

T.C  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**İMİPRAMİNE'İN PROSTAT KANSERİNDE POTASYUM KANAL  
KİNETİKLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fatma SÖĞÜT

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

MERSİN-2014

T.C  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**İMİPRAMİNE'İN PROSTAT KANSERİNDE POTASYUM KANAL  
KİNETİKLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fatma SÖĞÜT

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

Bu tez Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE BF  
(FS) 2011-3 DR nolu proje olarak desteklenmiştir.


Tez No:.....40.....


MERSİN-2014


**Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

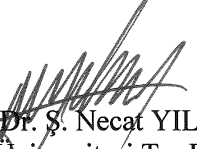
Biyofizik Anabilim Dalı Doktora Tez Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “İmipramine’in Prostat Kanserinde Potasyum Kanal Kinetikleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi: 27 /08 / 2014

  
Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı  
Jüri Başkanı


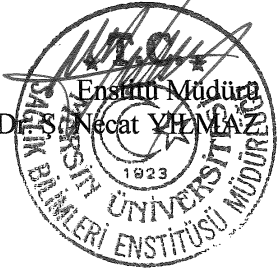
  
Prof. Dr. Nurten ERDAL  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

  
Prof. Dr. Serap YALIN  
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

  
Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim  
Dalı  
Jüri Üyesi

  
Prof. Dr. Handan TUNCEL  
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp  
Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 09.09.2014 tarih ve 2014/239 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ  


*Sevgili Babamın anısına...*

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca her konuda desteğini gördüğüm, akademik ve sosyal yaşamımda bana ışık tutan sevgili hocam Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na, tezimin hazırlanması boyunca gösterdiği titizlik, özveri, bilimsel katkı ve anlayışından dolayı çok teşekkür ederim.

Ayrıca Biyofizik Anabilim Dalı'nda aldığım lisansüstü eğitim boyunca yaptıkları katkılardan dolayı değerli hocalarım; Prof. Dr. Belgin BÜYÜKAKILLI'ya ve Prof. Dr. Nurten ERDAL'a, teşekkür ederim.

Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Serap YALIN'a,

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ'a ve sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Hülya DERVIŞOĞLU'na ve Arş. Gör. Derya YETKİN'e,

Sevgili dostlarım Prof. Dr. Gülsen ÖNENGÜT'e, Prof. Dr. Ali Havare'ye, Doç. Dr. Rıza Binzet'e, Yrd. Doç. Dr. Gün Binzet ve Dr. Figen DAĞ'a;

Kimya Bölümü öğretim üyesi değerli arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Pelin EROĞLU'na ve Biyoloji Bölümü'nden Turhan YILMAZ'a,

Tıbbi Bilişim ve Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Semra ERDOĞAN'a,

Hücreleri sağlamamda bana yardımcı olan Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda görevli olan Dr. İlker TİNAY'a ve Mustafa ÖZYÜREK'e,

Biyofizik Anabilim Dalı'nda birlikte çalıştığım arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Her başım sıkıştığında hep yanımda olan değerli ailem ve dostlarıma,

Hayatıma kattığı anlamdan ve sıcacık gülüşlerinden dolayı kızım Zeynep'e ve henüz yüzünü görmediğim sevgili oğluma,

Son olarak da manevi desteği ile hep yanımda olan sevgili eşim, Kenan'a çok teşekkür ederim.

Fatma SÖĞÜT

# İÇİNDEKİLER

<b>KABUL VE ONAY</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	x
<b>ÖZET</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Kanser .....	3
2.1.1. Prostat Kanseri .....	6
2.1.1.1. Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi .....	7
2.1.1.2. Prostat Kanserinin Nedenleri .....	8
2.1.1.3. Prostat Kanserinin Tanısı, Derecelendirilmesi ve Evrelendirilmesi .....	8
2.1.1.4. Prostat Kanserinde Uygulanmakta Olan Tedavi Yöntemleri .....	11
2.1.1.5. Prostat Kanserinde Gen Ekspresyon Değişimi .....	12
2.2. İyon Kanalları .....	12
2.2.1. Epitel Hücrelerde İyon Kanalları .....	14
2.2.2. İyon Kanalları-Kanser İlişkisi .....	15
2.2.2.1. K <sup>+</sup> Kanalları ve Kanser .....	16
2.2.2.2. Na <sup>+</sup> Kanalları ve Kanser .....	18
2.2.2.3. Ca <sup>+2</sup> Kanalları ve Kanser .....	18
2.2.2.4. Cl <sup>-</sup> Kanalları ve Kanser .....	19
2.2.3. K <sup>+</sup> Kanalları .....	19

2.2.4. Eag1 Kanalları .....	21
2.3. İmipramine Hidroklorür .....	24
2.4. İyon Kanalı Çalışmalarında Yama Kenetleme Tekniği .....	25
2.5. Eş Zamanlı PCR .....	28
2.6. MTT Ölçümü .....	29
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>30</b>
3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları .....	30
3.1.1. Hücre Besi Ortamı .....	30
3.1.2. Hücrelerin Bölünme ve Pasaj Zamanları .....	30
3.2. Deney Grupları .....	31
3.3. MTT Analizi .....	31
3.3.1. Doz Belirleme .....	31
3.3.2. IC <sub>50</sub> Değerinin Hesaplanması .....	32
3.3.3. Sitotoksosite Analizi .....	32
3.4. Elektrofizyolojik Kayıtlar .....	33
3.4.1. Hücre Kültürü ve Kullanılan Çözeltiler .....	33
3.4.2. Pipetler ve Hazırlanması .....	33
3.4.3. Deney Düzeneği .....	34
3.4.4. Uygulanan Kenetleme Protokolü .....	35
3.5. Gen Ekspresyon Deneyleri .....	36
3.5.1. RNA İzolasyonu .....	36
3.5.2. cDNA Sentez Aşamaları .....	37
3.5.3. Eş Zamanlı PCR ile Gen Ekspresyonu Aşamaları .....	38
3.5.4. PCR Analizi .....	39
3.6. İstatistiksel Analiz .....	39
3.6.1. MTT Veri Analizi.....	39
3.6.2. Eş Zamanlı PCR Verilerinin Analizi .....	40
3.6.3. Elektrofizyolojik Kayıtların Analizi .....	40
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>41</b>
4.1. MTT Analizi Bulguları .....	41

4.2. Eş Zamanlı PCR Bulguları .....	42
4.3. Elektrofizyolojik Bulgular .....	44
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>48</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>53</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>55</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>66</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Normal bir hücrede, hücre döngüsünün evreleri .....	4
Şekil 2.2. Prostat bezinin vücut içinde yerleşiminin yandan görünümü .....	6
Şekil 2.3. Tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları .....	7
Şekil 2.4. Gleason derecelendirme sistemi şematik gösterimi .....	9
Şekil 2.5. Voltaj kapılı bir kanalda $\alpha$ altbiriminin ve P gözenek yapısının yerleşimi .....	14
Şekil 2.6. Potasyum kanal ailesi yapısal sınıflandırması .....	20
Şekil 2.7. Eag1 kanal yapısı şematik gösterimi .....	22
Şekil 2.8. Normal ve tümörlü dokularda Eag1 kanalı ekspresyon dağılımı .....	23
Şekil 2.9. İmipramine'in kimyasal yapısı .....	25
Şekil 2.10. Yama kenetleme tekniğinin temel prensibi .....	26
Şekil 2.11. Yama kenetleme tekniği ile oluşturulan kayıt biçimleri .....	27
Şekil 3.1. MTT analizinde grupların doz belirleme amacıyla 96'lık platelerde yerleşimi .	32
Şekil 3.2. Sitotoksisite analizinde, grupların 96'lık platalere yerleşimi .....	33
Şekil 3.3. Yama kenetleme kayıt düzeneği .....	35
Şekil 3.4. Hücreye uygulanan voltaj-kenetleme protokolü .....	36
Şekil 4.1. $IC_{50}$ değerinin hesabı için elde edilen doz yanıt eğrisi .....	41
Şekil 4.2. 48 saat sonunda referans gen için elde edilen amplifikasyon eğrisi.....	43
Şekil 4.3. 48 saat sonunda Eag1 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi .....	43
Şekil 4.4. 10 $\mu$ M doz grubunun elektrofizyolojik değerlendirmesi .....	45
Şekil 4.5. 50 $\mu$ M doz grubunun elektrofizyolojik değerlendirmesi .....	46
Şekil 4.6. 75 $\mu$ M doz grubunun elektrofizyolojik değerlendirmesi .....	47

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Gleason derecelendirme sisteminin açıklaması .....	9
<b>Çizelge 2.2.</b> Prostat kanseri evrelendirilmesi .....	10
<b>Çizelge 2.3.</b> Kanserde K <sup>+</sup> kanal gen ekspresyonu .....	17
<b>Çizelge 3.1.</b> Eag1 K <sup>+</sup> kanal gen ekspresyonunda kullanılan primer dizileri .....	36
<b>Çizelge 3.2.</b> Beta actin housekeeping gen ve Eag1 kanal gen ekspresyon analizinde kullanılan maddelerin konsantrasyonları ve miktarları .....	38
<b>Çizelge 3.3.</b> Eag1 gen ekspresyon analizi için uygulanan PCR koşulları .....	39
<b>Çizelge 4.1.</b> MTT deneyleri sonucunda elde edilen absorbans değerleri .....	42
<b>Çizelge 4.2.</b> DU-145 hücre hattında Eag1 geni için 48. saat sonunda gen ekspresyonu oran değerleri .....	42
<b>Çizelge 4.3.</b> Yama-kenetleme deneylerinde elde edilen maksimum akım değerleri .....	45

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Å</b>	: Angström
<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>Ag</b>	: Gümüş
<b>AgCl</b>	: Gümüşklorür
<b>AMACR</b>	: Alfa metil açıl CoA rasemaz
<b>BK</b>	: Büyük iletkenlikli, Ca <sup>+2</sup> 'la aktive olan potasyum kanalları
<b>C</b>	: Karboksi terminal ucu
<b>°C</b>	: Santigrat
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Kalsiyumklorür
<b>cAMP</b>	: Siklik adenozin monofosfat
<b>cDNA</b>	: Tamamlayıcı DNA
<b>Cl<sup>-</sup></b>	: Klor
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>C<sub>p</sub></b>	: Geçiş noktası değeri
<b>dk</b>	: Dakika
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit, C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DNaz</b>	: Deoksiribonükleaz
<b>Eag</b>	: <i>ether-à-go-go</i>
<b>EC<sub>50</sub></b>	: Etkin konsantrasyon
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetra asetik asit
<b>EGTA</b>	: Etilen glikol tetra asetik asit

<b>Elk</b>	: Eag benzeri K <sup>+</sup> kanalı
<b>Erg</b>	: Eag-ilişkili gen, Kv11.1
<b>g</b>	: Gram
<b>GΩ</b>	: Gigaohm
<b>HEPES</b>	: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetanesulfonik asit
<b>hSK</b>	: İnsanda bulunan küçük iletkenlikli, Ca <sup>+2</sup> 'la aktive olan K <sup>+</sup> kanalı
<b>I</b>	: Kaydedilen akım
<b>IC<sub>50</sub></b>	: Verilen parametrede %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon
<b>IK</b>	: Orta iletkenlikli, Ca <sup>+2</sup> 'la aktive olan K <sup>+</sup> kanalı
<b>I<sub>p</sub></b>	: Paralel akım
<b>IP3</b>	: İnositol trifosfat
<b>K<sup>+</sup></b>	: Potasyum
<b>KCl</b>	: Potasyumklorür
<b>Kir</b>	: İçeri doğrultucu potasyum kanalları
<b>Kv</b>	: Voltaja bağlı potasyum kanalları
<b>L</b>	: Litre
<b>M</b>	: Hücre döngüsünün mitoz evresi
<b>mg</b>	: Miligram
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyumklorür
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>μL</b>	: Mikrolitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>μM</b>	: Mikromolar
<b>mRNA</b>	: mesajcı RNA
<b>MΩ</b>	: Megaohm
<b>ms</b>	: Milisaniye
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
<b>mV</b>	: Milivolt
<b>N</b>	: Amino- terminal ucu

<b>Na<sup>+</sup></b>	: Sodyum
<b>NaCl</b>	: Sodyumklorür
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>Ort.</b>	: Ortalama
<b>pA</b>	: Pikoamper, 10 <sup>-12</sup> amper
<b>PAS</b>	: Per-Arnt-Sim
<b>PBS</b>	: Fosfat tampon çözeltisi
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PDT</b>	: Populasyonun iki katına çıkma süresi, population doubling time
<b>pH</b>	: Bir çözeltinin asitlik ve bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi
<b>PRM</b>	: Parmakla rektal muayene
<b>PSA</b>	: Prostat spesifik antijen
<b>qPCR</b>	: Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>R<sub>s</sub></b>	: Giriş direnci, seri direnç
<b>R<sub>seal</sub></b>	: Mühürleme direnci
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>RNAi</b>	: RNA girişimi
<b>RNaz</b>	: Ribonükleaz
<b>RPMI</b>	: Roswell Park Memorial Institute medium
<b>s</b>	: Saniye
<b>S1, S2, S3, S4, S5, S6:</b>	Potasyum kanallarının transmembran bölgelerinden her biri
<b>Ss</b>	: Standart sapma
<b>TCA</b>	: Trisiklik antidepresan
<b>TRP</b>	: Geçici reseptör potansiyeli kanalları
<b>UPL</b>	: Universal Probe Library
<b>xg</b>	: Yerçekimi kuvvetinin kaç katı olduğunu belirten birim
<b>V</b>	: volt
<b>V<sub>CMD</sub></b>	: Yama kenetleme devresinde terslenmeyen uca uygulanan komut voltajı
<b>VGNa</b>	: Voltaja duyarlı Na <sup>+</sup>

## ÖZET

### İmipramine'in Prostat Kanserinde Potasyum Kanal Kinetikleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Ether a go-go1 (Eag1), kanserli dokuda yoğun görülen voltaja duyarlı K<sup>+</sup> kanallarıdır. Yapılan çalışmalar antidepressan olan imipraminin Eag1 kanalını bloke ettiğini göstermektedir. Bu çalışmada imipramine'in prostat kanserinde tedavi amacıyla kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Çalışmada DU-145 prostat kanseri hücre hattı kullanılmıştır. İmipramine'in sitotoksik etkisini belirlemek için MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) analizi, Eag1 kanalı gen ekspresyon üzerine etkisini belirlemek için eş zamanlı PCR ve Eag1 kanal akımı üzerine etkisini belirlemek amacıyla yama kenetleme tekniği kullanılmıştır. MTT ve gen ekspresyonu çalışmalarında, kontrol ve doz grupları (10, 50 ve 75 µM) olmak üzere dört grup kullanılmıştır. Yama kenetleme deneylerinde bu üç doz grubu için 0. dk. kayıtları kontrol olarak değerlendirilmiş ve 0., 2., 4., 6., 8. ve 10. dk.'larda elde edilen verilerden maksimum akım değerleri ölçülmüştür.

Sitotoksikite deneylerinde tüm doz gruplarında kontrole göre azalma olmuştur. Ancak bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (p>0,05). Benzer şekilde Eag1 kanal gen ekspresyonu da tüm doz gruplarında azalmış fakat bu azalma da istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (p>0,05). Maksimum akım değerleri 0. dk. ölçümlerine göre 75 ve 50 µM doz gruplarında 2., 4., 6., 8. ve 10. dk.'larda anlamlı olarak azalırken, 10 µM doz grubunda ise bu azalma 4., 6., 8. ve 10. dk.'larda gözlenmiştir (p<0,05).

Uygulama yapılan doz değerlerinde imipramine'in istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hücre proliferasyonunda ve Eag1 kanal gen ekspresyonunda azalmaya yol açtığı, bunun sonucunda da Eag1 kanal akımını önemli miktarda inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu bulgular imipramine'in prostat kanserinin tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmekle birlikte, bu alanda farklı hücre hatlarının ve farklı dozların kullanılmasıyla yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Sözcükler:** Eag1 kanalı, imipramine, qPCR, yama-kenetleme, MTT

## ABSTRACT

### Investigation of the Effect of Imipramine on Potassium Channel Kinetics in Prostate Cancer

Ether a go-gol (Eag1) are the voltage-sensitive potassium channels that are frequently seen in the cancer tissues. An antidepressant, imipramine, blocks the Eag1 channel. In this study, imipramine was investigated to use for treatment in prostate cancer.

In the study DU-145 prostate cancer cell line was used. In order to determine the cytotoxic effect of imipramine the MTT (3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) analysis, to determine the Eag1 channel gene expression effects the real-time PCR and to determine the effect on the Eag1 channel current the patch clamp method was used, respectively. Control and dose groups (10, 50, and 75- $\mu$ M) were used in four groups in MTT and gene expression studies. In patch clamp experiments for these three dose groups the 0<sup>th</sup> minute records were evaluated as the control records and from the data obtained in the 0, 2, 4, 6, 8 and 10<sup>th</sup> minutes the maximum current values have been measured.

In the cytotoxicity experiments there has been a reduction compared to the control groups for all dose groups. However, this reduction was not statistically significant ( $p>0,05$ ). Similarly, Eag1 channel gene expression decreased in all dose groups, but this decrease was not statistically significant ( $p>0,05$ ). The maximum current values have significantly decreased at the 75 and 50  $\mu$ M dose groups at the 2, 4, 6, 8 and 10<sup>th</sup> minutes measurements, compared to the 0<sup>th</sup> minute measurements, while for the 10  $\mu$ M dose group this reduction was observed at the 4, 6, 8 and 10<sup>th</sup> minutes ( $p<0,05$ ).

For the applied dose values, although the imipramine was not statistically meaningful, it leads reduction in cell proliferation and gene expression, then as a result of this it was observed that significant amount of the Eag1 channel current was inhibited. While these findings suggesting that they could be used in the treatment of prostate cancer of imipramine, new studies are needed in this area through the use of different cell lines and different doses.

**Key Words:** Eag1 channel, imipramine, qPCR, patch-clamp, MTT

# 1. GİRİŞ

Kanser ülkemizde ve dünyada, oldukça sık görülen ve mortalitesi yüksek bir hastalıktır. Yayılma, tekrar etme ve ölümlü sonuçlanma özellikleriyle son yıllardaki verilere bakıldığında önemli bir toplum sağlığı problemidir (1). Kanserde, hasarlı hücreler kontrolsüz bir şekilde üreyerek komşu dokuları işgal etmekte veya kaynağını aldığı organdan daha uzak bir yere, kan veya lenf yoluyla yayılmaktadır. Nedenleri karmaşık ve çeşitlidir. Çevresel ajanların yanı sıra virüsler ve onkogenler de kansere neden olabilir. Pek çok kanser deoksiribonükleik asit (DNA) mutasyonundan olur. İnsan vücudunda pek çok dokuda ortaya çıkabilir. Prostat kanseri, prostat bezi hücrelerinde erkeklerde en sık görülen organ kanserlerinden biridir (2, 3, 4).

Hücre zarında bulunan, iyon geçişlerini düzenleyen iyon kanalları fizyolojik süreçlerde oldukça önemlidir. Özellikle, bölünme, sinir ve kas uyarısı, hormon salgılanması, öğrenme ve hafıza, hücre proliferasyonu, sinyal iletimi, su-tuz dengesi, zar potansiyelinin düzenlenmesi ve kan basıncı düzenlenmesi gibi pek çok önemli olayda rol oynarlar (5). Son yıllarda yapılan çalışmalarla sinir sistemi dışında diğer hücrelerde de iyon kanallarının önemi gösterilmiştir. Hücre zarında, zar potansiyelinin sürdürülmesinde sodyum ( $\text{Na}^+$ ), potasyum ( $\text{K}^+$ ) ve klor ( $\text{Cl}^-$ ) iyon kanalları oldukça önemlidir. İyon kanal bozukluklarında bazı hastalıklar ortaya çıkmaktadır. İyon kanallarındaki çeşitli mutasyonlar iyon kanal geninin ekspresyonunda bozulmalara, kanalın normalden az veya aşırı ekspresyonuna neden olabilmekte, kanal fonksiyonunda bozulmalara yol açabilmekte ve kanal aktivitesinin düzenlenmesinde kusurlara sebep olabilmektedir (6). Yakın zamanda yapılan çalışmalarla iyon kanallarının kanserle ilişkilendirilebileceği gösterilmiştir (7, 8).

