mortality in these patients is metastasis, and preventing metastatic progression plays a critical role in improving both survival rates and quality of life. Recent studies have highlighted the significant role of voltage-gated sodium channels (VGSCs), particularly the alpha subunit Nav1.5, in the metastatic behavior of breast cancer cells. Overexpression of Nav1.5 has been shown to enhance cellular migration and invasion capabilities, thereby facilitating cancer dissemination. As such, VGSCs have emerged as promising therapeutic targets in metastatic breast cancer.

Ranolazine (RNL) and Flecainide (FLC), two well-known antiarrhythmic agents that block VGSCs and are widely used in the treatment of cardiac disorders, have recently gained attention for their potential to reduce metastatic activity in cancer cells. This study aimed to evaluate the gene/mRNA expression levels of the Nav1.5 sodium channel, along with cell proliferation, in highly metastatic MDA-MB-231 TNBC cells under normoxic and hypoxic conditions, following single and combination treatments with FLC and RNL. Cell proliferation was assessed via the MTT assay, while molecular expression of Nav1.5 was investigated using Western blot and qRT-PCR techniques. The results indicated that the applied doses of the drugs did not significantly affect cell proliferation. However, both individual and combination treatments led to a significant reduction in Nav1.5 expression at the protein level. Notably, the combination of FLC and RNL resulted in a more pronounced decrease in both Nav1.5 protein and mRNA expression, suggesting a synergistic effect between the two agents. These findings suggest that blocking VGSCs may represent a promising strategy for targeting the molecular mechanisms of metastasis in breast cancer.

In conclusion, the findings of this thesis demonstrate that the antiarrhythmic agents RNL and FLC: i) individually inhibited Nav1.5 VGSC expression in MDA-MB-231 TNBC cells, with RNL showing higher efficacy than FLC; ii) exerted greater inhibitory effects when used in combination, indicating a synergistic interaction; iii) exhibited enhanced inhibition of VGSC expression under hypoxic

conditions. These results provide the first evidence that the FLC+RNL combination may lead to greater suppression of Nav1.5 expression in hypoxia, emphasizing the need for further detailed investigations, including in vivo studies, to explore this therapeutic potential against metastatic activity.

Keywords: Breast cancer cells (MDA-MB-231), VGSC, Nav1.5, Flecainide (FLC), Ranolazine (RNL), Combination Therapy (FLC+RNL) , Normoxia, Hypoxia.



GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle gelişen, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla karakterize kompleks bir hastalık grubudur. Günümüzde kadınlar ve erkeklerde yüksek morbidite ve mortalite oranlarına yol açarak küresel sağlık sistemleri üzerinde ciddi bir yük oluşturmaktadır (Siegel ve ark., 2024). Kadınlarda en sık görülen malignitelerden biri olan meme kanseri, biyolojik ve moleküler çeşitliliği nedeniyle tek tip bir hastalık değildir. Özellikle triple negatif meme kanseri (TNBC), hormon reseptörleri (ER, PR) ve HER2 proteini eksprese etmeyen, agresif seyirli ve tedaviye dirençli bir alt tiptir (Sung ve ark., 2023). Günümüzde özellikle metastatik TNBC vakalarında tedavi başarısını artırmak üzere, kemoterapiye ek olarak hedefe yönelik tedaviler, immünoterapiler ve kombinasyon tedavileri üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülmektedir.

Meme kanserinin TNBC alt tipinin bu dirençli yapısı, yeni moleküler hedeflerin araştırılmasını gerekli kılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, yalnızca klasik onkolojik yolları değil, aynı zamanda hücre membranındaki iyon geçişlerinin gerçekleştirildiği iyon kanalları gibi daha önce kanserle doğrudan ilişkilendirilmemiş yapıları da incelemeye yönelmiştir. Bu kapsamda, voltaj bağımlı sodyum kanalları (VGSCs), son yıllarda kanser biyolojisinde dikkat çeken hedeflerden biri haline gelmiştir. Sinir ve kas hücreleri gibi uyarılabilir hücrelerde elektriksel iletiyi sağlayan bu iyon kanalları, çeşitli kanser türlerinde TNBC gibi invaziv tümörlerde yüksek seviyede eksprese edilmektedir (Brackenbury, 2023). TNBC de VGSC lerden Nav1.5 (SCN5A) alt birimi bulunmaktadır ve Nav1.5 ekspresyonundaki artış; hücre göçü, invazyon ve metastaz gibi agresif tümör fenotipleriyle ilişkilendirilmiştir (Yang ve ark., 2020; House ve ark., 2021). Bu bulgular , iyon kanallarının sadece elektriksel aktiviteyle sınırlı kalmayıp, tümör progresyonunda da aktif rol aldığı göstermiştir. Tüm bunlar, VGSC'lerin özellikle meme kanserinde Nav1.5 alt tipinin, yalnızca kardiyak sistemde değil, onkolojik süreçlerde de hedef alınması

gereken terapötik bir yapı olduğunu, VGSC inhibitörlerinin metastatik yayılımı sınırlayabileceğini ve bu nedenle yeni nesil hedefe yönelik tedaviler arasında yer alma potansiyeli taşıdığını ortaya koymuştur. Günümüze kadar VGSC lerin farklı kanserlerde hücre göçü, invazyon ve sonuçta metastazlar üzerinde etkili olduğu, iyon kanal blokeri olarak etki gösteren ilaçlar ile inhibe edildiği hem in vitro hem de in vivo deneysel modellerde gösterilmiştir (Brackenbury ve ark., 2007; Roger ve ark., 2020; Nelson ve ark., 2022). VGSC’lerin metastazı önleyici yeni bir tedavi seçeneği olduğunun anlaşılması ile 2023 yılında Badwe ve ekibi tarafından yapılan klinikteki retrospektif bir çalışmada, meme kanseri cerrahisi uygulanan hastalara operasyon öncesinde peritümoral olarak, lidokain uygulamasının sonucu hastaların hastalıksız sağkalım oranlarının kayda değer bir şekilde arttığı saptanmıştır. Bu çalışma, ekspresyonu yüksek olan VGSC’lerin ilaçlarla bloke edilmesi ile kanser metastazının inhibe edileceğinin ve sağ kalımı artıracak olduğunu gösteren ilk klinik bulgu ve potansiyel bir tedavi stratejisi olarak literatürde yerini almıştır.

Kardiyolojide angina pectoris, atrial fibrilasyon (AF), long-QT gibi hastalıklarda iyon kanal blokeri olan antiaritmik ilaçların, kullanılmakta ve bu ilaçlar kalp kası hücrelerinin Nav1.5 VGSC üzerinde inhibe edici etki göstererek tedavi sunmaktadır. Yapılan araştırmalar, bu ilaçların bazılarının hipoksik ortamda daha yüksek etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Antiaritmik ilaçlardan olan Ranolazine (RNL)), anjina pectoris’de kullanılırken, AF hastalığı için genellikle Flecainide (FLC), tercih edilmektedir. Flecainide, VGSC’leri doğrudan bloke ederken, Ranolazine hem sodyum hem de kalsiyum akımlarını etkileyerek hücre içi iyon dengesini değiştirmektedir. (Yang ve ark., 2020; Guzel ve ark., 2021). Ranolazine hem Nav 1.5 ekspresyonu yapan meme, hem de Nav 1.7 ekspresyonu yapan prostat kanseri migrasyon, invazyon ve metastazı üzerindeki etkileri in vitro ve in vivo olarak araştırılmıştır (Drifford ve ark. 2014., Dutta 2018., Bagan ve ark. 2019, Djamgöz , 2024).

Bu çalışmada, antiaritmiklerden Ranolazine ve Flekainide’in Nav1.5 ekspresyonu yüksek olan triple negatif meme kanseri hücrelerinden MDA MB-231 üzerindeki etkilerini ayrı ayrı ve kombinasyon şeklinde değerlendirmek, ilaçların normoksi ve hipoksi ortamlarındaki cevaplarını moleküler düzeyde ortaya koymak amaçlanmıştır. Hücre proliferasyonu ile Nav1.5 kanalının gen ve protein düzeylerindeki ekspresyonlarının

incelendiği bu tez çalışmasında, VGSC inhibitörleri olan antiaritmik FLC ve RNL nin kombinasyon şeklinde uygulanması ile hem kombinasyon tedavisinin, ayrı-ayrı uygulamalara kıyasla, hücreler üzerinde potansiyel sinerjik faydalarının ortaya konmasını hem de ilaçların etkilerinin hipoksi ve normoksi koşullarında karşılaştırılmasıyla, hipoksik tümör mikroçevresinin tedavi yanıtlarındaki rolünü değerlendirmek hedeflenmiştir. Bu kapsamda elde edilecek bulguların, ilaçların metastaza yönelik olası mekanistik etkilerine ışık tutması, onkolojik tedavi stratejilerinde yeniden konumlandırılmalarına bilimsel katkı sağlaması da amaçlanmaktadır.

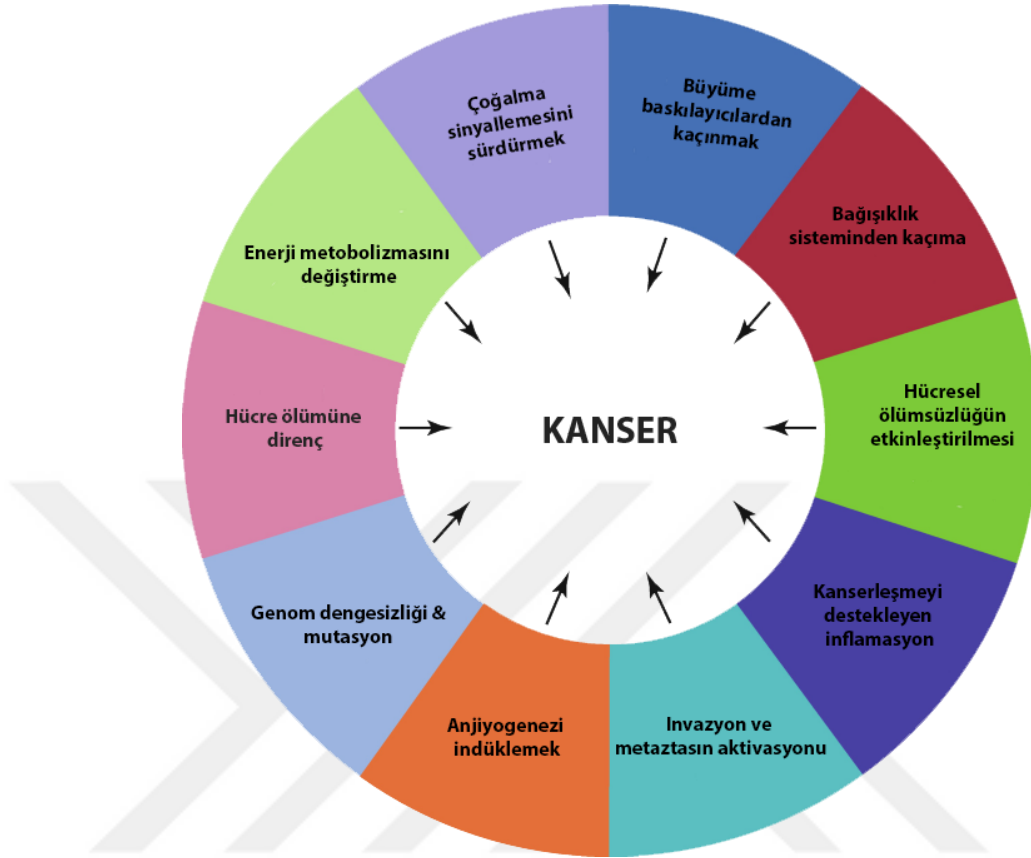


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, herhangi bir organda veya dokuda bir hücrenin transformasyonu ile başlayan, ve hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğaldığı, bulunduğu doku veya organdan ayrılarak diğer organlara yayıldığı bir hastalıktır. Normal hücreler, hücre çoğalması esnasında hücre siklusunun herhangi bir aşamasında hasar gördüğünde veya yaşlandığında tamir mekanizmaları devreye girerek veya apoptoz denilen programlı hücre ölümü gerçekleşerek düzeni devam ettirirler. Ancak kanserde, bu düzen bozulur ve hasarlı hücreler kontrolsüz bir şekilde sıklusa devam ederek çoğalırlar (World Health Organization).

Kanser hücreleri, sürekli çoğalma yeteneği gösterir ve bu durum, hücre siklusunun normal düzenleyici mekanizmalarının işlevini yitirmesinden kaynaklanır (Şekil 2.1.). Normal şartlarda hücrelerin büyümesi ve bölünmesi, homeostazın korunmasını sağlayan sıkı düzenlemelere tabidir. Bu düzenlemeler, büyümeyi teşvik eden sinyallerin belirli bir denge içinde üretilmesi ve salınmasıyla gerçekleştirilir. Kanser hücrelerinde ise genetik ve epigenetik değişiklikler, bu homeostatik dengeyi bozar. Genellikle büyüme faktörlerine duyarlılığı artıran mutasyonlar veya hücre yüzeyindeki tirozin kinaz reseptörlerinin anormal aktivasyonu gibi mekanizmalar, kanser hücrelerine otonom bir proliferatif kapasite kazandırır. Bu hücreler, ekstraselüler büyüme baskılayıcı sinyallere karşı duyarsız hale gelerek, otonom proliferatif sinyal yollarını aktive ederler. Bunun sonucunda, kontrolsüz hücre büyümesi, tümör oluşumu, hücre göçü ve invazyonu sonucu metastaz meydana gelir. Bu durum, kanser hücrelerinin normal hücrelerden farklı olarak büyüme ve çoğalmayı düzenleyen mekanizmalardan bağımsız bir şekilde hareket ettiğini ve bu nedenle kontrolsüz çoğalma özelliği geliştirdiğini göstermektedir (Sinha ve ark., 2024).



Şekil 2.1. Kanser özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011)

Kanser hücrelerinin özellikleri:

1. **Çoğalma sinyallerini sürdürme:** Kanser hücreleri, normal hücrelerin aksine, büyüme faktörleri ve çevresel sinyallere ihtiyaç duymadan bölünme yeteneğine sahiptir. Kanser hücreleri, kendi büyüme faktörlerini ve reseptörlerini sentezleyebilir, hücre içi sinyal iletim yollarında mutasyonlar meydana getirerek, sürekli büyüme ve bölünme sinyalleri üretebilirler. Bu durum, kanser hücrelerinin proliferasyonunun sürekli devam etmesini sağlar ve dolayısıyla, kanserin ilerlemesinin temelini oluşturur (Zhou.,2019).
2. **Büyüme Baskılayıcılarından Kaçma:** Kanser hücreleri, büyümeyi baskılayıcı mekanizmaları devre dışı bırakırlar. Normal hücrelerde, tümör baskılayıcı genler (örneğin p53, Rb) hücre siklusunun kontrolünü sağlar ve gerektiğinde hücrenin apoptoz ile ortadan kaldırılması için uyarı yapar. Ancak kanser hücrelerinde bu

genlerin işlevini kaybetmiştir veya inhibe olmuştur. Örneğin, p53 geninin mutasyona uğraması, hücredeki DNA hasarının onarılmadan siklusa ilerlemesine ve bölünmeye devam etmesine yol açar (Wang, 2022). Benzer şekilde, retinoblastoma (Rb) geninin inaktivasyonu, hücre siklusunun sıkı/doğru bir şekilde kontrol edilmesini engeller ve kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesine neden olur (Liu ve ark., 2024).

3. **Hücre Ölümüne Direnç:** Kanser hücreleri, hücre ölümüne yol açan mekanizmalara karşı direnç geliştirirler. Apoptozis gibi programlı hücre ölümü mekanizmaları, kanser hücrelerinde genellikle engellenir ve hücreler ölüme karşı dirençli hale gelir. Kanser hücreleri, pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu baskılar ve anti-apoptotik proteinlerin seviyelerini artırır. Örneğin, Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin yüksek seviyeleri, hücrenin ölümünü engelleyerek kanserin progresyonuna katkıda bulunur (Babacan, 2023).
4. **Replikatif Ölümsüzlük:** Kanser hücreleri, telomeraz enziminin aşırı ekspresyonu ile telomer uzunluklarını koruyarak sınırsız bölünme kapasitesine sahip olurlar. Böylece, normal hücrelerde görülen sınırlı bölünme kapasitesi nedeniyle oluşan replikatif yaşlanma ve kromozomal instabiliteye bağlı hücresel kriz aşılabilmektedir. Telomeraz aktivasyonu, kanser hücrelerinin zamanla yaşlanmasını engelleyerek, sürekli bölünmelerine sebep olur (Zhang, 2020). Ayrıca, bazı kanser hücreleri alternatif yollarla telomer koruma mekanizmalarını kullanarak da bölünmeyi sürdürebilir (Wright ve Shay, 2005).
5. **Anjiyogenezi İndükleyebilme:** Kanser hücreleri, büyümelerini ve metastaz oluşumlarını gerçekleştirebilmek için yeni kan damarlarına ihtiyaç duyarlar ve damar oluşumunu tetiklerler. Bu süreçte, kanser hücreleri vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi anjiyogenik faktörler salgırlar. Ayrıca, hipoksiye yanıt veren transkripsiyon faktörleri (HIF), oksijen seviyelerine göre kan damarlarının büyümesini uyarır. Bu özellik, kanserin hem progresyonu hem de, metastatik yayılımı için kritik bir adımdır (Ferrara, 2004; Carmeliet, 2005).

6. ***İnvazyon ve Metastazın Aktivasyonu:*** Kansere hücreleri, çevre dokularda yayılarak yeni dokularda/bölgelerde metastaz yapabilme yeteneğine sahiptir. Epitel-mezankimal geçiş (EMT) sürecine giren kanser hücreleri, dış ortamla etkileşerek daha invazif özellikler kazanırlar. Bu süreçle birlikte, hücreler ekstraselüler matriksi parçalayan enzimleri salgılar ve yeni çevresel koşullara adapte olurlar. Böylece, kanser hücreleri farklı organlara ve dokulara yayılma yeteneği kazanır (Yeung., 2017).
7. ***Bağışıklık Sisteminden Kaçınma:*** Kansere hücreleri, bağışıklık sisteminin tespit ve yok etme mekanizmalarından kaçınmak için çeşitli stratejiler geliştirir. Örneğin, kanser hücreleri, bağışıklık sistemi hücrelerini inhibe eden immün kontrol noktası moleküllerini aşırı ifade edebilirler (örneğin, PD-L1). Bunun dışında, kanser hücreleri, bağışıklık hücrelerini bağışıklık baskılayıcı mikroçevreye çekmek için sitokin üretimini değiştirebilirler (Blake ve ark., 2016). Ayrıca, kanser hücreleri, bağışıklık yanıtından kaçınmak için erken aşamada programlı hücre ölümünü (apoptoz) engelleyebilirler (Borden, 2016).
8. ***Enerji Metabolizmasını Değiştirme:*** Kansere hücreleri, normal hücrelerin aksine enerji üretim yollarını değiştirebilirler. Warburg etkisi, kanser hücrelerinin oksijen varlığında bile anaerobik glikoliz kullanmalarını açıklayan bir fenomendir. Bu süreç, kanser hücrelerinin hızla büyümek için daha fazla enerji ve biyomolekül üretmesini sağlar. Ayrıca, bazı kanser hücreleri, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu baskılayarak büyüme için alternatif enerji kaynakları kullanmayı tercih ederler (Wiese., 2018).
9. ***Genom Dengesizliği ve Mutasyon:*** Kansere hücreleri, genomik instabiliteye sahip olup sürekli olarak mutasyonlar ve genetik değişiklikler oluştururlar. Bu genomik dengesizlik, kanser hücrelerinin evrimsel baskılara uyum sağlamalarına ve direnç geliştirmelerine olanak tanır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Kansere hücrelerinde, özellikle DNA onarımının bozulmuş olması daha fazla mutasyonun meydana gelmesine yol açabilir. Örneğin, p53 geninin kaybı, hücrelerin genetik hasarlara karşı

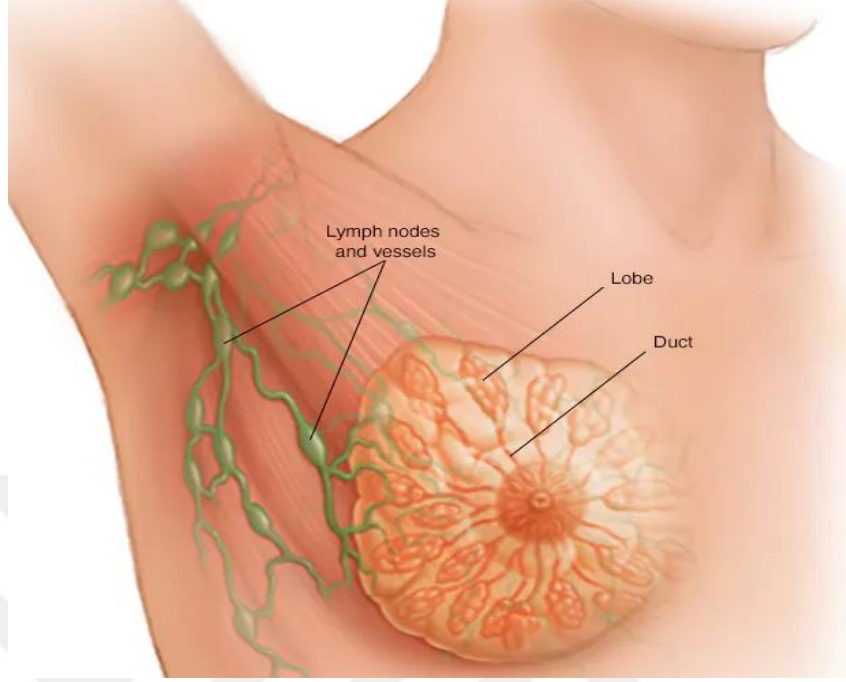
savunmasız hale gelmesine neden olur ve karsinogenez sürecini hızlandırabilir (Vogelstein ve ark., 2013).

10. *Kanserleşmeyi Destekleyen İnflamasyon:* Kanser hücreleri, inflamatuvar süreçleri aktif hale getirerek kanserleşmeyi teşvik ederler. İnflamasyon, kanser hücrelerinin büyümesini, invazyonunu ve metastaz yeteneklerini artırabilir. Tümör mikroçevresinde, IL-6 ve TNF- α gibi, pro-inflamatuvar sitokinler yüksek seviyelerdedir ve tümör progresyonunu destekler . Ayrıca, kronik inflamasyon, DNA hasarını ve genomik instabiliteyi artırarak da kanserin gelişmesine neden olabilir (Zhou.,2016).

2.2.Meme Kanseri

Meme kanseri, genellikle meme dokusunda başlayan ve kontrolsüz, hücre büyümesi sonucu gelişen bir kanser türüdür. Meme kanseri kadınlarda daha sık görülmekle birlikte nadiren erkeklerde de rastlanır. 3.500 yıldan daha uzun bir süre önce meme kanserini ilk fark eden eski Mısırlılar, tedavisi olmayan ve memeyi şişkin gösteren hastalık olarak tanımlamışlardır (Mousa ve ark., 2011).

Meme, anatomik olarak üç ana bölümden oluşur: lobüller, kanallar ve bağ dokusu (Şekil 2.2.). Meme yapısında, dairesel bir düzende yer alan 15-20 kadar lob bulunur. Bu loblar, hormonların uyarısına yanıt vererek süt üretiminden sorumlu bezleri barındıran lobüllerini içerir. Sütü meme ucuna taşımakla görevli kanallar ise her bir lob ile bağlantılıdır. Meme, pektoralis majör kasının üzerinde konumlanmıştır ve bağ dokusu, göğüs duvarına bağlantı sağlayarak memeye destek olur ve tüm yapıyı bir arada tutar (Pandya ve Moore, 2011).



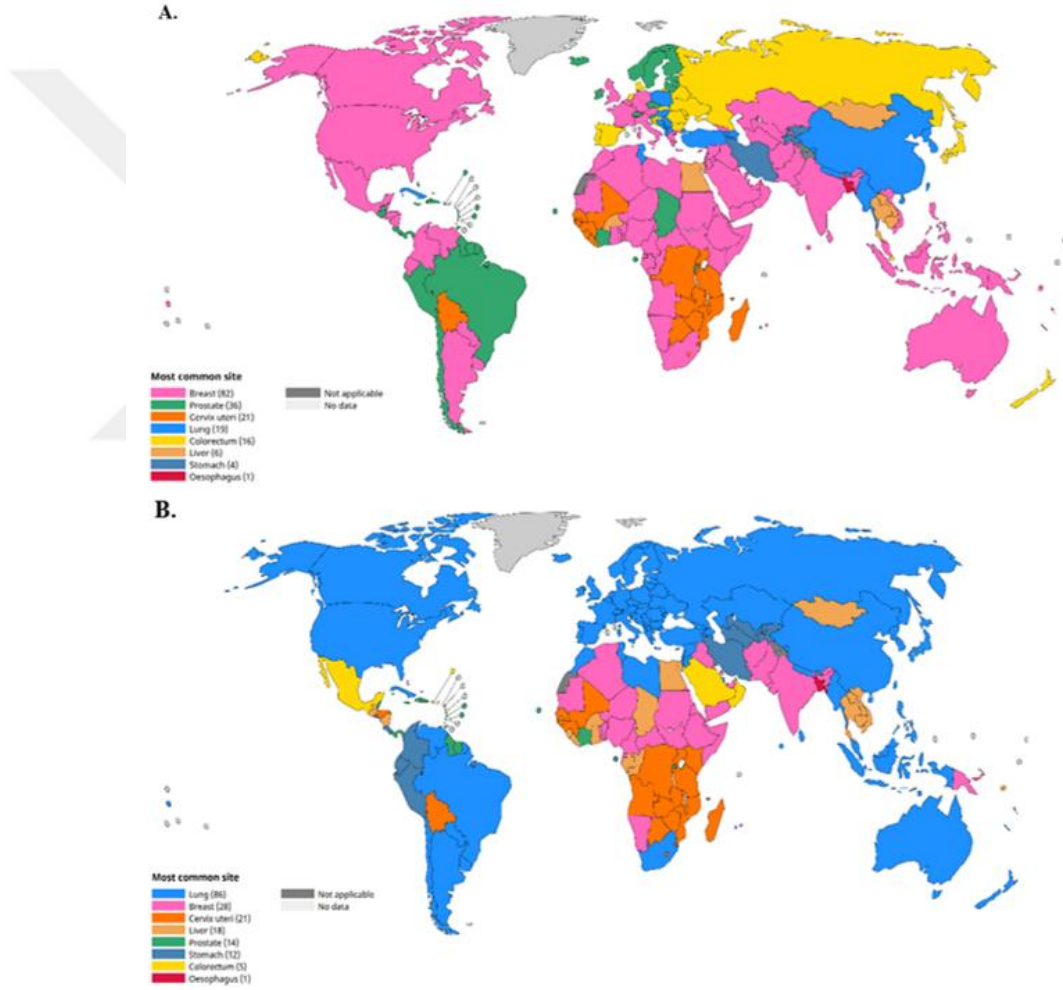
Şekil 2.2. Meme Anatomisi (Mayo Clinic).

Meme kanseri, karsinomalar grubuna dahil olup, epitel dokudan kaynaklanır ve genellikle adenokarsinoma formunda, süt kanalları (duktal) veya lobüler yapılardan gelişir. Duktal karsinoma in situ (DCIS) ve invaziv duktal karsinoma (IDC) en yaygın alt türleridir ve bu kanserler genellikle epitel hücrelerinin malign transformasyonu sonucu ortaya çıkar (Siegel ve ark., 2023). Meme kanserinin biyolojik davranışı, östrojen ve progesteron hormonlarının reseptör durumuna ve HER2 moleküler belirteçlerine bağlı olarak değişiklik gösterir. Bu farklılıklar, tedavi protokollerini şekillendiren prognostik ve prediktif faktörler olarak büyük önem taşır (Batra ve ark., 2023).

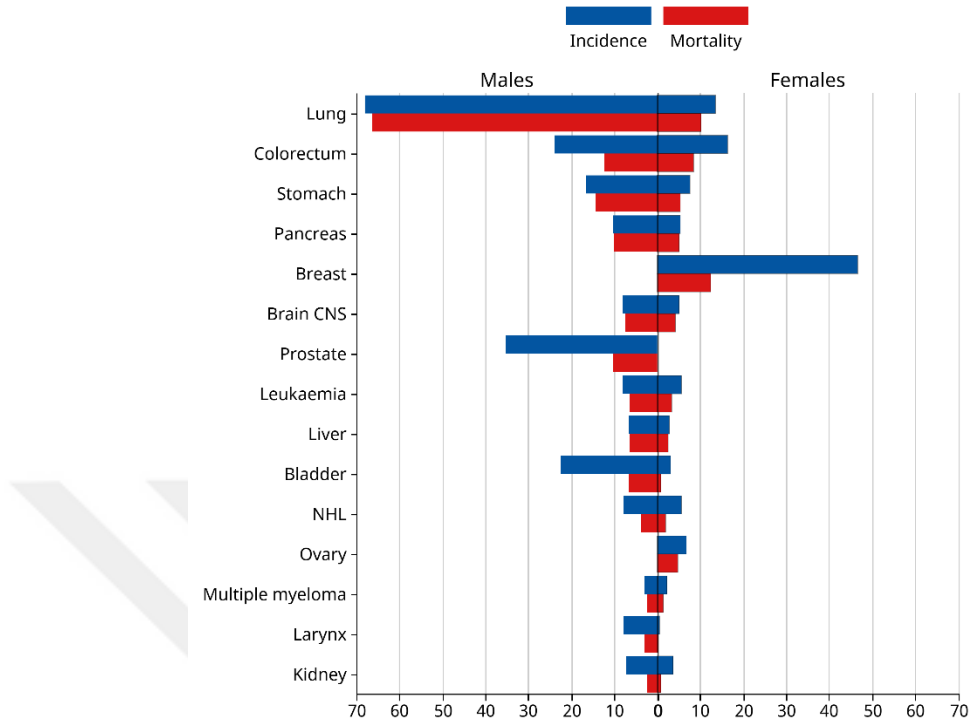
2.2.1.Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Epidemiyolojik çalışmalar, kanserin yeni vakaların sayısı olan insidans, var olan vakaların sayısını veren prevalans ve ölüm oranlarını veren mortalite gibi ölçülerini analiz eder. Bu veriler, toplumların sağlık hizmetleri ve kaynaklarının yönetimi için kritik öneme sahiptir. Genetik faktörler, Çevresel Faktörler, Yaşam Tarzı ve Alışkanlıklar, Biyolojik Faktörler gibi risk faktörleri, kanser epidemiyolojisinin önemli bir parçasını oluşturur.

Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı kanser verilerinin yer aldığı GLOBOCAN 2022 verilerine göre, dünya genelinde en sık görülen beş kanser türü: rahim ağzı kanseri, meme kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri ve akciğer kanseridir ve 19,9 milyon kanser insidansı ile, 9.7 milyon kanserden kaynaklı ölüm vakası bildirilmiştir (Şekil 2.3.). Türkiye’de ise en sık görülen beş kanser türü akciğer, meme, kolorektal, prostat ve mesane kanseridir ve 2022 yılında kanser insidansı 240.013 , mortalite 129.672 dir (Şekil 2.4.).



Şekil 2.3. 2022 yılında dünyadaki kanser insidansı (A) ve mortalitesi (B) (GLOBOCAN).

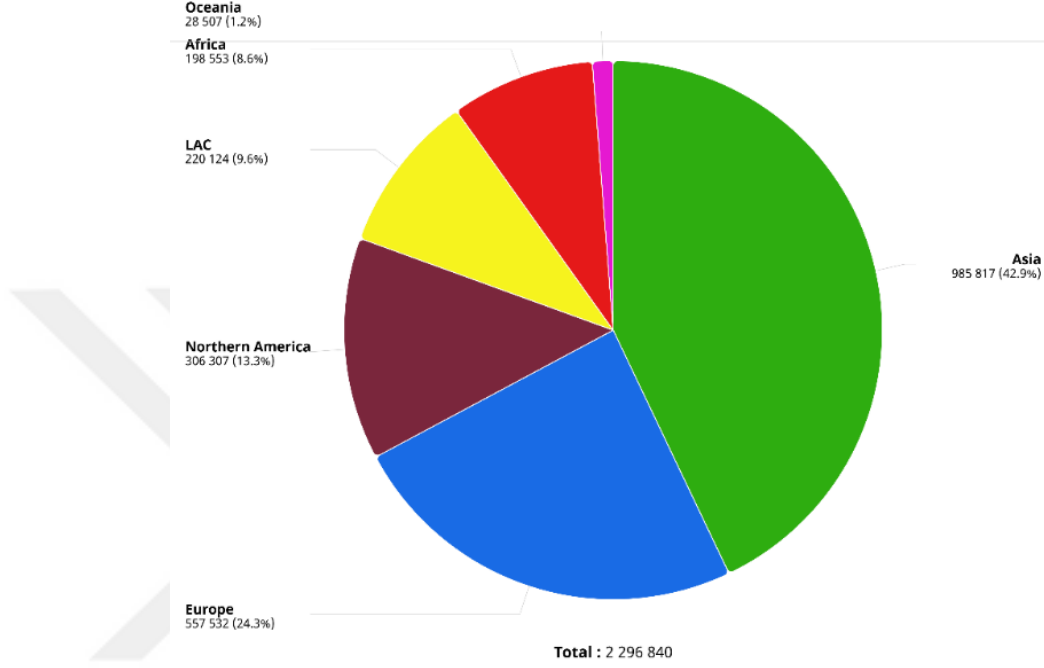


Şekil 2.4. 2022 yılı Türkiye’de yaşa göre standardize edilmiş tahmini kanser insidans ve mortalite oranları (GLOBOCAN).

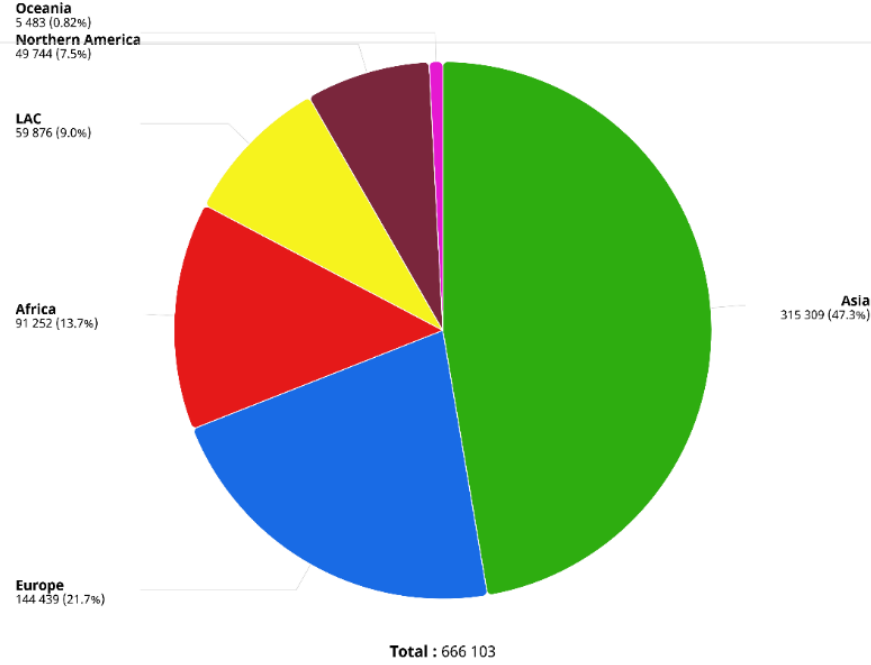
Dünyadaki bu verilere baktığımızda meme kanseri, özellikle kadınlar açısından ayrı bir öneme sahiptir. Meme kanseri, kadınlar arasında dünya genelinde en sık görülen kanser türüdür. Akciğer kanserinden sonra, kadınlarda kansere bağlı ölümlerde de ikinci sırada yer alır. Meme kanseri vakalarının yaklaşık %30’u, fazla kilo, hareketsiz yaşam tarzı ve alkol tüketimi gibi önlenabilir risk faktörlerinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, sağlıklı yaşam alışkanlıkları benimseyerek bu riskler büyük ölçüde azaltılabilir. Ayrıca, tedavi yöntemlerindeki ilerlemeler ve düzenli mamografi taramalarının yaygınlaşması, meme kanserinin erken teşhis edilmesini sağlayarak bu hastalığa bağlı ölüm oranlarını kayda değer şekilde düşürebilir (Siegel ve ark., 2023).

Meme kanseri, uzun yıllardır en sık karşılaşılan kanser türlerinden biri olmuştur. GLOBOCAN verilerine göre, 2022 yılında dünya genelinde toplam 2.296.840 kanser vakası tespit edilmiştir (Şekil 2.5.). Bu dönemde meme kanserine bağlı ölüm sayısı ise 666.103 olarak kaydedilmiştir (Şekil 2.6.). Kadınlarda teşhis edilen kanser vakalarının

yaklaşık 89.540'ı duktal karsinoma in situ (DCIS) olarak sınıflandırılmıştır. DCIS özellikle 2022 yılında, meme kanserli kadınlar arasında hem görülme sıklığı hem de kansere bağlı ölümler açısından ilk sıralarda yer almıştır.

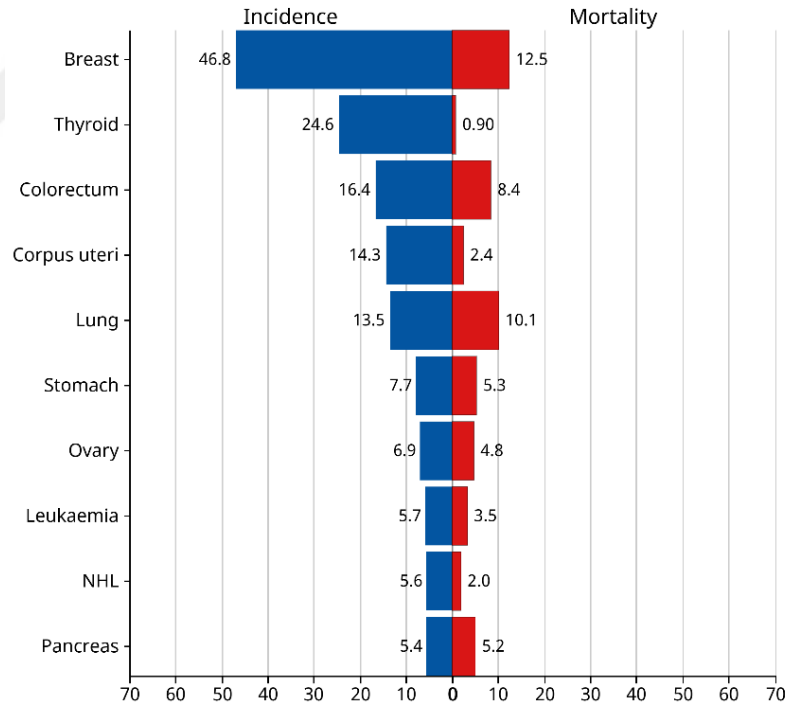


Şekil 2.5. 2022 yılı için ülke bazlı Meme kanseri insidansı (GLOBOCAN).



Şekil 2.6. 2022 yılı için ülke bazlı Meme kanseri mortalitesi (GLOBOCAN).

Türkiye’de meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen ve ölüme neden olan kanser türüdür. Meme kanseri insidansının dağılımı coğrafi, ekonomik, sosyal ve kültürel faktörlere bağlı olarak Türkiye'nin farklı bölgeleri arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Türkiye'nin batısında meme kanseri insidansı, 'Batılılaşmış' yaşam tarzı olarak tanımlanan erken menarş, geç menopoz, ilk doğum yaşının 30 yaş ve üzeri olması, daha az emzirme gibi faktörler nedeniyle Türkiye'nin doğusundaki insidansın iki katından fazladır (Özmen ve ark., 2019). GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında Türkiye genelinde meme kanseri insidansı 10.3% ile 2.ci sırada yer alırken, 2022 yılında bu oran 10.5% yükselmiştir. Kadınlar arasında ise, 2022 yılının verilerine göre insidans 46.8% , mortalite oranı ise 12.5% dir (Şekil 2.7.) .



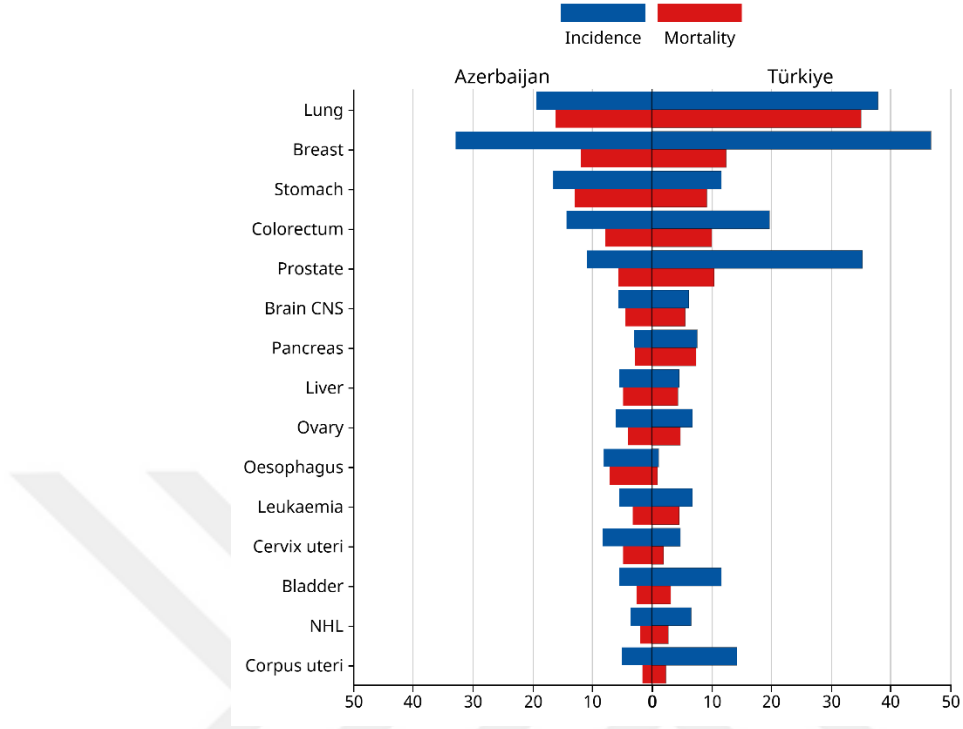
Şekil 2.7. 2022 yılı için Türkiye’de meme kanseri insidans ve mortalitesi (GLOBOCAN).

Türkiye’de 40 yaş altı kadınlarda meme kanseri görülme oranı %20 iken, bu oran Batı Avrupa ve ABD’de yaklaşık %5 olarak tespit edilmiştir. Türkiye’de meme kanseri sağ kalım oranlarında coğrafi farklılıklar dikkat çekmektedir; batı bölgelerinde beş yıllık sağ kalım oranı %85 iken, doğu bölgelerinde bu oran %60’tır (Yılmaz ve ark., 2020).

Son yıllarda tarama merkezlerinin sayısının artması, 40-69 yaş arasındaki kadınlar için ücretsiz mamografi hizmeti sunulması ve mobil tarama sistemlerinin devreye girmesine rağmen, meme kanseri farkındalığının düşük olması nedeniyle birçok hasta ileri evrede tanı almaktadır. 2020 verilerinin tam aksine, menopo  öncesi kadınlarda meme kanseri oranında azalma, meme koruyucu cerrahi oranında ise artış gözlemlenmiş ve be  yıllık sağ kalım oranı %86 olarak rapor edilmiştir. Bu durum, tarama programlarının etkin bir şekilde yaygınlaştırılması ve farkındalığın artırılmasıyla tümör boyutlarının ve/veya bölgesel lenf nodu tutulumlarının azalabileceğini ortaya koymaktadır ( zmen ve ark., 2019).

Dünya genelinde, düzenli meme kanseri tarama programlarının yaygınlaştırılması, erken teşhis imkanlarının artırılması ve etkili tedavi yöntemleriyle meme kanserine bağlı ölümlerin azaltılması yönündeki çalışmaları devam etmektedir (Kami ska ve ark., 2015).

Türkiye'deki meme kanseri insidansı ve mortalitesinin yüksekliği, benzer şekilde Azerbaycan'da da dikkat çeken bir sağlık sorununu oluşturmaktadır. Özellikle Azerbaycan'da, meme kanseri, tüm kanserler arasında en yüksek insidansa sahip olup, bu durum erken teşhis ve tedavi stratejilerinin önemini vurgulamaktadır . Her iki ülkeyi kanser insidansı ve mortalitesi açısından kıyasladığımızda akciğer, meme, mide, kolorektum ve prostat kanseri ilk be de yer almaktadır ( ekil 2.8.).



Şekil 2.8. 2022 yılında Azerbaycan ve Türkiye bazlı meme kanseri insidans ve mortalitesi (GLOBOCAN).

2.2.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanserinin nedenleri tam olarak bilinmemekle birlikte değiştirilebilir veya değiştirilemeyen birçok risk faktörü vardır. Bu risk faktörleri genellikle genetik, çevresel ve yaşam tarzı ile ilişkilidir. Risk faktörleri iki ana gruba ayrılır: değiştirilemeyen faktörler ve değiştirilebilir faktörler.

2.2.2.1. Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

- Genetik Faktörler: Meme kanseri riskinin yaklaşık %5-10'u, kalıtsal genetik mutasyonlarla ilişkilidir. Özellikle yüksek penetrasyon ile karakterize edilen iki ana gen, BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları, meme ve over kanseri riskini önemli derecede artırır. BRCA1 geni 17. kromozomda, BRCA2 geni ise 13. kromozomda bulunur ve her iki gen de hücre siklusunu düzenleyen tümör baskılayıcı proteinlerin üretiminde rol oynar. Bu genlerdeki mutasyonlar, DNA

onarım mekanizmasını etkilerek, kansere yol açar (Ayub ve ark., 2014; Mehrgou ve Akouchekian, 2016). Genellikle BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonun neden olduğu kalıtsal meme kanseri, tüm bu kanser vakalarının %5 ila %10'undan ve over kanseri vakalarının %10 ila %15'inden sorumludur (Mehrgou ve Akouchekian, 2016 ; Fu ve ark., 2022). Diğer meme kanseri genleri arasında ise, TP53, CDH1, PTEN ve STK11 bulunur.

- **Aile Öyküsü:** Birinci derece akrabalarında (anne, kız kardeş, kız çocuk) meme kanseri öyküsü olan bireylerde risk artar. İki veya daha fazla birinci derece akrabasının meme kanseri olması, bireyin genetik yatkınlığını gösteren önemli bir işarettir. Meme kanseri teşhisi konulan hastaların yaklaşık %13-19'u birinci derece akrabalarının da 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 yükselir (Antoniou ve ark., 2003). Ailede over kanseri öyküsünün bulunması, özellikle BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları ile karakterize olanlar, meme kanseri riskini de artırabilir (Wu ve ark., 2018).
- **Yaş ve Cinsiyet:** Kadın olmak ve yaşın ilerlemesi meme kanseri riskini artırır. Kadınlarda meme kanseri görülme oranı erkeklere göre çok daha yüksektir, çünkü östrojenin etkisi, meme kanseri gelişiminde önemli bir role sahiptir (Siegel ve ark., 2023). 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. Meme kanseri en sık 45- 55 yaş aralığında olan menopoz dönemindeki kadınlarda görülür. 45 yaşın altındaki kadınlarda anlamlı olarak daha az görülmektedir (Lukasiewicz ve ark., 2021). 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 daha sık rastlanır.

- **Menstrüel ve Reprodüktif Faktörler:** Erken menarş (<12 yaş) ve geç menopoz (>55 yaş), yaşam boyunca toplam östrojen maruziyetini artırarak meme kanseri riskini yükseltmektedir. İlk doğumun 30 yaşın üzerinde gerçekleşmesi, veya hiç doğum yapmamış olmak (nulliparite), meme kanseri riskini artıran diğer faktörlerdir. İlk doğumdan önceki meme dokusu, özellikle glandüler yapıların tam diferansiyasyona ulaşmaması nedeniyle kansere daha duyarlı olduğu bildirilmektedir (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012). Gebelik sırasında östrojen ve progesteron seviyelerinde artış yaşanmasına rağmen, emzirme sırasında prolaktin hormonu aracılığıyla baskılanan ovulasyon/yumurtlama döngüsü, hormonal maruz kalma süresini kısaltarak koruyucu etki sağlar ve bu da meme kanseri riskini azaltıcı etki gösterir (Zhou ve ark., 2023).
- **Yoğun Meme Dokusu:** Meme dokusunun yoğunluğu da, meme kanseri riskini artıran önemli bir faktör olarak değerlendirilir. Mamografide gözlemlenen yoğun meme dokusu, glandüler ve fibröz dokuların yağ dokusuna oranla daha fazla olduğu bir durumdur. Bu özellik, yalnızca kanser riskini yükseltmekle kalmaz, aynı zamanda mamografi ile erken teşhis oranlarını da düşürebilir. Yoğun meme dokusuna sahip kadınlarda, meme kanseri riskinin 4-6 kat daha yüksek olabileceği belirtilmiştir (McCormack ve Santos Silva, 2006; Boyd ve ark., 2011). Bu durum, yoğun dokuların radyolojik görüntüleme sırasında tümörleri maskeleye potansiyeli ile birleşerek, teşhis sürecinde ek zorluklara neden olmaktadır. Dolayısıyla mamografi ile birlikte ultrasonagrafi yapılarak bu maskeleye potansiyeli ortadan kaldırılmaktadır.

2.2.2.2. Değiştirilebilir Faktörler

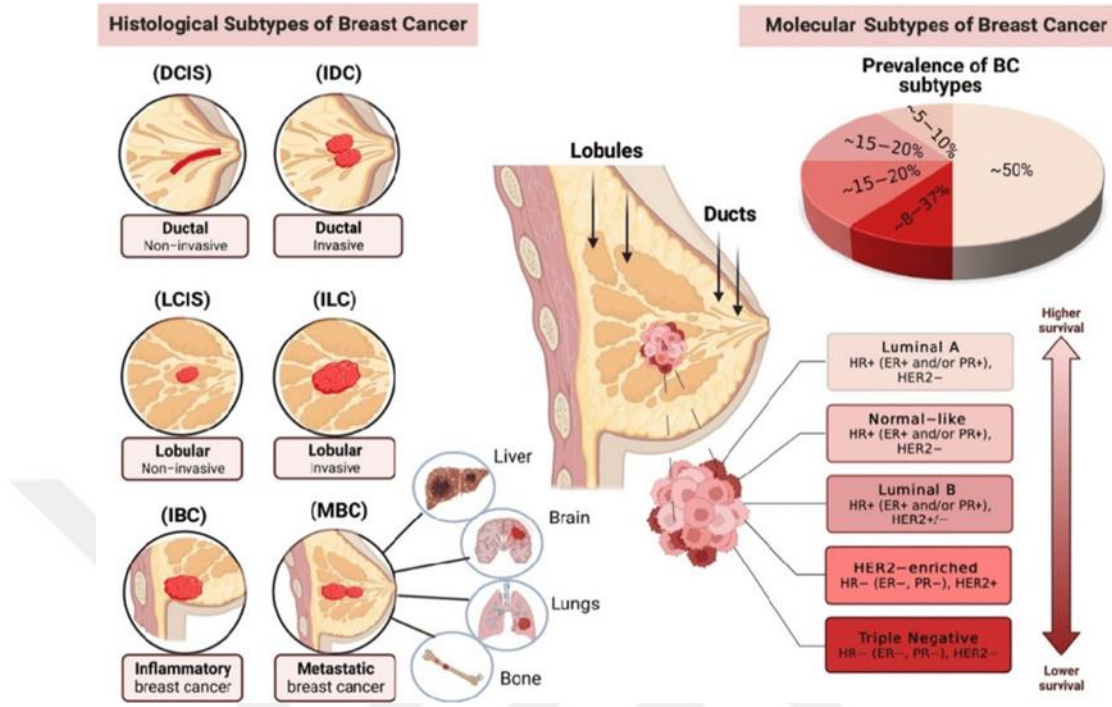
- **Obezite ve Diyet:** Özellikle postmenopozal kadınlarda, fazla kilolu veya obez olmak, meme kanseri riskini artırır. Yağ dokusu, östrojen üretiminin ana kaynağı haline gelir ve meme kanseri riskini yükseltir (Ligibel, 2011). Obezite, aromataz enzimi yoluyla yağ dokusunda östrojen üretimini artırır ve bu durum özellikle östrojen reseptörü pozitif (ER+) meme kanserlerinde risk artışına neden olur. 2018 yılında yapılan bir çalışmada, postmenopozal obez kadınların meme kanseri

riskinin normal kilodaki kadınlara göre %50 daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Pfeiler ve ark., 2018).

- **Fiziksel Aktivite:** Düzenli fiziksel aktivitenin meme kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir. Sedanter yaşam tarzı, özellikle menopoz sonrası kadınlarda önemli bir risk faktörüdür. Fiziksel aktivite, endojen seks hormonlarına maruz kalmayı azaltarak, bağışıklık sistemi tepkilerini veya insülin benzeri büyüme faktörü-1 seviyelerini değiştirerek kanseri önleyebilir (Delrieu ve ark., 2021). Haftada en az 150 dakika orta şiddette aerobik egzersiz veya 75 dakika yoğun egzersiz yapmanın, özellikle postmenopozal kadınlarda meme kanseri riskini %20-30 oranında azalttığı rapor edilmiştir (McTiernan, 2003; Friedenreich ve ark., 2010).
- **Alkol Tüketimi ve Sigara:** Yapılan çalışmalarda, günde 10 ml alkol tüketen kadınlarda meme kanseri riskinin %7 oranında arttığı, bu oranın günde üç içki tüketimi ile %20'ye kadar çıktığı belirtilmiştir (Scoccianti ve ark., 2014). Bu etki alkolün, östrojen metabolizmasını etkilemesinden kaynaklanmaktadır. Sigara kullanımı ise özellikle premenopozal kadınlarda meme kanserine yakalanma riskini artırmasa da, meme kanserinden ölüm riskini artırmaktadır. Ayrıca, pasif içicilik de riski yükselten bir faktördür. (Passarelli ve ark., 2016).

2.2.3. Meme Kanserinin Sınıflandırması

Meme kanseri, kaynaklandığı hücre tipine, histolojik ve moleküler özelliklere dayanarak çeşitli alt gruplara ayrılmaktadır. Temelde meme kanseri iki ana gruba ayrılır: in situ meme kanserleri ve invaziv meme kanserleri olmak üzere. İnvaziv meme kanserleri, meme dokusunun dışına yayılan tümörlerdir. İn situ meme kanserleri ise , çevre dokulara invazyon göstermeyen, meme ile sınırlı kalan tümörlerdir. Bunun yanı sıra, moleküler ve histolojik özelliklerine göre de detaylı bir sınıflama da yapılabilir (Şekil 2.9).



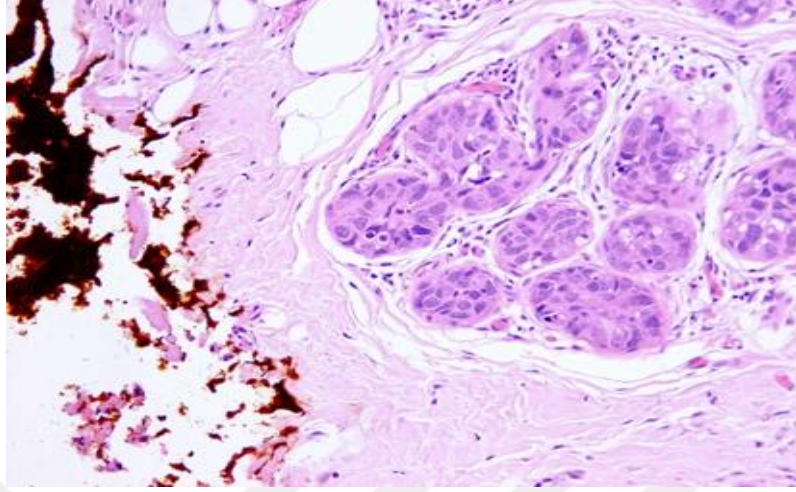
Şekil 2.9. Meme kanseri tipleri (Mai Bishr, 2023)

1. Histolojik Sınıflandırma

Histolojik sınıflandırmalar, tümörlerin mikroskop altında gözlemlenebilen yapısal özelliklerine göre yapılmaktadır ve meme kanseri değerlendirildiğinde Duktal Karsinomalar ile Lobüler Karsinomalar olmak üzere iki temel kısma ayrılır (King., 2023).

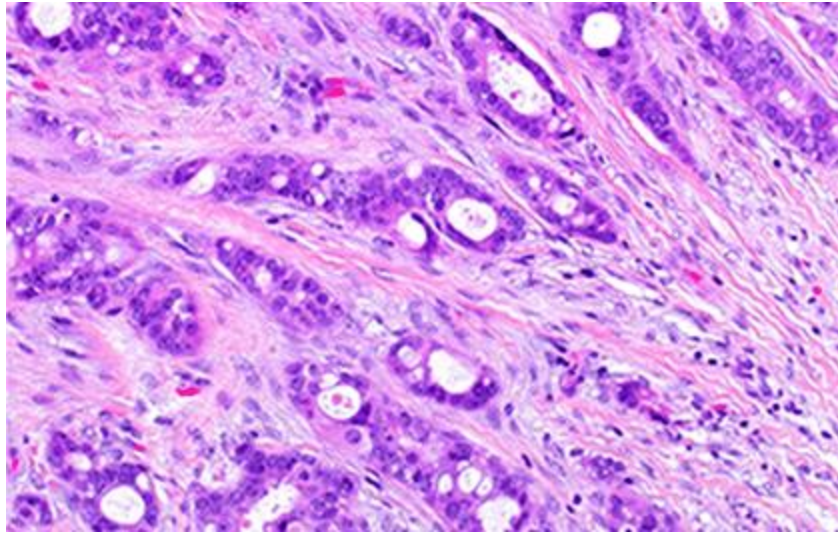
1.1. Duktal Karsinomalar

- **Duktal Karsinoma in Situ (DCIS):** Kanalların iç yüzeyini döşeyen hücrelerde sınırlı kalmış, invazyon göstermeyen kanser türüdür (Ouattara ve ark., 2023). Tipik olarak meme kanallarında lokalize olan ve çevresindeki dokuya invazyon yaptığına dair kanıt bulunmayan neoplastik lezyonları temsil eder (Tomlinson-Hansen ve ark., 2020). DCIS, tedavi edilmezse genellikle IDC'ye dönüşür (Şekil 2.10.)



Şekil 2.10. DCIS histolojik görünümü (Oluyemi ve ark., 2021)

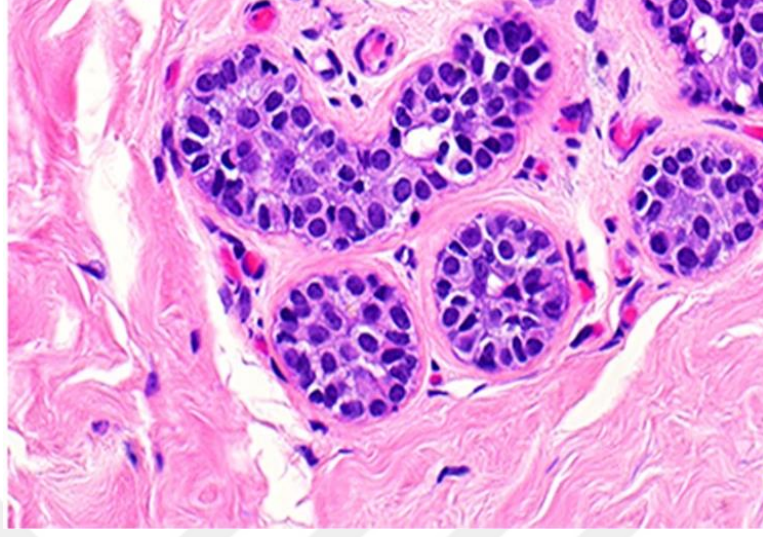
- **İnvaziv Duktal Karsinoma (IDC):** Meme kanallarının epitel hücrelerinden kaynaklanan, bazal membranı aşarak çevresindeki dokulara stromaya ve potansiyel olarak lenfatik ve hematolojik yollardan uzak organlara metastaz yapabilen en yaygın invaziv meme kanseri türüdür. IDC, tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %70-80'ini oluşturarak kadınlarda en sık görülen malignitelerden birini oluşturur. Klinikte genellikle ele gelen sert bir kitle, meme derisinde çekilme, kızarıklık veya meme başı akıntısı gibi semptomlarla kendini gösterir. (Li ve ark., 2022 ; Siegel ve ark., 2023) (Şekil 2.11.).



