

T.C
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**İYON KANAL BLOKERİ ANTİARİTMİK AJANLARIN (ELECLAZİNE,
GS-967) ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNDEKİ
NAV1.5 VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALLARINA ETKİSİ:
ANTİMETASTATİK POTANSİYEL**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mine Yıldırım BORUCU

1600002545

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seyhan ALTUN

ŞUBAT 2024

T.C
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**İYON KANAL BLOKERİ ANTİARİTMİK AJANLARIN (ELECLAZİNE,
GS-967) ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNDEKİ
NAV1.5 VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALLARINA ETKİSİ:
ANTİMETASTATİK POTANSİYEL**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mine Yıldırım BORUCU

1600002545

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seyhan ALTUN

Jüri Üyeleri: Prof Dr. Engin KAPLAN

Dr. Öğr. Üyesi Özge RENCÜZOĞULLARI

ŞUBAT 2024

ÖNSÖZ

Lisans eğitimimden beri hep yanımda olan, değerli tecrübeleriyle bana hayatın her alanıyla ilgili kattığı her türlü yardımdan dolayı sevgili hocam Prof. Dr. Seyhan ALTUN'a

Tez dönemim boyunca beni yalnız bırakmayan sevgili arkadaşlarım Didem SEZGİN, Ebrar KARAKAYA, Sevgi ÖZTÜRK, İlknur SÜTÇÜ, Fatima MOSTAFA ve Meltem DEMİREL'e,

Her ayağım takılıp düştüğümde bana elini uzatan, bana güç veren ailem olan diğer tüm arkadaşlarıma,

Ve sevgili ailem canım annem Belkıs YILDIRIM BORUCU ve canım babam Cem BORUCU kendimi bulmama yardım ettiğiniz için ve geri kalan tüm destekleriniz için size çok teşekkür etmek isterim.

Şubat, 2024

Mine Yıldırım BORUCU

Bu çalışma BAP-2211 ile T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR.....	vi
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Meme Kanseri	3
2.2 Meme Kanseri Epidemiyolojisi	4
2.3 Risk Faktörleri	9
2.4 Meme Kanserinin Sınıflandırılması	11
2.5 Meme Kanseri Tanı ve Teşhisi	20
2.6 Meme Kanseri Evreleri	21
2.7 Meme Kanseri ve Metastaz	24
2.8 Kanserde Hipoksi	28
2.9 İyon Kanalları	30
2.10 Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları (VGSC)	34
2.11 Nav 1.5 Kanalı ve Kardiyak Aksiyon Potansiyeli	38
2.12 Eleclazine	46
2.13 GS-967	48
3. MATERYAL VE METOT	51
3.1 Hücreler	51
3.2 Hücrelerin Kültüre Edilmeleri	52
3.3 Farmakolojik Ajanların Hazırlanması	52
3.4 Büyüme ve Toksisite	53
3.4.1 Büyüme	53
3.4.2 Toksisite	54
3.5 Hücrelerin Proliferatif Özellikleri	55

3.5.1 Hücre Proliferasyonu.....	55
3.5.2 Koloni oluşumu	55
3.6 Metastatik Potansiyel	56
3.6.1 Lateral Hareket (Migrasyon=Motilite)	56
3.6.2 Transvers Hareket	57
3.7 Moleküler Analizler	58
3.7.1 İmmünoablota.....	58
3.7.2 Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Analizi (QRT-PCR)	58
3.8 İstatistiksel Analiz.....	59
4. BULGULAR	60
4.1 Toksisite	60
4.2 Hücre Proliferasyonu	61
4.2.1 Normoksi Koşulları.....	61
4.2.2 Hipoksi Koşulları	66
4.2.3 Proliferatif özelliklerin Değerlendirilmesi	71
4.3 Metastatik Potansiyelin Değerlendirilmesi	73
4.3.1 Normoksi Koşulları.....	73
4.3.2 Hipoksi Koşulları	79
4.4 Moleküler Analizler	84
4.4.1 Normoksi Koşulları.....	84
4.4.2 Hipoksi Koşulları	86
4.5 Metastatik Potansiyelin Değerlendirmesi.....	88
4.6 Moleküler Değerlendirme	90
5. TARTIŞMA	93
KAYNAKÇA	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

KISALTMALAR

AP:	Aksiyon Potansiyeli
BRCA1:	Meme kanseri A1 geni
BRCA2:	Meme kanseri A2 geni
BSA:	Sığır serum albumin
BT:	Bilgisayarlı tomografi
CSC:	Kanser kök hücresi
DMSO:	Dimetil sülfoksit
ECIS:	Avrupa kanser bilgi sistemi
EDTA:	Etilen diamin tetraasetik asit
ELE:	Eleclazine
ER:	Östrojen reseptör
FBS:	Fetal sığır serum
HER2:	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HIF1 α :	Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 α
IARC:	Uluslararası kanser araştırma ajansı
INAL:	Geç sodyum akımı
INAP:	Erken sodyum akımı
MRI:	Manyetik rezonans görüntüleme
MTT:	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
PBS:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PET:	Pozitron emisyon tomografisi
PHN:	Fenitoin
RNL:	Ranolazine
SDS:	Sodyum dodesil sülfat

SDS-PAGE:	Sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi
TBS:	Tris tamponlu tuz çözeltisi
TBS-T:	TBS Tween
TEMED:	Tetrametiletildiamin
TNBC:	Üçlü negatif meme kanseri
TNF:	Tümör nekroz faktör
TTX:	Tetrodotoksin
VGIC:	Voltaj kapılı iyon kanalları
VGSC:	Voltaj kapılı sodyum kanalı
V _m :	Membran potansiyeli
WHO:	Dünya sağlık örgütü

SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

Cl⁻: Klor

H⁺: Hidrojen

Na⁺: Sodyum

P⁺: Potasyum

μl: Mikrolitre

μM: Mikromolar

kDA: Kilodalton

L: Litre

M: Molar

mM: Milimolar

mL: Mililitre

mA: miliamper

pH: Hidrojen kuvveti

rpm: Dakikadaki dönüş sayısı

rcf: Bağlı santrifüj kuvveti

V: Volt

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Meme Anatomisi.....	17
Şekil 2.2 Tahmini yeni kanser vakaları ve cinsiyete göre ölümler için önde gelen on kanser türü, Amerika Birleşik Devletleri, GLOCAN 2022.....	18
Şekil 2.3 Amerika Birleşik Devletlerinde, 2000-2019 yıllarında ırk / etnik kökene göre kadın meme kanseri insidans oranları White: Beyaz, Black: Siyahi, AIAN: Asyalı, Hispanic: Hispanik, API: Asya Pasifik Adalı.....	19
Şekil 2.4 Irk / etnik kökene göre kadın meme kanseri ölüm oranlarındaki eğilimler, Amerika Birleşik Devletleri, 1975-2020.....	19
Şekil 2.5 AB üye ülkelerinde 2020 yılında teşhis edilen kanserlerin dağılımı (ECIS – Avrupa Kanser Bilgi Sistemi, 2020)	20
Şekil 2.6 Meme Kanserin Histolojik Sınıflandırılması	21
Şekil 2.7 Non- invaziv meme karsinomalarının histolojik görünümüleri (a) LCIS, (b) DCIS (Pinder, 2010, Vickery ve Biernacka, 2022).....	22
Şekil 2.8 IDC Histolojik görünümü (Oluyemi v.d., 2021).....	14
Şekil 2.9 ILC Histolojik görünümüleri (Oluyemi v.d., 2021).....	28
Şekil 2.10 Medüller karsinom Histolojik görünümü (Zhang, 2021)	28
Şekil 2.11 Metaplastik karsinom histolojik görünümü (Zhang, 2021)	15
Şekil 2.12 Apokrin karsinom histolojik görünümü (Kito v.d., 2014)	316
Şekil 2.13 Müsinöz karsinom histolojik görüntüsü (LaBoy ve Siziopikou, 2022)	32
Şekil 2.14 Kribriform karsinom histolojik görüntüsü (Tozbikian, 2022)	34
Şekil 2.15 Tübüler karsinom histolojik görüntüsü (Brown Biology and Medicine).....	35
Şekil 2.16 Nöroendokrin karsinom histolojik görüntüsü (Li ve Tse, 2022)	35
Şekil 2.17 Metastaz sürecinin şematik bir modeli (McGee, 2010).	36
Şekil 2.18 Hücrelerin EMT ve MET geçişlerinin şematik gösterimi (Hill ve Yang, 2020)....	37
Şekil 2.19 DTC'lerin dormansi ve metastatik süreci (Sosa v.d., 2014)	38
Şekil 2.20 Tümörün hipoksi ve normoksi bölgeleri (Djamgoz ve Onkal, 2013)	39
Şekil 2.21 Kapılarına göre iyon kanalları tipleri (Kulbacka v.d., 2017)	42
Şekil 2.22 Hücre Tiplerinin Membran Potansiyelleri Dereceleri (Sheth ve Esfandiari, 2022)	43
Şekil 2.23 VGSC Yapısı (Fraser v.d., 2014)	44
Şekil 2.24 Nav1.5 iyon kanalının homoloji modelinin 3 boyutlu yapısı, (A) yandan görünüş ve (B) üstten görünüş gösterimi (Rajamani v.d., 2016)	45
Şekil 2.25 DIII ve DIV arasındaki IFM motifi (Stojilkovic v.d., 2022)	46
Şekil 2.26 Kalp Kasının Aksiyon Potansiyeli (Sundjaja ve Makaryus, 2023).....	48

Şekil 2.27 Normal ve Normal Olmayan Geç Sodyum Akımı (Rajamani v.d., 2013).....	49
Şekil 2.28 Eleclazine kimyasal formülü (Pubchem)	60
Şekil 2.29 Lidocaine'in bağlanma noktası (Zhu v.d., 2021)	60
Şekil 2.30 GS-967 Kimyasal Formülü (Pubchem).....	61
Şekil 3.1 Üçlü negatif meme kanseri (A) Yüksek metastatik MDA-MB-231 hücreleri, (B) Düşük metastatik MCF-7 hücreleri.....	61
Şekil 3.2 (C) MDA-MB-231 florasan boya ile Nav 1.5 gösterimi, (D) MCF-7 florasan boya ile Nav 1.5 gösterimi (Gould v.d., 2018)	62
Şekil 3.3 MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin hücre sayısı ile absorbands arasındaki ilişki.....	63
Şekil 3.4.MCF-7 meme kanseri hücrelerinin hücre sayısı ile absorbands arasındaki ilişki.....	54
Şekil 3.5 Wound healing deneyi için petrinin tabanına yapılan çizim.....	69
Şekil 3.6 Transwell hareket deney protokolü.....	70
Şekil 4.1 ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki toksisitesi (*P<0,05)	72
Şekil 4.2 ELE ve GS-967'nin MCF-7 hücreleri üzerindeki toksisitesi(*P<0,05).....	72
Şekil 4.3 ELE'nin normoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerini proliferasyonuna etkisi.....	72
Şekil 4.4 ELE'nin normoksi koşullarında MCF-7 hücrelerini proliferasyonuna etkisi.....	72
Şekil 4.5 GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna normoksi koşullarında etkisi (*P<0,05)	73
Şekil 4.6 GS-967'nin MCF-7 hücrelerinin proliferasyonuna normoksi koşullarında etkisi (*P<0,05).....	74
Şekil 4.7 ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerin normoksi koşullarında koloni oluşumuna etkilerinin yüzdesi (*P<0.05).....	77
Şekil 4.8 Normoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin koloni pleyti(A) Kontrol, B) 0,5 µM ELE, C) 0,05 µM GS-967, D) TTX, E) 1 µM, F) 0,1 GS-967.....	77
Şekil 4.9 Hipoksi koşullarında ELE'nin MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi (*P<0.05).....	78
Şekil 4.10 Hipoksi koşullarında ELE'nin MCF-7 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi (*P<0.05).....	79
Şekil 4.11 Hipoksi koşullarında GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi(*P<0.05).....	79

Şekil 4.12 Hipoksi koşullarında GS967'nin MCF-7 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi(*P<0.05)	80
Şekil 4.13 ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin koloni sayısına etkisi.	81
Şekil 4.14 Hipoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin koloni pleyti (A) Kontrol, B) 0,5 µM ELE, C) 0,05 µM GS-967, D) TTX, E) 1 µM, F) 0,1 GS-967	83
Şekil 4.15 Normoksi ve hipoksi koşullarında MDA-MB-231 hücre proliferasyonuna ELE'nin etkisi.....	83
Şekil 4.16 Normoksi ve hipoksi koşullarında MDA-MB-231 hücre proliferasyonuna GS-967'nin etkisi.....	83
Şekil 4.17 MDA-MB-231 hücrelerinin normoksi ve hipoksi koşullarında koloni sayılarına etkisi (Düz renk normoksi, desenli hipoksi) (* P>0,05)	84
Şekil 4.18 ELE'nin normoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonuna etkisi etkisi(*P>0,05)	85
Şekil 4.19 GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonuna normoksi koşullarında etkisi	86
Şekil 4.20 ELE'nin MCF-7 hücrelerinin migrasyonuna normoksi koşullarında etkisi.....	87
Şekil 4.21 GS-967'nin MCF-7 hücrelerinin migrasyonuna normoksi koşullarında etkisi.....	88
Şekil 4.22 ELE ve GS-967 uygulaması sonucu normoksi koşullarda invazive olan MDA-MB-231 hücrelerinin görüntüsü	89
Şekil 4.23 ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231ve MCF-7 hücrelerinin invazyonuna normoksi koşullarında etkisi	90
Şekil 4.24 ELE'nin hipoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonuna etkisi (* P>0,05).....	90
Şekil 4.25 GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonuna etkisi	91
Şekil 4.26 ELE'nin hipoksi koşullarında MCF-7 hücrelerinin migrasyonuna etkisi.....	92
Şekil 4.27 GS-967'nin hipoksi koşullarında MCF-7 hücrelerinin migrasyonuna etkisi	93
Şekil 4.28 Hipoksi koşullarda ELE ve GS-967 uygulanması sonucu invaze olan MDA-MB-231 hücreleri.....	94
Şekil 4.29 Hipoksi koşullarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin invazyonuna etkisi (*P<0,05).....	94

Şekil 4.30 Normoksi koşullarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerindeki Nav 1.5 proteinine etkisi ve bant görüntüleri (A) MDA-MB-231, (B) MCF-7 (Düz: MDA-MB-231, desenli: MCF-7)(* P<0,05).....	96
Şekil 4.31 Normoksi koşullarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerindeki SCNA5 ifadesine etkisi (* P<0,05).....	98
Şekil 4.32 Hipoksi koşullarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerindeki Nav 1.5 proteinine etkisi ve bant görüntüleri (A) MDA-MB-231, (B) MCF-7 (Düz: MDA-MB-231, desenli: MCF-7) (* P<0,05)	99
Şekil 4.33 Hipoksi koşullarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerindeki SCNA5 ifadesine etkisi (*P<0,05).....	100
Şekil 4.34 Normoksi ve hipoksik koşullarda ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin motilitesine etkileri (Düz renk normoksi, desenli hipoksi koşulları) (*P<0,05).....	101
Şekil 4.35 Normoksi ve hipoksi koşullarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonuna (Düz renk normoksi, desenli hipoksi) (*P<0,05).....	102
Şekil 1.36 Normoksi ve hipoksi koşullarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin Nav 1.5 protein miktarına etkisi (düz renk normoksi, desenli hipoksi) (*P<0,05)	103
Şekil 4.37 Normoksi ve hipoksi ortamlarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin SCNA5 ekspresyonuna etkisi (düz renk normoksi, desenli hipoksi) (*P<0,05).....	104

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	22
Tablo 2.2 Meme Kanserinin Moleküler Alt Tipleri	18
Tablo 2.3 TNM sisteminde T1, 2, 3 ve 4 açılımları	22
Tablo 2.4 TNM sisteminde N0, 1, 2, 3, 4 açılımları	23
Tablo 2.5 TNM sisteminde M0, 0 i+, 1 açılımları	23
Tablo 2.6 Meme Kanseri evrelendirilmesi	24
Tablo 2.7 Antiaritmik ilaç sınıflandırılması (King v.d., 2022)	45
Tablo 3.1 Kullanılan primerler	72
Tablo 4.1 ELE ve GS-967'nin hücrelerin normoksi koşullarında koloni yüzdesi üzerindeki etkisi (* P<0.05).....	64
Tablo 4.2 ELE ve GS-967'nin hücrelerin hipoksi koşullarında koloni yüzdesi üzerindeki etkisi (* P<0.05).....	68
Tablo 4.3 ELE ve GS-967'nin normoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerindeki motilite indeksi motilite değişimi (%)	72
Tablo 4.4 ELE ve GS-967'nin normoksi koşullarında MCF-7 hücrelerindeki motilite indeksi ve motilite değişimi (%).....	74
Tablo 4.5 ELE ve GS-967'nin hipokside MDA-MB-231 hücrelerindeki motilite indeksi ve motilite değişimi (%).....	78
Tablo 4.6 ELE ve GS-967'nin hipokside MCF-7 hücrelerindeki motilite indeksi ve motilite değişimi (%).....	80

ÖZET

Meme kanseri dünyada ve ülkemizde en yaygın görülen kanserden biridir ve dünya çapındaki tüm yeni kanser vakalarının %12,5'ini oluşturmaktadır. Kişiler çoğunlukla metastaz nedeniyle kaybedilmektedir. Dolayısıyla metastazın azaltılması, kanser hastalarının hem hayatta kalma süresini hem de yaşam kalitesini önemli derecede artırabilecektir. Yapılan çalışmalar iyon biri de hücre membranında bulunan, asıl görevi kalp ve nöron gibi uyarılabilen hücrelerin aksiyon potansiyelinin oluşmasında rol oynayan voltaj kapılı sodyum kanalları (VGSC) dır. Yüksek metastatik meme kanseri hücrelerindeki VGSC ekspresyonunun, düşük metastatik meme kanseri hücrelerine kıyasla arttığı tespit edilmiştir. VGSC'lerin alt birimlerinden olan Nav 1.5'in artan ekspresyonunun, özellikle meme kanserinde hastalığın ilerlemesi ve metastaz oluşumu ile ilişkili olduğu konusunda çalışmalar bulunmaktadır. Long QT sendromu, atriyal fibrilasyon gibi kalp hastalıkları ile bazı nörolojik hastalıkların tedavilerinde VGSC'leri bloke etme mekanizmasına sahip ilaç grupları bulunmaktadır. Antiaritmikler ve antiepileptikler asıl kullanım amaçları dışında yüksek VGSC ekspresyonu gösteren kanser hücrelerinin invazivliğini inhibe ettiği birçok araştırmada raporlanmıştır.

Yeni anti-aritmik ilaç adayı, VGSC inhibitörü Eleclazine (ELE) ve GS-967'nin anti-aritmik lidokain ve ranolazine'den çok daha etkili Na^+ kanal blokeri olduğu kalp hücreleri ile yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. VGSC'lerin meme kanseri hücreleri üzerindeki metastatik potansiyelinin artmasına katkı sağladığı bilindiğinden yeni nesil antiaritmik ajanlar ELE ve GS-967'nin farklı metastatik özelliklere sahip MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin metastatik potansiyeli üzerindeki etkilerinin normoksi ve hipoksi ortamlarında araştırılması amaçlanmıştır.

Ajanların yüksek metastatik MDA-MB-231 ve düşük metastatik MCF-7 meme kanseri hücre hatlarının normoksi ve hipoksi şartlarında hücre proliferasyonuna etkileri MTT yöntemi ile, metastatik aktiviteye olan etkileri; hücrenin motilitesi yara açma, invazyonu ise, Boyden Chamber deneyi ile değerlendirilmiştir. Ajanların Nav1.5 protein miktarına etkisi immüno blotlama, Nav1.5 ekspresyonuna etkisi ise qRT-PCR ile gerçekleştirilmiştir.,

Çalışmada hücre proliferasyonunu etkilemeyen ELE (0,5 μM ve 1 μM) ve GS-967 (0,05 μM ve 0,1 μM) konsantrasyonlarının yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinde, düşük metastatik MCF-7 hücrelerine göre, hücre motilite ve invazyonu üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Nav 1.5 VGSC'yi inhibe ederek gösterdiği bu etkinin normoksi koşullarına oranla, hipoksida daha fazla olduğu moleküler olarak da belirlenmiştir.

Sonuç olarak, VGSC blokeri olan antiaritmik ELE ve GS-967'nin yüksek metastatik MDA-MB-231 ile düşük metastatik MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde Nav 1.5 VGSC yi hedef alan ve metastatik potansiyelin ilk kez değerlendirildiği bu çalışmada; (1) ELE ve GS-967'nin diğer antiaritmiklere göre, Nav1.5 VGSC'yi daha düşük dozlarda bloke ettiği (2) bu blokasyonun normoksiye oranla hipoksi koşullarında daha etkili olduğu (3) GS-967'nin Nav 1.5'i daha düşük konsantrasyonlarda bloke ettiği (4) hatta GS-967'nin bu etkisinin TTX'e yakın olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, MDA-MB-231, MCF-7, VGSC, Nav 1.5 Eleclazine, GS-967



The Effect Of Ion Channel Blocker Antiarrhythmic Agents (Eleclazine, GS-967) On Nav1.5 Voltage Gated Sodium Channels In Triple Negative Breast Cancer Cells: Antimetastatic Potential

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most common cancers in the world and in our country, accounting for 12.5% of all new cancer cases worldwide. Most people die from metastasis. Therefore, reducing metastasis could significantly improve both the survival and quality of life of cancer patients. Studies show that ion channels have effects on cancer development and progression. One of these is voltage-gated sodium channels (VGSCs), which are located in the cell membrane and whose main function is to generate the action potential of excitable cells such as the heart and neurons. VGSC expression in high metastatic breast cancer cells was found to be increased compared to low metastatic breast cancer cells. There are studies showing that increased expression of Nav 1.5, a subunit of VGSCs, is associated with disease progression and metastasis formation, especially in breast cancer. There are drug groups that work with the mechanism of blocking VGSCs in the treatment of heart diseases such as Long QT syndrome, atrial fibrillation and some neurological diseases. Antiarrhythmics and antiepileptics have been reported in many studies to inhibit the invasiveness of cancer cells that show high VGSC expression outside their primary use.

The new anti-arrhythmic drug candidate, the VGSC inhibitor Eleclazine (ELE) and GS-967, were found to be much more effective Na⁺ channel blockers than the anti-arrhythmic lidocaine and ranolazine in studies with cardiac cells. Since it is known that VGSCs contribute to the increase in the metastatic potential of breast cancer cells, it was aimed to investigate the effects of new generation antiarrhythmic agents ELE and GS-967 on the metastatic potential of MDA-MB-231 and MCF-7 cells with different metastatic properties in normoxia and hypoxia environments.

The effects of the agents on cell proliferation of high metastatic MDA-MB-231 and low metastatic MCF-7 breast cancer cell lines under normoxia and hypoxic conditions were evaluated by MTT method, and their effects on metastatic activity; cell motility, wounding and invasion were evaluated by Boyden Chamber assay. The effect of the agents on the amount of Nav1.5 protein was determined by immunoblotting and the effect on Nav1.5 expression was determined by qRT-PCR,

The study revealed that ELE (0.5 μ M and 1 μ M) and GS-967 (0.05 μ M and 0.1 μ M) concentrations, which did not affect cell proliferation, had an inhibitory effect on cell motility and invasion in high metastatic MDA-MB-231 cells compared to low metastatic MCF-7 cells. It was also molecularly determined that this effect of Nav 1.5 by inhibiting VGSC was greater in hypoxia compared to normoxia conditions.

In conclusion, in this study, which targeted Nav 1.5 VGSC on highly metastatic MDA-MB-231 and low metastatic MCF-7 breast cancer cells and evaluated the metastatic potential of the antiarrhythmic VGSC blockers ELE and GS-967 for the first time; (1) ELE and GS-967 blocked Nav1.5 VGSC at lower doses compared to other antiarrhythmics (2) this blockade was more effective under hypoxia conditions compared to normoxia (3) GS-967 blocked Nav 1.5 at lower concentrations (4) and this effect of GS-967 was even close to TTX.

Keywords: Breast Cancer, MDA-MB-231, MCF-7, VGSC, Nav 1.5 Eleclazine, GS-967

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Meme kanseri dünyada kadınlarda en sık görülen kanserlerden biridir ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerde ikinci sıradadır. Kadınlarda giderek artan meme kanseri insidansı önemli bir halk sağlığı sorunudur. Meme kanseri hastalarında da metastatik hastalık gelişmesi kanserden kaynaklanan kayıpların önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir (Scully v.d., 2012). Genellikle cerrahi operasyon ve radyoterapi ile tedavi edilebilen primer tümörlerin aksine metastatik tümörlerin tedavisi daha zorlu olmakta ve tedaviden çoğu zaman olumlu sonuç alınamamaktadır. Mevcut kemoterapilerin yanı sıra immünoterapi gibi hedefe özel tedaviler kötü prognoza sahip hastalarda daha iyi sonuç alınmasını sağlamaktadır. Bu nedenle kanser tedavilerinde moleküler hedeflerin belirlenerek yeni tedavi seçeneklerinin oluşturulması üzerine çalışmalar sürdürülmektedir. Primer bölgedeki kanser hücrelerinin invazyonu ve endotelial migrasyonu, metastazın ilk adımlarını temsil eder ve hem prognozu hem de hastanın hayatta kalmasını önemli ölçüde kötüleştirir. Bu olaylara erken müdahale etmek ve daha başlangıcında metastazı ortadan kaldırmaya yönelik çok sayıda girişimde bulunulmuştur (Marino v.d., 2013).

Hücre membranında bulunan çeşitli iyon kanalları, hücre dışı ve hücre içi ortamın yanı sıra lipid membranla sınırlı hücresel kompartmanlar arasında asimetric olarak dağılır. İyon kanalları, açık olduklarında belirli iyonların bu bölmeler arasında serbestçe hareket edebildiği sulu bir por içeren integral membran proteinleridir. Bu kanallar hem uyarılabilir hem de uyarılamayan hücrelerde hayati hücresel sinyalleşme süreçlerinde önemli rol oynarlar. Kanalların açılması sonucunda iyonların hücre içine ve dışına geçişi, elektriksel uyarımdan hareketliliğe kadar çok sayıda hücresel süreci ve işlevi etkileyebilir. Bu süreçler arasında hücre çoğalması, hücre göçü ve apoptoz gibi normal doku homeostazını sürdürmek için çok önemli olanlar da vardır. Bu nedenle, kanalların normal olmayan ifadesi ve/veya işlevi, normal hücrelerin kanserin ayırt edici özellikleri olan kontrolsüz çoğalma ve yayılma sergileyen kötü huylu/malign şekle dönüşmesine neden olan süreçleri bozabilir (Petkov, 2009; Preverskaya v.d., 2010, 2018).

Prostat, kolon, over, akciğer ve meme gibi pek çok kanser türünde yapılan birçok çalışma hücre membranındaki voltaj kapılı sodyum kanallarının (VGSC), özellikle yüksek invaziv özellik gösteren tiplerinde normal ve daha düşük invaziv özellikte olan tiplerine kıyasla ekspresyonlarının daha yüksek olduğu görülmüştür (Mao v.d., 2019). Birçok alt tipi bulunan VGSC'lerin, her kanserde farklı tiplerinin rol oynadığı saptanmıştır. Meme kanserinde ise Nav 1.5 VGSC'nin yüksek ekspresyonunun hastalığın ilerlemesi ve metastaz oluşumu ile ilişkili

olduğu kanıtlanmıştır (Roger v.d., 2003, Fraser v.d., 2005). Klinikte kullanılan fenitoin gibi anti-epileptikler, lidokaine gibi anestetikler ve ranolazine gibi anti-aritmiklerin VGSC'leri bloke ederek kanser hücre migrasyon ve invazyonunu inhibe ettiği çalışmalarla gösterilmiştir (Yang v.d., 2012). Nav 1.5 kanalının α alt biriminin ifadesi, klinik meme kanseri örneklerinde kötü prognoz ile ilişkilidir, bu da VGSC'lerin kanserin ilerlemesi için prognostik belirteçler olarak faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, kanalopatik hastalıklarda kullanılan mevcut VGSC bloke edici terapötik ilaçların başka bir amaçla kullanılması, kansere bağlı ölümlerin başlıca nedeni olan ve mevcut yöntemlerle genellikle tedavi edilemeyen metastatik hastalığa sahip bireylerde sonuçları iyileştirmek için yeni bir strateji sağlayabilir (Prevarkaya v.d., 2018, Horne v.d. 2021).

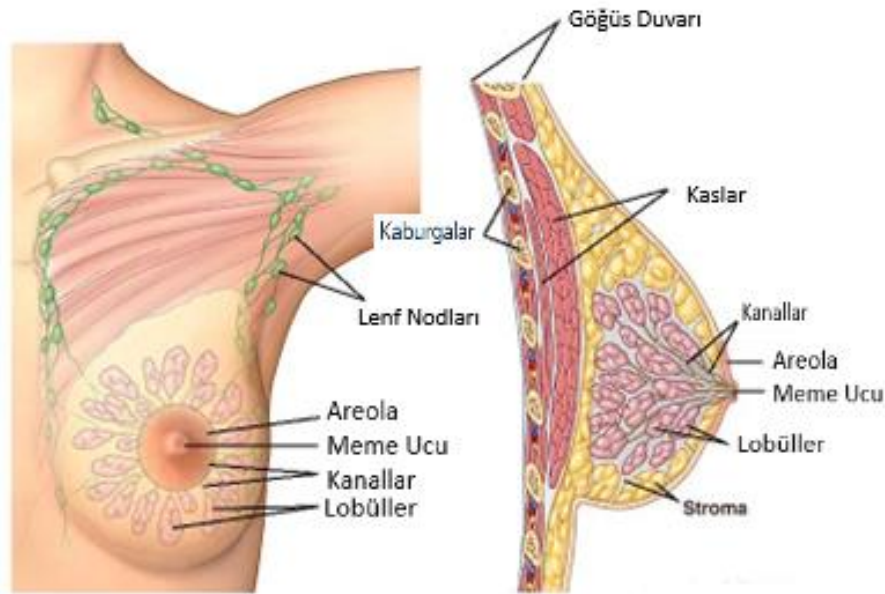
Bu çalışmada, kanser metastazının önemli başlangıç adımlarından olan migrasyon ve invazyonda ekspresyonu artan VGSC'lerin rollerinin in vitro ve in vivo çalışmalarla ortaya konulmuş olması ve bazı kanal blokerlerinin bu VGSC'leri bloke ederek, kanser hücrelerinin motilitelerini baskılaması yeteneğinden yola çıkılarak, yeni nesil antiaritmik etkiler gösteren VGSC blokeri Eleclazine (ELE) ve GS-967'nin nNav1.5 VGSC ekspresyonuna sahip meme kanseri metastazı üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla; yüksek metastatik MDA-MB-231 ve düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin proliferasyonları, koloni oluşumu, metastatik potansiyel bakımından migrasyon, invazyonu ile moleküler analizlerle protein miktarı ve gen ekspresyonu değişiklikleri hem normoksi hem de hipoksi koşullarında in vitro olarak ortaya konacaktır. Böylece, antiaritmik etkiler gösteren VGSC blokeri farmakolojik ajanlar ELE ve GS-967'nin meme kanseri üzerindeki antimetastatik potansiyelini saptayarak, meme kanseri metastazına karşı yeni bir tedavi prosedürünün geliştirilmesine katkıda bulunmak hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Meme Kanseri

Kanser, hücrelerin kontrolsüz biçimde çoğalarak, bulundukları doku veya organların işlevinin bozulmasına neden olan ve vücudun başka bölümlerini de etkileyebilen 20. ve 21. yüzyılın en sık görülen hastalıklarındandır (Roy ve Saika, 2016). Meme kanseri, meme dokusundaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüüp bölünerek tümör adı verilen bir doku kütlesi oluşturması ile meydana gelir. 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 v.d., 2011).

Göğüs bölgesinde yer alan meme anatomik olarak üç ana bölümden oluşur: lobüller, kanallar ve bağ dokusu (Şekil 2.1) (Rivard v.d., 2021). Memeyi oluşturmak için dairesel olarak düzenlenmiş 15 ila 20 lob bulunmaktadır. Her lob, hormon stimülasyonuna yanıt olarak süt üretiminden sorumlu bezleri içeren lobüllerden oluşmuştur. Kanallar ise sütü meme ucuna taşıyan tüplerdir. Her lobun kendi kanalı bulunmaktadır. Meme, pektoralis majör kası üzerine doğru uzanır ve memeyi destekleyen göğüs duvarına bağlayan bağ dokusu her şeyi çevreler ve bir arada tutar. Çoğu meme kanseri, kanallarda veya lobüllerde başlar (Pandya ve Moore, 2011).



Şekil 2.1 Meme Anatomisi (Bethesda, 2002)

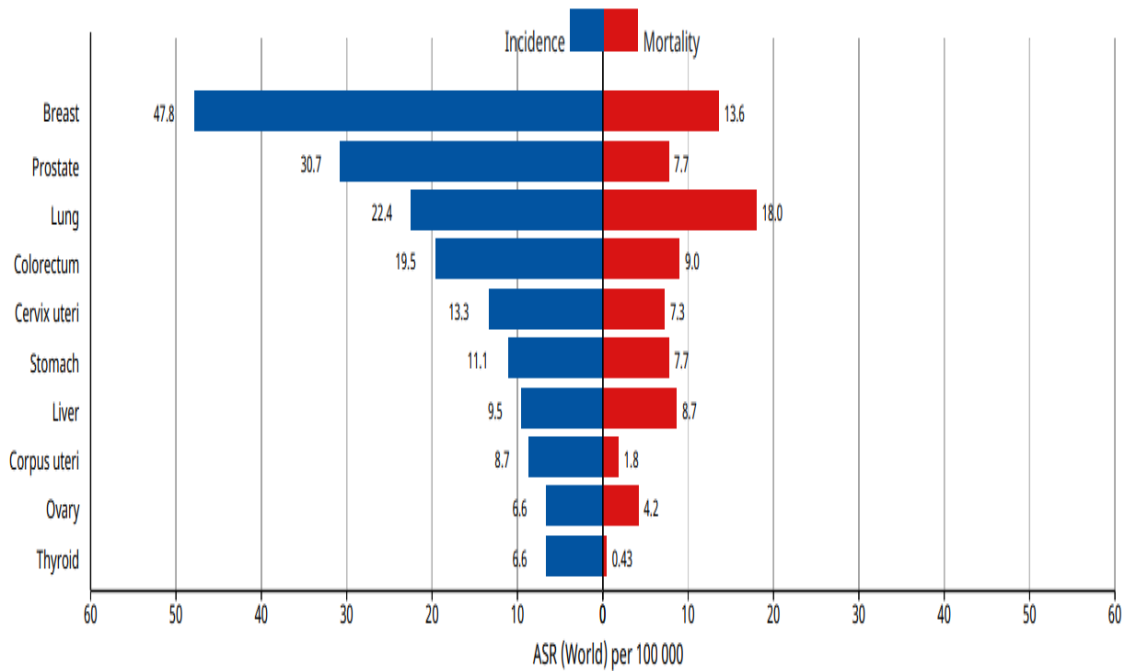
Ergenlik döneminde meme dokusunun yeniden şekillenmesi multipotent kök ve progenitör hücreler sayesinde gerçekleşir. Hücresel düzeyde, pubertal gelişim sırasında hem stromal hem de parankimal değişiklikler oluşur ancak stromanın fibröz ve yağ dokusundaki artış diğer duktal

değişikliklerden önce gelir. Bir stromal değişiklik periyodunu takiben, duktal uzama ve dikotom dallanma ortaya çıkar ve bu olayların her ikisi de östrojen hormonunun etkisi altındadır (Van Russo v.d., 2006, Keymeulen v.d., 2011). Duktal uzama devam ettikçe, memedeki boşluğun geri kalanı, kan damarları, bağışıklık hücreleri ve fibroblastların bir karışımı ile birlikte yağ dokusu tarafından doldurulur. Östrojen ve progesteronun sırasıyla duktal uzama ve yan dallanmadan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Wiseman ve Werb, 2002).

Bazı tümörler benign (selim) tiptedir ve yavaş büyüme eğiliminde olduklarını ve genellikle çevre dokulara veya vücudun diğer kısımlarına yayılma eğilimi göstermediklerini belirtir. Malign (habis) tümörler ise vücudun diğer bölgelerine yayılma potansiyeline yani invaziv özelliğe sahiptir. Tümör lenfatik ve hematolojik yol ile yayılma eğilimi gösterir, bu durum uzak metastaza ve kötü prognoza yol açar (Alkabban ve Ferguson, 2021).

2.2 Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri, tüm dünyada kadınlarda en sık teşhis edilen kanserdir. Akciğer kanserinden sonra genel olarak kadınlar arasında kanserden kaynaklı ölümün de ikinci önde gelen nedenidir (Şekil 2.2). Meme kanseri vakalarının yaklaşık %30'u, aşırı vücut ağırlığı, fiziksel hareketsizlik ve alkol alımı gibi değiştirilebilir risk faktörlerine atfedilir ve bu nedenle de önlenebilir. Bu faktörler dışında ve tedavideki ilerlemelerin yanı sıra, düzenli mamografi taraması ile erken teşhis, meme kanserinden kaynaklı ölümü daha fazla önleyebilir (Siegel v.d., 2023).



Şekil 2.2 Tüm dünyada 2020 yılında en yüksek insidans oranına sahip on kanser türü ve mortalite oranları (GLOCAN 2020).

Meme kanseri yıllardır en yaygın görülen kanserden biridir. GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında her gün yaklaşık 5250 yeni vaka ile yaklaşık 1.918.030 kanser vakası teşhis edilmiştir (Şekil 2.2). Kadınlarda teşhis edilen kanserlerin yaklaşık 51.400'ü duktal karsinoma (DCIS) olarak tanımlanmıştır. Amerikan Kanser Derneği'nin 2022 verilerine göre ise, kadınlarda yeni teşhis edilen kanserlerin yaklaşık %30'unun meme kanseri olduğu, bunlarında %13'nün invaziv tip meme kanseri olduğu görülmüştür.

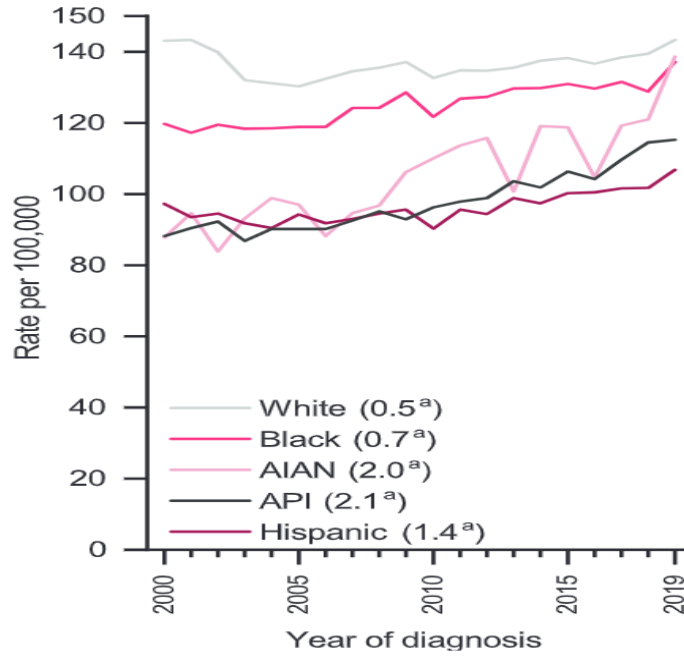
1987'de %29 olan mamografi taramasının 2000'de %70'e yükselmesine paralel olarak asemptomatik hastalık tespitinin artması nedeniyle 1980'lerde ve 1990'larda meme kanseri insidansı yükselmiştir. Sonuç olarak, 50 yaş ve üstü kadınlar arasında, DCIS oranı 1980 yılında ise 100.000'de 7 vakadan 2000 yılında 100.000'de 73 vakaya, invaziv meme kanseri oranı ise %40 artarak 100.000'de 275'ten 380 vakaya yükselmiştir. DCIS insidansı 2008 yılına kadar artmaya devam etmiş ancak, o tarihten 2019 yılına kadar da %1,5 azalmıştır (Sherman v.d., 2019).

1991 yılında Kadın Sağlığı Girişimi adı altında ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından postmenopozal kadınlarda morbidite ve mortaliteye neden olan önemli sağlık sorunlarını ele almak üzere bir dizi klinik çalışma gerçekleştirilmiştir. Araştırmacıların, büyük ölçüde östrojen, progesteron ve menopoz hormonu kullanımının meme kanseri ve kalp hastalığı ile ilişkili olduğunu gösteren sonuçlarını yayınlamalarının ardından, menopoz hormonlarının kullanımı azalmış ve buna bağlı olarak da invaziv meme kanseri indisansında 2001 yılından 2004 yılına kadar keskin bir şekilde düşüş göstermiştir (Miller v.d., 2021). Bu düşüş çoğunlukla beyaz ırk kadınlarında ve ER-pozitif olan hastalarda meydana gelmiştir. 2004 yılından bu yana, invaziv meme kanseri insidansı yılda %0,5 oranında yavaş bir seyir göstermektedir. Yakın tarihli bir ekolojik çalışma bu durumu, vücut kitle indeksindeki artışlara ve doğurganlık oranındaki düşüşlerin devam etmesine bağlamaktadır (Liu v.d., 2021).

2004 yılında 100.000'de 75 olan insidansın 2019 yılında 100.000'de 86'ya yükselmesi büyük ölçüde, metastatik olmayan ya da henüz metastaz yapmamış olan hastalık artışını yansıtmaktadır. 2015 yılından 2019 yılına kadar, insidans oranı primer tümör için yılda %0,9 artarken, metastatik hastalık için yılda % 0,7 azaldığını göstermekte ve bu durum, erken tanıya doğru bir eğilim olduğuna işaret etmektedir.

İrklara göre meme kanseri indisansı değişkenlik göstermektedir. 2015-2019 döneminde, beyaz ırk kadınlarda (%0,5/yıl) ve siyahi ırk kadınlardaki (%0,7/yıl) artış, hispanik kadınlara

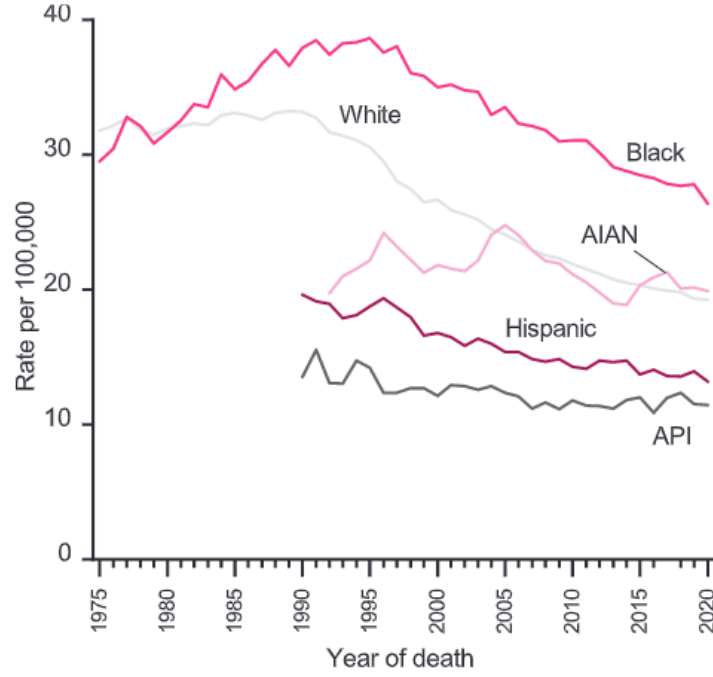
(%14/yıl) göre daha yavaş olmasına rağmen, ırksal / etnik insidans oranlarının tüm gruplarda arttığını ortaya koymaktadır (Şekil 2.3) (Awasthi v.d.,2022).



Şekil 2.3 Amerika Birleşik Devletleri'nde, 2000-2019 yıllarında ırk / etnik kökene göre kadın meme kanseri insidans oranları (Beyaz, Siyahi, Asyalı, Hispanik, Asya Pasifik Adalı kadınlar).

Meme kanseri mortalitesindeki düşüşler, düzenli mamografi taraması yoluyla, daha hedefe yönelik tedaviye ve erken tanıya bağlanmıştır. Bununla birlikte, son zamanlarda meme kanseri mortalitesinde 1998-2011 yılları arasında yıllık %1,9'luk azalmanın 2011-2020 arasında %1,3'e kadar gerilemesi meme kanseri insidansındaki istikrarlı artışı ve istikrarlı tarama mamografi prevalansını yansıtmaktadır. Irksal ve etnik gruplar arasında, meme kanseri ölüm oranları 2016-2020 yılları arasında siyahi, beyaz ve İspanyol kadınlarda yıllık %1,0-%1,4, Asya/Pasifik adalı kadınlarında %0,6 azalırken, Asyalı kadınların oranlarında herhangi bir değişiklik olmadığı saptanmıştır (Şekil 2.4) (Sung v.d., 2019, Awasthi v.d.,2022).

Siyahi ve beyaz kadınlarda 1980'li yıllardan önce meme kanseri mortalitesi benzerken erken teşhis ve tedavideki ilerlemelerin yayılmasıyla farklılaşmaya başlamıştır. Siyahi ve beyaz kadınlar arasındaki ırksal eşitsizlik 2011'de zirveye ulaşmış ve o zamandan günümüze kadar da devam etmiştir. 2016-2020 yılları arasında beyaz kadınlara oranla siyahi kadınlarda %40 daha yüksek bulunmuştur (Pfeiffer v.d., 2018, Lovejoy v.d., 2023).

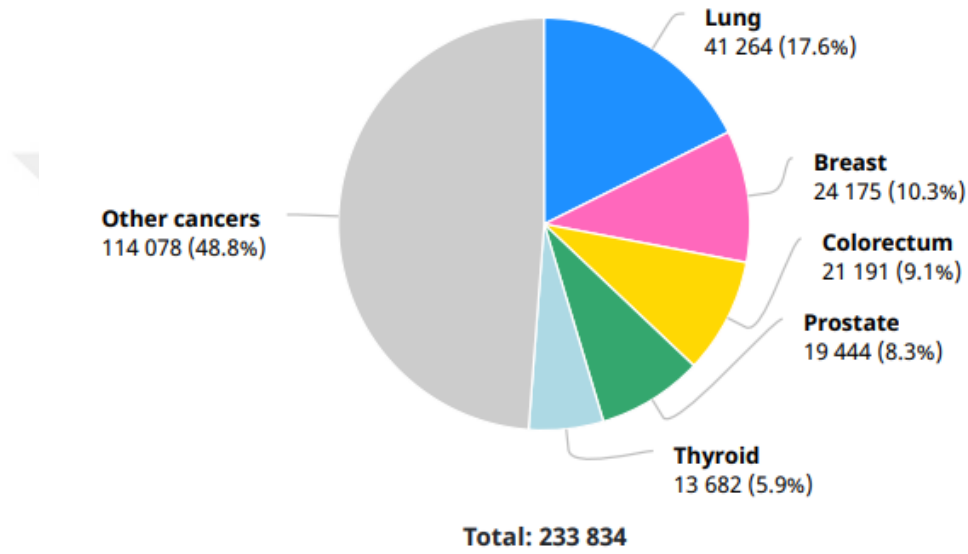


Şekil 2.4 Amerika Birleşik Devletleri’nde ırk / etnik kökene göre kadın meme kanseri ölüm oranlarındaki eğilimler, Amerika Birleşik Devletleri, 1975-2020 (Beyaz, Siyahi, Asyalı, Hispanik, Asya Pasifik Adalı kadınlar).

Siyah kadınlarda HER negatif (HER-) meme kanseri insidansının beyaz kadınlara göre daha yüksek olması, bu tümörler için daha düşük sağ kalım göz önüne alındığında, meme kanseri mortalitesindeki ırksal eşitsizliğe de katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.4). Bununla birlikte, özellikle, hormon reseptörü (HR) negatif kanserli siyah kadınlar için ölüm oranındaki ırksal uçurum, insidansın iki katı kadardır ve bu, HER2 pozitif ve üçlü negatif tümörler için hedefe yönelik tedavilere ve diğer ilerlemelere daha az erişim anlamına gelmektedir (Pfeiffer v.d., 2018).

2017 yılında Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde 85.500 kişinin meme kanserinden öldüğü raporlanmıştır. Bu ölümlerin binden biraz azı erkek ve büyük çoğunluğu (84.500) kadındır. Bu nedenle, meme kanserinden ölümler tüm kanser ölümlerinin %7,3’ünü oluşturur. 27 AB Üye Devletinden 16’sında, 2019’da kadınlarda meme kanseri nedeniyle standartlaştırılmış ölüm oranı akciğer kanserinden daha yüksek olduğu görülmüştür. AB Üye Devletleri genelinde, 2019 yılında (kadınlar arasında) meme kanserinden ölümlerde en yüksek pay %4,6 ile İrlanda ve Lüksemburg’da olurken, bu oran Letonya, Hırvatistan, Litvanya, Romanya ve Bulgaristan’da %3,0’ün altındadır (European statistics).

