

## İmipramin'in Mcf-7 Hücre Hattında Eag1 Potasyum Kanalları Üzerine Sitotoksik ve Elektrofizyolojik Etkileri

Barış UÇAR<sup>1\*</sup>, Ali AŞKIN<sup>2</sup>, Fatma SÖĞÜT<sup>3</sup>, Ülkü ÇÖMELEKOĞLU<sup>4</sup>, Hatice ORUÇ<sup>5</sup>, Ş. Necat YILMAZ<sup>6</sup>

<sup>1,2</sup>Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 33343, Mersin

<sup>3,4</sup>Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Bölümü, 33343, Mersin

<sup>5,6</sup>Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Bölümü, 33343, Mersin

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0003-2190-0131>

<sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0002-6862-8430>

<sup>3</sup><https://orcid.org/0000-0002-1108-8947>

<sup>4</sup><https://orcid.org/0000-0001-8060-6333>

<sup>5</sup><https://orcid.org/0000-0002-1086-713X>

<sup>6</sup><https://orcid.org/0000-0003-1759-3052>

\*Sorumlu yazar: ikiletki@gmail.com

### Araştırma Makalesi

#### Makale Tarihi:

Geliş tarihi: 24.05.2023

Kabul tarihi: 18.09.2023

Online Yayınlanma: 22.01.2024

#### Anahtar Kelimeler:

İmipramin

Eag1 potasyum kanalı

Meme kanseri

MCF-7 hücre hattı

Elektrofizyoloji

Sitotoksiste

### ÖZ

Kanser hücrelerinde bazı iyon kanallarının aşırı eksprese edilmesi dikkat çekmektedir. Bu iyon kanallarından biri de Ether à-go-go 1 (KCNH1, Kv10.1) (Eag1 K<sup>+</sup>) kanalıdır. Bu çalışmada, bir trisiklik antidepresan olan imipramin'in MCF-7 hücre hattında farklı konsantrasyonları kullanılarak, Eag1 K<sup>+</sup> kanalları üzerindeki sitotoksik ve elektrofizyolojik etkileri incelenmiştir. Sitotoksik etkisi MTT analizi yöntemiyle incelenirken, elektrofizyolojik etkisi yama-kenetleme tekniği ile araştırılmıştır. MTT analizi yöntemiyle elde edilen sonuca göre, imipramin'in MCF-7 hücreleri üzerinde kontrol grubuna göre 20 µM ve üzeri konsantrasyonlarının yaklaşık %85 oranında baskılayıcı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Yama-kenetleme deneylerinde MCF-7 hücrelerine 2µM, 5µM ve 20µM imipramin uygulanarak Eag1 K<sup>+</sup> kanalları üzerine etkisi incelenmiştir. Düşük doz olan 2µM imipramin'in kontrol grubuna göre Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımları yaklaşık %75, yüksek doz olan 20µM imipraminin ise Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımlarını yaklaşık %82 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir.

## Cytotoxic and Electrophysiological Effects of Imipramine on Eag1 Potassium Channels in The Mcf-7 Cell Line

### Research Article

#### Article History:

Received: 24.05.2023

Accepted: 18.09.2023

Published online: 22.01.2024

#### Keywords:

Imipramine

Eag1 potassium channel

Breast cancer

MCF-7 cell line

Electrophysiology

Cytotoxicity

### ABSTRACT

It is noteworthy that some ion channels are overexpressed in cancer cells. One of these ion channels is Ether à-go-go 1 (KCNH1, Kv10.1) (Eag1 K<sup>+</sup>) channel. In this study, the cytotoxic and electrophysiological effects of imipramine, a tricyclic antidepressant, on Eag1 K<sup>+</sup> channels were investigated by using different concentrations in the MCF-7 cell line. While its cytotoxic effect was investigated by MTT analysis method, the electrophysiological effect was investigated by patch-clamping technique. According to the result obtained from the MTT analysis method, it was determined that imipramine had an approximately 85% suppressive effect on MCF-7 cells at concentrations of 20 µM and above, compared to the control group. In patch-clamping experiments, the effects of 2µM, 5µM and 20µM imipramine on Eag1 K<sup>+</sup> channels were investigated in MCF-7 cells. It has been shown that low dose of 2µM imipramine inhibits Eag1

K<sup>+</sup> channel currents approximately 75% and the high dose of 20µM inhibits Eag1 K<sup>+</sup> channel currents approximately 82% compared to the control group.

---

**To Cite:** Uçar B., Aşkın A., Söğüt F., Çömelekoğlu Ü., Oruç H., Yılmaz ŞN. İmipramin'in Mcf-7 Hücre Hattında Eag1 Potasyum Kanalları Üzerine Sitotoksik ve Elektrofizyolojik Etkileri. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2024; 7(1): 263-275.

## 1. Giriş

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve büyümesi sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır ve metastaz yoluyla vücudun farklı doku ve organlarına yayılır. Tedavisi ve tanısında birçok uzmanlık dallarının iş birliği gerektirmektedir. Çok yaygın bir hastalık olan kanser dünya genelinde ikinci en büyük ölüm nedenidir. Dünya Sağlık örgütünün verilerine göre 2018 yılı içinde yaklaşık 9,6 milyon kişi bu hastalıktan yaşamını yitirmiştir. Kadınlarda en yaygın olarak meme, kolorektal, akciğer, servikal ve tiroid kanseri görüldüğü belirtilmektedir (URL 1).