Kanserin, hücrelerde oluşturduğu anormal değişimlerin (farklılaşma, proliferasyonun artması, malign büyüme ve doku işgali gibi) iyon kanallarının ekspresyonunda değişimlere yol açtığı ve bu nedenle bu kanalların yer aldıkları hücreler durumlarında anomaliler olduğu gösterilmiştir. Sinir ve kas sistemine ait olmayan organlarda voltaj kapılı  $\text{Na}^+$  kanalının ekspresyonu genellikle prostat, meme ve akciğer kanseri gibi farklı kanser türlerinde metastaz ile ilişkilendirilmekle beraber,  $\text{K}^+$  kanalının da tümör



oluşumu ve ilerlemesinde önemli olduğu gösterilmiştir (8). K<sup>+</sup> kanallarının bir alt türü olan Ether a go go (Eag) kanalları da hücre proliferasyonu ile ilişkilendirilerek melanom, meme nöroblastoma, ve serviks kanseri gibi kanser türlerinde önemli olduğu gösterilmiştir (9, 10, 11, 12). Tüm bu çalışmalar iyon kanallarının kanser tedavisinde yeni hedefler olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada bir antidepresan olan imipramine'in (13) erkeklerde en sık görülen kanser türlerinden biri olan prostat kanserinde Eag1 kanalları üzerine etkisinin sitotoksik, elektrofizyolojik ve moleküler yöntemlerle incelenmesi ve prostat kanserinin tedavisinde kullanılabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Kanser, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanan, gen ekspresyonundaki çoklu değişimlerin neden olduğu, hücrenin hem yapısının hem de fonksiyonunun değiştiği anormal hücre çoğalmasıdır. Oluşan hücre topluluğu çevredeki dokulara hücum ederek uzak bölgelere sıçrayabilir ve tedavi edilemediği durumda bireyin ölümüyle sonuçlanabilir (2). İnsanların üçte biri hayatı boyunca kanserle karşılaşmaktadır ve kanser ölüm oranı farklı kanser türlerinde değişmektedir (3).

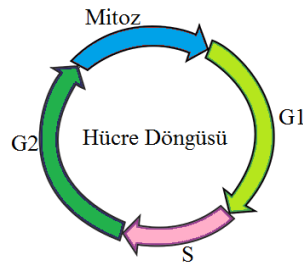
Kanser tek bir hastalığa verilen bir isim değildir. Günümüzde kanserin özellikleri ve tedavisi birbirinden farklı 200'den (3, 4, 14, 15) fazla türü vardır. Kanseri adlandırması yapılırken sıçrama yaptığı organın değil ilk ortaya çıktığı organın adını alır. Örneğin prostat kanseri kemiğe sıçradığında, kemikte oluşan kanser dokusunun adı kemik kanseri değil, metastatik prostat kanseri olarak isimlendirilir.

Kanser hem genetik hem de çevresel etkenlerden kaynaklanabilen bir hastalık olup, çok çeşitli sebeplerden meydana gelebilir. Genetik etkenler kalıtsal olarak kişinin ebeveynlerinden gelen yatkınlığı iken, çevresel etkenler arasında sigara kullanımı, diyet ve fiziksel aktivite gibi hayat tarzından kaynaklanan faktörler, güneşten gelen ışınlar ile ultraviyole ışınları, çevreden gelen farklı türde kimyasallar, ışınlar ve virüsler sayılabilir (4).

Hücredeki düzenleyici mekanizmaları bozan kanser, hücre çekirdeğinde oluşan DNA hasarı sonucunda meydana gelir (16). Normal hücrelerde oluşan DNA hasarı ya düzeltilir ya da hücre ölüme gider, ancak kanser hücresi bu durumda hasarı düzeltemez ve olması gerektiği gibi hücre ölümü gerçekleşmez. Bunun yerine hücre, vücudun ihtiyacı olmayan ve hasarlı hücre ile aynı DNA'ya sahip olan yeni kanserli hücreler yapmaya başlar (2). Kanserli bir hücrede oluşan genetik değişiklikler, hücrenin çoğalması, ömrü, komşu hücrelerle iletişiminin kesilmesi gibi durumları etkiler, immün sistemin bozulmasına neden olur (17).

Kanser hücreleri hızlıca bölünen hücrelerdir ve kontrolsüz hücre çoğalması kanserin ayırıcı özelliklerinden biridir. Kanser hücreleri tipik olarak, kendi hücre döngülerini doğrudan düzenleyen genlerde hasar oluştururlar ve normal hücre döngüsündeki mekanizmalar kanserde bozulur. Kanser hücreleri kontrolsüz çoğalmadan köken alarak tümör oluştururlar (18).

Hücre döngüsü, bir hücrenin bölünmesinden sonra ikinci bölünme sonuna kadar, birbirini takip eden, sıralı olaylar dizisidir. Hücre döngüsünün evreleri hücreden hücreye farklılık göstermektedir. Pek çok hücre türünde mitoz (M) ve interfaz olmak üzere iki temel basamağa ayrılır. M fazı hücre bölünmesi ile gerçekleşen bir dizi moleküler olayları içerir. İnterfaz ise G1, S ve G2 evrelerinden oluşmak üzere 3 temel aşamada gerçekleşir. G1 fazı M ve S fazlarını ayırmaktadır. G1 fazında hücre büyümek için dışarıdan sinyal alır, hacmi giderek artar; hücrede ribonükleik asit (RNA) ve protein sentezi yapılarak DNA sentezi için hazırlık yapılır. S fazında DNA sentezi gerçekleşir. G2 fazında hücre büyümeye devam eder, bir sonraki aşama olan mitoz hazırlık için RNA ve protein sentezine devam eder. G2 fazı tamamlandıktan sonra profaz, metafaz, anafaz ve telofazdan oluşan mitoz aşaması gerçekleşir. Eğer bu döngü sırasında bir evre tamamlanmadan diğer bir evreye geçilirse hücrede hasar oluşabilir. Bu amaçla hücre döngüsü içinde, her şeyin yolunda olup olmadığını kontrol eden, kontrol noktaları bulunmaktadır. Bu kontrol noktaları G1-S geçişinde, G2-M geçişinde ve metafaz anafaz geçişinde bulunmaktadır. Böylece döngünün devamlılığına karar verilir (16, 19, 20). Hücre G1 evresindeyken büyüme faktörleri, sitokinler ve mitojenler gibi sinyalleri alamadığı durumlarda, hücre G0 istirahat evresine geçer ve bölünme sinyali alıncaya kadar bu evrede kalır (21) (Şekil 2.1.).



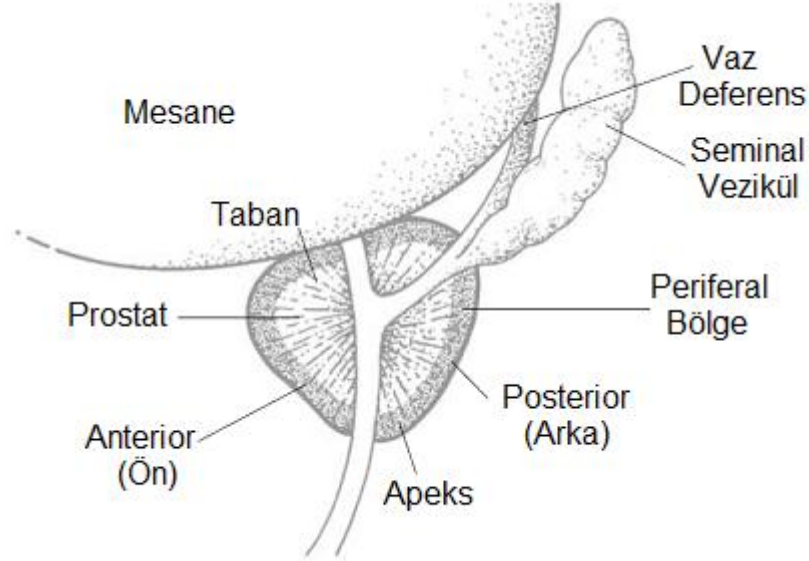
Şekil 2.1. Normal bir hücrede, hücre döngüsünün evreleri.

Hücre döngüsünde onkogenler (Her2/neu, Ras, c-Myc vb.) ve tümör baskılayıcı genler (p53 ve retinoblastoma geni) olmak üzere iki temel gen grubunun rolü vardır. Kanserin başlangıcında, proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olmak üzere iki temel gen grubundaki mutasyonlar önemlidir. Aşırı hücre çoğalmasına sebep olan bir mutasyonla beraber protoonkogenler aktifleşerek onkogenleri (kontrolünü kaybetmiş protein kodlayan genlerdir ve kanser gelişiminin başlangıcında rol oynarlar) oluştururlar. Tümör baskılayıcı genler ise normalde hücre çoğalmasını sınırlandırdıkları için, bu genlerde oluşabilecek bir mutasyon uygun olmayan hücre çoğalmasına sebep olacaktır. Bu iki gen sınıfındaki genlerin pek çoğu hücre oluşumunu düzenlemede yardımcı proteinleri şifrelemektedir. Tümör baskılayıcı genlerden olan p53 ve retinoblastoma genleri işlevini kaybettiğinde hücre büyümesinin kontrolü ortadan kalkar, DNA tamiri oluşmaz ve hücre döngüsü sonraki evrelere hasarlı olarak devam eder. Hasarın tamir edilemediği hücrelerde normalde hücre apoptozise gider (18, 22, 23).

Kanser karsinogenez adı verilen çok basamaklı bir süreçten oluşur. Bu aşamalar, başlangıç, promosyon, ve progresyon aşamalarıdır. Başlangıç basamağı kalıcı, tersinir olmayan ve normal hücrelerin sınırsızca çoğalmakta olduğu ölümcül dönüşümlere daha yatkın olduğu, DNA'daki genetik değişimlerle beraber gözlenir. Karsinojenlere maruziyet sonucu bir veya daha çok hücrel değişimden kaynaklanır. Başlangıç aşamasındaki hücreler neoplastik hücre değildir, ancak genotipik ve fenotipik değişimler meydana geldikten sonra bu durum için ilk adımı atmış olurlar. Oluşan mutasyonlarla çoğalma olması mümkün olsa da henüz diferansiyasyon olamamaktadır. Başlangıç aşaması sonrasında dönüşüme uğramış olan bu hücreler tümörü daha büyük bir kitleye dönüştürecek bir uyarana maruz kalıncaya kadar zararsız kalabilirler. Bu geri dönüşümlü basamak ise promosyon basamağı adını alır. Progresyon basamağı ise benign tümörün malign tümöre dönüştüğü, geri dönüşü olmayan bir süreçtir. Yaşam şekli ve çevresel faktörlere bağlı olarak, karsinogenez süreci genellikle 10 yıl veya daha uzun bir süreyi kapsar (24, 25, 26).

### 2.1.1. Prostat Kanseri

Prostat, erkek üreme sisteminde yer alan fibröz bir doku içerisinde küçük bezlerin, kanalların ve kas dokularının bir araya gelerek oluşturduğu bir dış salgı bezidir. Normal durumda yetişkin bir bireyde, ceviz büyüklüğünde ve ağırlığı yaklaşık olarak 30-40 gram (g) kadardır; hastalık olması durumunda 100 g'a kadar çıkabilir. Bir halka gibi üretrayı çevreleyen prostat bezi, mesanenin hemen altında yer alır. Üreme sisteminin bir parçası olan prostat bezi idrar akışını kontrol eder, salgıladığı sıvı ile spermi besler ve korur (27, 28, 29) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Prostat bezinin vücut içinde yerleşiminin yandan görünümü (29).

Salgıladığı sıvı içinde çinko, prostaglandinler, kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ), sitrat, fosfat, prostat spesifik antijen (PSA), pıhtılaşma enzimi, profibrinolizin gibi maddeler bulunmaktadır. Seminal sıvının %20-30 kadarını prostat sıvısı oluşturmaktadır (30). Prostat sıvısının içinde bulunan maddeler üretranın kayganlaşmasını ve ejakülasyon sonrasında, spermin asidik ortamdan korunmasını, beslenmesini ve hareketliliğini sağlar (27).

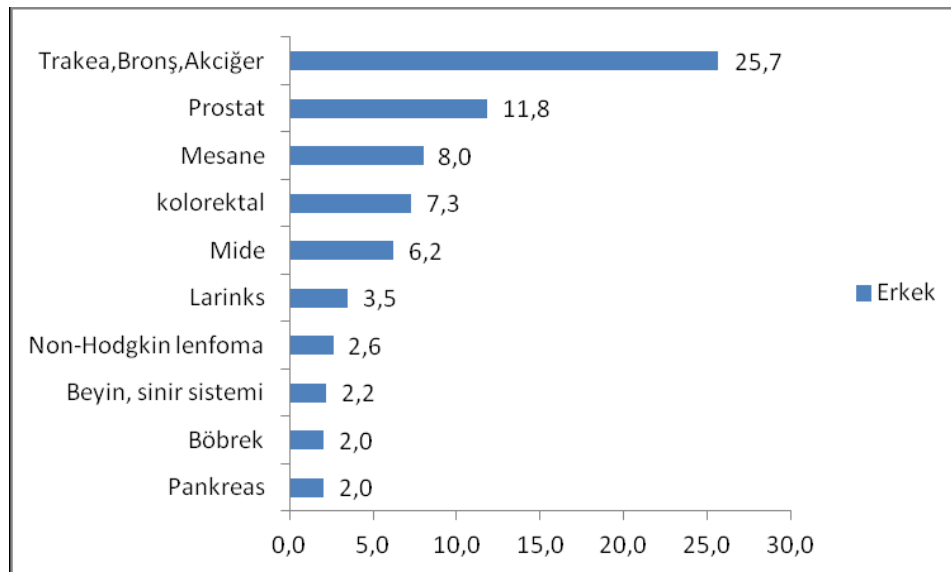
Prostat kanseri ise, prostat bezinde bulunan ve prostat sıvısını üreten glandüler yapıdaki hücrelerde oluşan malign çoğalmadır. Prostat kanseri de, meme kanseri gibi

hormona duyarlı bir kanser türüdür. Prostat bezinde, testosteron hormonu bir başka güçlü hormon olan dihidrotestosterona dönüştürülür. Prostat kanserinde bu hormonlar kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmalarını sağlar (29).

### 2.1.1.1. Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi

Prostat kanseri dünya genelinde, erkeklerde görülen kanserlerin üçte birlik kısmını oluşturur ve en yaygın olanıdır. Prostat kanserinde 1970'li yıllarda her yıl 200.000 yeni vaka eklenirken, 2002 yılına gelindiğinde bu sayı 700.000 yeni vaka olarak bildirilmiştir. Avrupa'da 2006 senesi raporlarına göre, 345.900 yeni vaka ve 87.400 kayıtlı ölüm oranı ile dördüncü en yaygın kanser türüdür (17).

Ülkemizde kanserle ilgili yapılan epidemiyolojik çalışmalar sınırlı olup, sadece 15 merkezde yürütülmektedir. Bununla beraber yapılan çalışmalar göstermektedir ki, tüm yaş grupları beraber değerlendirildiğinde, prostat kanseri ülkemizde erkeklerde en yaygın görülen ikinci kanser türü olup, ölümlerle sonuçlanması bakımından solunum yollarında meydana gelen kanserlerden sonra ikinci sırada yer alır (31) (Şekil 2.3.).



**Şekil 2.3.** Tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (Birleşik Veri Tabanı, 2009) (31).

### **2.1.1.2. Prostat Kanserinin Nedenleri**

Prostat kanserinin nedenleri tam olarak bilinmese de, yapılan çalışmalar prostat kanserini, prostat hücrelerinde zamanla artan mutasyonların neden olduğu genetik dengesizliğin oluşturabileceğini göstermektedir. Bu dengesizliklerin oluşmasında yaş, ırk/etnik köken, uyruk, aile öyküsü, genler, diyet, obezite, sigara kullanımı, çalışma ortamı koşulları, çeşitli hastalıklar ve vazektomi gibi çeşitli risk faktörleri etken olsa da, bu risk faktörlerinin hiçbiri prostat kanseri için kesin neden değildir (32).

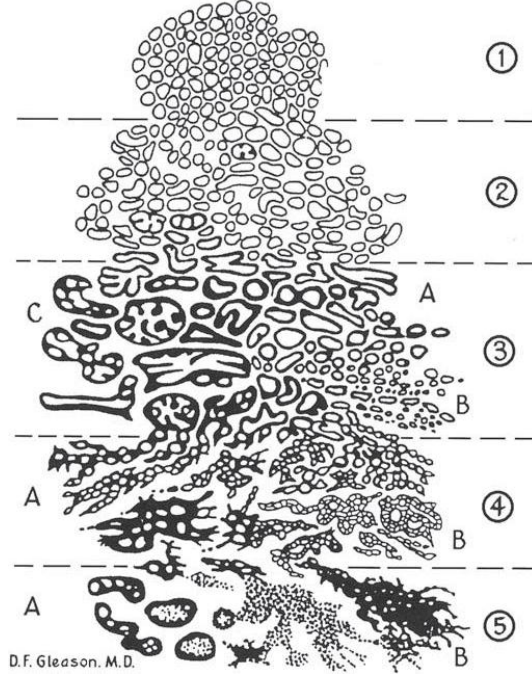
### **2.1.1.3. Prostat Kanserinin Tanısı, Derecelendirilmesi ve Evrelendirilmesi**

Prostat kanserinin tanısında çeşitli inceleme yolları kullanılmaktadır. Bu incelemeler, parmakla rektal muayene (PRM), kanda PSA bakılması, prostat biyopsi parçalarında ve iğne aspirasyonlarında adenokarsinomun görülmesi olarak sıralanabilir. Tanı konduktan sonra ise tümörün vücuda yayılıp yayılmadığını, yayıldıysa ne ölçüde yayıldığını saptamak için duruma göre kemik sintigrafisi, bilgisayarlı tomografi ve magnetik rezonans görüntüleme gibi başka yöntemlerden de yararlanır. Histopatolojik değerlendirme ise tümörü derecelendirmeyi mümkün kılar (33).

Tedavi yöntemine karar verilirken kanserin hangi durumda olduğu tespit edilmelidir. Bunun için de çeşitli sınıflandırma sistemleri kullanılır. Kanser sınıflandırma sistemleri konusunda tam olarak uzlaşmaya varılmasa da kanserin derecelendirilmesi ve evrelendirilmesi oldukça önemlidir. Bu iki kavram biribiri ile bağlantılıdır (33).

Derecelendirme kanser hücrelerinin ne kadar anormal ve agresif olduğunu tanımlamaktadır. Tedavi uygulamasını belirlemede kullanılan bu derecelendirme için en yaygın olarak, histolojik sonuçlardan elde edilen Gleason skorum sistemi kullanılır (34) (Şekil 2.4., Çizelge 2.1.). Hücrenin durumuna göre Gleason derecelendirmesi 1-5 arası değerlerde yapılır (35).

PROSTATIC ADENOCARCINOMA  
(Histologic Grades)



Şekil 2.4. Gleason derecelendirme sistemi şematik gösterimi (35).

Çizelge 2.1. Gleason derecelendirme sisteminin açıklaması (35).

DERECE	AÇIKLAMA
1	Hücreler oldukça farklılaşmıştır, basit yuvarlak bez yapısında ve iyi belirlenmiş sınırlarla birbirlerine oldukça yakın yuvarlak kitleler halindedirler
2	Basit yuvarlak bez yapısındadırlar, gevşekçe belirsiz bir şekilde toplanmışlardır, gevşekçe belirlenmiş sınırlarla yuvarlak kitleler halindedirler.
3A	Orta büyüklükte tek bez yapısındadırlar, düzensiz şekil ve düzensiz boşluklara sahiptirler, bozuk olarak tanımlanan, sızdıran sınırları vardır.
3B	3A'ya çok benzerdirler, fakat çok küçük bezlerdir, belirgin bir zincir ve kordon yapısı oluşturmaları gerekmez.
3C	Düzgün, yuvarlak silindirler ve kitleler içinde papiller ve kribriform epitel yapısındadır; nekroz yoktur.
4A	Küçük, orta ve geniş bezler kordonlara, zincirlere kaynaşmıştır veya düzensiz sızdıran kitlelerdir.
4B	4A'ya çok benzer, fakat oldukça büyük soluk hücreler bulunur, bazen hipernefromayı andırır.
5A	Genellikle merkezi nekrozla birlikte, papiller ve kribriform epitel yapısında, 3C'den daha solid tümör kitleleri bulunur.
5B	Düzensiz anaplastik adenokarsinom kitlesi yapısındadır.



