

**STAT-3 İNHİBİTÖRÜ CRYPTOTANSHİNONE İLE MEME
KANSERİ HÜCRELERİNDE KALSİYUM İLE AKTİVE
EDİLEN KLORÜR İYON KANALI TMEM16A’NIN
İNHİBİSYONUNUN, KANSER HÜCRELERİNİN
PROLİFERASYONU ÜZERİNE ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Berrin ÜSTÜNDAĞ
ORCID ID: 0000-0001-5211-7874

MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. YUSUF ÇAMLICA
ORCID ID: 0000-0001-5211-7874

MERSİN
OCAK - 2022

ONAY

Berrin Üstündağ tarafından Prof. Dr. Yusuf ÇAMLICA danışmanlığında hazırlanan “STAT-3 inhibitörü Cryptotanshinone ile meme kanseri hücrelerinde kalsiyum ile aktive edilen klorür iyon kanalı tmem16a’nın inhibisyonunun, kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri” başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından .../.../.....tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği/çokluğu ile Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Yusuf ÇAMLICA	
Üye	Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU	
Üye	Prof. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN	
Üye		
Üye		

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun .../.../.... tarih ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cahit BİLİM
Enstitü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written information and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

...../...../ 2022

İmza / Signature

Berrin ÜSTÜNDAĞ

ÖZET

STAT-3 İNHİBİTÖRÜ CRYPTOTANSHİNONE İLE MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE KALSİYUM İLE AKTİVE EDİLEN KLORÜR İYON KANALI TMEM16A'NIN İNHİBİSYONUNUN, KANSER HÜCRELERİNİN PROLİFERASYONU ÜZERİNE ETKİLERİ.

İyon kanalları yaşayan hücrelerin temel yapı taşlarındandır. Birçok önemli fizyolojik süreçte merkezi rol oynayan iyon kanallarının yapısal veya işlevsel bozuklukları, özellikle uyarılabilme özelliği olan her türlü hücreyi, dokuyu ve organı etkileyen, "kanalopatiler" olarak adlandırılan çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Son araştırmalar iyon kanallarının çeşitli kanser özelliklerine dahil olarak, tümör oluşumunda ve kanserin gelişiminde önemli roller üstlendiğini göstermektedir. Bir iyon kanalının seçici olarak bloke edilmesi, özel bir molekülün bir hücrede fizyolojik bir yanıt oluşturmak için iyon kanalının açılmasını önleyen biyolojik mekanizmadır. Bu inhibitörler, kanalın açılması ile oluşan yanıtı engellerler. Kanser hücrelerinin özelliklerinden olan sürekli anjiyogenez, doku istilası ve metastaz kritik olarak Ca^{2+} 'yi taşıyan iyon kanallarına bağlıdır. TMEM16A (ANO1) de bunlardan biridir. TMEM16A'nın aşırı ekspresyonunun meme kanserinde karsinogenezde nasıl bir rol oynadığı belirsizliğini korumaktadır. Bu nedenle tez çalışmasının literatürdeki var olan kısıtlı çalışmalara katkı sağlaması ve yeni ilaç hedeflerine ışık tutması amaçlanmıştır. Bu çalışmada, inhibitör etkisi olduğu bilinen Cryptotanshinone'un farklı konsantrasyonlarının uygulandığı meme kanseri hücre hattındaki (MCF-7) anti-proliferatif etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla MCF-7 hücreleri üzerinde üç yöntem uygulanmıştır. Birincisi, Cryptotanshinone'un sitotoksik etkisini incelemek ve diğer deneylerde kullanılacak dozları belirlemek için MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) yöntemi, ikincisi ANO1 kanalı gen ekspresyonunu incelemek için qRT-PCR yöntemi ve üçüncüsü ANO1 kanal akımını ölçmek amacıyla elektrofizyolojik bir yöntem olan yama kenetleme tekniği kullanılmıştır. Yapılan MTT analizi sonucunda gen ekspresyonu ve yama kenetleme çalışmalarında kullanılmak üzere 10, 20 ve 30 μ M doz grupları olarak belirlenmiştir. Yama kenetleme deneylerinde bu üç doz grubu için 0. dk. kayıtları kontrol olarak değerlendirilmiş ve 15. dakikada elde edilen verilerden maksimum akım değerleri ölçülmüştür. Buna göre dozlar arasında TMEM16A kanalını en yüksek miktarda inhibe eden grup, 30 μ M doz grubu olarak belirlenmiştir. Diğer iki doz grubunda da inhibisyon gözlenmektedir ancak kontrole kıyaslandığında büyük bir fark oluşturmamıştır. Gen ekspresyonu deneylerinde ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmasa da, 24. saate ait veriler için, kontrole göre değerlendirme yapıldığında gen ekspresyon düzeyinin 10 μ M doz grubunda %65 oranında azaldığı, 20 μ M doz grubunda %71 oranında azaldığı ve 30 μ M doz grubunda %83 oranında azaldığı belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen bu verilere göre, Cryptotanshinone'un MCF7 hücrelerinde sitotoksik etki göstererek kanser hücrelerini azalttığı, ANO1 kanal akımını bloke ettiği ve kanal ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir. Bu çalışma Cryptotanshinone'un meme kanserinde tedavi edici ilaç olarak kullanılabilirliğine dair literatürdeki çalışmalara katkı sağlamıştır. Ayrıca günümüzde meme kanserinde uygulanan tedavi yöntemlerinin etkinliğini artırma amacıyla kullanılabilirliğine dair literatürde bulunan çalışmalara ve yeni ilaç hedeflerine katkısı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: İyon kanalları, Meme Kanseri, Hücre kültürü, TMEM16A, Cryptotansinone.

Danışman: Prof. Dr. Yusuf Çamlıca, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

EFFECTS OF INHIBITION OF CALCIUM-ACTIVATED CHLORIDE ION CHANNEL TMEM16A IN BREAST CANCER CELLS WITH STAT-3 INHIBITOR CRYPTOTANSHINONE ON THE PROLIFERATION OF CANCER CELLS.

Ion channels are the basic building blocks of living cells. Structural or functional disorders of ion channels, which play a central role in many important physiological processes, cause various diseases called "channelopathies" that affect all kinds of cells, tissues and organs, especially those with excitability. Recent studies show that ion channels play important roles in tumor formation and cancer development, including in various cancer features. Selective blocking of an ion channel is the biological mechanism that prevents a particular molecule from opening the ion channel to induce a physiological response in a cell. These inhibitors inhibit the response that occurs when the channel is opened. Persistent angiogenesis, tissue invasion, and metastasis, characteristics of cancer cells, are critically dependent on ion channels that transport calcium. TMEM16A (ANO1) is one of them. It remains unclear what role overexpression of TMEM16A plays in carcinogenesis in breast cancer. For this reason, it is aimed that the thesis study will contribute to the limited studies in the literature and shed light on new drug targets. In this study, it was aimed to investigate the anti-proliferative effect of Cryptotanshinone, which is known to have an inhibitory effect, in breast cancer cell line (MCF-7) to which different concentrations are applied. For this purpose, three methods were applied on MCF-7 cells. First, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) method was used to examine the cytotoxic effect of Cryptotanshinone and to determine the doses to be used in other experiments, secondly, qRT-PCR method to examine ANO1 channel gene expression, and thirdly, patch clamping technique, an electrophysiological method, to measure ANO1 channel current. As a result of the MTT analysis, 10, 20 and 30 μ M dose groups were determined to be used in gene expression and patch clamping studies. 0 min for these three dose groups in patch clamping experiments. Recordings were evaluated as control and maximum current values were measured from the data obtained at the 15th minute. Accordingly, the group that inhibited the TMEM16A channel the most among the doses was determined as the 30 μ M dose group. Inhibition was also observed in the other two dose groups, but did not make a big difference compared to the control. Although there was no significant difference between the groups in gene expression experiments, for the 24-hour data, when compared to the control, it was determined that the gene expression level decreased by 65% in the 10 μ M dose group, decreased by 71% in the 20 μ M dose group, and decreased by 83% in the 30 μ M dose group. According to these data obtained from the study, it was observed that Cryptotanshinone showed a cytotoxic effect on MCF7 cells and reduced cancer cells, blocked ANO1 channel current and decreased channel expression. This study contributed to the studies in the literature on the use of Cryptotanshinone as a therapeutic drug in breast cancer. In addition, it is thought that it will contribute to the studies in the literature and new drug targets regarding the usability of the treatment methods applied in breast cancer today in order to increase the effectiveness.

Keywords: Ion channels, Breast Cancer, Cell culture, TMEM16A, Cryptotansinone.

Advisor: Prof. Dr. Yusuf Çamlıca, Mersin University, Department of Biology, Mersin.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca tecrübesi ve hoşgörüsü ile her zaman bana yol gösteren, bu zorlu süreçte beni cesaretlendiren ve destekleyen çok sevgili danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Yusuf ÇAMLICA'ya,

Her konuda beni destekleyip bu süreci başarıyla tamamlamamda bana çok büyük katkıları olan, bilgisine, samimiyetine güvenerek başvurduğum sevgili hocam Prof. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN'e,

Tez çalışmam süresince hiçbir yardımı esirgmeden fikir ve önerileriyle bana her zaman ışık tutan sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na,

Deneyisel çalışmalarımda yardımını aldığım, samimiyeti ve güleryüzlü yaklaşımıyla beni destekleyen sevgili hocam Dr. Öğr.Üyesi Fatma SÖĞÜT'e,

Hücre kültürü çalışmalarımda tecrübe ve tavsiyelerine ihtiyaç duyduğumda beni geri çevirmeyen ve güleryüzüyle rahat bir şekilde çalışmamı sağlayan Dr. Öğr. Gör. Derya YETGİN'e ve Ayşegül ÇETİNKAYA'ya teşekkür ederim.

Aile bu dünyadaki en önemli kavramdır, en ihtiyaç duyduğumuz zamanlarda hep onlar yanımızdadır. Bu yüzden varlığına şükrettiğim, benden sevgisini merhametini esirgemeyen canım babama, anneliğin hakkını veren tüm anneler gibi ayaklarımın üstünde durmam için her türlü fedakarlığı yapan canım anneme ve her biri benim canımdan kıymetli sevgili kardeşlerime ve biricik eşime sonsuz teşekkürler...

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 2021-1-TP3-4331 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Kanser ve Tarihçesi	3
2.1.1. Kanserin Genel Özellikleri	5
2.2. Meme Kanseri	6
2.2.1. Meme Bezinin Histolojik ve Hormonal Yapısı	6
2.2.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	7
2.2.3. Meme Kanserinde Risk Faktörleri	8
2.2.4. Meme Kanserinin Patogenezi	10
2.2.5. Meme Kanseri ile İlgili Genler	11
2.2.6. Meme Kanseri Tanı ve Tedavi Yöntemleri	12
2.2.7. MCF-7 Hücre Soyunun Tarihçesi ve Karakterizasyonu	13
2.3. İyon Kanalları Biyolojisi ve Fonksiyonu	14
2.3.1. İyon Kanallarının Sınıflandırılması	15
2.3.2. İyon Kanallarının Hastalıklarla İlişkisi	23
2.3.3. İyon Kanallarının Kanserle İlişkisi	24
2.3.4. Kanser Patofizyolojisinde Rol Alan Ana Membran Kanal Aileleri	27
2.3.4.1. K ⁺ Kanalları ve Kanser	29
2.3.4.2. Na ⁺ Kanalları ve Kanser	30
2.3.4.3. Ca ²⁺ Kanalları ve Kanser	31
2.3.4.4. Cl ⁻ Kanalları ve kanser	31
2.3.4.5. Ca ²⁺ ile Aktive Edilen İyon Kanalları	33
2.4. İyon Kanallarına Yönelik İlaç Geliştirme Hedefleri	39
2.5. Cryptotanshinone	40
3. MATERYAL ve YÖNTEM	43
3.1. Tezde Kullanılan Araç Gereçler ve Kimyasallar	43
3.2. Hücre Kültürü	44
3.2.1. Hücre Besi Ortamı Hazırlanması	44
3.2.2. MCF-7 Hücre Soyunun Açılması ve Çoğaltılması	45
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması	45
3.2.4. Hücrelerin Sayımı	46
3.2.5. Crptotanshinone Stok Çözeltilisinin Hazırlanması	46
3.2.6. MTT stok Çözeltilisinin Hazırlanması	47
3.3. MTT Testi	47
3.3.1. Deney Grupları	47
3.3.2. Sitotoksite Analizinin Uygulanması	48
3.3.3. IC50 Değerinin Hesaplanması	49
3.4. q-RT PCR Tekniği ile Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi	49
3.4.1. RNA izolasyonu	49
3.4.2. cDNA Sentezi Aşaması	50
3.4.3. Real Time PCR Aşaması	51

	Sayfa
3.5. Patch Clamp Tekniği ile Elektrofizyolojik Kayıtlar	51
3.5.1. Hücre Kültürü Çalışması	52
3.5.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	52
3.5.2.1. Banyo Çözeltilisinin Hazırlanması	52
3.5.2.2. Pipet Çözeltilisinin Hazırlanması	52
3.5.3. Cam Pipetlerin Hazırlanması	53
3.5.4. Deney Düzenegi	53
3.5.5. Kenetleme Protokolü	55
3.6. İstatistiksel Analizler	55
3.6.1. MTT Veri Analizi	55
3.6.2. Eş Zamanlı PCR Verilerinin Analizi	55
3.6.3. Elektrofizyolojik Kayıtların Analizi	56
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	57
4.1. Bulgular	57
4.1.1. MTT Analizi Bulguları	57
4.1.2. q-RT PCR Analizi Bulguları	62
4.1.3. Patch Clamp Analizine Ait Elektrofizyolojik Bulgular	64
4.2. Tartışma	65
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	85

TABLÖLER DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Voltaj kapılı sodyum kanallarının α ve β alt birimleri ve ilişkilendirildikleri kanser türleri.	18
Tablo 2.2. İnsan kanserlerinde ifadesi değişen iyon kanalları ve hücresel işlevleri.	28
Tablo 2.3. Potasyum kanallarının alt tiplerinin ilgili kanser türüyle apoptozdaki rolleri.	29
Tablo 3.1. Sarf malzemeleri ve kimyasallar.	43
Tablo 3.2. Kullanılan araç ve gereçler.	44
Tablo 3.3. cDNA sentezinde kullanılan örnek ve reaktifler.	50
Tablo 4.1. 24 saat ortalama ve standart sapma değerleri (490nm).	59
Tablo 4.2. 48 saat ortalama ve standart sapma değerleri (490nm).	59
Tablo 4.3. 72 saat ortalama ve standart sapma değerleri (490nm).	60
Tablo 4.4. Uygulama süresine göre 24, 48 ve 72 saat absorbans (ortalama±standart sapma) değerleri.	60
Tablo 4.5. Kontrol grubu ve uygulanan dozların absorbans (ortalama±standart sapma) değerleri.	61
Tablo 4.6. MCF-7 hücre hattında ANO1 geni için 24,48 ve 72. saatler sonunda gen ekspresyonu oran değerleri.	63
Tablo 4.7. Yama-kenetleme deneylerinde elde edilen maksimum akım değerleri (pA).	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kanserin ayırt edici özellikleri.	6
Şekil 2.2. Bazı meme kanseri türlerinin histolojik yapısı (ER pozitif).	11
Şekil 2.3. Kanser hücre döngüsü sırasında ifade seviyelerine göre farklı VGIC kanallarının aktiviteleri.	16
Şekil 2.4. Voltaj kapılı potasyum kanallarının alt tipleri.	17
Şekil 2.5. Ligand kapılı iyon kanallarının üç yapısal alt biriminin şematik gösterimi.	21
Şekil 2.6. İyon kanalları ile ilişkili hastalıklar.	24
Şekil 2.7. İyon kanallarının kanser hücrelerinin çoğalmasına ve hücre döngüsü ilerlemesine katkısı.	26
Şekil 2.8. İnsan kanserleriyle ilişkilendirilmiş iyon kanal türleri ve aquaporinler.	27
Şekil 2.9. Klorür kanalları ile ilişkili kanserlerin gösterimi.	32
Şekil 2.10. TMEM16A monomerinin topolojisi.	34
Şekil 2.11. TMEM16A'nın (ANO1) farklı dokulardaki dağılımı ve hastalıklardaki rolü.	35
Şekil 2.12. TMEM16A ekspresyonunu düzenleyen mekanizmalar.	36
Şekil 2.13. TMEM16A ve TGF- β sinyal yolunun düzenlenmesi yoluyla hücre çoğalmasının ve göçünün miR-381 aracılı inhibisyonu.	38
Şekil 2.14. İyon kanallarının modülasyonu ve ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılan klasik yöntemler.	39
Şekil 2.15. Cryptotanshinone'un kimyasal yapısı.	40
Şekil 2.16. CPT'nin anti-kanser etki mekanizmaları.	41
Şekil 3.1. Cedex XS hücre sayım cihazı ve cedex smart slides.	46
Şekil 3.2. MCF-7 hücrelerinin Cedex XS hücre sayım cihazındaki görüntüsü.	46
Şekil 3.3. Sitotoksosite analizinde grupların 96'lık plate yerleşimi.	48
Şekil 3.4. Thermal Cycler cihazı sıcaklık protokolü.	50
Şekil 3.5. Çalışmada kullanılan filamentli pipetler ve pipet çözeltisi enjektörü.	53
Şekil 3.6. Patch clamp kayıt düzeneği ve ortamı.	54
Şekil 4.1. 24 saat sonunda IC50 değerinin hesabı için elde edilen doz yanıt eğrisi.	57
Şekil 4.2. 48 saat sonunda IC50 değerinin hesabı için elde edilen doz yanıt eğrisi.	58
Şekil 4.3. 72 saat sonunda IC50 değerinin hesabı için elde edilen doz yanıt eğrisi.	58
Şekil 4.4. IC50 ortalama (24,48,72,) doz yanıt eğrisi.	58
Şekil 4.5. Doza ve uygulama süresine bağlı % canlılık grafiği.	61
Şekil 4.6. ANO1 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.	62
Şekil 4.7. ACT β geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltma/Simgesi	Tanım
ACT β	Aktin beta
AICR	Amerikan Kanseri Araştırmaları Enstitüsü
ANO1	Anoctamin1 iyon kanalı
ASIC	Asite duyarlı iyon kanalları
AQPs	Aquaporinler
A2780	Yumurtalık kanseri hücre hattı
A549	Akciğer kanseri hücre hattı
CACC	Kalsiyumla aktive edilen klorür kanalları
CAES17	Özofagus kanseri hücre hattı
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CF	Kistik fibröz
CTFR	Kistik fibröz transmembran iletkenlik düzenleyici
CPT	Cryptotanshinone
CRAC	Kalsiyum salınımıyla aktive edilen kanallar
DCIS	Duktal Carcinoma In Situ
DP	Dehidroandrographolide
ECM	Hücre dışı matris
EC109	Özofagus kanseri hücre hattı
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ESCC	Özofagus skuamöz hücreli karsinom
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	Epidermal mezenkimal geçiş
ENaC	Epitelyal sodyum kanalı
ER	Östrojen reseptörü
GABAA	γ -aminobütirik asitA
GPCR	G proteinine bağlı reseptörler
G Ω	Giga ohm
HCT-116	Kolon kanseri hücre hattı
HepG2	İnsan hepatoblastom hücre hattı
HER-2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2
Hey	Yumurtalık kanseri hücre hattı
HNSCC	Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom
HPV	İnsan papilloma virüsü
HSC	Hematopoetik kök hücre
Huh7	İnsan hepatoselüler karsinom hücre hattı
IBC	İnflamatuvar meme kanseri
IP3R	İnositol-3 fosfat reseptörü
IC50	Hücrelerin %50'sini öldüren inhibitör konsantrasyon
JAK	Janus kinaz
K2P	İki porlu potasyum kanalı
LCIS	Lobular Carcinoma In Situ
LGIC	Ligand kapılı iyon kanalları
M	Molar
μ M	Mikromolar
MCF-7	Meme kanseri hücre hattı
miR-381	Mikro RNA-381
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
ms	Milisaniye
mV	Milivolt
NCI-H520	Akciğer kanseri hücre hattı

Kısaltma/Simgesi	Tanım
pA	Piko amper
PC9	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı
PR	Progesteron reseptörü
RKO	Kolon kanseri hücre hattı
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
STAT-3	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü-3
SW620	İnsan kolorektal kanseri hücre hattı
TGF- β	Tümör büyüme faktörü- β
TM	Tümör mikroçevresi
TMEM16A	Transmembran protein16A
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
TNF- α	Tümör nekroz faktörü- α
TRP	Geçici reseptör potansiyeli
VDAC	Voltaja bağımlı anyon kanalı
VGCC	Voltaj kapılı kalsiyum kanalları
VGCLC	Voltaj kapılı klorür kanalları
VGIC	Voltaj kapılı iyon kanalları
VGKC	Voltaj kapılı potasyum kanalları
VGSC	Voltaj kapılı sodyum kanalları
V _m	Transmembran potansiyeli
V _r	Dinlenim membran potansiyeli
WCRF	Dünya Kanser Araştırma Fonu
WHO	Dünya sağlık örgütü

1. GİRİŞ

Kanser genellikle normal bir hücrenin soyunda somatik mutasyonların birikmesinden kaynaklanan evrimsel bir süreç olarak görülmektedir. Mutasyona uğramış hücrelerde seçici bir büyüme avantajı gelişmektedir ve bu durum kontrolsüz çoğalmayla sonuçlanmaktadır. Tümör gelişiminin büyümeyi kontrol eden genlerin (onkogenler ve tümör baskılayıcı genler) düzensizliğinden kaynaklandığı kabul edilmektedir. Bu hücreler ayrıca hücrel yaşlanmadan muaftırlar. Bu nedenle, ölümsüz öncü hücrelerde kansere, büyüme kontrol yollarının anormal aktivasyonu neden olmaktadır. Günümüzde her birinin etki mekanizması ve tedavisi birbirinden farklı 200'den fazla kanser türü bulunmaktadır. En sık görülen insan kanserleri deri, kolon, meme, prostat veya akciğer gibi epitel dokularında ortaya çıkmaktadır ve toplu olarak yılda birkaç milyon ölüme yol açmaktadır (Blanpain, 2013).

Artan insidans ve mortalite ile kanser, günümüzde birincil bir halk sağlığı sorunu olmaya devam ederken, kanser türlerinin değişen profillerine ait çalışmalar sonucunda, meme kanserinin 2020 yılında tüm dünyada en çok teşhis edilen kanser olarak akciğer kanserinin yerini aldığı ortaya çıkmıştır (Cao vd., 2021). Devam eden sayısız araştırmalara rağmen hala insan kanserlerinde malign transformasyonun hücrel ve moleküler patolojisi konusundaki anlayışımız eksiktir.

İyon kanalları, yaşayan hücrelerin temel yapı taşlarındandır. Birçok önemli fizyolojik süreçte merkezi rol oynayan iyon kanallarının yapısal veya işlevsel bozuklukları, özellikle uyarılabilme özelliği olan her türlü hücreyi, dokuyu ve organı etkileyen, "kanalopatiler" olarak adlandırılan çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Kanser de bu hastalıklardan biridir ve iyon kanalları ve kanser arasındaki ilişki son yıllarda yapılan çalışmalarla aydınlatılmaya çalışılmaktadır (Vaeth ve Feske, 2018). İyon kanalları onkolojide yeni bir araştırma alanını oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalarda, spesifik iyon kanallarının bu işaretlere katkısının farklı kanser türlerine göre değiştiği gösterilmiştir. Bu nedenle iyon kanallarının kanser teşhisi için hedef olarak önemini belirlemek ve tedavi etmek için ekspresyon, fonksiyon ve düzenlenmeleri her kanser türü için ayrı ayrı değerlendirilmelidir. İyon kanallarının kanserle ilgili anahtar süreçlerdeki rollerinin ayrıntılı bir şekilde anlaşılması, tanı ve tedavi için moleküler hedefli araçların geliştirilmesini kolaylaştıracaktır (Falconer vd., 2002).

İyon kanalı tutulumu kavramı, 1980'lerin sonlarına doğru, kanser ilerlemesinde bazı kanalların, özellikle K^+ ve Ca^{2+} kanalları için klasik blokörlerin, *in vitro* hücrel proliferasyon veya apoptozu önleyebildiğinin farkına varılmasıyla ortaya çıkmıştır. Ancak bu konunun önemi yıllarca anlaşılamamıştır. Bilim insanlarının, onkologların ve ilaç endüstrisinin katılımıyla 2008 yılında gerçekleştirilen ilk uluslararası toplantıda, iyon kanallarının kanser gelişimi ve ilerlemesindeki olası rolüne ve çeşitli kanserlerde teşhis ve tedavilerde kullanılabilirliğine dair fikirler öne sürülmüştür (Kunzelmann, 2005).

İyon kanalları dolaylı veya doğrudan birçok patolojik durumda değişikliğe uğramaktadırlar. Bu nedenle, iyon kanallarını hedef alan ilaçların bir dizi hastalık için önemli terapötik hedefler olarak

tanımlanmaları şaşırtıcı değildir (Zamponi, 2016). Bir iyon kanalının seçici olarak bloke edilmesi, özel bir molekülün bir hücrede fizyolojik bir yanıt oluşturmak için iyon kanalının açılmasını önleyen biyolojik bir mekanizmadır. İyon kanallarını bloke eden bu özel moleküller iyon kanal inhibitörü, blokeri veya antagonisti olarak adlandırılmaktadır. Kanal inhibisyonu, katyonlar, anyonlar, amino asitler veya bazı kimyasallar kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Bu inhibitörler, kanalın açılması ile oluşan yanıtı engellemektedir. Kanseri hücrelerinin özelliklerinden olan sürekli anjiyogenez, doku istilası ve metastaz özellikle Ca^{2+} 'yi (evrensel sinyalleşme iyonunu) taşıyan iyon kanallarına bağlıdır. Bu nedenle, kanser ilerlemesi sırasında farklı kanalların ifadesinde genetik olarak belirlenmiş değişikliklerin, en azından kısmen, malign büyümeyi tanımlayan patofizyolojik özelliklerin birinden veya daha fazlasından sorumlu olabilmektedir (Bain, 2019).

Bu çalışmada, iyon kanallarının tercih edilmesinin en büyük sebebi, her şeyden önce, insan kanserlerinde ifadeleri büyük ölçüde değişmektedir. Bunun yanında, yapılan az sayıda çalışmada kanal disfonksiyonunun, kanser ilerlemesi üzerinde etki yaratan hücre fonksiyonu ve sinyalleşme üzerinde güçlü bir etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda, iyon kanalları farmasötik olarak izlenebilir bir moleküler sınıftır. En büyük avantajları, transmembran protein yapısında oldukları için hücre dışı ortamdan da bu yapılara ulaşmanın mümkün olmasıdır (Díaz-García ve Varela, 2020).

Çalışmamızda, meme kanserinde farklı sinyal yollarını aktive ederek kanser hücrelerinin proliferasyonuna katkı sağladığı bilinen Ca^{2+} ile aktive edilen klorür iyon kanalı TMEM16A'nın, aşırı ekspresyonunu inhibe etmek amacıyla, STAT-3 inhibitörü 'Cryptotanshinone' kullanılarak, kanser hücrelerinin çoğalması ve göç yeteneklerinin azaltılması hedeflenmiştir.

Böylece meme kanserinin etyopatogenezinde rol oynayan farklı mekanizmaların ortaya konması, ayrıca meme kanserinde teşhis ve tedavide yeni biyobelirteçlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Buna istinaden meme kanserinde, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ifadeleri değiştiği bilinen TMEM16A iyon kanallarına spesifik inhibitörlerin meme kanserinde tedavi amaçlı kullanılabilirliğinin ortaya konması da amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Kanser ve Tarihçesi

Kanser, dünyada en çok korkulan hastalıkların başında gelmektedir. 200 milyon yıldan fazla bir süredir çok hücreli canlıları tehdit etmektedir ve modern insanın ataları arasında bir milyon yıldan daha eskiye dayanan kanserlere dair kanıtlara ulaşılmıştır (Hausman, 2019). İnsan kanserinin en eski tanımı sekiz meme tümörü vakasına atıfta bulunan, M.Ö. 3000-1500 civarında yazılmış Mısır'lı Edwin Smith Papirüsünde bulunmuştur. En eski insan kanserlerine ait örnekler, Tunç çağında (M.Ö.1900-1600) yaşamış bir kadın kafatası kalıntılarında ve eski Mısır'ın fosilleşmiş kemiklerinde tespit edilmiştir. Perulu İnka'ların yaklaşık 2400 yıl öncesine ait mumyalanmış iskelet kalıntıları, malign melanomu düşündürülen lezyonlar içermektedir. "Kanser" terimi ilk defa Hipokrat tarafından (M.Ö. 460-370) ortaya atılmıştır. Galen (M.Ö. 200-130) ise kanseri şişlik anlamına gelen 'onkos' olarak tabir etmiştir. 1951'de Johns Hopkins Hastanesi'nde George Gey, 30 yaşındaki Henrietta Lacks'in servikal adenokarsinomundan insan kanser hücresi kültürü oluşturmuştur. Ortaya çıkan HeLa hücreleri, kanser araştırmalarının temel taşı olmuştur. Genel olarak, kültürde kalıcı olarak büyüyen insan tümör hücreleri, çok agresif kanserlerden oluşan seçilmiş bir gruptur. Neredeyse tüm sürekli hücre dizileri, yüksek dereceli, yüksek evreli kanserlerden türetilmiştir (Weber, 2007).

Dünya sağlık örgütü (WHO) tanımına göre kanser, anormal hücreler kontrolsüz bir şekilde büyüdüğünde, vücudun hemen her organında veya dokusunda başlayabilen, bulunduğu doku veya organın sınırlarını aşarak diğer organları da istila edebilen ve yayılabilen geniş bir hastalık grubu olarak nitelendirilmektedir. İkinci sürece metastaz adı verilmektedir. İnsan kanserleri, kanser hücrelerinin köken aldığı bölgeye göre; karsinom (iç organları kaplayan dokular), sarkom (kemik, kıkırdak, bağ veya destek dokuları), lösemi (kan dokusu hücreleri), lenfoma veya miyelom (bağışıklık sistemi hücreleri) gibi birkaç geniş kategoride sınıflandırılmaktadır (Bortner ve Cidlowski, 2014).

Hücre proliferasyonu normal hücrelerde, Ca^{+2} , ATP, siklinler, sikline bağımlı kinazlar ve diğer birçok hücre döngüsü düzenleyicileri dahil olmak üzere, hücre döngüsü mekanizmaları ile bağlantılı bir dizi iyon, molekül ve protein tarafından sıkı bir şekilde düzenlenen karmaşık bir olaydır ve çok iyi senkronize edilmektedir (Rao vd., 2015). Kanser, hücrelerdeki düzenleyici mekanizmaları bozarak, hücre çekirdeğinde DNA hasarı oluşturmaktadır. Normal hücrelerde oluşan DNA hasarı düzeltilir ya da hücre programlanmış hücre ölümüne gider, ancak kanser hücreleri hata düzeltme mekanizmalarını atlayarak, olması gerektiği gibi hücre ölümünü gerçekleştirmez. Bunun yerine, vücudun ihtiyacı olmayan ve hasarlı hücre ile aynı DNA'ya sahip olan yeni kanserli hücreler üretmeye başlamaktadır ve sonuçta kanserli hücrelerde oluşan genetik değişiklikler, hücrenin çoğalması, ömrü, komşu hücrelerle iletişiminin kesilmesi gibi durumları etkilemektedir ve immün sistemin bozulmasına yol açmaktadır (Chaffey, 2003).

Kanser; ölüm oranı, yayılma hızı ve nüksetme özelliği ile çözüm bekleyen sorunların başında yer almaktadır. Kanserde, hasarlı hücreler kontrolsüz bir şekilde üreyerek komşu dokuları işgal etmekte veya kaynağını aldığı organdan daha uzak bir yere, kan veya lenf yoluyla yayılmaktadır. Kanser hücresi ‘‘neoplazma’’ veya ‘‘kötü huylu tümör’’ olarak da adlandırılmaktadır. Birçok araştırmadan elde edilen sonuçlara göre, kanser araştırmalarında kanser hücrelerinin tek başına çalışılması yetersiz görülmektedir ve onu çevreleyen 'tümör mikroçevresi' (TM) ile birlikte araştırılması gerektiği vurgulanmaktadır. TM, hücre dışı matris (ECM) proteinleri ve çözünür faktörler ağına bağlı mezenkimal, endotelial ve bağışıklık hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. TM, tümör ilerlemesine güçlü bir şekilde katkıda bulunmaktadır ve hücreden hücreye veya hücreden matrise ulaştırılan sinyaller dahil olmak üzere çeşitli etkileşimler yoluyla tümör hücresi davranışlarına katkıda bulunmaktadır (Panyi vd., 2014). Kanser, dünya çapında önde gelen bir ölüm nedenidir ve 2020'de yaklaşık 10 milyon ölüme veya yaklaşık altı ölümden birine neden olmaktadır. En sık görülen kanserler meme, akciğer, kolon, rektum ve prostat kanserleridir. Kanserden ölümlerin yaklaşık üçte biri tütün kullanımı, yüksek vücut kitle indeksi, alkol tüketimi, düşük meyve ve sebze alımı ve fiziksel aktivite eksikliğinden kaynaklanmaktadır. İnsan papilloma virüsü (HPV) ve hepatit gibi kansere neden olan enfeksiyonlar, düşük ve orta gelirli ülkelerde kanser vakalarının yaklaşık %30'undan sorumlu olmaktadır. Pek çok kanser erken teşhis ve etkili bir tedaviyle yenilebilmektedir. Kolon, akciğer, rahim ağzı, meme kanseri gibi bazı kanserler, kanserin ilerlemesini geciktirmeye ve hatta durdurmaya yardımcı olan tarama testleri ile tespit edilmektedirler (Moleyar Narayana ve Ranganathan, 2021).

Kanser hücreleri, normal vücut hücrelerinden immünolojik olarak önemli iki yolla ayrılmaktadır. Birincisi, tümör hücreleri ya hücreSEL dönüşümden sorumlu olan, yada sadece sinyal yollarında biriken onlarca veya yüzlerce protein değiştiren mutasyon taşımaktadır. İkincisi, genetik ve epigenetik değişikliklerin bir sonucu olarak, tümör hücreleri normal hücrelerde bulunmayan veya daha düşük seviyelerde bulunan bir dizi proteini eksprese etmektedir (Heemskerk vd., 2012).

DNA onarım mekanizmalarındaki veya homeostazın epigenetik düzenleyicilerindeki kusurlar, mutasyonları dönüştürme olasılığını ve dolayısıyla kanser riskini arttırmaktadır. Bu biyolojik işlevler, onkogenlerdeki veya tümör baskılayıcı genlerdeki dönüştürücü kusurlara karşı koruma sağlayan ikinci bir savunma hattı oluşturmaktadır. Bu genler ‘‘meta baskılayıcı genler’’ olarak kabul edilmektedirler. Sınırlı sayıda gen ve bunların gen ürünlerini kapsayan genetik programların bozulması veya anormal aktivasyonu, malign büyüme neden olmaktadır (Weber, 2007).

Kanser hücreleri ile kök hücrelerin kendi kendini yenileme durumu da benzemektedir. Kanıtlar, klasik olarak kanserle ilişkilendirilen birçok yolun normal kök hücre gelişimini de düzenleyebileceğini göstermektedir. Örneğin, onkogen bcl-2'nin zorunlu ifadesi ile apoptozun önlenmesi, *in vivo* olarak artan sayıda HSC (Hematopoietik kök hücreler) ile sonuçlanmaktadır. Bu durum apoptozun HSC'lerin homeostazını düzenlemede bir rolü olduğunu göstermektedir. Çoğu kanser için, transforme mutasyonların hedef hücresi bilinmemektedir; ancak belirli lösemi türlerinin HSC'lerde biriken mutasyonlardan kaynaklandığına dair önemli kanıtlar bulunmaktadır (Reya vd., 2001).

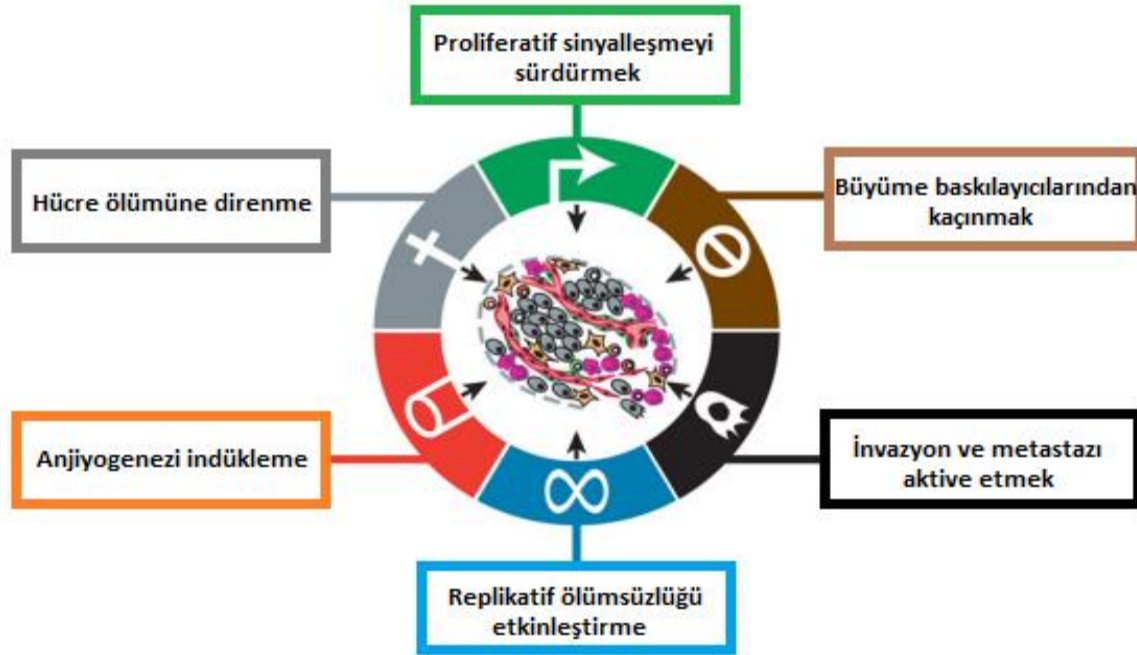
2.1.1. Kanserin Genel Özellikleri

Kanserin ayırt edici özellikleri, insan tümörlerinin çok aşamalı gelişimi sırasında kazanılan altı biyolojik yeteneği içermektedir. Ayırt edici özellikler, neoplastik hastalığın karmaşıklığını rasyonalize etmek için düzenleyici bir ilke oluşturmaktadır. Bunlar;

1. Proliferatif sinyallemeyi sürdürme,
2. Büyüme baskılayıcılardan kaçınma,
3. Hücre ölümüne direnme,
4. Replikatif ölümsüzlüğü sağlama,
5. Anjiyogenezi indüklemeye,
6. İstila ve metastazdır (Gutschner ve Diederichs, 2012).