Son zamanlarda yapılan bilimsel çalışmalarda kanserli hücrelerde bazı iyon kanallarının daha çok eksprese edildiği tespit edilmiştir (Stühmer ve ark., 2006). Özellikle meme kanseri hücrelerinde bol miktarda bu iyon kanalına rastlanmaktadır. Hücre zarında yer alan iyon kanalları, fizyolojik süreçlerde büyük bir öneme sahiptir ve iyon geçişlerini düzenlemektedir. Bu iyon kanalları, membran potansiyelindeki değişikliklere yanıt olarak iyonların kontrollü geçişini düzenleyen membran proteinleridir. Çoğu özel bir iyonu geçirmek için özelleşmiştir. Örnek olarak K<sup>+</sup> kanalları, K<sup>+</sup> ve Na<sup>+</sup> arasında seçim yaparak, K<sup>+</sup> 'nu geçirir. Tümör hücrelerinde voltaj kapılı iyon kanallarının varlığı, iyon kanalı araştırmalarının ilk yıllarından itibaren tespit edilmiştir. K<sup>+</sup> kanalları bunlardan biridir (Occhiodoro ve ark., 1998; Stühmer ve ark., 2006; Borowiec ve ark., 2007; Rodríguez-Rasgado ve ark., 2012; Wang ve ark., 2017). Voltaj kapılı K<sup>+</sup> kanalları (K<sub>v</sub>); düz kas kasılması, hücre hacmi ve hücre döngüsü evreleri kontrolü, kardiyak repolarizasyon ve tümör hücrelerinin proliferasyonu gibi çeşitli birçok fizyolojik süreçte yer alırlar (Nelson ve ark., 1990; Lang, 2007; Perrin ve ark., 2008; Blackiston ve ark., 2009; Asher ve ark., 2010). K<sub>v</sub> ailesi üyesi ether á go-go (Eag)- K<sup>+</sup> kanalları ilk defa 1969'da eter anestezisine tabi tutulan mutant *Drosophilamelanogaster*'de keşfedilmiştir (Kaplan ve Trout, 1969; Rodríguez-Rasgado ve ark., 2012). Bugüne kadar, 70'in üzerinde K<sub>v</sub> türü bilinmektedir, ancak bunlardan sadece birkaçı, hücre çoğalması ve tümör büyümesi ile doğrudan ilişkilendirilmiştir (Catterall ve ark., 2002; Stühmer ve ark., 2006). Eag 1 K<sup>+</sup> kanalları (Protein adı: Kv10.1, Gen adı: KCNH1, Bulunduğu lokus: 1q32) normal olarak beyinde, plasenta, testis ve adrenal bezde ve miyoblastlarda düşük seviyelerde ifade edilmektedir (Occhiodoro ve ark., 1998; Gutman ve ark., 2005; Wang ve ark., 2017). Fakat, çeşitli tümör hücrelerinde çok yüksek sıklıkta (>%70) anormal şekilde eksprese edilmektedir (Queiroz ve ark., 2006). Eag1 K<sup>+</sup> kanalları son zamanlarda kapsamlı bir şekilde araştırılmasına rağmen, tümör hücrelerinde ekspresyon mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır.

Eag1 K<sup>+</sup> kanalı normal dokularda sınırlı dağılımı ve kanser hücrelerinde yaygın dağılımı ve onkojenik özellikleri nedeniyle, tümör tanı ve teşhisi için birer faktör ve terapötik hedefler olarak

düşünülmektedir (Kaplan ve Trout, 1969). Bu özellikleri nedeni ile kanser tedavisinde ve tespitinde bilim insanlarının dikkatlerini bu kanallara çevirmesine neden olmuştur. Eag1 K<sup>+</sup> kanalı için kullanılan kanal blokerler, aktif olarak bölünen tümör hücrelerini baskılamaktadır (Pardo ve Stühmer, 2008). Kanal blokerlerine örnek olarak; bir trisiklik antidepresan olan imipramin ve bir antihistaminik olan astemizol verilebilir (Gavrilova-Ruch ve ark., 2002; García-Ferreiro ve ark., 2004). Ayrıca yine bazı K<sup>+</sup> kanal inhibitörleri (Dofetilid, Sotalol, 4-aminopiridin, Ubitilid vb.) Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımını engelleyici etkiye sahiptir. Bu inhibitörlerin Eag1 K<sup>+</sup> kanalı üzerinde etkisi, kanser için olası terapötik etken olarak düşünülebilir. Daha önce yapılmış bilimsel çalışmalarda da gösterildiği gibi, Eag1 K<sup>+</sup> kanalı ile transfekte edilen farelerde hücre proliferasyon artışı ve tümör oluşum davranışı gözlenirken, tümürlü dokularda bu kanalın blokerleriyle, hücre proliferasyonun yavaşladığı gösterilmiştir (Hemmerlein ve ark., 2006).

Günümüzde kanser çalışmalarının odağı haline gelmeye başlayan K<sub>v</sub> kanal ailesinin bir üyesi olan Eag1 K<sup>+</sup> kanalının en belirgin özelliği, sağlıklı hücrelerde kısıtlı, fakat pek çok tümör hücresinde yaygın olarak eksprese olmasıdır.

Çalışmamızda meme kanser hücre hattı olan MCF-7 üzerine imipramin maddesinin hücrede sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, bu hücre hattında Eag1 K<sup>+</sup> kanalları voltaj bağımlı oldukları için yama-kenetleme yöntemi ile kanal akımlarının kayıtları alınmıştır.

Elde edilen kayıtlarla bir antidepresan olan imipramin'in kanser hücre proliferasyonunu veya elektrofizyolojik olarak kanser hücre hattında Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımını engelleyip engellemediği incelenmiştir. Ek olarak, çalışmanın hedefi, literatürdeki boşlukları doldurarak daha önceki çalışmaların eksikliklerini tamamlamak ve araştırmacılara gelecekteki çalışmalarını planlama konusunda rehberlik etmektir. Bu sayede, elde edilen sonuçlar hem önceki çalışmalara katkıda bulunacak hem de ilerideki çalışmaların yolunu aydınlatacaktır.