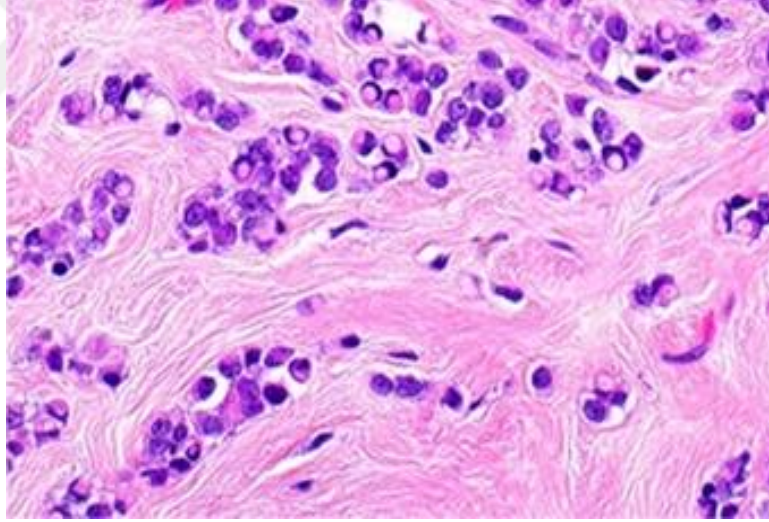
Şekil 2.11. IDC histolojik görünümü (Oluyemi ve ark., 2021)

1.2. Lobüler Karsinomalar

- **Lobüler Karsinoma in Situ (LCIS):** Meme lobüllerinin epitel hücrelerinden kaynaklanan ve invazyon göstermeyen bir neoplazmdır. LCIS hücreleri bol sitoplazma ve büyük nükleusa sahiptir (Wen ve Brogi, 2017). LCIS genellikle mamografi sırasında tesadüfen saptanır, çünkü çoğu zaman herhangi bir fiziksel semptoma veya kitleye neden olmaz. Bu durum, genellikle kansere dönüşme potansiyeli düşük olarak değerlendirilir; ancak, her iki memede de invaziv meme kanseri gelişme riskini artırdığı için önemli bir risk göstergesi olarak kabul edilir. (Li ve ark., 2003; Fisher ve ark., 2004) (Şekil 2.12.).
- **İnvaziv Lobüler Karsinom (ILC):** Meme lobüllerinin hücrelerinden kaynaklanan ve stromaya invazyon gösteren ikinci en yaygın invaziv meme kanseri türüdür. ILC, tüm meme kanserlerinin yaklaşık %10-15'ini oluşturur ve sıklıkla diffüz bir büyüme paterni sergiler, bu durum mamografide tespitini zorlaştırabilir. Klinik belirtileri IDC'den farklı olarak daha belirsiz olabilir; meme hacminde asimetri, ciltte kalınlaşma veya çekilme gibi semptomlarla kendini gösterebilir. Moleküler düzeyde genellikle östrojen ve progesteron reseptör pozitifliği gösterirken HER2-negatif olma eğilimindedir. Tedavi seçenekleri IDC ile benzerdir, ancak hastalığın kendine özgü biyolojisi nedeniyle yönetiminde farklılıklar olabilir (Batra ve ark., 2023) (Şekil 2.13.)



Şekil 2.12. LCIS histolojik görünümü (Oluyemi ve ark., 2021)

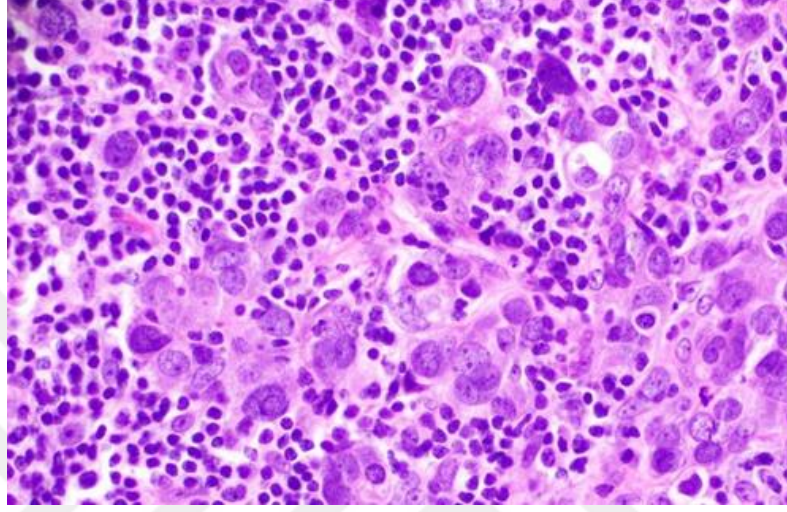


Şekil 2.13. ILC histolojik görünümü (Oluyemi ve ark., 2021)

Medüller Karsinoma

Medüller karsinoma, meme kanserlerinin nadir bir alt tipi olup, genellikle iyi sınırlı, yumuşak ve kistik yapısıyla ayırt edilir. Bu tür, lenfosit infiltrasyonu nedeniyle immünohistokimyasal olarak belirgin bir inflamatuvar yanıt gösterir, tüm vakaların yaklaşık %5'ini kapsar. Östrojen ve progesteron reseptörleri ile HER2 negatiftir (Limaiem ve Mlika, 2022). Daha çok BRCA1 mutasyonu taşıyan kadınlarda görülür ve agresif histolojik özelliklerine rağmen, prognozu genellikle daha olumludur. Medüller karsinoma

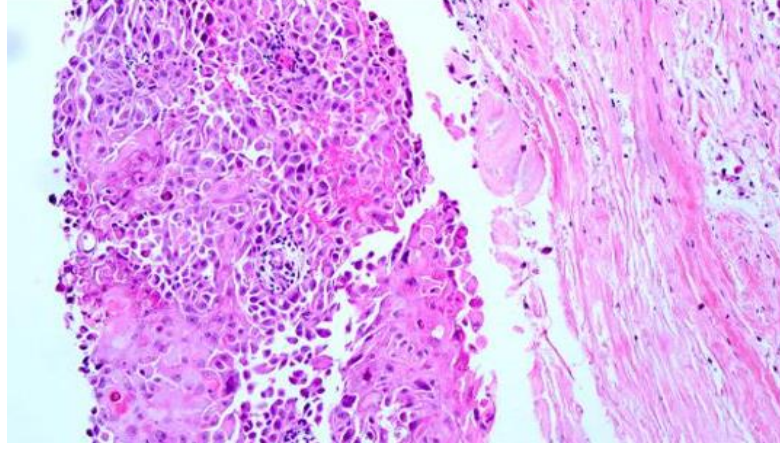
genellikle hormonal tedavilere yanıt vermez, ancak kemoterapiye duyarlı olabilir (Geyer ve ark., 2009) (Şekil 2.14.)



Şekil 2.14. Medüller karsinom histolojik görünümü (Zhang, 2021)

Metaplastik Karsinoma

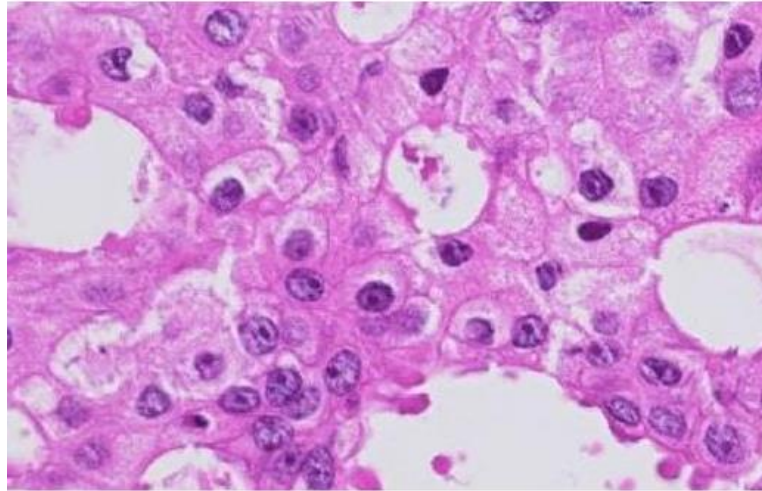
Metaplastik meme kanseri, kanserli hücrelerin glandüler veya epitel dokular yerine skuamöz hücrelere veya mezenkimal yapılara dönüştüğü nadir bir alt tiptir , tüm vakaların yaklaşık %1'ini kapsar . Genellikle triple-negatif özellik taşır ve agresif bir seyir gösterir. ER HER2 negatiftir (Zangouri ve ark., 2018) .Kemoterapiye yanıtı sınırlıdır ve prognozu diğer meme kanserlerine kıyasla daha kötüdür. Metaplastik karsinoma, biyolojik heterojenliği nedeniyle tedavi için yeni hedefler üzerinde çalışmaların devam ettiği bir alandır (Rakha ve ark., 2011; Weigelt ve ark., 2014) (Şekil 2.15.).



Şekil 2.15. Metaplastik karsinomanın histolojik görünümü (Zhang, 2021)

Apokrin Karsinoma

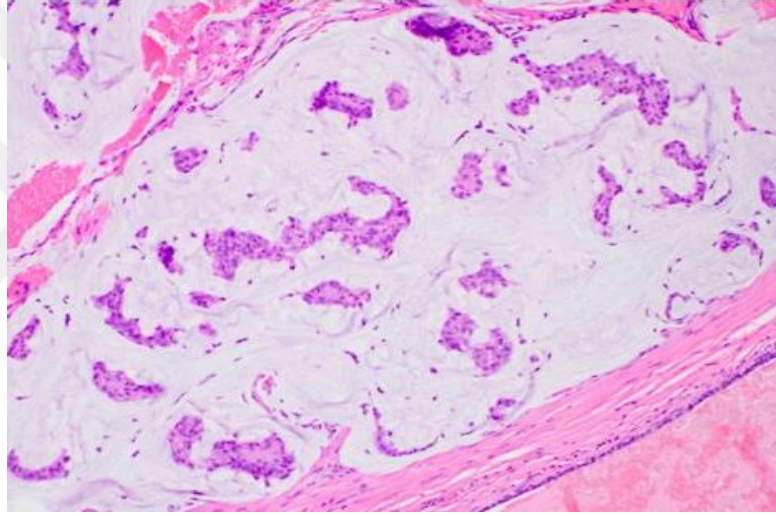
Apokrin karsinoma, meme kanserlerinin nadir bir histolojik alt tipi olup, apokrin bezlerine benzeyen büyük, eozinofilik hücrelerle karakterizedir. Bu tip karsinoma tüm vakaların yaklaşık %1 ila %4 'ünü oluşturur. Klinik olarak yavaş seyirli bir tümör tipidir ve prognozu genellikle olumludur. İmmünohistokimyasal belirteçler, bu tümörlerin doğru teşhisinde kilit rol oynar (Celis ve ark.,2009). ER ve PR negatiftir (Vranic ve ark., 2017). (Şekil 2.16.)



Şekil 2.16. Apokrin karsinoma histolojik görünümü (Kito ve ark., 2014)

Müsinöz Karsinoma

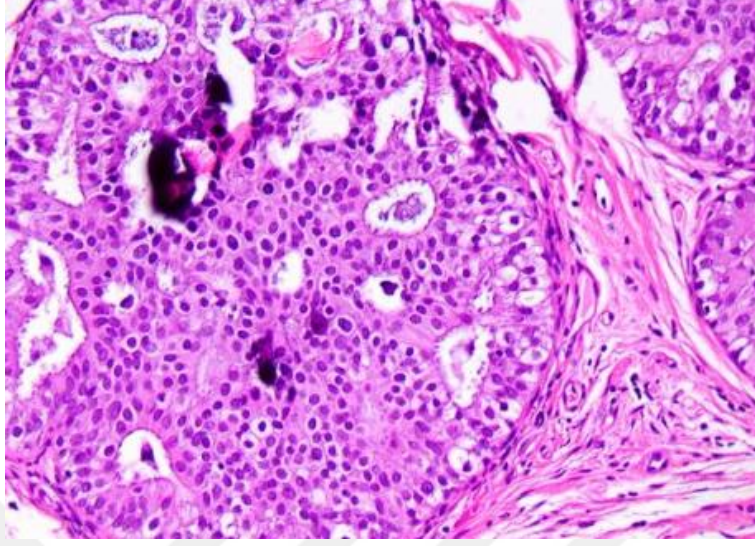
Müsinöz (kolloid) karsinoma, müsin salgısı ile çevrili tümör hücrelerinden oluşan nadir bir meme kanseri alt tipidir. Tüm vakaların %2'sini kapsar. Genellikle yaşlı kadınlarda görülür ve iyi diferansiye bir histolojiye sahiptir. Prognozu genellikle diğer invaziv meme kanseri türlerine kıyasla daha iyidir. Hormonal tedaviye yanıt verme oranı yüksektir ve metastaz yapma olasılığı düşüktür. ER ve PR pozitifir, HER2 bakımından negatifir (Di Saverio ve ark., 2008; Lakhani ve ark., 2012) (Şekil 2.17.).



Şekil 2.17. Müsinöz karsinoma histolojik görünümü (Laboy ve Siziopikou, 2022)

Kribriform Karsinoma

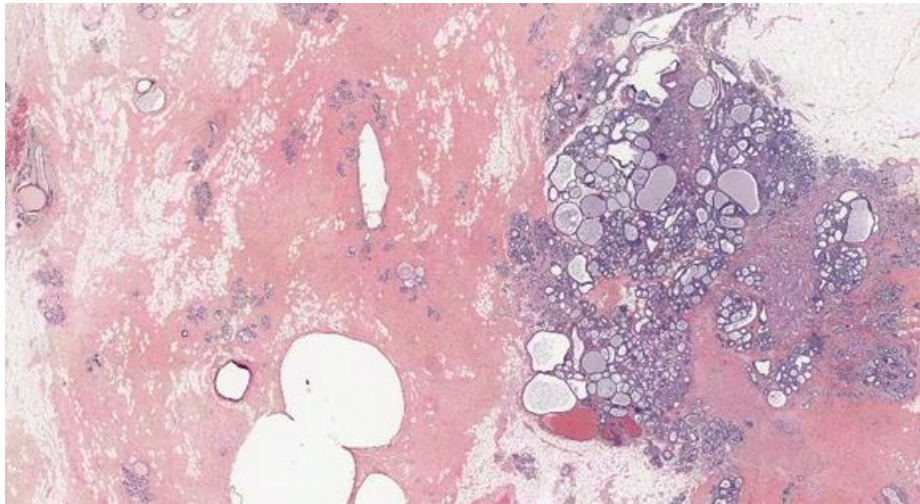
Kribriform karsinoma, meme kanserlerinin düşük dereceli bir alt tipi olup, düzenli ve boşluk içeren yapılar oluşturan hücre kümeleri ile karakterizedir. Prognozu genellikle çok iyidir ve hormonal tedavilere yüksek oranda yanıt verir. Çoğunlukla diğer düşük dereceli meme kanserleriyle birlikte görülür ve nadiren metastaz yapar. Genellikle yaklaşık 50 yaş ve üzeri kişilerde görülür tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %1 ila %3,5'ini oluşturan iyi bir prognoz ile ilişkili özel bir alt tiptir. ER PR ve HER2 pozitifir (Rakha ve ark., 2008) (Şekil 2.18.).



Şekil 2.18. Kribriform karsinoma histolojik görünümü (Tozbikian, 2022)

Tübüler Karsinoma

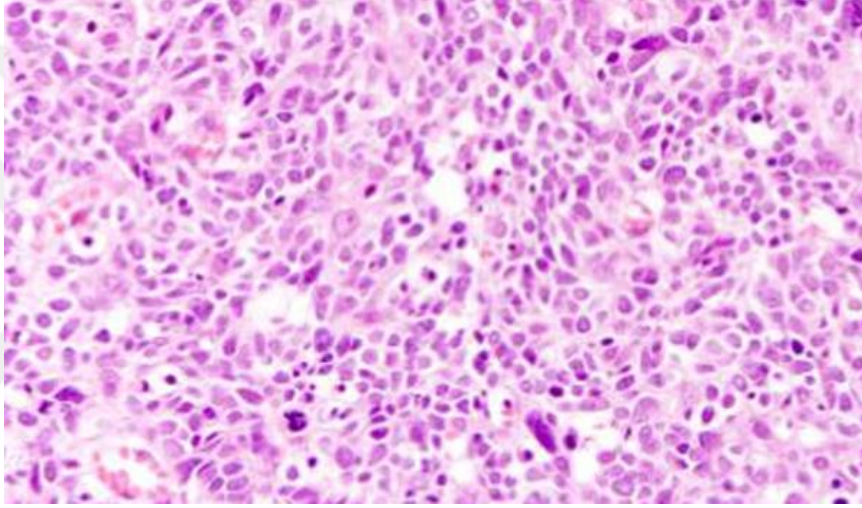
Tübüler karsinoma, meme kanserlerinin nadir bir alt tipi olup, iyi organize olmuş ve tübüler yapılar oluşturan hücrelerden oluşur, ve vakaların yaklaşık %2'sini kapsamaktadır. Prognozu çok iyidir ve hormonal tedavilere yüksek oranda yanıt verir. Genellikle lenf nodu metastazı yapmaz ve düşük dereceli bir tümör olarak sınıflandırılır, ER pozitifdir. Genç kadınlarda daha sık görülür ve erken tanı ile tamamen tedavi edilebilir (Tavassoli ve Devilee., 2003) (Şekil 2.19.).



Şekil 2.19. Tübüler karsinoma histolojik görünümü (Christgen ve ark., 2021)

Nöroendokrin Karsinoma

Nöroendokrin meme kanseri, nöroendokrin farklılaşma gösteren nadir bir meme kanseri alt tipidir, tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %0,5 ila %5'ini oluşturur. Bu tür, sinaptik veziküller ve nöroendokrin granüller içeren hücrelerle karakterizedir. Çoğunlukla, düşük veya orta dereceli nükleer dereceye sahiptir. ER, PR pozitif, HER2 negatiftir. Nöroendokrin belirteçlerin immünohistokimyasal analizi, teşhis için kritik öneme sahiptir (Reis-Filho ve ark., 2005) (Şekil 2.20.).



Şekil 2.20. Nöroendokrin karsinoma histolojik görünümü (Li ve Tse, 2022)

2. Moleküler Sınıflandırma

Moleküler sınıflandırma, tümörün genetik ve proteomik özelliklerine göre, gen ekspresyon profili çalışmalarına dayanarak, meme kanseri tiplerinin dört moleküler alt tipe ayrılabilceği ileri belirtilmiştir. Bunlar, Luminal A, Luminal B, HER2 eksprese eden (HER2 +) ve Üçlü Negatif meme kanseridir (Tablo 2.1.). Esas olarak bu sınıflandırma ER, PR ve HER2 ekspresyonlarına dayanmaktadır (Cho, 2016). ER, PR, ve HER2 ekspresyonlarına ek olarak hücresel çoğalma ile ilişkili bir nükleer protein olan Ki-67 ekspresyonuna da bakılır.

Tablo 2.1. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tipleri

	ER	PR	HER2	Görölme sıklığı
Luminal A	+	+	-	%40-50
Luminal B	+	+/-	+/-	%20-30
HER2	-	-	+	%15-20
Üçlü Negatif	-	-	-	%10-20

2.1. Luminal Tip A

Bu alt tipte, ER transkripsiyon faktörleri, ekspresyonu, meme kanallarını kaplayan lümen epiteli için karakteristik olan genleri aktive eder (Prat ve ark.,2013). Östrojen ve progesteron reseptörleri (ER, PR) pozitif ve HER2 negatiftir. Aynı zamanda Luminal Tip A düşük proliferasyon göstergeleri (Ki-67) ile karakterizedir. Bu tip , tüm meme kanseri vakalarının %40 ila %50'sini kapsar. Pek çok luminal-A tümörü, tamoksifen gibi endokrin tedavilere yüksek oranda yanıt verse de, önemli bir kısmı kazanılmış ilaç direncine sahiptir (Poudel ve ark., 2019).

2.2. Luminal Tip B

Luminal B tümörleri daha yüksek derecelidir ve daha kötü prognoza sahiptir. ER pozitifler ve PR veya HER2 hem pozitif hem de negatif olabilirler. HER2 pozitif ise ER ve PR'de pozitif, HER2 negatif ise ER pozitif, PR negatiftir (Feng ve ark.,2018). Luminal B tümörleri, luminal A'dan farklı olarak, sıklıkla p53 mutasyonu ile ilişkilendirilir (Tang, 2015). 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. Luminal B hastalarında, HER2+ alt grubu, HER2- alt grubuna göre daha yüksek oranda kemik metastazına 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 ve ark, 2013). Luminal Tip B meme kanseri vakalarının yaklaşık %20 ila %30'u kapsarlar.

2.3. HER2 Pozitif

HER2 pozitif meme kanseri, HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) geninin amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonuyla karakterize edilir. Bu durum, hücre proliferasyonunun kontrolsüz bir şekilde artmasına neden olarak agresif bir hastalık seyrine yol açar. HER2 pozitif tümörler genellikle daha hızlı büyür ve metastaz yapma olasılığı daha yüksektir. Bu kanser türü, meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'sini oluşturur. HER2 pozitif meme kanseri, trastuzumab, pertuzumab ve T-DM1 gibi HER2 hedefli ajanlara duyarlıdır ve sağkalımı önemli ölçüde artırmıştır (Baselga ve ark., 2012). 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, primer tümörün ve ardından metastazlara neden olan uzak lezyonların proliferasyonunu ve hayatta kalmasını arttırmada rol oynar (Freudenberg ve ark., 2009).

2.4. Triple-Negatif (Bazal Tip)

Triple-negatif meme kanseri (TNBC), östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve HER2 ekspresyonunun görülmediği alt gruptur. Meme kanserlerinin yaklaşık %15'ini oluşturur ve genellikle genç yaştaki hastalarda daha sık görülür. Bu alt tip, agresif bir klinik seyir ile karakterizedir ve yüksek tekrarlama oranlarına sahiptir. Tedavi seçenekleri sınırlıdır; hormonal veya HER2 hedefli tedavilere yanıt vermez. Standart tedavi çoğunlukla kemoterapiye dayanır, ancak immünoterapi ve PARP inhibitörleri gibi yeni yaklaşımlar umut vaat etmektedir. Prognoz genellikle diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha düşüktür, bu nedenle erken teşhis ve etkili tedavi stratejileri hayati önem taşır (Dent ve ark., 2007; Foulkes ve ark., 2010).

2.2.4. Meme Kanseri Tanısında Kullanılan Yöntemler

Meme kanseri vakalarının görülme sıklığının ve kansere bağlı ölümlerin azaltılmasında, erken teşhisi hedefleyen tarama programları ile tanı testlerinin uygulanması oldukça önemlidir. Amerikan Radyoloji Koleji (ACR), ortalama risk grubundaki tüm kadınların 40 yaşından itibaren düzenli olarak meme kanseri taramasından geçmesini tavsiye etmektedir. Günümüzde meme kanserinde tarama ve tanı amaçlı olarak genellikle mamografi, ultrason ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi teknikler kullanılmaktadır.

Mamografi, meme kanseri taramasında en yaygın olarak kullanılan bir testtir. Yüksek risk grubundaki bireylerde, mamografi ile birlikte manyetik rezonans görüntüleme kullanımı, kanseri daha erken aşamalarda tespit etme şansını artırabilir. Ancak, meme MRI'ı bazı durumlarda yanlış/ pozitif sonuçlar verebilmekte ve kanserli olmayan dokuların yanlışlıkla kanser olarak değerlendirilmesine yol açabilmektedir (Jones ve ark., 2020). Mamografik tarama sonuçları şüpheli bulunan hastalarda, tanı amaçlı mamografi, ultrasonografi, meme MRI ve biyopsi gibi farklı kombinasyonlar da uygulanabilmektedir. Ancak, kesin tanının konulabilmesi için biyopsiden alınan doku örneklerinin histopatolojik ve moleküler düzeyde incelenir (Autier ve Boniol, 2018; Duffy ve ark., 2020). Erken teşhis programlarının etkin bir şekilde hayata geçirilmesi, meme kanserine bağlı ölüm oranlarını düşürme potansiyeline sahip olup, toplum sağlığını büyük ölçüde iyileştirebilir.

Güncel çalışmalar, meme kanseri tarama programlarının etkinliğini bir kez daha gözler önüne sermektedir. Rim ve arkadaşlarının (2024) gerçekleştirdiği araştırmada, düzenli yapılan mamografik taramaların meme kanserine bağlı ölüm oranlarını azalttığı ve hastalığın daha erken evrelerde teşhis edilmesini sağladığı belirtilmiştir. Bu etkinin özellikle 40-49 yaş grubundaki kadınlarda belirgin olduğu ve yıllık taramaların mortaliteyi azaltmada daha faydalı olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, meme MR görüntülemelerinin yüksek risk grubundaki kadınlarda mamografi ile birlikte kullanıldığında, duyarlılığın arttığı ve invaziv kanserlerin erken tespitinde başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Rim ve ark., 2024). Ancak, MRI'nın yanlış pozitif sonuç

oranı hala önemli bir tartışma konusudur. Bu nedenle, görüntüleme testlerinin sonuçlarını doğrulamak için biyopsi ve histopatolojik inceleme gerekliliği ileri sürülmektedir.

1. Görüntüleme Yöntemleri

- Mamografi - Tarama programlarında yaygın olarak kullanılan bu yöntem, meme kanserinin tespitinde standart bir tarama aracı olarak kabul edilmektedir. Meme dokusunun X-ray görüntülerinde şüpheli bir kitle veya anormal doku değişiklikleri gözlemlenirse tanısal mamografi yapılır (American Cancer Society, 2023).
- Meme Ultrasonu - Ultrason, mamografide meme dokusunun yoğun olması nedeniyle görünmeyen anormallikleri değerlendirmek için kullanılır. Katı kitlelerin sıvı dolu kistlerden ayırt edilmesini sağlar (National Cancer Institute, 2023).
- Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI)- özellikle genetik risk taşıyan veya mamografide değerlendirilmesi zor olan durumlar için önerilir. Kontrast madde kullanılarak tümörlerin tespit edilmesinde yüksek hassasiyet sunar, ancak yanlış/pozitif sonuçlara neden olabileceği için genellikle diğer yöntemlerle birlikte kullanılır (Bhushan ve ark., 2021).

2. Moleküler ve Genetik Testler

- Hormonal Reseptör Durumu - Kanser hücrelerinin östrojen (ER) ve progesteron (PR) reseptörleri açısından pozitif olup olmadığı test edilir, hormon tedavilerine uygunluğu belirler (Harbeck ve ark., 2019).
- HER2 Testi - Kanser hücrelerinin HER2 gen amplifikasyonuna sahip olup olmadığı incelenerek, hedefe yönelik tedavi seçeneklerini belirlenir (Wolff ve ark., 2018).
- Genetik Testler - Genetik risk taşıyan bireyler için, BRCA1 ve BRCA2 gibi gen mutasyonları araştırılır. (National Comprehensive Cancer Network, 2023).

3. Biyopsi

Kesin tanı için gerekli yöntemlerden biri de biyopsidir. Biyopsinin bir kaç türü vardır . Bunlardan sıvı biyopsi, genomik ve proteomik verilerin elde edilmesinde periferik dolaşımdaki tümör hücrelerinin, tümör kaynaklı serbest DNA'nın (cfDNA) ve/veya eksozomların tespit edilmesi ve izole edilmesine dayanır. Minimal invaziv bir yöntem olarak, yüksek özgüllükle verilerin elde edilmesini sağlar ve tek bir kan örneği kullanılarak sağlam, tekrarlanabilir analizlerin yapılmasına imkan tanır. Bu yöntem, özellikle erken teşhis, tedavi yanıtının izlenmesi ve hastalığın nüks riskinin değerlendirilmesinde değerli bir araç olarak öne çıkmaktadır (Palmirotta ve ark., 2018). İğne Biyopsisinde, ince veya kalın bir iğneyle doku örneği alınırken cerrahi biyopsi, şüpheli bölgenin tamamının veya bir kısmının cerrahi işlemle çıkarılmasıdır. Vakum Destekli Biyopsi ise, daha büyük doku örnekleri almak için cihaz yardımıyla gerçekleştirilir (Duffy ve ark., 2020).

2.2.5. Meme Kanseri Evreleri

Meme kanseri evrelemesi, yukarıda belirtilen tanı yöntemleri kullanılarak, kanserin ne kadar yayıldığını ve hastalığın genel durumunu değerlendirmek amacıyla yapılır. Meme kanseri evrelemesinde, genellikle Amerikan Kanseri Derneği (AJCC) tarafından belirlenen sistem kullanılır. AJCC Evreleme Kılavuzu'nun, klinik ve patolojik sonuçlarına dayanarak primer tümör boyutu (T), lenf nod tutulumu (N) ile metastazı (M) değerlendiren ve TNM ile gösterilen evreleme yöntemi kullanılmaktadır (Zhu ve Doğan, 2021).

Primer tümörün klinik evrelendirilmesi, fiziksel muayene ve görüntüleme yöntemleri aracılığıyla tümör boyutunun değerlendirilmesiyle gerçekleştirilir. Bu süreçte TNM sistemi temel alınarak tümör boyutu T0'dan başlayarak, sırasıyla Tis, T1, T2, T3 ve T4 seviyelerine kadar kategorilere ayrılır (Tablo 2.2.) (Sawaki ve ark., 2019).

T0: Memede kanser varlığına dair herhangi bir bulguya rastlanmamasıdır (Veronesi ve ark., 2009).

Tis: Bu evre, "in situ" karsinomu ifade eder ve kanserin meme dokusundaki kanallarla sınırlı olduğu, çevre dokulara yayılmadığı anlamına gelir. Tis kategorisi iki alt tipe ayrılır: Tis (DCIS) ve Tis (Paget).

Tis (DCIS): İnvaziv olmayan bir kanserdir ancak, uygun şekilde tedavi edilmezse invaziv meme kanserine dönüşme potansiyeli taşır.

Tis (Paget): Yalnızca meme başı cilt hücrelerinde görülen nadir ve erken bir kanser türüdür. Paget hastalığı, bazı durumlarda invaziv meme kanseri ile birlikte bulunabilir. Eğer invaziv bir tümör mevcutsa, tümörün evresi bu invaziv komponentin özelliklerine göre belirlenir (Park ve ark.,2011).

Tablo 2.2. TNM sisteminde tümör boyutlarının değerlendirilmesi .

Tümör Evresi (T)	
T0	Memede kanser bulgusuna rastlanmaz
Tis	In situ karsinoma
T1	Tümör 2 cm'den küçük.
T2	Tümör 2 cm ile 5 cm arasında.
T3	Tümör 5 cm'den büyük.
T4	Tümör, meme dışındaki dokulara (göğüs duvarı, cilt vb.) yayılmıştır.

T4 de kendi içerisinde bazı alt kategorilere ayrılır.:

T4a: Tümör, göğüs duvarına (kemik veya kaslar dahil) invazyon göstermiştir.

T4b: Ciltte ülserasyon veya nodül oluşumu gibi değişikliklere neden olmuştur.

T4c: Hem göğüs duvarına hem de cilde yayılmıştır.

T4d ise: İnflamatuvar meme kanserini ifade eder.