Bu ayırt edici özelliklerin altında, onların gereksinimlerini ve inflamasyonunu hızlandıran ve birden fazla ayırt edici işlevi besleyen genetik çeşitliliği oluşturan genom kararsızlığı yatmaktadır. Son yıllardaki ilerlemelerle beraber, bu listeye iki ayırt edici özellik eklenmiştir bunlar; enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve bağışıklık yıkımından kaçınılmasıdır. Kanser hücrelerine ek olarak, tümörler başka bir karmaşıklık boyutu sergilemektedirler; kendi “tümör mikroçevresini” yaratarak ayırt edici özelliklerin kazanılmasına katkıda bulunan, toplanmış, görünüşte normal hücrelerden oluşan bir repertuar içermektedirler. Bu kavramların yaygın olarak uygulanabilirliğinin kabul edilmesi, insan kanserini tedavi etmek için yeni araçların geliştirilmesini giderek daha fazla etkileyecektir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

On yıl sonra Hanahan, kanser araştırmalarındaki büyük ilerleme ve birikmiş verilerle bir kez daha kanserin ayırt edici özelliklerine geri dönmüştür ve varolan özelliklere ek olarak, yeni bir ayırt edici özellik önermiştir ve bu özelliği fenotipik plastisite ve bozulmuş farklılaşma olarak tanımlamıştır. Bu durum, normal hücrelerde terminal farklılaşması ve kalıcı bir proliferasyon durması ile ilişkilendirilmiştir. Bu durum malign hücrelerin farklılaşmadan kaçtığını ve büyümeye devam etmek için fenotipik plastisite olarak bilinen şeyin kilidini açtığını göstermektedir. Başka bir deyişle, kimliklerini çoğalmaya daha meyilli bir şeye dönüştürmektedirler. Bu olay farklı şekillerde olabilmektedir örneğin, tam farklılaşmaya yaklaşan hücreler, bir progenitör benzeri duruma geri farklılaşabilmektedirler. Farklılaşmamış bir progenitör hücreden kaynaklanan neoplastik hücreler, farklılaşma sürecini durdurabilmektedirler veya kısmen farklılaşmış progenitör benzeri durumda kalabilmektedirler. Ayrıca belirli bir farklılaşma fenotipine bağlı hücreler, gelişim programlarını değiştirebilmektedirler veya kökenleri ile ilişkili olmayan özellikleri farklılaştırabilmektedirler. Aynı araştırmacı, diğer ayırt edici özelliklerde olduğu gibi, hücresel plastisitenin kanser hücrelerinin “yeni bir buluşu” olmadığını, daha ziyade bazı normal hücrelerin normal dokuları onarmak ve yenilemek için aktive edebileceği mevcut mekanizmaların kötü huylu bir eğilimi olduğunu belirtmektedir (Hanahan, 2022).



Şekil 2.1. Kanserın ayırt edici özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.2. Meme Kanseri

2.2.1. Meme Bezinin Histolojik ve Hormonal Yapısı

Meme dokusu, hormonal regülasyon altında döngüsel olarak büyüyen ve değişen bağ ve glandüler yapıları birbirine bağlayan heterojen yapıda bir dokudur. Her meme, yağ dokusuna gömülü 15-25 salgı lobundan oluşmaktadır. Bu durum memelilerde bulunan ayırt edici özelliklerden biridir. Dişi ve erkeklerde meme bezleri doğumdan ergenliğe kadar benzer şekilde gelişmektedir ancak ergenliğin başlangıcında farklı değişikliklere uğramaktadırlar. Dişilerde, ergenlik çağına kadar hareketsiz olan meme epiteli ergenlikle birlikte meme yağ yastığını işgal etmeye başlamaktadır ve epitelyal proliferasyonla birlikte meme büyümesi ve artan yağ dokusu birikimi ile sonuçlanmaktadır. Erkeklerde bu süreç, meme stromasının mezenkimal hücrelerinde regresyon ve nekrozu indükleyen testosteron seviyelerinin artmasıyla birlikte inhibe edilmektedir (Gutierrez ve Perez, 2019).

Menstrual siklus esnasında meme zayıf siklik değişimlere uğramaktadır. Foliküler fazın erken aşamasında intralobüler stroma daha az yoğundur ve terminal duktuslar kübik şekilli epitel hücrelerden oluşan dar lümenli ya da lümensiz kordonlar şeklindedirler. Luteal faz esnasında, epitel hücrelerin boyu uzamaktadır ve kanalların lümeni az miktarda salgı biriktikçe görünür hale gelmektedir ve bağ dokusunda da sıvı birikimi gerçekleşmektedir. Daha sonra bunları takiben menstruasyonun başlamasından önce involüsyon ve apoptoz görülmektedir. Menopoza giren kadınlarda hormonal ortamın değişimi ile memenin bez yapısı gerilemeye başlamaktadır ve bez dokusu yağ ve bağ dokusu

ile yer değiştirmektedir (Russo vd., 2001). Normal şartlarda meme dokusunda lob ve lobüller görülmemektedir ancak gebelikte kanallar dallara ayrılmaktadır ve bir lobülü oluşturan alveoller veya asinüslerden oluşan keselerde sonlanmaktadır ve her lobül çeşitli salgı yapan tübüloasiner birimler içermektedir. Gebelikte meme bezi korpus luteumdan ve plasentadan salgılanan östrojene, progesterona, pitüiter bezden salgılanan prolaktine ve adrenal korteksten salgılanan gonadokortikoidlere bağlı olarak gelişmeye devam etmektedir ve gebeliğin sonunda epitelyal hücrelerde salgı vezikülleri bulunsa da yüksek miktarda progesteron tarafından süt üretimi baskılanmaktadır. Daha sonra süt salgısı doğumdan hemen sonra gerçekleşmektedir ve adenohipofizden salgılanan prolaktin hormonu tarafından indüklenmektedir. Bununla birlikte memeden süt ejeksiyonu ise nörohipofizden salıverilen oksitosin hormonu tarafından stimüle edilmektedir. Duyusal impulslar nörohipofizden oksitosin salıverilmesini sağlamaktadırlar. Alveolar salgı hücrelerinin bazallerini ve büyük kanalların bazallerini çevreleyen mioepitelyal hücreleri stimüle eden oksitosin, mioepitelyal hücrelerin kasılmasıyla birlikte alveollerden ve kanallardan süt ejeksiyonunu gerçekleştirmektedir (Erel, 2019).

Erken menarj (adet döngüsü başlaması) ve emzirme süresinin, kadınlarda meme kanserine yakalanma riskine etkisinin olduğu son yıllarda yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Kadınların erken yaşta adet olmaya başlaması ve geç yaşta menapoza girmesi, fertil süresinin uzamasına sebep olmaktadır ve bu süreç ne kadar uzarsa kadınlar östrojenin etkisine o kadar süre maruz kalır ve bu durum kansere yakalanma riskini arttırmaktadır (McPherson vd., 2000). Kadınlarda gebelik sonrası emzirme döngüsüyle birlikte meme değişikliğe uğramaktadır ve bu durumun meme kanseri riskini etkilediğine dair yürütülen çalışmalarda, uzun süreli emzirme ile kanser oluşumu arasında negatif bir insidans olduğu bildirilmektedir (Sun vd., 2017).

2.2.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık teşhis edilen kanserlerden olup, toplam kanser vakalarının %23'ünü ve kanser ölümlerinin %14'ünü oluşturmaktadır. Erkek meme kanseri nadirdir ve erkeklerde meydana gelen kanserlerin yaklaşık %1'ini temsil etmektedir. Meme kanserinin gelişimi, birden fazla hücre tipini içeren çok adımlı bir süreçtir. Meme kanserinin erken teşhisi, bu hastalığı önlemek için en iyi yaklaşımlardan biridir. Tanı ve tedavisindeki ilerlemelere rağmen meme kanseri insidansı (100.000 kadın başına düşen vaka sayısı) tüm dünya ülkelerinde artmaya devam etmektedir ve küresel ölçekte en yüksek insidans gösteren vakaların neredeyse yarısı, sanayileşmiş ve gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Bu durumun nedeni temel olarak, dengesiz ve yetersiz beslenme, nikotinizm, aşırı stres ve az fiziksel aktivite ile ilişkili olan batı yaşam tarzına bağlanmaktadır (Smolarz vd., 2022).

2.2.3. Meme Kanserinde Risk Faktörleri

Karsinogenezin nedeni henüz kesin olarak bilinmemekle beraber, meme kanseri gelişimine yardımcı olan birkaç risk faktörü olduğu bilinmektedir. Cinsiyet, yaşlanma, östrojen, aile öyküsü, gen mutasyonları ve sağlıklı yaşam tarzı gibi meme kanseri geliştirme olasılığını artırabilecek çok sayıda risk faktörü vardır (Sun vd., 2017). Meme kanserinin risk değerlendirmesi erken tanı ve tedavi süreci için büyük önem taşımaktadır. Meme kanseri ile ilgili Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2018 yılında yaptığı bildiride, erken menarj (adet döngüsü başlangıcı), geç menopoz, ilk doğumu geç yaşta yapma gibi endojen ve östrojene uzun süre maruz kalmanın önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir. Ayrıca oral kontraseptif ve hormon replasman tedavisi kullananların, kullanmayanlara göre daha fazla risk altında olduğunu ve emzirmenin koruyucu bir etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Ailesel meme kanseri öyküsünün meme kanseri riskini iki ya da üç kat artırdığı, özellikle BRCA1, BRCA2 ve p53 mutasyonlarının, meme kanseri için çok yüksek risk oluşturduğu ancak bu mutasyonların meme kanseri vakalarının büyük bir bölümünde görülmediği verilerle ortaya konmuştur (Akyolcu vd., 2020).

Cinsiyet: Meme kanseri vakalarının büyük çoğunluğu %99'a varan oranlarda kadınlarda görülmektedir, bu malignitenin sadece %1'i erkekleri etkilemektedir. Bununla birlikte, kadınlarda olduğu gibi erkeklerde de meme kanseri insidansı, büyük olasılıkla obezite ile ilişkili olarak, istikrarlı bir artış göstermektedir (Smolarz vd., 2022). Erkeklerde kansere bağlı ölümlerin %0,2'sinden azı meme kanserinden kaynaklanmaktadır. Erkeklerde meme kanseri çok düşük bir insidansla gerçekleştiği için literatür, araştırma, klinik denemeler ve yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi öncelikle kadınlara odaklanmaktadır. Kadın meme kanseri hakkındaki mevcut bilgiler erkek meme kanseri tanı ve tedavisini yönlendirse de moleküler ve klinikopatolojik özellikler erkek ve kadın meme kanserlerinde farklılık göstermektedir. Erkeklerde bu hastalığı tanımlarken ve tedavi seçeneklerine karar verirken cinsiyet farklılıkları, hormonal regülasyon ve tedaviye yanıt (hem tolere edilebilirlik hem de aktivite) gibi biyolojik faktörler göz önünde bulundurulmaktadır. Günümüzde, erkek meme kanserleri için herhangi bir standart tedavi mevcut değildir ve bu hastalık için daha fazla araştırma ve tedavi seçeneklerine ihtiyaç bulunmaktadır (Gucalp vd., 2019).

Yaş: Meme kanseri için en önemli risk faktörlerinden biridir. Meme kanseri insidansındaki küresel artış tüm yaş gruplarında görülmektedir ancak en yüksek 50 yaş üstü kadınlarda görülmektedir. Meme kanseri ağırlıklı olarak bir yaşlanma hastalığıdır ve gelişmiş ülkelerde teşhis konulan hastaların sadece %5 ila %7'sinin 40 yaşın altında olduğu tespit edilmiştir (Azim ve Partridge, 2014). Bu malign tümör genç kadınlarda nadir görülmesine rağmen, daha kötü seyretmedir. Bu nedenle önemli bir klinik ve sosyal problem haline gelmiştir ve çok sayıda çalışma, genç kadınlarda meme kanserinin daha fazla histolojik malignite, steroid reseptörlerinin sıklıkla aşırı ekspresyonu ile karakterize olduğunu göstermektedir. Ancak son yıllarda, menopoz öncesi kadınlarda da meme kanseri insidansı artmaktadır ve bu artış son 30 yıl içinde neredeyse 2 katına ulaşmıştır (Lima et al., 2021). Yüksek endojen östrojen seviyesinin, daha yüksek meme kanseri insidansına katkıda bulunan bir risk faktörü olduğu

kanıtlanmıştır. Araştırmalar sonucunda, postmenopozal kadınlarda artan seks hormonları (toplam östradiol, serbest östradiol, östron, östron sülfat, androstenedion, dehidroepiandrosteron, dehidroepiandrosteron sülfat ve testosteron) ile daha yüksek meme kanseri riski arasında güçlü bir ilişki olduğu kanıtlanmıştır (Kaminska vd., 2015).

Uyku kalitesi: Son yıllarda yetersiz uyku ile meme kanseri riskinin artması arasında bir bağlantı olduğunu destekleyen kanıtlar öne sürülmektedir. Yetersiz uykunun kanserin gelişimini nasıl doğrudan etkileyebileceğini açıklayan iki biyolojik model öne sürülmüştür; bozulmuş bağışıklık fonksiyonu ve obeziteye yol açan metabolik yollar. Değişen melatonin salınımı nedeniyle kanser riskinin arttığını öne süren ek bir dolaylı mekanizma da önerilmiştir. Melatonin salınımı, uykudan ziyade aydınlık/karanlık döngüsü tarafından düzenlenir ve önceki çalışmalar, uykuyu “karanlığa maruz kalma” için bir aracı olarak tanımlamaktadır. Önerilen 3 yolun hepsinin onları destekleyecek kanıtları vardır, ancak uykunun kanser riskini ne ölçüde etkilediğine dair gerçek süreç henüz bilinmemektedir (Girschik vd., 2013).

Beslenme ve fiziksel aktivite: 2007 yılında, Dünya Kanser Araştırma Fonu ve Amerikan Kanser Araştırmaları Enstitüsü (WCRF ve AICR), diyet ve fiziksel aktivitenin kanser gelişimi üzerindeki etkisi ile ilgili birçok araştırmayı analiz etmişlerdir ve ikisi arasında yüksek bir bağlantı olduğunu açıklamışlardır. Önerilere göre kanserden korunmada sağlıklı bir diyet, uygun vücut ağırlığını korumaya yardımcı olan, meyve, sebze, tahıl ve baklagillerden zengin, az kırmızı et ve az tuz içeren ve işlenmiş et içermeyen bir diyetdir. Ayrıca, tatlı içeceklerden uzak durulması ve yüksek kalorili yiyecek ve alkollü içeceklerin tüketiminin azaltılması gerektiği tavsiye edilmektedir. Ayrıca, gıda faktörleri (ör. yenilebilir yağlar) onkogeneze yol açan geri dönüşümlü epigenetik değişikliklere (DNA hipometilasyonu, tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgesinin hipermetilasyonu ve histonların anormal modifikasyonu) neden olabilmektedir (Kolak vd., 2017).

Aile öyküsü: Birinci dereceden yakını meme kanserine yakalanan bir kadının, meme kanserine yakalanma riski, diğer kadınlara kıyasla 5 kat daha sık görülmektedir. Kanser riski taşıyan bireylerin bu yatkınlığı gösterme sebepleri iki ana nedenden oluşmaktadır. Birincisi; genetik (kalıtsal) bileşen ikincisi ise; genetik olmayan (çevresel faktörler, beslenme alışkanlığı, yaşam tarzı gibi) risk faktörlerinin etkisi sonucu meydana gelen bileşenler olmak üzere iki başlık altında toplanmaktadır. Genetik bileşen tüm meme kanserlerinin %5-10’undan sorumludur. Kanser genetik sebebi BRCA1 (Breast Cancer 1) ve BRCA2 (Breast Cancer 2) genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu genler DNA tamir genleridir ve bu genlerin mutasyona uğraması sonucunda meme kanseri gelişmektedir. Meme kanserinin kadınlarda 50 yaş ve üzerinde daha sık görülmesine karşın, nadiren genç yaşta bu hastalığa yakalanan kadınların çoğunda BRCA1 geninde mutasyon olduğu bildirilmektedir (Rubinstein vd., 2011; Malone vd., 1998).

Üreme faktörleri: Erken menarş, geç menopoz, ilk gebeliğin geç yaşı ve düşük parite gibi üreme faktörlerin meme kanseri riskini artırabileceği bildirilmektedir (Sun vd., 2017).

2.2.4. Meme Kanserinin Patogenezi

Meme, asimetrik bir bağ dokusu içinde sabitlenmiş, çocuk doğurma yaşından yaşlılığa kadar bir değişim zincirinden geçen karmaşık tübülo-alveolar bir organdır. Her adet döngüsünde ve hamilelikte görülen değişiklikler, olgun dokuda yeni kanal-lobüler birimleri sentezleyebilen öncü hücrelerin sentezine yol açmaktadır. Tipik meme anatomisi, bir bazal membranla sınırlanmış ve kan damarları, lenfatik ve stromal hücrelerden oluşan bir şablonda sabitlenmiş tabakalı bir epitel içermektedir. Meme bozukluklarında hücresel heterojenliğin yaratılmasının, normal memenin birincil gelişimsel serisine bağlı olduğu düşünülmektedir. Meme karsinomunun bu heterojenliği ya miyoepitelyal ya da epitelyal hücrenin neoplastik değişiminden ya da miyoepitelyal ya da epitelyal hücrelere dönüşme yeteneğine sahip bir kök hücreden kaynaklanabilmektedir (Akram vd., 2017).

Meme kanserleri iki tiptir:

1. Non-invaziv: Hücreler kanser özellikleri göstermektedirler ancak orijinal yerlerinde kalıp süt kanalını aşıp çevreye yayılmamaktadırlar. Bu kanserlere in situ (yerinde) kanser denmektedir. Tümör kökenini süt kanallarından alırsa ‘’duktal’’ süt bezlerinden alırsa ‘’lobüler’’ kanser adını almaktadır.

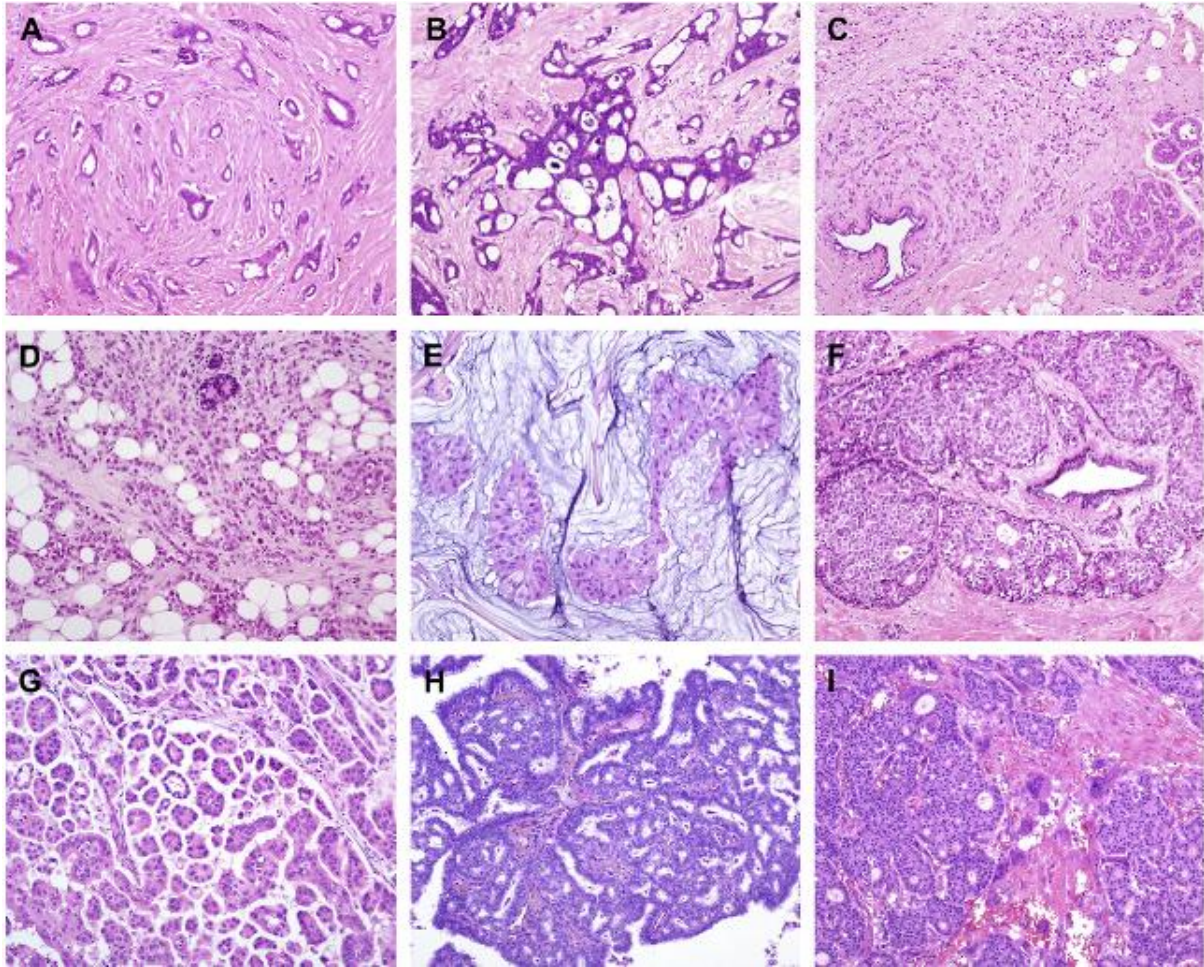
(DCIS=Duktal Carcinoma In Situ, LCIS=Lobular Carcinoma In Situ)

2. Invaziv: Kanser hücreleri normalde kendilerini çevreleyen bazal membran denilen yapıyı tahrip edip çevre dokulara yayılmaktadırlar. Tümör hücreleri doku arasında ilerleyerek küçük toplar damarlara ve lenf kanallarına girerler ve bu durum ‘’lenfovasküler invazyon’’ olarak tanımlanmaktadır. Bundan sonraki aşamada koltukaltındaki lenf düğümlerine ilerlemektedirler ve kan yoluyla vücudun çeşitli dokularına yayılmaktadırlar (metastaz) (Cowell vd., 2013).

Kökenini destek dokusundan (sarkomlar) alan meme tümörleri ise genellikle duktal hiperproliferasiyondan başlamaktadır ve daha sonra çeşitli kanserojen faktörlerin sürekli uyarılmasıyla, iyi huylu tümörlere veya metastatik karsinoma dönüşmektedirler. Meme kanseri hücrelerinin özellikle yerleştiği bazı organlar; kemik, beyin, böbreküstü bezleri, karaciğer ve akciğerlerdir (Li vd., 2005).

Stromal etkiler veya makrofajlar gibi tümör mikro-ortamları, meme kanserinin başlaması ve ilerlemesinde hayati roller oynamaktadırlar. Makrofajlar, anjiyogenezi teşvik edebilen ve kanser hücrelerinin bağışıklık reddinden kaçmasını sağlayan mutajenik bir inflamatuvar mikro-ortam oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Normal hücreler ve tümörle ilişkili mikro-ortamlar arasında farklı DNA metilasyon işlemleri gözlenmektedir. Bu durum tümör mikroçevresindeki epigenetik modifikasyonların karsinogenezi destekleyebileceğini göstermektedir (Sun vd., 2017). Meme kanseri, klinik özelliklerine, tümör belirteçlerinin ekspresyonuna ve histolojik tipine göre çeşitli şekillerde kategorize edilmektedir. İnvaziv meme kanserinin en yaygın iki histolojik türü, tüm vakaların sırasıyla yaklaşık %75 ve %15'ini oluşturan duktal ve lobüler karsinomlardır. Ayrıca lobüler karsinomların

duktal karsinomlardan hormon reseptörü pozitif olma olasılığının daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmektedir (Li vd., 2005).



Şekil 2.2. Bazı meme kanseri türlerinin histolojik yapısı (ER pozitif). (A) Tübüler karsinom, (B) kribriform karsinom, (C) klasik invaziv lobüler karsinom, (D) pleomorfik invaziv lobüler karsinom, (E) müsinöz karsinom, (F) nöroendokrin karsinom, (G) mikropapiller karsinom, (H) papiller karsinom, (I) osteoklast benzeri dev hücreli düşük dereceli invaziv duktal karsinom (Weigelt vd., 2010).

2.2.5. Meme Kanseri ile İlgili Genler

Meme kanseri ile ilgili birçok gen tanımlanmıştır. Hem onkogenlerin hem de anti onkogenlerin mutasyonları ve anormal amplifikasyonu, tümörün başlaması ve ilerlemesi süreçlerinde kilit rol oynamaktadır.

BRCA1/2: Meme kanseri ile ilişkili gen 1 ve 2 (BRCA1 ve BRCA2), meme kanseri riski için iki ünlü anti onkogendir. BRCA1 ve BRCA2 sırasıyla 17q21 ve 13q12 kromozomlarında bulunmaktadır. Her ikisi de tümör baskılayıcı proteinleri kodlamaktadır. BRCA1 eksikliği, hücre döngüsü kontrol noktasının düzensizliğine, anormal sentrozom duplikasyonuna, genetik kararsızlığa ve nihayetinde apoptoza yol açmaktadır (Haddad, 2020).

HER2: *c-erbB-2* olarak da bilinen insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2, meme kanserinde önemli bir onkogendir ve insan kromozomu 17'nin (17q12) uzun kolunda bulunmaktadır. HER2 geninin ekspresyonu, esas olarak gen amplifikasyonu ve yeniden düzenlenmesi yoluyla aktive edilmektedir. HER2 proteini, tirozin kinaz ailesinin bir epidermal büyüme faktörü reseptörüdür (EGFR) ve *Her3* ve *Her4* gibi diğer ligand-bağlı EGFR ailesi üyeleriyle heterodimerler oluşturmaktadır. Böylece aşağı akış sinyal yollarını aktive etmektedir. HER2'nin aşırı ekspresyonu primer meme kanserlerinin yaklaşık %20'sinde tespit edilmiştir ve kanser kök hücrelerinin sayısını arttırarak ve kötü klinik sonuçlar sergilemektedir (Malone vd., 1998).

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR): İnsanlarda *c-erbB-1* veya *Her1* olarak da bilinen EGFR, kromozom 7'nin (7p12) kısa kolunda bulunmaktadır. EGFR proteini, tirozin kinaz ailesinin bir hücre yüzeyi glikoproteinidir ve EGF, TGF- α , amphiregulin, betacellulin ve benzerlerine bağlanarak aktive edilmektedir. PI3K, Ras Raf-MAPK ve JNK dahil olmak üzere EGFR'nin aşağı akış sinyal yolları, hücre proliferasyonunu, hücre istilasını, anjiyogenezi teşvik etmek ve hücreleri apoptoza karşı korumak için tetiklenir. EGFR'nin aşırı ekspresyonu, meme kanserinin çok agresif bir alt tipi olan inflamatuvar meme kanseri (IBC) vakalarının %30'dan fazlasında bulunmaktadır. EGFR-pozitif IBC'si olan hastalar, EGFR-negatif tümörleri olanlara göre daha kötü bir prognoza sahip olmaktadır. Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ekspresyonu ve HER2 amplifikasyonunun yokluğu ile karakterize edilen üçlü negatif meme kanseri (TNBC) vakalarının yarısından fazlasında EGFR aşırı ekspresyonu gözlenmektedir (Dalivandan vd., 2021).

Malign transformasyon sırasında etkilenen genler arasında, plazma zarı iyon kanallarını kodlayan genlerin de dahil edilmesi kaçınılmazdır. Bu kanallardan geçen iyon akıları, hücre zarı potansiyelini ve hacmini tanımlamaktadır, hücre içi sinyal olaylarına katılmaktadır ve spesifik hücre tepkilerini aktive etmektedir. Son iki fonksiyon kritik olarak Ca^{2+} 'yi (evrensel sinyalleşme iyonunu) taşıyan iyon kanallarına bağlıdır. Bu nedenle, kanser ilerlemesi sırasında farklı iyon kanallarının ifadesinde genetik olarak belirlenmiş değişiklikler, en azından kısmen, malign büyümeyi tanımlayan patofizyolojik özelliklerin birinden veya daha fazlasından sorumlu olabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, iyon kanallarının, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz gibi doku homeostazının korunmasındaki kritik roller dahil, neredeyse tüm temel hücresel işlemlere katkısını göstermektedir (Prevarskaya vd., 2018).

2.2.6. Meme Kanseri Tanı ve Tedavi Yöntemleri

Tedavide artan farkındalığa ve ilerlemelere rağmen, meme kanseri kadınlarda kanserden ölümlerin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir (Dutta vd., 2018). Mamografi ve ultrasonografi meme kanserinin saptanmasında yaygın olarak kullanılan tarama yaklaşımlarıdır ve mortaliteyi etkin bir şekilde azaltmaya yardımcı oldukları kanıtlanmıştır. Mamografiden daha hassas olan Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) gibi diğer tarama yöntemleri de son on yılda uygulanmaktadır. Meme

kanseri tedavisi multidisiplinerdir. Tedavi stratejileri moleküler alt tipe göre değişmektedir ve bölgesel terapi (cerrahi ve radyasyon tedavisi) ile sistemik terapi yaklaşımlarını içermektedir. Meme kanseri için tedavi seçenekleri, hormon reseptörü pozitif tümörler için endokrin tedavisi, HER2 pozitif hastalık için anti-HER2 tedavisi antikör bazlı ilaçlar, lokal tedavi için cerrahi girişim, kemoterapi, radyoterapi ve yakın zamanda ortaya çıkan immünoterapiyi içermektedir. Lokalize meme kanseri teşhisi konan hastalar için hayatta kalma oranı önemli ölçüde iyileşmiş olsada, esas olarak ölümle ilişkili olan hastalığın metastatik formu olmaktadır. Metastaz gelişimi, kanser hücrelerinin hücre dışı matrisler (ECM) yoluyla uzak dokulara yayılma ve göç etme kabiliyetinin kazanılmasını içeren karmaşık bir mekanizmadır. Metastatik meme kanserinde aynı temel sistemik tedaviler uygulanmaktadır. Ancak, metastaz yapmış meme kanserleri, etkilenen hemen hemen tüm hastalarda büyük ölçüde tedavi edilememektedir, bu nedenle meme kanserinin tedavisi için yeni modaliteler ve ilaç rejimlerinin geliştirilmesi gerekmektedir (Afshari vd., 2020; Comşa vd., 2015). Meme kanserinin tanı ve tedavisinde bilimsel ve teknolojik birçok gelişme kaydedilmesine ve olumlu dönüşlere rağmen, meme kanseri sıklığının dünyada ve Türkiye’de arttığı bildirilmiştir. Bu artışın önümüzdeki yıllarda da devam edeceği öngörülmektedir.

2.2.7. MCF-7 Hücre Soyunun Tarihçesi ve Karakterizasyonu

1973 yılında Dr. Soule ve Michigan Kanser Vakfı'ndaki arkadaşları tarafından, meme adenokarsinomu olan 69 yaşındaki bir kadının plevral efüzyonundan elde edilen ve türetilen MCF-7 hücreleri adını da Adını Michigan Kanser Vakfı'ndan (MCF) almıştır (Lee vd., 2015). MCF-7, 40 yılı aşkın süredir birçok çalışmada genellikle tümör biyolojisi ve hormon etki mekanizması çalışmalarında yaygın *in vitro* model olarak kullanılan bir meme kanseri hücre dizisidir. Meme kanseri dahil tüm antikanser ilaç çalışmaları ve ilaç direnci araştırmaları için uygun bir model hücre soyu olduğu kanıtlanmıştır. MCF-7, östrojen reseptörü alfa (ER- α)3-5, progesteron reseptörü (PR), androjen ve glukokortikoid reseptörlerini eksprese eden birkaç hücre dizisinden biridir ve bu nedenle tıbbi araştırmalarda değerli bir araçtır. MCF-7, lümen A moleküler alt tipine aittir ve ayrıca normalde düşük metastatik potansiyele sahip olduğu düşünülen, zayıf agresif ve invaziv olmayan bir hücre dizisidir. Bu nedenle zamanla hasta bakımı için diğer meme kanseri hücre dizilerinden daha fazla pratik bilgi verisi üretimi sağlamıştır ve dünyada en çok çalışılan insan meme kanseri hücre dizisi olmuştur (Comşa vd., 2015). MCF-7 hücreleri, meme epiteline benzer bir dizi özelliği korudukları için epitel benzeri bir morfolojiye sahiptir ve tek tabakalar, kültür kabı ve hücre tek tabakası arasındaki sıvı birikimi nedeniyle kubbe şeklinde yapıları oluşturmaktadır. Büyüyen kültürlerde farklı alt popülasyonlarının olduğu keşfedilmiştir. ER pozitif veya ER negatif olabilen, östrojene aşırı duyarlı diziler ve ayrıca kemoterapiye dirençli bir dizi olmak üzere çeşitli varyantları belli amaçlar için geliştirilmektedir (Nugoli vd., 2003).

2.3. İyon Kanalları Biyolojisi ve Fonksiyonu

Bir iyon kanalı genellikle dört temel kısımdan meydana gelmektedir; iyonların geçmesi için bir merkezi iletim yolu (açıklık, por), belirli iyonların geçişine izin vermek için bir iyon tanıma alanı (seçici olarak filtre), biri açılırken diğeri kapanabilen birden fazla kapı ve tetikleme sinyali algılayan ve kapıya ileten bir sensörden oluşmaktadır. İyon kanalları yaşayan hücrelerin temel yapı taşlarındandır. İyon kanalları, belirli iyonların elektrokimyasal potansiyellerine göre, lipid membranından hücre içine veya dışına pasif olarak geçişini sağlayan ve kontrol eden entegral membran proteinleri olarak bilinmektedir. Neredeyse bütün plazma zarları ve pek çok hücre içi organelin zarında bulunmakta olup çok fazla çeşitliliğe sahiptirler. Hücrelerin lipid membranları, bu makromoleküler sistemler olmadan, herhangi bir iyonun geçişini engelleyici derecede yüksek enerjili bir bariyer görevi görmektedir (Tabassum ve Ahmad, 2011). İyon kanalları, birden fazla gözenek içeren kanallar olarak bilinmesine rağmen, genellikle merkezi bir gözenekten ve onu çevreleyen farklı alt birimlerden veya alanlardan oluşan integral zar proteinleri olarak tanımlanmaktadır. Tipik olarak iletken yol, V_m (voltaj kapılı kanallar) veya ligand kapılı kanallar tarafından enerjetik olarak kontrol edilen, konformasyonel bir geçit şeklinde kapılanmaktadır. Bu işlem (aktivasyon) ayrıca, membran gerilmesi (mekanik olarak kapılı kanallar) gibi diğer mekanizmalar tarafından da yürütülebilmektedir. İyon kanallarının açılması, aktive edici faktörlerin varlığında fosforilasyon veya allosterik modülasyon yoluyla da düzenlenebilmektedir, uyarı kaldırıldığında kanallar tekrar kapanmaktadır (deaktivasyon). Devre dışı bırakılmış kanallar, dinlenme durumunda tipik olarak kapalıdır. Ancak etkinleştirme faktörü devam ederse çoğu kanal türü, inaktivasyon (voltaj kapılı kanallar için) veya duyarsızlaştırma adı verilen bir süreçle, devre dışı bırakılmış durumdan farklı bir kapalı duruma aşamalı olarak ulaşma eğilimi göstermektedirler. İnaktivasyon/duyarsızlaştırma kinetiği, kanal tipine ve koşullarına bağlı olarak milisaniye ile dakika arasında değişmektedir. İnaktivasyon veya duyarsızlaştırma gerçekleşikten sonra uyarı uzaklaştırıldığında, daha fazla uyarı uygulaması ile kanal hemen yeniden etkinleştirilemez. Proteinin aktivasyon için uygun olan dinlenme kapalı durumuna geri dönmesi için belirli bir süre gerekmektedir (Di Resta ve Becchetti, 2010).

İyon pompaları, iyonları elektrokimyasal potansiyellerine karşı yokuş yukarı hareket ettirerek hücre zarı boyunca bir konsantrasyon gradyanı oluşturmak ve sürdürmek için ATP hidrolizinden yararlanmaktadır. Biyolojik membran kanalları ve pompalar, spesifik iyonlar için çok seçici olabilmektedir (Roux, 2017). Kapalı ve açık konformasyonel durumlar arasında geçiş yaparak (geçitleme) plazma zarından pasif iyon akışını kontrol etmektedirler. Kanallar, membran potansiyeli, spesifik ligandlar veya mekanik uyarılar gibi diğer ajanlar tarafından kapılanabilmektedir. Spesifik uyarılara cevap olarak kapılarını açıp kapatılabilmekte, belirli iyonların geçişine seçici olarak izin verebilmekte, çeşitli düzenleyici sinyalleri algılayabilmekte ve çevrenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine tepki gösterebilmektedirler (Prevarskaya vd., 2018). Neredeyse tüm hücrelerde yüksek

oranda eksprese edilen önemli bir ‘membran protein ailesi’ olan iyon kanalları, sadece hücre uyarılabilirliğini, kas kasılmasını ve salgı salgılanmasını düzenlemez aynı zamanda plazma zarı ve hücre içi organel zarlarındaki çeşitli iyon kanallarının aktivitesi ve ayrıca hücre çoğalması, göç, apoptoz ve farklılaşma gibi hücre fonksiyonları düzenlemektedirler. Ayrıca iyon kanalları madde transportu, volüm kontrolü, enzim aktivitesi, sekresyon, gen ekspresyonu ve intersellüler iletişimde de rol oynamaktadır (Di Resta ve Becchetti, 2010). İyon kanallarının kuramsal olarak varlıkları ilk kez 1952 yılında Alan Hodgkin ve Andrew Huxley tarafından sinir iletimi çalışmalarıyla gösterilmiştir, deneysel olarak varlıklarının gösterimi ise 1970’li yıllarda Erwin Neher ve Bert Sakmann tarafından yapılmıştır. İnsan genomunda sinir ve kas gibi uyarılabilir hücrelerde 400’ün üzerinde iyon kanalı kodlayan gen keşfedilmiştir. İyon kanalları ya tek bir proteinden veya daha yaygın olarak, her biri farklı bir gen tarafından kodlanan bir protein olan birkaç alt birimin bir araya gelmesinden oluşmaktadırlar. İnsan hastalıklarının iyon kanalı genlerindeki (kanalopatiler) kalıtsal bir kusurdan kaynaklanabileceği fikri, nörofizyologların iskelet kası uyarılabilirliğinde (miyotoni ve periyodik felç) çeşitli bozuklukların nedenlerini araştırdıkları 1970’lerin başından bu yana araştırma konusu olmaya devam etmektedir (Carbone ve Mori, 2020).

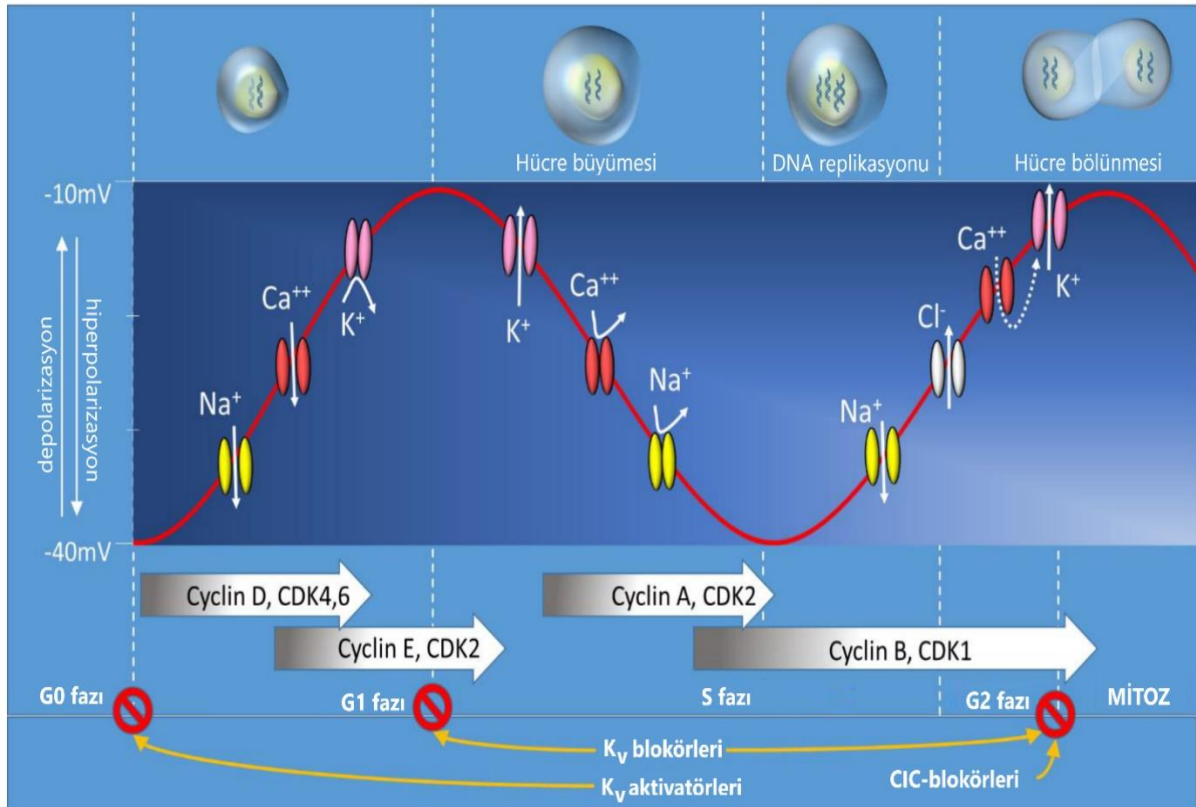
2.3.1. İyon Kanallarının Sınıflandırılması

İyon kanalları her biri farklı bir gen tarafından kodlanan farklı alt birimlerden oluşmaktadır ve farklı ölçütlere göre değişik kategorilerde sınıflandırılmaktadırlar. İyon kanalları, geçmesine izin verdikleri iyon tiplerine, geçitlenme faktörlerine (kapılı ve kapısız olmak üzere) doku ekspresyon paternlerine ve yapısal özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Kanallar, her biri farklı bir gen tarafından kodlanan farklı alt birimlerden oluşmaktadır. Voltaj kapılı ve ligand kapılı kanallar olmak üzere iki ana iyon kanalı sınıfı bulunmaktadır. İyon kanalları tipik olarak üç farklı durumda bulunabilmektedir; birincisi açık halde, ikincisi inaktive edilmiş halde (kanal açıldıktan sonra, kanalın iyonların geçmesine izin vermeyeceği refrakter periyot, kapalı) ve üçüncüsü istirahat halinde (dinlenme durumu) kapalı halde olabilmektedir. İyon kanallarının açılıp kapanması, membran potansiyeli (voltaj), ligandlar (örn., hormonlar ve nörotransmitterler), ikinci haberciler (örn., kalsiyum ve döngüsel nükleotitler), ışık, sıcaklık ve mekanik değişiklikler (mekanik olarak aktive edilen kanallar) gibi çeşitli faktörler tarafından kontrol edilmektedir (Kim, 2014).

