

T.C
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**Tirozin Kinaz İnhibitörü Erlotinib'in Küçük Hücreli Olmayan
Akciğer Kanseri Hücreleri Üzerinde Değerlendirilmesi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SEVGİ ÖZTÜRK
1900006000

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

NİSAN 2024

T.C
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**Tirozin Kinaz İnhibitörü Erlotinib'in Küçük Hücreli Olmayan
Akciğer Kanseri Hücreleri Üzerinde Değerlendirilmesi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SEVGİ ÖZTÜRK
1900006000

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seyhan ALTUN

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Engin KAPTAN

Dr. Öğr. Üyesi Özge RENCÜZOĞULLARI

NİSAN 2024

ÖNSÖZ

Akademik olarak ilerleme hayallerime adım attığım yüksek lisans tez dönemim boyunca değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, çalışmam boyunca yardımlarını benden asla esirgemeyen, sabırla ve ihtiyatla her sorumu yanıtlayan tez danışmanım saygıdeğer Prof. Dr. Seyhan ALTUN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

H460 hücre hattımı bulmamda bana yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Nihal KARAKAŞ' a, Dr. Muradiye ACAR' a ve Dr. Bircan Dinç'e sonsuz teşekkür ederim.

Ekip ruhu ve çalışma aşkıyla laboratuvarında birlikte çalıştığım arkadaşlarım; beni hiç yalnız bırakmayan çok değerli insan Didem SEZGİN başta olmak üzere, Mine Yıldırım BORUCU' ya, Ebrar KARAKAYA'ya ve İlknur SÜTCÜ'ye de ayrıca teşekkür ederim.

Benden maddi ve manevi desteğini asla esirgemeyen biricik eşim Kemal Onur ÖZTÜRK'e ve hayattaki en değerlim olan minik kızım Miray Sare ÖZTÜRK' e de her daim yanımda oldukları için teşekkürü bir borç bilirim.

Hedeflerime ulaşmam konusunda bana doğduğum andan itibaren destek olan, beni cesaretlendiren, bulunduğum konuma gelmemde önemli görevler üstlenen, her zaman yanımda olan ve olacak olan çok değerli canım annem Meryem BALA'ya, canım babam Mehmet BALA'ya, canım kardeşlerim Oktay BALA ve Recep Tayyip BALA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak işyerinde benim kahrımı çeken dostlarım Yeşim KELEŞ YÜKSEL'e, Hatice YURTBEĞENDİ'ye, Enes KÜÇÜKAYTEKİN'e ve Kübra TÜREGÜN'e teşekkür ederim.

NİSAN, 2024

SEVGİ ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	iii
KISALTMALAR.....	vi
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Kanser Hücresinin Özellikleri.....	4
2.3. Akciğer Kanseri.....	5
2.3.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi.....	6
2.3.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi.....	7
2.3.3. Akciğer Kanserinin Histopatolojisi	8
2.3.4. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)	9
2.3.5. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK).....	9
2.4. Akciğer Kanseri ile İlişkili Genler ve Mutasyonlar.....	9
2.5. Akciğer Kanseri Evrelemesi	11
2.6. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavisi.....	12
2.7. İyon Kanalları.....	13
2.7.1. Ligand Kapılı İyon Kanalları	15
2.7.2. Voltaj Kapılı İyon Kanalları	16
2.8. VGSC ve Kanser.....	21
2.9. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)	22
2.9.1. EGFR'nin Alt Yolakları	25
2.9.2. EGFR Tirozin Kinaz İnhibitörleri	27
2.10. Erlotinib	28
3. MATERYAL ve METOD	31
3.1. Hücre Kültürü	31

3.2. Hücre Dondurma.....	32
3.3. Farmakolojik Ajanların Hazırlanması.....	32
3.4. Hücre Büyüme Analizi.....	32
3.5. Toksisite.....	33
3.6. Hücre Proliferasyonu	33
3.7. Koloni Oluşum Analizi.....	34
3.8. Apoptotik Hücre Ölümü	34
3.9. Lateral Hareket (Migrasyon/Motilite).....	35
3.10. Protein İzolasyonu	35
3.11. QRT PCR.....	35
3.12. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38
4.1. Hücrede Büyüme	38
4.2. Toksisite.....	39
4.3. Hücre Proliferasyonu	40
4.4. Koloni Oluşumu.....	43
4.5. Apoptotik Hücre Ölümü	44
4.6. Lateral Motilite (Migrasyon/Motilite)	46
4.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	49
5.TARTIŞMA	51
6. REFERANSLAR.....	57

KISALTMALAR

A549	Akciğer Kanseri Hücre Hattı
ALK	Anaplastik Lenfoma Kinaz
CRAB	Cancer Research and Bio Statistics
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Ethylen Diamine Tetra Asetik Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FBS	Fetal Bovine Serum
GABA	γ -aminobutirik asit
GLOBOCAN	The Global Cancer Observation
GTPaz	Trimerik guanozin trifosfat
H460	Akciğer Kanseri Hücre Hattı
IASLC	International Association for The Study of Lung Cancer
INa(P)	Israrlı akım
INa(T)	Geçici akım
IUAC	International Union Against Cancer
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (NSLC)
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (NSCLC)
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
KRAS	K-Ras proteini kodlayan gen
LCA	Leber Konjenital Amorozisi
LCC	Büyük Hücreli Karsinom
LCFA	Amerika Akciğer Kanseri Vakfı

LKB1	Liver Kinase B1
SCC	Squamos Hücre Karsinomu
TK	Tirozin Kinaz
TKİ	Tirozin Kinaz İnhibitörü
TNM	Kanser Evreleme Sistemi
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VGCaC	Voltaj kapılı kalsiyum kanalı
VGIC	Voltaj kapılı iyon kanalı
VGKC	Voltaj kapılı potasyum kanalı
WHO	Dünya Sağlık rgt
$\Delta\Delta$CT	Real Time PCR CT Değeri

SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

$\pm$ SE	Standart hata
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nM/nm	Nanomolar

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kanser hücresinin on temel özelliği	4
Şekil 2 . Epidemiyolojik olarak erkeklerdeki ilk on kanserin oranları	6
Şekil 3. Epidemiyolojik olarak kadınlardaki ilk on kanserin oranları	7
Şekil 4. Akciğer kanser türleri.....	8
Şekil 5. Genler ve alakalı oldukları mutasyonlar	10
Şekil 6. Farklı tip iyon kanalları.....	15
Şekil 7. Ligand kapılı iyon kanalı çeşitleri	16
Şekil 8. İlgili protein ve voltaj kapılı kanallar arası moleküler ilişki	17
Şekil 9. Voltaj kapılı sodyum kanalı (VGSC)	19
Şekil 10. EGFR'nin yapısal şeması.....	23
Şekil 11. EGFR ailesine ait heterodimerizasyon ve homodimerizasyon şeması	24
Şekil 12. Epidermal büyüme faktörü reseptörünün dimerizasyonu.....	24
Şekil 13. Adaptör proteinlerinin bağlandıkları bölgeler	25
Şekil 14. Epidermal büyüme faktörü reseptör yolları.....	26
Şekil 15. Akciğer kanserinde görülen epidermal büyüme faktörü reseptör mutasyonları.....	27
Şekil 16. A) İnaktif EGFR ve B) Aktif EGFR'ye ait konformasyonel gösterim.....	28
Şekil 17. Erlotinib'in kimyasal formülü.....	28
Şekil 3.1. Düşük metastatik A549 (A) ve yüksek metastatik H460 (B) akciğer kanseri hücreleri (10x).....	31
Şekil 4.1. Yüksek metastatik H460 hücrelerinin 24. ve 48. saatlerde zamana bağlı absorbanısı.....	38
Şekil 4.2. Düşük metastatik A549 hücrelerinin 24. ve 48. saatlerde zamana bağlı absorbanısı	39
Şekil 4.3. Erlotinib'in H460 hücreleri üzerindeki toksik etkisi.....	40
Şekil 4.4. Erlotinib'in A549 hücreleri üzerindeki toksik etkisi.....	40
Şekil 4.5. Erlotinib'in H460 hücre proliferasyonu üzerinde 24. saatteki etkisi.....	41
Şekil 4.6. Erlotinib'in H460 hücre proliferasyonu üzerinde 48. saatteki etkisi.....	41

Şekil 4.7. Erlotinib'in A549 hücre proliferasyonu üzerinde 24. saatteki etkisi	42
Şekil 4.8. Erlotinib'in A549 hücre proliferasyonu üzerinde 48. saatteki etkisi (*P <0.05)	42
Şekil 4.9. Erlotinib'in H460 hücrelerinin koloni yüzdesi üzerine etkisi	43
Şekil 4.10. Erlotinib'in A549 hücrelerinin koloni yüzdesi üzerine etkisi	44
Şekil 4.11. Erlotinib'in H460 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi	45
Şekil 4.12. Erlotinib'in A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi	46
Şekil 4.13. Erlotinib'in H460 hücrelerinin lateral hareketi/motilite indeksi üzerine etkisi (*P<0.05)	48
Şekil 4.14. Erlotinib'in A549 hücrelerinin lateral hareketi/motilite indeksi üzerine etkisi (*P<0.05)	49
Şekil 4.15. Erlotinib'in yüksek metastatik H460 hücrelerinin SCN9A ifadesine etkisi (*P<0.05)	50
Şekil 4.16. Erlotinib'in düşük metastatik A549 hücrelerinin SCN9A ifadesine etkisi(*P<0.05)	50

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Birinci evreleme: Lenf nodu	11
Tablo 2. İkinci evreleme: Uzak metastaz.....	12
Tablo 3. Üçüncü evreleme: TNM	13
Tablo 4. İyon kanal ailesi ve ilişkili oldukları iyon kanalları	14
Tablo 5. VGSC ye ait α alt birimlerin bulunduğu dokular ve ilişkili olduğu bilinen kanser türleri	20
Tablo 6. VGSC ye ait β alt birimlerinin bulunduğu dokular ve ilgili olduğu kanser türleri....	20
Tablo 7. VGSC de yer alan α ve β alt birimlerin kanser hücresindeki fonksiyonları..	21
Tablo 8. VGSC'ler tarafından düzenlenen metastatik hücrenin davranışları	22
Tablo 9. Nav1.7 ve Beta-actin forward ve reverse primerler.....	36
Tablo 10. Erlotinib'in H460 ve A549 hücrelerinin koloni oluşum yüzdesi üzerindeki etkisi (P>0.05).....	43
Tablo 11. H460 hücrelerine TTX ve erlotinib uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri (*P<0.05).....	47
Tablo 12. A549 hücrelerine TTX ve erlotinib uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri (*P<0.05).....	48

ÖZET

Akciğer kanseri, mortalitesi en yüksek kanserlerdendir. Akciğer kanserinde, kanser hücrelerinin primer tümörden ayrılarak vücudun kan dolaşımına veya lenfatik sistemine girerek zamanla vücuttaki farklı dokulara yayılması olarak tanımlanan metastaz, kanser hastalarında yaşamı en fazla tehdit eden olaydır ve ölümlerin büyük çoğunluğundan sorumludur. Dolayısıyla, metastatik sürecin altında yatan mekanizmaları anlamak ve tedavi stratejileri geliştirmek önem taşımaktadır. Hücre membranında eksprese olan voltaj kapılı sodyum kanallarının (VGSC), malignitenin görüldüğü yüksek metastatik kanser hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildikleri saptanmıştır. Kolorektal, prostat, meme gibi kanser hücreleri ile yapılan in vitro hatta in vivo çalışmalarda, VGSC'lerin bazı ilaç ve ajanlarla bloke edilmesiyle metastaza neden olan hücre hareketinin (migrasyon ve invazyonun) baskılanabileceği gösterilmiştir. Günümüzde farmakolojik ajanlar ile kanser tedavisi önemli bir yere sahip olmakla birlikte, hedefe yönelik farmakolojik ajanların daha fazla kullanıldığı dikkati çekmektedir. Bu çalışmada erlotinib'in küçük hücreli dışı akciğer kanserinde, klinikte hedefe yönelik olarak kullanılan düşük metastatik A549 ve yüksek metastatik H460 hücrelerinin proliferasyonunu, toksisitesini, koloni oluşumunu ve metastatik davranışlarını in vitro olarak değerlendirilmek böylece ekspresyonu yüksek olan Nav 1.7 VGSC üzerindeki rolünü saptamak amaçlanmıştır.

Bu amaç için, erlotinib'in yüksek metastatik H460 ve düşük metastatik A549 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri MTT yöntemi, apoptoz oluşumu annexin yöntemiyle araştırılmış, koloni oluşumuna bakılmıştır. Metastatik aktiviteye etkisi, yara analizi ile hücre motilitesi değerlendirilmiş, Nav 1.7 ekspresyonuna etkisi ise, qRT-PCR ile bakılmıştır. Çalışmada hücrenin proliferasyonu ve koloni oluşumu üzerinde inhibe edici etki göstermeyen 0,01 μ M ve 0,02 μ M erlotinib konsantrasyonları esas alınmış ve pozitif kontrol olarak sodyum kanal blokeri TTX kullanılmıştır. Erlotinib'in yüksek metastatik H460 hücrelerinin motilitesi üzerinde daha yüksek bir inhibisyona neden olduğu ancak, Nav1.7 mRNA düzeyinde etki göstermediği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, elde edilen bu veriler tirozin kinaz inhibitörü erlotinib'in H460 ve A549 hücreleri üzerinde Nav 1.7 VGSC'yi hedef alan ve metastatik potansiyelin ilk kez değerlendirildiği bu çalışmada; erlotinib'in H460 ve A549 hücre motilite/migrasyonunu inhibe etse de, PCR sonuçları Nav 1.7 VGSC ler üzerinde etki gösterdiğine dair bir veriyi açık bir şekilde ortaya koyamamıştır. Motilite üzerinde görülen etkinin hangi yol ile meydana geldiğine dair ayrıntılı moleküler çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Erlotinib, KHDAK, A549, H460, Nav 1.7 VGSC, Migrasyon, Apoptoz

ABSTRACT

Lung cancer is one of the cancers with the highest mortality rate. In lung cancer, metastasis, in which cancer cells break away from the primary tumor and are distributed intermittently to different tissues throughout the blood units or lymphatic system, is the most life-threatening event in cancer patients and is responsible for large amounts of deaths. Therefore, it is stored under the metastatic process and distribution of the treatment is important. Voltage-gated sodium channels (VGSC), expressed in the cell membrane, are highly expressed in the highly metastatic range of cancers that promote malignancy. Cell movement (migration and invasion) due to metastasis can be suppressed by blocking VGSCs with some drugs and agents, which can be rescued in vitro and even in vivo by cancer treatment such as colorectal, prostate, breast. Although cancer treatment with today's pharmacological agents has an important place, targeted pharmacological agents attract more attention. The performance of this effective erlotinib in small cell lung cancer, low metastatic A549 and high metastatic H460, which are used as targeted in the clinic, by evaluating the live proliferation, inflammation, colony formation and metastatic activities of Nav 1.7 VGSC with high expression in vitro.

For this purpose, the effects of erlotinib on the characteristic proliferation of high metastatic H460 and low metastatic A549 were investigated by the MTT method, apoptosis formation by the annexin method, and colony formation was examined. Its effect on metastatic activity and cell motility was evaluated by wound analysis, and its effect on Nav 1.7 expression was examined by qRT-PCR. In the study, recording was based on 0.01 μM and 0.02 μM erlotinib concentrations, which have an inhibitory effect on cell proliferation and colony formation, and the sodium channel blocker TTX was used as a positive control. It was determined that erlotinib caused a higher inhibition on the high metastatic H460 characteristic motility, but had no effect on the Nav1.7 mRNA level.

In conclusion, the data obtained are the first time that the tyrosine kinase inhibitor erlotinib targets Nav 1.7 VGSC on H460 and A549 records and its metastatic potential has been evaluated; Although erlotinib inhibited H460 and A549 cell motility/migration, PCR results did not clearly demonstrate an effect on Nav 1.7 VGSCs. Daily detailed visits are required to determine how the effect on motility occurs.

Keywords: Erlotinib, NSCLC, A549, H460, Nav 1.7 VGSC, Migration, Apoptosis

1.GİRİŞ

Ölümcül bir hastalık olan kanser, hücrelerin anormal şekilde çoğalması, tümör oluşturmaları ve dokuların işlevini kaybetmesiyle karakterize edilir ve mortalite oranı yüksektir. Çevresel faktörlerden ve genetik değişikliklerden kaynaklanabilen primer tümörler, tümör süpressör genler ve onkogenlerde oluşan hasarlar hücrelerin proliferasyon, migrasyon invazyon ve hücre fonksiyonlarının anormal değişimine sebep olmaktadır. Tümör hücreleri, hücre kontrol mekanizmalarından kaçarak invazyon yeteneği kazanırlar ve böylece çevredeki dokulara ve organlara metastaz yaparak ölüme neden olurlar (Nikitovic ve ark., 2013). Bu nedenle de kanserdeki metastaz mekanizmasını anlamak ve tedavi seçenekleri geliştirmek büyük önem arz etmektedir (Redig ve McAllister, 2013).

Dünya genelinde insidansı en yüksek olan akciğer kanseri, kanserden kaynaklı olarak meydana gelen ölümlerin ilk sırasında yer alır ve hızla da ilerlemektedir. Akciğer kanseri, kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sırada olmakla birlikte artış eğilimi göstermekte, erkeklerde ise, kansere bağlı ölümlerin ilk sırasında bulunmaktadır (Siegel ve ark. 2020).

Hücresinin savunma mekanizmalarından en güçlüsü olan apoptoz sinyal iletim kaskadlarıyla birlikte sıkı şekilde programlanmış hücresel proteinler tarafından düzenlenen hücre ölümü türüdür (Abotaleb ve ark., 2018). Mutasyona uğramış hücrelerin ortadan kaldırılmasında etkindir. Bu sebeple de apoptoz, kanser hücrelerinde üzerine en çok yoğunlaşılan araştırma konusudur (Scorei ve ark., 2008).

Hücresinin bir dizi fizyolojik sürecinde rol alan hücre membranlarındaki iyon kanalları, transmembran protein grubudur. İyon kanallarında genetik ya da edinsel bozukluklar sonucu meydana gelen kanalopatik hastalıklar başlığı altında sınıflandırılmaktadır (Petkov, 2009; Preverskaya ve ark., 2010). Bunlardan voltaj kapılı sodyum iyon kanalları (VGSC), iyon kanallarından elektrokimyasal gradyanların geçiş durumuna göre sınıflandırılır ve membran potansiyeline göre açılıp kapanan bir transmembran protein kompleksinden oluşur (Yi ve Jan, 2002; Resta ve Bacchetti, 2010; Ruiz ve Kraus, 2015; Wang ve ark., 2017). Son yıllarda giderek artan sayıdaki çalışmayla elde edilen birçok in vitro ve in vivo kanıt VGSC'lerin, kanalopatik hastalıkların yanı sıra, kanserde özellikle de metastazdaki rolü olduğunu ortaya koymuştur (Grimes ve ark., 1995; Fraser ve ark., 2003; Campbell ve ark., 2013; Djamgoz ve Onkal, 2013; Nelson ve ark., 2015; Djamgoz ve ark., 2019; Horne ve ark., 2021).

Bu zamana kadar yapılan alışmalar “VGSC’lerin, kanser hücrelerinin metastatik potansiyelinde kuvvetlendirici bir etkiye sahip olduğu ve bu kanalların bloklanmasıyla metastatik ilerlemenin baskılanabileceği” varsayımını oluşturmuştur. Elde edilen bu veriler insan dokularına ait materyallerin kullanıldığı bazı çalışmalarla da desteklemiştir (Diss ve ark., 2004; Suy ve ark., 2012).

Bu bilgiler ışıkında, metastazların akciğer kanseri sağkalımını etkilemesi nedeniyle klinikte kullanılan erlotinib’in yüksek metastatik H460 ve düşük metastatik A549 akciğer kanser hücrelerinin proliferasyonları, koloni oluşumunu, apoptozunu ve metastatik potansiyel bakımından hücre migrasyonu ile gen ekspresyonu değişikliklerinin moleküler analizlerle in vitro olarak belirlenmesi hedeflenmiştir. Dolayısıyla metastazdan sorumlu Nav 1.7 VGSC kanalı üzerine odaklanılmış olup, erlotinib’in metastatik aktivite üzerindeki etkilerini in vitro ve moleküler yöntemlerle araştırarak, metastazda rol alan Nav 1.7 VGSC üzerinde etkisinin bulunup bulunmadığını ortaya koymak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser kelimesi, Yunanca “carcinos” Latince “cancer” sözcüklerinden türemiştir. Fizyolojik olarak koordinasyonunu kaybetmiş hücrelerin kontrolsüz çoğalması olarak tanımlanan kanser ile ilgili olarak, yıllarca önceki dinazor fosillerinde kemik tümörüne hatta Ebers papiruslarında çeşitli tümörlerle ilgili bilgilere rastlanmaktadır (Bayık, 1989).

Kanser, genetik değişikliklerden veya çevresel faktörlerden kaynaklanan değişiklikler sonucu oluşan ve kontrolsüz hücre büyümesine yol açan bir hastalıktır. Karsinogenez olarak isimlendirilen normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi sürecinde meydana gelen genetik değişiklikler kalıtsal olabileceği gibi karsinojenlere de bağlı olabilmektedir (Byerley, 2022).

Sağlıklı normal hücreler, vücudun ihtiyacı olan yeni hücreleri meydana getirmek için büyür ve proliferasyon olurlar (Weinberg, 2014). Normal şartlarda düzenli işleyen bu sistem bozularak hücreler sürekli bölünür ve çoğalmaya başlar. Kanser hücresi, insan vücudundaki herhangi bir dokuda oluşabilir. Çoğalmaları ile meydana gelen tümörlerde, iyi veya kötü huylu olarak ikiye ayrılır (Baran, 2018).

Ciddi sağlık problemlerine yol açmayan ve büyük olabilen benign (iyi huylu) tümörler, genellikle çevresindeki dokulara yayılmaz ve onlara metastaz yapmaz. Cerrahi olarak çıkarılarak, tedavi edilen kanser, daha sonra bazı kanser hücrelerinin çoğalması ile yeniden tekrarlayabilirler. (Baran, 2018). Malign (kötü huylu) tümörler ise, çevre dokulara hatta uzak doku ve organlara yayılarak onları istila ederler. Çoğu kanser solid tümörler (katı) oluştururken kan kanserleri katı kitlesel bir tümör oluşturmazlar (Baran, 2018).

Kanserler, çeşitli hücre ve dokularda ortaya çıkar. Bu çeşitlilik spesifik teşhis ve tedavide ciddi zorluklarla karşılaşılmasına neden olur (Fisher ve ark., 2013; Meacham ve Morrison, 2013). Sağlıklı olan hücrelerle kanserli hücreler bazı temel özelliklerle birbirinden ayrılmaktadır. Kanser hücrelerinin farklı nitelikteki özelliklerini dikkate alan Weinberg ve Hanahan ve arkadaşları (2011), tümörlerin gelişim göstermesi esnasında on temel özellik de belirtmişlerdir. (Şekil 1). Bunlar, büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık, proliferatif sinyalleri sürdürmek, hücre ölümüne direnmek, sınırsız replikatif potansiyel, metastaz ve invazyonu aktive etmek ve anjiyogenezi indüklemek olarak sınıflandırılabilir (Weinberg ve ark., 2000; Hanahan, 2011).

2.2. Kanser Hücresinin Özellikleri

Kanserin bilinen temel özelliklerinin yanında onu normal hücrelerden ayıran özellikler de tanımlanmıştır. Kanser gelişim gösterdiği dönemde normal hücreden kanser hücresine dönüşen hücrelerin kazanım sağladığı çeşitli biyolojik özellikler vardır. Bunlara bakıldığında, kanser hastalığının kompleks olduğunu açıkça görmek mümkündür. Bunlar; büyüme baskılayıcılarından kaçınmak, hücrenin devam eden proliferatif sinyalleri, hücrenin ölümüne direnme/apoptoz, DNA replikasyonunun devamlılığı, anjiyogenezin indüklenmesi, invazyon ve metastaz aktivasyonu, hücresel metabolizmayı ATP üretimini yani enerji metabolizmasını daha fazla enerji üretmek için düzenleme ve bağışıklık yıkımından kaçma şeklinde söylemek mümkündür (Şekil 1.) (Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 1. Kanser hücresinin on temel özelliği (Hanahan ve Weinberg, 2011)

Farklı özellikler kazanmış olan kanser hücrelerinin ortadan kaldırılmasını hedefleyen kanser tedavisi, değişkenlik göstermekle birlikte son zamanlarda bireysel tedaviler dikkat çekmektedir. Tedavide tümörün tipi, evresi ve ne kadar ilerlemiş olduğu, metastaz yapıp yapmadığı gibi,

birçok faktör önem taşımaktadır. Bu nedenle bazı kanser hastalarına tek tip tedavi uygulanırken, diğer hastalara iki veya daha fazla sayıdaki tedavinin kombinasyonu kullanılır. Geleneksel tedaviler cerrahi, radyoterapi ve kemoterapiyi içerirken zaman zaman ilaç direnci geliştirmesi nedeniyle sınırlanmaktadır. Günümüzde kök hücre tedavisi, immünoterapi, nanoteknoloji ilaçları gibi gelişmiş ve yenilikçi tedaviler, kanser tedavisinde daha fazla kullanılmaktadır. Tüm bu yöntemlere rağmen, onkoloji daha güvenli ve etkili kanser ilaçlarının geliştirilmesine odaklanmaktadır (Debela ve ark., 2021).

En yaygın olarak görülen kanser türlerinden olan karsinomalar, insan kanserlerinin yaklaşık yüzde 90'ını içerir. Vücudu ve pek çok organı çevreleyen epitel hücrelerinden meydana gelmektedir. Epidermisin yani derinin dış tabakası olarak bilinen bazal hücreli karsinomalar alt veya bazal tabakada meydana gelen kanserlerdir (Baran, 2018).

Derinin altındaki epitel hücrelerde oluşan kanserler, skuamoz karsinomalar, epidermoid karsinoma olarak ta bilinir. Düz formda görünen skuamoz hücreler bağırsaklar, böbrekler, mide, mesane, böbrek ve akciğerler gibi pekçok yerde görülürler.

