



## İN VİTRO, İN VİVO VE KLİNİK ÇALIŞMALARLA KANSER TEDAVİSİNDE KALSİYUM ELEKTROPORASYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Güney GÜRSOY<sup>1\*</sup>, Meriç Arda EŞMEKAYA<sup>2</sup>, Zehra ÇİÇEK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, 40100, Kırşehir, Türkiye

<sup>2</sup>Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik ABD, 06560, Ankara, Türkiye

<sup>3</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD, 06018, Ankara, Türkiye

**Özet:** Tıp ve biyoteknolojide birçok uygulamaya sahip olan elektroporasyon (EP), hücre membranını harici, kısa ve yüksek voltajlı elektrik pulsuları ile geçirgen hale getirmek için kullanılan bir yöntemdir. EP sonrasında hücre membranı boyunca artan molekül akışı gözlenir. Elektrokemoterapi (EKT), kemoterapi ile EP tekniğini birleştirerek tümörlerin palyatif tedavisi için kullanılmaktadır. Birçok anti-kanser uygulaması, kalsiyum (Ca<sup>2+</sup>) sinyallerini etkileyerek kanser tedavisinde hedef olarak Ca<sup>2+</sup> yollarını desteklemektedir. EKT uygulamasının yanı sıra Ca<sup>2+</sup> elektroporasyonun (CaEP) kullanılması ATP miktarının azalmasına bağlı olarak tümör hücrelerinin ölümüne neden olur. Bu derlemede, CaEP'nin mevcut in vitro, in vivo ve klinik çalışmaların deney sonuçlarının gözden geçirilmesi ve yeni bir anti-kanser tedavi yöntemi olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Elektroporasyon, Kalsiyum elektroporasyon (CaEP), Kanser

### Evaluation of Calcium Electroporation in Cancer Treatment with In Vitro, In Vitro and Clinical Studies

**Abstract:** Electroporation (EP), which has many applications in medicine and biotechnology, is a method used to make the cell membrane permeable with external, short and high voltage electrical pulses. After EP, an increased flow of molecules across the cell membrane is observed. Electrochemotherapy (ECT) is used for palliative treatment of tumors by combining chemotherapy and EP technique. Many anti-cancer applications support Ca<sup>2+</sup> pathways as a target in cancer treatment by affecting calcium (Ca<sup>2+</sup>) signals. The use of Ca<sup>2+</sup> electroporation (CaEP) instead of ECT application causes the death of tumor cells due to the decrease in the amount of ATP. In this review, it is aimed to review the experimental results of existing in vitro, in vivo and clinical studies of CaEP and to evaluate it as a new anti-cancer treatment method.

**Keywords:** Electroporation, Calcium electroporation (CaEP), Cancer

\*Sorumlu yazar (Corresponding author): Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, 40100, Kırşehir, Türkiye

E mail: gursoy.guney@gmail.com (G. GÜRSOY)

Güney GÜRSOY <https://orcid.org/0000-0003-1849-9068>

Meriç Arda EŞMEKAYA <https://orcid.org/0000-0003-0469-4954>

Zehra ÇİÇEK <https://orcid.org/0000-0003-3205-5463>

**Gönderi:** 24 Mart 2022

**Kabul:** 09 Mayıs 2022

**Yayınlanma:** 01 Eylül 2022

**Received:** March 24, 2022

**Accepted:** May 09, 2022

**Published:** September 01, 2022

**Cite as:** Gürsoy G, Eşmekaya MA, Çiçek Z. 2022. Evaluation of calcium electroporation in cancer treatment with in vitro, in vitro and clinical studies. BSJ Health Sci, 5(3): 585-590.

### 1. Giriş

EP, hücreye yüksek yoğunluklu, pulslu elektrik alan (EA) uygulandığı ve membran potansiyelinin kritik bir değeri aştığı durumda hücre membranında geçici olarak nanometre (nm) boyutunda porların oluştuğu biyofiziksel bir olaydır (Dev ve ark., 2000; Miklavcic ve Kotnik, 2004). EP, genellikle hücre zarını geçemeyen hidrofilik moleküllerin ve iyonların hücrelere girmesine olanak sağlar (Ramos ve ark., 2004). Standart bir EP uygulamasında, yoğun EA pulsuları, uygun elektrotlar tarafından hücrelere iletilir ve plazma membranının iletkenliğinde ve geçirgenliğinde hızlı bir artışa neden olur. Elektro-permeabilizasyon bir eşik olgusudur ve puls parametrelerinin özelliklerine bağlı olarak geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz por oluşumuna neden olur (Golberg ve ark., 2010). Porlar, mikrosaniye (µs) içinde oluşur ve uygulanan EA pulsularının büyüklüğüne ve

süresine bağlı olarak saniye (s) veya dakika (dk)'lar süresinde yeniden kapanmaya başlar (Pavlin ve ark., 2005). EP yöntemi, klinik olarak Avrupa'da 140'tan fazla merkezde anti-kanser tedavisi için kemoterapötik ilaçlarla kombine halinde kullanılmaktadır (Belehradek ve ark., 1993; Heller ve ark., 1998; Curatolo ve ark., 2012; Matthiessen ve ark., 2012; Mozzillo ve ark., 2015). EKT, kemoterapötik ilacın hücre içine alınımı ve dolayısıyla sitotoksitesini önemli ölçüde artırır (Gehl ve ark., 1998). Çoğu anti-kanser uygulaması, Ca<sup>2+</sup> sinyallerini etkileyerek kanser tedavisinde hedef olarak Ca<sup>2+</sup> yollarını desteklemektedir (Bergner ve Huber, 2008). Ca<sup>2+</sup> birçok fizyolojik olayda görev alan ikincil habercidir ve zamana, yere, genliğe, frekansa ve süreye bağlı olarak hücre ölümü de dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde rol oynar (Florea ve Busselberg, 2009).