2.3.1.1. Voltaj Kapılı İyon Kanalları (VGIC)

Transmembran potansiyelindeki değişikliklerle inaktive veya aktive edilen voltaj kapılı iyon kanalları, kanal boyunca iletilen ana iyon (örneğin; sodyum, potasyum, kalsiyum veya klorür) göre isimlendirilmektedir ve ana işlevlerine göre nöronların farklı bölgelerinde yoğunlaşmaktadırlar. Voltaj kapılı sodyum kanalları, aksiyon potansiyelini oluşturmak için akson tepciğinde yüksek

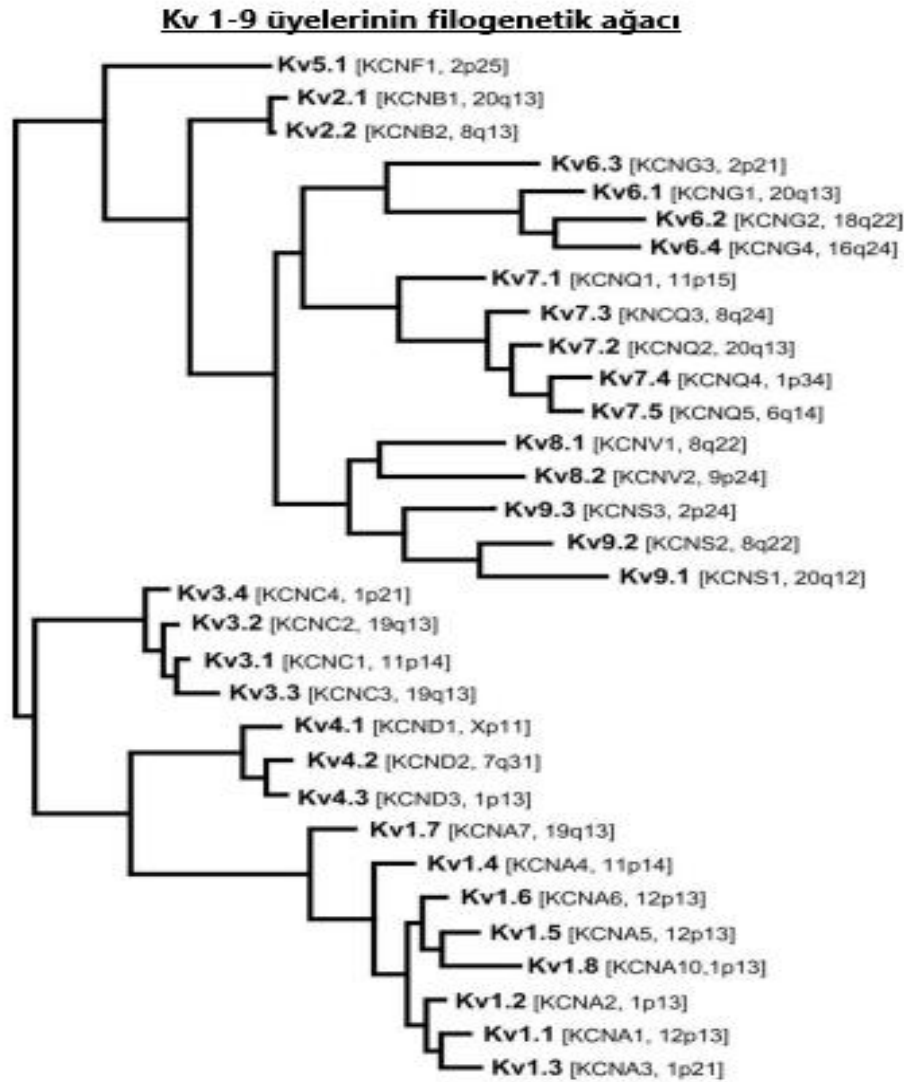
konsantrasyonda bulunmaktadır. Ranvier düğümleri, aksiyon potansiyelini yeniden oluşturmak için yüksek konsantrasyonda hem sodyum hem de potasyum kanalları içermektedir. Nörotransmitterlerin salınımına izin vermek için, akson terminalleri büyük miktarda kalsiyum kanalı konsantrasyonu içermektedir. Farklı voltaj kapılı kanallar, S1-S6 olmak üzere altı transmembran bölgeye sahiptirler. Alt birimler, merkezi bir gözenek oluşturacak şekilde birleştirilmektedir. Bu merkezi gözenğin özel yapısı, kanalın belirli bir iyon seçici geçirgenliğini belirlemektedir (Bernard ve Shevell, 2008). Voltaj kapılı iyon kanallarının, kanser hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli görevleri bulunmaktadır.



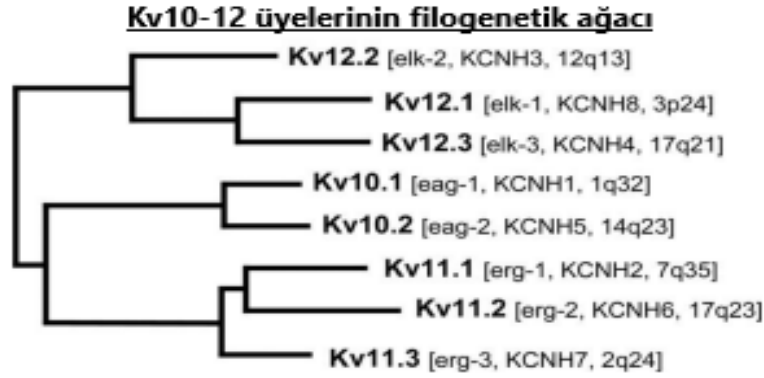
Şekil 2.3. Kanser hücre döngüsü sırasında ifade seviyelerine göre farklı VGIC kanallarının aktiviteleri.

Hücre döngüsü sırasında voltaj kapılı Na^+ ve/veya Ca^{+2} kanallarının açılması pozitif yükleri hücre dışı boşluktan sitoplazmaya hareket ettirerek zarın depolarizasyonuna neden olmaktadır ve bu olay hücre döngüsünün G0/G1 fazından S fazına geçişi teşvik etmektedir. Diğer yandan, S fazındaki membran potansiyeli, K^+ kanallarının açılması ve/veya Ca^{+2} ve/veya Na^+ kanallarının kapanması nedeniyle repolarize olma eğilimi göstermektedir. S fazının geri kalanındaki hücrelere kıyasla mitoz artan sitozolik Na^+ ve/veya Ca^{+2} nedeniyle, daha çok depolarize membran potansiyeli ile ilişkili görünmektedir. Artan Ca^{+2} girişi ve depolarizasyon, Ca^{+2} ile aktive olan K^+ kanallarının stimülasyonuna ve Cl^- kanallarının aktivasyonuna neden olmaktadır (Rao vd., 2015).

Voltaj kapılı Potasyum Kanalları (VGKC): Yapılan araştırmalara göre, voltaj kapılı potasyum kanallarının (VGKC) hücre çoğalması, kanser ilerlemesi, hücre döngüsü ve apoptozda rol oynadığı bildirilmektedir. Voltaj kapılı K⁺ kanalları (VGKC; Kv), adından da anlaşıldığı üzere K⁺ iyonlarına seçici olarak geçirgen olan, 12 alt aileden (Kv1–Kv12) meydana gelen heterojen ve geniş bir iyon kanal ailesidir. Bu iyon kanallarını kodlayan proteinlerin aktiviteleri, zar potansiyelindeki değişiklikler tarafından düzenlenmektedir ve hem uyarılabilir hem de uyarılabilir olmayan hücrelerde dinlenme zar potansiyelini yönetmekte görevlidirler. Birkaç VGKC'nin ifade edildiği dokudan uzaktaki farklı kanser dokularında anormal şekilde eksprese edildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca VGKC aktivitesinin değiştirilmesinin, hücre proliferasyonunun durdurulmasından motilitenin inhibisyonuna kadar kanser biyolojisinin çeşitli yönleri üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Rao vd., 2015). Aşağıdaki şekilde voltaja bağımlı K⁺ kanallarının alt tipleri filogenetik ağaç şeklinde gösterilmiştir (Ruta vd., 2003).



Şekil 2.4. Voltaj kapılı potasyum kanallarının alt tipleri.



Şekil 2.4. (devamı) (Ruta vd., 2003).

Voltaj kapılı Na⁺ kanalları (VGSC): Diğer yandan voltaja bağlı sodyum kanalları (VGSC), hücre dışı pH'nın düşmesine katkıda bulunmaktadır ve bu da kanser hücresi göçünü ve istilasını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca VGSC ve VGKC'ler, membran potansiyelini kontrol ederek ve çoğalma, istila, göç ve metastaz ile ilgili süreçlerde ikinci bir haberci olarak işlev gören Ca²⁺ akışını düzenleyerek, voltaja duyarlı Ca²⁺ kanal aktivitesini modüle etmektedirler (Diaz-Garcia ve Varela, 2020). Voltaj kapılı Na⁺ kanallarının çeşitli karsinomlarda ifadesinin arttığı bildirilmektedir. Nav1.5a alt biriminin ifadesi, meme kanserinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (Lang ve Stournaras, 2014).

Voltaj kapılı Na⁺ kanalları (VGSC'ler), gözenek oluşturuca α alt birimleri ve gözenek oluşturmayan β alt birimleri içeren heteromerik protein kompleksleri olarak tanımlanmaktadır. VGSC'lerin dokuz α alt birimi (Nav1.1-Nav1.9 arası isimlendirilen) ve dört β alt birimi (β 1- β 4) bulunmaktadır. VGSC'lerin β alt birimleri immünoglobulin süper ailesinin üyeleridir, kanal aktivitelerini düzenler ve ayrıca hücre yapışma molekülleri olarak bilinmektedirler (CAM'ler). VGSC'lerin temel görevi, elektriksel olarak uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyellerinin başlatılması ve iletilmesidir. Bununla birlikte VGSC'ler, bazı uyarılamayan hücrelerde de ifade edilebilmektedirler. Fibroblastlar, glia hücreleri, bağışıklık hücreleri ve kanser hücrelerinde artan veya azalan ifadelerinin etkisi henüz tam anlamıyla anlaşılamamıştır (Patel ve Brackenbury, 2015). Birkaç kanser türünde α alt birimlerin, mRNA ve protein ekspresyonunu değiştirerek metastatik potansiyel ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir. Aşağıdaki tabloda, voltaja bağlı Na⁺ kanallarının α ve β alt birimleri ve ilişkilendirildikleri kanser türleri gösterilmektedir (Brackenbury, 2012).

Tablo 2.1. Voltaj kapılı sodyum kanallarının α ve β alt birimleri ve ilişkilendirildikleri kanser türleri.

Protein	Gen	Kanser Tipi
α alt birimleri		
Nav1.1	SCN1A	Yumurtalık
Nav1.2	SCN2A	Rahim ağzı, mezotelyoma, yumurtalık, prostat
Nav1.3	SCN3A	Yumurtalık, prostat, küçük hücreli akciğer kanseri
Nav1.4	SCN4A	Rahim ağzı, yumurtalık, prostat
Nav1.5	SCN5A	Meme, kolon, lenfoma, nöroblastom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, yumurtalık, küçük hücreli akciğer kanseri

Tablo 2.1. (devamı)

Protein	Gen	Kanser Tipi
α alt birimleri		
Nav1.7	SCN9A	Meme, servikal, lenfoma, mezotelyoma, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, yumurtalık, prostat
Nav1.8	SCN10A	-
Nav1.9	SCN11A	Lenfoma, küçük hücreli akciğer kanseri
β alt birimleri		
$\beta 1$	SCN1B	Meme, servikal, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat
$\beta 2$	SCN2B	Meme, servikal, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat
$\beta 3$	SCN3B	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat
$\beta 4$	SCN4B	Meme, servikal, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat

Voltaj kapılı kalsiyum (VGCC) kanalları: Voltaj kapılı Ca^{2+} kanalları yüksek voltajla etkinleştirilen (Cav1.1–1.4, Cav2.1–2.3) ve düşük voltajla etkinleştirilen (Cav3.1–3.3) kanallar olarak sınıflandırılmaktadır ve 10 farklı izoformdan oluşan alt tiplere sahiptirler. Neredeyse tüm uyarılabilir hücrelerde farklı oranlarda ekspres edilmektedirler ve nöronal uyarılabilirliği, sinaptik plastisiteyi, gen transkripsiyonunu, kas kasılmasını, kardiyak otomatiziteyi ve hormon salınımını kontrol etmektedirler (Carbone ve Mori, 2020).

Voltaj kapılı Ca^{2+} kanalları (VGCC'ler), presinaptik sinir terminalinde, Ca^{2+} iyonlarının akışına izin vermek için aksiyon potansiyellerine yanıt olarak açılmaktadırlar. İyon akışı, aksiyon potansiyellerinin frekansı ile doğrusal bir şekilde değişen dereceli bir süreç olmakla birlikte, sonuçta sinaptik yarıktan postsinaptik membrana yayılan ve onların spesifik reseptörlerine bağlanan çeşitli nörotransmitterlerin salınımı gerçekleşmektedir. Hücre içi serbest Ca^{2+} , hücrelerde en yaygın sinyal iletim elemanı olarak bilinmektedir. Hücre dışı ve hücre içi (sitoplazmik) Ca^{2+} konsantrasyonları arasında bir elektrokimyasal gradyan bulunmaktadır ve bunlar ayrıca plazma zarı VGCC'leri yoluyla sitozole girmektedir veya hücre içi havuzlardan salınmaktadırlar. Değişmiş Ca^{2+} kanal fonksiyonu yoluyla hücre içi Ca^{2+} düzeylerinin anormal yükselmesi, kardiyovasküler hastalıklar, kas bozuklukları, akut veya kronik ağrı, epilepsi, serebellar ataksi, migren, duygudurum bozuklukları ve belirli kanser türleri dahil olmak üzere çeşitli insan patofizyolojileriyle ilişkilendirilmektedir (Gupta, 2011).

Voltaj kapılı klorür kanalları (VGIC): ClC ailesine ait voltaj kapılı klorür (Cl^-) kanalları hemen hemen tüm hücrelerde bulunmaktadır ve birçok farklı fizyolojik ve patofizyolojik süreçte önemli roller oynadığı düşünülmektedir. ClC ailesi hücre zarları boyunca Cl^- iyonlarının voltaja bağlı taşınmasına aracılık eden geniş bir protein ailesi olarak tanımlanmaktadır (Poroca vd., 2017). İlk klorür kanallarının (ClC-0 ve CFTR) klonlanmasından önce, Cl^- iyonlarının hücre zarları boyunca elektrokimyasal dengede olduğu düşünüldüğü için, klorür kanalları bilim adamlarının ilgisini çekmemiştir. Ayrıca, spesifik inhibitörlerinin olmaması ve biyokimyasal saflaştırmasının zorluğundan dolayı voltaj kapılı klorür kanallarının moleküler olarak tanımlanması, diğer kanallara göre daha geç yapılmıştır. İlk defa 1990 yılında *Torpedo marmorata*'dan klonlama stratejisi ile saflaştırılan klorür kanalı ClC-0 olarak

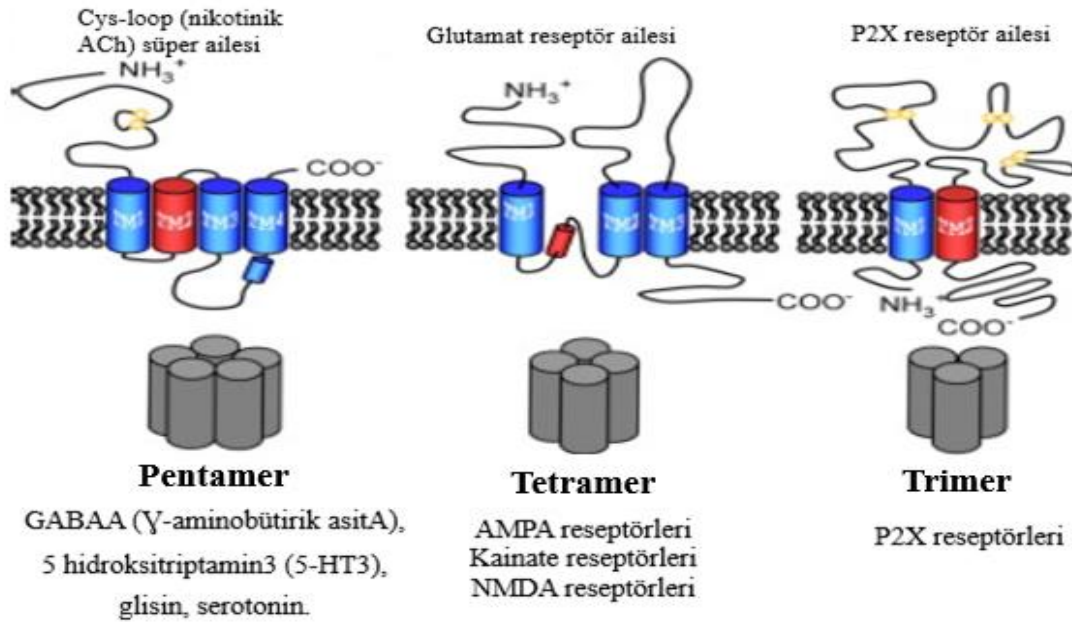
adlandırılmıştır. Daha sonraki yıllarda öbakterilerden hayvanlara kadar birçok organizmada daha da genişleyerek birçok alt üyesi tanımlanmıştır. Son zamanlardaki araştırma sonuçlarına göre, voltaj kapılı klorür kanallarının hücre proliferasyonunda ve birincil beyin tümör hücrelerinin istilacı hücre göçünde önemli rolleri olduğu ortaya çıkmıştır (Olsen vd., 2003). Klorür iyonu elektronegatif bir yapıda olduğundan membran potansiyelindeki değişiklikler yoluyla, nöronların ve kasların uyarılabilirliğini düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır. Epitel hücrelerinde Cl^- konsantrasyonu, hücre içi ve hücre dışı ozmotik homeostazın korunmasına yardımcı olan iyon taşıyıcıları aracılığıyla iyon hareketinin yönünü belirlemektedir. ClC-0 'ın keşfinden sonra dokuz memeli ClC proteini tanımlanmıştır ve bunların dördü plazma zarında eksprese edilmektedir ve kanal olarak çalışmaktadır, diğer beşi ise hücre içi zarlara lokalize durumunda olan Cl^-/H^+ değiştiricileridir (Poroca vd., 2017).

2.3.1.2. Ligand Kapılı İyon Kanalları (LGIC)

Bu transmembran iyon kanalı grubu, bir nörotransmitter gibi bir kimyasal habercinin (yani bir ligandın) bağlanmasına yanıt olarak açılan veya kapanan kanallardan oluşmaktadır ve hızlı sinaptik aktarım sağlamaktadırlar. LGIC'lerin protein kompleksleri üzerinde endojen ligandların bağlanma bölgeleri (allosterik bir bağlanma bölgesi) bulunmaktadır. İyon kanalı bir ligand tarafından düzenlenmektedir ve genellikle Na^+ , K^+ , Ca^{2+} veya Cl^- gibi iyonlara karşı çok seçici olmaktadır. Sinapslarda bulunan bu tür reseptörler, presinaptik olarak salınan nörotransmitterin kimyasal sinyalini doğrudan ve çok hızlı bir şekilde postsinaptik bir elektrik sinyaline dönüştürmektedir (Keramidas vd., 2004).

LGIC'lerin farklı alt tipleri bulunmaktadır:

- Nikotinik asetilkolin reseptörleri (Cys-loop): GABAA (γ -aminobütirikasitA), 5-hidroksitriptamin3 (5-HT3), glisin, serotonin.
- İyonotropik glutamat reseptörleri: AMPA, Kainate, NMDA.
- ATP-kapılı kanallar: P2X reseptör aileleri (Hucho ve Weise, 2001).



Şekil 2.5. Ligand kapılı iyon kanallarının üç yapısal alt biriminin şematik gösterimi (Collingridge vd., 2009).

2.3.1.5. Mekanik Olarak Aktive Edilen İyon Kanalları

Bu kanallar mekanik girdileri biyokimyasal sinyallere dönüştürmektedirler. Mekanik olarak aktive edilmiş iyon kanallarının tanımlanması ve karakterizasyonundaki zorluklar nedeniyle araştırmaları kısıtlı kalmıştır. Ancak, bu kanallarla ilişkili çeşitli kanalopatilerin varlığı, kanalların önemini ortaya koymaktadır. Mekanik olarak aktive edilen iyon kanalları, plazma zarında gözenekler oluşturmaktadır ve mekanik uyarılarla açılmaktadırlar. Bu kanallar açıldığında, yüklü iyonlar pasif difüzyonla elektrokimyasal gradyanlarından aşağı doğru bir membran akımı üretmektedir. Çoğu kanal gözenekten geçebilen spesifik iyonlar için seçicilik göstermektedir (Martinac ve Poole, 2018). Prokaryotik ve ökaryotik canlılarda her biri farklı yapılara ve işlevlere sahip çeşitleri bulunmaktadır. Dokunma, yerçekimi ve ozmotik basınç gibi mekanik uyarılar, mekanik olarak aktive edilmiş (MA) iyon kanalları tarafından algılanmaktadır. Hücrelerin fiziksel çevrelerini algılama ve tepki verme yeteneği, geniş bir biyolojik süreç olarak neredeyse tüm canlılarda korunmuş bir özelliktir. Memelilerde ENaC (epitelyal sodyum kanalı) /ASIC (asite duyarlı kanallar ailesi), TRP (geçici reseptör potansiyel ailesi), K₂P (iki porlu K⁺ kanalları ailesi) ve PIEZO olmak üzere 4 kanal ailesinin bazı alt üyeleri mekanik aktive kanallar sınıfına girmektedir. Ancak bunlardan yalnızca PIEZO1 ve PIEZO2 kanallarının birincil aktivasyon mekanizması mekanik uyarılardır, diğerleri öncelikli türlerine göre de aktivasyon gösterebilmektedirler (Ranade vd., 2015).

Akciğer epitel hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, PIEZO1 kanalının hücrelerin yapışmasını azalttığı ve hücre göçünü indüklediği gösterilmiştir. PIEZO2 kanalı üzerine yapılan bir çalışmada ise, premalign insan fibroblastlarında PIEZO2 kanallarının inhibisyonunun normalden

bağımsız büyümeyi desteklediği bildirilmiştir (Volkers vd., 2015). TRPV4'ün inhibisyonunun mekanik algılamaya bağlı süreçlerde değişikliklere neden olduğu ve ağrı algılama, kıkırdığın homeostatik bakımı, mesanede basınç algılama ve tümör anjiyogenezi gibi sonuçlara yol açtığı bildirilmektedir (White vd., 2016).

2.3.1.4. Por Sayısına Göre İyon Kanalları (TPC'ler)

Tek porlu kanallar: Hemen hemen tüm iyon kanalları bu sınıfa girmektedir.

İki porlu kanallar: Aşağıdaki gruplara ayrılmaktadır;

1. CatSper kanalları: Sperm katyon kanallarıdır. CatSper1-4 olmak üzere 4 alt tipi bulunmaktadır (Chung vd., 2022).
2. 2 porlu potasyum kanalları (K₂P'ler): TASK1-5, TREK-1, TREK-2, TRAAK, TWIK-1, TWIK-2, TRESK, THIK-1, THIK-2, TALK-1 ve TALK-2 bu gruba girmektedir (Decher vd., 2021).
3. Geçici reseptör potansiyeli (TRP) kanalları: TRP kanallarının 20 alt tipi tanımlanmıştır.
 - TRPC grubu (TRPC1, TRPC4,5, TRPC3,6,7 ve TRPC2)
 - TRPV grubu (TRPV1-5)
 - TRPM grubu (TRPM1-8) (Clapham vd., 2001).

2.3.1.5. Aquaporinler (AQPs)

Aquaporinler (AQPs), zar boyunca suyun ve bazı küçük çözünen maddelerin transferinde iyon kanalları gibi işlev gören bütünleyici zar proteinleri olarak tanımlanmaktadır. Bakterilerde, bitkilerde ve hayvanlarda korunmuş olarak bulunmaktadır ve yapısal analizler sonucu her aquaporin molekülünün merkezinde bir gözenek olduğu gösterilmiştir. AQP'lerin memeli hücrelerinde şimdiye kadar 10'dan fazla izoformu (AQP0-AQP12) belirlenmiştir ve birçok hücrede ve dokuda farklı şekillerde eksprese olmaktadır (Takata, 2004). İnsanlarda hemen hemen her doku ve organda bulunan AQP'ler, su kanalları olarak bilinmelerine rağmen aquaporin 1 (AQP1) dahil olmak üzere birçok tipinde iyon kanallarına benzer işlevler gözlenmiştir. AQP1 özellikle aktif Na⁺ taşınması ve kandan beyne su akışı ile BOS üreten beyin ventriküllerini çevreleyen bir doku olan koroid pleksusta yüksek oranlarda eksprese edilmektedir (Boassa vd., 2006). AQP2 ise renal tübüllerin toplama kanallarındaki ana hücrelerde yüksek oranda eksprese edilmektedir, ayrıca kalp yetmezliği durumunda ve gebelik durumunda da aşırı eksprese edildiği bildirilmektedir (Kozono vd., 2002). AQP'lerin kanserin gelişmesinde ve ilerlemesinde çok önemli rolleri olduğu kanıtlanmıştır, örneğin AQP'ler hücrel ortamı değiştirdiğinde, hücrel ozmolalite, hacim, iyonik bileşim ve sinyal yollarında değişiklikler meydana gelmektedir ayrıca ikinci haberciler olarak görev yapan belirli moleküllerin hücre içi seviyelerindeki değişiklikler de AQP'ler tarafından senkronize edilmektedir. Bu nedenle AQP'lerin,

kanser gelişimini ve ilerlemesini destekleyen çok sayıda efektör sinyal molekülünü düzenlemekle görevli olduğu düşünülmektedir. AQP1, AQP3 ve AQP5 ekspresyonu insan meme kanserlerinde aşırı eksprese edilmektedir. AQP1 ise, östrojen reseptörleri aracılığıyla endotel hücrelerini uyarak anjiyogenezin gelişimini indüklemektedir (Dajani vd., 2018).

2.3.2. İyon Kanallarının Hastalıklarla İlişkisi

İyon kanalları tüm hayvan, bitki ve bakteri hücrelerinin zarlarında bulunmaktadır ve hücre gelişimi ve fonksiyonunun tüm ana yönlerinde kilit rol oynamaktadırlar. İyon kanalları, dinlenme ve aktivite sırasında hücre fonksiyonunu etkin bir şekilde düzenlemek için oynadıkları role bağlı olarak farklı oranlarda ve yoğunluklarda ifade edilmektedirler. 500’den fazla alt birimi olduğu bildirilen iyon kanallarıyla ilişkili hastalıklar genetik, otoimmün, toksik (çevresel) veya iyatrojenik temelli olabilmektedir. İyon kanallarının ortasında içinden iyonların geçtiği bir gözenek yapısı bulunur, bu gözeneklerin etrafında subüniteler vardır ve bunların her biri bir gen tarafından kodlanmaktadır. Bu üniteleri oluşturan proteinlerdeki aminoasit dizilimlerinin değişimi kanalların geçirgenliğini değiştirerek iyon alış-verişlerinde bozukluklara ve dolayısı ile hücre içi haberleşmede aksaklıklara neden olabilmektedir (Di Resta ve Becchetti, 2010). Birçok çeşidi bulunan bu iyon kanallarının değişik dokulardaki farklı ekspresyonları sonucunda değişen aktivitelerinin çeşitli hastalıklara (kanalopati) neden olduğu bilinmektedir. Kanalopatiler, iyon kanallarının kalıtsal mutasyonlarının neden olduğu bozukluklardır. Kanalopatiler, birçok önemli fizyolojik süreçte merkezi rol oynayan iyon kanallarının yapısal ve işlevsel fonksiyonlarında genetik veya sonradan kazanılmış faktörlerin neden olduğu kusurlarla ortaya çıkan, özellikle uyarılabilme özelliği olan her türlü hücreyi, dokuyu ve organı etkileyen çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Bu hastalıklar arasında; migren, depresyon, şizofreni, diyabet, astım ve çağımızın hastalığı olan kanser gibi birçok hastalık bulunmaktadır ve bu hastalıklar ile iyon kanallarının doğrudan ilişkisi olduğu bildirilmektedir (Felix, 2000). Bu hastalıkların ortaya çıkışında birbiriyle ilişkili iki kavram öne çıkmaktadır. Birincisi, fenotipik heterojenliktir ve bu durumda aynı gendeki farklı mutasyonlar farklı hastalıklara neden olabilmektedir. Örneğin, iskelet kasındaki aynı voltaja bağlı sodyum kanalındaki mutasyonlar, hiperkalemik periyodik felç, hipokalemik periyodik felç, potasyumla ağırlaştırılmış miyotoni ve paramiyotoni konjenita ile sonuçlanabilmektedir. İkinci kavram ise, genetik heterojenliktir ve bu durumda farklı genlerdeki mutasyonlar, aynı görünen hastalık fenotipiyle sonuçlanabilmektedir. Örneğin, hiperkalemik periyodik felç, iskelet kası sodyum kanalını kodlayan farklı genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanabilmektedir (Bernard ve Shevell, 2008).



Şekil 2.6. İyon kanalları ile ilişkili hastalıklar (Falconer vd., 2002).

2.3.3. İyon Kanallarının Kansere İlişkisi

Son yıllarda yapılan araştırmalar iyon kanallarının çeşitli kanser özelliklerine dahil olarak, tümör oluşumunda ve kanserin gelişiminde önemli roller üstlendiğini göstermektedir. Bu sebeple iyon kanalları onkolojide yeni bir araştırma alanını oluşturmaktadır (Vaeth ve Feske, 2018). Kanser patogenezi, nihayetinde normal doku homeostazını bozan ve normal hücrelerin kontrolsüz çoğalma ve yayılma sergileyen kötü huylu türevlere dönüşümünü sağlayan genomda dinamik değişiklikleri içermektedir. Kötü huylu dönüşüm sırasında membran iyon kanallarını ve taşıyıcıları kodlayan genler de bu durumdan etkilenmektedir. İyon kanallarının ifadesi dolaylı veya doğrudan birçok patolojik durumda değişikliğe uğramaktadır. Zarlardan geçen iyon ve molekül akışları, hücre zarı potansiyelini ve hacmini tanımlar, hücre içi sinyal olaylarında yer alırlar ve spesifik hücresel tepkileri etkinleştirmektedirler (Herve, 2015).

İyon kanalları, iyon akışlarını kontrol ederek, aksiyon potansiyeli ve sinaptik iletim gibi hızlı hücre sinyallerini ve ayrıca mitoz ve hücre göçü gibi çok daha yavaş süreçleri şekillendirmektedirler. Son yıllarda giderek daha fazla kabul edilen verilere göre, kanserin ayırt edici özelliklerinde çeşitli kanal türleri yer almaktadır ve neoplastik ilerlemenin belirli aşamalarını düzenlemektedirler. Uzun süreli in vitro çalışmalar sonucunda, bu iyon kanallarının inhibisyonunun kanser hücrelerinin büyümesini bozduğu bildirilmektedir (Arcangeli ve Becchetti, 2015).

Son yıllarda sadece plazma membran kanalları değil, aynı zamanda hücre içi olanlar da kanser hücrelerindeki bazı tipik özelliklerin kontrolü ile ilişkilendirilmektedir. Endoplazmatik retikulum, çekirdek, lizozom, endozom ve mitokondri dahil olmak üzere hücre altı organellerde iyon homeostazının korunmasında çeşitli kanal türleri rol oynamaktadır (Leanza vd., 2013). Süper

çözünürlüklü mikroskopi, organellar elektrofizyoloji, organel hedefli floresan görüntüleme ve organel proteomiklerinde son zamanlarda yaşanan teknik gelişmeler, hücre içi iyon taşınması araştırmalarında çığır açmaktadır. Birçok yeni organellar kanal moleküler olarak tanımlanmaktadır ve elektrofizyolojik olarak karakterize edilmektedir. Bu gelişmeler sayesinde iyon kanalı taşıyıcılarının çoğunun moleküler tanımlanması, fizyolojik işlevlerinin genetik ve farmakolojik yollarla incelenmesini mümkün kılmaktadır (Xu vd., 2015).

İyon kanallarının kanserdeki rolü, tanımlanan kanser özelliklerine dahil olmaları bağlamında değerlendirilmektedir, bunlar:

- Büyüme sinyallerinde kendine yeterlilik,
- Antigrowth sinyallerine duyarsızlık,
- Programlanmış hücre ölümünden kaçma (apoptoz),
- Sınırsız çoğalma potansiyeli,
- Sürekli anjiyogenez ve
- Doku istilası ve metastazı.

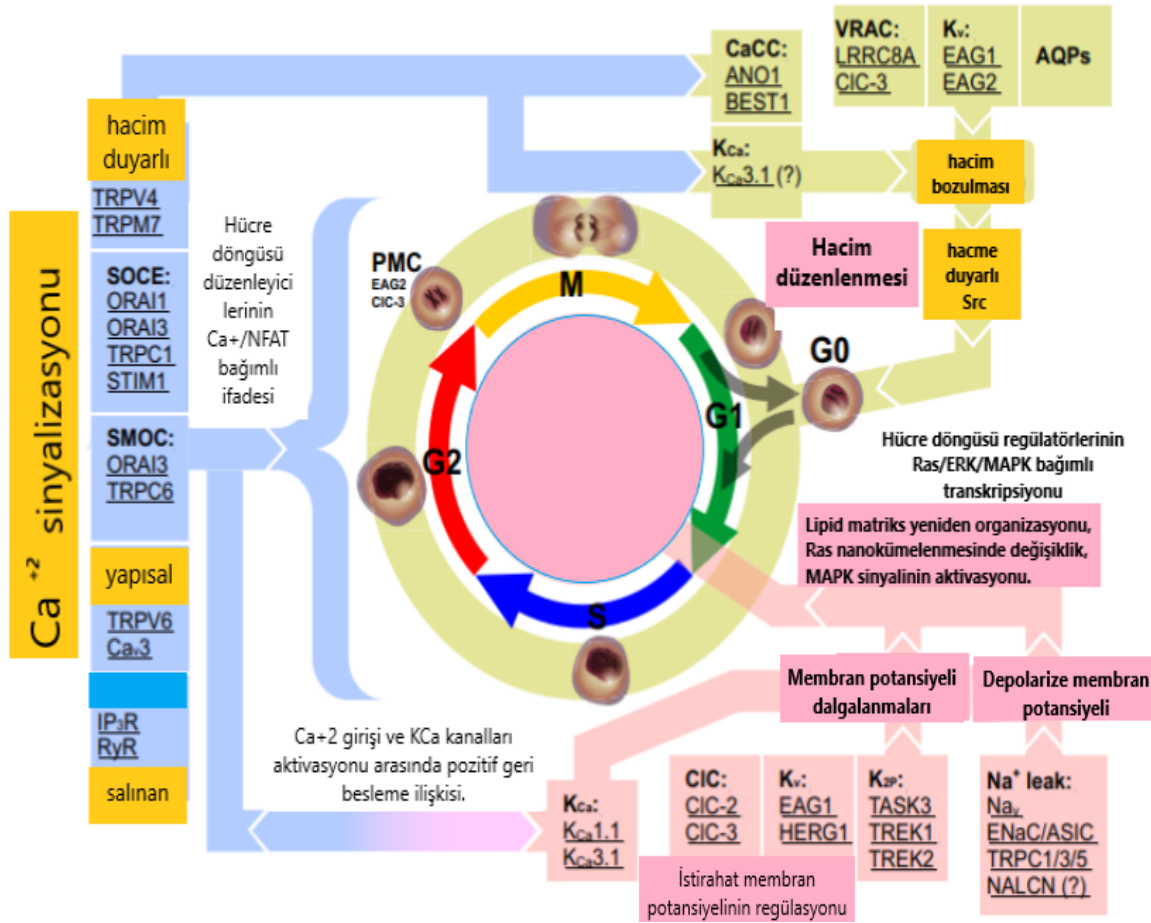
Son çalışmalar, spesifik iyon kanallarının tanımlanan kanser özelliklerine katkısının farklı kanser türlerine göre değiştiğini göstermektedir. Bu nedenle iyon kanallarının kanser teşhisi için hedef olarak önemini belirlemek ve tedavi etmek için ekspresyon, fonksiyon ve düzenlemeleri her kanser türü için ayrı ayrı değerlendirilmesi gerekmektedir (Zamponi, 2016). Günümüzde bilindiği kadarıyla, insanlarda iyon kanallarının 500'den fazla alt birimi mevcuttur, dolayısıyla bu büyük protein sınıfı giderek artan bir şekilde çok önemli ilaç hedefleri olarak kabul edilmektedirler (Pless ve Ahern, 2015).

Hücre Döngüsü

Bir hücre döngüsü, temel olarak çoğalmayan hücrelerden oluşan G0 fazı, hücrelerin DNA replikasyonu için hazırlandığı G1 fazı, ardından hücrelerin DNA replikasyonuna uğradığı S fazı ve hücrelerin mitoz/hücre bölünmesine girmeye hazırlandığı G2 fazı ve son olarak hücrelerin hücre döngüsü sürecini bireysel olarak devam ettiren yavru hücrelerle tamamen bölünmesiyle sonuçlanan mitoz (M) fazından oluşmaktadır (Rao vd., 2015).

Hücre döngüsü sırasında üç önemli kontrol noktası bulunmaktadır; birincisi G1/S geçişi sırasında, ikincisi G2/M geçişi sırasında ve üçüncüsü metafazdan anafaza geçiş sırasında. Bir fazdan diğerine geçişte hücre döngüsü ilerlemesini ve doğru hücre bölünmesini sağlamak amacıyla hücre döngüsü Ca^{+2} , ATP, siklinler, sikline bağımlı kinazlar, protein kinazlar, protein fosfatazlar ve proteazlar tarafından yüksek oranda düzenlenmektedir (Pineda vd., 2020). Hücre döngüsünün normal şekilde ilerlemesi doku yenilenmesi, yaşlanma ve üreme ile doğrudan ilgili olduğu için her çok hücreli organizmanın doğal süreçlerinde öneme sahiptir. Hücre döngüsünün ilerleyişi sırasında oluşan düzensizlikler, kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açan, kanserin ayırt edici özelliğidir. Bu nedenle, çok

yönlü ve çok karmaşık kontrol mekanizmaları ile sıkı bir şekilde düzenlenmektedir ve çeşitli iyon kanallarının bu mekanizmalara etkileri yıllardır süregelen araştırmalarla aydınlatılmaya çalışılmaktadır (Urrego vd., 2014).