Evrelendirme ise kanserin büyüklüğü ve yayılımı ile ilgilidir. Kansere vücutta ne kadar çoksa muhtemelen o kadar çok yayılacaktır ve tedavi o kadar az işe yarayacaktır. Bu nedenle ne kadar ayrıntılı evrelendirme yapılırsa, bu durum sonuçların uzun süreli olmasını ve sağ kalmayı o kadar çok etkileyecektir. Evrelendirme elde edilen biyopsi, PSA seviyesi fiziksel muayene gibi tetkik sonuçlarına göre yapılır.

En yaygın kullanılan evrelendirme sistemleri ABCD ve TNM sistemleridir. Burada T harfi tümörü, N harfi lenf nodülünü, M harfi ise uzak metastazı simgelemektedir. TNM sistemine göre yapılan sınıflandırma Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

**Çizelge 2.2.** Prostat kanseri evrelendirilmesi (29, 33, 36).

<b>TNM</b>	<b>ABCD</b>	<b>AÇIKLAMA</b>
<b>T0</b>	Eşdeğeri yok	Kanser yok.
<b>T1a</b>	A1	Kanser sadece prostatla sınırlıdır ve sadece mikroskopla görülebilir (Prostatın %5'inden az).
<b>T1b</b>	A2	Kanser sadece prostatla sınırlıdır ve sadece mikroskopla görülebilir (Prostatın %5'inden fazla).
<b>T1c</b>	A3	Normal muayenede artmış PSA ile kanser tespit edilmiştir.
<b>T2a</b>	B1	Kanser prostatın bir tarafının %50'sinden daha azında bulunur ve hissedilir.
<b>T2b</b>	B1	Kanser prostatın bir tarafının %50'sinden daha çoğunda bulunur ve hissedilir.
<b>T2c</b>	B2	Kanser prostatın her iki tarafında da bulunur ve hissedilir.
<b>T3a</b>	C1	Kanser prostatın bir tarafında ve kapsül dışına doğru büyümektedir.
<b>T3b</b>	C1	Kanser prostatın her iki tarafında ve kapsül dışına doğru büyümektedir.
<b>T3c</b>	C2	Kanser seminal veziküle yayılmıştır.
<b>T4a</b>	C2	Kanser mesane boynunu ve/veya rektumu ve/veya eksternal sfinkteri sarmıştır.
<b>T4b</b>	C2	Kanser prostatın yakınındaki diğer bölgelerde de gözlenmektedir.
<b>N0</b>	Eşdeğeri yok	Lenf nodüllerinde kanser tespit edilmemiştir.
<b>N1 (N+)</b>	D1	Kanser iki veya daha çok lenf nodülüne yayılmıştır ( 2 santimetre'lik (cm) veya daha küçük olan kanserler).
<b>N2 (N+)</b>	D1	Kanser iki veya daha çok lenf nodülüne yayılmıştır ( 2-5 cm aralığındaki kanser).
<b>N3 (N+)</b>	D1	Kanser iki veya daha çok lenf nodülüne yayılmıştır ( 5 cm'lik veya daha büyük olan kanserler).
<b>M0</b>	Eşdeğeri yok	Kanser prostatı, çevre dokuları ve lenf nodüllerini tamamen sarmıştır.
<b>M1 (M+)</b>	D2	Kanser pelvis bölgesini geçerek, kemikler, akciğerler gibi organlara sıçramıştır.

#### **2.1.1.4. Prostat Kanserinde Uygulanmakta Olan Tedavi Yöntemleri**

Günümüzde prostat kanseri tedavisi için çok sayıda yöntem kullanılmaktadır. Prostat kanseri tedavisinde hastalığın seyrine, yan etkilere ve hastalara bağlı olarak bir veya birkaç tedavi yöntemi seçilebilmektedir. Yapılan incelemeler sonrasında hastalığın prostat ile sınırlı olması veya metastaz yapmasına göre farklı tedavi seçenekleri kullanılmaktadır. Eğer hastalık prostat ile sınırlı ise; bekleyerek gözlem yapılabildiği gibi farklı cerrahi yöntemler, ışın tedavisi, krioterapi gibi yöntemler seçilebilir. Kanserin metastaz yapması durumunda ise hormon tedavisi ve kemoterapi uygulaması tercih edilmektedir (37).

Bekleyerek gözlem, PSA seviyesinin artması ya da histopatolojik olarak tümör varlığının gösterilmesine kadar beklenmesidir. Bu hastalar dikkatle izlenmelidir (33).

Radikal prostatektomi prostat bezinin cerrahi yolla vücuttan çıkarılarak kanserli hücreler temizlenmesidir. T1a, T1b, T1c, T2, T3 evrelerinde bu tedavi yöntemi uygulanabilmektedir. Tedavi sonrasında perioperatif ölüm, majör kanama, rektal yaralanma, derin ven trombozu, pulmoner emboli, lenfösel, idrar kaçağı, mesane zayıflığı, impotans, mesane boynu darlığı, üretral tıkanma ve üretral darlık gibi komplikasyonlar ortaya çıkabilir (33).

Işın tedavisi ise iki türlü yapılabilir; birincisinde ışın uygulaması vücut dışından prostat bezine doğrudan uygulanır, ikinci uygulama şekli ise prostat bezi içine radyoaktif tohumların ekilmesi ile olur. Bu tedavi şeklinde de ishal, karın ağrısı, makatta rahatsızlık ve idrar yapmakta zorlanma gibi yan etkiler oluşabilmektedir (33).

Kriyoterapide hücre ölümüne sebep olmak için dondurucu yöntemler kullanılır. Dehidratasyon sonucu oluşan protein denatürasyonu, hücre zarının doğrudan buz kristalleri ile yırtılması, mikrosirkülasyonun yavaşlatılmasıyla iskemi oluşumu ve apoptozis kullanılan yöntemlerdir. Sınırlı prostat kanserinde ve prostat dışına minimal yayılımı olan hastalarda kullanılır. Dokuda bozulma, mesane zayıflığı, pelvik ağrı idrar retansiyonu erektil fonksiyon bozukluğu gibi komplikasyonlar görülebilir (33).

İlk defa 1941 yılında, Huggin ve Hedges cerrahi kastrasyonun ve östrojen uygulamasıyla androjenin (testesteron) baskılanmasının metastatik prostat ilerlemesi üzerine olumlu etkileri olduğunu ortaya koymuşlardır. Hormonal tedavi hastalığın ilerleme belirtilerinde etkili olsa da, hastaların ömrünü uzatma anlamında kesin bir kanıt yoktur.

Burada testesteron her ne kadar tümör oluşturan bir hormon olmasa da, tıpkı prostat hücrelerinde olduğu gibi, kanser hücrelerinde de büyüme ve süreklilik için gereklidir. Eğer prostat hücreleri androjenik uyarıdan mahrum kalırsa hücreler apoptozise gider. Uzun süreli androjen deprivasyonu tedavisinin çeşitli yan etkileri de söz konudur. Bunların arasında libido kaybı, erektil işlev kaybı, sıcak basmaları, jinekomasti ve göğüs ağrısı, vücut yağ kitlesinde artış, kas kaybı, anemi, kemik mineral yoğunluğunda azalma, bilişsel işlev kaybı sayılabilir (33).

Hormon tedavisinin işe yaramadığı durumda, hücre çoğalmasını frenleyen ilaçlar tedavi amacıyla kullanılırlar. Ancak prostat kanseri bu ilaçlara karşı diğer kanserler kadar duyarlı değildir (33).

#### **2.1.1.5. Prostat Kanserinde Gen Ekspresyonu Değişimi**

Kullanılan yeni teknoloji ürünleri prostat kanserinde gen ekspresyon değişimlerinin geniş çaplı analizini mümkün kılmaktadır. Prostat kanserinde ilk ve en çok aşırı eksprese edilen gen bazı lipitlerin  $\beta$ -oksidasyon sırasında R-steroidizomerlerini S-'ye çeviren bir enzim olan “*alfa metil açıl CoA rasemaz (AMACR)*”dır. Yapılan immün boyama çalışmaları AMACR'nin normal prostat hücrelerinde nadiren eksprese olurken prostat kanser hücrelerinde oldukça fazla eksprese olduğunu göstermiştir (38). Yine son yıllarda klinik tümörlerde yapılan çalışmalarla prostat kanserinde voltaj kapılı Eag1 K<sup>+</sup> kanalının, normal prostat dokusunda çok az görülürken, prostat kanserinde aşırı eksprese olduğu görülmüştür (39, 40).

#### **2.2. İyon Kanalları**

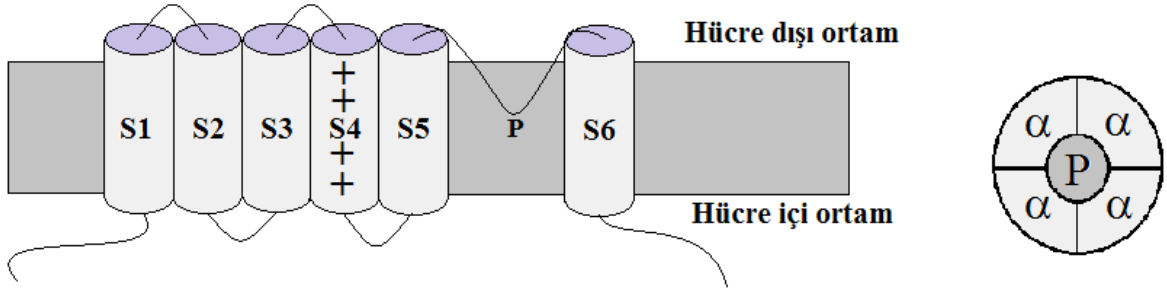
İyon kanallarının kuramsal olarak varlıkları ilk kez 1952 yılında Alan Hodgkin ve Andrew Huxley tarafından sinir iletimi çalışmalarıyla gösterilmiş, deneysel olarak varlıklarının gösterimi ise 1970'li yıllarda Erwin Neher ve Bert Sakmann tarafından yapılmıştır (41).

İyon kanalları lipit çift katlı hücre zarının içine yerleşmiş, protein yapısında, en dar kısmından sadece bir iyonun geçebileceği makromoleküler gözeneklerdir (42). Neredeyse bütün plazma zarları ve pek çok hücre içi organelin zarında bulunmakta olup çok fazla çeşitliliğe sahiptirler. İnsan genomunda sinir ve kas gibi uyarılabilir hücrelerde 400'ün üzerinde iyon kanal türü belirlenmiştir. Bunların yaklaşık 170 tanesi  $K^+$  kanallarını, 38 kadarı  $Ca^{+2}$  kanallarını, 29 kadarı  $Na^+$  kanallarını 58 kadarı  $Cl^-$  kanallarını ve 15 kadarı da glutamat reseptörlerini kodlamaktadır. Geri kalan genler de inositol trifosfat (IP3) reseptörlerini, geçici reseptör potansiyeli kanallarını (TRP) ve diğer kanalları kodlamaktadır (43).

İyon kanalları, iyon geçişinin kontrol edilmesiyle, tipik olarak dinlenme zar potansiyeli ve uyarılabilirliği düzenleme, aksiyon potansiyelini şekillendirme, kas kontraksiyonunu ve eksositozu tetikleme, hücre hacmini düzenleme ve daha pek çok önemli hücrenel süreçte yer alırlar (5).

Sahip oldukları sulu gözenek yapısı, açık-kapalı olma durumunu belirleyen kapı mekanizmaları ve seçici geçirgenlikleri gibi fiziksel özellikleri ile suda çözünebilir olan bazı iyonik moleküllerin hücre zarından pasif geçişlerini kontrol etmektedirler (5, 44). Gözenek yapısı hücre içi ve hücre dışı sıvıları arasında bir geçiş noktası oluşturmaktadır. Gözenek duvarlarında ise çoğunlukla iyon geçişlerini sınırlandıran hidrofilik aminoasit rezidüleri sıralanmıştır. Kapı mekanizması protein konformasyonundaki bir değişimdir. Konformasyon değişimini ise zarda oluşan bir voltaj değişimi, kanala bir ligand bağlanması ve hücre içi bir faktöre yanıt olarak ikincil mesajcı bir sistemin etkinleşerek kanalı etkilemesi gibi çeşitli mekanizmalar başlatabilmektedir (44).

Yapısal özellikleri bakımından değerlendirildiğinde farklı sayıda  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  gibi altbirimlerden ve S1, S2... gibi farklı segmentlerden oluşurlar. Pek çok voltaj kapılı kanalda gözenek yapısını  $\alpha$  altbirimi oluşturur (41). Şekil 2.5. voltaj kapılı bir kanalda  $\alpha$  altbiriminin yapısını göstermektedir.



**Şekil 2.5.** Voltaj kapılı bir kanalda  $\alpha$  altbiriminin ve P gözenek yapısının yerleşimi. S1, S2, S3, S4, S5 ve S6  $\alpha$  altbirimini oluşturan segmentler, S4 voltaja duyarlı olan segment.

Kapı mekanizmasına göre iyon kanalları; voltaj-kapılı, ligand-kapılı (iyonotropik reseptörler) ışık-kapılı, mekanosensitif, siklik nükleotid-kapılı ve  $\text{Ca}^{+2}$  kapılı iyon kanalları olarak sınıflandırılabilir (45).

İyon kanallarının modülasyonu kalp hastalıkları, nörolojik hastalıklar, böbrek yetmezliği, ağrı algısı ve körlük gibi çok geniş aralıkta bir hastalık grubu ile ilişkilidir. İnsan hastalıklarında 60'dan fazlası kanallarda oluşan mutasyonlardan kaynaklandığı için kanalopati olarak değerlendirilmektedir. İnsan fizyolojisinde bu kadar önemli bir yer tutması ve dokularda oldukça çeşitli bir dağılıma sahip olması, iyon kanallarını tedaviye yönelik ilaç araştırmalarında oldukça çekici kılmaktadır (46). İyon kanallarına yönelik ilaç çalışmaları bağıl olarak azdır. Satılmakta olan ilaçların sadece %5'i iyon kanallarını hedef almaktadır. İnsan genomu giderek keşfedildikçe ilaç tedavisinde iyon kanalları oldukça önemli proje kaynakları olacaktır (43).

### 2.2.1. Epitel Hücrelerde İyon Kanalları

Kanser sıklıkla epitel doku hücrelerinde görülen bir hastalıktır. Epitel hücreler vücudun farklı fizyolojik bölümlerini ayıran dinamik bariyer görevi görür. Bir taraftan konak vücut kısmına girmeye çalışan patolojik mikropları engelleyen fiziksel bir bariyer görevi görürken, diğer taraftan hücrelere taşınan iyonların, elektrolitlerin ve suyun geçişini düzenleyerek doku homeostazını sürdürmek zorundadırlar (47).

Epitel hücrelerin görevlerini yerine getirmede iyon kanalları oldukça önemlidir. Epitel hücrelerdeki iyon kanalları vücudun belirli bölümleri arasında iyonların, bazı durumlarda da sıvıların hareketinde görevlidirler. Madde taşınımının işlevi temel olarak pek çok uyarılabilir dokudaki bilgi iletiminden farklıdır. Ancak kanalların temel yapısı her iki doku türünde de benzerlik göstermektedir. Epitel dokularda, özellikle  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  kanalları oldukça önemlidirler. İyon kanal yapısının asıl önemli işlevi transepitel olarak tuz hareketidir. Sıklıkla, bu tuz hareketine paralel olarak suyun da geçişi söz konusudur. Bu geçişler bazı vücut sıvılarında bulunan  $\text{K}^+$  ve  $\text{Na}^+$  seviyelerinin sürdürülmesi (homeostaz) ve ter, tükürük ve gözyaşı iletiminin yanı sıra, sindirim enzimlerinin ve mukusun, mide, bağırsak ve havayollarına iletimi için sıvının düzenlenmesi gibi önemli fizyolojik fonksiyonlara aracılık eder. Bu kanallar iyon geçişlerinde, uyarılabilir hücrelerle aynı temel prensiplere göre hareket ederler. Ancak düzenleri oldukça farklıdır. Kistik fibrozis transmembran iletiminin düzenlenmesi gibi bazı durumlarda, düzenlenme kanal proteinin fosforilasyonu ve siklik adenosin monofosfat (cAMP) üretimine bağlıdır. Epitelyal  $\text{Na}^+$  ve muhtemelen epitelyal  $\text{K}^+$  kanallarında ise kanalın intraselüler kısımları ve plazma zarı arasındaki translokasyon kanal aktivitesinin modülasyonunun altını çizer. Bu süreçlerde oluşabilecek sorunlar ise önemli hastalıklara yol açmaktadır (47).

Bütün hücre türleri kansere duyarlı olmasına karşın epitel hücrelerinde kansere yatkınlık daha fazladır (48).

### **2.2.2. İyon Kanalları - Kanser İlişkisi**

İyon kanalları çeşitli özelliklerinden dolayı hücre zarında tanı ve tedavide kullanılan ilaçlar için çok iyi hedefler olmuşlardır. İyon kanallarının 1970'li yıllarda keşfinden sonra pek çok hastalık kanalopati olarak ifade edilmiştir (41). İyon kanal proteinlerinin ekspresyonunun veya aktivitesinin değişimi kalp aritmileri, epilepsi, diyabet, kistik fibrozis, sağırılık ve migren gibi farklı pek çok hastalığa neden olmaktadır. Transmembran protein yapısında olduklarından hücre dışı ortamdan da bu yapılara ulaşmak mümkündür. Bu nedenle pek çok hastalıkta iyon kanalları tedavi amacı ile ilaç hedefi olarak kullanılmaktadır (6). Kanser her ne kadar kanalopati sınıflandırmasına girmese de, iyon

kanalları kanser arasındaki ilişki çalışmalarıyla desteklenmektedir. O nedenle son yıllarda özellikle voltaj kapılı kanallar başta olmak üzere kanser hastalığında da tedavi hedefi olarak değerlendirilmeye başlanmıştır (39).

Teknolojik gelişimlere paralel olarak, yama-kenetleme ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi yöntemler ile beraber iyon kanallarına özgü blokerlerin kullanımı kanser çalışmalarında giderek yaygınlaşmaktadır. Bu tip çalışmalarla özellikle  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$  ve  $Cl^-$  gibi kanalların, kanserde hücre döngüsü, hücre proliferasyonu, apoptozis, onkogenez ve hücre göçü gibi durumlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (7, 49, 50, 51)

### **2.2.2.1. $K^+$ Kanalları ve Kanser**

$K^+$  kanalları en çok çeşitliliğe sahip olan iyon kanalları olmasının yanı sıra, zar potansiyelinin kontrolü, aksiyon potansiyeli düzenlenmesi, nörotransmitter salınımı, insülin salınımı, hücre farklılaşması, aktivasyon, proliferasyon, hücre döngüsü ve apoptozis gibi pek çok fizyolojik işlevde önemli bir yere sahiptir. Deneysel veriler yer aldıkları bu normal fizyolojik süreçlerin dışında aynı zamanda kanser oluşumunda, hücre proliferasyonu, hücre göçü, gibi süreçlerde yer aldıklarını da göstermektedir (42, 52, 53, 54, 55).

$K^+$  kanalları pek çok kanser türünde bulunurlar (Çizelge 2.3.).  $K^+$  kanallarının pek çoğu proliferatif durumla çok fazla ilişkiliyken, sadece voltaja bağlı  $K^+$  kanal türü olan (Kv) Kv10.1 ve K2p9.1 (KCNK9) gibi birkaç türü net bir şekilde onkogenik bir etkiye sahiptir. Sadece bu kanallar sağlıklı hayvanlarda eksprese edildiklerinde onkogenik fenotip oluştururlar (55, 56, 57).

Farklı tümör ve kanser hücrelerinde eksprese olan  $K^+$  kanalları da değişen ekspresyon oranlarına sahiptir (52). Kv1 ailesinden Kv1.3 kanalı meme, kolon ve prostat kanserlerinde aşırı eksprese olurken, Kv1.1 ve Kv1.5 kanalları meme ve malign glioma hücre hatlarında bozulmuş ekspresyona sahiptir (58, 59, 60, 61, 62). Ayrıca Kv10.1'in onkogenik potansiyeline ek olarak, Kv10 (Eag) ve Kv11 (Erg) kanal ailelerinin üyelerinin pek çok hücre hattında eksprese oldukları gösterilmiştir. Kv10.1-2 meme ve nöroblastoma kanser hücre hatlarında eksprese olurken, Kv11.1 (eag-ilişkili gen, erg) gastrointestinal, endometriyal, nöroblastoma, lösemi kanserleri ve kanser hücre hatlarında eksprese

olmaktadırlar (9, 11, 55, 63, 64, 65, 66, 67, 68). Bunlara ek olarak içeri doğrultucu K<sup>+</sup> kanalları (Kir) da meme ve akciğer kanserinde tespit edilmişlerdir (69, 70, 71, 72). KCa1.1 olarak isimlendirilen, büyük iletkenlikli Ca<sup>+2</sup>'la aktive olan K<sup>+</sup> kanalı (BK) ve KCa3.1 olarak isimlendirilen, orta iletkenlikli Ca<sup>+2</sup>'la aktive olan K<sup>+</sup> kanalı (IK) ekspresyonlarının da prostat ve nöroblastoma kanserlerinde arttığı belirtilmiştir (73, 74, 75, 76).