Dolayısıyla bu derlemede, kemoterapötik ajanların yanı



sıra  $Ca^{+2}$  ile kombinasyon halinde EP (CaEP) uygulamasıyla in vitro, in vivo ve klinik çalışmaların deney sonuçlarının gözden geçirilmesi ve yeni bir anti-kanser tedavi yöntemi olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

### 2. Kalsiyum Homeostaz: Sağlıklı ve Kanser Hücrelerinde

$Ca^{+2}$  plazma membranı boyunca 10-20.000 kat konsantrasyon gradyanına sahiptir. Bu nedenle hücre, kalsiyumu farklı proteinlere bağlanarak şelatlamak, endoplazmik retikulum (ER) ve mitokondri gibi organellere bölmek veya iyon homeostazını sürdürmek için farklı pompalar (ATPazlar) ve değiştiriciler kullanarak kalsiyumu hücre dışına çıkarmak zorundadır (Berridge ve ark., 2000; Brini ve Carafoli, 2000; Berridge ve ark., 2003).  $Ca^{+2}$  esas olarak endoplazmik retikulum (ER), sarkoplazmik retikulum (SR, kas hücrelerinde) ve mitokondride depolanır. Sarko-endoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz (SERCA), kalsiyumu ER ve SR'ye pompalar (Lytton ve ark., 1992; Brini ve Carafoli, 2000). Mitokondri içindeki  $Ca^{+2}$ , organelin işlevini, hareketini ve canlılığını düzenleyebilir. Artmış mitokondriyal  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu, ATP üretimini artırarak mitokondriyal metabolizmayı modüle edebilir. Ancak mitokondriyal membran geçirgenliği hücre ölümünü, apoptozu veya nekrozu da tetikleyebilir.  $Ca^{+2}$ , ATP'ye bağımlı plazma zarı  $Ca^{+2}$ ATPaz (PMCA) ve ATP'den bağımsız  $Na^{+}/Ca^{+2}$ -değiştirici (NCX) ve  $Na^{+}/Ca^{+2}/K^{+}$ -değiştirici (NCKX) tarafından hücre içinden uzaklaştırılır (Armstrong, 2006; Clapham, 2007; Decuypere ve ark., 2011). Kanser hücrelerinde  $Ca^{+2}$  sinyallerini düzenlemede yer alan proteinler, çoğalmayı sürdürmek ve hücre ölümünü önlemek için normal hücrelere kıyasla sıklıkla düzenlenirler (Roderick ve Cook, 2008).  $Ca^{+2}$  kanalları, pompalar ve  $Ca^{+2}$  değiştiricilerin tümü, normal hücrelerde olduğu gibi kanser hücrelerinde de bulunur fakat bunların lokalizasyonu ve etkinliği farklı olabilir. SERCA2 ve SERCA3 ekspresyonunda bir azalma birkaç farklı kanser hücre hattında ve tümör numunesinde gözlenmiştir. Kanser hücrelerinde, SERCA2 ve SERCA3'ü kodlayan genlerdeki değişiklikler, kalsiyumun sitozolden ER'ye taşınmasını azaltılabileceğini gösterir (Gelebart ve ark., 2002; Endo ve ark., 2004; Bergner ve ark., 2009). Hücrelerin artan farklılaşmasıyla birlikte, normal hücreler ve dokulara kıyasla kanser hücrelerinde ve tümör dokularında PMCA4 ekspresyonunun arttığı ve en düşük PMCA4 ekspresyonunun gözlemlendiği PMCA değişiklikleri de gösterilmiştir (Aung ve ark., 2007; Ribiczey ve ark., 2007; Aung ve ark., 2009; Ruscho ve ark., 2012).

### 3. Elektroporasyon

Hücre membranının lipit çift tabakası içine kararlı bir şekilde gömülü bir dizi farklı protein yapı vardır. Bu yapılar, kanallar ve pompalar olarak işlev görür ve zar boyunca belirli molekülleri taşımada önemli bir rol oynar. Bu proteinler olmasaydı, membran büyük ölçüde aşılmaz

bir bariyer olurdu. Elektriksel olarak hücre membranı, her iki tarafı sulu elektrolit çözeltileriyle çevrelenmiş ince bir yalıtım tabakası olarak görülebilir. Hücre membranı yeterince güçlü bir EA maruz kaldığında elektriksel bozulmaya uğrar ve membranı geçemeyen moleküller için geçirgen hale gelir (Coster ve Simmermann, 1975; Chang ve ark., 1992; Chen ve ark., 2006).