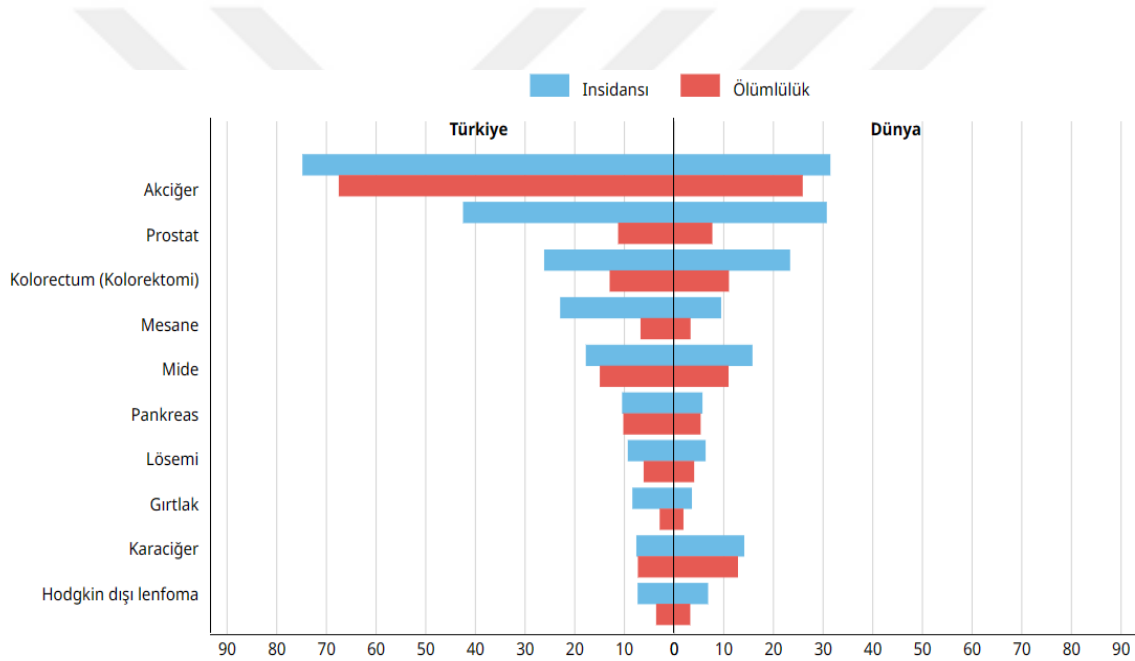
Epitel dokuda meydana gelen bir kanser olan transisyonel karsinoma ise transisyonel epitel hücreleri veya ürotelyum olarak da isimlendirilir. Böbrek, üreter ve idrar kesesi gibi organların iç katmanında bulunurlar (Baran, 2018).

2.3. Akciğer Kanseri

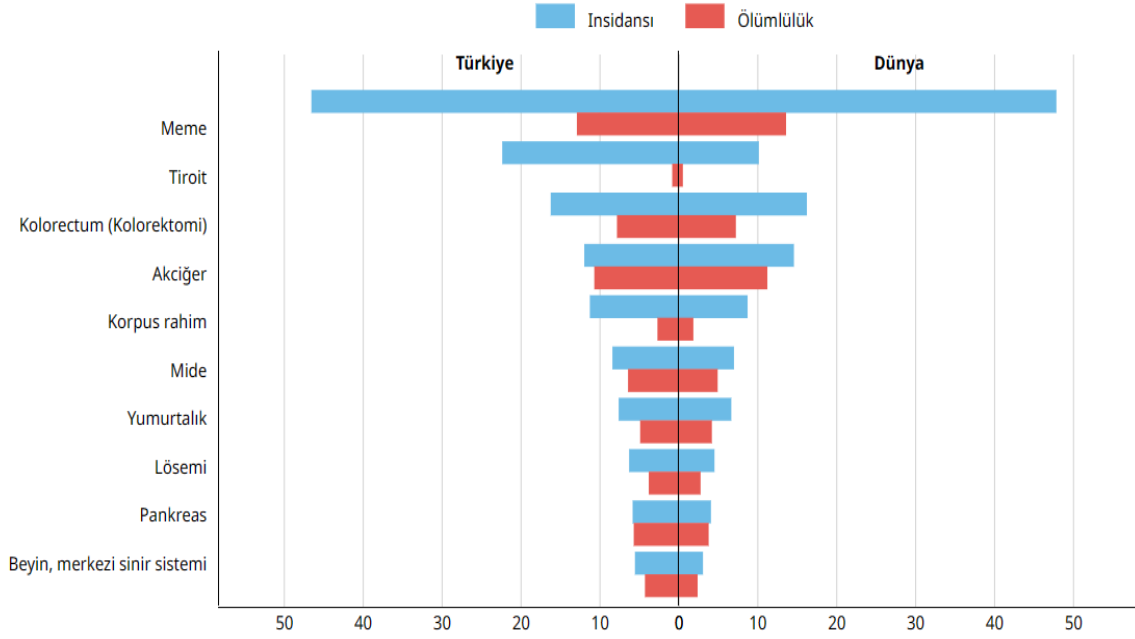
Dünya geneline bakıldığında, tüm kanser ölümlerinin yaklaşık olarak % 30' undan sorumlu olan akciğer kanseri önde gelen malign kanserlerdendir. Kanserde erken teşhis oldukça önem arz etmektedir. Kadın ve erkeklerde ilk sıralarda görülmektedir. Teşhis edildikten sonraki süreçte hayatta kalma oranının artması için hastanın bulunduğu evrede başarılı bir tedavi gerekmektedir. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) şeklinde ayrılır. Bütün akciğer kanseri vakalarının yaklaşık yüzde 85'ini oluşturan KHDAK, büyük hücreli karsinoma, skuamöz hücreli karsinoma ve adenokarsinoma olarak gruplandırılır. Akciğer kanserinde görülen ölümlerin yaklaşık yüzde 80 kadarı sigaraya bağlı gerçekleşmektedir. Hedefe yönelik tedavi ve immünoterapiler çok geliştirilmiş olsa da henüz yeterli değildir. (Kalinke ve ark., 2020).

2.3.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

İnsidans ve mortalite oranı birinci sırada olan akciğer kanserinin Dünya'daki ve Türkiye'deki istatistikleri incelendiğinde erkeklerde ilk sırada yer alırken (Şekil 2), kadınlarda dördüncü sırada yerini almıştır (Şekil 3). 2020 yılında akciğer kanserinde teşhis edilen 2.206.771 yeni vakanın 1.1796.144'ü ölümle sonuçlanmıştır. Erkeklerdeki insidans ve ölüm oranları kadınlara göre yaklaşık iki kat daha yüksek olmakla birlikte, bölgeler arasında da farklılıklar göstermektedir, Kuzey Amerika'da 1.2'den Kuzey Afrika'da 5.6'ya kadar değişebilmektedir (GLOBOCAN, 2020). Özellikle tütüne erişimin kolay olması ve sanayileşmenin artmasıyla paralel olarak akciğer kanseri de artış göstermektedir (Thandra ve ark., 2021).



Şekil 2. Epidemiyolojik olarak erkeklerdeki ilk on kanserin oranları (GLOBOCAN, 2020)



Şekil 3. Epidemiyolojik olarak kadınlardaki ilk on kanserin oranları (GLOBOCAN, 2020).

2.3.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

Akciğer kanserinin oluşmasına zemin hazırlayan birtakım sebepler belirlenmiştir.

Aile öyküsü: Ailedeki pozitif öykü akciğer kanserine yakalanma oranını yaklaşık iki kat arttırmaktadır. Orta ve Doğu Avrupa’da yapılan analizlere göre pozitif aile öyküsü akciğer kanseri riskini yaklaşık 1,7 kat arttırmaktadır. (Thandra ve ark., 2021).

İrk: Afrika kökenli Amerikalı erkekler akciğer kanserinde en yüksek insidansa sahipken (87.9), Asyalı/Pasifikler Adalılar ve Hispanikler en düşük insidansa (sırasıyla 40.6 ve 45.2) sahiptir. Kadınlarda ise, en yüksek insidansa Kafkasyalı Amerikalılar (57.6) , Afrika kökenli Amerikalı kadınlar 50.1 sahipken, Asyalılar/Pasifik Adalılar 27.9 Hispanikler 25.2 ile nispeten, daha düşük insidansa sahiptir. Akciğer kanserinde temel sorunlardan biri olan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) mutasyonunun prevalansı Doğu Asyalı hastalarda Kafkasyalılarda daha yüksektir.

Tütün: Batıdaki akciğer kanseri vakalarının yüzde 80 inden fazlasının sigaraya bağlı olduğu düşünülmektedir. Tüketimi azaltıldığında ölümlerin ciddi önlenabilir olmasının yanında yüksek oranda tüketimine bağlı olarak ta ölüm oranında artış görülmektedir. Tütünün içindeki nikotinin bağımlılığı artırması tütün kullanımının bırakılmasını azaltmaktadır, bunun yanında pasif olarak tütüne ikinci derecede maruz kalmak kişinin daha çok solumasına bağlı olarak akciğer kanserine yakalanma ihtimalini arttırmaktadır (Thandra ve ark., 2021).

Cinsiyet: Erkeklerin bu tanıyı alma ihtimali kadınlardan yaklaşık iki üç kat daha yüksektir.

Yaş: Hastalığın ileri yaşlarda ortaya çıkmasının nedeni, mutajenlere maruz kalındıktan seneler sonra kanserin ortaya çıkması olduğu söylenebilir. Diğer bir ifadeyle, yaş ilerledikçe DNA hasarının tamiri ve onarım yeteneğinin azaldığı görülmektedir (Thandra ve ark., 2021).

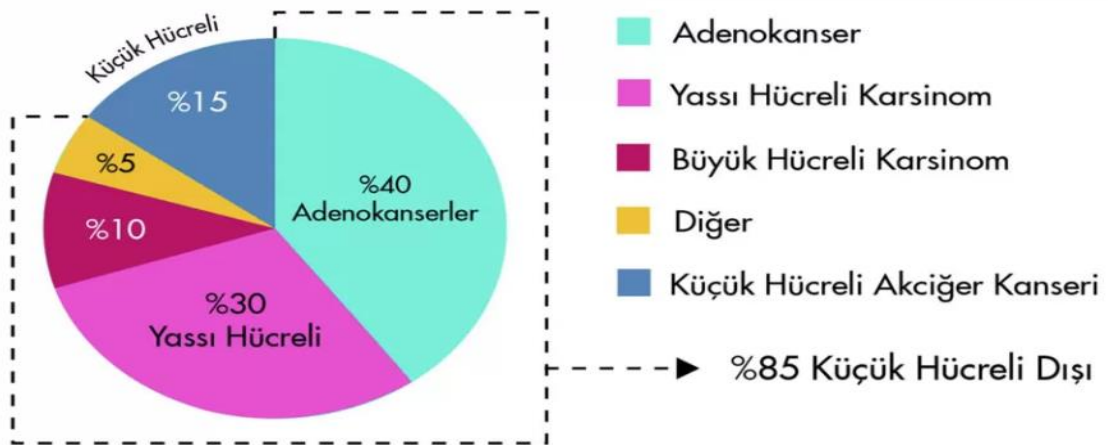
Asbest: Çeşitli mesleklere ait çalışma alanlarında kullanılan bir mineral olmakla beraber, akciğerlerde lif biriktirmekte buna bağlı olarak ta akciğerlerde farklı maligniteler geliştirmektedirler (Thandra ve ark., 2021).

KOAH: Sigara tüketimine bağlı olarak ortaya çıkan kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), akciğer kanserine yakalanma ihtimalini beş ile on kat arttırmaktadır (Thandra ve ark., 2021).

Beslenme: Günümüzde abur cubur adı altında satılan paketli hazır gıdaların ve hazır yiyecek tüketiminin artmasıyla beraber, yetersiz beslenme hayat kalitesini azaltmakta ve akabinde akciğer kanserine yakalanma riskini de arttırmaktadır.

2.3.3. Akciğer Kanserinin Histopatolojisi

Akciğer kanseri metastaz yetenekleri ve tedaviye verdikleri yanıtlar bakımından küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak iki grupta incelenir. Tedavi cevabı iyi olan KHAK akciğer kanserlerinin yaklaşık % 15'ini kapsarken, tedaviye cevabı daha düşük olan küçük hücreli dışı akciğer kanseri yüzde 85'lik oran ile bünyesinde adenokarsinoma, yassı hücreli karsinoma ve büyük hücreli karsinoma olarak üç farklı tipi barındırmaktadır. (Şekil 4) (Cruz ve ark., 2011).



Şekil 4. Akciğer kanser türleri

2.3.4. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)

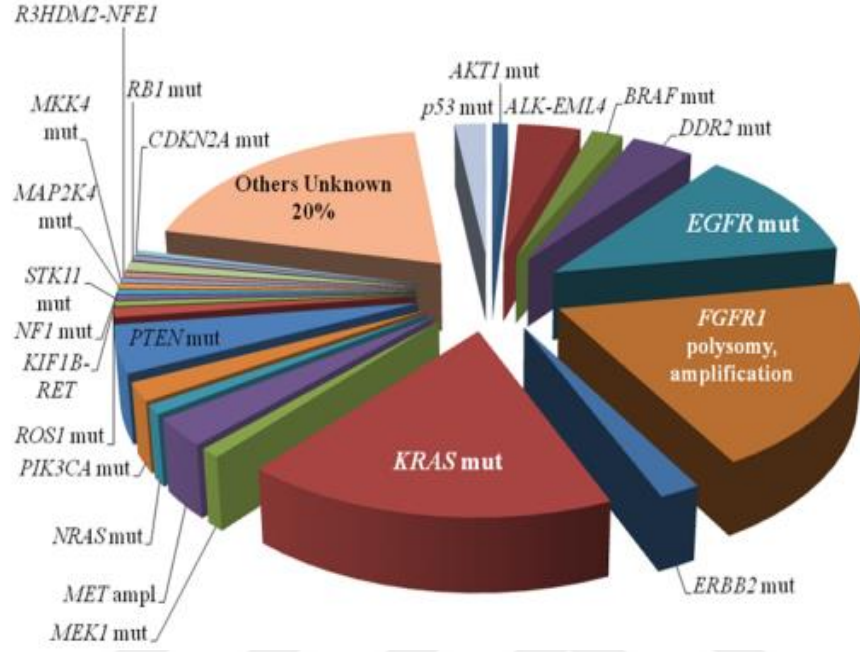
Küçük hücreli akciğer kanseri terim olarak ilk kez 1926'da kullanılmıştır (Barnard, 1926). Akciğer kanserli tüm hastaların neredeyse yüzde 15'inde görülürken tütün kullanımı ile doğru orantılı olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Kromozom analizinde 3. Kromozomun p kolundaki delesyon hemen hemen tüm KHAK hastalarında rastlanırken, 7p13 bölgesine denk gelen TP53 mutasyonu ve RB1 tümör baskılayıcı gendeki delesyonlar en sık görülen mutasyonlardır. Işık mikroskobu altında görülmesi zor dikkat çekmeyen küçük hücrelerdir. Göğüs ağrısı, öksürük kanlı balgam gibi bir takım belirti ve şikayetler ile başvuran hastalar genelde ileri yaştadır ve hızlı yayılım göstermesine paralel olarak hayatta kalma süreleri dokuz ila onbir ay ile sınırlıdır (Basumallik, 2023).

2.3.5. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri üç alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar skuamöz hücreli karsinoma, büyük hücreli karsinoma ile bu türün neredeyse yarısını oluşturan adenokarsinomadır. KHDAK görülmesindeki en büyük etken faktör sigara olmakla beraber, alkol tüketimi, çevresel kirliliğe maruz kalma gibi diğer faktörlerde etkili olur (Clark, 2023). Büyük hücreli karsinoma, sigara tüketimiyle bağlantılıdır ve akciğerin genellikle orta kısımlarında meydana gelir, diğer organlara da yayılım gösterir. Skuamöz hücreli karsinoma, erkeklerde daha sık olmakla birlikte akciğerlerin merkez kısmında görülür ve akciğer kanseri vakalarının yaklaşık % 25-30'unu oluşturmaktadır. Lenf nodlarına hızlı, akciğer dışına daha geç yayılım gösterir. Adenokarsinomalar yaklaşık % 40 görülme sıklığına sahiptir. Yaşa bakılmaksızın kadın ve erkeklerde en çok görülen akciğer kanseri türüdür ve akciğerin genellikle periferinde oluşma eğilimindedir. Yavaş büyür, erken aşamalarda iken, metastaz oluşturur. Farklı alt tiplere ayrılır (Zappa ve ark., 2016).

2.4. Akciğer Kanseri ile İlişkili Genler ve Mutasyonlar

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında çeşitli insersiyon, nokta mutasyonu, delesyon ve de translokasyonlar genetik açıdan önemli bozukluklardır (Şekil 5).



Şekil 5. Genler ve alakalı oldukları mutasyonlar (Krawczyk ve ark., 2012).

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör Geni (EGFR) : Hücrenin büyümesini ve proliferasyonunu aktive eden tirozin kinaz ailesine dahil bir reseptördür. EGFR’de meydana gelen mutasyonlar kontrolsüz şekilde bölünme eğilimi gösterirler. Tamamına yakın kısmı ekzon 19 delesyonu ve ekzon 21’de bulunan L858R nokta mutasyonlarından oluşur. (Zappa ve ark., 2016).

K-Ras proteini kodlayan gen (KRAS): Tek amino asit mutasyonları olarak bilinen bu mutasyonlar çoğunlukla adenokarsinomalarda meydana gelir.

Anaplastik Lenfoma Kinaz Geni (ALK): Anaplastik lenfoma kinaz bütün akciğer kanserlerinin yüzde üç ila yedisini kapsamaktadır. Genç bireylerde daha sık görülür. En yaygın görüleni 2. Kromozomun p23 bölgesinde karşımıza çıkmaktadır.

Mezenkimal Epitelyal Transizyon (MET): 7. Kromozomda bulunan bu proto onkogen, SF kısaltmasıyla bilinen doğal ligand saçılma faktörü, HGF’ye bağlı bir reseptör tirozin kinazı (RTK) kodlamaktadır. Bu yolak pleiotropik etkilere aracılık eder (El-Telbany ve ark., 2012).

LKB1: STK11 olarak adlandırılan bu gen 19. kromozomun p13.3 bölgesindeki tümör baskılayıcı gendir (El-Telbany ve ark., 2012).

V-raf murine sarkom viral onkogen homolog B (BRAF): Proto onkogen olan BRAF, hücrenin çoğalarak hayatta kalmasını sağlar. Bu somatik mutasyonlar tüm KHDAK hastalarının yüzde bir ila dördünde görülmektedir (Zappa ve ark., 2016).

Fosfotidilinositol 3 Kinaz (PTEN): Tümör baskılayıcı genlerden olan PTEN, birden fazla hücresel süreçte yer alan lipid kinaz ailesine ait fosfatidilinositol 3-kinazların (PI3K'ler) önemli tümör baskılayıcı genlerin önemli aile üyelerindendir (El-Telbany ve ark., 2012).

2.5. Akciğer Kanseri Evrelemesi

Akciğer kanseri evrelemesi, uygun tedavinin saptanmasında önemli bir yere sahiptir. Evre 1 ve evre 2'deki hastalar cerrahiden yararlanırlar ve primer tümör cerrahi yol ile çıkarılır. İleri evreler olan evre 3 ve evre 4 teki hastalara cerrahi tedavi yapılamaz (Molina ve ark., 2009). Meme, prostat gibi kanserlerde olduğu gibi akciğer kanserinde de TNM denilen tümörün özelliklerine, metastazına ve lenf noduna göre bir evreleme sistemi geliştirilmiştir (Tablo 1, Tablo 2, Tablo 3,) (Çok, 2018).

Tablo 1. Birinci evreleme: Lenf nodu (Goldstraw, Chansky ve ark., 2016).

Nx	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemiyorsa
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	İpsilateral peribronşial ve/veya hiler lenf noduna ve intrapulmoner lenf nodunda metastaz
N2	Mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodlarında metastaz
N3	Kontralateral mediastinal, hiler / skalen / supraklavikuler lenf nodu metastazı

Tablo 2. İkinci evreleme: Uzak metastaz (Goldstraw, Chansky ve ark., 2016).

M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz mevcut ise
M1a	Kontralateral lobda ayrı tümör nodülleri; plevral/perikardiyal nodüllü veya malign plevral/perikardiyal efüzyonlu tümör
M1b	Tek ekstra torasik organda tek metastaz
M1c	Bir veya daha fazla organda mültipleks tratorasik metastazlar

2.6. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavisi

Tümörün tipi, evresi ve ne kadar ilerlemiş olduğu, metastaz yapıp yapmadığı gibi durumlar TNM evreleme sistemiyle belirlenerek uygun tanı konulur ve tedavi şekli belirlenir (Tablo 3). Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi tedavi yöntemleri kanser hücrelerinin ortadan kaldırılmasını doğrudan hedef almasına rağmen, ilaca direnç geliştirmesi, özgüllük taşınamamasıyla sınırlı etki gösterir. Cerrahi, özellikle evre III hastalarına uygulanabilirken, cerrahi yapılamayan ileri evre hastalara platin içerikli kemoterapi uygulanmaktadır. Radyoterapi genellikle metastatik durumda palyatif amaçlı olarak kullanılmaktadır.

Günümüzde diğer kanserlerde olduğu gibi akciğer kanserinde de akıllı ilaç olarakta adlandırılan hedefe yönelik tedaviler ile kanser hücre proliferasyon ve metastazını engellemek amaçlanmaktadır. Burada özellikle hücrenin sinyal iletim yolları önemli hedeflerdir. Bu yol ile, kontrolsüz çoğalma baskılanabilir, anjiyogenez olarak adlandırılan damar gelişimi inhibe edilebilir, apoptoz başlatılabilir, bağışıklık sistemini uyarılabilir.

Akciğer kanserinde hedefe yönelik tedavi olarak, tirozin kinaz inhibitörleri ve monoklonal antikorlar kullanılmaktadır. Her ikisinin hedefi de hücre membranında bulunan EGFR'dir. Bunun yanısıra günümüzde bu tedavilerin dışında sürekli olarak daha etkili ve güvenli olan kanser ilaçlarının geliştirilmesi yönünde araştırmalar yürütülmektedir (Debelo ve ark., 2021).

Tablo 3. Üçüncü evreleme: TNM (Detterback, 2018).

T0	Primer tümör yok
Tis	Yerinde karsinom (skuamoz veya adenokarsinom)
T1	Tümör ≤ 3 cm
T1mi	Minimal invaziv adenokarsinom
T1a	Santral hava yollarında yüzeysel yayılan tümör
T1a	Tümör ≤ 1 cm
T1b	Tümör > 1 ama ≤ 2 cm
T1c	Tümör > 2 ama ≤ 3 cm
T2	Tümör > 3 ama ≤ 5 cm
T2a	Tümör > 3 ama ≤ 4 cm
T2b	Tümör > 4 ama ≤ 5 cm
T3	Tümör > 5 ama ≤ 7 cm
T4	Tümör > 7 cm
N (Bölgesel Lenf Nodülleri).	
N0	Bölgesel nodül metastazı yok
N1	İpsilateral pulmoner veya hiler nodüllerde metastaz
N2	İpsilateral mediastinal veya subcarinal nodüllerde metastaz
N3	Kontralateral mediastinal, hiler veya supraklaviküler nodüllerde metastaz
M (Metastaz Mesafesi).	
M0	Metastaz yok
M1a	Kontralateral lobda malign plevral veya perikardiyal efüzyon, plevral veya perikardiyal nodüller, ayrı tümör nodülleri
M1b	Tek ekstratoraksik metastaz
M1c	Çoklu ekstratoraksik metastaz (1 veya > 1 organ).

2.7. İyon Kanalları

İyon kanalları, hücre uyarılabilirliği ve sıvı salgılanmasını kontrol eden özelliklerinin yanında hücrenin bölünmesinde, farklılaşmasında ve göçünde rol aldığına dair kanıtlar giderek artmaktadır. Farklı kanser türlerine dair veriler mevcuttur ve yapılan pekçok araştırma, kanserdeki biyobelirteçler ve ilaçla tedavi edilebilir hedefler olarak iyon kanallarını araştırmaktadır (Delisi, 2023).

İyon kanalları, birçok alt birimin bir araya gelmesiyle oluşmuş ve iyonların elektrokimyasal gradyanlardan pasif olarak geçmesine izin veren porları oluşturan integral membran proteinlerden meydana gelmiştir. Alt birim sayıları iyon kanalının tipine göre değişmektedir (Yi ve Jan, 2002 ; Resta ve Bacchetti, 2010) (Tablo 4).

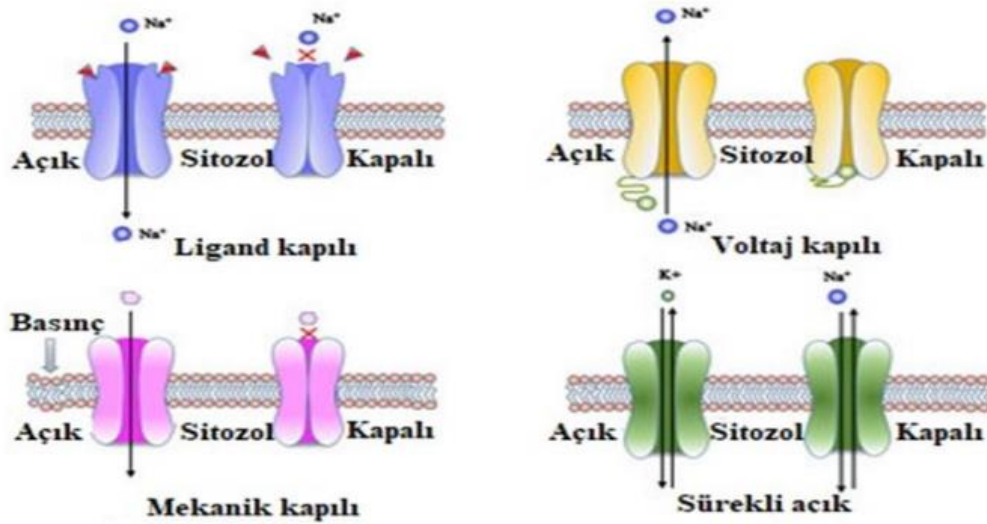
Tablo 4. İyon kanal ailesi ve ilişkili oldukları iyon kanalları (Alexander ve ark., 2017).