## **2. Materyal ve Metot**

### *2.1. Hücre Kültürü*

Çalışmada MCF-7 meme kanseri hücre hattı (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Şap Enstitüsü, Hücre Kayıt No: 00092502) kullanılmıştır. MCF-7 hücrelerinin çoğaltılması ve pasajlanması Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji ABD hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin kültürü için %10 fetal sığır serumu (FBS, Gibco, 10082147), %2.5 L-glutamin (Thermo, 25030081), %1 amfoterisin (Thermo, 15290018), %1 penisilin+streptomisin (Thermo, 15140130) katkılı RPMI 1640 (Gibco, 52400-025) kullanılmıştır. Hücreler, besiyerleri 3 günde bir değiştirilerek, %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C sıcaklıktaki nemli inkübatörde (Sanyo MCO18) kültüre edilmiş ve çoğaltılmıştır. Hücreler %70- %80 civarı konfluent olduğunda tripsin-EDTA solüsyonu (Lonza, 17-161E) ile kaldırılarak pasajlanmış ve yeterince hücre elde edilmiştir.

## 2.2. MTT Analizi

MTT analizinde imipramin'in (Sigma-Aldrich, USA) 1, 10, 20, 50, 100, 200 ve 400  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları test edildi. 96 kuyucuklu planelere her bir konsantrasyon için  $n=4$  olacak şekilde kuyucuk başına  $1 \times 10^4$  hücre ekildi. Hücre ekiminden 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyer uzaklaştırılarak, yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda imipramin içeren besiyer hücrelerin üzerine konuldu. Kontrol grubuna ilaç içermeyen besiyer uygulandı. Bu besiyerler 24 saat sonra uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 200  $\mu\text{L}$  katkılı besiyer ve 50  $\mu\text{L}$  5 mg/mL MTT içeren çözelti ilave edildi. Hücreler 37 °C sıcaklıkta 4 saat inkübe edildi. Daha sonra hücrelerin üzerindeki besiyer çekildi ve her bir kuyucuğa 200  $\mu\text{L}$  dimetil sülfoksit (DMSO) ve pH değeri 10,5 olan glisin tamponundan 50  $\mu\text{L}$  ilave edildi. Zaman kaybetmeden ELISA cihazında 570 nanometre (nm) dalga boyunda kuyuların optik absorbans değerleri ölçüldü. MTT analizi neticesinde öncelikle imipramin'in  $\text{IC}_{50}$  değerini tespit etmek için 1, 10, 20, 50, 100, 200 ve 400  $\mu\text{M}$  dozları ile edinilen sonuçlarla absorbans-imipramin konsantrasyon eğrisi oluşturuldu. Graphpad Prism 9 adlı yazılım kullanılarak, elde edilen eğri sigmoidal bir eğriye denkleştirildi ve  $\text{IC}_{50}$  değerleri hesaplandı.

## 2.3. Yama-kenetleme Uygulaması

Kanal akım kayıtları tüm hücre modunda alınmıştır. Alınan kayıtlarda iç çapı 0,84 mm, dış çapı 1,5 mm ve duvar kalınlığı ise 0,66 mm olan borasilikat cam pipetler kullanılmıştır. Pipetler programlanabilir, otomatik pipet çekici (Sutter Instruments, P97, USA) ile çekilerek hazırlanmıştır. Kayıt aşamasındaki pipetler içeriği, 150 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM EGTA 10 mM HEPES (pH 7,3) olan pipet çözeltisi ile doldurulmuş ve kayıtlarda direnci 2-4  $\text{M}\Omega$  olan pipetler kullanılmıştır. Hücreler, 60 mm'lik petri kaplarına ekilmiş ve deney aşamasına kadar inkübatörde medyum içerisinde bekletilmiştir. Deneyden önce hücrelerin içinde bulunduğu medyum sıvısı, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM Glukoz, 10 mM HEPES (pH 7,3) içeriğine sahip olan banyo çözeltisi ile değiştirilmiştir.



Şekil 1. Yama-kenetleme kayıt düzeneği

Akım kayıtları için Multi Clamp 700 B amplifikatörü ve Digidata 1322A sayısal çevirici kullanılmış, elde edilen akım kayıtları Clampfit 10.3 yazılımı ile analiz edilmiştir (Axon Instruments, USA) (Şekil 1.). Kenetleme potansiyeli -40 mV ve başlangıç potansiyeli -120 mV olarak belirlendi. Voltaj kenetleme protokolü, 20 mV'lik adımlarla +120 mV'a kadar tamamlandı. Kayıtlarda 1-10 GΩ aralığındaki kenetleme dirençleri değerlendirmeye alındı. Deney grupları olarak imipramin uygulanmayan kontrol grubu ve MTT analizi sonucunda elde edilen IC<sub>50</sub> değerine yakın olacak şekilde seçilmiş 2µM (düşük), 5µM (orta) ve 20µM (yüksek) olan üç farklı konsantrasyon grubu seçilmiştir. Kanal akım kayıtları, içinde imipramin bulunan çözeltinin eklenmesinden sonraki 15. dakikada alınmıştır.