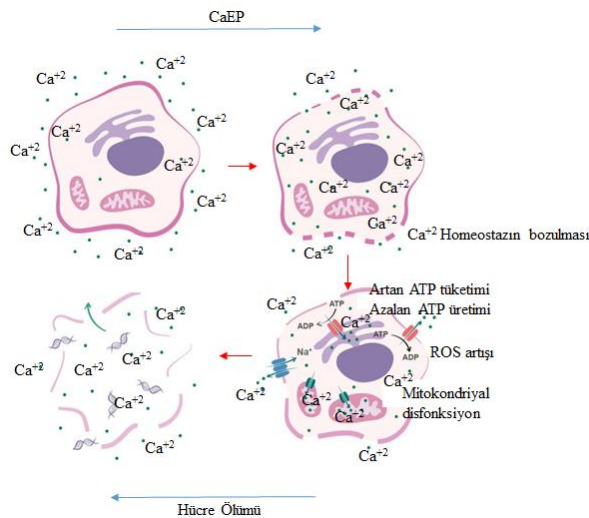
EP, hücre membranında nm boyutunda geçici porlar oluşturmak üzere hücre ve dokulara kısa zamanlı ve çok kuvvetli elektrik pulsları uygulanması işlemidir. EP'nin etkinliği, uygulanan elektrik pulsu parametrelerine (Pulsun şekli, sayısı, süresi ve şiddeti) bağlıdır. Membran elektroporasyonunu sağlayan uygulamalar oldukça kısa süreli (mikrosaniye ( $\mu s$ ), milisaniye (ms)) ve E alan şiddeti ise kV/cm'ler düzeyindedir. Membran boyunca uygulanan EA, hücre membranının lipit moleküllerinde kimyasal değişiklik meydana getirilmeden, pozitif ve negatif yüklerin membran boyunca birikmesine ve konumlarını değiştirmelerine sebep olur. Membran yapısındaki bu değişim hareketine "*flip-flop hareketi*" denir ve böylece EP, büyük moleküllerin hücre içine girişine olanak sağlar. EP yöntemi, kemoterapötik ilaçlar, genler veya kalsiyum gibi farklı iyonları veya molekülleri hücrelere sokmak için in vitro, in vivo ve klinikte kullanılır (Tsong, 1991; Jaroszeski ve ark., 2000; Frandsen ve ark., 2012; Falk ve ark., 2018). EP, puls parametrelerinin özelliklerine bağlı olarak *geri dönüşümlü* veya *geri dönüşümsüz* por oluşumuna neden olur. Hücre membranında geçici sulu gözeneklerin oluşumunu tetiklemek için, uygulanan E alan 200 mV-1V aralığında kritik bir değere ulaşmalıdır. EA şiddeti eşik değerinin altında tutulursa, hücre membranı orijinal durumunu geri kazanabilir ve böylece geri dönüşümlü EP'den bahsedilebilir. Eğer EA eşik değeri aşarsa, hücre membranı hasar görür ve hücre canlılığı tehlikeye girer bu durum ise geri dönüşümsüz EP'dir (Jaroszeski ve ark., 2000; Puc ve ark., 2003; Rebersek ve Miklavcic, 2014). Geri dönüşümlü EP'de, hücre membranında artan geçirgenlik EA'nın kesilmesiyle birlikte belirli bir sürede azalır ve membran onarılır. Hücre homeostazı yeniden kurulur. Por'un kapanması, sıcaklığa, geçirgenlik derecesine, hücre iskeletinin bütünlüğüne ve hücre tipine bağlı olarak değişebilmektedir, sağlıklı hücreler in vitro kanser hücrelerinden daha hızlı onarım sağlar ve por kapanmasını etkiler (Orlowski ve Mir, 1993; Gehl, 2003; McNeil ve Steinhardt, 2003; Frandsen ve ark., 2016). Geri dönüşümlü EP, biyoteknolojide, tıpta, EKT ve gen elektrotransferinde (GET) kemoterapötikler ve nükleik asitler gibi membranı geçemeyen moleküllerin hücre membranından geçişine olanak sağlar (Lambricht ve ark., 2016; Campana ve ark., 2019).

EKT ile ilgili ilk klinik çalışma 1990-1991'de yapıldı (Belehradek ve ark., 1993). O tarihten itibaren EKT, kutanöz ve subkutan metastazlar gibi küçük tümörlerin tedavisinde, göğüs duvarı meme kanseri nüksleri gibi daha büyük tümörlerde ve iç organlardaki derin yerleşimli tümörlerin tedavisi için klinik çalışmalarda kullanıldı (Heller ve ark., 1998; Marty ve ark., 2006; Edhemovic ve ark., 2011, Matthiessen ve ark., 2012; Sersa ve ark., 2012;

Curatolo ve ark., 2012; Bianchi ve ark., 2016; Bimonte ve ark., 2016; Plaschke ve ark., 2017; Egeland ve ark., 2018; Gehl ve ark., 2018). Geri dönüşümsüz EP, özellikle spesifik anatomik konumları nedeniyle cerrahi veya termal ablasyon için uygun olmayan tümörleri tedavi etmek için fokal ablatif bir teknik olarak halihazırda kullanılmaktadır (Geboers ve ark., 2020). Bu nedenle EP, yeni veya mevcut ilaçlarla kombinasyon halinde in vitro, in vivo, pre-klinik ve klinik test edilebilir bir yöntemdir.