<i>İyon kanalı ailesi</i>	<i>İyon kanalları</i>
Voltaj kapılı iyon kanalları	CatSper ve 2-por kanalları
	Siklik nükleotid ilişkili kanallar
	Potasyum kanalları
	Ryanodine reseptörleri
	Voltaj kapılı kalsiyum kanalları
	Voltaj kapılı proton kanalları
	Voltaj kapılı sodyum kanalları
Ligand kapılı iyon kanalları	5-HT3 reseptörleri
	Proton kapılı iyon kanalları (ASICs)
	Epitelyal sodyum kanalları
	GABAA reseptörleri
	İyonotropik glutamat reseptörleri
	IP3 reseptörleri
	Nikotinik asetil kolin reseptörleri
	P2X reseptörleri
Diğer iyon kanalları	ZAC
	Aquaporinler
	Klor kanalları
	Konneksinler ve Panneksinler
	Piezo kanalları
	Sodyum sızıntı kanalları

İlaça dirençte ve potansiyel farmakolojik hedefler olarak iyon kanalları son günlerde önemli role sahiptir. Bu roller, ilaca olan direncin ortaya çıkmasına engel olmak ve/veya geciktirmek amacıyla iyon kanalının düzenli olmasını hedef alan yeni tedavilere yol açabilir. Potansiyel olarak ilgi çekici olan iyon kanalları, plazma membranındaki ekspresyonların küçük moleküllerce düzenlenmesini kolayca sağlayan terapötik hedeflerdendir.

Edinsel ve genetik nedenlerle iyon kanallarında oluşan işlev bozuklukları sonucunda heterojen ve konjenital hastalıklar meydana gelmekte bunlar kanalopatik hastalıklar olarak adlandırılmaktadır. Voltaj kapılı sodyum iyon kanalları (VGSC) grubunda belirlenen hastalıklar Na⁺ kanalopatileri adını almış ancak, günümüzde hepsine birden kanalopatiler denilmektedir. Bu hastalıklar, epilepsiden, migrene, kalp ritim bozukluklarından hipertansiyona, diyabetten astıma kadar pek çok hastalığı içine almaktadır (Preverskaya, 2018).

Hücre membranında bulunan iyon kanallarından kapılı kanallar kapının açılıp kapanma özelliğine göre voltaj kapılı kanallar ve ligand kapılı kanallar şeklinde sınıflandırılmaktadır (Şekil 6).



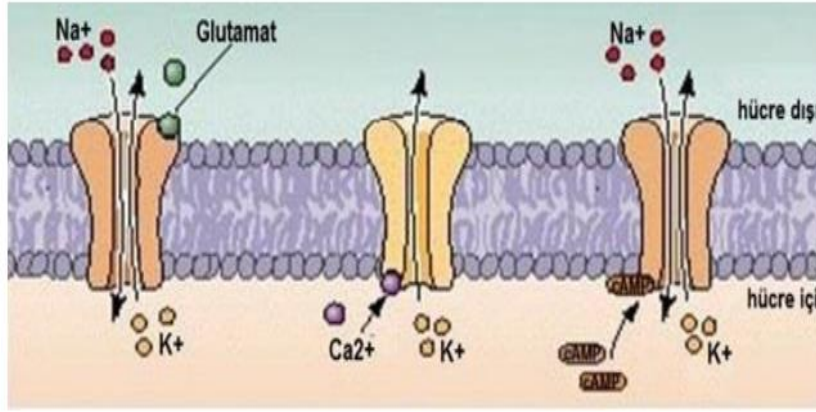
Şekil 6. Farklı tip iyon kanalları (<https://www.cusabio.com/c-20803.html>).

2.7.1. Ligand Kapılı İyon Kanalları

İyonotropik reseptör olarak bilinen ve iyon akışı pasif olan bu kanallar, plazma zarında seçilen iyonların geçişine izin vermekle görevli proteinlerdir. Sinaptik bir iletme aracılık eden bu kanallar, bir nörondan nörotransmitter salınımını ve ardından hızlıca postsinaptik konumdaki reseptörlerdeki aktivasyonu içermektedir (Alexander ve ark., 2011) (Şekil 7). Hücre içi ligand kapılı ve hücre dışı ligand kapılı iyon kanalları olarak iki gruba ayrılmaktadır.

Hücre İçi Ligand Kapılı İyon Kanalları: Hücrelerdeki duyuların iletiminde görevli olan hücre içi ligand kapılı kanallardır. Kokuyu ve ışığı elektrik sinyaline dönüştürmekle yükümlüdürler (Purves ve ark., 2001).

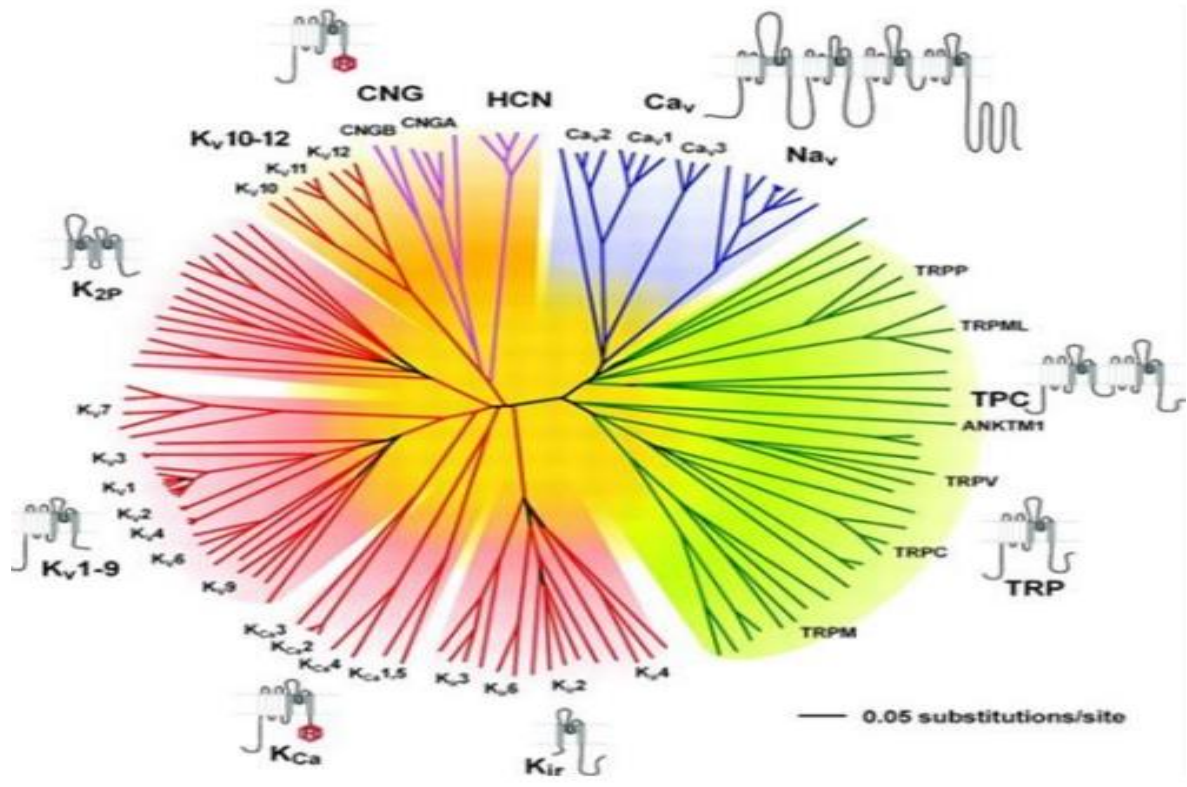
Hücre Dışı Ligand Kapılı İyon Kanalları: Sinaps yoluyla gerçekleştirdikleri iletişim sayesinde hücre dışı ligand kapılı iyon kanalları, nörotransmitterler olarak bilinen kimyasalların ekzositozu ile özelleşmiştir. Örnek olarak y-aminobütirik asit kapılı GABA reseptörleri verilebilir.



Şekil 7. Ligand kapılı iyon kanalı çeşitleri (<http://acikerisim.harran.edu.tr/506100>).

2.7.2. Voltaj Kapılı İyon Kanalları

Voltaj kapılı iyon kanalları membranın potansiyeline bağlı olarak açılırlar ve içinden geçen iyon tiplerine göre de, kalsiyum, potasyum, sodyum ve klorür kanalları olarak adlandırılırlar (Prevarskaya ve ark., 2018 ; Shad ve ark., 2018) (Şekil 8).



Şekil 8. İlgili protein ve voltaj kapılı kanallar arası moleküler ilişki (Catterall ve ark., 2017).

2.7.2.1. Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları (VGCaC)

Sinyal molekülü olarak görev yapan bir ikinci haberci olmasının yanında hücrenin apoptozunda göçünde ve hücre döngüsü de dahil olmak üzere daha temel hücre aktivitelerinde görev alır ve düzenler. (Anderson ve ark., 2019). Bunun yanında endoplazmik retikulum ve mitokondrilerde önemli akışa ve depolama alanlarının salınımına katkı sağlamaktadır (Imaizumi, 2022).

2.7.2.2. Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları (VGKC)

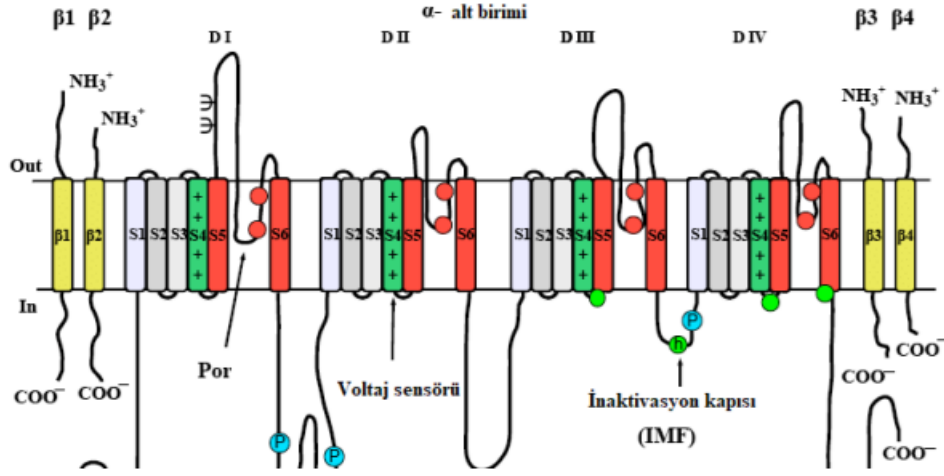
Bütün iyon kanalları arasında en büyük olan ve dört aile üyesinden oluşan voltaj kapılı potasyum iyon kanalıdır. Kanalların alt grupları, geçit mekanizması, alan yapısı ve işlevine göre farklılıklar gösterir. VGKC'ler, depolarizasyonu hücrenin zarında algıladığı zamana kadar ki süreçte kapalı kalır ve bu arada protein konformasyonla sonuçlanarak yapısal olarak değişikliğe uğrar. VGKC'lerin biyolojik işlevleri arasında apoptozun düzenlenmesi, potansiyel yayılım,

kalp kasındaki fonksiyonlar ile hücrede büyüme ve çoğalma hacimsel değişiklikleri kapsamaktadır (Boyle ve ark., 2022).

2.7.2.3. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları (VGSC)

VGSC'ler, 1952'de Hodgkin ve Huxley tarafından keşfedilen voltaj kapılı iyon kanalı alt grubudur ve bu ailede keşfedilen ilk iyon kanalıdır (Yu ve Catterall, 2004; Ruiz ve Kraus, 2015). VGSC; sinir, kas ve diğer kasılabilir hücrelerde membran depolarizasyonuna yanıt niteliğinde aksiyon potansiyelini başlatabilir ve yayabilirler (Wisedchaisri ve ark., 2020). VGSC'ler yapısal olarak 260 kDa por oluşturan büyük bir α alt birimi ile 30-40 kDa iki β alt biriminden oluşmaktadır (Şekil 9). α alt birim, yaklaşık 2000 amino asit kalıntısından oluşan büyük ve tek zincirli polipeptitlerdir. Homolog olan bu dört alanın her biri, altı transmembran sarmaldan S1-S6 oluşmakta olup, α alt birimi, voltaj algılama alanı, seçicilik filtresi, aktivasyon kapısı ve inaktivasyon kapısını kapsamaktadır. Voltaj algılama alanını oluşturan S1-S4 transmembran sarmallarıdır. Bu segmentlerden S4, inaktivasyon sürecini hızlı bir şekilde başlatan, arjinin ve lizin kalıntılarını içeren pozitif yüklü voltaj sensörüdür. Porları açıp kapatmak için konformasyonel değişiklikleri başlatırlar ve hücre içi bir bağlayıcı ile elektrik alanı boyunca hareket ederler. S4-S5 segmentleri arasında fiziksel yönden bağlı olduklarından porlardaki gözeneklerin açılmasını sağlarlar. S5, S6 segmentleri, hücre dışı bağlantı por loopları ile arasındaki bağlanma yoluyla kanal, por, ve seçicilik filtresini oluşturur (Ruiz ve Kraus, 2015; Wang ve ark., 2017). Seçicilik filtresi benzer yük ve yarıçaplara sahip olan iyonları ayıran, porun en dar kısmıdır, DI'de aspartat, DII'de glutamat, DIII'de lizin ve DIV'de alaininden oluşur. Büzülme bölgesi de denilen bu kısım seçici pordan hidratlı Na^+ akışına izin vermektedir. Ayrıca glutamattan oluşan dış halka Na^+ geçirgenliğinde önemli rol oynamaktadır (Ruiz ve Kraus, 2015; Wisedchaisri ve ark., 2019; Barbieri ve ark., 2023) (Şekil 9).

VGSC farklı genler (SCN1A-SCN11A) tarafından kodlanan ve farklı işlevlere sahip Nav 1.1'den Nav 1.9'a kadar dokuz alt tipe ayrılmaktadır. (Tablo 5). İşlevi olmayan bir alt tip Na_x kodlanmaktadır. Bunların dışında, dört β alt birim proteini (β_1 , β_2 , β_3 , β_4) kodlayan dört adet SCN1B, SCN2B, SCN3B ve SCN4B geni bulunur (Tablo 6) (Yu ve Catterall, 2004; Ruiz ve Kraus, 2015; Wang ve ark., 2017).



Şekil 1. Voltaj kapılı sodyum kanalı (VGSC) (Andavan ve Gruber, 2011).

Değişik fizyolojik rollere sahip VGSC'ler farklı hücrelerde oluşur. İşlevlerinde oluşan düzensizlik ile bazı hastalıkları da beraberinde getirmektedir. Uyarılabilir hücreler olan kas ve sinir hücrelerinin yanı sıra glia, lenfosit, fibroblast ve epitel kökene sahip metastatik özellikteki kanser hücrelerinin VGSC ekspresyonlarının yüksek olduğu belirlenmiştir (Diss ve ark., 2004). Son yıllarda giderek artan sayıdaki çalışmalar ile elde edilen birçok in vitro ve in vivo kanıtlar VGSC'lerin, kanalopatik hastalıkların yanı sıra, metastatik kanserdeki rolünü de ortaya koymuştur. Kanser türleri ile ilişkisi, özellikle de zayıf metastatik kanser hücrelerini yüksek metastatik kanser hücreleri ile karşılaştıran deneylerde gösterilmiştir. Prostat, akciğer ve endometriyal kanserlerde ifade edilen Nav 1.7, serviks kanserinde Nav 1.6 ve meme, kolon ve ovaryum kanserinde Nav 1.5 üzerinde yürütülen çalışmalarda bazı VGSC blokerlerinin etkileri de araştırılmıştır (Fraser ve ark., 2003; Fraser ve ark., 2005; House ve ark., 2010; Campbell ve ark., 2013; Drifford ve ark., 2014; Nelson ve ark., 2014; Bugan ve ark., 2016; Djamgoz ve ark., 2019; Horne ve ark., 2021).

Tablo 5. VGSC ye ait α alt birimlerin bulunduğu dokular ve ilişkili olduğu bilinen kanser türleri (Goldin ve ark., 2000; Brackenbury, 2012).

VGSC alt tipleri	Gen	Doku lokasyonu	Kanser tipi
Na _v 1.1	<i>SCN1A</i>	Merkezi sinir sistemi (MSS), Periferik sinir sistemi (PSS), kalp	Yumurtalık
Na _v 1.2	<i>SCN2A</i>	MSS, PSS	Rahim ağzı, mezotelyoma, yumurtalık, prostat
Na _v 1.3	<i>SCN3A</i>	MSS, PSS	Yumurtalık, prostat, küçük hücreli akciğer kanseri
Na _v 1.4	<i>SCN4A</i>	İskelet kası	Rahim ağzı, yumurtalık, prostat
Na _v 1.5	<i>SCN5A</i>	İskelet kası, kalp, beyin	Meme, kolon, lenfoma, nöroblastoma, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, yumurtalık, küçük hücreli akciğer kanseri
Na _v 1.6	<i>SCN8A</i>	MMS, PSS, kalp	Meme, rahim ağzı, lenfoma, melanoma, mezotelyoma, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat, küçük hücreli akciğer kanseri
Na _v 1.7	<i>SCN9A</i>	PSS, nöroendokrin hücreler, duyuşal nöronlar	Meme, rahim ağzı, lenfoma, mezotelyoma, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, yumurtalık, prostat
Na _v 1.8	<i>SCN10A</i>	Duyuşal nöronlar	Prostat
Na _v 1.9	<i>SCN11A</i>	Duyuşal nöronlar	Lenfoma, küçük hücreli akciğer kanseri

Tablo 6. VGSC ye ait β alt birimlerinin bulunduğu dokular ve ilgili olduğu kanser türleri (Brackenbury and Isom, 2011; Brackenbury, 2012).

Protein	Gen	Doku lokasyonu	Kanser tipi
β 1	<i>SCN1B</i>	Kalp, iskelet kası, böbreküstü, MSS, glia, PSS	Meme, rahim ağzı, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat
β 2	<i>SCN2B</i>	MSS, PSS, kalp, glia	Meme, rahim ağzı, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat
β 3	<i>SCN3B</i>	MSS, böbreküstü, böbrek, PSS	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat
β 4	<i>SCN4B</i>	Kalp, iskelet kası, MSS, PSS	Meme, rahim ağzı, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat

Metastatik hücrelerde VGSC α alt birimi hücrelerin invazyon ve migrasyonuna sebep olmaktadır (Brackenbury ve ark., 2008; Onkal ve Djamgoz, 2009). β alt birimi ise zayıf metastatik hücrelerin adhezyon artışı, voltaj kapılı iyon kanallarının ekspresyon seviyelerinin düzenlenmesi sağlamaktadır (Tablo 7) (Brackenbury ve ark., 2008; Kaufmann ve ark., 2010).

Bununla birlikte yeni bazı çalışmalar VGSC’lerde görevli β alt birimlerin α alt biriminin işlevini değiştirebildiğini ortaya koymuştur (Sokolov ve ark., 2018).

Tablo 7. VGSC de yer alan α ve β alt birimlerin kanser hücresindeki fonksiyonları (Brackenbury, 2012).

α alt birimi	β alt birimi
Kuvvetli metastatik hücrelerde yüksek oranda ifade edilir (Onkal ve Djamgoz, 2009). Migrasyon, invazyon olmak üzere metastatik hücre davranışlarını artırır (Brackenbury ve diğ., 2008) α alt birim ekspresyonunu aktiviteye bağlı olarak pozitif geri besleme ile düzenler (Brackenbury ve Djamgoz, 2006; Chioni ve diğ., 2010)	Yüksek derecede zayıf metastatik hücrelerde ekspresse edilir (Jansson ve diğ., 2012). Adhezyonu artırır (Jansson ve diğ., 2012). Süreç genişletmeyi artırır (Jansson ve diğ., 2012). Migrasyonu düzenler (Jansson ve diğ., 2012). α alt birim mRNA ifadesini düzenler (Jansson ve diğ., 2012; Chioni ve diğ., 2009)

2.8. VGSC ve Kanser

VGSC’ler akciğer kanseri, prostat kanseri, meme kanseri ve serviks kanseri gibi birçok kanserde normal olmayan şekilde aşırı şekilde eksprese edilir. Metastatik hücrelerin lateral motilite, migrasyon, invazyon gibi göç ve istila süreçlerinde görevlidirler (Tablo 8) (Wu ve ark., 2020).

Yapılan çalışmalarla akciğer kanseri yüksek metastatik H460 ve H23 hücrelerinde voltaj kapılı sodyum iyon kanalları bulunurken, düşük metastatik A549 hücrelerinde voltaj kapılı sodyum kanalına dair herhangi bir akım belirlenememiştir. VGSC blokeri olan TTX, yüksek metastatik H460 ve H23 hücrelerindeki invazif kapasiteyi yaklaşık yüzde 50 oranında azaltırken, düşük metastatik BEAS-2B ve A549 hücrelerinde herhangi bir etki göstermemiştir. Bu bulgulara göre, VGSC’nin hücrelerin metastatik sürecinin vazgeçilmez bir parçası olduğu düşünülmektedir (Jiang ve ark., 2019).

Pek çok araştırma kanser metastazında VGSC’nin rolünün önemini göstermektedir (Laniado ve ark., 2001; Onkal ve Djamgoz, 2009; Brackenbury ve ark., 2012; Campbell ve ark., 2013; Fraser ve ark., 2014; Martin ve ark., 2015; Mohammad ve ark., 2016). Bununla beraber kanser

hücrelerinin metastazında VGSC'nin mekanizması tam anlamıyla bilinmemektedir. Ayrıca gen ifadesinin düzenmesinde de VGSC'ler görev almaktadır (Jiang ve ark., 2019).

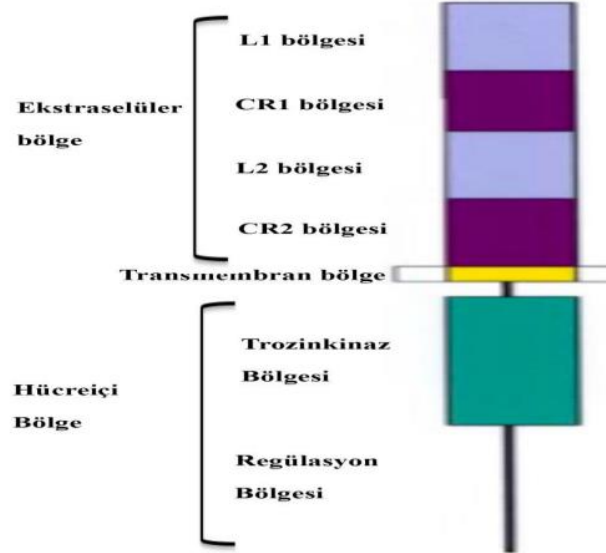
Tablo 8. VGSC'ler tarafından düzenlenen metastatik hücrenin davranışları (Brackenbury, 2012).

Hücresel aktivite	Kanser tipi	Eksprese olan alt birimler
Aşırı büyüme süreci	Meme, prostat	Nav1.5, Nav1.7, $\beta 1$
Galvanotaksi	Meme, prostat	Nav1.5, Nav1.7
Lateral motilite	Meme, mezotelyoma, prostat	Nav1.5, Nav1.7, $\beta 1$, $\beta 2$
Migrasyon	Meme, prostat	Nav1.5, Nav1.7
Endositik membran aktivite	Meme, prostat, küçük hücreli akciğer kanseri	Nav1.5, Nav1.7
Vesikular model	Meme, prostat	Nav1.7
Adezyon	Meme, prostat	Nav1.5, Nav1.7, $\beta 1$, $\beta 2$
Gen ekspresyonu	Meme, kolon, prostat	Nav1.5, Nav1.7, $\beta 1$
İnvazyon	Meme, rahim ağzı, kolon, lenfoma, melanoma, küçük hücreli olamayan akciğer kanseri, prostat	Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, $\beta 1$, $\beta 2$

2.9. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)

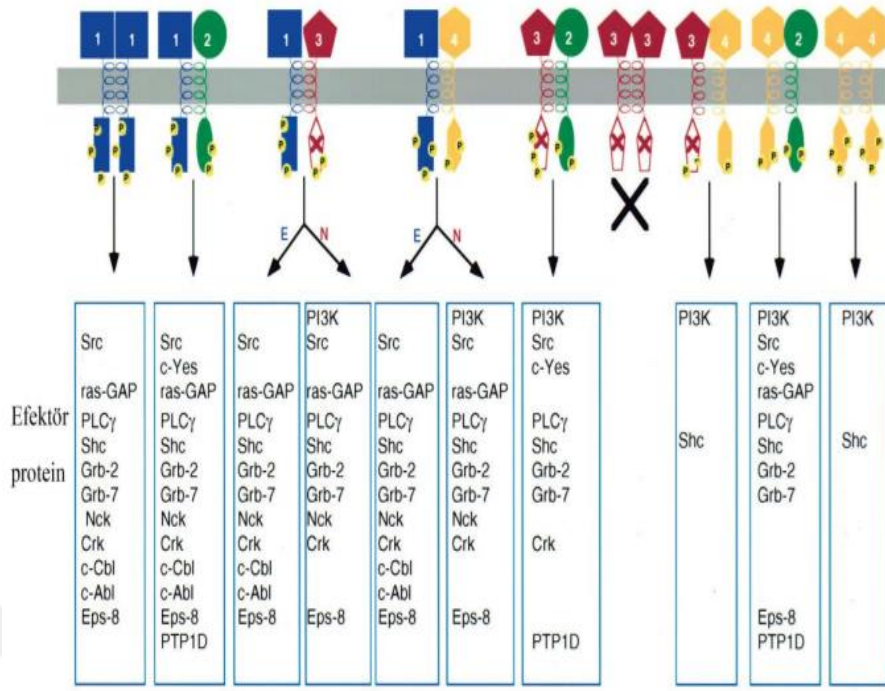
EGFR, epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunan bir tirozin kinaz reseptörüdür ve çeşitli kanser tiplerinde yüksek düzeyde eksprese edilmesi, kanserin ilerlemesi ve kötü prognoz ile ilişkilidir. EGFR geni, 170 kDa ağırlığında ve 1186 aminoasitten oluşan 7p12 kromozom bölgesiyle lokalize transmembran glikoprotein olup, hücre dışı sinyalleri hücre içerisine iletir (Şekil 10) (Miller, 2008). 28 ekzondan oluşan farklı mutant formlarındaki bu proteinin yapısal aktif formu EGFRVIII, en kritik varyantlarından (Talukdar ve ark., 2020).