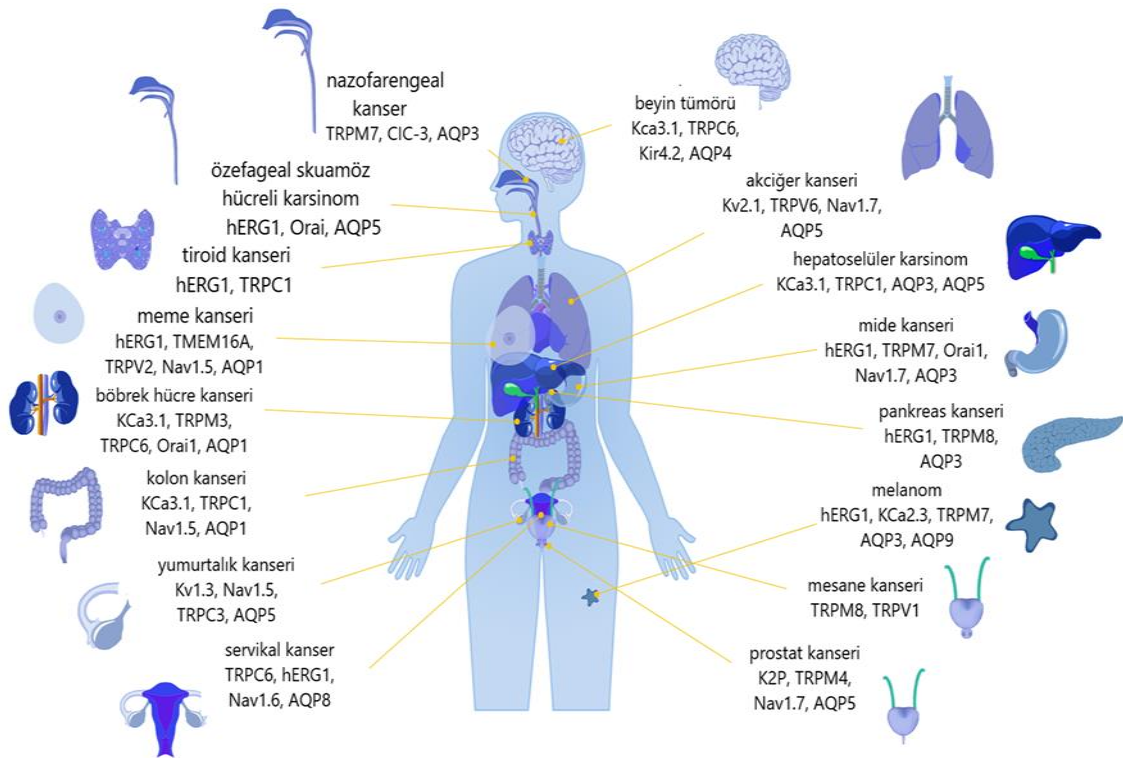
Şekil 2.7. İyon kanallarının kanser hücrelerinin çoğalmasına ve hücre döngüsü ilerlemesine katkısı (PMC: premitotik yoğunlaşma) (Prevarskaya vd., 2018).

Hücre döngüsünü düzenleyen en önemli ve dinamik faktörlerden biri zar potansiyelidir (V_m , transmembran potansiyeli olarak da adlandırılır). Bu membran potansiyeli, aslında hücre içi ve hücre dışı ortam arasındaki iyonik konsantrasyondaki farklılıklar sonucu gelişen, bir elektrik yükünden ibarettir. Membran potansiyeli ve Ca^{2+} homeostazına ilişkin klasik mekanizmalardan pH kontrolü, hücre hacmi düzenlenmesi, büyüme faktörü salınımı, hücre dışı matris ile etkileşim gibi birçok hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde iyon aktarımı ve dolayısıyla iyon kanalları büyük rol oynamaktadır (Becchetti vd., 2013). İyon kanallarının varlığının sadece bir hipotez olduğu zamanlarda bile, hücre döngüsünde membran potansiyeli (V_m) ve iyon aktarımının önemli roller oynadığına dair görüşler bulunmaktaydı ve özellikle neoplastik olan farklılaşmış hücrelerin, hareketsiz veya döngülü hücrelere kıyasla genellikle hiperpolarize durumda olduğu bilinmekteydi. Patch clamp tekniğinin geliştirilmesiyle birlikte, bu konuda daha fazla kanıtlar elde edilmiştir ve voltaj kapılı Ca^{2+} ve K^+ kanallarının T lenfositlerde ve hibridomlarda mitozu düzenlediği ortaya çıkmıştır (Becchetti, 2011). İnsan glioma hücrelerinde Cl^- akımlarının ekspresyonunun hücre döngüsüne bağlı olduğu

bilinmektedir. Klor akımı, erken G1'de en yüksek kanal aktivitesi ve G0, G1 ve S fazlarında en düşük kanal aktivitesi göstermektedir. Bu akımın, hücre döngüsünün durmasından sonra belirgin şekilde upregüle olduğu gösterilmektedir (Valenzuela vd., 2000). Membran zar potansiyelini negatif değerlerde tutan K^+ kanalları aynı zamanda hücrelere kalsiyum girişi için büyük bir itici güç sağlamaktadır ve Ca^{2+} akışı tarafından üretilen yüksek hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonları, hücrelerin çoğalma yeteneğine katkıda bulunmaktadır (Ullrich, 1999).

2.3.4. Kanser Patofizyolojisinde Rol Alan Ana Membran Kanal Aileleri

Uyarılabilir ve uyarılabilir olmayan hücrelerde iyon kanalları, hücresel homeostazın kritik düzenleyicileri olarak; elektrik sinyali iletimi, gen ekspresyonu, hücre sinyal yolları, hormonal salgılama, öğrenme ve hafıza gibi hayati fizyolojik süreçleri düzenlemektedirler. Anormal iyon kanalı aktivitelerinin karsinojeniz, hücre göçü ve metastası ile bağlantılı olduğunu gösteren kanıtların miktarı arttıkça, kanser de kanalopatiler arasına katılmıştır. Farklı iyon kanalları ve onların alt aileleri, farklı histolojik kökenlerden gelen birçok kanser türüyle ve bu kanserlerin çeşitli aşamalarındaki rolleriyle ilişkilendirilmiştir (Rao vd., 2015).



Şekil 2.8. İnsan kanserleriyle ilişkilendirilmiş iyon kanal türleri ve aquaporinler (AQPs) (Xia vd., 2017).

İyon kanallarının farklı kanserlerdeki rollerinin tümör tipine özgü olduğu düşünülmektedir çünkü her tümör hücresi benzersiz bir heterojenlik sergilemektedir (tümör mikroçevresi) ve bu durum kanser tedavilerinin kişiye özgü olması gerektiği görüşünü doğurmaktadır. Bu nedenle iyon kanallarının

farklı kanserlerdeki ekspresyon, fonksiyon ve düzenlemeleri her kanser türü için ayrı ayrı değerlendirilmektedir. Tablo 2.2.'de insan kanserlerinde ifadesi değişen iyon kanallarına ait literatürdeki çalışmalar özetlenmiştir.

Tablo 2.2. İnsan kanserlerinde ifadesi değişen iyon kanalları ve hücresel işlevleri (Prevarskaya vd., 2018).

İyon Kanalları	Hücresel işlevi	Kanser işaretleri	Etkilenen Kanser Tipi
ANO1 (TMEM16A)	Hacim düzenleme	Proliferasyon, Metastaz, Migrasyon, İnvazyon	Prostat, Akciğer, Meme kanseri HNSCC*
AQP1	Hacim düzenleme	Apoptoz Direnci, Anjiyogenez	RCC*, Melanom, Meme kanseri
AQP8/9	Hacim düzenleme	Apoptoz direnci	HCC (Karaciğer kanseri)
ASIC1	Ph hassasiyeti	Migrasyon, İnvazyon, Proliferasyon, Metastaz	Glioblastoma, HCC, Meme Kanseri
ASIC2a/ASIC3	Ph hassasiyeti	-	Adrenokortikal kanser
CLC-3	Hacim düzenleme	Migrasyon, İnvazyon	Glioma
IP ₃ R	Ca ²⁺ sinyalizasyonu	Proliferasyon ve Yaşama oranı	Bütün kanser tipleri
K _{2p} 2.1 (TREK1)	ER, Mitokondri		
	V _r regülasyonu ve Ca ²⁺ girişi için itici güç	Proliferasyon	Prostat kanseri
K _{2p} 3.1 (TASK1)	Ph Hassasiyeti	Proliferasyon ve Apoptoz Direnci	NSCLC (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri)
K _{2p} 9.1 (TASK3)	V _r regülasyonu ve Ca ²⁺ girişi için itici güç	Proliferasyon	Meme kanseri, Akciğer, Kolorektal kanser
K _{ca} 2.2 (SK2)	V _r regülasyonu ve Ca ²⁺ girişi için itici güç	Proliferasyon	Melanom
K _{ca} 2.3 (Sk3)	V _r regülasyonu ve Ca ²⁺ girişi için itici güç	Metastaz, Migrasyon	Meme Kanseri ve Kolon kanseri
K _{ca} 3.1 (IK)	Hacim düzenleme, V _r regülasyonu ve Ca ²⁺ girişi için itici güç	Migrasyon, İnvazyon, Proliferasyon	Glioma, Melanom ve Kolon kanseri
	V _r regülasyonu, Protein-protein etkileşimi, V _r regülasyonu, Ca ²⁺ girişi için itici güç		
K _v 10.1 (EAG1)		Proliferasyon, Migrasyon, Metastaz, Anjiyogenez	Çoklu kanserler, Meme kanseri ve Nonspesifik kanserler
K _v 10.2 (EAG2)	Hacim düzenleme	Proliferasyon, Migrasyon, Metastaz	Medulloblastoma
K _v 11.1 (Herg)	V _r regülasyonu, Protein-protein etkileşimi	Proliferasyon, Metastaz, İnvazyon, Anjiyogenez	Çoklu kanserler, Kolorektal kanser
Na _v 1.5	V _r regülasyonu, Ph düzenlemesi, Protein-protein etkileşimi	Metastaz, İnvazyon	Meme kanseri, Kolon, Yumurtalık kanseri
Na _v 1.6	Hücresel işlevi bilinmemektedir	İnvazyon	Rahim ağzı kanseri
Na _v 1.7	V _r regülasyonu, Na ⁺ girişi	İnvazyon	Meme, Prostat, NSCLC, Rahim ağzı kanseri

(*HNSCC; baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom, RCC; renal hücreli karsinom, Vr: dinlenim membran potansiyeli).

Tümör hücreleri, normal hücrelerin düzenli olarak geçirdiği, düzenleyici kontrol ve kısıtlamaların çoğundan kaçmaktadır ve iyonik homeostazın bozulması sonucu daha yüksek hücre içi Na^+ ($[\text{Na}]_i$) ve Cl^- ($[\text{Cl}]_i$) konsantrasyonlarına sahiptirler. Bu durum, onkogenenin karakteristik özelliklerdendir. Sonuçta kanser hücrelerinin normal hücrelere kıyasla daha fazla depolarize V_r 'ye sahip olması bu nedenledir. Ayrıca kanser hücrelerinde depolarize V_r artık sadece bozulmuş iyonik konsantrasyon dengesinin bir yansıması olarak kalmaz, kanser belirtilerini teşvik etmede aktif bir belirteç haline gelmektedir (Cameron vd., 1980).

2.3.4.1. K^+ Kanalları ve Kanser

İyon kanallarının en çok sayıda çeşidine sahip olan ve hemen hemen her hücrede bulunan bir sınıfı olan K^+ kanallarının, membran potansiyelini kontrol etme, sinir ve kardiyak aksiyon potansiyellerine ve nörotransmitter salınımına katkıda bulunma gibi çeşitli görevleri bulunmaktadır. Ayrıca, insülin salınımı, farklılaşması, aktivasyonu, çoğalması, apoptoz ve diğer bazı fizyolojik fonksiyonların yanı sıra, neoplastik hücre çoğalmasının ve hayatta kalmasının düzenleyici mekanizmalarında da yer almaktadırlar. K^+ geçirgenliğini kontrol eden K^+ kanalları hem uyarılabilir hem de uyarılabilir olmayan hücrelerde çok önemli roller oynamaktadır ve insan genomunda yaklaşık 90 farklı gen ürünüyle eksprese olmaktadır. Hücrelerde ifade edilen en büyük ve en çeşitli voltaj kapılı iyon kanalları grubunu oluşturan voltaja bağlı K^+ kanalları, yardımcı KVb alt birimleriyle birleşebilen gözenek oluşturu bir alt birim (KVb alt birimi) içermektedir. KVb alt birimleri, iyon kanalı işlevini veya lokalizasyonunu değiştirerek, bu iyon kanallarıyla ilişkili fizyolojik rollerin çeşitliliğini arttırmaktadır. Birçok veriye göre, K^+ kanallarının tipleri olan voltaj kapılı K^+ kanalları, Ether à-go-go K^+ kanalları, iki porlu (K_{2P}) K^+ kanalları ve Ca^{2+} ile aktive edilmiş K^+ kanalları gibi birkaç K^+ kanalı ailesi, tümör biyolojisi ile ilişkilendirilmektedir (Herve, 2015).

Bazı çalışmalarda, hücre içi potasyum kaybının apoptoza etkisi araştırılmıştır ve voltaj kapılı K^+ kanallarının apoptoz mekanizmasında nasıl bir rol oynadığı gözlemlenmiştir. Buna istinaden tetretlamonyum, tetrapentilamonyum veya kinin kullanılarak potasyum kanallarının doğrudan inhibisyonunun, hücreleri hücre ölümünden koruyabildiği açıklanmıştır. Aşağıdaki tabloda K^+ kanallarının alt tiplerinin ilişkili oldukları kanser tipleri ve apoptozdaki rolleri gösterilmiştir (Bortner ve Cidlowski, 2014).

Tablo 2.3. Potasyum kanallarının alt tiplerinin ilgili kanser türüyle apoptozdaki rolleri.

Kanal türü	Apoptozdaki rolü	İlgili kanser türü
Kv1.3	Kv1.3'ün rituksimab tarafından inhibisyonu, apoptozu indüklemek için FcγRIIB reseptörünü uyarır.	B hücreli lenfoma
Kv1.5	Dikloroasetat, apoptozu indüklemek için Kv1.5'i upregüle eder.	Karaciğer kanseri, Adenokarsinom

Tablo 2.3. (devamı)

Kanal türü	Apoptozdaki rolü	İlgili kanser türü
Kv10.1 (Eag1)	Eag1'in eşzamanlı yıkılması ve TRAIL kaynaklı apoptozun aşırı ekspresyonu.	Osteokarsinom
Kv10.1 (Eag1)	Eag1'in imipramin kaynaklı apoptoz ile inhibisyonu.	Yumurtalık kanseri
Kv10.1 (Eag1)	Sitotoksik ilaçlarla duyarlılaştırma ile TRAIL kaynaklı apoptoz ile inhibisyonu.	Prostat kanseri
Kv11.1 (hERG)	Bu kanalı aşırı eksprese eden hücrelerde doksazosin kaynaklı apoptoz ile Kv11.1'in inhibisyonu.	Prostat, Hipofiz
TREK-1	TREK-1'in kurkumin kaynaklı apoptoz ile inhibisyonu.	Yumurtalık kanseri
KCa3.1	TRAIL kaynaklı apoptoz ve KCa3.1'in TRAM-34 tarafından inhibisyonu.	Melanom
BK_{Ca}	Zoledronik asit kaynaklı apoptoz ile BK _{Ca} aktivitesinin artması.	Meme kanseri
K_{ATP}	KATP'nin glibenclamid veya U37883A tarafından inhibisyonu, TRAIL kaynaklı apoptozda artış.	Melanom
mitoKV1.3	MitoKv1.3'ün Psora-4, PAP-1 veya klofaimin kaynaklı apoptoz tarafından inhibisyonu.	Osteokarsinom ve melanom
HERG	Sisplatin kaynaklı apoptoz ile HERG ekspresyonunda artış.	Mide kanseri
hERG1	hERG1'in E-4031 ile inhibisyonu, SDF-1 ile indüklenen apoptoz.	Akut miyeloid lösemi

2.3.4.2. Na⁺ Kanalları ve Kanser

Na⁺ kanallarının kanserdeki rolleri, esas olarak NaV1.5 (nNaV1.5), NaV1.6 ve NaV1.7' nin neonatal varyantlarının aşırı ekspresyonu ile ilişkilendirilmektedir. Na⁺ kanallarının meme kanseriyle ilişkisi üzerine yapılan bir çalışmada, metastatik insan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-23 üzerinde, nNaV1.5'in aşırı ekspresyonu gösterilmiştir. Benzer sonuçlar nNaV1.5 kanallarının ekspresyonu ile çeşitli histolojik kökenlerden gelen kanser hücrelerinin yüksek invaziv potansiyeli arasında da bulunmuştur. Sonuç olarak, nNaV1.5 kanalının aşırı ekspresyonunun kanser hücrelerinin metastatik potansiyelini arttırdığı bildirilmiştir (Diaz-Garcia ve Varela, 2020). Voltaja duyarlı Na⁺ kanalları (NaV), sinir ve kas gibi uyarılabilir dokularda aksiyon potansiyelinin oluşumu ve sürdürülmesinde görevlidirler. Diğer yandan uyarılabilir olmayan epitel dokulardan (meme, prostat, akciğer ve serviks) türeyen yüksek derecede metastatik kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilmektedirler (Lee vd., 2006).

Örneğin, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde, NaV1.5 ve yardımcı alt birimlerinden oluşan fonksiyonel sodyum kanalı komplekslerinin aşırı ifadesiyle birlikte, zar potansiyelinde sürekli bir içe doğru sodyum akımı gerçekleştiği bildirilmektedir (Gillet vd., 2009). Diğer bir çalışmada, Nav1.5 mRNA'sının yumurtalık kanserinde aşırı eksprese olduğu bildirilirken, yumurtalık kanserindeki ekspresyon seviyelerinin farklılıklarına göre, yumurtalık kanserinin derecelendirilmesi ve metastazı hakkında bilgi sağladığı açıklanmıştır (Gao vd., 2010).

2.3.4.3. Ca^{+2} Kanalları ve Kanser

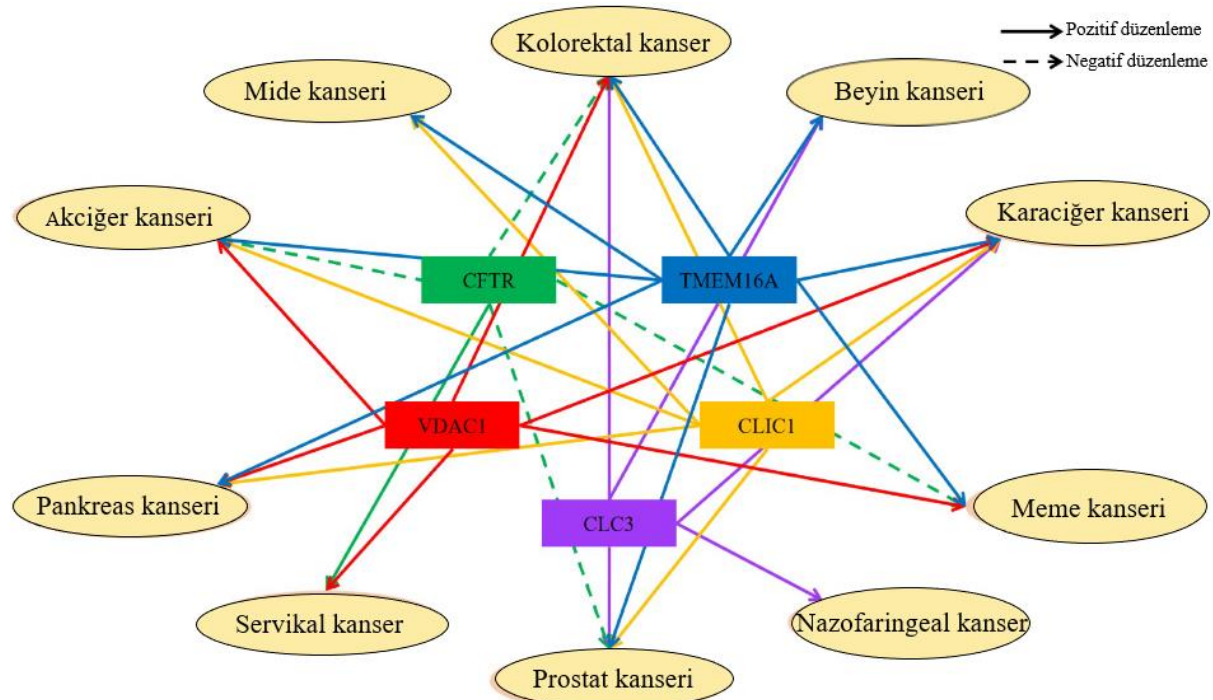
Kalsiyum sinyallerinin pek çok hücrel süreçte geniş bir rol oynadığı bilinmektedir ve anormal kalsiyum sinyallerinin, kanserle ilişkili sinyal yollarından tümör ilerlemesini kesin olarak etkilediği kanıtlanmıştır. Onkojenik sinyal yollarında kalsiyum homeostazı çok önemlidir. Bu sinyal yolları kanserde önemli bir transkripsiyon faktörü olan STAT-3'ü aktive ederek glioma, prostat kanseri ve meme kanseri gibi birçok kanser türünün ilerlemesine katkıda bulunduğu bildirilmektedir. Ayrıca çok sayıda çalışma bazı kanserler türlerinin, spesifik Ca^{+2} kanallarının ekspresyonundaki büyük değişikliklerle ilişkili olduğunu ve bu kanalları kodlayan proteinlerin bazılarının inhibisyonunun, kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve metastazını engellediğini yada azalttığını ortaya koymaktadır (Monteith vd., 2012).

Üç ana plazma membran Ca^{+2} geçirgen kanal sınıfı bulunmaktadır;

1. Membran depolarizasyonunu kalsiyum girişine bağlayan voltaj kapılı kalsiyum kanalları (VGCC'ler): insanlarda 10 gen tarafından kodlanan CaV1 , CaV2 ve CaV3 o.ü. üç alt tipi bulunmaktadır.
2. Geçici reseptör potansiyeli (TRP'ler) kanalları: insanlarda 27 gen tarafından kodlanan TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP, TRPML o.ü. 6 alt tipi bulunmaktadır.
3. Ca^{+2} salınımıyla aktive olan kanallar (CRAC'ler): SOCE, STIM ve ORA1 ve IP3R (inositol 3-fosfat reseptörleri) proteinlerini kodlayan kanallardır (Wu vd., 2021).

2.3.4.4. Cl^- Kanalları ve Kanser

Birçok yaşayan organizmada ifade edilen klorür iyon kanalları (CLC), hem hücrelerde hem de hücrel organellerin zarlarında bulunmaktadır ve Cl^- iyonlarının zarlardan hareketine izin vererek çeşitli hücrel yolları düzenlemektedirler. Bu kanalların ifadelerindeki değişimler, çeşitli insan kanserleriyle ilişkilendirilmektedir. Yapısal olarak, CLC'ler, her monomerde ayrı bir iyon translokasyon yoluna sahip dimerler oluşturmaktadır ve bunlar, protonlar için klorürü değiştiren kanallar veya taşıyıcılar olarak çalışmaktadırlar (K. Wang vd., 2019).



Şekil 2.9. Klorür kanalları ile ilişkili kanserlerin gösterimi (kesikli oklar negatif düzenlemeyi, kesiksiz oklar pozitif düzenlemeyi ifade etmektedir). Her bir klorür kanalı en az iki kanser türünde rol oynamaktadır. VDAC1: Voltaj bağımlı anyon kanalı 1, TMEM: Transmembran kanal ailesi üyesi, CLC: Voltaj kapılı klorür kanalları, CLIC: Ekstrasellüler klorür kanalları, CFTR: Kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyicisi (Kim vd., 2022).

Yüksek oranda korunmuş CLIC klorür iyon kanalları, sitoplazmada ve geçici olarak plazma ve iç hücre zarlarında bulunmaktadır. CLIC'lerin CLIC1, 2, 3, 4, 5 ve 6 olmak üzere altı tane alt tipi bulunmaktadır. Bunlardan CLIC1 ve CLIC3 kanserle ilişkilendirilmektedir. Hücre döngüsü düzenlenmesi, pH homeostazisinin korunması, hücre sağ kalımı, hücre hacmi düzenlenmesi, membran potansiyeli modülasyonu gibi çok çeşitli hücresel işlevlere katılmaktadırlar. Prostat kanseri, karaciğer kanseri, nazofaringeal kanser, beyin tümörleri ve kolorektal kanser gibi çeşitli kanserlerde, farklı düzeylerde eksprese oldukları bildirilmektedir (Ozaki vd., 2022).

VDAC'ler, mitokondriyal metabolizmada rol alan iyon kanalları sınıfıdır. Ayrıca belirli insan kanseri türleri için prognostik bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedirler. VDAC1'in yüksek ekspresyonu, akciğer, baş ve boyun, meme ve karaciğer kanserleriyle ilişkilendirilmektedir (Heslop vd., 2021).

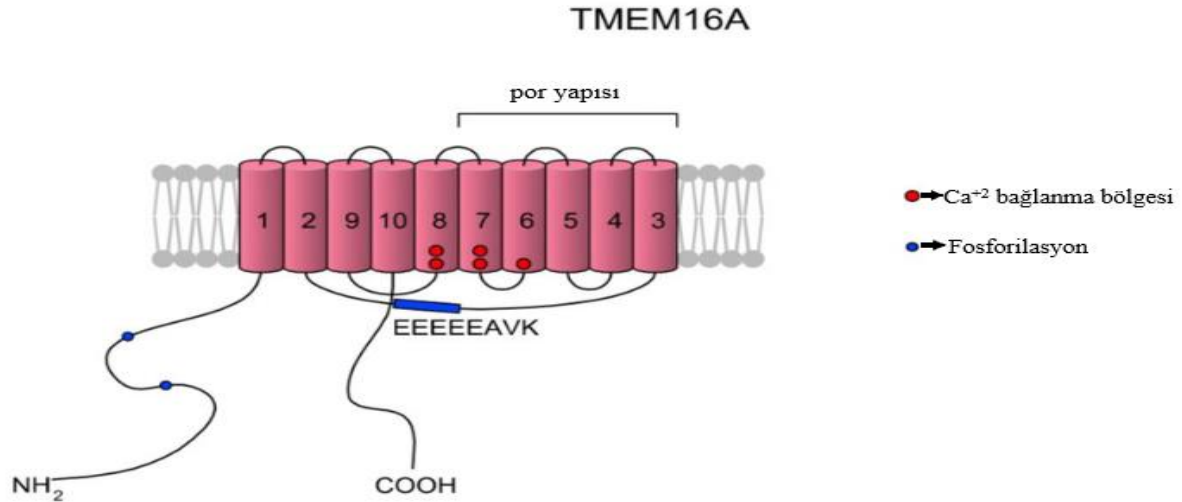
CTFR genindeki mutasyonların, CF (kistik fibroz) hastalığına neden olduğu bilinse de aynı zamanda, kanser ile ilişkisi son yıllarda araştırma konusu olmaktadır. CFTR akciğer, gastrointestinal sistem ve üreme sistemi gibi farklı doku ve organlarda eksprese edilmektedir. CTFR geninin servikal ve kolorektal kanserler gibi farklı kanserlerde farklı oranlarda eksprese olduğu bildirilmiştir (Parisi vd., 2022).

2.3.4.5. Ca^{+2} ile Aktive Edilen Cl^- İyon Kanalları

Kalsiyum ile aktive olan klorür kanallarının (CaCC'ler), ilk olarak tanımlanması semender retinasındaki çubuk segmentlerinde ve *Xenopus* oositlerinde elektrofizyolojik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, sayısız elektrofizyolojik çalışmayla epitelyal, nöronal, salgı ve kas (kalp, iskelet ve düz kas) hücreleri dahil olmak üzere, birçok farklı memeli hücresinde geniş ölçüde eksprese edilen CaCC'lerin alt tipleri tanımlanmıştır. Epitelden mukus salgılanması, nöronal ve kardiyomiyosit uyarılabilirliği, düz kas kasılması, koku alma, duyuşal sinyal iletimi ve hücre çoğalmasının düzenlenmesi gibi çeşitli fizyolojik işlevlerde CaCC'lerin önemli rolleri bulunmaktadır. CaCC'leri hedef alan ilaçlar, hipertansiyon, kistik fibroz, astım ve kanser gibi hastalıklarda terapötik olarak aktif bir şekilde kullanılmaktadır (Yang ve Colecraft, 2015). Bir araştırma grubu tarafından ilk olarak 2008 yılında TMEM16A'nın tanımlanmasıyla bu kanalların gizemi çözülmeye başlanmıştır. 3 farklı laboratuvarında çalışan araştırmacılardan oluşan bu grup, CaCC'lerin temel yapısal bileşenleri olarak ilk defa, TMEM16 transmembran protein ailesinin iki üyesini, TMEM16A (ANO1) ve TMEM16B'yi (ANO2, anoktamin2) tanımlamışlardır (Cruz-Rangel vd., 2015).

2.3.4.5.1. Ca^{+2} ile Aktive Edilen TMEM16A Kanalının (ANO1) Kanserle İlişkisi

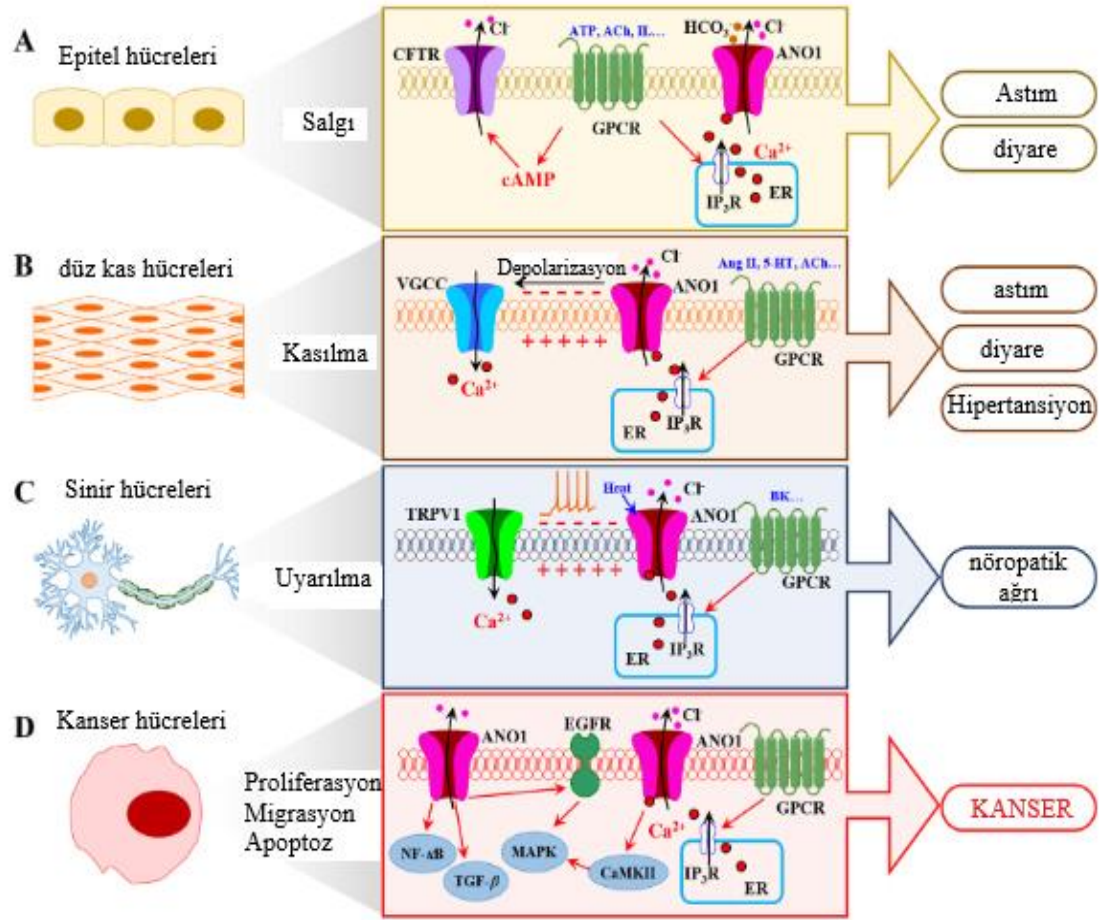
Transmembran protein 16A (aynı zamanda anoktamin 1 (ANO1) olarak da adlandırılan TMEM16A), voltajla veya hücre içi Ca^{+2} ile aktive olan klorür iyon kanalı olarak tanımlanmaktadır. Hidropati analizleri sonucunda TMEM16 ailesinin tüm üyeleri sitozolik N (amino) ve C (karboksi) terminal uçlu 10 TM (transmembran) alanına sahiptir. TMEM16A, birçok Ca^{+2} kanalının (örn., IP3R, TRP kanalları, STIM1 ve Orai kanalları) ve reseptörlerin (örn., GPCR'ler, EGFR) Ca^{+2} sinyalini düzenlemek için bulunduğu endoplazmik retikulum (ER) ve plazma zarı temas bölgelerinde bulunmaktadır. Membranın hidrofobik çekirdeğine gömülü olan yüksek oranda korunmuş bir bölgesinde TMEM16A'nın Ca^{+2} aktivasyonuna aracılık eden bir Ca^{+2} bağlama bölgesi bulunmaktadır (Ma vd., 2017).



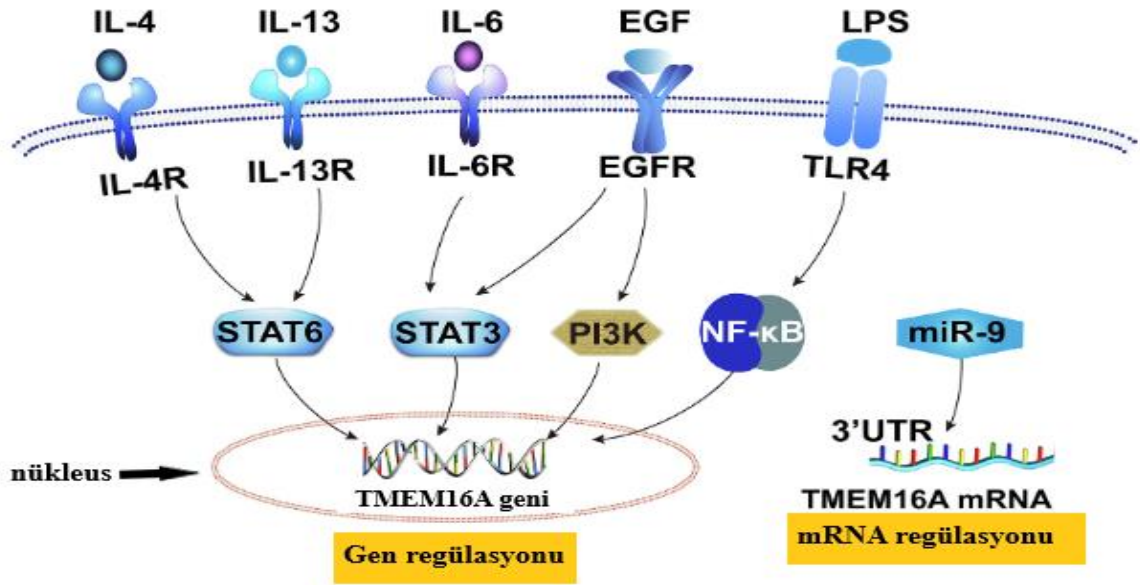
Şekil 2.10. TMEM16A monomerinin topolojisi. Her monomerin 10 TM alanı bulunmaktadır.

TMEM16A'nın iyon iletimi sağlayan por yapısı her alt birimde üç ila yedi TM tarafından oluşturulmaktadır. TMEM16A'nın aktivasyonu iki yolla gerçekleşmektedir; TM2-TM3 döngüsündeki EEEEEAVK motifi aracılığıyla voltajla (V_m) aktivasyon veya düşük Ca^{2+} konsantrasyonları (<600 nM) aracılığıyla düzenlenmektedir (Nowicka-Bauer ve Szymczak-Cendlak, 2021).

TMEM16A iyon kanalı, salgı epiteli, solunum yolları ve vasküler düz kas hücreleri, vasküler endotel, Cajal interstisyel hücreleri ve nosiseptif nöronlar dahil olmak üzere birçok hücrede eksprese edilmektedir. Salgı epitelinde sıvı salgılanması, düz kas kasılması, bağırsak hareketliliği, hücre hacmi düzenlemesi, apoptoz ve ağrı gibi birçok hücresel işlevi düzenlemektedir. TMEM16A kanalının disfonksiyonunun kanser, hipertansiyon, gastrointestinal motilite bozuklukları ve kistik fibroz gibi birçok hastalığın oluşumuna katkı sağladığı bildirilmektedir (H. Wang vd., 2017). TMEM16A kanalları ayrıca, transepitelyal sekresyon, kardiyak ve nöronal uyarım, duyuşal transdüksiyon, düz kas kasılması ve fertilizasyon gibi çok sayıda fizyolojik süreçte temel araçlar olarak işlev göstermektedirler. TMEM16 membran ailesinin, memelilerde yüksek oranda korunmuş zarla çevrili proteinlerden oluşan on tane alt birimi bulunmaktadır (Tmem16 (a-h, j-k)) ve epitel hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilmektedirler (Yang vd., 2008).



Şekil 2.11. TMEM16A'nın (ANO1) farklı dokulardaki dağılımı ve hastalıklardaki rolü (Liu et al., 2021). (A) Epitel hücrelerinde, ANO1 aktivasyonu elektrolit ve müsin salgılanmasına aracılık etmektedir. GPCR'lerin (ATP, asetilkolin, ikincil haberciler) aktivasyonu hücre içi cAMP ve Ca^{+2} 'da artışa neden olmaktadır. Ayrıca CFTR ve ANO1'in aktivasyonu, Cl^- sekresyonunu indüklemektedir. ANO1'in aşırı ekspresyonu astım ve ishal gibi inflamatuvar hastalıklara neden olmaktadır. (B) Düz kas hücrelerinde ANO1 aktivasyonu yoluyla Cl^- iyonlarının dışarı akışı depolarizasyona ve düz kas kasılmasına neden olmaktadır. ANO1'in aşırı ifadesi, astım ishal ve hipertansiyona yol açmaktadır. (C) Duyu nöronlarında, ANO1'in hücre içi Ca^{+2} veya ısı ile aktivasyonu, Cl^- akışına neden olmaktadır ve nöropatik ağrıya yol açan nöronal uyarılabilirliği arttırmaktadır. TRPV1 ve ANO1 arasındaki fonksiyonel bağlantı da nosisepsiyonda rol oynamaktadır. (D) Kanser hücrelerinde ANO1 upregülasyonu hücre çoğalması ve göçüyle ilişkiliyken, ANO1 downregülasyonu, EGFR/MAPK sinyal yolu, CaMKII/MAPK sinyal yolu, TGF- β sinyal yolu ve NF- κ B sinyal yolu dahil olmak üzere çoklu sinyal yolları aracılığıyla apoptozu indüklemektedir. ANO1'in aktivatörler veya güçlendiriciler tarafından farmakolojik aktivasyonu, ağız kuruluğu ve kuru göz sendromlarının tedavisi için terapötik bir stratejidir ve ANO1'in inhibisyonu, astım, diyare, hipertansiyon, nöropatik ağrı, kanserler ve ANO1 ile ilgili kanalopatilerde olumlu sonuçlar vermektedir (Liu vd., 2021).



Şekil 2.12. TMEM16A ekspresyonunu düzenleyen mekanizmalar (Bai vd., 2021).