#### 4. Kalsiyum Elektroporasyon (CaEP)

Hücre membranı boyunca kalsiyum için konsantrasyon gradyanı, hücrel homeostazi korumak için sıkı bir şekilde düzenlenir. Normal hücrelerde, iyonize kalsiyumun hücre dışı konsantrasyonu yaklaşık 1 mM, hücre içi konsantrasyonu ise yaklaşık 100 nM civarında olacak şekilde tutulur (Brini ve Carafoli, 2000). Tümörigenez,  $Ca^{+2}$  pompaları ve kanallarının regülasyonu, hücre iskeleti ve membran onarımındaki değişiklikler yoluyla hücre kalsiyum homeostazını değiştirir. Bu durumda, aşırı  $Ca^{+2}$  yüklenmesi sonucu kanser hücrelerinde hücre ölümünün indüklenmesi gözlemlenebilir (Aung ve ark., 2007; Papp ve ark., 2012). Anti-kanser tedavisi olarak CaEP hakkındaki ilk bilimsel çalışmada ve sonraki yayınlarla da desteklenen bir etki mekanizması önerilmiştir (Şekil 1.). CaEP,  $Ca^{+2}$ -ATPaz ile diğer ATPazların artan aktivitesi ve ATP üretiminin azalması sonucu ATP tükenmesine bağlı olarak, hücre içi  $Ca^{+2}$  iyonlarının artışı sonucu mitokondri membranında porların oluşması ile meydana gelen elektrokimyasal gradyan kaybıyla ve reaktif oksijen türlerinin üretimi de dahil olmak üzere diğer hücrel etkiler ile apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümüne yol açar (Cerella ve ark., 2008; Hojman ve ark., 2008; Frandsen ve ark., 2012; Frandsen ve ark., 2017).



Şekil 1. Kanser hücrelerinde CaEP'nin etki mekanizması.

#### 5. İn Vitro, İn Vivo ve Klinik CaEP

CaEP'nin in vivo ve in vitro kanser hücrelerinin ölümünü indüklemekteki etkinliğini gösteren ilk klinik öncesi çalışma 2012'de yayınlandı. Yapılan çalışmada

araştırmacılar, CaEP'nin, ATP'nin artan hücrel kullanımının, mitokondri üzerindeki etkileri nedeniyle ATP üretiminin azalmasının ve ayrıca geçirgenleştirilmiş hücre mebranı yoluyla ATP kaybının bir kombinasyonu nedeniyle akut ATP tükenmesine neden olduğunu göstermişlerdir (Frandsen ve ark., 2012).

Yapılan in vitro bir çalışmada, Çin hamsteri akciğeri fibroblast hücre hattı (DC-3F), murin akciğer karsinom hücre hattı (Lewis Lung Carcinoma) ve insan lösemi hücre hattı (K-562) artan kalsiyum konsantrasyonu (0-5 mM) varlığında 1 Hz tekrarlamalı frekansında 99  $\mu$ s 'lik 8 kare puls parametrelerinde 1,2 kV/cm ve 1,4 kV/cm elektrik alan şiddetinde elektropore edildi. Uygulama sonrası 1 ve 2 günlük inkübasyon sonrasında hücre canlılığında doza bağlı bir azalma ölçülmüştür. Çalışmada, CaEP ve bleomisin kemoterapötik ilacı ile EKT uygulamasının hücre canlılıkları üzerinde benzer etkiler gözlenmiştir. Kalsiyum ve bleomisin'in olası bir katkı etkisi de araştırılmış olup sinerjik bir etki gözlenmemiştir. Çalışmada ayrıca, hücrelerin tek başına kalsiyum ile tedavisinin tek başına bleomisin ile karşılaştırıldığında hücre ölümünü indüklediğini, hücre canlılığında bir azalma sağladığını ancak bleomisin EP ile tedavi edilen hücreler kadar dramatik olmadığı bildirilmiştir (Frandsen ve ark., 2014).

H69 (EGFP ile transfekte edilmiş insan küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı) tümörleri nakledilen bir fare modelinde yapılan çalışmada, tümör çapı ortalama 6,2 mm olan fareler izotonik kalsiyum klorür çözeltisi (168 mmol/L  $CaCl_2$ ) enjeksiyonu ve 1,0 kV/cm'de 100 ms'lik 8 darbe kare puls EP parametrelerinde 6 mm plaka elektrot kullanılarak tedavi edildi. Çalışmada, klinik kullanım için onaylanmış kalsiyum klorür (168 mmol/L) enjeksiyonu ile tedavi edilen tümörlerin %89'unun nekroz ile elimine edilmesiyle önemli bir antitümör tepkisi indüklediği belirlenmiştir (Frandsen ve ark., 2012).

H69 (küçük hücreli akciğer kanseri), SW780 (mesane kanseri) ve U937 (lösemi) hücre hatları 1, 3 ve 5 mM kalsiyum konsantrasyonu ve 1Hz tekrarlamalı frekansında 8 kare puls ve 99  $\mu$ s süresince 0,8, 1,0, 1,2, 1,4 veya 1,6 kV/cm elektrik alan şiddeti ile tedaviden sonra hücre canlılıkları ve hücre içi ATP düzeylerini belirlemek için yapılan çalışmada, hem H69 hem de SW780 hücreleri, hücre içi ATP'de doza bağlı (kalsiyum konsantrasyonu ve elektrik alan) azalma ve düşük canlılık gösterdiği bulunmuştur (Hansen ve ark., 2015).

NMRI- *Foxn1*<sup>nu</sup> farelerinde metformin ile CaEP'nin tümör boyutu, hayatta kalma ve hücre içi ATP üzerindeki etkisini belirlemek için, in vivo yapılan bir diğer çalışmada, CaEP'nin tedavi edilen mesane kanseri tümörlerinin boyutunu ve ATP seviyesini önemli ölçüde azalttığı ancak CaEP ile birlikte metforminin, ne tümör boyutu ne de hayatta kalma ve ATP seviyesi üzerinde artan bir etkisi olmadığı belirlenmiştir (Frandsen ve ark., 2017).