EGFR, dört üyeden oluşmakta olup, reseptör tirozin kinaz (RTKs) üst ailesinin üyesidir. Bu aile üyeleri ErbB-1/HER-1, ErbB-2/neu/HER-2, ErbB-3/HER-3 ve ErbB4/HER-4 olarak isimlendirilmiştir. Tirozin kinaz ailesinde ilk bulunan reseptör ErbB-1/HER-1 dir. Yapı olarak homoloji gösterdikleri alt birimler transmembran ve ekstraselüler bölgelerdir (Şekil 10) (Yarden, 2001; Ferguson, 2003 ; Burgess, 2003 ; Capuzzo, 2007). ErbB2, diğer ErbB ailesi üyeleriyle dimer oluştururken herhangi bir ligandı tek başına bağlayamazken, ErbB3, işlevsel olmayan kinaz alanına sahiptir aynı zamanda heterodinamik komplekslerde sinyal verebilirler. Bu sinyal yolları arasında MAPK (mitojenle aktive edilen protein kinaz) ve PI3K(fosfatidil-inositol-3kinaz) basamakları yer alır (Irmer ve ark., 2007).



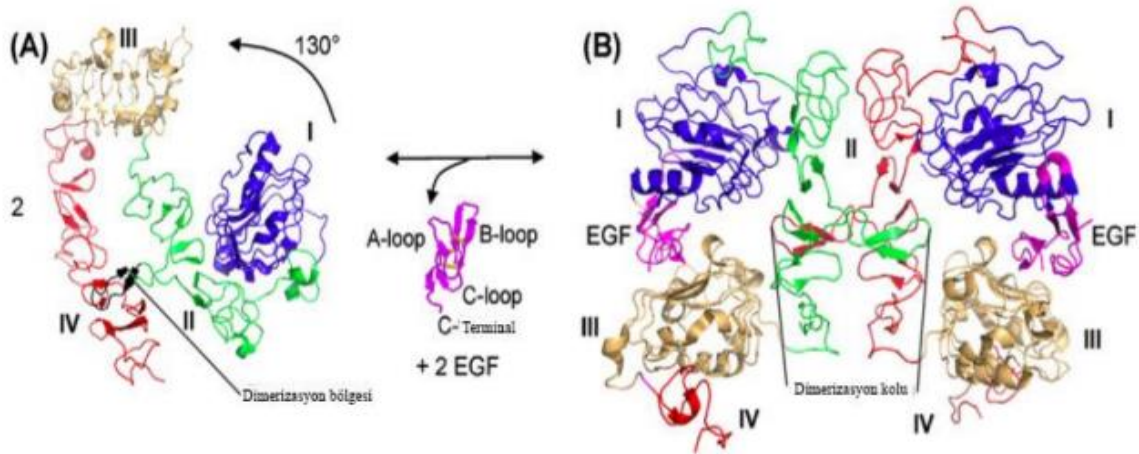
Şekil 10. EGFR'nin yapısal şeması

ErbB ailesi üyelerinin dimerleşmeleri; ErbB-1/ErbB-2, ErbB-1/ErbB-3, ErbB-1/ErbB-4, ErbB-2/ErbB-3, ErbB-2/ErbB-4, ErbB-3/ErbB-4 şeklindedir. Hücre içinde homo-heterodimerizasyonuyla hücrelerin farklı sinyal yolları ile etkileşime girerek, hücre proliferasyonunu artırır, apoptozu inhibe eder, hücre motilitesini ve protein salgısını artırır. Anjiyogenez ve sitokin salınımını uyarır (Şekil 11).



Şekil 11. EGFR ailesine ait heterodimerizasyon ve homodimerizasyon şeması

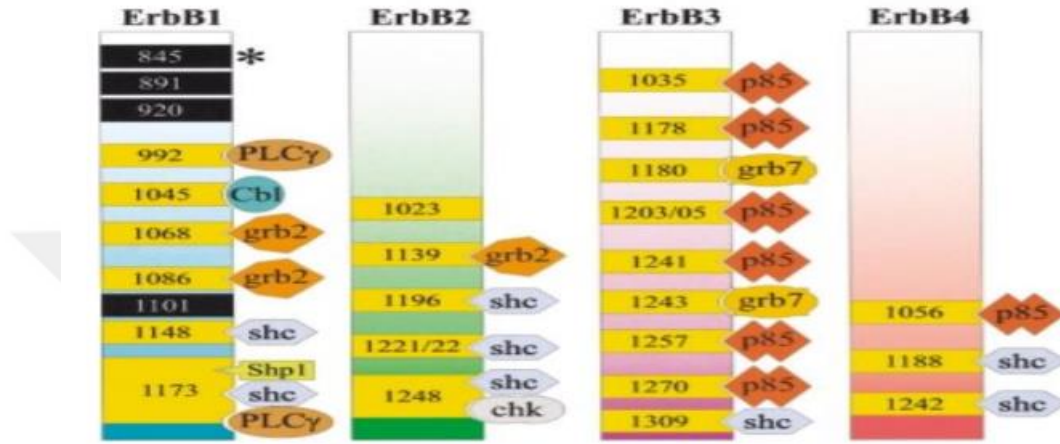
EGFR dimerizasyon şeması (Şekil 12) incelendiğinde anlaşılabacağı üzere bağlanacak olan ligand molekülü önce birinci ve üçüncü kolların arasında bağlı şekilde kalır. Sonrasında ikinci kol 130° dönüş yaparak ortada bir bağ meydana getirir. Dimerin yapısının membrana bağlı halde kalmasını sağlayan ise dördüncü koldur (Roskoski, 2004).



Şekil 12. Epidermal büyüme faktörü reseptörünün dimerizasyonu (Roskoski, 2004)

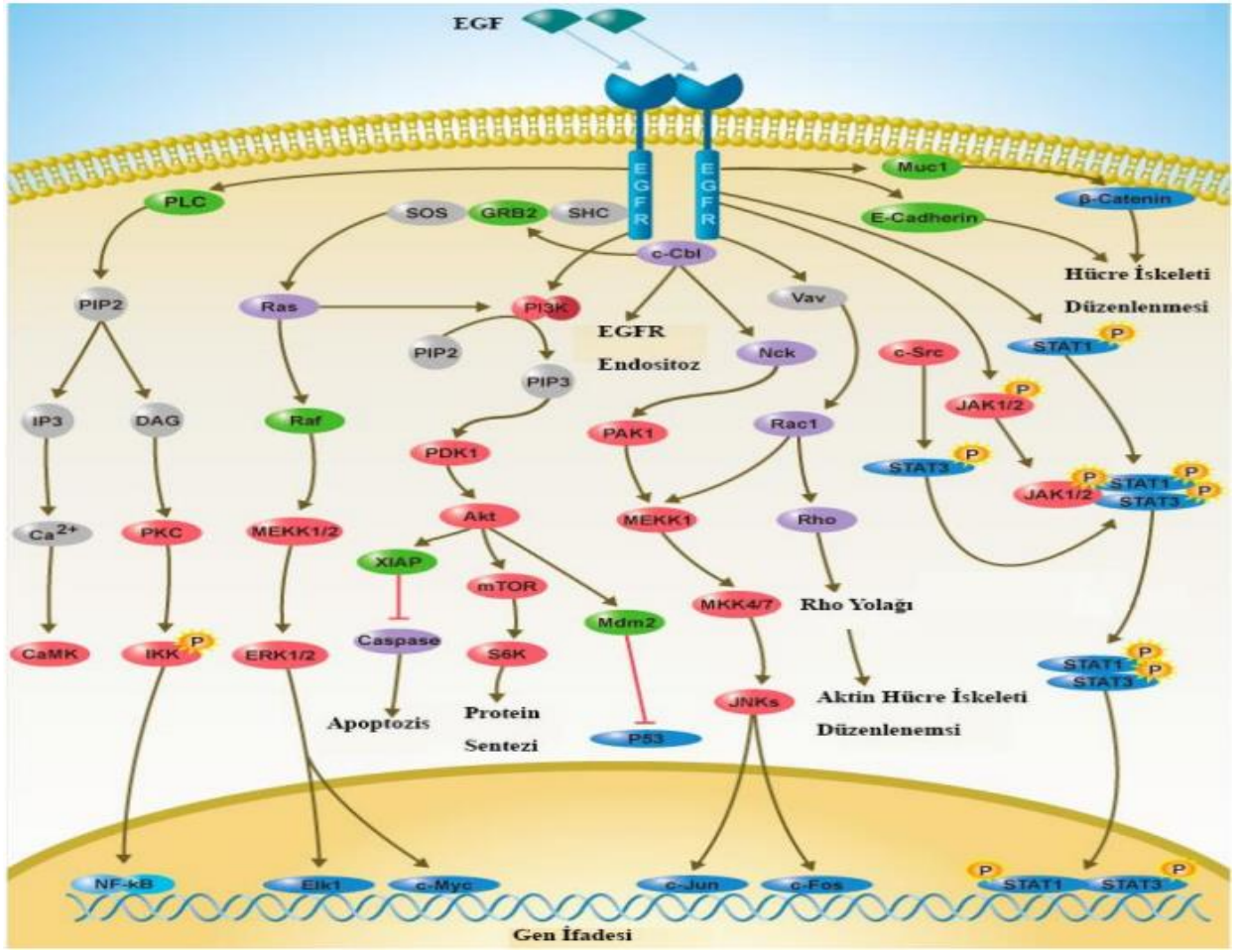
2.9.1. EGFR'nin Alt Yolakları

EGFR'leri otofosforilizasyon sonrasında p85 (C-terminal bölgesi), shc 2 (src homology 2), grb 2, PLCY, shp 1, Cbl, grb7 gibi adaptör proteinlerinin spesifik bağlanma bölgeleri oluşur (Olayioye, 2000) (Şekil 13).



Şekil 13. Adaptör proteinlerinin bağlandıkları bölgeler (Olayioye ve ark., 2000).

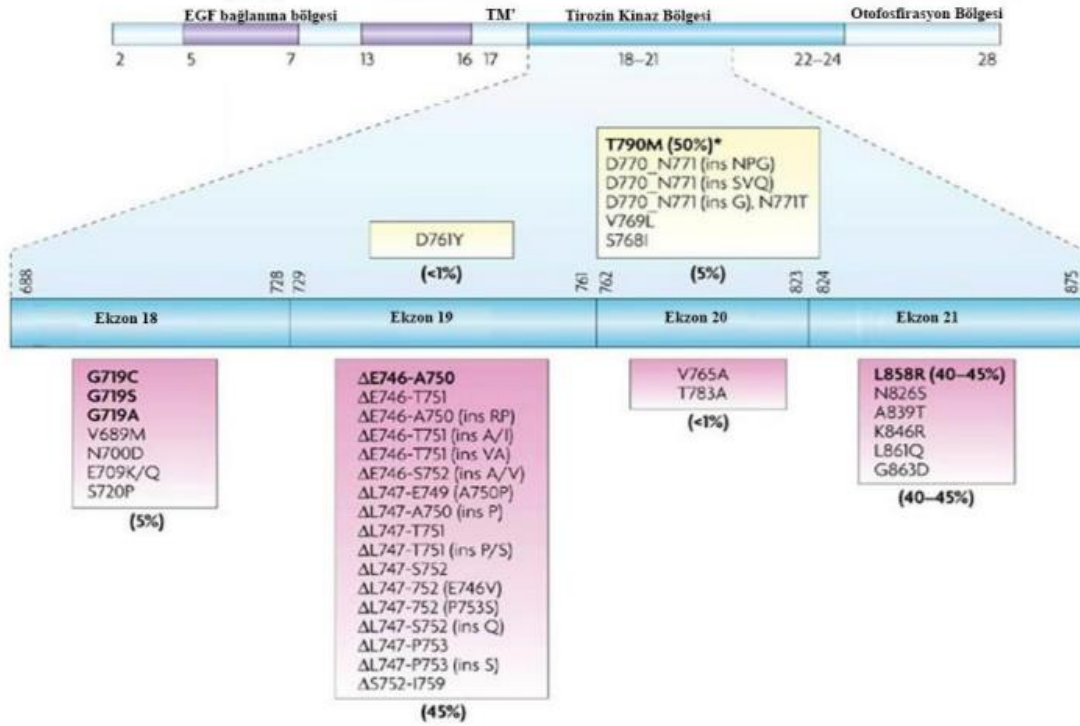
Bu adaptör proteinler hücrenin içerisinde pekçok sinyal yolunda görevli proteinleri fosforile ederler (Şekil 14). Bunun sonunda hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, protein sentezi, hücre sağkalımı ve proliferasyonu gerçekleşir (Olayioye, 2000). B1 sinyal alanı arasında kanserin meydana gelmesinde en kritik role sahip olan PI3K/Akt, Jak/Stat ve Ras/Raf/Mek sinyal yollarıdır (Olayioye, 2000). Farklı kanser türlerinden glioblastomalarda delesyon sonucu ekstraselüler bölge ifadesindeki değişim nedeniyle reseptör devamlı aktive haldedir (Roskoski, 2004). Akciğer kanser hücrelerinde de ErbB ailesinin 18-21 arası mutasyonları EGFR reseptörünün tirozin kinaz bölgesindedir. Kanser hücrelerinin invazyonu, metastazı, proliferasyonu, apoptozisten kaçışı gibi durumların oluşmasını teşvik etmektedir (Roskoski, 2004).



Şekil 14. Epidermal büyüme faktörü reseptör yolları.

Akciğer kanser türünde EGFR’de oluşan mutasyonlar da mevcuttur bunlardan en yaygın olanı T790M ‘dir. Hücrenin dış alanına ligandların bağlanması, tirozin fosforilasyonuna, reseptör dimerizasyonuna ve aşağı yönde görevli sinyal yollarının aktivasyonuna öncülük eden konformasyonel değişikliklere neden olurlar (Şekil 15) (Cooper ve ark., 2022).

EGFR, diğer bazı malign olmayan dokularda eksprese olmasına rağmen küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve diğer bazı kanserlerde yüksek oranda ekprese edildiğinden bir süredir terapötik hedef olarak görülmekte ve bu alanda yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Cooper ve ark., 2022).



Şekil 15. Akciğer kanserinde görülen epidermal büyüme faktörü reseptör mutasyonları (Sharma, 2007).

2.9.2. EGFR Tirozin Kinaz İnhibitörleri

EGFR sinyal yolunu bloke eden ilk moleküller gefitinib ve erlotinib'dir. İlk olarak 2000'li yıllarda gefitinib ve erlotinib KHDAK'lı hastalarda denenmiş ve orta düzeyde bir etki gösterdiği belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarla erlotinib ve gefitinib'in, hızlı tümör yanıtları KHDAK' de hedef odaklı tedaviye karşı ilk değerlendirmeleri vermiştir. Ancak EGFR inhibitörlerine karşı kazanılan direnç mekanizması bir yılda gelişim göstermiştir. En sık karşılaşılan direnç mekanizması T790M mutasyonu olan ve ATP ye bağlanmasını arttırmasıyla gefitinib ve erlotinibe bağlanmayı sınırlaması olarak saptanmıştır (Cooper ve ark., 2022).

Afatinib, HER2 ve EGFR'ye kovalent bağ ile bağlanacak şekilde tasarlanmış EGFR/HER2 inhibitörüdür. FDA tarafından 2015 yılında onaylanan Osimertinib, mutant EGFR'nin ATP bağlanma bölgesinde kovalent bağlar oluşturarak EGFR T790M mutasyonunu seçici olarak hedefler. Gefitinib veya erlotinib'den daha iyi etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. (Huang ve ark., 2021).

Erlotinib anjiyogenez ve tümörün büyümesiyle bağlantılı bir tirozin kinaz inhibitörü olarak moleküler anomalilere karşı savaşılmaktadır. Kanserin ilerlemesini durduran reseptörlerin inhibisyonu bazen tümör direncinin gelişmesine katkı da sağlayabilmektedir. Erlotinib, birçok kanserde mevcut olarak yer alan insan epidermal büyüme faktörü (EGF) tirozin kinaz reseptörleri HER1 ve EGFR'ye karşı özel bir aktiviteye sahiptir. Günümüzde küçük hücre dışı akciğer kanseri hastalarında spesifik rahatsızlıkları olan ve ameliyat edilemeyen hastalarda birincil basamak tedavi olarak kullanılmaktadır.

Günlük 150 mg'lık tablet şeklinde kullanılması önerilen erlotinib'in bazı yan etkileri de görülmektedir. Döküntü, anoreksi, ödem, karın rahatsızlıkları, baş ağrısı, el ve ayak sendromları, cilt renginde değişiklik gözlenmesi, yorgunluk, anemi, kaşıntı ve öksürük. Yaygın olmayan yan etkileri olarakta interstisyel akciğer rahatsızlığı, gastrointestinal perforasyon, pankreatit, kalp rahatsızlıkları, böbrek yetmezliği, cilt rahatsızlıkları ve de embriyo-fetal toksisite sayılabilir.

EGFR tirozin kinaz inhibitörü olan erlotinib'in faz II çalışmaları, EGFR mutasyonlu tümörlere karşı oldukça aktif olduğu gerçeğinin yanında KHDAK'lı hastalarda aktivitesi sınırlı olmakla birlikte genel sağkalım açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır (Hsu W.H. ve ark., 2018).

Tümör baskılayıcı miRNA olan miR-223'ün, akciğer kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerindeki varlığı bilinmektedir. miR'nin yüksek oranda eksprese olmasını indüklemek için erlotinib'e dirençli PC-9 akciğer hücrelerinde miR-223 modeli oluşturulmuştur ve 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M ve 500 μ M erlotinib konsantrasyonları uygulanmıştır, miR-223'ün in vitro apoptozu indüklemesi sağlanarak PC-9 hücrelerinin erlotinib'e duyarlılığını arttırmıştır. Aynı çalışmada in vivo olarak nude farelere PC-9 hücreleri enjekte edilerek İki haftalık erlotinib uygulanmasından sonra farelerin tümör kütlesi ölçülmüştür. Erlotinib uygulanmış PC-9 hücreleri kontrol grubuna göre beş kat daha büyüktü, PC-9/ER-miR-223 tümörü taşıyan nude farelerde tümör büyümesinde inhibisyon gözlenmiştir ve tümör kütlesi kontrol grubuna oranla yaklaşık %60 daha büyük olduğu görülmüştür (Zhao ve ark., 2016).

İnsan akciğer kanser hücresi olan HCC827'ye 0,001 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarda erlotinib uygulanmasıyla ilaca olan direnci gösterilmiştir. Ubikuitin ligaz enzimi olan NEDD4'ün rolünü belirlemek için HCC827 hücresinde NEDD4 mRNA seviyesi ve protein ekspresyonu qRT-PCR ile analiz edildiğinde, kontrole kıyasla erlotinib uygulanan HCC827 hücrelerinde mRNA seviyesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Yapılan western blot analizi ile de NEDD4 ekspresyonunun bu hücrelerde artması qRT-PCR sonuçları ile de paralellik göstermektedir (Sun ve ark., 2017).

Zhou ve arkadaşlarının (2017), özofagus skuamöz hücreli karsinom hücreleri olan OE21 ve KYSE140 hücrelerine 1µM erlotinib uygulandığında AKT ve ERK'nin fosforilasyonunu inhibe ettiği, dirençli TE8, KYSE30 ve KYSE520 hücrelerinde daha az inhibisyon görülmüştür. Dolayısıyla seçilen özofagus skuamöz hücreli karsinoma hücrelerinde bazılarının proliferasyonu engellediği, hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozu indüklediği görülmektedir. Yapılan in vivo çalışmayla da OE21 ksenografları barındıran nude farelere tümör oluştuktan sonra erlotinib (1µM), palbociclib(1µM) ile kombinasyon tedavisine başlanmıştır, yaklaşık dört hafta sonra tek başına uygulanan erlotinib, tümör büyümesini çok daha yavaş şekilde devam ettirdiği görülmüştür bunun yanında palbociclib monoterapisi ile tümörün büyümeye devam ettiği gözlenmiştir yaklaşık üç hafta sonra ise büyüme tümör büyümesi sabit kalmıştır, erlotinib/palbociclib kombinasyonu beraber uygulandığında ise tümör hacminde tutarlı azalma görülmüştür. Bu çalışma ayrıca, erlotinib'in palbociclib ile uygulanmasıyla direncin bloke edildiğini net bir şekilde göstermiştir.

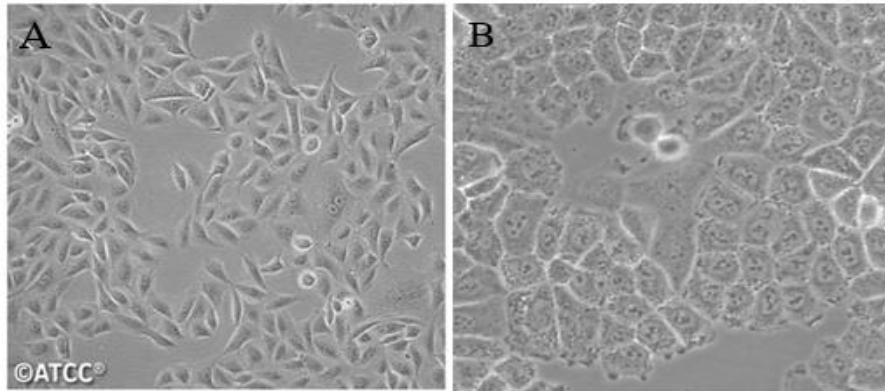
Bu şekilde kanser hücrelerinin hücre proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu, metastatik aktivitesi, apoptozu üzerine erlotinib'in etkisi pek çok araştırma olduğu görülmektedir. Literatürde, erlotinib'in VGSC'ler üzerine etkisi ile alakalı sınırlı oranda çalışma bulunmaktadır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmada iki farklı KHDAK hücresi kullanılmış olup, bunlardan A549 hücre hattı 1972’de erkek bir hastanın tümörlü akciğer dokusundan alınarak in vitro ortamda yetiştirilmiştir (Giard, Aaronson ve ark., 1973). Yüksek metastatik olan H460 hücre hattı ise, 1982 yılında büyük hücreli akciğer karsinom erkek hastanın plevral sıvısından elde edilmiştir (Şekil 3.1). Düşük metastatik A549 hücre hattı laboratuvarımızda devam eden kültürden, yüksek metastatik H460 hücre hattı ise, İstinye Üniversitesi Tıp Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarından getirilerek, yetiştirilmiş ve çalışmada kullanılmıştır.

H460 (ATCC - HTB-177™) ve A549 (ATCC - CCL-185™) hücreleri RPMI-1640 besiyerine, ek olarak %10 fetal bovin serum (FBS), 5 ml penisilin/streptomisin ve 1 mM sodyum pirüvat içeren petrilerde bulunan medyumda, 37°C, %5CO₂ li inkübatörde yetiştirilmiştir. Stok olarak -86°C’de bulunan düşük metastatik A549 ve yüksek metastatik H460 hücre hatlarının deneye hazırlanabilmesi için hızlı bir şekilde eritilen hücre stoğu 1 ml besiyeri ile yavaş bir şekilde pipetaj yapılarak, içerisinde 6 ml besiyeri bulunan 100 cm² lik hücre kültürü petrilere ekilir. Hücreler günlük olarak inverted mikroskop ile incelenerek, petri kabının %80’ninden fazlasını kaplaması sonucunda, tripsin ile 5-7dk muamele edilerek hücrelerin petriden kalkmaları sağlanır. Hücrelerin tamamına yakını petriden ayrılmış ise, dikkatle toplanarak, hücreler RPMI1640 besiyeri bulunan santrifüj tüpüne eklenir. Santrifüj edildikten sonra süpernatant atılır ve üzerine taze besiyeri konularak homojen bir hücre süspansiyonu oluşturulur. Hücreler tripan mavisi yöntemi ile hemositometrede sayılarak 1 ml’deki hücre sayısı belirlenir.



Şekil 3.1. Düşük metastatik A549 (A) ve yüksek metastatik H460 (B) akciğer kanseri hücreleri (10x)

3.2. Hücre Dondurma

Stok hücre oluşturmak için gerçekleştirilen hücre dondurma prosedürü, pasajlama işleminde olduğu gibi yürütülür ve santrifüj aşamasından sonra, süpernatant atılır. Hücrelerin üzerine 1 ml dondurma besiyeri (Freezing Media= FBS: RPMI1640: DMSO, 7:2:1) eklenip iyice pipetaj yapıp homojen bir süspansiyon elde edilir. Oluşan bu süspansiyon kriyoviyal tüpe aktarılır. Etiketlemesi yapıp yavaş yavaş dondurulmak üzere önce -21°C ye konur, ardından -86°C derin dondurucuda saklanır (Freshney ve ark., 1987).

3.3. Farmakolojik Ajanların Hazırlanması

Erlotinib (OSI-774) (Apollo SCL), DMSO içinde çözülerek hazırlanır ve -21°C'de saklanır. Erlotinib, 1 ml dimetil sülfoksit (DMSO) içine 4 mg eklenerek çözündürülmüş ve 1mM ana stok hazırlanmıştır. DMSO miktarı %0,1'dir. Literatürde erlotinib'in küçük hücreli dışı akciğer kanseri üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalarda dozlar değerlendirildikten sonra çalışmada kullanılacak konsantrasyonlar ön denemeler ile belirlenmiştir. Deney yapıldığı sırada 0,01µM ve 0,02µM konsantrasyonları taze medyum ile seyreltilerek kullanılmıştır.

Spesifik VGSC blokeri olan Tetrodotoksin (TTX) (Alomone Labs), pozitif kontrol olarak pH 7.4'te fizyolojik tuzlu suda 1mg'ı 1ml distile suda çözünmüş, 3132 µM ana stok olarak hazırlanmış ve -21°C'de saklanmıştır. TTX, tüm deneylerde 600 nM konsantrasyonunda kullanılmıştır.