**Çizelge 2.3.** Kanserde K<sup>+</sup> kanal gen ekspresyonu (54).

Kanser Türü	Kanal Geni																					
	Kv1.1	Kv1.3	Kv1.5	Kv3.4	Kv4.1	Kv7.1	Kv10.1	Kv10.2	Kv11.1	Kc <sub>v</sub> 1.1	Kc <sub>v</sub> 2.3	Kc <sub>v</sub> 3.1	Kir2.2	Kir3.1	Kir3.4	Kir4.1	Kir6.1	Kir6.2	K2P2.1	K2P3.1	K2P5.1	K2P9.1
	KCNA1	KCNA3	KCNA5	KCNC4	KCND1	KCNQ1	KCNH1	KCNH5	KCNH2	KCNMA1	SK3	IK1	KCNJ12	KCNJ3	KCNJ5	KCNJ10	KCNJ8	KCNJ11	KCNK2	KCNK3	KCNK5	KCNK9
Adrenal																						
Kan																						
Kemik																						
Beyin																						
Meme																						
Serviks																						
GI Sistem																						
Baş ve Boyun																						
Böbrek																						
Akciğer																						
Lenfoma																						
Melanom																						
Over																						
Pankreas																						
Prostat																						
Sarkoma																						
Tiroid																						
Rahim																						

Kırmızı kutular, aşırı eksprese oldukları bildirilen ve tümör oluşturucu süreçlerin (proliferasyon artışı, hücre göçü veya yayılım gibi) arttığı kanser türlerini; yeşil kutular, tümör malignitesi ve klinik agresiflik ile tersine ilişkili olan kanser türlerini; mavi kutu da yinelenen somatik mutasyonlar olması durumunda tespit edilen geni göstermektedir.

Kanser ve K<sup>+</sup> kanallarının artan ilgisi ortaya kondukça kanser tedavisinde K<sup>+</sup> kanallarının hedef olarak kullanımına da ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Potasyum kanalının kanser tedavisinde hedef olabileceğinin düşünülmesindeki temel nedenler ise şöyle sıralanabilir (52):

- K<sup>+</sup> kanalları hücre döngüsünü kontrol ederek hücre proliferasyonda yer alırlar.
- K<sup>+</sup> kanalları hücre ve dokuya özgü ekspresyona sahiptir.



- Bu proteinler sentetik blokerlere oldukça duyarlıdırlar. Bu da farmasötik firmaların daha etkili ve seçici moleküller üzerine çalışmalarında etkili olur.
- Kalp ve sinir hastalıklarında  $K^+$  kanallarını hedef alan tedavi yöntemleri günümüzde oldukça başarılıdır ve yan etkileri azdır.
- Pek çok kanser ve tümörde,  $K^+$  kanal ekspresyonu bozulmuştur.

#### **2.2.2.2. $Na^+$ Kanalları ve Kanser**

Voltaja duyarlı  $Na^+$  (VGNa) kanalları sinir ve kas gibi uyarılabilir dokularda aksiyon potansiyelinin oluşumu ve sürdürülmesinde önemlidir (77). Ancak bu kanallar görevleri tam olarak aydınlatılamasa da T-lenfositleri gibi uyarılabilir olmayan dokularda da eksprese edilmektedirler (78).  $Na^+$  kanalları bir  $\alpha$  birimi ve onunla bağlantılı olan  $\beta$  altbiriminden oluşur.  $\alpha$  altbirimini kodlayan 10 farklı gen bulunmaktadır. Bunlardan dokuzu Nav1 olarak isimlendirilen tek bir aileye aittir (77, 79, 80). VGNa kanalları kanserde ilk olarak 1995 yılında sıçan prostat kanseri hücre hattında yapılan bir çalışma ile tanımlandı (81). Daha sonra insan prostat kanseri hücre hattında yapılan bir çalışma ile insanda da varlığı gösterildi. Moleküler biyoloji ve farmakoloji çalışmaları ile eksprese olan asıl izoformun Nav1.7 olduğunu bulunmuştur. Yapılan çalışmalarla kanser hücrelerinde bulunan bu VGNa kanallarının galvanotaksi (hücrelerin elektriksel bir alana yanıt olarak belirli doğrultuda hareket etmesi), motilite ve invaziv potansiyellerine katkıda buldukları gösterilmiştir (82, 83, 84).

Prostat kanseri hücre hatlarında elde edilen bu sonuçlar araştırmacıları VGNa kanal aktivitelerini bloke ederek kanser tedavisinde hedef olarak kullanmaya yönlendirmiştir (85, 86).

#### **2.2.2.3. $Ca^{+2}$ Kanalları ve Kanser**

Voltaj kapılı  $Ca^{+2}$  kanalları (VGCa)  $Ca^{+2}$  homeostazında, ve böylece kasılma, sekresyon ve gen düzenlenmesinde, önemli bir role sahiptirler. Temelde bir  $\alpha$  ( $\alpha1$ ,  $\alpha2$ ) altbiriminin yanı sıra yardımcı altbirimlerden ( $\beta1-4$ ,  $\gamma$ ) oluşur (bazen yardımcı altbirim

olmayabilir).  $\alpha$  altbirimini 10 farklı gen kodlamaktadır. Düz kas gibi bazı dokularda hücre proliferasyonuna katkıda bulunurlar ve hücre döngüsünde ekspresyonları değişmektedir. G1 evresinde az oranda eksprese olurken, S ve M evresinde ekspresyonları artar (49).

PC-3 ve LNCaP prostat kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada  $Ca^{+2}$  girişi bloke edildiğinde kanser tümör hücrelerinin proliferasyonunun azaldığı gözlenmiştir. Bu çalışmada, fare prostat kanseri modelinde Cav3.2 kanalının TH-1177 ile blokajının hayvan sağ kalımını uzattığı sonucuna ulaşılrken hiçbir yan etki gözlenmemiştir (87). Meme kanseri ve prostat kanserinde yapılan çeşitli çalışmalarla Cav3.2 kanalının aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir (88, 89).

Tümör hücrelerinde Cav3 kanalının proliferasyondaki rolünün keşfi ile tümör proliferasyonunu inhibe edecek farmakolojik ajanlar ve antikörler üzerine çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (89, 90).

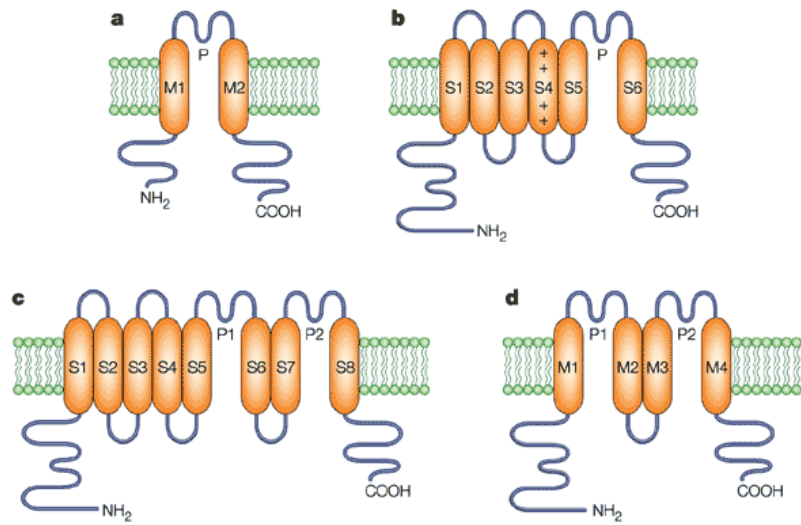
#### **2.2.2.4. Cl<sup>-</sup> Kanalları ve Kanser**

Diğer voltaj kapılı kanallar ile karşılaştırıldığında voltaj kapılı Cl<sup>-</sup> kanalları ile yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. MDA-MB-231, MDA-MB-435 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada  $Ca^{+2}$ 'la aktive olan Cl<sup>-</sup> kanal türü olan CLCA2'nin meme kanserinde tümör baskılayıcı gibi hareket ettiği sonucuna varılmıştır (91). Kolon kanserinde yapılan başka bir çalışma ile CLCA1 ve CLCA2'nin bu kanser türünde tümör baskılayıcı olarak düşünülebileceği sonucuna varılmıştır (92). Daha sonra bu kanalların neden tümör baskılayıcı olduğunu anlamaya yönelik pek çok çalışma yapılsa da bu konu netlik kazanmamıştır.

#### **2.2.3. K<sup>+</sup> Kanalları**

K<sup>+</sup> kanalları 100'ün üzerinde çeşide sahip olan en geniş kanal ailesidir (93). İnsan genomunda yaklaşık 90 farklı gen ürünüyle eksprese olurlar. Genetik çeşitliliklerine rağmen bütün K<sup>+</sup> kanallarında örneğin gözenek yapısını oluşturan dizilimlerin benzer olması gibi yapısal benzerlikler vardır.

Yapısal olarak incelendiğinde temel olarak  $\alpha$  ve  $\beta$  altbirimlerinden oluşur.  $\alpha$ -altbirimi gözenek yapısını şekillendirmektedir.  $K^+$  kanalları sahip oldukları altbirim ve gözenek yapılarına bağlı olarak dört temel gruba ayrılmaktadırlar. Bunlardan birincisi 2 altbirim 1 gözenek yapısına (2TM, 1P), ikincisi 4 altbirim 2 gözenek yapısına (4TM, 2P), üçüncüsü 6 altbirim 1 gözenek yapısına (6TM, 1P) ve dördüncüsü de 8 altbirim 2 gözenek yapısına (8TM 2P) sahiptir (Şekil 2.6.) (94).



Nature Reviews | Neuroscience

Şekil 2.6. Potasyum kanal ailesi yapısal sınıflandırması (94).

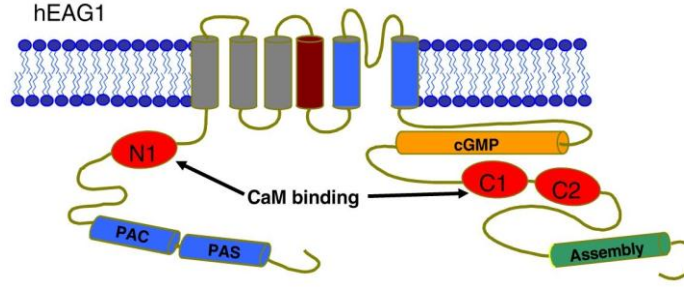
$K^+$  kanallarının açılması katyonların pasif olarak zardan geçişini sağlar. İyon akışı hızlı olmasına rağmen  $K^+$  kanalları oldukça seçicidir. İyon seçiciliği gözenek yapısında yer alan seçici filtre ile gerçekleşir. KcsA kanalının kristal yapısı incelendiğinde, filtrenin boyunun  $\sim 12$  Å, çapının ise  $\sim 2,5$  Å olduğu bulunmuştur. Gözenek yapısı tirozin-valin-glisin-tirozin-glisin aminoasit rezüdülerinden oluşmaktadır. Sahip oldukları  $\beta$ -altbirimleri ve pek çok aksesuar protein kanalın fonksiyonel özelliklerini belirlemektedir (94, 95).

K<sup>+</sup> kanalları dinlenme zar potansiyelinin ve aksiyon potansiyelinin düzenlenmesinde, hormon salgılanmasında, hücre hacminin düzenlenmesinde de önemli rol oynamaktadırlar (6).

#### 2.2.4. Eag1 Kanalları

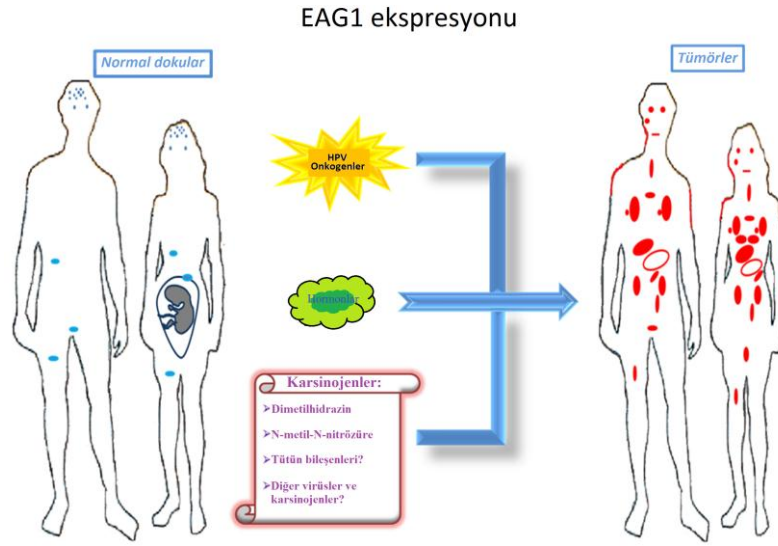
K<sub>v</sub> kanallarının Eag ailesi KCNH1 genleri ile kodlanmaktadır (96, 97). Eag kanal ailesi farklı türlerin ilişkili DNA dizilerine bakıldığında, *ether-a`-go-go* (Eag, insandan elde edilen hEag), Erg ve Eag-benzeri K<sup>+</sup> kanalı (Elk) olmak üzere dizileri benzer üç alt aileye ayrılmaktadır (98, 99). Eag kanal ailesinin bir ferdi olan Eag1 kanal geni (Kv10.1, KCNH1) ilk olarak *Drosophila melanogaster* olarak isimlendirilen sirke sineğinde belirlenmiştir (100).

Dizi verileriyle beraber, sıçan, fare, *Drosophila* ve insan Eag kanallarının dizi uyuşması incelendiğinde, bu kanalların yapısal olarak K<sub>v</sub> kanallarıyla ve siklik nükleotid-kapılı katyon kanallarıyla ilişkili oldukları gösterilmiştir (98). Kanalın elektrofizyolojik özellikleri oldukça karakteristiktir. Bu kanallar zar depolarizasyonu ile aktive olurken, yavaş inaktivasyon gözlenir (101). Eag kanalları da pek çok K<sub>v</sub> kanalı ile benzer kanal yapısına sahiptir. İletkenlik gözeneği olarak isimlendirilen bir merkez etrafında yerleşik olan dört altbirimden oluşup tetramerik yapıdadır. Her bir altbirim S1, S2, S3, S4, S5 ve S6 olarak ifade edilen altı parça transmembran bölümden oluşmaktadır. S4 bölümü temelde voltaj sensörü görevi görmektedir. S5 ve S6 bölümleri birleşerek K<sup>+</sup>a duyarlı olan kanal gözeneğini oluşturmaktadır. Ayrıca her altbirim hücre içi ortamda geniş amino- (N) ve karboksi- (C) terminal bölgeleri içermektedir. Eag kanallarının N-terminal ucu, kalmodülün bağlanan bir kısım ve oksijene duyarlı diğer faktörlerle ve hipoksi ile indüklenebilir faktörün aktivasyonu ile ilişkili olan Per-Arnt-Sim (PAS) bölümünü içermektedir. C-terminal ucu ise siklik kalmodülün bağlayan bölge, tetramerizasyon-bobin-bobin ve kalmodülün bağlanması için bölge ile Ca<sup>2+</sup>/kalmodülün bağımsız protein kinaz II bölümlerini içermektedir (39, 102, 103, 104, 105) (Şekil 2.7. ).



Şekil 2.7. Eag1 kanal yapısı şematik gösterimi (106).

Eag1 kanalının normal dokularda ekspresyonu oldukça sınırlıdır (107). Normal dokuda, başlıca sinirsel uyarıyı düzenleyen merkezi sinir sisteminde bulunmasının yanı sıra miyoblastlarda, placentada, testislerde ve adrenal bezlerde de bulunabilmektedir. Ancak kanser hücre hatları ve primer kanser dokularından elde edilen pek çok çalışmada Eag1 mesajcı RNA'sı (mRNA) eksprese edilmiştir (Şekil 2.8.). Pek çok kanser türünde kanserin ilerlemesini desteklemektedir. Ayrıca, tümör dokularında Eag1 kanal aktivitesinin farmakolojik blokajı ve RNA girişimiyle (RNAi) kanal ekspresyonunun engellenmesinin hücre proliferasyonunu azalttığı belirtilmiştir. Miyoblastlarda Eag1 kanalının aktivasyonu hücre füzyonu için gereken hiperpolarizasyonu sağlamaktadır. Ancak Eag1 kanalının görevi ekspresyonun görüldüğü normal dokuların çoğunda henüz tam olarak bilinmemektedir. Şekil 2.8. normal ve tümörlü dokularda Eag1 kanal ekspresyonunu göstermektedir (9, 12, 39, 55, 102, 108, 109, 110, 111, 112, 113).



**Şekil 2.8.** Normal ve tümörlü dokularda Eag1 kanalı ekspresyon dağılımı (Normal dokularda mavi noktalar, tümörlü dokularda ise kırmızı noktalar Eag1 kanalının eksprese olduğu dokuları göstermektedir) (39).

Eag1 kanalının, kanser dokusunda hücre döngüsü ve hücre proliferasyonunda rol oynadığını gösteren çalışmalar, bu kanalın yüksek onkogenik potansiyelini ortaya koymaktadır. Xenopus oositinde yapılan bir çalışmada progesteron ve mitoz kolaylaştırıcı hormonun neden olduğu oosit olgunlaşmasının Eag1 kanalının akım genliğini azalttığı ve bunun sonucunda Eag1 kanalının hücre döngüsünde yer aldığı gösterilmiştir (114). Başka bir çalışmada, G2/M fazı geçiş sırasında hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinin, Eag1 kanalının akım-voltaj karakteristiklerinde olan değişikliklerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Eag1 kanalının onkogenik potansiyeli Pardo ve ark.'nın (55) 1999 yılında yaptıkları bir çalışma ile gösterilmiştir. Yaptıkları çalışmada Eag1 kanalının, normalde Eag1 kanalını eksprese etmeyen hücrelere transfeksiyonunun, transfekte bir fenotipe neden olduğunu ve Eag1 transfekte hücrelerin düşük serum konsantrasyonlarında ve belirli odaklarda büyüebildiklerini belirtmişlerdir. Bu çalışmayla Eag1 mRNA'sının nöroblastoma, meme ve serviks kanseri hücre hatlarında eksprese olabileceğini bulmuşlardır. Ayrıca kanal ekspresyonunun antisens oligonükleotidler ile inhibisyonu sonucu kanser hücrelerinde DNA sentezi azalmış bu durum da Eag1 kanalının onkogenik potansiyelini ortaya koymuştur. Daha sonra antihistaminik astemizol ve antidepresan imipramine gibi çeşitli

maddeler ile yapılan çalışmaların sonucunda da Eag1 kanal ekspresyonunun ve aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (9, 115).

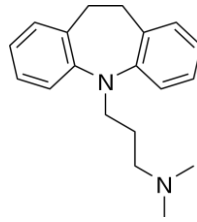
İyon kanallarının kanser de dahil pek çok hastalıkta rol oynaması ve yanı sıra günümüzde kanser tedavileri değerlendirildiğinde, özellikle tedaviye yanıt vermeyen hastalarda iyon kanallarının bir tümör belirteci olarak öne sürülebileceği kanısı giderek yaygınlaşmaktadır. Eag1 kanalının da kanserdeki yeri göz önünde bulundurulduğunda, bir tümör belirteci olarak değerlendirilme potansiyeli yüksektir. Eag1'in normal dokuda sınırlı olup pek çok kanserli dokuda yaygın bir şekilde bulunması, tedavi sürecinde diğer kanallara göre daha bir önem kazandırmaktadır. Çeşitli bulgular Eag1 kanalının serviks, meme ve kolon kanserinde erken bir tümör belirteci olabileceğini desteklemektedir. Ayrıca Eag1 kanal aktivitesinin ve ekspresyonunun inhibisyonuyla kanser hücre proliferasyonunun azalması da Eag1 kanalının bir antikanser hedefi olma potansiyelini de arttırmaktadır (39, 116, 117).