Normal sıçan iskelet kası hücreleri (L6) ve kanser kas hücreleri (Wehi-164-Fibrosarkom) kullanılarak CaEP'nin etkinliği ve güvenliğini belirlemek için iki  $CaCl_2$  (0,5 mM ve 5 mM) konsantrasyonu ve EP (1000 V/cm, 1200 V/cm

ve 1500 V/cm) parametreleriyle birlikte yapılan çalışmada, Ca<sup>2+</sup> ile desteklenen EP'nin Wehi-164 hücreleri için sitotoksik olduğunu ve aynı zamanda normal kas hücreleri için güvenli olduğunu ve 0,5 mM Ca<sup>2+</sup> içeren EP, proliferasyonu artırmak için normal kas hücreleri L6'yı hafifçe uyardığı belirlenmiştir (Zielichowska ve ark., 2016).

3D sferoid hücre kültürü modeli ile kolorektal adenokarsinom (HT29), mesane geçiş hücreli karsinomu (SW780), meme adenokarsinomu (MDA- MB231) ve ayrıca birincil normal insan dermal fibroblastlarında (HDF-n) EKT ve CaEP'nin etkinliğini belirlemek için yapılan çalışmada, CaEP ve EKT'nin tedaviden üç gün sonra üç kanser hücresi sferoidinin hepsinde sferoid boyutunda net bir azalma meydana getirdiği, çarpıcı bir şekilde normal fibroblast sferoidlerinin boyutunun ne CaEP ne de EKT'den etkilenmediği belirlendi. Bu durum tümörlerin EKT gibi CaEP ile tedavi edildiğinde tümörü çevreleyen normal doku üzerinde sınırlı ölçüde olumsuz etkilere sahip olacağını ifade edilmiştir (Frandsen ve ark., 2015). C57BL/6JOLAHSd farelerinde yapılan in vivo çalışmada, 1300 V/cm, 100 µs, 1 Hz, 8 puls EP parametrelerinde ve 50-250 mM kalsiyum konsantrasyonunda CaEP'nin tümör damar sistemi üzerinde EKT'ye benzer şekilde hem normal hem de tümör kan damarlarının yapısında bozulma meydana getirdiği ve tedavi edilen alandaki daha küçük damarlar tahrip olurken, daha büyük damarlar hasar görmüş ancak işlevselliği koruduğu belirlenmiştir (Staresinic ve ark., 2018).

CaEP'nin tümör yanıtını ve EKT ile karşılaştırmak için yapılan randomize çift kör faz II çalışması yakın zamanda tamamlanan ilk klinik deneydir. Çalışmaya meme kanseri ve malign melanomlu 47 kutanöz metastazı olan yedi hasta dahil edilmiş olup, yanıt için toplam 37 metastaz değerlendirilmiştir. Tüm metastazlar, tümör içine 220 mmol/L kalsiyum klorür veya 1000 IU/ml bleomisin enjeksiyonu ile 5 kHz frekansta 8 darbe 100 µs, 400V EP parametreleri kullanılarak tedavi edildi. Tedaviden 7 gün sonra alınan biyopsiler, CaEP ve EKT ile tedavi edilen metastazlarda daha az sayıda kanser hücresi gösterdiği belirlenmiştir. 6 aylık bir takipten sonra, CaEP ve EKT ile tedavi edilen metastazların sırasıyla %66'sında (12/18) ve %68'inde (13/19) tam yanıt olarak bulunmuştur. Çalışmada, ilginç bir şekilde, EKT sonrası ortaya çıkan estetik olmayan hiperpigmentasyonun kalsiyum ile tedavi edilen metastazlarda görülmediği belirlenmiştir (Falk ve ark., 2018).

Yakın tarihte yapılan faz I klinik çalışmasında, CaEP'nin baş ve boyun bölgesindeki mukozal tümörler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Tekrarlayan baş ve boyun kanseri olan altı hasta, intratümöral kalsiyum enjeksiyonları (225 mmol/L) ve ardından 1000 V/cm, 1 Hz'de 100 µs'lik 8 darbe EP parametreleri ile genel anestezi altında tedavi edilerek tümör yanıtı PET/MRG taramaları üzerinde değerlendirilmiştir. Tedavinin güvenliği doğrulanarak ve herhangi bir yan etki, hiperkalsemi belirtisi veya kardiyak aritmi gözlenmediği bildirilmiştir. Klinik yanıtlar

tedaviden iki ay sonra gözlemlenmiş olup, MRG incelemesinde üç kısmi yanıt, bir stabil hastalık ve iki progresyon elde edilirken, PET incelemesinden bir kısmi metabolik hastalık, dördü stabil metabolik hastalıklı ve bir tanesi değerlendirilemez olarak belirlenmiştir. Çalışmada, 12 aylık gözlemden sonra bir hastada klinik hastalık kanıtı bulunamadığı bildirilmiştir (Plaschke ve ark., 2019).