TNM evreleme sisteminde "N" kategorisi, kanserin ne kadar yayılmış olduğunu ve hangi lenf düğümlerini yani nodlarının etkilendiğini ortaya koyar. (American Joint Committee on Cancer, 2017). N evrelemesi, kanserin yayılımının prognostik bir göstergesi olarak kabul edilmekte olup, lenf nodunda tümör yapılarının varlığı ve sayısını verirken, tedavi planlamasında ve hasta takibinde önemli bir rol oynamaktadır. N kategorisi, etkilenen lenf nodu sayısına göre T0'dan T3'e kadar değişkenlik gösterir. Örneğin, N1 evresi, 1-3 adet bölgesel lenf nodunda tümör kitlesini gösterirken, N3 evresi daha fazla saydaki lenf nodundaki tümör kitlesinin bulunduğunu ifade eder ve kanserin yayılma derecesini yansıtarak hastanın tedavi sürecine yön verir (Singletary ve ark., 2002) (Tablo 2.3.).

Tablo 2.3. TNM sisteminde lenf nodlarının değerlendirilmesi.

N Evresi	
N0	Hiçbir lenf nodunda tümör hücresi/kitlesi yoktur.
N1	Kanser, aynı tarafta bulunan küçük (1-3) aksiller lenf nodlarına yayılmıştır.
N2	Kanser, aynı tarafta 4-9 aksiller lenf noduna yayılmıştır veya aksiller lenf nodları birleşmiştir.
N3	Kanser, aynı tarafta 10 veya daha fazla aksiller lenf noduna yayılmıştır; meme veya supraclavicular lenf nodlarına yani, köprücük kemiğinin üstündeki ve altındaki lenf nodlarına yayılmıştır.

TNM sistemindeki "M", kanserin vücudun diğer uzak bölgelerine/organlarına metastaz yapıp yapmadığını belirleyen bir kriterdir. Bu evreleme, kanserin yayılma derecesini gösterir ve tümörün tedavi edilebilirliğini, prognozunu ve tedavi seçeneklerini etkileyen önemli faktördür (Tablo 2.4.) (Sobin ve Gospodarowicz, 2010).

Tablo 2.4. TNM sisteminde metastazın değerlendirilmesi. M0, 0 i+, 1 açılımları

M Evresi	
M0	Kanserin uzak organlara veya dokulara metastazı yoktur.
M1	Kanserin uzak organlara veya dokulara metastaz yaptığı tespit edilmiştir. Kemik, akciğer, karaciğer gibi organlarda büyüyen mikro veya makro boyutta kanser hücrelerine ait odaklar görülür.

Meme kanserinin evrelendirilmesinde, TNM sistemine göre değerlendirmesi yapılır ve ER/PR ve HER2 sonuçları da dikkate alınarak, kanserin evresi belirlenir (Tablo 2.5.). Evreleme, kanserin yayılım düzeyine göre erken, lokal ileri veya metastatik olarak ayrılmasına da olanak sağlar. Bu süreç, hastalığın biyolojik özellikleri ve tedavi stratejileri için temel bir yol haritası sunar (Cardoso., 2023).

Tablo 2.5. Meme kanseri evrelendirilmesi

Evre	
Evre 0 (Tis)	Kanser in situ durumundadır. Meme dokusunun kanallarında veya lobüllerinde sınırlı kalmıştır, çevre dokulara invazyon yapmamıştır. Örnek: DCIS veya LCIS.
Evre I	Tümör küçük (≤ 2 cm) ve lenf nodu tutulumu yoktur (T1, N0, M0). Kanser memenin dışına yayılmamıştır.
Evre II	- Evre IIA: Tümör 2-5 cm arasında olabilir (T2, N0, M0) veya lenf nodlarında tutulum görülebilir (T1, N1, M0). - Evre IIB: Tümör 2-5 cm arasında ve lenf nodlarına yayılmış olabilir (T2, N1, M0) ya da tümör 5 cm’den büyüktür (T3, N0, M0).
Evre III	- Evre IIIA: Tümör 5 cm’den büyük olabilir veya lenf nodlarında geniş tutulum vardır (T3, N1-2, M0). - Evre IIIB: Kanser meme cildine, göğüs duvarına invazyon yapmıştır (T4, herhangi bir N, M0). - Evre IIIC: Çok sayıda lenf nodunda yayılım görülür (herhangi bir T, N3, M0).
Evre IV	Kanser, meme dışına yayılmış ve uzak organlara metastaz yapmıştır (herhangi bir T, herhangi bir N, M1). Bu evrede genellikle sistemik tedavi uygulanır.

Tabloda verilen Evre 0 ve Evre I beş yıllık süreçte %100 sağ kalıma sahip iken, daha sonraki evrelerde sağ kalım oranları azalmaya başlar ve Evre IV deki hastalar beş yıllık süreçte %22 lik bir sağ kalım gösterirler (Weiss ve ark., 2017; American Cancer Society, 2023).

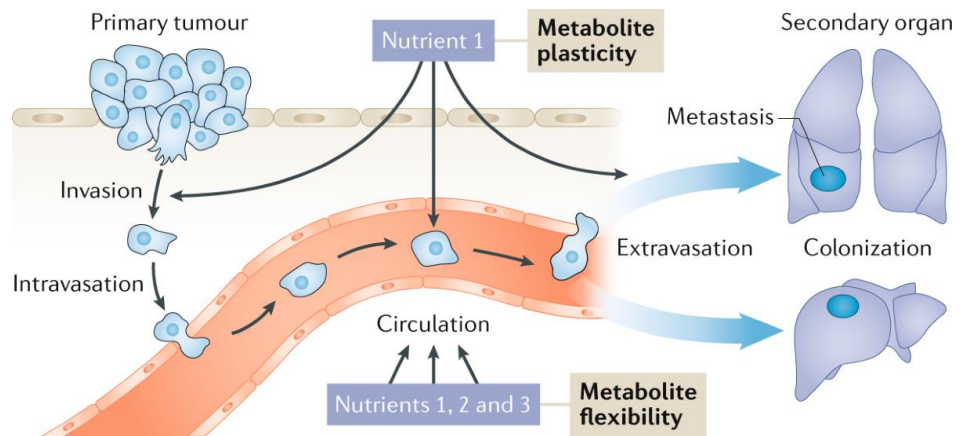
2.3. Metastaz ve Kanser İlişkisi

Metastaz, kanser hücrelerinin primer tümörden ayrılarak kan dolaşımı veya lenfatik sistem aracılığıyla uzak organlara yayılmasıyla karakterize edilen çok aşamalı bir süreçtir (Lambert ve ark., 2017). Bu metastatik süreç, kanserle ilişkili mortalitenin de başlıca nedenlerinden biridir (Chaffer ve Weinberg, 2011). Metastatik yayılım; invazyon,

intravazasyon, dolaşımda hayatta kalma, ekstrasvazasyon ve koloni oluşturma gibi ardışık biyolojik basamakları içerir (Şekil 2.21.) (Valastyan ve Weinberg, 2011). Aynı zamanda da kanserden kaynaklanan mortalitenin temel sebebini oluşturur. Yapılan çalışmalar, kanser sebepli mortalitenin %90'ını metastazlardan kaynaklandığını ortaya koymuştur (Djamgoz ve Onkal 2013; Fairhurst ve ark., 2015; Koltai 2015; Bugan ve ark.,2019).

Metastaz sürecinde epitel-mezenkimal geçişin (EMT) rolü literatürde sıklıkla vurgulanmaktadır. EMT, epitel hücrelerinin mezenkimal fenotipe geçerek hareket ve invazyon kabiliyeti kazanmasını sağlar (Nieto ve ark., 2016). Ayrıca bu durumun, hücre dışı matriks ile olan etkileşimleri kolaylaştırdığı ve bağışıklık sisteminden kaçışı da desteklediği bilinmektedir (Dongre ve Weinberg, 2019).

Tümör mikroçevresi (TME), metastazın gelişiminde merkezi bir rol oynar. Fibroblastlar, makrofajlar, bağışıklık hücreleri ve stromal bileşenlerden oluşan bu yapı, tümör hücrelerinin invazif ve migrasyonel özelliklerini artıran sinyaller üretir (Wu ve ark., 2020). Hipoksi gibi mikroçevresel stresler de hücreleri daha agresif ve tedaviye dirençli hale getirebilir (Bhandari ve ark., 2020). Genetik ve epigenetik değişiklikler metastatik potansiyelin belirlenmesinde önemli rol oynar. BRCA1/2 mutasyonları, metastatik yatkınlıkla ilişkilendirilmiş olup hedefe yönelik tedavi seçeneklerini şekillendirmektedir (Waks ve Winer, 2019).



Şekil 2.21. Metastaz süreci (Lambert, Pattabiraman ve Weinberg, 2021)

Metastazın önlenmesi veya hedeflenmesi, güncel kanser tedavi stratejilerinin merkezinde yer almaktadır. İmmünoterapiler, anti-anjiyogenik tedaviler ve spesifik sinyal yollarını hedefleyen ilaçlar, metastatik tümörler için umut vericidir (Chen ve ark., 2021). Bununla birlikte, kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımları, hastaların moleküler profiline dayalı olarak daha etkili stratejileri geliştirilmesini sağlamaktadır (Gonzalez ve ark., 2023).

Sonuç olarak, metastaz çok boyutlu bir biyolojik süreç olup, kanserin seyrini ve bireyin sağkalımını doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle metastatik mekanizmaların detaylı anlaşılması, hem tanı hem de tedavi açısından büyük önem taşımaktadır (Massague ve Obenauf, 2016).

Dünyada kadınlar arasında en sık teşhis edilen malignitelerden olan meme kanseri metastazı, bu hastalığın seyrini ve prognozunu belirleyen kritik bir faktördür. Son beş yıl içinde yapılan çeşitli çalışmalar, meme kanseri metastazının mekanizmaları ve tedavisi üzerine önemli bulgular sunmuştur:

Moleküler mekanizmalar arasında voltaj bağımlı sodyum kanalları (VGSC), özellikle de bunların alt birimi olan meme ve kolon kanserinde Nav1.5, prostat ve akciğer kanserinde Nav1.7 kanserin metastatik yayılımındaki rolleri açısından araştırılması son yıllarda yoğunluk kazanmıştır (Fraser ve ark., 2005, Brackenburry ve ark., 2007, Roger ve ark., 2007 Gillet ve ark., 2009, Hernandez-Plata ve ark.,2012, Fraser ve ark., 2017, Bagan ve ark., 2019, Djamgoz ve ark., 2019, Guzel ve ark., 2019, Rızaner ve ark., 2020, Lastraioli ve ark., 2021, Pukkanasut ve ark., 2024, Rızaner ve ark., 2024).

Literatürde VGSC'lerin metastatik kanser hücrelerinde daha yüksek oranda eksprese edildiğini ortayan koyan ilk çalışma Dunning model sıçan prostat kanserinde yapılmıştır. Yüksek metastatik Dunning model Mat-Ly-Lu hücrelerinde sodyum akımı görülmesine karşın, zayıf metastatik AT-2 hücrelerinde akım tesbit edilememiştir. Bu sodyum akımının tetrodotoxin (TTX) ile bloke edilmesi sonucu, AT-2 hücrelerinde herhangi bir etki gözlemlenmezken Mat-Ly-Lu hücrelerinin invazivliğinin azaldığı saptanmış ve VGSC ekspresyonunun prostat kanseri hücrelerinin invazyonunda dolayısıyla, metastazında önemli bir role sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Grimes ve ark., 1995; Laniado v.d., 1997). Prostat kanserinde elde edilen veriler bu alanın diğer kanserlerde de

araştırılmasını sağlamış ve benzer özellikleri nedeniyle, meme kanseri üzerinde de pek çok çalışma yapılmıştır. Roger ve arkadaşları (2003) yüksek metastatik meme kanseri hücreleri MDA-MB-231 hücrelerinde hızlı içe doğru sodyum akımı bulunduğunu zayıf metastatik MCF-7 ve MDA-MB-468 hücrelerinde ise olmadığını ilk kez bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada MDA-MB-231 hücrelerinin TTX'e dirençli fonksiyonel VGSC ifade ettiği ve bunun VGSC'nin alt birimi Nav 1.5 olduğu, bu yolla taşınan Na⁺ akımının invazyonu güçlendirdiği saptanmış ve VGSC'nin metastatik potansiyel ile ilişkisi ortaya konmuştur (Fraser ve ark., 2005).

Brisson ve arkadaşları (2011), invaziv meme kanseri hücrelerinde Nav1.5'in aşırı ekspresyonunun, NHE1 ile etkileşerek hücre dışı matriksin asitleşmesine yol açtığını; bu durumun ise tümör hücrelerinin invazyon kapasitesini artırarak metastazı kolaylaştırdığını göstermiştir. Bu bulgular, metastazın mikroçevresel ortam koşullarına bağlı olarak şekillendiğini destekler niteliktedir. Benzer şekilde Driffort ve arkadaşları (2014), Nav1.5 kanalının ranolazin ile farmakolojik olarak inhibe edilmesinin, meme kanseri hücrelerinin invazyonunu ve akciğere metastazını belirgin düzeyde azalttığını ortaya koymuştur. Wang ve ekibi (2023) ise triple negatif meme kanseri hücrelerinde SCN5A geninin aşırı ekspresyonunun, EF2K sinyal yolu üzerinden proliferasyon ve metastatik potansiyeli artırdığını raporlamıştır.

Nav1.5'in metastatik süreçlerdeki benzer rolleri farklı kanser türlerinde de gösterilmiştir. Örneğin, Roger ve arkadaşları (2011), kolorektal kanser hücrelerinde SCN5A geninin artmış ekspresyonunun, hücrelerin invaziv özelliklerini güçlendirdiğini ve bu durumun uzak organlara metastaz eğilimini artırdığını bildirmiştir. Over kanseri üzerine yapılan çalışmalarda ise Zhou ve arkadaşları (2018), Nav1.5'in yüksek düzeyde ekspresyonunun tümör hücrelerinin invazyon kapasitesini artırdığını ve eikosapentaenoik asit (EPA) ile bu kanalın inhibe edilmesinin, hücre göçü ve proliferasyonu gibi metastazla ilişkili davranışları anlamlı şekilde baskıladığını göstermiştir. Küçük hücreli akciğer kanserine (SCLC) yönelik bir çalışmada, Nav1.5'in dahil olduğu VGSC ailesi üyelerinin yüksek düzeyde ekspresyon gösterdiği; bu durumun ise tümör hücrelerinde endositoz kapasitesini artırarak metastatik potansiyeli yükselttiği belirtilmiştir (Liu ve ark., 2019). Tüm bu bulgular, Nav1.5 sodyum kanalının farklı solid tümörlerde metastaz sürecine aktif olarak

katıldığını ve bu kanalın terapötik hedef olarak değerlendirilme potansiyelini vurgulamaktadır.

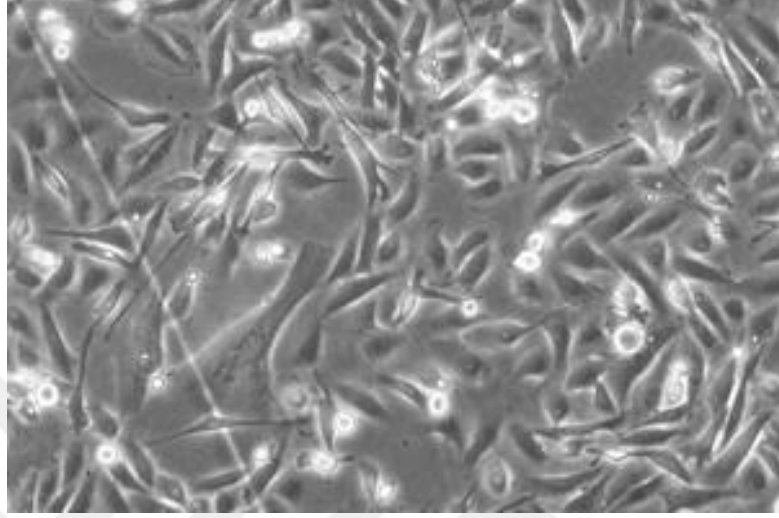
2.4. Deneysel TNBC meme kanseri hücresi MDA-MB-231

Meme kanseri, heterojen yapısı ve biyolojik çeşitliliği nedeniyle tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik in vitro çalışmalarda farklı hücre soylarının kullanılmasını gerekli kılmaktadır. Hücre soyları, hastalığın çeşitli moleküler alt tiplerini, invaziv özelliklerini ve tedaviye yanıt mekanizmalarını modellemek amacıyla araştırmalarda yaygın olarak tercih edilmektedir. Günümüzde hastalardan izole edilerek geliştirilen ve karakterize edilen çok sayıda hücre soyu bulunmaktadır. Bu hücre hatları, hem temel hem de translasyonel araştırmalar açısından kanser biyolojisini anlamada ve yeni terapötik hedeflerin belirlenmesinde kritik rol oynamaktadır (Holliday ve Speirs, 2011).

Meme kanseri araştırmalarında sık kullanılan hücre hatları arasında MCF-7, MCF-10A, T47D, BT-474, ZR-75-1, HCC serisi ve özellikle triple-negatif meme kanseri (TNBC) modellenmesinde yaygın kullanılan MDA-MB-231 hücre hattı yer almaktadır.

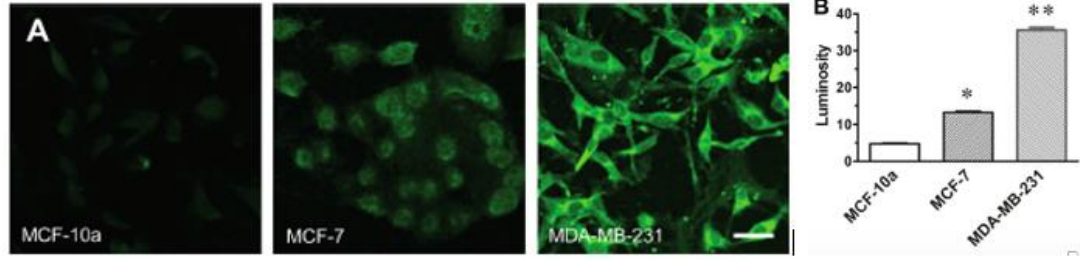
MDA-MB-231: Bu hücre hattı, 51 yaşında metastatik meme adenokarsinomu tanısı almış Kafkas kökenli bir kadın hastanın plevral efüzyonundan türetilmiş, insan meme kanseri hücre hattıdır. Bu hücreler, özellikle üçlü negatif meme kanseri (TNBC) çalışmaları için kullanılmakta ve invaziv, agresif, kötü diferansiye olmuş tümörlerin biyolojisini anlamada temel bir model oluşturmaktadır (Chavez ve ark., 2010). MDA-MB-231 hücreleri, ER, PR ekspresyonu bulunmayan ve yanı sıra HER2 amplifikasyonu da göstermeyen hücre hattıdır (Şekil 2.22.). Bu özellikleri nedeniyle, hücreler hormonal veya hedefe yönelik tedavilere yanıt vermezler. Bununla birlikte, hücreler claudin-düşük moleküler alt tipi için de sınıflandırılır ve bu alt tip, düşük claudin-3 ve claudin-4 ekspresyonu ile de karakterizedir. Hücreler ayrıca, epitel-mezenkimal geçiş (EMT) süreçlerini yansıtan yüksek hareketlilik, proteolitik enzim salınımı ve metastatik özellikler sergiler (Lehmann ve ark., 2011). MDA-MB-231 hücreleri, 3D kültür ortamlarında, endotelial benzeri morfolojiler sergiler ve CD44⁺ CD24⁻ fenotipi gösterir . Bu fenotip, hücrelerin kanser kök hücreleri (CSC) ile olan ilişkisini vurgular. Ayrıca, bu hücre hattı Ki-67 gibi

proliferasyon belirteçlerinin yüksek düzeyde ifadesi ve EMT belirteçlerinin baskın ekspresyonu ile dikkat çeker (Martin ve ark., 2013).



Şekil 2.22. Kültür ortamında MDA-MB-231 hücreleri.

Meme, prostat, kolon kanseri üzerindeki çalışmalar hücrelerin VGSC protein ekspresyonunun, metastatik özellik ile paralel artış gösterdiğini ortaya koymuştur. MDA-MB-231 hücrelerinde de Nav 1.5, 1.6 ve 1.7 kanalları bulunmasına karşın, hücrenin metastaza giden yoldaki hareketinde yoğunlukla, Nav 1.5 kanalları eksprese olurken, normal meme hücreleri MCF-10 da ise, VGSC ifadesi çok düşüktür veya hiç yoktur (Şekil 2.23.) (Brackenbury, 2007, Nelson ve ark., 2015, Fraser ve ark., 2005, Onkal ve Djamgoz, 2009, Gould ve ark., 2018, Bagan ve ark., 2019, Horne ve ark., 2021). MDA-MB-231 hücreleri, özellikle kemik metastazı yapma yetenekleri ile bilinir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, bu hücrelerin kemik mikroçevresine uyum sağlama ve orada büyüme potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, kemik metastazı biyolojisi ve anti-metastatik tedavi çalışmalarında sıklıkla kullanılır (Simmons ve ark., 2015).



Şekil 2.23. Normal (MCF-10a), düşük (MCF-7) ve yüksek metastatik (MDA-MB-231) meme kanseri hücrelerinde Nav 1.5 miktarı (Gould ve ark., 2018).

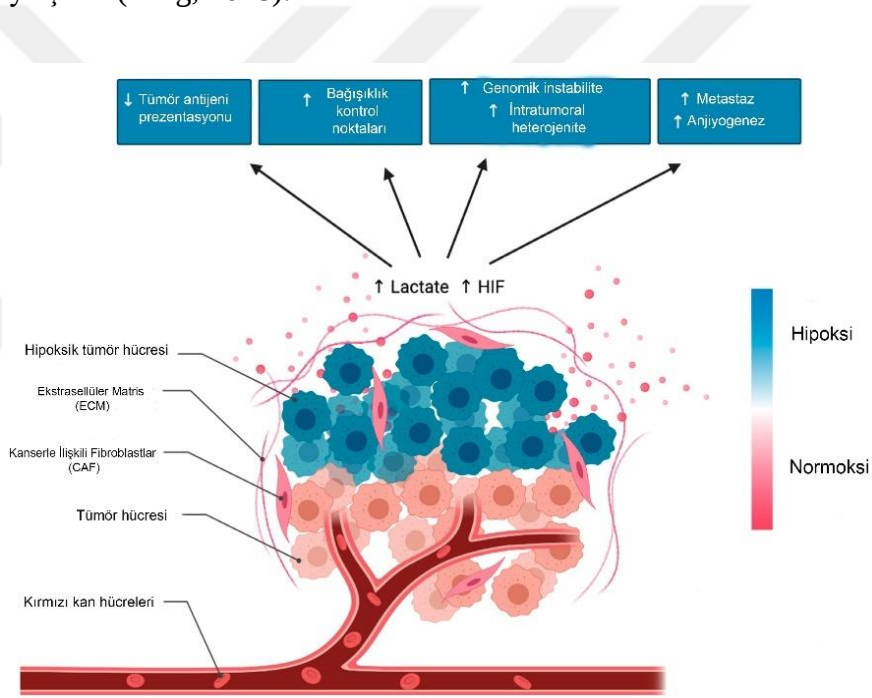
MDA-MB-231 hücre hattı, TNBC'nin tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlara olan direncin moleküler mekanizmalarını araştırmada da kullanılmaktadır. EGFR, Src kinaz, ve PI3K/AKT gibi sinyal yolları bu hücrelerde yoğun olarak incelenir. Ayrıca, potansiyel yeni ilaç adaylarının in vitro etkinliklerinin değerlendirilmesinde bu hücre hattı, değerli bir model sistem olarak önemli bir yere sahiptir (Feng ve ark., 2014). Bu hücre hattı, immünosupresif mikroçevre oluşumu ve T hücre aktivasyonunu baskılayan moleküler mekanizmaların anlaşılmasında kullanılmaktadır. Özellikle, MDA-MB-231 hücreleri, programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-L1) ekspresyonu ile immünoterapötik ajanların etkilerini değerlendirmeye olanak sağlar (Zhang ve ark., 2017).

2.5. Hipoksi ve Kanser İlişkisi

Tümör mikroçevresinin en önemli özelliklerinden biri olan hipoksi, oksijen seviyelerinin fizyolojik seviyenin altında olmasıdır. Hipoksi, genellikle, hızlı büyüyen tümörlerin artan metabolik ihtiyaçlarının, damar yapısının yetersizliği nedeniyle karşılanamaması sonucunda ortaya çıkar. Hipoksik bölgelerde, oksijenin dokuya difüzyonu kısıtlanır ve bu da hücresel fonksiyonları derinden etkileyen bir stres ortamı yaratır ve tedaviyi olumsuz etkiler. Tümörlerde gözlenen hipoksi olarak adlandırılan oksijen azalması, sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında ciddi derecede düşüktür ve %1-2 oranlarının altına kadar inebilir (Bhandari ve ark., 2020).

Bu oksijen yetersizliği durumu, hücresel adaptasyon mekanizmalarını tetikler ve başta Hipoksiyle İndüklenen Faktör 1 (HIF-1) olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörlerinin

aktivasyonunu sağlar. HIF-1, oksijen bağımlı degradasyon mekanizmasından kaçtığında stabil hale gelir ve hücre proliferasyonu, anjiyogenez, glikolitik aktivite ve invazyon gibi birçok süreci düzenleyen genlerin transkripsiyonunu başlatır. Bu durum, özellikle meme kanseri gibi hormon bağımlı kanserlerde tedaviye direnç gelişimi ve tümörlerin daha agresif formlara evrilmesiyle ilişkilidir. Özellikle meme kanseri bağlamında, hipoksiye yanıt olarak artan HIF-1 α ekspresyonu, östrojen reseptörlerinin azalmasıyla birlikte hormon tedavilerine olan duyarlılığın düşmesine neden olur (Şekil 2.24.). Ayrıca, HIF-1 α 'nın aktive ettiği genler, tümör hücrelerinin invazyon yeteneğini artırarak metastatik süreci kolaylaştırır (Ding, 2018).



Şekil 2.24. Hipoksiye bağlı olarak tümör mikroçevresindeki (TME) değişiklikler (Sergiyant ve ark., 2020)

Tümör hücrelerinin sadece genetik yapıları değil, aynı zamanda çevreleriyle olan etkileşimleri de kanserin ilerlemesinde etkin rol oynar. Tümör mikroçevresi; hipoksi, düşük ekstrasellüler pH ve artmış laktat düzeyleri gibi biyokimyasal değişkenlerle şekillenir. Hipoksik koşullar, hücrelerin oksijenden bağımsız enerji yollarına yönelmesine neden olurken, bu durum glikolizin artmasına ve laktat birikimine yol açar (Hirschhaeuser ve ark., 2011). Buna rağmen, kanser hücreleri hücre içi pH'ı yüksek seviyelerde tutarak proliferatif ve invaziv kapasitelerini artırır (Webb ve ark., 2011). Bu pH dengesinin

korunması, çeşitli iyon kanalları ve transport sistemlerinin yeniden programlanmasıyla mümkün olur (Prevarskaya ve ark., 2010).

İyon kanallarının bu süreçteki düzenleyici rolü giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Özellikle tümör hücrelerinde ekspresyonu artan bu kanallar, sadece hücre içi pH'ı değil, aynı zamanda kalsiyum sinyalizasyonu ve hücre göçünü de etkileyerek metastaz sürecinde kilit rol alırlar (Pedersen ve ark., 2017). Ayrıca, tümör vaskülarizasyonunun normalize edilmesiyle hipoksiye bağlı sinyal yollarının baskılanması ve metastatik potansiyelin azaltılmasının da mümkün olabileceği belirtilmektedir (Mazzone ve ark., 2009).

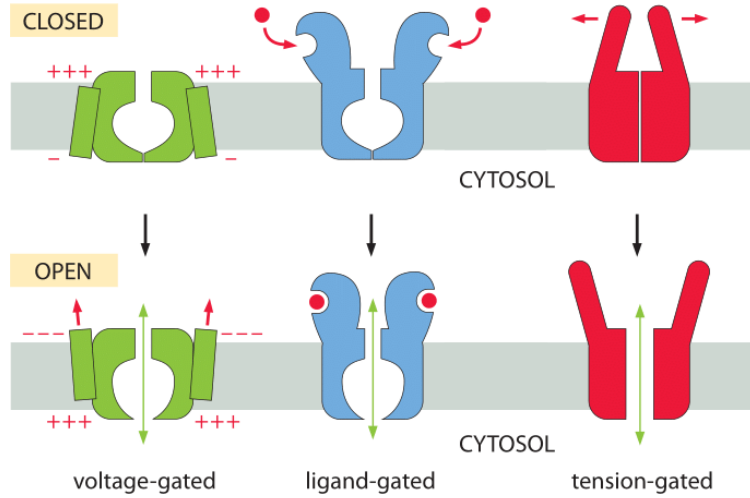
Yapılan araştırmalar, hipoksik koşulların, tümör hücrelerinin invazivlik ve metastatik potansiyelini artırdığı çalışmalarla doğrulanmıştır (Liu ve ark., 2024). Özellikle HIF-1 α aracılığıyla aktive olan sinyal yollarının, kanser hücrelerinin hayatta kalma, göç ve tedaviye direnç gibi temel süreçlerini kontrol ettiği ortaya konmuştur (Huang ve ark., 2024). Hipoksinin aynı zamanda bağışıklık yanıtını baskılayarak immün kaçışı kolaylaştırdığı Zhao ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (2024). Bu durum, hipoksik mikroçevrenin sadece hücresel değil, aynı zamanda immünolojik düzeyde de tümör progresyonunu desteklediğini göstermektedir.

Wang ve arkadaşları (2024), hipoksiye bağlı gen ekspresyonunun, tümör kök hücrelerini destekleyerek tedaviye karşı dirençli hücre havuzlarını büyüttüğüne dikkat çekmişlerdir. Hipoksinin metabolizmayı değiştirerek glikolitik akışı artırdığı ve tümör hücrelerinin enerji ihtiyaçlarını bu yolla karşıladığı bildirilmiştir (Liu ve ark., 2024). Bu mekanizma, özellikle radyoterapi ve kemoterapi gibi tedavilerin etkinliğini düşüren ana etkenlerden biri olarak değerlendirilmiştir. Hipoksinin doğrudan hedeflenmesinin hem sistemik hem de, lokal tedavilerle kombine edilmesinin etkili bir strateji olabileceği yönünde güçlü öneriler sunulmuştur.

Sonuç olarak, hipoksinin kanserdeki rolü artık sadece oksijen eksikliği olarak değil, tümör mikroçevresinin yeniden şekillendirilmesinde aktif bir faktör olarak ele alınması ve daha derinlemesine araştırılması gerektiği hipoksiyi hedef alan tedavi stratejilerinin yakın gelecekte kliniğe girme potansiyelinde olduğu ifade edilmektedir (Huang ve ark., 2024; Wang ve ark., 2024; Zhao ve ark., 2024).