Epitel hücrelerinde TMEM16A'nın aşırı ekspresyonu, IL4/IL13/STAT6 sinyal yollarının aktivasyonu aracılığıyla, astım, eozinofilik özofajit gibi birçok enflamatuvar hava yolu hastalığına yol açmaktadır. TMEM16A'nın IL-6, IL6R/STAT3 sinyal yolu aracılığıyla ekspresyonu akut pankreatitte aşırı eksprese olduğu ve EGFR ve STAT-3 sinyal yolu aracılığıyla ise meme kanserinde aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir. Ayrıca LPS, NF-κB sinyal yolu yoluyla bağırsak epitel hücrelerinde TMEM16A ekspresyonu gözlenmektedir. Ek olarak, birçok inflamatuvar hastalıkta ve kolorektal kanserlerde TMEM16A ekspresyonu, miR-9 tarafından düzenlenmektedir (Bai vd., 2021).

Araştırmalara göre TMEM16A, gastrointestinal stromal tümörler, mide kanseri, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (HNSCC), kolon kanseri, pankreas duktal adenokarsinomu ve özofagus kanseri dahil olmak üzere birçok kanserde aşırı eksprese edilmektedir. TMEM16A'nın aşırı ekspresyonu, tümör hücrelerinin oluşumu, çoğalması ve göçü ile ilişkilendirilmektedir. TMEM16A farklı kanserlerde farklı sinyal yollarını aktive etmektedir. Örneğin, meme kanserinde EGFR, STAT-3 ve CAMKII sinyalini, hepatomda p38 ve ERK1 / 2 sinyalini ve gliomada NFκB sinyal yolunu aktifleştirmektedir (Q. Ji vd., 2019).

TMEM16A'nın ekspresyonunun değiştirilmesi, transkripsiyonda veya hücre bölünmesinde görevli proteinlerin ifadelerinin değişmesiyle sonuçlanmaktadır. Örneğin, Siklin A2 (CCNA2), Siklin D1, Siklin E, Sikline bağımlı Kinazlar 1 ve 2 (CDK1 ve CDK2) gibi hücre döngüsü proteinleri, artan TMEM16A ekspresyonu ile beraber kanser hücrelerinde upregüle edilmektedir. Ayrıca, NF-κB, c-myc ve STAT3 gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, TMEM16A ekspresyonu ile paralel artış gösterirken, JUN ve JNK transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi, TMEM16A ekspresyonu ile negatif olarak ilişkilendirilmektedir (Crottes ve Jan, 2019).

TMEM16A, hücreye özgü rolünü ilişkili protein ağları, farklı kinazlarla fosforilasyon ve farklı sinyal yollarının katılımı yoluyla göstermektedir. Bu sinyal yollarını inhibe eden bazı ajanlar

(inhibitörler) uygulandığında, TMEM16A'nın indüklediği hücre proliferasyonu ve göçünün azalacağı yönünde bazı çalışmalar yapılmıştır. "Potansiyel bir onkogen" olan TMEM16A'nın aşırı ekspresyonuna, 11q13 gen amplifikasyonu, transkripsiyonel regülasyon, epigenetik regülasyon ve miRNA'lar dahil olmak üzere birçok mekanizma neden olmaktadır. Bunlar ayrıca, diğer birçok proteinin ekspresyonunu değiştirmektedir ve bu nedenle TMEM16A'yı aşırı eksprese eden kanser hücrelerinin heterojenliğini oluşturmaktadırlar. Bu heterojenlik, TMEM16A'nın hücre proliferasyonunda ve göçünde hücreye özgü rolünü uyguladığı, belirli bir kanser tipine özgü benzersiz hücre ortamı belirlemektedir. TMEM16A gen modifikasyonu, farklı tümörler arasında büyük ölçüde değişiklik göstermektedir, bu durum anormal TMEM16A gen düzenlenmesinin veya protein fonksiyonunun tümör tipine özgü olabileceğini düşündürmektedir (Cj vd., 2003; H. Wang vd., 2017).

Yapılan bazı araştırmalarda antikanser etkisi olduğu bilinen antihelminetik bir ilaç olan Niklosamidin'in, çeşitli kanser hücrelerinde, ANO1 kanallarını inhibe ettiği ve ANO1 ekspresyonunun ortadan kaldırılmasıyla birlikte kanser hücrelerinde proliferasyonu durduğu gösterilmiştir. Böylece, ANO1 kanallarının inhibisyonunun, kanser proliferasyonu ile doğrudan ilişkili olduğu ortaya çıkmaktadır (Kunzelmann vd., 2019). TMEM16A inhibitörü olarak tanımlanmış küçük molekül yapılı Dehidroandrographolide (DP) kullanılarak yapılan bir çalışmada, patch clamp elektrofizyolojisi kullanılarak, DP'nin, TMEM16A'yı aşırı ifade eden insan SW620 (insan kolorektal kanseri hücre hattı) hücrelerinde ve Fisher sıçan tiroid (FRT) hücrelerinde TMEM16A klorür akımlarını inhibe ettiği, ancak kistik fibroz transmembran iletkenlik regülatörü (CFTR) klorür akımlarını değiştirmediği gösterilmiştir. Farklı bir çalışmada ise, DP'nin MTT deneyleri kullanılarak doza ve zamana bağlı bir şekilde SW620 hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı ve SW620 hücrelerinin göçünü inhibe ettiği gösterilmiştir. Ek olarak, SW620 hücrelerinin DP ile muamelesinin TMEM16A protein seviyelerinde bir azalmaya yol açtığı, ancak mRNA seviyeleri üzerinde hiçbir etkisi olmadığı bildirilmiştir (Sui vd., 2015).

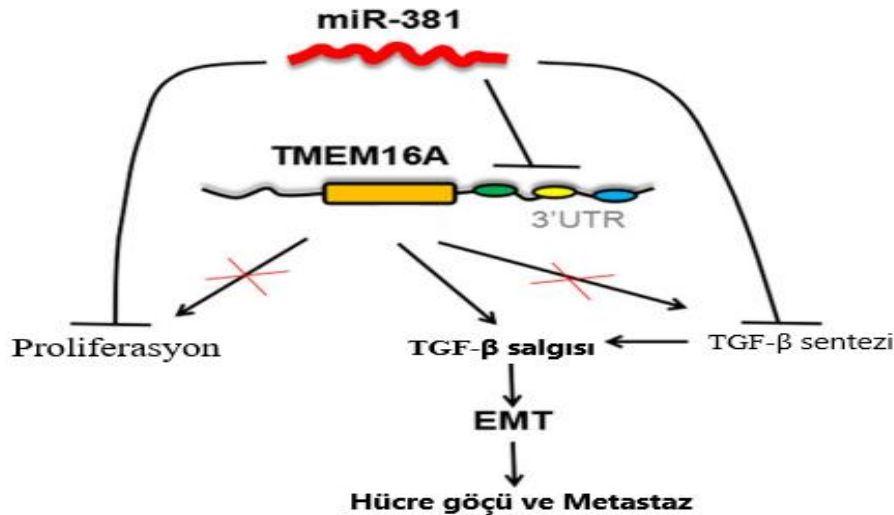
TMEM16A'nın, gastrointestinal stromal tümörler, mide kanseri, baş ve boyun skuamöz hücre karsinomu (HNSCC), kolon kanseri, pankreas duktal adenokarsinomu ve yemek borusu kanseri dahil olmak üzere birçok kanserde aşırı eksprese edildiği bilinmektedir. TMEM16A, farklı kanser türlerinde farklı sinyal yollarını aktive etmektedir. Örneğin, meme kanserinde EGFR ve CAMKII sinyali, hepatomda p38 ve ERK1/2 sinyali, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom ve mesane kanserinde Ras-Raf-MEK-ERK1/2 sinyali ve gliomada NFκB sinyal yolunu aktive etmektedir. TMEM16A'nın aşırı ekspresyonunun meme kanserinde karsinogeneze nasıl bir rol oynadığı hala belirsizliğini korumaktadır ancak, bazı çalışmalarda meme kanserinde EGF tarafından (epidermal büyüme faktörü) uyarılan EGFR-STAT3 sinyal yolunun, TMEM16A ekspresyonunu arttırdığı bildirilmektedir (H. Wang vd., 2019). Ayrıca, TMEM16A inhibisyonunun özellikle EGFR inhibitörleri ile kombinasyon halinde uygulandığında meme kanseri hücre proliferasyonunu etkili bir şekilde azalttığı da bildirilmiştir (Chen vd., 2021). Bugüne kadar birçok çalışma, çok çeşitli doğal ve sentetik bileşiklerin TMEM16A üzerinde düzenleyici etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu küçük moleküllu bileşiklerin, gelecekte

TMEM16A işlev bozukluğunun neden olduğu birçok hastalığın tedavisi için yeni ilaçlar olabileceği düşünülmektedir (Q. Ji vd., 2019).

TMEM16A kanalının miRNA aracılığıyla düzenlenmesi

MicroRNA (miRNA'lar), kodlama yapmayan küçük RNA'lardır ve hedef mRNA'larının 3' çevrilmemiş bölgelerine (3'-UTR) bağlanmaktadır. Bundan dolayı, gen ekspresyonunun negatif yönde ilerlemesine ve bozulma veya çeviri baskısına neden olmaktadır, yani gen ekspresyonunu baskılamaktadır. Veriler arttıkça ortaya çıkan tabloya göre miRNA'lar, çeşitli insan kanserlerinde düzensiz bir yapı sergilemektedirler. Onkogenler ve anti-onkogenlerle etkileşimlere girerek, hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez ve metastaz gibi kanserin bazı aşamalarına etki etmektedirler. miRNA'lar meme kanseri, akciğer kanseri, pankreas kanseri, kolorektal karsinom ve yumurtalık kanseri dahil olmak üzere, çeşitli kanser türlerinde anormal ekspresyonlar sergilemektedirler (Chi ve Zhou, 2016).

Cao ve arkadaşları, mide kanserinde miR-381'in (miRNA-381) doğrudan TMEM16A sinyal yolunu hedef aldığını belirledikleri bir çalışma yapmışlardır ve ayrıca miR-381'in TGF- β sentezini ve salgılanmasını inhibe ettiğini ve ardından EMT (epitelyal mezenkimal geçiş) ekspresyonunu downregüle ettiğini de bildirmişlerdir. Bu çalışma, miR381'in doğrudan TMEM16A'nın 3'UTR kod bölgesini hedeflediğini ve mide kanserinde TMEM16A ekspresyonunu negatif olarak modüle ettiğini göstermektedir. Bu çalışmanın sonucunda, miR-381'in TMEM16A'nın yukarı akış düzenleyicilerinden biri olduğu ve mide kanseri göçü ve istilası üzerinde tümör baskılayıcı görevi olduğu gösterilmektedir.



Şekil 2.13. TMEM16A ve TGF- β sinyal yolunun düzenlenmesi yoluyla hücre çoğalmasının ve göçünün miR-381 aracılı inhibisyonu (3'UTR 3'; çevrilmemiş bölge, EMT; epitelyal mezenkimal geçişi temsil etmektedir) (Cao vd., 2017).

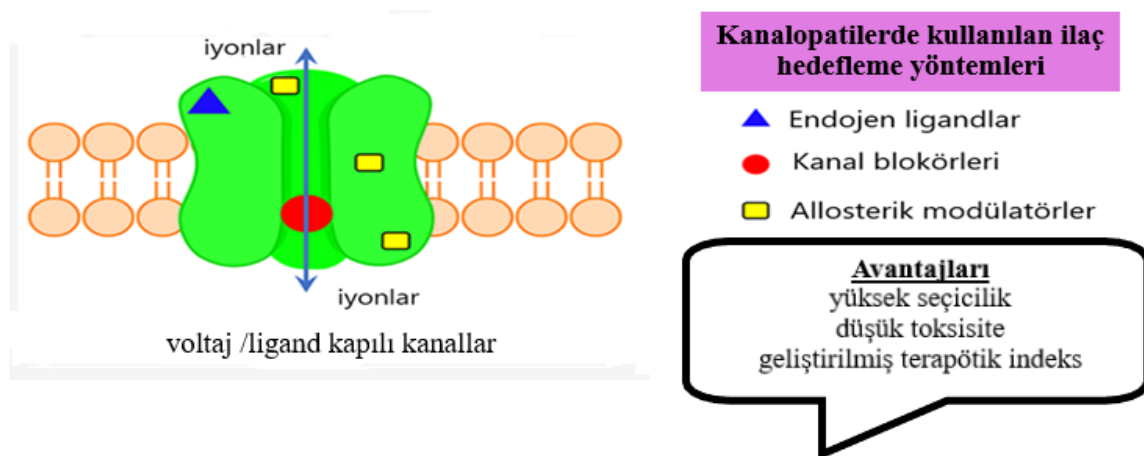
Yakın zamanda yapılan birkaç araştırmada, çeşitli kanser türlerinde mikroRNA'ların downregülasyonu nedeniyle, TMEM16A'nın aşırı ekspresyon sergilediği bildirilmiştir. Kolorektal kanserde miR-132, miR-9 ve miR-144'ün downregülasyonundan ve mide kanserinde miR-381'in

downregülasyonundan kaynaklanan TMEM16A aşırı ekspresyon seviyeleri bildirilmiştir (Bai vd., 2021).

2.4. İyon Kanallarına Yönelik İlaç Geliştirme Hedefleri

İyon kanalları, sayısız insan hastalığının tedavisi için umut verici ilaç hedefleri olarak nitelendirilmektedir. Yapılan araştırmalardan elde edilen verilere göre, insan genomu en az 400 iyon kanalı ailesini kodlamaktadır. İyon kanalları, G proteinine bağlı reseptörlerden (GPCR'ler) sonra, FDA onaylı birçok ilaç için en büyük ikinci membran proteini hedef sınıfını temsil etmektedirler (Hutchings vd., 2019; Santos vd., 2017). İyon kanalları tüm hücrelerde ifade edildikleri için, duyu algısı, sinir iletimi, kas kasılması, salgılama, bağışıklık tepkisi, hücre çoğalması ve farklılaşması dahil olmak üzere hemen hemen tüm fizyolojik süreçlerde yer almaktadırlar. İyon kanalları dolaylı veya doğrudan birçok patolojik durumda değişikliğe uğramaktadır ve bu değişikliklerin insanlarda birçok hastalıkla bağlantısı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, iyon kanallarını hedef alan ilaçlar bir dizi hastalık için önemli terapötik hedefler olarak tanımlanmaktadır (Zamponi, 2016).

İyon kanallarının hücre dışı ve hücre içi alanlarında çok sayıda ilaç bağlanma bölgesi tanımlanmıştır ve şu anda piyasada bulunan çok sayıda ilaç, farmakolojik aktivitelerini bu bölgelerle etkileşime girerek göstermektedirler. Bu bağlamda, iyon kanallarının modülasyonunda ve ilaç hedeflemesi çalışmalarında endojen ligandları, kanal blokörleri ve allosterik modülatörler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir iyon kanalının seçici olarak bloke edilmesi, özel bir molekülün bir hücrede fizyolojik bir yanıt oluşturmak için iyon kanalının açılmasını önleyen biyolojik mekanizmadan ibarettir. İyon kanallarını bloke eden bu özel moleküller iyon kanal inhibitörü, blokörü veya antagonisti olarak adlandırılmaktadır. Kanal inhibisyonu, katyonlar, anyonlar, amino asitler ve diğer kimyasallar gibi farklı molekül türleri tarafından gerçekleştirilebilmektedir. Bu inhibitörler, kanalın açılması ile oluşan yanıtı engellemektedirler (Bain, 2019).



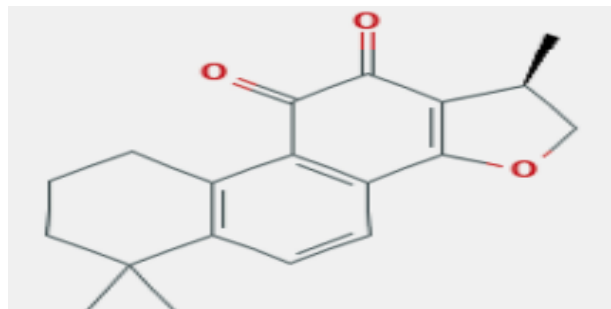
Şekil 2.14. İyon kanallarının modülasyonu ve ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılan klasik yöntemler (Zhang vd., 2020).

Teknolojik gelişmeler ve araştırma verilerinin artışı ile paralel olarak, patch clamp ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi yöntemler ile beraber iyon kanallarına özgü blokerlerin kullanımı kanser çalışmalarında giderek yaygınlaşmıştır. Bu tip çalışmalarla özellikle K^+ , Na^+ , Ca^{+2} ve Cl^- kanallarının ve alt tiplerinin kanserde hücre döngüsü, hücre proliferasyonu, apoptozis, onkogeneze ve hücre göçüyle ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmaktadır (Kale vd., 2015).

2.5. Cryptotanshinone (CPT)

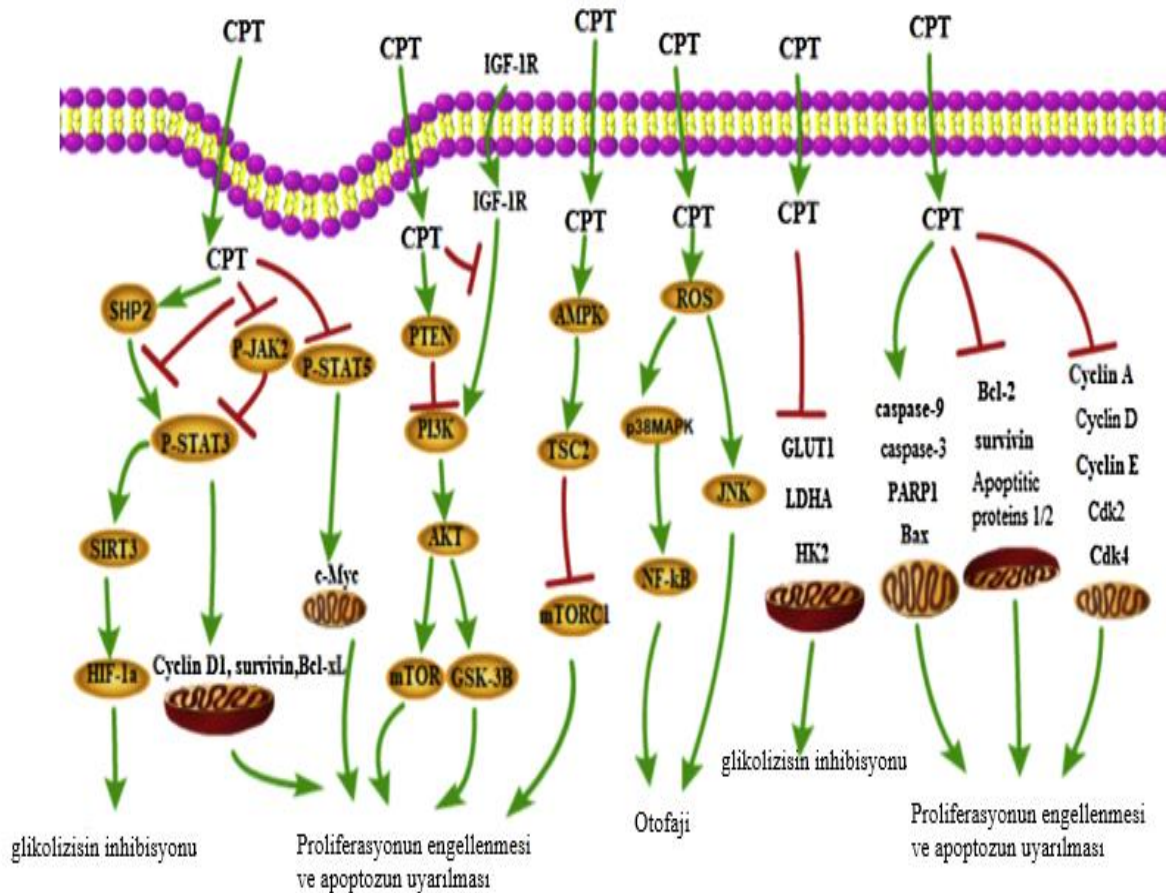
Geleneksel Çin tıbbında oldukça değerli bir bileşik olan, *Salvia miltiorrhiza* bitkisinin köklerinden ve rizomlarından ekstrakte edilen Cryptotanshinone, farmakodinamik aktif bir bileşik olarak derinlemesine araştırılmış ve çok sayıda hastalık ve bozukluğun tedavisinde etkinliği kanıtlanmıştır (Chen vd., 2014). Yağda çözünen Cryptotanshinone'un anti inflamatuvar, antioksidan, antibakteriyel, antikanser ve antitrombosit agregasyon aktivitesi dahil olmak üzere, çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmektedir. Ayrıca kardiyovasküler hastalıklarda, kronik yetmezliklerde ve Alzheimer gibi hastalıkların tedavisinde etkili olduğu ve hastaların bu bileşene ciddi yan etkiler göstermediği bildirilmiştir (Wu vd., 2020).

Cryptotanshinone'un programlanmış hücre ölümü ve apoptozun uyarılmasında rolünün olduğu ve kanser malignitelerinin tedavisinde etkinliği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Bissinger vd., 2014). CPT, antikanser etkisini STAT-3 sinyal yolunu hedefleyerek, VEGFR-3 aracılı ERK1 / 2 fosforilasyonunu baskılayarak ve küçük GTPaz aracılı yollar aracılığıyla, sinyalleşmeyi inhibe ederek gerçekleştirmektedir. Araştırmalara göre STAT-3, antiapoptotik etkileri aracılığıyla hücrelere DOXO, sisplatin ve docetaxel gibi kemoterapötik ajanlara karşı direnç sağlamaktadır. STAT-3 aktivitesinin inhibe edilmesinin, kanser hücre hatlarının kemoterapötik ilaçlarına duyarlılığını arttırdığı yapılan araştırmalarla gösterilmektedir ve bu kanıt, STAT-3 aktivasyonunun kesilmesinin tümör hücrelerini kemoterapötik ilaçlara daha duyarlı hale getirdiğini göstermektedir. Diğer taraftan, STAT-3 yollarını hedef alarak inhibe eden bir ajan olarak CPT ise, kanser hücrelerini TNF-a, TRAIL, Fas ve imatinib gibi antikanser ajanlarına karşı duyarlı hale getirmektedir, bu nedenle antikanser ajanlarla birlikte kullanımı araştırma konusudur (J. Wang vd., 2017).



Şekil 2.15. Cryptotanshinone'un ($C_{19}H_{20}O_3$) kimyasal yapısı (Wu vd., 2020).

Yapılan bir araştırmada anti-tümör etkinliğini arttırmak için CPT'nin anti-tümör ilaçlarla kombinasyonunun mümkün olduğu bildirilmiştir. Cryptotanshinone molekülünün doğrudan STAT-3'ün (sinyal dönüştürücüsü ve transkripsiyon aktivatörü-3) SH-2 alanına bağlanarak bir sinyal dönüştürücüsü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT-3) olarak hareket ettiği ve böylece SHP2 protein tirozin fosfatazin aktivitesini upregüle ettiği, ayrıca STAT-3 fosforilasyonunun bu durumdaki inhibisyonunun, JAK2 fosforilasyonu üzerindeki etkisinden bağımsız olduğu açıklanmıştır (Wu vd., 2020). Dae-Shin ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada, CPT'nin sitoplazmada STAT-3 molekülleri ile birlikte lokalize olduğu ve STAT-3 dimerlerinin oluşumunu inhibe ettiğini açıklamışlardır ve CPT'nin, STAT-3'ün downregüle ettiği hedef proteinlerinin (siklin D1, survivin ve Bcl-xL gibi) ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Sonuç olarak CPT; anti-tümör aktivite sergileyen bir STAT-3 inhibitörü olarak nitelendirilmiştir. JAK-2 fosforilasyonunun inhibisyonu, CPT'nin antitümör etkisinin ikincil yolu olarak kabul edilmektedir. CPT'nin ayrıca JAK-2/STAT-3 sinyal yolu aracılığıyla Hepa1-6 hücre apoptozunu indüklediği ve ayrıca tümör infiltre eden makrofajların ve dendritik hücrelerin aktivasyonunu desteklediği bildirilmektedir (Shin vd., 2009).



Şekil 2.16. CPT'nin anti-kanser etki mekanizmaları. "Ok", teşvik etkisini ve "T" alanı, engelleme etkisini temsil etmektedir (H. Li vd., 2021).

CPT'nin; tümör hücrelerini hedefleyerek anjiyogenezi inhibe ettiği, proliferasyonu durdurduğu, NF κ B ve STAT-3 yollarını hedefleyerek tümör vaskülarizasyonunu bozduğu ve mRNA'nın kararsızlığı nedeniyle TNF- α seviyesini azalttığı bildirilmektedir. Bütün bu sonuçlara dayanarak, CPT'nin kanser araştırmalarında önleyici ve tedavi edici bir ilaç olarak kullanılabilir olduğu ortaya çıkmaktadır (Yuan vd., 2014).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Tezde Kullanılan Araç Gereçler ve Kimyasallar

Tez çalışmasında sitotoksosite, qRT-PCR ve patch clamp analizleri için kullanılan gerekli sarf malzemeler ve kimyasallar Tablo 3.1’de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Sarf malzemeleri ve kimyasallar.

Adı	Markası
Trypsin-EDTA	Biowest
MTT	Biobasic
Fetal Bovine Serum	Biowest
Amphotericin B (20ml)	BIO
RPMI 1640 W. HEPES (500 ml)	BIO
Penicillin-Streptomycin (100 ml)	Biowest
Trypan Blue (C.I.23850) (50 gr)	Isolab
Steril DMSO (2.5 lt)	Isolab
Cesium chloride, 98%	Sigma
N-Methyl-D-glucamine reagent plus	Sigma
Cryptotanshinone ,98%	Sigma
LightCycler 480 Sealing Foil	Thermo
LightCycler 480 Multiwell Plate	Thermo
High Pure Rna Isolation Kit	Thermo
TaqMan Gene Expression Master Mix	Thermo
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo
ACTB TaqMan® Gene Expression Assay, 75 Test	Thermo
ANO1 TaqMan® Gene Expression Assay, 75Test	Thermo
Cell culture dish 60 x 15 mm	Greiner
Pastör Pipeti	LP Italiana
Serolojik pipet (5, 10ml)	Sarstedt
96 kuyucuklu Well Plate	Sarstedt
Flask 75 cm ²	Sarstedt
Steril Santrifüj Tüpü (15,50ml)	Sarstedt
Eppendorf Tüp (2.0 ml)	Isolab
Cedex XS akıllı hücre sayma lamı	Roche, Mannheim, Germany
Otomatik Pipet tek kanal (100-1000 µl)	Isolab
Otomatik Pipet tek kanal (10-100 µl)	Isolab
Parafilm- 100 x38 mm	Isolab
Filtreli Pipet Ucu (10, 100, 1000 1000 µl’lik)	Isolab

Tez çalışmasında sitotoksikite, qRT-PCR ve patch clamp analizleri için kullanılan gerekli araç ve gereçler Tablo 3.2’de özetlenmiştir.

Tablo 3.2. Kullanılan araç ve gereçler.

Adı	Markası
CO ₂ inkübatörü	CCL-170B-8, ESCO
Etüv	5040 BP, Elektro-mag Wise Cuba
Laminar akımlı kabin	SafeFast ELITE, FASTER
Santrifüj	Hettich, 320R
İnverted mikroskop	PrimaVert, ZEISS
Hücre sayım cihazı (Cedex XS)	Roche, Mannheim, Germany
Hassas terazi	Sartorius
Mikropipet seti	Eppendorf
Buzdolabı	Arçelik
Elisa reader	Thermo
Filamentli pipetler	World Precision Instruments
Pipet çekici	P97, Sutter Instruments CO, ABD
BM-37XB invert mikroskop	U-Therm International (H. K.) Limited
Multiclamp 700B yama kenetleme yükselteci	Axon Instruments, ABD
Digidata 1322A sayısal çevirici	Axon Instruments, ABD

3.2. Hücre Kültürü

Çalışmalarımızda STAT-3 inhibitörü Cryptotanshinone’un sitotoksik etkilerini incelemek amacıyla insan meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücreleri kullanılmıştır. Bu hücre hattı Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi’ de bulunan sıvı azot tankındaki stoklardan çoğaltılmıştır.

MCF-7, meme adenokarsinomundan muzdarip 69 yaşındaki bir kadından alınan plevral efüzyondan elde edilmiştir. Adını Michigan Kanseri Vakfı’ndan (MCF) almıştır ve dünyada en çok çalışılan insan meme kanseri hücre dizisidir. Hücre hattı epitel benzeri bir morfolojiye sahiptir ve kültür kabı ile hücre tek tabakası arasında sıvı birikmesi nedeniyle tek tabakalar kubbe yapıları oluşturur. Östrojen reseptörü alfa (ER- α)3-5’i eksprese eden birkaç meme kanserinden biridir. Hücreler ayrıca androjen, progesteron ve glukokortikoid reseptörlerini de eksprese eder ve tıbbi araştırmalarda çok değerli hale gelmişlerdir. Hücrelerin doubling (duplike) zamanı yaklaşık olarak 38 saattir. MCF-7 hücre hatları, öncelikle meme kanseri biyolojisini incelemek için bir *in vitro* model olarak kullanılmaktadır (Lee vd., 2015).

3.2.1. Hücre Besi Ortamı Hazırlanması

Tez çalışmasında kullandığımız MCF-7 hücreleri için uygun olduğu bilinen RPMI-1640 medyumunu (firmanın önerisine göre 2,5 mM L-Glutamin eklendi) içine inaktive edilmiş %10 fetal sığır

serumu (FBS), %1 penisilin-streptomisin ve %1 amfoterisin eklenerek katkılı medyum hazırlanmıştır. Hazırlanan katkılı medyum +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. MCF-7 Hücre Soyunun Açılması ve Çoğaltılması

Sıvı azot tankından çıkartılan hücreler su banyosunda çözündürülerek 37°C’ye gelmesi sağlanmıştır. Steril koşullar altında çözünmüş hücrelerin bulunduğu kriyoviyal tüp açıldı ve hücreler 15ml’lik falkon tüp içerisine boşaltılarak üzerine 37°C sıcaklıkta eşit hacimde medyum eklenerek yıkanmıştır. Falkon tüpteki hücreler 130 g’de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır, kalan pellete 1ml medium eklenerek yavaşça pipetaj yapılmıştır ve önceden 4 ml besiyeri konulmuş T25 flasklara (25cm²) ekim yapılmıştır. Ekim yapılan hücreler 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğalmaya bırakılmıştır. Hücreler 25 cm²’lik flasklarda 5 ml hücre mediumu içersinde 37°C’de ve %5 CO₂ ortamında yeterli yoğunluğa ulaşana kadar inkübe edilmiştir. Gün aşırı flask yüzeyinde hücrelerin çoğalmaları mikroskopik olarak incelenmiştir. 2-3 günde bir, hücreler %80 konfluent oluncaya kadar medyumları değiştirilerek inkübasyon işlemine devam edilmiştir.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

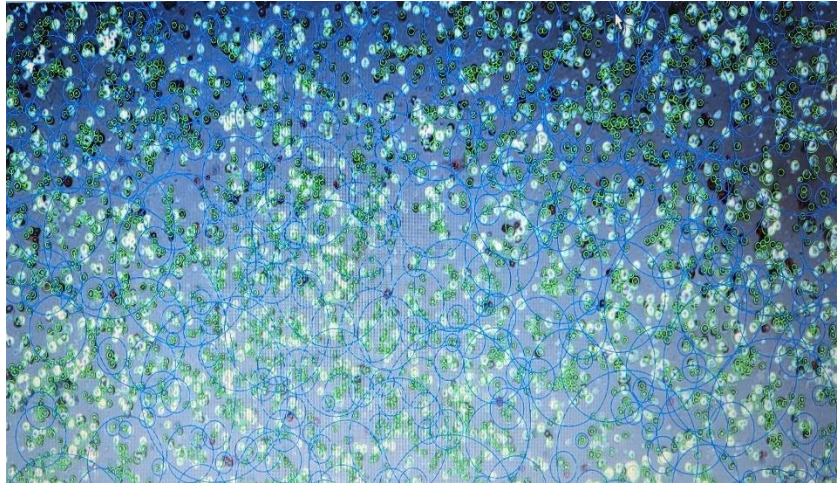
Üremekte olan hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücre tabakasının üzerindeki medyum steril serolojik pipet yardımıyla çekilmiş ve 37°C steril fosfat tamponu (dPBS) ile yıkanmıştır (25cm²’lik flask için 2ml) ve hemen ardından hücrelerin üzerinde kalan bu tampon da uzaklaştırılmıştır. Bu aşamadan sonra zemine yapışan hücreleri kaldırmak için, hücrelerin yüzeyini kaplayacak miktarda (%0,25 ml) tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilmiştir ve etüvde 5 dk bekletilmiştir. Hücrelerin kalkıp kalkmadığı mikroskopta kontrol edilmiştir ve hücre tabakası yüzeyden tamamen kalkınca flastaki tripsin-hücre solüsyonu 15 ml’lik bir falkon tüpe aktarılmıştır. Falkon tüpte bulunan tripsin-hücre karışımının üzerine, tripsini inkübe etmesi için karışımın iki katı kadar medyum eklenerek pipetaj yapılmıştır. Hücre süspansiyonu 130 g’de 5 dakika döndürüldükten sonra süpernatant kısmı atılmıştır ve pellet üzerine 1 ml katkılı medyum eklenerek pipetaj yapılmıştır. Daha sonra hücre sayımı ve canlılık oranları belirlenerek hücrelerin ne kadar seyreltilmesi gerektiğine ve ekim konsantrasyonuna karar verilmiştir. Karar verilen miktarda hücre, yeni flaska aktarılmıştır ve 37°C’ye ısıtılmış yeni katkılı medyum, hücrelerin üzerine eklenmiştir. Flask nazikçe sallanmıştır ve böylelikle hücrelerin eşit şekilde dağılması sağlanmıştır. Daha sonra hücreler inkübatöre yerleştirilmiştir. 2-3 günde bir hücreler %80 oranında konfluent oluncaya kadar medyum değiştirilerek inkübe edilmiştir. Deney için yeterli sayıda hücreye ulaşana kadar bu işlem tekrarlanmıştır.

3.2.4. Hücre Sayımı

Hücre sayımı için Cedex XS (Roche, Mannheim, Germany) cihazı kullanılmıştır. Hücreler 1:1 oranında hücre süspansiyonu / tripan mavisi boyası ile seyreltildikten sonra (10'ar μ L) cihazın özel lamı olan Smart slides (Roche, Mannheim, Germany) haznesine 20 μ L eklenmiştir, elde edilen boya karışımı örnek lam içinde Cedex XS hücre sayım cihazına yerleştirilmiştir ve sayım işlemi cihazın yazılımı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Sitotoksiteyi belirlemek amacıyla yapılacak olan MTT deneyi için yeterli hücre sayısını belirlemek amacıyla inkübatörde bekleyen flasklarda %80 yoğunluğa ulaşan hücreler tripsin-EDTA yardımıyla kültür ortamından kaldırılmıştır ve hücre sayımları yapılmıştır. 96'lık plate için kuyu başına ekilecek hücre sayısını belirlemek amacıyla yapılan literatür taramasının ardından, deney için uygun hücre sayısı, kuyu başına~30.000-35.000 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Cedex XS hücre sayım cihazı ve cedex smart slides (Roche, Mannheim, Germany).



Şekil 3.2. MCF-7 hücrelerinin Cedex XS hücre sayım cihazındaki görüntüsü.

3.2.5. Cryptotanshinone Stok Çözeltilisinin Hazırlanması

Cryptotanshinone'dan (CPT) uygun stok solüsyonlar hazırlanıncaya kadar +4⁰ C'de saklanmıştır. Deneye başlamadan önce Cryptotanshinone steril şartlar altında (DMSO) içerisinde çözülürerek (DMSO< %0,1) 5mM stok solüsyon hazırlanmıştır. Stok çözelti buzdolabında bir ay

kadar muhafaza edilebilmektedir. Deneyde kullanılacak uygun konsantrasyonlar stok solüsyonların katkılı medyum ile sulandırılması ile elde edilmiştir.

3.2.6. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) stok çözeltisinin hazırlanması

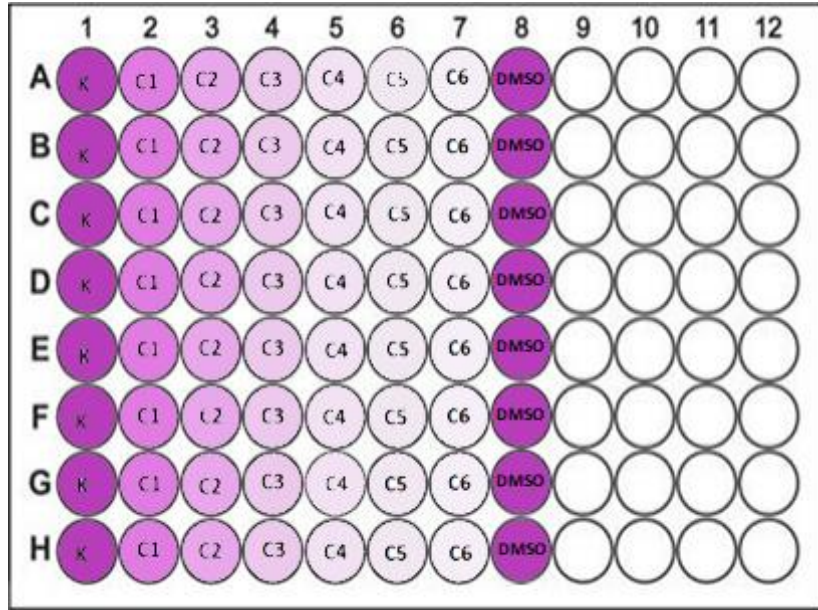
MTT boyası, uygun stok solüsyonlar hazırlanıncaya kadar +4⁰ C’de saklanmıştır. MTT boyasının ışığa hassasiyeti nedeniyle stok hazırlanırken ve sonraki deney aşamalarında da işlemler mümkün olduğunca karanlıkta yapılmıştır. MTT boyası steril PBS (phosphate buffered saline) içerisinde çözündürülerek 5mg/mL stok çözelti hazırlanmıştır ve ışığa maruz kalmaması için bulunduğu şişe folyo ile kaplanarak buzdolabında +4⁰C’de muhafaza edilmiştir. Deneyde kullanılacak uygun konsantrasyonlar stok solüsyonların katkılı medyum ile sulandırılması ile elde edilmiştir.

3.3. MTT testi

Tez çalışmasında yapılan MTT analizi hem dozların belirlenmesinde hem de sitotoksitenin değerlendirmesinde kullanılmıştır. Günümüzde en yaygın kullanılan hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksiste belirleme yöntemlerinin başında MTT testi gelmektedir. Yöntem esası şu şekildedir; MTT boyası yaşayan hücreler tarafından aktif bir şekilde absorbe edilir ve reaksiyon mitokondriyal dehidrogenaz tarafından katalizlenerek reaksiyon sonucunda mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazanlar oluşmaktadır. Oluşan formazanlar yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelere spesifik olduğu için, hücre canlılığının bir göstergesi olarak görülmektedir ve spektrofotometrik yolla belirlenen absorbans değerleri, yaşayan hücre sayısını göstermektedir (Çetin, 2019).

3.3.1. Deney Grupları

Doz belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda, Cryptotanshinone (CPT) için 1, 10, 20, 30, 40, 50 µM doz değerleri belirlenmiştir. Hücre sayımı için Cedex XS (Roche, Mannheim, Germany) cihazı kullanılmıştır. Çalışmamızda MTT deneyi için 2 flasktan (%100 üremiş) 6milyon hücre, 3 ayrı 96’lık kuyucuklu plate’e 200 µL medyum içerisinde ekilmiştir (kuyu başına 35 milyon). Ekim yapıldıktan sonra, 24 saat boyunca hücrelerin kuyucuk tabanlarına tutunması beklenmiştir. Şekil 3.3.’de sitotoksiste analizinde grupların 96’lık plate yerleşimi gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Sitotoksiste analizinde grupların 96'lık plate yerleşimi.