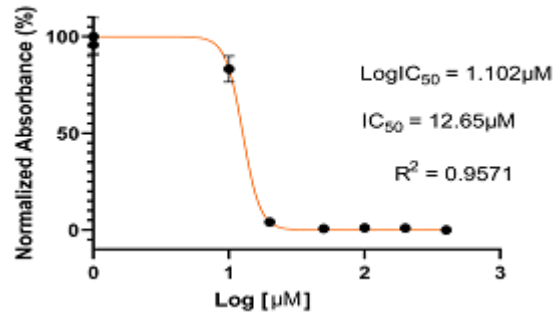
### 2.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics 25 programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıp dağılmadığına bakıldı. Gruplar arasında farkın olup olmadığını saptamak için non parametrik Kruskal Wallis testi uygulandı. Bu test grupları arasında fark olduğu için non parametrik bir test olan ve ikili karşılaştırma yapan Mann-Whitney U testi uygulandı. Veriler istatistiksel olarak ortalama ± standart sapma ve ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık olarak p<0.05 alındı.

## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3.1. Sitotoksosite Çalışmaları Sonuçları

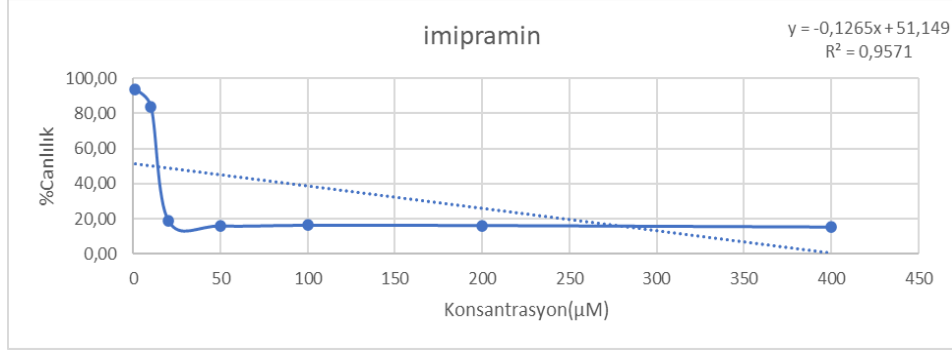
Bilimsel araştırmalar, kanser hücrelerinin sağlıklı hücelere kıyasla önemli ölçüde hızlı bir şekilde çoğalan hücreler olduğunu göstermektedir. Kanser hücrelerinin çoğalma hızını düşürme veya durdurma, günümüzde yapılan bilimsel çalışmaların temelini oluşturmaktadır. Çalışmada imipramin'in MCF-7 hücre proliferasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.



Şekil 2. İmipraminin doz-yanıt eğrisi. Seçilen dozların logaritması alınmaktadır.

Yapılan MTT analizi sonucunda, imipramin'in IC<sub>50</sub> değeri 12,65 µM olarak hesaplandı (Şekil 2.). Daha sonra canlı hücre sayımı yapılarak, proliferasyonun engellenip engellenmediği tespit edildi (Şekil 3.). MTT analizleri sonucunda imipramin'in MCF-7 hücre proliferasyonunu anlamlı şekilde

baskıladığı gözlenmiştir. Bu durum, imipramin'in kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılayabileceğini göstermektedir. Başka bir çalışmada, bu maddenin prostat kanseri gibi diğer başka kanser türlerinde de hücre proliferasyonunu baskılayıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Söğüt ve ark., 2021).



**Şekil 3.** İmipramin'in hücre canlılığı üzerine etkisi. Grafikte hücre canlılığı değerlerinin ortalaması alınmıştır.

İmipramin'in 1 µM konsantrasyonu, MCF-7 hücreleri üzerine kontrol grubuna göre yaklaşık %6 oranında, 10 µM konsantrasyonu ise kontrol grubuna göre yaklaşık %16 baskılamıştır. 1 µM ve 10 µM konsantrasyonlarda oluşan bu baskılama, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Fakat, 20 µM ve üzeri konsantrasyonları yaklaşık %85 oranında baskılayıcı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 1.). Bu etki istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ )

**Tablo 1.** İmipramin'in farklı dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisi

Konsantrasyon	% Canlılık
1 µM	93,825 ± 7,652
10 µM	83,540 ± 12,221
20 µM	18,648 ± 3,654*
50 µM	15,802 ± 2,102*
100 µM	16,174 ± 3,825*
200 µM	16,057 ± 1,607*
400 µM	15,215 ± 4,040*

MTT analizi verileri ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=5),  
 (\*) Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir ( $p < 0,05$ ).

DU-145 (Prostat kanseri hücre hattı) ile yapılan çalışmada 10, 50 ve 75 µM imipramin dozlarının hücre çoğalmasını azaltıcı etkiye sahip olduğunu, fakat bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ortaya konulmuştur (Söğüt ve ark., 2021). Yine DU-145 hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada düşük doz olan 1 µM imipramin'in anlamlı derecede proliferasyonu engellediğini belirlemişlerdir (Öztanrıverdi, 2019). Başka bir çalışmada, bu maddenin aynı dozları melanom hücrelerinin proliferasyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (Gavrilova-Ruch ve ark., 2002). SK-OV-3 ovaryum kanser hücreleri üzerine yapılan başka bir çalışmada da imipramin'in 50 µM konsantrasyonun kanser hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini belirlemişlerdir (Asher ve ark., 2011). 10 µM imipramin konsantrasyonun Burkitt Lenfoma tümör hücrelerinin boyutunu önemli ölçüde

azalttığı bildirilmiştir (Klingenberg ve ark., 2014). Diğer bir çalışmada akut miyeloid lösemide 0,15-0,075  $\mu\text{M}$  gibi düşük konsantrasyonlarda hücre ölümünde etkili olmuştur (Metts ve ark., 2017). Bu anlamda, bu çalışmadaki veriler, yapılan diğer çalışmalarla uyumludur. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 10  $\mu\text{M}$  astemizol konsantrasyonunda %89 oranında hücre proliferasyonunun inhibe ettiğini tespit etmişlerdir (Ouadid-Ahidouch ve ark., 2001). Fakat bu çalışmada, yaklaşık aynı oran hücre inhibisyonuna 20  $\mu\text{M}$  imipramin ile ulaşılmıştır.