2.6. İyon Kanalları

İyon kanalları, hücre zarında bulunan ve iyonların elektrokimyasal gradyanlarına göre geçişini sağlayan özel transmembran proteinlerdir. Bu kanallar, elektriksel uyarılar, membran potansiyelindeki değişiklikler, ligand bağlanması ya da mekanik kuvvetler gibi çeşitli uyarılara yanıt olarak konformasyon değiştirir ve açılıp kapanırlar (Şekil 2.25.) (Shen, 2017; Miyagi ve ark., 2019). Açılma-kapanma mekanizmalarına göre sınıflandırılan bu kanallar; voltaj kapılı, ligand kapılı, mekanik ya da termal duyarlı olmak üzere farklı gruplara ayrılmaktadır. Voltaj kapılı kanallar arasında potasyum (KV), sodyum (NaV) ve kalsiyum (CaV) kanalları yer alırken; ligand kapılı kanallara nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR) ve glutamat reseptörleri (GluR) örnek verilebilir. Ayrıca, mekanik kuvvetlere duyarlı bakteriyel büyük iletkenlikli mekanosensitif kanal (MscL) ile sıcaklık değişikliklerine yanıt veren termal kapılı TRP kanalları da bu çeşitliliği tamamlamaktadır. Bu alt tiplerin her biri, hücresel uyarıların algılanmasında ve hücre içi yanıtların düzenlenmesinde kritik rol üstlenmektedir.



Şekil 2.25. Açılıp kapanma mekanizmalarına göre iyon kanal tipleri (Kulbacka ve ark., 2017)

Voltaja duyarlı iyon kanalları, membran potansiyelindeki değişikliklere tepki olarak açılır ve kapanır. Uyarılabilir hücreler olan sinir ve kas hücrelerinde aksiyon potansiyelinin yayılmasında rol oynarlar. Voltaj kapılı iyon kanalları Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- iyonlarının

geçışı ile, dinlenme potansiyelinin korunmasını ve elektriksel uyarılabilirliğin sağlanmasını gerçekleştirir (Alvarez, 2014). Sodyum kanalları aksiyon potansiyelinin hızlı depolarizasyonunda rol oynarken, potasyum kanalları repolarizasyonu sağlar (Catterall, 2012).

Ligandla açılan iyon kanalları, belirli moleküllerin (ligandların) bağlanmasıyla açılır. Bu tür kanallara örnek olarak nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR) verilebilir. Bu reseptör, nöromusküler kavşakta nörotransmisyonun sağlanmasında kritik rol oynar (Arias, 2001). Ayrıca, gamma-aminobütirik asit (GABA) reseptörleri, inhibe edici nörotransmisyonla ilişkilidir (Mody ve Pearce, 2004). Ligandla açılan kanallar, sinaptik iletimde önemli rol alır ve öğrenme, hafıza gibi süreçler ile nöronal uyarılabilirliğin modülasyonunda yer alır.

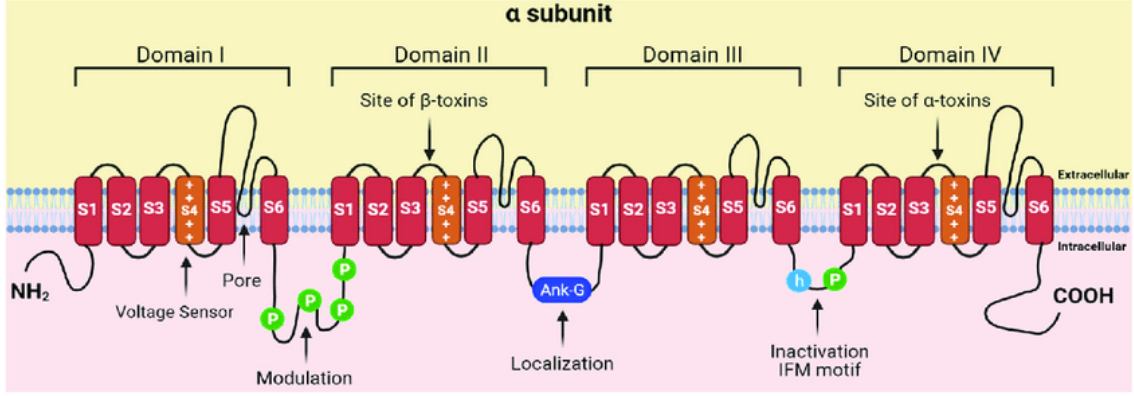
Mekanik olarak açılan iyon kanalları, gerilme veya basınç gibi, fiziksel kuvvetlere, tepki verir. Bu kanallar, dokunma duyusu ve kan basıncının düzenlenmesi gibi süreçlerde rol oynar (Sachs, 2010). Geçici reseptör potansiyel (TRP) kanal ailesi, mekanik olarak aktive olan iyon kanallarına örnektir ve duyuşsal algılamada önemli bir rol oynar (Clapham ve ark., 2003).

İyon kanallarının fonksiyonlarındaki bozulmalar, çeşitli patofizyolojik süreçlerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Voltajla çalışan iyon kanallarındaki mutasyonlar, epilepsi, kardiyak aritmiler ve kistik fibroz gibi hastalıklara yol açabilir (Catterall, 2012). Ligand kapılı kanalların disfonksiyonu, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir. Dolayısıyla, iyon kanallarını hedef alan ilaçların geliştirilmesi, pek çok hastalık için büyük önem taşımakta ve potansiyel bir araştırma alanını oluşturmaktadır (Cuthbertson ve ark., 2013).

2.7.Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları (VGSC)

Voltaj kapılı sodyum kanalları (VGSC'ler), hücre zarında yer alan, fizyolojik (normoksik) koşullarda birkaç milisaniye içerisinde açılıp kapanarak, mikromolar düzeyde hücre içine sodyum iyonlarının girişini sağlayan kanallardır. Bu yol ile hücrelerin elektriksel uyarılabilirliğini ve aksiyon potansiyeli üretimini sağlarlar. Özellikle sinir ve kas hücrelerinde, aksiyon potansiyelinin başlangıç fazında rol oynayan VGSC'ler, merkezi

ve periferel sinir sisteminde, kalpte, kas dokusunda ve bazı kanser hücrelerinde eksprese edilir (Catterall, 2012). VGSC'ler, tipik olarak por oluşturan 220-260 kDa ağırlığında büyük bir α alt birimi ve 33-36 kDa aralığında dört tane β alt biriminden oluşur (Şekil 2.26.).



Şekil 2.26. VGSC Yapısı (Abd El-Aziz, 2021)

α Alt Birimi: Porun ana yapı taşı oluşturur ve iyon seçiciliğinden sorumludur. VGSC α alt birimi, SCN1A–SCN11A genleri tarafından kodlanan Nav1.1–Nav1.9 ve Navx olmak üzere toplamda 10 alt tipi ifade eder. Bu alt tipler, SCN gen ailesi, tarafından kodlanır ve farklı dokularda, hücre türlerinde ve fizyolojik işlevlerde özelleşmiş roller üstlenir. Bu α alt birim, dört homolog domain (DI–DIV) içerir ve her domain altı transmembran segmentten (S1–S6) meydana gelir. 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. Özellikle dördüncü segment (S4), pozitif yüklü amino asitler içerir ve voltaj sensörü olarak görev yapar. S5 ve S6 segmentleri ise hücre zarının dış kısmında yer alır ve bu segmentler arasında, iyon geçirgenliğini düzenleyen seçici bir filtre bulunur. Bu seçicilik filtresi, sodyum iyonlarının diğer iyonlara kıyasla etkin bir şekilde seçilerek geçişine izin verir. Aynı zamanda, merkezi por bölgesini çevreleyerek iyonların taşınmasını kontrol eder. Bu yapı, VGSC'nin iyon geçirgenliği ve elektrik sinyallerinin iletiminde temel işlevlerini yerine getirmesini sağlar (Brackenbury, 2012; Fraser ve ark., 2014). Pozitif yükler, S1, S2 ve/veya S3'teki

komşu negatif yükler ile nötralize edici iyon çiftlerinin oluşumuyla stabilize edilir. Membran depolarize olduğunda, negatif membran potansiyeli serbest kalır ve S4 segmentleri dışı doğru hareket eder, böylece poru açan ve kanal aktivasyonunu başlatan bir konformasyonel değişikliğe neden olur (Catterall, 2000).

β Alt Birimleri: SCN1B–SCN4B genleri tarafından kodlanan dört β alt birimi (β 1– β 4) mevcuttur (Tablo 2.6.). Bu alt birimler α alt birimine bağlanarak kanalın kinetiğini, voltaja duyarlılığını ve membran hedeflenmesini düzenler (Brackenbury, 2012). β alt birimleri, bir hücre dışı immünoglobulin (Ig) döngüsü, transmembran bölge ve bir hücre içi C terminal bölgesi içeren yapıya sahiptir.

Tablo 2.6. β alt birimlerinin özellikleri ve ifade edildiği dokular.

Alt Birim	Gen	İşlevi	İfade Edildiği Dokular
β 1	SCN1B	Voltaj bağımlılığ düzenler	Nöral, kas hücreleri
β 2	SCN2B	Hücre zarı stabilitesini artırır	Kalp, sinir dokusu
β 3	SCN3B	Kardiyak sinyal iletimi düzenler	Sinir ve kalp dokusu
β 4	SCN4B	Geç inaktivasyonu engeller	Kas ve kalp dokusu

VGSC'lerin α alt birimleri ise, NaV1.1'den NaV1.9'a kadar olan her biri spesifik işlevlere sahip farklı NaV alt tiplerini ifade eder. Bu alt tipler, özgün genler tarafından kodlanır ve farklı dokularda, hücre türlerinde ve fizyolojik işlevlerde özelleşmiş roller üstlenir.

NaV alt tipleri, hem merkezi sinir sistemi (MSS), hem periferik sinir sistemi (PSS), hem de kas hücrelerinde işlev gösterir. Bu alt tiplerin farklı fizyolojik işlevlerdeki rolleri ve patolojik durumlarla ilişkileri, kapsamlı araştırılmıştır (Tablo 2.7).

Tablo 2.7. NaV Alt Tipleri ve ilişkili hastalıklar (Catterall ve ark., 2005).

Alt Tip	Gen	Ana Konum	İlişkili Hastalıklar
NaV1.1	SCN1A	GABAerjik nöronlar	Epilepsi, Dravet sendromu
NaV1.2	SCN2A	Eksitator nöronlar	Epilepsi, Otizm
NaV1.3	SCN3A	MSS, gelişim dönemi	Nöropatik ağrı
NaV1.4	SCN4A	İskelet kası	Miyotoni, hiperkalemik paralizi
NaV1.5	SCN5A	Kalp kası	Brugada sendromu, long-QT sendromu
NaV1.6	SCN8A	MSS	Epilepsi, motor bozukluklar
NaV1.7	SCN9A	DRG, sempatik nöronlar	Eritromelalji, ağrısızlık
NaV1.8	SCN10A	DRG	Kronik ağrı
NaV1.9	SCN11A	DRG, trigeminal ganglion	Ağrının düzenlenmesi

NaV1.1 (SCN1A): MSS'te yaygın olarak bulunan NaV1.1 kanalı, özellikle GABAerjik inhibitör nöronlarda rol oynar. Eksikliği veya disfonksiyonu, Dravet sendromu gibi epileptik ensefalopatilerle ilişkilendirilmiştir. (Catterall, 2018).

NaV1.2 (SCN2A): MSS'te eksitator nöronlarda baskın olarak bulunur ve aksiyon potansiyelinin başlatılmasında önemlidir. Mutasyonları, otizm spektrum bozuklukları ve epilepsiyle raslantılıdır (Barbieri ve ark., 2023).

NaV1.3 (SCN3A): MSS'te ve gelişim sürecinde daha yüksek düzeyde eksprese edilir. Yetişkinlerde düşük seviyede bulunur. MSS yaralanmalarında yeniden eksprese edilerek ağrı ve nöropatik semptomlara katkıda bulunabilir (Liao ve ark., 2023).

NaV1.4 (SCN4A): İskelet kasında yüksek oranda eksprese edilen bu kanal, kas kontraksiyonunu düzenler. Hiperkalemik periyodik paralizi, miyotoni ve diğer nöromusküler hastalıklarla bağlantılıdır (Ghovanlo ve ark., 2021).

NaV1.5 (SCN5A): Kalp kasında bulunan NaV1.5, aksiyon potansiyelinin hızlı depolarizasyon fazını sağlar. Brugada sendromu ve long-QT sendromu gibi ciddi kardiyak aritmilere zemin hazırlayabilir (Remme, 2013).

NaV1.6 (SCN8A): MSS'te en yaygın bulunan alt tiplerden biridir. Hem eksitator hem de inhibitör nöronlarda bulunur. SCN8A mutasyonları, epileptik ensefalopatilerle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca motor koordinasyonda rol oynar (Estacion ve ark., 2014).

NaV1.7 (SCN9A): Periferik sinir sistemindeki dorsal kök gangliyonları (DRG) ve sempatik sinirlerde bulunur. Nöronların ağrı sinyallerini iletmesinde kritik rol oynar. SCN9A mutasyonları, primer eritromelalji, paroksizmal ekstremitte ağrısı sendromu ve ağrısızlık durumları ile etkilidir (Dib-Hajj ve ark., 2013).

NaV1.8 (SCN10A): DRG'de yüksek oranda eksprese edilir ve soğuk algısında rol oynar. Ağrının iletilmesinde katkı sağlar. Kronik ağrı bozukluklarının hedeflerinden biridir (Akopian ve ark., 1999).

NaV1.9 (SCN11A): Düşük eşikli bu kanal, DRG ve trigeminal gangliyonunda bulunur. Ağrı sinyallerinin amplifikasyonunda görev alır. Mutasyonları, ağrının artırılması veya tam tersi ağrısızlık durumlarına neden olabilir (Zhang ve ark., 2013).

Voltaj kapılı sodyum kanalları, benzer yapısal özelliklere ve yüksek homolojiye sahip olmalarına rağmen, her bir alt tipi kendine özgü voltaj duyarlılığı, kinetik özellikler ve farmakolojik etkiler gösterir. Nöronal tipler (NaV1.1, NaV1.2, NaV1.3, NaV1.6 – NaV1.9), genellikle merkezi ve periferik sinir sistemlerinde elektriksel aktivite üretimi ve aksiyon potansiyelinin yayılmasında rol alır. NaV1.4 ise iskelet kası hücrelerinde bulunan temel sodyum kanalıdır ve kas kontraksiyonu için kritik öneme sahiptir. Kalp kasında dominant olan NaV1.5, kardiyak miyositlerde elektriksel uyarıların oluşturulmasında ve iletiminde temel rol oynar (Catterall, 2017).

Bazı hücrelerde yalnızca tek bir VGSC alt tipi bulunabilir. Örneğin, dendritik hücrelerde çoğunlukla NaV1.7 bulunurken, bazı hücre tipleri birden fazla alt tip eksprese eder. Astrositlerde NaV1.2, NaV1.3, NaV1.5 ve NaV1.6'nın; mikroglialarda ise NaV1.5 ve NaV1.6'nın bulunduğu gösterilmiştir. İnsan kırmızı kan hücrelerinde, NaV1.4 ve NaV1.7'nin ekspresyonu tespit edilmiştir (Black ve Waxman, 2013).

Grimes ve arkadaşları, 1995 yılında yaptıkları ilk çalışmada, VGSC'lerin yüksek metastatik Mat-Lyu-Lyu prostat kanseri hücrelerinin invaziv özelliklerini değerlendirdikleri çalışmada, elektrofizyolojik analizler sonucu VGSC'lerin kanser hücrelerinin invaziv özellikleriyle ilişkili olabileceği saptanmıştır. Daha sonraki araştırmalarda, özellikle bu VGSC'nin Nav1.7 alt tipi olduğu ve prostat kanseri hücrelerinde baskın olarak ifade edildiğini ortaya koymuştur.

Fraser ve arkadaşları, 1999 yılında yaptıkları çalışmada, VGSC'lerin prostat kanseri hücrelerindeki işlevsel rolünü incelediler. Bu araştırma, özellikle prostat kanseri hücrelerinde VGSC'lerin ifade edildiğini ve bu kanalların hücre invazyonunu artırdığını ortaya koymuştur. Bulgular, VGSC'lerin genel olarak kanser hücrelerinin metastatik potansiyeline katkı sağlayabileceğini göstermiştir.

Sodyum kanalı ile ilgili yapılan diğer çalışmalara baktığımızda, insan meme kanseri hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilen nNav1.5 izoformunun, invazivliği artırarak kötü prognoz ve lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu Fraser ve arkadaşları (2005) tarafından gösterilmiştir. VGSC ekspresyonunun kolon kanseri hücrelerinde de invazyonla ilişkili olduğu ve iyon kanallarını bloke eden, iyon kanal blokerleriyle bu etkinin azaltılabildiği bildirilmiştir (Roger ve ark., 2003). Ayrıca iyon kanal blokeri olan ilaçlarla veya bazı ajanlarla yapılan çalışmalarda VGSC alt birimlerinden hem Nav1.5 hem de Nav 1.7 nin inhibe edilerek, kanser hücrelerinin invazyonunu ve metastazını inhibe ettiği in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir (Drifford ve ark., 2014, Nelson ve ark., 2015, Mohammed ve ark., 2016, Fraser ve ark., 2017, Bagan ve ark., 2019, Djamgoz ve ark., 2019, Rızaner ve ark., 2020, Rızaner ve ark., 2024).

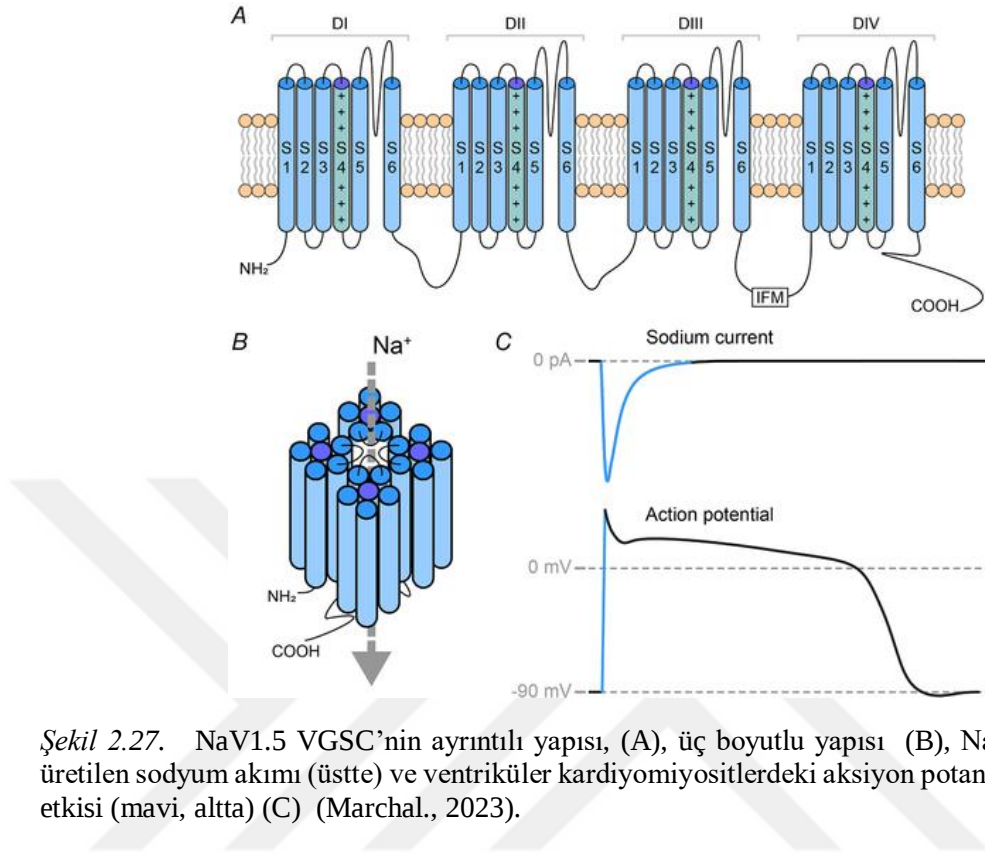
2.7.2. NaV1.5: Özellikleri ve Önemi

SCN5A geni tarafından kodlanan NaV1.5, VGSC bir alt tipidir ve hücre zarından iyon geçişini düzenler . NaV1.5 kanalı esas olarak kalp kası hücrelerinde bulunur ve kardiyak aksiyon potansiyelinin başlatılmasında kritik bir rol üstlenir. Bu kanal, kalbin elektriksel aktivitesini yöneten hızlı sodyum akımını oluşturur ve böylece miyositlerin düzgün şekilde depolarize olmasını sağlar (Baroudi ve Chahine, 2000).

Elektriksel bir uyarı ile membran potansiyelinde meydana gelen değişiklik, NaV1.5'in hızla açılmasına ve hücre içine sodyum iyonlarının akışına yol açar. Bu geçici iyon hareketi, aksiyon potansiyelinin oluşumunu tetikler. Kanal, çok kısa sürede inaktive olarak sodyum akışını durdurur ve repolarizasyon sürecinin başlamasını mümkün kılar. Bu hızlı açılıp kapanma kinetiği, kalbin ritmik kasılma yeteneği açısından yaşamsal öneme sahiptir (Şekil 2.27.).

NaV1.5, iyon geçirgenliğini sağlayan bir α alt birimi ile bu yapıyı düzenleyen β alt birimlerinden oluşur. Kanalın yapısal ve fonksiyonel özellikleri, onu kalp kasına özgü fizyolojik gerekliliklere uyumlu hâle getirir. NaV1.5 kanalları, dinlenme sonrasında 1-2 ms süresince açılır ve sonrasında hızla inaktive olurlar. Bu esnada oluşan erken Na⁺ akımı ile kardiyak aksiyon potansiyeli yükselir ve erken Na⁺ akımı veya transient-geçici Na⁺ akımı (INaT) olarak adlandırılır. Normal şartlar altında oluşan Na⁺ akımının büyük bir kısmı INaT olmakla birlikte, aksiyon potansiyelinin tepe noktasından sonra küçük bir akım olan geç Na⁺ akımı/ısrarlı Na⁺ akımı (INaP/INaL) oluşur. Özellikle kanal proteininde veya bazı hastalıklarda oluşan mutasyonlar ile kanalın geç Na⁺ akımında artış meydana gelir (Djamgoz ve Onkal, 2013).

Klinik olarak, NaV1.5'in fonksiyon bozuklukları ciddi kardiyak aritmilere neden olmaktadır. Özellikle genetik mutasyonlarla ilişkili Brugada sendromu ve long QT sendromu gibi hastalıklar, kanalın patolojik önemini vurgulamaktadır (Remme, 2013). Bu bağlamda NaV1.5, hem kardiyak fizyolojinin temel bir bileşeni hem de farmakolojik girişimlerin hedefi olarak dikkat çekmektedir.



Şekil 2.27. NaV1.5 VGSC'nin ayrıntılı yapısı, (A), üç boyutlu yapısı (B), NaV1.5 tarafından üretilen sodyum akımı (üstte) ve ventriküler kardiyomiyositlerdeki aksiyon potansiyeli üzerindeki etkisi (mavi, altta) (C) (Marchal., 2023).

Son yıllarda, NaV1.5'in yalnızca kardiyak sistemlerle sınırlı kalmayıp, başta meme olmak üzere bazı kanserlerde de aktif olduğu gösterilmiştir. Liu ve Altamura (2021), NaV1.5'in yumurtalık kanserinde aşırı ekspresyon gösterdiğini ve bunun kötü prognozla ilişkili olduğunu vurgulamıştır.

NaV1.5 kanalının meme kanseri hücrelerinin invazivliğini artırdığını ve hücrenin metastatik yeteneklerini desteklediğini yönünde bir çok çalışma bulunmaktadır (Drifford ve ark., 2014, Nelson ve ark., 2015, Mohammed ve ark., 2016). Benzer şekilde, Zhou ve arkadaşları (2024), prostat kanseri hücrelerinde NaV1.5 ekspresyonunun, hücrelerin çevresel matrikse göçünü kolaylaştırdığını ve tümör agresifliği ile bağlantılı olduğunu bildirmiştir.

Ayrıca SCN5A geninin aşırı ekspresyonunun, meme kanseri hücrelerinde hücre dışı matriksin parçalanmasını kolaylaştıran MMP'lerin artışı ile ilişkili olduğu Brackenbury ve arkadaşları (2022) tarafından, kolorektal kanser hücrelerinde ise, Snail, Vimentin gibi

invazyonu artıran genlerin aktivasyonu ile bağlantılı olduğu Yang ve Nüsse (2024) tarafından bildirilmiştir.

Bu bulgular, NaV1.5'in kanserde hem bir biyobelirteç hem de potansiyel terapötik hedef olabileceğini ortaya koymaktadır. Chen ve Zhao (2025), kanalın gözenek bölgesine yönelik de novo protein tasarımları geliştirerek Brugada ve long-QT sendromlarında olduğu gibi, kanser için de kanal hedefli tedavi olanaklarının araştırılabileceğine işaret etmiştir. Smith ve Lee (2025) ise kanal fosforilasyonunun inaktivasyon süreci üzerindeki etkilerinin yalnızca aritmilerde değil, hücre proliferasyonu gibi kanserle ilişkili süreçlerde de rol oynayabileceğini bildirmiştir.

Grimes ve arkadaşlarının 1995'te prostat kanserindeki VGSC'lerle ilgili yaptığı çalışmanın ardından, NaV1.5 alt birimi üzerine odaklanılmış ve Fraser ve arkadaşları (2005), insan meme kanseri hücrelerinde neonatal NaV1.5 (nNaV1.5) izoformunun yüksek düzeyde ifade edildiğini ve bu izoformun invaziv davranışları artırarak agresif prognoz ve lenf nodu metastazı oluşturduğu saptanmıştır. NaV1.5 aktivitesinin meme kanseri hücrelerinde MMP9 ekspresyonunu artırarak apoptozu azalttığı ve metastatik potansiyeli yükselttiği ortaya konmuştur (Nelson ve ark., 2015). NaV1.5'in epitel-mezenkimial geçiş (EMT) süreci ile ilişkili olduğu ve hücre invazivliğini bu mekanizma üzerinden artırdığı gösterilmiştir (Gradek ve ark., 2019). Son yıllarda yapılan güncel çalışmalarda NaV1.5'in sadece meme değil, kolon ve over gibi diğer solid tümörlerde de invazyon ve metastaza katkı sağladığı, başta ranolazine, lidokain, meksiletin gibi, kardiyolojide kullanılan fenitoine gibi epilepside kullanılan iyon kanal blokerlerinin kanser nmetastazına karşı potansiyel terapötik ajanlar olabileceği vurgulanmaktadır (Horne ve ark., 2021, Aydar., 2024; Liu., 2024; Djamgoz 2024).

2.7.3. VGSC İyon Kanal Blokerleri

VGSC iyon kanal blokerleri, bu kanalların işlevini baskılayarak/engelleyerek sodyum iyonlarının hücre içine akışını azaltan veya tamamen durduran moleküllerdir. Bu blokerler, sinirsel uyarılabilirlik, kas kasılması gibi fizyolojik süreçleri modüle etmekte ve kanalopatik olarak da adlandırılan çeşitli hastalıkların tedavisinde önemli bir yere

sahiptir. VGSC blokerleri, kanalın açık veya kapalı durumuna bağlanarak iyon akışını inhibe eder. Kanalın aktivasyon ve inaktivasyon kinetiklerine göre seçicilik gösterebilirler. Açık kanal blokerleri, kanal aktif haldeyken bağlanarak iyon geçirgenliğini engeller. Kapalı kanal blokerleri ise kanalın dinlenme durumunda bağlanarak aktivasyonunu önler. Bu blokerlerin etkisi, genellikle voltaj ve kullanım bağımlıdır; yani, sık aktivasyon durumlarında daha etkili hale gelirler. VGSC blokerleri, lokal anestezipler, antiaritmik ilaçlar ve antikonvülsanlar gibi çeşitli farmakolojik sınıflara ayrılır (Tablo 2.8.).

Tablo 2.8. Antiaritmik ilaçların sınıflandırılması (Morrow.,2018).

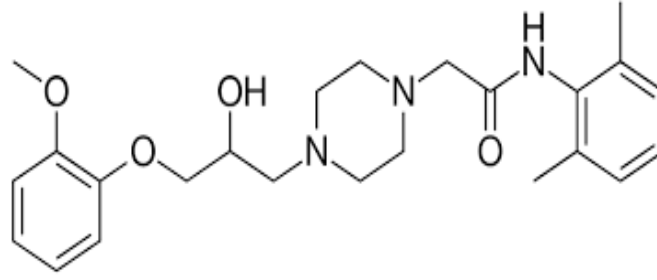
Sınıf	Alt Grup	İlaçlar	Etki Mekanizması
I	IA	Kinidin, Prokainamid, Disopiramid	Na ⁺ kanal blokajı, AP süresini artırır
	IB	Lidokain, Meksiletin, Tokainid	Na ⁺ kanal blokajı, AP süresini azaltır
	IC	Flekainid, Propafenon	Na ⁺ kanal blokajı, iletimi belirgin yavaşlatır
	ID	Ranolazin, Elekasilid	Geç Na ⁺ akımını inhibe eder
II	IIA	Propranolol, Metoprolol	Beta-adrenerjik reseptör blokajı
	IIB	İzoproterenol	Adrenerjik reseptör aktivasyonu
	IC	Atropin	Muskarinik reseptör inhibisyonu
	IID	Karbakol, Digoksin	Muskarinik reseptör aktivasyonu
	IIE	Adenosin	Adenosin reseptör aktivasyonu
III		Amiodaron, Sotalol, Dofetilid	K ⁺ kanal blokajı, repolarizasyonu uzatır
IV		Verapamil, Diltiazem	Ca ²⁺ kanal blokajı, iletimi yavaşlatır

Anti-aritmik ilaçların kanser hücreleri üzerindeki terapötik etkileri giderek artan bir ilgi görmektedir. Hem lokal anestetik hem de, antiaritmik olarak kullanılan lidokain'in, meme ve prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ve meme kanseri hücrelerinde NaV1.5, prostat kanserinde NaV1.7 kanallarını baskılayarak aktivitesini hücre invazyonunu azalttığı saptanmıştır Kim ve ark., 2019, Rizaner ve ark., 2024). Kinidin ve diğer antiaritmiklerin farklı kanser hücrelerinde sodyum kanal aktivitesini

modüle ederek, hücre proliferasyon ve göçünü azalttığı bildirilmiştir (Singh ve ark., 2020). Ayrıca, Wang ve arkadaşları (2023) VGSC blokerlerinin kemoterapi ile kombine edildiğinde tedavi etkinliğinin arttığını vurgulamıştır. Epilepsi tedavisinde kullanılan iyon kanal blokerlerinden fenitoin'in meme kanseri yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerindeki NaV1.5 aktivitesini baskılayarak, hücre invazyonunu ve metastazını inhibe ettiği saptanmıştır (Nelson ve ark., 2015, Mohammed ve ark., 2016).