2020 yılında Türkiye’de yaklaşık 234000 kişiye kanser teşhisi konulmuş ve bunların 24000 yani %10’unu meme kanseri oluşturmaktaydı (Şekil 2.5). 2020’de meme kanserinden hayatını kaybeden kadınların sayısı ise yaklaşık 7000’dir ve tüm kadın kanser ölümlerinin %15’sini oluşturmaktadır (GLOBOCAN). Ülkemizde de son on yılda meme kanseri insidans oranları artarken, ölüm oranları daha erken teşhis ve daha iyi tedaviye bağlı mortalite oranları azalarak, hayatta kalma oranlarının artmasına neden olmuştur (The European Cancer Information System).



Şekil 2.5 Türkiye’de 2020 yılında teşhis edilen kanserlerin dağılımı (GLOBOCAN, 2020)

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 v.d., 2019).

Türkiye’de 40 yaş altı kadınlarda meme kanseri sıklığı %20, Batı Avrupa ve ABD’de ise %5 civarında bulunmuştur. Türkiye’de meme kanseri sağ kalım oranlarına ilişkin coğrafi heterojenlik de görülmektedir. Beş yıllık meme kanserine özgü sağ kalım oranları Türkiye'nin batı ve doğusunda sırasıyla %85 ve %60’tır (Özmen v.d., 2019).

Türkiye’de tanı konulan her 4 kadın kanserinden 1’i meme kanseridir. Meme kanseri evreleri incelendiğinde vakaların %48,2’sinin lokalize evrede tanı aldığı görülmektedir. Türkiye’de DCIS hastaları meme kanseri tanısı alan tüm hastaların sadece %5’ini oluşturmaktadır.

Ülkemizde 2008 ile 2018 yılları arasında meme teşhisi konulmuş kadınlarla yapılan çalışmada hastaların %19'unda DCIS ve %55'inde evre I invaziv meme kanseri vardır (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2018). Bu sonuçlar ülkemizde başarılı bir toplum temelli taramanın yapılabileceğine işaret etmektedir. Bu çalışmada tümörlerin moleküler alt tip analizleri ile tümörlerin %57,7'sinin luminal A (ER ve/veya PR pozitif, HER-2 negatif), %20,6'sının luminal B (ER ve/veya PR pozitif, HER) olduğu görülmüştür. HER-2 pozitif, %9,6'sı HER-2 tipi (ER ve PR negatif, HER-2 pozitif) ve %12,1'i üçlü negatiftir. Tarama ile saptanan meme kanserli hastalar ile semptomatik meme kanseri olgularını karşılaştıran çalışmalarda, tarama ile meme kanseri tanısı alan hastalarda tümör çapının daha küçük olduğu ve meme kanserinin luminal A alt tipi oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır (Özmen v.d., 2019)

Son yıllarda artan tarama merkezleri ve ücretsiz mamografi (40-69 yaş arası) ile mobil tarama sistemlerine rağmen meme kanseri farkındalığının yüksek olmaması nedeniyle hastaların önemli bir kısmına ileri evre tanı konulmuştur. Beş yıl önce yayınlanan çalışmanın aksine menopoz öncesi kadın oranında azalma ve meme koruyucu cerrahide artış görülmüş olup beş yıllık sağ kalım oranı da %86 olarak bulunmuştur. Bu nedenle tarama programlarının kullanımının ve farkındalığın artması ile meme kanseri hastalarda tümör çapının ve bölgesel lenfatik tutulumun azalmasına neden olacaktır (Özmen v.d., 2019).

Gelişmiş ülkelerde 1990'ların başlarından beri meme kanserine bağlı ölümlerde gözlenen azalma, iyileştirici tedavinin hala bir seçenek olduğu aşamada tanıya izin veren gelişmiş taramaya bağlanmaktadır. Mamografi, meme kanserinin saptanmasında en yaygın olarak kullanılan bir tarama yöntemidir ve mortaliteyi etkin bir şekilde azaltmaya yardımcı olduğu kanıtlanmıştır. Dünya genelinde düzenli şekilde meme kanseri tarama programlarının yaygınlaştırması, erken teşhis ve etkili tedavi ile meme kanseri mortalitesini azaltılmasına çalışılmaktadır. Ayrıca, meme kanseri gelişimine katkıda bulunan çevresel ve değiştirilebilir faktörlerin belirlenmesi, meme kanseri insidansını azaltan önleme stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilecektir (Kamińska v.d., 2015).

2.3 Risk Faktörleri

Cinsiyet, yaşlanma, östrojen, aile öyküsü, gen mutasyonları ve sağlıksız yaşam tarzı gibi meme kanseri geliştirme olasılığını artırabilecek çok sayıda risk faktörü bulunmaktadır. Bu risk faktörleri, genetik ve çevresel faktörler olmak üzere iki gruba ayrılır (Tablo 2.1) (Strumylaite v.d., 2010; Ataollahi v.d., 2015).

Tablo 2.1 Meme kanseri risk faktörleri

Meme Kanseri Risk Faktörleri
Çevresel
Erken menopoza
Alkol ve tütün kullanımı
Radyasyona maruz kalma
Obezite
Azalmış fiziksel aktivite
Yüksek yağlı diyet
Hormon replasman tedavisi
Yaşlanma
Coğrafik konum
Sosyo-ekonomik koşullar
Genetik
Gen mutasyonları (BRCA1, BRCA2)

Bu gruptaki ilk temel faktör, meme kanseri tanısı konulduğu zamanındaki hastanın yaşıdır. Meme kanserli hastaların yaklaşık %80'i 50 yaş üstü bireylerdir, aynı zamanda %40'tan fazlası da 65 yaşın üzerindedir. Meme kanseri en sık 45- 55 yaş aralığında olan menopoza dönemindeki kadınlarda görülür. 45 yaşın altındaki kadınlarda anlamlı olarak daha az görülmektedir (Łukasiewicz v.d., 2021).

Meme kanseri insidansındaki etnik ve coğrafi farklılıklar, çevresel koşulların ve yaşam tarzının etkisini ortaya koymaktadır. Meme kanseri oluşum riskini değiştiren temel faktörlerden bir diğeri ise, özellikle gelişmiş ülkelerin popülasyonlarında sıklıkla görülen ve obeziteye yol açan beslenme alışkanlıklarını içerir. Yağ açısından zengin aşırı kilo veya obeziteye neden olan ürünlerin yanı sıra, aroma maddeleri aromayı arttırmak ya da gıda korumak için kullanılan kimyasal maddeler, işlenmiş ürünlerden oluşan besinler, meme bezi hücrelerinde neoplastik dönüşüm sürecini teşvik eden bir faktördür (Colditz ve Bohlke, 2014). Bu korelasyon, özellikle postmenopozal dönemdeki kadınlarda gözlemlendiğinde, östrojen, progesteron veya HER2 reseptörlerinin aşırı ekspresyonu olmaksızın da meme kanserinin ortaya çıkma riskinin artmasıyla ilişkilidir (Sung v.d., 2017).

Meme özellikle östrojene duyarlı bir organdır. Doğum kontrol hapları veya östrojen replasman tedavisi alan birçok kadın, bu ilaçların göğüslerin büyümesine ve sıklıkla hassaslaşmasına neden olduğunu ifade etmiştir. Bu ilaçların aktivitesi, meme dokusunu aşırı uyaran standart yüksek yağlı, düşük lifli batı diyeti ile birleştiğinde meme kanseri için bir tetikleyici olabileceği belirtilmektedir (Howell v.d., 2014, Feng v.d., 2018).

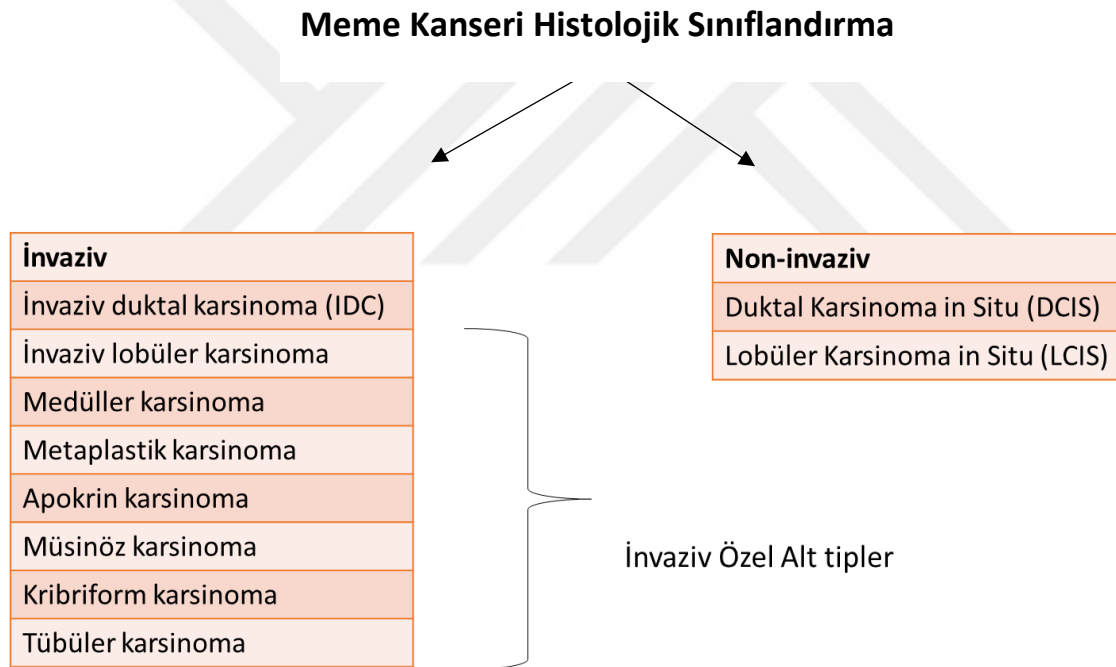
Sigara ve alkol kullanan kadınlar ile yapılmış olan epidemiyolojik çalışmaların sonuçları, uzun süreli sigara içimi ve pasif sigara içimi ile meme kanseri riskinin artabileceğini göstermektedir. Ancak sigara kullanımı meme kanseri oluşumu riskinden ziyade meme kanserinden ölüm riski ile daha çok ilişkilendirilmiştir (Passarelli v.d., 2016). Genetik faktörlerde BRCA1 ve BRCA2 genleri rol oynamaktadır, otozomal dominant ve yüksek penetrans meme kanseri ve yumurtalık kanseri formundaki en yaygın iki gendir (Mehrgou ve Akouchekian, 2016). BRCA1 ve BRCA2 genleri, Tümör Baskılayıcı Gen (TSG) proteinleri üretir, böylece iki gen TSG olarak adlandırılır. BRCA1 geni 17. kromozon, BRCA2 geni ise 13. kromozom üzerinde bulunur ve bu gendeki herhangi bir mutasyon meme, over ve prostat kanseri gelişme riskinin artmasına neden olabilir (Ayub v.d., 2014). Bu iki gen, hücre çoğalmasını baskılama şeklinde görev yapar ve TSG proteinleri üretir. Bu proteinler aynı zamanda anti-onkogen olarak da adlandırılır ve hücrenin hasarlı DNA'yı onarmasına yardımcı olur, genetik materyalin korunmasını sağlar. Bu nedenle, bu iki genden herhangi biri hasar görürse, hasarlı DNA onarılamayacaktır, böylece hücre DNA'sında daha fazla değişiklik ve mutasyon meydana gelerek kansere yol açabilir. Genellikle BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki bir 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 v.d., 2022). Bir kadının birinci derece akrabasına (anne, kız kardeş veya kızında) meme kanseri teşhisi konmuşsa, bu kadında meme kanseri riski neredeyse iki katına çıkar. Meme kanserine yakalanan kadınların yaklaşık %15'inde bir aile üyesinde meme kanseri teşhis edilmiştir (Juwle ve Saranath, 2012, Brandão v.d., 2019, Bach v.d., 2021). Ortalama olarak, BRCA1 mutasyonu olan kadınların yaşam boyu meme kanseri geliştirme riski %72'ye kadar çıkmaktadır. BRCA2 mutasyonu olan kadınlar ise %69'a varan bir risk taşımaktadır (Fu v.d., 2022).

2.4 Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Histolojik sınıflandırmalar öncelikle tümörlerin mikroskopik özelliklerine dayanmakta ve ışık mikroskobu ile geleneksel boyama teknikleri aracılığıyla incelendiğinde morfolojik olarak tanımlanabilen hücre tipleri ve histolojik şekillerle ilgilidir (Northridge v.d., 1997). Meme kanserinin morfolojisini tanımlamak için; tümörün memenin epitel bileşeniyle sınırlı olup

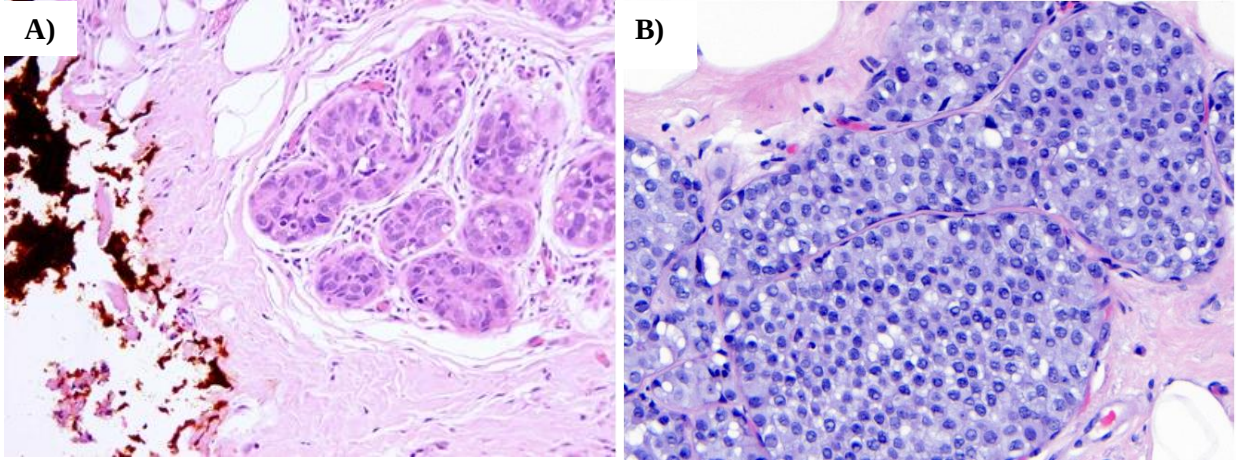
olmadığını veya çevredeki stromaya invazyon yapıp yapmadığını, nükleer derecesini yani kanserli hücrelerin nukleuslarının normal meme hücrelerinin nukleuslarına ne kadar benzer olduğunu ve tümörün meme kanallarında veya loblarında bulunup, bulunmadığını anlamak gereklidir (Vuong, 2014; Henry, 2019). Meme kanserinin alt tipinin saptanması, hastalığın prognozunun değerlendirilmesi kadar, yeterli ve doğru tedavinin belirlenmesi ve sağlanması açısından da büyük önem taşımaktadır.

Son birkaç yılda meme kanserinin patolojisi ve moleküler biyolojisine ilişkin birçok ilerleme kaydedilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) memenin tüm neoplastik ve preneoplastik lezyonlarını kapsayan bir sınıflandırma yapmıştır (Şekil 2.6). Meme kanseri bazal membran ile ilişkisine göre invaziv veya non-invaziv olmak üzere iki ana tipe ayrılır. Memedeki noninvaziv neoplazmalar genel olarak lobüler karsinoma in situ (LCIS) ve duktal karsinoma in situ (DCIS) olmak üzere iki ana tipe ayrılır (Sharma, v.d., 2010).



Şekil 2.6 Meme kanserinin histolojik sınıflandırılması

Duktal Karsinoma in situ (DCIS): Tipik olarak meme kanallarında lokalize olan ve çevreleyen dokuya invazyon yaptığına dair kanıt bulunmayan neoplastik lezyonları temsil eder (Şekil 2.7A) (Tomlinson-Hansen v.d., 2020). Belirgin bir nükleusa sahiptir. DCIS, tedavi edilmezse genellikle invaziv kansere dönüşür. Nükleer derecesi ne kadar büyükse malign tipe dönüşme olasılığı da bir o kadar artar (Tomlinson-Hansen v.d., 2020).



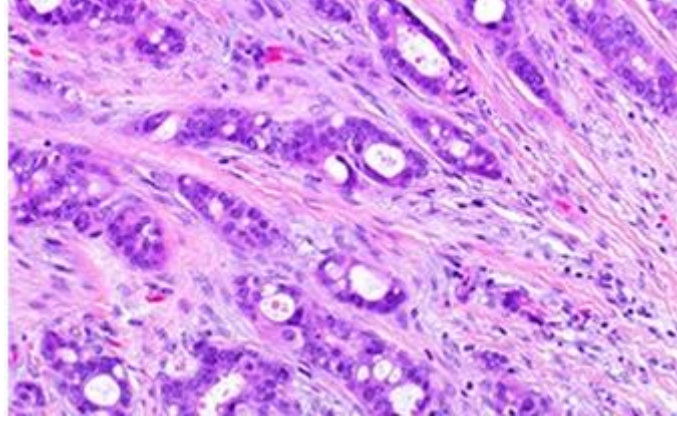
Şekil 2.7 Non- invaziv meme karsinomalarının histolojik görünümü (A) DCIS, (B) LCIS (Pinder, 2010, Vickery ve Biernacka, 2022).

Lobüler Karsinoma in situ (LCIS): Bu tip meme kanseri meme lobüllerinde meydana gelir. Meme kanseri lobüllerin dışına meme dokusuna yayılmamıştır (Şekil 2.7B) (Inoue M, v.d., 2017). LCIS hücreleri bol sitoplazma ve büyük nükleusa sahiptir (Wen ve Brogi, 2017).

Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %50 ila %80'i invaziv duktal karsinomadır (IDC). IDC'ler WHO tarafından “özel tip olmayan” invaziv karsinoma olarak sınıflandırılmıştır, çünkü bu tümörler karakteristik bir histolojik tip şeklinde belirlenecek yeterli morfolojik özellik göstermezler. Ancak yeterli ayırt edici özellikler ile belirli hücresel ve moleküler davranışlar gösterirlerse “özel tip” olarak da tanınabilmektedir (Sharma v.d., 2010).

İnvaziv Duktal Karsinoma Özel Tip Olmayan (IDC): Histolojik alt tip IDC en yaygın olan gruptur ve tüm invaziv meme karsinomalarının yaklaşık %40 ila %75'ini oluşturur. Genellikle, geniş bir morfolojik varyasyon ve klinik davranışa sahiptir (Şekil 2.8). Tümör hücreleri çok sayıda mitoz geçirmelerinden dolayı pleomorfik bir görünüme sahiptir (Makki, 2015).

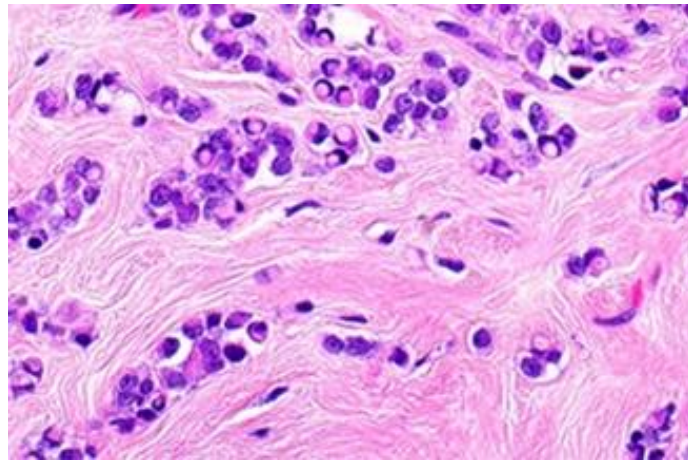
Meme kanserinin histolojik özel tipleri vakaların yaklaşık %25'ini oluşturur, farklı büyüme ile mimari şekile sahiptir ve özel olmayan tip duktal karsinomadan daha iyi prognoza sahiptir (Shea v.d., 2020). Gen ekspresyonu profillemeye çalışmalarının çoğu, spesifik olmayan tipte duktal karsinoma ile ilgilidir. Tanının gecikmesine neden olan yavaş seyir ve yaygın büyüme paterni, rutin tarama programları ile tespit edilme güçlüğü, güvenilir ve güvenli cerrahi sınırlar elde edilmesindeki güçlükler bu durumun nedenleri olarak sayılabilir (Zhao, 2021).



Şekil 2.8 IDC histolojik görünümü (Oluyemi v.d., 2021)

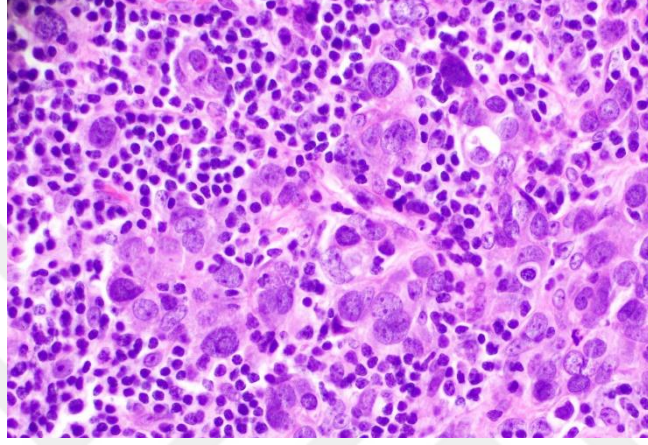
En sık görülen özel tip meme kanseri türleri, medüller karsinoma, metaplastik karsinoma, apokrin karsinoma, müsinöz karsinoma, kribriform karsinoma, tübüler karsinoma, nöroendokrin karsinoma, invaziv lobüler karsinomadır (Masood, 2016).

İnvaziv Lobüler Karsinoma (ILC): Tüm vakaların yaklaşık %5 ila %15'ini temsil eden ve genellikle ileri yaştaki kadınları etkileyen meme kanserinin en yaygın "özel tip"idir (Şekil 2.9). ILC, eşmerkezli bir düzende stroma boyunca eşit olarak dağılmış, az atipik küçük tümör hücrelerinin varlığı ile karakterize edilir. Hücre döngüsünü düzenleyen transkripsiyon faktörü olan tümör protein 53 (p53) mutasyonlarına sahip olma olasılıkları yüksektir. ILC hücreleri, karakteristik sitolojik özelliklere ve yaygın bir büyüme modeline sahiptir. Lenfovasküler invazyon göstermezler ve genellikle östrojen reseptörleri (ER), progesteron reseptörleri (PR) pozitif olup, nadiren insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2), tümör protein 53 (p53) eksprese ederler. ILC uzak metastazlarla kendini gösterir. ILC metastaz yerleri, kemik, gastrointestinal sistem ve beyini kapsar (Masood, 2016; Thomas v.d., 2019).



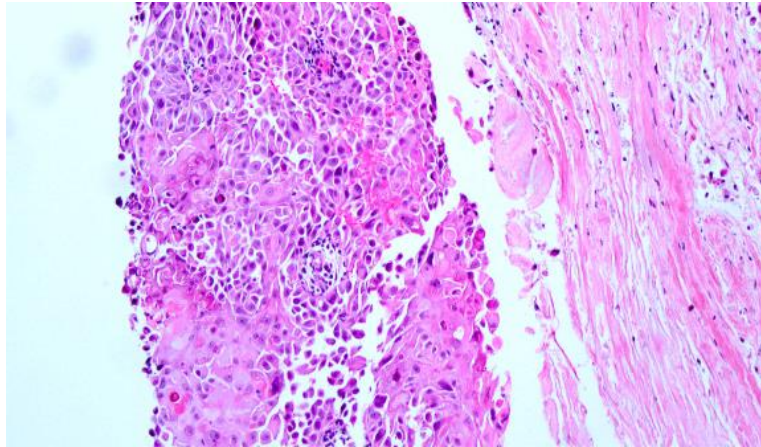
Şekil 2.9 ILC histolojik görünümleri (Oluyemi v.d., 2021)

Medüller Karsinoma: İnvaziv meme karsinomasının bu özel alt tipi, tüm vakaların yaklaşık %5'inden sorumludur daha iyi prognoz ve lenf nodlarına daha düşük tutulum oranları gösterir (Şekil 2.10). Genellikle 30 ila 40 yaş arasındaki hastaları etkiler ve BRCA1 genindeki mutasyonlarla ilişkilidir. Mitoz bölünmedeki hücre sayısı çoktur ve atipik dev tümör hücreler de bulunur. Tümörün yakınında DCIS hücrelerine de rastlanabilir. Östrojen ve progesteron reseptörleri ile HER2 negatiftir (Limaïem ve Mlika, 2022).



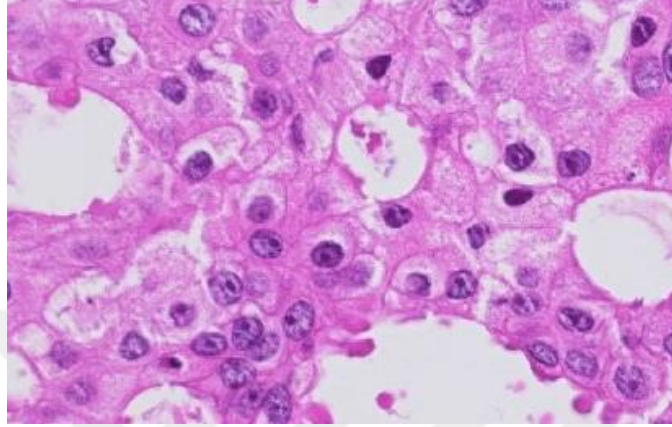
Şekil 2.10 Medüller karsinom histolojik görünümü (Zhang, 2021)

Metaplastik karsinoma: Tüm vakaların yaklaşık %1'ini temsil eden ve başta menopoza sonrası olmak üzere ileri yaştaki kadınları etkileyen bu tip karsinoma agresif biyolojik davranış ve sıklıkla lenf nodu tutulumu gösterir (Şekil 2.11). Morfolojik olarak heterojendir düşük ve yüksek dereceli tümörleri içerir. ER HER2 negatiftir (Zangouri v.d., 2018).



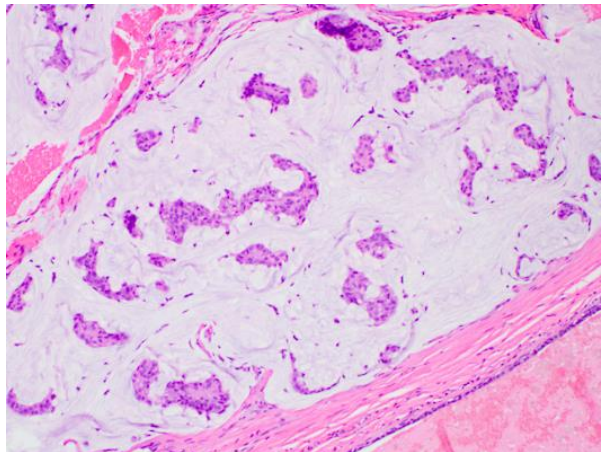
Şekil 2.11 Metaplastik karsinomanın histolojik görünümü (Zhang, 2021)

Apokrin karsinoma: Bu tip karsinoma tüm vakaların yaklaşık %1 ila %4'ünü oluşturur. Bu alt tip genellikle yüksek histolojik derecededir, prognozu kötüdür ve geniş bir yaş grubunu etkiler. Ancak postmenopozal kadınlarda daha sık görülür. Mikroskopik değerlendirmede, tümör hücreleri büyüktür ve bol miktarda granüler eozinofilik sitoplazmaya sahiptir. ER ve PR negatiftir (Şekil 2.12) (Vranic v.d., 2017).



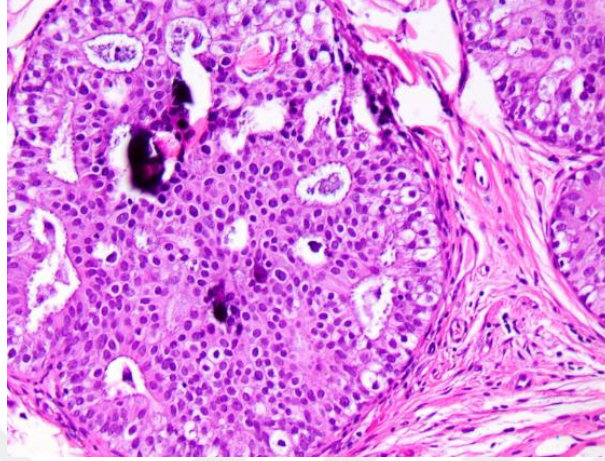
Şekil 2.12 Apokrin karsinoma histolojik görünümü (Kito v.d., 2014)

Müsinöz karsinoma: Kolloid, mukoid ve mukoid karsinoma olarak da bilinen ve vakaların %2'sinden sorumlu olan özel bir meme kanseri alt tipidir (Şekil 2.13). Bu alt tip olumlu bir prognoz ile ilişkilendirilmiştir ve sıklıkla 60 yaşın üzerindeki kadınları etkilemektedir. Bu tümörler, farklı büyüme şekillerine ve hafif nükleer normal olmayan şekile sahip küçük tümör hücresi kümelerini çevreleyen bol miktarda hücre dışı müsinе sahiptir. ER ve PR pozitif, HER2 negatiftir (Akram v.d., 2017).



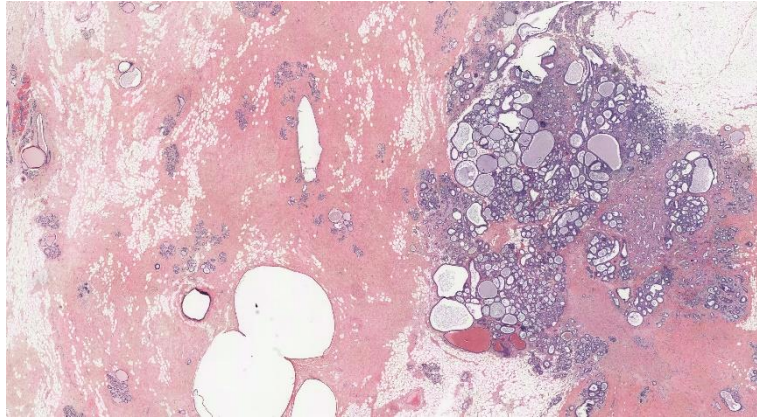
Şekil 2.13 Müsinöz karsinoma histolojik görünümü (LaBoy ve Siziopikou, 2022)

Kribriform karsinoma: 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 pozitifdir (Şekil 2.14) (Adachi v.d., 2021).



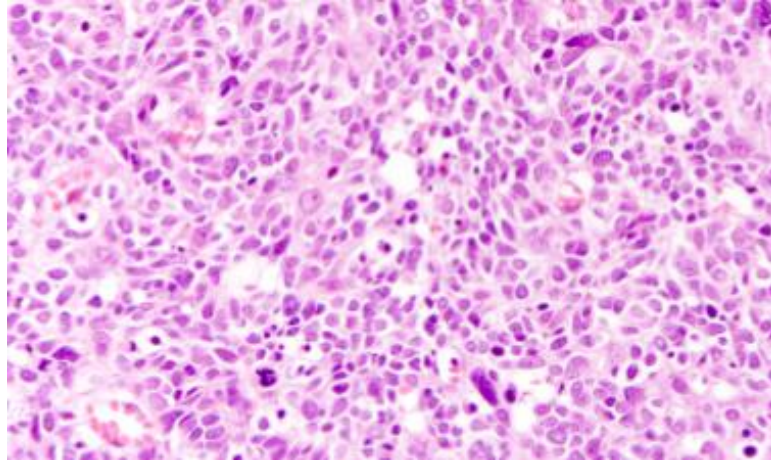
Şekil 2.14 Kribriform karsinoma histolojik görünümü (Tozbikian, 2022)

Tübüler karsinoma: 50 ile 60 yaş arasındaki kadınlarda görülen ve vakaların yaklaşık %2'sini oluşturan iyi bir diferansiyele sahip alt tiptir. Özel tipler arasında en düşük nükleer dereceye sahip olup, ER pozitifdir (Şekil 2.15) (Sakatani v.d., 2017).



Şekil 2.15 Tübüler karsinoma histolojik görünümü (Christgen v.d., 2021)

Nöroendokrin karsinoma: Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %0,5 ila %5'ini oluşturur ve genellikle ileri yaşlarda görülür (Şekil 2.16). Morfolojik olarak, neoplastik hücreler farklı boyutlarda olabilir ve genellikle ince eozinofilik granüler bir sitoplazma görülür. Çoğunlukla, düşük veya orta dereceli nükleer dereceye sahiptir. ER PR pozitif, HER2 negatiftir (Trevisi v.d., 2020).



Şekil 2.16 Nöroendokrin karsinoma histolojik görünümü (Li ve Tse, 2022)

Histolojik sınıflandırma dışında kapsamlı gen ekspresyon profili çalışmalarına dayanarak, meme kanseri tiplerinin dört moleküler alt tipe ayrılacağı ileri sürülmüştür. Bunlar, Luminal A, Luminal B, HER2 eksprese eden (HER2 +) ve Üçlü Negatif meme kanseridir (Tablo 2.2). 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 2.2 Meme Kanserin Moleküler Alt Tipleri

Moleküler Alt tipler	Luminal A	Luminal B	HER2	Üçlü Negatif
Biyomarkörler	ER+ PR+ HER2-	ER+ PR-/PR+ HER2-/HER2+	ER- PR- HER2+	ER- PR- HER2-
Vakalarda görülme sıklığı	%40–50	%20–30	%15–20	%10–20
Prognoz	İyi	Orta	Kötü	Kötü

Luminal A: Bu moleküler alt tip en yaygın olanıdır tüm meme kanseri vakalarının %40 ila %50'sini kapsar. ER ve PR pozitifdir, HER2 ise negatiftir (Goldhirsch v.d., 2013). Tüm moleküler alt tiplere kıyasla luminal A sınıfı iyi prognoz ile ilişkilidir. Düşük miktarda proliferasyonla ilgili gen seviyesine sahiptir (Prat v.d., 2018). Hormon tedavileri, hormon reseptörlerinin karşılık gelen reseptörlerine bağlanmasını bloke eder veya androjen kaynaklı östrojen oluşumunu azaltır, bu da tümörlerin proliferasyonunu inhibe eder ve tümör nüksünü ve metastaz riskini azaltır (Puhalla v.d., 2012). Pek çok luminal-A tümörü, tamoksifen gibi endokrin tedavilere yüksek oranda yanıt verse de önemli bir kısmı kazanılmış ilaç dirence sahiptir (Poudel v.d., 2019).

Luminal B: İnvaziv meme kanseri vakalarının yaklaşık %20 ila %30'undan sorumludur. HER2 pozitif olan ve olmayan olarak ikiye ayrılır. HER2 pozitif ise ER ve PR'de pozitifdir, HER2 negatif ise ER pozitifdir PR negatiftir (Feng v.d., 2018). Luminal B tümörleri luminal A tipine kıyasla proliferatiftir ve hücre döngüsü genlerinin ekspresyonu daha yüksektir. Luminal B tümörleri, luminal A'dan farklı olarak, sıklıkta p53 mutasyonu ile ilişkilendirilir (Tang, 2015). Luminal B meme kanseri, agresif klinik davranışı ile tanınır ve luminal olmayan kanserlerinkine benzer bir prognoz görülür. Luminal B hastalarında, HER2+ alt grubu, HER2- alt grubuna göre daha yüksek oranda kemik metastazına sahiptir. Diğer bölgelerdeki metastazlar arasında bir farklılık görülmemiştir. Luminal B meme kanserinin, luminal A meme kanserinden daha düşük hormon reseptörleri ekspresyonuna, daha yüksek proliferasyon belirteçleri ekspresyonuna ve daha yüksek histolojik dereceye sahip olduğu bildirilmiştir (Smid v.d., 2008). Birkaç çalışma, luminal-B meme kanserinin, luminal-A meme kanserine kıyasla endokrin tedavisiye ve HER2+ kanserlerine kıyasla kemoterapiye nispeten duyarsız olduğu ileri sürülmektedir (Rouzier v.d., 2005, Esserman v.d., 2009, Tran ve Bedard, 2011).

HER2 eksprese eden: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü tip2 (HER-2) meme kanserinde ER kadar önemli bir moleküler biyobelirteç olarak ortaya çıkmıştır. İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü HER2'nin aşırı ekspresyonu, meme kanserlerinin yaklaşık %20-30'unda bulunur (Tang, 2015). HER2'nin aşırı ekspresyonunun, daha agresif bir hastalık, daha yüksek tekrarılma oranı ve daha kısa sağkalım ile ilişkili olduğunu ifade etmektedir. Tümör büyümesi, HER2 sinyalinin aktivasyonu ile daha fazla desteklenir. HER2, primer tümörün ve ardından metastazlara neden olan uzak lezyonların proliferasyonunu ve hayatta kalmasını arttırmada rol oynar (Freudenberg v.d., 2009).

Üçlü Negatif: Bu sınıf, tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %20'sini oluşturur. Bu alt tip, tüm hormon reseptörlerinin ekspresyon eksikliği ile karakterize edilir (Tsang, 2020). Yüksek invaziv yapıya sahiptir ve terapötiklere nispeten düşük tepkileri nedeniyle tedavileri kısıtlı ve etkisizdir. Sonuç olarak, bu tip metastatik meme kanseri için özel tedavi yaklaşımları gereklidir (Medina v.d., 2020). Anti-östrojenler ile yürütülen hormon tedavisi veya trastuzumab gibi hedefe yönelik tedaviler gibi, belirli meme kanseri tedavi stratejileri, yalnızca ilgili reseptörler tümör hücresi tarafından eksprese edildiğinde etki göstermektedir. Bununla birlikte, bazı tümörler ER ve PR'yi ifade etmedikleri gibi HER2'yi de aşırı derecede ifade etmeyebilirler. Bu tip tümörü olan hastaların prognozu, sadece hormonal tedavi ve trastuzumab tedavisine yanıt vermeme nedeniyle değil, aynı zamanda bu tümörlerin diğer tüm meme karsinoması alt tiplerinden daha agresif olması nedeniyle de çok kötüdür (Ruijter v.d., 2011).

2.5 Meme Kanseri Tanı ve Teşhisi

Meme kanseri insidansını ve mortalitesini azaltmak üzere erken teşhis için tarama programları ve tanı testleri gereklidir. Amerikan Radyoloji Koleji, ortalama riskli tüm kadınlara 40 yaşından itibaren meme kanseri taraması yapılmasını önermektedir. Meme kanseri teşhisi, en yaygın olarak mamografi, meme ultrasonu ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) olmak üzere farklı yöntemlerle yapılabilmektedir. Bir mamogram meme kanseri taraması için standart testtir. Bazen hastalık riski yüksek olan kadınlarda meme kanserini saptamak veya ekarte etmek için mamografi, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile birlikte kullanılabilir. Meme MRI'ları mamogramların gözden kaçırabileceği tümörleri tespit edebilir ancak aynı zamanda kanserli olmayan meme dokusunu bazen yanlışlıkla kanserli olarak tanımlayarak yanlış tanıya da yol açabilir (Bhushan v.d., 2021). Yaygın olarak meme kanseri taraması, mamografi ile gerçekleştirilir ve mamografik tarama sonuçları şüpheli olan hastalar, tanısal mamografi, ultrason, meme MRI, biyopsi veya bunların farklı kombinasyonları ile birden fazla görüntülemeyi gerektirir. Ancak kesin tanı için doku örneği alınması gerekir. Alınan doku örnekleri çeşitli testler yapılarak moleküler seviyede incelenir ve kesin tanı konularak tedavi şekli belirlenir (Autier ve Boniol, 2018, Duffy v.d., 2020).

1. Moleküler Test: Meme kanseri, genomik yapıdaki değişime bağlı olarak ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Tümör baskılayıcı ve onkogenik genlerdeki genetik değişiklikler, meme epitel hücrelerini malign fenotipe dönüştürür. Bu genetik değişiklikler hem tedaviye yanıt hem de klinik sonuçlar olmak üzere meme kanserinin davranışını da etkiler. Moleküler tekniklerdeki önemli gelişmeler meme kanseri tanısını ve tedavi kararını daha kolay hale getirmiştir. Meme kanserinin moleküler alt tiplerini doğru bir şekilde sınıflandırmak ve tanımlamak için moleküler testlerle geleneksel histopatolojik yöntemlerin entegrasyonu sonucu kesin tanı konulmaktadır. Moleküler testler, hastalığın prognozunu ve tedavinin etkinliğini tahmin etmeye yardımcı olabilecek biyobelirteçler olarak belirli bir dizi genin belirlenmesine yardımcı olur. Farklı meme kanseri gelişimlerinde ve ilerlemelerinde yer alan genlerin ekspresyonunu kontrol etmek için birçok test mevcuttur. Bu testlerden biri olan mikrodizi tabanlı PAM50, postmenopozal kadınlar için meme tümörü örneklerini tanıdan sonraki 10 yıl içinde uzak nüks riski açısından test eden 50 genden oluşur. PAM50 skorunun yüksek çıkması metastaz riskinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir (Litton v.d., 2019, Beňačka v.d., 2022).

2. Yeni Nesil Dizileme (NGS): Yeni nesil dizileme, tek bir deney setinde bir multigen paneli kullanarak eksiksiz genom bilgisi sağlayan uygun maliyetli bir yöntemdir. Bu yüksek verimli teknik, gen varyantları, gen değişikliği, nokta mutasyonları, gen füzyonu ve kopya sayısı

varyasyonu hakkında bilgi sağlar. Meme kanseri tanısında kullanılan bu gelişmiş dizileme tekniği, hastaya/bireye özel tedavilere katkı sağladığından dünya çapında yaygın olarak kabul görmüştür. NGS'nin tanılamadaki popülaritesi ultra yüksek verim, ölçeklenebilirlik ve hız gibi çeşitli ek avantajlara atfedilmektedir (Han ve Lim, 2021, Sturgill v.d., 2021).

3. Sıvı Biyopsi: Kanserli hastalarda genomik ve proteomik bilgi kaynağı olarak periferik dolaşımdaki tümör hücrelerinin, tümör DNA'sının ve/veya eksozomların saptanması ile izolasyonundan oluşur. Sıvı biyopsi şu anda yüksek bir özgüllük sunarak, bir kan örneğinin kullanılması ile basit bir şekilde sağlam ve tekrarlanabilir verilerin toplanmasına olanak tanımaktadır (Palmirotta v.d., 2018).

4. Genetik Test: Meme kanseri ile ilgili araştırmalar farklı genlerdeki çeşitli genetik anormallikleri hastalık başlangıcı ve klinik sonuçlarla tanımlamış ve ilişkilendirmiştir. Genetik dizileme teknikleri ve biyoinformatik araçlardaki gelişmelerle desteklenen genetik testler, meme kanseri hastalarında germ hattı mutasyonlarının etkin bir şekilde saptanmasını sağlar. Meme kanserinde genetik testlerin kanserden korunma, erken teşhis ve hastalar ve yakınları için tedavi açısından önemli etkileri vardır (Valencia v.d., 2017).

2.6 Meme Kanseri Evreleri

Lokal, primer tümörün yakınındaki lenf düğümlerine yayılmış bölgesel ve hematogen yolla uzak organlara yayılmış olanlar yani, metastatik kanserlerin prognozunun belirtilen aşamalarda giderek kötüleştiği ve birçok kanserin bu aşamalı evrelerin izlenebileceği uzun zamandır bilinmektedir. Meme kanserleri de dahil olmak üzere bu evreleme sistemi karsinomalarının temeli haline gelmiştir (Cserni v.d., 2018).

Meme kanseri evrelemesi klinik olarak tedavi öncesi fizik muayene ve görüntüleme yöntemleriyle, cerrahi yöntemleriyle çıkarılan primer tümör ve bölgesel lenf nodlarının patolojik muayenesi ile meme kanseri evresi patolojik olarak belirlenir. Meme kanseri için genellikle Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC)'nin evreleme sistemi kullanılır. AJCC Evreleme Kılavuzu'nun, klinik ve patolojik değerlendirme sonuçlarına dayanarak primer tümör boyutu (T) nodal tutulum (N) ile metastazı (M) kullanan ve TNM ile gösterilen tamamen anatomik bir evreleme yöntemidir (Zhu ve Doğan, 2021).

Primer tümörün klinik evrelemesi, fizik muayene ve görüntülemeye dayalı olarak tümör boyutunun ölçülmesiyle başlar. TNM sistemi kullanılarak tümörün boyutu T0 ile başlayıp Tis T1, T2, T3 ve T4'e kadar kategorilendirilir (Tablo 2.3) (Sawaki v.d., 2019).

T0: Memede kanser olduğuna dair bir kanıt yoktur (Veronesi v.d., 2009).

Tis: In situ karsinomu ifade eder. Kanser, meme dokusunun kanalları içinde sınırlıdır ve memenin çevresindeki dokuya yayılmamıştır. Tis (DCIS) ve Tis (Paget) olmak üzere iki şekilde gösterilir. DCIS invaziv olmayan bir kanser iken, ancak ameliyat ile çıkarılmazsa daha sonra invaziv bir meme kanserine dönüşebilir. Paget yalnızca meme ucunun cilt hücrelerinde bulunan nadir görülen, invaziv olmayan erken bir kanser türüdür. Bazen Paget hastalığı invaziv bir meme kanseri ile de ilişkili olabilir. İnvaziv bir meme kanseri varsa, invaziv tümörün evresine göre sınıflandırılmaktadır (Park v.d., 2011).

Tablo 2.3 TNM sisteminde T0, Tis, T1, 2, 3 ve 4 açılımları

T0	Tümör yok,
Tis	In situ karsinoma
T1	Tümör boyutu 2 cm'den az,
T2	Tümör boyutu 2 ila 5 cm,
T3	Tümör boyutu 5 cm'den büyük
T4a	Tümörün göğüs duvarında büyümeye başladığı anlamına gelir
T4b	Tümör ciltte büyümeye başlamıştır.
T4c	Tümör hem göğüs duvarında hem ciltte büyüme gösterir.
T4d	İnflamatuvar meme kanseridir.

Kanserin başladığı yere yakın lenf düğümleri bölgesel lenf düğümleri olarak adlandırılır ve altında köprücük kemiğinin üstünde ve altında ve göğüs kemiğinin altında bulunur. N, primer tümörün yakınındaki lenf düğümlerinin sayısını ifade eder (Tablo 2.4) (Brierley v.d., 2017).

Tablo 2.4 TNM sisteminde N0, 1, 2, 3, 4 açılımları

N0	0,2 mm'den küçük veya yok
N1	Aksiller lenf düğümünde veya iç meme lenf düğümlerinde 1 ila 3 arasında 0,2 mm'den büyük kitle veya kitleler meydana gelmiştir.
N2	Tümör 4 ila 9 tanedir, aksiller lenf noduna veya iç meme lenf düğümlerine yayılmıştır, ancak aksiller lenf düğümlerine yayılmamıştır.
N3	Tümör 10 veya daha fazla olarak aksiller lenf düğümüne veya köprücük kemiğinin altında bulunan lenf düğümlerine yayılmıştır. Ayrıca iç meme lenf düğümlerine de yayılmış olabilir. Köprücük kemiğinin üstündeki lenf düğümlerine yayılan ve supraklaviküler lenf düğümleri olarak adlandırılan kanser de N3 olarak tanımlanır.

TNM sistemindeki “M”, kanserin metastaz adı verilen vücudun diğer bölgelerine yayılıp yayılmadığını gösterir. Bu durumda primer tümörden uzaktaki doku veya organlara giden tümör hücrelerinin gittikleri yerlerde farklı boyutta yeni sekonder tümörleri oluşturduğunu ortaya koyar (Tablo 2.5) (Curigliano v.d., 2017).

Tablo 2.5 TNM sisteminde M0, 0 i+, 1 açılımları

M0	Uzak metastaz olduğuna dair bir kanıt yoktur
M0 (i +)	Uzak metastazların klinik veya radyografik kanıtı yoktur. Bununla birlikte, kanda, kemik iliğinde veya diğer lenf düğümlerinde 0,2 mm'den büyük olmayan tümör hücrelerinin mikroskopik kanıtı bulunur.
M1	Vücudun başka bir yerine metastaz olduğuna dair kanıtlar vardır, yani diğer organlarda büyüyen meme kanseri hücreleri veya odakları görülür.

Doktorlar tümörün, T, N ve M sınıflandırmalarını, tümör derecesini ve ER / PR ve HER2 testinin sonuçlarını birleştirerek kanserin evresini belirler. Evre I'den evre IIA kanserine "erken evre" olarak tanımlanırken evre IIB'den evre III'e kadar "yerel olarak ilerlemiş" şeklinde evrelerler (Tablo 2.6) (Cserni v.d., 2018).