3.4. Hücre Büyüme Analizi

Hücrelerin büyüme eğrilerinin ortaya konulması için, H460 ve A549 hücreleriyle büyüme deneyi yapılmıştır. Büyüme deneyi için 96 kuyucuklu hücre kültür pleyti kullanılmış ve her kuyucuğa 2×10^3 , 4×10^3 , 6×10^3 , 8×10^3 , 10×10^3 , 12×10^3 , 14×10^3 hücre olmak üzere farklı sayıda hücre ekilmiştir. Kültür medyumları eklenmiş ve her 24 saatte bir tazesini ile değiştirilmiştir. H460 ve A549 hücrelerinin 24. ve 48. saatteki büyümelerini saptamak üzere MTT yöntemi kullanılmıştır. Pleytin kuyucuklarındaki medyumlar çıkartılarak, 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) – 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) eklenmiş ve dört saat karanlıkta tutulmuştur. Bu süre içerisinde sarı renkli tetrazolyum tuzu canlı hücrelerin mitokondri aktivitesi sonucunda, mor renkli formazan kristallerini oluşturmuştur. 4 saat sonra MTT çıkarılarak kuyucuklara organik çözücü DMSO ve glisin eklenmiştir. Canlı hücre sayısına paralel olarak oluşan mor formazan

kristalleri DMSO ve glisin eklenmesi ile pembe-mor renk meydana getirmiştir. Tüm kuyucuklar, bir mikropilaka absorban okuyucusunda (iMark™ BioRad) 570 nm dalga boyunda okunmuştur. Her hücre hattı için deney minimum üç kez tekrarlanmış ve elde edilen absorban değerlerinden hücre sayısı ile zamana bağlı büyüme grafiği çizilmiştir.

3.5. Toksikite

Kullanılan farmakolojik ajan, erlotinib'in H460 ve A549 hücreleri üzerinde toksik etkisi olup olmadığını belirlemek üzere tripan mavisi yöntemi kullanılmıştır. Toksikite deneyi için altı kuyucuklu hücre kültürü pleytlerine kuyucuk başına 3×10^4 hücre ekilmiştir. Kültür medyumunu ile gece boyunca 37°C sıcaklıktaki %5 CO_2 inkübatörde tutulmuştur. 24 saatte hücreler invert mikroskopta kontrol edildikten sonra, kontrol grubu için hücrelere kültür medyumunu, deney gruplarına ise, 0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 20 μM erlotinib ile negatif kontrol olarak DMSO içeren kültür medyumunu uygulanmıştır. Her 24 saatte medyum değiştirilmiş ve 48 saatlik erlotinib uygulamasından sonra medyumlar kuyucuklardan çıkarılmış ve 0,2 ml tripan mavisi ile 10 dakika bekletildikten sonra boya uzaklaştırılmış ve FBS içermeyen taze kültür medyumunu eklenmiştir. 40x objektif ile invert mikroskopta, 40 farklı alandaki mavi renkli ölü hücreler ile boyanmamış canlı hücreler sayılmıştır. Her hücre hattı için deneyler üç paralel olarak yürütülmüş ve ölü hücre yüzdesi hesaplanarak grafik çizilmiştir.

3.6. Hücre Proliferasyonu

Yüksek metastatik H460 hücreleri ve düşük metastatik A549 hücreleri ayrı iki 96 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 2×10^4 hücre olacak biçimde ekim yapılır. 24 saat boyunca 37°C , %5 CO_2 li inkübatörde kültür medyumunu ile yetiştirilir. İnkübasyon sonrasında kontrol ve DMSO içeren kuyucukların yanı sıra deney gruplarına 0,01 μM , 0,02 μM , 0,05 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM konsantrasyonlarda hazırlanmış olan erlotinib ilave edilir. 24 ve 48 saat olmak üzere iki ayrı sürede hücreler erlotinib ile tedavi edildikten sonra her kuyucuktaki besiyeri çıkarılıp 100 μl MTT çözeltisi eklenir ve alimünyum folyoya sarılı şekilde dört saat boyunca inkübatörde bekletilir. Bu süre sonunda kuyucuklardaki MTT çözeltisi atılır, oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için her bir kuyucuğa 89 μl DMSO ve 11 μl glisin eklenerek meydana gelen boya absorbanı, mikropilaka okuyucuda (iMark™ BioRad) 570 nm dalga boyunda

ölçülür (Budan ve ark., 2015). Deneyler her hücre için üç kez tekrarlanmış ve elde edilen absorbanans değerlerinin hücre sayısı ile zamana bağlı grafiği çizilmiştir.

3.7. Koloni Oluşum Analizi

Erlotinib'in hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri üzerindeki etkisini incelemek üzere koloni oluşum deneyi yapılmıştır. Altı kuyucuklu pleyte her kuyucuğa 2×10^4 hücre olacak şekilde hücrelerin ekimi yapılmış ve bir gecelik inkübasyondan sonra deney grubu hücrelere erlotinib uygulanmıştır. 48 saat süre ile erlotinib uygulanan kontrol ve deney grupları normal medyum ile değiştirilmiş ve sonraki, 14 gün süresince hücreler büyümeye bırakılmıştır. Her dört günde bir grupların medyumları taze ile değiştirilmiştir. 14. günde metanol ile tesbit edilen hücreler, %0,5 kristal viyole ile boyanmıştır. (Franken ve ark., 2006). İnvert mikroskop kullanılarak her kuyucuktan rastgele 40 alandaki koloni sayısı sayılmış ve grupların ortalamaları ile grafikler çizilmiştir. Deneyler üç kez tekrarlanmıştır.

3.8. Apoptotik Hücre Ölümü

Erlotinib'in yüksek metastatik H460 ile düşük metastatik A549 akciğer kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin belirlenmesi için, Annexin V-FITC apoptoz tespit kiti kullanılmıştır. Annexin V-FITC kiti, üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde kullanılarak akış sitometresi ile hücre zarının dış katmanındaki fosfatidilserin aracılığıyla saptanmıştır. Kit içerisinde ayrıca, degrede edilmiş hücrenin zarına giren nükleus ve kromozomu boyayan propidyum iyodür (PI) bulunmaktadır. Altı kuyucuklu pleytlere 10×10^4 hücre ekilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. 24 ve 48 saatlerde kontrol grubu kültür medyumunu ile değiştirilmiş, deney gruplarına erlotinib 0,01 μ M ve 0,02 μ M olarak uygulanmıştır. 48 saat sonra hücreler tripsin EDTA ile toplanıp 2500 g'de santrifüj edilmiştir. PBS ile yıkandıktan sonra 200 μ L bağlama tamponu (1x) içinde yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. 5 μ L Annexin V-FITC eklenerek pipetaj yapılmıştır. Oda sıcaklığında 15 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra hücrelere 5 μ L propidyum iyodür (PI) eklenmiştir. Hücre ölümü FACS (BD Accuri™) analizi ile gerçekleştirilmiş ve grafikler çizilmiştir. Her hücre hattı için deneyler üç kez tekrarlanmıştır.

3.9. Lateral Hareket (Migrasyon/Motilite)

Akciğer kanseri yüksek metastatik H460 ve düşük metastatik A549 hücrelerinde erlotinib'in hücrenin lateral hareketi yani hücrenin motilitesi/migrasyonu üzerine olan etkisi, yara iyileşme modeli ile belirlenmiştir. Kontrol, TTX ve deney grupları için alt yüzü çizilerek hazırlanan 35 mm'lik steril petrilere 3×10^5 hücre olarak ekilir. Hücrelerin ekilmesinden 24 saat sonra petrilere yara oluşturulur. Medyum değiştirildikten sonra invert mikroskop altında mikrometrik oküler ile, çizgilerin kesiştiği noktalardaki yara genişlikleri ölçülerek, 0.saatteki yara genişliği (W_0) saptanır. Petrilere kontrol ve deney medyumları ilave edilerek, 24. ve 48. saatlerdeki yara genişlikleri (W_t) yeniden ölçülmüş ve her ölçümde medyumları değiştirilmiştir. Değerler $MI=1 - (W_t - W_0)$ formülünde yerine konularak hücrenin migrasyon indeksi (motilite indeksi=MI) hesaplanmıştır. W_0 , 0. saatteki yara genişliği; W_t ise, 24 veya 48. saatlerdeki yara genişliğini vermektedir (Fraser ve ark., 2014). Her grup için minimum üç adet petri kullanılmış ve deneyler en az üç kez tekrarlanmıştır.

3.10. Protein İzolasyonu

Yüksek metastatik H460 hücreleri ve düşük metastatik A549 hücreleri 100 mm'lik petrilere 2×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılır. 24 saat sonunda hücrelerin yapışıp yapışmadığı kontrol edildikten sonra, deney grubuna belirlenen konsantrasyonda erlotinib uygulaması yapılır. Ardından 24 saatlik inkübasyon sonunda hücrelerin medyumunu çıkarılır ve 1 ml 1X PBS ile petri yıkanır. Daha sonra petrilere soğuk 1-1,5 ml 1X PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) eklenir ve hücreler kazınarak ependorfa toplanır, 13.200 rpm'de, 2 dakika santrifüj edilir ve süpernatant kısım olan üst faz atılır. Bu işlem iki kere tekrarlanır. Pellet miktarına göre RIPA tamponu (RIPA Lysis Buffer) eklenir. RIPA tamponu eklendikten sonra pipetaj işlemi uygulayarak pellet çözündürülür. Kısa süreli vortex uygulamasından sonra ependorf çalkalayıcıda çalkalanır. Çalkalama sonrasında 20 dakika boyunca 13.200 rpm'de santrifüj yapılır. Süpernatant, protein içeriği, farklı bir ependorfa alınır ve -86°C 'de muhafaza edilir (Lobb ve ark., 2015).

3.11. QRT PCR

RNA Ekstraksiyonu ve Pürifikasyonu: TRIzol Reagent total RNA izolasyonu için kullanılmıştır. TRIzol Reagent eklendikten sonra soğuk kloroform ilavesi ile 14 g'de 15 dk santrifüj yapılır ve üst faz alınır, purezole eklenen miktarda izopropanol ilavesi yapılarak, 14 g

'de 10 dk santrifüj ile RNA çöktürülür. Elde edilen RNA pelleti, DEPC su içerisinde çözündürüldü. Elde edilen total RNA' nın konsantrasyonu ve saflık derecesi kantitatif olarak Nanodrop cihazı ile 260/280 nm' lık absorbansta spektrofotometrik olarak tayin edilir (Diss ve ark., 2005).

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

Jelde Yürütme: Total RNA ürünlerinin bütünlüğü % 0,8'lik agaroz jel elektroforez yöntemi ile görüntülenir. 1X TBE tamponunun içerisine 0,8 gr agaroz ilave edilerek karışım hızlanır. Kaynatılan agaroz, 10 dk oda sıcaklığında soğutularak içerisine red safe ilave edilmiş ve hava kabarcıkları olmaksızın önceden hazırlanmış olan jel plağına dökülerek katılması sağlanmıştır. İlk kuyucuğa 1 kb marker yüklendikten sonra, sırasıyla diğer kuyucuklardaki örnekler brom-fenol mavisi ile karıştırılır ve 80V akımda 40 dk yürütülür. Bantlar ultraviyole ışık altında incelenir ve RNA zincirinin bütünlüğü Science UV Translüminatör ile görüntülenir (Diss ve ark., 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 dk 'Taq' polimeraz aktivasyonu; 95°C'de 30 saniye denatürasyon; 60°C'de 30 saniye primer bağlanma ve uzama olmak üzere 35 siklustan oluşan deney protokolü uygulandı. Nav 1.7 için amplifikasyon döngüleri 2-ΔΔCt yöntemi ile analiz edildi (Livak ve ark., 2001). Kullanılan primerler Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. Nav1.7 ve Beta-actin forward ve reverse primerler

Gene Name	Gene Product	Forward primer 5'>3	Reverse primer 3'>5'
SCN9A	Nav 1.7	GGCTCCTTGTTTCTGCAAG	TGGCTTGGCTGATGTTACTG
ACTB	Beta-Actin	TCACCCACATGTGCCATCTACGA	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG

3.12. İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Deneylerden elde edilen tüm veriler ortalama $\pm$ SE olarak verilmiştir. Kontrol ve tedavi grupları arasındaki farkı değerlendirmek için t-testi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda $P < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

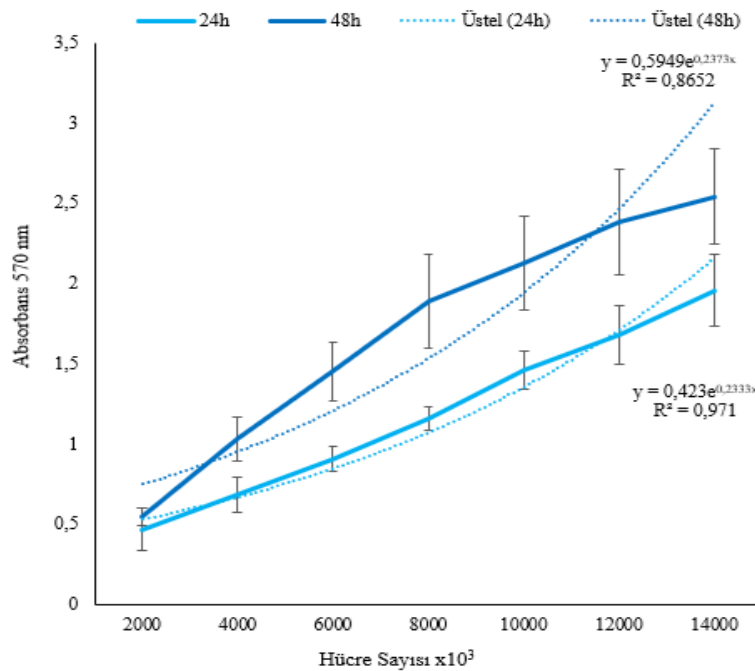


4. BULGULAR

Akciğer kanseri hastalarında hedefe yönelik tedavi amaçlı olarak klinikte kullanılan tirozin kinaz inhibitörü erlotinib'in küçük hücreli dışı akciğer kanseri yüksek metastatik H460 ve düşük metastatik A549 hücrelerinin büyüme, toksisite, proliferasyon, koloni oluşumu ve apoptozu üzerindeki etkilerinin yanı sıra metastatik potansiyeli arttırıcı özelliğe sahip Nav 1.7 VGSC'ler üzerindeki etki profili migrasyon indeksi ve qRT-PCR ile in vitro olarak araştırılmıştır.

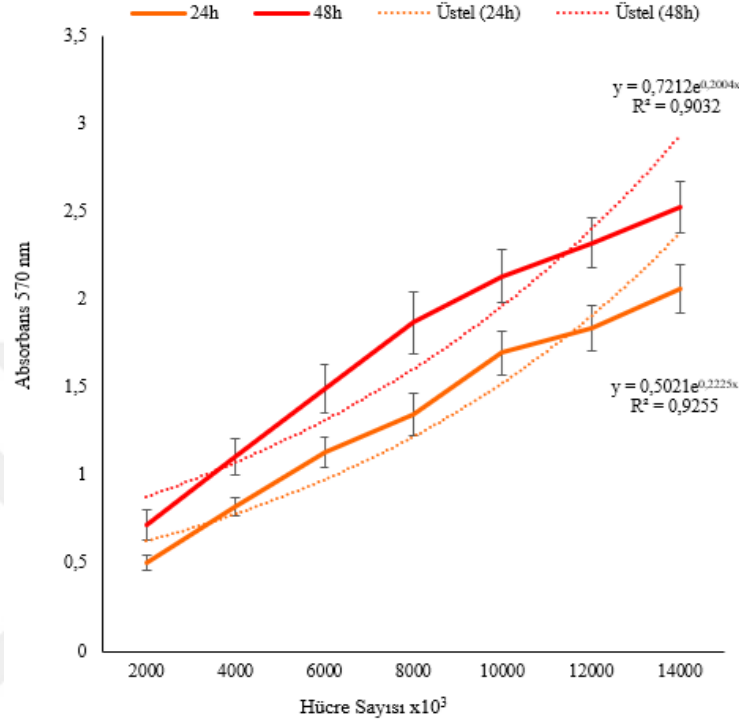
4.1. Hücrede Büyüme

Erlotinib'in etkileri değerlendirilmeden önce hem yüksek metastatik H460 hem de düşük metastatik A549 hücrelerinin in vitro ortamdaki büyüme özellikleri belirlenmiştir. Hücre kültür pleytinin her kuyucuğuna 2×10^3 , 4×10^3 , 6×10^3 , 8×10^3 , 10×10^3 , 12×10^3 ve 14×10^3 olarak ekilen hücrelerin, 24. ve 48. saatlerde elde edilen absorbans değerleri grafik şeklinde verilmiş ve korelasyon katsayısı belirlenmiştir (Şekil 4.1). Şekil 4.1'de yüksek metastatik H460 hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki absorbansı ile hücre sayısı arası ilişki incelendiğinde, büyüme eğrilerinin her iki saatte de absorbans ile hücre sayısının paralel olarak artış gösterdiği izlenmektedir. H460 hücrelerinin büyüme eğrisindeki 24. ve 48. saatteki korelasyon katsayısı sırasıyla 0,971 ve 0,8652 olarak saptanmıştır.



Şekil 4.1. Yüksek metastatik H460 hücrelerinin 24. ve 48. saatlerde zamana bağlı absorbansı.

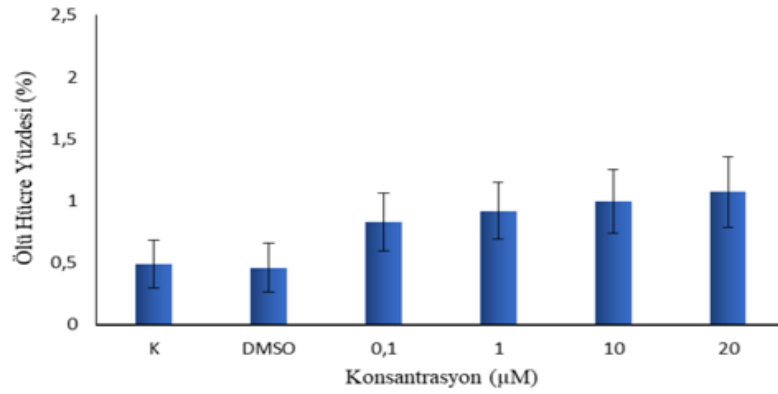
Düşük metastatik A549 hücrelerinin büyüme eğrileri incelendiğinde; araştırılan her iki saatte de hücre sayısındaki artışa bağlı olarak absorbansın'da arttığı görülmektedir. A549 hücrelerinin büyüme eğrisindeki 24. ve 48. saatlerdeki korelasyon katsayısı sırasıyla 0,9255 ve 0,9032 olarak saptanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Düşük metastatik A549 hücrelerinin 24. ve 48.saatlerde zamana bağlı absorbansı.

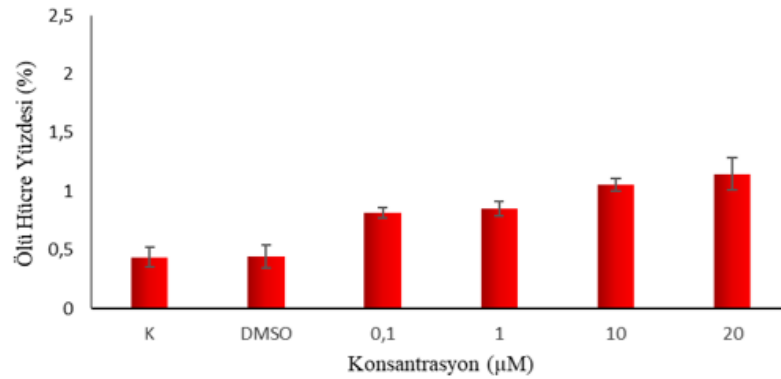
4.2. Toksisite

DMSO'da çözünen Erlotinib'in yüksek metastatik H460 ve düşük metastatik A549 küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde toksik etki gösterip göstermediği tripan mavisi yöntemiyle ölü hücrelerin yüzdesi hesaplanarak belirlenmiştir. Şekil 4.3'te çizilen grafikte görüldüğü gibi, yüksek metastatik H460 hücrelerine DMSO, 0,1µM, 0,2µM, 10 µM, 20 µM erlotinib uygulanması sonucu ölü hücre yüzdesi konsantrasyon artışı ile biraz artmakla birlikte, istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın bulunmadığı ($P>0,05$) dolayısıyla, erlotinib'in hücreler üzerinde toksik bir etki göstermediği saptanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Erlotinib'in H460 hücreleri üzerindeki toksik etkisi.

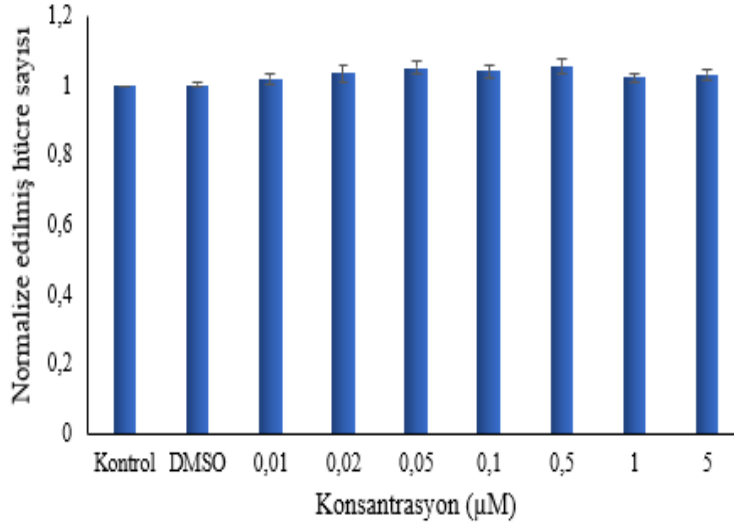
Düşük metastatik A549 hücreleri ile yapılan deneylerde saptanan ölü hücre yüzdesine göre, hem DMSO hem de erlotinib konsantrasyonları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ölü hücre yüzdesinin konsantrasyon artışıyla artmakla birlikte, bu farkın anlamlı olmadığı ($P>0,05$) ve toksik bir etki göstermediği saptanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Erlotinib'in A549 hücreleri üzerindeki toksik etkisi.

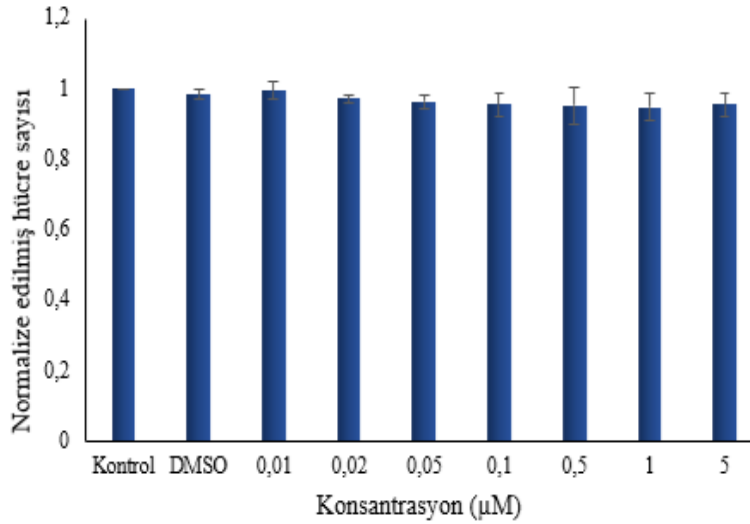
4.3. Hücre Proliferasyonu

Belirlenen Erlotinib konsantrasyonlarının yüksek metastatik H460 hücrelerine Bölüm 3.6'da açıklandığı gibi, uygulanması ve MTT yöntemi ile saptanması sonucu elde edilen normalize hücre sayısı ve konsantrasyon arasında 24. saatte çizilen grafik Şekil 4.5'de verilmiştir. 24. saatte kontrol grubu ile çözücü olarak kullanılan DMSO grubu hücrelerin proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etki oluşturmadığı görülmektedir ($P>0,05$). Kontrol grubu ile 0,01µM, 0,02µM, 0,05µM, 0,1µM, 0,5µM, 1µM, 5µM erlotinib uygulanan H460 hücrelerinin proliferasyonları üzerinde konsantrasyon artışına rağmen anlamlı bir etki meydana getirmediği saptanmıştır ($P>0,05$).



Şekil 4.5. Erlotinib'in H460 hücre proliferasyonu üzerinde 24. saatteki etkisi.

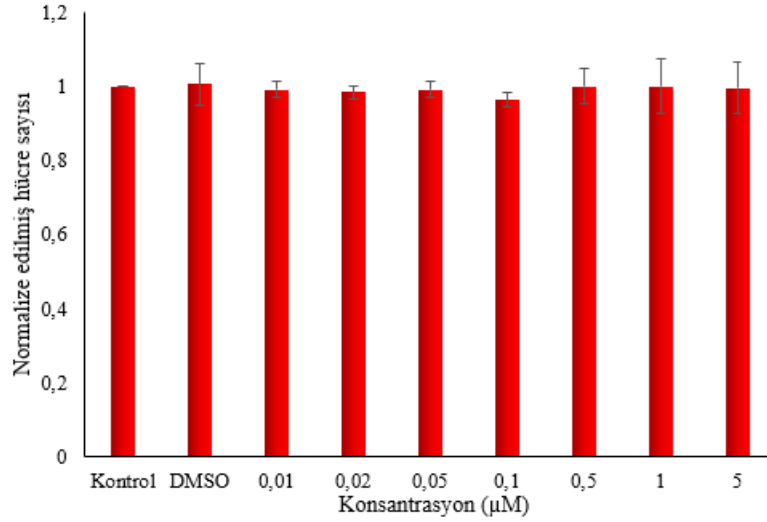
Erlotinib'in belirlenen konsantrasyonlarının yüksek metastatik H460 hücrelerine 48.saat süresince uygulanması sonucunda hücrelerin proliferasyonlarında anlamlı bir farklılık olmadığı ($P>0,05$) ve 24. saatteki veriler ile benzerik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Erlotinib'in H460 hücre proliferasyonu üzerinde 48. saatteki etkisi.