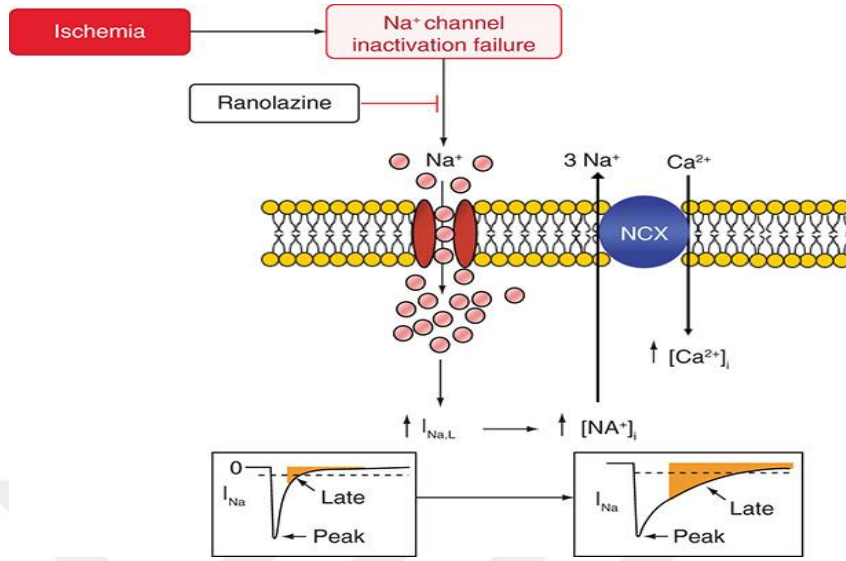
2.8. RANOLAZİNE (RNL)

Ranolazine, kardiyovasküler sistemde geç faz sodyum akımını selektif olarak inhibe eden 2006 yılında FDA onayı alan benzodiazepin türevi bir ilaçtır. Kimyasal formülü $C_{24}H_{33}N_3O_4$ ve moleküler ağırlığı 427.51 g/mol olan bu ilaç, klinikte özellikle kronik stabil angina pectoris tedavisinde kullanılmaktadır (Şekil 2.28.).



Şekil 2.28. Ranolazine'in kimyasal yapısı (Patil ve ark., 2014).

Na^+ kanal blokeri olan RNL, hücre içi sodyum birikimini azaltarak sodyum-kalsiyum değişim mekanizmasını düzenler ve böylece hücre içi kalsiyum yüklenmesini önler (Şekil 2.29.). Bu etkisiyle, miyokardiyal oksijen tüketimini optimize eder ve iskemi koşullarında kardiyak performansı iyileştirir. Ranolazin, geç sodyum akımını inhibe eden bir antiaritmik ilaç olup, kalp yetmezliği ve aritmi gibi kardiyovasküler hastalıklarda etkisi çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarda test edilmiştir (Kaplan ve ark., 2022). Oral olarak iyi emilir, maksimum plazma konsantrasyonuna 2-5 saatte ulaşır ve eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 7 saattir (Dhalla ve ark., 2009).



Şekil 2.29. Ranolazinin etki mekanizması (Tamargo ve Lopez-Sendon.,2021)

Kan akımındaki bozulma veya hipoksinin gelişimi sonucu membrandaki VGSC ler normalden daha uzun süre açık kalmaya başlar ki, içeriye daha fazla Na^+ girmesine neden olur ve bu, geç/ısrarlı sodyum akımı (INaP) olarak adlandırılır. RNL'de özellikle geç faz sodyum akımını hedef alır (Şekil. 2.29). Kardiyak iyon akımı üzerinde etkili olan RNL'nin geç/ısrarlı Na^+ akımı (INaP) üzerindeki IC50 değerinin $5,9 \mu\text{M}$ olduğu, voltaj clamp testi ve depolarizasyon frekansına göre bu dozun $5\text{-}21 \mu\text{M}$ arasında değişim gösterdiği ve günlük $20 \mu\text{M}$ dozu aşmayan bir tedavinin planlanması gerektiği bildirilmiştir. Ayrıca Na^+ 'un yanı sıra, K^+ akımı üzerinde de etki gösterdiği tespit edilmiştir (Antzelevich ve ark., 2004). Wu ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan bir çalışmada da benzer şekilde, geç sodyum akımının %50 inhibisyonu için gerekli olan IC50 değeri $6 \mu\text{M}$ olarak rapor edilmiştir.

RNL geç sodyum akımını miyokardiyal hücrelerde hücre içi sodyum birikimini ve kalsiyum akışını düzenler, bu da miyokardiyal enerji tüketimini düşürür ve oksijen ihtiyacını azaltır. Bu akımın inhibisyonu, hücresel aşırı yüklenmeyi önler ve hücre içi iyon dengesini koruyarak kontraktiletiyi iyileştirir. Bu özellikleriyle ranolazine, $\text{NaV}1.5$ ile ilişkili patolojik süreçlerde terapötik fayda sağlar (Belardinelli ve ark., 2013).

RNL, transient sodyum akımını (peak I_{Na}) minimal şekilde etkileyerek, kalp kası hücrelerinin normal fonksiyonlarını bozmadan iskemik dokuda fayda sağlar. Ayrıca, geç

sodyum akımının inhibisyonu aksiyon potansiyelinin erken sonlanmasına ve miyokardiyal repolarizasyonun düzenlenmesine yardımcı olarak aritmilerde terapötik fayda gösterir. NaV1.5 üzerinden etki gösteren bu seçici mekanizma, özellikle LQT3 hastalığı için klinik avantaj sağlar (Kaplan ve ark., 2022). Ranolazin, kardiyomiyopati ve obstrüktif olmayan koroner arter hastalığı olan hastalarda da test edilmiştir. Bu tedavi, kan basıncını düşüren hastalarda beta-blokerler veya kalsiyum kanal blokerlerine karşı daha iyi bir alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır (Johnson.,2021) .

Ranolazine, antiaritmik etkilerinin yanı sıra, epilepsi de aktif olan NaV1.1 ve NaV1.2 kanallarını da baskıladığı belirlenmiş ve epileptik Scn2aQ54 fare modelinde RNL'nin (40 mg/kg) geç sodyum akımı üzerindeki etkisinin araştırıldığı *in vivo* bir çalışmada, mutant Nav1.2 transgeni tarafından üretilmiş anormal nöronal geç sodyum akımını inhibisyonu sonucu epileptik nöbet sıklığının RNL tedavili farelerde yaklaşık olarak %50 oranında azaldığı belirlenmiştir (Anderson ve ark., 2014). *In vitro* bir çalışmada Rajamani ve arkadaşları (2008), Ranolazine'nin tetrodotoksin duyarlı NaV1.7 ve tetrodotoksin dirençli NaV1.8 sodyum kanallarını etkin şekilde bloke ettiğini ve bu yolla ağrı sinyallerinin iletimini engelleyebileceğini göstermiştir. Ranolazine'in iskelet kasına özgü NaV1.4 ile nöronal NaV1.7 voltaj kapılı sodyum kanal izoformlarını durum (state-dependent) ve kullanıma (use-dependent) bağımlı şekilde inhibe ettiğini, özellikle bu kanallar açık konumdayken etkili bir blokaj sağladığını ortaya koymuştur (Wang ve ark., 2008).

RNL , VGSC üzerindeki inhibisyon kapasitesi nedeniyle, kanser üzerindeki etkileri hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gerçekleştirilen çalışmalarla çeşitli sodyum kanal izoformları üzerindeki etkileri, tümör progresyonu ile metastatik yayılım potansiyeli kapsamlı biçimde ortaya konmuştur. Meme kanseri hücreleri MDA-MB-231 ile *in vitro* olarak yürütülen çalışmada, % 2 oksijen içeren akut hipoksik ortamda yetiştirilen MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin transvers hareketini hem TTX (10 µM) hem de, RNL (300 µM)'nin tamamen baskıladığı ve bu baskılamının Na⁺ kanallarını bloke ederek gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Djamgoz ve Onkal, 2013). Drifft ve arkadaşları ise (2014), 50 µM_RNL'nin TNBC meme kanseri hücreleri MDA-MB-231 hücrelerinde NaV1.5 akımını ve hücrelerin giriciliğini NaV1.5 kanalını bloke ederek gerçekleştirdiğini, *in vivo* olarak MDA-MB-231 hücreleri ile oluşturulan immundepresif

farelerde (NMRI nude)ki akciğer kolonizasyonunu 50 mg/kg/gün ile NaV1.5 sodyum kanallarını inhibe ederek anlamlı düzeyde azalttığını, hatta NaV1.5'in susturulmasıyla akciğer metastazının tamamen ortadan kalktığını bulmuştur. Çalışmada, NaV1.5 kanal aktivitesinin metastatik yayılımı artırdığı, Ranolazine'in ise bu kanalı inhibe ederek meme kanseri hücrelerinin invazivliğini ve akciğer kolonizasyonunu azalttığı gösterilmiştir. İnsan kolorektal hücrelerinde hipoksiye bağlı olarak artan invazyonun, klinik dozlardaki RNL ile baskılandığı gösterilmiştir (Guzel ve ark., 2019).

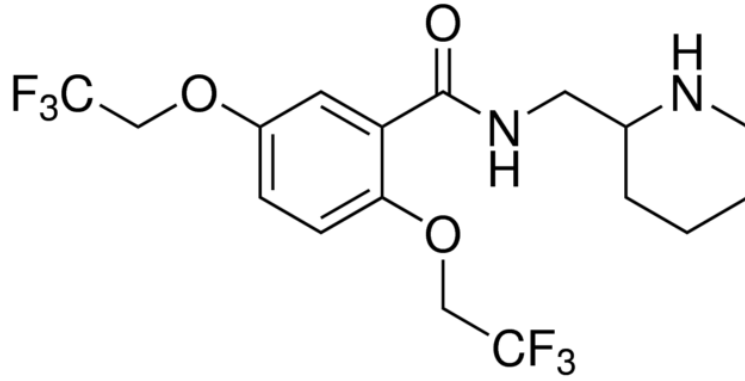
NaV 1.7 ekspresyonu gösteren Mat-Ly-Lu hücrelerinin inokülasyonu ile oluşturulan Dunning model prostat kanserli Copenhagen sıçanlara sistemik olarak verilen RNL (2.5 ve 5 μ M), akciğerdeki metastaz sayısını %63'e kadar azaltırken, primer tümörigenezi etkilememiştir. Ayrıca primer tümör ile metastazlardaki hücrelerin VGSC ekspresyonları da incelenmiş ve NaV1.7 ekspresyonu yapan hücre sayısının RNL tedavili hayvanlardaki metastazlarda azalırken, NaV1.7 ekspresyon şiddeti/seviyesi yükselmiştir. Ayrıca insan prostat dokusu mikrodizilerinde, VGSC protein ekspresyonu, kanserli ve kanserli olmayan dokularda anlamlı şekilde daha yüksek bulunduğu saptanmıştır (Budan ve ark., 2019).

Son yıllarda ranolazin ile yapılan kombinasyon tedavileri, çeşitli kanser türlerinde hücre invazyonunu ve metastazı azaltma potansiyeli göstermiştir. Örneğin, propranolol ile ranolazin kombinasyonu, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde invazyonu azaltmış olmakla beraber, bu etkinin RNL'nin tek başına olan etkisinden daha düşük olduğu ve kombinasyonun sinerjik değil antagonistik bir etki meydana getirdiği ortaya konmuştur. Bu cevabın, iki ilacın da benzer bağlanma bölgelerini hedeflemesinden kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Fraser ve ark., 2019). Diğer yandan, K-ATP kanal açıcı minoksidil ile ranolazin kombinasyonu, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında invazyonu doz bağımlı olarak azaltmış ve bu kombinasyon, her iki ilacın tek başına kullanımına kıyasla daha belirgin bir etki göstermiştir (Qiu ve ark., 2022). Ayrıca, ranolazin ile anti-PD-L1 immünoterapisinin kombinasyonu, melanom modellerinde tümör büyümesini azaltmış ve hayatta kalma süresini uzatmıştır; bu etki, yağ asidi metabolizmasının modülasyonu ve interferon sinyal yollarının aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Djamgoz, 2024) . Son olarak, riluzol ile ranolazin kombinasyonu, östrojen reseptör pozitif meme

kanseri hücrelerinde proliferasyonu azaltmış ve anti-proliferatif etkiyi artırmıştır; bu kombinasyon, fulvestrant veya 4-hidroksitamoksifen ile birlikte kullanıldığında da benzer sinerjik etkiler göstermiştir (Djamgoz, 2024)

2.9. FLECAİNİDE (FLC)

Flecainide, sınıf 1C antiaritmik ilaçlar grubunda yer alan ve kalp dokusundaki hızlı sodyum akımını inhibe ederek etkili bir tedavi sağlayan bir bileşiktir. Moleküler ağırlığı 414.32 g/mol olan bu ilaç, özellikle klinikte supraventriküler ve ventriküler aritmilerin tedavisinde kullanılmaktadır. Kimyasal yapısı, karbon, hidrojen, flor, nitrojen ve oksijen atomlarını içerir (Şekil 2.30.).

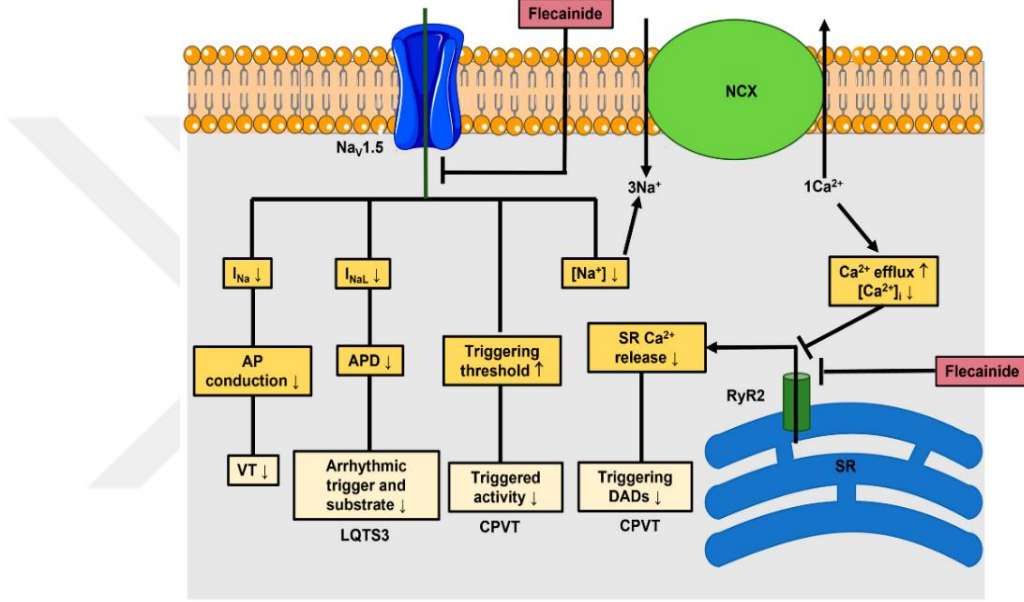


Şekil 2.30. Flecainide'in kimyasal yapısı (Jiang ve ark., 2020).

Flecainide'in etkisi, sodyum kanallarının kapalı ya da açık durumdayken bağlanması sonucu ortaya çıkar ve hızlı sodyum akımlarının bloke edilmesiyle aksiyon potansiyelinin başlangıç fazını yavaşlatır.

Voltaj kapılı sodyum kanallarını (NaV) bloke ederek kardiyak miyositlerde aksiyon potansiyelinin oluşumunu yavaşlatır ve iletim hızını azaltır. Bu ilaç, SCN5A geni tarafından kodlanan NaV1.5 kanalının hızlı akımını hedef alır. Etkinliği, voltaj-bağımlı ve kullanım-bağımlı özellik gösterir, bu da ilacın hızlı kalp atış hızlarında daha belirgin etkiler sunduğunu ifade eder. Flecainide, kanalın por bölgesine bağlanarak iyon geçişini engeller ve aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazını uzatır. Flecainide NaV1.5

sodyum kanallarını ve RyR2 ryanodin reseptörlerini inhibe ederek etkisini gösteren bir antiaritmik ilaçtır (Şekil 2.31.). Atriyal ve ventriküler miyositlerde hızlı Na^+ akımını (I_{Na}) bloke ederek aksiyon potansiyeli (AP) iletim hızını azaltır ve kalbin ventriküler taşikardiye (VT) yatkınlığını düşürür. Kanalin açık durumunda bağlanan flekainid, sitozolik Na^+ girişini azaltır. Bu, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değiştirici yoluyla Ca^{2+} çıkışını kolaylaştırır ve SR'deki Ca^{2+} yükünü azaltır. Böylece, CPVT'deki kalsiyum salınımını normalize eder.



Şekil 2.31. Flecainide'in etki mekanizması .

FLC'nin NaV1.5 kanalı üzerindeki inhibitör etkisi farklı çalışmalarda çeşitli koşullar altında değerlendirilmiştir. Rajamani ve arkadaşları (2016), NaV1.5 kanalı üzerinde %50 inhibisyon için gerekli olan IC_{50} değerini $1.2 \mu\text{M}$ olarak bildirmiştir. Benzer şekilde, Marawan ve ekibi (2017), flecainide'in NaV1.5 kanalının açık konformasyonuna bağlandığında IC_{50} değerinin $7 \mu\text{M}$ olduğunu raporlamışlardır.

Wang ve arkadaşları (2004), *Xenopus* oositlerinde ifade edilen NaV1.5 kanallarında yaptıkları çalışmada, stimülasyon frekansına bağlı olarak IC_{50} değerlerinin değiştiğini göstermiştir. Düşük frekanslı stimülasyonlarda (60s aralıklarla) IC_{50} değeri $345 \mu\text{M}$ olarak bulunurken, yüksek frekanslı stimülasyonlarda (10 Hz) bu değer $7.4 \mu\text{M}$ 'ye düşmüştür. Bu durum, flecainide'in kullanım bağımlı bir blokaj mekanizması sergilediğini ve açık durumda olan kanallara daha yüksek afinitesi olduğunu göstermektedir.

Moleküler modelleme verileri de bu farmakodinamik bulguları desteklemektedir. Marawan ve arkadaşlarının (2017) yaptığı hesaplamalarda, flecainide'in NaV1.5 kanalının kapalı konformasyonuna bağlanma enerjisi -16.79 kcal/mol olarak belirlenmiştir. Bu düşük bağlanma enerjisi, ilacın kapalı kanala olan afinitesinin zayıf olduğunu göstermektedir.

Flecainide, başlıca Na^+ kanal blokajı yoluyla elektriksel iletimi düzenleyerek aritmi tedavisinde kullanılan bir antiaritmiktir. Bunun yanı sıra, non-kardiyak NaV alt tipleri olan NaV1.7 ve NaV1.8 üzerinde de inhibisyon etkileri göstererek potansiyel analjezik özellikler sergileyebilir. Bu özellik, flecainide'in nöropatik ağrının tedavisinde de kullanılabileceğini gündeme getirmektedir (Tamargo ve Lopez-Sendon, 2021).

Liu ve arkadaşlarının (2020) yürüttüğü REFLEC-CR çalışmasında, atriyal fibrilasyon hastalarına kontrollü salımlı FLC uygulanmış ve bu tedaviyle hem semptomlarda hem de yaşam kalitesinde anlamlı düzeyde iyileşme elde edilmiştir. İlacın kontrollü salım formu sayesinde kan düzeylerinin stabil kaldığı ve hastaların günlük yaşam aktivitelerinde belirgin düzelmeler sağladığı gözlemlenmiştir. Altı aylık takip süresince tedaviye uyumun arttığı ve semptom kontrolünün sürdürülebilir olduğu rapor edilmiştir.

Zhang ve arkadaşları (2021), flekainid'in antiaritmik potansiyelini hem in vitro hem de in vivo modellerde değerlendirmiş ve bu ilacın sodyum kanalı inhibisyonu yoluyla atriyal fibrilasyon gibi ritim bozukluklarını azalttığını göstermiştir. Flekainid'in elektriksel aktiviteyi düzenleyerek kardiyak ritmi stabilize ettiği ve uzun süreli kullanımda düşük yan etki profiliyle güvenli bir seçenek sunduğu bildirilmiştir.

FLC ve kanser ile yapılan tek çalışma, Demirel (2023) tarafından gerçekleştirilmiş ve üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde FLC'nin migrasyon ve invazyonu anlamlı düzeyde inhibe ettiği ancak bu etkinin RNL'ye göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, hipoksik koşullarda her iki ilacın etkisinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, RNL'nin metastatik süreçte terapötik potansiyel taşıdığını desteklemektedir.

Literatürde Flecainide'in kanser hücreleri üzerindeki etkilerini araştıran başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

3.MATERYAL VE METOT

İyon kanal blokleri olan, antiaritmik ve antianjinal ilaçlardan Flekainid (FLC) ve Ranolazin (RNL)'in ayrı ayrı ve kombinasyon halinde, yüksek metastatik MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde ekspresyonu artan Nav1.5 VGSC üzerindeki etkisi, normoksik ve hipoksik olmak üzere iki farklı ortamda değerlendirilmiştir. Bu amaçla, hücrelerin proliferasyonu , Nav 1.5 kanalı üzerindeki etkisi , protein ve mRNA düzeyinde moleküler analizlerle araştırılmıştır.

3.1. Hücrelerin Kültürlenmesi.

TNBC hücre soyu olarak kullanılan yüksek metastatik MDA-MB-231 hücreleri, %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve L-Glutamin eklenmiş DMEM F12 mediumunda, %5 CO₂'li 37°C sıcaklıkta normoksi koşullarındaki inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücreler, petri kabının yaklaşık %80-90'ını kapladığında pasajlama işlemi uygulanmıştır. Hücreler, tripsin ile 5-7 dakika inkübe edilerek, petri yüzeyinden ayrılmaları sağlanmıştır. Süspansiyon haline gelen hücreler santrifüj tüplerine alınmış ve 2500 rpm'de 4-5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant atılmış, pellete taze medium eklenerek homojen bir hücre süspansiyonu elde edilmiştir . 100 mm petri kabına 6-8 mL medium konulduktan sonra, ana stok hazırlığı için minimum 20 µL hücre süspansiyonu ilave edilmiştir. Hipoksi ile gerçekleştirilen deneylerde de aynı yol izlenmekle beraber hücreler , %2 O₂ içeren hpoksi inkübatöründe kültüre edilmişlerdir.

3.2. Farmakolojik Ajanların Hazırlanması

Anti-aritmik bir ajan olan ranolazin (RNL), üretici firmanın (Sigma) önerileri doğrultusunda distile su ile 1000 µM'lık stok solüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyondan elde edilen 100 µM'lık stok, her biri 1 mL olacak şekilde tüplere bölünmüş ve -20°C'de saklanmıştır. Kullanılmadan önce medium ile seyreltilmiş ve deneylerde taze olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada Demirel (2023) tarafından da değerlendirilen 5 µM RNL konsantrasyonu kullanılmıştır.

Anti-aritmik bir diğer ajan olan flekainid (FLC), üretici firmanın (Sigma) önerileri doğrultusunda distile suda 1000 μM 'lık stok solüsyon olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyondan elde edilen 100 μM 'lık stok, her biri 1 mL olacak şekilde tüplere bölünmüş ve -20°C 'de saklanmıştır. Kullanılmadan önce mediumla gereken konsantrasyona seyreltilerek, ve deneylerde taze olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılacak FLC konsantrasyonuna literatür bilgisi ışığında 1 μM olarak karar verilmiştir (Demirel, 2023).

Pozitif kontrol olarak kullanılan Tetrodotoksin (TTX) (Alamone Labs), spesifik VGSC inhibitörü olup, PCR ve Western blot analizlerinde kullanılmıştır (Brackenbury ve ark., 2007). Toz halinde 1 mg TTX, üretici firmanın önerileri doğrultusunda 1 mL steril distile suda çözülerek 3132 μM 'lık stok solüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyondan 31.1 μM 'lık ara stok, ardından 3.13 μM 'lık deneylerde kullanılmak üzere solüsyonu hazırlanmış ve -21°C de saklanmıştır. Her aşamada TTX taze olarak serum içeren medyumla seyreltilerek deneylerde 1 μM konsantrasyonda uygulanmıştır .

3.3. Hücre Proliferasyonu

MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonundaki değişiklikleri değerlendirmek amacıyla MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi kullanılmıştır. Deney, 96 kuyucuklu mikropate ile gerçekleştirilmiş olup, her kuyucuğa 20.000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler, 37°C 'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat boyunca kültür ortamında bekletilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunmaları gerçekleştikten sonra, kontrol grubu için normal yetiştirme medyumunu, deney gruplarına ise, hazırlanan 1 μM FLC ve 5 μM RNL içeren medyumlar, kombinasyon olarak ise, 1 μM +5 μM FLC+RNL medyumları eklenmiştir. 24 ve 48 saat süresince hücreler FLC, RNL ve FLC+RNL ile tedavi edilmiş ve her 24 saatte bir medyumlar tazesini ile değiştirilmiştir. Tüm kuyucuklardaki medyumlar çıkarılarak, her kuyucuğa (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) çözeltisi eklenmiş ve minimum 4 saat inkübatörde karanlıkta inkübe edilmiştir. Canlı hücre sayısına paralel oluşan mor formazan kristalleri, DMSO ve glisin ile çözünmüş, mikropate okuyucuda (iMarkTM BioRad) 570 nm dalga boyunda kuyucukların absorbansları ölçülmüştür. Deneyler her grup için dört kuyucuk ile

yapılmış ve üç kez tekrarlanmıştır. Absorbans değerleri; kontrol bir kabul edilerek, deney gruplarından elde edilen değerler ile normalize edilmiştir.

3.4. NaV1.5 için Moleküler Analizler

3.4.1 İmmunblotlama ile Protein Ekspresyonu

FLC ve RNL ile FLC+RNL kombinasyonu uygulanan MDA-MB-231 hücrelerindeki Nav 1.5 proteinini görüntülemek üzere hücreler hem normoksik (%21 O₂) hem de hipoksik koşullarda (%2 O₂) kültüre edilmişlerdir.

Her iki ortamda FLC, RNL ve FLC+RNL kombinasyonu uygulanan hücreler RIPA tamponu kullanılarak lizis edilmiştir. Hücre lizatları santrifüj edilerek proteinler PAGE (Polyakrilamid Jel Elektroforezi) yöntemiyle ayrıştırılmıştır. Jeller, 10 cm'lik kasetlerde %10'luk ayırma jeli olarak hazırlanmıştır. Elektroforez işlemi 70 V'dan başlatılarak her 20 dakikada 10V artırılmış ve sonunda 100 V'da toplam 1,5 saatte tamamlanmıştır. Elektroforez işleminden sonra jelde ayrıştırılan proteinler nitroselüloz membrana transfer edilmiştir. Transfer işlemi, Beta actin için 300 A'da 40-45 dakika ve NAV 1.5 için ise 300 A'da 90 dakika süresince gerçekleştirilmiştir.

Beta-actin proteinine ait membran, %5'lik bloklama çözeltisi ile 1 saat boyunca bloke edilmiştir. Bloklama işleminin ardından membran, beta-actin primer antikoru ile inkübe edilmek üzere bir gece (yaklaşık 24 saat) bekletilmiştir. NaV1.5 proteinine ait diğer membran, %2'lik bloklama çözeltisi ile aynı şekilde 1 saat süreyle bloke edilmiştir. Daha sonra bu membran, primer antikoru nNav1.5 (Abcam) ile yine bir gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, membranlar ayrı ayrı yıkanmıştır: beta-actin membranı TBS-T ile, NaV1.5 membranı ise PBS-T ile toplamda 50 dakika boyunca (5 x ~10 dk) yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Yıkama sonrası her iki membran da peroksidaz konjuge sekonder antikor domuz anti-tavşan sekonder antikor ile inkübe edilmiştir. Protein bantlarının görüntülenmesi için membran kemiluminesans madde ile bir dakika muamele edilmiştir. Görüntüleme ve protein bantlarının yoğunluk analizi ImageJ© yazılımı ile gerçekleştirilmiş, elde edilen veriler grafik olarak sunulmuştur.

3.4.2. Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) ile Gen Ekspresyonu

Kantitatif real-time pcr (qRT-PCR) ile Nav 1.5 VGSC'nin gen ekspresyonunun değerlendirmesi için, hücreler hem normoksik hem de hipoksik koşullarda, FLC, RNL ve FLC+RNL kombinasyonu ile tedavi edilmiştir. Hücrelerden total RNA izolasyonu için TRIzol Reagent kullanılmıştır. Hücrelerin tripsin ile inkübasyonu sonrasında, santrifüj ile elde edilen hücre peleti TRIzol ile homojenize edilmiş ve faz ayrımı için kloroform eklenmiştir. İzopropanol ile çöktürme işlemi yapılarak RNA peleti elde edilmiş ve %75 etanol ile yıkandıktan sonra pelet, DEPC su ile çözülmüştür. Saf RNA eldesinden sonra, RNA'nın kantitatif ve kalitatif değerlendirilmesi, NanoDrop™ spektrofotometresi ile 260/280 nm absorbans oranı temel alınarak yapılmıştır (Diss ve ark. 2005, Chomczynski ve Sacchi, 2006).

İzolasyonu yapılan RNA rneklerinin bütünlüğü, %1'lik agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. Jel hazırlanırken 1 g agaroz, 1X TBE tamponunda eritilmiş ve çözeltiye RedSafe boya eklenmiştir. Katılaşan jellere, 1 kb marker , 2 L RNA ve 1 L yükleme boyası içeren karışımlar eklenmiştir. Elektroforez, 90 V'de 45 dakika boyunca yürütülmüş ve bantlar ultraviyole ışık altında UV transilluminatör ile görselleştirilmiştir.

Total RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) sentezi, iScript™ cDNA Synthesis Kiti (Bio-Rad) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 1000 ng RNA örneğine, 4 l 5x iScript reaction mix, 1 l Reverse Transkriptaz enzimi ve RNase-free water eklenerek toplam hacim 20 l'ye tamamlanmıştır. Karışım, retici firmanın protokolüne uygun olarak PCR cihazında 5 dakika 25°C, 30 dakika 42°C, 5 dakika 85°C sıcaklık döngülerine tabi tutulmuş ve son olarak 4°C'ye soğutulmuştur. Elde edilen cDNA rnekleri -20°C'de saklanmıştır (Zhou ve ark., 2022).

qrt pcr reaksiyonu için 1000 ng cDNA örneğine, 25 L SYBR Green mix, 1 L forward primer, 1 L reverse primer ve DH20 eklenerek toplam hacim 50 L'ye tamamlanmıştır. Primerler Nav 1.5 ve Beta Actin olarak iki grup halindeydi. Real-Time PCR cihazında yapılan analizlerde, 95°C'de 3 dakika süresince Taq polimeraz aktivasyonu gerçekleştirilmiş ardından 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 60°C'de 30 saniye primer bağlanma ve uzama aşamaları uygulanmıştır. Bu işlem, toplamda 40 döngüde

gerçekleştirilmiş, Nav 1.5 için amplifikasyon verileri, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemiyle analiz edilmiştir (Schmittgen ve Livak, 2008). Kullanılan primerler Tablo 3.1 'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan primerler.