### **2.3. İmipramine Hidroklorür**

Kimyasal adı *10,11-Dihidro-N,N-dimetil-5h-dibenz[b,f]azepin-5-propanamin hidroklorür* ( $C_{19}H_{24}N_2.HCl$ ) olan imipramine, Amerikan Ulusal Gıda ve İlaç Kuruluşu'nun onayladığı, trisiklik bir antidepresandır (TCA). Depresyonun yanı sıra, pedyatrik nokturnal enürezis gibi rahatsızlıkların tedavisinde ve bazı durumlarda ağrı kesici ilaçlar ile beraber kronik ağrı tedavisinde kullanılan bir ilaçtır (118, 119).

Depresif olmayan bireylerde ruh halini etkilemezken sedasyona sebep olabilir. Depresif bireylerde ise ruh haline pozitif bir etkisi vardır. TCA'lar serotonin ve norepinefrin geri alımının potansiyel inhibitörleridir. İmipramine gibi tersiyer amin TCA'lar sekonder TCA'lerden daha etkili inhibitörlerdir. Aynı zamanda, kronik kullanımında, serebral kortikal  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerde down regülasyon ve postsinaptik serotonerjik reseptörlerde duyarlılaştırma oluşturmaktadır. Antidepresan etkisini serotonerjik iletimde artışa neden olarak gösterdikleri düşünülmektedir. TCA'lar H1 histamin reseptörlerini,  $\alpha_1$ -adrenerjik reseptörlerini ve muskarinik reseptörleri de bloke

ederler. Bu durum sırasıyla sedatif, hipotansif ve antikolinergik etkilerini de açıklamaktadır. İmipramine'in sedasyon ve antikolinergik etkileri diğer tersiyer amin TCA'lerden daha azdır (120) (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. İmipramine'in kimyasal yapısı (120).

Klinik farmakoloji açısından değerlendirildiğinde, imipramine'in etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak etkisini temelde merkezi sinir sisteminin uyarılması ile göstermemektedir. Klinik etkisinin sinir uçlarında norepinefrin alımını bloke ederek adrenerjik sinapsların potensiyelizasyonundan kaynaklandığı varsayılmaktadır. İmipramine bir miyoakardiyal enfarktüs sonrasında akut düzelme periyodunda uyarıcıdır (121).

Çeşitli tümör hatları ile ilgili yapılan çalışmalarda, imipramine'in Erg ve Eag kanallarını bloke ederek hücre proliferasyonunu etkileyebileceği gösterilmiştir (10, 39).

#### 2.4. İyon Kanalı Çalışmalarında Yama Kenetleme Tekniği

İyon kanallarının temel işlevi belirli iyonların zar boyunca geçişine izin vererek zarın içi ile dışı arasında bir denge oluşturmaktır. Oluşan bu iyonik akım elektrofizyolojik ölçümlerle elektriksel bir akım olarak saptanabilir. Oluşan bu akım aktif kanal sayısı ve bu kanalların aktivasyon derecesi ile orantılıdır. Yama kenetleme tekniği ise bu kanallardan geçen akımı ölçerek zarda aktif olan kanallar ile ilgili bilgi vermektedir (122).

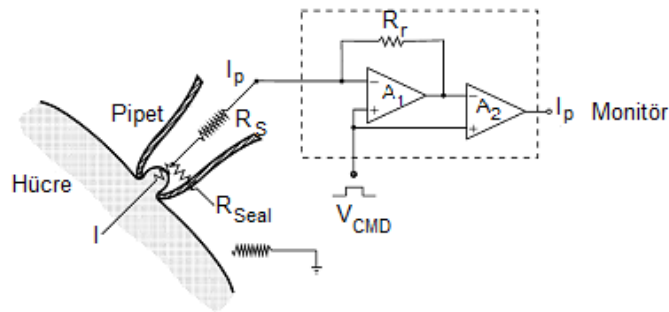
Bu teknik ilk olarak 1976 yılında Erwin Neher ve Bert Sakmann tarafından ucu mikrometreler mertebesinde olan bir cam mikroelektrot yardımı ile hücre zarındaki bir veya birkaç iyon kanal proteinin elektriksel aktivitesini ölçmek için tasarlanmıştır. Kurbağa



iskelet kasında yaptıkları bu çalışma sonraki çalışmalarını tetiklemiş ve bu alanda yaptıkları çalışmalar, kendilerine 1991 yılında Nobel Tıp Ödülünü kazandırmıştır (123, 124). Bu teknik, mühürleme ve farklı yama kenetleme yöntemlerinin keşfedilmesiyle 1980’li yıllardan bu yana pek çok hücrede kullanılmaktadır. Günümüzde canlı hücrede iyon kanal çalışmalarında yüksek zaman çözünürlüğünde, toplam zar akımındaki değişiklikler, hücre içi voltajı veya zar kapasitansının ölçümü gibi çeşitli amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır (122, 125).

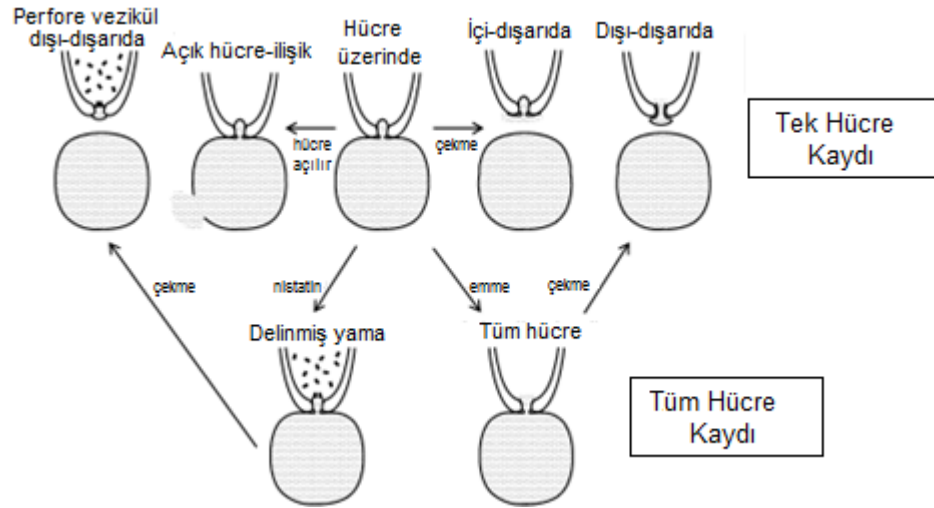
Yama kenetleme tekniği, cam bir mikropipiller tüpün içine yerleştirilen gümüş / gümüşklorür (Ag / AgCl) elektrodun kullanılmasıyla hücre zarında bulunan iyon kanallarından elektriksel kayıtların yapıldığı bir tekniktir. Elektrodun ucu hücre zarına o kadar sıkı yapışır ki, elektrodun içi ve dışı arasındaki elektriksel direnç 1 GΩ (gigaohm) değerinden fazla olur. Giga-mühür koşulu sağlandıktan sonra zarın belirli voltaj değerlerine kenetlenmesi (voltaj kenetleme) ile zarda bulunan iyon kanallarından pikoamper (pA,  $10^{-12}$  A) dolayındaki elektriksel akımlar kayıtlanmaktadır (122).

Yama-kenetleme tekniği temel devresi birkaç operasyonel yükseltecin (A1, A2) bir araya gelmesi ile oluşan bir akım-voltaj çeviricisidir (Şekil 2.10.). Operasyonel yükseltecin hem tersleyen ucu hem de terslemeyen ucu bir geri besleme direnci yardımı ile aynı voltaja kenetlenir. Uygulanan bu kenetleme voltajı terslenmeyen uca uygulanan komut voltajıdır ( $V_{CMD}$ ). Böylece zar parçası istenen voltaja kenetlenmiş olur. Mühürleme işlemi gerçekleştirildikten sonra, mühürleme boyunca oluşan paralel akım ( $I_p$ ), kaydedilen akımla ( $I$ ) karşılaştırılabilir seviyeye gelir. Bu durumda kaydedilen akım zar akımını yansıtır (122).



**Şekil 2.10.** Yama kenetleme tekniğinin temel prensibi. Burada  $R_s$  seri direnç ya da giriş direnci,  $R_{seal}$ , mühürleme direnci olarak ifade edilir (122).

Yama kenetleme tekniğinde, ilk olarak tek kanal akımlarının kayıtları amacıyla hücre üzerinde adı verilen yöntem kullanılmıştır (123). İlerleyen zamanlarda iyon kanalları ile ilgili farklı katkılar sağlayan yeni yöntemler geliştirilmiştir. Özellikle tek kanal kaydı çalışmalarında içi dışarıda, dışı dışarıda, açık hücre üzerinde içi dışarıda ve delinmiş vezikül dışı dışarıda yöntemleri ile tüm hücreden kayıt almak amacıyla da klasik hücre üzerinde ve delinmiş yama modu kullanılmaktadır (125, 126, 127, 128). Şekil 2.11. bu teknikte kullanılan kayıt biçimlerini kısaca özetlemektedir.



Şekil 2.11. Yama kenetleme tekniği ile oluşturulan kayıt biçimleri (122).

Hücre üzerinde kayıt biçiminde  $G\Omega$  koşulları sağlandıktan sonra tek kanal akımları kaydedilir. Gözlenen kanal aktivitesi hücre içi ortama minimum dağılım gösterir. İç-dışarıda kayıt biçiminde zar parçasının hücre içine denk gelen kısmı banyo perfüzyonu ile kontrol edilebilir. Tek kanal aktivitesi hücreden bağımsız olarak gözlenebilir. Dışı-dışarıda kayıt biçiminde ise hücre zarının iç kısmı pipet çözeltisi ile etkileşebilir. Bu kayıt biçiminde zarın dış kısmı tek kanal kaydı sırasında perfüze edilebilir. Açık hücre-ilişik içi-dışarıda kayıt biçiminde hücrede, elektrottan uzak bir noktada mekanik parçalama

ile delik açılır. Bu durumda hücre içi ortam perfüzyon ile kontrol edilebilir. Perfore vezikül dışı-dışarıda kayıt biçiminde zar parçası dikkatlice hücreden ayrılır. Bu yöntemde mitokondri gibi bazı hücre içi organelleri içeren veziküller oluşturmak mümkündür. Dışı-dışarıda kayıt biçimindeki gibi tek kanal kaydı almak mümkündür. Klasik tüm hücre kayıt biçimi ise hücre üzerinde modu elde edildikten sonra zar parçasının yırtılmasıyla oluşturulur. Tüm zar boyunca oluşan akımlar kaydedilir. Bu kayıt biçiminde voltaj-kenetleme ve akım-kenetleme yapmak mümkündür. Tüm hücre kayıt biçiminde pipet çözeltisine gözenek oluşturucu özelliği olan iyonoforlar, nistatin (veya amfoterisin B), eklenir. Bu iyonoforlar sadece aynı değeriğe sahip iyonlara geçirendir (122).

Yama-kenetleme kayıt biçimleri farklı çalışma alanlarında, farklı amaçlar için kullanılabilir. Böylece kanal akımlarının kaydı ile hücre içi veya hücre dışında oluşan mekanizmaları tartışmak mümkün olur.

## **2.5. Eş Zamanlı PCR**

PCR yöntemi 1985 yılında Kary Mullis tarafından tanımlanmıştır. Eş zamanlı PCR (qPCR, real time PCR), hedef DNA molekülünü çoğaltmak ve eş zamanlı olarak nitelemek ya da miktarını belirlemek için kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu tabanlı bir moleküler biyoloji laboratuvar yöntemidir. Bu yöntem, bir DNA örneğindeki bir veya daha çok özel dizinin hem tespitini hem de nitelenmesini mümkün kılar(129, 130). .

Eş zamanlı PCR'da, PCR tekniğinin genel prensipleri takip edilir; temel prensibi DNA dizisi arttırılırken reaksiyon sürecinin eş zamanlı olarak yapılmasıdır. PCR'a göre daha yeni bir yöntemdir. Eş zamanlı PCR'da ürünlerin tespiti için iki yaygın yöntem kullanılır (129, 130).:

1. Spesifik olmayan, floresan habercilerin DNA çift sarmalına eklenmeleri,
2. Floresan bir haberci ile işaretlenmiş oligonükleotidleri içeren spesifik dizi DNA problemleri ile,

yapılır. Floresan prob ile kantitasyonu yapılmak üzere izole edilen mRNA'lardan sentezlenen tamamlayıcı DNA'yı (cDNA) niteleyen komplementer dizinin hibridizasyonu sağlanmış olur.

Kanser hastalığının genetik faktörleri düşünüldüğünde, eş zamanlı PCR yöntemi kanser çalışmalarında da oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle lösemi gibi kanser türlerinde, özgün gen ifadesi düzeylerinin belirlenmesi tedavi protokollerini de etkilenmektedir (129, 130).

## 2.6. MTT Ölçümü

Hücre ilaç duyarlılığını değerlendiren farklı analiz yöntemleri bulunmaktadır. Bunlardan biri de hücre canlılığının bir ölçütü olan sitotoksosite analizleridir ve özellikle yeni ilaç geliştirme alanında oldukça yaygın kullanılırlar. Sitotoksosite analizleri ilaç maruziyeti sonrasında hücrelerin yapısal bütünlüğünü ve metabolik fonksiyonlarını değerlendirirler ve tek tabakalı hücre kültürüne uygulanmaktadırlar (131).

Sitotoksosite analizlerinden biri olan MTT analizi, canlı hücrelerde *3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür* (MTT) bileşiğinin formazan kristallerine dönüştürülmesini temel alan bir analizdir. Bu dönüşüm mitokondriyal aktiviteyi gösterir. Pek çok hücre popülasyonunun toplam mitokondriyal aktivitesi, canlı hücre sayısı ile ilişkilidir. Bu analiz yöntemi *in vitro* olarak, hücre hatları veya primer hasta hücreleri üzerine bir ilacın sitotoksik etkisinin ölçümünde yaygın olarak kullanılır (131).

Kolorimetrik bir analiz olan MTT analizinin temeli eksponansiyel büyüme fazındaki hücrelerin sitotoksik bir ilaca maruz bırakılmasına dayanmaktadır. Maruziyet süresi genellikle maksimum hasarın meydana gelmesi için gereken süre ile belirlenir, ancak aynı zamanda ilacın kararlılığından da etkilenir. İlacın geri alınmasından sonra hücrelerin popülasyon ikiye katlanma sürelerinin (PDT) 2 veya 3 katı kadar süre çoğalmalarına izin verilir. Böylece canlı olup çoğalma yeteneği olan hücreler ile canlı olup çoğalma yeteneği olmayan hücreler arasında ayırım yapılır. MTT sarı renkli ve suda çözülebilir bir tuzdur, canlı hücre mitokondrisinde süksinik dehidrogenaz enzimine duyarlıdır ve burada suda çözülemeyen mor renkli formazan tuz kristallerine indirgenir. Oluşan MTT-formazan miktarı uygun bir çözücüde çözüldüğünde spektrofotometrik olarak belirlenebilir. MTT uygulamalarında laboratuvarlar arası farklılıklar bulunabilir (131).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmalarda kullanılan DU-145 prostat hücre hattı Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Üroonkoloji Laboratuvarı'ndan sağlanmıştır.

##### 3.1.1. Hücre Besi Ortamı

Deney aşamasına kadar hücreler fiziksel ortamın sıcaklığı 37 santigrat (°C)'de, pH değeri 7,0-7,4 aralığında ve karbondioksit (CO<sub>2</sub>) miktarı %5 değerinde sabit tutulan inkübatör içinde aşağıda belirtilen besi ortamında tutuldular:

100 mililitre (mL) RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) medyum

10 mL fötal sığır serumu

2,5 mL L-glutamin

1 mL Penisilin-Streptomisin

1 mL Amfoterisin

##### 3.1.2. Hücrelerin Bölünme ve Pasaj Zamanları

Ekim yapıldıktan sonra inkübatörde bekletilmekte olan hücreler, konfluent oluncaya kadar 3-4 günde bir beslendi. Hücreler, konfluent olduktan sonra üç defa fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkanıp tripsin etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) ile 5 dakika (dk.) inkübe edildikten sonra kaldırılıp 1:5 oranında kaplara pasajlandı. Üreme ortamı için T25 (25 cm<sup>2</sup>), T75 (75 cm<sup>2</sup>) ortam kapları, 96 kuyucuklu plateler ve 35 milimetre (mm)'lik çapa sahip petri kapları kullanıldı.

### **3.2. Deney Grupları**

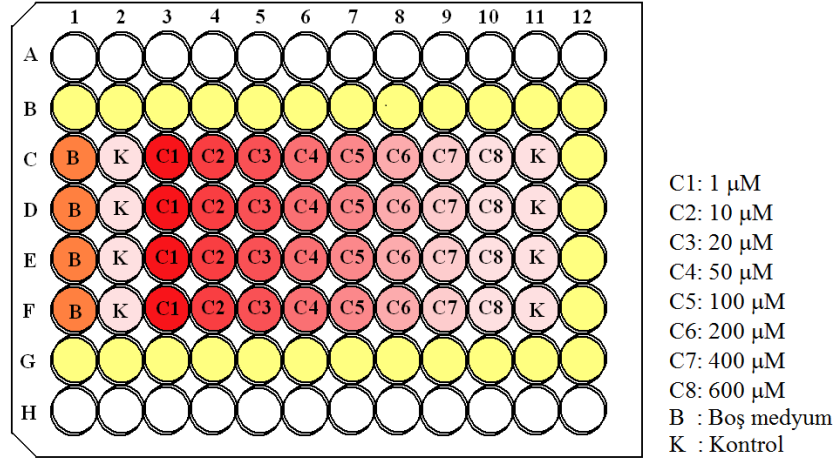
Yapılan doz belirleme analizi sonucunda 10, 50 ve 75 mikromolar ( $\mu\text{M}$ ) olmak üzere üç deney grubu oluşturuldu. Sitotoksisite ve gen ekspresyonu deneylerinde 48 saatlik ilaç uygulamasının yapıldığı üç doz grubunun yanı sıra hiç ilaç uygulanmayan bir kontrol grubu olmak üzere 4 grup çalışıldı. Yama kenetleme deneylerinde, her bir grup için ilaç uygulamadan (0. dk.) yapılan ilk ölçümler her grubun kendi kontrolü olarak değerlendirildi.

### **3.3. MTT Analizi**

MTT analizi, çalışmada hem dozların belirlenmesinde hem de sitotoksisitenin değerlendirmesinde kullanıldı.

#### **3.3.1. Doz Belirleme**

Doz belirleme amacıyla yapılan pilot çalışmalarda imipramine hidroklorür için 1, 10, 20, 50, 100, 200, 400 ve 600  $\mu\text{M}$  doz değerleri kullanıldı. Innovatis Cedex XS hücre analizörü (Roche) ile %90 oranında sitotoksisite tespit edilerek, hücreler kuyucuk başına 2000 hücre olacak şekilde 3 tane 96'lık platee imipramine konsantrasyon değerleri Şekil 3.1.'de gösterildiği biçimde ekildi. Her bir kuyucuğa 200 mikrolitre ( $\mu\text{L}$ ) medyum eklendi. Ekimden 24 saat sonra ilaçlı medyum alınarak yerine taze medyum eklendi. DU-145 hücreleri için "populasyonun iki katına çıkma süresi" (population doubling time, PDT) 33 saat olarak belirlendi. PDT'nin 3 katı kadar süre içinde her gün medyumlar yenilendi. Bu sürenin sonunda platelerden medyumlar alınarak yerine MTT'li medyum eklendi. Bunun için her bir kuyucuğa minimum ışıklı ortamda 200  $\mu\text{L}$  medyum ve konsantrasyonu 5 miligram (mg)/mL MTT'den 50  $\mu\text{L}$  eklendi. Bu şekilde inkübatörde 3,5 saat inkübe edildi ve Elisa analizi öncesi kuyucuklardan bu sıvı alınarak yerine 200  $\mu\text{L}$  dimetil sülfoksit (DMSO,  $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ ) ve pH değeri 10,5 olan glisin tamponu eklendi. Plateler bekletilmeden 570 nanometre (nm) dalgaboyuna ayarlanmış ELISA cihazında absorbans ölçümü yapıldı.