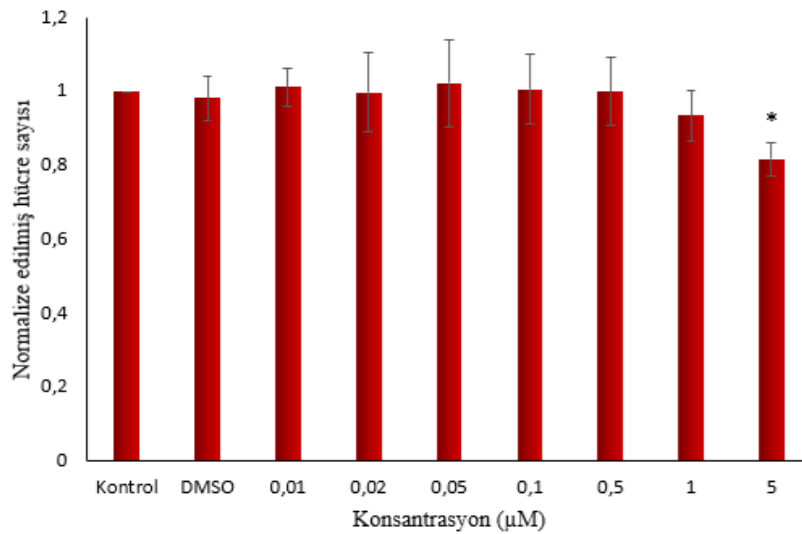
Düşük metastatik A549 hücrelerine belirlenen erlotinib konsantrasyonlarının uygulanması sonucu elde edilen normalize hücre sayılarının erlotinib konsantrasyonuyla ilişkisi Şekil 4.7'te verilmiştir. Elde edilen verilere göre, 24. saatte kontrol grubu hücre proliferasyonu ile DMSO grubu hücre proliferasyonları arasında bir fark bulunmadığı saptanmıştır ($P>0,05$). Kontrol grubu ile, 0,01 µM, 0,02 µM, 0,05 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM ve 5 µM erlotinib uygulanan

deney gruplarının hücre proliferasyonları arasında da istatistiksel bakımdan anlamlı bir farkın görülmediği izlenmektedir ($P>0.05$).



Şekil 4.7. Erlotinib'in A549 hücre proliferasyonu üzerinde 24. saatteki etkisi.

Erlotinib'in A549 hücrelerine 48. saat süre ile uygulanması sonucu ise, 1 µM erlotinib uygulanmasına kadar artan ilaç konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre proliferasyonunda anlamlı bir fark görülmezken, 1 µM erlotinib'in hücre proliferasyonunda anlamlı olmayan ($P>0,05$) bir azalma meydana getirdiği belirlenmektedir (Şekil 4.8). Erlotinib 5µM konsantrasyonda uygulandığında ise, hücre proliferasyonu anlamlı ($P<0,05$) olarak azalmaktadır (Şekil 4.8).



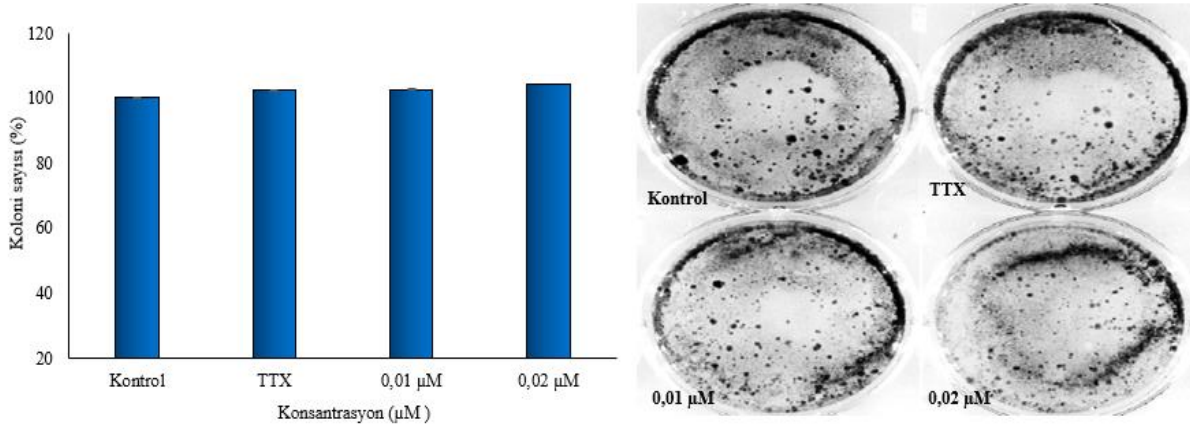
Şekil 4.8. Erlotinib'in A549 hücre proliferasyonu üzerinde 48. saatteki etkisi (* $P < 0.05$).

4.4. Koloni Oluşumu

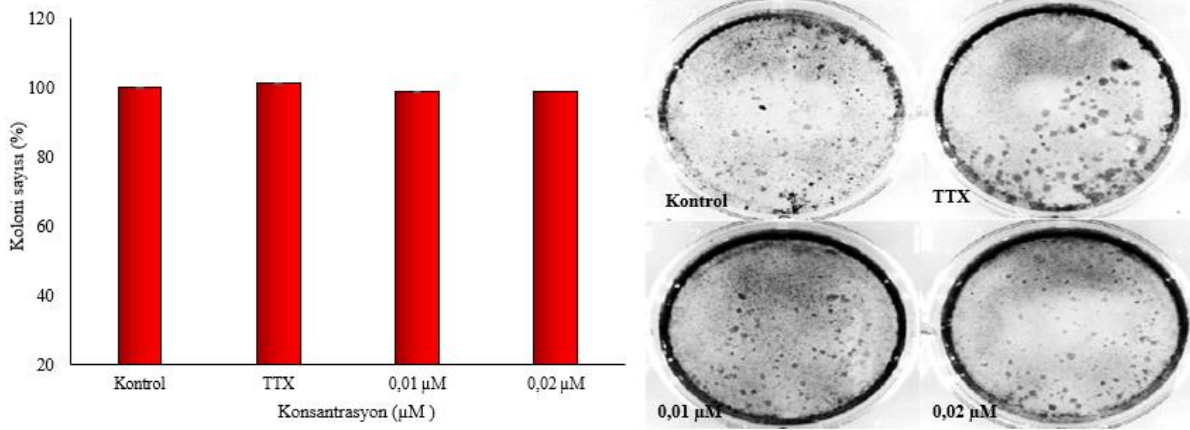
İn vitro olarak yüksek metastatik H460 ve düşük metastatik A549 küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinin koloni oluşumları üzerinde erlotinib'in etkileri değerlendirilmiş ve koloni yüzdeleri Tablo 10'da verilmiştir. H460 hücrelerine 48.saat süreyle TTX ile 0,01 μM ve 0,02 μM erlotinib uygulanması sonucu oluşan koloni oluşum yüzdelерinin grafikleri Şekil 4.9'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre TTX, 0,01 μM ve 0,02 μM erlotinib'in koloni yüzdeleri üzerinde anlamlı etki meydana getirmediği ($P>0.05$) görülmektedir. Erlotinib'in düşük metastatik A549 hücrelerinin koloni yüzdeleri üzerindeki etkisi Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Burada A549 hücrelerinin koloni oluşumları üzerinde de TTX, 0,01 μM ve 0,02 μM erlotinib'in istatistiksel bakımdan anlamlı bir etki meydana getirmediği ($P>0.05$) saptanmıştır.

Tablo 10. Erlotinib'in H460 ve A549 hücrelerinin koloni oluşum yüzdesi üzerindeki etkisi ($P>0.05$).

Deney Grupları	Koloni Yüzdesi (%)			
	Kontrol	TTX	0,01 μM	0,02 μM
A549	100	101 $\pm$ 0,1	98,8 $\pm$ 0,1	98,9 $\pm$ 0,1
H460	100	102,1 $\pm$ 0,1	102,5 $\pm$ 0,1	104,1 $\pm$ 0,1



Şekil 4.9. Erlotinib'in H460 hücrelerinin koloni yüzdesi üzerine etkisi ($P>0.05$).

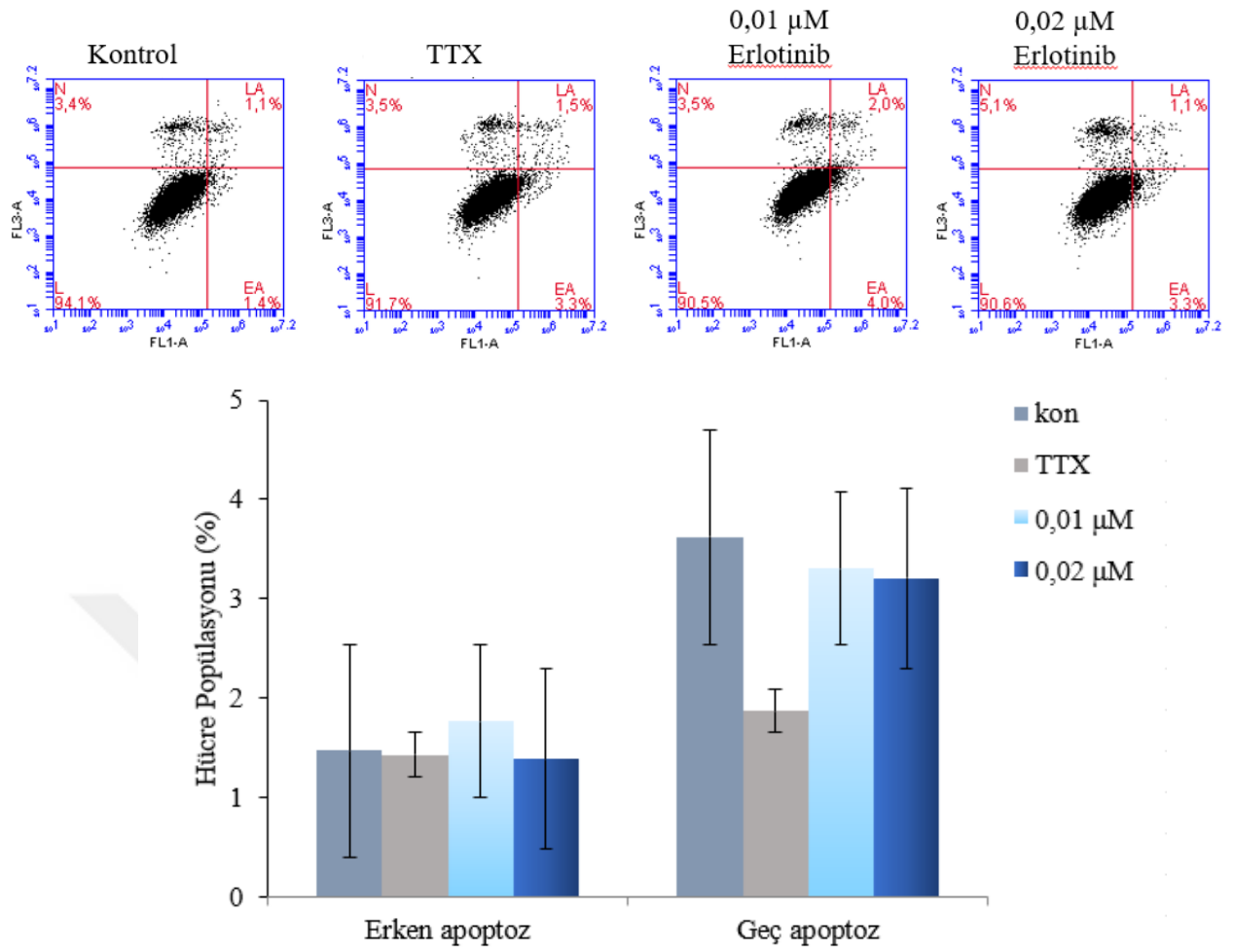


Şekil 4.10. Erlotinib'in A549 hücrelerinin koloni yüzdesi üzerine etkisi ($p>0.05$).

4.5. Apoptotik Hücre Ölümü

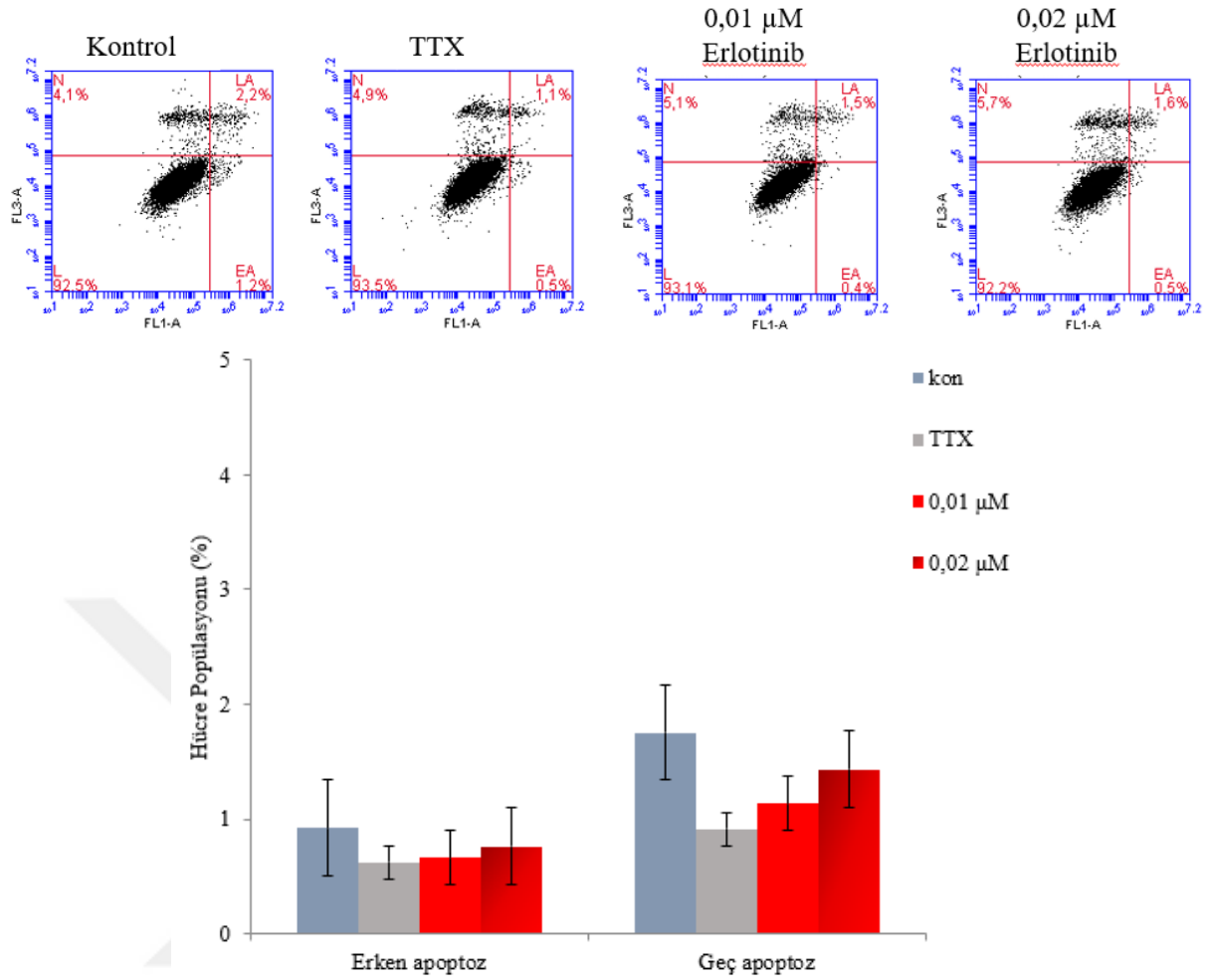
Erlotinib'in yüksek metastatik H460 ve düşük metastatik A549 hücrelerinin hücre ölümü üzerindeki apoptotik etkisi incelenmiştir (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). Annexin V-FITC kiti kullanarak, apoptotik hücre yüzdesi, akım sitometri analizi ile ölçülmüştür. Akım sitometri analizinde canlı hücreler, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz olarak dört alana ayrılan diyagramda canlı hücreler ilk alanda görünmektedir. Erken apoptotik fazda Annexin V'in, membranın dış tabakasındaki fosfatidilserin'e bağlanması diyagramının sağ alt alanında geç aşaması ise, propidium iyodürün (PI), membran bütünlüğü bozulduğundan hücre için hareket eder ve diyagramın sağ üst köşesinde yer alır. Nekrozda sadece PI olduğu için sol üst alanda bulunur (Şekil 4.11).

Erlotinib'in yüksek metastatik H460 hücreleri üzerindeki etkisi Şekil 4.11'te verildiği gibi 48. Saatte sodyum kanal blokeri TTX'in geç apoptotik hücre sayısını azalttığı 0,01 µM ve 0,02 µM erlotinib'in de geç apoptotik hücre sayısını kontrole oranla azaltmakla birlikte bu farkın anlamlı olmadığı ($P>0.05$) belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Erlotinib'in H460 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi ($P>0.05$).

Düşük metastatik A549 hücrelerinin, 0,01µM ve 0,02µM erlotinib'e 48 saat boyunca maruz bırakılmasıyla hem erken hem de geç apoptoz üzerinde kontrole kıyasla azalma görülmekle birlikte istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı ($P>0,05$) gösterilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Erlotinib'in A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi ($P>0.05$).

4.6. Lateral Motilite (Migrasyon/Motilite)

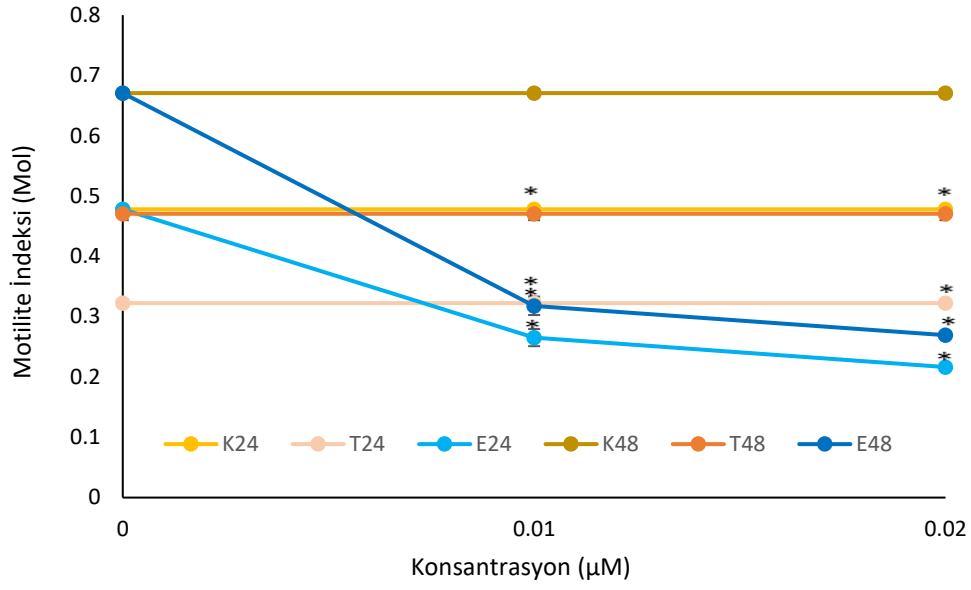
Yüksek metastatik H460 ve düşük metastatik A549 akciğer kanseri hücrelerinin migrasyonu üzerinde erlotinib'in etkisini değerlendirmek amacıyla yara iyileşme deneyi uygulanmış, motilite indeksi ve motilite yüzdesi hesaplanmıştır. Hücrelerin lateral hareketini tespit etmek üzere erlotinib'in hücre proliferasyonu üzerinde etki göstermediği 0,01 µM ve 0,02 µM konsantrasyonları kullanılmıştır. Yüksek metastatik H460 hücrelerinin motilite indeksi ve motilite değişim yüzdesi Tablo 11 ve Şekil 4.13'te verilmiştir. Kontrol grubunda motilite indeksi 24. saatte $0,47 \pm 0,01$, 48. saat için $0,67 \pm 0,01$ olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan VGSC blokeri TTX için ise, motilite indeksi 24. saatte $0,32 \pm 0,01$, 48. saat için ise, $0,47 \pm 0,01$ olarak tespit edilmiştir. TTX, kontrol grubuna göre hücrelerin lateral hareketini 24 ve 48. saatte sırasıyla %32,5, %29,8 oranında anlamlı ($P<0.05$) olarak azaltmıştır. 24. saatte 0,01µM ve 0,02µM erlotinib'in 24 saat süre ile uygulanması sonucu H460 hücrelerinin motilite

indeksi sırasıyla $0,26 \pm 0,01$, $0,21 \pm 0,01$, 48. saat için, $0,31 \pm 0,01$, $0,26 \pm 0,01$ olarak hesaplanmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmelere göre, $0,01 \mu\text{M}$ ve $0,02 \mu\text{M}$ erlotinib uygulanması sonucu yüksek metastatik H460 hücrelerinin lateral hareketlerinin kontrol grubuna oranla sırasıyla 24. saatte %44,5, %54,7, 48. saatte %52,5, %59,8 oranında anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir ($P < 0,05$).

Düşük metastatik A549 hücrelerinin motilitelerine erlotinib'in etkisi motilite indeksi ve motilite değişim yüzdesi olarak Tablo 12 ve Şekil 4.14'te verilmiştir. Kontrol grubunda motilite indeksi 24. saatte $0,55 \pm 0,01$, 48. saatte $0,58 \pm 0,01$ olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan VGSC blokeri TTX için ise, motilite indeksi 24. saatte $0,48 \pm 0,01$, 48. saat için ise, $0,49 \pm 0,01$ olarak saptanmıştır. TTX, kontrol grubuna oranla hücrelerin lateral hareketini 24 ve 48. saatte sırasıyla %13,2, %15,6 oranında anlamlı ($P < 0,05$) olarak azaltmıştır. Erlotinib'in $0,01 \mu\text{M}$ ve $0,02 \mu\text{M}$ konsantrasyonları motilite indeksi 24. saatte sırasıyla $0,41 \pm 0,01$, $0,44 \pm 0,01$ ve 48. saatte $0,43 \pm 0,01$, $0,44 \pm 0,01$ olarak hesaplanmıştır. Yapılan istatistik değerlendirmelere göre, $0,01 \mu\text{M}$ ve $0,02 \mu\text{M}$ erlotinib uygulaması sonucu düşük metastatik A549 hücrelerinin lateral hareketleri kontrol grubuna oranla sırasıyla 24. saatte %24,8 ve %20,7, 48. saatte ise, %25,1 ve %22,9 oranında anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir ($P < 0,05$).

Tablo 11. H460 hücrelerine TTX ve erlotinib uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri (* $P < 0,05$).

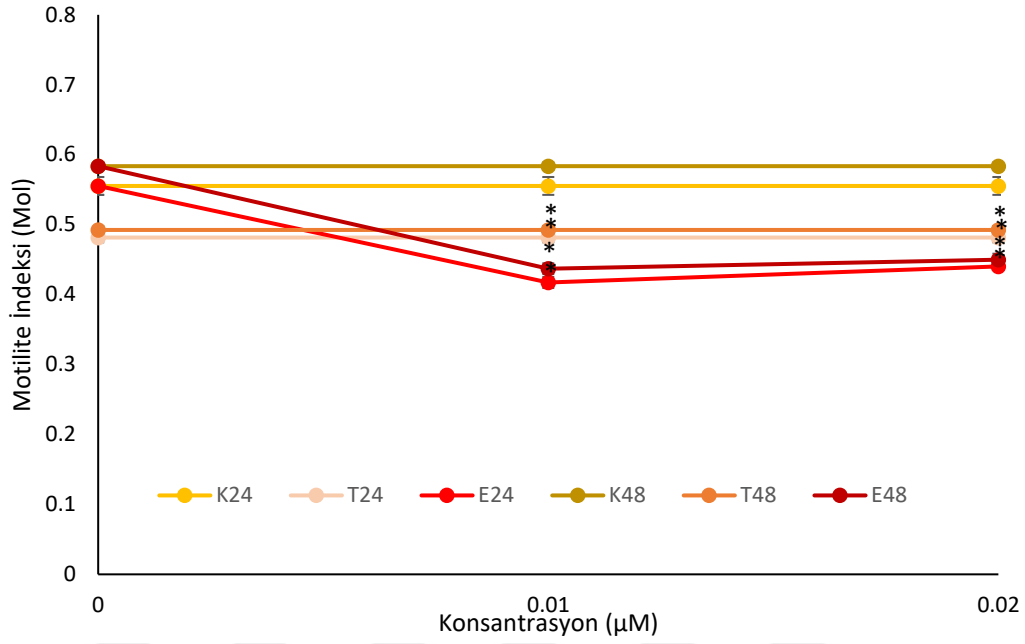
Deney Grupları	n sayısı	Motilite İndeksi		Motilite Değişim (%)	
		24.saat	48.saat	24.saat	48.saat
Kontrol	3	$0,47 \pm 0,01$	$0,67 \pm 0,01$		
TTX	3	$0,32 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,01$	32,5↓*	29,8↓*
$0,01 \mu\text{M}$	3	$0,26 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	44,5↓*	52,5↓*
$0,02 \mu\text{M}$	3	$0,21 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,01$	54,7↓*	59,8↓*



Şekil 4.13. Erlotinib'in H460 hücrelerinin lateral hareketi/motilite indeksi üzerine etkisi (*P<0.05).

Tablo 12. A549 hücrelerine TTX ve erlotinib uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri (*P<0.05).

Deney Grupları	n sayısı	Motilite İndeksi		Motilite Değişim (%)	
		24.saat	48.saat	24.saat	48.saat
Kontrol	3	0,55±0,01	0,58±0,01		
TTX	3	0,48±0,01	0,49±0,01	13,2↓*	15,6↓*
0,01 μM	3	0,41±0,01	0,43±0,01	24,8↓*	25,1↓*
0,02 μM	3	0,44±0,01	0,44±0,01	20,7↓*	22,9↓*



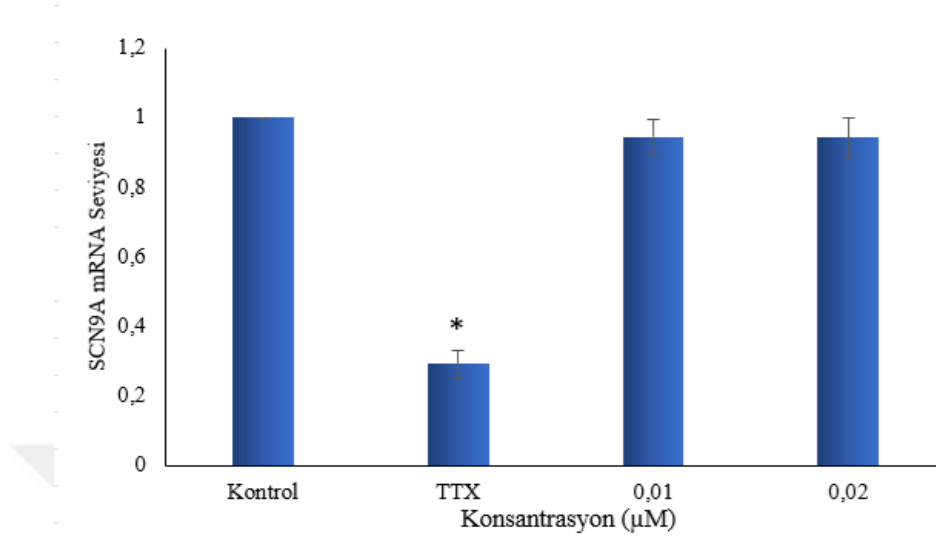
Şekil 4.14. Erlotinib'in A549 hücrelerinin lateral hareketi/motilite indeksi üzerine etkisi (*P<0.05).