Vissing ve arkadaşları yayınladıkları protokolle, çok merkezli ve randomize olmayan faz II çalışması ile kutanöz veya subkutan malignitesi olan 30 hastanın CaEP tedavisi ile ortaya çıkan birincil yanıtların tedaviden 2 ay sonra, ikincil yanıtların ise MRG ile tedavi yanıtı, anketler ve nitel görüşmeler ile değerlendirilip araştıracaklarını ve bilimsel yayın olarak sunulacağını bildirmişlerdir (Vissing ve ark., 2021).

### 6. Sonuç

Sonuç olarak, kemoterapötik ajanların yanı sıra son yıllarda yapılan çalışmalarda CaEP'nin hücrelere suprafizyolojik dozlarda kalsiyum verilmesi şiddetli ATP azalmasına bağlı olarak tümör hücrelerinin ölümüne neden olabilmektedir. CaEP uygulamasının EKT'ye benzer şekilde hızla kanser hücrelerini öldürdüğü ve sağlıklı hücrelerin etkilenmediği bir tedavi yöntemi olarak görülmektedir. Bu durum yan etkileri fazla ve pahalı olan kemoterapötik ilaçlar yerine kalsiyumun düşük sitotoksitesi, kolay hazırlama, taşıma, saklama prosedürlerine sahip olması, ucuz ve ulaşılabilir olması ile birlikte; günümüzde klinik uygulamalarda kullanılan elektroprotonerler sayesinde CaEP, kemoterapötik ilaçlar olmadan uygulanabilen etkili, yenilikçi bir kanser tedavi tekniğini temsil etmektedir.

### Katkı Oranı Beyanı

Konsept: G.G. (34%), M.A.E. (%33) ve Z.Ç. (%33), Tasarım: G.G. (34%), M.A.E. (%33) ve Z.Ç. (%33), Denetim: G.G. (34%), M.A.E. (%33) ve Z.Ç. (%33), Veri toplama ve/veya işleme: G.G. (34%), M.A.E. (%33) ve Z.Ç. (%33), Veri analizi ve/veya yorumlama: G.G. (34%), M.A.E. (%33) ve Z.Ç. (%33), Kaynak taraması: G.G. (34%), M.A.E. (%33) ve Z.Ç. (%33), Yazma: G.G. (34%), M.A.E. (%33) ve Z.Ç. (%33), Eleştirel inceleme: G.G. (34%), M.A.E. (%33) ve Z.Ç. (%33), Gönderim ve revizyon: G.G. (34%), M.A.E. (%33) ve Z.Ç. (%33). Tüm yazarlar makalenin son halini incelemiş ve onaylamıştır.

### Çatışma Beyanı

Yazarlar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedirler.

### Kaynaklar

- Armstrong JS. 2006. The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Mitochondrion*, 6(5): 225-234.
- Aung CS, Kruger WA, Poronnik P, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR. 2007. Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase expression during colon cancer cell line differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 355(4): 932-936.
- Aung CS, Ye W, Plowman G, Peters AA, Monteith GR, Roberts-