Iyon kanallarının proliferasyonunda etkili olduğu bilinen mitojen uyarımlı protein sentezi, pH düzenlemesi, osmoregülasyon, hücre iskeleti yapınması, hücresekresyon, kalsiyum sinyalizasyonu üretimi gibi birçok farklı mekanizma bulunmaktadır. Fakat Eag1  $\text{K}^+$  kanallarının kanser hücre proliferasyonu ile olan ilişkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Imipramin, Eag1  $\text{K}^+$  kanallarının blokajı yoluyla tümör hücre proliferasyonunu inhibe etmek için birçok farklı çalışmada değerlendirilmiştir. Bu inhibisyonun, hücre döngüsü fazlarını etkilediği bilinmektedir. Diğer taraftan astemizol'ün hücre döngüsünün S fazını modüle ettiği bildirilmiştir (Borowiec ve ark., 2007).

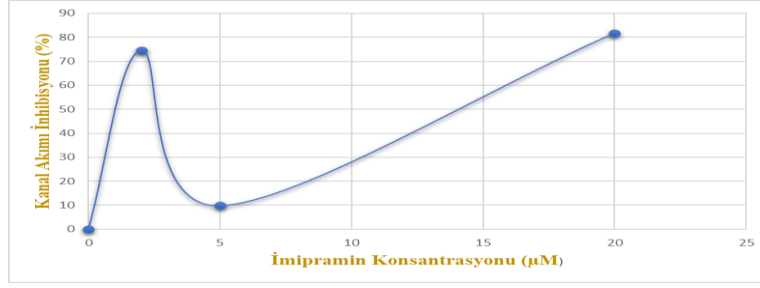
Imipramin de Eag ve Erg  $\text{K}^+$  kanal blokerleri gibi hücre döngüsünün bu fazlarını etkilemektedir. Bunun böyle olup olmadığını tespit edebilmek için daha fazla çalışma yapılmalıdır. Bu bulgular ışığında, bu çalışmada, imipramin kullanımının MCF-7 hücrelerinde görülen çoğalmanın inhibe edilmesinin Eag1  $\text{K}^+$  kanallarının engellenmesiyle gerçekleştiği ve ayrıca bu engellenmenin hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerle ilişkili olabileceği ileri sürülebilir.

### *3.2. Yama-Kenetleme Çalışmalarında Elde Edilen Sonuçlar*

Yapılan araştırmalar, kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelere kıyasla belirgin bir şekilde daha hızlı çoğalma yeteneğine sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Prolifere olan kanser hücrelerinde de bazı iyon kanallarının daha çok eksprese edildiği görülmüştür (Stühmer ve ark., 2006). Eag1  $\text{K}^+$  kanalları, kanser hücrelerinde çok yüksek sıklıkta (>%70) anormal şekilde eksprese edilmektedir (Queiroz ve ark., 2006). Eag1  $\text{K}^+$  kanallarının akciğer kanseri, meme kanseri, kolon kanseri, medulla blastoma, kan kanseri, solid kanserler, lenf kanseri ve prostat kanseri gibi farklı kanser türünde fazla miktarda ifade edildiği ve bu kanserlerin çoğalmasını artırıcı bir rol oynadığı belirtilmektedir. Böylece  $\text{K}^+$  kanalları, kanser tedavisinde hedef olarak görülmesini sağlamıştır (Pardo ve ark., 1999; Li ve Xiong, 2011).

Eag1  $\text{K}^+$  kanalları, kanser hücrelerinde yoğun bir şekilde eksprese olması nedeniyle hücre proliferasyonunu artırıcı etkiye sahiptirler.  $\text{K}^+$  kanal akımları imipramin, astemizol gibi farmakolojik ajanlarla inhibe edildiği ve proliferasyonda azalmaya neden olduğu belirtilmektedir (García-Ferreiro ve ark., 2004). Bu nedenle, bu çalışmada yama-kenetleme deneylerinde hücre proliferasyonunun baskılanıp baskılanmadığını tespit etmek için imipramin adlı antidepresan kullanıldı.

Yama-kenetleme deneylerinde MCF-7 hücrelerine imipramin'in üç dozu olan 2, 5 ve 20  $\mu\text{M}$  uygulanarak, Eag1  $\text{K}^+$  kanal akımları inhibisyon yüzdeleri incelenmiştir (Şekil 4.).



**Şekil 4.** İmipramin'in Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımları üzerine etkisi. Grafikte kanal akımları inhibisyonu değerlerinin ortalaması alınmıştır.

5 µM imipramin kontrol grubuna göre Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımlarını %9,79 gibi düşük oranda inhibe ettiği gözlenirken, 20 µM imipramin'in, ise Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımlarını %81,60 gibi yüksek oranda baskılamıştır (p <0.05). Ancak bu azalma, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p > 0.05). İmipramin'in düşük konsantrasyonu olan 2 µM grubu ise, kontrol grubu değerlerine göre Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımlarını %74,49 inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu inhibisyon, istatistiksel olarak anlamlıdır (p <0.05) (Tablo 2.).