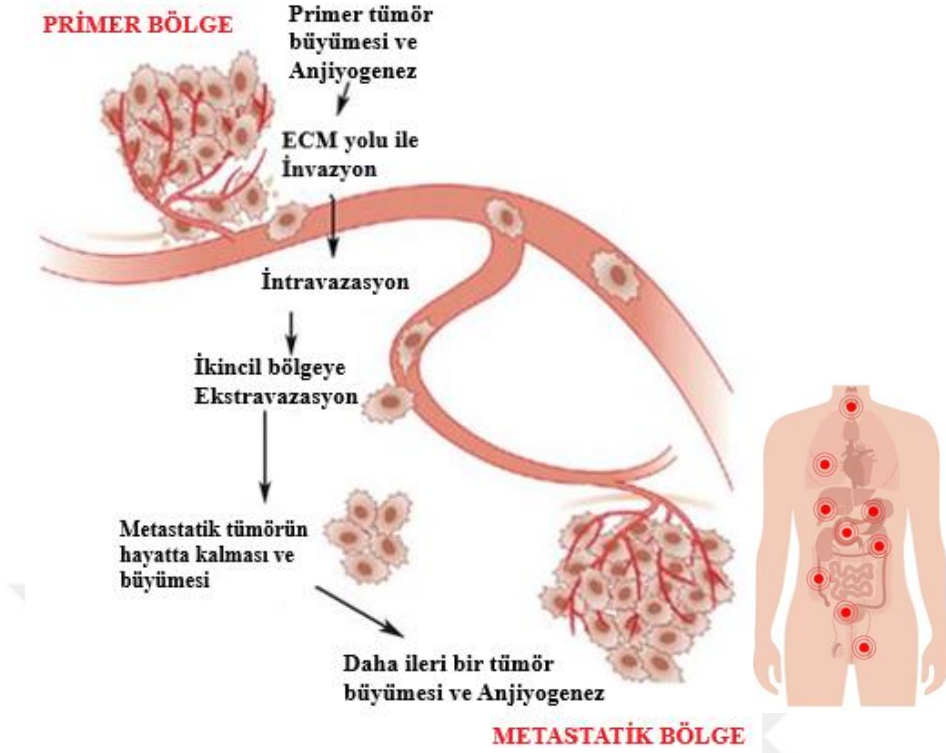
Erken meme kanserinin prognozu iyidir. Evre 0 ve evre I'in her ikisi de %100 oranında 5 yıllık sağkalım oranına sahiptir. Evre II ve evre III meme kanserinin 5 yıllık sağkalım oranı sırasıyla yaklaşık olarak %93 ve %72'dir. Hastalık sistemik olarak yayıldığında prognozu kötüleşir. Evre IV meme kanseri hastalarının sadece %22'si 5 yıllık sağkalıma sahiptir (Arciero v.d., 2016).

Tablo 2.6 Meme kanseri evrelendirilmesi

Evre 0	Sadece meme dokusunun kanallarında bulunan ve memenin çevresindeki dokuya yayılmayan hastalığı tanımlar. Ayrıca invaziv olmayan kanser (Tis N0, M0) olarak da adlandırılır.
Evre IA	Tümör küçüktür, invazivdir ve lenf düğümlerine yayılmamıştır (T1, N0, M0).
Evre IB	Kanser lenf düğümlerine yayılmıştır ve lenf düğümündeki kanserin boyutu 0,2 mm'den büyük ancak 2 mm'den küçüktür.
Evre IIA	Kanser 1 ila 3 aksiller lenf düğümüne yayılmış olup vücudun uzak bölgelerine yayılmamıştır (T0, N1, M0). Tümör 20mm ile 50mm arasındadır.
Evre IIB	Tümör 50 mm'den büyüktür, ancak aksiller lenf düğümlerine (T3, N0, M0) yayılmamıştır.
Evre IIIA	Herhangi bir boyuttaki tümör 4 ila 9 aksiller lenf düğümüne veya iç meme lenf düğümlerine yayılmıştır. Vücudun diğer bölgelerine yayılmamıştır (T0, T1, T2 veya T3, N2, M0). Evre IIIA ayrıca 1 ila 3 aksiller lenf noduna (T3, N1, M0) yayılmış 50 mm'den büyük bir tümör de olabilir.
Evre IIIB	Tümör göğüs duvarına yayılmıştır. 9'a kadar aksiller veya internal meme lenf noduna yayılmış olabilir. Vücudun diğer bölgelerine yayılmamıştır (T4; N0, N1 veya N2; M0).
Evre IIIC	10 veya daha fazla aksiller lenf düğümüne, iç meme lenf düğümlerine veya köprücük kemiğinin altındaki lenf düğümlerine yayılmıştır. Vücudun diğer bölgelerine yayılmamıştır (herhangi bir T, N3, M0).
Evre IV (metastatik)	Tümör herhangi bir boyutta olabilir ve kemikler, akciğerler, beyin, karaciğer, uzak lenf düğümleri veya göğüs duvarı (herhangi bir T, herhangi bir N, M1) gibi diğer organlara yayılmıştır.

2.7 Meme Kanseri ve Metastaz

Vücudun orijinal primer tümörden uzak bir bölümünde sekonder tümörlerin gelişmesi “metastaz” olarak adlandırılır. Kanser metastazı, çoğu kanserli hastanın kaybedilmesindeki en önemli nedendir (Heppner ve Miller, 1998, Welch, 2006, Djamgoz ve Onkal, 2013, Welch ve Hurst, 2019). Kanser teşhisi sırasında, hastaların en az yarısında klinik olarak saptanabilir bir metastaz mevcuttur. Kanser hücresinin başarılı bir şekilde metastaz yapması için metastatik kaskad olarak da adlandırılan bir dizi ardışık olayı tamamlaması gerekmektedir (Şekil 2.17) (Valastyan ve Weinberg, 2011; Obenauf ve Massague, 2015).



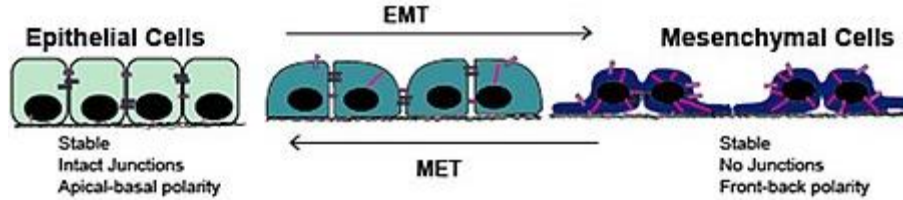
Şekil 2.17 Metastaz sürecinin şematik bir modeli (McGee, 2010).

Katı tümörlerin metastatik kaskadta ilerlemesi dört ana aşamaya ayrılabilir. 1. kanser hücrelerinin yayılması için bazal membranın invazyonu ve hücre migrasyonu; 2. dolaşım veya lenfatik sisteme intravazasyon; 3. dolaşımda hayatta kalma ve damar sisteminden ikincil bir dokuya ekstravazasyon; ve son olarak, 4. kolonizasyon ve tümör anjiyogenezi (Majidpoor ve Mortezaee, 2021).

1. Kanser Hücrelerinin Yayılması: Yayılma süreci, malign tümör hücrelerinin oluşturdukları primer bölgeyi terk etme ve uzak dokulara gitme yeteneği kazanmasını sağlayan invazyon-metastaz kaskadının ilk adımlarını içerir. Hücreler çeşitli süreçler ile bulundukları yerden başka yerlere göç edebilme yeteneği kazanarak yayılma gerçekleştirirler. Bu adımları sağlayan en önemli süreç, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) olarak adlandırılmaktadır. EMT; normal şartlarda embriyogenez sırasında ve yetişkinlerde yaralanan epitel dokuların iyileşmesi sırasındaki bir mekanizmadır. Ancak bu mekanizma kanser hücreleri tarafından hücrelerin epitel özelliklerini kaybetmesi ve bunların yerine bazı embriyonik karakter gibi mezenkimal hücre özelliklerin kazanılması için yürütülür (Şekil 2.18) (Hapach v.d., 2019, Fares v.d., 2020).

Erişkin bir bireyin organ veya dokularında bulunan epitel hücreleri hem birbirlerine hem de hücre dışı matrikse (ECM) sıkıca bağlı olduğundan hareket etmezler. EMT spesifik bir epitel

hücresinin mezenkimal bir fenotipe ulaşmasına izin veren geri dönüşümlü biyokimyasal değişiklikleri ifade eder ve epitel hücrelerinin epitel–mezenkimal plastisite kazanması, hücrelerin hareket yeteneği kazanması ile kanserin ilerlemesinde ve metastazında çok önemlidir (Ye v.d., 2015, Fares v.d., 2019).



Şekil 2.18 Hücrelerin EMT ve MET geçişlerinin şematik gösterimi (Hill ve Yang, 2020)

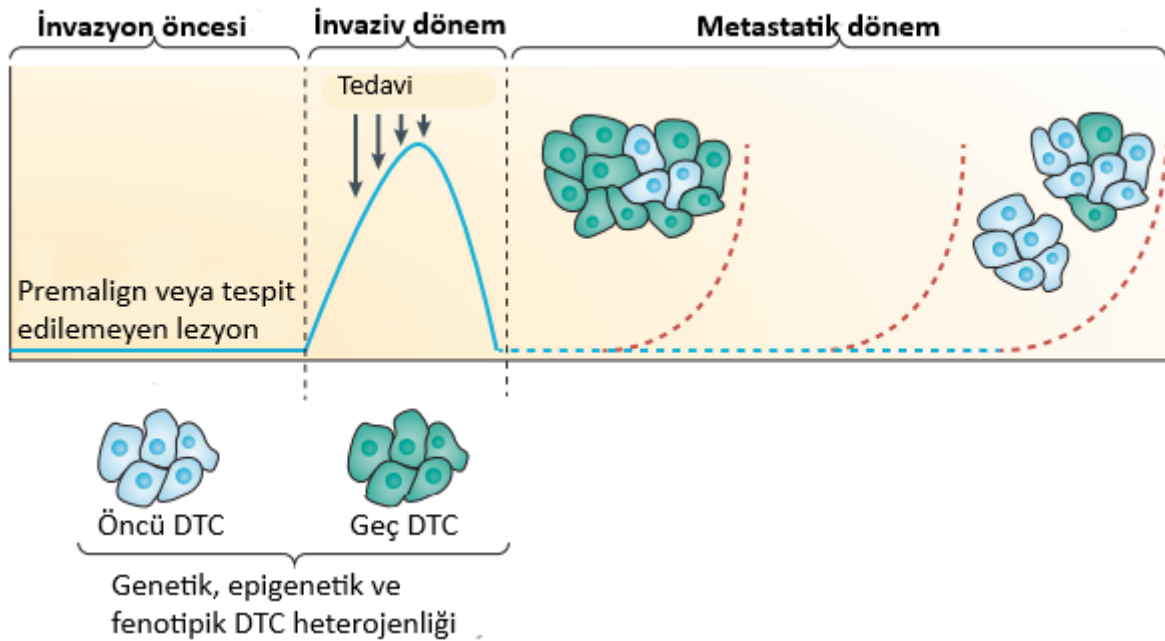
2.İntravazasyon: Kanser hücreleri komşu hücrelerle olan bağlantılarını koparmalı ve matriksten ayrılmalı, kılcal damarın bazal membrana invaze olmalı ve kan dolaşımına girmek için damar içerisindeki endotel bariyerini geçmelidir. İntravazasyon, lenf veya kan damarlarının çeperinden içeriye giren ve dolaşıma katılan lokal invaziv karsinoma hücrelerini kapsar. Normal dokularda bulunan kan damarlarının aksine, anjiyogenez ile kanser hücrelerinin aralarında oluşan yeni damarlar kıvrımlıdır, sızıntıya eğilimlidir ve sürekli yeniden yapılandırma durumundadır. Dolayısıyla damarların bu yapıları sayesinde kanser hücrelerinin damar içine geçişleri yani intravazasyonları kolay olmaktadır (Van Zijl v.d., 2011).

3.Dolaşımda hayatta kalma ve endotelyuma tutunma: Dolaşıma pek çok kanser hücresi ulaşsa da orada karşılaştıkları hemodinamik kesme kuvvetleri, bağışıklık stresleri ve kırmızı kan hücresi çarpışmalarından daha azı hayatta kalır. Dolaşımda bulunan tümör hücreleri (CTC) ve o kansere özgü metastaz yerinde bir damarda durur ve farklı mekanizmalar ile intravazasyonun tersini, ekstravazasyon yapar (Hapach v.d., 2019).

4.Kolonizasyon ve Tümör Anjiyogenezi: Ekstravazasyondan sonra kanser hücrelerinin tamamlaması gereken son aşama: sekonder bölge kolonizasyonudur. Metastaz yapacağı dokuda kılcal damardan dışarı çıkan kanser hücreleri bazen dormansi olarak adlandırılan uyku durumuna girebileceği gibi bazen de hücre çoğalmaları ile önce küçük nodülleri (mikrometastazlar) oluşturur ve daha sonra mikrometastatik lezyonların makroskopik tümörlere büyümesi ile bu son adım “kolonizasyon” olarak adlandırılır (Hannahan ve Weinberg, 2011). Metastatik lokustaki mikro çevre, genellikle primer tümör oluşumu

bölgesinde mevcut olandan büyük ölçüde farklıdır. Kanser hücreleri tutundukları bölgede hayatta kalmaları durumunda bir vasküler ağ oluşturmaları gerekmektedir. Anjiyogenez tümörün ilerlemesi sırasında, besin ve oksijenin sağlanmasını ve ayrıca atıkların uzaklaştırılmasını sağlayan yeni damar sisteminin oluşumunu ifade eder (Valastyan ve Weinberg, 2011).

Metastatik dormansi, kanserin ilerlemesi sırasında, metastatik hücrelerin proliferasyonlarını durdurduğu hücrenin bölünme aktivitesini durdurarak sessiz bir şekilde hayatta kaldığı sadece hücre canlılığını devam ettirdiği sekonder bir bölgede hücrelerin ekstrasvazyonundan sonra meydana gelebilen bir aşamadır. Kanser dormansisi, primer tümör oluşumu aşamasında veya sekonder bölgelere yerleştiğinde meydana gelebilen kanser ilerlemesinde bir mola aşaması olarak da tanımlanır (Neophytou v.d., 2019). Metastatik uyku hali olarak da adlandırılmaktadır. Genellikle kanser hücrelerinin yayıldıkları sekonder bölgeye alışmaları için geçirilen bir dönem gibi de düşünülebilir. Sekonder bölgeye yayılmış olan tümör hücreleri (DTC'ler), proliferatif döngüden çıkarak veya dengeli bir proliferasyon ve apoptoz durumu elde ederek bir uyku durumuna girebilir (Şekil 2.19). Bu dormansi periyodu sırasında metastatik hücreler, konak mikroçevresine en iyi şekilde adapte olmalarını sağlayan genetik veya epigenetik değişiklikler biriktirebilir. Koşullar uygun olduğunda, hücreler bu dormansi durumundan çoğalmaya başlayarak kolonizasyonu başlatır (Gomis ve Gawrzak, 2017).



Şekil 2.19 DTC'lerin dormansi ve metastatik süreci (Sosa v.d., 2014)

Primer tümör cerrahisi ile tümör tamamen çıkarıldıktan veya tümör kitlesi azaldıktan sonra dormansi haldeki DTC'ler uzun süre tespit edilebilir. Belli bir zaman sonra metastatik tümör gelişmeye başlayabilir (Klein, 2009). Bu sebepten dolayı, adjuvan tedaviler daha uzun süreli devam ettirilir (Shien ve Iwata, 2020). Primer tümörden kaynaklanan geç DTC'ler daha yüksek metastatik potansiyele sahip olabilir ve bu sebepten daha erken metastatik lezyonlara yol açabilir. Buna karşılık, dormansi haldeki preinvaziv lezyonlardan kaynaklanan erken DTC'ler ilk tanıdan on yıl gibi bir süreden sonra metastatik tümörler oluşturabilir (Klein, 2010, Joseph v.d., 2012).

Meme kanserinin erken teşhisindeki gelişmelerle birlikte, tanı anında hastaların sadece %5-10'unda uzak metastaz tespit edilmektedir (Jin v.d., 2018). Bununla birlikte, standart tedaviyi takiben tekrarlayan metastatik hastalık riski hala yüksektir. Dünya çapında yarım milyondan fazla kadın hala her yıl metastatik meme kanseri tanısı almakta ve ölümlerin %90'ından meme kanserinden kökenli metastazlar sorumludur. Meme kanserinde uzak metastaz yerleri kemik, karaciğer, akciğer ve beyindir ve meme kanserinde hastaların kötü sağ kalım sonuçlarıyla ilişkili en yaygın olarak görülen uzak metastaz bölgeleridir (Redig ve McAllister, 2013).

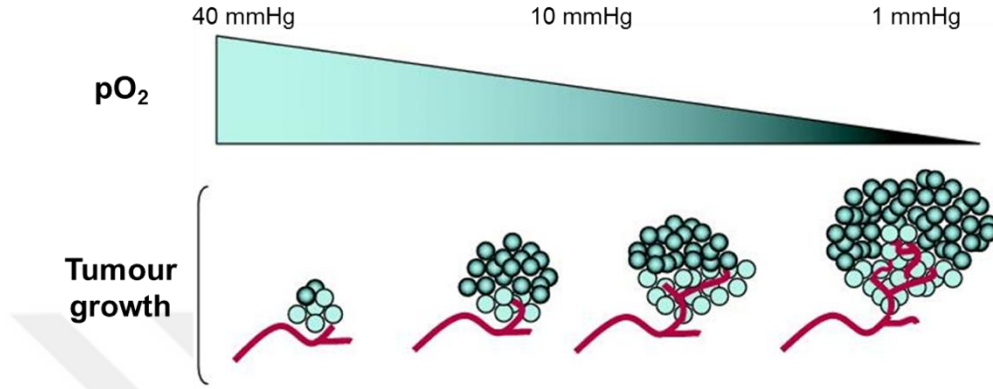
Meme kanserinin kemik, beyin, karaciğer ve akciğeri hedef alır ve metastazlı meme kanseri hastalarının %30-60'ı kemikte, %4-10'unun beyinde, %15-32'sinin karaciğerde ve %21-32'sinin akciğerde metastazları vardır (Jin v.d., 2018). Özellikle akciğer metastazları, ilk meme kanseri teşhisinin ardından 5 yıl içinde ortaya çıkma eğilimindedir ve hasta morbidite ve mortalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Medeiros ve Allan, 2019).

Primer tümörü hedef alan tedavi stratejileri önemli ölçüde gelişmiştir, ancak metastazı önlemeye yönelik sistemik tedaviler daha az etkilidir; Metastatik hastalık, hastalıklarına yenik düşen meme kanseri hastalarının çoğunda altta yatan ölüm nedeni olmaya devam etmektedir. Bu nedenle 21. yüzyılda meme kanseri teşhisi ve tedavisine yönelik stratejilerin geliştirilmesinin yüksek bir önceliğe sahiptir (Jin ve Ping, 2015).

2.8 Kanserde Hipoksi

Çoğu tümörün ortak bir özelliği olan ve şiddeti tümör tipleri arasında değişen hipoksi, düşük oksijen seviyesini ifade etmektedir. Çok hızlı biçimde genişleyen tümör dokusunda oksijen ihtiyacı giderek artar ve hücreler ile mevcut kılcal damarlar arasındaki mesafe artar, oksijen difüzyonu azaltarak hipoksik ortam oluşur (Şekil 2.20) (Hill v.d., 2001). Hipoksik tümör dokularındaki oksijen seviyesinin, ilgili normal dokuların oksijenasyonundan daha zayıf olduğu ve ortalama olarak O_2 'nin %1-2 arasında veya altında olduğu genel olarak kabul edilmektedir

(Muz v.d., 2015). Hipoksi, majör hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) yolu gibi bir dizi karmaşık hücre içi sinyal yolunu indükler. Bu yollar hücre proliferasyonu, hayatta kalma, apoptoz ve migrasyon ile ilgilidir. Özellikle, HIF'lerin yüksek aktivasyonunun metastazı arttırdığı ve hastanın sağkalım prognozunu kötüleştirdiği görülmektedir (Semenza, 2012).



Şekil 2.20 Tümörün hipoksi ve normoksi bölgeleri (Djamgoz ve Onkal, 2013)

Primer tümördeki hipoksi, meme kanseri hücrelerinde HIF-1 α stabilizasyonunu teşvik ederek meme kanseri metastazını düzenleyen proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun artmasına neden olur. HIF-1 α 'nın yüksek ekspresyonu, yalnızca daha agresif tümörlere yol açan yolaklarla değil, aynı zamanda meme kanserinde hormon, kemoterapi ve radyoterapi uygulamalarına direnç göstermesi nedeniyle de daha kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Hipoksi, östrojen reseptörlerinin (ER'ler) kaybına bağlı olarak hormonal tedaviye yanıtı azaltıyor gibi görünmektedir (Peiró v.d., 2019).

Son çalışmalar, kanserin ilerlemesinin ve metastazının, birlikte tümör mikro ortamını (TME) oluşturan kanser hücreleri ve çevreleri arasındaki çift yönlü etkileşimlere bağlı olduğunu göstermiştir. TME, hipoksi, asidik hücre dışı pH ve yüksek laktat seviyesi ile karakterize edilen bir kompleks bir yapıdır. Hipoksinin kanser hücrelerinde glikoz ihtiyacına olan bağımlılığı artırır ve bu da büyük miktarda laktik asit üretilmesine neden olur (Huber v.d., 2017). Bununla birlikte, kanser hücreleri normal hücrelere göre daha yüksek bir hücre içi pH'ı (pH_i) korur, bu hücrelerin asit atılım seviyesini artırabileceğini gösterir (Casazza v.d., 2014, Burgdorf v.d., 2020). Hücre içi pH'ı korumayı iyon kanallarının aktivitesini değiştirerek sağlar. Bu nedenle, iyon kanallarının rolü kanser araştırmalarının odak noktası haline gelmiştir (Chen v.d., 2021).

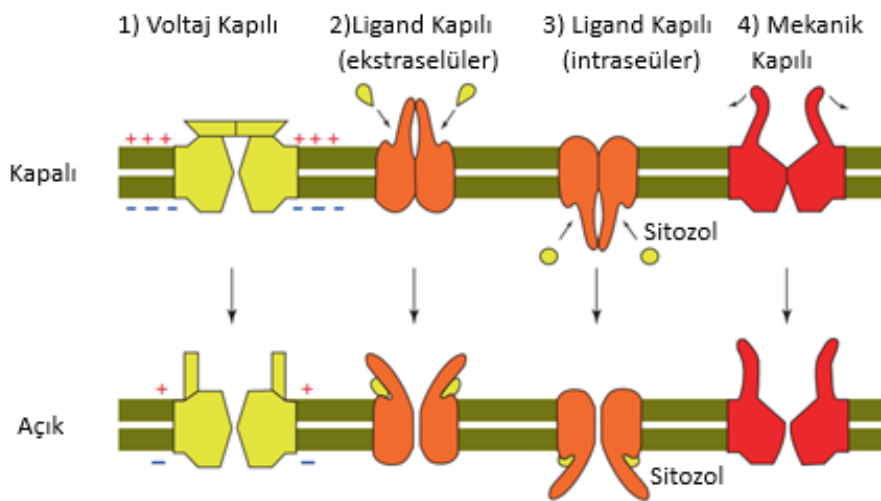
Hipoksi, kanser tedavisinin önündeki en büyük engellerden biridir. Hücresel tepkileri ve hipoksi altındaki faktörleri düzenlemek metastazı engellemeye yönelik bir hedef olabilir. Bu iyon kanallarının kanserde merkezi bir rolüne işaret eder ve iyon taşınmasını özellikle tümör

mikro-ortamı bağlamında inceleme ihtiyacını vurgular (Pugh ve Ratcliffe, 2017, Lee v.d., 2020, Sebestyen v.d., 2021).

2.9 İyon Kanalları

İyon kanalları, lipid içerikli hücre membranlarından çeşitli iyonların (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) geçişini kontrol eden, tüm hücrelerde eksprese edilen transmembran proteinlerdir. Yardımcı alt birimlerle bir araya gelen por oluşturuvcu bir integral membran proteini içeren makromoleküler komplekslerdir. Açık bir iyon kanalı üzerinden iyon taşıma yönü, söz konusu membran boyunca belirli iyon türleri için elektro-kimyasal gradyana göre yönetilmektedir (Di Resta ve Becchetti, 2010). Kardiyak miyositler ve nöronlar gibi uyarılabilir hücrelerde, farklı iyon kanallarının aktivitesi, dinlenme membran potansiyelini (V_m) oluşturur ve temel biyolojik süreçleri kontrol etmek için aksiyon potansiyelleri üretir. Voltaj kapılı iyon kanalları olarak adlandırılan bu kanallar iyon kanallarının bir çeşidini oluşturur ve kas kasılması, nörotransmitter salınımı ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alırlar. Epitel hücreleri gibi uyarılmayan hücrelerde iyon kanalları, tuz ve su akışını kontrol eder, hücre hacmini ve pH'ı düzenler (Hille, 2001, Dubyak, 2004).

İyon geçişindeki yüksek seçiciliğin yanı sıra, kanallar açılıp kapanma mekanizması ile karakterize edilir. İyon kanalları türlerine bağlı olarak, iyon akışına izin vermek üzere konformasyonlarını değiştirirler ve membran potansiyeli, nörotransmitter ligandları, iyonlar ve mekanik kuvvetler dahil olmak üzere çeşitli uyaranlara yanıt olarak açılır ve kapanırlar (Şekil 2.21) (Alberts v.d., 2010).



Şekil 2.21 Kapılarına göre iyon kanal tipleri (Kulbacka v.d., 2017)

- 1) Voltaj kapılı kanallar: Voltaj veya membran potansiyelindeki değişiklikler
- 2-3) Ligand kapılı kanallar: Nörotransmitterler ve iyonlar gibi ligandların bağlanması
- 4) Mekanik kapılı kanallar: Titreşim veya basınç gibi mekanik stres

Voltaj kapılı iyon kanalları (VGIC'ler), hücrelerin elektriksel sinyalleşmesinde önemli roller oynayan transmembran proteinlerdir. VGIC'lerin aktivitesi, bir hücrenin zar potansiyeli tarafından düzenlenir ve açık kanallar, iyonların hücre zarları boyunca bir elektrokimyasal gradyan boyunca hareketine izin verir. Kanaldan geçen iyonlara bağlı olarak, VGIC'ler voltaj kapılı sodyum, potasyum, kalsiyum veya klorür kanalları olarak sınıflandırılabilir (Catterall, 2012).

Ligand kapılı iyon kanalları (LGIC'ler), membran potansiyelindeki değişikliklerden ziyade kimyasal sinyallere (ligandlar) yanıt vererek iyonların geçişine izin veren protein grubudur. Bu kanallar, sinaptik aktarım hücre-hücre sinyalleşmesinde büyük önem taşır (Alexander, v.d., 2017).

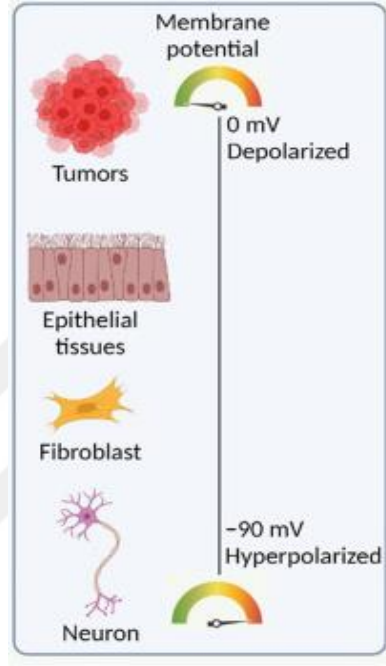
Mekanik kapılı kanallar ise dokunma ve basıncın duysal reseptörlerinde olduğu gibi reseptörün fiziksel deformasyonuna yanıt olarak açılır (Choudhury v.d., 2021).

Hücre çoğalması, farklılaşması, hacminin düzenlemesi ve pigmentasyon, membran potansiyel biyoelektrik özelliklerinden etkilenir. Membran potansiyeli, mitoz ve DNA sentezini teşvik ederek hücre büyümesini destekler. Hücre hareketliliği Ca^{2+} konsantrasyonundan etkilenebilir. Dolayısıyla, membran potansiyeli hücre hareketliliği üzerinde dolaylı bir etkiye sahiptir.

Hücre membranı boyunca iyon taşınması, iyonların giriş veya çıkışı hücre hacminin düzenlenmesinde, hücre döngüsünün ilerlemesinde, hücre çoğalması ve hücre ölümü gibi temel tümör hücresi fonksiyonlarında çok önemli bir rol oynar. Genetik veya edinsel faktörlerin neden olduğu iyon kanallarındaki kusurlar nedeniyle gelişen hastalıklara Kanalopatiler ismi verilmektedir (Kim, 2014). İyon kanallarını kodlayan genlerde kanal işlevini bozan mutasyonlar, kanalopatilerin en yaygın nedenidir. İyon kanallarının insan vücudundaki dağılımı ile tutarlı olarak, iyon kanalı kusurları epilepsi, migren, körlük, sağırılık, diyabet, hipertansiyon, kardiyak aritmi, astım, irritabl bağırsak sendromu ve kanser gibi çok çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. İyon kanallarının çeşitli fonksiyonları tümör hücresinin sağ kalımında ve metastazında kritik öneme sahiptir. Bu nedenle kanalların normalden farklı olan ekspresyonu ve işlevi, normal hücrelerin kanserin ayırt edici özelliklerinden olan kontrolsüz çoğalma ve yayılma özelliklerine sahip olan malign tipe dönüşmesine katkı sağlayan bu süreçlere yardımcı

olmaktadır (Prevarskaya v.d., 2018). Tüm bu özellikleri nedeniyle de Preverskaya v.d, (2018) tarafından onkokanalopati olarak adlandırmış ve terapötik hedef olabileceklerini vurgulamıştır.

Hücre tipine özgü olarak hücrelerin membran potansiyelleri 10 ila 90 mV arasında değişebilir (Şekil 2.22). Hücre membran potansiyeli, (i) iyon kanallarından, (ii) hücre dışı ortamın iyonik bileşiminden ve (iii) doku içindeki biyoelektrik gradyandan etkilenir. Özellikle kanser hücrelerinde çok sayıda iyon kanalı membran potansiyeli (V_m) regülasyonuna katılır ve kanser gelişimine katkı sağlarlar.



Şekil 2.22 Hücre Tiplerinin Membran Potansiyelleri Dereceleri (Sheth ve Esfandiari, 2022)

Biyoelektrik, onkolojik araştırmalar için yeni biyoelektrik tedavi seçenekleri üretme potansiyeline sahiptir. Elektrokimyasal yollar ve membrandan membrana hareket birbiriyle ilişkilidir ve biyolojik sistemleri bir homeostaz durumunda tutar (Levin v.d, 2019, Jiang v.d., 2021). Hücresel biyoelektrik aktivite, hücreler, dokular ve organlar arasındaki iletişimi koordine edebilir. Aksiyon potansiyeli, nöronlarda ve kaslarda aşırı elektriksel aktivite ile bağlantılıdır. Elektriksel aktivite tüm hücre tiplerinde bulunur ve çeşitli fizyolojik süreçlere katılır (Prevarskaya v.d., 2010, 2018). Uyarılmayan hücrelerde iyon hareketliliği, biyolojik moleküllerin indirgenmesi ve oksidasyonu ile iyonik akımlar oluşur. Ligand kapılı kanallar, bir elektrokimyasal gradyan ile aktive edilir. Membran potansiyeli, yüklü parçacıklar bir hücre membranının her iki tarafında biriktiğinde oluşur. Mitokondri gibi organellerin membranlarının her iki tarafı da potansiyel bir gradyana sahiptir. Yüklü moleküller hücre, doku ve organ düzeyinde polarizasyondan sorumludur. Canlı organizmaların oksidasyonu iyonik akımlar

 retir. NADPH, NADH, glutatyon, askorbik asit ve ubikinon genellikle bu işlemlerde yer alan biyomoleküllerdir. Biyomoleküler elektron taşıyıcıları olan enzimler ve sitokromlar oksidasyon ve indirgeme süreçlerini katalize etme özelliklerine sahiplerdir (Levin v.d., 2009, 2019, McCaig v.d., 2009).

 yonik anormaliler kanser hücrelerinin hem proliferasyonunda hem de migrasyonunda rol oynayabilir. Kemirgen ve insan dokularından elde edilen kayıtlar, proliferatif hücrelerin, özellikle hızla çoğalan tümör hücrelerinin depolarize Vm gösterdiğini, kas hücreleri ve nöronlar gibi proliferatif olmayan, terminal olarak farklılaşmış somatik hücrelerin ise hiperpolarize Vm'ler ile karakterize edildiğini ortaya koymuştur (Yang ve Brackenbury, 2013). Kök hücrelerin farklılaşması için hiperpolarizasyon gereklidir. Örneğin, depolarize edici koşullar altında insan mezenkimal kök hücrelerinde (hMSC'ler) hem osteogenez hem de adipogenez engellenir. Bu nedenle, kanser bağlamında, membran depolarizasyonu, sürekli tümör büyümesine yol açan kanser kök hücrelerinin (CSC'ler) ortaya çıkması ve korunması için önemli olmakla birlikte kanserli hücre tiplerinde sıklıkla bulunan depolarize Vm, hücelere hücre döngüsünde hızla ilerlemelerini söyleyen “devam eden proliferatif bir sinyal” olarak kabul edilebilir (Blackiston v.d., 2009, Chernet ve Levin, 2013).

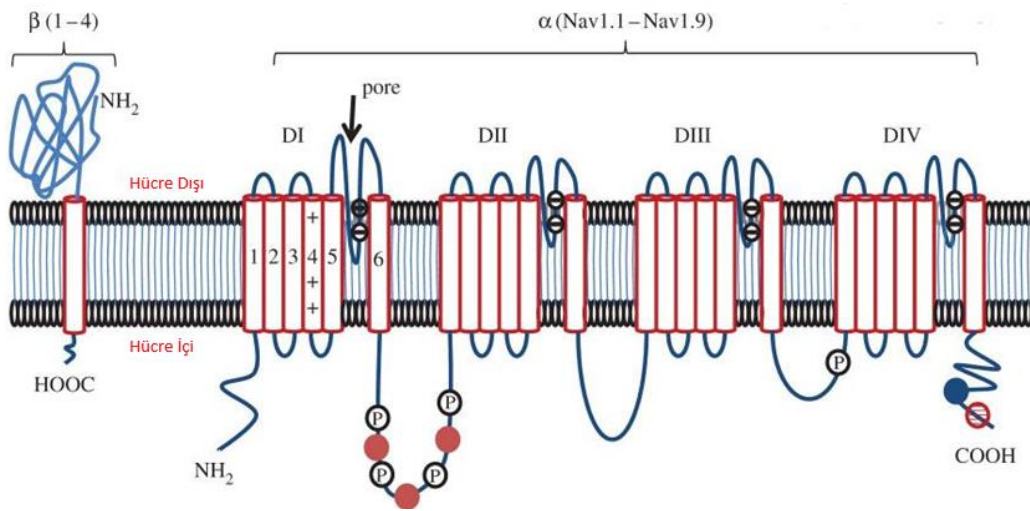
Membran potansiyelinin hücre fonksiyonu üzerindeki etkisi kanser hücrelerinin fenotipini etkiler. Hızla çoğalan bir hücrenin, yavaş çoğalan bir hücreye göre depolarize bir membrana sahip olma olasılığı daha yüksektir. Biyoelektronik gradyan, bir iyon kanalı ve hücre dışı ortamın tümü bir hücrenin membran potansiyelini etkiler (Silver v.d, 2018, Payne v.d., 2019, Levin v.d., 2019). Hücre fonksiyonu ve sinyal mekanizmaları süreçleri, membran potansiyelinden etkilenir ve bu da kanserin gelişmesine yol açar. Farklı kanserlerde çok çeşitli VGIC ekspresyonu ve aktivitesi vardır. Voltaj kapılı potasyum kanalları (VGPC) kanser tipinden ve malignite evresinden etkilenir. Tümör oluşumunun erken evreleri, VGPC proteininin aktivitesindeki bir artışla ilişkilidir. Geç evre kanserler için, membran uyarılabilirli indeki artışa bağlı olarak Voltaj kapılı sodyum kanalları (VGSC) aktivitesi artar ve metastaza yol açar (Sonnenschein ve Soto, 2008, Lobikin v.d., 2012, Funk v.d., 2015).

Ayrıca iyon kanalları hücresel olaylarda rol aldıklarından ve bulundukları konumdan dolayı ideal ilaç hedefleridir, çünkü membran üzerinde bulunduklarından ilgili küçük moleküller hücre dışından etki gösterebilir ve hedef hücelere girmeleri gerekmez. Bu nedenle, tümör hücrelerinin geliştirdiği ilaç direnci mekanizmalarına da takılmazlar.  yon kanallarının inhibisyonunun, tümör büyümesini ve metastazını durdurmada etkili olduğu giderek daha

kesin/belirgin hale gelmektedir (Wang v.d., 2007, Chou v.d., 2008, Bagal v.d., 2013, 2015, Kischel v.d., 2019, Hutchings v.d., 2019, Capatina v.d., 2020).

2.10 Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları (VGSC)

VGSC'ler, sinir, kas ve diğer uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyelinin başlangıçta hızla yükselen fazı sırasında sodyum geçirgenliğindeki artıştan sorumludur (Catterall, 1992). Tipik olarak bir veya daha fazla küçük β alt birimi ile ilişkili olarak por oluşturan bir α alt biriminden oluşur (Şekil 2.23). VGSC α alt birim ailesi, SCN1A–SCN11A genleri tarafından kodlanan Nav1.1–Nav 1.9 ve Nav x olmak üzere on üye içerir. SCN1B–SCN4B genleri tarafından kodlanan β 1– β 4, dört β alt birimi vardır (Brackenbury, 2012).



Şekil 2.23 VGSC Yapısı (Fraser v.d., 2014)

VGSC'lerin α -alt birimleri, her biri altı transmembran segmentinden oluşan dört alana (DI–DIV) sahiptir. Dördüncü segment pozitif yüklü amino asitler içerir ve bu bölge ana gerilime duyarlıdır. Beşinci ve altıncı transmembran segmentleri arasındaki döngü negatif yüklüdür ve por bölgesini oluşturur (Fraser v.d., 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 dışa doğru hareket eder, böylece poru açan ve kanal aktivasyonunu başlatan bir konformasyonel değişikliğe neden olur (Catterall, 2000).

β alt birimleri, benzersiz fonksiyonel özellikler sağlayabilen tek bir α sarmal transmembran alanı içerir. β alt birim hücre içi C-terminal alanları, düzensiz yapıya sahip olduğu tahmin edilen kısa dizilerdir. Transmembran segmenti ile birlikte hücre içi kuyruklar, VGSC α alt birimleri ile ek etkileşimler sağlar (Messner ve Catterall, 1985.). İyon kanal porunu oluşturmazken,

VGSC α alt birimlerinin geçiş, voltaj bağımlılığı ve kinetiğini değiştirir, böylece hücresel uyarılabilirliği düzenler. β alt birimleri, kanal modülasyonuna ek olarak, hücre adezyon ve migrasyonunu düzenlemekle sorumludur (Brackenbury ve Isom, 2011).

Kas hücreleri, miyositler, nöronlar gibi uyarılabilir hücrelerin dışındaki glia, fibroblastlar, bağışıklık hücreleri ve metastatik kanser hücreleri dahil olmak üzere bir dizi hücre tipinde VGSC'lerin artan ekspresyonları tespit edilmiştir (Angus ve Ruben, 2019). 1990'lı yıllarda ilk kez tanımlanmakla beraber giderek artan sayıda elde edilen sonuçlar, kanserde VGSC'lerin ekspresyonunun, hücresel migrasyon ve invazyon üzerindeki rollerini ve daha da önemlisi teşhis ve tedavi için terapötik hedefler olarak potansiyel faydalarını ortaya koymaktadır (Brackenbury, 2012, Djamgoz ve Onkal, 2013, Martin v.d., 2015, Hull ve Isom, 2018, Djamgoz v.d. 2019, Horne v.d., 2021).

VGSC'lerin α alt birimlerinin anormal ekspresyonu bugüne kadar; meme kanseri, serviks kanseri, kolon kanseri, melanoma, mezotelyoma, nöroblastom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, over kanseri, prostat kanseri ve küçük hücreli akciğer kanseri gliomalar, lenfoma ve lösemi hücrelerinde de rapor edilmiştir (Grimes v.d., 1995, Diss v.d., 2001, Fraser v.d., 2003, Fraser v.d., 2005, Onganer v.d., 2005, Brackenbury v.d., 2007, Roger v.d., 2007 Gillet v.d., 2009, Hernandez-Plata v.d., 2012, Fraser v.d., 2014, Bugan v.d., 2019, Djamgoz v.d., 2019, Guzel v.d., 2019).

Literatürde VGSC'lerin metastatik kanser hücrelerinde daha yüksek oranda eksprese edildiğini ortaya koyan ilk alışma Dunning model sıçan prostat kanserinde yapılmıştır. Sıçan prostat kanseri yüksek metastatik Mat-Ly-Lu hücre hattında içe doğru bir sodyum akımı tespit edilmiş olup, zayıf metastatik AT-2 prostat kanseri hücrelerinde böyle bir akım görülmemiştir. Çalışmanın devamında bu sodyum akımının TTX ile bloke edilmesi sonucunda Mat-Ly-Lu hücrelerinde invazivliğin önemli ölçüde azaldığı ancak, zayıf metastatik AT-2 hücrelerinde herhangi bir etki gözlemlenmediği saptanmıştır (Grimes v.d., 1995). Böylece VGSC ekspresyonunun prostat kanseri hücrelerinin invazyonu ve dolayısıyla metastazında önemli bir role sahip olduğu düşüncesi ortaya çıkmıştır (Grimes v.d., 1995, Laniado v.d., 1997). PC-3 ve LNCaP hücreleri, iki farklı metastatik insan prostat kanseri hücre hatlarıdır ve PC-3 hücreleri, LNCaP hücrelerinden daha yüksek bir invaziv kapasiteye sahiptir (Fraser v.d., 2000). Benign prostat hiperplazisi (BPH) ve prostat kanseri hücrelerinde VGSC α alt birimlerinin kapsamlı bir kantitatif ekspresyon çalışması yapılmıştır. PC-3 hücrelerinde, Nav1.6 ve Nav1.7'nin, normal prostat veya BPH örneklerinde 6-27 kat daha yüksek mRNA seviyeleri ile yüksek oranda eksprese edildiğini ortaya koymuştur (Shan v.d., 2014). Bu sonuçların tamamı VGSC α alt

birimlerinin prostat kanserinin metastatik yayılımını azaltmada yararlı bir tedavi stratejisi olabileceğini düşüncesini desteklemektedir (Shan v.d., 2014).

VGSC'lerden Nav 1.5'in aşırı ekspresyonunun saptandığı over kanserinde (OC) VGSC aktivitesi ile kanser oluşum ve gelişim süreçleri arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (Gao v.d., 2010). Gen ekspresyonu analizi, Nav1.1, Nav1.3, Nav1.4 ve Nav1.5'in mRNA seviyelerinin OC hücrelerinde normal over dokusundakilerden önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiş ve bu da VGSC'nin yumurtalık kanseri gelişiminde bir rolü olduğunu ortaya koymuştur. Ek deneyler, Nav1.5 proteininin OC'de yer alan ana VGSC olduğunu ve artan Nav1.5 ekspresyonunun OC'de kötü prognoz ve metastaz ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır (Liu v.d., 2021, Altamura v.d., 2021).

Kolon kanseri hücre soyları SW620, SW480 ve HT29 ile yapılan çalışmada Nav 1.5 izoformunun artan ekspresyonu saptanmış ve TTX uygulanmasıyla da üç hücre hattında sodyum akımında önemli bir azalma meydana geldiği ve hücre invazyonunda önemli derecede bir inhibisyon meydana geldiği belirlenmiştir. Çalışma, kolon kanseri hücrelerinin invaziv potansiyelinin Nav1.5'in işleviyle bağlantılı olduğunu göstermektedir (House v.d., 2010). Yapılan başka bir çalışmada, kolon kanserinin farklı evrelerinde SCN5A ekspresyon seviyelerinin giderek arttığı, belirlenmiş ve hastalık ilerlediğinde metastazlar saptandığında, SCN5A geninin aşırı bir ekspresyonunun mevcut olduğu tesbit edilmiştir. Çalışmanın devamında hücrelerdeki Na^+ akımı lokal anestezi ropivakain tarafından bloke edildiğinde ise hücre invazivliğinin yaklaşık %30 azaldığı saptanmıştır (Lopez-Charcas v.d., 2023).

Roger v.d., (2003) yüksek oranda invaziv meme kanseri hücreleri MDA-MB-231'de ilk defa hızlı içe doğru sodyum akımı bulunduğunu zayıf invaziv MCF-7 ve MDA-MB-468 hücrelerinde ise olmadığını bildirmiştir. MDA-MB-231 hücrelerindeki akımlar, yüksek konsantrasyonlarda Tetrodotoksin (TTX) tarafından bloke edildiğinde invazivliğin ~%30 oranında azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar meme kanseri hücrelerinde meydana gelen hızlı hücre içine doğru olan sodyum akımının (I_{Na}) hücre içi sodyum homeostazının düzenlenmesine katılımı yoluyla invazyon sürecine dahil olduğunu gösteren ilk bulgulardandır. Bir diğer çalışma ise MDA-MB-231 hücreleri, ağırlıklı olarak tetrodotoksin dirençli olan bir fonksiyonel VGSC'yi ifade ettiğini ardından da bu VGSC'nin Nav 1.5 olduğu ve Nav 1.5 tarafından taşınan Na^+ akımının invazyonu güçlendirdiği böylece VGSC'nin metastatik potansiyel ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Fraser v.d., 2005).

Sodyum kanallarının spesifik bir blokörü olan TTX, Tetraodontiformes'den kirpi balığı, küre balığı ve kurbağa balığı gibi bazı balıklar ile amfibi, ahtapot ve kabuklu deniz hayvanlarında da bulunan ve elde edilen bir nörotoksindir. TTX'e karşı değişen duyarlılıklarına göre VGSC'ler, TTX'e duyarlı (TTX-S) ve TTX'e dirençli (TTX-R) olmak üzere ikiye ayrılır; Nav 1.5, Nav 1.8 ve Nav 1.9, TTX'e dirençlidir (TTX-R), diğerleri TTX'e duyarlıdır (TTX-S). TTX VGSC kanalının porunu fiziksel olarak bloke eder ve böylece kanallardan sodyum geçişi engellemiş olur (Lee ve Ruben, 2008).

Epilepsi, aritmi, angina pectoris, atrial fibrilasyon gibi, kanalopatik hastalıklarda kullanılan ilaçların etki mekanizmaları VGSC kanallarını bloke etme üzerinedir. Benzer etki mekanizmasına sahip olan bu ilaçlar bazı grupları oluştururlar. Lokal anestezikler, antiaritmikler ve antiepileptikler, sodyum kanalları üzerinde kanal poruna ortak bir bölgeye bağlanmaları nedeniyle benzer etki mekanizmalarına sahiptir (Catterall, 1987, Ragsdale v.d., 1996, Catterall, 2012). Sodyum kanalları üç farklı durum arasında geçiş yapabilir: dinlenme (kapalı), açık (aktif) ve inaktive (iletken olmayan) (Hodgkin ve Huxley, 1952). Bu durumlar arasındaki geçişler voltaja ve zamana bağlıdır. Antiaritmik, antiepileptik ve lokal anestetik ajanların, her kanal durumu ile farklı etkileşerek aksiyon potansiyellerinin yayılmasını engelledikleri gösterilmiştir (Docherty ve Farmer, 2009, Fozzard v.d., 2011).

1850 yılında Karl von Scherzer'in arkadaşı Sigmund Freud'un önerisi ile koka bitksinin yaprağından kokain sentezlemesi ve özelliklerinin anlaşılması ile 1854 yılında hastasının gözüne kokain uygulayarak, lokal anestezi altında ilk klinik operasyonu gerçekleştirilmesi sodyum kanal blokerlerinin terapötik kullanımı olarak tarihe geçmiştir (Ruetsch ve Borgeat, 2001, Calatayud ve González, 2003). Kokainin toksik etkilerinin kısa sürede tanımlanması ve hem hastalar hem de bağımlı olan sağlık personeli arasında ölümlerin meydana gelmesi ile oluşan kriz ve organik kimyanın gelişmesi çoğu VGSC blokörü olan tropokain, eukain, holokain, ortoform, benzokain ve tetrakain gibi yeni amino ester lokal anesteziklerin 1891 ile 1930 yılları arasında sentezlenmesine yol açmıştır (Wang v.d., 1984, Herre v.d., 1990, Epstein v.d., 1993).