- | | |
|------------------------------|-----------------------------|
| 1. K: Kontrol (hücre+medyum) | 5. C4: 4. CPT dozu (30 µM) |
| 2. C1: 1. CPT dozu (1 µM) | 6. C5: 5. CPT dozu (40 µM) |
| 3. C2: 2. CPT dozu (10 µM) | 7. C6: 6. CPT dozu (50 µM) |
| 4. C3: 3. CPT dozu (20 µM) | 8. DMSO: pozitif DMSO grubu |

Çalışmaya DMSO grubu dahil edilmesinin nedeni, Cryptotanshinone maddesinin DMSO'da çözündürülerek hazırlanmasıdır ve DMSO'nun %0,1 oranından fazla miktarda hücrelere uygulanması durumunda hücreler için ayrıca bir sitotoksik durum gelişebilmektedir. Bu nedenle uyguladığımız DMSO miktarının hücreler için sitotoksik etkisinin olmadığı bu grupla gösterilmiştir.

MTT testi sonunda, CPT uygulaması yapılmayan (kontrol) grubun canlılığı %100 kabul edilerek, diğer gruplarla kıyaslama yapılmıştır.

3.3.2. Sitotoksiste Analizinin Uygulanması

96'lık platelere ekilip 24 saat üremeye bırakılan hücrelerin inkübasyon süresi sonunda steril şartlarda medyum içeriği dökülerek (kontrol ve DMSO grubu hariç), Şekil 3.3.'de gösterilen düzene göre sekiz tekrarlı olacak şekilde (n=8), belirlenen konsantrasyonlarda (1, 10, 20, 30, 40, 50 µM) CPT içeren besiyeri içerisinde (24 saat, 48 saat ve 72 saat) inkübe edilmiştir. Süre sonunda well plate içerikleri atılmıştır, her bir kuyucuğa 80 µL besiyeri ve önceden hazırlanan 5mg/mL MTT çözeltisinden 20'şer µL (toplamda 100'er µL) eklenmiştir (bu işlem MTT boyasının ışığa hassasiyeti nedeniyle mümkün olduğunca karanlıkta yapılmalıdır). 4 saat karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucukların içerikleri dökülmüştür, yerine 100'er µL DMSO eklenmiştir ve 490 nm'de ELİSA okuyucuda absorbans ölçümü yapılmıştır. Daha sonra hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitor konsantrasyonu (IC50) hesaplanmıştır (Çetin, 2019).

3.3.3. IC50 Değerinin Hesaplanması

IC50= $1 - (\text{kontrol ort.} - \text{örnek ort.}) / (\text{kontrol ort.}) \times 100$ formülünden hesaplanmıştır ve Excel programında sigmoidal bir eğride değerler yerine konarak ortalaması alınmıştır. Elde edilen kantitatif veriler kontrol grubu ve grupların konsantrasyon değerleri arasındaki değişimler kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

3.4. qRT-PCR Tekniği ile Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

3.4.1. RNA İzolasyonu

MTT analizinde elde edilen veriler ışığında, kontrol ve belirlenen 3 dozun (10, 20, 30 µM) konsantrasyonları uygulanmış meme kanseri hücre hattında total RNA'lar High Pure RNA izolasyon kiti (Roche Cat. No: 1828665) kullanılarak prosedüre göre izole edilmiştir. İşlem basamakları aşağıdaki gibidir.

1. Hücrelere CPT uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler tripsinle muamele edilerek toplanmıştır. Flasklardan toplanan hücreler Cedex cihazında sayılıp son konsantrasyonu 200 µl PBS içinde 1×10^6 hücre olacak şekilde 3 tekrarlı olarak ekim yapılmıştır.

2. Tampon içindeki hücrelerin iyice karışması sağlanmıştır. Üzerine 400 µl lysis buffer konarak vortekslenmiştir. Ardından spin atılıp ve üzerine 500 µl etanol eklenmiştir (etanol tespit etme amaçlı kullanılmaktadır).

3. Filtreli tüpler hazırlanmıştır ve eppendorf tüplerinden hücreyi almadan üst kısımdan max. 700 µl alınarak filtreli tüplere aktarılmıştır. 13,000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü boşaltılıp, filtreler aynı tüplere yerleştirilmiştir ve 15 sn 8000 g'de santrifüj edilmiştir.

4. Her bir örneğe 90 µl DNase inkübasyon tamponu + 10 µl DNase I eklenip 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

5. Filtreli tüplerin içerisine 500 µl wash buffer I konup 15 sn 8000 g'de çevrilmiştir. Daha sonra toplama tüpleri boşaltılıp filtreli tüpler bu toplama tüplerine aktarılmıştır.

6. Filtreli tüplerin içerisine 200 µl wash buffer II konup 2 dk 13,000 g'de çevrilmiştir. Toplama tüpler atılıp, filtreli tüpler kapaklı 1,5 ml lik eppendorf tüplere aktarılmıştır.

7. Her örneğe 50-100 µl elüsyon tampon eklenmiştir ve 1 dk 8000 g'de çevrilmiştir.

8. Elde edilen RNA'lar direkt RT-PCR da c-DNA ya çevrilmiştir veya elüsyon tamponu içindeki RNA'lar -80°C de saklanmıştır.

3.4.2. cDNA Sentezi Aşaması

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Thermo Cat. No: 4368814) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz RNA'ları komplementer DNA'ya çevirmek için kullanılmaktadır. Bu kitin çalışma prospektüsü aşağıda anlatıldığı gibidir. Kullanıma başlamadan önce bütün reaktifler ve RNA örnekleri erimeye bırakılmaktadır. Prosedüre başlamadan önce erimiş örnek ve reaktifler kısa bir spin yapılmaktadır (Bütün reaktifler ve RNA örnekleri buz üzerinde korunmalıdır).

Tablo 3.3. cDNA sentezinde kullanılan örnek ve reaktifler.

Madde	Miktar
10× RT Buffer	2 µL
25× dNTP Mix (100 mM)	0,8 µL
10× RT Random Primers	2 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µL
Nuclease-free H ₂ O	4,2 µL
Total RNA	10 µL
Total Hacim	20 µL

Bu karışım Thermal Cycler'da 25°C'de 10 dakika, 37°C de 120 dakika ve 85°C de 5 dakika bekletilmiştir ve böylece cDNA'lar elde edilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri analizi yapılmıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4. Thermal Cycler cihazı sıcaklık protokolü

3.4.3. Real-Time PCR Aşaması

Elde edilen cDNA örneklerinden Beta Actin Housekeeping Gen ve ANO1 hedef genlerinin ekspresyon analizi (Universal Probe Library, UPL) Realtime Revers Transkriptaz PCR ile Light Cyclers 480 Probes Master (Roche) kiti kullanılarak yapılmıştır. Bu aşamada gerekli malzemeler aşağıda listelenmiştir.

1. Lightcycler 480 II cihazı (Roche cat no: 05015278001)
2. Lightcycler 480 multiwell plate 96 (Roche cat no: 04729692001)
3. Lightcycler 480 sealing foil (Roche cat no: 04729757001)
4. Master Mix; TaqMan® Gene Expression Master Mix, (Thermo cat no: 4369016)
5. TaqMan® Gene Expression Assay, ANO1 Hs00216121_m1 (Thermo cat no:4453320)
6. TaqMan® Gene Expression Assay, ACTB Hs99999903_m1 (Thermo cat no:44453320)

Ekspresyon çalışması için izlenilen yöntemde Real-Time PCR için kullanılan karışım aşağıdaki gibidir.

-2.0 µL PCR için uygun saflıkta su

-10 µL Reaksiyon enzimi (Master Mix)

-1.0 µL Primer-probe karışımı (Taqman Assay)

-7 µL c-DNA

Real-Time PCR protokolünün aşamaları aşağıda belirtildiği gibi tamamlanmıştır.

1.İnkübasyon aşaması: 50°C’de 2 dakika UDG enziminin aktive olması için bekletilmiştir.

95°C’de 10 dakika AmpliTaq Gold, UP enziminin aktive olması için bekletilmiştir.

2.Amplifikasyon aşaması: 2 aşamada gerçekleştirilmiştir, aşağıdaki döngü 40 defa tekrarlanmıştır.

1.Basamak; 95°C’de 15 saniye DNA’nın çift iplikli yapıdan tek iplikli yapıya geçmesi (denatürasyon).

2.Basamak; 60°C’de 60 saniye, primerlerin bağlanması, DNA zincirinin uzaması (Anneal/ Extend).

3.Soğutma aşaması: 40°C’de 30 saniye bekletilmiştir.

Üretilen gen miktarları DNA erime eğrileri ile (melting curve) kıyaslanarak ölçülmüştür.

3.5. Patch Clamp (yara-kenetleme) Tekniği ile Elektrofizyolojik Kayıtlar

Patch clamp tekniği, özel bir mikroelettrot aracılığı ile hücrelere temas ederek, hücre membran potansiyelinin istenen değere sabitlenmesi ile membrandan geçen iyonik akım değişiminin ya da hücre membran potansiyel değişiminin kaydedildiği elektrobiyofiziksel bir ölçüm yöntemidir. Çalışmanın amacına göre; hücre üzerinde kayıt, tüm hücre kaydı, dışı dışarıda kayıt ve içi dışarıda kayıt olmak üzere dört farklı patch clamp uygulaması vardır (Ergün ve Dursun, 2018).

3.5.1. Hücre Kültürü Çalışması

Tez çalışmasında tüm hücre (whole cell) patch clamp kaydı, kültür içindeki bir hücre üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bu hassas yöntemde her seferinde tek hücreden kayıt alınmaya çalışıldığından ekim yapılan hücrelerin sayısı diğer yöntemlere kıyasla çok az olmaktadır. Petri kabına ekilen hücrelerin mümkün olduğu kadar tek yapışması gerekmektedir. Bunun için, hücreler 60 x 15 mm'lik petri kaplarına belirlenen yoğunlukta ekilmiştir ve çalışma gününe kadar inkübatörde katkılı medyum içerisinde bekletilmiştir.

3.5.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.5.2.1. Banyo Çözeltisinin Hazırlanması

Deneyde kullanılan banyo çözeltisi solüsyonu 1000 mL hacimde olacak şekilde hazırlanmıştır ve deney süresince +4°C'de muhafaza edilmiştir. Banyo çözeltisinin içeriği aşağıdaki gibidir.

- 140 mM NaCl
- 4 mM KCl
- 2mM CaCl₂
- 1 mM MgCl₂
- 10 mM glukoz
- 10 mM HEPES

3.5.2.2. Pipet Çözeltisi Hazırlanması

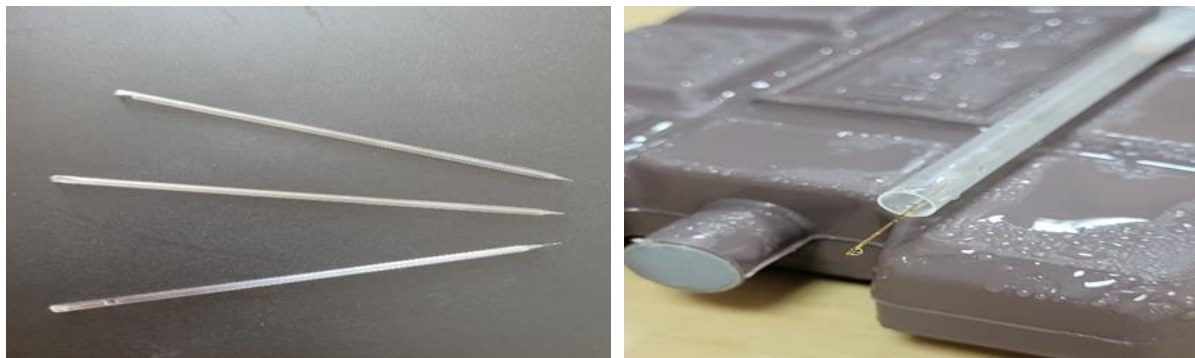
Deneyde kullanılan pipet çözeltisi solüsyonu aşağıda belirtilen içeriğe göre hazırlanmıştır ve deney süresince +4°C'de muhafaza edilmiştir.

- 146 mM CsCl
- 2 mM MgCl₂
- 5 mM EGTA (bu madde 1M NaOH çözeltisi içerisinde çözülerek hazırlandı)
- 8 mM HEPES

Bu çözelti belirtilen şekilde hazırlandıktan sonra N-Methyl-D-glucamine (NMDG) ile PH değeri 7,3'e ayarlanmıştır.

3.5.3. Pipetlerin Hazırlanması

Elektrofizyolojik kayıtların alınması için iç çapı 0,84 mm, dış çapı 1,5 mm ve duvar kalınlığı 0,66 mm ölçülerinde olan, World Precision Instruments firmasına (ABD) ait, 1B150F-4 model filamentli pipetler kullanılmıştır. Deneylerde pipetlerin kullanılabilir uzunluk ve şekilde olması için hız, sıcaklık ve basınç gibi değişkenleri programlanabilir, otomatik bir pipet çekici kullanılmıştır (P97 model, Sutter Instruments CO, ABD). Pipetler cihazda çekilerek uygun şekle dönüştürüldükten sonra içleri pipet çözeltisi ile doldurularak yama kenetleme sisteminde bulunan pipet tutucu kısmına takılarak deneye hazır hale getirilmiştir. Pipet çözeltisi deney sırasında buz aküsü üzerinde bekletilmiştir.



Şekil 3.5. Çalışmada kullanılan filamentli pipetler ve pipet çözeltisi enjektörü.

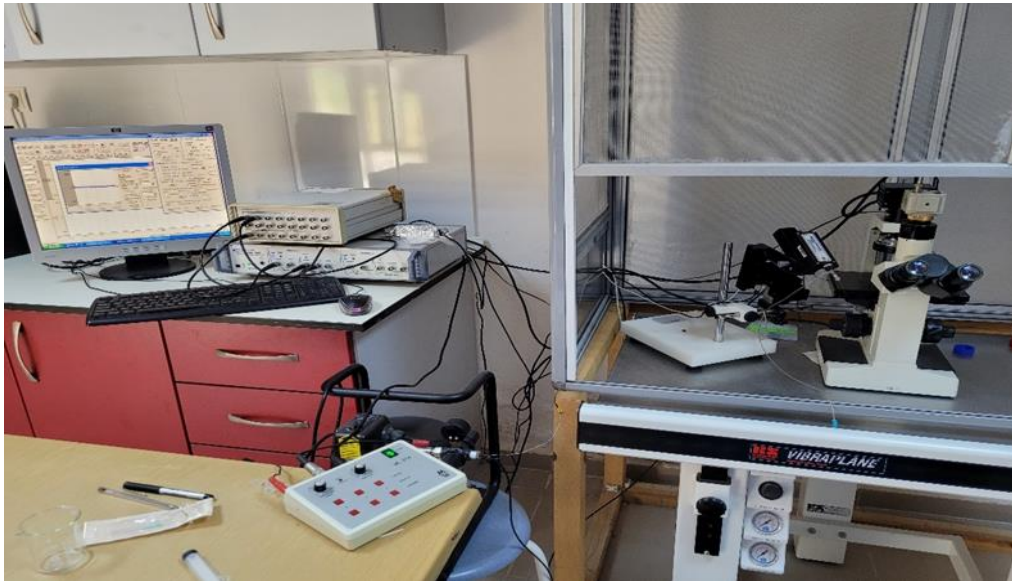
3.5.4. Deney Düzenegi

Hücre zarı belirli voltaj değerlerine kenetlenerek zarda oluşan akımlar kayıt alınmıştır. Kayıtlarda, iki kanallı olan bilgisayar kontrollü Multiclamp 700B (Axon Instruments, ABD) yama kenetleme yükselteci ve bununla uyumlu olan Digidata 1322A sayısal çevirici (Axon Instruments, ABD) kullanılmıştır. Multiclamp 700B yükselteci bilgisayardan MultiClamp 700B Commander (Axon Instruments, ABD) yazılımı ile yönlendirilmiştir. Uygun şekilde çekilmiş olan pipetler CV-7B (Axon Instruments, ABD) model gerilim takibi yapan bir operasyonel yükseltecin pipet tutucu kısmına takılarak Multiclamp 700B yükselteci ile bağlantısı yapılmıştır. Kayıt aşamasında hücre ile pipetin takibini yapabilmek için BM-37XB (U-Therm International (H. K.) Limited), invert mikroskop kullanılmıştır. Bilgisayarda bulunan Clampex 9.2 (Axon Instruments, ABD) yazılımı ile kenetleme direncinin takibi, hücre zarına gerilim protokolünün uygulaması ve akım kaydı yapılmıştır. Oluşan akım kayıtları Clampfit 10 (Axon Instruments, ABD) yazılımı ile analiz edilerek değerlendirilmiştir. Yapılan analizlerde sadece maksimum akım kayıtları değerlendirmeye alınmıştır.

Deney protokolü aşağıda yazıldığı şekildedir.

1. Hücre membranı mikroelettrotların uçları temas ederken bir negatif basınç uygulanarak giga seal oluşturulmaktadır ve sonrasında basınç sistemiyle sürekli vakum uygulanarak hücre membranının yırtılması sağlanmaktadır.
 2. Daha sonra mikroelettrot ile hücre sitoplazması arasında elektriksel açıdan düşük direçli bir bağlantı kurularak, mikroelettrot ile hücre sitoplazması arasında dengeye ulaşılan kadar, mikroelettrot içerisinde bulunan intrasellüler ortam solüsyonu ile hücre sitoplazması arasında madde transportu yapılmaktadır.
 3. Bu durumda mikroelettrot hücre içi ile direkt temastadır ve mikroelettrot doğrudan hücre sitoplazmasının potansiyel değişimlerini ölçmektedir.
 4. Alınan kayıttan, hücre membranı yırtıldıktan sonra hücre içine girer girmez mikroelettrot potansiyeli ile hücre içi potansiyel eşitleneceği için hücre içine girmeden önce mikroelettrot potansiyelini istirahat membran potansiyeline kenetleme aşaması sağlanmalıdır.
 5. Sonuç olarak hücrede voltaj sabit bir değere kenetlendiği zaman, küçük bir depolarizasyon oluşturularak hücre membranından geçen iyonik akım ölçülebilmektedir (Sucher vd., 2000).
- Tüm hücre kayıt yöntemi ile yapılan kayıt, bir hücrenin tüm kanallarının verdiği cevabı göstermektedir. Mikroelettrot hücre membranını yırtmıştır, fakat mikroelettrot ve hücre hala temas halinde olduğu için kayıt sırasında hücre içi organeller ile iyon kanalları etkileşimi devam etmektedir.

Bu yöntem, küçük hücrelerden (5-20 μM) akım ya da potansiyel değişimi kaydetmek için kullanılan en uygun patch clamp yöntemi olarak tanımlanmaktadır. Bu çeşit tüm hücre kaydı, hücre membranındaki tüm Ca^{2+} kanallarının davranışlarını incelemeye ve iyon kanalı aktivatörlerinin, blokerlerinin ve ikinci habercilerin araştırılması amacıyla tercih edilmektedir (Quinn ve Beech, 1998).



Şekil 3.6. Patch clamp kayıt düzeneği ve ortamı.

3.5.5. Kenetleme Protokolü

MCF-7 hücrelerinin zarlarından geçen maksimum akım kayıtlarını alabilmek için hücrelere uygulanan voltaj kenetleme protokolü aşağıda belirtildiği gibidir.

- Kenetleme potansiyeli -40 milivolt (mV) ve başlangıç potansiyeli -100 mV olacak şekilde belirlenmiştir.
- Komut potansiyeli her bir uygulamada ilk 20 milisaniye (ms)'de -100 mV'da sabit tutularak, sonraki 20 ms'de -40 mV'dan başlayarak, 10 mV'luk artışlarla +100 mV'a kadar ulaşılmıştır.
- 0. dakika kontrol olarak kabul edilmiştir ve hemen ardından ilaç uygulaması yapılarak, her doz grubu için (10 μ M, 20 μ M ve 30 μ M) en az 6 kez olmak üzere 15. dakika sonunda kayıtlar alınmaya başlanmıştır.
- Kayıtlarda sadece mühürleme direnci 1-10 G Ω aralığında olan hücre kayıtları değerlendirmeye alınmıştır.

3.6. İstatistiksel Analizler

Tüm deneylere ait verilerin analizlerinde SPSS 11.5 paket programı kullanılmıştır.

3.6.1. MTT Veri Analizi

24, 48 ve 72 saat arasındaki oluşan farklılığı belirlemek için gruplar hem kendi içinde hem birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Normallik kontrolleri Shapiro Wilk testi ile test edilmiştir. Gruplar arası farklılığı belirlemek için varyans analizi kullanılmıştır. Varyans analizinde varyansların homojenliği kontrolleri Levene testi ile test edilmiştir. Varyansların homojen olduğu belirlenmiştir. Gruplar arası farklılığı belirlemek için One Way ANOVA testi yapılmıştır. İstatistik anlamlılık olarak $p < 0.05$ alınmıştır.

Dozlar arasında oluşan farklılığı belirlemek için, gruplar hem kendi içinde hem birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Normallik kontrolleri Shapiro Wilk testi ile test edilmiştir ve bütün grupların normal dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Gruplar arası farklılığı belirlemek için varyans analizi kullanılmıştır. Varyans analizinde varyansların homojenliği kontrolleri Levene testi ile test edilmiştir. Homojen olan gruplarda One Way ANOVA ile homojen olmayan gruplarda Welch testi kullanılmıştır. İstatistik anlamlılık olarak $p < 0.05$ alınmıştır.

3.6.2. Eş Zamanlı PCR Verilerinin Analizi

RT-PCR verilerinin normallik kontrolleri Shapiro Wilk testi ile test edilmiştir ve normal dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Gruplar arası farklılığı belirlemek için varyans analizi kullanılmıştır. Varyans analizinde varyansların homojenliği kontrolleri Levene testi ile test edilmiştir. Varyansların homojen olduğu durumlarda One-Way Anova, olmadığı durumlarda ise Welch testi kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler, ortalama (ort.) ve standart sapma (ss.) değerleri olarak verilmiştir. İstatistik anlamlılık olarak $p < 0.05$ olarak alınmıştır.

3.6.3. Elektrofizyolojik Kayıtların Analizi

Yama kenetleme verilerine ait istatistiksel analizlerde gruplar arası farklılıklar incelenmiştir. Sürekli ölçümlere ait normallik kontrolleri Shapiro Wilks testi ile test edilmiştir ve normal dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Gruplar arası farklılığı belirlemek için varyans analizi kullanılmıştır. Varyans analizinde varyansların homojenliği kontrolleri Levene testi ile test edilmiştir. Varyansların homojen olmadığı belirlenmiştir. Grupların arası farklılıklar Welch testi ile belirlenmiştir. Tanımlayıcı istatistikler, ort. ve ss. değerleri olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık olarak $p < 0.05$ alınmıştır.

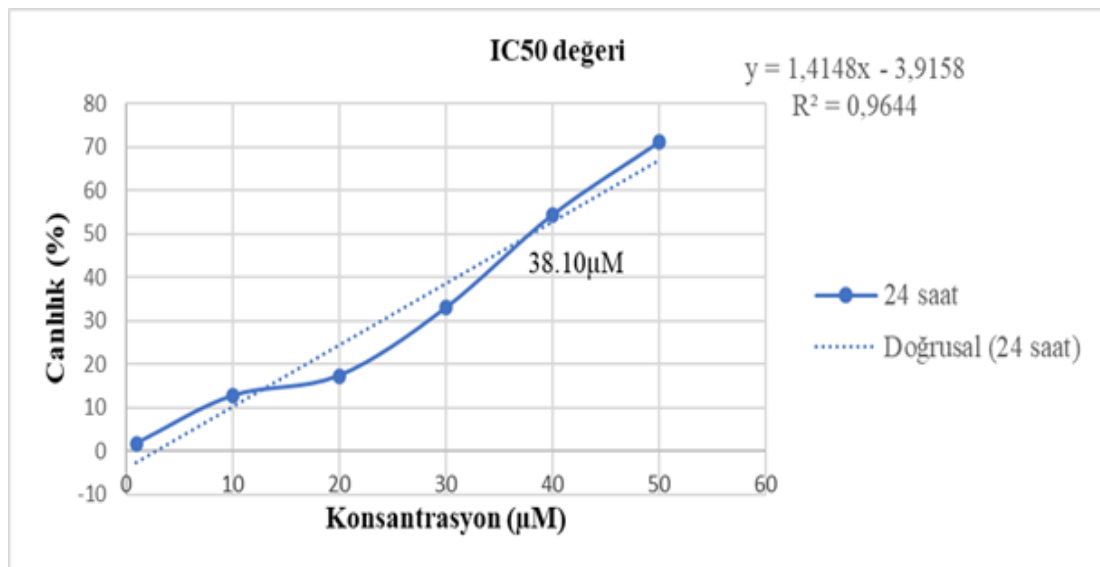
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

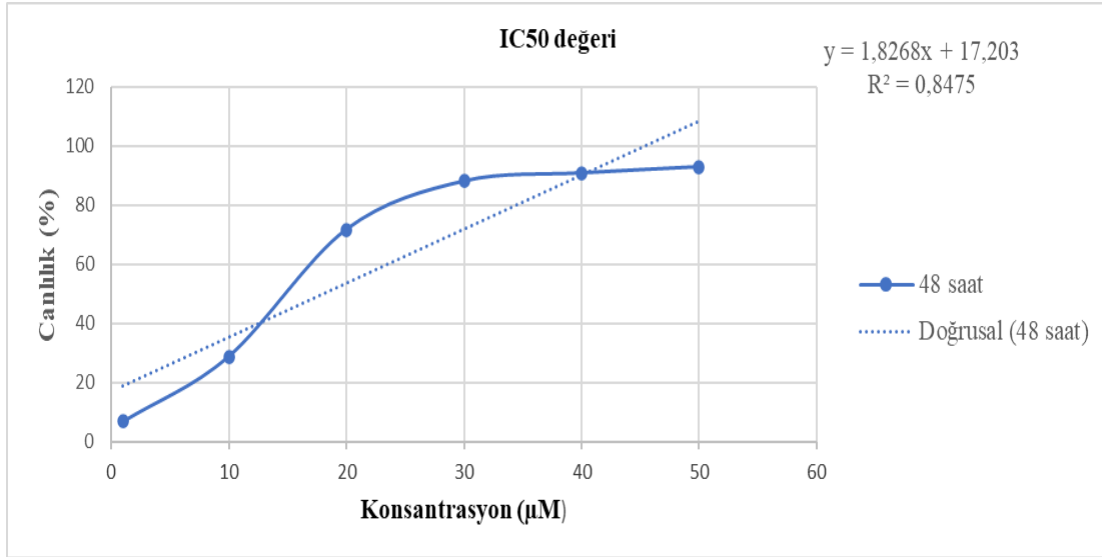
4.1.1. MTT Analizi Bulguları

MTT analizi ile Cryptotanshinone'un IC₅₀ (hücrelerin %50'sini öldüren inhibitör konsantrasyon) değerini bulmak için öncelikle seçilen 1, 10, 20, 30, 40, 50 µM doz örnekleriyle 24, 48 ve 72. saat ölçümlerinden elde edilen absorbans değerleriyle doz-yanıt eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 4.1., 4.2. ve 4.3.).

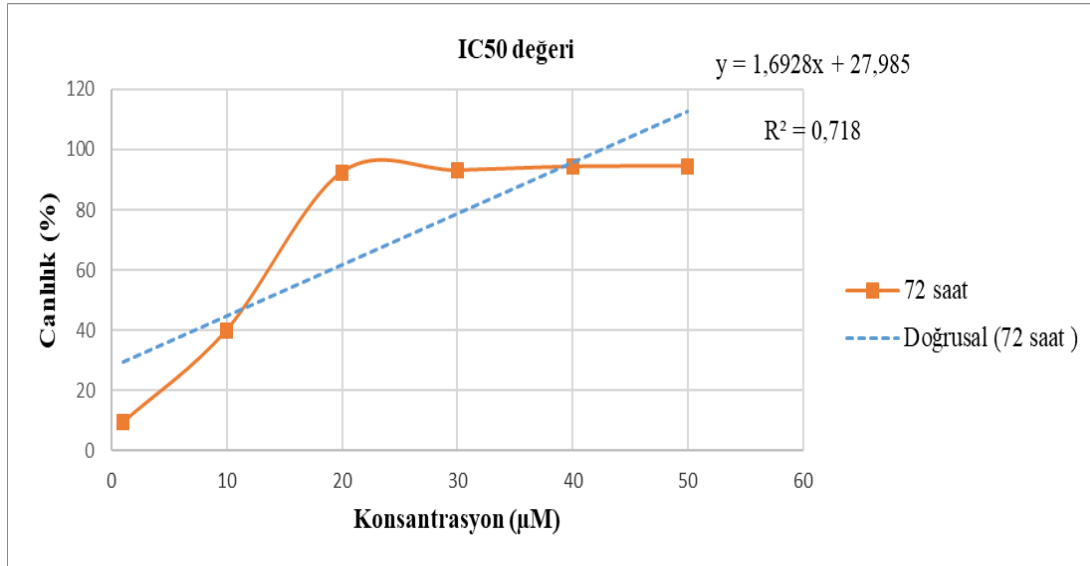
IC₅₀= 1- (*kontrol ort.* - *Örnek ort.*) / (*kontrol ort.*) × 100 formülünden hesaplanmıştır ve sigmoidal eğrisi çıkartılmıştır. Elde edilen kantitatif veriler kontrol grubu ve diğer grupların absorbans değerleri arasındaki değişimler kıyaslanarak değerlendirilmiştir. 24, 48 ve 72. saatlerin ortalaması alınarak 23,01 µM değerinde bir IC₅₀ değeri elde edilmiştir (Şekil 4.4.).



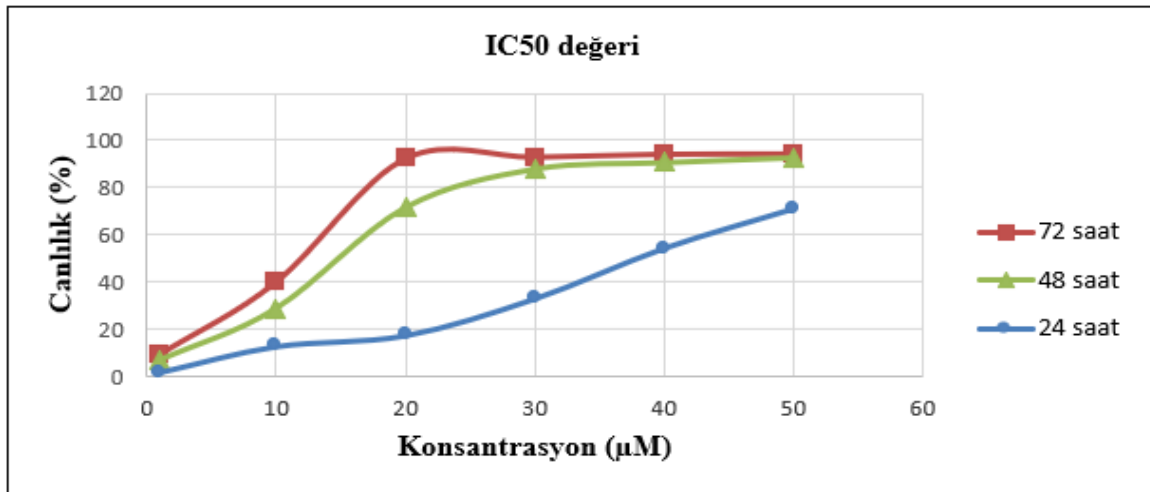
Şekil 4.1. 24 saat sonunda IC₅₀ değerinin hesabı için elde edilen doz yanıt eğrisi.



Şekil 4.2. 48 saat sonunda IC50 değerinin hesabı için elde edilen doz yanıt eğrisi.



Şekil 4.3. 72 saat sonunda IC50 değerinin hesabı için elde edilen doz yanıt eğrisi.



Şekil 4.4. IC50 ortalama (24,48,72,) doz yanıt eğrisi.

MCF-7 hücreleri üzerinde Cryptotanshinone dozlarını belirlemek amacıyla uygulanan 24, 48 ve 72. saatler için ayrı ayrı ortalama, standart sapma, en yüksek ve en düşük absorbans değerleri Tablo 4.1., 4.2. ve 4.3.'de gösterildiği gibidir. Sitotoksisteyi değerlendirebilmek için canlı hücre sayısı ile orantılı olan absorbans değerleri 24, 48 ve 72. saat maruziyetlerine göre ölçülmüştür ve veriler ort. $\pm$ ss. şeklinde değerlendirilmiştir.

Buna göre, 24 saat maruziyet için, inhibitör/ilaç uygulanmayan kontrol grubunda absorbans değeri $1,73 \pm 0,05$ olarak elde edilirken, $1\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $1,70 \pm 0,06$, $10\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $1,51 \pm 0,06$, $20\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $1,43 \pm 0,03$, $30\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $1,16 \pm 0,06$, $40\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $0,79 \pm 0,04$, $50\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $0,50 \pm 0,07$ olarak bulunmuştur. Bu verilere göre, 24. saatteki absorbans verileri göz önüne alındığında, kontrole göre Cryptotanshinone dozu arttıkça hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir.

Tablo 4.1. 24 saat ortalama ve standart sapma değerleri (490nm).

Gruplar (n=4)	En düşük değer	En yüksek değer	Ortalama $\pm$ standart sapma
Kontrol	1,46	1,91	$1,73 \pm 0,05$
$1\mu\text{M}$	1,60	1,82	$1,70 \pm 0,06$
$10\mu\text{M}$	1,34	1,61	$1,51 \pm 0,06$
$20\mu\text{M}$	1,36	1,48	$1,43 \pm 0,03$
$30\mu\text{M}$	1,02	1,28	$1,16 \pm 0,06$
$40\mu\text{M}$	0,71	0,89	$0,79 \pm 0,04$
$50\mu\text{M}$	0,30	0,65	$0,50 \pm 0,07$

48 saat maruziyet için, inhibitör/ilaç uygulanmayan kontrol grubunda absorbans değeri $1,64 \pm 0,16$ olarak elde edilirken, $1\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $1,53 \pm 0,03$, $10\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $1,18 \pm 0,01$, $20\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $0,47 \pm 0,02$, $30\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $0,20 \pm 0,05$, $40\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $0,15 \pm 0,01$, $50\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $0,12 \pm 0,01$ olarak bulunmuştur. Buna göre 48. saat absorbans verileri göz önüne alındığında, kontrole göre Cryptotanshinone dozu arttıkça hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir.

Tablo 4.2. 48 saat ortalama ve standart sapma değerleri (490nm).

Gruplar (n=4)	En düşük değer	En yüksek değer	Ortalama $\pm$ standart sapma
Kontrol	1,35	2,08	$1,64 \pm 0,16$
$1\mu\text{M}$	1,43	1,61	$1,53 \pm 0,03$
$10\mu\text{M}$	1,12	1,24	$1,18 \pm 0,01$
$20\mu\text{M}$	0,44	0,48	$0,47 \pm 0,02$
$30\mu\text{M}$	0,16	0,26	$0,20 \pm 0,05$
$40\mu\text{M}$	0,15	0,16	$0,15 \pm 0,01$
$50\mu\text{M}$	0,11	0,13	$0,12 \pm 0,01$

72 saat maruziyet için, inhibitör/ilaç uygulanmayan kontrol grubunda absorbans değeri $1,20 \pm 0,01$ olarak elde edilirken, $1\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $1,09 \pm 0,02$, $10\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $0,72 \pm 0,01$, $20\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $0,09 \pm 0,01$, $30\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $0,08 \pm 0,01$, $40\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $0,07 \pm 0,01$, $50\mu\text{M}$ 'lık doz grubunda $0,07 \pm 0,01$ olarak bulunmuştur.

Tablo 4.3. 72 saat ortalama ve standart sapma değerleri (490nm).

Gruplar (n=4)	En düşük değer	En yüksek değer	Ortalama±standart sapma
Kontrol	1,02	1,41	1,20±0,01
1µM	1,05	1,12	1,09±0,02
10µM	0,69	0,77	0,72±0,01
20µM	0,08	0,10	0,09±0,01
30µM	0,07	0,09	0,08±0,01
40µM	0,07	0,07	0,07±0,01
50µM	0,07	0,07	0,07±0,01

MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine inhibitör uygulama süreleri arasındaki ortalama, standart sapma, en yüksek ve en düşük absorbans değerleri Tablo 4.4.'te gösterildiği gibidir. Hücreler üzerine 24, 48 ve 72 saat inhibitör uygulamasından sonra, absorbans (ortalama±standart sapma) değerleri kendi aralarında karşılaştırılmıştır.

Uygulama sürelerine göre 24, 48 ve 72. saatler arasındaki farklılığı belirlemek için gruplar hem kendi içinde hem birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Gruplar arası farklılığı belirlemek için varyans analizi kullanılmıştır. Yapılan analizlerde grupların absorbans değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Maruziyet süresine bağlı olarak 24. saat grubunda, özellikle 30 µM'dan, 48. saat grubunda 20 µM'dan ve 72. saat grubunda 20 µM'dan yüksek olan dozlarda grupların absorbans değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. Uygulama sürelerine göre 24, 48 ve 72. saatlerde absorbans değerlerindeki düşüş oranları birbiri ile kıyaslandığında, hücre canlılığının zamana bağlı olarak azaldığı görülmektedir.

Tablo 4.4. Uygulama süresine göre 24, 48 ve 72 saat absorbans (ortalama±standart sapma) değerleri*.

Gruplar	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	1,73±0,21 ^a	1,64±0,32 ^a	1,70±0,17 ^a
1 µmol	1,70±0,11 ^a	1,53±0,09 ^a	1,09±0,03 ^b
10 µmol	1,51±0,12 ^a	1,18±0,06 ^{ab}	0,72±0,03 ^{abc}
20 µmol	1,43±0,05 ^a	0,47±0,02 ^{ab}	0,09±0,01 ^{abc}
30 µmol	1,16±0,12 ^a	0,20±0,05 ^{ab}	0,08±0,01 ^{abc}
40 µmol	0,79±0,08 ^a	0,15±0,01 ^{ab}	0,07±0,01 ^{abc}
50 µmol	0,50±0,15 ^a	0,12±0,01 ^{ab}	0,07±0,01 ^{abc}

Aynı satırda farklı üst karaktere sahip ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$) * n=4.