4.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Erlotinib'in yüksek metastatik H460 ve düşük metastatik A549 hücrelerinin Nav 1.7 protein üretiminden sorumlu olan SCN9A geninin mRNA miktarına etkileri qRT-PCR ile değerlendirilmiştir. Housekeeping gen olarak β -actin kullanılmıştır. Sodyum kanal blokeri TTX, 0,01 μ M, 0,02 μ M erlotinib'in cq değerleri, kontrol grubunun cq değerlerine göre normalize edilmiş ve yüksek metastatik H460 hücrelerinin SCN9A gen ifadesine etkisi Şekil 4.15'te ve düşük metastatik A549 hücrelerinin SCN9A ifadesine etkisi ise 4.16'da gösterilmiştir.

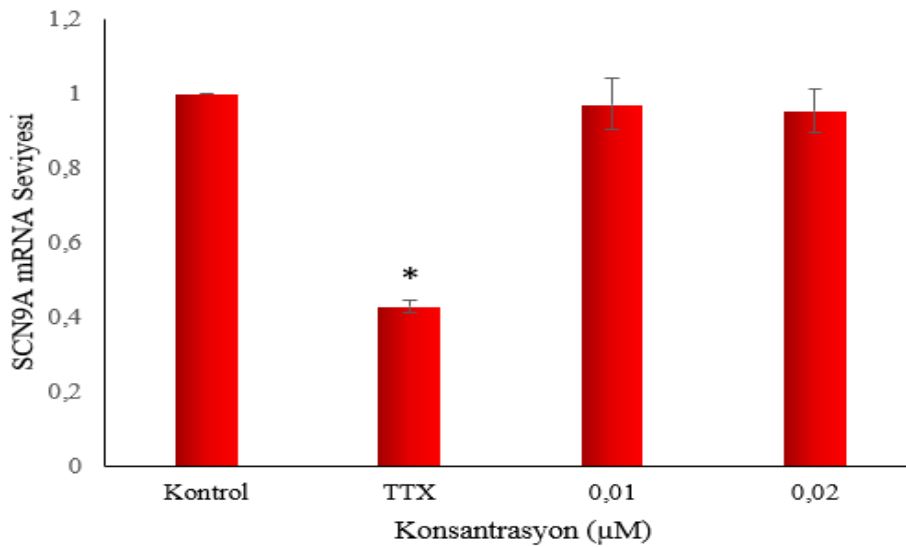
Sodyum kanal blokeri olan TTX, yüksek metastatik H460 hücrelerinin SCN9A mRNA seviyesi üzerinde kontrol grubuna oranla yaklaşık %70 civarında anlamlı bir azalmaya neden olduğu

dolayısıyla Nav 1.7 kanalını inhibe ettiği görülmüştür ($P<0,05$). $0,01\mu\text{M}$ ve $0,02\mu\text{M}$ erlotinib'in ise, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir etki göstermediği belirlenmiştir ($P>0,05$).



Şekil 4.15. Erlotinib'in yüksek metastatik H460 hücrelerinin SCN9A ifadesine etkisi(* $P<0,05$).

Şekil 4.16'da verilen düşük metastatik A549 hücrelerinin SCN9A mRNA seviyeleri değerlendirildiğinde TTX, kontrol grubuna oranla yaklaşık %60 azalma gösterdiği tespit edilmiştir ($P<0,05$). TTX, hücrelerin SCN9A mRNA seviyesini inhibe ederken, erlotinib'in bir etki göstermediği ($P>0,05$) belirlenmiştir.



Şekil 4.16. Erlotinib'in düşük metastatik A549 hücrelerinin SCN9A ifadesine etkisi (* $P<0,05$).

5.TARTIŞMA

Kanser, dünyadaki en yaygın ölümcül hastalıklardan biri haline gelmekle beraber, insidans oranının da giderek artmakta olduğu görülmektedir. Akciğer kanseri dahil olmak üzere kanserde meydana gelen farklı genetik değişiklikler ve farklı organlara yayılma yeteneği nedeniyle, kanser gelişiminden metastatik aşamaya kadar altında yatan mekanizmaları anlamak ve yeni tedavi stratejileri geliştirmek temel hedeftir.

Çalışmalar ilaca olan direncin dinamik düzenlenmesiyle ilişkili olabilecek EGFR mutasyonunda sürekli değişiklik olduğunu göstermiştir. Bazı çalışmalar, ilaca olan direncin ortaya çıkmasının kısa ve geri dönüşümlü olabileceğini, EGFR tirozin kinaz inhibitörünün akciğer kanseri hücre hatlarının EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine karşı duyarlılığı yeniden kazanabileceğini de göstermiştir. (Dong Y. Ve ark., 2021).

Bu çalışmada, sağ kalımda etkili olan metastazlardan sorumlu olduğu belirlenen akciğer kanserindeki Nav 1.7 VGSC kanalı üzerine odaklanılmış olup, küçük hücreli dışı akciğer kanser hastalarında hedefe yönelik tedavi olarak kullanılan erlotinib'in apoptoz ve metastatik aktivite üzerindeki etkilerini in vitro ve moleküler yöntemlerle araştırmak, metastazda rol alan Nav 1.7 VGSC üzerinde etkisinin bulunup bulunmadığını ortaya koymak amaçlanmıştır. Bu amaç için, erlotinib'in yüksek metastatik H460 ve düşük metastatik A549 küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu, koloni oluşumu, apoptotik hücre ölümü üzerindeki etkileri ile Nav 1.7 VGSC üzerindeki etkileri hücre migrasyonu ve PCR ile değerlendirilmiştir.

Erlotinib'in, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hatlarından yüksek metastatik H460 ve düşük metastatik A549 hücreleri üzerinde toksik etki göstermediği saptandıktan sonra, hücre proliferasyonuna etkisi incelenmiştir. Anti-proliferatif aktivite için incelenen 0,01 μ M, 0,02 μ M, 0,05 μ M, 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, erlotinib konsantrasyonları hem yüksek metastatik H460, hem de düşük metastatik A549 hücrelerinin proliferasyonları üzerinde 24. saatte bir etki göstermezken, erlotinib'in 48 saat uygulanması sonucunda, 5 μ M erlotinib'in sadece düşük metastatik A549 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Çalışmamızda düşük metastatik A549 ve yüksek metastatik H460 hücrelerinin koloni oluşum kapasitesi üzerine 48 saat erlotinib uygulamasının etkisi de incelenmiştir. TTX ve 0,01 μ M ve 0,02 μ M erlotinib konsantrasyonlarının koloni oluşumu üzerinde bir etki göstermediği saptanmıştır.

EGFR tirozin kinaz inhibitörleri olan gefitinib ve erlotinib, ilk kez EGFR mutasyonlarının bulunmasından yaklaşık on yıl kadar evvel kullanılmıştır. Gefitinib ile yapılan ilk klinik deneylerde sağ kalım oranı başarısız olsa da, erlotinib ile yapılan faz III çalışması orta seviyede pozitif bir etki göstermiştir (Kelleher ve ark., 2012). Erlotinib ve EGFR'yi hedef alan diğer ilaçlar bir kinolin halkasından meydana gelmektedir. Sülfonile indenol [1,2-c] kinolinler (SIQ), kinolin çift halkalı yapıyı içerdiğinden dolayı bu çalışmada SIQ'ların EGFR inhibitörlerine benzer şekilde EGFR tirozin kinaz aktivitesini inhibe edebileceği varsayılmış ve SIQ'lar ile birlikte A549 ve A431 akciğer kanser hücreleriyle yapılan proliferasyon deneyinde 10 µM erlotinib konsantrasyonunda A549 ve A431 hücre cevaplarının birbiriyle benzer olduğu görülmüştür. SIQ'ların EGFR ekspresyon seviyesinin A431 hücrelerinde daha yüksek olması nedeniyle A549'a göre daha yüksek proliferasyona sahip olduğu belirlenmiştir (Hengphasatporn ve ark., 2023).

Literatürde, A549 ve H460 hücre hatlarının akciğer kanser hücrelerinde doza bağlı olarak büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiştir. Memon ve arkadaşları (2009), düşük metastatik A549 hücreleri, EGFR tirozin kinaz mutasyonuna sahip akciğer adenokarsinoması HCC827 hücreleri ile bronkoalveolar karsinoma hücreleri NCI358'in hücre proliferasyonları üzerine 0,5- ile 6 µmol/L erlotinib'in etkilerini değerlendirmişlerdir. Farklı özellikteki bu akciğer hücresinden HCC827 hücrelerinin proliferasyonu artan doza bağlı olarak inhibe olurken, 6 µmol/L'ye kadar olan dozlardaki erlotinib, A549 ve NCI358 hücrelerinin proliferasyonunda bir etki göstermemiş ve bu hücrelerin ilaca karşı duyarlılıklarının az olduğunu belirtmişlerdir.

Yan ve arkadaşlarının (2024) yaptığı bir çalışmada, birinci nesil tirozin kinaz inhibitörü olan erlotinib'in en sık rastlanan yan etkilerinin ishal ve döküntü olduğu ve sıklıkla iyi toleransa sahip etkili ve güvenli tedavi seçeneği olarak kabul gördüğü ifade edilmektedir. EGFR L858R mutasyonlu akciğer adenokarsinomu tanılı kadın hasta, birinci basamak tedavide erlotinib almış, tedavi sonrası megaloblastik anemi meydana gelmiştir. (Yan ve ark., 2024). Çalışılan bir vaka raporunda ise, pankreas adenokarsinomlu 59 yaşındaki erkek hastaya gemsitabinle kombine erlotinib günde 150 mg başlandıktan yaklaşık 15 gün sonra ciddi deri döküntüsü geliştiğinden erlotinib uygulanması geçici olarak kesilmiştir. Günlük erlotinib dozu 100 mg'a düşürüldüğünde ve ilerleyen dönemde düşmeyen ateş nedeniyle erlotinib tedavisinin pankreas kanserli hastalardaki yan etkilerinin dikkatle değerlendirilmesi gerektiği ortaya konmuştur (Boeck ve ark., 2007).

Erlotinib'in düşük metastatik A549 hücreleri üzerindeki antitümör aktivitesine hem monoterapötik olarak hem de kabozantinib ile kombine olarak uygulayan çalışmada hücre

canlılığı üzerinde belirlenen konsantrasyonlarda (10nM, 100nM, 1µM, 10µM, 30µM) doza bağlı olarak hücre canlılığını inhibe ettiği tespit edilmiştir. Erlotinib'in tek başına 5.3µM ve kabozantinib'in tek başına 9.5µM olarak uygulanmasıyla proliferasyonda bir etki görülmezken, Erlotinib ve kabozantinib'in kombine olarak birlikte A549 hücrelerine uygulanması hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (Alhazzani ve ark., 2023). Erlotinib'in akciğer ksenograft modellerindeki tümör büyümesine etkisini inceleyen bir çalışmada QG56, HCC827, NCI-H3255 ve H1975 küçük hücreli dışı akciğer kanser hücreleri kullanılmıştır. 24 ve 48 saat sürelerde 0 - 100 µM artan erlotinib konsantrasyonlarında hücrelerin proliferasyonu araştırılmıştır. HCC827 ve NCI-H3255 hücreleri erlotinib'e duyarlıyken QG56 ve NCI-H1975 hücrelerinin daha az duyarlı olduğu görülmektedir. Daha sonra bu hücreler farelere uygulanmış ve yaklaşık bir saat sonra PET çekimi ile tümörün canlılığı ve büyüme hızı tespit edilmiştir. Küçük hücreli dışı akciğer kanser hastalarında karşılaşılan mutasyonları teşhis edip, erlotinib'e duyarlı ve duyarlı olmayan tümörleri, erlotinib'e dirençli olan tümörlerden ayırt edilmesini göstermek amaçlanmıştır (Abourbeh ve ark., 2015).

Hepatosit büyüme faktörü HGF'nin MAPK/ERK1/2 ve PI3K/Akt yollarının fosforilasyonunu sağlayan MET'i aktive ettiği ve EGFR tirozin kinaz inhibitör direncini indüklediği bilinmektedir. Bu direncin üstesinden gelmesi için terapötik hedef olarak önem göstermektedir. Yapılan çalışmada kullanılan erlotinib, gefitinib ile PI-103(PI3Ka inhibitörü-1) ajanları için 0,01µM, 0,03µM, 0,1µM, 0,3µM, 1µM, 3µM konsantrasyonları hazırlanmış ve PC-9 ve HCC827 hücrelerine ayrı ayrı uygulanmıştır. Erlotinib ve gefitinib hücre proliferasyonlarını doza bağlı olarak indüklemekle beraber PI-103 proliferasyonundaki inhibisyonun daha yüksek olduğu saptanmıştır (Donev ve ark., 2011).

Ying Lu ve arkadaşları (2008), tarafından BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerine 1 µM ile 100 µM aralığında farklı konsantrasyonlarda erlotinib uygulanmış ve artan doza bağlı olarak hücre büyümesinin inhibe olduğu belirlenmiştir. 50 µM erlotinib konsantrasyonunda 24 ve 48 saat ile 72 ve 96. saatler arasında hücre büyümesinde anlamlı bir fark görülmemiştir.

Bir çalışma, Bryopsis plumosa lektinlerinden BPL2'nin antikanser ajanı olduğu düşünülmüş ve akciğer kanseri hücre hatları olan A549, H460 ve H1299 hücrelerine karşı hücre canlılığı ve koloni oluşumlarına bakılmıştır. 24. saatte 100 µg/mL konsantrasyonda A549 ve H1299 hücrelerinde hücre canlılığı yaklaşık %40, 72 iken saatte ise %20'ye kadar düştüğü görülmüştür. Bunun yanında koloni oluşturma kapasitesi analiz edildiğinde, düşük konsantrasyonda bile BPL2'nin etkili olduğu, 20 µg/mL'de kolonilerin yarısının öldüğü görülmüştür (Jei Ha Lee ve ark., 2022).

Elde ettiğimiz proliferasyon ve koloni oluşum sonuçlarımız mevcut literatürdeki çalışmalarla uyum içerisindedir.

Çalışmada erlotinib'in apoptotik aktivitesi üzerindeki etkisi de değerlendirilmiş ve 0,01µM ve 0,02µM erlotinib hem yüksek metastatik H460 hem de düşük metastatik A549 hücrelerinde, geç apoptotik hücre yüzdesini azaltmakla beraber bu etkinin anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Literatürde tirozin kinaz inhibitörlerinin, EGFR aktivasyonunu bloke etmesiyle kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Marisa L ve ark., 2021). Bir çalışma ile 20 µg/mL BPL2 ajanının A549 ve H460 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisine bakılmış ve sırasıyla A549'da %17.1 H460'da %9.5 apoptoza gittiği görülmüştür (Lee ve ark., 2022).

İlaçların hücre apoptozundaki etkisini tespit etmek amacıyla Alhazzani ve arkadaşları (2023), A549 hücrelerine, 24 saat boyunca 10µM erlotinib, 10µM kabozantinib ve 5µM erlotinib+kabozantinib ile muamele etmişlerdir. Tek başına veya kombine şekilde yapılan uygulamaların A549 hücrelerinin apoptozunu arttırdığı görülmektedir.

Yapılan bir literatür çalışmasında erlotinib ile çeşitli kanserlerde anti-proliferatif etkisi olduğu bilinen TAT-NBI1'in kombine tedavisi ile birlikte akciğer kanseri A549 (>20 µM) hücresinin yanında üç farklı meme kanseri hücresi olan MCF-7 (>20 µM), SKBr3 (5 µM) ve MDA-MB-468 (>20 µM) kullanılmıştır. Belirlenen konsantrasyonlar anti-proliferatif özelliklerine göre belirlenmiştir. Deney sonunda 20 µM MCF-7'nin apoptozu herhangi bir şekilde etkilemediği A549, SKBr3 ve MDA-MB-468'in ise apoptozu %50'ye yakın indüklediği saptanmıştır (Orzaez ve ark., 2012).

Ying Lu ve arkadaşlarının pankreas kanseri hücre hattı olan BxPC-3'te, 50 µM erlotinib konsantrasyonuyla 48 saat sonunda apoptotik etkisine baktıklarında, hücre döngüsü değişiklikleri ve hücre apoptozundaki artışın, erlotinib'in in vitro BxPC-3 hücrelerinde antiproliferatif etkisinden sorumlu mekanizmalardan olduğunu gösterdiler ayrıca in vivo BxPC-3 tümörlerini taşıyan farelere günde 100 mg/kg dozunda erlotinib uygulanmış ve sonuçta erlotinib'in tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini gösterdiler (Ying Lu ve ark., 2008). Potasyum tutucu bi diüretik olan amiloridin erlotinib ile kombinasyonu ile pankreas kanseri hücrelerine karşı in vitro antikanser etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışma 24 ve 48 saatlik sürelerde amilorid (30 µM) ve erlotinib (3 µM) uygulamasıyla pankreas kanserinde sinerjik sitotoksitesinden apoptotik hücre ölümünün sorumlu olup olmadığını açıklayabilmek için Annexin V ve PI boyama ile akış sitometrisi analizinde erlotinib ve amiloridin beraber

uygulanması apoptoz oranını tek başına erlotinib uygulanmasına göre ciddi oranda arttırdığı görülmüştür (Zheng ve ark., 2015).

Metastatik aktivitenin in vitro olarak incelenmesi hücrenin lateral hareketi ve Nav 1.7 mRNA belirlenmesiyle ortaya konmuştur. Hücre hareketi üzerine Nav 1.7'nin katkısının değerlendirilmesi hücre proliferasyonunu etkilemeyen 0,01µM ve 0,02µM erlotinib konsantrasyonları ile yapılmıştır. Sodyum kanal blokeri olan TTX, yüksek metastatik H460 hücrelerinin motilitesi üzerinde yaklaşık %30 oranında düşük metastatik A549 hücrelerinin motilitesi üzerinde de yaklaşık %15 civarında inhibisyon meydana getirmiştir. Uygulanan 0,01 µM ve 0,02µM erlotinib konsantrasyonları, yüksek metastatik H460 hücrelerinin motilitesini artan erlotinib konsantrasyonlarında biraz daha yüksek oranda olmak üzere yaklaşık %53-59 oranında inhibe ettiği, düşük metastatik A549 hücrelerinin lateral hareketini/motilitesinde ise yaklaşık %23-25 oranında inhibisyon oluşturduğu saptanmıştır. Hücre hareketi üzerinde erlotinib'in meydana getirdiği inhibisyonun Nav 1.7 VGSC üzerinden olup olmadığını değerlendirmek için PCR ile Nav 1.7 mRNA miktarları araştırılmıştır. Sodyum kanal blokeri TTX, her iki hücrenin Nav 1.7 mRNA üzerinde yaklaşık % 60-70 oranında inhibisyon meydana getirirken, her iki erlotinib konsantrasyonu hem H460 hem de A549 hücreleri üzerinde herhangi bir etki oluşturmamıştır.

Literatürde bazı küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde Nav 1.7 mRNA'yı baskın VGSC alt tipi olarak tanımlanmış ve Nav 1.7 protein ekspresyonunun normal dokulara oranla tümör hücrelerinde daha yüksek olduğu ifade edilmiştir (Campbell ve ark., 2013; Djamgoz ve ark., 2019). Campbell ve arkadaşları (2013), Nav 1.7 VGSC'nin küçük hücreli dışı akciğer kanserindeki aktivitesini değerlendirmek üzere gerçekleştirdikleri çalışmalarında, yüksek metastatik H460 hücrelerinin düşük metastatik A549 hücrelerine oranla daha invaziv olduğu, düşük metastatik A549 hücrelerinin ise, daha yüksek hücre migrasyonunu sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, yüksek düzeyde invaziv olan H460 hücreleriyle invaziv olmayan A549 hücrelerinin Nav 1.7 ekspresyon düzeylerinde ise benzerlik görülmektedir. Hücrelere 1µM gefitinib uygulandığında, Nav 1.7 mRNA ekspresyonunun bloke olduğu görülmüştür (Campbell ve ark., 2013). Literatürde erlotinib'in Nav 1.7 üzerindeki etkisini ortaya koyan bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Erlotinib ile kombinasyon çalışması yapan Alhazzani ve arkadaşları (2023), düşük metastatik A549 hücresi olan akciğer hücrelerine, erlotinib (10 µM) ve kabozantinib'i (10 µM) ayrı ve erlotinib+kabozantinib (5µM) şeklinde kombine olarak uygulamıştır. Kombine erlotinib + kabozantinib uygulanmasında önemli derecede azalma görülmüştür.

Sonuç olarak erlotinib ile elde edilen bu veriler literatürdekilerle paralellik göstermekte olup, erlotinib hücrelerin migrasyonunu inhibe etse de, elde edilen pcr sonuçları, metastazda etkili olduğu bilinen Nav 1.7 VGSC ler üzerinde etki gösterdiğine dair bir veriyi açık bir şekilde ortaya koyamamıştır. Elde edilen verilere göre erlotinib'in motilite üzerinde göstermiş olduğu inhibe edici etkinin Nav 1.7 VGSC aracılı olmadığı düşünölmekte olup, bu etkinin hangi yol ile meydana geldiğinin saptanması için ayrıntılı moleküler çalışmaların yapılması gerekmektedir.



6. REFERANSLAR

Abotaleb, M., Samuel S.M., Varghese E., Varghese S., Kubatka., Liskova A., Büsselberg D., 2018, "Flavonoids in Cancer and Apoptosis." *Cancers (Basel)* 11(1): 28. doi: 10.3390/cancers11010028.

Abourbeh G., Batel I., Salnikov O., Beltsov S., Mishani E., Identifying erlotinib-sensitive non-small cell lung carcinoma tumors in mice using [¹¹C]erlotinib PET, doi: 10.1186/s13550-014-0080-0 PMCID: PMC4385014 PMID: 25853010.

Alexander, SPH, Mathie A., Peters JA., 2011, Ligand-gated ion channels. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01649_4.x.

Alexander, S.P.H., Kelly E, Marrion, N.V., Peters, J.A., Faccenda, E., Harding, S.D., Pawson, A.J., Sharman, J.L., Southan, C., Buneman, O.P., Cidlowski, J.A., Christopoulos, A., Davenport, A.P., Fabbro, D., Spedding, M., Striessnig, J. and Davies, J.A., 2017. CGTP Collaborators. The Concise Guide to Pharmacology 2017/18: Overview. *Br J Pharmacol.*, 174 Suppl 1: S1-S16. doi: 10.1111/bph.14747.

Alhazzani K., Alsahli M., Alanazi A.Z., Algahtani M., Alenezi A.A., Alhoshani A., Alqinyah M., Alhamed A.S., 2023, Augmented antitumor effects of erlotinib and cabozantinib on A549 non-small cell lung cancer: In vitro and in vivo studies, *Oct;31(10):101756*. doi: 10.1016/j.jsps.2023.101756.

Andavan G.S.B., Lemmens-Gruber R., 2011, Voltage-gated sodium channels: mutations, channelopathies and targets, *18(3):377-97*. doi: 10.2174/092986711794839133.

Anderson KJ, Cormier RT, Scott PM. Role of ion channels in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* 2019; 25(38): 5732-5772 [PMID: 31636470 DOI: 10.3748/wjg.v25.i38.5732] doi: 10.3748/wjg.v25.i38.5732.

Baran, Y. (2018). *Kanser Moleküler Biyolojisi*. Kısayol yayıncılık, ISBN: 978-605-2329-30-6.

Barbieri R., Nizzari M., Zanardi I., Pusch M., Gavazzo P., 2023, Voltage -Gated Sodium Channel Dysfunctions in Neurological Disorders. *16;13(5):1191*. doi: 10.3390/life13051191.

Barnard, W. G. (1926). The nature of the “oat-celled sarcoma” of the mediastinum. The Journal of Pathology and Bacteriology, 29(3), 241-244. <https://doi.org/10.1002/path.1700290304>.

Basumallik N., Agarwal M., 2023, Small cell lung cancer., PMID: 29494065. Bookshelf ID: NBK482458.

Bayık A., Kanser Epidemiyolojisi, Ege Üniversitesi Hemşirelik Yüksek Okulu Dergisi, 1989, 5: 3 58-71.

Boeck S., Hausmann A., Reibke R., Schulz C., Heinemann V., Severe lung and skin toxicity during treatment with gemcitabine and erlotinib for metastatic pancreatic cancer, Anti-Cancer Drugs 18(9): p 1109-1111, October 2007. | DOI: 10.1097/CAD.0b013e3281ceabec.

Boyle Y., Johns T.G., Fletcher E.M., 2022, Potassium Ion Channels in Malignant Central Nervous System Cancers. doi: 10.3390/cancers14194767.

Brackenbury, W. J., 2012, Voltage-gated sodium channels and metastatic disease, Channels, 6(5), 352-361. doi: 10.4161/chan.21910.

Brackenbury, W. J., Isom, L. L., 2008, Voltage-gated Na⁺ channels: Potential for β subunits as therapeutic targets, Expert opinion on therapeutic targets, 12(9), 1191-1203. doi: 10.1517/14728222.12.9.1191.

Brackenbury, W. J., Isom, L. L., 2011, Na⁺ channel β subunits: overachievers of the ion channel family, Frontiers in pharmacology, 2, 53. doi: 10.3389/fphar.2011.00053.