Kardiyolojide aritmilerin ilaç tedavisi ise 100 yılı aşkın bir süre önce, 'elektroterapi' kategorisine giren tedavilerden çok önce Wenckebach'ın kinidin'i tanıtmasıyla başlatılmıştır. Kinin ve ilgili alkaloidlerin atriyal aritmileri bastırmadaki etkinliği 1800'lerde kaydedilmiştir. (Levy ve Azoulay, 1994). Ancak, Wenckebach'ın kinin, kinidin izomerinin kullanımını tanımlamasıyla devam etmiştir (Vardanyan ve Hruby, 2016). Kardiyak elektrofizyoloji çalışmaları ile kalp kası sodyum kanallarının rolü ve antiaritmik ilaçların elektrofizyolojik

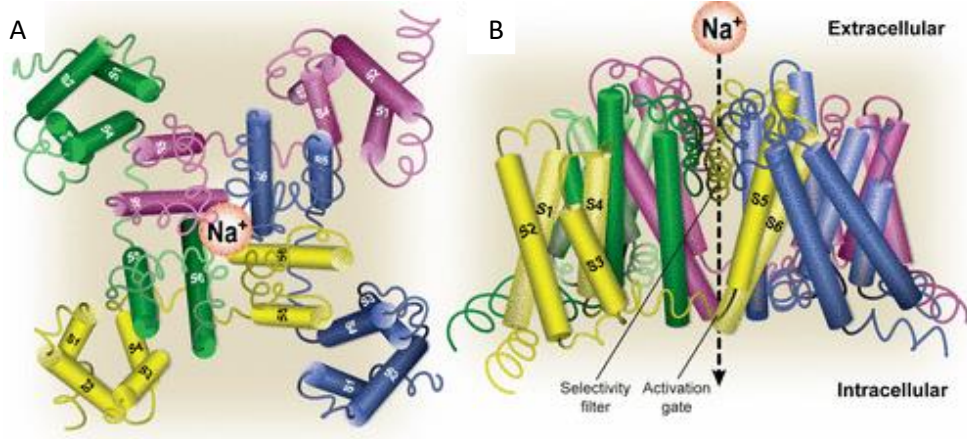
etkilerinin araştırılması güçlü ve spesifik anti-aritmilerin keşfine yol açsa da, toksisite ciddi bir sorun oluşturmuş ve ani kardiyak ölüm riski ile mortaliteyi arttırdığı gösterilmiştir (Backonja, 1994, Roberson v.d., 2010).

Çoklu sodyum kanalı bloke edici antiaritmiklerin gelişmesiyle birlikte, ilaçların temel elektrofizyolojik özelliklerine göre sınıflandırılmasının, temel etki mekanizmalarını anlamada, belirli ilaçları belirli hastalara veya aritmi mekanizmalarına hedeflemede ve yeni ilaç geliştirmeyi yönlendirmede yararlı olabileceği fikri ile ilaçlar sınıflandırılmıştır (Walker, 2006). İlk sınıflandırmada sodyum kanalı bloke edici ilaçları; kardiyak aksiyon potansiyellerini uzatanlara (kinidin, prokainamid, disopiramid) ve aksiyon potansiyelleri üzerinde çok az etkisi olanlar ile aksiyon potansiyellerini biraz kısaltanlar (lidokain ve türevleri) olmak üzere ayrılmıştır (Dessertenne v.d., 1966, Au v.d., 1983, Nattel, 1991).

1970'li yıllardaki deneyler, bazı dokularda, hızlı sodyum kanalı inaktivasyonunun eksik olabileceğini ve bu nedenle uzun voltaj clamp deneyleri kalıcı bir akımın gelişebileceğini göstermiştir. Sonraki çalışmalar, düşük bir TTX konsantrasyonunun maksimum fazı etkilemeden köpek Purkinje liflerindeki aksiyon potansiyellerini kısaltabileceğini ortaya koymuştur (Satin v.d., 1992, Fozzard v.d., 2005). Artık bir dizi bulgu, bu kalıcı veya geç sodyum akım (INa-L) inhibisyonunun, önemli proaritmik potansiyel olmadan aritmileri baskılayabileceği görüşünü desteklemektedir (Nagatomo v.d., 2000, Roden, 2014).

2.11 Nav 1.5 Kanalı ve Kardiyak Aksiyon Potansiyeli

Nav 1.5 VGSC, N- ve C-termini ve dört alanı birbirine bağlayan büyük hücre içi segmentlere sahip yaklaşık 2000 amino asit kalıntısından oluşan kardiyak aksiyon potansiyelinin başlatılmasında ve ardından kalbe yayılmasında önemli role sahip olan kanaldır (Şekil 2.24) (Catterall, 2012).



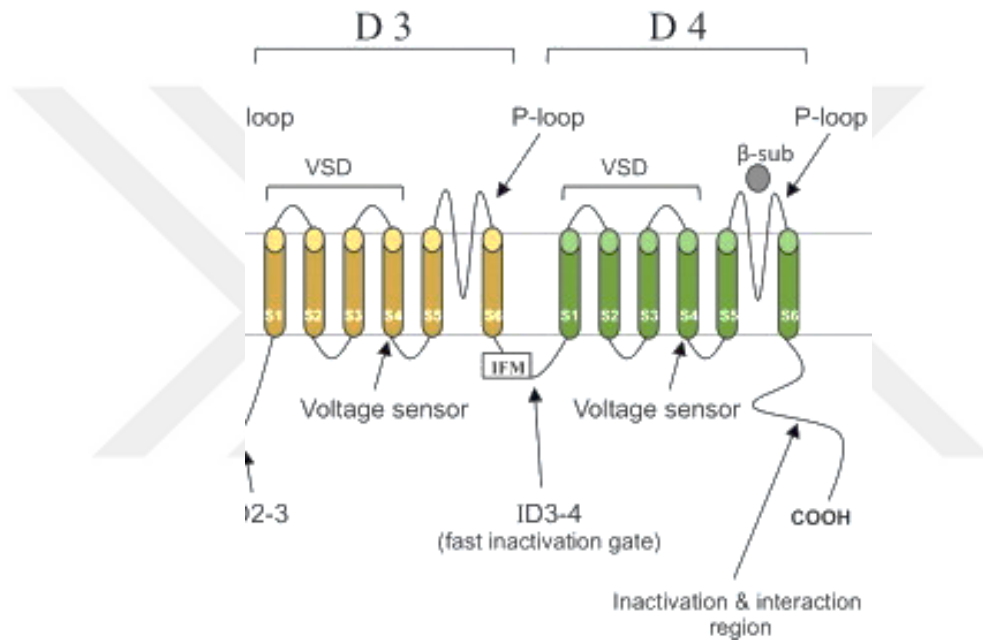
Şekil 2.24 Nav1.5 iyon kanalının homoloji modelinin 3 boyutlu yapısı, (A) yandan ve (B) üstten görünüşü (Rajamani v.d., 2016)

Sodyum kanallarının, çevre sıvılardaki diğer rakip iyonlar arasından Na^+ 'yı ayırt etme yeteneği, hücresel işlevlerin sürdürülebilmesi için çok önemlidir. Nav kanalları, hücre zarı voltajındaki değişikliklere dinamik olarak yanıt verir ve açık (iletken), kapalı (iletken değil) ve etkisizleştirilmiş (iletken değil) gibi farklı konformasyonel durumları benimser. Nav kanallar dört homolog alan (DI ile DIV) içerir; her bir alan S1 ile S4 zar ötesi segmentleri içeren bir voltaj algılama alanından (VSD) ve P1 ile bir döngü bölgesi ile bağlanan transmembran bölümleri S5 ve S6'yı içeren bir por alanından (PD) ve seçicilik filtresini (SF) oluşturan P2 sarmalları oluşur (Brackenbury, 2012).

Her VSD, hücre içi kapıda kanal aktivasyonunu (por açılması) veya kanal deaktivasyonunu (por kapanması) tetikleyebilen S4 segmentinin hareketine yol açan membran potansiyelindeki değişiklikleri algılar. Dört voltaj algılama alanı, por alanı (PD) tarafından oluşturulan merkezi bir kanal etrafında düzenlenmiştir (Xu v.d., 2019, Wang v.d., 2022). VSD, transmembran segmentleri S4 ve S5 arasında hücre içi bir bağlayıcı ile PD'ye bağlanır. Depolarizasyon üzerine, pozitif yüklü S4 transmembran segmentlerinin hücre dışı yüzeye doğru hareket ettiğine inanılmaktadır. Bu hareket, hücre içi bağlayıcılar aracılığıyla por alanına aktarılır ve kanal porunun açılmasıyla sonuçlanan konformasyonel bir değişikliğe neden olur. Depolarizasyon sırasında, inaktivasyon kapısı kanal poru katlandıkça kanal inaktive olur. Membran repolarizasyonu üzerine Na kanalları inaktivasyondan kurtulur ve S4 segmentleri dinlenme pozisyonlarına geri dönerek bir sonraki depolarizasyon için kullanılabilir hale gelir (de Lera Ruiz v.d., 2015, Ahern v.d., 2016).

DIII ve DIV arasındaki hücre içi bağlayıcı, hızlı bir inaktivasyon kapılama mekanizmasına katkıda bulunan ve kanal açılmasının ardından Na^+ iletiminin hızlı bir şekilde

sonlandırılmasıyla sonuçlanan hidrofobik bir izolösin-fenilalanin-metiyonin (IFM) motifi içerir (Şekil 2.25) (Dubyak, 2004). Bu inaktivasyon süreci, Nav kanal fonksiyonunda ve ilaç bağlanmasında kritik roller oynar. S5 ve S6 segmentleri hücre dışı bağlantı por döngüleri (P döngüleri) kanal porunu ve seçicilik filtresini (SF) oluşturur. S6 segmentlerinin her biri hücre içi ucundan birer tane olmak üzere dört hidrofobik amino asit kalıntısı, aktivasyon kapısı adı verilen küçük bir hücre içi boşluk oluşturur. Kanalin açık gözenəğinin en dar kısmı olan ve özellikle nüfuz eden iyonla etkileşime giren amino asit kalıntılarıyla kaplı seçicilik filtresi (SF), Na^+ seçiciliğinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar (Hille, 2001).



Şekil 2.25 DIII ve DIV arasındaki IFM motifi (Stojilkovic v.d., 2022)

Düzgün çalışan bir VGSC için önemli olan, son derece güçlü moleküler seçim görevi yapan ve tüm memeli VGSC'leri arasında evrimsel olarak korunmuş olan kanalın SF'leridir. Farklı sodyum kanallarının, metal bağlayıcı grupların simetrisi, sayısı, yükü, düzeni ve kimyasal türü ve por boyutu bakımından değişen farklı SF'leri vardır. Bu SF'lerin her biri iyon geçirgenliğini kolaylaştırmada ayrı bir rol oynar. Dış SF (EEDD halkası), E375 (DI), E901 (DII), D1423 (DIII) ve D1714 (DIV) olmak üzere dört amino asit rezidüsünü kapsar. Bu rezidüler dört alana yayılmıştır. Tüm alanlardaki P1 ve P2 sarmallarını birbirine bağlayan kısa dönüşler, seçiciliğe özgü bu kalıntıları içerir. Bir dizi çalışma, SF'yi oluşturan rezidülerden herhangi birinin mutasyonunun sadece kanalın seçiciliğini etkilemekle kalmayıp aynı zamanda kanalın geçit kinetiğini de etkileyebileceğini göstermiştir (Ahmed v.d., 2017).

α alt birimindeki bir diğer önemli yapısal eleman, DIII ve DIV homolog alanları birbirine bağlayan hücre içi bir döngüden oluşan inaktivasyon kapısıdır. İnaktivasyon kapısı menteşeli bir kapak gibi görevi yapar ve hızlı inaktivasyon sırasında porun hücre içi tarafına doğru katlanır (Djamgoz ve Onkal, 2013).

Domain III'ün voltaj sensörünün aktivasyonu, IFM motifinin inaktivasyon kapısı reseptörüne bağlanmasına izin verir. DEKA seçicilik motifindeki Asp ve Ala, iyon seçicilik filtresinin duvarlarını kaplarken, Glu ve Lys, bir yük delokalizasyon ağı aracılığıyla Na⁺ iyonlarını kabul edip serbest bırakabilecek konumlardadır. Nav1.5'nin SF'sinin genel yapısı, TTX için yüksek bir afiniteye sahip olan Nav1.7 kanalı ile neredeyse aynıdır (Kruger ve Isom, 2016).

Tyr362, TTX'in Nav1.5'te eksik olan, aromatik moleküllerin atomlar arası etkileşimi veya bir diğer adı ile istifleme etkileşimi yoluyla Nav1.7'ye sıkıca bağlanmasına yardımcı olur. Bu anahtar etkileşimin olmaması, TTX, Nav1.5'in bağlanma afinitesini 500 kata kadar azaltır. Bu nedenle bu rezidü, TTX'e dirençli sodyum kanallarını (Nav1.5 ve Nav1.8-9) bir Cys veya Ser ile TTX'e duyarlı kanallardan (Nav1.1-1.4, Nav1.6 ve Nav1.7) ise, bir Tyr veya Phe ile ayıran yapısal belirleyicidir. Bununla birlikte Nav1.5, Asp373'ün hücre dışı tarafında Cys374 ve Arg377 için net bir yoğunluk gösterir (Wood ve Baker, 2001, Diss v.d., 2004, Yu v.d., 2006, Wang v.d., 2017).

Iyon seçicilik filtresinin yeri ilk olarak klasik sodyum kanal blokleri tetrodotoksin için bağlanma bölgesinin haritalanmasıyla ortaya çıkarılmıştır. TTX, SF dış kısmına bağlanır ve gözenekleri tıkar (Hille, 1975; Terlau v.d., 1991). Sinir ve iskelet kasındaki (4-10 nM) sodyum kanallarına kıyasla Nav1.5 kanallarına (2 μ M) olan karakteristik düşük afinitesi, esas olarak tek bir amino asit kalıntısının ikame edilmesiyle belirlenen sodyum kanalı farmakolojisinin ayırt edici bir özelliğidir (Fozzard ve Hanck, 1996; Sivillotti v.d., 1997).

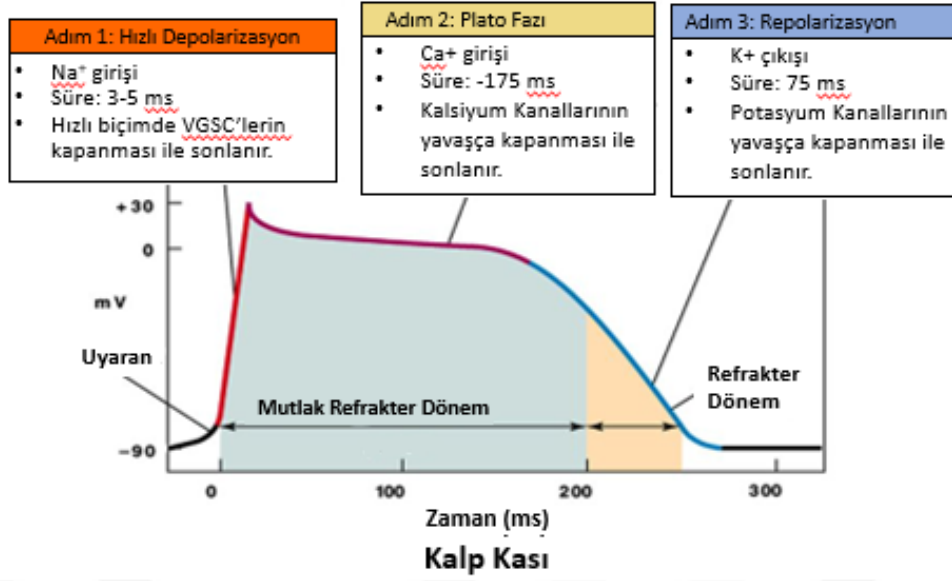
Nav1.5, işlevsel davranışını modüle eden birkaç translasyon sonrası modifikasyona uğrar. Bu modifikasyonlar, proteinin hem kanal kinetiğini hem de hücre membranına doğru hedeflenmesini modüle edebilir. VGSC, ağır glikosile edilmiş bir proteindir. Hem kanal aktivasyonu hem de kanal inaktivasyonu, bu translasyon sonrası modifikasyonla düzenlenir (Detta v.d., 2015). Bir diğer modifikasyon şekli olan fosforilasyon, kardiyak sodyum kanalının iyon trafiğini değiştirebilir. Nav1.5'in protein kinaz A (PKA) ile doğrudan fosforilasyonu, hücre membranındaki kanal yoğunluğunu artırır (Hallaq v.d. 2006). Ubikuitin-proteazom sistemi (UPS), özellikle Nav1.5 olmak üzere iyon kanalları dahil hücre içi proteinler için önemli bir parçalayıcı sistemdir. Bu modifikasyon membran proteinlerinin bozulması yanı sıra, DNA

hasarının ve / veya hücre sinyallemesinin kontrolü gibi proteolitik olmayan etkilerde rol oynar (van Bemmelen v.d., 2004, Chen ve Sun, 2009).

Bir aksiyon potansiyeli, bir membran boyunca voltajdaki hızlı bir değişim dizisidir. Membran voltajı veya potansiyeli, herhangi bir zamanda, hücre dışı ile hücre içi iyonların oranı ve her bir iyonun geçirgenliği ile belirlenir (Stojilkovic v.d., 2022). Kardiyak aksiyon potansiyeli, kardiyomisinlerin zamana karşı membran potansiyeli olan V_m 'nin bir kaydıdır. Her kalp döngüsü sırasında, iyonlar kardiyomiyosit hücre zarı boyunca ileri geri hareket ederek V_m 'yi değiştirir. Çok sayıda iyonik akımın bütünsel davranışını yansıtan kardiyak aksiyon potansiyeline büyük ölçüde Na^+ , Ca^{2+} ve K^+ iyonlarının hareketi hakimdir (Şekil 2.26) (Fishman v.d., 2020).

Bu iyonlar, kanalların seçici porlarından hücre içine veya dışına geçiş sağlarlar. Bu iyonik yolların davranışı oldukça hassas düzenlenir. İyonların transportu, membran potansiyelindeki değişiklikler, ligand bağlanması, siklik adenozin monofosfat gibi ikinci haberciler ve translasyon sonrası modifikasyon olan birçok faktörden etkilenir (Kay, 2017). Kanal fonksiyonu ve buna bağlı olarak aksiyon potansiyeli davranışı, normal fizyolojik faktörlere, özellikle kalp atış hızına yanıt olarak dinamik olarak ayarlanır. Bununla birlikte, kalp hipertrofisi ve yetmezliği ile ilişkili edinilmiş sendromların yanı sıra giderek artan sayıda konjenital hastalık da dahil olmak üzere bir dizi patolojik stresör kanal aktivitesini etkiler. Altta yatan patolojiden bağımsız olarak, aksiyon potansiyeli davranışı üzerindeki etkiler aritmik aktiviteyi tetikleyebilir (Van Der Werf v.d., 2010, Garcio-Elias ve Benito, 2018, Li v.d., 2023).

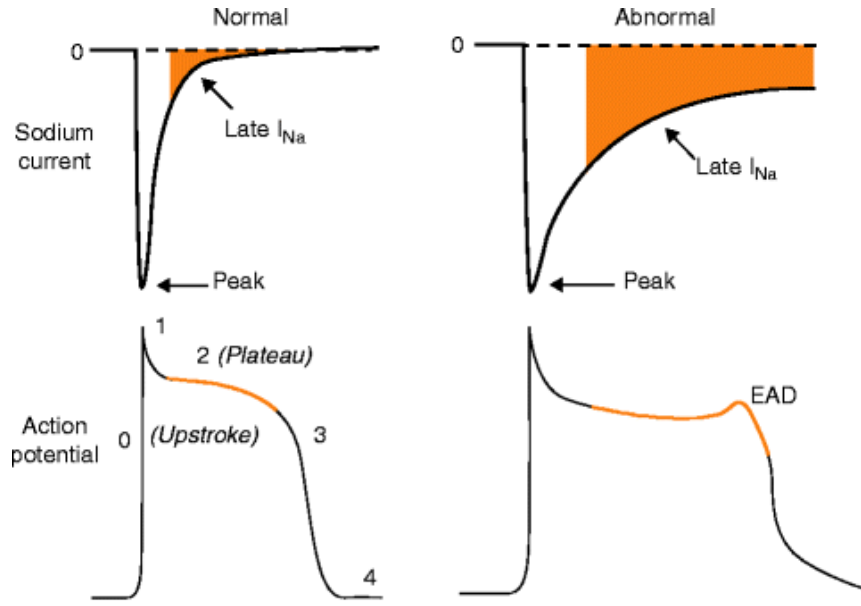
Kardiyak aksiyon potansiyeli, her biri meydana gelen ana iyonik hareketleri yansıtan fazlara ayrılmıştır. İlk olarak sodyum iyonlarının akışı başlar. Ardından sodyum kanalı etkisizleştirilir ve bu voltaj değişikliği kalsiyum kanallarının açılmasına neden olur. Son olarak potasyum iyonlarının repolarize edilmesi ile sonlanır (Şekil 2.26). Bu mekanizma, kalp atışını tutarlı bir frekansta sürmek için tekrarlanan aksiyon potansiyelleri üretmek bakımından çok önemlidir (Trenor v.d., 2017, Hof v.d., 2019).



Şekil 2.26 Kalp kasının aksiyon potansiyeli (Sundjaja ve Makaryus, 2023)

Nav1.5 tarafından taşınan sodyum akımı, atriyal ve ventriküler aksiyon potansiyellerinin hızlı yükselmesi ve depolarizasyonun kalp boyunca hızlı yayılmasından sorumludur (Potet v.d., 2016).

Dinlenme membran potansiyelinde, Nav1.5 kanallarının büyük çoğunluğu kapalı durumdadır. Depolarizasyondan sonra, Nav1.5 kanalları 1-2 ms içinde açılır ve daha sonra hızla inaktive olurlar. Bu durum, erken sodyum akımına ve kardiyak aksiyon potansiyelinin yükselmesine neden olur (Makielski, 2009). Geç sodyum akımı ise aksiyon potansiyelinin tepe noktasından sonraki oluşan akımdır. Normal koşullar altında Na^+ akımının büyük kısmını erken sodyum akımı (INAT) oluşturur ancak geç sodyum akımı (INAP/INAL) küçük bir akım olmasına rağmen, kanal proteininin veya bazı hastalıklarda meydana gelen mutasyonlar ile, Nav1.5 kanal aktivitesini etkileyerek geç sodyum akımının artmasına neden olur (Şekil 2.27) (Horváth v.d., 2020).



Şekil 2.27 Normal ve Normal Olmayan Geç Sodyum Akımı (Rajamani v.d., 2013)

Nav 1.5'i kodlayan gen olan SCN5A'daki mutasyonlar, konjenital ve edinilmiş uzun QT sendromu, Brugada sendromu, iletim yavaşlaması, hasta sinüs sendromu, atriyal fibrilasyon ve dilate kardiyomiyopati dahil olmak üzere birçok kardiyak fenotiple ilişkilendirilmiştir (Abriel, 2010). Mutasyon gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanan artan geç sodyum akımı (INaP), ritim bozuklukları da dahil olmak üzere kalp hastalıklarında önemli bir patofizyolojik problemdir. Bu yüzden geç sodyum akımının seçici inhibisyonu, kardiyak iskemi ve kalp yetmezliğinde elektriksel ve kontraktıl disfonksiyonun tedavisi için terapötik bir hedefdir.

Birçok lokal anestezi ve antiaritmik ajan, geç sodyum akımı blokleri olarak tanımlanmaktadır (Fairhurst v.d., 2016). Günümüzde anti aritmik ilaçlar ana etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır. Sınıf I, II, III, IV olarak ayrılırlar (Tablo 2.7).

Sınıf I kendi içerisinde A, B ve C olmak üzere üç gruba ayrılır. A grubu orta derece blokaja, B grubu hafif derece blokaja ve C grubu ise yüksek derece blokaja neden olan ajanları içerir. Sınıf II, Sınıf III potasyum kanallarını bloke ederken, Sınıf IV ise kalsiyum kanallarını bloke eder.

Tablo 2.7 Antiaritmik ilaçların sınıflandırılması (King v.d., 2022)

		İlaçlar
Sodyum Kanal Blokerleri		
Orta Derece Blokaj	Sınıf IA	Prokainamid
Hafif Derece Blokaj	Sınıf IB	Lidocaine
		Ranolazine
		Fenitoin
		Eleclazine
		GS-967
Yüksek Derece Blokaj	Sınıf IC	Flekainid
B adrenerjik Blokerler		Sınıf II
Potasyum Kanal Blokerleri	Sınıf III	Proplanolol
		Esmolol
		Amiodorane
Kalsiyum Kanal Blokerleri	Sınıf IV	Sotalol
		Verapamil

En sık görülen klinik aritmilerden Atriyal fibrilasyon (AF), atriyumun hızlı ve düzensiz elektriksel aktivasyonu ile karakterize edilir ve esas olarak yüksek tromboembolizm ve iskemik inme riski nedeniyle de önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir. Nispeten yavaş ayrışma kinetiğine sahip Na⁺ kanal blokerleri olan IC sınıfı antiaritmik ilaçları, erken başlangıçlı AF'nin kardiyoversiyonunda ve sinüs ritminin korunmasında etkilidir. AF tedavisinde IC sınıfı antiaritmik ilaçların etkinliğine rağmen, Kardiyak Aritmi Baskılama Denemesi (CAST) çalışması, bu ilaçların miyokard enfarktüsülü hastalarda artmış mortalite taşıdığını ve bu tür bireylerde kullanımlarını engellediğini göstermiştir. Sonuç olarak, VGSC'lerin atriyal seçici hedeflemesine izin veren alternatif ajanlara büyük ilgi gösterilmektedir.

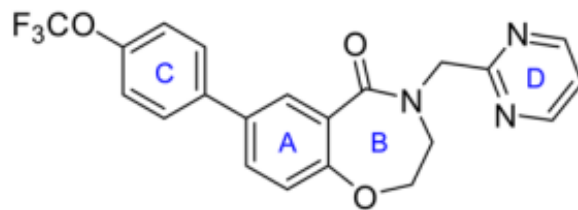
Atriyal etki seçiciliği, ilk olarak voltaj kapılı Na⁺ kanallarının moleküler, biyofiziksel veya farmakolojik özelliklerindeki atriyal-ventriküler farklılıklar, dinlenme membran potansiyeli ve aksiyon potansiyeli konfigürasyonundaki atriyal-ventriküler farklılıklar yoluyla ortaya çıkabilir. Ventriküler miyositlerin voltaj kapılı Na⁺ kanal akımı (I_{Na}) ile karşılaştırıldığında, atriyal I_{Na} daha hızlı başlangıçlı olarak daha negatif potansiyellerde inaktive olur ve aktive olur ve inaktivasyondan daha yavaş iyileşir. Ventriküler miyositlerin I_{Na} ile karşılaştırıldığında,

atriyal INa daha hızlı başlangıçlı olarak daha negatif potansiyellerde inaktive ve devamında aktive olur ve inaktivasyondan daha yavaş iyileşir.

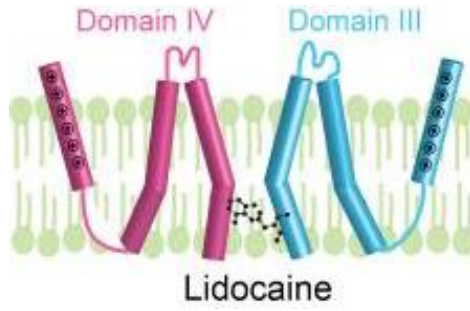
Sınıf IB de yer alan ve kronik stabil angina tedavisi için 2006 yılında FDA tarafından onaylanan Ranolazin (Ranexa), VGSC'lere karşı atriyal seçici etkiye sahip bir ilacın prototipik örneğidir. Ranolazin, Na⁺ kanal girişindeki lokal anesteziik bağlanma bölgesine bağlanarak kanalı bloke eder ve INaL için nispeten seçicidir. Ranolazinin anjinal hastalarda AF insidansını baskıladığı ve erken başlangıçlı AF hastalarının farmakolojik kardiyoversiyonunda ve postoperatif AF'nin önlenmesinde etkili olduğu önerilmektedir. Bununla birlikte, terapötik olarak ilgili konsantrasyonlarda, ranolazinin ventriküler kas aksiyon potansiyeli repolarizasyonundan sorumlu büyük bir dış akım olan Gecikmiş Doğrultucu Potasyum akımı (IKr) inhibe ettiği ve ventriküler repolarizasyonu geciktirdiği görülmüştür (Antzelevitch v.d., 2004). Bundan dolayı IKr üzerinde etkisi olmayan atriyal seçici bir antiaritmik ilaçların geliştirilmesine önem gösterilmelidir. Klinik etkisi geç sodyum akımı bloğundan kaynaklandığından, QT aralığını da minimum düzeyde uzatmaktadır (Makita v.d., 2002, Zaza v.d., 2008, Antzelevitch v.d., 2011, Belardinelli v.d., 2013).

2.12 Eleclazine

Eleclazine (ELE=GS-6615), dihidrobenzodiazepin tipi bir yapıya sahip, moleküler ağırlığı 415.11 g/mol olan, çeşitli in vitro ve in vivo modellerde geç sodyum akımını bloke eden bir etki mekanizması ile güçlü antiaritmik etkiler gösteren sınıf IB sodyum kanal blokeridir (Şekil 2.28). ELE ile yapılan klinik çalışmalar kalp dokularındaki geç sodyum akımı için oldukça seçici bir inhibitör olduğunu göstermektedir. Bu ajanın Na⁺ kanalı üzerindeki etki alanı tam belirlenmemiş olmasına rağmen, lidokainin dahil olduğu lokal anesteziik ilaçlar grubu gibi, kanal porunun içinde III. ve IV. segmentlerin arasına bağlandığı varsayılmaktadır (Şekil 2.29). Rajamani v.d., (2016) tarafından sodyum kanalının %50 oranında inhibisyonu için gereken konsantrasyonu (IC₅₀) 0.7 µM olarak saptanmıştır.



Şekil 2.28 Eleclazine kimyasal formülü (Pubchem)



Şekil 2.29 Lidocaine'in bağlanma noktası (Zhu v.d., 2021)

Nav1.5 kanalları, aktif, inaktif ve dinlenme durumlarına bağlı olarak farklı ilaç bağlama özelliklerine sahiptir. Buna göre, gerçek açık veya kapalı kanal durumlarına bağlı olarak kanalların bağlanma bölgeleriyle etkileşime giren ilaçlar INaL üzerinde değişken etkiler üretebilir.

Na⁺ kanal akımını inhibe eden ilaçlar tepe sodyum akımını, geç sodyum akımını veya her ikisini de azaltabilir. Ventriküler miyositlerdeki Na⁺ kanallarının inhibitörleri arasında, ranolazin, şu anda klinik uygulamada kullanılan tepe noktasından farklı olarak, son zamanlarda en seçici inhibitör olarak görünmektedir (Antzelevitch v.d., 2011). Bu gözlemle tutarlı olarak, ranolazin ventriküldeki elektriksel impulsların iletim hızını azaltmaz. Buna karşılık, flekainid gibi Sınıf IC Na⁺ kanal inhibitörleri hem tepe hem de INaL'nın güçlü inhibitörleridir (Belardinelli v.d., 2013). Ancak yapılan çalışmalar sonucu ELE'nin geç fakat tepe sodyum akımını yerine geç sodyum INaL'ı azaltma seçiciliğinin 40 kattan daha az olması mümkün görünmektedir (Rajamani v.d., 2016).

LQT3 hastalarında gözlenen uzamış ve heterojen ventriküler repolarizasyon, Nav1.5'teki fonksiyon kazancı mutasyonlarının neden olduğu Na⁺ iletkenliğinin artmasından kaynaklanır. ELE, 0.33 ila 1.7 mM arasında değişen potansiyele sahip test edilmiş tüm mutant kanallar için artmış INaL'ı inhibe etmektedir. Buna karşılık, ELE, uzun QT3 sendromlu hastalarda güvenli ve iyi tolere edildiği ve QT aralığını kısalttığı bildirilen ranolazine benzer özelliklere sahip seçici bir INaL blokerdir. ELE'nin, IKr üzerinde çok az etkisi olup, kullanıma bağlı bir şekilde hızla INaL'ı inhibe ettiği ve hayvan modelinde AF'yi azalttığı gösterilmiştir (Belardinelli v.d., 2013). Lokal anestetik bağlanma bölgesine bağlanan ELE'nin INaL üzerindeki inhibe etkileri mutant kanalda azalmıştır. Bu deneysel veriler merkezi gözeneğin INaL'ın ELE tarafından seçici inhibisyonundaki rolünü vurgular (El-Bizri v.d., 2018).

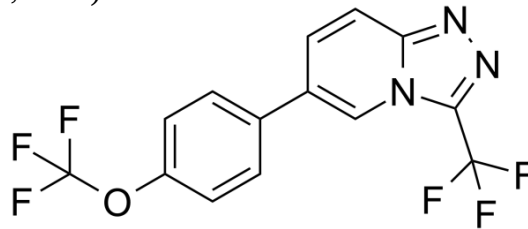
ELE'nin, alışılmadık derecede hızlı kinetik ile kardiyak Na⁺ kanallarını bloke ettiği, lokal anestetik bağlanma bölgesi ile etkileşime girdiği ve INaL için belirgin seçicilik gösterdiği saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada atriyal ve ventriküler miyositlere bir nörotoksin olan ve

VGSC kanallarının inaktivasyonunu yavaşlatan neurotoxin 2 (ATX-II) ile aktive edilmiş INAL durumunda ELE'nin iki hücre içinde benzer afinite gösterdiği görülmüştür. Terapötik olarak etkili ELE dozları $\sim 0.5 \mu\text{M}$ plazma konsantrasyonları üretmesine rağmen, ELE oldukça lipofiliktir ($\log P \sim 4.35$) ve kalp dokusunda daha yüksek konsantrasyonlarda birikir. Bu nedenle, ELE ile tedavinin, özellikle taşiaritmiler sırasında daha yüksek oranlarda INAL'ı etkileyeceği düşünülebilir (Caves v.d., 2020).

İskemik kalp hastalığı, kalbin yeterli kan ve oksijen alamayıp, fonksiyonlarının bozulmasıyla sonuçlanan bir hastalıktır (Severino v.d., 2020). İskemi sırasında üretilen reaktif oksijen türleri (ROS), kardiyak sodyum kanalını değiştirebilir ve kanalın eksik inaktivasyonu ile sonuçlanabilir ve inaktivasyon kapısının tekrar tekrar açılmasına izin vererek aksiyon potansiyelinin sonlarında meydana gelen kalıcı bir sodyum akımı ile sonuçlanır, bu da iskemi sırasında erken depolarizasyon olasılığını artırır ve depolarizasyondan sonra geciken kalsiyum aşırı yüklenmesine yol açar. Tüm bu durumlar aritmileri tetikler. Tavşan kalbi ile yapılan bir in vivo çalışmada Ranolaze'nin bu geç akımı %15-30 aralığında bloke ettiği ve terapötik konsantrasyonlarda önemli β blokeri aktivitesine sahip olduğu görülmekle birlikte, Ele'nin Ranolazine'e göre 10 kat daha güçlü inhibisyon yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada ELE'nin β reseptörlerine herhangi bir inhibe edici özelliği görülmemiştir. ELE şu anda LQT-3 sendromu, Hipertrofik kardiyomiyopati ve İskemik kalp hastalığı tedavisi için klinik gelişim aşamasındadır. Haziran 2022 tarihinde kardiyak hastalıklar, konjenital, ailesel ve genetik bozukluklar üzerine kadınlar ile yapılan faz II çalışması başlamıştır ve devam etmektedir. ELE'nin INAL'ı inhibe etme yeteneği kardiyovasküler hastalığı olan hastaların tedavisi için faydalı olacak yeni bir güçlü geç sodyum inhibitörleri sınıfını temsil eder niteliktedir (Zablocki v.d., 2016).

2.13 GS-967

Anti aritmik olarak sentezlenen GS-967 (PRAX-330), moleküler ağırlığı 347.2 g/mol olan, kalp ve nöronlarda meydana gelen INaL'in seçici bir blokeri olarak kabul edilen sınıf IB bir ajandır (Şekil 2.30) (Barbieri v.d., 2019).



Şekil 2.30 GS-967 kimyasal formülü (Pubchem)

GS-967 ile yapılan kalp dokularında ve miyosit hücrelerinde in vivo çalışmalarda geç sodyum akımı için oldukça seçici ve güçlü bir inhibitör olduğu gösterilmiştir. IC50 değeri de 70-100 nM arasında olduğu saptanmıştır (Potet v.d., 2016). Ayrıca ventriküler aksiyon potansiyelinin süresini kısalttığı ve nörotoksin ATX-II'nin ve iskemi'nin proaritmik etkilerini azalttığı saptanmıştır (Belardinelli v.d., 2013). Bununla birlikte, GS967'nin öncelikli bir sodyum inhibitörü olmasına rağmen, aynı zamanda inaktivasyonu arttırdığı ve inaktivasyon sürecini uzattığı ve tepe sodyum akımı bloğu ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Bu etki, GS-967'nin aktive edilmiş durumlarda da Nav1.5 yüksek afiniteli bağlanması ile ilişkilendirilmiştir (Del Canto v.d., 2018). Bir diğer çalışmada INaL'ı baskılayan Ranolazin'den çok daha etkili bloker olduğu gösterilerek ve kinetik özelliklerine dayanarak, GS967 yeni güçlü sınıf Ib antiaritmik ajan olarak sınıflandırılması gerektiği öne sürülmüştür (Hézső v.d., 2021).

ELE ve GS-967'nin etkileri, sınıf Ib antiaritmik ve lokal anestezi olan lidokain etkilerine benzer olduğu VGSC'ye bağlanma noktalarında aynı olabileceği öne sürülmektedir (Zablocki v.d., 2016). Ancak kardiyomisinlerdeki geç sodyum akımını lidokain, ranolazin veya antiepileptik ilaç olan lakozamidinden daha güçlü şekilde engelleyebileceği gösterilmiştir (Potet v.d., 2020).

I_{Kr} 'ye karşı çok az aktiviteye sahip bir kavram kanıtı seçici INaL inhibitörü olan triazolopiridin GS-967'nin, aksiyon potansiyeli süresine, postrepolarizasyon refrakterliğine ve aksiyon potansiyelinin maksimum yüksekliğine karşı atriyal seçici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Burashnikov v.d., 2015). GS-967'nin daha önce kardiyak voltaj kapılı sodyum kanalının aracılık ettiği kalıcı sodyum akımını inhibe ettiği ve ventriküler aritmilerin etkili bir baskılayıcısı olduğu gösterilmekle birlikte Anderson v.d., (2014) yaptığı araştırmada ranolazinin aksine GS-967'nin kan beyin bariyerine de etkili şekilde nüfuz edebildiğini ve vücuttan daha yavaş eliminasyona sahip olduğunu ortaya koymuş olup, GS-967'nin antiepileptik bir özellik de gösterebildiği belirtilmiştir. Elde edilen veriler, GS-967'nin nöronal voltaj kapılı sodyum kanalının aracılık ettiği kalıcı sodyum akımını FDA onaylı antiepileptik ajan Fenitoin'den daha fazla bloke edebilme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda GS-967'nin diğer kardiyak iyon akımları kardiyak kontraktilite ve iletim hızı üzerinde minimum etkisi olduğunu belirten veriler mevcuttur (Belardinelli v.d., 2013, Fernandes v.d., 2014).

Ailesel hemiplejik migren (FHM), nöronal veya glial iyon taşıyan membran proteinlerini kodlayan üç farklı gendeki mutasyonların neden olduğu kalıtsal otozomal dominant migrenin şiddetli bir şeklidir. FHM1, presinaptik nöronal Ca^{+2} kanal Cav2.1'i kodlayan gendeki

mutasyonlardan kaynaklanır, FHM2, glial spesifik Na-K-Atpaz'ın mutasyonlarıyla ilişkilidir, oysa FHM3, nöronal CNS spesifik Na⁺ kanal Nav1.1'i kodlayan gen olan SCN1A'daki mutasyonlardan kaynaklanır. Kardiyak sodyum kanalı SCNA5'te meydana gelen mutasyonlar Long QT'ye (LQTS) ve Brugada sendromuna (BS) yol açabileceğinden ranolazin gibi “geç Na⁺ akım blokerleri”, mutasyona bağlı inaktivasyon bozulmasının spesifik düzelticileri olarak önerilmiştir. Bu nedenle, FHM hastalarında da benzer bir strateji uygulanabilmesine yönelik araştırmalar mevcuttur. FHM3'e neden olan SCNA1 mutasyonlara sahip HEK-293 hücreleri ile yapılan bir çalışmada 5 µM GS-967 uygulamasının, test edilen tüm mutantlarda kalıcı akımları güçlü bir şekilde azalttığı ve GS-967'nin Nav1.1 proteinine doğrudan bağlandığını ve onunla etkileşime girdiğini doğrulamıştır. Devamında *Xenopus* oositleri ile yapılan in vivo deneylerden, GS967'nin kan-beyin bariyerine de nüfuz ettiğini ve bu nedenle FHM3 tedavisinde avantajlı olabileceği düşünülmektedir (Barbieri v.d. 2019). Fare nöronları ile yapılan bir başka çalışmada, GS-967'nin kan-beyin bariyerini etkili bir şekilde geçme yeteneğinin gözlemlenmesi, Nav 1.2'yi bloke etmesi ve ranolazinden daha yavaş bir eliminasyon oranı ile birleştirilmiş ve bu in vitro verilere dayanarak, GS967'nin in vivo'da da antiepileptik bir aktivite göstereceği varsayılmaktadır (Anderson v.d., 2014).

Bir dizi nöronal Na⁺ kanal izoformu üzerindeki seçici olmayan etkilerle ilişkili GS-967'nin düşük terapötik indeksi ve yüksek beyin penetrasyonu, onu sadece antiaritmik bir ilaç olarak geliştirme için çekici kılmamaktadır (Koltun v.d., 2016).

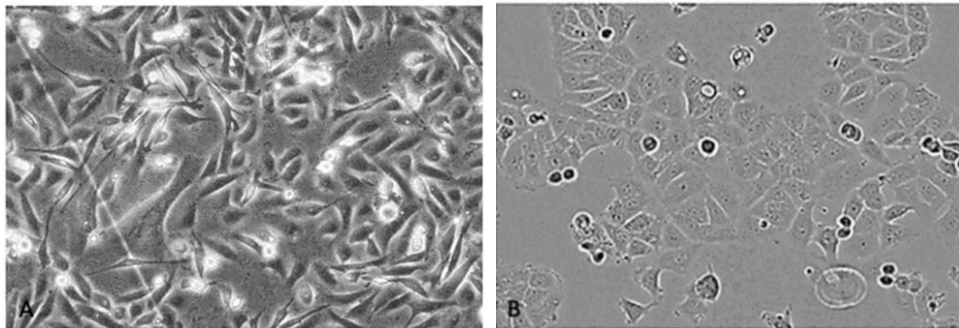
3. MATERYAL VE METOT

Antiaritmik iyon kanal blokeri olarak sentezlenen farmakolojik ajanlar ELE ve GS-967'nin meme kanserinde metastatik aktiviteyi arttıran Nav1.5 VGSC üzerine etkisi, yüksek metastatik MDA-MB-231 ve düşük metastatik MCF-7 hücrelerinde değerlendirilmek üzere ajanların; i) hücrelerin proliferatif özellikleri, ii) metastatik aktivitenin başlangıç aşaması olan lateral ve transwell hücre hareketi ile iii) Nav 1.5 kanalının protein ve gen ekspresyonları normoksi ve hipoksi olmak üzere iki farklı ortam koşulunda araştırılmıştır.

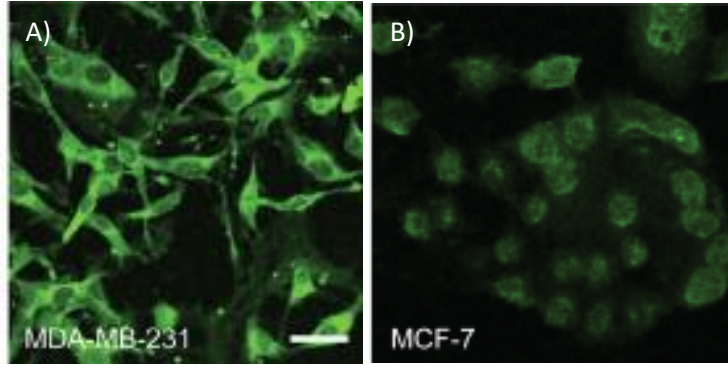
3.1 Hücreler

Çalışmada kullanılan yüksek metastatik meme kanseri MDA-MB-231 hücre hattı MD Anderson kanser merkezinde invaziv duktal karsinomlu bir hastanın plevral efüzyonundan izole edilmiştir. ER ve PR ekspresyonu olmayan ve HER2 amplifikasyonu da göstermeyen, yanı sıra p53 mutasyonuna sahip oldukça agresif ve invaziv fenotip gösteren üçlü negatif meme kanseri hücre hattıdır. Bu hücre hattı geç evre meme kanserini modellemek için araştırılmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 3.1.A). (Mur v.d., 1998). Normal meme hücrelerine kıyasla MDA-MB-231 hücrelerinin 7 kat daha fazla Nav1.5 eksprese ettiği floresan boya ile gösterilmiştir. (Şekil 3.2A) (Gould v.d., 2018).

Diğer hücre hattı MCF-7 ise östrojen, progesteron ve glukokortikoid reseptörlerine sahip bir insan meme kanseri hücre hattıdır (Şekil 3.1B). Michigan Kanser Vakfından Dr. Soule tarafından 1970 yılında 69 yaşındaki Kafkasyalı bir metastatik meme kanserinin (adenokarsinom) plevral efüzyonundan elde edilmiştir. Hormona yanıt veren ilk meme kanseri hücre hattıdır. Bu hücre hattı az agresif ve non-invaziv karaktere sahiptir (Gunduz v.d., 2011). Normal meme hücrelerine kıyasla MCF-7 hücreleri 3 kat daha fazla Nav 1.5 eksprese etmektedir (Şekil 3.2B) (Gould v.d., 2018).



Şekil 3.1 Üçlü negatif meme kanseri (A) Yüksek metastatik MDA-MB-231 hücreleri, (B) Düşük metastatik MCF-7 hücreleri



Şekil 3.2 Floresan boy ile Nav 1.5 görünümü. (A) MDA-MB-231 hücrelerinde (B) MCF-7 hücrelerinde (Gould v.d., 2018)

3.2 Hücrelerin Kültüre Edilmeleri

MDA-MB-231 ve MCF-7 kullanılmış hücreleri, L-Glutamin ve Fetal Bovine Serum (FBS) eklenmiş DMEM medyum içeren petrilerde, 37°C, %5CO₂ normoksi ortamında inkübatörde yetiştirilmiştir. Tüm deneylerde pasaj numarası 9 ile 15 arasında olan hücreler kullanılmıştır. Hücreler her gün inverted mikroskop ile incelenmiş, petri kabının %80'inden fazlasını kaplaması sonrasında pasajlama yapılmıştır. Pasaj için hücreler tripsinde 5-7dk tutularak petriden kalkmaları sağlanılmıştır. Hücreler yuvarlak hale gelerek tamamına yakını petriden ayrılmış ise, dikkatli bir biçimde toplanan hücreler, içinde DMEM medyum bulunan santrifüj tüpüne eklenmiştir. 2500 rpmde 4 dk boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmış ve üzerine taze besiyeri konularak homojen bir hücre süspansiyonu oluşturulmuştur. Hücreler tripan mavisi yöntemi ile hemositometrede sayılarak 1 ml'deki canlı hücre sayısı belirlenmiştir.

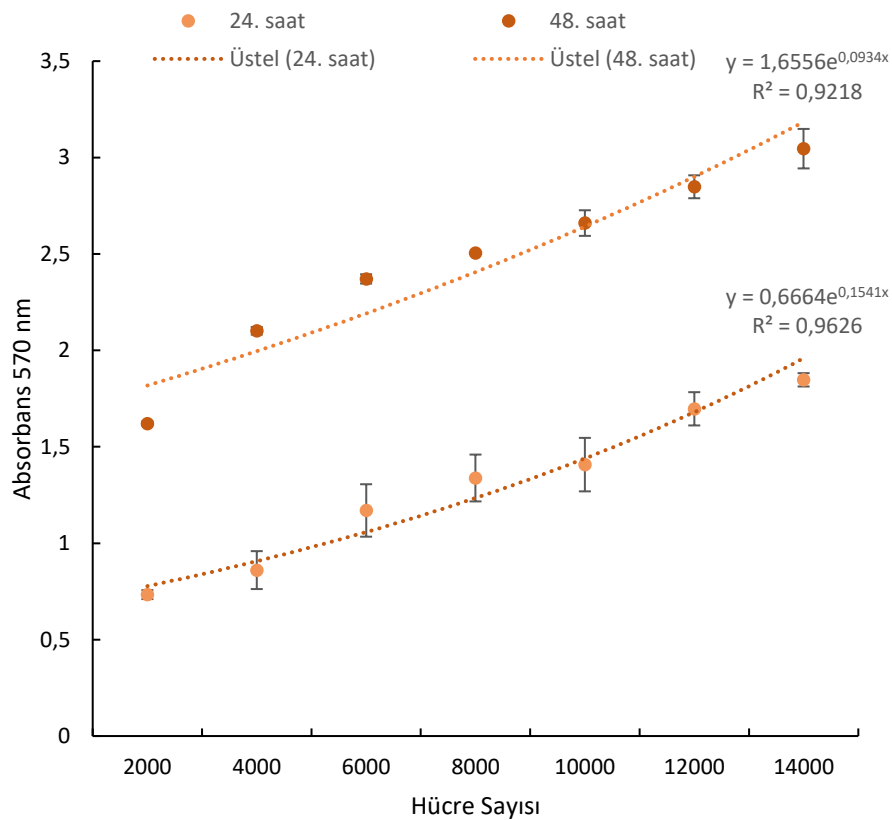
3.3 Farmakolojik Ajanların Hazırlanması

Farmsakolojik ajanlardan ELE (Sigma) satın alındı ve üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda 4 mg'ı 1 ml dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürülerek 1mM'lık ana stok elde edilmiştir. Bu stok PBS ile 1:10 dilüe edilerek 100 µM ve 10 µM stok solüsyon olarak hazırlanmıştır. Diğer ajan GS-967 (Alamone labs) üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda 3mg'ı 1 ml DMSO'da çözündürülerek 1mM'lık ana stok hazırlanmıştır. Ana stoktan 1:10 PBS ile dilüe edilerek 100 µM ve 10 µM olmak üzere iki ayrı stok yapılmıştır. Hazırlanan stoklar -21°C'de saklanmıştır. DMSO miktarı her iki ajan için %0.1'dir. Pozitif kontrol olarak kullanılması planlanan VGSC blokeri TTX (Alamone labs) 1mg'ı 1 ml distile su ile çözündürülmüş olup, 3132 µM ana stok olarak hazırlanmıştır. PBS ile dilüe edilerek deneylerde kullanılmak üzere 3 µM stok solüsyon elde edilmiştir. TTX stokları -21°C'de muhafaza edilmiştir.