- Thomson SJ. 2009. Plasma membrane calcium ATPase 4 and the remodeling of calcium homeostasis in human colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 30(11): 1962-1969.
- Belehradek M, Domenge C, Luboinski B, Orłowski S, Behraderk J Jr, Mir LM. 1993. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial. *Cancer*, 72(12): 3694-3700.
- Bergner A, Kellner J, Tufman A, Huber RM. 2009. Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-homeostasis is altered in small and non-small cell lung cancer cell lines. *J Exp Clin Cancer Res*, 28(1): 25.
- Bergner A, Huber RM. 2008. Regulation of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store in cancer. *Anti Cancer Agents Med. Chem.* 8(7): 705-709.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. 2003. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(7): 517-529.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1: 11-21.
- Bianchi G, Campanacci L, Ronchetti M, Donati D. 2016. Electrochemotherapy in the Treatment of Bone Metastases: A Phase II Trial. *World J Surg*, 40(12): 3088-3094.
- Bimonte S, Leongito M, Granata V, Barbieri A, Del Vecchio V, Falco M, Nasto A, Albino V, Piccirillo M, Palaia R. 2016. Electrochemotherapy in pancreatic adenocarcinoma treatment: Pre-clinical and clinical studies. *Radiol Oncol*, 50(1): 14-20.
- Brini M, Carafoli E. 2000. Calcium signalling: A historical account, recent developments and future perspectives. *Cell Mol Life Sci*, 57(3): 354-370.
- Campana LG, Edhemovic I, Soden D, Perrone AM, Scarpa M, Campanacci L, Cemazar M, Valpione S, Miklavcic D, Mocellin S, Sieni E, Serša G. 2019. Electrochemotherapy - emerging applications technical advances, new indications, combined approaches, and multi-institutional collaboration. *Eur J Surg Oncol*, 45(2): 92-102.
- Cerella C, Diederich M, Ghibelli L. 2010. The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival. *Int J Cell Biol*, 2010: 546163. DOI: 10.1155/2010/546163.
- Chang DC, Chassy BM, Saunders JA, Sowers AE. 1992. Overview of Electroporation and Electrofusion, in *Guide to Electroporation and Electrofusion*, Academic Press: San Diego, US, pp: 1-6.
- Chen C, Smye SW, Robinson MP, Evans JA. 2006. Membrane electroporation theories: a review. *Med Biol Eng Comput*, 44(1-2): 5-14.
- Clapham DE. 2007. Calcium signaling. *Cell*, 131(6): 1047-1058.
- Coster HG, Simmermann U. 1975. The mechanism of electrical breakdown in the membranes of Valonai utricularis. *J Membrane Biol*, 22(1): 73-90.
- Curatolo P, Quaglino P, Marengo F, Mancini M, Nardo T, Mortera C, Rotunno R, Calvieri S, Bernengo MG. 2012. Electrochemotherapy in the treatment of Kaposi sarcoma cutaneous lesions: A two-center prospective phase II trial. *Ann Surg Oncol*, 19(1): 192-198.
- Decuyper JP, Monaco G, Bultynck G, Missiaen L, De Smedt H, Parys JB. 2011. The IP(3) receptor-mitochondria connection in apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1813(5): 1003-1013.
- Dev SB, Widera DP, Hofmann GA. 2000. Medical applications of electroporation. *IEEE Trans Plasm Sci*, 28(1): 206-223.
- Edhemovic I, Gadzijevec EM, Breclj E, Miklavcic D, Kos B, Zupanic A, Mali B, Jarm T, Pavliha D, Marcan M. 2011. Electrochemotherapy: A new technological approach in treatment of metastases in the liver. *Technol Cancer Res Treat*, 10(5): 475-485.
- Egeland C, Baeksgaard L, Johannesen HH, Lofgren J, Plaschke CC, Svendsen LB, Gehl J, Achiam MP. 2018. Endoscopic electrochemotherapy for esophageal cancer: A phase I clinical study. *Endosc Int Open*, 6(6): E727-E734.
- Endo Y, Uzawa K, Mochida Y, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Tanzawa H. 2004. Sarcoendoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>ATPase type 2 downregulated in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 110(2): 225-231.
- Falk H, Matthiessen LW, Wooler G, Gehl J. 2018. Calcium electroporation for treatment of cutaneous metastases; a randomized double-blinded phase II study, comparing the effect of calcium electroporation with electrochemotherapy. *Acta Oncol*, 57(3): 311-319.
- Florea AM, Busselberg D. 2009. Anti-cancer drugs interfere with intracellular calcium signaling. *Neurotoxicology*, 30: 803-810.
- Frandsen SK, Gehl J. 2017. Effect of calcium electroporation in combination with metformin in vivo and correlation between viability and intracellular ATP level after calcium electroporation in vitro. *Plos One*, 12(7): e018183948.
- Frandsen SK, Gibot L, Madi M, Gehl J, and Rols MP. 2015. Calcium electroporation: Evidence for differential effects in normal and malignant cell lines, evaluated in a 3D spheroid model. *Plos One*, 10(12): e0144028.
- Frandsen SK, Gissel H, Hojman P, Eriksen J, Gehl J. 2014. Calcium electroporation in three cell lines: A comparison of bleomycin and calcium, calcium compounds, and pulsing conditions. *Biochim Biophys Acta*, 1840(3): 1204-1208.
- Frandsen SK, Gissel H, Hojman P, Tramm T, Eriksen J, Gehl J. 2012. Direct therapeutic applications of calcium electroporation to effectively induce tumor necrosis. *Cancer Res*, 72(6): 1336-1341.
- Frandsen SK, McNeil AK, Novak I, McNeil PL, Gehl J. 2016. Difference in membrane repair capacity between cancer cell lines and a normal cell line. *J Membr Biol*, 249: 569-576.
- Geboers B, Scheffer HJ, Graybill PM, Ruarus AH, Nieuwenhuizen S, Puijk RS, Van den Tol PM, Davalos RV, Rubinsky B, De Gruijl TD, Miklavcic D, Meijerink MR. 2020. High-voltage electrical pulses in oncology: irreversible electroporation, electrochemotherapy, gene electrotransfer, electrofusion, and electroimmunotherapy. *Radiology*, 295(2): 254-272.
- Gehl J, Sersa G, Matthiessen LW, Muir T, Soden D, Occhini A, Quaglino P, Curatolo P, Campana LG, Kunte C. 2018. Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. *Acta Oncol*, 57(7): 874-882.
- Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM. 1998. Enhancement of cytotoxicity by Electropermeabilization: An improved method for screening drugs. *Anti Cancer Drugs*, 9(4): 319-325.
- Gehl J. 2003. Electroporation: Theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand*, 177(4): 437-447.
- Gelebart P, Kovacs T, Brouland JP, van Gorp R, Grossmann J, Rivard N, Panis Y, Martin V, Bredoux R, Enouf J. 2002. Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation. *J Biol Chem*, 277(29): 26310-26320.
- Golberg AL, Rubinsky B, Rubinsky B. 2010. A statistical model for multidimensional irreversible electroporation cell death in tissue. *Biomed Eng Online*, 26(9): 13.
- Hansen EL, Sozer EB, Romeo S, Frandsen SK, Vernier PT, Gehl J. 2015. Dose-dependent ATP depletion and cancer cell death following calcium electroporation, relative effect of calcium concentration and electric field strength. *Plos One*, 10(4): e0122973.
- Heller R, Jaroszeski MJ, Reintgen DS, Puleo CA, DeConti RC, Gilbert