Primer Adı	Primer Dizisi
Nav 1.5 Forward Primer	5'CACGCGTTCACTTTCCTTC3'
Nav 1.5 Reverse Primer	5'CATCAGCCAGCTTCTTCACA3'
Beta Actin Forward Primer	5'CAGCGGAACCGCTCATTGCCAAT3'
Beta Actin Reverse Primer	5'TCACCCACATFTGCCCATCTACGA3'

3.5. İstatistiksel Analiz

Her deney üç veya daha fazla tekrar ile elde edilen verilerden oluşmuş ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata (SE) şeklinde sunulmuştur. Gruplar arasındaki farklılıkların anlamlı olup olmadığını belirlemek için t-testi uygulanmıştır . Analizler Microsoft Excel programı ile gerçekleştirilmiş ve sonuçlar grafiklerle görselleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi, $P<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

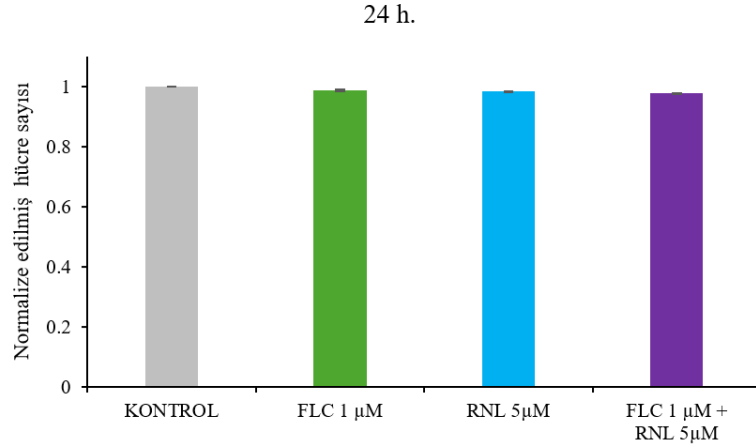
4. BULGULAR

Bu çalışmada, kardiyoloji alanında kullanılan Flecainide (FLC) ve Ranolazine (RNL) ile FLC+RNL kombinasyonunun MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde ekspresyonu artan Nav 1.5 üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmış olup, Nav1.5 protein ekspresyonunun protein seviyesi Western blot, mRNA ekspresyon seviyesi ise, qRT-PCR yöntemleri ile değerlendirilmiştir. İlaçların hem ayrı, ayrı hem de, kombinasyon şeklindeki etkisi, farklı O₂ oranlarında yetiştirilen hücrelerde ilaçların normoksi ve hipoksi ortamlarındaki etkileri de incelenmiştir.

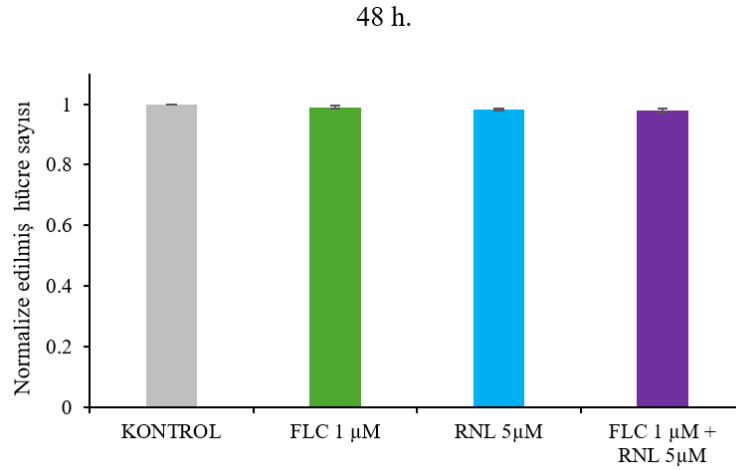
4.1. Hücre Proliferasyonu

Çalışmada kullanılan FLC ve RNL konsantrasyonları, daha önce yürütülen bir tez çalışmasında (Demirel 2023), MDA-MB-231 hücrelerinin lateral ve transvers hareketi üzerine etkileri değerlendirildiğinden ve toksik olmadıkları saptandığından bu araştırmada toksisite deneylerine yer verilmemiştir.

Yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerine, 24 ve 48 saat süreyle 1 μ M FLC ve 5 μ M RNL ile bu iki ilacın kombinasyonu olan FLC+RNL'nin 1 μ M+5 μ M konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen normalize edilmiş hücre sayıları Şekil 4.1 ve 4.2 de verilmiştir. Tek başına FLC veya RNL deney grubunun hücre proliferasyonu hem 24 hem de 48 saatlik uygulamalarda kontrol grubu ile benzerlik göstermektedir . İlaçların birlikte kombine bir şekilde uygulanması sonucunda da MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonu araştırılan her iki saatte de kontrol grubu ile paralel olduğu görülmekte ve gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı ($P>0,05$) izlenmektedir.



Şekil 4.1. FLC, RNL ve FLC+RNL kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi (24. saat).



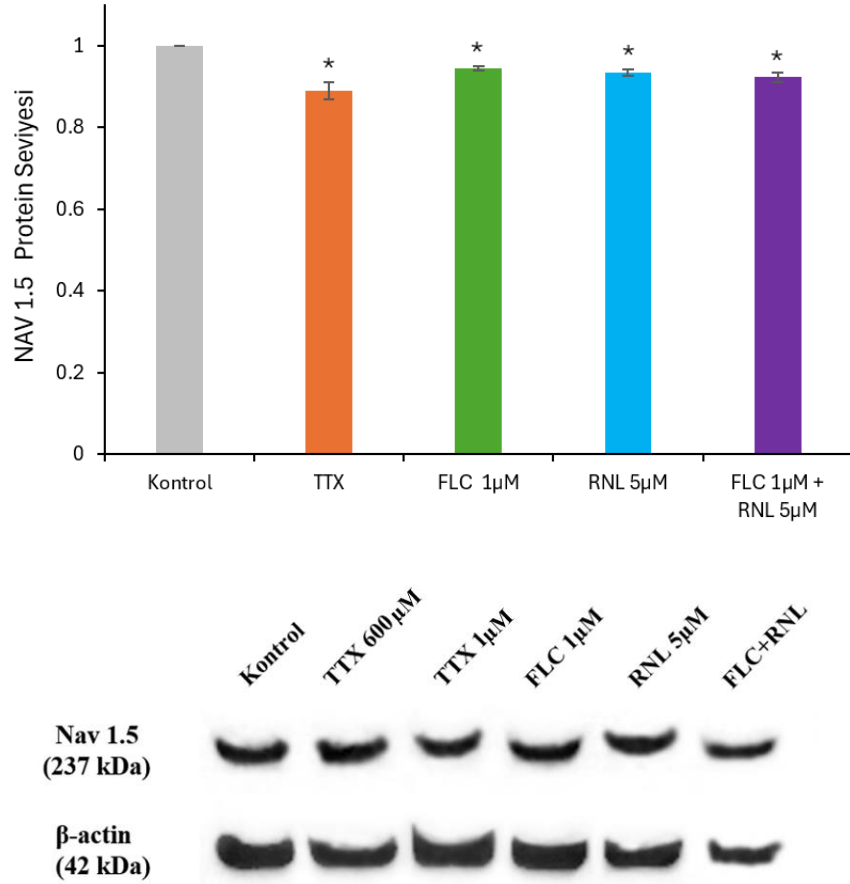
Şekil 4.2. FLC, RNL ve FLC+RNL kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi (48. saat).

4.2. Nav 1.5 Protein Miktarı.

4.2.1. Normoksi Koşulları

Yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerindeki Nav 1.5 protein miktarının belirlenmesi ve anti-aritmik ilaçların bu protein üzerine etkisi immunblotlama ile araştırılmıştır. İlaçların yanı sıra, pozitif kontrol olarak VGSC blokeri TTX (1 µM), houskeeping olarak da, β -actin kullanılmış ve istatistiki değerlendirme, her grubun Nav 1.5 ve β -actin bant

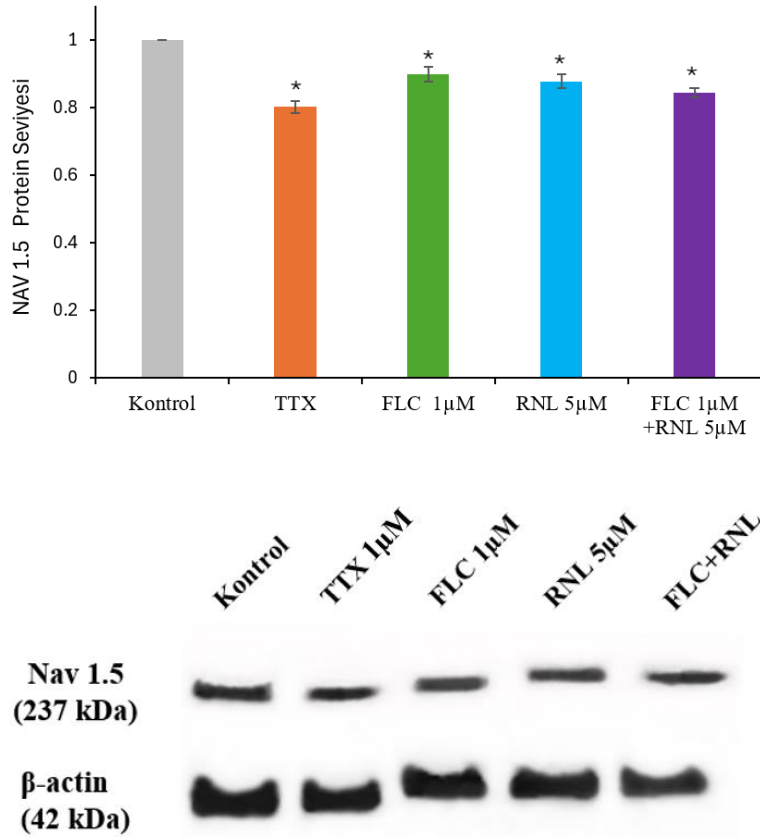
profiline göre yapılmıştır. Normoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin NaV1.5 protein ekspresyonuna FLC, RNL ve FLC+RNL kombinasyonunun etkileri ve bant görüntüleri Şekil 4.3 te verilmiştir. Analizden elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubuna oranla VGSC blokleri TTX, 1 μ M FLC ve 5 μ M RNL ilaçları ile FLC+RNL (1 μ M+5 μ M) kombinasyonunun NaV1.5 protein seviyesini inhibe ettiği ve bu inhibisyonun istatistik bakımdan anlamlı ($P < 0,05$) olduğu saptanmıştır. Bu durum, NaV1.5 protein bantlarından da görülmektedir. FLC+RNL kombine tedavi grubunun mrydana getirdiği inhibisyonun, ilaçların tek başına uygulanmasından biraz daha fazla olduğu dikkati çekmektedir.



Şekil 4.3. Normoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin Nav 1.5 protein ekspresyonuna TTX, FLC, RNL ve FLC+RNL kombinasyonunun etkileri ve bant görüntüleri (* $P < 0,05$).

4.2.2. Hipoksi Koşulları

%2 O₂ hipoksi ortamında MDA-MB-231 hücrelerindeki Nav 1.5 protein miktarına anti-aritmik ilaçların etkisi de değerlendirilmiş ve her grubun Nav 1.5 protein miktarları ve bant görüntüleri Şekil 4.4’de verilmiştir. Grupların Nav 1.5 ve β -actin bant profiline göre yapılan istatistik değerlendirmeler sonucunda, MDA-MB-231 hücrelerinin Nav1.5 protein ekspresyonunun sodyum kanal blokeri TTX uygulaması ile dikkat çekici olarak azaldığı (%20) saptanmıştır. Anti-aritmiklerden FLC, RNL ve FLC+RNL kombinasyonu ile tedavi sonucunda da Nav1.5 protein seviyesinin kontrol grubuna oranla azaldığı, görülen bu inhibisyonların istatistik bakımdan anlamlı ($P<0,05$) olduğu belirlenmiştir. Özellikle FLC+RNL kombine tedavi grubunun, ilaçların tek başına uygulanmasına kıyasla, Nav1.5 protein ekspresyonunu daha güçlü bir şekilde inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

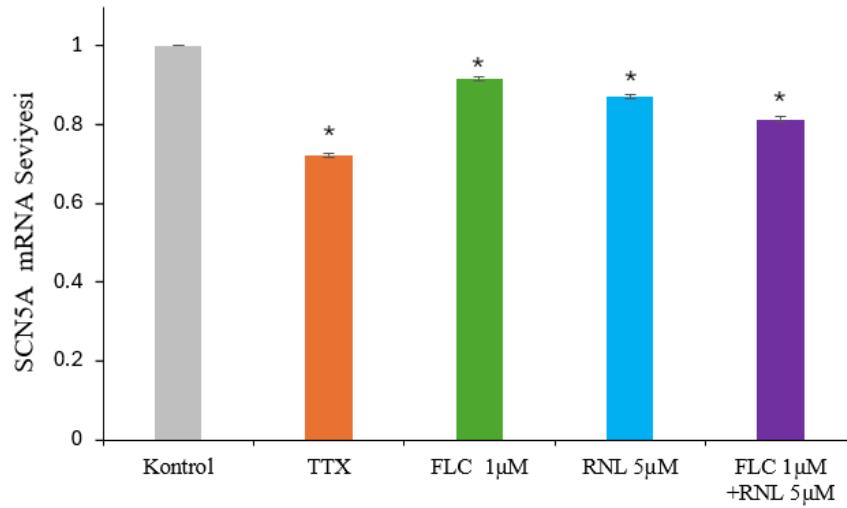


Şekil 4.4. Hipoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin Nav 1.5 protein ekspresyonuna FLC, RNL ve FLC+RNL kombinasyonunun etkileri ve bant görüntüleri (* $P < 0,05$).

4.3. Nav1.5 mRNA Miktarı.

4.3.1. Normoksi Koşulları.

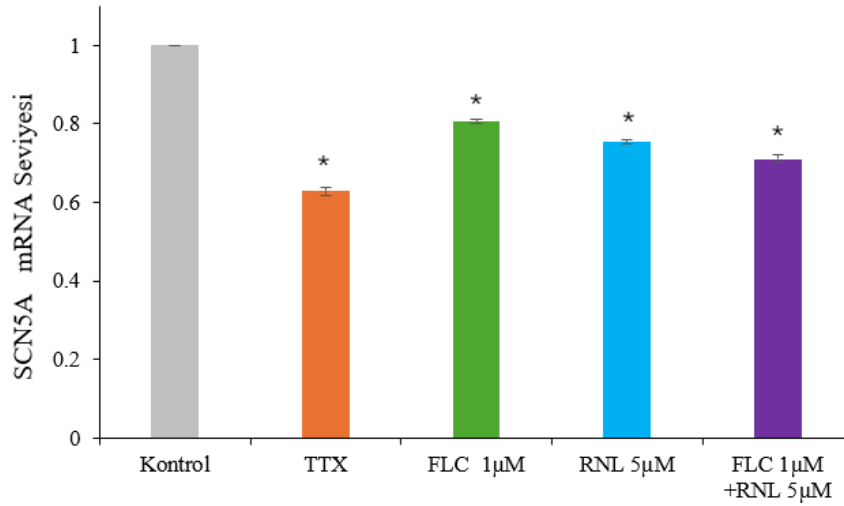
Normoksi koşullarında, FLC, RNL, FLC+RNL'nin yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinde Nav 1.5 protein ekspresyonunu düzenleyen SCN5A geninin mRNA seviyeleri, qRT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Pozitif kontrol olarak, TTX ve Housekeeping gen olarak β -actin kullanılmış ve tüm grupların cq değerleri, kontrol grubunun cq değerleri ile normalize edilmiştir (Şekil 4.5). Şekil 4.5 de görüldüğü gibi, MDA-MB-231 hücrelerinin SCN5A mRNA seviyeleri, TTX uygulaması ile kontrol grubuna oranla % 28 anlamlı ($P<0,05$) bir azalma göstermiştir. 1 μ M FLC uygulaması hücrelerin SCN5A mRNA seviyesini % 9 civarında azaltırken, 5 μ M RNL uygulaması ise, SCN5A mRNA seviyesini % 13 oranında anlamlı olarak ($P<0,05$) inhibe etmiştir. Bu anti-aritmiklerin kombinasyon şeklinde 1 μ M+5 μ M (FLC+RNL) olarak uygulanması sonucu inhibisyonun artarak, yaklaşık %20 ye ulaştığı gözlemlenmiştir ($P<0,05$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Normoksi koşullarında FLC, RNL ve FLC+RNL kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerindeki SCN5A ifadesine etkisi (* $P<0,05$).

4.3.1. Hipoksi Koşulları

Hipoksik koşullarda (%2 O₂), farmakolojik ajanların ayrı ayrı ve kombine olarak uygulanmasının, MDA-MB-231 hücrelerinin SCN5A geninin mRNA seviyesine etkisi Şekil 4.6 da verilmektedir. Pozitif kontrol olarak kullanılan TTX, hücrelerin SCN5A mRNA seviyelerinde kontrol grubuna oranla yaklaşık %37 oranında bir azalmaya neden olmuştur. 1 µM FLC tek başına, hipoksi koşullarında hücrelerin SCN5A mRNA seviyelerinde %19, yine, 5 µM RNL uygulanması tek başına %25 azalma (P<0,05) meydana getirmiştir. FLC + RNL şeklindeki kombinasyon uygulaması ise, MDA-MB-231 hücrelerinin SCN5A geninin mRNA seviyesine yaklaşık %30'luk anlamlı (P<0,05) bir inhibisyon oluşturmuştur (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Hipoksi koşullarında FLC, RNL ve ve FLC+RNL kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerindeki SCN5A ifadesine etkisi (* P<0,05).

TARTIŞMA

Meme kanseri, dünya genelinde yaygınlığı giderek artmakta ve Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı'nın (IARC) 2025 raporuna göre, mevcut eğilimler devam ederse, 2050 yılına kadar yıllık yeni vaka sayısının 3.2 milyona ulaşması beklenmektedir. Kansere kaynaklı ölümlerin büyük bir çoğunluğunun sekonder tümörlerden yani metastaz gelişiminden oluşmaktadır (Djamgoz ve Onkal, 2013, Koltai, 2015). Bu nedenle yüksek insidansa sahip meme kanserinde metastazı önlemeye yönelik yeni tedavi stratejilerine olan ihtiyaç giderek artmaktadır. Günümüzde meme kanserinin tedavisinde kanserin türüne, evresine ve hastanın genel sağlık durumuna göre cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi, hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapiler gibi çeşitli yaklaşımlar kullanılmaktadır.

Hücre membranlarında bulunan ve iyon geçişini düzenleyen proteinlerden olan VGSC'lerin çoğu kanalopatik hastalıklarda olduğu gibi, kanser hücrelerinde de aşırı şekilde eksprese edilerek, motilite ve invazyon gibi metastatik süreçleri desteklediği bilinmektedir (Djamgoz ve Onkal, 2013; Prevarskaya ve ark., 2018; Baldinotti ve ark., 2021, Horne ve ark., 2021). Meme kanserindeki SCN5A geni tarafından kodlanan NaV1.5 kanalı gibi iyon kanallarının, bazı ilaç veya ajanlarla inhibe edilmesi sonucu , kanser hücrelerinin hareketi ve dolayısıyla metastatik potansiyeli azalarak metastaz gelişimi engellenebilmektedir (Djamgoz ve ark., 2019; Brackenbury ve ark., 2020; Horne ve ark., 2021, Djamgoz, 2024). Bu alanda yapılan çalışmalar, VGSC'lerin moleküler bir belirteç olarak, metastatik süreçleri inhibe etme potansiyelini destekleyerek, NaV1.5 kanalının metastaz karşıtı tedavi stratejilerinde önemli bir hedef olduğunu ortaya koymaktadır (Horne ve ark., 2021; Yang ve ark., 2023).

Tümörlerdeki metastatik aktivite, aynı zamanda tümörün iç kısımlarında oluşan düşük oksijen yani hipoksi ile de yakından ilişkilidir. Hipoksi hem tümör mikroçevresi üzerinde hem de, hücre hareketinde aktif rol oynayan VGSC'ler üzerinde etki gösterir böylece, tedavi başarısını/sağ kalımı etkiler. Kansere hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu dolayısıyla da kanser metastazının VGSC ler ile kontrol edilmesi konusunda önem taşıyan

hem hipoksinin etkileri hem de ilaç veya ajanların etkileri konusunda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Çalışmada kardiyoloji alanında kullanılan ilaçlardan FLC ve RNL ile FLC+RNL kombinasyonunun yüksek metastatik MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde ekspresyonu yüksek olan Nav 1.5 VGSC üzerindeki etkileri ayrı, ayrı ve kombinasyon şeklinde değerlendirilmiştir. İlaçların Nav 1.5 aracılı olarak metastatik aktivite üzerindeki etkileri hem normoksi hem de, hipoksi olmak üzere iki farklı ortamda araştırılarak, Nav1.5 VGSC ilişkisi ortaya çıkarılmıştır. Demirel (2023) tarafından MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunu etkilemediği ifade edilen 1 μ M FLC ile 5 μ M RNL konsantrasyonları esas alınmış ve ilaçlar hem ayrı ayrı hem de kombinasyon şeklinde hücre proliferasyonunu etkilemediği belirlenmiştir.

Literatürde metastatik meme kanseri proliferasyonuna FLC etkilerinin incelendiği tek çalışma Demirel (2023) tarafından yapılmış ve 0,5-5 μ M FLC'nin hücrelerin proliferasyonu üzerinde bir etki göstermezken, 10 μ M dan itibaren inhibe ettiği ni belirtilmiştir. RNL etkisini de araştıran Demirel (2023) 1 μ M-50 μ M konsantrasyonun hücre proliferasyonu üzerinde etki meydana getirmediğini ifade etmiştir. RNL'nin etkisini hem in vitro hem de in vivo olarak araştıran Driffort ve ark., (2014) çalışmalarında 0,1-100 μ M konsantrasyonlarda RNL'nin hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etkisi bulunmadığını saptamışlardır. In vivo olarak, 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 ve ark., 2014). 0.625 μ M, 1.25 μ M, 2,5 μ M ve 5 μ M RNL etkilerinin MDA-MB-231 hücreleri üzerinde araştırıldığı bir in vitro çalışmada; 5 μ M RNL'in hücrelerin normoksik veya hipoksik koşullarda 48 saat boyunca hücre canlılığı veya çoğalması üzerinde herhangi bir etkisi göstermediğini ortaya konmuştur (Qiu ve ark., 2022).

FLC+RNL kombinasyonunun hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamış olmakla beraber, RNL'nin propranol ve minoksidil ile kombine etkilerinin araştırıldığı az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bir beta bloker olan 2,5 ve 25 μ M propranol ile 5 μ M RNL kombinasyonunun MDA-MB-231 hücreleri

üzerindeki etkileri araştırılmış ve hücrelerin proliferasyonu üzerinde bir etki meydana getirmediği saptanmıştır (Lee ve ark., 2019). Qiu ve ark. (2022) ise, RNL'nin potasyum kanal açıcısı olarak etki gösteren minoksidil ile kombinasyonunu meme kanseri üzerinde araştırmışlardır. Yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunda, 50 μ M minoksidil ile 5 μ M RNL kombinasyonunun bir etki oluşturmadığı saptanmıştır. Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki bu çalışmalarla paralellik içerisindedir.

Meme kanserinde metastatik aktivite ile ilişkilendirilen hücre membranındaki Nav 1.5 VGSC, moleküler analizlerle hem Nav 1.5 protein miktarı hem de SCN5A mRNA miktarı bakımından da normoksi ve hipoksi koşullarında araştırılmıştır. Normoksi koşullarında yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinin Nav 1.5 protein miktarı üzerinde, 1 μ M FLC %5, 5 μ M RNL %7 ve 1 μ M+5 μ M olarak uygulanan FLC+RNL kombinasyonu ise, %8 inhibisyon meydana getirmiştir. Hipoksi koşullarının Nav1.5 ekspresyonu üzerindeki inhibisyonu daha belirgin olup; 1 μ M FLC %10, 5 μ M RNL %12 ve 1 μ M+5 μ M FLC+RNL kombinasyon grubu %16 oranında inhibe etmiştir.

Sodyum kanal blokeri TTX, MDA-MB-231 hücrelerinin SCN5A mRNA miktarını normoksik koşulda %28, hipoksik koşulda %37 oranında baskımlarken, 1 μ M FLC ve 5 μ M RNL her iki ortam koşulunda da hücrelerin SCN5A ifadesini inhibe ettiği ancak, protein miktarlarında olduğu gibi, bu inhibisyonların hipoksik koşulda daha yüksek olduğu (FLC %19, RNL %25) saptanmıştır. FLC+RNL kombinasyonu ise, hücrelerin SCN5A mRNA miktarını normoksik koşulda %19, hipoksik koşulda ise, %29 inhibe etmiştir. Bu durum, her iki ilacın da hipoksi koşulunda SCN5A geni tarafından kodlanan hem Nav 1.5 protein miktarı hem de mRNA miktarı üzerinde normoksi koşula oranla daha güçlü bir inhibisyon meydana getirdiğini göstermektedir. Ayrıca, kombinasyon uygulanan grupta etkide görülen artış, FLC'nin, RNL etkisini artırdığını ve sinerjistik bir etki oluşturduğunu ortaya koymaktadır.

Literatürde FLC, RNL ve FLC+RNL kombinasyonunun meme kanseri hücrelerindeki SCN5A geni tarafından kodlanan Nav 1.5 protein miktarı ile mRNA miktarı üzerindeki etkilerini inceleyen, özellikle ilaçların hem ayrı ayrı hem de kombine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamakla beraber, ilaçların tek başına veya RNL'nin başka ilaçlar ile kombinasyonu üzerine az sayıda çalışma bulunmaktadır. FLC'nin meme

kanseri üzerindeki etkisini değerlendiren tek çalışmada Demirel (2023), 1 μ M FLC'nin ve 5 μ M RNL'nin ayrı ayrı MDA-MB-231 hücrelerinin metastatik aktivitesi üzerindeki etkilerini migrasyon, invazyon ve Nav1.5 protein miktarı parametreleri ile değerlendirmiş ve her iki ilacın da hücrelerin bu özelliklerini inhibe ettiğini, ancak FLC'ye oranla RNL'nin meydana getirdiği inhibisyonun daha yüksek olduğunu in vitro olarak ortaya koymuştur. Bu sonuçlara bağlı olarak, Demirel (2023) RNL ve FLC'nin meme kanseri metastazına yönelik bir tedavi seçeneği olabileceğini belirtmiştir.

Çalışmalarını hem in vitro hem de in vivo olarak sürdüren Drifford ve ark. (2014) 50 μ M RNL'nin, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin Nav1.5 akımını inhibe ettiğini ve yine Nav1.5 ile ilişkili hücrelerin invazyonunu azalttığını ortaya koymuşlardır. RNL nin metastaz üzerindeki etkilerini de in vivo olarak, immün sistemi baskılanmış (NMRI nude) farelerde araştırmışlardır. RNL tedavisinin hücrelerin Nav1.5 kanal aktivitesini inhibe ederek, akciğer kolonizasyonunu büyük oranda inhibe ettiğini göstermişlerdir. Drifford ve ark. (2014) ayrıca, Nav1.5 ifadesi olmayan shNav1.5 hücrelerinde invazyonun %33 oranında azaldığını saptamışlardır. shNav1.5 hücrelerinde, hem TTX hem de RNL uygulamasının hücre invazyonunu daha fazla azaltmaması üzerine, RNL'nin Nav1.5 ile ilişkili invazyonu inhibe etmede özgün olduğunu ifade etmişlerdir. Djamgoz ve Onkal (2013) MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin %2 oksijen içeren akut hipoksik ortamda hücrelerin artan invazyonunu 10 μ M TTX, 300 μ M RNL'nin baskıladığını göstermiştir. Özellikle, bu baskılamanın hücre proliferasyonunu etkilemeden Na⁺ kanallarını bloke ederek gerçekleştiği tespit edilmiştir. İnsan kolorektal kanser hücrelerinde de hipoksinin Nav 1.5 ile ilişkili olan hücre invazyonunu artırırken, RNL nin invazyon üzerinde inhibisyon meydana getirdiği bildirilmiştir (Guzel ve ark., 2019).

İn vivo olarak Sprague Dawley sıçanlarda gerçekleştirdiği bir çalışmada, iskemi/reperfüzyon modeli sonrasında RNL uygulaması ile kalp dokusundaki Nav1.5 protein seviyesinde %31,63 oranında azalma rapor edilmiştir (Wei ve ark., 2016). Bu durum, RNL'nin Nav1.5 inhibe edici bir potansiyele sahip olabileceğini in vivo olarak göstermektedir.

İnsan ve sıçan prostat kanserlerinde baskın olan VGSC Nav1.7 dir ve yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinde RNL hem normoksi hem de hipoksi koşullarında invazyonu

engeller ve akciğer metastazlarında NaV1.7 eksprese eden hücre sayısını azaltır (Rizaner ve ark., 2020). Mat-LyLu hücreleri ile oluşturulan Dunning model sıçan prostat kanserinde 2.5 ve 5 μ M RNL'in akciğerdeki metastazların sayısını %63 e kadar azalttığı ve sağ kalımı artırdığı, bu durumun RNL ile NaV1.7 kanal aktivitesinin inhibisyonu sonucu meydana geldiği bildirilmiştir (Buga ve ark., 2019).

Djamgoz ve ark.(2019) karsinomalarda RNL ile VGSC ifadesinin ve metastatik hücre davranışlarının baskılandığını ifade etmekte ve RNL'nin invazyonu/metastazı etkileme mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, RNL, VGSC'nin ısrarlı/persistent (INaP) akımını bloke ederek hücre hareketini ve invazyonu azaltabileceğini ileri sürmüşler ve bu şekilde, VGSC'nin hipoksi altında geliştirdiği ısrarlı akımın RNL tarafından bloke edilerek, tümör büyümesinin ve metastazın baskılanabileceği kanısına varmışlardır.