**Tablo 2.** İmipramin'in Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımları üzerine etkisi

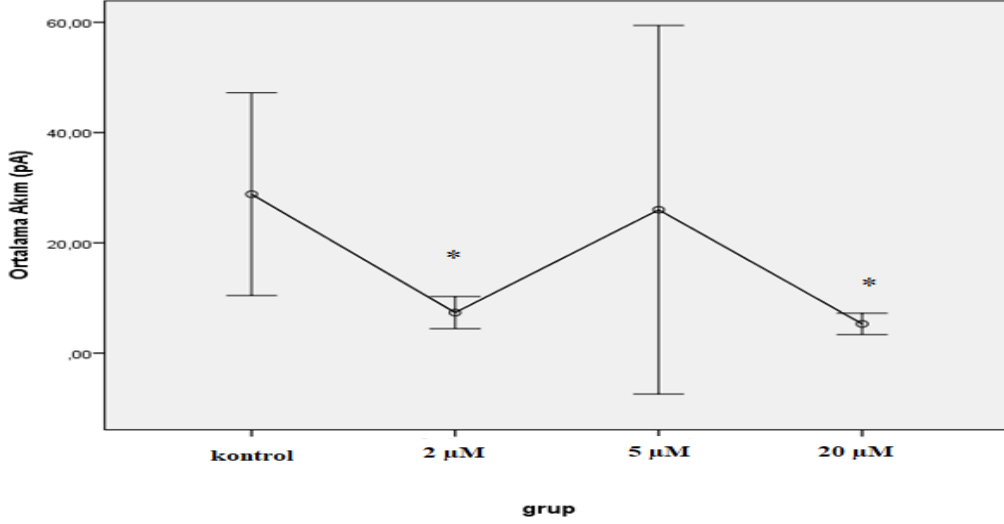
imipramin Konsantrasyonu,	ortalama akım değerleri (pA) ± standart hata,	kanal akımı inhibisyonu %
Kontrol (n=5)	28,828 ± 9,193	0
2 µM (n=6)	7,3533 ± 1,458 *	74,49
5 µM (n=3)	26,007 ± 16,716	9,79
20 µM (n=8)	5,3038 ± 0,969 *	81,60

(\*) Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir (p<0,05). Veriler Ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Kanal akımı inhibisyonu kontrole göre % olarak verilmiştir.

Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında, kontrol grubu ile 2 µM grubu değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Buna göre, 2 µM grubun akım değeri yaklaşık %75 oranında azalmıştır (p<0.05). Buna karşılık, 5 µM dozun akım değeri ortalama %10 oranında azalmıştır. Ancak bu dozdaki düşüş, istatistiksel olarak anlamlı değildir (p > 0.05). 20 µM grubun değerleri ile kontrol grubu verileri karşılaştırıldığında bu fark, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p <0.05). Bu dozun akım değeri, kontrol grubuna göre yaklaşık %82 oranında azalmıştır (Tablo 2.).

İmipramin'in dozlar arası akım değerlerinin karşılaştırmasındaki farka bakıldığında, bu maddenin 2 ile 20 µM konsantrasyonlarının arasındaki akım değerlerinin farkı, önemli bulunmamaktadır (p > 0.05). Buna karşın, 5 ile 20 µM konsantrasyonlarının arasındaki fark, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.05) (Şekil 5.).





**Şekil 5.** Ortalama akım değerinin doza bağlı değişimi. (\*) kontrole göre farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir ( $p < 0.05$ ).

Bu çalışmaya uygun şekilde, 20 µM konsantrasyondaki imipramin'in Eag K<sup>+</sup> kanalını blokaj yoluyla hücre proliferasyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiği ve 20 µM'dan daha yüksek konsantrasyonları apoptoza neden olduğu belirlenmiştir (Gavrilova-Ruch ve ark., 2002). Yine benzer şekilde, 25 µM imipramin dozunun doğrudan uygulanmasının, iç-dış yamalarda tam bir akım bastırmasına neden olduğu belirlenmiştir (García-Ferreiro ve ark., 2004).

Farklı bir çalışmada da nöroblastoma (N1E-115) hücrelerinde bulunan Eag1 K<sup>+</sup> kanallarında 10 µM imipramin konsantrasyonun K<sup>+</sup> akımlarını hemen hemen %40 oranında azalttığını göstermişlerdir (Ogata ve ark., 1989).

DU-145 üzerine yapılan çalışmada 10, 50 ve 75 µM imipramin dozlarının, Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımlarını anlamlı düzeyde azalttığını belirlemişlerdir (Söğüt ve ark., 2021). DU-145 hücrelerinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada, 1 µM imipramin uygulamasının Eag1 kanal akımlarında %66'lık bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Öztanrıverdi, 2019). İnsan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK-293) yama-kenetleme tekniği kullanarak, Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımlarını 2 µM konsantrasyonda imipramin'in bloke ettiğine dair elektrofizyolojik kanıtlar sunmuşlardır (García-Ferreiro ve ark., 2004). Bu çalışmada da imipramin'in MCF-7 hücrelerinde bulunan Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımını yaklaşık %75 oranında inhibe ettiği görülmektedir.

İmipramin ile farklı çalışmalarda, farklı kanser hücrelerinin Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımlarını inhibe edici etkisi gösterilmiştir. Bu çalışma sonuçları da diğer çalışmalar ile uyumludur.

İmipramin'in farklı dozları kullanılarak, yapılan MTT analizi çalışmasında; İmipramin'in MCF-7 hücrelerinde sitotoksik bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Daha önce yapılan benzer çalışmalar, imipramin'in, bu etkiyi Eag1 K<sup>+</sup> kanalı inhibisyonu ile gerçekleştirdiğini göstermektedir. Bu düşünceden hareketle, yama-kenetleme yöntemi ile Eag1 K<sup>+</sup> kanallarının kanal akım inhibisyonu değerlendirilmiştir. MTT analizi sonuçlarına göre, imipramin'in 20 µM konsantrasyonu, kanser hücre canlılığını yaklaşık %81 oranında engellediği bulunmuştur. Yama-kenetleme deneyinde de 20 µM konsantrasyonun kontrole göre, kanal akımını yaklaşık %81 oranında inhibe ettiğini belirlemiştir.