Dozlar arasındaki ortalama, standart sapma, en yüksek ve en düşük absorbans değerleri Tablo 4.5.'de gösterildiği gibidir. Doz grupları arasındaki farklılığı belirlemek için gruplar hem kendi içinde hem birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Gruplar arası farklılığı belirlemek için varyans analizi kullanılmıştır. Kontrol grubuna göre tüm doz gruplarında, absorbans değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Özellikle hücrelere 20 µM doz uygulandığında 24. saate absorbans değeri 1,43±0,05 olarak ölçülürken 48. saatte 0,47±0,02 ve 72. saatte 0,09±0,01 olarak ölçülmüş ve absorbans değerinin düştüğü belirlenmiştir. Buna göre 24, 48 ve 72. saatler ve her birinin doz grupları birbiriyle kıyaslandığında, en düşük hücre canlılığına 72. saat sonunda ulaşılırken, tüm saatlerde hücre canlılığı doza bağlı olarak azalma göstermektedir. 48 ve 72. saatlerde hücreler üzerindeki en yüksek

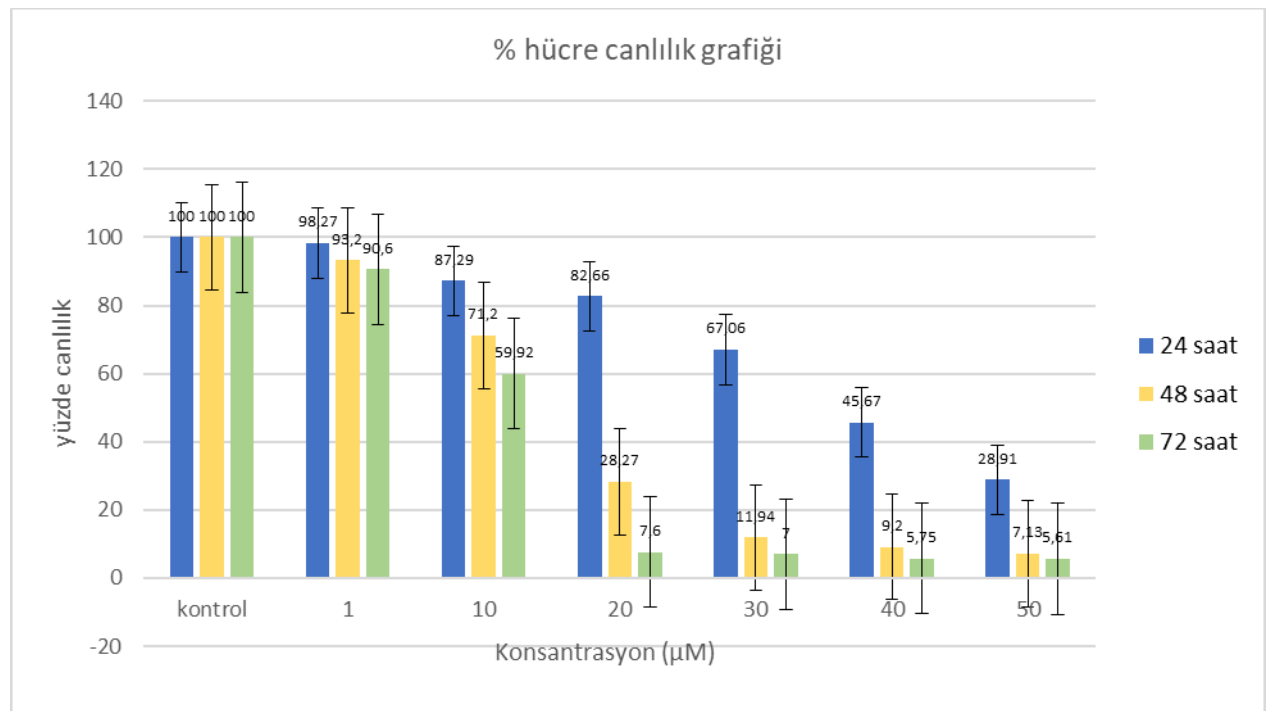
sitotoksik etkiyi yapan dozların 20-30 μM olduğu, 40-50 μM dozlarında sitotoksik etkinin artmaya devam ettiği ancak çok belirgin bir artış olmadığı gözlenmiştir. Bu durumun nedeninin, maksimum sitotoksik etkiye ulaşılmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu verilerden çıkan sonuçları daha iyi anlamak için Tablo 4.5.'e bakınız.

Tablo 4.4. Uygulama süresine göre 24, 48 ve 72 saat absorbans (ortalama $\pm$ standart sapma) değerleri*.

Gruplar	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	1,73 $\pm$ 0,21	1,64 $\pm$ 0,32	1,70 $\pm$ 0,17
1 μmol	1,70 $\pm$ 0,11	1,53 $\pm$ 0,09	1,09 $\pm$ 0,03
10 μmol	1,51 $\pm$ 0,12	1,18 $\pm$ 0,06	0,72 $\pm$ 0,03 ^c
20 μmol	1,43 $\pm$ 0,05 ^a	0,47 $\pm$ 0,02 ^b	0,09 $\pm$ 0,01 ^c
30 μmol	1,16 $\pm$ 0,12 ^a	0,20 $\pm$ 0,05 ^b	0,08 $\pm$ 0,01 ^c
40 μmol	0,79 $\pm$ 0,08 ^a	0,15 $\pm$ 0,01 ^b	0,07 $\pm$ 0,01 ^c
50 μmol	0,50 $\pm$ 0,15 ^a	0,12 $\pm$ 0,01 ^b	0,07 $\pm$ 0,01 ^c

Aynı sütunda farklı üst karaktere sahip ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$) * $n=4$
a: 24 saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$, b: 48 saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$,
a: 72 saat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$,

Aşağıdaki grafikte, belirlenen konsantrasyonlarda CPT uygulanan MCF-7 hücrelerinin 24, 48 ve 72. saatler sonunda elde edilen verilere göre, CPT'nin hücrelerdeki sitotoksik etkisi % canlılık grafiği şeklinde gösterilmektedir.



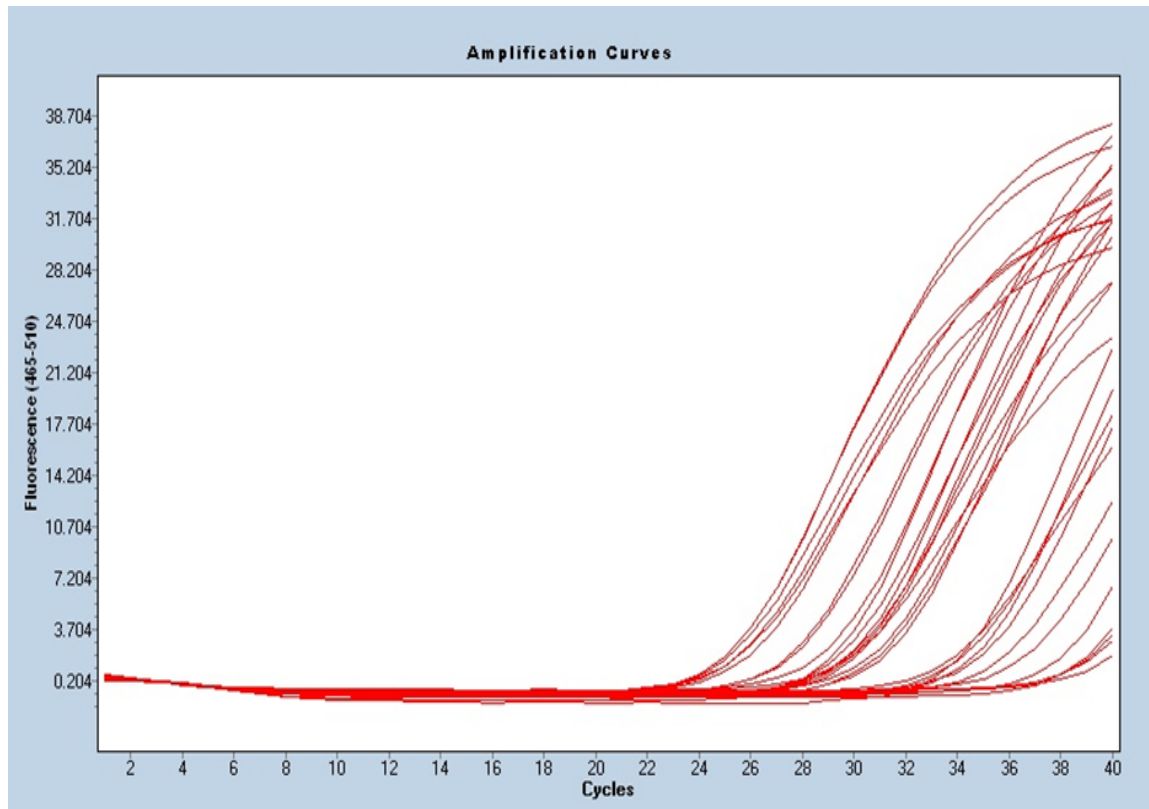
Şekil 4.5. Doza ve uygulama süresine bağlı % canlılık grafiği.

Grafikten de anlaşıldığı gibi Cryptotanshinone, MCF-7 hücrelerinde, 20 μM doz grubunda 24. saatte %17,34 oranında düşük bir sitotoksik etkiye sahipken, 48. saatte %71,73 ve 72. saatte %92,4 oranında yüksek bir sitotoksik etki göstermiştir. 30 μM doz grubunda 24. saatte bu oran %32,94'e

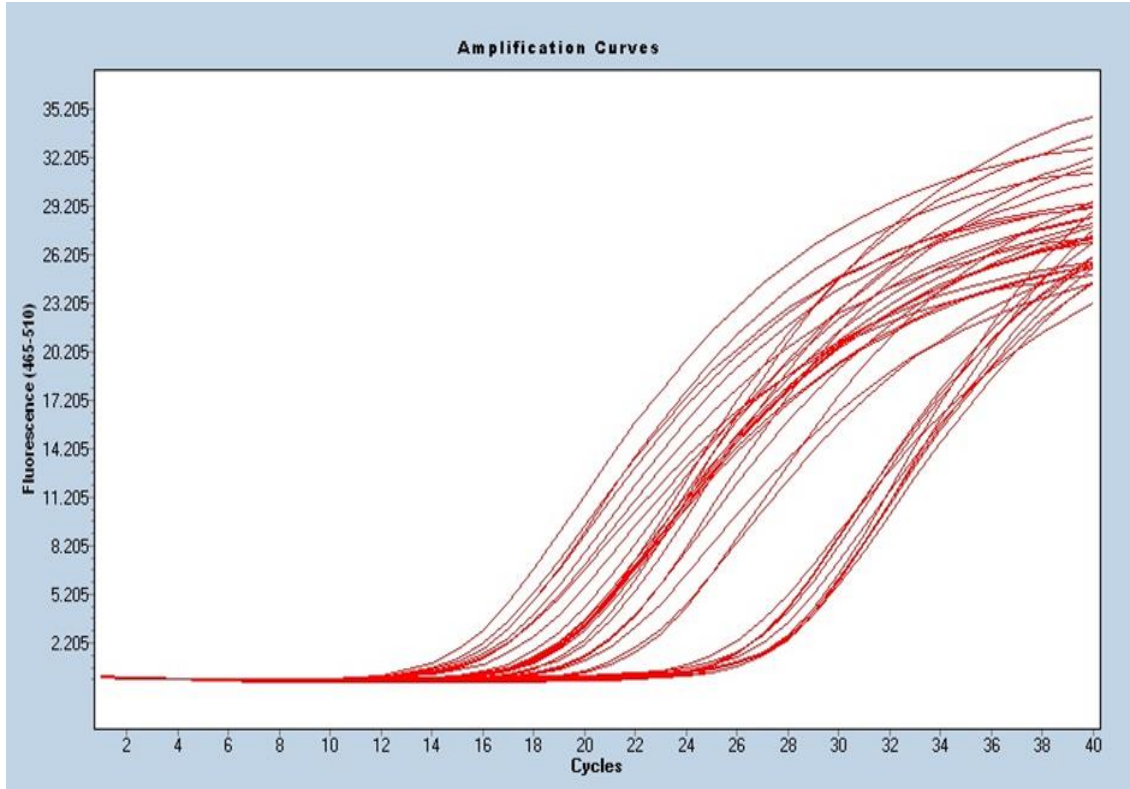
yükselirken, 48 ve 72. saatlerde sırayla %88,06 ve %93'e yükselmiştir. 40 ve 50 μ M doz gruplarına bakıldığında 48 ve 72. saatlerde maksimum sitotoksik etkiye ulaşıldığından, sitotoksik etki hemen hemen aynı kalmış, daha fazla artış göstermemiştir. 24. saat için en yüksek sitotoksik etkiye 50 μ M doz grubunda %71,09 oranıyla ulaşılmıştır. Tüm bu veriler ışığında, bu çalışmada, Cryptotanshinone'un doza ve zamana bağlı olarak, meme kanseri hücreleri üzerinde belirgin bir sitotoksik etkisinin olduğu anlaşılmıştır.

4.1.2. q-RT PCR Analizi Bulguları

Gen ekspresyon analizinde kontrol, 10 μ M, 20 μ M ve 30 μ M olmak üzere dört grup kullanılarak MCF-7 hücre hattında CPT'nin TMEM16A (ANO1) kanal geninin ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Referans gen (ACT β) ve ANO1 geni için elde edilen amplifikasyon eğrileri Şekil 4.8. ve 4.9.'de gösterilmektedir. Verilerin analizinde SPSS programı kullanılmıştır. Varyansların homojen olduğu durumlarda One-Way Anova olmadığı durumlarda ise Welch testi kullanılarak gruplar arası farklılıklar belirlenmiştir.



Şekil 4.6. ANO1 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.



Şekil 4.7. ACT β (kontrol) geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.

Gen ifadesi düzeylerinde doz ve zamanlara göre değerlendirme yapılmıştır. Kontrol genine göre 24. saate ait veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p < 0,05$), 48 ve 72. saat verileri istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p > 0,05$). Dozlar birbiriyle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p = 0,69 > 0,05$). Bu değerlere ait tanımlayıcı istatistikler ve p değerleri Tablo 4.6.'da gösterildiği gibidir.

Tablo 4.6. MCF-7 hücre hattında ANO1 geni için 24,48 ve 72. saatler sonunda gen ekspresyonu oran değerleri. Sonuçlar ort. $\pm$ ss. olarak verilmiştir.

Gruplar	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	1,00 $\pm$ 0,03	2,13 $\pm$ 1,18	2,61 $\pm$ 2,51
10 μ M	0,35 $\pm$ 0,07 ^a	0,77 $\pm$ 0,05	1,96 $\pm$ 0,48
20 μ M	0,29 $\pm$ 0,06 ^a	0,15 $\pm$ 0,05	2,77 $\pm$ 1,10
30 μ M	0,17 $\pm$ 0,03 ^a	2,83 $\pm$ 2,75	1,51 $\pm$ 0,9

Aynı sütunda farklı üst karaktere sahip ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)

*n=4, a: 24 saatteki kontrol grubuna göre farklılığı temsil etmektedir.

24. saate ait veriler için, kontrole göre değerlendirme yapıldığında ANO1 geninin ekspresyon düzeyinin 10 μ M doz grubunda %65 oranında azaldığı, 20 μ M doz grubunda %71 oranında azaldığı ve 30 μ M doz grubunda %83 oranında azaldığı görülmektedir. Diğer dozlar birbiriyle kıyaslandığında anlamlı bir farklılık bulunmasa da, kontrole göre kıyaslandığında, CPT'nin özellikle 48. saate 10 ve 20 μ M doz gruplarında ANO1 geninin ekspresyonunu azalttığı görülmektedir. Bu verilere dayanarak, 24. saate Cryptotanshinone'un ANO1 geninin ekspresyonunu doza bağlı olarak geciktirdiği/azalttığı görülmektedir.

4.1.3. Patch Clamp Analizine Ait Elektrofizyolojik Bulgular

Elektrofizyolojik kayıtların analizinde; kontrol, 10 μ M, 20 μ M ve 30 μ M olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur. Oluşturulan bu gruplar arasındaki farklılıklar incelenmiştir. Sürekli ölçümlere ait normalite kontrolleri Shapiro Wilks testi ile test edilmiştir ve normal dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Gruplar arası farklılığı belirlemek için varyans analizi kullanılmıştır. Varyans analizinde, varyansların homojenliği kontrolleri Levene testi ile test edilmiştir. Varyansların homojen olmadığı belirlenmiştir. Grupların arası farklılıklar Welch testi ile belirlenmiştir. Tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama (ort.) ve standart sapma (ss.) değerleri verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık olarak $p < 0,05$ alınmıştır.

CPT'nin TMEM16A (ANO1) kanalında bir blokaj yapıp yapmadığını değerlendirmek amacıyla yapılan istatistik analizler sonucunda, yama-kenetleme deneylerinde elde edilen maksimum akım değerleri (pA) Tablo 4.7.'de gösterildiği gibidir (Sonuçlar ort. $\pm$ ss. olarak verilmiştir). Tüm doz grupları için akım kayıtları, başlangıçta ilaç uygulanmadan hemen önce 0. dakika kontrol olarak ve her doz için ilaç uygulandıktan sonra 15. dakikada maksimum akımlar olacak şekilde her bir hücreden en az 5 defa kayıt alınmıştır. Buna göre, kontrol grubunda ölçülen maksimum akım değerlerinin ortalaması $216,7875 \pm 57,85675$ pA iken, en düşük doz olan 10 μ M doz grubunda maksimum akım değerlerinin ortalaması $102,9190 \pm 26,18077$ pA, 20 μ M doz grubunda maksimum akım değerlerinin ortalaması $43,4090 \pm 21,06937$ pA ve en yüksek doz olan 30 μ M doz grubunda maksimum akım değerlerinin ortalaması $6,3138 \pm 1,66446$ pA olarak ölçülmüştür.

Elde edilen bu verilere göre kontrol kaydıyla kıyaslandığında doza bağlı olarak, ölçülen akımların azaldığı görülmektedir. Ancak, dozlar kendi arasında kıyaslandığında 10 μ M CPT uygulanan doz grubunda ölçülen akım değeri kontrole göre azalsa da anlamlı bir fark göstermemiştir. 20 μ M CPT uygulanan grupta ölçülen akım değerinde de düşüş gözlenmiştir ancak, yine kontrole göre anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. En yüksek inhibisyonun $6,3138 \pm 1,66446$ akım değeriyle, 30 μ M CPT uygulanan grupta olduğu belirlenmiştir ve bu değer kontrole göre anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo 4.7. Yama-kenetleme deneylerinde elde edilen maksimum akım değerleri (pA). Sonuçlar ort. $\pm$ ss. olarak verilmiştir.

Gruplar	Maksimum akım değeri (pA) ort. $\pm$ std. sp
Kontrol	$216,7 \pm 57,85^{c,d}$
10 μ M	$102,9 \pm 26,18^c$
20 μ M	$43,40 \pm 21,06^a$
30 μ M	$6,31 \pm 1,66^a$

Aynı sütunda farklı üst karaktere sahip ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$).

a: Kontrol grubuna göre farklılığı; b: 10 μ M'a göre farklılığı; c: 20 μ M'a göre farklılığı; d: 30 μ M'a göre farklılığı ifade etmektedir.

Tabloda grupların maksimum akım değerlerinin (pA) ortalamaları birbiri ile karşılaştırıldığında; doza bağlı olarak ölçülen akım değerlerinde azalma olmuştur ancak kontrol

kayıtlarıyla kıyaslandığında 30 μ M doz grubu istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p<0,05$). Yani dozlar arasında TMEM16A kanalını en yüksek miktarda inhibe eden grup, 30 μ M doz grubu olarak belirlenmiştir. Diğer iki doz grubunda da inhibisyon gözlenmektedir ancak, kontrolle kıyaslandığında büyük bir fark oluşturmamıştır. Bu veriler göz önüne alındığında, Cryptotanshinone'un doza bağlı olarak TMEM16A kanalından geçen akımlarda inhibitör etkisinin olduğu gözlemlenmektedir.

4.2. Tartışma

Çağımızın en kötü hastalıklarından biri olan kanser, teşhis ve tedavilerdeki olumlu gelişmelere rağmen, toplum için hala en büyük sağlık problemlerinden biri olmaya devam etmektedir. Meme kanseri ise özellikle kadınlarda en yaygın kanser türleri arasında olup, kanserden ölümlerde diğer kanser türlerine göre ilk sıralarda yer almaktadır. Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde, meme kanseri dünya çapında en ağır külfetli kanserlerden biri olarak nitelendirilmesine sebep olan insidans ve mortalite ile sürekli artmaya devam etmektedir (Mubarik vd., 2022).

Kanser tedavisinde en yaygın kullanılan yöntemler; kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlerdir. Bunların dışında aşilar, biyolojik ve hormonal tedaviler ile hedeflenmiş gen terapisi gibi yöntemler de uygulanmaktadır. Ayrıca birçok yöntem ve ilaç olabilecek ajanlar da meme kanseri tedavisi için araştırılmaya devam edilmektedir. İyon kanalları ve onların spesifik inhibitörleri de son yıllarda kanser araştırmalarında yerini alan ilgi çekici ajanlardandır. Bu kanalların ekspresyonlarındaki değişimlerin kanser hücrelerine, büyüme sinyalizasyonunda kendi kendine yetme, büyüme karşıtı sinyallere karşı duyarsızlık, apoptozdan kaçma, sınırsız replikasyon potansiyeli, sürekli devam eden anjiyogenez ile doku invazyonu ve metastaz yeteneklerini kazandırdıkları bildirilmektedir (Prevarskaya vd., 2018).

İyon kanalları, iyon akışlarını kontrol ederek, aksiyon potansiyeli ve sinaptik iletim gibi hızlı hücre sinyallerini ve ayrıca mitoz ve hücre göçü gibi çok daha yavaş süreçleri şekillendirmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalara göre, kanserin ayırt edici özelliklerinde çeşitli iyon kanal türleri yer almaktadır ve bu kanallar neoplastik ilerlemenin belirli aşamalarını düzenlemektedirler. Uzun süreli *in vitro* çalışmalar sonucunda, bu iyon kanallarının inhibisyonunun, kanser hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı yönünde sonuçlar bildirilmektedir (Arcangeli ve Becchetti, 2015). İyon kanalları, birçok kanser türünde etkin rol oynamaktadır. Bu kanallardan biri olan, kalsiyumla aktive edilen klorür iyon kanalı TMEM16A'nın, birçok kanserde aşırı eksprese edildiği ve bunun sonucunda kanser ilerlemesine çeşitli yollardan katkıda bulunduğu bilinmektedir. Ancak TMEM16A'nın aşırı ekspresyonunun meme kanserinde karsinogenezde nasıl bir rol oynadığı hala belirsizliğini korumaktadır (H. Wang vd., 2017).

Birçok araştırmaya göre, çeşitli doğal ve sentetik bileşiklerin TMEM16A üzerinde düzenleyici etkilerinin olduğu ortaya çıkmıştır. TMEM16A'nın farklı sinyal yolları üzerinden farmakolojik blokajının, çeşitli enflamatuvar hastalıklar, reaktif solunum yolları hastalıkları, hipertansiyon, ağrı ve kanser gibi hastalıklarda olumlu sonuçları olduğu ortaya konmuştur. TMEM16A'nın hem Ca^{+2} hem de

voltaj yoluyla düzenlendiği bilinmektedir. TMEM16A'nın inhibisyonu, çeşitli kanserlerde tedavi için yeni bir farmasötik yaklaşımı temsil etmektedir. Bu nedenle hem meme kanseri hem de TMEM16A'yı aşırı ifade eden kanserler için potansiyel bir tedavi olarak TMEM16A inhibitörlerinin daha fazla araştırılması ve yeni yaklaşımlar geliştirilmesi gerekmektedir (Ji vd., 2019).

TMEM16A, farklı kanserlerde farklı sinyal yollarını aktive etmektedir, meme kanserinde ise STAT-3, EGFR ve CAMKII yolunu aktive etmektedir. Üçlü negatif meme kanserlerinin (TNBC'ler) genellikle kötü prognoz sergilediği ve etkili ilaçlar olmadan metastaz yapma olasılığının yüksek olduğu bilinmektedir. TNBC'lerde anormal şekilde aktive olduğu bilinen STAT-3 sinyal yolağını inhibe etmek umut verici bir stratejidir. STAT-3, kanser hücresi proliferasyonu, apoptoz ve metastaz dahil hücrel olayları düzenleyen temel bir onkogen olarak sınıflandırılmaktadır (Zhang vd., 2021). Bu amaçla bu çalışmada, TMEM16A kanalının meme kanseri proliferasyonu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla MCF-7 hücrelerine bir STAT-3 inhibitörü olan Cryptotanshinone uygulanmıştır. CPT'nin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksitesi ve diğer deneylerde kullanılan dozların belirlenmesi için MTT yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem en yaygın kullanılan sitotoksite analizlerinden biridir ve hücre canlılığı hakkında bilgi vermektedir. IC50 değeri, hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyonudur (Çetin, 2019).

Liteatürde CPT'nin farklı kanserlerdeki hücre hatları üzerinde IC50 değerleri gösterilmiştir. Örneğin, karaciğer kanserinde tedavi amaçlı kullanılan Sorafenib isimli ilacın, duyarlılığının artmasında CPT'nin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, HepG2 (insan hepatoblastom hücre hattı) ve Huh7 (insan hepatoselüler karsinom hücre hattı) hücreleri kullanılmıştır. 24, 48 ve 72 saat sürelerinde ve artan konsantrasyonlarda CPT uygulanmış ve MTT yöntemi ile hücre canlılığı ölçülmüştür. Araştırmanın sonucunda, CPT'nin doza ve zamana bağlı şekillerde hücre canlılığını inhibe ettiği bildirilmiştir. CPT'nin IC50 değeri HepG2 hücrelerinde 35 μM ve Huh7 hücresinde 51 μM olarak gösterilmiştir (Li vd., 2022). Bir diğer çalışmada, HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde, CPT'nin STAT-3'e bağlı lusiferaz aktivitesi üzerindeki doza bağlı inhibisyon oranlarını araştırmak üzere, 24 saat boyunca 0,2 ile 50 μM arasında doz konsantrasyonları uygulanmış ve CPT'nin hücre canlılığını doza bağlı olarak azalttığı ve belirlenen IC50 değerinin 4,6 μM olduğu bildirilmiştir (Shin vd., 2009). A549 akciğer kanseri hücreleri üzerinde Cryptotanshinone'un anti-proliferatif etkisini araştırmak için yapılan bir araştırmada ise, A549 hücreleri artan konsantrasyonlarda CPT (0, 1, 5, 10, 20, 30, 40 μM) ile muamele edilmiş ve farklı sürelerde (12, 24 ve 48 saat) inkübe edilmiştir. Sonuçta CPT'nin doz ve zamana bağlı bir şekilde A549 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiş ve 12, 24 ve 48. saatler için ayrı ayrı IC50 değerleri sırayla >40 μM , >40 μM ve 18.53 $\pm$ 1.29 μM olarak gösterilmiştir. (Zhang vd., 2021). STAT-3 yolunun inhibisyonu yoluyla, kolorektal kanserde, CPT'nin kanser proliferasyonu üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, yapılan MTT analizi sonucunda 2 farklı kolon kanseri hücre hattında (HCT116 ve RKO hücre hatları) hücre canlılığının azaldığı bildirilmiştir. HCT116 hücre hattı için CPT'nin IC50 değeri 25,25 μM olarak bulunurken, RKO hücre hattında 21,06 μM olarak belirlenmiştir (Wang vd., 2020). Özofagus kanserinin en yaygın alt tipi olan özofagus

skumöz hücreli karsinom (ESCC) üzerinde, CPT'nin antikanser etkisinin ve moleküler mekanizmalarının *in vitro* ve *in vivo* olarak incelendiği bir çalışmada, iki insan özofagus kanseri hücre hattı, EC109 ve CAES17 kullanılmıştır. MTT analizi için, hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (0, 1.25, 5, 10, 20 ve 40 μM) CPT ile muamele edilmiştir. Bu çalışmada JAK/STAT-3 yolunun CPT tarafından inhibisyonu hedeflenmiştir. CPT'nin, her iki özofagus kanseri hücre hattının proliferatif aktivitelerini zamana ve doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde azalttığı bildirilmiş ve EC109 ve CAES17 hücrelerinin 72 saatte IC50 değerleri sırasıyla 2.57 μM ve 10.07 μM olarak bulunmuştur. Ayrıca, *in vivo* olarak CPT'nin, ksenograft farelerde EC109 hücrelerinin tümör büyümesini inhibe ettiği de bildirilmiştir. Bu sonuçlar *in vitro* ve *in vivo* olarak STAT-3 inhibisyonunun özofagus kanseri için terapötik bir hedef olabileceğini göstermektedir (Y. Ji vd., 2019). Bir diğer çalışmada, iki insan akciğer kanseri hücre hattı olan A549 ve NCI-H520 hücrelerinde, CPT'nin hücre proliferasyonu, metastazı ve tümör oluşumuna etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. MTT analiziyle CPT'nin sırasıyla 57.95 μM ve 67.65 μM IC50 ile A549 ve NCI-H520 hücrelerini doza bağlı bir şekilde öldürdüğü gösterilmiştir (Li vd., 2021). CPT'nin kolon kanseri CT26 hücrelerinin proliferasyonu ve tümör büyümesinin baskılanması üzerinde bir etkisinin olup olmadığının *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırıldığı bir çalışmada, *in vitro* deneyler için CT26 hücreleri, 24 saat boyunca belirtilen CPT konsantrasyonlarına (0.625, 1.25, 2.5, 10, 20, 40 ve 80 μM) maruz bırakılmış ve hücre canlılığı, MTT ile analiz edilmiştir. Ayrıca *in vivo* deneyler için hayvanlara 20mg/kg ve 80 mg/kg CPT verilerek 3 günde bir tümör hacimleri ölçülmüştür. Deney boyunca, iki doz CPT ile tedavi edilen fareler ile tedavi edilmeyen fareler arasında ağırlık bakımından gözle görülür bir fark gözlenmemiş, bu da CPT uygulamasının sistemik toksisite ile sonuçlanmadığını göstermiştir. Sonuçta, *in vitro* CPT uygulamasında 5-40 μM arası yüksek sitotoksosite gözlenirken, *in vivo* uygulamada, model grubuyla karşılaştırıldığında, doza bağlı olarak tümör büyümesini bastırdığı gözlenmiştir. Bu da farmakolojik bir ajan olarak CPT'nin kolon kanserinin hücre proliferasyonunu ve tümör büyümesini baskıladığını göstermektedir (Zhang vd., 2018).

Bu çalışmada MCF-7 hücre hattında belirlenen IC50 değeri, literatürdeki diğer kanser hatları üzerinde Cryptotanshinone için bulunan IC50 değerleriyle uyumlu bulunmuştur. Çalışmamızda 24, 48 ve 72. saatlerde farklı dozların (1, 10, 20, 40, ve 50 μM) uygulandığı MTT analizi sonucunda her saat için ayrı ayrı IC50 değeri elde edilmiş ve saatlerin ortalamaları alınarak 23,01 μM değerinde bir IC50 değeri belirlenmiştir. MTT analizleri sonucunda diğer deneylerde kullanılmak üzere üç doz, (10, 20 ve 30 μM) doz konsantrasyonları olarak belirlenmiştir.

MTT analizi kullanılarak yapılan sitotoksosite deneylerinde tüm dozlarda 24, 48 ve 72. saatler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) ve kontrolle kıyaslandığında doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı görülmüştür. Buna göre 24, 48 ve 72. saatler ve her birinin doz grupları birbiriyle kıyaslandığında, en yüksek sitotoksosite oranına 72. saat sonunda ulaşıırken, tüm saatlerde hücre canlılığı doza bağlı olarak azalma göstermektedir. 48 ve 72. saatlerde

hücreler üzerindeki en yüksek sitotoksik etkiyi yapan dozların 20-30 μ M olduğu, 40-50 μ M dozlarında sitotoksik etkinin artmaya devam ettiği ancak çok belirgin bir artış olmadığı gözlenmiştir.

Yapılan literatür taramasında Cryptotanshinone'un sitotoksik etkisi ile ilgili çeşitli sonuçlara ulaşılmıştır. Örneğin, kronik myeloid lösemi (KML) hücre hattı olan K-562 hücrelerinde CPT'nin sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan MTT analizinde hücre proliferasyonunun doza bağlı olarak azaldığı ve uygulanan 10 μ M CPT dozunun hücre canlılığında %70 azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Dong vd., 2018). Yumurtalık kanseri hücre hatlarında (Hey ve A2780) CPT'nin, STAT3/SIRT3/HIF-1 α sinyal yolunun baskılanması yoluyla hücresel glikoliz kaynaklı hücre büyümesini ve proliferasyonu üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, 24 ve 48. saatler için ayrı ayrı bir dizi CPT konsantrasyonu uygulanmış ve her iki kanser hücre hattında da CPT'nin doza bağımlı ve zamana bağlı bir şekilde kontrollerle karşılaştırıldığında hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Hey ve A2780 hücreleri için IC50 değerleri sırasıyla 18.4 μ M ve 11.2 μ M olarak belirlenmiş ve bu dozlarda hücre canlılığında %95 azalma olduğu bildirilmiştir (Yang vd., 2018).

Bizim çalışmamızda CPT, 20 μ M doz grubunda 24. saatte %17,34 oranında düşük bir sitotoksik etkiye sahipken, 48. saatte %71,73 ve 72. saatte %92,4 oranında yüksek bir sitotoksik etki göstermiştir. 30 μ M doz grubunda 24. saatte bu oran %32,94'e yükselirken, 48 ve 72 saatlerde sırayla %88,06 ve %93'e yükselmiştir. 40 ve 50 μ M doz gruplarına bakıldığında 48 ve 72 saatlerde sitotoksitede belirgin bir artış gözlenmezken, 24. saatte %71,09 oranıyla en yüksek sitotoksik etki 50 μ M doz grubunda görülmüştür. Tüm bu veriler ışığında bu çalışmada, Cryptotanshinone'un doza ve zamana bağlı olarak, literatürde rastlanan diğer kanser türlerinde olduğu gibi, meme kanseri hücreleri üzerinde de belirgin bir sitotoksik etkisinin olduğu anlaşılmıştır.

Bu çalışmada, CPT'nin hücre proliferasyonu üzerine etkisini incelemek amacıyla kullanılan ikinci yöntem RT-PCR tekniğidir. Bu yöntem CPT'nin TMEM16A (ANO1) kanal geninin ekspresyonu üzerine etkisini incelemek amacıyla kullanılmıştır. ANO1 geninin çeşitli kanser türlerinde aşırı eksprese olduğu bilinmektedir ve meme kanseri tümörjenezinde de rol oynamaktadır. ANO1, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2), progesteron reseptörü (PR) ve östrojen reseptörü (ER) pozitif durumu olan meme kanseri hastalarında klinik prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Literatürdeki araştırmalara göre, ANO1'in farmakolojik inhibisyonunun çeşitli kanser hücre tipleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* antikanser etkisi olduğu gösterilmektedir (Li vd., 2022). Çalışmamızda MCF-7 hücre hattı üzerinde MTT analizi ile belirlenen kontrol, 10 μ M, 20 μ M ve 30 μ M olmak üzere dört doz grubu CPT ile muamele edilerek, meme kanseri hücrelerinde aşırı eksprese olduğu bilinen ANO1 geninin ekspresyonuna etkisi araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre, gen ifadesi düzeylerinde doz ve zamanlara göre değerlendirme yapıldığında, 24. saate ait veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0,05$), 48 ve 72. saat verileri istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0,05$). Diğer dozlarda anlamlı bir farklılık bulunmasa da kontrole göre kıyaslandığında, CPT'nin özellikle 48. saatte 10 ve 20 μ M doz gruplarında ANO1 geninin ekspresyonunu azalttığı görülmektedir. Bu durumun gen ekspresyonunun analiz edildiği örnek sayısının az olmasından dolayı standart sapmalardaki

uyumsuzluklardan ilişkili olabileceği düşünülmektedir. 24. saate ait veriler kontrolle kıyaslandığında, gen ekspresyon düzeyinin 10 μM doz grubunda %65 oranında azaldığı, 20 μM doz grubunda %71 oranında azaldığı ve 30 μM doz grubunda %83 oranında azaldığı gözlenmiştir.

Literatürde ANO1 geninin çeşitli kanserlerdeki ekspresyon seviyelerine ait az sayıda araştırma bulunmaktadır. Bunlardan birisi, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücre hattı olan PC9 hücrelerinde, ANO1 inhibitörü olarak verteporfin kullanılarak, ANO1 ekspresyonunun azaltılmasının ve antikanser ajan olarak verteporfinin kullanılmasının, NSCLC üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak verteporfinin, EGFR aktivasyonunun indüklediği STAT-3 yolunun inhibisyonu yoluyla, ANO1 gen ekspresyonunu geciktirdiği ve PC9 hücrelerinin canlılığını azalttığı bildirilmiştir (Jeong vd., 2022).

Çalışmamızda, inhibitör uygulanan söz konusu iyon kanalının davranışını voltaj yoluyla incelemek amacıyla, zardan geçen akımları patch clamp tekniği ile ölçülmüştür. Patch clamp, bütün hücre zarları ve hücre zarı kanallarından geçen iyon akımlarını ölçmek için yaygın olarak kullanılan elektrofizyolojik bir tekniktir. Bu yöntemle, hücre zarındaki kanalların yapıları, açılıp kapanmaları ve değişik nörotransmitter veya kimyasal ajanlara verdikleri yanıtlar incelenebilmektedir. Voltajla ve ligandla aktive olan iyon kanallarının davranışlarını incelemek için en etkili yol akım voltaj ilişkisini değerlendirmektir. Tüm hücre kaydında; pipet ucu ile zara uygulanan vakum pompası ile devamlı vakum yaptırılarak zar yırtılmaktadır. Bu durumda pipet elektrotu direk hücre sitoplazması voltaj değişimlerini ölçmektedir. Pipet ucu zarın yırtılması nedeniyle pipet içerisindeki solüsyonu hücre sitoplazmasına, hücre sitoplazması sıvısı da pipet içerisine geçmektedir ve böylece denge durumuna gelmektedir. Bu uygulamayla hücre içerisine aktivatör veya inaktivatör madde kolaylıkla verilerek hücre zarı cevapları kontrol edilebilmektedir (Gandini vd., 2014).

Bu çalışmada, TMEM16A (ANO1) kanalında bir blokaj yapıp yapmadığını değerlendirmek amacıyla MCF-7 hücrelerine 10 μM , 20 μM ve 30 μM dozlarında CPT inhibitörü uygulanmıştır ve yama-kenetleme deneylerinde elde edilen maksimum akım değerleri (pA) ölçülmüştür. Tüm doz grupları için akım kayıtları, başlangıçta ilaç uygulanmadan hemen önce (0. dakika) kontrol olarak ve her doz için ilaç uygulandıktan sonra 15. dakikada maksimum akımlar ölçülerek, her bir hücreden en az 5 defa (n=5) kayıt alınmıştır. İstatistiksel analizlerden elde edilen verilere göre, kontrol kaydıyla kıyaslandığında, ANO1 kanalından geçen Cl^- akımlarının, doza bağlı olarak azaldığı görülmektedir. Grupların maksimum akım değerlerinin (pA) ortalamalarına bakıldığında; 10 ve 20 μM CPT uygulanan doz gruplarında ölçülen akım değeri kontrole göre azalsa da anlamlı bir farklılık göstermezken, kontrol kayıtlarıyla kıyaslandığında 30 μM doz grubu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Yani dozlar arasında TMEM16A kanalından geçen Cl^- akımlarını en yüksek miktarda inhibe eden grup 30 μM CPT doz grubu olarak belirlenmiştir.

Literatürde kalsiyum ile aktive olan klorür iyon kanalı TMEM16A'nın farklı kanserlerde, çeşitli ajanlar tarafından inhibisyonunun, elektrofizyolojik yöntemlerle ölçüldüğü araştırmalar bulunmaktadır. Geniş bir araştırmacı grubu tarafından yapılan bir araştırmada, daha önceki çalışmalarda antikanser etkisi kanıtlanmış olan Honoikol adlı bileşenin, kolorektal kanserin patogeneze katkıda bulunduğu

bilinen ANO1 kanallarını hedefleyerek, kolorektal kanserin hücre proliferasyonunu inhibe edip etmediği incelenmiştir. Bu amaçla, ANO1'i aşırı eksprese eden plazmit ile transfekte edilmiş HEK293 hücre hattı kullanılarak, ANO1 kanallarındaki Cl⁻ akımlarını kaydetmek için tüm hücre kayıt yöntemi kullanılarak kayıtlar alınmıştır. Kenetleme protokolü -100 ve +100 mV aralığında, 750 ms'lik voltaj uyarılarıyla, 20 mV'luk artışlar şeklinde uygulanmıştır. Sonuçta, ANO1 kanalından geçen Cl⁻ akımlarının, Honokiol'ün 1µM'dan büyük tüm doz konsantrasyonlarında zamana bağlı olarak önemli ölçüde inhibe ettiği (10 µM konsantrasyonda %80 inhibisyon) bildirilmiştir. Ayrıca ANO1 kanalından geçen Cl⁻ akımlarının, 50 µM Honokiol tarafından neredeyse tamamen inhibe edildiği gösterilmiştir (Wang vd., 2021).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada bir STAT-3 inhibitörü olarak bilinen ve TMEM16A iyon kanallarını inhibe ettiği gösterilen Cryptotanshinone'un meme kanseri hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, çalışmada MTT analizi, yama kenetleme tekniği ve eş zamanlı PCR tekniği kullanılarak, Cryptotanshinone'un ANO1 kanal akımını bloke ettiği ve kanal ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir. Bu bulgular ışığında Cryptotanshinone'un meme kanserinde tedavi amaçlı ilaç olarak veya günümüzde meme kanserinde kullanılan tedavi yöntemlerinin etkinliğini artırma amacıyla kullanılabileceğine ilişkin ipuçları elde edilmiştir.