Bugan I., Karagoz Z., Altun S., Djamgoz M., ‘Gabapentin, an Analgesic Used Against Cancer-Associated Neuropathic Pain: Effects on Prostate Cancer Progression in an In Vivo Rat Model’, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, Volume 118, Issue 3, 03 September 2016. doi: 10.1111/bcpt.12484.

Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson, KM, Garrett TP. An open- and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. Mol Cell 2003; 12: 541–552. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00350-2.

Byerley, L. (2022). APUS: An Introduction to Nutrition: Carcinogenesis. America. American Public University.

Campbell T.M., Main M.J., Fitzgerald E.M., 2013, Functional expression of the voltage-gated Na⁺ - channel Nav1.7 is necessary for EGF-mediated invasion in human non-small cell lung cancer cells, *Journal of Cell Science* 126, 4939–4949, doi: 10.1242/jcs.130013.

Cappuzzo F. Predictive factors for response and for resistance to tyrosine kinase inhibitor therapy in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007; 2(5 Suppl): 12-14. doi: 10.1097/01.JTO.0000268634.17956.5e.

Catterall, W.A., 2000, From ionic currents to molecular review mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels, *Neuron*, 26, 13–25. doi: 10.1016/s0896-6273(00)81133-2.

Catterall, W.A., Cestele, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F., Konoki, K., Scheuer, T., 2007, Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins, *Toxicon*, 49, 124-141. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.09.022.

Catterall, W. A., 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspective Biol.*, 3: a003947. doi: 10.1101/cshperspect.a003947.

Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P. and Striessnig, J., 2017. Voltage-gated calcium channels, introduction. <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyIntroductionForward?familyId=80>.

Cooper A.J., Sequist L.V., Lin J.J., 2022, Third-generation EGFR and ALK inhibitors: mechanisms of resistance and management. doi:10.1038/s41571-022-00639-9.

Cruz, C. S. D., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A (2011). Lung cancer: epidemiology, etiology, and presendin. *Clinics in chest medicine*, 32(4)., 605-644. doi: 10.1016/j.ccm.2011.09.001.

Çoban Ö., Değim Z., Development of Nanocochleates Containing Erlotinib HCl and Dexketoprofen Trometamol and Evaluation of *In Vitro* Characteristic Properties, 2018, Apr;15(1):16-21. doi: 10.4274/tjps.83803.

Çok, G (2018). Akciğer Kanserinde TNM Evrelemesi. Nükleer Tıp Seminerleri, 4, 1-5. doi:10.4274/nts.2018.001.

Debela D.T., Muzazu SG, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC, Kitui SK, Manyazewal T.(2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. SAGE Open Med., 12;9:20503121211034366. doi: 10.1177/20503121211034366.

Delisi, D.A , Saatloo M.V., Chapter Six-Ion channels and their role in chemo-resistance, 2023;92:125-150.doi: 10.1016/bs.ctm.2023.09.008.

Detterbeck, F. C (2018). The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: what does it mean on main Street?. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 155(1)., 356-359. doi: 10.1016/j.jtcvs.2017.08.138.

Driffort V., Gillet L., Bon E., Marionneau-Lambot S., Oullier T., Joulin V., Collin C., Pages J-C., Jourdan M.L., Chevalier S., Bougnoux P., Guennec J.Y., Besson P., Roger S., 2014, Ranolazine inhibits Nav 1.5-mediated breast cancer cell invasiveness and lung colonization, Driffort et al. Molecular Cancer 2014, 13:264.

Diss, J. K., Archer, S. N., Hirano, J., Fraser, S. P., Djamgoz, M. B., 2001, Expression profiles of voltage-gated Na⁺ channel α -subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines, The prostate, 48(3), 165-178. doi: 10.1002/pros.1095.

Diss JK, Fraser SP, Djamgoz MB., 2004, Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects, European biophysics journal: EBJ, 33, 180-193. doi: 10.1007/s00249-004-0389-0.

Diss, J. K. J., Stewart, D., Pani, F., Foster, C. S., Walker, M. M., Patel, A., Djamgoz, M. B. A., 2005, A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo, Prostate cancer and prostatic diseases, 8(3), 266. doi: 10.1038/sj.pcan.4500796.

Djamgoz, M.B.A. & Onkal, R. (2013). Persistent Current Blockers of VoltageGated Sodium Channels: A Clinical Opportunity for Controlling Metastatic Disease. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 8, 66-84. doi: 10.2174/15748928130107.

Djamgoz B.A., Fraser S.P., Brackenbury W.J., 2019, In vivo Evidence for Voltage –Gated Sodium Channel Expression in Carcinomas and Potentiation of Metastasis,11(11),1675, doi: 10.3390/cancers11111675.

Donev I.S., Wang W., Yamada T., Li Q., Takeuchi S., Matsumoto K., Yamori T., Nishioka Y., Sone S., Yano S., Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer, 15;17(8):2260-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1993.

Dong Y., Li Q, Miao Q, Li D, 2021, Erlotinib as a salvage treatment after gefitinib failure for advanced non-small-cell lung cancer patients with brain metastasis: A successful case report and review. doi: 10.1097/MD.00000000000026450.

Dragana Nikitovic, Katerina Kouvidi, Nikos K. Karamanos, George N. Tzanakakis, 2013, The Roles of Hyaluronan/RHAMM/CD44 and Their Respective Interactions along the Insidious Pathways of Fibrosarcoma Progression. doi: 10.1155/2013/929531.

El-Telbany, A., & Ma, P. C (2012). Cancer genes in lung cancer: racial disparities: are there any?. *Genes & cancer*, 3(7-8)., 467-480. doi: 10.1177/1947601912465177.

Eslaminejad, T. Ve ark. (2022). Brain Cancer Treatment ; A Systematic Review. *International Journal of Cancer Management*. 15. doi: <https://doi.org/10.5812/ijcm-121473>.

Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, Lemmon MA. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 2003; 11: 507–517.

Franken N., Rodermond H., Stap J., Haveman J. and Bree C., ‘Clonogenic assay of cells in vitro’, *Nature Protocols*, 2006;1(5):2315-9.doi: 10.1038/nprot.2006.339.

Fraser, S.P., Salvador, V, Manning, E.A., Mizal, J., Altun, S., Raza, M., Berridge, R.J. & Djamgoz M.B.A. (2003). Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to

cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. lateral motility. *Journal of cellular physiology*, 195(3), 479-487. doi: 10.1002/jcp.10312.

Fraser, S. P., Diss, J. K., Lloyd, L. J., Pani, F., Chioni, A. M., George, A. J., Djamgoz, M. B., 2004, T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na⁺ channel activity, *FEBS letters*, 569(1-3), 191-194. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.05.063.

Fraser, S. P., Diss, J. K., Chioni, A. M., Mycielska, M. E., Pan, H., Yamaci, R. F., Brackenbury, W. J., 2005, Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis, *Clinical cancer research*, 11(15), 5381-5389. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0327.

Fraser S., Gunduz I., Brackenbury W., Fitzgerald E., Campbell T., Coombes R., Djamgoz M., 'Regulation of voltage-gated sodium channel expression in cancer: hormones, growth factors and auto-regulation', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2014, Feb 3;369(1638): 20130105.doi: 10.1098/rstb.2013.0105.

Freshney R., Alan R. Liss, 'Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique', Volume 25, Issue 8, 1987. ISBN: 978-1-119-51304-9.

Giard D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Dosik H., Parks W.P., In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors, 51(5):1417-23. doi: 10.1093/jnci/51.5.1417.

Globocan, (2020) Global Cancer Observatory. Erişim adresi: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi> .

Goldin, A. L., Barchi, R. L., Caldwell, J. H., Hofmann, F., Howe, J. R., Hunter, J. C., Noda, M., 2000, Nomenclature of voltage-gated sodium channels, *Neuron*, 28(2), 365-368. doi: 10.1016/s0896-6273(00)00116-1.

Goldin, A.L., 2003, Mechanisms of sodium channel inactivation, *Current Opinion in Neurobiology*, 13, 284–290. doi: 10.1016/s0959-4388(03)00065-5.

Goldstraw, P., & Crowley, J. J (2006). The International Association for the Study of Lung Cancer international staging Project on lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 1(4), 281-286.

Goldstraw, P., Chansky K., Crowley J., Rami-Porta R., Asamura H., Eberhardt W.E.E., Nicholson A.G., Groome P., Mitchell A., Bolejack V., (2016). "The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer." *J Thorac Oncol* 11(1): 39-51. doi: 10.1016/j.jtho.2015.09.009.

Grimes, J.A., Fraser, S.P., Stephens, G.J., Downing, J.E., Laniado, M.E., Foster, C.S., Abel, P.D., Djamgoz, M.B., 1995, Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro, *FEBS Letters*, 369, (2-3), 290-294. doi: 10.1016/0014-5793(95)00772-2.

Hengphasatporn K., Aiebchun T., Mahalapbutr P., Auepattanapong A., Khaikate O., Choowongkamon K., Kuhakarn C., Meesin J., Shigeta Y., Rungrotmongkol T., Sulfonlated Indeno[1,2- c]quinoline Derivatives as Potent EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors, 23;8(22):19645-19655. doi: 10.1021/acsomega.3c01195.

Hille, B., 2001, *Ion channels of excitable membranes*, Sinauer Associates, Sunderland, MA. ISBN: 0878933212.

Hodgkin AL, Huxley AF., 1952d, The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*, *The journal of physiology*, 116(4), 497- 506. doi: 10.1113/jphysiol.1952.sp004719.

Horne, J., Mansur, S., Bao, Y. (2021). Sodium ion channels as potential therapeutic targets for cancer metastasis. *Drug Discov Today*, 26(5):1136-1147. doi: 10.1016/j.drudis.2021.01.026.

House CD, Vaske CJ, Schwartz AM, Obias V, Frank B, Luu T, Sarvazyan N, Irby R, Strausberg RL, Hales TG, Stuart JM., Lee NH., 2010, Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion, *Cancer research*, 70, 6957-6967. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1169.

<https://www.cusabio.com/Transmembrane/Ion-Channels-A-Switch-that-Controls-the-Entry-and-Exit-of-Ions.html> [22.01.2024].

<https://www.drozdogan.com/kucuk-hucureli-ve-kucuk-hucureli-olmayan-akciger-kanseri-farklari-nelerdir/> [22.01.2024].

http://www.sinobiological.com/EGFR-SignalingPathway_image_pegfr-signaling-pathway.html (Son güncellenme tarihi: 01.03.2015, Alındığı tarih 14.02.2024)

Huang Y., Ognjenovic J., Karandur D., Miller K., Merk A., Subramaniam S., Kuriyan J., 2021, A molecular mechanism for the generation of ligand-dependent differential outputs by the epidermal growth factor receptor, 30:10:e73218. doi: 10.7554/eLife.73218.

Hsu W.H., Yang J.C.H., Mok T.S., Loong H.H., 2018, Overview of current systemic management of EGFR -mutant NSCLC, Annals of Oncology, Jan 1;29(suppl_1):i3-i9, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx702>.

In: LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012,2018 Jun 28., PMID: 31643726, Bookshelf ID: NBK548407.

Imaizumi Y., 2022, Reciprocal Relationship between Ca^{2+} Signaling and Ca^{2+} -Gated Ion Channels as a Potential Target for Drug Discovery, <https://doi.org/10.1248/bpb.b21-00896>.

Irmer D., Funk J.O., Blaukat A., EGFR kinase domain mutations- functional impact and relevance for lung cancer therapy, 2007, Aug 23;26(39):5693-701. doi:10.1038/sj.onc.1210383.

J. Anido, P. Matar, J. Albanell, M. Guzman, F. Rojo, J. Arribas, S. Averbuch and J. Baselga, 2003, ZD1839, a specific epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase 1971 inhibitor, induces the formation of inactive EGFR/HER2 and EGFR/HER3 heterodimers and prevents heregulin signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells, Clin Cancer Res 9, 1274-1283.

Jiang, F., Qiu, Q., Khanna, A., Todd, N. W., Deepak, J., Xing, L., ... & Katz, R. L. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. Molecular cancer research, 7(3), 330-338. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0393.

Kalinke L., Thakrar R., Janes S.M., 2020, The promises and challenges of early non small cell lung cancer detection: patient perceptions, low-dose CT screening, bronchoscopy and biomarkers. 15(10):2544-2564. doi: 10.1002/1878-0261.12864.

Kaufmann, S. G., Westenbroek, R. E., Zechner, C., Maass, A. H., Bischoff, S., Muck, J., Maier, S. K., 2010, Functional protein expression of multiple sodium channel α and β -subunit isoforms in neonatal cardiomyocytes, Journal of molecular and cellular cardiology, 48(1), 261-269. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.04.017.

Kelleher F.C., Solomon B., McAerthur G.A., 2012, Molecular Therapeutic Advances in Personalized Therapy of Melanoma and Non-Small Cell Lung Cancer, . Pers. Med. 2012, 2(2), 35-49; <https://doi.org/10.3390/jpm2020035>.

Krawczyk, P., Kucharczyk, T., & Wojas-Krawczyk, K (2012). Screening of gene mutations in lung cancer for qualification to molecularly targeted therapies. InTech. DOI: 10.5772/48689.

Laniado, M.E., Fraser, S.P. and Djamgoz, M.B.A., 2001. Voltage-gated K⁺ channel activity in human prostate cancer cell lines of markedly different metastatic potential: Distinguishing characteristics of PC-3 and LNCaP cells. Prostate, 45: 1–15. doi: 10.1002/1097-0045(20010301)46:4<262::aid-pros1032>3.0.co;2-f.

LCFA (2021). Lung Cancer types. Erişim adresi: Types of Lung Cancer | Lung Cancer Foundation of America (lcfamerica.org).

Lee, J.H., Lee, S.B., Kim H., Shin J.M., Yoon M., An H.S., Han J.W., 2022, Anticancer Activity of Mannose-Specific Lectin, BPL2, from Marine Green Alga Bryopsis plusoma, Mar. Drugs 20, 776. <https://doi.org/10.3390/md20120776>.

LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury, june 28, 2018. PMID: 31643176 Bookshelf ID: NBK547852.

Lobb R., Becker M., Wen S., Wong C., Wiegmanns A., Leimgruber A., Möller A., ‘Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma’, Journal of Extracellular Vesicles, 2015; 4: 10.3402/jev.v4.27031. doi: 10.3402/jev.v4.27031.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Darnell, J., 2003, Molecular Cell Biology, fifth edition, WH Freeman.

Manisha, P., 2012, Leukemia: a review article. International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical & Bio Sciences, Vol.2 (3):397-407. ISSN2277 – 6222.

Marisa L., Martin F., Fluorescence Imaging of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer, 2022 Jan 28;14(3):686. doi: 10.3390/cancers14030686.

Martin F., Ufodiama C., Watt I., Mülâyim M., Brackenbury W.J., 2015, Therapeutic Value of Voltage-Gated Sodium Channel Inhibitors in Breast, Colorectal, and Prostate Cancer: A Systematic Review, 12:6:273. doi: 10.3389/fphar.2015.00273.

Meacham, C.E., Morrison, S.J., 2013, Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. 501, 328-337. doi: 10.1038/nature12624.

Memon A.A., Jakobsen S., Dagnaes-Hansen F., Sorensen BS, Keiding S., Nexø E., 2009, Positron emission tomography (PET) imaging with [11C]-labeled erlotinib: a micro-PET study on mice with lung tumor xenografts, Feb 1;69(3):873-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3118.

Miller VA. EGFR mutations and EGFR tyrosine kinase inhibition in non-small cell lung cancer. Semin Oncol Nurs 2008; 24(1): 27-33. doi: 10.1016/j.soncn.2007.11.009.

Mohammed F., Khajah M., Yang M., Brackenbury W. and Luqmani Y., 'Blockade of voltage-gated sodium channels inhibits invasion of endocrine-resistant breast cancer cells', International Journal Of Oncology, Volume 48, 2016.

Molina J.R., Yang P., Cassivi S.D., Schild S.E., Adjei A.A., Non small cell lung cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. 2008 May;83(5):584-94. doi: 10.4065/83.5.584.

Nelson, M., Millican-Slater, R., Forrest, L. C., Brackenbury, W. J., 2014, The sodium channel $\beta 1$ subunit mediates outgrowth of neurite-like processes on breast cancer cells and promotes tumour growth and metastasis, International journal of cancer, 135(10), 2338-2351. doi: 10.1002/ijc.28890.

Nikitovic, D., Kouvidi K., Karamanos N.K., Tzanakakis G.N., 2013, "The roles of hyaluronan/RHAMM/CD44 and their respective interactions along the insidious pathways of fibrosarcoma progression." *Biomed Res Int* 2013: 929531. doi: 10.1155/2013/929531.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000; 19: 3159-67. doi: 10.1093/emboj/19.13.3159.

Onkal, R., Djamgoz, M. B., 2009, Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: clinical potential of neonatal Nav1. 5 in breast cancer, *European journal of pharmacology*, 625(1-3), 206-219. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.08.040.

Orzaez M., Guevara T., Sancho M., Paya E.P., Intrinsic caspase-8 activation mediates sensitization of erlotinib-resistant tumor cells to erlotinib/cell-cycle inhibitors combination treatment, 25;3(10):e415. doi: 10.1038/cddis.2012.155.

Petkov, G.V. (2009). Chapter 16 - Ion Channels. *Pharmacology* , Pages 387-427. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369521-5.00016-6>.

Prevarskaya, N. , Skryma, R. & Shuba, Y., 2010, Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 16 (3). :107-21. doi: 10.1016/j.molmed.2010.01.005.

Prevarskaya, N., Skryma, R. & Shuba, Y.(2018). Ion channels in cancer: are cancer hallmarks oncochannelopathies? *Physiol Rev*, 98, 559-621. doi: 10.1152/physrev.00044.2016.

Purves, D., Augustine, G. J. and Fitzpatrick, D., 2001. Editors. *Neuroscience*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10799/> ISBN-10: 0-87893-742-0.

Rami-Porta, R., Bolejack, V., Giroux, D. J., Chansky, K., Crowley, J., Asamura, H., & Goldstraw, P (2014). The IASLC lung cancer staging Project: the new database to inform the eighth edition of the TNM classification of lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(11), 1618-1624. doi: 10.1097/JTO.0000000000000334.

Redig, A.J. & McAllister S.S., 2013, Breast cancer as systemic disease: a view of metastasis. *J Intern Med*, 274(2);113-26. doi: 10.1111/joim.12084.

Resta, C.D., & Becchetti A., 2010, Introduction to ion channels. *Adv Exp Med Biol*, 674:9-21. doi: 10.1007/978-1-4419-6066-5_2.

Roskoski Jr R. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319: 1–11. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.04.150.

Roskoski Jr, R. (2013). Anaplastic Lymphoma kinase (ALK): structure, oncogenic activation, and pharmacological inhibition. *Pharmacological research*, 68(1), 68-94. doi: 10.1016/j.phrs.2012.11.007.

Ruiz, M.D.L.& Kraus, R.L. (2015). Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J. Med. Chem.*, 58, 7093–7118. doi: 10.1021/jm501981g.

Ryohei Miyazaki, Takashi Anayama, Kentaro Hirohashi, Hironobu Okada, Motohiko Kume and Kazumasa Orihashi, 2016, In Vitro Drug Sensitivity Tests to Predict Molecular Target Drug Responses in Surgically Resected Lung Cancer. 11(4): e0152665. doi: 10.1371/journal.pone.0152665.

Shad, K.F., Salman, S., Afridi, S., Tariq, M. & Asghar, S. (2018). Introductory Chapter: Ion Channels. *Ion Channels in Health and Sickness*. doi: 10.5772/intechopen.80597

Scorei, R., Ciubar R., Ciofrangeanu C.M., Mitran V., Cimpean A., Irdachescu D., 2008, "Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells." *Biol Trace Elem Res* 122(3): 197-205. doi: 10.1007/s12011-007-8081-8.

Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(3): 169-81. doi: 10.1038/nrc2088.

Siegel, R.L., Miller K.D., Jemal A., 2020, "Cancer statistics, 2020." *CA Cancer J Clin* 70(1): 7-30. doi: 10.3322/caac.21590.

Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., ... & Mano, H. (2007). Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 448(7153), 561-566. doi: 10.1038/nature05945.

Sokolov, M. V., Henrich-Noack, P., Raynoschek, C., Franzén, B., Larsson, O., Main, M., Dabrowski, M., 2018, Co-expression of β Subunits with the Voltage-Gated Sodium Channel Na V 1.7: the Importance of Subunit Association and Phosphorylation and Their Effects on Channel Pharmacology and Biophysics, *Journal of molecular neuroscience*, 65(2), 154-166. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1082-6>.

Sun H., Ma H., Wang J., Xia L., Zhu G., Wang Z., Sun J., Chen Z., 2017, Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 degradation induced by NEDD4 promotes acquired erlotinib resistance in non-small-cell lung cancer, *Jul*;39(7):1010428317709639. doi: 10.1177/1010428317709639.

Suy, S., Hansen, T. P., Auto, H. D., Kallakury, B. V. S., Dailey, V., Danner, M., Macarthur, L., Zhang, Y., Miessau, M. J., Collins, S. P. and Brown, M. L., 2012. Expression of voltagegated sodium channel Nav1.8 in human prostate cancer is associated with high histological grade. *J Clin Exp Oncol*, 2012 Nov 1;1(2):10.4172/2324-9110.1000102. doi: 10.4172/2324-9110.1000102.

Talukdar S., Emdad L., Das S.K., Fisher P.B., 2020, Chapter four-EGFR: A n eesential receptor tyrosine kinase-regulator of cancer stem cells. 147:161-188. doi: 10.1016/bs.acr.2020.04.003.

Tanoue, L. T., Tanner, N. T., Gould, M. K., & Silvestri, G. A. (2015). Lung cancer screening. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 191(1), 19-33. doi: 10.1164/rccm.201410-1777CI.

Thandra K.C., Barsouk A., Saginala K., Aluru J.S., Barsouk A., 2021, Epidemiology of lung cancer. 25(1):45-52. doi: 10.5114/wo.2021.103829.

Tarceva (2004). Highlights of prescribing information, Tarceva (erlotinib) tablets for oral use, Initial US.

Wang, J., Ou, S.W., & Wang, Y.J. (2017). Distribution and function of voltagegated sodium channels in the nervous system. *Channels (Austin)*, 11(6): 534–554. doi: 10.1080/19336950.2017.1380758.

Wang, Z., 2004. Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflügers Archiv*, 448(3): 274-286. doi: 10.1007/s00424-004-1258-5.

Weinberg, R. A. (2014). *The Biology of Cancer*. (2nd ed). Garland Science. <https://doi.org/10.1201/9780429258794>.

Wisedchaisri, G., Tonggu, L., McCord, E., El-Din, T.M.G., Wang, L., Zheng, N. & Catterall, W.A. (2019). Resting State Structure and Gating Mechanism of a Voltagegated Sodium Channel. *Cell*, 178(4), 993–1003.e12. doi: 10.1016/j.cell.2019.06.031.

Wu W., Ceng G., Luo Q., Deng M., Wu T., Jiang L., Tao H., Rong M., Kang S., 2020, The Functional Role of Voltage-Gated Sodium Channel Nav 1.5 in Metastatic Breast Cancer. 11: 1111. doi: 10.3389/fphar.2020.01111.

Yan X., Kong J., Wang J., Wang C., Shen H., 2024, Severe megaloblastic anemia in a patient with advanced lung adenocarcinoma during treatment with erlotinib: a case report and literature review, 6;24(1):121. doi: 10.1186/s12890-024-02935-9.

Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001; 37(Suppl. 4): 3–8. doi: 10.1016/s0959-8049(01)00230-1.

Ying Lu Y., Jing D., Xu M., Wu K., Wang X P., 2008, Anti-tumor activity of erlotinib in the BxPC-3 pancreatic cancer cell line, 14(35): 5403–5411. doi: 10.3748/wjg.14.5403.

Ying Y, Li XF, Chen JQ, Dong CX, Weng SS, Huang JJ. Critical appraisal of the role of gefitinib in the management of locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Onco Targets Ther* 2014; 7: 841–852. doi: 10.2147/OTT.S34124.

Yi, B.A.& Jan, L.Y. (2002). Ion Channels. *Encyclopedia of the Human Brain*.599-615.

Yu, F. H. And Catterall, W. A.,2004. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE*, 253:15. doi: 10.1126/stke.2532004re15.

Yu, F.H., Yarovoy, V., Gutman, G.A., Catterall, W.A., 2005, Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily, *Pharmacological reviews*, 57,387-395. doi: 10.1124/pr.57.4.13.

Zhao F.Y., Han J., Chen X.W., Wang J., Wang X.D., Sun J.G., Chen Z.T., 2016, miR-223 enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to erlotinib by targeting the insulin-like growth factor-1 receptor, 38(1):183-91. doi: 10.3892/ijmm.2016.2588.

Zappa C., Mousa S.A., 2016, Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Jun*;5(3):288-300. doi: 10.21037/tlcr.2016.06.07.

Zhang, G. Fang, B. Liu, R.Z. Lin, H. Kinose, F. Bai, Y. Oguz, U. Remily-Wood E.R. Li, J. Altiok, S. Eschrich, S. Koomen, J. Haura, E.B. (2011). Mass spectrometry mapping of epidermal growth factor receptor phosphorylation related to oncogenic mutations and tyrosinekinase inhibitor sensitivity, *Journal of Proteome Research*, 10(1): 305–319. doi: 10.1021/pr1006203.

Zheng Y T., Yang H Y., Li T., Zhao B., Shao T F., Xiang X Q., Cai W M., Amiloride sensitizes human pancreatic cancer cells to erlotinib in vitro through inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway, 2015, 36: 614–626. doi: 10.1038/aps.

Quatrala, A.E., Porcelli L., Silvestris N., Giuseppe C., Paradiso A., Azzariti A., 2011, GFR tyrosine kinases inhibitors in cancer treatment: in vitro and in vivo evidence, *Frontiers in Bioscience* 16, 1962-1972, January 1, Clinical Experimental Oncology Laboratory, Italy.

Zhou J., Wu Z., Wong G., Pectasides E., Nagaraja A., Stachler M., Zhang H., Chen T., Zhang H., Liu J.B., Xu X., Sicinska E., Sanchez-Vega F., Rustgi A.K., Diehl J.A., Wong K.K., Bass A.J., 2017, CDK4/6 or MAPK blockade enhances efficacy of EGFR inhibition in oesophageal squamous cell carcinoma, 6:8:13897. doi: 10.1038/ncomms13897.