Kanal akımı inhibisyonu, hücre proliferasyonundaki azalmanın göstergesi olarak gösterilebilir (García-Ferreiro ve ark., 2004). Bu sonuçlar, MCF-7 hücrelerinde bulunan Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımını inhibe eden imipramin'in meme kanserinde tedavi edici bir ilaç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

MTT testleri kullanılarak IC<sub>50</sub> değeri 12,65 µM olarak hesaplanmıştır. Yama-kenetleme deneyi sonuçlarında 2 µM konsantrasyonda da kanal akımı kontrole göre %74,49 inhibe olmuştur.

Bu tez çalışmasında elde edilen verilere göre imipramin'in Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımlarını inhibe ettiğini göstermektedir. İmipramin ile Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımlarında meydana gelen bu değişim, meme kanseri tedavisinde potansiyel bir ilaç adayı olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmada Eag1 K<sup>+</sup> kanalı gen ekspresyonuna bakılmamış olması ve kanserli olmayan epitel dokuda kanal akımlarının kayıtlanamamış olması çalışmanın sınırlılıkları oluşturmaktadır. İleriki çalışmalar için bu etkilerin değerlendirilmesi hedeflenmektedir.

#### 4. Sonuçlar

Çalışmamızda MTT analizi ve yama-kenetleme tekniği kullanılarak, imipramin'in MCF-7 hücreleri üzerine stotoksitesisi ve Eag1 K<sup>+</sup> kanalları inhibisyonu değerlendirilmiştir. İmipramin'in MCF-7 hücrelerini belli konsantrasyonlarda proliferasyonunu engellediği ve Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımını bloke ettiği belirlenmiştir. Bu bulgular ışığında, imipramin'in kadınlarda meme kanserinde tedavi edici veya mevcut tedavi yöntemlerinin etkinliğini artırma potansiyeline sahip bir ilaç olabileceğine ilişkin sonuçlar elde edilmiştir. İmipramin'in 20 µM ve üzeri dozları MCF-7 meme kanseri hücrelerini %81,36 oranında öldürücü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. 2µM ve 20µM imipramin'in kontrole göre MCF-7 meme kanseri hücrelerinde Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımlarını yaklaşık %80 gibi yüksek oranda inhibe ettiği belirlenmiştir. İmipramin'in MCF-7 kanser hücreleri üzerinde öldürücü etkisinin kısmen kanal akım inhibisyonu ile gerçekleştiği söylenebilir. Yama-kenetleme deneyinde 20 µM imipramin konsantrasyonu, kanal akımını kontrole göre yaklaşık %80 oranında inhibe ederken, MTT analizinde de yine aynı konsantrasyonun yaklaşık %80 öldürücü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

İmipramin'in 2 µM'lık bu düşük konsantrasyonun Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımı inhibisyonu oluşturması, imipramin'in yan etkisini azaltma açısından önemli bir bulgudur. İmipramin ile uzun süre tedavi gören hastaların %20'sinde karaciğer anomalileri meydana geldiği bildirilmiştir. Ayrıca merkezi sinir sistemi ile ilgili yan etkilerde bildirilmiştir. Bunu yanı sıra, Eag K<sup>+</sup> kanal blokerleri, Erg K<sup>+</sup> kanalına da etki etmekte kalp rahatsızlığı riskini arttırmaktadır. Bu nedenle daha sonra yapılacak çalışmalarda, bu riskler de göz önüne alınarak, 2 µM'a yakın konsantrasyonların çalışılmasının, bu riskleri azaltması açısından avantaj olabileceği düşünülebilir.

İmipramin'in sadece meme kanseri için tedavi edici olmayabileceği, bunun yanında başka kanser türleri için de aynı etkileri gösterebileceği düşünülebilir. Kanser; meme kanseri, akciğer kanseri prostat kanseri gibi yüzden fazla tür ile genellenmektedir. Fakat tüm insanların DNA'larının birbirinden farklı olması, tüm kanser türlerinin farklı DNA'lara sahip olduğunu göstermektedir. Bu da

ortak bir tedavi yöntemini engelleyen en büyük etmendir. Nöroblastoma, meme, melanom, kolon, akciğer, servikal ve yumurtalık vb. kanser türlerinde Eag1 K<sup>+</sup> kanal protein ekspresyonu artmaktadır. Eag1 K<sup>+</sup> kanalının aşırı eksprese edilmesi, bu kanser türlerinin tedavisi için ortak bir hedef oluşmasına izin vermektedir. Bu çalışmada ve benzeri çalışmalarda, imipramin, astemizol, dofetilid, sotalol, 4-aminopiridin, ubitilid gibi maddelerin, bu kanalın bloke etmesinin, kanser hücrelerinin proliferasyonunu yavaşlattığı gösterilmiştir. Bu çalışmada olduğu gibi, Eag1 K<sup>+</sup> kanalının hedef olarak belirlenmesi, bazı kanser türleri için genel bir tedaviye imkân sağlayabilir. Bu durum, ortak bir kanser tedavisi için Eag1 K<sup>+</sup> kanalının önemli bir hedef olduğunu göstermektedir.

### **Teşekkür**

BAP (Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri) Birimi tarafından 2021-1-TP2-4276 numaralı proje ile desteklenmiştir.