Bu çalışmada şu sonuçlara ulaşılmıştır:

1. Cryptotanshinone'un IC50 değeri, 23,01 μ M olarak bulunmuştur.
2. Doza ve uygulama sürelerine bağlı olarak Cryptotanshinone'un MCF-7 hücreleri üzerinde belirgin bir sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.
3. Cryptotanshinone'un ANO1 geninin ekspresyonu üzerine etkisini araştırmak için yapılan eş zamanlı PCR analizi sonucunda, 24. saatte ANO1 geninin ekspresyon düzeyinin 10 μ M doz grubunda %65 oranında azaldığı, 20 μ M doz grubunda %71 oranında azaldığı ve 30 μ M doz grubunda %83 oranında azaldığı belirlenmiştir.
3. Cryptotanshinone'un doza bağlı olarak TMEM16A kanalından geçen klorür akımları üzerinde inhibitör etkisinin olduğu ve özellikle 30 μ M doz uygulandığında ANO1 akımını önemli miktarda inhibe ettiği gözlenmiştir.
5. Bu sonuçlara dayanarak Cryptotanshinone'un meme kanserinde, ANO1 kanal akımını bloke ederek ve gen ekspresyonunu azaltarak, hücre proliferasyonunu azalttığı bulunmuştur. Bu nedenle, meme kanserinin tedavisinde kullanılabilirliği açısından olumlu bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir.
6. Ancak, bu çalışmada CPT'nin anti-proliferatif etkilerinin incelenmesi için sadece bir meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Bu nedenle çalışmayı genişletmek için, farklı meme kanseri hücre hatlarında ve hatta farklı kanser hücrelerinde antiproliferatif etkilerinin incelenmesi üzerine çalışılmalar yapılması daha yararlı olacaktır.
7. Bu araştırmaya ek olarak, karşılaştırma yapmak için Cryptotanshinone'un kanserli olmayan, normal meme bezi hücrelerine etkisi de incelenebilir. Normal meme dokusunda Cryptotanshinone'un oluşturabileceği etkileri değerlendirmek, ilacın kanserli hücrelerdeki etki mekanizmasını açıklamak için fayda sağlayabilir.
8. Bu araştırmadan elde edilen sonuçları desteklemek ve genişletmek adına, STAT-3 inhibitörü Cryptotanshinone'un, klorür iyon kanalı olan TMEM16A kanalına olan seçiciliği üzerine analizler yapılabilir. Literatürde de bu tarz bir yaklaşım görülmüştür. Bir araştırma grubu, Cinobufagin isimli inhibitörün ANO1 kanalına seçiciliğini belirlemek adına, başka bir klorür kanalı olan CTFR (kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyici) ile ANO1 kanalının protein ekspresyon seviyelerini birlikte ölçmüşlerdir. CAL-27 (oral skuamöz hücreli karsinom) hücrelerine uygulanan çeşitli artan dozlarda

Cinobufagin'in, ANO1 protein ekspresyon seviyelerini doza bağlı olarak azalttığı bulunmuştur. Diğer klorür kanalı olan CTFR'yi eksprese eden FRT hücreleri üzerinde ise uygulanan en yüksek dozlarda bile protein ekspresyon seviyelerinde bir değişiklik olmamıştır. Böylece, Cinobufagin'in ANO1 kanalını özel olarak hedeflediği gösterilmiştir (Jo vd., 2021).

9. TMEM16A'nın ekspresyonunun ayrıca miRNA'lar aracılığıyla kontrol edildiği de bilinmektedir. Bu çalışmaya ek bir çıktı olarak, TMEM16A kanal geni olan ANO1'i hedefleyen miRNA seviyelerinin belirlenmesiyle, meme kanserinde TMEM16A iyon kanalları / miRNA ilişkisi araştırılabilir. Literatürde benzer bir çalışma olarak, Park ve arkadaşları, bir tümör baskılayıcı gen olarak bilinen miR-9'un kolorektal kanseri (CRC) hücre hattı olan HCT116 hücrelerinde ANO1 mRNA'sı ve protein ekspresyonu seviyelerine etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla, otuz iki eşleştirilmiş CRC dokusu ve bitişik normal doku, kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) kullanılarak ANO1 ekspresyonu için analiz edilmiştir. CRC örneklerinde miR-9 ile ANO1 mRNA ekspresyonu arasında ters bir ilişki bulmuşlardır. Luciferaz aktivitesine bakılarak ANO1'in, miR-9'un doğrudan bir hedefi olduğunu kanıtlamışlardır ve miR-9'un aşırı ekspresyonunun, normal dokularla kıyaslandığında hem mRNA'yı hem de ANO1'in protein ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladığını bildirmişlerdir (Park vd., 2019).

10. Diğer kanserlerde olduğu gibi, meme kanserinde de değerlendirme yapılırken buna tümör mikroçevresinin de dahil edilmesi gerektiği artık bilinen bir gerçektir. Literatürde, çeşitli biyokimyasal yöntemlerle tümör mikro çevresinin modülasyonunun, bir anti-metastatik etkiye sahip olabileceğine dair çalışmalara rastlanmıştır. Bu nedenle, çalışmamızda kullandığımız Cryptotanshinone ile, tümör mikro çevresini modüle ettiği bilinen antimetastatik doğal ürünlerden bir veya birkaçı birlikte *in vitro* kombinasyon çalışmaları yapılarak, meme kanseri hücreleri üzerinde sinerjik etkileri incelenebilir. Böylece, meme kanserinde daha etkili antitümöral sonuçlar elde edilebilir.

11. Bu çalışmada, Ca^{+2} ile aktive edilen klorür iyon kanalı TMEM16A'nın, CPT ile inhibisyonu yoluyla, meme kanserindeki anti-proliferatif etkisi incelenmiştir. Ancak, TMEM16A iyon kanalının aynı zamanda, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom, prostat kanseri ve akciğer kanseri gibi farklı kanserlerde de aşırı eksprese olduğu bilinmektedir. Bu nedenle CPT'nin, farklı kanserlerde farklı sinyal yolları üzerinden TMEM16A kanalı üzerinde inhibisyon etkisi olup olmadığı da araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Afshari, H., Nourbakhsh, M., Salehi, N., Mahboubi Rabbani, M., Zarghi, A. and Noori, S. (2020). "STAT3-mediated apoptotic-enhancing function of sclareol against breast cancer cells and cell sensitization to cyclophosphamide", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research IJPR*, Vol. 19, No. 1, pp. 398–412.
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M. and Khan, A. U. (2017). "Awareness and current knowledge of breast cancer." *Biological Research*, Vol. 50, No. 33, pp. 1-23.
- Arcangeli, A. and Becchetti, A. (2015). "Novel perspectives in cancer therapy: targeting ion channels." *Drug Resist Updates*, Vol. 21-22, pp. 11–19.
- Bai, W., Liu, M. and Xiao, Q. (2021). "The diverse roles of TMEM16A Ca^{2+} -activated Cl^- channels in inflammation." *Journal of Advanced Research*, Vol. 33, pp. 53–68.
- Bain, A. (2019). "Use of calcium channel blockers in cardiovascular disease." *British Journal of Cardiac Nursing*, Vol. 14, No. 2, pp. 64–70.
- Becchetti, A. (2011). "Ion channels and transporters in cancer. 1. Ion channels and cell proliferation in cancer." *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, Vol. 301, No. 2, pp. 255–265.
- Becchetti, A., Munaron, L. and Arcangeli, A. (2013). "The role of ion channels and transporters in cell proliferation and cancer." *Frontiers in Physiology*, Vol. 4, No. 312, pp. 1-3.
- Bernard, G. and Shevell, M. I. (2008). "Channelopathies: A Review." *Pediatric Neurology*, Vol. 38, No. 2, pp. 73–85.
- Bissinger, R., Lupescu, A., Zelenak, C., Jilani, K. and Lang, F. (2014). "Stimulation of Eryptosis by Cryptotanshinone." *Cellular Physiology and Biochemistry*, Vol. 34, No. 2, pp. 432–442.
- Blanpain, C. (2013). "Tracing the cellular origin of cancer." *Nature Cell Biology*, Vol. 15, No. 2, pp. 126–134.
- Boassa, D., Stamer, W. D. and Yool, A. J. (2006). "Ion Channel Function of Aquaporin-1 Natively Expressed in Choroid Plexus." *Journal of Neuroscience*, Vol. 26, No. 30, pp. 7811–7819.

Bortner, C. D. and Cidlowski, J. A. (2014). "Ion channels and apoptosis in cancer." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 369, No. 1638, pp. 1-9.

Brackenbury, W. J. (2012). "Voltage-gated sodium channels and metastatic disease." *Channels*, Vol. 6, No. 5, pp. 352–361.

Cameron, I. L., Smith, N. K., Pool, T. B. And Sparks, R. L. (1980). "Intracellular concentration of sodium and other elements as related to mitogenesis and oncogenesis in vivo." *Cancer Research*, Vol. 40, No. 5, pp. 1493–1500.

Cao, Q., Liu, F., Ji, K., Liu, N., He, Y., Zhang, W. and Wang, L. (2017). "MicroRNA-381 inhibits the metastasis of gastric cancer by targeting TMEM16A expression." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, Vol. 36, No. 1, pp. 29.

Cao, W., Chen, H. D., Yu, Y. W., Li, N. and Chen, W. Q. (2021). "Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020." *Chinese Medical Journal*, Vol. 134, No. 7, pp. 783–791.

Carbone, E. and Mori, Y. (2020). "Ion channelopathies to bridge molecular lesions, channel function, and clinical therapies." *European Journal of Physiology*, Vol. 472, No. 7, pp. 733–738.

Eker, E. D., Çetin, B., and Şahin, N. Ö. (2019). "In vitro cytotoxic effects and quality control studies on black cumin seed capsules and oils in turkey market." *Journal of Medical Case Reports and Reviews*, Vol. 2, No. 07, pp. 2589-8647.

Chaffey, N., Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2003). "Molecular biology of the cell." *Annals of Botany*, Vol. 91, No. 3, pp. 401.

Chen, L., Wang, H. J., Xie, W., Yao, Y., Zhang, Y.S. and Wang, H. (2014). "Cryptotanshinone inhibits lung tumorigenesis and induces apoptosis in cancer cells in vitro and in vivo." *Molecular Medicine Reports*, Vol. 9, No. 6, pp. 2447–2452.

Chen, W., Gu, M., Gao, C., Chen, B., Yang, J., Xie, X., Wang, X., Sun, J. and Wang, J. (2021). "The Prognostic Value and Mechanisms of TMEM16A in Human Cancer." *Frontiers in Molecular Biosciences*, Vol. 8, pp. 54-56.

Chi, Y. and Zhou, D. (2016). “MicroRNAs in colorectal carcinoma-from pathogenesis to therapy.” *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, Vol. 35, No. 1, pp. 43.

Chung, J. J., Clapham, D. E., Garbers, D. L., Grimm, C. M. and Ren, D. (2022). “CatSper and Two-Pore channels (TPC) in GtoPdb v.2022.1.” *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*, Vol. 2022, No. 1.

Ormandy, C. J., Musgrove, E. A., Hui, R., Daly, R. J. and Sutherland, R. L. (2003). “Cyclin D1, EMS1 and 11q13 amplification in breast cancer.” *Breast cancer research and treatment*, Vol. 78, pp. 3.

Clapham, D. E., Runnels, L. W. and Strübing, C. (2001). “The trp ion channel family.” *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 2, No. 6, pp. 387–396.

Collingridge, G. L., Olsen, R. W., Peters, J. and Spedding, M. (2009). “A nomenclature for ligand-gated ion channels.” *Neuropharmacology*, Vol. 56, No. 1, pp. 2–5.

Comşa, Ş., Cîmpean, A. M. and Raica, M. (2015). “The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research.” *Anticancer Research*, Vol. 35, No.6, pp. 3147-54.

Cowell, C. F., Weigelt, B., Sakr, R. A., Ng, C. K. Y., Hicks, J., King, T. A. and Reis-Filho, J. S. (2013). “Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: Revisited.” *Molecular Oncology*, Vol. 7, No. 5, pp. 859–869.

Crottès, D. and Jan, L. Y. (2019). “The multifaceted role of TMEM16A in cancer.” *Cell Calcium*, Vol. 82, pp. 102050.

Cruz-Rangel, S., De Jesús-Pérez, J. J., Contreras-Vite, J. A., Pérez-Cornejo, P., Hartzell, H. C. and Arreola, J. (2015). “Gating modes of calcium-activated chloride channels TMEM16A and TMEM16B.” *The Journal of Physiology*, Vol. 593, No. 24, pp. 5283–5298.

Dajani, S., Saripalli, A. and Sharma-Walia, N. (2018). “Water transport proteins–aquaporins (AQPs) in cancer biology.” *Oncotarget*, Vol. 9, No. 91, pp. 36392–36405.

Dalil, D., Iranzadeh, S. and Kohansal, S. (2022). “Anticancer potential of cryptotanshinone on breast cancer treatment; A narrative review.” *Frontiers in Pharmacology*, Vol. 13, pp. 979634.

Decher, N., Rinné, S., Bedoya, M., Gonzalez, W. and Kiper, A. K. (2021). “Molecular Pharmacology of K2P Potassium Channels.” *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 55, No.3, pp. 87–107.

Di Resta, C. and Becchetti, A. (2010). “Introduction to Ion Channels.” *Integrins and Ion Channels*, Vol. 674, pp. 9-21.

Díaz-García, A. and Varela, D. (2020). “Voltage-Gated K⁺/Na⁺ Channels and Scorpion Venom Toxins in Cancer.” *Frontiers in Pharmacology*, Vol. 11, pp. 913.

Dong, B., Liang, Z., Chen, Z., Li, B., Zheng, L., Yang, J., Zhou, H. and Qu, L. (2018). “Cryptotanshinone suppresses key onco-proliferative and drug-resistant pathways of chronic myeloid leukemia by targeting STAT5 and STAT3 phosphorylation.” *Science China Life Sciences*, Vol. 61, No. 9, pp. 999–1009.

Dutta, S., Lopez Charcas, O., Tanner, S., Gradek, F., Drifort, V., Roger, S., Selander, K., Velu, S. E. and Brouillette, W. (2018). “Discovery and evaluation of nNav1.5 sodium channel blockers with potent cell invasion inhibitory activity in breast cancer cells.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 26, No. 9, pp. 2428–2436.

Ergün, D. D. and Dursun, Ş. (2018). “Patch Clamp Yönteminin Biyofiziksel Prensipleri ve Tıpta Kullanımı.” *Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi*, Vol. 1, No. 1, pp. 93–108.

Falconer, M., Smith, F., Surah-Narwal, S., Congrave, G., Liu, Z., Hayter, P., Ciaramella, G., Keighley, W., Haddock, P., Waldron, G. And Sewing, A. (2002). “High-Throughput Screening for Ion Channel Modulators.” *Journal of Biomolecular Screening*, Vol. 7, No. 5, pp. 460–465.

Felix, R. (2000). “Channelopathies: ion channel defects linked to heritable clinical disorders.” *Journal of Medical Genetics*, Vol. 37, No. 10, pp. 729–740.

Gandini, M. A., Sandoval, A. and Felix, R. (2014). “Patch-Clamp Recording of Voltage-Sensitive Ca²⁺ Channels.” *Cold Spring Harbor Protocols*, Vol. 4, pp. 329-5.

Gao, R., Shen, Y., Cai, J., Lei, M. and Wang, Z. 2010. “Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer.” *Oncology Reports*, Vol. 23, No. 5, pp. 1293–1299.

Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Lecaillon, F., Gore, J., Bougnoux, P., Lalmanach, G. and Le Guennec, J.-Y. (2009). “Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells.” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 284, No. 13, pp. 8680–8691.

Girschik, J., Heyworth, J. and Fritschi, L. (2013). “Self-reported Sleep Duration, Sleep Quality, and Breast Cancer Risk in a Population-based Case-Control Study.” *American Journal of Epidemiology*, Vol.177, No. 4, pp. 316–327.

Gucalp, A., Traina, T. A., Eisner, J. R., Parker, J. S., Selitsky, S. R., Park, B. H., Elias, A. D., Baskin-Bey, E. S. and Cardoso, F. (2019). “Male breast cancer: a disease distinct from female breast cancer.” *Breast cancer research and treatment*, Vol. 173, No. 1, pp. 37–48.

Gupta, S. P. (2011). “Ion Channels and Their Inhibitors” Springer, Berlin Heidelberg.

Gutschner, T. and Diederichs, S. (2012). “The hallmarks of cancer.” *RNA Biology*, Vol. 9, No. 6, pp. 703–719.

Haddad, C. F. (2020). “Hereditary breast cancer: review and current approach.” *Mastology*, Vol. 30, pp. 2020.

Hanahan, D. (2022). “Hallmarks of Cancer: New Dimensions.” *Cancer Discovery*, Vol. 12, No. 1, pp. 31–46.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). “Hallmarks of Cancer: The Next Generation.” *Cell*, Vol. 144, No.5, pp. 646–674.

Hausman, D. M. (2019). “What Is Cancer?” *Perspectives in Biology and Medicine*, Vol. 62, No. 4, pp. 778–784.

Heemskerk, B., Kvistborg, P. and Schumacher, T. N. M. (2012). “The cancer antigenome.” *The EMBO Journal*, Vol. 32, No. 2, pp. 194–203.

Hervé, J. C. (2015). “Membrane channels and transporters in cancers.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, Vol. 1848, No. 10, pp. 2473–2476.

Heslop, K. A., Milesi, V. and Maldonado, E. N. (2021). “VDAC Modulation of Cancer Metabolism: Advances and Therapeutic Challenges.” *Frontiers in Physiology*, Vol. 12, pp. 742839.

Hucho, F. and Weise, C. (2001). “Ligand-Gated Ion Channels.” *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 40, No. 17, pp. 3100–3116.

Hutchings, C. J., Colussi, P. and Clark, T. G. (2019). “Ion channels as therapeutic antibody targets.” *mAbs*, Vol. 11, No. 2, pp. 265–296.

Kandemir, D. (2020). “Recent Developments in Breast Cancer.” *Sağlık Bilimleri ve Meslekleri Dergisi*, Vol. 6, No. 3, pp. 583–594.

Jeong, S. B., Das, R., Kim, D.-H., Lee, Sion, Oh, H. I., Jo, S., Lee, Y., Kim, J., Park, S., Choi, D. K., Moon, U. Y., Kwon, O., Namkung, W., Lee, Sungwoo, Cho, B. C., Woo, J. and Seo, Y. (2022). “Anticancer effect of verteporfin on non-small cell lung cancer via downregulation of ANO1.” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Vol. 153, pp. 113373.

Ji, Q., Guo, S., Wang, X., Pang, C., Zhan, Y., Chen, Y. and An, H. (2019). “Recent advances in TMEM16A: Structure, function, and disease.” *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 234, No. 6, pp. 7856–7873.

Ji, Y., Liu, Y., Xue, N., Du, T., Wang, L., Huang, R., Li, L., Yan, C. and Chen, X. (2019). “Cryptotanshinone inhibits esophageal squamous-cell carcinoma in vitro and in vivo through the suppression of STAT3 activation.” *OncoTargets and therapy*, Vol.12, pp. 883.

Jo, S., Yang, E., Lee, Y., Jeon, D. and Namkung, W. (2021). “Cinobufagin Exerts Anticancer Activity in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells through Downregulation of ANO1.” *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 22, No. 21, pp. 12037.

Kale, V. P., Amin, S. G. and Pandey, M. K. (2015). “Targeting ion channels for cancer therapy by repurposing the approved drugs.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, Vol. 1848, No. 10, pp. 2747–2755.

Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P. and Starosławska, E. (2015). “Breast cancer risk factors.” *Menopausal Review*, Vol. 3, pp. 196–202.

Keramidas, A., Moorhouse, A. J., Schofield, P. R. and Barry, P. H. (2004). "Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity." *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Vol. 86, No. 2, pp. 161–204.

Kim, H. J., Lee, P. C.-W. and Hong, J. H. (2022). "Chloride Channels and Transporters: Roles beyond Classical Cellular Homeostatic pH or Ion Balance in Cancers." *Cancers*, Vol. 14, No. 4, pp. 856.

Kim, J. B. (2014). "Channelopathies", *Korean Journal of Pediatrics*, Vol. 57, No. 1, pp. 1–18.

Kolak, A., Kamińska, M., Sygit, K., Budny, A., Surdyka, D., Kukielka-Budny, B. and Burdan, F. (2017). "Primary and secondary prevention of breast cancer." *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, Vol. 24, No. 4, pp. 549–553.

Kozono, D., Yasui, M., King, L. S. and Agre, P. (2002). "Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine." *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 109, No. 11, pp. 1395–1399.

Kunzelmann, K. (2005). "Ion Channels and Cancer." *The Journal of Membrane Biology*, Vol. 205, No. 3, pp. 159.

Kunzelmann, K., Ousingsawat, J., Benedetto, R., Cabrita, I. and Schreiber, R. (2019). "Contribution of Anoctamins to Cell Survival and Cell Death." *Cancers*, Vol. 11, No. 3, pp. 382.

Lang, F. and Stournaras, C. (2014). "Ion channels in cancer: future perspectives and clinical potential." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 369, No. 1638, pp. 20130108.

Leanza, L., Biasutto, L., Managò, A., Gulbins, E., Zoratti, M. and Szabò, I. (2013). "Intracellular ion channels and cancer." *Frontiers in Physiology*, Vol. 4, pp. 227.

Lee, A. V., Oesterreich, S. and Davidson, N. E. (2015). "MCF-7 Cells--Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years." *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 7, pp. 107.

Lee, J. Y., Park, Seong Jun, Park, Sung Jun, Lee, M. J., Rhim, H., Seo, S. H. and Kim, K. S. (2006). "Growth inhibition of human cancer cells in vitro by T-type calcium channel blockers." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 16, No. 19, pp 5014–5017.

Li, C. I., Uribe, D. J. and Daling, J. R. (2005). “Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer.” *British Journal of Cancer*, Vol. 93, No. 9, pp.1046–1052.

Li, H., Gao, C., Liu, C., Liu, L., Zhuang, J., Yang, J., Zhou, C., Feng, F., Sun, C. and Wu, J. (2021). “A review of the biological activity and pharmacology of cryptotanshinone, an important active constituent in Danshen.” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Vol. 137, pp. 111332.

Li, H., Yu, Z., Wang, H., Wang, N., Sun, X., Yang, S., Hua, X. and Liu, Z. (2022). “Role of ANO1 in tumors and tumor immunity.” *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, Vol. 148, No. 8, pp. 2045–2068.

Li, X., Li, W., Yang, P., Zhou, H., Zhang, W. and Ma, L. (2021). “Anticancer effects of Cryptotanshinone against lung cancer cells through ferroptosis.” *Arabian Journal of Chemistry*, Vol. 14, No. 6, pp. 103177.

Li, Z., Chen, K., Cui, C., Wang, Y. and Wu, D. (2022). “Cryptotanshinone increases the sensitivity of liver cancer to sorafenib by inhibiting the STAT3/Snail/epithelial mesenchymal transition pathway.” *Frigid Zone Medicine*, Vol. 2, No. 2, pp. 119–128.

Lima, S. M., Kehm, R. D. and Terry, M. B. (2021). “Global breast cancer incidence and mortality trends by region, age-groups, and fertility patterns.” *EClinicalMedicine*, Vol. 38, pp. 100985.

Liu, Y., Liu, Z. and Wang, K. (2021). “The Ca^{2+} activated chloride channel ANO1/TMEM16A: An emerging therapeutic target for epithelium-originated diseases?” *Acta Pharmaceutica Sinica B*, Vol. 11, No. 6, pp. 1412–1433.

Ma, K., Wang, H., Yu, J., Wei, M. and Xiao, Q. (2017). “New Insights on the Regulation of Ca^{2+} Activated Chloride Channel TMEM16A: NEW INSIGHTS ON THE TMEM16A REGULATION.” *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 232, No. 4, pp. 707–716.

Malone, K. E., Daling, J. R., Thompson, J. D., O’Brien, C. A., Francisco, L. V. and Ostrander, E. A. (1998). “BRCA1 mutations and breast cancer in the general population: analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history.” *JAMA*, Vol. 279, No. 12, pp. 922–929.

Martinac, B. and Poole, K. (2018). “Mechanically activated ion channels.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 97, pp. 104–107.

McPherson, K., Steel, C. M. and Dixon, J. M. (2000). “Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics.” *BMJ, British Medical Journal*, Vol. 321, No. 7261, pp. 624–628.

Moleyar-Narayana, P. and Ranganathan, S. (2022). “Cancer Screening.” *StatPearls*, p. 1-18.

Monteith, G. R., Davis, F. M. and Roberts-Thomson, S. J. (2012). “Calcium Channels and Pumps in Cancer: Changes and Consequences.” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 287, No. 38, pp. 31666–31673.

Mubarik, S., Yu, Y., Wang, F., Malik, S. S., Liu, X., Fawad, M., Shi, F. and Yu, C. (2022). “Epidemiological and sociodemographic transitions of female breast cancer incidence, death, case fatality and DALYs in 21 world regions and globally, from 1990 to 2017: An Age-Period-Cohort Analysis.” *Journal of Advanced Research*, Vol. 37, pp. 185–196.

Nowicka-Bauer, K. and Szymczak-Cendlak, M. (2021). “Structure and Function of Ion Channels Regulating Sperm Motility An Overview.” *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 22, No. 6, pp. 3259.

Nugoli, M., Chuchana, P., Vendrell, J., Orsetti, B., Ursule, L., Nguyen, C., Birnbaum, D., Douzery, E. J., Cohen, P. and Theillet, C. (2003). “Genetic variability in MCF-7 sublines: evidence of rapid genomic and RNA expression profile modifications.” *BMC Cancer*, Vol. 1, pp. 1–12.

Olsen, M. L., Schade, S., Lyons, S. A., Amaral, M. D. and Sontheimer, H. (2003). “Expression of Voltage-Gated Chloride Channels in Human Glioma Cells.” *Journal of Neuroscience*, Vol. 23, No. 13, pp. 5572–5582.

Ozaki, S., Mikami, K., Kunieda, T. ve Tanaka, J. (2022). “Chloride Intracellular Channel Proteins (CLICs) and Malignant Tumor Progression: A Focus on the Preventive Role of CLIC2 in Invasion and Metastasis.” *Cancers*, Vol. 14, No. 19, pp. 4890.

Panyi, G., Beeton, C. and Felipe, A. (2014). “Ion channels and anti-cancer immunity.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 369, No. 1638, pp. 20130106.

Parisi, G. F., Mòllica, F., Giallongo, A., Papale, M., Manti, S. and Leonardi, S. (2022). “Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR): beyond cystic fibrosis.” *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, Vol. 23, No. 1, pp. 94.

Park, Y. R., Lee, S. T., Kim, S. L., Zhu, S. M., Lee, M. R., Kim, S. H., Kim, I. H., Lee, S. O., Seo, S. Y. and Kim, S. W. (2019). “Down-regulation of miR-9 promotes epithelial mesenchymal transition via regulating anoctamin-1 (ANO1) in CRC cells.” *Cancer Genetics*, Vol. 231, No. 232, pp. 22–31.

Patel, F. and Brackenbury, W. J. (2015). “Dual roles of voltage-gated sodium channels in development and cancer.” *The International Journal of Developmental Biology*, Vol. 59, No. 7, pp. 357–366.

Pless, S. A. and Ahern, C. A. (2015). “Introduction: Applying Chemical Biology to Ion Channels.” *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 869, pp. 1–4.

Poroca, D. R., Pelis, R. M. and Chappe, V. M. (2017). “ClC Channels and Transporters: Structure, Physiological Functions, and Implications in Human Chloride Channelopathies.” *Frontiers in Pharmacology*, Vol. 23, No. 8, pp. 151.

Prevarskaya, N., Skryma, R. and Shuba, Y. (2018). “Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies?” *Physiological Reviews*, Vol. 98, No. 2, pp. 559–621.

Quinn, K. and Beech, D. J. (1998). “A method for direct patch-clamp recording from smooth muscle cells embedded in functional brain microvessels.” *European Journal of Physiology*, Vol. 435, No. 4, pp. 564–569.

Ranade, S. S., Syeda, R. and Patapoutian, A. (2015). “Mechanically Activated Ion Channels.” *Neuron*, Vol. 87, No. 6, pp. 1162–1179.

Rao, V. R., Perez-Neut, M., Kaja, S. and Gentile, S. (2015). “Voltage-Gated Ion Channels in Cancer Cell Proliferation.” *Cancers*, Vol. 7, No. 2, pp. 849–875.

Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. and Weissman, I. L. (2001). “Stem cells, cancer, and cancer stem cells.” *Nature*, Vol. 414, No. 6859, pp. 105–111.

Rosendo-Pineda, M. J., Moreno, C. M. and Vaca, L. (2020). “Role of ion channels during cell division.” *Cell Calcium*, Vol. 91, pp. 102258.

Roux, B. (2017). “Ion channels and ion selectivity *Essays in Biochemistry*.” *Essays in biochemistry*, Vol. 61, No. 2, pp. 201–209.

Rubinstein, W. S., O'Neill, S. M., Rothrock, N., Starzyk, E. J., Beaumont, J. L., Acheson, L. S., Wang, C., Gramling, R., Galliher, J. M. and Ruffin, M. T. (2011). "Components of family history associated with women's disease perceptions for cancer: A report from the Family Healthware TM Impact Trial." *Genetics in medicine*, official journal of the American College of Medical Genetics, Vol. 13, No. 1, pp 52–62.

Russo, J., Hu, Y. F., Silva, I. D. C. G. and Russo, I. H. (2001). "Cancer risk related to mammary gland structure and development." *Microscopy Research and Technique*, Vol. 52, No. 2, pp. 204–223.

Ruta, V., Jiang, Y., Lee, A., Chen, J. and MacKinnon, R. (2003). "Functional analysis of an archaeobacterial voltage-dependent K⁺ channel." *Nature*, Vol. 422, No. 6928, pp. 180–185.

Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A. P., Donadi, R. S., Bologa, C. G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T. I. and Overington, J. P. (2017). "A comprehensive map of molecular drug targets." *Nature reviews. Drug discovery*, Vol. 16, No. 1, pp. 19.

Shin, D.-S., Kim, H.-N., Shin, K. D., Yoon, Y. J., Kim, S.-J., Han, D. C. and Kwon, B. M. (2009). "Cryptotanshinone inhibits constitutive signal transducer and activator of transcription 3 function through blocking the dimerization in DU145 prostate cancer cells." *Cancer Research*, Vol. 69, No. 1, pp. 193–202.

Smolarz, B., Nowak, A. Z. and Romanowicz, H. (2022). "Breast Cancer Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment." *Review of Literature, Cancers*, Vol. 14, No. 10, pp. 2569.

Sucher, N. J., Deitcher, D. L., Baro, D. J., Harris Warrick, R. M. and Guenther, E. (2000). "Genes and channels: patch/voltage-clamp analysis and single-cell RT-PCR." *Cell and Tissue Research*, Vol. 302, No. 3, pp. 295–307.

Sui, Y., Wu, F., Lv, J., Li, H., Li, X., Du, Z., Sun, M., Zheng, Y., Yang, L., Zhong, L., Zhang, X. and Zhang, G. (2015). "Identification of the Novel TMEM16A Inhibitor Dehydroandrographolide and Its Anticancer Activity on SW620 Cells." *PLoS ONE*, Vol. 10, No. 12, pp. 144715.

Sun, Y.-S., Zhao, Z., Yang, Z.-N., Xu, F., Lu, H.-J., Zhu, Z.-Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P.-P. and Zhu, H. P. (2017). "Risk Factors and Preventions of Breast Cancer." *International Journal of Biological Sciences*, Vol. 13, No. 11, pp. 1387–1397.

Tabassum, N. and Ahmad, F. (2011). “Ion Channels and their Modulation.” *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, Vol. 1, pp. 20–25.

Takata, K. (2004). “Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane.” *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 39, No. 1, pp. 1–83.

Torabi Dalivandan, S., Plummer, J. and Gayther, S. A. (2021). “Risks and Function of Breast Cancer Susceptibility Alleles.” *Cancers*, Vol. 13, No. 16, pp. 3953.

Ullrich, N. (1999). “The Role of Ion Channels in Cell Proliferation.” *The Neuroscientist*, Vol. 5, No. 2, pp. 70–73.

Urrego, D., Tomczak, A. P., Zahed, F., Stühmer, W. and Pardo, L. A. (2014). “Potassium channels in cell cycle and cell proliferation.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 369, No. 1638, pp. 94.

Vaeth, M. and Feske, S. (2018). “Ion channelopathies of the immune system.” *Current Opinion in Immunology*, Vol. 52, pp. 39–50.

Valenzuela, S. M., Mazzanti, M., Tonini, R., Qiu, M. R., Warton, K., Musgrove, E. A., Campbell, T. J. and Breit, S. N. (2000). “The nuclear chloride ion channel NCC27 is involved in regulation of the cell cycle.” *The Journal of Physiology*, Vol. 529, No. 3, pp. 541–552.

Volkers, L., Mechoukhi, Y. and Coste, B. (2015). “Piezo channels: from structure to function.” *European Journal of Physiology*, Vol. 467, No. 1, pp. 95–99.

Wang, H., Liu, Z., Guan, L., Li, J., Chen, S., Yu, W. and Lai, M. (2020). “LYW-6, a novel cryptotanshinone derived STAT3 targeting inhibitor, suppresses colorectal cancer growth and metastasis.” *Pharmacological Research*, Vol. 153, pp. 104661.

Wang, H., Yao, F., Luo, S., Ma, K., Liu, M., Bai, L., Chen, S., Song, C., Wang, T., Du, Q., Wu, H., Wei, M., Fang, Y. and Xiao, Q. (2019). “A mutual activation loop between the Ca²⁺ activated chloride channel TMEM16A and EGFR/STAT3 signaling promotes breast cancer tumorigenesis.” *Cancer letters*, Vol. 455, pp. 48–59.

Wang, H., Zou, L., Ma, K., Yu, J., Wu, H., Wei, M. and Xiao, Q. (2017). “Cell-specific mechanisms of TMEM16A Ca²⁺ activated chloride channel in cancer.” *Molecular Cancer*, Vol. 16, No. 1, pp. 152.

Wang, J., Zhang, G., Dai, C., Gao, X., Wu, J., Shen, L., Chen, Z. and Liu, P. (2017). “Cryptotanshinone potentiates the antitumor effects of doxorubicin on gastric cancer cells via inhibition of STAT3 activity.” *Journal of International Medical Research*, Vol. 45, No. 1, pp. 220–230.

Wang, K., Preisler, S. S., Zhang, L., Cui, Y., Missel, J. W., Grønberg, C., Gotfryd, K., Lindahl, E., Andersson, M., Calloe, K., Egea, P. F., Klaerke, D. A., Pusch, M., Pedersen, P. A., Zhou, Z. H. and Gourdon, P. (2019). “Structure of the human ClC-1 chloride channel.” *PLOS Biology*, Vol. 17, No. 4, pp. 218.

Wang, T., Wang, Hui, Yang, F., Gao, K., Luo, S., Bai, L., Ma, K., Liu, M., Wu, S., Wang, Huijie, Chen, Z. and Xiao, Q. (2021). “Honokiol inhibits proliferation of colorectal cancer cells by targeting anoctamin 1/TMEM16A Ca^{2+} activated Cl^- channels.” *British Journal of Pharmacology*, Vol. 178, No. 20, pp. 4137–4154.

Weber, G. F. (2007). “Molecular Mechanisms of Cancer.” Published by Springer, USA, p. 262-265.

Weigelt, B., Geyer, F. C. and Reis-Filho, J. S. (2010). “Histological types of breast cancer: How special are they?” *Molecular Oncology*, Vol. 4, No. 3, pp. 192–208.

White, J. P. M., Cibelli, M., Urban, L., Nilius, B., McGeown, J. G. and Nagy, I. (2016). “TRPV4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra.” *Physiological Reviews*, Vol. 96, No. 3, pp. 911–973.

Wu, L., Lian, W. and Zhao, L. (2021). “Calcium signaling in cancer progression and therapy.” *The FEBS Journal*, Vol. 288, No. 21, pp. 6187–6205.

Wu, Y. H., Wu, Y. R., Li, B. and Yan, Z.-Y. (2020). “Cryptotanshinone: A review of its pharmacology activities and molecular mechanisms.” *Fitoterapia*, Vol. 145, pp. 104633.

Xia, J., Wang, H., Li, S., Wu, Q., Sun, L., Huang, H. and Zeng, M. (2017). “Ion channels or aquaporins as novel molecular targets in gastric cancer.” *Molecular Cancer*, Vol. 16, No. 1, pp. 54.

Xu, H., Martinoia, E. and Szabo, I. (2015). “Organelle channels and transporters.” *Cell Calcium*, Vol. 58, No. 1, pp. 1–10.

Yang, T. and Colecraft, H. M. (2015). “Calmodulin regulation of TMEM16A and 16B Ca^{2+} activated chloride channels.” *Channels*, Vol. 10, No. 1, pp. 38–44.

Yang, Y., Cao, Y., Chen, L., Liu, F., Qi, Z., Cheng, X. and Wang, Z. (2018). “Cryptotanshinone suppresses cell proliferation and glucose metabolism via STAT3/SIRT3 signaling pathway in ovarian cancer cells.” *Cancer Medicine*, Vol. 7, No. 9, pp. 4610–4618.

Yang, Y. D., Cho, H., Koo, J. Y., Tak, M. H., Cho, Y., Shim, W. S., Park, S. P., Lee, J., Lee, B., Kim, B. M., Raouf, R., Shin, Y. K. And Oh, U. (2008). “TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance.” *Nature*, Vol. 455, No. 7217, pp. 1210–1215.

Yuan, D.P., Long, J., Lu, Y., Lin, J. and Tong, L. (2014). “The forecast of anticancer targets of cryptotanshinone based on reverse pharmacophore-based screening technology.” *Chinese Journal of Natural Medicines*, Vol. 12, No. 6, pp. 443–448.

Zamponi, G. W. (2016a). “Targeting voltage-gated calcium channels in neurological and psychiatric diseases.” *Nature Reviews, Drug Discovery*, Vol. 15, No. 1, pp. 19–34.

Zamponi, G. W. (2016b). “Targeting voltage-gated calcium channels in neurological and psychiatric diseases.” *Nature Reviews, Drug Discovery*, Vol. 15, No. 1, pp. 19–34.

Zhang, L., Chen, C., Duanmu, J., Wu, Y., Tao, J., Yang, A., Yin, X., Xiong, B., Gu, J., Li, C. and Liu, Z. (2018). “Cryptotanshinone inhibits the growth and invasion of colon cancer by suppressing inflammation and tumor angiogenesis through modulating MMP/TIMP system, PI3K/Akt/mTOR signaling and HIF-1 α nuclear translocation.” *International Immunopharmacology*, Vol. 65, pp. 429–437.

Zhang, W., Yu, W., Cai, G., Zhu, J., Zhang, C., Li, S., Guo, J., Yin, G., Chen, C. and Kong, L. (2021). “Retraction Note to: A new synthetic derivative of cryptotanshinone KYZ3 as STAT3 inhibitor for triple-negative breast cancer therapy.” *Cell Death & Disease*, Vol. 12, No. 6, pp. 1–1.

Zhang, X., Liu, M., Yang, F. and Ma, L. (2021). “Antiproliferative effect of cryptotanshinone against human non-small cell lung cancer cells through inactivation of lncRNA HOTAIR /p-Akt signaling pathway.” *Arabian Journal of Chemistry*, Vol. 14, No. 6, pp. 103150.

Zhang, Y., Wang, K. and Yu, Z. (2020). “Drug Development in Channelopathies: Allosteric Modulation of Ligand-Gated and Voltage-Gated Ion Channels.” *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 63, No. 24, pp. 15258–15278.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Berrin ÜSTÜNDAĞ

Doğum Tarihi: 06.06.1989

E-mail : berrin_cetin_236@hotmail.com

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2013
Yüksek Lisans	Farmasötik Teknoloji	Mersin Üniversitesi	2018
Doktora	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	

Görevler :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

- 1.
- 2.
- 3.