3.4 Büyüme ve Toksisite

3.4.1 Büyüme

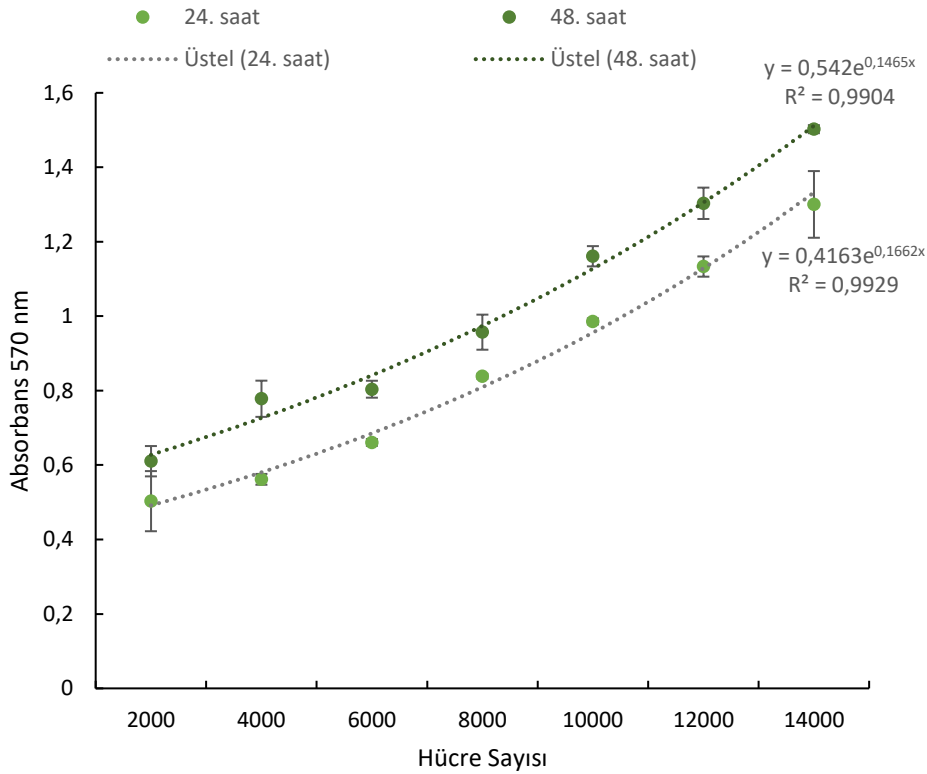
Ajanların MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerindeki etkileri değerlendirilmeden önce hücre sayısı ile absorbans arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu amaçla, büyüme analizi MTT yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Bügan v.d., 2019). 96 kuyucuklu hücre kültür pleytinde kuyucuklara sırayla 2×10^3 , 4×10^3 , 6×10^3 , 8×10^3 , 10×10^3 , 12×10^3 ve 14×10^3 hücre olmak üzere farklı sayıda hücre ekilmiştir. Medyumlar her 24 saatte bir tazesi ile değiştirilmiştir. Hücrelerin 24. ve 48. saatteki büyümelerini saptamak üzere pleytin kuyucuklarındaki medyumlar çıkarılarak, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) (Sigma) eklenmiş ve pleytler inkübatörde dört saat karanlıkta tutulmuştur. Canlı hücre sayısına paralel olarak oluşan mor formazan kristalleri DMSO ve glisin eklenmesi ile çözülmüştür. Tüm kuyucuklar, mikropilaka absorbans okuyucusunda (iMark™ BioRad) 570 nm dalga boyunda okunmuştur. Her hücre hattı için deney minimum üç kez tekrarlanmış ve elde edilen absorbans değerlerinden hücre sayısı ile zamana bağlı olarak büyüme grafiği çizilmiştir. (Şekil 3.3 ve 3.4).



Şekil 3.3 MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin hücre sayısı ile absorbans arasındaki ilişki.

Yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinin büyüme grafiği incelendiğinde, hem 24 hem de 48. saatlerde hücre sayısının artışına bağlı olarak absorbansın arttığı ve eksponansiyel bir büyüme gösterdikleri izlenmektedir (Şekil 3.2). 24. ve 48. saatteki korelasyon katsayıları da hesaplanmış olup, sırasıyla $R^2=0,9612$ ve $0,904$ 'tür.

Düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin büyüme grafiğinden görüldüğü üzere hem 24 hem de 48. saatte absorbansın arttığı ve eksponansiyel bir büyümeye sahip oldukları görülmektedir (Şekil 3.4). Korelasyon katsayıları hesaplanmış 24. saatte $R^2=0,9929$ ve 48. saatte ise, $0,9904$ 'tür. Absorbanslar dikkate alındığında düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin, yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerine oranla daha yavaş bir büyüme seyri gösterdikleri de izlenmektedir.



Şekil 3.3 MCF-7 meme kanseri hücrelerinin hücre sayısı ile absorbans arasındaki ilişki

3.4.2 Toksisite

Kullanılan ajanların hücreler üzerinde toksik etki gösterip göstermediği tripan mavisi yöntemi ile değerlendirilmiştir. Altı kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğuna 4×10^4 hücre ekilmiştir. Farmakolojik ajanların kullanılan en yüksek konsantrasyonlarının toksik etkisi değerlendirilmek üzere her gruba ait medyumlar eklenmiş ve hücreler 48 saat boyunca farmakolojik ajanlara maruz bırakılmıştır. 48. saatin sonunda pleyttteki medyumlar çıkarılmış

ve DMEM ile hazırlanan %4'lük tripan mavisi eklenmiştir. 10 dk inkübatörde bekletildikten sonra, tripan mavisi yerine kontrol medyumunu eklenen kuyucuklarda 40 bölge olmak üzere invert mikroskopta (40x) renksiz, canlı ve mavi boyanan ölü hücreler sayılmış, ölü hücre yüzdesi saptanmıştır. Her hücre için deney üç kez tekrarlanmış ve grupların ortalamaları belirlenmiştir.

3.5 Hücrelerin Proliferatif Özellikleri

ELE ve GS-967 ajanlarının hücrelerin proliferatif özellikleri üzerindeki etkileri iki farklı deney ile değerlendirilmiş olup, deneyler hem normoksik hem de hipoksik koşullarda gerçekleştirilmiştir.

3.5.1 Hücre Proliferasyonu

Hücre proliferasyonu için ise, her bir kuyucukta 3×10^4 hücre olacak şekilde hem MDA-MB-231 hem de MCF-7 hücreleri için ayrı ayrı mikropate'e hücre ekimi yapılmış ve hücreler 24 saat boyunca 37°C , %5 CO_2 ile normoksi koşullarında yetiştirilmiştir. Hipoksi ortamında ise, hücreler, 37°C %2 O_2 içeren O_2 kontrollü inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin yüzeye tutunduğundan emin olunduktan sonra, kuyucuklara kontrol grubu için normal medyum, deney grupları için ise, stoktan 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM , 20 μM ve 50 μM hazırlanmış olan ELE ile 0,01 μM , 0,05 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 3 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM ve 30 μM olarak hazırlanan GS-967 içeren medyumlar eklenmiştir. 24 saat ve 48 saat olmak üzere iki farklı sürede hücreler ELE ve GS-967 ile tedavi edildikten sonra her bir kuyucuktaki medyum çıkarılıp, Bölüm 3.1.1'de olduğu gibi 100 μl MTT (Sigma) çözeltisi eklenmiş ve 4 saat boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Bu süre sonunda kuyucuklardaki MTT çözeltisi atılarak, oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için her bir kuyucuğa 89 μl DMSO ve 11 μl glisin eklenerek boya absorbansı, mikropate okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kontrol bir kabul edilerek diğer gruplardan elde edilen değerler normalize edilmiştir. Her deney, hem normoksi hem hipoksi koşullarda en az üç kez tekrar olacak şekilde tekrarlanmıştır.

3.5.2 Koloni oluşumu

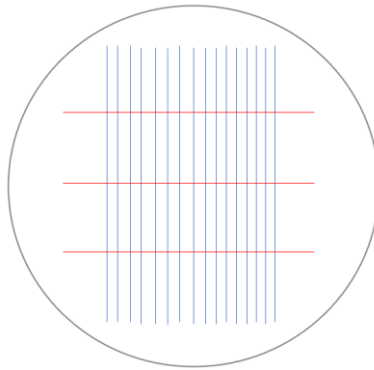
ELE ve GS-967'nin hücreler üzerindeki hayatta kalabilmelerine etkisi in vitro da koloni oluşum testi ile değerlendirilmiştir. Altı kuyucuklu pleytin her birine 300 hücre ekilmiş ve 24 saat inkübasyondan sonra hücrelere 0,5 μM ve 1 μM ELE ile 0,05 μM ve 0,1 μM GS-967, pozitif kontrol grubu olarak da TTX grubuna 600 nM TTX içeren medyum uygulanmış ve normoksi ve hipoksi ortamlarda büyümeye bırakılmışlardır. 48 saat sonra tüm grupların medyumları atılmış ve her gruba kültür medyumunu eklenerek 14 gün boyunca hücreler büyümeye

birakılmıştır. Tüm gruplarda büyümeye bırakılan hücrelerin medyumları her dört günde bir taze kültür medyumunu ile değiştirilmiştir. 14 gün sonunda tüm medyumlar çıkarılarak hücreler PBS ile yıkanmıştır. Her kuyudaki koloni oluşturan hücreler 3:1 oranında oda sıcaklığındaki metanol/asetik asit ile 5 dakika boyunca fikse edilmiştir. Metanol/asetik asit çıkarıldıktan sonra %0.5 kristal viyole ile 15 dakika boyanmıştır. Distile su ile yıkanıp, oda sıcaklığında kuruyuncaya kadar beklenmiş ve karanlıkta saklanmıştır. İnvert mikroskop kullanılarak her kuyucuktan rastgele 40 alandaki koloni sayısı sayılmış ve grupların ortalamaları ile grafikleri çizilmiştir. Deneyler üç kez tekrarlanmıştır.

3.6 Metastatik Potansiyel

3.6.1 Lateral Hareket (Migrasyon=Motilite)

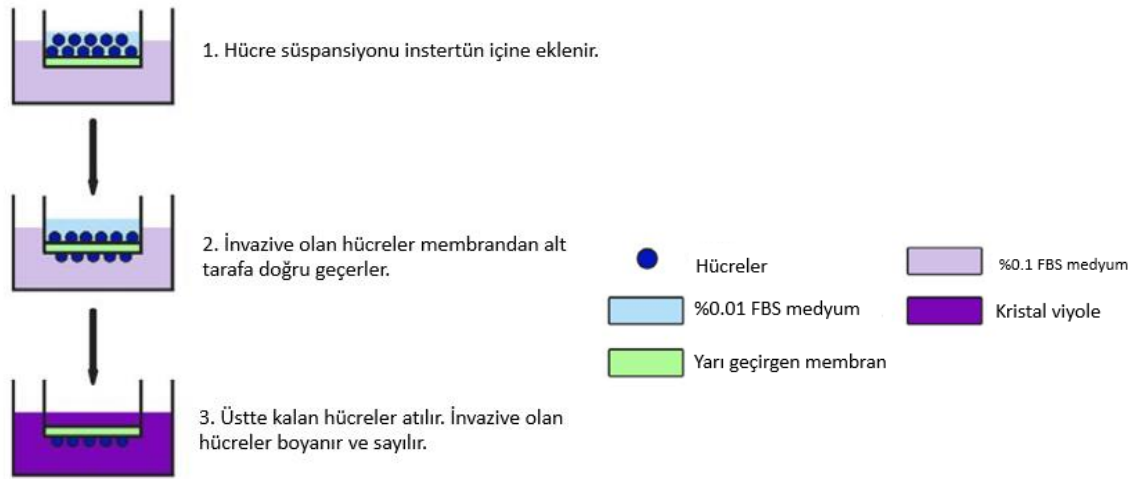
Hücre migrasyonunun değerlendirilmesi yara iyileşmesi deneyi (Wound-healing assay) ile normoksi ve hipoksi koşullarında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri Şekil 3.4'te görülen çizimin yapıldığı 35mm petrilere ekilmiş ve normal kültür medyumunu ile 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24. saatin sonunda tüm petrilere üç çizginin bulunduğu yerlerden mavi pipet ucu ile yara açılmış ve medyum çıkarılmıştır. Kontrol, 0,5 μ M ve 1 μ M ELE ile 0,05 μ M ve 0,1 μ M GS-967 deney grubunun yanı sıra pozitif kontrol olarak TTX içeren medyumlar ilave edilmiştir. 0. saatteki yara genişliği (W0), 24. ve 48. saatlerdeki yara genişliği (Wt) mikrometrik oküler ile ölçülmüş ve medyumları değiştirilmiştir. Alınan ölçümler $MI=1 - (Wt - W0)$ formülünde yerine konularak hücrenin 24. ve 48. saatlerdeki migrasyon/motilite indeksi belirlenmiştir. (Fraser v.d., 2003). Her deney grubunda en az üç petri kullanılmış ve deneyler üç kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3.5 Migrasyon/motilite deneyi için petrinin tabanına yapılan çizim

3.6.2 Transvers Hareket

Ajanların hücrelerin invazyon yetenekleri üzerindeki etkileri BD Falcon Cell Culture Inserts Sistemi ve BD Matrigel Basement Membrane Matrix kullanılarak iki farklı ortamda değerlendirilmiştir (Şekil 3.5). Öncelikle matrigel (Sigma) medyum ile 7'ye 1 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır. İnsert içerisine +4°C'deki matrigel konularak, bir gece boyunca 37°C'de bırakılmış ve daha sonra insertlere L-glutaminli medyumla 6 saat dehidratasyon yapılmıştır. Her inserte 4×10^4 hücre ekildi. Hücrelerin hareketi için serum gradienti uygulandı. Bu gradient insert içerisine %0,01 FBS'li medyum, pleyt içine %0,1 FBS'li medyum konularak sağlanılmıştır. Her inserte 4×10^4 hücre bulunacak şekilde önceden hazırlanmış olan ajanların içinde bulunduğu hücre süspansiyonları ilave edilmiştir. Medyum içeren kuyucuklarda hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek, insertler transfer edilmiştir. Sonrasında bu insertler 48 saat boyunca 37°C'de inkübe edilerek, ardından medyumlar çıkartılmış ve insertlerin içerisindeki invazive olmayan hücreler pamuklu çubuk ile temizlenmiştir. Membrana invazive olan hücrelerin görülmesi için insertler 4°C de %100 metanol ile fikse edilmiş, oda sıcaklığında 15 dakika %0,1'lik Kristal Viyole ile boyanmış, insertteki fazla boya distile su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Her insertte 12 alanda invazive olmuş hücrelerin sayımı yapılmış ve gruplar arası farklar hesaplanmıştır (Fraser, v.d., 2016; Xu v.d, 2017; Rizer v.d., 2020). Her deney grubu için minimum üç insert kullanılmış ve deney üç kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3.6 Transwell hareket deney protokolü

3.7 Moleküler Analizler

3.7.1 İmmünoiblotlama

ELE ve GS-967 uygulanmış olan MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri RIPA tamponunda lizis edilmiştir. Hücre lizatları santrifüj edildikten sonra proteinler PAGE ile ayrıştırıldı. Jeller, 10 cm'lik kasetlerde, %8'lik ayırma jeli, %4'lik yükleme jeli olarak hazırlandı. Elektroforez işlemi 50 V'da 15 dakika, sonrasında 100 V'da 60-75 dakikada tamamlandı. Elektroforez işleminden sonra jel de ayrıştırılan proteinler nitroselüler membrana transfer edildi. Transfer işlemi 45 V'da 30 dakika, 90 V'da 60 dakikada gerçekleştirilecektir. Membranlar 2 saat %5'lik bloklama çözeltisinde bekletildi. Sonrasında membran bir gece boyunca primer antikör nNav1.5 (abcam) içinde bırakılmıştır. Sekonder antikör olarak peroksidaz konjuge domuz anti-tavşan kullanıldı. Protein bantlarının görüntülenmesi için membran kemiluminisans madde ile 1 dakika işleme konulmuştur. (Chioni v.d., 2005, Brackenbury v.d., 2007).

3.7.2 Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Analizi (QRT-PCR)

RNA Ekstraksiyonu ve Pürifikasyonu: Total RNA izolasyonu için; TRIzol Reagent kullanılmıştır. Hücrelere TRIzol Reagent'e eklendikten sonra homojenizasyon işlemi gerçekleştirilerek soğutulmuş kloroform ilave edilip 14 G'de 15 dk santrifüj yapıldı. Üst faz alındı, purezole eklenen miktarda izopropanol ilavesi yapılarak, 14 G 10dk santrifüj ile RNA çöktürüldü. Elde edilen RNA peleti, DEPC su içerisinde çözündürüldü. Elde edilen total RNA'nın konsantrasyonu ve saflık derecesi kantitatif olarak Nanodrop cihazı ile 260/280 nm'lik absorbansta spektrofotometrik olarak tayin edildi (Diss v.d., 2005).

cDNA sentezi: Konsantrasyonları belirlenen total RNA örneklerinden iScript™ cDNA cDNA Synthesis Kiti (Bio-Rad) kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi yapıldı. RNA örneğinden 1000 ng, kitin içerisinde çıkan 4 µl 5x iScript reaction mix, nucklease free water ve en son 1 µl Reverse Transkriptaz enzimi eklenerek PCR cihazına yerleştirildi. Üretici firmanın protokolü doğrultusunda 5 dk 25°C, 30 dk 42°C 5 dk 85°C ve en son 4 °C soğuduktan sonra cDNA sentez işlemi bitirilmiş ve elde edilen cDNA örnekleri -20 °C'de saklanmıştır (Diss v.d., 2005).

Jelde Yürütme: Total RNA ürünlerinin bütünlüğü %0,8'lik agaroz jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmiştir. 1X TBE Tamponunun içerisine 0,8 gr agaroz ilave edilerek karışım hazırlandı. Kaynatılan agaroz, 10 dakika oda sıcaklığında soğutularak içerisine red safe ilave edildi ve hava kabarcıkları olmaksızın önceden hazırlanmış olan jel plağına dökülerek katılaşması sağlandı. İlk kuyucuğa 1 kb marker yüklendikten sonra, sırasıyla diğer

kuyucuklardaki örnekler brom-fenol mavisi ile karıştırıldı ve 80V akımda 40 dakika yürütüldü. Bantlar ultraviyole ışık altında incelendi ve RNA zincirinin bütünlüğü Science UV Translüminatör ile görüntülenmiştir (Diss v.d., 2005).

QRT-PCR: Her PCR reaksiyonu cDNA örnekleri, ilgili primerler ve SYBR Green ilave edilerek hazırlandı. Real-Time PCR cihazında gerçekleştirilen analizlerde 95°C’de 3 dakika ‘Taq’ polimeraz aktivasyonu; 95°C’de 30 saniye denatürasyon; 60°C’de 30 saniye primer bağlanma ve uzama olmak üzere 35 siklusa oluşan deney protokolü uygulandı. nNav 1.5 için amplifikasyon döngüleri 2- $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile analiz edildi (Livak v.d., 2001). Kullanılan primerler Tablo 3.1 ‘de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Kullanılan primerler

Primer ismi	Primer dizisi
nNav 1.5 Forward Primer	5'-CATCCTCACCAACTGCGTGT-3'
nNav 15 Reverse Primer	5'-CCTAGTTTTTCTGATACA-3'
β -Aktin Forward Primer	5'-TCACCCACATGTGCCCATCTACGA-3'
β -Aktin Reverse Primer	5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'

3.8 İstatistiksel Analiz

Çalışmada gerçekleştirilen in vitro deneylerde en az üç tekrar ile elde edilen veriler ile gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirmek için t-testi ve ANOVA kullanılmıştır. Microsoft Excel ile grafikleştirilmiş ve anlamlılık düzeyi $P < 0,05$ olarak alınmıştır.

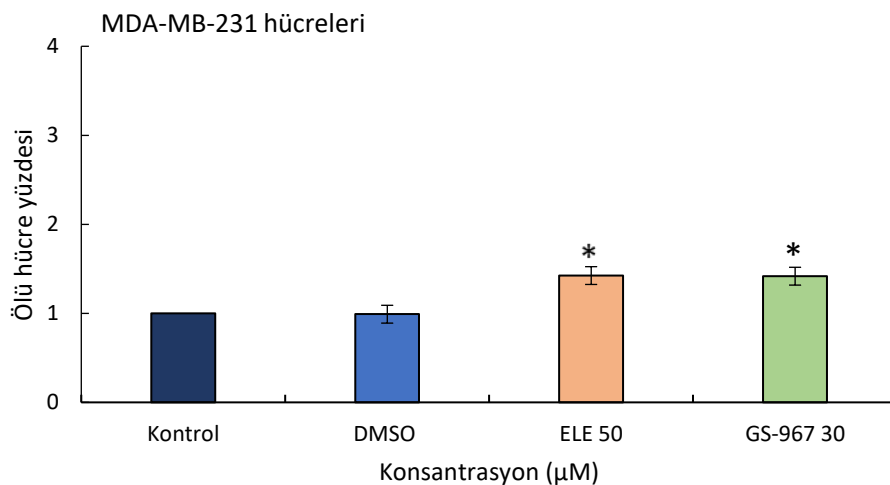
4. BULGULAR

Bu çalışmada, antiaritmik etkileri saptanmış olan iki yeni VGSC blokeri ELE ve GS-967'nin, meme kanseri hücrelerinde ekspresyonu artan Nav1.5 kanalı üzerindeki etkilerini belirlemek üzere yüksek metastatik MDA-MB-231 ve düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin proliferasyonları ile koloni oluşumu, metastatik potansiyeli etkileyen hücrenin lateral hareketi, transvers invazyonu in vitro olarak araştırılmış, Nav 1.5 protein miktarı ve mRNA ifadesi moleküler analizler ile tayin edilmiştir. Deneyler hem normoksi hem de hipoksi ortamında gerçekleştirilmiş olup, bulguların sonunda iki ortama ait genel bir değerlendirme yapılmıştır.

4.1 Toksisite

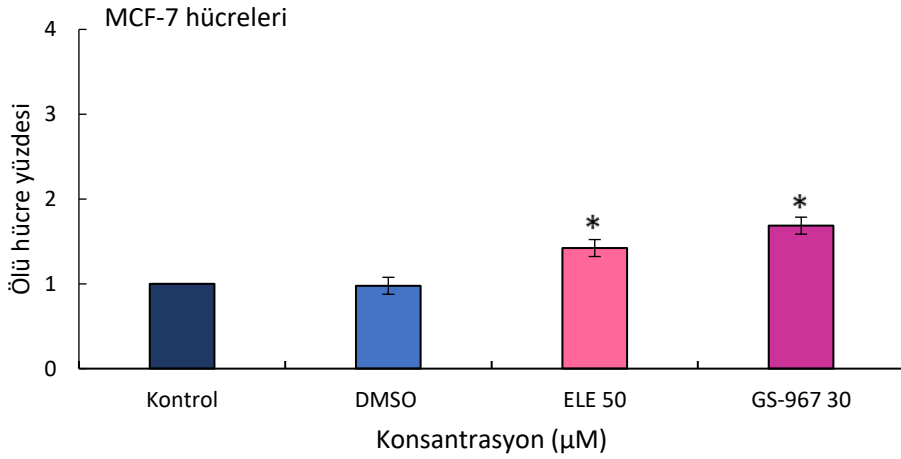
VGSC blokeri olarak sentezlenen ELE ve GS-967'nin farklı metastatik özelliğe sahip MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerindeki toksik etkisinin değerlendirilmesinde tripan mavisi yöntemi kullanılmıştır. Yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerine 50µM ELE ve 30 µM GS-967 uygulanması sonucunda elde edilen ölü hücre yüzdeleri Şekil 4.1'de verilmiştir. Kontrol grubunun yanı sıra ELE ve GS-967 DMSO içerisinde çözündüğünden kullanılan en yüksek DMSO konsantrasyonunun da toksisitesi incelenmiştir.

MDA-MB-231 hücrelerinin ölü hücre yüzdesi grafiğinden görüldüğü gibi çözücü olarak kullanılan DMSO'nun kontrol grubuna benzer orandaki ölü hücre yüzdeleri ile hücreler üzerinde toksik bir etki meydana getirmediği saptanmıştır. 50 µM ELE'nin ve 30 µM GS-967'nin kontrol grubuna kıyasla MDA-MB-231 hücrelerinin ölü hücre yüzdesini biraz arttırdığı ve bu artış istatistiksel bakımından anlamlı ($P>0,05$) olduğundan bu konsantrasyonların hücreler üzerinde toksik bir etki meydana getirdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.1 ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki toksisitesi (* $P<0,05$)

Şekil 4.2’de çizilen MCF-7 hücrelerinin ölü hücre yüzdesi grafiğine bakıldığında çözücü olarak kullanılan DMSO’nun toksik etkisi olmadığı görülmektedir. Kullanılan farmakolojik ajanlardan ELE ve GS-967’nin hem kontrole hem de DMSO’ya kıyasla MCF-7 hücrelerinin ölü hücre yüzdesini arttırdığı ve yapılan istatistik değerlendirme sonucunda farkların anlamlı olduğu ve toksik bir etki meydana getirdiği saptanmıştır



Şekil 4.2 ELE ve GS-967’nin MCF-7 hücreleri üzerindeki toksisitesi (*P<0,05)

4.2 Hücre Proliferasyonu

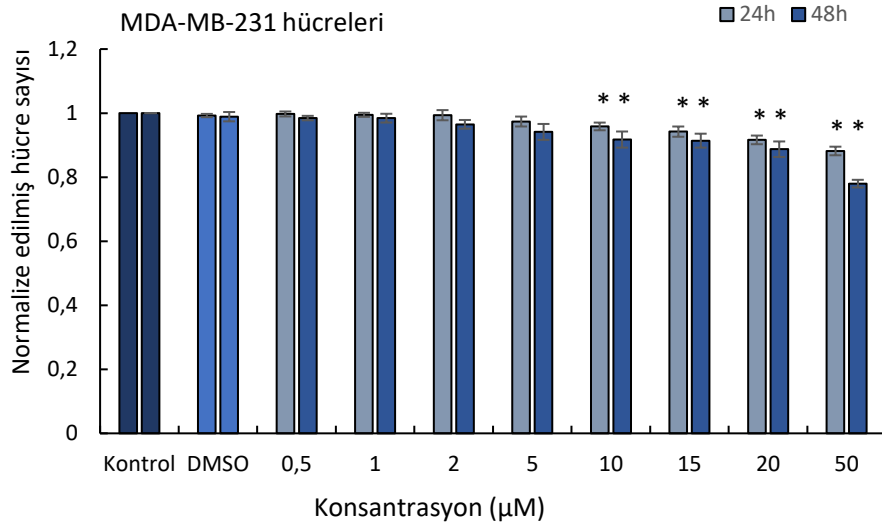
ELE ve GS-967’nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri hem normoksi hem de hipoksi ortamında MTT yöntemi ile incelenerek değerlendirilmiştir.

4.2.1 Normoksi Koşulları

4.2.1.1 ELE

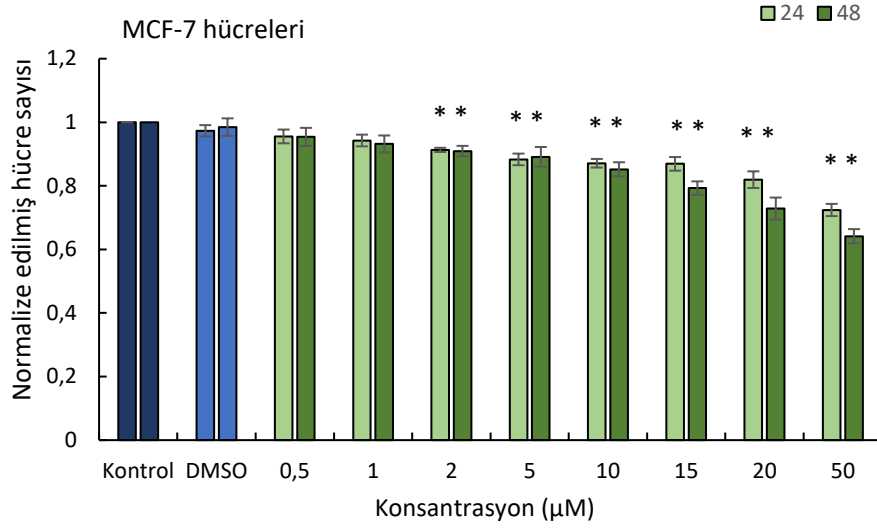
Yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerine %5 CO₂ içeren normoksi ortamında 24 ve 48 saat süreyle 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM ve 50 µM ELE uygulanması sonucunda elde edilen normalize edilmiş hücre sayıları Şekil 4.3’te verilmiştir. ELE, DMSO’da çözüldüğünden kontrol grubunun yanı sıra, ikinci kontrol olarak kullanılan DMSO grubu MDA-MB-231 hücre sayılarının kontrol grubu ile benzer olduğu görülmektedir. MDA-MB-231 hücre proliferasyonları üzerinde DMSO’nun herhangi bir etki göstermediği belirlendiğinden, deney gruplarına ait sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Elde edilen hücre proliferasyonu verilerine göre, MDA-MB-231 hücrelerinin 24. ve 48. saatte kontrol ile DMSO ve 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M 5 μ M, ELE uygulanan deney grupları arasında istatistik bakımdan anlamlı bir fark görülmediği ($P<0.05$) belirlenmiştir. Ancak 10 μ M, 20 μ M ve 50 μ M ELE konsantrasyonlarında hücre sayılarının azaldığı ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı ($P<0,05$) bir fark meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 ELE'nin MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna normoksi koşullarında etkisi (* $P<0,05$)

Belirlenen ELE konsantrasyonlarının düşük metastatik MCF-7 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen veriler ile çizilen grafik Şekil 4.4 de görülmektedir. Bu verilere göre, her iki deney saatinde de kontrol grubu ile DMSO 0,5 μ M ve 1 μ M ELE uygulanan deney grupları arasında hücre proliferasyonu bakımından anlamlı bir fark görülmediği ($P>0,05$) ancak, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M ve 50 μ M ELE konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerinin proliferasyonlarını hem 24 hem de 48. saatte kontrol grubuna oranla azalttığı ve bu azalmanın anlamlı ($P<0,05$) olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.4).

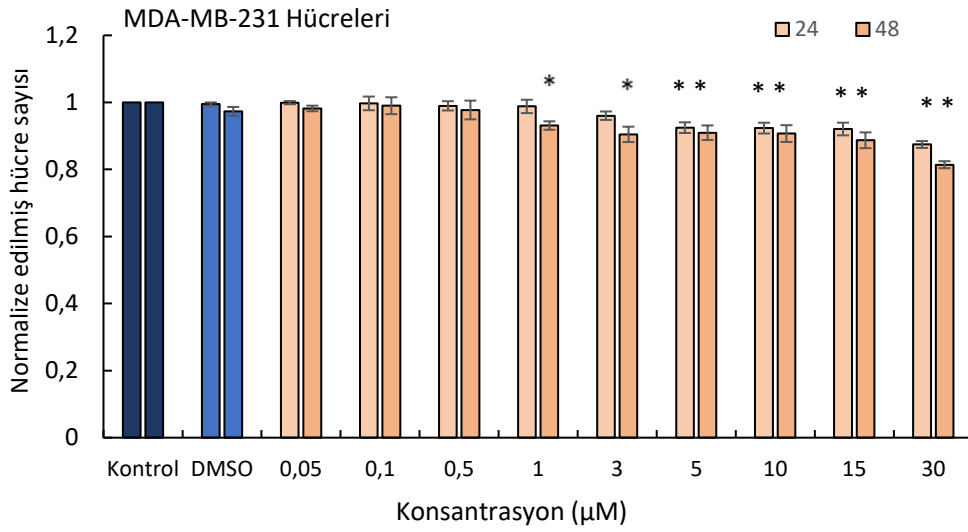


Şekil 4.4 ELE'nin MCF-7 hücrelerinin proliferasyonuna normoksi koşullarında etkisi (*P<0,05)

4.2.1.2 GS-967

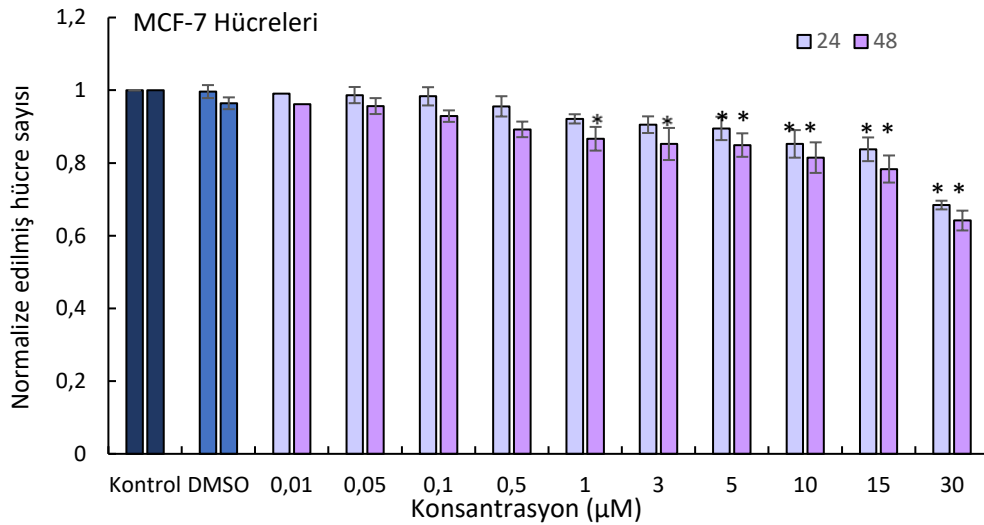
MDA-MB-231 hücrelerine normoksi ortamında 24 ve 48 saat süreyle 0,05 µM, 0,1 µM ve 0,5 µM, 1 µM, 3 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM ve 30 µM GS-967 uygulanması sonucunda hücrelerin proliferasyonuna olan etkileri Şekil 4.5'te verilmiştir. GS-967, DMSO'da çözünerek hazırlandığından dolayı kontrol grubunun yanı sıra, DMSO'nun da hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Grafikte hem 24 hem de 48. saatte DMSO grubu MDA-MB-231 hücre sayılarının kontrol grubu-hücre sayıları ile benzer olduğu görülmektedir (Şekil 4.5). Böylece DMSO'nun, MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonları üzerinde bir etki göstermediği belirlenmiş ve deney gruplarına ait sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

0,05 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM ve 3 µM konsantrasyonlarında GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerine 24. saat süreyle uygulandığında, hücre sayıları üzerinde anlamlı bir fark ($P>0,05$) görülmezken, 5 µM ve üzeri konsantrasyonlarda GS-967 uygulanan hücrelerde azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerine 48 saat süre ile GS-967 uygulaması ile hücre proliferasyonu üzerindeki anlamlı ($P<0,05$) azalmanın 1 µM konsantrasyonundan başladığı izlenmektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna normoksi koşullarında etkisi (*P<0,05)

GS-967'nin düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Deneyden elde edilen veriler değerlendirildiğinde, normoksi koşullarında kontrol grubu ile DMSO grubu hücre proliferasyonları arasında bir fark bulunmadığı, farklı konsantrasyonlarda uygulanan GS-967'nin de hücre proliferasyonları üzerindeki etkisinin MDA-MB-231 hücrelerinininkine benzer olduğu saptanmıştır. 1 µM, 3 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM ve 30 µM konsantrasyonlarındaki GS-967, MCF-7 hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir (P<0,05).



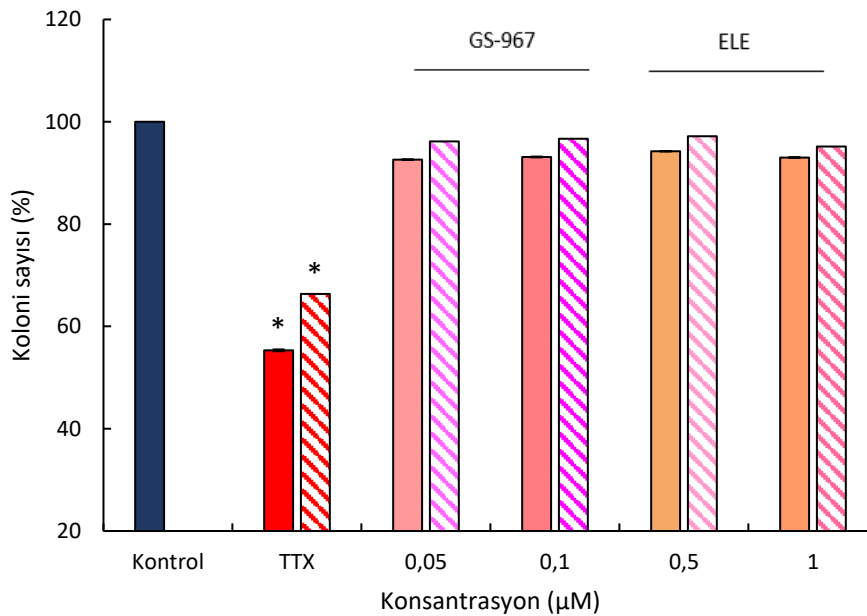
Şekil 4.6 GS-967'nin MCF-7 hücrelerinin proliferasyonuna normoksi koşullarında etkisi (* P<0.05)

4.2.1.3 Koloni Oluşumu

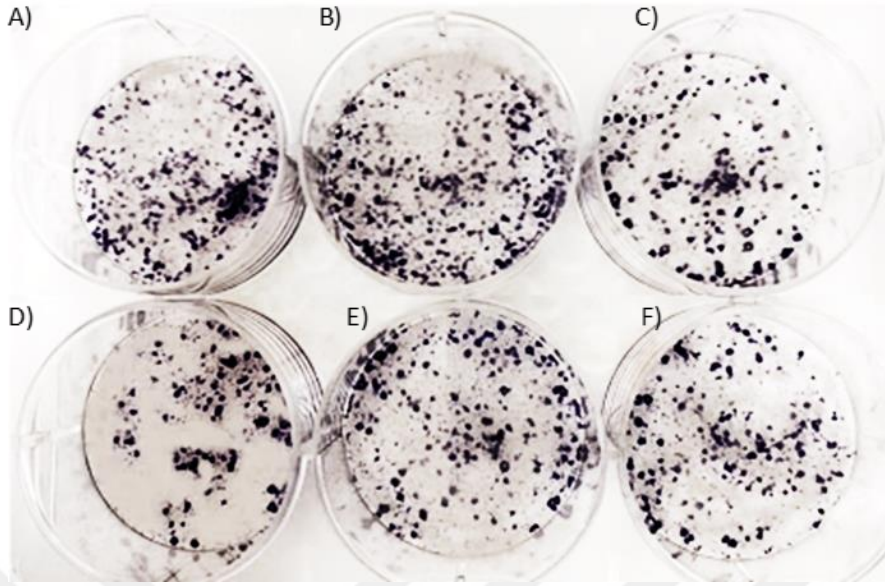
Normoksi ortamında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin koloni yüzdeleri üzerindeki etkileri Tablo 4.1'de ve grafikleri Şekil 4.7'de verilmiştir. Yüksek metastatik MDA-MB-231 ve düşük metastatik MCF-7 hücrelerine 48 saat süre ile 600 nM TTX, 0,5 µM ve 1 µM ELE ile 0,05 µM ve 0,1 µM GS-967 uygulanması sonrası 14. günde MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin oluşturduğu koloniler-Şekil 4.8'de gösterilmiştir. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin koloni sayısı TTX ile azalmış olup, bu azalmanın istatistik bakımdan anlamlı ($P<0.05$) olduğu, hücre proliferasyonunu etkilemeyen ELE ve GS-967 konsantrasyonlarının ise, normoksi ortamında her iki hücre hattının koloni oluşum kapasitesi üzerinde herhangi bir etki göstermediği belirlenmiştir.

Tablo 4.1 ELE ve GS-967'nin hücrelerin normoksi koşullarında koloni yüzdesi üzerindeki etkisi (* $P<0.05$)

Deney Grupları Hücreler	Koloni Yüzdesi (%)					
	Kontrol	TTX 600 nM	GS-967 0,05 µM	GS-967 0,1 µM	ELE 0,5 µM	ELE 1 µM
MDA-MB-231	100	55,3±0,1*	92,5±0,1	93,1±0,08	94,2±0,03	93,0±0,03
MCF-7	100	66,3 ±0,1*	96,2±0,04	96,8±0,08	97,2±0,1	95,2±0,08



Şekil 4.7 ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin koloni oluşumuna etkileri (Düz: MDA-MB-231, desenli: MCF-7) (* $P<0.05$)

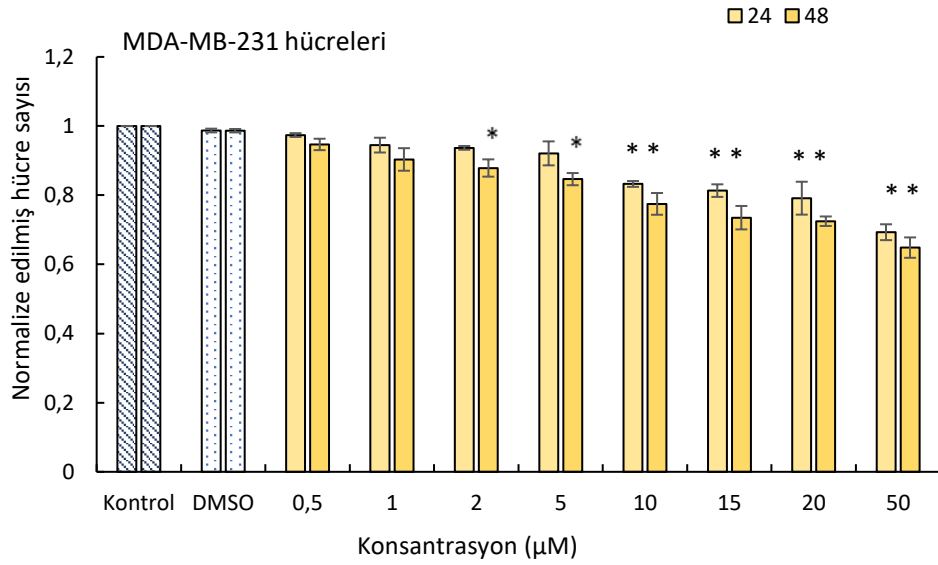


Şekil 4.8 Normoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin koloni pleyti (A) Kontrol, B) 0,5 µM ELE, C) 0,05 µM GS-967, D) TTX, E) 1 µM, F) 0,1 GS-967

4.2.2 Hipoksi Koşulları

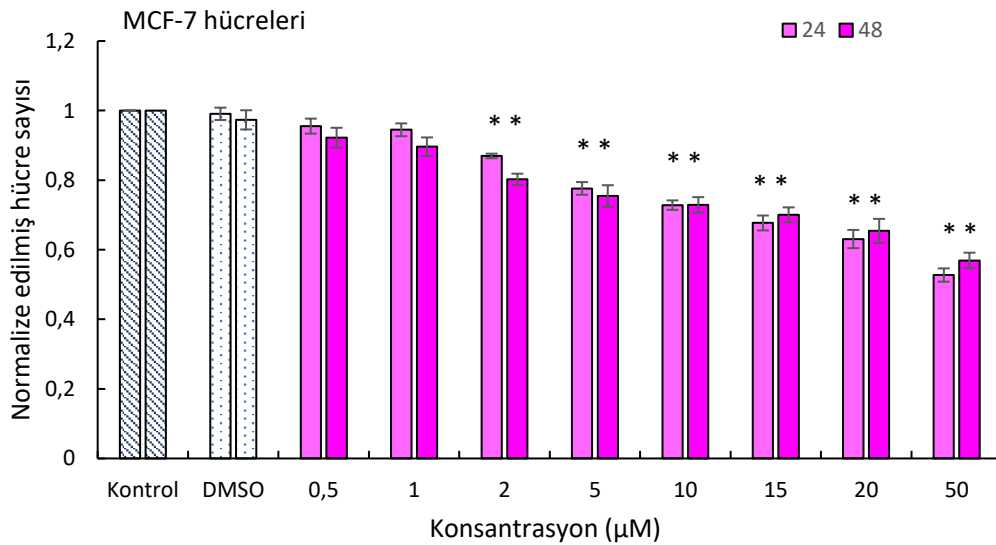
4.2.2.1 ELE

%2 O₂ olan hipoksi koşulları altında ELE'nin MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonlarına etkisi Şekil 4.9'daki grafikte verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, hipoksik koşullarda MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonları kontrol ve DMSO gruplarında benzerlik göstermektedir. 24 saat süreyle 0,5 µM, 1 µM, 2 µM ve 5 µM ELE uygulanan deney gruplarının hücre proliferasyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında konsantrasyon artışına bağlı olarak hafif bir azalma gösterse de istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark ($P>0,05$) saptanmamıştır. Ancak 48 saat süre ile ELE'ye maruz kalan hücrelerin hücre proliferasyonlarında 2 µM'dan itibaren anlamlı bir azalma görülmeye başlandığı izlenmektedir. Hem 24 saat hem de 48 saat süreyle 10 µM, 15 µM, 20 µM ve 50 µM ELE konsantrasyonları kontrol grubuna kıyasla hücre proliferasyonunda anlamlı ($P<0,05$) bir azalma meydana getirmiştir (Şekil 4.9). 50 µM ELE ile MDA-MB-231 hücrelerinde bu azalma 48. saatte % 35'e kadar ulaşmıştır.