### **Çıkar Çatışması Beyanı**

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

### **Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti**

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

### **Kaynakça**

- Asher V., Sowter H., Shaw R., Bali A., Kahn R. Eag and HERG potassium channels as novel therapeutic targets in cancer. *World Journal of Surgical Oncology* 2010; 8(113): 1-9.
- Asher V., Warren A., Shaw R., Sowter H., Bali A., Khan, R. The role of Eag and ERG channels in cell proliferation and apoptotic cell death in SK-OV-3 ovarian cancer cell line. *Cancer Cell International* 2011; 11(6): 1-7.
- Blackiston D., McLaughlin K., Levin, M. Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell Cycle* 2009; 8(21): 3527-3536.
- Borowicz A., Hague F., Harr N., Gue'Nin S., Guerineau F., Gouilleux F., Ouaïd-Ahıdouch H. IGF-1 activates hEAG KR channels through an akt-dependent signaling pathway in breast cancer cells: role in cell proliferation. *Journal of Cellular Physiology* 2007; 212(3): 690-701.
- Catterall, W., Chandy K., Gutman G. Introduction to the IUPHAR compendium of voltage-gated ion channels. *Pharmacological Reviews* 2005; 57(4): 385-385.
- García-Ferreiro R., Kerschensteiner D., Major F., Monje F., Stühmer W., Pardo L. Mechanism of block of hEag1 K<sup>+</sup> channels by imipramine and astemizole. *Journal of General Physiology* 2004; 124(4): 301-317.

- Gavrilova-Ruch O., Schönherr K., Gessner G., Schönherr R., Klapperstück T., Wohlrab W., Heinemann S. Effects of imipramine on ion channels and proliferation of igr1 melanoma cells. *The Journal of Membrane Biology* 2002; 188(2): 137–149.
- Gutman G., Chandy K., Grissmer S., Lazdunski M., Mckinnon D., Pardo L., Wang X. International union of pharmacology. LIII. nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews* 2005; 57(4): 473-508.
- Hemmerlein B., Weseloh R., Queiroz F., Knötgen H., Sánchez A., Rubio M., Pardo L. Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Molecular Cancer* 2006; 5(41): 1-13.
- Kaplan W., Trout W. The behavior of four neurological mutants of drosophila. *Genetics* 1969; 61(2): 399-409.
- Klingenberg M., Becker J., Eberth S., Kube D., Wilting J. The NADPH oxidase inhibitor imipramine-blue in the. *American Association for Cancer Research* 2014; 13(4): 833-841.
- Lang F. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *Journal of the American College of Nutrition* 2007; 26(5): 613-623.
- Li M., Xiong ZG. Ion channels as targets for cancer therapy. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology* 2011; 3(2): 156–166.
- Metts J., Bradley HL., Wang Z., Shah NP., Kapur R., Abiser JL., Bunting KD. Imipramine blue sensitively and selectively targets FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia cells. *Scientific Reports* 2017; 7(1): 1-10.
- Nelson M., Patlak J., Worley J., Standen N. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 1990; 259(28): 3-18.
- Occhiodoro T., Bernheim L., Liu JH., Bijlenga P., Sinnreich M., Bader C., Fischer-Lougheed, J. Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion. *FEBS Letters* 1998; 434(1-2): 177-812.
- Ogata N., Yoshii M., Narahashi T. Psychotropic drugs block voltage-gated ion channels in neuroblastoma cells. *Brain Research* 1989; 476(1): 140-144
- Ouadid-Ahidouch H., Bourhis X., Roudbaraki M., Toillon R., Delcourt P., Prevarskaya N. Changes in the K<sup>+</sup> current-density of MCF-7 cells during progression through the cell cycle: possible involvement of a h-ether.a-gogo K<sup>+</sup> channel. *Recept Channels* 2001; 7(5): 345-356.
- Öztañrıverdi O. Astemizol ve imipramin'in DU-145 prostat hücre hatlarına sitotoksik ve EAG1 kanalları üzerine elektrofizyolojik etkileri. Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, sayfa no:1-57, Mersin, Türkiye, 2019.
- Pardo LA., Stühmer W. Eag1: An emerging oncological target. *Cancer Research* 2008; 68(6):1611-1613.
- Perrin M., Subbiah R., Vandenberg J., Hill A. Human ether-a-go-go related gene (hERG) K<sub>v</sub> channels: function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2008; 98(2-3):137-148.

- Queiroz F., Suarez-Kurtz G., Stühmer W., Pardo, LA. Ether à go-go potassium channel expression in soft tissue sarcoma patients. *Molecular Cancer* 2006; 5(42): 1-10.
- Rodríguez-Rasgado JA., Acuña-Macía I., Camacho J. Eag1 channels as potential cancer biomarkers. *Sensors* 2012; 12(5): 5986–5995.
- Stühmer W., Alves F., Hartung F., Zientkowska M., Pardo AL. Potassium channels as tumour markers. *FEBS Letters* 2006; 580(12):2850-2852.
- Söğüt F., Çömelekoğlu Ü., Dervişoğlu H., Eroğlu P., Yalin S., Yılmaz N. Effect of imipramine on ether à-go-go potassium channel (Kv1.10) expression in DU145 prostate cancer cells. *Andrologia* 2021; 54(1):1-8.
- Wang X., Chen Y., Zhang Y., Guo S., Mo L., An H., Zhan Y. Eag1 Voltage-dependent potassium channels: structure, electrophysiological characteristics, and function in cancer. *The Journal of Membrane Biology* 2017; 250(2): 123-132
- URL 1: [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1). Cancer. (Erişim Tarihi 22 Aralık 2020; 12 22).