Şekil 3.1. MTT analizinde grupların doz belirleme amacıyla 96'lık platelerde yerleşimi.

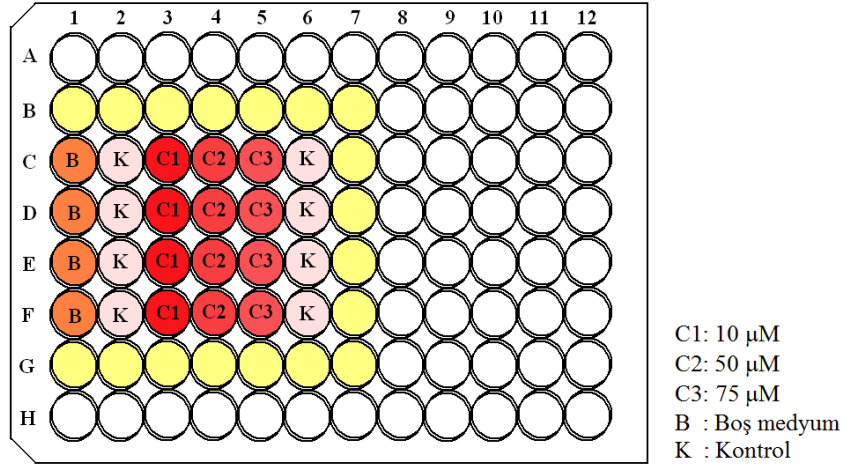
### 3.3.2. IC<sub>50</sub> Değerinin Hesaplanması

Yapılan MTT analizi sonucunda maksimumun canlı hücre sayısının yarısını inhibe eden, verilen parametrede %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) değeri hesaplandı ve doz belirleme çalışmaları tamamlandı.

IC<sub>50</sub> değerinin hesaplanması için, elde edilen doz-absorbans eğrisi Grappad Prism 6 programı kullanılarak sigmoidal bir eğriye fit edildi.

### 3.3.3. Sitotoksosite Analizi

Deneylerde kullanılacak 10, 50 ve 75 µM olan doz grupları belirlendikten sonra Bölüm 3.3.1'de belirtilen bütün aşamalar sitotoksosite analizinde 48 saatlik uygulama zamanı için tekrarlandı. Kontrol ve deney gruplarının yerleşimi Şekil 3.2.'de belirtildiği gibidir.



Şekil 3.2. Sitotoksiste analizinde, grupların 96'lık platelere yerleşimi.

### 3.4. Elektrofizyolojik Kayıtlar

#### 3.4.1. Hücre Kültürü ve Kullanılan Çözeltiler

Elektrofizyolojik kayıtlarda hücreler 35 mm'lik petri kaplarına ekildi ve çalışma gününe kadar inkübatörde besi ortamında bekletildi. Ekim işleminden 1-2 gün sonra çalışmalarda kullanıldılar.

Petrilerdeki hücrelerden kayıt alabilmek ve hücrelerin canlılığını sürdürmek için inkübatördeki besi ortamları yerine içeriği 144 sodyumklorür (NaCl), 5,4 potasyumklorür (KCl), 1 magnezyumklorür (MgCl<sub>2</sub>), 2,5 kalsiyumklorür (CaCl<sub>2</sub>), 5 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetanesulfonik asit (HEPES), 5,6 D-glukoz (milimolar, mM) olan banyo çözeltisi kullanıldı. Kayıt alma amacı ile kullanılan cam pipetleri doldurmak için de, içeriği 5 NaCl, 145 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 etilen glikol tetra asetik asit (EGTA) ve 10 HEPES (mM) olan pipet çözeltisi kullanıldı.

#### 3.4.2. Pipetler ve 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 (Amerika



Birleşik devletleri, ABD) ait, 1B150F-4 model filamentli pipetler kullanıldı. Deneyleerde pipetlerin kullanılabilir uzunluk ve şekilde olması için hız, sıcaklık ve basınç gibi değişkenleri programlanabilir, otomatik bir pipet çekici kullanıldı (P97 model, Sutter Instruments CO, ABD). Pipetler cihazda çekilerek uygun şekilde dönüştürüldükten sonra içleri pipet çözeltisi ile doldurularak yama kenetleme sisteminde bulunan pipet tutucu kısmına takıldı. Bu aşamadan sonra pipet direnç değeri 2-6 megaohm (MΩ) olmayan pipetler kayıtlarda kullanılmadı.

### **3.4.3. Deney Düzenegi**

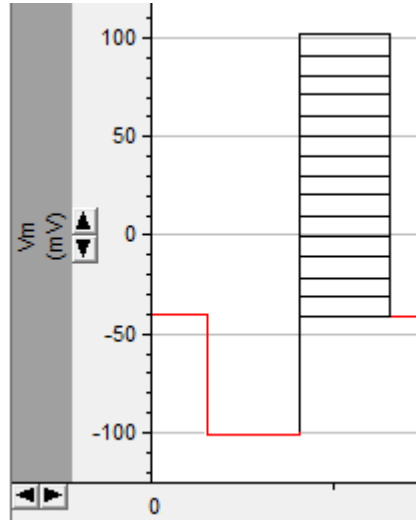
Hücre zarı belirli voltaj değerlerine kenetlenerek zarda oluşan akımlar kayıtlandı. Bu amaçla yama kenetleme tekniği kullanıldı. Kayıtlarda, iki kanallı olan bilgisayar kontrollü Multiclamp 700B (Axon Instruments, ABD) yama kenetleme yükselteci ve bununla uyumlu olan Digidata 1322A sayısal çevirici (Axon Instruments, ABD) kullanıldı. Multiclamp 700B yükselteci bilgisayardan MultiClamp 700B Commander (Axon Instruments, ABD) yazılımı ile yönlendirildi. 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 yapıldı. Kayıt aşamasında hücre ile pipetin takibini yapabilmek için BM-37XB (U-Therm International (H. K. ) Limited), invert mikroskop kullanıldı (Şekil 3.3.). Bilgisayarda bulunan Clampex 9.2 (Axon Instruments, ABD) yazılımı ile kenetleme direncinin takibi, hücre zarına gerilim protokolünün uygulaması ve akım kaydı yapıldı. Oluşan akım kayıtları Clampfit 10 (Axon Instruments, ABD) yazılımı ile analiz edilerek değerlendirildi. Yapılan analizlerde sadece maksimum akım kayıtları değerlendirmeye alındı.



Şekil 3.3. Yama kenetleme kayıt düzeneği.

#### 3.4.4. Uygulanan Kenetleme Protokolü

Yapılan ön denemeler ve literatür taraması sonucunda hücrelere uygulanacak kenetleme protokolüne karar verildi. Kenetleme protokolü, kenetleme potansiyeli -40 milivolt (mV) ve başlangıç potansiyeli -100 mV olacak şekilde belirlendi. 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 ulaşıldı (Şekil 3.4.). Her iki dk.'da bir kayıt alınmak üzere 0. (kontrol), 2., 4., 6., 8. ve 10. dk.'larda olmak üzere toplam 10 dk. süresince kayıt alındı. Kayıtlarda sadece mühürleme direnci 1-10 G $\Omega$  aralığında olan hücre kayıtları değerlendirmeye alındı.



Şekil 3.4. Hücreye uygulanan voltaj-kenetleme protokolü.

### 3.5. Gen Ekspresyonu Deneyleri

Çalışma için kullanılan primer dizaynları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Eag1 K<sup>+</sup> kanalı gen ekspresyonunda kullanılan primer dizileri

Primer	Uzunluk	Pozisyon	Tm	%GC	Primer Dizileri
Reverse Primer	20	1184 - 1203	60	65	ggaggggagagagagtcagg
Forward Primer	20	1227 - 1246	59	50	agcagccggacaacttttag

#### 3.5.1. RNA İzolasyonu

High Pure RNA Isolation Kit (Roche) ile yapıldı.

Hücre kültüründen elde edilen 10<sup>6</sup> hücre 200 µL PBS ve 400 µL Lysis Binding Tamponu karışımında süspanse edilerek toplam 600 µL'lik bir karışım elde edildi.

İşlem adımları şu şekilde gerçekleşmiştir:

1. Örnek sayısı kadar filtreli tüpler ve toplama tüpler hazırlandı ve numaralandırıldı. Hazırlanan karışım filtreli tüpler içerisine kondu ve tüplerin kapakları kapatıldı.
2. Santrifüj işlemi 15 s süresince 8000 xg'de (yerçekimi kuvvetinin kaç katı olduğunu belirten birim) yapıldı.
3. Toplama tüpler boşaltıldı, filtreli tüpler tekrar toplama tüplere aktarılarak her bir örneğe 90 µL deoksiribonükleaz (DNaz) inkübasyon tamponu + 10 µL DNaz I eklendi. 15 dk. süre ile +15/+25°C inkübasyona bırakıldı.
4. Filtreli tüplerin içerisine 0,5 mL yıkama tamponu I konarak 15 s 8000 xg'de çevrildi. Bu tüpler tekrar toplama tüplerine aktarıldı.
5. Filtreli tüplerin içerisinde 0,5 mL yıkama tamponu II konarak 15 s 8000 xg'de çevrildi. Bu tüpler tekrar toplama tüplerine aktarıldı.
6. Filtreli tüplerin içerisine 0,2 mL yıkama tamponu III konarak 2 dk. maksimum devirde çevrilerek toplama tüplerine aktarıldı.
7. Filtreli tüpler içerisine 1,5 mL'lik kapaklı ependorf tüplere aktarıldı.
8. Her örneğe 50-100 µL elüsyon tamponu eklendi ve 1 dk. boyunca 8000 xg'de çevrildi.
9. Elde edilen RNA'lar direkt revers transkriptaz ile cDNA'ya çevrildi veya elüsyon içindeki RNA'lar yapılacak işlemlere kadar -80°C'de saklandı.

### **3.5.2. cDNA Sentez Aşamaları**

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kiti kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. İki aşamalı olan bu işlemlerde öncelikle her bir örnek için; 9 µL saf Total RNA, 2 µL random hexamer primer ve 2 µL PCR distile su karışımından 13 µL hazırlandı ve bu karışım Thermal Cycler'da 65°C'de 10 dk. bekletildi. Buna daha sonra 4 µL transkriptör revers transkriptaz tamponu, 0,5 µL koruyucu ribonükleaz (RNAaz) inhibitörü, 2 µL deoksinükleotid karışımı ve 0,5 µL transkriptör revers transkriptaz eklenerek 20 µL'lik final hacmi olan karışım elde edildi. Bu karışım Thermal Cycler'da 25°C'de 10 dk.,

50°C'de 60 dk. ve 85°C'de 5 dk. bekletildi ve cDNA'lar elde edildi ve cDNA örnekleri analizi yapıncaya kadar -20°C'de saklandı.

### 3.5.3. Eş Zamanlı PCR ile Gen Ekspresyonu Aşamaları

Elde edilen cDNA örneklerinden Beta Actin Housekeeping Gen ve Eag 1 hedef genlerinin ekspresyon analizi (Universal Probe Library, UPL) Realtime Revers Transkriptaz PCR ile Light Cycler 480 Probes Master (Roche) kiti kullanılarak yapıldı. Bunun için 0,4 µL Forward Primer, 0,4 µL Reverse Primer, 0,4 µL Roche UPL Probe, 10 µL Roche Probe Master ve 3,8 µL PCR distile su beraber kullanılarak 15 µL toplam hacimli bir karışım elde edildi. Her bir örnek Çizelge 3.2.'de verilen karışımlara 5'er µL cDNA eklenerek Light Cycler 480 Sistemine ait plateler üzerinde çalışıldı.

**Çizelge 3.2.** Beta actin housekeeping gen ve Eag1 gen ekspresyon analizinde kullanılan maddelerin konsantrasyonları ve miktarları.

<b>Bileşen</b>	<b>Konsantrasyon</b>	<b>Hacim (µL)</b>	<b>Final Konsantrasyonu</b>
Primer (GOI) forward	20 µM	0,4	400 nm
Primer (GOI) reverse	20 µM	0,4	400 nm
UPL prob (GOI)	10 µM	0,4	200 nm
LightCycler® 480 Probe Master	2x	10,0	1x
Saf su	-	3,8	-
Toplam Hacim		15,0	

Gen ekspresyonları için kullanılan PCR koşulları Çizelge 3.3.'de gösterildi.

**Çizelge 3.3.** Eag1 gen ekspresyon analizi için uygulanan PCR koşulları.

	<b>Döngü</b>	<b>Hedef Sıcaklık (°C)</b>	<b>Bekleme Süresi (s)</b>	<b>Sıcaklık geçiş oranı (°C/s)</b>
<b>Denatürasyon</b>	1	95	600	4,4
<b>Amplifikasyon</b>	45	95	10	4,4
		60	30	2,2
		72	1	4,4
<b>Soğuma</b>	1	40	60	2,2

#### **3.5.4. PCR Analizi**

Housekeeping gen (Beta Actin) FAM (465-510) dalga boyunda hedef gen (Eag1) ise VIC / HEX / Yellow555 (533-580) dalga boyunda Roche Light Cyclers 480 qPCR siteminin Version 1.5.0 yazılımı üzerinden “Advanced Relative Quantification” hesaplamaları ile yapıldı. Her bir gruptan elde edilen “geçiş noktası değeri” ( $C_p$ ), Beta Actin housekeeping gene oranlanarak ekspresyonların bağıl oranı (E değeri, efficiency) saptandı. Kontrole göre örneklerin E değeri karşılaştırılarak gen ekspresyon düzeyi belirlendi. E değeri  $E=2^{-(\text{örnek } C_p \text{ değeri/housekeeping değeri})}$  denklemi ile hesaplandı.

#### **3.6. İstatistiksel Analiz**

##### **3.6.1. MTT Veri Analizi**

Sürekli ölçümlere ait normallik kontrolleri Shapiro Wilk testi ile test edildi ve normal dağılım gösterdiği belirlendi. Gruplar arası farklılığı belirlemek için varyans analizi kullanıldı. Varyans analizinde varyansların homojenliği kontrolleri Levene testi ile test edildi. Varyansların homojen olduğu durumda One Way ANOVA ile homojen olmadığı durumda Welch testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama (ort.) ve standart sapma (ss.) değerleri verildi. İstatistik anlamlılık olarak  $p<0,05$  alındı.

### **3.6.2. Eş Zamanlı PCR Verilerinin Analizi**

Sürekli ölçümlere ait normallik kontrolleri Shapiro Wilk testi ile test edildi ve normal dağılım gösterdiği belirlendi. Gruplar arası farklılığı belirlemek için varyans analizi kullanıldı. Varyans analizinde varyansların homojenliği kontrolleri Levene testi ile test edildi. Varyansların homojen olduğu durumda One Way ANOVA ile homojen olmadığı durumda Welch testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak ort. ve ss. değerleri verildi. İstatistik anlamlılık olarak  $p < 0,05$  alındı.

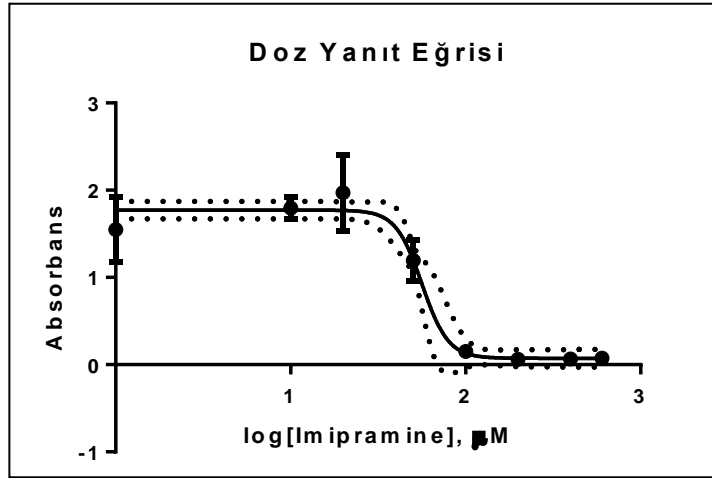
### **3.6.3. Elektrofizyolojik Kayıtların Analizi**

Elektrofizyolojik kayıtların analizi için iki faktörlü ve faktörlerden biri tekrarlanan ölçümlü deneme düzeni kullanılarak, gruplar arası, zamanlar arası ve grup ile zaman etkileşimleri (interaksiyon) incelendi. Gruplar ile zamanlara ait etkileşim değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Sürekli ölçümlere ait normallik kontrolleri Shapiro Wilks testi ile test edildi ve normal dağılım göstermediği belirlendi. Gruplar arası farklılıklar için Kruskal Wallis testi, her bir grupta zamanlar arası farklılıklar ise Friedman testi ile test edildi. İkili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi ile Wilcoxon Signed rank test kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak ort. ve ss. değerleri verilmiştir. İstatistik anlamlılık olarak  $p < 0,05$  alındı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. MTT Analizi Bulguları

MTT analizi sonucunda öncelikle imipramine'in  $IC_{50}$  değerini bulmak için 1, 10, 20, 50, 100, 200, 400 ve 600  $\mu M$  doz değerlerinde elde edilen absorbans değerleriyle doz-yanıt eğrisi oluşturuldu (Şekil 4.1.). Eğri sigomidal bir eğriye uydurulduktan sonra  $IC_{50}$  değerini 56,32  $\mu M$  olarak hesaplandı.



Şekil 4.1.  $IC_{50}$  değerinin hesabı için elde edilen doz yanıt eğrisi. Belirlenen dozların logaritması alınmıştır.

MTT deneyleri sonucunda yapılan sitotoksosite analizinde sitotoksositeyi değerlendirebilmek için canlı hücre sayısı ile orantılı olan absorbans değerleri 48. saat maruziyete göre ölçüldü ve veriler ort. + ss. şeklinde değerlendirildi. Buna göre ilaç uygulanmayan kontrol grubunda absorbans değeri  $3,24 \pm 0,69$  olarak elde edilirken, 10  $\mu M$ 'lık doz grubunda  $3,46 \pm 0,55$ , 50  $\mu M$ 'lık doz grubunda  $3,29 \pm 0,68$  ve 75  $\mu M$ 'lık doz grubunda  $2,76 \pm 0,60$  olarak bulundu. Kontrol grubuna göre değerlendirme yapıldığında gruplar arası fark anlamlı bulunmadı (Çizelge 4.1.).