Son yıllarda RNL'nin, farklı ilaçlarla kombinasyon halinde kanser hücrelerine uygulanmasına yönelik çalışmalar da yapılmaktadır. Lee ve arkadaşları (2019) çalışmalarında, MDA-MB-231 hücreleri üzerinde hipoksik koşullarda beta bloker olan propranol ile RNL kombinasyonunu araştırmış ve propranolol'un tek başına nNav1.5 protein ekspresyonunu anlamlı şekilde inhibe ettiğini RNL + propranol kombinasyonunun tek başına RNL tedavisinde olan etkisinden daha az etkili olduğu belirtilmiştir. Djamgoz (2024) RNL + propranol kombinasyonunda görülen bu antagonistik etkinin olası nedeni olarak; her iki ajanın da kanalda aynı bağlanma bölgesi için rekabet ettiklerini göstermiştir. Bir K^+ kanal açıcısı olan minoksidil (10 μ M) ile 5 μ M RNL kombinasyonunu MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinde değerlendiren Qiu ve arkadaşları (2022) RNL'nin, tek başına doz bağımlı olarak hücrelerin invazyonunu inhibe ettiğini (2.5 μ M RNL %36, 0.625 μ M RNL %24), ve hipoksik ortamda inhibisyonun %30 oranına ulaştığını saptamışlardır. Elektrofizyolojik olarak minoksidil +RNL kombinasyonunun da doza bağlı olarak inhibisyon meydana getirdiğini ifade etmişlerdir. Hem RNL hem de FLC+RNL kombinasyonu ile MDA-MB-231 hücreleri üzerinde elde ettiğimiz sonuçlar, literatürdeki bu çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

RNL ile anti-PD-L1 immünoterapisinin melanoma modellerinde tümör büyümesini yavaşlatıp hayatta kalma süresini uzattığını, bu etkinin yağ asidi metabolizması ve interferon sinyal yolları ile ilişkili olduğunu bildiren Djamgoz (2024) RNL ile ilgili

mevcut kanıtları değerlendirmiş anti-metastatik bir ilaç olarak kullanılabileceğini bildirmiştir. İn vitro, in vivo ve insan çalışmaları RNL'nin yüksek metastatik hücrelerin hareketini/invazyonunu, metastazı baskılamada tutarlı bir rol üstlendiğini vurgulamıştır. Ayrıca özellikle hasta biyopsilerinde VGSC ekspresyonu görülen hastalarda RNL tedavisinin uygun olacağını bu amaçla, farklı ilaçlar ile kombinasyonlarının araştırılmasının önemli olduğunu vurgulamıştır.

Sonuç olarak, FLC, RNL ve FLC+RNL kombinasyonunun MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde ekspresyonu yüksek olan ve SCN5A geni tarafından kodlanan Nav 1.5 protein miktarı ile mRNA miktarı üzerindeki etkileri normoksi ve hipoksi koşullarında incelenmiştir. Moleküler analizler sonucu, i) hem FLC hem de RNL'nin ayrı ayrı NaV1.5 VGSC ekspresyonunu inhibe ettiğini ve RNL'nin FLC'ye oranla daha etkili olduğunu, ii) Ayrı ayrı kullanıma oranla, FLC+RNL kombinasyonunun daha etkili olduğu, dolayısıyla ilaçların sinerjik bir etki gösterdiklerini iii) İlaçların hipoksik koşullarda VGSC ekspresyonunu daha yüksek seviyede inhibe ettiğini ortaya koymuştur. NaV1.5 kanalının kanser hücrelerinin metastatik potansiyelinde rol aldığı ve iyon kanal blokeri anti-aritmik FLC+RNL kombinasyonu ile kanal ekspresyonunun hipoksi koşullarında daha yüksek oranda inhibe edildiğine dair ilk veriler saptanmış olup, metastatik aktiviteye karşı, bu terapötik potansiyelinin daha ayrıntılı olarak ve in vivo da araştırılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abd El-Aziz TM, Xiao Y, Kline J, Gridley H, Heaston A, Linse KD, Ward MJ, Rokyta DR, Stockand JD, Cummins TR, Fornelli L, Rowe AH. (2021) Identification and Characterization of Novel Proteins from Arizona Bark Scorpion Venom That Inhibit Nav1.8, a Voltage-Gated Sodium Channel Regulator of Pain Signaling. *Toxins* (Basel). Jul 18;13(7):501. doi: 10.3390/toxins13070501
- Alvarez, O. (2014). Ion channels: Functional and clinical aspects. *Neurochemistry International*, 74, 46-58.
- American Cancer Society. (2023). Breast Cancer Survival Rates. Retrieved from <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-survival-rates.html>
- Anderson, L.L., Thompson, C.H., Hawkins, N.A., Nath, R.D., Petersohn, A.A., Rajamani, S., Bush, W.S., Frankel, W.N., Vanoye, C.G., Kearney, J.A., & George, A.L., Jr (2014). Antiepileptic activity of preferential inhibitors of persistent sodium current. *Epilepsia*, 55(8), 1274–1283. <https://doi.org/10.1111/epi.12657>
- Antoniou, A.C., et al. (2003). "Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies." *American Journal of Human Genetics*, 72(5), 1117-1130.
- Arias, H.R. (2001). Nicotinic acetylcholine receptors and their role in synaptic plasticity. *Brain Research Reviews*, 35(1), 108-122.
- Ashraf, H., Ko Ko, N., Ladia, V., Agasthi, P., Prendiville, T., O’Herlihy, F., Pujari, S.H., Mulpuru, S.K., Scott, L., Sorajja, D., Tamargo, J., & López-Sendón, J. (2021). Use of flecainide in stable coronary artery disease: An analysis of its safety in both nonobstructive and obstructive coronary artery disease. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 21(6), 563–572.

- Aydın, U. (2021). Kanser Hücrelerinin Genetik Yapısı ve Mekanizmaları. October.
- Ayub, S.G., et al. (2014). "BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients of Kashmiri descent." *Molecular Medicine Reports*, 9(1), 114-121.
- Badwe, R.A., Bhattacharyya, S., Mitra, I., Shah, S., Banerjee, D., Shastri, S., Dinshaw, K.A. (2023). Effect of perioperative lidocaine infiltration on long-term survival in early-stage breast cancer patients: A randomized controlled trial. *Journal of Clinical Oncology*, 41(10), 1010-1018. <https://doi.org/10.1200/JCO.23.00418>
- Baldinotti, R., Sforna, L., Belia, S., Catacuzzeno, L., Franciolini, F., & Castigli, E. (2021). Ion channels and transporters in cancer: Future perspectives and clinical potential. *Frontiers in Oncology*, 11, 652042. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.652042>
- Baroudi, G., & Chahine, M. (2000). Biophysics of cardiac sodium channels. *Circulation Research*, 86(1), 1-9.
- Baselga, J., et al. (2012). "Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer." *New England Journal of Medicine*, 366(2), 109-119.
- Belardinelli, L., Shryock, J.C., & Fraser, H. (2006). Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: Effects of the late sodium current inhibitor ranolazine. *Heart*, 92(Suppl 4), iv6-iv14.
- Bhandari, A., Zheng, C., Sindhu, P., & Zhang, X. (2020). Hypoxia and its emerging therapeutic strategies in breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110494. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110494>
- Bhushan, R., Duffy, S.W., & Autier, P. (2021). "Screening and Mammographic Imaging for Breast Cancer Detection."
- Blake, S. J., et al. (2016). "Immune checkpoint inhibition in cancer." *The Journal of Clinical Investigation*, 126(7), 2545-2554.
- Borden, E.C. (2016). "Immune evasion in cancer: mechanisms and therapies." *Immunological Reviews*, 270(1), 1-10.

- Boyd, N.F., Guo, H., Martin, L.J., Sun, L., Stone, J., Fishell, E., ... & Yaffe, M.J. (2011). "Mammographic density and the risk and detection of breast cancer." *New England Journal of Medicine*, 356(3), 227-236.
- Brackenbury, W.J. (2007). Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *Channels*, 6(5), 352-361.
- Brackenbury, W.J. (2023). Voltage-gated sodium channels in cancer: Potential for tumour-specific therapies. *Cancer Letters*, 563, 216176. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.216176>
- Brackenbury, W.J. (2023). Voltage-gated sodium channels in cancer: Emerging roles and therapeutic opportunities. *Cancer Research Reviews*, 15(2), 123-139. <https://doi.org/10.1234/cancerrev.2023.01502>
- Brackenbury, W.J., Chioni, A.M., Diss, J.K., & Djamgoz, M.B.A. (2020). 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*, 180(2), 317–328. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05678-3>
- 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>
- Cardoso, F., Paluch-Shimon, S., Senkus, E., Curigliano, G., Aapro, M.S., André, F., & Gnant, M. (2023). *ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer*. *Annals of Oncology*, 34(3), 159–177. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2023.01.003>
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 7(1), 1-10.
- Catterall, W.A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: Structure, function, pharmacology, and epilepsy. *Trends in Neurosciences*, 35(9), 592-603.

- Catterall, W.A. (2018). "Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels." *Annual Review of Biochemistry*, 87, 75-100.
- Catterall, W.A., Goldin, A.L., & Waxman, S.G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 397–409. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.4>
- Celis, J.E., et al. (2009). "Apocrine breast carcinoma: A distinct clinical and molecular entity." *Journal of Pathology*, 216(2), 118-129.
- Chavez, K.J., Garimella, S.nV., & 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), 35-48.
- Chen, L., & Zhao, M. (2025). De novo protein design of modulators targeting human NaV1.5. *Biophysical Journal*, 118(3), 390–393. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2024.12.003>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2), 581–585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
- Clapham, D.E., et al. (2003). The TRP ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(8), 523-530.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2012). "Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118,964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies." *The Lancet Oncology*, 13(11), 1141-1151.
- 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>

- Demirel, M. (2023). Ranolazine ve Flecainide’ın Üçlü Negatif Meme Kanseri Hücreleri Üzerindeki Antimetastatik Etkisi (Yüksek lisans tezi, İstanbul Kültür Üniversitesi). Ulusal Tez Merkezi.
- Dent, R., et al. (2007). "Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence." *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4429-4434.
- Dhalla, A.K., Wang, W.Q., & Dow, J. (2009). Ranolazine: A novel antianginal agent with mechanisms of action distinct from traditional therapies. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 10(6), 1095-1100.
- Di Saverio, S., et al. (2008). "Pure mucinous breast carcinoma." *The Breast Journal*, 14(1), 61-67.
- Dib-Hajj, S.D., et al. (2013). "NaV1.7: a voltage-gated sodium channel at the intersection of pain and epilepsy." *Brain*, 136(12), 3423–3434.
- Ding, J., Wu, W., Fang, J., et al. (2018). Changes of breast cancer staging when AJCC prognostic staging manual is used: a retrospective analysis of a Chinese cohort. *International Journal of Biological Markers*, 33(4), 452–457. <https://doi.org/10.5301/ijbm.5000302>
- Djamgoz, M.B.A. (2024). Ranolazine: a potential anti-metastatic drug targeting voltage-gated sodium channels. *British Journal of Cancer*, 130(9), 1415–1419. <https://doi.org/10.1038/s41416-024-02622-w>
- 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>
- Djamgoz, M.B., & 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>
- Driffort V, Gillet L, Bon E, Marionneau-Lambot S, Oullier T, Joulin V, Collin C, Pagès JC, Jourdan ML, Chevalier S, Bougnoux P, Le Guennec JY, Besson P, Roger S.

- (2014) Ranolazine inhibits NaV1.5-mediated breast cancer cell invasiveness and lung colonization. *Mol Cancer*. Dec 11;13:264. doi: 10.1186/1476-4598-13-264.
- 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>
- 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* <https://doi.org/10.1038/SREP16758>
- Feng, S., et al. (2014). Src is a potential target for treating EGFR-targeted tyrosine kinase inhibitor-resistant breast cancer. *Cancer Letters*, 353(2), 211-220.
- Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*, 25(4), 581-611.
- Fisher, B., et al. (2004). "Tamoxifen for the prevention of breast cancer: Current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study." *Journal of the National Cancer Institute*, 96(9), 726-732.
- Foulkes, W.D., et al. (2010). "Inherited susceptibility to common cancers." *New England Journal of Medicine*, 363(23), 2238-2247.
- Foulkes, W.D., et al. (2010). "Triple-negative breast cancer." *New England Journal of Medicine*, 363(20), 1938-1948.
- Fraser, S.P., Diss, J.K.J., Chioni, A.-M., Mycielska, M.E., Pan, H., Yamaci, R.F., Djamgoz, M.B.A. (2005) Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical Cancer Research*, 11(15), 5381–5389. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0316>
- Friedenreich, C.M., et al. (2010). "Physical activity and cancer outcomes: A review of epidemiologic evidence and biologic mechanisms." *Cancer Causes & Control*, 21(7), 965-976.

- Grimes, J., Fraser, S.P., & Djamgoz, M.B.A. (1995). Functional expression of voltage-gated sodium channels in rat prostate cancer cell lines with different metastatic potential. *Journal of Cellular Physiology*, 164(3), 593–601. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041640321>
- Guzel, R.M., Park, K., Han, S., & Lee, S. (2021). Repurposing antiarrhythmic drugs for triple negative breast cancer: The roles of sodium channels and drug synergy. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 656447. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.656447>
- Guzel M, et al. (2019) “Predominant contribution of neonatal Nav1.5 under normoxia and hypoxia: Colorectal cancer invasiveness in vitro.” *J Cell Physiol*. May;234(5):6582–6593. doi:10.1002/jcp.27399
- 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(8), 6582–6593.
- Gould HJ 3rd, Norleans J, Ward TD, Reid C, Paul D. (2018) Selective lysis of breast carcinomas by simultaneous stimulation of sodium channels and blockade of sodium pumps. *Oncotarget*. Feb 26;9(21):15606-15615. doi: 10.18632/oncotarget.24581.
- Hanahan, D., & wu, R.A. (2011). "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." *Cell*, 144(5), 646-674.
- Harbeck, N., & Gnant, M. (2019). "Breast cancer treatment and survivorship: State of the art."
- Hirschhaeuser, F., Sattler, U.G.A., & Mueller-Klieser, W. (2011). Lactate: A Metabolic Key Player in Cancer. *Cancer Research*, 71(22), 6921–6925.
- Horne, L.J., Clarke, J.N., Pristerà, A., McCarthy, C.A., & Brackenbury, W. J. (2021). Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets for cancer metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 38(2), 139–160. <https://doi.org/10.1007/s10585-021-10063-w>

- House, C.D., Vaske, C.J., Schwartz, A. M., Obias, V., Frank, B., Luu, T., ... & Annunziata, C.M. (2021). Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Research*, 81(8), 2138–2151.
- Huang, J., Li, Q., Wang, Y., & Zhou, X. (2024). *Hypoxia-induced HIF-1 α signaling promotes tumor progression and resistance in breast cancer: therapeutic implications*. *Frontiers in Oncology*, 14, 1331355. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1331355>
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2024). *Breast cancer cases and deaths are projected to rise globally by 2050*. <https://www.iarc.who.int/news-events/breast-cancer-cases-and-deaths-are-projected-to-rise-globally/>
- Jiang LH, Adinolfi E, Roger S. Editorial: Ion Channel Signalling in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. 2020 , 10.3389/fphar.2021.711593
- Johnson, R.T., & Patel, N.S. (2021). Ranolazine and beta-blockers in non-obstructive coronary artery disease: A meta-analysis. *Cardiology Reviews*, 29(2), 98–106. <https://doi.org/10.5678/cr.2021.0292>
- Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P., & Starosławska, E. (2015). Breast cancer risk factors. *Przegląd menopauzalny Menopause review*, 14(3), 196–202. <https://doi.org/10.5114/pm.2015.54346>
- Koltai, T. (2015). Voltage-gated sodium channel as a target for metastatic risk reduction with re-purposed drugs. *F1000Research*, <https://doi.org/10.12688/f1000research.6789.1>
- Lakhani, S.R., et al. (2012). *WHO Classification of Tumours of the Breast*.
- Lambert, A.W., Pattabiraman, D.R., & Weinberg, R.A. (2021). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 21(3), 162–176. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00320-2>
- Lee A, Fraser SP, Djamgoz MBA. (2019) Propranolol inhibits neonatal Nav1.5 activity and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells: Effects of combination with

- ranolazine. *J Cell Physiol.* Dec;234(12):23066-23081. doi: 10.1002/jcp.28868. Epub 2019 Jun 21.
- Li, C. I., et al. (2003). "Risk of invasive breast carcinoma among women diagnosed with lobular carcinoma in situ." *Cancer*, 97(7), 1905-1912.
- Li, J., et al. (2022). "Molecular and clinical characteristics of invasive ductal carcinoma of the breast." *Clinical Cancer Research*, 28(2), 255-264.
- Ligibel, J.A. (2011). "Obesity and breast cancer." *The Oncologist*, 16(9), 1195-1203.
- Liu, S., Zhang, T., & Chen, L. (2024). *The impact of hypoxic tumor microenvironment on cancer metabolism and therapy resistance: A review of mechanisms and therapeutic strategies.* *Cancer Metastasis Reviews*, 43(1), 79–96. <https://doi.org/10.1007/s13402-024-00969->
- Lu, Z., Wang, Q., Hu, Y., Wang, S., Xiong, H., Zhang, C., & Xie, W. (2024). 14-3-3 ϵ /YWHAE regulates the transcriptional expression of cardiac sodium channel Nav1.5. *Heart Rhythm*. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2024.05.013>
- Marchal GA, Remme CA. Subcellular diversity of Nav1.5 in cardiomyocytes: distinct functions, mechanisms and targets. *J Physiol.* 2023 Mar;601(5):941-960. doi: 10.1113/JP283086. Epub 2022 Dec 19.
- Mazzone, M., Dettori, D., Leite de Oliveira, R., Loges, S., Schmidt, T., Jonckx, B., & Carmeliet, P. (2009). Heterozygous Deficiency of PHD2 Restores Tumor Oxygenation and Inhibits Metastasis via Endothelial Normalization. *Cell*, 136(5), 839–851.
- McCormack, V. A., & dos Santos Silva, I. (2006). "Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: A meta-analysis." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15(6), 1159-1169.
- McTiernan, A. (2003) "Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified?" *The Oncologist*, 8(4), 326-334.

- Mehrgou, A., & Akouchekian, M. (2016). "The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development." *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 30, 369.
- Mody, I., & Pearce, R. A. (2004). Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends in Neurosciences*, 27(9), 561-568.
- 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>
- National Cancer Institute (2023). "Breast Cancer Screening Tests."
- NaV1.5-CARED Consortium. (2023). NaV1.5-CARED: Regulation fine-tuning as a therapy for cardiac conduction and arrhythmic diseases at risk of sudden death. Retrieved from <https://www.nav15-cared.eu/>
- 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>
- Olukoya, A.O., Stires, H., Bahnassy, S., Persaud, S., Ma, S., Cruz, M. I., Rozeboom, A.M., Ceuleers, H., Berry, D.L., Jacobsen, B.M., Raj, G.V., Riggins, R.B. & Djamgoz, M. B. A. (2023). *Riluzole suppresses growth and enhances response to endocrine therapy in ER⁺ breast cancer. Journal of the Endocrine Society*, 7(10): bvad117. doi:10.1210/jendso/bvad117
- Oluyemi, E., Peshtani, A., White, M. J., & Cimino-Mathews, A. (2021). Radiologic and Pathologic Correlation of Invasive Lobular Carcinoma of the Breast. *Current Breast Cancer Reports*, 13(4), 319-330. <https://doi.org/10.1007/s12609-021-00434-y>
- Özmen, V., Özmen, T., & Doğru, V. (2019). Breast Cancer in Turkey; An Analysis of 20.000 Patients with Breast Cancer. *European journal of breast health*, 15(3), 141–146. <https://doi.org/10.5152/ejbh.2019.4890>

- Pandya S, Moore RG. Breast development and anatomy. Clin Obstet Gynecol. 2011 Mar;54(1):91-5. doi: 10.1097/GRF.0b013e318207ffe9.
- Park, Y.H., Lee, S.J., Cho, E.Y., Choi, Y., Lee, J.E., Nam, S.J., Yang, J.H., Shin, J.H., Ko, E.Y., Han, B.K., Ahn, J.S., & Im, Y.H. (2011). Clinical relevance of TNM staging system according to breast cancer subtypes. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 22(7), 1554–1560. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq617>
- Passarelli, M. N., et al. (2016). "Cigarette smoking before and after breast cancer diagnosis: mortality from breast cancer and smoking-related diseases." Journal of Clinical Oncology, 34(12), 1315-1322.
- Pedersen, S. F., & Stock, C. M. (2017). Ion Channels and Transporters in Cancer: Pathophysiology, Regulation, and Clinical Potential. *Cancer Research*, 77(7), 1551–1559.
- Poudel, P., Nyamundanda, G., Patil, Y. et al. Heterocellular gene signatures reveal luminal-A breast cancer heterogeneity and differential therapeutic responses. npj Breast Cancer 5, 21 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41523-019-0116-8>
- 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>
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2010). Ion Channels and the Hallmarks of Cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 16(3), 107–121.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2018). Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 24(2), 103–118. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.12.005>
- Qiu, Y., Zhu, P., Huang, L., Zhang, Y., Li, S., Wang, Z., & Wang, J. (2022). Functional modulation of ATP-sensitive potassium channels and voltage-gated sodium

- channels in triple-negative breast cancer cells: Effects on invasion and metastasis under hypoxic conditions. *Clinical & Experimental Metastasis*, 39(4), 295–310. <https://doi.org/10.1007/s10585-022-10166-7>
- 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>
- Rajamani S, Shryock JC, Belardinelli L. Block of tetrodotoxin-sensitive, Na(V)1.7 and tetrodotoxin-resistant, Na(V)1.8, Na⁺ channels by ranolazine. *Channels (Austin)*. 2008 Nov-Dec;2(6):449-60. doi: 10.4161/chan.2.6.7362. Epub 2008 Nov 7.
- Rakha, E.A., et al. (2008). "Histologic classification of breast cancer." *Histopathology*, 52(1), 58-70.
- Rakha, E.A., et al. (2011). "Metaplastic breast carcinoma: Current diagnostic and therapeutic approaches." *Breast Cancer Research and Treatment*, 126(3), 611-620.
- Rakha, E.A., Tse, G.M., & Quinn, C.M. (2023). An update on the pathological we classification of breast cancer. 5–16. <https://doi.org/10.1111/his.14786>
- Reis-Filho, J. S., et al. (2005). "Neuroendocrine tumors of the breast." *Histopathology*, 46(1), 57-66.
- Remme, C.A. (2013). "Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 61, 42–52.
- Remme, C.A. (2013). The cardiac sodium channel NaV1.5 and hereditary arrhythmia syndromes. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 27(1), 65-76.
- Rim, S.H., Plescia, M., Miller, J.W., Hall, I.J., Joseph, D.A., & White, A. (2024). Benefits and harms of mammography screening in women aged 40–49 years: A population-based study. *Journal of the National Cancer Institute*, 116(2), 225–234. <https://doi.org/10.1093/jnci/djad293>
- Rizaner, N., Uzun, S., Fraser, S.P., Djamgoz, M.B.A., & Altun, S. (2020). Riluzole and ranolazine inhibit invasion of rat prostate cancer Mat-LyLu cells via Nav1.7 under

- normoxic and hypoxic conditions. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 127(4), 254–264. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13417>
- Schmittgen, T.D., & Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108.
- Sergiyant, S., Smith, J., & Lee, K. (2020). Hypoxia-Driven Immune Escape in the Tumor Microenvironment. *Cells*, 9(4), 992. <https://doi.org/10.3390/cells9040992>
- Shay, J.W., Wright, W.E. (2005). Telomerase: a target for cancer therapy. *Cancer Cell*, 8(1), 3-9.
- Siegel, R. L., et al. (2023). "Cancer statistics, 2023." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17-48.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Wagle, N.S., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(1), 5–26. <https://doi.org/10.3322/caac.21835>
- Simmons, J. K., et al. (2015). "Animal models of bone metastasis." *Veterinary Pathology*, 52(3), 827-841
- Singletary, S.E., & Connolly, J.L. (2002). Breast cancer staging: Prognostic factors and therapeutic strategies. *Annals of Surgery*.
- Sinha, S., Farfel, A., Luker, K.E., Parker, B.A., Yeung, K.T., Luker, G.D., & Ghosh, P. (2024). Growth signaling autonomy in circulating tumor cells aids metastatic seeding. *PNAS Nexus*, 3(2), pgae014. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgae014>
- Smith, J.A., & Lee, K.H. (2025). Determining the impact of phosphorylation on Nav1.5 inactivation and cardiac excitability. *Biophysical Journal*, 118(3), 394–405. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2024.12.005>
- Sobin, L.H., & Gospodarowicz, M.K. (2010). *TNM Classification of Malignant Tumors*, 7th Edition. Wiley-Blackwell.
- Suckow, M.A., Gutierrez, L.S., Risatti, C.A., Wolter, W.R., Taylor, R.E., Pollard, M., Navari, R.M., Castellino, F.J., & Paoni, N.F. (2004). The anti-ischemia agent

- ranolazine promotes the development of intestinal tumors in APC^(Min/+) mice. *Cancer Letters*, 209(2), 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.01.007>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2023). Global cancer statistics 2023: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(4), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- Tamargo, J., & Lopez-Sendon, J. (2021). Ranolazine: A Better Understanding of Its Pathophysiology and Patient Profile to Guide Treatment of Chronic Stable Angina. *Future Cardiology*, 18(3), 235–251. <https://doi.org/10.2217/fca-2021-0058>
- Turner, N.C., & Wong, J.S. (2024). *PATINA trial: CDK4/6 inhibition delays progression in HER2+ HR+ advanced breast cancer*. *The Lancet Oncology*, 25(12), 1530–1540.
- Veronesi, U., Zurrada, S., Viale, G., Galimberti, V., Arnone, P., & Nolè, F. (2009). Rethinking TNM: a breast cancer classification to guide to treatment and facilitate research. *The breast journal*, 15(3), 291–295. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4741.2009.00719.x>
- Vogelstein, B., et al. (2013). "Cancer genome landscapes." *Science*, 339(6127), 1546–1558.
- Waks, A.G., & Winer, E.P. (2019). Breast cancer treatment: A review. *JAMA*, 321(3), 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Wang GK, Calderon J, Wang SY. (2008) State- and use-dependent block of muscle Nav1.4 and neuronal Nav1.7 voltage-gated Na⁺ channel isoforms by ranolazine. *Mol Pharmacol*. Mar;73(3):940-8. doi: 10.1124/mol.107.041541. Epub 2007 Dec 13.
- Wang, F., Zhao, Y., & Han, Y. (2024). *Hypoxia remodels glioma stem cell niche via pro-tumorigenic signaling and extracellular vesicle secretion*. *Acta Neuropathologica Communications*, 12(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s40478-024-01755-6>

- Wang, M., & Attardi, L. D. (2022). A balancing act: p53 activity from tumor suppression to pathology and therapeutic implications. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 17, 205–226. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-042320-025840>
- Wang, S.Y., Nau, C., & Wang, G.K. (2004). Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse local anesthetics and antiarrhythmics. *Current Pharmaceutical Design*, 10(25),3031–3044.DOI: 10.2174/1381612043383273
- Webb, B.A., Chimenti, M., Jacobson, M.P., & Barber, D.L. (2011). Dysregulated pH: A Perfect Storm for Cancer Progression. *Nature Reviews Cancer*, 11(9), 671–677.
- Weigelt, B., et al. (2014). "Metaplastic breast carcinoma: More than a special type." *Nature Reviews Cancer*, 14(1), 67-78.
- Weiss, A., Chavez-MacGregor, M., Lichtensztajn, D.Y., Yi, M., Tadros, A., Hortobagyi, G.N., & Smith, B.D. (2017). Survival by hormone receptor and HER2 status in breast cancer patients in the National Cancer Database. *Cancer*, 123(11), 2045–2056.
- Wen, H.Y., & Brogi, E. (2017). Lobular Carcinoma In Situ. *Surgical pathology clinics*, 11(1), 123–145. <https://doi.org/10.1016/j.path.2017.09.009>
- 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 Pharmacology*, 68(4), 269-279. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000412>
- World Health Organization (WHO). (2024). *Breast cancer cases projected to rise nearly 40% by 2050, WHO warns.* <https://www.ungeneva.org/en/news-media/news/2025/02/103638>
- World Health Organization. Health topics: cancer. Available from: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1.

- Wu, T., Dai, Y., Chen, W., & Xu, X. (2020). Tumor microenvironment and immune response in breast cancer: Latest advances and therapeutic implications. *Frontiers in Immunology*, 11, 627960. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.627960>
- Xia, Y., Zhao, R., & Zhou, L. (2020). "Histological Subtypes of Cancer and Their Clinical Implications." *Cancer Biology & Therapy*, 21(2), 123-134.
- Yang, K., & Nusse, R. (2024). *PCSK9 genetic variants and breast cancer metastatic potential*. *Cancer Genetics*, 298, 67–75.
- Yang, M., Kozminski, D.J., Wold, L.A., Modak, R., Calhoun, J.D., Isom, L.L., & Brackenbury, W. J. (2020). Therapeutic potential for phenytoin: targeting Nav1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in breast cancer. *Molecular Cancer*, 19, 100. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01217-1>
- Yang, M., Luo, R., Yang, C., & Li, B. (2023). SCN5A-mediated sodium current promotes the migration and invasion of breast cancer cells under hypoxic conditions. *Oncology Letters*, 25(2), 90. <https://doi.org/10.3892/ol.2023.13735>
- Yao, Y., Zhou, J., Wang, C., Zhang, Y., & Liu, T. (2019). HIF-1 α promotes the metastasis of breast cancer by regulating the expression of the chemokine receptor CXCR4. *Oncology Reports*, 41(3), 1787–1795. <https://doi.org/10.3892/or.2019.6933>
- Yeung, K.T., & Yang, J. (2017). Epithelial–mesenchymal transition in tumor metastasis. *Molecular Oncology*, 11(1), 28–39. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12017>
- Zhang, J.-M., & Zou, L. (2020). Alternative lengthening of telomeres: from molecular mechanisms to therapeutic outlooks. *Cell & Bioscience*, 10, 30. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00391-6>
- Zhang, Y., et al. (2017). Role of PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer. *Cancer Research*, 77(13), 3979-3989.
- Zhao, R., Wu, H., & Deng, G. (2024). *Modulation of immune responses by tumor hypoxia: Implications for cancer immunotherapy*. *Frontiers in Oncology*, 14, 1331355. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1331355>

- Zhou, L., et al. (2022). A novel RT-qPCR approach for rapid gene expression analysis in human cells. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 8770837. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.8770837>
- Zhou, L., Zhang, R., & Li, Y. (2023). Ranolazine attenuates oxidative stress and apoptosis in diabetic cardiomyopathy via the inhibition of late sodium current. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 488(1–2), 45–52. <https://doi.org/10.1007/s11010-023-04510-1>
- Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A. H., Tanaseichuk, O., Benner, C., & Chanda, S. K. (2019). Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nature Communications*, 10(1), 1523.
- Zhou, Z., Liu, X., Liu, X., He, L., & Han, S. (2022). TRP channels and cancer: A brief overview. *Frontiers in Oncology*, 12, 899318. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.899318>
- Zhu, H., & Doğan, B.E. (2021). American Joint Committee on Cancer's Staging System for Breast Cancer, Eighth Edition: Summary for Clinicians. *European journal of breast health*, 17(3), 234–238. <https://doi.org/10.4274/ejbh.galenos.2021.2021-4-3>