- RA, Glass LF. 1998. Treatment of cutaneous and subcutaneous tumors with electrochemotherapy using intralesional bleomycin. *Cancer*, 83(1): 148-157.
- Hojman P, Gissel H, Andre FM. 2008. Physiological effects of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle. *Hum Gene Ther*, 19(11): 1249-1260.
- Jaroszowski MJ, Dang V, Pottinger C. 2000. Toxicity of anticancer agents mediated by electroporation in vitro. *Anticancer Drugs*, 11(3): 201-208.
- Lambricht L, Lopes A, Kos Š, Serša G, Prémat V, Vandermeulen G. 2016. Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery, *Expert Opinion Drug Deliv*, 13(2): 295-310.
- Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH. 1992. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem*, 267(20): 14483-14489.
- Marty M, Sersa G, Garbay JR, Gehl J, Collins CG, Snoj M, Billard V, Geertsen PF, Larkin JO, Miklavcic D. 2006. Electrochemotherapy An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *EJC Suppl*, 4: 3-13.
- Matthiessen LW, Johannesen HH, Hendel HW, Moss T, Kamby C, Gehl J. 2012. Electrochemotherapy for large cutaneous recurrence of breast cancer: A phase II clinical trial. *Acta Oncol*, 51(6): 713-721.
- McNeil PL, Steinhardt RA. 2003. Plasma membrane disruption: Repair, prevention, adaptation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19: 697-731.
- Miklavcic D, Kotnik T. 2004. Electroporation for electrochemotherapy and gene therapy. In: Markov MS (ed) *Bioelectromagnetic medicine*. Marcel Dekker, New York, US, pp: 637-656.
- Mozzillo N, Simeone E, Benedetto L, Curvietto M, Giannarelli D, Gentilcore G, Camerlingo R, Capone M, Madonna G, Festino L. 2015. Assessing a novel immuno-oncology-based combination therapy: Ipilimumab plus electrochemotherapy. *Oncoimmunology*, 4(6): e1008842.
- Orlowski S, Mir LM. 1993. Cell electropermeabilization: A new tool for biochemical and pharmacological studies. *Biochim Biophys Acta*, 1154(1): 51-63.
- Papp B, Brouland JP, Arbabian A, Gélébart P, Kovács T, Bobe R, Enouf J, Blank NV, Apáti A. 2012. Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer cell differentiation. *Biomolecules*, 2: 165-186.
- Pavlin M, Kanduser M, Rebersek M, Pucihar G, Hart FX, Magjarevic R, Miklavcic D. 2005. Effect of cell electroporation on the conductivity of a cell suspension. *Biophys J*, 88: 4378-4390.
- Plaschke CC, Bertino G, McCaul JA, Grau JJ, de Bree R, Sersa G, Occhini A, Groselj A, Langdon C, Heuveling DA. 2017. European Research on Electrochemotherapy in Head and Neck Cancer (EURECA) project: Results from the treatment of mucosal cancers. *Eur J Cancer*, 87: 172-181.
- Plaschke CC, Gehl J, Johannesen HH, Fischer BM, Kjaer A, Lomholt AF. 2019. Calcium electroporation for recurrent head and neck cancer: A clinical phase I study. *Laryngo-oscope Investig Otolaryngol*, 4(1): 49-56.
- Puc M, Kotnik T, Mir LM, Miklavčič D. 2003. Quantitative model of small molecules uptake after in vitro cell electropermeabilization. *Bioelectrochemistry*, 60(1-2): 1-10.
- Ramos A, Suzuki DO, Marques JL. 2004. Numerical simulation of electroporation in spherical cells. *J Artif Organs*, 28: 357-361.
- Reberšek M. and Miklavčič D. 2014. Cell Membrane Electroporation-Part 1: The equipment. *IEEE Electrical Insul Magaz*, 28(5): 14-23.
- Ribiczey P, Tordai A, Andrikovics H, Filoteo AG, Penniston JT, Enouf J, Enyedi A, Papp B, Kovacs T. 2007. Isoform-specific up-regulation of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>ATPase expression during colon and gastric cancer cell differentiation. *Cell Calcium*, 42(6): 590-605.
- Roderick HL, Cook SJ. 2008. Ca<sup>2+</sup> signalling checkpoints in cancer: Remodelling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer*, 8(5): 361-375.
- Ruscho JH, Brandenburger T, Strehler EE, Filoteo AG, Heinmoller E, Aumuller G, Wilhelm B. 2012. Plasma membrane calcium ATPase expression in human colon multistep carcinogenesis. *Cancer Invest*, 30(4): 251-257.
- Sersa G, Cufer T, Paulin SM, Cemazar M, Snoj M. 2012. Electrochemotherapy of chest wall breast cancer recurrence. *Cancer Treat Rev*, 38(5): 379-386.
- Staresinic B, Jesenko T, Kamensek U, Frandsen SK, Sersa G, Gehl J. 2018. Effect of calcium electroporation on tumour vasculature. *Scientific Rep*, 8: 9412.
- Tsong TY. 1991. Electroporation of cell membranes. *Biophys J*, 60(2): 297-306.
- Vissing M, Ploen J, Pervan M, Vestergaard K, Schnefeldt M, Frandsen SK, Rafaelsen SR, Lindhardt CL, Jensen LJ, Rody A, Gehl J. 2021. Study protocol designed to investigate tumour response to calcium electroporation in cancers affecting the skin: a non-randomised phase II clinical trial. *Bmj Open*, 11: e046779. DOI: 10.1136/bmjopen-2020-046779.
- Zielichowska A, Daczewska M, Saczko J, Michel O, Kulbacka J. 2016. Applications of calcium electroporation to effective apoptosis induction in fibrosarcoma cells and stimulation of normal muscle cells. *Bioelectrochemistry*, 109: 70-78.