**Çizelge 4.1.** MTT deneyleri sonucunda elde edilen absorbans değerleri. Sonuçlar ort. ± ss. olarak verilmiştir.

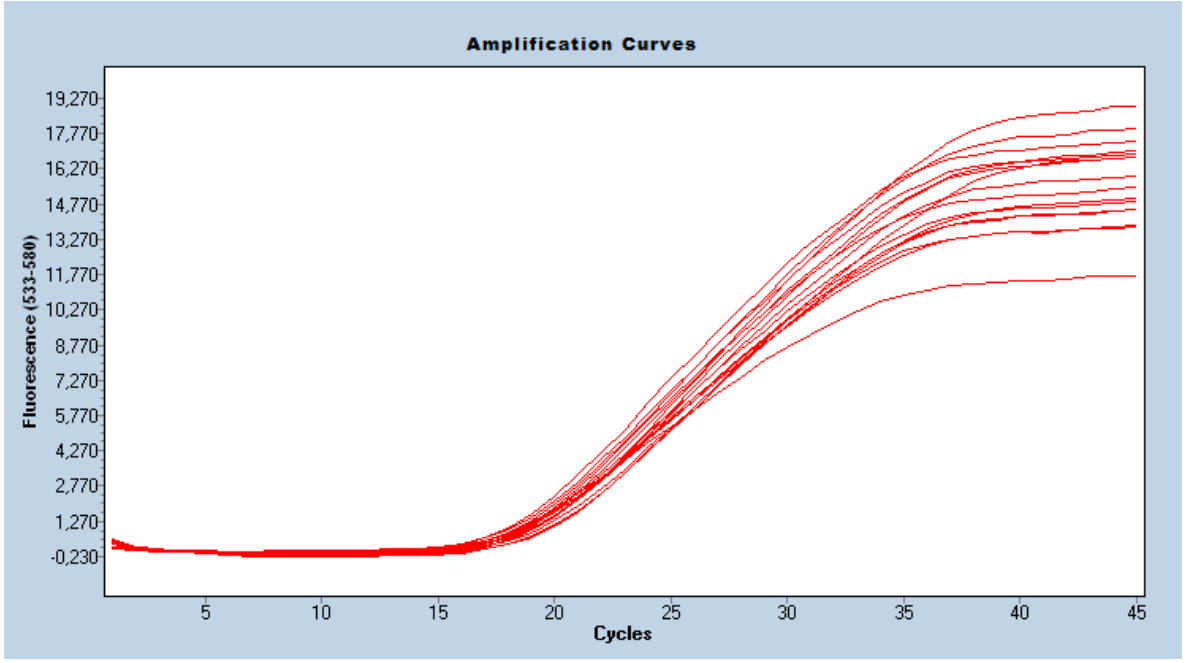
	<b>Absorbans</b>
<b>Kontrol (n=5)</b>	3,24 ± 0,69
<b>10 µM (n=4)</b>	3,46 ± 0,55
<b>50 µM (n=4)</b>	3,29 ± 0,68
<b>75 µM (n=6)</b>	2,76 ± 0,60
<b>p</b>	0,360

#### **4.2. Eş Zamanlı PCR Bulguları**

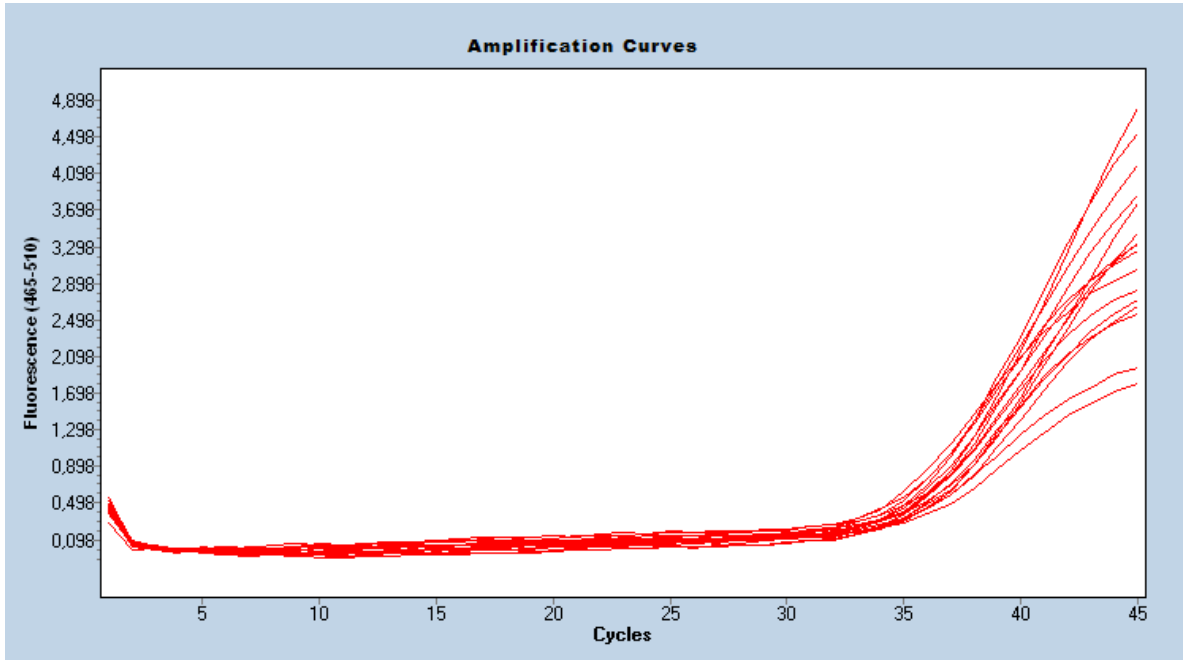
Gen ekspresyon analizinde kontrol, 10 µM, 50 µM ve 75 µM olmak üzere dört grup kullanılarak DU-145 hücre hattında imipramine'in Eag1 kanal geninin ekspresyonu üzerine etkisi araştırıldı. Referans gen ve Eag1 geni için elde edilen amplifikasyon eğrileri Şekil 4.2.'de ve 4.3.'de gösterilmektedir. Gen ifadesi düzeylerinde gruplar arası farklılıklar incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir ( $p < 0,05$ ). Ancak istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, kontrole göre değerlendirme yapıldığında gen ekspresyon düzeyinin 10 µM doz grubunda %53 oranında azaldığı, 50 µM doz grubunda %33 oranında azaldığı 75 µM doz grubunda ise %44 oranında azaldığı göze çarpmaktadır. Bu değerlere ait tanımlayıcı istatistikler ve p değerleri Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** DU-145 hücre hattında Eag1 geni için 48. saat sonunda gen ekspresyonu oran değerleri. Sonuçlar ort. ± ss. olarak verilmiştir.

	<b>Gen Ekspresyon Oranı</b>
<b>Kontrol (n=4)</b>	14,5250.10 <sup>-6</sup> ± 7,81574.10 <sup>-6</sup>
<b>10 µM (n=4)</b>	6,8175.10 <sup>-6</sup> ± 2,42316.10 <sup>-6</sup>
<b>50 µM (n=4)</b>	9,7175.10 <sup>-6</sup> ± 8,80960.10 <sup>-6</sup>
<b>75 µM (n=4)</b>	8,0700.10 <sup>-6</sup> ± 2,62733.10 <sup>-6</sup>
<b>p</b>	0,433



Şekil 4.2. 48 saat sonunda referans gen için elde edilen amplifikasyon eğrisi.



Şekil 4.3. 48 saat sonunda Eag1 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.

### 4.3. Elektrofizyolojik Bulgular

Yama kenetleme deneylerinde Şekil 3.4.'de belirtilen kenetleme protokolünün uygulanması sonucunda zar akımları kaydedildi (Şekil 4.4-6.). İmipramine'in Eag1 kanalında bir blokaj yapıp yapmadığını değerlendirmek amacıyla maksimum akım verileri ve akım-voltaj eğrileri elde edildi. Tüm doz grupları için akım kayıtları, başlangıçta ilaç uygulanmadan hemen önce 0. dk.'da (kontrol) ve ilaç uygulandıktan sonra 10 dk. boyunca her 2 dk.'da bir (2., 4., 6., 8. ve 10. dk.) olmak üzere her bir hücreden toplamda 6 defa kayıt alındı. En düşük doz değeri olan 10 µM'lık ilaç uygulamasında maksimum akım değeri ortalamaları, kontrol kaydında  $56,88 \pm 28,99$  pA elde edilirken, sırasıyla 2. dk.'da  $50,02 \pm 25,50$  pA, 4. dk.'da  $43,50 \pm 21,96$  pA, 6. dk.'da  $39,16 \pm 17,92$  pA, 8. dk.'da  $37,28 \pm 15,90$  pA ve 10. dk.'da  $35,56 \pm 15,78$  pA olarak elde edildi. IC<sub>50</sub> değerine en yakın olan 50 µM'lık doz uygulamasında ise maksimum akım değeri ortalamaları, kontrol kaydında  $105,32 \pm 90,90$  pA elde edilirken, sırasıyla 2. dk.'da  $64,94 \pm 50,18$  pA, 4. dk.'da  $71,46 \pm 66,53$  pA, 6. dk.'da  $75,94 \pm 76,46$  pA, 8. dk.'da  $63,30 \pm 52,19$  pA ve 10. dk.'da  $47,16 \pm 28,71$  pA olarak elde edildi. En yüksek doz değeri olan 75 µM grubunda ise maksimum akım değeri ortalamaları, kontrol kaydında  $167,28 \pm 89,41$  pA elde edilirken, sırasıyla 2. dk.'da  $146,04 \pm 70,62$  pA, 4. dk.'da  $128,32 \pm 64,09$  pA, 6. dk.'da  $116,50 \pm 66,61$  pA, 8. dk.'da  $104,90 \pm 55,68$  pA ve 10. dk.'da  $92,32 \pm 57,24$  pA olarak bulundu.

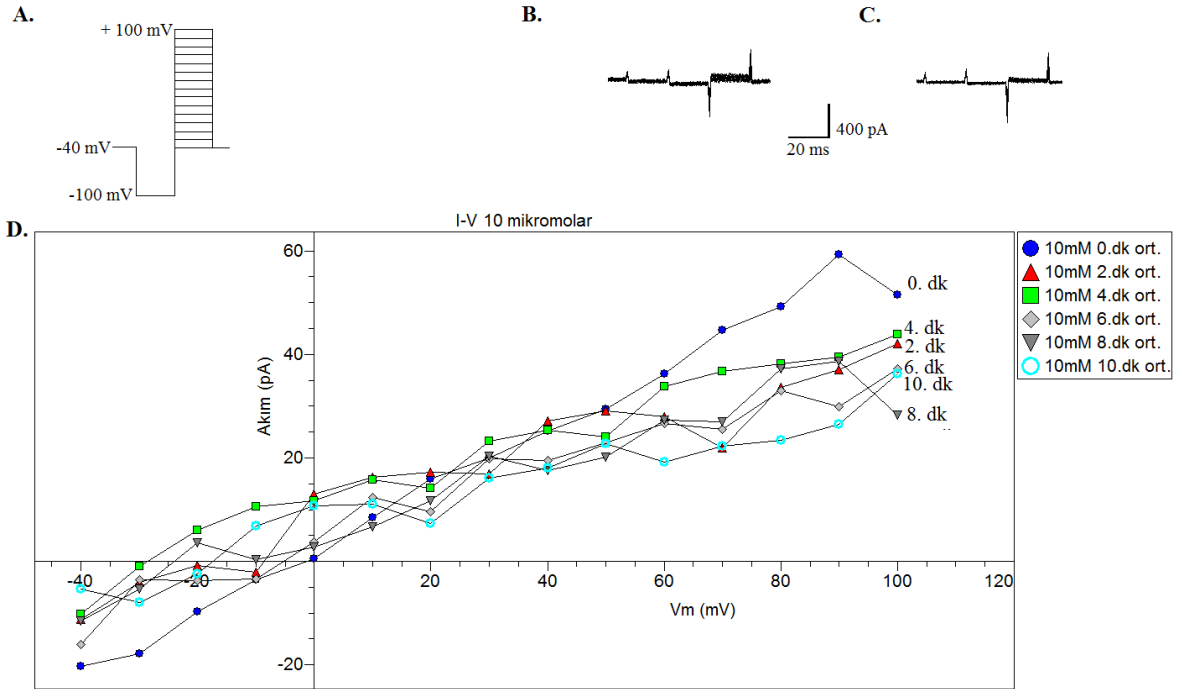
Gruplar arası farklılık, zamanlar arası farklılık ve grup-zaman interaksyonları incelenerek ve interaksyonları için farklılığın anlamlı olmadığı tespit edildi ( $p=0,163$ ). Her bir zaman dilimi için gruplar arası farklılıklar incelendiğinde, sadece 4. dk.'da alınan ölçümler için gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0,047$ ). Bu farklılıklar araştırıldığında, 10 µM grubuna ait ölçüm değeri, 75 µM grubuna ait ölçüm değerine göre azaldığı ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ( $p=0,009$ ). Her grup kendi içinde değerlendirildiğinde kontrole göre zamana bağlı olarak bir azalma olduğu Çizelge 4.3.'ten görülmektedir. Bu azalma 75 µM ve 50 µM gruplarında 2. dk. ve sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, 10 µM grubunda ise 4. dk. ve sonrasında anlamlı bulundu ( $p<0,05$ ).

**Çizelge 4.3.** Yama-kenetleme deneylerinde elde edilen maksimum akım değerleri. Sonuçlar ort.  $\pm$  ss. olarak verilmiştir.

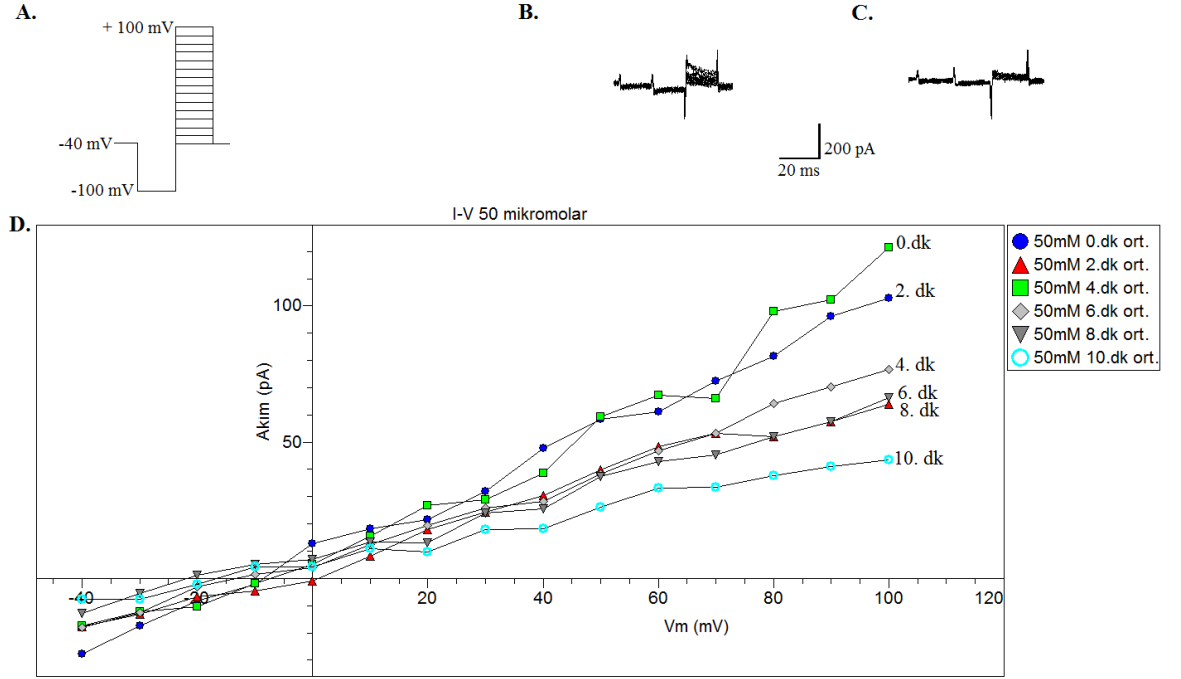
	Maksimum Akım Değerleri (pA)						p
	Kontrol	2. dk.	4. dk.	6. dk.	8. dk.	10. dk.	
<b>75 <math>\mu</math>M</b> (n=4)	141,10 $\pm$ 78,04	123,35 $\pm$ 56,73 <sup>a</sup>	104,15 $\pm$ 39,77 <sup>a,b</sup>	89,53 $\pm$ 32,63 <sup>a,b,c</sup>	81,20 $\pm$ 19,71 <sup>a,b,c</sup>	67,0 $\pm$ 10,95 <sup>a,b,c,d,e</sup>	<b>0,002</b>
<b>50 <math>\mu</math>M</b> (n=5)	105,32 $\pm$ 90,90	64,94 $\pm$ 50,18 <sup>a</sup>	71,46 $\pm$ 66,53 <sup>a</sup>	75,94 $\pm$ 76,46 <sup>a</sup>	63,30 $\pm$ 52,19 <sup>a</sup>	47,16 $\pm$ 28,71 <sup>a,b,c,d,e</sup>	<b>0,005</b>
<b>10 <math>\mu</math>M</b> (n=5)	56,88 $\pm$ 28,99	50,02 $\pm$ 25,50	43,50 $\pm$ 21,96 <sup>*a</sup>	39,16 $\pm$ 17,92 <sup>a,b</sup>	37,28 $\pm$ 15,90 <sup>a,b,c</sup>	35,56 $\pm$ 15,78 <sup>a,b,c</sup>	<b>0,001</b>
<b>p</b>	0,051	0,061	<b>0,048</b>	0,060	0,070	0,088	

\*. 75  $\mu$ M grubu ile olan farklılıkları vermektedir.

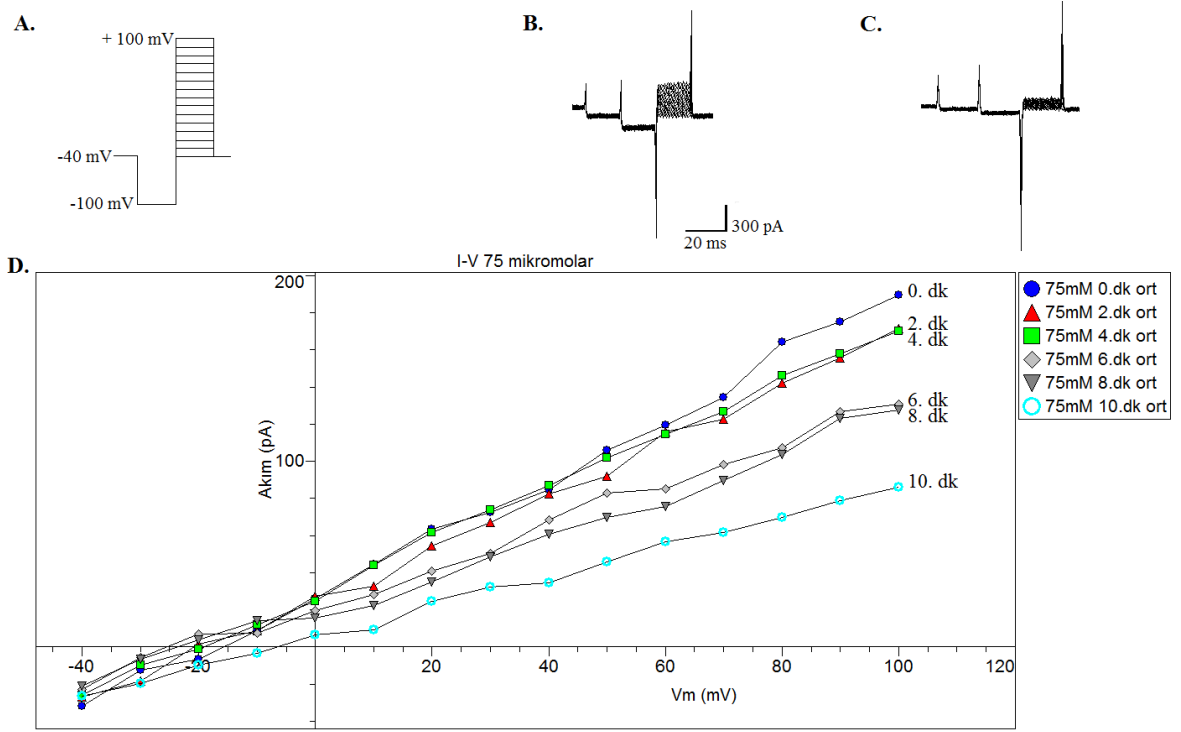
a: 0. dk.'da alınan ölçümlere göre farklılığı, b: 2 dk.'da alınan ölçümlere göre farklılığı, c: 4 dk.'da alınan ölçümlere göre farklılığı, d: 6 dk.'da alınan ölçümlere göre farklılığı, e: 8 dk.'da alınan ölçümlere göre farklılığı vermektedir.



**Şekil 4.4.** 10  $\mu$ M doz grubunun elektrofizyolojik değerlendirmesi. (A) Voltaj kenetleme protokolü, (B) 10  $\mu$ M imipramine uygulamasından hemen önce kaydedilen akım kaydı (kontrol), (C) 10  $\mu$ M imipramine uygulamasından 10 dk. sonra elde edilen akım kaydı, (D) belirlenen zaman dilimleri için akım kayıtlarından elde edilen akım-voltaj eğrileri.



**Şekil 4.5.** 50 µM doz grubunun elektrofizyolojik değerlendirmesi. (A) Voltaj kenetleme protokolü, (B) 50 µM imipramine uygulamasından hemen önce kaydedilen akım kaydı (kontrol), (C) 50 µM imipramine uygulamasından 10 dk. sonra elde edilen akım kaydı, (D) belirlenen zaman dilimleri için akım kayıtlarından elde edilen akım-voltaj eğrileri.



**Şekil 4.6.** 75  $\mu$ M doz grubunun elektrofizyolojik değerlendirmesi. (A) Voltaj kenetleme protokolü, (B) 75  $\mu$ M imipramine uygulamasından hemen önce kaydedilen akım kaydı (kontrol), (C) 75  $\mu$ M imipramine uygulamasından 10 dk. sonra elde edilen akım kaydı, (D) belirlenen zaman dilimleri için akım kayıtlarından elde edilen akım-voltaj eğrileri.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada antidepresan olarak kullanılan ve iyon kanallarını inhibe ettiği gösterilen imipramine'in prostat kanseri hücrelerinde Eag1 kanalı üzerine etkisi sitotoksik, elektrofizyolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak incelenmiş ve imipramine'in Eag1 kanal akımını bloke ederek ve kanal ekspresyonunu azaltarak prostat kanserinde tedavi edici ilaç olarak kullanılabileceğine ilişkin ipuçları elde edilmiştir.