Şekil 4.9 Hipoksi koşullarında ELE'nin MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi

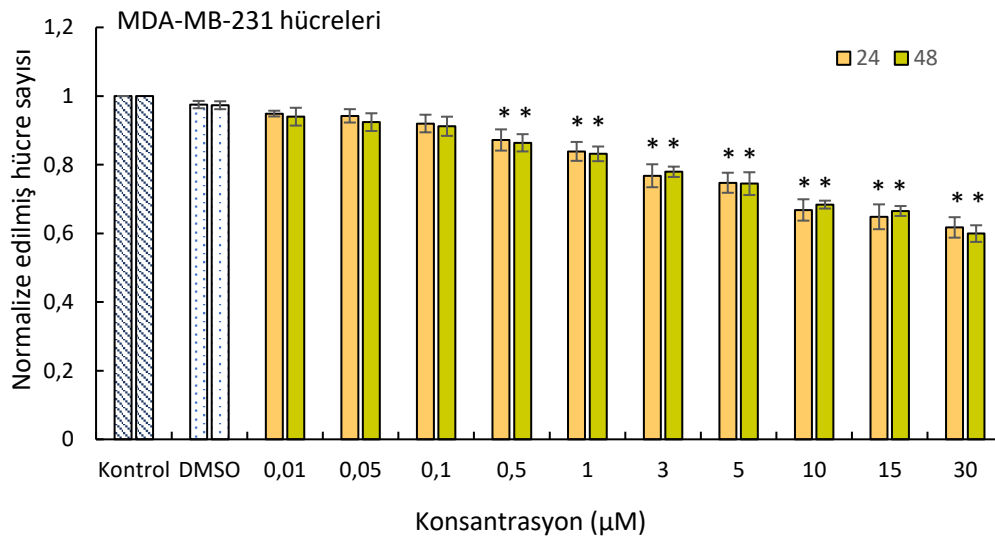
Düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin hücre proliferasyonları kontrol grubu ile DMSO grubunda paralellik göstermektedir. Hipoksi koşullarında 0,5 µM ve 1 µM ELE uygulanması sonucu MCF-7 hücrelerinin proliferasyonları üzerinde bir etki görülmezken, daha yüksek ELE konsantrasyonlarında, konsantrasyon artışına bağlı olarak artan bir inhibisyon görülmüş ve istatistiksel bakımdan da 2 µM'dan itibaren kontrol grubuna kıyasla anlamlı ($P < 0.05$) bir azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Hipoksi koşullarında ELE'nin MCF-7 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi

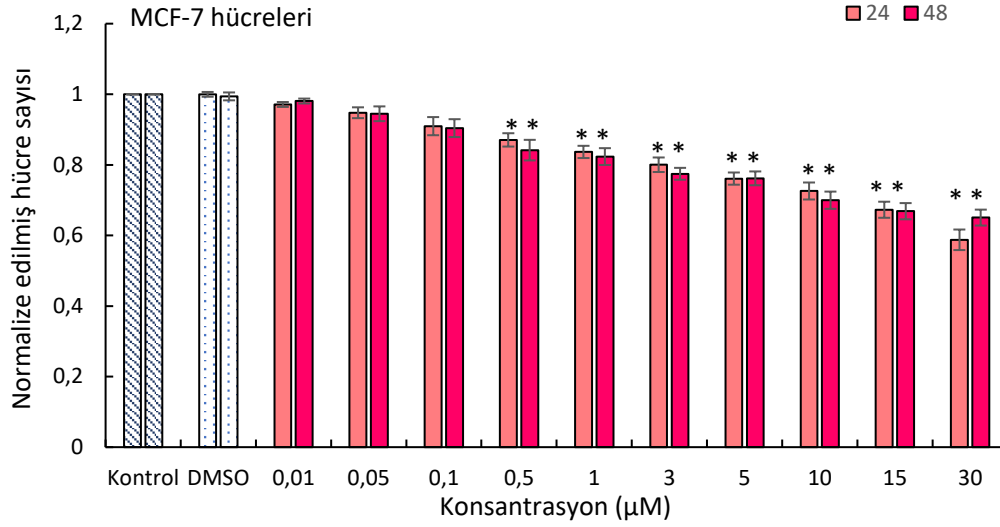
4.2.2.2 GS-967

GS-967'nin hipoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Çözücü DMSO, hipoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etki göstermemiştir. 0,01 μ M, 0,05 μ M ve 0,1 μ M GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir etkisi saptanmamıştır ($P>0,05$). Hem 24 hem de 48. saat süreyle uygulanan GS-967 0,5 μ M'dan itibaren hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı bir azalmaya neden olduğu görülmektedir. (Şekil 4.11). Bu inhibisyon, 30 μ M GS-967 ile metastatik hücrelerde % 40'a ulaşmaktadır.



Şekil 4.11 Hipoksi koşullarında GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi

GS-967'nin hipoksi koşullarında MCF-7 hücreleri üzerindeki etkilerine bakıldığında, DMSO grubunun kontrol grubu ile paralellik gösterdiği, ancak, 0,5 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M 15 μ M ve 30 μ M GS-967 konsantrasyonlarının kontrol grubuna kıyasla hem 24, hem de 48. saatte hücre proliferasyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür (Şekil 4.12). Daha düşük olan 0,01 μ M, 0,05 μ M ve 0,1 μ M GS-967'nin MCF-7 hücrelerinin proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etkisi saptanmamıştır.



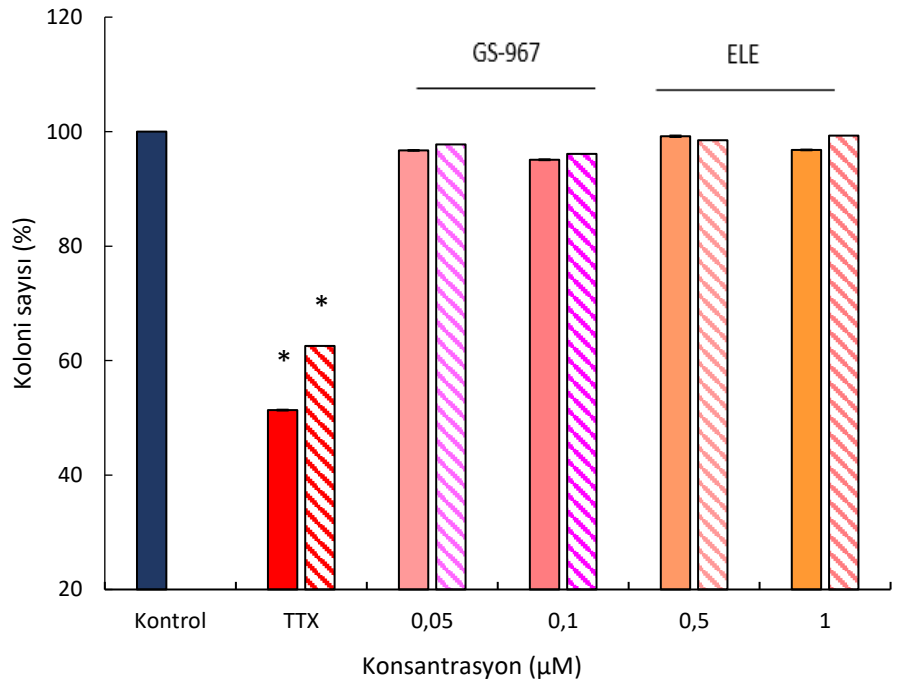
Şekil 4.12 Hipoksi koşullarında GS-967'nin MCF-7 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi

4.2.2.3 Koloni Oluşumu

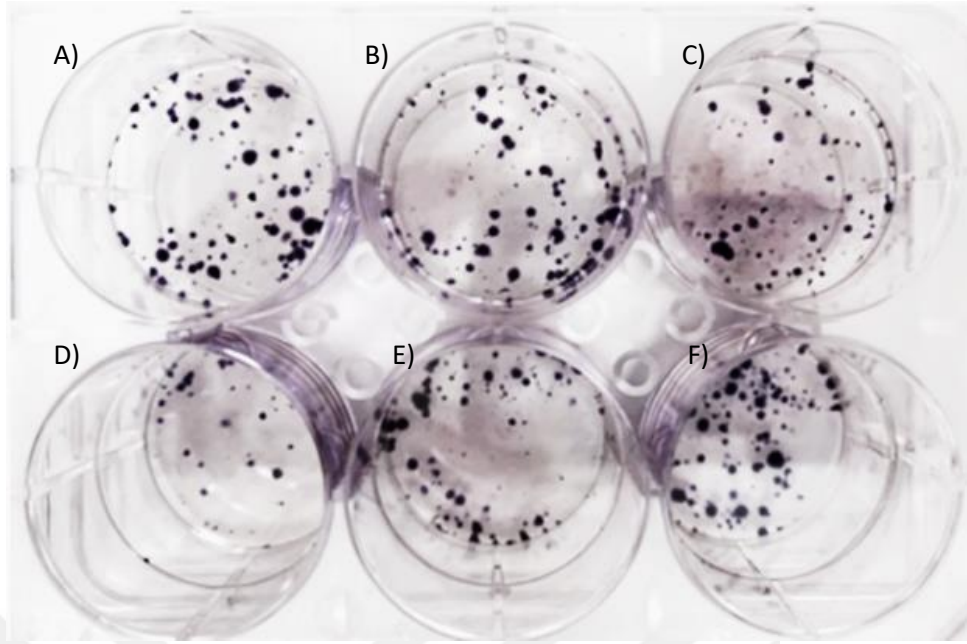
Hipoksi koşullarında MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerine 48 saat süreyle, TTX, 0,5 µM ve 1 µM ELE ile 0,05 µM ve 0,1 µM GS-967 uygulanması sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.2 de MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin oluşturduğu kolonilerin yüzdeleri Şekil 4.13'te, koloni görünimleri de Şekil 4.14'te verilmiştir. Tablo ve Şekiller incelendiğinde hipoksik koşullarda TTX'in, kontrole kıyasla koloni sayısını yaklaşık %50 oranında anlamlı olarak ($P < 0.05$) azaltmıştır. Hücre proliferasyonunu etkilemeyen ELE ve GS-967 konsantrasyonları ise, her iki hücre hattının koloni sayısı üzerinde bir etki göstermemiştir.

Tablo 4.2 Hipoksi koşullarında ELE ve GS-967'nin hücrelerin koloni yüzdesi üzerindeki etkisi (* P<0.05)

Deney Grupları Hücreler	Koloni Yüzdesi (%)					
	Kontrol	TTX 600 nM	GS-967 0,05 μ M	GS-967 0,1 μ M	ELE 0,5 μ M	ELE 1 μ M
MDA-MB-231	100	51,4 $\pm$ 0,1*	96,7 $\pm$ 0,1	95,1 $\pm$ 0,1	99,2 $\pm$ 0,2	96,8 $\pm$ 0,1
MCF-7	100	62,6 $\pm$ 0,1*	97,8 $\pm$ 0,04	96,1 $\pm$ 0,1	98,5 $\pm$ 0,1	99,2 $\pm$ 0,1



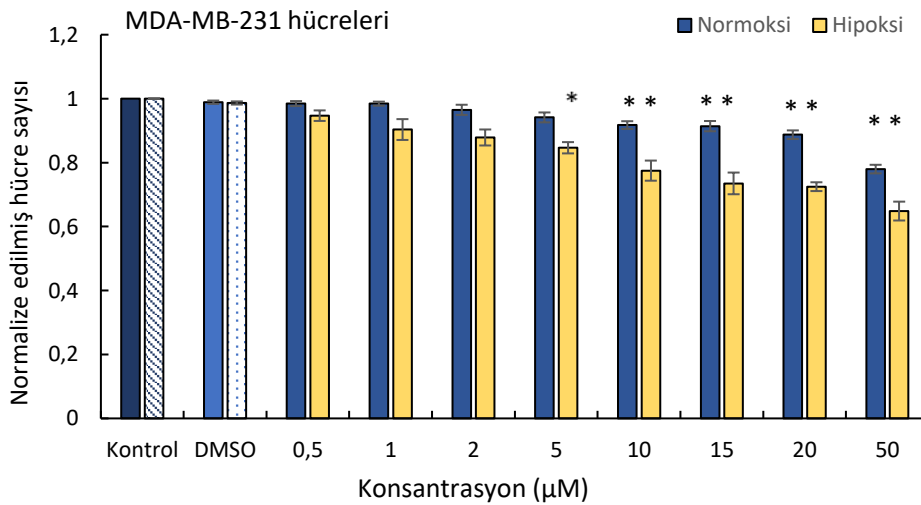
Şekil 4.13 Hipoksi koşullarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin koloni sayısına etkisi



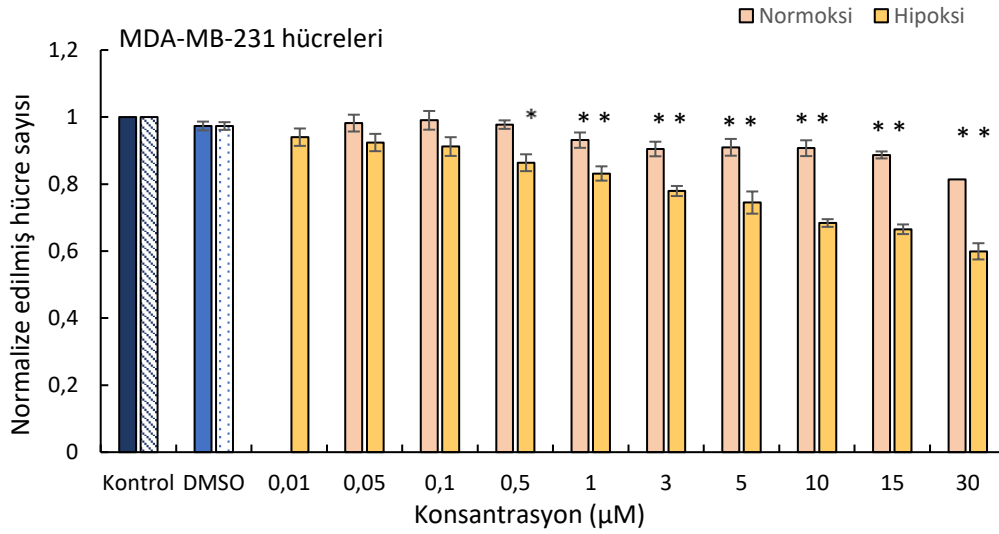
Şekil 4.14 Hipoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin koloni pleyti (A) Kontrol, B) 0,5 μ M ELE, C) 0,05 μ M GS-967, D) TTX, E) 1 μ M, F) 0,1 μ M GS-967

4.2.3 Proliferatif özelliklerin Değerlendirilmesi

ELE'nin yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde normoksi koşullarında 5 μ M'dan, hipoksi koşullarında ise, 10 μ M'dan itibaren inhibisyon meydana getirdiği tesbit edilmiştir (Şekil 4.15). Diğer antiaritmik ajan GS-967 ise, MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunu normoksi koşullarında 1 μ M'dan itibaren hipokside ise, 0,5 μ M'dan itibaren inhibe etmektedir. (Şekil 4.16).



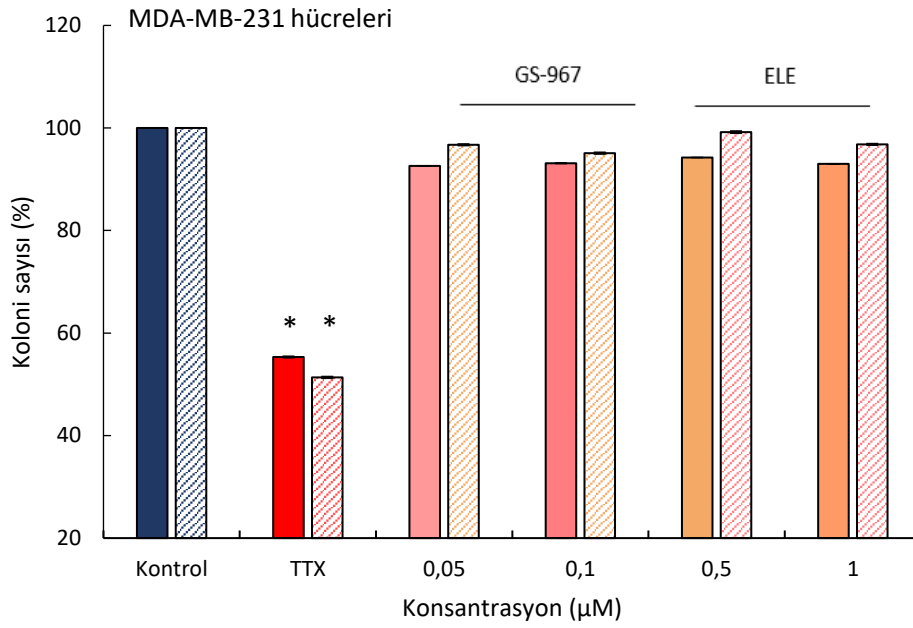
Şekil 4.15 Normoksi ve hipoksi koşullarında MDA-MB-231 hücre proliferasyonuna ELE'nin etkisi



Şekil 4.16 Normoksi ve hipoksi koşullarında MDA-MB-231 hücre proliferasyonuna GS-967'nin etkisi

Düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu ELE, her iki ortam koşulunda da 2 µM'dan itibaren, GS-967 ise, normoksida 1 µM'dan, hipoksi koşullarında 0,5 µM'dan itibaren inhibe etmektedir.

Hücrelerin proliferasyon yetenekleri ile ilgili olan ve tek bir hücrenin hayatta kalıp çoğalabilme yeteneğini gösteren koloni oluşturma deneyi verilerine göre hem normoksi hem de hipoksi koşullarında MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin koloni sayıları TTX grubunda anlamlı ($P < 0,05$) bir azalma gösterirken, ELE ve GS-967'nin proliferasyonu etkilemeyen konsantrasyonlarında anlamlı bir etki saptanmamıştır ($P > 0,05$) (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 MDA-MB-231 hücrelerinin normoksi ve hipoksi koşullarında koloni sayılarına etkisi (düz renk normoksi, desenli hipoksi) (* P<0,05)

4.3 Metastatik Potansiyelin Değerlendirilmesi

Hücrelerin metastaz yapabilmelerine yol açan migrasyon (lateral hareket=motilite) ve invazyon (transvers hareket) adımları üzerine ELE ve GS-967'nin etkisi, hem yüksek metastatik MDA-MB-231 hem de düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin proliferasyonlarına etki etmeyen konsantrasyonlarda yürütülmüştür.

4.3.1 Normoksi Koşulları

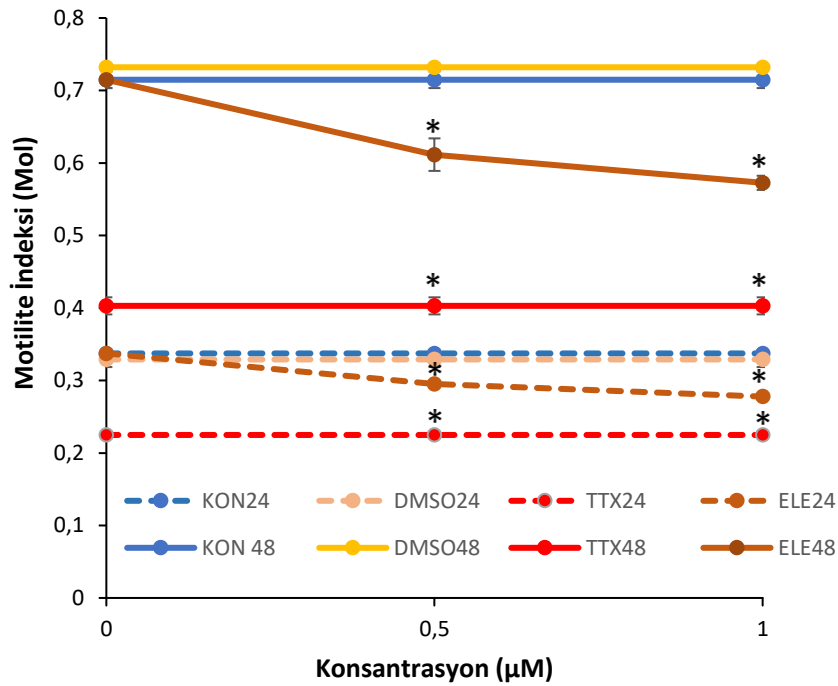
4.3.1.1 Migrasyon

ELE ve GS-967'nin yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinin motilitelerine olan etkisi motilite indeksi ve motilite değişim yüzdesi olarak Tablo 4.3 ve Şekil 4.18 ile Şekil 4.19'de verilmiştir. Kontrol grubunda motilite indeksi 24. saat için $0,34 \pm 0,01$, 48. saat için $0,71 \pm 0,01$ olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan VGSC blokeri TTX için ise, motilite indeksi 24. saatte $0,22 \pm 0,01$, 48. saat için ise, $0,40 \pm 0,01$ olarak tespit edilmiştir. TTX, kontrol grubuna oranla hücrelerin lateral hareketini 24 ve 48. saatte sırasıyla %33,3 ve %43,6 oranında anlamlı ($P < 0,05$) olarak azaltmıştır. 24. saatte $0,5 \mu\text{M}$ ve $1 \mu\text{M}$ ELE için motilite indeksi de sırasıyla, $0,30 \pm 0,01$, $0,28 \pm 0,01$, 48. saat için $0,61 \pm 0,02$ $0,57 \pm 0,01$ olarak hesaplanmıştır. Yapılan istatistik değerlendirmelere göre, $0,5 \mu\text{M}$ ve $1 \mu\text{M}$ ELE uygulanması sonucu hücrelerin lateral hareketlerinin kontrol grubuna oranla 24. saatte %12,2 ve %17,6, 48 saatte ise, %14,3 ve %19,8 oranında azaldığı tespit edilmiştir. GS-967 için ise, $0,05 \mu\text{M}$ ve $0,1 \mu\text{M}$

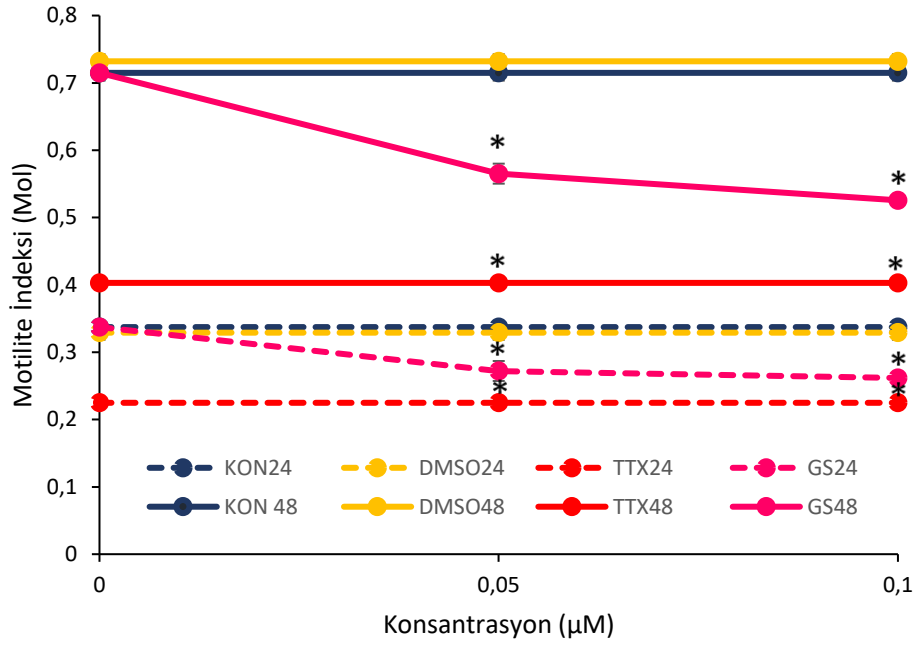
konsantrasyonlarının MDA-MB-231 hücrelerinin 24. saatte motilite indeksi sırasıyla $0,27 \pm 0,01$ ve $0,26 \pm 0,01$, 48. saatte $0,57 \pm 0,02$ ve $0,53 \pm 0,01$ olarak hesaplanmıştır. $0,05 \mu\text{M}$ ve $0,1 \mu\text{M}$ GS-967 konsantrasyonları 24. saatte hücreler üzerinde sırasıyla %19,3 ve %22,4 oranında azalma ($P < 0,05$) meydana getirirken 48. saatte bu oranlar %20,9 ve %26,4 olarak saptanmıştır (Şekil 4.19).

Tablo 4.3 ELE ve GS-967'nin normoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerindeki motilite indeksi ve motilite değişimi (%) (* $P < 0,05$)

Deney Grupları	Motilite İndeksi		Motilite Değişim (%)	
	24. Saat	48. Saat	24. Saat	48. Saat
Kontrol	$0,34 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,01$		
DMSO	$0,33 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,01$	2,4↑	2,3↑
TTX 600 nM	$0,22 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,01$	33,3↓*	43,6↓*
ELE 0,5 μM	$0,30 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,02$	12,2↓*	14,3↓*
ELE 1 μM	$0,28 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,01$	17,6↓*	19,8↓*
GS-967 0,05 μM	$0,27 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,02$	19,3↓*	20,9↓*
GS-967 0,1 μM	$0,26 \pm 0,01$	$0,53 \pm 0,01$	22,4↓*	26,4↓*



Şekil 4.18 ELE'nin normoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonuna etkisi

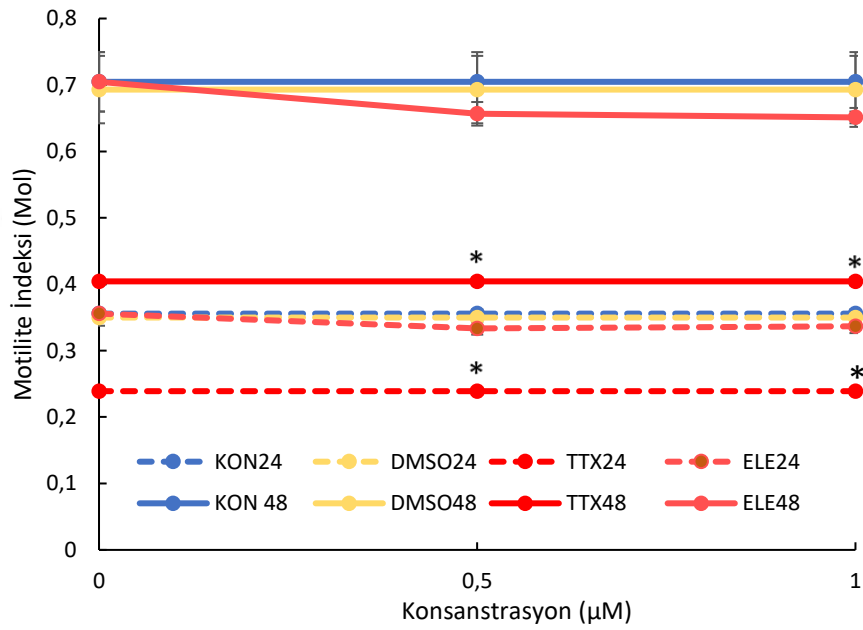


Şekil 4.19 GS-967'nin normoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonuna etkisi

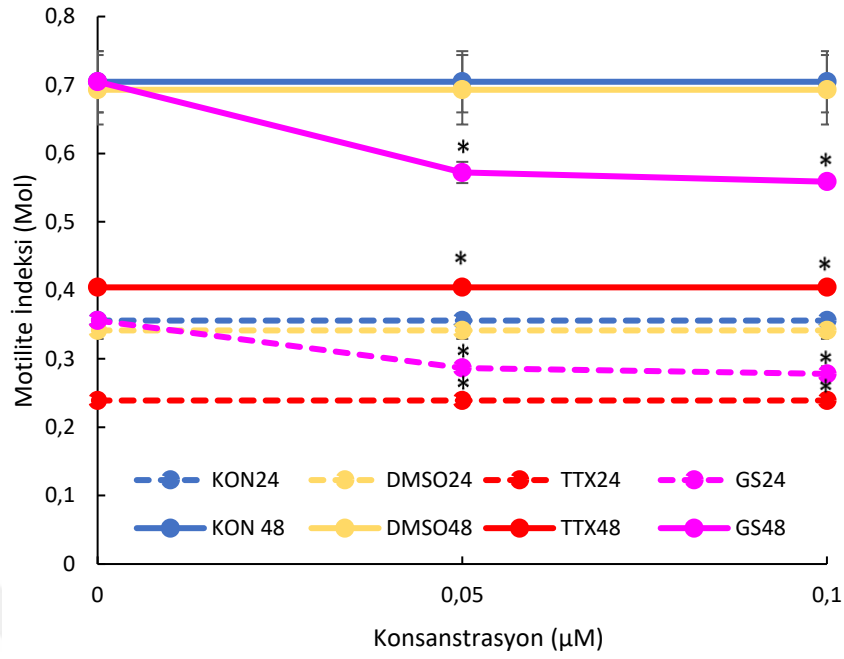
Düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin motiliteleri üzerine ELE ve GS-967'nin etkisi motilite değişim indeksi ve motilite yüzdesi olarak Tablo 4.4, Şekil 4.20 ve 4.21'de verilmiştir. Kontrol grubunun motilite indeksi 24. ve 48. saatte sırasıyla $0,36 \pm 0,01$ ve $0,70 \pm 0,04$ TTX için ise, bu oranlar sırasıyla $0,23 \pm 0,01$ ve $0,40 \pm 0,01$ olarak saptanmıştır. TTX 24. saatte kontrole kıyasla %32,8, 48. saatte %42, 6 oranında motiliteyi azalttığı ($P < 0,05$) görülmüştür. ELE 0,5 µM ve 1 µM için motilite indeksi 24. saatte sırasıyla $0,23 \pm 0,01$ ve $0,33 \pm 0,01$, 48. saatte ise $0,66 \pm 0,01$ ve $0,65 \pm 0,01$ olarak hesaplanmıştır. ELE 0,5 µM ve 1 µM'ın MCF- 7 hücrelerinin motilitesini azaltmakla birlikte bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı ($P > 0,05$) olmadığı görülmüştür. 0,05 µM ve 0,1 µM GS-967 ise 24. saatte motilite indeksi $0,31 \pm 0,01$, $0,28 \pm 0,01$, 48. saatte $0,57 \pm 0,01$ ve $0,56 \pm 0,01$ 'dir. 0,05 µM ve 0,1 µM GS-967 konsantrasyonlarının etkisi 24. saatte hücreler üzerinde sırasıyla %12 ve %18,8 olmakla birlikte 48. saatte bu oranlar %22,1 ve %20,7 olarak hesaplanmış ve elde edilen bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0,05$) olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.4 ELE ve GS-967'nin normoksi koşullarında MCF-7 hücrelerindeki motilite indeksi motilite değişimi (%) (* P<0.05)

Deney Grupları	Motilite İndeksi		Motilite Değişim (%)	
	24. Saat	48. Saat	24. Saat	48. Saat
Kontrol	0,36±0,01	0,70±0,04		
DMSO	0,34±0,02	0,69±0,07	1,6↓	1,6↓
TTX 600 nM	0,23±0,01	0,40±0,01	32,8↓*	42,6↓*
ELE 0,5 µM	0,33±0,01	0,66±0,01	6,25↓	6,8↓
ELE 1 µM	0,34±0,01	0,65±0,01	5,3↓	10,0↓
GS-967 0,05 µM	0,31±0,01	0,57±0,01	12,0↓*	18,8↓*
GS-967 0,1 µM	0,28±0,01	0,56±0,01	22,1↓*	20,7↓*



Şekil 4.20 ELE'nin normoksi koşullarında MCF-7 hücrelerinin migrasyonuna etkisi

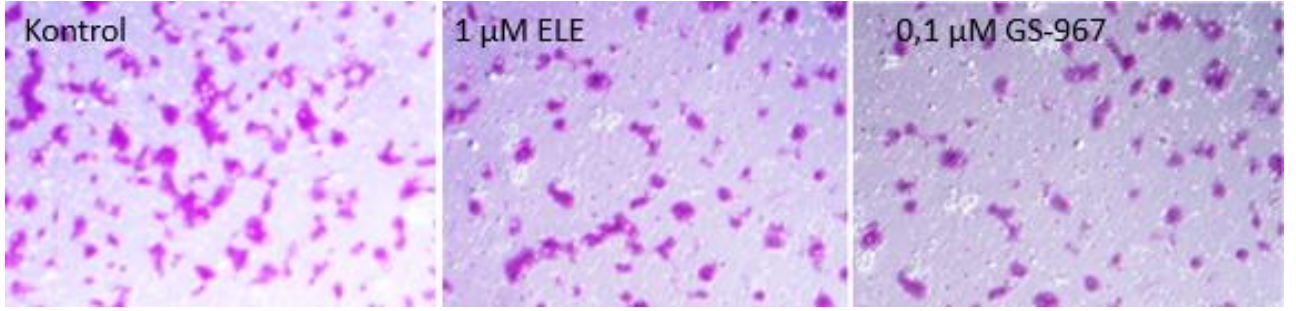


Şekil 4.21 GS-967'nin normoksi koşullarında MCF-7 hücrelerinin migrasyonuna etkisi

4.3.1.2 İnvazyon

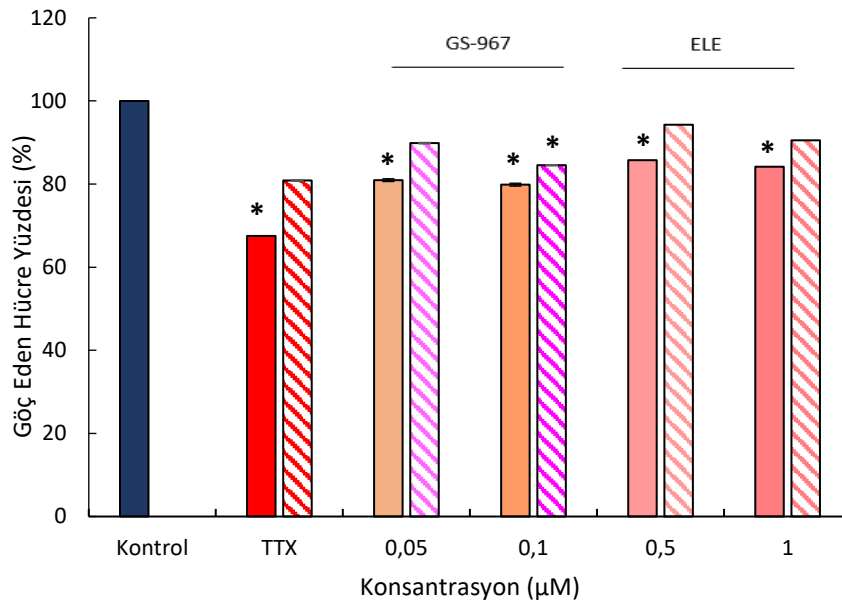
MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin transvers migrasyonu üzerinde ELE ve GS-967'nin etkisi, hücrelerin bazal membrandan invaze olma kapasiteleri boyden chamber yöntemiyle değerlendirilmiş ve Şekil 4.22'de hücrelerin görüntüleri, migrasyon yapan hücre sayısı yüzdesi Şekil 4.23'de verilmiştir.

Yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerine sodyum kanal blokeri olan TTX uygulanması ile, MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonu kontrole grubuna oranla %32,5 azalmış olup, istatistik bakımdan da anlamlı ($P<0,05$) olduğu belirlenmiştir. 0,5 µM ve 1 µM ELE, hücrelerin invazyonunu sırasıyla %14,5 ve %16 oranında anlamlı olarak ($P<0,05$) azaltmıştır. 0,05 µM ve 0,1 µM konsantrasyonlarındaki GS-967 ise hücrelerin invazyonunu anlamlı olarak ($P<0,05$) sırasıyla %19,1 ve %20 oranında azalttığı saptanmıştır.



Şekil 4.22 ELE ve GS-967 uygulaması sonucu normoksi koşullarda invazive olan MDA-MB-231 hücrelerinin görüntüsü

Şekil 4.23'te gösterildiği gibi, MCF-7 hücrelerine TTX uygulanması sonucu invaze olan hücre yüzdesi kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde %19 azalmışken, 0,5 μ M ve 1 μ M konsantrasyondaki ELE anlamlı bir inhibisyon meydana getirmemiştir. 0,05 μ M GS-967 ise anlamlı bir azalma göstermemekle birlikte, MCF-7 hücrelerinde sadece 0,1 μ M GS-967 hücre invazyonunda %15,5 oranında istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) bir inhibisyona neden olmuştur.



Şekil 4.23 ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin invazyonuna normoksi koşullarında etkisi (düz: MDA-MB-231, desenli: MCF-7) (* $P < 0,05$)

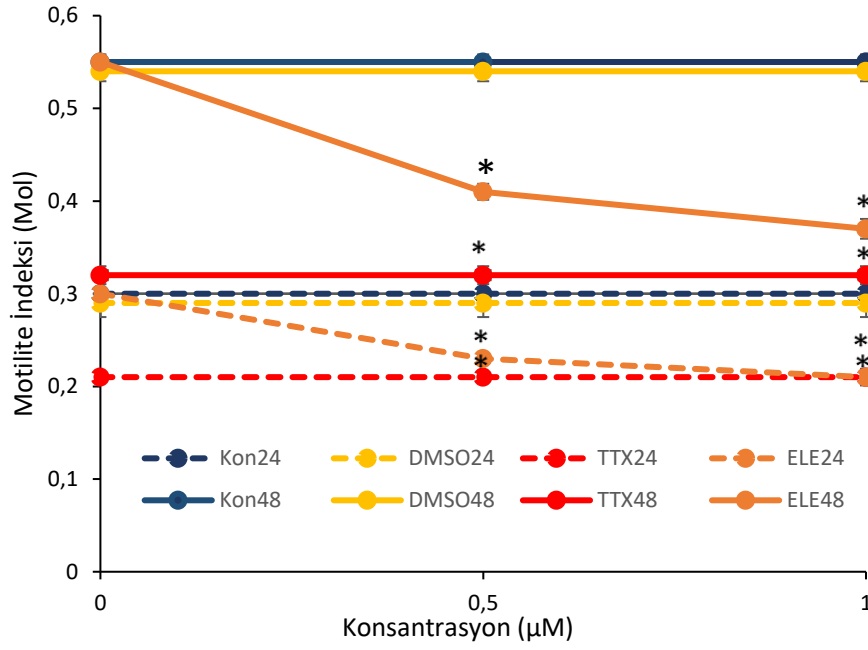
4.3.2 Hipoksi Koşulları

4.3.2.1 Migrasyon

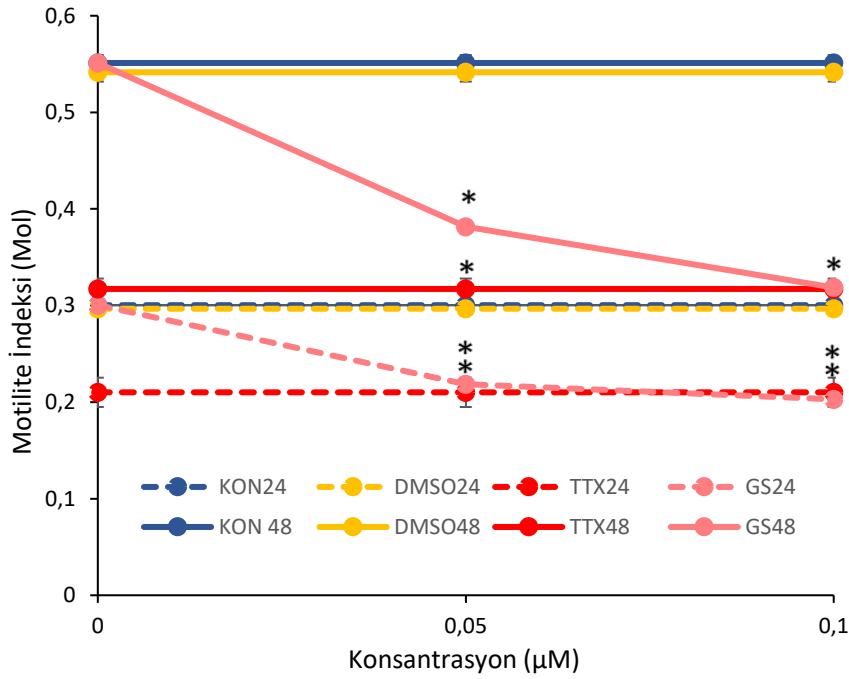
Hipoksik koşullarda ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin motilitelerine olan etkisi motilite indeksi ve motilite yüzdesi olarak Tablo 4.5 ve Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'de verilmiştir. Kontrol grubunda motilite indeksi 24. saat için $0,30 \pm 0,01$, 48. saat için $0,55 \pm 0,01$ olarak belirlenmiştir. DMSO'nun 24. saat ve 48. saat motilite indeksi sırasıyla $0,30 \pm 0,02$ ve $0,54 \pm 0,01$ olarak görülmüşken, hücrelerin motiliteleri üzerinde anlamlı etkisi olmamıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan VGSC blokeri TTX için ise motilite indeksi 24. saatte $0,21 \pm 0,01$, 48. saat için $0,32 \pm 0,01$ olarak tespit edilmiştir. TTX, kontrol grubuna oranla hücrelerin lateral hareketini 24 ve 48. saatte sırasıyla %30 ve %42,4 oranında anlamlı ($P < 0,05$) olarak azaltmıştır. 24. saatte $0,5 \mu\text{M}$ ve $1 \mu\text{M}$ ELE için motilite indeksi de sırasıyla, $0,23 \pm 0,01$ ve $0,22 \pm 0,01$, 48. saat için $0,42 \pm 0,02$ ile $0,37 \pm 0,01$ olarak hesaplanmıştır. Yapılan istatistik değerlendirmelere göre, $0,5 \mu\text{M}$ ve $1 \mu\text{M}$ ELE uygulanması sonucu hücrelerin lateral hareketlerinin kontrol grubuna oranla 24. saatte %22,6 ve %27,7, 48 saatte ise, %23,9 ve %33,3 oranında azaldığı tespit edilmiştir. GS-967 konsantrasyonları ($0,05 \mu\text{M}$ ve $0,1 \mu\text{M}$) 24. saatte motilite indeksi sırasıyla $0,22 \pm 0,01$ ve $0,20 \pm 0,01$, 48. saatte $0,38 \pm 0,01$ ve $0,32 \pm 0,01$ olarak hesaplanmıştır. $0,05 \mu\text{M}$ ve $0,1 \mu\text{M}$ GS-967 konsantrasyonları 24. saatte hücreler üzerinde sırasıyla %27,2 ve %32,4 oranında azaltma meydana getirirken 48. saatte bu %30, ve %42,1 oranlarına kadar çıkmıştır.

Tablo 4.5 ELE ve GS-967'nin hipoksida MDA-MB-231 hücrelerindeki motilite indeksi ve motilite değişimi (%)

Deney Grupları	Motilite İndeksi		Motilite Değişim (%)	
	24. Saat	48. Saat	24. Saat	48. Saat
Kontrol	$0,30 \pm 0,01$	$0,55 \pm 0,01$		
DMSO	$0,30 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,01$	1,2↑	1,7↑
TTX 600 nM	$0,21 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$	30↓*	42,4↓*
ELE 0,5 μM	$0,23 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,01$	22,6↓*	23,9↓*
ELE 1 μM	$0,22 \pm 0,01$	$0,37 \pm 0,01$	27,7↓*	33,3↓*
GS-967 0,05 μM	$0,22 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,01$	27,2↓*	30,7↓*
GS-967 0,1 μM	$0,20 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$	32,4↓*	42,1↓*



Şekil 4.24 ELE'nin hipoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonuna etkisi



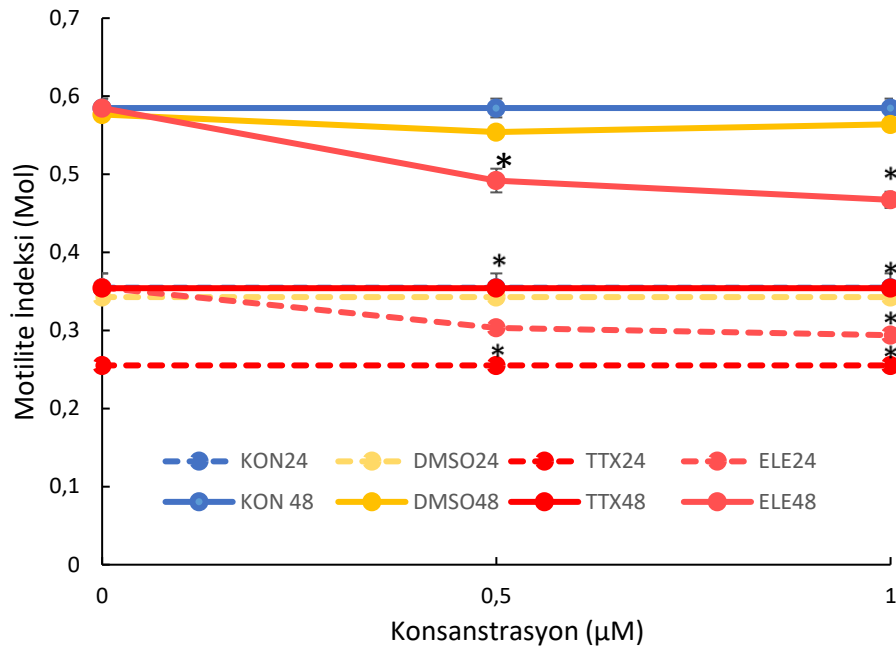
Şekil 4.25 GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonuna etkisi

Ajanların hipoksik koşullarında düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin motilitelerine olan etkisi motilite indeksi ve motilite yüzdesi olarak Tablo 4.6 ve Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da verilmiştir. Kontrol grubunda motilite indeksi 24. saat $0,35 \pm 0,01$, 48. saat $0,58 \pm 0,01$, Negatif kontrol

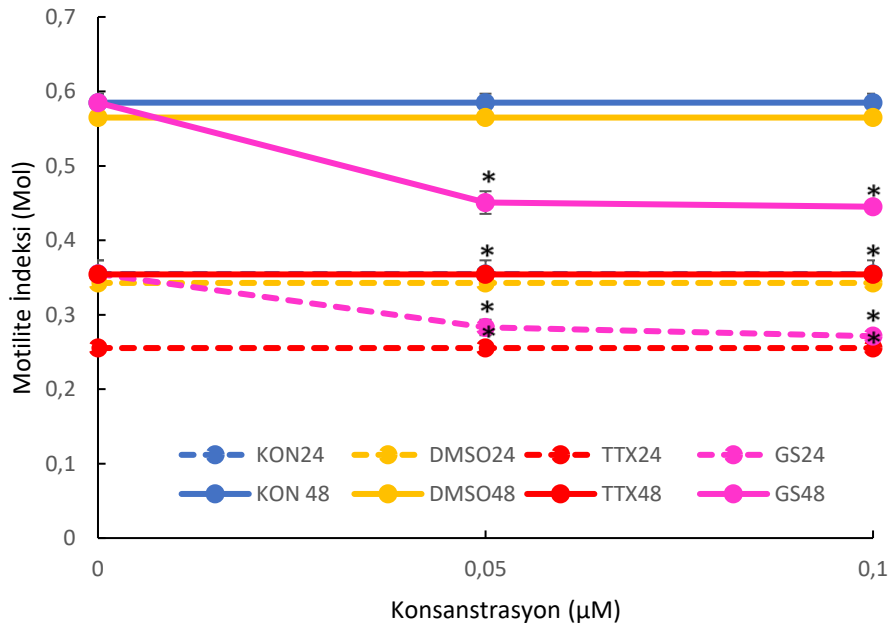
DMSO için ise bu değerler sırasıyla $0,34 \pm 0,01$ ve $0,57 \pm 0,01$ olarak belirlenmiş olup istatistiksel olarak ($P > 0,05$) anlamlı bulunmamıştır. Pozitif kontrol TTX için ise motilite indeksi 24. saatte $0,26 \pm 0,01$, 48. saat için $0,35 \pm 0,01$ olarak tespit edilmiştir. TTX, kontrol grubuna oranla hücrelerin lateral hareketini 24 ve 48. saatte sırasıyla %29,9 ve %39,4 oranında anlamlı ($P < 0,05$) olarak azaltmıştır. 24. saatte $0,5 \mu\text{M}$ ve $1 \mu\text{M}$ ELE için motilite indeksi de sırasıyla, $0,31 \pm 0,01$, $0,29 \pm 0,01$, 48. saat için $0,49 \pm 0,02$ ve $0,47 \pm 0,01$ olarak saptanmıştır. Yapılan istatistik değerlendirmelere göre, $0,5 \mu\text{M}$ ELE hücreler üzerinde 24. saatte anlamlı bir etkiye neden olmayıp 48. saatte %15,8 oranında anlamlı olarak motilitede azaltma meydana getirmiştir. $1 \mu\text{M}$ ELE uygulanması sonucu hücrelerin lateral hareketlerinin kontrol grubuna kıyasla 24. saatte %17,1, 48 saatte ise, 20,1 oranında motiliteyi azalttığı tespit edilmiştir. GS-967 için ise $0,05 \mu\text{M}$ ve $0,1 \mu\text{M}$ konsantrasyonlarının 24. saatte motilite indeksi sırasıyla $0,28 \pm 0,01$ ve $0,27 \pm 0,01$, 48. saatte $0,45 \pm 0,02$ ve $0,45 \pm 0,01$ olarak hesaplanmıştır. $0,05 \mu\text{M}$ ve $0,1 \mu\text{M}$ GS-967 konsantrasyonları 24. saatte hücreler üzerinde sırasıyla %20,2 ve %25,5 oranında azaltma meydana getirirken 48. saatte bu oranlar %22,9 ve %23,9 olarak saptanmıştır.

Tablo 4.6 ELE ve GS-967'nin hipoksi koşullarında MCF-7 hücrelerindeki motilite indeksi ve motilite değişimi (%)

Deney Grupları	Motilite İndeksi		Motilite Değişim (%)	
	24. Saat	48. Saat	24. Saat	48. Saat
Kontrol	$0,35 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,01$		
DMSO	$0,34 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,01$	3,3↓	3,42↓
TTX 600 nM	$0,26 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,01$	29,9↓*	39,4↓*
ELE 0,5 μM	$0,31 \pm 0,01$	$0,49 \pm 0,01$	14,4↓	15,8↓*
ELE 1 μM	$0,29 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,01$	17,1↓*	20,1↓*
GS-967 0,05 μM	$0,28 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,02$	20,2↓*	22,9↓*
GS-967 0,1 μM	$0,27 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,01$	23,5↓*	23,9↓*



Şekil 4.26 ELE'nin hipoksi koşullarında MCF-7 hücrelerinin migrasyonuna etkisi

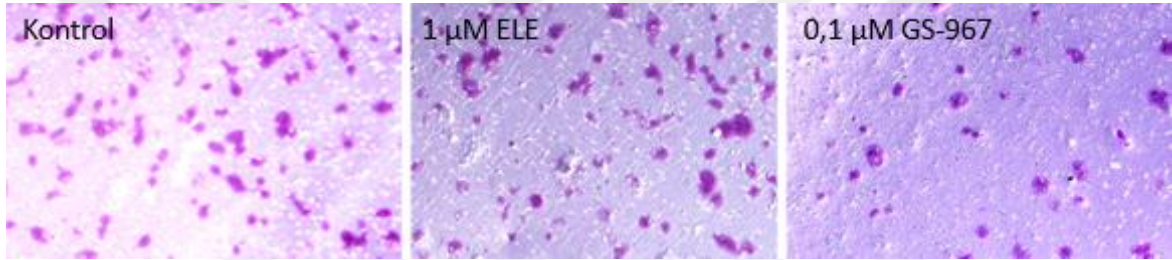


Şekil 4.27 GS-967'nin hipoksi koşullarında MCF-7 hücrelerinin migrasyonuna etkisi

4.3.2.2 İnvazyon

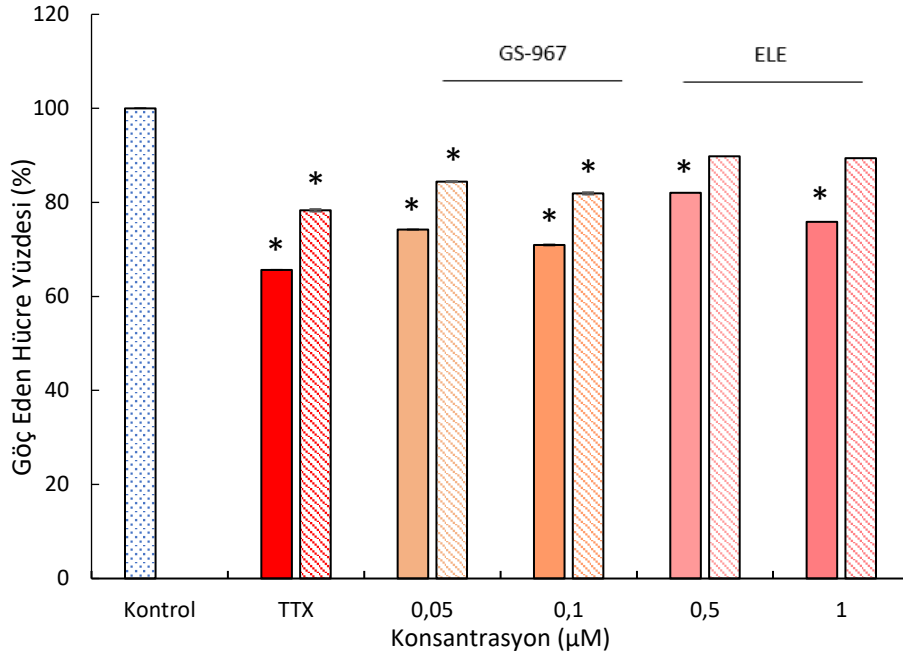
Hipoksi koşullarında MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin transvers migrasyonu üzerinde ELE ve GS-967'nin etkisini değerlendirmek üzere, bazal membrandan invaze olan hücreler Şekil 4.27'de, invaze olan hücre yüzdesi Şekil 4.28'de verilmiştir.

Yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerine TTX uygulanması, hücrelerin invazyonunu kontrol grubuna kıyasla %34,5 oranında anlamlı olarak ($P<0,05$) azaltmıştır. 0,5 μM ve 1 μM ELE uygulanması sonucu hücrelerin invazyonu sırasıyla %17,9 ve %24,1 oranında anlamlı olarak azaltmıştır. Diğer farmakolojik ajan olan GS-967'nin 0,05 μM ve 0,1 μM konsantrasyonları da invazyonu sırasıyla %25,7 ve %29 oranında anlamlı olarak ($P<0,05$) inhibe ettiği saptanmıştır (Şekil 4.29).



Şekil 4.28 Hipoksi koşullarda ELE ve GS-967 uygulanması sonucu invaze olan MDA-MB-231 hücreleri.

Düşük metastatik MCF-7 hücrelerine hipoksik ortamda TTX uygulanması hücrelerin transvers hareketini istatistiksel olarak %21,6 oranında inhibisyon ($P<0,05$) meydana getirdiği saptanmıştır. 0,5 μM ve 1 μM ELE uygulanması MCF-7 hücrelerinin invazyonunda anlamlı bir etkiye neden olmazken, 0,05 μM ve 0,1 μM GS-967 konsantrasyonları hücrelerin invazyonunda, sırasıyla %15,5 ve %18 oranında istatistiksel bakımdan anlamlı ($P<0,05$) bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.29).



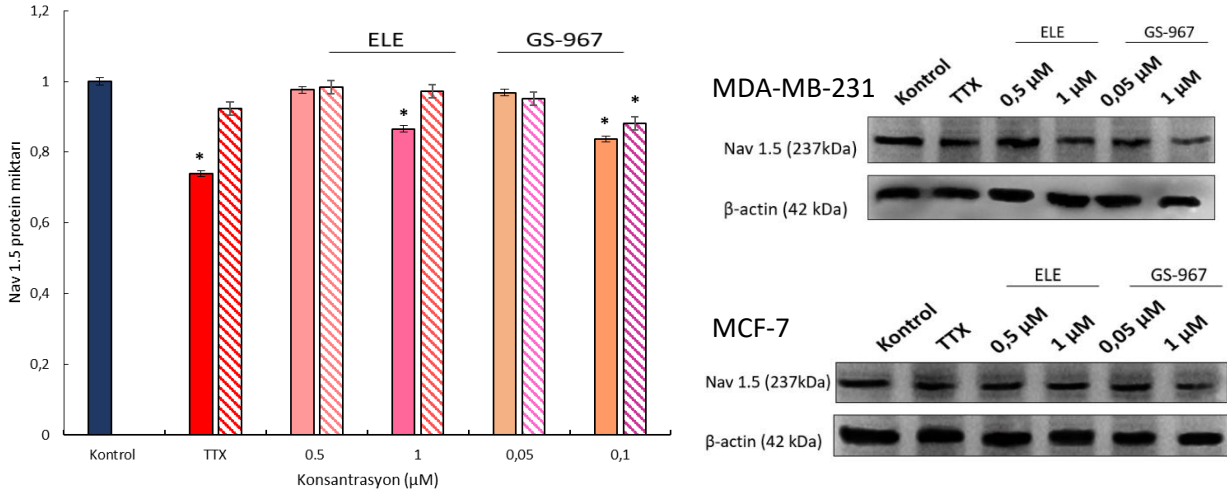
Şekil 4.29 Hipoksi koşullarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin invazyonuna etkisi (düz: MDA-MB-231, desenli: MCF-7) (*P<0,05)

4.4 Moleküler Analizler

4.4.1 Normoksi Koşulları

4.4.1.1 İmmünoiblotlama

Yüksek metastatik MDA-MB-231 ve düşük metastatik MCF-7 hücrelerinde Nav 1.5 proteininin miktarının belirlenmesi ve ajanların bu protein miktarına olan etkilerinin gözlemlenebilmesi için immünoiblotlama yöntemi kullanılmıştır. Referans gen (Housekeeping) olarak β -actin kullanılmıştır. İstatiksel hesaplamalar her grubun Nav 1.5 ve β -actin bant profiline göre yapılmıştır. ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde Nav 1.5 protein miktarına etkisi için şekil 4.30'da gösterilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde TTX, 1 μ M ELE ve 0,1 μ M GS-967 gruplarında kontrol grubuna kıyasla Nav 1.5 protein miktarının anlamlı ($P<0,05$) olarak azaldığı görülmüştür.

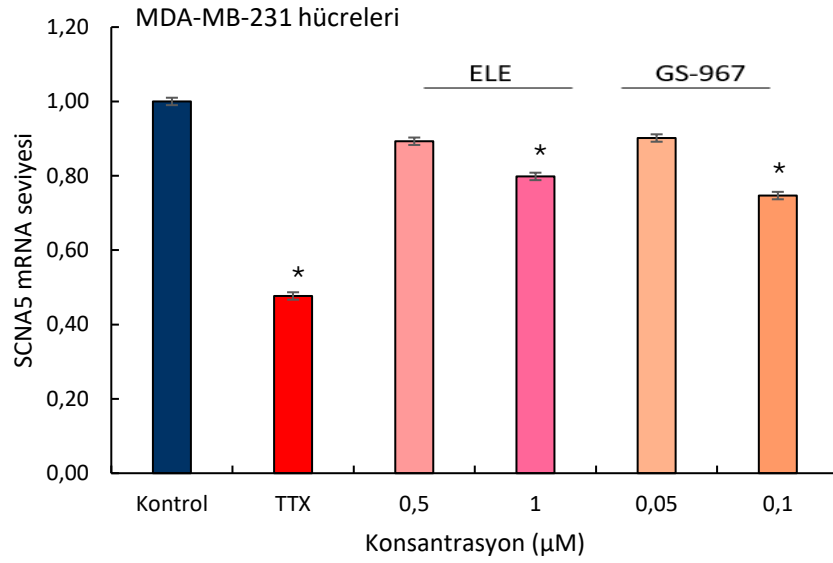


Şekil 4.30 Normoksi koşullarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerindeki Nav 1.5 proteinine etkisi ve bant görüntüleri (A) MDA-MB-231, (B) MCF-7 (düz: MDA-MB-231, desenli: MCF-7) (* P<0,05)

MCF-7 hücrelerinde ise, sadece 0,1 μ M GS-967'nin kontrole grubuna kıyasla Nav 1.5 proteininde anlamlı (P<0,05) bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.30).

4.4.1.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Farmakolojik ajanların, hücrelerin Nav 1.5 protein üretiminden sorumlu olan SCNA5 geninin mRNA miktarına normoksi koşullarındaki etkileri qRT-PCR ile değerlendirilmiştir. Housekeeping gen olarak β -actin kullanılmıştır. TTX, ELE ve GS-967 deney gruplarının cq değerleri, kontrol grubunun cq değerlerine göre normalize edilmiştir. ELE ve GS-967'nin yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerindeki SCNA5 ifadesine etkisi Şekil 4.31'de gösterilmiştir. TTX grubu kontrole kıyasla SCNA5 mRNA seviyesinde yaklaşık %50 civarında azalmaya neden olmuştur. ELE grubuna bakıldığında, 1 μ M ELE'nin kontrol grubuna göre mRNA seviyesinde %20 oranında azalmaya neden olduğu görülmüştür. 0,1 μ M GS-967 ise SCNA5A mRNA seviyesini %26 oranında azaltmıştır.



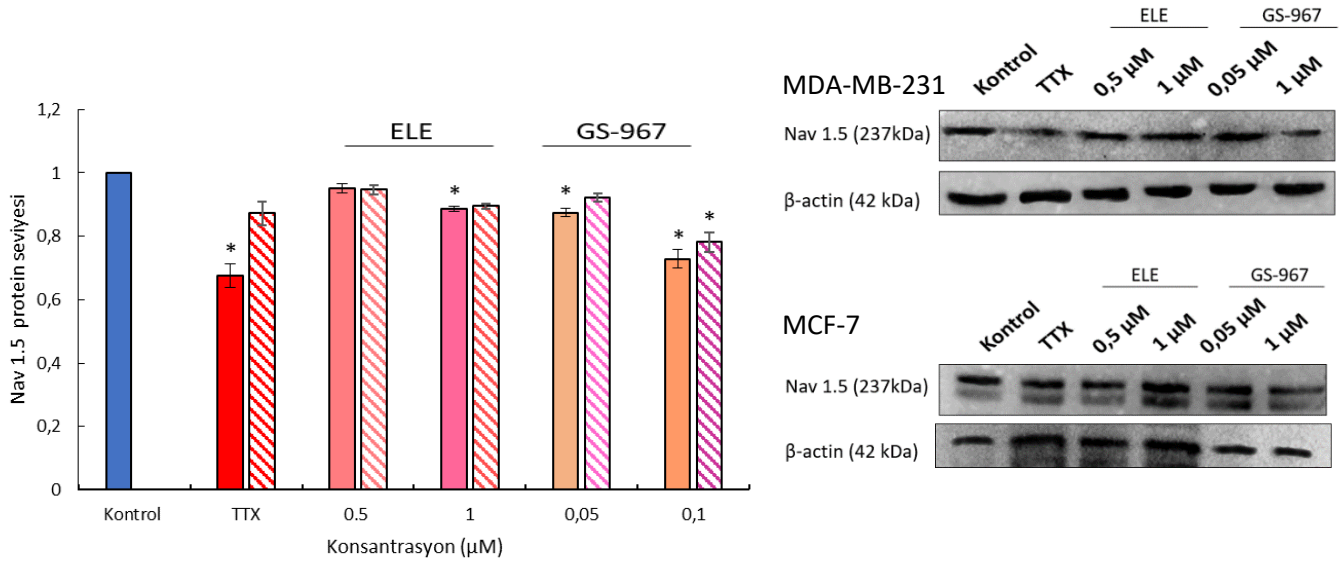
Şekil 4.31 Normoksi koşullarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerindeki SCNA5 ifadesine etkisi (* $P < 0,05$).

4.4.2 Hipoksi Koşulları

4.4.2.1 İmmünoblotlama

Hipoksi ortamında MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin ifade ettiği Nav 1.5 protein miktarları referans gen β -actin kullanılarak, immünoblotlama yöntemi ile saptanmıştır. Her grubun Nav 1.5 ve β -actin bant profiline göre yapılan istatistik değerlendirmeler sonucu MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerindeki Nav 1.5 protein miktarları Şekil 4.32'de verilmiştir.

Yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinin Nav 1.5 protein miktarında hem sodyum kanal blokeri TTX, hem de kullanılan farmakolojik ajanlardan 1 μ M ELE ile 0,05 μ M ve 0,1 μ M GS-967 azalmaya neden olurken, 0,5 μ M ELE herhangi bir etki göstermemiştir.

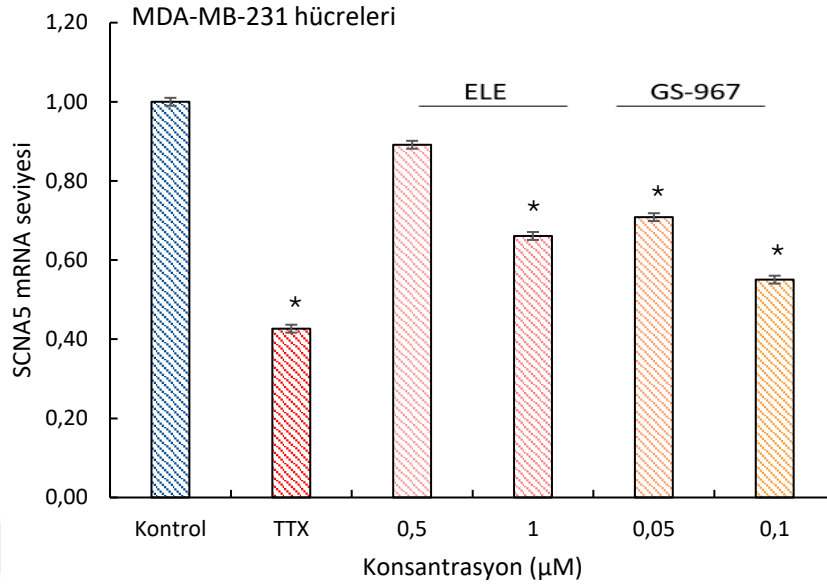


Şekil 4.32 Hipoksi koşullarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerindeki Nav 1.5 proteinine etkisi ve bant görüntüleri (A) MDA-MB-231, (B) MCF-7 (düz: MDA-MB-231, desenli: MCF-7) (* $P < 0,05$)

Hipoksi koşullarda düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin Nav 1.5 ifadesi üzerine iki ajanın etkisi incelendiğinde, deney gruplarından sadece 0,1 μM GS-967'nin kontrol grubuna kıyasla anlamlı ($P < 0,05$) bir azalmaya sebep olduğu belirlenmektedir.

4.4.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

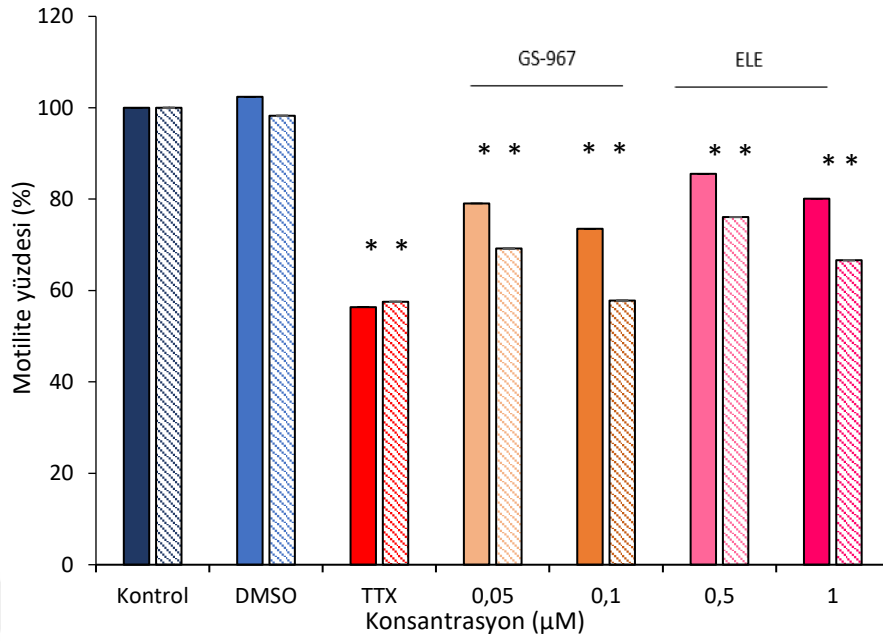
ELE ve GS-967'nin hipoksik koşullardaki MDA-MB-231 hücrelerindeki SCNA5 ifadesine etkisi Şekil 4.33'te gösterilmiştir. TTX, MDA-MB-231 hücrelerinin SCNA5 mRNA seviyesi üzerinde kontrol grubuna kıyasla, yaklaşık %60'a yakın bir azalmaya neden olmuştur. 0,5 μM ELE anlamlı bir etki göstermezken, 1 μM ELE ise, kontrole göre yaklaşık %34 oranında mRNA seviyesinde azalmaya neden olmuştur. GS-967'nin etkisine bakıldığında, 0,05 μM GS-967'nin SCNA5A mRNA seviyesini %30 oranında 0,1 μM GS-967'nin ise %45 oranında anlamlı ($P < 0,05$) olarak azalttığı saptanmıştır.



Şekil 4.33 Hipoksi koşullarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerindeki SCNA5 ifadesine etkisi (*P<0,05).

4.5 Metastatik Potansiyelin Değerlendirmesi

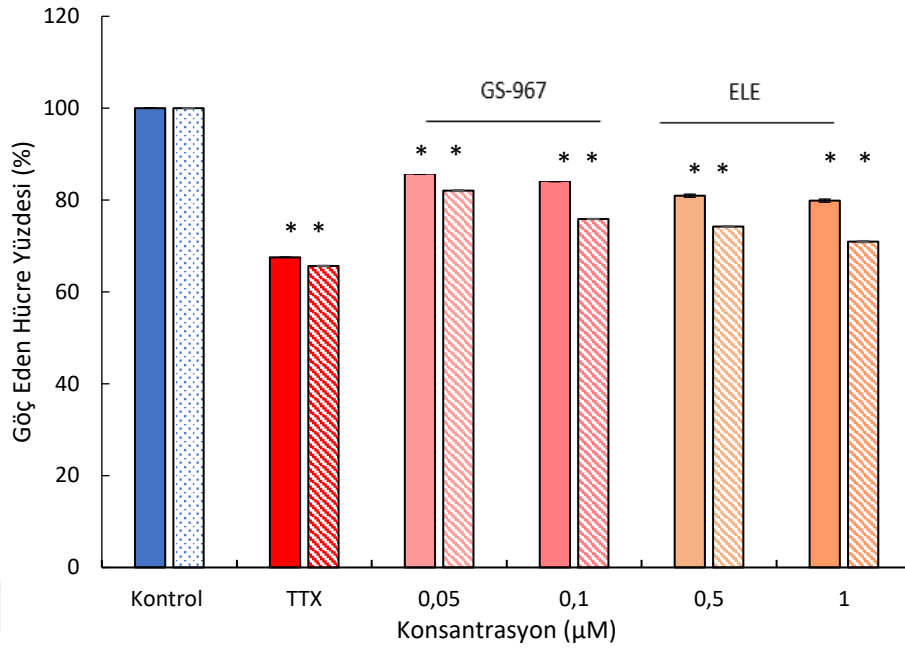
Çalışmada kullanılan farmakolojik ajanlar ELE ve GS-967'nin hem normoksi hem de hipoksi koşullarında yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonuna etkisi Şekil 4.34'te gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, her iki koşulda da çözücü olarak kullanılan DMSO'nun hücrelerin lateral hareketi/motilitesi üzerinde etki göstermediği, sodyum kanal blokeri olan TTX'in ise, oluşturduğu inhibisyonun benzer olduğu dikkati çekmektedir. Hipoksik koşullarda ELE, normoksiye oranla %10-14 GS-967 ise, %10-16 oranında MDA-MB-231 hücrelerinin motilitesini daha fazla inhibe etmiştir.



Şekil 4.34 Normoksi ve hipoksik koşullarda ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin motilitesine etkileri (düz renk normoksi, desenli hipoksi koşulları) (*P<0,05)

Düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin motilitesi üzerinde normoksi koşullarında ELE anlamlı bir etki göstermezken, hipoksi koşullarında her iki farmakolojik ajanın da hücrelerin motilitesini inhibe ettiği ancak, bu inhibisyonun MDA-MB-231 hücrelerindeki kadar yüksek olmadığı izlenmiştir.

Hücrelerin metastatik potansiyelinde etkili diğer faktör hücre invazyonu üzerine ELE ve GS-967 ajanlarının normoksi ve hipoksik koşullarda MDA-MB-231 hücrelerindeki etkileri Şekil 4.35'te verilmiştir. Sodyum kanal blokeri TTX'in yanı sıra, ELE ve GS-967 normoksi ve hipoksik koşullarda kontrol grubuna kıyasla hücre invazyonunu inhibe etmiştir. Hücrelerin lateral hareketinde olduğu gibi, invazyonunda da hipoksik koşullarda bu inhibisyonun daha yüksek olduğu saptanmıştır.



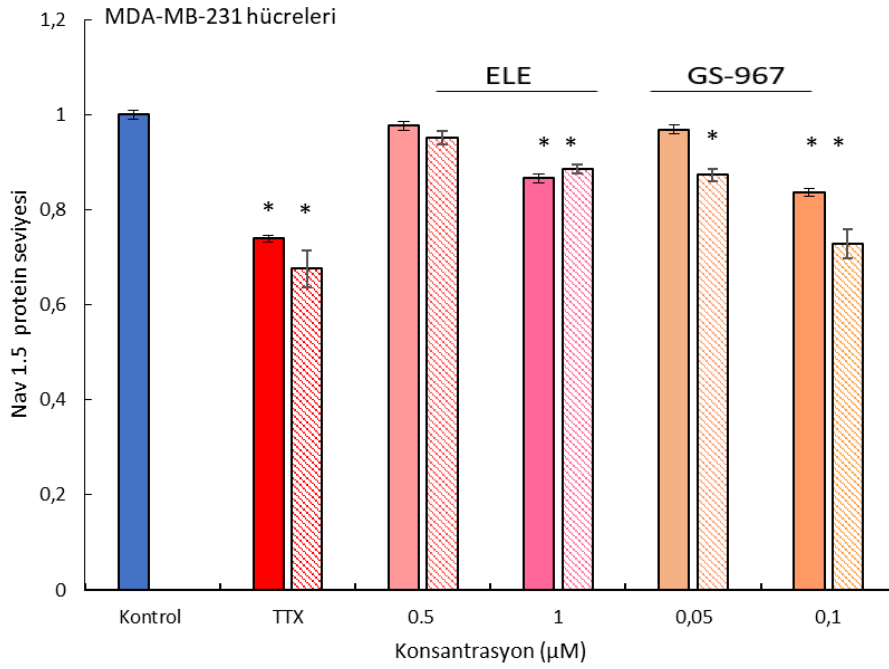
Şekil 4.35 Normoksi ve hipoksi koşullarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonuna (Düz renk normoksi, desenli hipoksi) (*P<0,05).

MCF-7 hücrelerinde TTX hem normoksi hem de hipoksi koşullarında hücrelerin invazyonunu inhibe ederken, ELE, her iki ortamda da etki göstermemiştir. GS-967 uygulaması ise, yüksek oranda olmamakla birlikte hipoksi koşullarında daha etkili bir inhibisyon meydana getirmiştir.

4.6 Moleküler Değerlendirme

Yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinde Nav 1.5 protein miktarına ELE ve GS-967'nin normoksi ve hipoksi koşullarındaki etkisi Şekil 4.36'da gösterilmiştir. TTX grubu normoksi ve hipoksi koşullarında kontrol grubuna kıyasla Nav 1.5 protein miktarında anlamlı ($P > 0,05$) bir azalmaya neden olmuştur. Hem normoksi hem de hipoksi koşullarında etki gösteren TTX grubu, hipoksida normoksiye göre protein miktarında %5 daha fazla inhibe edici etki göstermiştir. 0,5 µM ELE normoksi ve hipoksi koşullarında hücrelerin Nav 1.5 protein miktarına anlamlı bir etki göstermemişken 1 µM ELE, her iki ortamda da %13-15 miktarında inhibisyon meydana getirmiştir.

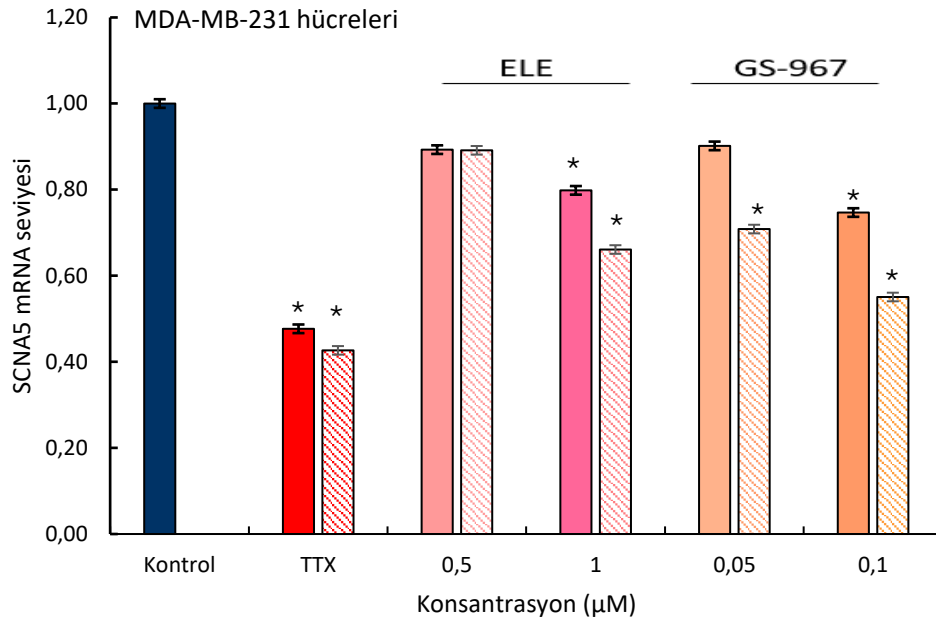
GS-967'nin MDA-MB-231 Nav 1.5 protein seviyelerine etkisine bakıldığında, normoksi koşullarında 0,05 µM anlamlı bir etki göstermezken, 0,1 µM %20 oranında anlamlı ($P > 0,05$) bir azalışa neden olmuştur. Hipoksi koşullarında ise her iki konsantrasyonda kontrole kıyasla Nav 1.5 protein miktarında anlamlı azalış meydana getirmiştir. Protein azalma miktarları 0,05 µM için %13, 0,1 µM GS-967 için ise %28 olarak saptanmıştır.



Şekil 2.36 Normoksi ve hipoksi koşullarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin Nav 1.5 protein miktarına etkisi (düz renk normoksi, desenli hipoksi) (*P<0,05)

İki farklı ortamda düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin Nav 1.5 protein miktarına üzerinde TTX ve ELE etki göstermezken, sadece 0,1 µM GS-967'nin yüksek oranda olmamakla beraber, bir inhibisyon meydana getirdiği saptanmıştır.

Düşük metastatik/invaziv MCF-7 hücrelerine kıyasla daha fazla SCNA5 ekspresyona sahip olduğu bilinen yüksek metastatik/invaziv MDA-MB-231 hücrelerine normoksi ve hipoksi koşullarında ELE ve GS-967 uygulanması sonucu hücrelerin SCNA5 ekspresyonları Şekil 4.37'de verilmiştir. TTX her iki ortam koşulunda da gen ifadesi üzerinde inhibisyon (%52-57) meydana getirirken, 1 µM ELE'nin hem normoksi hem de hipoksi koşulda MDA-MB-231 hücrelerinin SCNA5 ifadesini baskıladığı ve bunun hipoksik ortamda daha yüksek oranda (%34) olduğu saptanmıştır. Diğer ajan GS-967'nin 0,05 µM konsantrasyonu sadece hipoksik ortamda hücrelerin SCNA5 ifadesini %30 oranında inhibe ederken, 0,1 µM konsantrasyondaki GS-967 her iki ortamda da inhibisyon göstermiştir. 0,1 µM GS-967 uygulaması ile MDA-MB-231 hücrelerinin metastatik aktivitesine paralel, yüksek olan SCNA5 ifadesindeki inhibisyon hipoksik ortamda %45 oranına ulaşmıştır.



Şekil 4.37 Normoksi ve hipoksi ortamlarında ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinin SCNA5 ekspresyonuna etkisi (düz renk normoksi, desenli hipoksi) (* $P < 0,05$)

5. TARTIŞMA

Meme kanseri her yıl artan insidans oranları ile dünya çapında kadınlar için en önemli halk sağlığı sorunlarından biridir. Erken teşhis ve tanı yöntemleri ile önüne geçilebilmesi son yıllarda artmış olsa bile, mortalitede kayda değer bir azalma görülmemektedir. Özellikle metastaz oluşumu tedaviyi zorlaştırmakta, hayat kalitesini oldukça düşürmeye devam etmekte ve en önemlisi de kansere bağlı ölümlerin sebebi olmaktadır (Djamgoz & Onkal, 2013; Park v.d., 2022). Metastaz birkaç adımdan oluşan bir süreçtir. Mezenkimal fenotipe geçen kanser hücreleri motilite kazanırlar ve böylece vücudun diğer bölgelerine yayılım göstererek, metastaz yaparlar. Bu nedenle meme kanseri metastazının aşamalarının daha iyi anlaşılması, meme kanserinin yönetimi ve ilerlemesinin öngörülmesi açısından önemlidir (Wunderle v.d., 2018, Rhiem v.d., 2019, Kolberg v.d., 2023).

Hücre membranı boyunca uzanan ve iyonların membranın bir tarafından diğer tarafına geçişine izin veren iyon kanalları, protein yapılarında meydana gelen konformasyonel değişikliklerle açılıp kapanarak, iyonların geçişini sağlarlar. Temelde sinir iletimi ve kas kasılması için gerekli olan hücre membran potansiyelini düzenlemek üzere plazma membranı boyunca iyonların taşınmasından sorumlu oldukları bilinsede, yapılan çalışmalar iyon kanallarının fagositoz, hücre proliferasyonu, hücre motilitesi ve invazivliği gibi pek çok hücresel süreçte rol aldıkları tanımlanmıştır (Pineda v.d., 2020). Sadece sağlıklı hücrelerde değil aynı zamanda, kanser hücrelerinin gelişiminde ve ilerlemesinde de farklı iyon kanallarının görev aldığı bilinmektedir (Angus ve Ruben, 2019).

İyon kanallarından VGSC'ler aksiyon potansiyelinin başlatılması için gereklidir ve bu nedenle uyarılabilir hücrelerin karakteristik özelliğidir. Ayrıca VGSC'ler, mikrogial hücrelerden ve makrofajlarda bulunan ve hücrelerin hücre dışı matrisi (ECM) bozmalarına ve doku mikro ortamlarına hızla göç etmelerine yardımcı olmada rol oynadıkları düşünülen çeşitli uyarılabilir olmayan hücre tiplerinde de bulunur. Bununla birlikte, meme, akciğer, prostat, serviks, over ve kolon kanseri gibi uyarılabilir olmayan epitelyal kanser hücrelerinde ve insanlardan alınan biyopsilerde farklı NaV izoformları bulunmuştur. Bu iyon kanallarının kanser hücrelerindeki kesin mekanizmaları bilinmemekle birlikte, kanser hücrelerinin, hücre invazivliğine yardımcı olmak için VGSC'yi mikrogial hücrelerine benzer bir şekilde kullanabilecekleri düşünülmektedir (Kim, 2014).

Çeşitli VGSC'lerin α ve β alt birimlerinin kanser hücrelerinde normal dokuya kıyasla farklı şekilde ifade edildiğine dair artan kanıtlar, bu moleküllerin malign hücrelerin tespitinde

moleküler belirteçler ve daha doğru bir tedavi için moleküler hedefler olarak kullanılması olasılığını artırmaktadır (Djamgoz ve Onkal, 2013). Daha önce de belirtildiği gibi, kanalların neonatal ve diğer ek varyantları kanserde tercihli olarak ifade edilir ve bu gerçek, diğerlerinin yanı sıra meme, servikal, kolon ve mide kanseri için önerildiği gibi, sağlıklı dokularda ifade edilen "normal" izoformların işlevselliğini değiştirmeden bu izoformlara yönelik stratejilerin geliştirilmesine gereksinim vardır (Prevarskaya v.d., 2018).

VGSC'lerin Nav1.5 izoformu meme kanseri biyopsilerinde anormal şekilde ifade edilirken, kanserli olmayan meme dokularında ifade edilmez. Neonatal Nav1.5 (nNav1.5) ağırlıklı olarak metastatik meme kanseri hücrelerinde ifade edilir ve ifade düzeyi lenf nodu invazyonu, metastaz gelişimi ve hastaların sağ kalımının azalması ile ilişkilidir (Fraser vd., 2005; Yamaci vd., 2017). Bu formun neonatal gelişime katıldığı, postnatal gelişimde ise bulunmadığı tespit edilmiştir.

Tümörlerin en iyi bilinen özelliklerinden biri de metastatik özelliklerini destekleyen iç hipoksinin oluşmasıdır. Bu durum en belirgin şekilde, kanser hücrelerin invazivliğinde meydana gelen artışı göstermektedir. Bununla birlikte, kanser hücresi davranışının iyonlarla kontrolü üzerine yapılan çalışmaların çoğu normoksik koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Özellikle hipoksi koşullarda meme kanserindeki VGSC aktivitesi pek bilinmemektedir.

Çalışmada antiaritmik ajanlardan ELE ve GS-967'nin yüksek metastatik MDA-MB-231 ve düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin proliferasyonları üzerindeki etkileri hem normoksi hem de hipoksi koşullarında değerlendirilmiştir. Normoksi ortamında elde edilen sonuçlara göre; ELE, MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonu üzerinde 10 μ M konsantrasyondan itibaren, MCF-7 hücrelerinde ise, 2 μ M konsantrasyondan itibaren inhibisyon meydana getirmiş ve artan ELE konsantrasyonlarına paralel olarak inhibisyon oranlarının da arttığı izlenmiştir. Hipoksi ortamında ise, hem yüksek metastatik MDA-MB-231, hem de düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin proliferasyonları üzerinde 2 μ M ELE'nin inhibisyona neden olduğu saptanmıştır. Diğer antiaritmik ajan GS-967'nin hücrelerin proliferasyonu üzerindeki etkilerine bakıldığında, normoksi koşullarında MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu 1 μ M konsantrasyondan itibaren inhibe ettiği görülmektedir. Hipoksi koşulunda ise, her iki hücre hattı için de proliferasyonu etkileyen konsantrasyon 0,5 μ M GS-967'ye gerilemiştir. Her iki ajan ve her iki ortamda koloni oluşumu da araştırılmış ve hücre proliferasyonunda elde edilenlere paralel sonuçlar elde edilmiştir.

Literatürde meme kanseri üzerinde ELE ve GS-967'nin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamış olup, sadece glioblastoma üzerinde ELE ile yapılan bir çalışma bulunmaktadır. Esas olarak Nav 1.1, Nav1.2, Nav 1.6 VGSC'lerin yüksek seviyede eksprese edildiği U87 glioblastoma hücrelerine 15 μ M ELE uygulanması sonucu hücre proliferasyonunun inhibe olduğu ve bu inhibisyonun normoksi koşulunda %19 iken, hipoksi koşulunda %9 olarak saptanmıştır. Çalışmada U87 glioblastoma hücrelerinde ELE'nin meydana getirdiği bu inhibe edici etkiye VGSC aktivitesinin aracılık etmediği sonucuna varılmıştır (Ulutürk v.d., 2019).

ELE ve GS-967 ile benzer etkiler gösteren ve angina pectoris için klinikte yaygın olarak kullanılan antiaritmik ilaçlardan RNL ile yapılmış birkaç çalışma bulunmaktadır. Driffort v.d. (2014) yaptığı çalışmada RNL ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi in vitro ve in vivo olarak incelemiş olup, RNL'nin sitotoksik etkisini değerlendirmiş ve 0,1-100 μ M RNL konsantrasyonlarının da hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir.

MDA-MB-231 hücrelerinde, 0.625 μ M, 1.25 μ M, 2,5 μ M ve 5 μ M RNL konsantrasyonlarının kullanıldığı bir başka bir in vitro çalışmada, 5 μ M RNL konsantrasyonunun hücrelerin normoksi koşullarında 48 saat boyunca hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı ortaya konmuştur. Ayrıca 2.5 ve 5 μ M RNL konsantrasyonunun hipoksi koşullarında da 48 saat boyunca MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonuna veya hücre canlılığına hiçbir etkisi görülmemiştir (Qiu vd., 2022). Çalışmamızda, ELE'nin MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonu üzerinde 10 μ M'dan itibaren, GS-967'nin ise 1 μ M'dan itibaren inhibe edici etki oluşturması bu ajanların antiaritmik RNL'e oranla daha düşük dozlarda etkili olabileceklerini düşündürmektedir.

Nav 1.5 kanalında ELE ile benzer yerlere bağlandığı ileri sürülen antiaritmik ve lokal anestezik olarak kullanılan lidocaine (LDC) ile yaptığı çalışmada Tran v.d., (2022) yüksek metastatik MDA-MB-231 meme hücrelerine klinik doz olan 10 mM LDC uygulanmasının hücre proliferasyonunu baskıladığını belirtmiştir. Benzer olarak, 0,625 mM, 1.25 mM, 2,5 mM, 5 mM ve 10mM LDC uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, levobupivakain, bupivakain ve ropivakain olmak üzere LDC benzeri bu üç lokal anestezik de MDA-MB-231 hücre hattının proliferasyonunu inhibe etmenin yanı sıra, sitotoksik olduğu da bildirilmiştir (Chen v.s., 2021).

Hücrelerin metastatik potansiyelinde etkili faktörlerin hücre lateral hareketi/migrasyon/motilitesi ile hücre invazyonu olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda hücre proliferasyonu üzerinde etki göstermeyen ELE (0,5 μ M ve 1 μ M) ve GS-967 (0,05 μ M ve 0,1

μM) konsantrasyonlarının uygulanması sonucunda MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin metastatik potansiyeli (motilite ve invazyon) değerlendirilmiştir.

Hücre hareketi üzerine Nav 1.5'in katkısının değerlendirilmesinde pozitif kontrol olan TTX, hücrelerin motilitesi üzerinde %45 oranında inhibisyon meydana getirmiştir. 0,5 μM ve 1 μM ELE konsantrasyonları normoksi koşullarında yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinin lateral hareketini/motilitesini %20 oranında inhibe etmiştir. Hipoksi koşullarında ise, bu oran %30'lara kadar yükselmiştir. Düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin lateral hareketi üzerinde normoksi koşullarında herhangi bir etki göstermeyen ELE, hipoksi koşullarında %20'ye yakın bir oranda hücrelerin migrasyonunu inhibe ettiği tesbit edilmiştir. GS-967'nin hücrelerin motiliteleri üzerindeki etkilerine bakıldığında ise, normoksi koşullarında MDA-MB-231 hücrelerinin lateral hareketinde %27 oranında inhibisyona neden olurken, hipoksi koşullarında bu oran %40'a ulaşarak TTX'e yakın bir inhibisyon oranını oluşturmuştur. MCF-7 hücrelerinin lateral hareketini normoksi koşullarında GS-967 konsantrasyonları %20 oranında bloke etmiştir. Hipoksi koşullarında bu oran biraz yükselerek, %23'e ulaşmıştır.

Her iki ortam koşulunda da sodyum kanal blokeri TTX ve farmakolojik ajanların MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonuna etkisi incelendiğinde, tüm ajanların invaze olan hücre sayısında azalma meydana getirdiği görülmüştür. 600 nM olarak uygulanan TTX'in normoksi ve hipoksi koşullarında hücre invazyonunu %40-45 oranında inhibe ettiği saptanmıştır. Hem ELE hem de GS-967, MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonunu her iki ortam koşulunda inhibe etmekle beraber, inhibisyon oranının hipoksi koşullarında %10-15 daha fazla olduğu bulunmuştur. Düşük metastatik MCF-7 hücrelerinin invazyonu üzerinde ELE'nin bir etkisi gözlenmezken, uygulanan GS-967 konsantrasyonlarının düşük oranda hipoksi koşulunda ise, biraz daha etkili bir inhibisyon meydana getirdiği belirlenmiştir.

VGSC'lerin metastatik kanser davranışıyla en sık ilişkilendirilen rolü, kanser hücrelerinin transvers invazyon gerçekleştirme yeteneğine katkılarıdır ki, bir VGSC tipinin ifadesi, kanser hücrelerinin malignitesi ile paralel olarak invazivlik potansiyelinin artırmasıdır (Roger v.d., 2003). Sodyum kanal blokeri TTX varlığında veya diğer kanal blokerleri ile VGSC'lerin bloke edilmesi sonucu invaze olan meme kanseri hücre sayısının azaldığı in vitro çalışmalarla ortaya konmuştur (Fraser v.d., 2005; Brackenbury v.d., 2007, Brisson v.d., 2013).

Literatürde ELE ve GS-967'nin meme kanseri veya başka bir kanser hücrelerinin motilite ve /veya invazyonu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamış ancak, bazı antiaritmikler ile yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Djamgoz ve Onkal'ın (2013) MDA-MB-

231 meme kanseri hücreleri ile gerçekleştirdiği çalışmada, %2 O₂ içeren hipoksi ortamına maruz kalan hücrelerin invazivliğinin arttığı tespit edilmiş, bu hücrelere 10 µM TTX ve 300 µM RNL uygulamasının, hücrelerde artan invazyonu baskıladığı gösterilmiştir. Anjina da kullanılan RNL (50 µM)'nin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine uygulandığı in vitro bir çalışmada, ilacın hücrelerin invazyonunu azaltmasının yanı sıra, in vivo olarak MDA-MB-231 hücreleri enjekte edilen farelere 50 mg/kg/gün dozda RNL uygulanması sonucu, meme kanserli farelerdeki akciğer kolonizasyonunu yani, metastazları anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur. Nav1.5 ekspresyonunun yüksek olduğu bu meme kanseri hücrelerinde VGSC'lerin RNL ile bloke edildiği belirtilmiştir (Driffort v.d., 2014). Yüksek metastatik ve Nav 1.5 ekspresyonu yüksek olan MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 iki meme kanseri hücre hattı ile gerçekleştirilen in vitro çalışmada normoksi koşullarında 2,5 µM RNL'nin hücre invazyonunu %30, hipoksi koşullarında ise, %36 oranında azalttığı belirlenmiştir (Qui v.d., 2022). Tüm bu çalışmalar RNL'nin Nav 1.5 ekspresyonu yüksek olan meme ve kolon kanseri hücre hatlarında hipoksik koşullarda hücre invazivliğini normoksik koşullara göre daha yüksek oranda inhibe ettiğini göstermektedir ki, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki bu çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Günümüzde antiaritmik ve lokal anestezik olarak kullanılan VGSC blokeri LDC'nin erken meme kanseri operasyonlarında peritümöral bölgeye on dakika süreyle uygulandıktan sonra opere edilmesiyle, metastatik potansiyelin azaldığı, operasyon öncesi LDC kullanmayanlara oranla hastalıksız sağ kalım ve total sağ kalımın arttığı, 5 yıllık lokal nüksün 3,4 olduğu klinik bir çalışma ile yakın zamanda ortaya konmuştur (Badwe v.d., 2023).

Meme ve kolon kanserinin yanı sıra, Nav 1.7 ekspresyonu yapan Dunning model yüksek metastatik Mat-LyLu hücreleri ile oluşturulan prostat tümörlü Kopenhagen sıçanlarına sistemik olarak RNL uygulamasının akciğer metastazlarının sayısını önemli ölçüde azalttığı, bu anti-metastatik etkinin primer tümörlerin büyümesinde herhangi bir değişiklik olmadan meydana geldiği ve akciğerdeki metastazlarda Nav1.7 proteini eksprese eden hücre yüzdesini de inhibe ettiği tesbit edilmiştir (Bugan v.d., 2019).

İn vitro olarak metastatik potansiyeli oluşturan motilite ve invazyonun yanında, moleküler analizlerle, ELE ve GS-967'nin SCNA5 geni tarafından kodlanan Nav 1.5 protein miktarına ve SCNA5 mRNA miktarı üzerine etkileri ortaya konmuştur. Yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinin Nav 1.5 protein miktarı üzerinde 1 µM ELE, her iki ortamda da %13-15 kadar inhibisyon meydana getirmiştir. 0,1 µM GS-967'nin normoksi koşullarında %20 oranında olan inhibisyon oranı, hipoksi koşullarında artarak %28'e ulaşmıştır. Düşük metastatik MCF-7

hücrelerinin Nav 1.5 protein miktarı üzerinde düşük oranda da olsa sadece 0,01 μ M GS-967'nin inhibe edici bir etkisi görülmüştür.

Sodyum kanal blokeri TTX, MDA-MB-231 hücrelerinin SCNA5 mRNA miktarını her iki ortamda %50 nin üzerinde baskılarken, 1 μ M ELE'nin, her iki ortam koşulunda da hücrelerin SCNA5 ifadesini inhibe ettiği ve inhibisyonun hipoksik ortamda daha yüksek oranda (%34) olduğu belirlenmiştir. Diğer ajan GS-967 (0,05 μ M) sadece hipoksik ortamda hücrelerin SCNA5 ifadesini %30 oranında inhibe ederken, 0,1 μ M konsantrasyondaki GS-967 her iki ortamda da inhibisyon göstermiştir. 0,1 μ M GS-967 uygulaması ile MDA-MB-231 hücrelerinin metastatik aktivitesine paralel olarak, yüksek olan SCNA5 ifadesindeki inhibisyon hipoksik ortamda %45 oranı ile TTX'in inhibisyon oranına yaklaşmıştır.

Meme kanserinde SCNA5 geni tarafından kodlanan Nav 1.5 protein miktarı ve SCNA5 mRNA miktarı üzerine ELE ve GS-967'nin MDA-MB-231 hücrelerinde yüksek inhibisyona sebep olması, Gould ve arkadaşlarının (2018) belirttiği gibi, hücredeki Nav 1.5 ekspresyonunun MCF-7 hücrelerinin mRNA miktarından yaklaşık yedi kat daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır.

Literatürde ELE ve GS-967'nin meme kanseri hücrelerinde SCNA5 geni tarafından kodlanan Nav 1.5 protein miktarı ve SCNA5 mRNA miktarı üzerine etkilerini ortaya koyan bir çalışmaya rastlanmamakla beraber, iyon kanal blokeri olan RNL'nin etkilerini ortaya koyan iki araştırmaya ulaşılmıştır. Sprague Dawley sıçanlarında iskemi/reperfüzyon sonrası Nav 1.5 ekspresyonu üzerinde RNL'nin rolünün araştırıldığı bir çalışmada immüno blotlama sonuçları, Nav 1.5 protein düzeyinin %32 oranında azaldığını tespit edilmiştir (Wei v.d., 2016). İnsan kolon düz kaslarının uyarılabilirliğinden sorumlu olduğu düşünülen güçlü voltaja duyarlı içe doğru bir akım olduğu ve bu akımın yüksek Nav 1.5'ten kaynaklandığını gösteren çalışmada RNL tedavisi ile, Na^+ pik akımlarının azaldığı ve bağlı olarak protein ve mRNA seviyesinin de azaldığı saptanmıştır (Neshatian v.d., 2015).

Meme kanserinin antimetastatik potansiyeli üzerine antiaritmik ELE ve GS-967'nin etkilerini ilk kez araştıran bu çalışmada elde edilen veriler birbirleri ile paralellik göstermekte olup, literatürde konu ile ilgili başka bir yayın bulunmadığından, kardiyolojide benzer farmakolojik özelliğe sahip olan sodyum kanal blokeri RNL'nin kanserdeki etkilerini konu eden araştırmaların sonuçları ile karşılaştırılmış ve uyum içerisinde olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak, antiaritmik olarak sentezlenen ve VGSC'leri bloke eden bir etki mekanizmasına sahip olan ELE ve GS-967'nin yüksek metastatik MDA-MB-231 ile düşük metastatik MCF-7

meme kanseri hücreleri üzerinde Nav 1.5 VGSC yi hedef alarak ayrıntılı bir şekilde ilk kez araştırıldığı bu çalışmada; (1) ELE ve GS-967'nin diğer anti-aritmik ilaçlara kıyasla Nav1.5 VGSC'yi daha düşük dozlarda bloke ettiği (2) bu blokasyonun normoksiye oranla hipoksi koşullarında daha etkili olduğu (3) ELE'ye oranla, GS-967'nin Nav 1.5'i daha düşük konsantrasyonlarda bloke etki ettiği (4) hatta GS-967'nin bu etkisinin sodyum kanal blokeri TTX'e yakın olduğu saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçların in vivo olarak da değerlendirilmesi ile ELE ve GS-967, gelecekte kanser metastazının azaltılmasında/engellenmesinde kullanılabilme potansiyeline sahip olacaktır.



KAYNAKÇA

Abriel H. (2010). Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 48(1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.08.025>

Ahmed, M., Jalily Hasani, H., Ganesan, A., Houghton, M., & Barakat, K. (2017). Modeling the human Nav1.5 sodium channel: structural and mechanistic insights of ion permeation and drug blockade. *Drug design, development and therapy*, 11, 2301–2324. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S133944>

Alkabban FM, Ferguson T. Breast Cancer. [Updated 2022 Sep 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482286/>

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>

Antzelevitch C., Belardinelli L., Zygmunt A.C. Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties. *Circulation*. 2004;110:904–910.

Antzelevitch, C., Burashnikov, A., Sicouri, S., & Belardinelli, L. (2011). Electrophysiologic basis for the antiarrhythmic actions of ranolazine. *Heart rhythm*, 8(8), 1281–1290. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2011.03.045>

Arciero, C., Liu, Y., Gillespie, T., & Subhedar, P. (2019). Surgery and survival in patients with stage IV breast cancer. *The breast journal*, 25(4), 644–653. <https://doi.org/10.1111/tbj.13296>

Arias E, Xu J, Curtin S, Bastian B, Tejada-Vera B. Mortality profile of the non-Hispanic American Indian or Alaska Native population, 2019. *Natl Vital Stat Rep*. 2021; 70(12): 1- 27.

Arking, D. E., Pulit, S. L., Crotti, L., van der Harst, P., Munroe, P. B., Koopmann, T. T., Sotoodehnia, N., Rossin, E. J., Morley, M., Wang, X., Johnson, A. D., Lundby, A., Gudbjartsson, D. F., Noseworthy, P. A., Eijgelsheim, M., Bradford, Y., Tarasov, K. V., Dörr, M., Müller-Nurasyid, M., Lahtinen, A. M., ... Newton-Cheh, C. (2014). Genetic association study of QT interval highlights role for calcium signaling pathways in myocardial repolarization. *Nature genetics*, 46(8), 826–836. <https://doi.org/10.1038/ng.3014>

Au, T. L., Collins, G. A., Macleod, B. A., & Walker, M. J. (1983). Effects of prostaglandin E₂, propranolol and nitroglycerine with halothane, pethidine or pentobarbitone anaesthesia on arrhythmias and other responses to ligation of a coronary artery in rats. *British journal of pharmacology*, 79(4), 929–937. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1983.tb10538.x>

Autier, P., & Boniol, M. (2018). Mammography screening: A major issue in medicine. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990), 90, 34–62. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.11.002>

Awasthi, S., Grass, G. D., Torres-Roca, J., Johnstone, P. A. S., Pow-Sang, J., Dhillon, J., Park, J., Rounbehler, R. J., Davicioni, E., Hakansson, A., Liu, Y., Fink, A. K., DeRenzis, A., Creed, J. H., Poch, M., Li, R., Manley, B., Fernandez, D., Naghavi, A., Gage, K., ... Yamoah, K. (2022). Genomic Testing in Localized Prostate Cancer Can Identify Subsets of African Americans With Aggressive Disease. *Journal of the National Cancer Institute*, 114(12), 1656–1664. <https://doi.org/10.1093/jnci/djac162>

Babst, C. R., & Gilling, B. N. (1978). Bupivacaine: a review. *Anesthesia progress*, 25(3), 87–91.

Bach, K., Pensa, S., Zarocsinceva, M., Kania, K., Stockis, J., Pinaud, S., et al. (2021). Time-resolved Single-Cell Analysis of Brca1 Associated Mammary Tumourigenesis Reveals Aberrant Differentiation of Luminal Progenitors. *Nat. Commun.* 12, 1502. doi:10.1038/s41467-021-21783-3

Badwe, R. A., Parmar, V., Nair, N., Joshi, S., Hawaldar, R., Pawar, S., Kadayaprath, G., Borthakur, B. B., Rao Thammineedi, S., Pandya, S., Balasubramanian, S., Chitale, P. V., Neve, R., Harris, C., Srivastava, A., Siddique, S., Vanmali, V. J., Dewade, A., Gaikwad, V., & Gupta, S. (2023). Effect of Peritumoral Infiltration of Local Anesthetic Before Surgery on Survival in Early Breast Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 41(18), 3318–3328. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.01966>

Bagal, S. K., Brown, A. D., Cox, P. J., Omoto, K., Owen, R. M., Pryde, D. C., Sidders, B., Skerratt, S. E., Stevens, E. B., Storer, R. I., & Swain, N. A. (2013). Ion channels as therapeutic targets: a drug discovery perspective. *Journal of medicinal chemistry*, 56(3), 593–624. <https://doi.org/10.1021/jm3011433>

Bagal, S. K., Marron, B. E., Owen, R. M., Storer, R. I., & Swain, N. A. (2015). Voltage gated sodium channels as drug discovery targets. *Channels (Austin, Tex.)*, 9(6), 360–366. <https://doi.org/10.1080/19336950.2015.1079674>

Baker, E. M., Thompson, C. H., Hawkins, N. A., Wagnon, J. L., Wengert, E. R., Patel, M. K., George, A. L., Jr, Meisler, M. H., & Kearney, J. A. (2018). The novel sodium channel modulator GS-458967 (GS967) is an effective treatment in a mouse model of SCN8A encephalopathy. *Epilepsia*, 59(6), 1166–1176. <https://doi.org/10.1111/epi.14196>

Barbieri, R., Bertelli, S., Pusch, M., & Gavazzo, P. (2019). Late sodium current blocker GS967 inhibits persistent currents induced by familial hemiplegic migraine type 3 mutations of the SCN1A gene. *The journal of headache and pain*, 20(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s10194-019-1056-2>

Beatch, G. N., Abraham, S., MacLeod, B. A., Yoshida, N. R., & Walker, M. J. (1991). Antiarrhythmic properties of tedisamil (KC8857), a putative transient outward K⁺ current blocker. *British journal of pharmacology*, 102(1), 13–18. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1991.tb12124.x>

Belardinelli, L., Liu, G., Smith-Maxwell, C., Wang, W. Q., El-Bizri, N., Hirakawa, R., Karpinski, S., Li, C. H., Hu, L., Li, X. J., Crumb, W., Wu, L., Koltun, D., Zablocki, J., Yao, L., Dhalla, A. K., Rajamani, S., & Shryock, J. C. (2013). A novel, potent, and selective inhibitor of cardiac late sodium current suppresses experimental arrhythmias. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 344(1), 23–32. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.198887>

Beňačka, R., Szabóová, D., Guľašová, Z., Hertelyová, Z., & Radoňák, J. (2022). Classic and New Markers in Diagnostics and Classification of Breast Cancer. *Cancers*, 14(21), 5444. <https://doi.org/10.3390/cancers14215444>

Bhushan, A., Gonsalves, A., & Menon, J. U. (2021). Current State of Breast Cancer Diagnosis, Treatment, and Theranostics. *Pharmaceutics*, 13(5), 723. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050723>

Blackiston DJ, McLaughlin KA, Levin M. Bioelectric Controls of Cell Proliferation: Ion Channels, Membrane Voltage and the Cell Cycle. *Cell Cycle* (2009) 8:3527–36. doi: 10.4161/cc.8.21.9888

Brackenbury WJ. (2012) Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *Channels (Austin)*; 6(5):352-361.

Brackenbury, W. J., & Isom, L. L. (2011). Na Channel β Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Frontiers in pharmacology*, 2, 53. <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00053>

Brandão, R. D., Mensaert, K., López-Perolio, I., Tserpelis, D., Xenakis, M., Lattimore, V., et al. (2019). Targeted RNA-seq Successfully Identifies normal and Pathogenic Splicing Events in Breast/ovarian Cancer Susceptibility and Lynch Syndrome Genes. *Int. J. Cancer* 145, 401–414. doi:10.1002/ijc.32114

Brierley JD, Gospodararowicz MK, Wittekind C. Union for International.Cancer Control (UICC) TNM Classification of Malignant Tumours. 8th edn. Oxford, UK: Wiley Blackwell, 2017.

Brisson L, Gillet L, Calaghan S, Besson P, Le Guennec JY, et al. (2011) Na(V)1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H⁺ efflux in caveolae. *Oncogene*. 30(17):2070-6. doi:0.1038/onc.2010.574.

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>

Burgdorf, S., Porubsky, S., Marx, A., & Popovic, Z. V. (2020). Cancer Acidity and Hypertonicity Contribute to Dysfunction of Tumor-Associated Dendritic Cells: Potential Impact on Antigen Cross-Presentation Machinery. *Cancers*, 12(9), 2403. <https://doi.org/10.3390/cancers12092403>

Calatayud, J., & González, A. (2003). History of the development and evolution of local anesthesia since the coca leaf. *Anesthesiology*, 98(6), 1503–1508. <https://doi.org/10.1097/00000542-200306000-00031>

Casazza, A., Di Conza, G., Wenes, M., Finisguerra, V., Deschoemaeker, S., & Mazzone, M. (2014). Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment. *Oncogene*, 33(14), 1743–1754. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.121>

Catterall W. A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *The Journal of physiology*, 590(11), 2577–2589. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224204>

Caves, R. E., Carpenter, A., Choisy, S. C., Clennell, B., Cheng, H., McNiff, C., Mann, B., Milnes, J. T., Hancox, J. C., & James, A. F. (2020). Inhibition of voltage-gated Na⁺ currents by eleclazine in rat atrial and ventricular myocytes. *Heart rhythm O2*, 1(3), 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.hroo.2020.05.006>

Chen, J. L., Liu, S. T., Huang, S. M., & Wu, Z. F. (2022). Apoptosis, Proliferation, and Autophagy Are Involved in Local Anesthetic-Induced Cytotoxicity of Human Breast Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*, 23(24), 15455. <https://doi.org/10.3390/ijms232415455>

Chen, J., Zhang, M., Ma, Z., Yuan, D., Zhu, J., Tuo, B., Li, T., & Liu, X. (2021). Alteration and dysfunction of ion channels/transporters in a hypoxic microenvironment results in the development and progression of gastric cancer. *Cellular oncology (Dordrecht)*, 44(4), 739–749. <https://doi.org/10.1007/s13402-021-00604-1>

Chen, Z. J., & Sun, L. J. (2009). Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Molecular cell*, 33(3), 275–286. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.014>

Chernet B, Levin M. Endogenous Voltage Potentials and the Microenvironment: Bioelectric Signals That Reveal, Induce and Normalize Cancer. *J Clin Exp Oncol Suppl* (2013) 1:S1–002. doi: 10.4172/2324-9110.S1-002

Chou, C. C., Lunn, C. A., & Murgolo, N. J. (2008). KCa3.1: target and marker for cancer, autoimmune disorder and vascular inflammation?. *Expert review of molecular diagnostics*, 8(2), 179–187. <https://doi.org/10.1586/14737159.8.2.179>

Christgen, M., Cserni, G., Floris, G., Marchio, C., Djerroudi, L., Kreipe, H., Derksen, P. W. B., & Vincent-Salomon, A. (2021). Lobular Breast Cancer: Histomorphology and Different Concepts of a Special Spectrum of Tumors. *Cancers*, 13(15), 3695. <https://doi.org/10.3390/cancers13153695>

Colditz, G. A., & Bohlke, K. (2014). Priorities for the primary prevention of breast cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(3), 186–194. <https://doi.org/10.3322/caac.21225>

Cserni, G., Chmielik, E., Cserni, B., & Tot, T. (2018). The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 472(5), 697–703. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2301-9>

Curigliano G, Burstein HJ, PW E, et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol* 2017;28:1700–12.

Curtis, M. J., MacLeod, B. A., & Walker, M. J. (1984). Antiarrhythmic actions of verapamil against ischaemic arrhythmias in the rat. *British journal of pharmacology*, 83(2), 373–385. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1984.tb16497.x>

de Ruijter, T. C., Veeck, J., de Hoon, J. P., van Engeland, M., & Tjan-Heijnen, V. C. (2011). Characteristics of triple-negative breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 137(2), 183–192. <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0957-x>

Dei Tos A. P. (2013). The role of the pathologist in the decision-making process. *EJC supplements : EJC : official journal of EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer ... [et al.]*, 11(2), 23–26. <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2013.07.027>

Del Canto, I., Santamaría, L., Genovés, P., Such-Miquel, L., Arias-Mutis, O., Zarzoso, M., Soler, C., Parra, G., Tormos, Á., Alberola, A., Such, L., & Chorro, F. J. (2018). Effects of the Inhibition of Late Sodium Current by GS967 on Stretch-Induced Changes in Cardiac Electrophysiology. *Cardiovascular drugs and therapy*, 32(5), 413–425. <https://doi.org/10.1007/s10557-018-6822-x>

Dessertenne, F., Fabiato, A., & Coumel, P. (1966). Un chapitre nouveau d'électrocardiographie: les variations progressives de l'amplitude de l'électrocardiogramme [A new chapter in electrocardiography: progressive variations in the amplitude of the electrocardiogram]. *Actualites cardiologiques et angiologiques internationales*, 15(4), 241–258.

Detta, N., Frisso, G., & Salvatore, F. (2015). The multi-faceted aspects of the complex cardiac Nav1.5 protein in membrane function and pathophysiology. *Biochimica et biophysica acta*, 1854(10 Pt A), 1502–1509. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.07.009>

Di Resta, C., & Becchetti, A. (2010). Introduction to ion channels. *Advances in experimental medicine and biology*, 674, 9–21. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6066-5_2

Diss, J. K., Fraser, S. P., & Djamgoz, M. B. (2004). Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects. *European biophysics journal : EBJ*, 33(3), 180–193. <https://doi.org/10.1007/s00249-004-0389-0>

Djamgoz MBA. (2014) Biophysics of cancer: cellular excitability (‘CELEX’) hypothesis of metastasis. *J Clin Exp Oncol* . doi:10.4172/2324-9110.S1-005.

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, et al. (2014) Ranolazine inhibits NaV1.5-mediated breast cancer cell invasiveness and lung colonization. *Mol Cancer*; 13:264.

Duffy, S., Vulkan, D., Cuckle, H., Parmar, D., Sheikh, S., Smith, R., Evans, A., Blyuss, O., Johns, L., Ellis, I., Sasieni, P., Wale, C., Myles, J., & Moss, S. (2020). Annual mammographic screening to reduce breast cancer mortality in women from age 40 years: long-term follow-up of the UK Age RCT. *Health technology assessment (Winchester, England)*, 24(55), 1–24. <https://doi.org/10.3310/hta24550>

e Lera Ruiz M, Kraus RL (2015) Voltage-gated sodium channels: structure, function, pharmacology, and clinical indications. *J Med Chem* 58:7093–7118

ECIS – Avrupa Kanser Bilgi Sistemi , <https://ecis.jrc.ec.europa.eu> .

El-Bizri, N., Xie, C., Liu, L., Limberis, J., Krause, M., Hirakawa, R., ... Kahlig, K. M. (2018). Eleclazine exhibits enhanced selectivity for long QT syndrome type 3–associated late Na⁺ current. *Heart Rhythm*, 15(2), 277–286. doi:10.1016/j.hrthm.2017.09.028

Esserman L, Perou C, Cheang M, DeMichele A, Carey L, Van 't Veer L, Gray J, Petricoin E, Conway K, Hylton N, Berry D. (2009). Breast cancer molecular profiles and tumor response of neoadjuvant doxorubicin and paclitaxel: the I-SPY TRIAL (CALGB 150007/150012, ACRIN 6657) *J Clin Oncol*, 27:LBA515.

Fairhurst, C., Martin, F., Watt, I., Doran, T., Bland, M., & Brackenbury, W. J. (2016). Sodium channel-inhibiting drugs and cancer survival: protocol for a cohort study using the CPRD primary care database. *BMJ open*, 6(9), e011661. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-011661>

Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>

Fernandes S, Hoyer K, Liu G, Wang WQ, Dhalla AK, Belardinelli L et al (2014). Selective inhibition of the late sodium current has no adverse effect on electrophysiological or contractile function of the normal heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 63: 512–519.

Fischer J, Ganellin CR (2006). *Analogue-based Drug Discovery*. John Wiley & Sons. p. 460.

Fozzard, H. A., Lee, P. J., & Lipkind, G. M. (2005). Mechanism of local anesthetic drug action on voltage-gated sodium channels. *Current pharmaceutical design*, 11(21), 2671–2686. <https://doi.org/10.2174/1381612054546833>

Fraser SP, Diss JKJ, Chioni AM, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, et al. (2005) Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res*; 11 (15):5381-89.

Fraser SP, Diss JK, Lloyd LJ, Pani F, Chioni AM, George AJ, Djamgoz MB. (2004) T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na⁺ channel activity. *FEBS Lett.*;569:191–194.

Fraser SP, Salvador V, Manning EA, Mizal J, Altun S, Raza M, Berridge RJ, Djamgoz MB. (2003) Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility. *J Cell Physiol.*;195:479–487.

Freudenberg, J. A., Wang, Q., Katsumata, M., Drebin, J., Nagatomo, I., & Greene, M. I. (2009). The role of HER2 in early breast cancer metastasis and the origins of resistance to HER2-targeted therapies. *Experimental and molecular pathology*, 87(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.05.001>

Fu, X., Tan, W., Song, Q., Pei, H., & Li, J. (2022). BRCA1 and Breast Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 813457. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.813457>

Funk RH. Endogenous Electric Fields as Guiding Cue for Cell Migration. *Front Physiol* (2015) 6:143. doi: 10.3389/fphys.2015.00143

- Garcia-Elias, A., & Benito, B. (2018). Ion Channel Disorders and Sudden Cardiac Death. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 692. <https://doi.org/10.3390/ijms19030692>
- Gomis, R. R., & Gawrzak, S. (2017). Tumor cell dormancy. *Molecular oncology*, 11(1), 62–78. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.09.009>
- Grimes JA, Fraser SP, Stephens GJ, Downing JE, Laniado ME, Foster CS, Abel PD, Djamgoz MB. (1995) Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett.* ;369:290–294.
- Hallaq, H., Yang, Z., Viswanathan, P. C., Fukuda, K., Shen, W., Wang, D. W., Wells, K. S., Zhou, J., Yi, J., & Murray, K. T. (2006). Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells. *Cardiovascular research*, 72(2), 250–261. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.08.007>
- Han, W., & Lim, W. (2021). Next-Generation Sequencing-Based Biomarkers in Breast Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 1187, 323–335. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9620-6_16
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hapach, L. A., Mosier, J. A., Wang, W., & Reinhart-King, C. A. (2019). Engineered models to parse apart the metastatic cascade. *NPJ precision oncology*, 3, 20. <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0092-3>
- Heppner GH, Miller FR. The cellular basis of tumor progression. (1998) *Int Rev Cytol* ;177:1–56
- Herre, J. M., Titus, C., Oeff, M., Eldar, M., Franz, M. R., Griffin, J. C., & Scheinman, M. M. (1990). Inefficacy and proarrhythmic effects of flecainide and encainide for sustained ventricular tachycardia and ventricular fibrillation. *Annals of internal medicine*, 113(9), 671–676. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-113-9-671>
- Hill, C., & Wang, Y. (2020). The importance of epithelial-mesenchymal transition and autophagy in cancer drug resistance. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*, 3(1), 38–47. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.75>
- Hill, R. P., De Jaeger, K., Jang, A., & Cairns, R. (2001). pH, hypoxia and metastasis. *Novartis Foundation symposium*, 240, 154–168. <https://doi.org/10.1002/0470868716.ch11>

Hof, T., Chaigne, S., Récalde, A., Sallé, L., Brette, F., & Guinamard, R. (2019). Transient receptor potential channels in cardiac health and disease. *Nature reviews. Cardiology*, 16(6), 344–360. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0145-2>

Horne, J., Mansur, S., & Bao, Y. (2021). Sodium ion channels as potential therapeutic targets for cancer metastasis. *Drug discovery today*, 26(5), 1136–1147. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.01.026>

<https://www.brown.edu/academics/biomed/departments/pathology/residency/digital-pathology-library/breast/malignant-disease/tubular-carcinoma-2>

Huber, V., Camisaschi, C., Berzi, A., Ferro, S., Lugini, L., Triulzi, T., Tuccitto, A., Tagliabue, E., Castelli, C., & Rivoltini, L. (2017). Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation. *Seminars in cancer biology*, 43, 74–89. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.03.001>

Hull, J. M., & Isom, L. L. (2018). Voltage-gated sodium channel β subunits: The power outside the pore in brain development and disease. *Neuropharmacology*, 132, 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.018>

Hutchings, C. J., Colussi, P., & Clark, T. G. (2019). Ion channels as therapeutic antibody targets. *mAbs*, 11(2), 265–296. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1548232>

Jiang LH, Adinolfi E, Roger S. Editorial: Ion Channel Signalling in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. *Front Pharmacol* (2021) 12:711593. doi: 10.3389/fphar.2021.711593

Jin, L., Han, B., Siegel, E., Cui, Y., Giuliano, A., & Cui, X. (2018). Breast cancer lung metastasis: Molecular biology and therapeutic implications. *Cancer biology & therapy*, 19(10), 858–868. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1456599>

Joseph, J., Shiozawa, Y., Jung, Y., Kim, J. K., Pedersen, E., Mishra, A., Zalucha, J. L., Wang, J., Keller, E. T., Pienta, K. J., & Taichman, R. S. (2012). Disseminated prostate cancer cells can instruct hematopoietic stem and progenitor cells to regulate bone phenotype. *Molecular cancer research : MCR*, 10(3), 282–292. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0404>

Juwle A, Saranath D. BRCA1/BRCA2 gene mutations/SNPs and BRCA1 haplotypes in early-onset breast cancer patients of Indian ethnicity. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 2012;29(5):3272–81.

- 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>
- Kay A. R. (2017). How Cells Can Control Their Size by Pumping Ions. *Frontiers in cell and developmental biology*, 5, 41. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00041>
- Kim J. B. (2014). Channelopathies. *Korean journal of pediatrics*, 57(1), 1–18. <https://doi.org/10.3345/kjp.2014.57.1.1>
- King GS, Goyal A, Grigorova Y, et al. Antiarrhythmic Medications. [Updated 2022 Feb 16]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.
- Kito, K., Maeda, T., Ninomiya, K., Sugita, A., Sagawa, T., Matsuoka, K., Kinoshita, K., Hyodo, N., Morita, N., & Furuya, K. (2014). HER2-Positive Metaplastic Spindle Cell Carcinoma Associated with Synchronous Bilateral Apocrine Carcinoma of the Breast. *Case reports in pathology*, 2014, 310829. <https://doi.org/10.1155/2014/310829>
- Klein, C. A. Framework models of tumor dormancy from patient-derived observations. (2010). *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 42–49.
- Klein, C. A. Parallel progression of primary tumours and metastases. (2009). *Nature Rev. Cancer* 9, 302–312.
- LaBoy C, Siziopikou KP. Mucinous. *PathologyOutlines.com* website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/breastmalignantmucinous.html>. Accessed October 11th, 2022.
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168(4), 670–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>
- Lang, F., & Stournaras, C. (2014). Ion channels in cancer: future perspectives and clinical potential. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1638), 20130108. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0108>
- Laniado, M. E., Lalani, E. N., Fraser, S. P., Grimes, J. A., Bhangal, G., Djamgoz, M. B., & Abel, P. D. (1997). Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *The American journal of pathology*, 150(4), 1213–1221.

Lee K. S. (1992). Ibutilide, a new compound with potent class III antiarrhythmic activity, activates a slow inward Na⁺ current in guinea pig ventricular cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 262(1), 99–108.

Lee P, Chandel NS, Simon MC. Cellular Adaptation to Hypoxia through Hypoxia Inducible Factors and beyond. *Nat Rev Mol Cel Biol* (2020) 21:268–83. 10.1038/s41580-020-0227-y

Levin M, Selberg J, Rolandi M. Endogenous Bioelectrics in Development, Cancer, and Regeneration: Drugs and Bioelectronic Devices as Electroceuticals for Regenerative Medicine. *iScience* (2019) 22:519–33. doi: 10.1016/j.isci.2019.11.023

Levin M. Molecular Bioelectricity: How Endogenous Voltage Potentials Control Cell Behavior and Instruct Pattern Regulation In Vivo. *Mol Biol Cell* (2014) 25:3835–50. doi: 10.1091/mbc.E13-12-0708

Lévy, S., & Azoulay, S. (1994). Stories about the origin of quinquina and quinidine. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 5(7), 635–636. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.1994.tb01304.x>

Li JJX, Tse GM. Neuroendocrine carcinoma (NEC). *PathologyOutlines.com* website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/breastNEC.html>. Accessed October 11th, 2022.

Li, P., Tian, X., Wang, G., Jiang, E., Li, Y., & Hao, G. (2023). Acute osimertinib exposure induces electrocardiac changes by synchronously inhibiting the currents of cardiac ion channels. *Frontiers in pharmacology*, 14, 1177003. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1177003>

Litton, J. K., Burstein, H. J., & Turner, N. C. (2019). Molecular Testing in Breast Cancer. *American Society of Clinical Oncology educational book*. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting, 39, e1–e7. https://doi.org/10.1200/EDBK_237715

Liu, B., Zhu, L., Zou, J., Chen, H. S., Miller, K. D., Jemal, A., Siegel, R. L., & Feuer, E. J. (2021). Updated Methodology for Projecting U.S.- and State-Level Cancer Counts for the Current Calendar Year: Part I: Spatio-temporal Modeling for Cancer Incidence. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research*, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 30(9), 1620–1626. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-20-1727>

Lobikin M, Chernet B, Lobo D, Levin M. Resting Potential, Oncogene-Induced Tumorigenesis, and Metastasis: The Bioelectric Basis of Cancer In Vivo. *Phys Biol* (2012) 9:65002. doi: 10.1088/1478-3975/9/6/065002

Lopez-Charcas, O., Poisson, L., Benouna, O., Lemoine, R., Chadet, S., Pétereau, A., Lahlou, W., Guyétant, S., Ouaiissi, M., Pukkanasut, P., Dutta, S., Velu, S. E., Besson, P., Moussata, D., & Roger, S. (2022). Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5 Controls NHE-1-Dependent Invasive Properties in Colon Cancer Cells. *Cancers*, 15(1), 46. <https://doi.org/10.3390/cancers15010046>

Lovejoy, L. A., Shriver, C. D., Haricharan, S., & Ellsworth, R. E. (2023). Survival Disparities in US Black Compared to White Women with Hormone Receptor Positive-HER2 Negative Breast Cancer. *International journal of environmental research and public health*, 20(4), 2903. <https://doi.org/10.3390/ijerph20042903>

Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers*, 13(17), 4287. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>

Luo, Q., Wu, T., Wu, W., Chen, G., Luo, X., Jiang, L., Tao, H., Rong, M., Kang, S., & Deng, M. (2020). The Functional Role of Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5 in Metastatic Breast Cancer. *Frontiers in pharmacology*, 11, 1111. Makki J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical medicine insights. Pathology*, 8, 23–31. <https://doi.org/10.4137/CPath.S31563>

Magheru, C., Magheru, S., Coltau, M., Hoza, A., Moldovan, C., Sachelarie, L., Gradinaru, I., Hurjui, L. L., Marc, F., & Farcas, D. M. (2022). Antiepileptic Drugs and Their Dual Mechanism of Action on Carbonic Anhydrase. *Journal of clinical medicine*, 11(9), 2614. <https://doi.org/10.3390/jcm11092614>

Malcolm AD, David GK. (1987) Quinidine in cardiology. *Acta Leiden*; 55: 87–98.

Mao W, Zhang J, Körner H, Yong J, Ying S. (2019) The emerging role of voltage-gated sodium channels in tumor biology. *Front Oncol*; 9: 124.

Marino, N., Woditschka, S., Reed, L. T., Nakayama, J., Mayer, M., Wetzel, M., & Steeg, P. S. (2013). Breast cancer metastasis: issues for the personalization of its prevention and treatment.

The American journal of pathology, 183(4), 1084–1095.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.06.012>

McCaig CD, Song B, Rajnicek AM. Electrical Dimensions in Cell Science. *J Cell Sci* (2009) 122:4267–76. doi: 10.1242/jcs.023564

Medina, Mauricio A et al. “Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies.” *International journal of environmental research and public health* vol. 17,6 2078. 20 Mar. 2020, doi:10.3390/ijerph17062078

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.

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.

Messner, D. J., & Catterall, W. A. (1985). The sodium channel from rat brain. Separation and characterization of subunits. *The Journal of biological chemistry*, 260(19), 10597–10604.

Miller, K. D., Siegel, R. L., Liu, B., Zhu, L., Zou, J., Jemal, A., Feuer, E. J., & Chen, H. S. (2021). Updated Methodology for Projecting U.S.- and State-Level Cancer Counts for the Current Calendar Year: Part II: Evaluation of Incidence and Mortality Projection Methods. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 30(11), 1993–2000. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-20-1780>

Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., & Azab, A. K. (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckland, N.Z.)*, 3, 83–92. <https://doi.org/10.2147/HP.S93413>

Nagatomo, T., January, C. T., & Makielski, J. C. (2000). Preferential block of late sodium current in the LQT3 DeltaKPQ mutant by the class I(C) antiarrhythmic flecainide. *Molecular pharmacology*, 57(1), 101–107.

Nattel S. (1991). Antiarrhythmic drug classifications. A critical appraisal of their history, present status, and clinical relevance. *Drugs*, 41(5), 672–701.
<https://doi.org/10.2165/00003495-199141050-00002>

Nelson M, Yang M, Dowle AA, Thomas JR, Brackenbury WJ. (2015) The sodium channel-blocking antiepileptic drug phenytoin inhibits breast tumour growth and metastasis. *Mol Cancer*; 14:13.

Neophytou, C. M., Kyriakou, T. C., & Papageorgis, P. (2019). Mechanisms of Metastatic Tumor Dormancy and Implications for Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*, 20(24), 6158. <https://doi.org/10.3390/ijms20246158>

Neshatian, L., Strege, P. R., Rhee, P. L., Kraichely, R. E., Mazzone, A., Bernard, C. E., Cima, R. R., Larson, D. W., Dozois, E. J., Kline, C. F., Mohler, P. J., Beyder, A., & Farrugia, G. (2015). Ranolazine inhibits voltage-gated mechanosensitive sodium channels in human colon circular smooth muscle cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 309(6), G506–G512. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00051.2015>

Nguyen, P. T., DeMarco, K. R., Vorobyov, I., Clancy, C. E., & Yarov-Yarovoy, V. (2019). Structural basis for antiarrhythmic drug interactions with the human cardiac sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(8), 2945–2954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817446116>

Northridge, M. E., Rhoads, G. G., Wartenberg, D., & Koffman, D. (1997). The importance of histologic type on breast cancer survival. *Journal of clinical epidemiology*, 50(3), 283–290. [https://doi.org/10.1016/s0895-4356\(96\)00366-6](https://doi.org/10.1016/s0895-4356(96)00366-6)

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>

Ozmen, V., Ozcinar, B., Karanlik, H., Cabioglu, N., Tukenmez, M., Disci, R., Ozmen, T., Igci, A., Muslumanoglu, M., Kecer, M., & Soran, A. (2009). Breast cancer risk factors in Turkish women--a University Hospital based nested case control study. *World journal of surgical oncology*, 7, 37. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-7-37>

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>

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., Newcomb, P. A., Hampton, J. M., Trentham-Dietz, A., Titus, L. J., Egan, K. M., Baron, J. A., & Willett, W. C. (2016). Cigarette Smoking Before and After Breast Cancer Diagnosis: Mortality From Breast Cancer and Smoking-Related Diseases. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(12), 1315–1322. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.9328>

Payne SL, Levin M, Oudin MJ. Bioelectric Control of Metastasis in Solid Tumors. *Bioelectricity* (2019) 1:114–30. doi: 10.1089/bioe.2019.0013

PDQ Adult Treatment Editorial Board. Breast Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version. 2023 Aug 23. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-.

Pedersen, S. F., & Stock, C. (2013). Ion channels and transporters in cancer: pathophysiology, regulation, and clinical potential. *Cancer research*, 73(6), 1658–1661. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4188>

Peiró CHF, Encina JA, Perez MM, Aquino GSA, Veiga GL, Fonseca F, Alves BCA. (2019;)The role of hypoxia-induced factor 1 α in breast cancer. *J Cancer Metastasis Treat* 5:49. <http://dx.doi.org/10.20517/2394-4722.2018.109>

Pfeiffer, R. M., Webb-Vargas, Y., Wheeler, W., & Gail, M. H. (2018). Proportion of U.S. Trends in Breast Cancer Incidence Attributable to Long-term Changes in Risk Factor Distributions. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 27(10), 1214–1222. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-18-0098>

Pinder S. E. (2010). Ductal carcinoma in situ (DCIS): pathological features, differential diagnosis, prognostic factors and specimen evaluation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 23 Suppl 2, S8–S13. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.40>

Potet, F., Egecioglu, D. E., Burridge, P. W., & George, A. L., Jr (2020). GS-967 and Eleclazine Block Sodium Channels in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Molecular pharmacology*, 98(5), 540–547. <https://doi.org/10.1124/molpharm.120.000048>

- Potet, F., Vanoye, C. G., & George, A. L., Jr (2016). Use-Dependent Block of Human Cardiac Sodium Channels by GS967. *Molecular pharmacology*, 90(1), 52–60. <https://doi.org/10.1124/mol.116.103358>
- 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, Pineda E, Adamo B, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast* 2015;24 Suppl 2:S26–S35.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2018). Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies?. *Physiological reviews*, 98(2), 559–621. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2016>
- Pugh CW, Ratcliffe PJ. New Horizons in Hypoxia Signaling Pathways. *Exp Cel Res* (2017) 356:116–21. [10.1016/j.yexcr.2017.03.008](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.008)
- Ranade, S. S., Syeda, R., & Patapoutian, A. (2015). Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron*, 87(6), 1162–1179. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.032>
- Redig, A. J., & McAllister, S. S. (2013). Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *Journal of internal medicine*, 274(2), 113–126. <https://doi.org/10.1111/joim.12084>
- Rivard AB, Galarza-Paez L, Peterson DC. Anatomy, Thorax, Breast. [Updated 2023 Jul 17]. In: StatPearls [Internet].
- Roberson, D. P., Binshtok, A. M., Blasl, F., Bean, B. P., & Woolf, C. J. (2011). Targeting of sodium channel blockers into nociceptors to produce long-duration analgesia: a systematic study and review. *British journal of pharmacology*, 164(1), 48–58. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01391.x>
- Roden D. M. (2014). Pharmacology and Toxicology of Nav1.5-Class 1 anti-arrhythmic drugs. *Cardiac electrophysiology clinics*, 6(4), 695–704. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2014.07.003>
- Roden D. M. (2016). Pharmacogenetics of Potassium Channel Blockers. *Cardiac electrophysiology clinics*, 8(2), 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2016.02.003>

- Roden, D. M., Johnson, J. A., Kimmel, S. E., Krauss, R. M., Medina, M. W., Shuldiner, A., & Wilke, R. A. (2011). Cardiovascular pharmacogenomics. *Circulation research*, 109(7), 807–820. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.230995>
- Roger, S., Besson, P., & Le Guennec, J. Y. (2003). Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochimica et biophysica acta*, 1616(2), 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.07.001>
- Rosendo-Pineda, M. J., Moreno, C. M., & Vaca, L. (2020). Role of ion channels during cell division. *Cell calcium*, 91, 102258. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102258>
- Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, Hess KR, Stec J, Ayers M, Wagner P, Morandi P, Fan C, Rabiul I, Ross JS, Hortobagyi GN, Puztai L. (2005). Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res.*, 11:5678–5685. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2421.
- Ruetsch, Y. A., Böni, T., & Borgeat, A. (2001). From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs. *Current topics in medicinal chemistry*, 1(3), 175–182. <https://doi.org/10.2174/1568026013395335>
- Russo J, Balogh G A, Chen J. et al. The concept of stem cell in the mammary gland and its implication in morphogenesis, cancer and prevention. *Front Biosci.* 2006;1:151–172.
- Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., & Keating, M. T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell*, 81(2), 299–307. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90340-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90340-2)
- Satin, J., Kyle, J. W., Chen, M., Bell, P., Cribbs, L. L., Fozzard, H. A., & Rogart, R. B. (1992). A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5060), 1202–1205. <https://doi.org/10.1126/science.256.5060.1202>
- Sattiraju, S., Reyes, S., Kane, G. C., & Terzic, A. (2008). K(ATP) channel pharmacogenomics: from bench to bedside. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 83(2), 354–357. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100378>
- Scully, O. J., Bay, B. H., Yip, G., & Yu, Y. (2012). Breast cancer metastasis. *Cancer genomics & proteomics*, 9(5), 311–320.

Sebestyén, A., Kopper, L., Dankó, T., & Tímár, J. (2021). Hypoxia Signaling in Cancer: From Basics to Clinical Practice. *Pathology oncology research : POR*, 27, 1609802. <https://doi.org/10.3389/pore.2021.1609802>

Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* (2012) 148(3):399–408. [10.1016/j.cell.2012.01.021](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021)

Severino, P., D'Amato, A., Pucci, M., Infusino, F., Adamo, F., Birtolo, L. I., Netti, L., Montefusco, G., Chimenti, C., Lavalle, C., Maestrini, V., Mancone, M., Chilian, W. M., & Fedele, F. (2020). Ischemic Heart Disease Pathophysiology Paradigms Overview: From Plaque Activation to Microvascular Dysfunction. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 8118. <https://doi.org/10.3390/ijms21218118>

Shan, B., Dong, M., Tang, H., Wang, N., Zhang, J., Yan, C., Jiao, X., Zhang, H., & Wang, C. (2014). Voltage-gated sodium channels were differentially expressed in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia and prostate cancer cells. *Oncology letters*, 8(1), 345–350. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2110>

Shea, E., Koh, V., & Tan, P. H. (2020). Invasive breast cancer: Current perspectives and emerging views. *Pathology international*, 70(5), 242–252. <https://doi.org/10.1111/pin.12910>

Sherman R, Firth R, Kahl A, et al. *Cancer in North America: 2015-2019. Volume Two: Registry-Specific Cancer Incidence in the United States and Canada* North American Association of Central Cancer Registries, Inc.; 2022.

Sheth, M., & Esfandiari, L. (2022). Bioelectric Dysregulation in Cancer Initiation, Promotion, and Progression. *Frontiers in oncology*, 12, 846917. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.846917>

Shien, T., & Iwata, H. (2020). Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. *Japanese journal of clinical oncology*, 50(3), 225–229. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyz213>

Shien, T., & Iwata, H. (2020). Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. *Japanese journal of clinical oncology*, 50(3), 225–229. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyz213>

Shirazi, F. H., Zarghi, A., Ashtarinezhad, A., Kobarfard, F., Nakhjavani, M., Anjidani, N., ... & Zebardast, T. (2011). Remarks in successful cellular investigations for fighting breast cancer using novel synthetic compounds (pp. 85-102). Croatia: INTECH Open Access Publisher.

Puhalla, S., Bhattacharya, S., & Davidson, N. E. (2012). Hormonal therapy in breast cancer: a model disease for the personalization of cancer care. *Molecular oncology*, 6(2), 222–236. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.02.003>

Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: a cancer journal for clinicians*, 73(1), 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>

Silver BB, Nelson CM. The Bioelectric Code: Reprogramming Cancer and Aging From the Interface of Mechanical and Chemical Microenvironments. *Front Cell Dev Biol* (2018) 6:21. doi: 10.3389/fcell.2018.00021

Singh, B. N., & Williams, E. M. (1970). Local anaesthetic and anti-arrhythmic actions of alprenolol relative to its effect on intracellular potentials and other properties of isolated cardiac muscle. *British journal of pharmacology*, 38(4), 749–757. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1970.tb09884.x>

Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JGM, Foekens JA, Martens JWM. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res.* 2008;68:3108–3114. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5644.

Sonnenschein C, Soto AM. Theories of Carcinogenesis: An Emerging Perspective. *Semin Cancer Biol* (2008) 18:372–7. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.03.012

Sonnenschein C, Soto AM. Theories of Carcinogenesis: An Emerging Perspective. *Semin Cancer Biol* (2008) 18:372–7. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.03.012

Sosa, M. S., Bragado, P., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2014). Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nature Reviews Cancer*, 14(9), 611–622. doi:10.1038/nrc3793

Stapleton MP (1997). "Sir James Black and propranolol. The role of the basic sciences in the history of cardiovascular pharmacology". *Texas Heart Institute Journal*. 24 (4): 336–42.

Sturgill, E. G., Misch, A., Lachs, R., Jones, C. C., Schlauch, D., Jones, S. F., Shastry, M., Yardley, D. A., Burris, H. A., 3rd, Spigel, D. R., Hamilton, E. P., & McKenzie, A. J. (2021). Next-Generation Sequencing of Patients With Breast Cancer in Community Oncology Clinics. *JCO precision oncology*, 5, 1297–1311. <https://doi.org/10.1200/PO.20.00469>

- Subramanyam, P., & Colecraft, H. M. (2015). Ion channel engineering: perspectives and strategies. *Journal of molecular biology*, 427(1), 190–204. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.09.001>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality
- Sung, H., Siegel, R. L., Rosenberg, P. S., & Jemal, A. (2019). Emerging cancer trends among young adults in the USA: analysis of a population-based cancer registry. *The Lancet. Public health*, 4(3), e137–e147. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(18\)30267-6](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(18)30267-6)
- Tang P, Tse GM. Immunohistochemical surrogates for molecular classification of breast carcinoma: a 2015 update. *Arch Pathol Lab Med* 2016;140(8):806–814.
- Tikhonov, D. B., & Zhorov, B. S. (2017). Mechanism of sodium channel block by local anesthetics, antiarrhythmics, and anticonvulsants. *The Journal of general physiology*, 149(4), 465–481. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611668>
- Timour, Q., Freysz, M., Couzon, P., Loufoua, J., Bertrix, L., Gerentes, I., & Faucon, G. (1990). Possible role of drug interactions in bupivacaine-induced problems related to intraventricular conduction disorders. *Regional anesthesia*, 15(4), 180–185.
- Tozbikian G. DCIS. *PathologyOutlines.com* website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/breastmalignantdcis.html>. Accessed October 11th, 2022.
- Tran, B., & Bedard, P. L. (2011). Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast cancer research : BCR*, 13(6), 221. <https://doi.org/10.1186/bcr2904>
- Trenor, B., Cardona, K., Saiz, J., Noble, D., & Giles, W. (2017). Cardiac action potential repolarization revisited: early repolarization shows all-or-none behaviour. *The Journal of physiology*, 595(21), 6599–6612. <https://doi.org/10.1113/JP273651>
- Trevisi, E., La Salvia, A., Daniele, L., Brizzi, M. P., De Rosa, G., Scagliotti, G. V., & Di Maio, M. (2020). Neuroendocrine breast carcinoma: a rare but challenging entity. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 37(8), 70. <https://doi.org/10.1007/s12032-020-01396-4>
- Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275–292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>

Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275–292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>

Valencia, O. M., Samuel, S. E., Viscusi, R. K., Riall, T. S., Neumayer, L. A., & Aziz, H. (2017). The Role of Genetic Testing in Patients With Breast Cancer: A Review. *JAMA surgery*, 152(6), 589–594. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2017.0552>

van Bemmelen, M. X., Rougier, J. S., Gavillet, B., Apothéloz, F., Daidié, D., Tateyama, M., Rivolta, I., Thomas, M. A., Kass, R. S., Staub, O., & Abriel, H. (2004). Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circulation research*, 95(3), 284–291. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000136816.05109.89>

van der Vring JA, Daniëls MC, Holwerda NJ, Withagen PJ, Schelling A, Cleophas TJ, Hendriks MG (June 1999). "Combination of calcium channel blockers and beta blockers for patients with exercise-induced angina pectoris: a double-blind parallel-group comparison of different classes of calcium channel blockers. The Netherlands Working Group on Cardiovascular Research (WCN)". *Angiology*. 50 (6): 447–54. doi:10.1177/000331979905000602

van der Werf, C., van Langen, I. M., & Wilde, A. A. (2010). Sudden death in the young: what do we know about it and how to prevent?. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*, 3(1), 96–104. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.109.877142>

Van Keymeulen A, Rocha A S, Ousset M. et al. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;479:189–193

van Zijl, F., Krupitza, G., & Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation research*, 728(1-2), 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.05.002>

Vardanyan, R., & Hruby, V. (2016). Analgesics. *Synthesis of Best-Seller Drugs*, 15–64. doi:10.1016/b978-0-12-411492-0.00003-1

Veronesi, U., Zurrida, 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>

Vickery J, Biernacka A. Lobular carcinoma in situ (LCIS) classic. *PathologyOutlines.com* website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/breastmalignantlcis.html>. Accessed September 19th, 2022.

- Wang, G., Yu, J., Du, H. et al. VGSC-DB: an online database of voltage-gated sodium channels. *J Cheminform* 14, 75 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13321-022-00655-y>
- Wang, J., Ou, S. W., & Wang, Y. J. (2017). Distribution and function of voltage-gated sodium channels in the nervous system. *Channels (Austin, Tex.)*, 11(6), 534–554. <https://doi.org/10.1080/19336950.2017.1380758>
- Wang, T., Roden, D. M., Wolfenden, H. T., Woosley, R. L., Wood, A. J., & Wilkinson, G. R. (1984). Influence of genetic polymorphism on the metabolism and disposition of encainide in man. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 228(3), 605–611.
- Wang, Z. H., Shen, B., Yao, H. L., Jia, Y. C., Ren, J., Feng, Y. J., & Wang, Y. Z. (2007). Blockage of intermediate-conductance-Ca(2+) -activated K(+) channels inhibits progression of human endometrial cancer. *Oncogene*, 26(35), 5107–5114. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210308>
- Welch DR. Defining a cancer metastasis In: Research AAFc, editor. AACR Education Book 2006. (2006) Philadelphia: AACR;.p 111–5.
- Welch, D. R., & Hurst, D. R. (2019). Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer research*, 79(12), 3011–3027. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0458>
- Wen, H. Y., & Brogi, E. (2018). Lobular Carcinoma In Situ. *Surgical pathology clinics*, 11(1), 123–145. <https://doi.org/10.1016/j.path.2017.09.009>
- Wiseman B S, Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Sci Total Environ*. 2002;296(5570):1046–1049.
- Wood, J. N., & Baker, M. (2001). Voltage-gated sodium channels. *Current opinion in pharmacology*, 1(1), 17–21. [https://doi.org/10.1016/s1471-4892\(01\)00007-8](https://doi.org/10.1016/s1471-4892(01)00007-8)
- Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.
- Xu L, Ding X, Wang T, Mou S, Sun H, Hou T (2019) Voltage-gated sodium channels: structures, functions, and molecular modeling. *Drug Discov Today* 24:1389–1397
- Yang, M., & Brackenbury, W. J. (2013). Membrane potential and cancer progression. *Frontiers in physiology*, 4, 185. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00185>

Yu, F. H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. A., & Catterall, W. A. (2005). Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacological reviews*, 57(4), 387–395. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.13>

Zablocki, J. A., Elzein, E., Li, X., Koltun, D. O., Parkhill, E. Q., Kobayashi, T., ... Desai, M. C. (2016). Discovery of Dihydrobenzoxazepinone (GS-6615) Late Sodium Current Inhibitor (Late INai), a Phase II Agent with Demonstrated Preclinical Anti-Ischemic and Antiarrhythmic Properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(19), 9005–9017. [doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00939](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00939)

Zaza, A., Belardinelli, L., & Shryock, J. C. (2008). Pathophysiology and pharmacology of the cardiac "late sodium current". *Pharmacology & therapeutics*, 119(3), 326–339. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.06.001>

Zhang H. Metaplastic. PathologyOutlines.com website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/breastmalignantmetaplastic.html>. Accessed September 19th, 2022.

Zhao H. (2021). The prognosis of invasive ductal carcinoma, lobular carcinoma and mixed ductal and lobular carcinoma according to molecular subtypes of the breast. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*, 28(1), 187–195. <https://doi.org/10.1007/s12282-020-01146-4>

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>

Zhu, W., Wang, W., Angsutararux, P., Mellor, R. L., Isom, L. L., Nerbonne, J. M., & Silva, J. R. (2021). Modulation of the effects of class Ib antiarrhythmics on cardiac NaV1.5-encoded channels by accessory NaVβ subunits. *JCI insight*, 6(15), e143092. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.143092>