Kanser, ülkemizde ve dünyada yüksek oranda ölüme neden olan bir hastalıktır. Ölüm nedenleri sıralamasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alır. Kanser tedavisinde cerrahi işlemler, kemoterapi ve radyoterapi yaygın olarak kullanılmaktadır (33, 132). Ancak bu tedavilerin birçok yan etkisi vardır ve bu yan etkiler hastaların yaşam kalitesini düşürmektedir. Bu nedenle moleküler süreçleri de içine alan yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik araştırmalarda son yıllarda büyük bir artış gözlenmektedir.

Bu yönde yapılan çalışmalarla pek çok kanser türünde voltaja duyarlı iyon kanallarının önemi ortaya konmuştur. Ayrıca bu iyona spesifik blokerlerin kullanımı ile kanser hastalığının tedavisinde olumlu gelişmeler olabileceği yönündeki çalışmalar da giderek yaygınlaşmaktadır. İyon kanal türlerinden biri olan voltaj kapılı sodyum kanallarının meme, prostat, serviks, kolon, akciğer, deri, over gibi birçok epitelyal kökenli metastatik kanser türünde rol oynadığı gösterilmiştir (133). Benzer şekilde voltaj bağımlı  $Ca^{+2}$  kanallarının da kolon kanseri, küçük hücreli akciğer karsinomu gibi kanser türlerinde ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (132). Kanserle ilişkilendirilen bir başka iyon kanalı TRP kanallarıdır. TRP kanalları memeli dokularında yaygın olarak bulunur. Hücrede  $Na^{+}$  ve  $Ca^{+2}$  konsantrasyonlarını kontrol ederler. Bu kanalların da tümör oluşumu ve metastazını içeren birçok fizyopatolojik süreçte rolü olduğu bildirilmiştir (134).

$K^{+}$  kanallarının kanserdeki rolüne ilişkin çok sayıda çalışma mevcuttur. Voltaj kapılı  $K^{+}$  kanallarının da medullablastoma, meme kanseri, kolon ve prostat kanseri, solid kanserler ve kan kanseri, lenf kanseri, akciğer kanseri gibi birçok kanser türünde aşırı miktarda eksprese edildiği saptanmıştır. İyon kanallarının kanserdeki rolünün hücrede

migrasyonu ve proliferasyonu arttırmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Tüm bu çalışmalar iyon kanallarının kanser tedavisinde yeni bir hedef olarak görülmesini sağlamıştır (54, 132).

Bu çalışmada kullanılacak imipramine dozunu belirlemek için sitotoksisite analizlerinden yararlanılmıştır. İlaç geliştirmede, sitotoksisite analizleri hücre ilaç duyarlılığını değerlendirmek amacıyla kullanılan yöntemlerdendir (131). Bu analizlerden biri olan MTT analizi çalışmamızda hem doz belirleme hem de canlı hücre oranını değerlendirme amacıyla kullanılmış ve IC<sub>50</sub> değeri 56,32 µM olarak ölçülmüştür. IC<sub>50</sub> değeri hücre canlılığının yarıya düştüğü değerdir. İmipramine'in IC<sub>50</sub> değeri farklı hücrelerde belirlenmiştir. Çin kobayı over (CHO-K1) hücrelerinde yapılan bir çalışmada insanda bulunan küçük iletkenlikli, Ca<sup>+2</sup>'la aktive olan K<sup>+</sup> kanallarının (hSK) trisiklik antidepressanlara ve antipsikotik ilaçlara olan duyarlılığı incelenmiş ve hSK için imipramine'in kanal akımını inhibisyonuna bakılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda bu hücrelerde IC<sub>50</sub> değeri 43,7 µM bulunmuştur (135). Shimizu ve ark.'nın (136) sıçan kortikal nöronlarında imipramine ile yaptıkları başka bir çalışmada K<sup>+</sup> miktarıyla orantılı değişen hücre içi Ca<sup>+2</sup> miktarı değerlendirilmiş ve IC<sub>50</sub> değeri 32 µM bulunmuştur. Bu çalışmada elde belirlenen IC<sub>50</sub> değeri diğer çalışmalarda imipramine için bulunan IC<sub>50</sub> değerleriyle uyumludur. Bu çalışmada biri IC<sub>50</sub> değerinin altında (10 µM), biri IC<sub>50</sub> değerine eşit (50 µM) diğeri de IC<sub>50</sub> değerinin üzerinde (75 µM) olmak üzere ve 3 farklı doz değeri belirlenmiştir.

Voltajla ve ligandla aktive olan iyon kanallarının davranışını özetlemek için etkili yol akım-voltaj ilişkisini değerlendirmektir. Elde edilen eğrilerden zıtlanma potansiyeli, iyon bağıllığı/seçiciliği, voltaj ilişkisi, aktivasyon eşiği, eğim ve iletkenlik gibi pek çok önemli parametre değerlendirilebilir. Bu değerlendirmelerden biri de pik ya da kararlı durum akım değerleridir. Pik akımlar uygulanan voltajla aktive olan en büyük akımlardır. Bu durumda sisteme ait yazılımla en yüksek akımın belirlenebileceği akım-voltaj ilişkisi elde edilir (137). Tüm hücre yama kenetleme tekniği kullanılarak kayıtlanan Eag1 akımlarında akım-voltaj eğrilerinden de görüldüğü gibi (Şekil 4.4-6.) doz gruplarında zamana bağlı olarak kontrol değerine göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Her bir doz için 0. dk. ölçümleri kontrol değeri olarak alınmış ve imipramine uygulandıktan sonra 2., 4., 6.,



8. ve 10. dk.'arda akım değerleri ölçülmüştür. Yapılan analiz sonucunda 10 µM doz grubunda imipramine inhibitör etkisini 4. dk.'dan itibaren gösterirken 50 ve 75 µM doz gruplarında inhibitör etki 2. dk.'dan itibaren başlamıştır. Akım değerleri 10. dk.'da tüm doz gruplarında başlangıçtaki değerinin yaklaşık yarısına düşmüştür. Doz grupları arasında ise sadece 4. dk. verilerinde 75 µM grubu ile 10 µM grubu arasında anlamlı fark olduğu ancak diğer zaman değerleri içinde anlamlı fark olmadığı saptanmıştır. Bu sonuç imipramine'in prostat kanserinde Eag1 kanal akımını güçlü bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir. Ancak bu inhibisyon doza değil, zamana bağlıdır. Çünkü doz grupları arasında inhibisyon oranı açısından önemli bir fark bulunmamıştır. 10. dk. sonunda 75 µM doz grubunda akım değeri kontrolün %47,4'ü iken bu değer 50 µM'da %44,7, 10 µM'da %62,25'dir. İmipramine'in prostat kanseri hücre hatlarında Eag1 kanal akımı üzerindeki inhibe edici etkisi ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Ancak imipramine'in farklı kanser hücrelerinde Eag1 kanal akımını inhibe edici etkisine yönelik çalışmalar mevcuttur ve bizim prostat kanseri hücrelerinde gözlediğimiz inhibisyon önceki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Gavrilova-Ruch ve ark. (110) tarafından yapılan bir çalışmada imipramine'in IGR1 melanoma hücrelerinde K<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> kanalları üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmada Ca<sup>+2</sup>'la aktive olan K<sup>+</sup> kanalları ile insanda bulunan hEag kanal akımları ve hücre hacmine duyarlı Cl<sup>-</sup> kanal akımları ile DNA sentezi ve apoptozis üzerine etkisi ölçülmüştür. Kırksekiz saat 10-15 µM imipramine ile inkübe edilen IGR1 melanoma hücrelerinde tüm kanal akımlarının bloke olduğu, DNA sentezinin ve metabolizmanın azaldığı gösterilmiştir. Ancak imipramine'in apoptozis üzerine etkisi gözlenmemiştir. Ferreira ve ark. (115) tarafından yapılan bir başka çalışmada imipramine'in kanser hücrelerinde hEag1 K<sup>+</sup> kanal akımları üzerine etkisi incelenmiştir. İmipramine'in 0,5-50 µM aralığında dozlarının kullanıldığı çalışmada kanser hücre hatlarında hEag1 akımını bloke ederek kanser hücre proliferasyonunu azalttığı belirtilmiştir.

İmipramine'in Eag1 K<sup>+</sup> kanal akımını inhibe etmesi bu maddenin kanala bağlanabildiğini ve membranı geçebildiğini göstermektedir. Ferreira ve ark. (115) tarafından yapılan ve hEag1 kanallarının imipramine ve astemizol ile inhibisyonunun mekanizmasının açıklandığı çalışmada imipramine'in hEag1 kanallarına bağlanma bölgesinin kanalın intrasellüler tarafında olduğunu ve kanal açıkken bağlanmanın

gerçekleştiği öne sürülmüştür. Aynı çalışmada imipramine Eag1 kanal etkileşiminin voltaj bağımlı olduğu ve voltaj arttıkça imipramine tarafından bloke edilen akım oranının arttığı bildirilmiştir.

Eag1 kanalları çoğunlukla kanser hücrelerinde eksprese edilen kanallardır ve hücre proliferasyonunda önemli rol oynar. Kanal akımının farmakolojik ajanlarla inhibisyonu hücre proliferasyonu ile ilişkilendirilmektedir ve kanal akımının inhibisyonu hücre proliferasyonundaki azalmanın göstergesi olarak kabul edilmektedir (115). Bu çalışmada da Eag1 kanal akımını inhibe eden imipramine'in prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı düşünülmektedir.

İmipramine'in hücre proliferasyonu üzerine etkisini göstermek için akım inhibisyonuna ek olarak MTT analizi ve Eag1 kanal gen ekspresyonu kullanılmıştır. MTT analizi kullanılarak yapılan sitotoksikite deneylerinde uygulanan tüm dozlarda 48 saat sonunda hücre canlılığında kontrol değerlerine göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Yapılan literatür taramasında imipramine'in sitotoksik etkisi ile ilgili farklı sonuçlara rastlanmıştır. Gavrilova-Ruch ve ark. (115) tarafından yapılan çalışmada imipramine'in IGR1 melanoma hücrelerinde metabolizmayı azaltarak proliferasyonu azalttığı bulunmuştur. Farklı bir çalışmada Leishmania donovani parazitinin neden olduğu şark çibanının oral yolla tedavisi amacıyla imipramine kullanılmış ve bu amaçla fare ve kobaya Leishmania donovani paraziti uygulanmıştır. Çalışmada imipramine'in sitotoksik etkisine bakmak amacıyla 48 saatlik ilaç uygulamasının yapıldığı MTT analizi yapılmış ve hem IC<sub>50</sub> hem de etkin konsantrasyon (EC<sub>50</sub>) değerleri hesaplanmıştır. Farklı formda parazitlere yapılan uygulama sonucunda IC<sub>50</sub> değeri 3,5-4 µM arası EC<sub>50</sub> değeri ise 21-23 µM arasında bulunmuştur. Yapılan uygulama sonucunda 60 µM imipramine parazitlerin hepsini temizlerken, imipramine'in toksik etkisine bakmak için yapılan uygulama sonucunda 90 µM'a kadar uygulama yapılan hayvanlarda %100 canlılık sağlanırken bu doza kadar toksik etkisinin olmadığı gözlenmiştir (138). DU-145 hücre hattı ile yaptığımız bu çalışmada IC<sub>50</sub> 56,32 µM olarak elde edilmiş ve yapılan sitotoksikite analizi sonucunda 10, 50 ve 75 µM grupları kontrol değeri ile karşılaştırıldığında hücre canlılığının 10 ve 50 µM'da %100 korunduğu ve 75 µM'da %85'e düştüğü gözlenmiştir. Bu sonuç ve önceki çalışmalar imipramine'in 90 µM'a kadar sitotoksik etkisi olmadığını göstermektedir.

Bu çalışmada imipramine'in Eag1 kanal geni ekspresyonu üzerine etkisi de araştırılmıştır. Eş zamanlı PCR tekniği kullanılarak yapılan gen ekspresyonu analizinde düşük dozdan yüksek doza doğru gen ekspresyon düzeylerinde sırasıyla %53, %33 ve %43 oranlarında azalmanın olduğu görülmüştür. Bu azalma yüksek oranda olmasına rağmen kontrole göre istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bu durum gen ekspresyonunun analiz edildiği örnek sayısı ile ilişkili olabilir. Her bir doz grubu için kayıt alınan örnek sayısı istatistiksel güç analizi yöntemiyle belirlenmesine rağmen bu sayı yeterli olmamış olabilir. İmipramine'in Eag1 kanal ekspresyonu üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Eag1 kanalları genel olarak kanser hücrelerinde eksprese edilir. Kanser hücreleri dışında ekspresyonu nadirdir. İmipramine'in istatistiksel olarak önemli olmasa da gen ekspresyonunu uygulanan tüm dozlarda büyük oranda azaltmış olması hücre proliferasyonu üzerine azaltıcı etkisi olduğunu düşündürmüştür. Potasyum kanallarının hücre proliferasyonu üzerine düzenleyici etkisine ilişkin dört temel hipotez öne sürülmektedir (54). Bunlar, membran potansiyeli osilasyonlarının düzenlenmesi, hücre hacminin kontrolü,  $Ca^{+2}$  sinyallerinin regülasyonu ve malign büyümenin iyon geçişinden bağımsız kanonik olmayan fonksiyonla kontrolüdür. Hücre döngüsünde G1-S geçişinde geçici hiperpolarizasyon görülmektedir. Bunun artmış kanal aktivitesiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Depolarizasyon mitotik aktiviteyi indükleyebilir. G2-M geçişinde geçici depolarizasyon gözlenmiştir. Potasyum kanalları hücre proliferasyonunu hücre hacmini kontrol ederek de düzenleyebilir. Kanonik olmayan fonksiyonla kontrolde ise  $K^{+}$  geçişlerinden bağımsız olarak gen ekspresyonundaki değişikliklerin etkili olduğu öne sürülmektedir. Tüm bunlar değerlendirildiğinde  $K^{+}$  akımlarının hücre döngüsünde önemli olduğu ve akım değişikliklerinin hücre proliferasyonunu etkilediği düşünülmektedir.

Sonuçlarımız imipramine'in prostat kanseri hücrelerinde hem  $K^{+}$  akımlarını inhibe ederek hem de gen ekspresyonunu azaltarak hücre proliferasyonunu azalttığı konusunda ipuçları vermektedir

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada antidepresan olarak kullanılan ve iyon kanallarını inhibe ettiği gösterilen imipramine'in prostat kanseri hücrelerinde Eag1 kanalı üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla çalışmada MTT analizi, yama kenetleme tekniği ve eş zamanlı pCR tekniği kullanılarak, imipramine'in Eag1 kanal akımını bloke ettiği ve kanal ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir. Bu bulgular ışığında imipramine'in prostat kanserinde tedavi edici ilaç olarak veya günümüzde prostat kanserinde kullanılan tedavi yöntemlerinin etkinliğini artırma amacıyla kullanılabileceğine ilişkin ipuçları elde edilmiştir.

Bu çalışma aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır: İmipramine'in

1. IC<sub>50</sub> değeri 56,32 µM olarak bulunmuştur.
2. Uygulanan dozlarında sitotoksik etkisi gözlenmemiştir.
3. 10 µM'lık dozu uygulamanın 4. dk.'sından 50 ve 75 µM'lık dozları uygulamanın 2. dk.'sından itibaren Eag1 akımını önemli miktarda inhibe ettiği gözlenmiştir.
4. Eag1 kanal ekspresyonunda istatistiksel olarak önemli bulunmasa da 10, 50 ve 75 µM'lık dozlarda gen ekspresyon düzeylerinde sırasıyla %53, %33 ve %43 oranlarında azalmanın olduğu görülmüştür. Bu sonuç klinik açıdan önemli olabilir.
5. Bu sonuçlara dayanarak imipramine'in Eag1 kanal akımını bloke ederek ve gen ekspresyonunu azaltarak prostat kanserinde hücre proliferasyonunu azalttığı ve prostat hücre kanserinin tedavisinde kullanılabileceği konusunda ipuçları elde edilmiştir.
6. Potasyum kanallarının hücre proliferasyonu ile ilişkili olması, hücre döngüsünde önemli role sahip bir iyon olan Ca<sup>+2</sup>'la ilişkisinin de irdelenmesi gerektiğini düşündürmektedir. Ayrıca K<sup>+</sup>-Ca<sup>+2</sup> ilişkisi iyon kanalları temelinde de irdelenebilir. Çünkü kanser hücrelerinde sadece Eag1 kanalları değil Ca<sup>+2</sup>'la aktive olan K<sup>+</sup> kanalları da yer alabilir. Kanser hücrelerinde K<sup>+</sup> kanallarının

hücre proliferasyonuna etkisine ilişkin mekanizmaları açıklayabilmek için hücre döngüsü,  $Ca^{+2}$ , zar potansiyeli gibi birçok kavramı içeren yeni çalışmaların planlanmasına ihtiyaç vardır.

7. Bu çalışmada sadece bir prostat kanseri hücre hattı türü kullanılmıştır. İleriki çalışmalar için farklı prostat kanseri hücre hatları da çalışılarak etkilerine bakmak yararlı olabilir. Ayrıca imipramine'in kanserli olmayan, normal prostat epiteli hücrelerine etkisi de bilinmemektedir. Normal prostat dokusunda imipramine'in oluşturabileceği etkileri değerlendirmek ilacın kanserli hücrelerdeki etki mekanizmasını açıklamak için yapılacak çalışmalara katkı sağlayabilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Tuncer MA.** Kanserin Ülkemiz ve Dünyadaki Önemi, Hastalık Yüğü ve Kanser Kontrol Politikaları. Ed: Tuncer MA. *Türkiye’de Kanser Kontrolü*. Ankara: Koza Matbaacılık, **2009**:5-6.
2. **Hejmadi M.** *Introduction to Cancer Biology*.1<sup>st</sup> Ed., Momna Hejmadi & Ventus Publishing Aps. **2009**: 6-10.
3. **Pardee AB, Stein GS Bronstein EA.** What Goes Wrong in Cancer. In: Pardee AB, Stein GS. Eds. *The Biology and Treatment of Cancer*. 1<sup>st</sup> Ed., USA: John Wiley & Sons, Inc, **2009**: 3-56.
4. **Lyons L.** *Diagnosis and Treatment of Cancer*. 1<sup>st</sup> Ed., New York: Infobase Publishing, **2007**: 6- 27.
5. **Di Resta C, Becchetti A.** Introduction to Ion Channels, In: Becchetti A, Arcangeli A, Eds. *Intergins and Ion Channels*. 1<sup>st</sup> Ed., New York: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC, **2010**: 9-19.
6. **Ashcroft FM.** *Ion Channels and Disease*. 1<sup>st</sup> Ed., San Diego: Academic Press **1999**.
7. **Wonderlin WF, Strobl JS.** Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol*, **1996**; 154:91–107.
8. **Kunzelmann K.** Ion channels and cancer. *J Membr Biol*, **2005**; 205(3):159-173.
9. **Meyer R, Schonherr R, Gavrilova-Ruch O, Wohlrab W, Heinemann SH.** Identification of ether a go-go and calcium-activated potassium channels in human melanoma cells. *J Membr Biol*, **1999**;171(2): 107–115.
10. **Ouadid-Ahidouch H, Le Bourhis X, Roudbaraki M, Toillon RA, 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. *Receptors Channels*, **2001**; 7(5):345–356.
11. **Meyer R, Heinemann SH.** Characterization of an eag-like potassium channel in human neuroblastoma cells. *J Physiol*, **1998**; 508(1):49–56.

12. **Farias LMB, Ocaña DB, Díaz L, Larrea F, Avila-Chávez E, Cadena A, Hinojosa LM, Lara G, Villanueva LA, Vargas C, Hernández-Gallegos E, Camacho-Arroyo I, Dueñas-González A, Pérez-Cárdenas E, Pardo LA, Morales A, Taja-Chayeb L, Escamilla J, Sánchez-Peña C and Camacho J.** Ether à go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res*, 2004; 64(19): 6996-7001.
  
13. **Wang Z.** Potassium Channels: Oncogenic Potential and Therapeutic Target for Cancers. In: Fermini B. Priest BT, Eds. *Ion channels*. 1<sup>st</sup> Ed., Heidelberg: Springer, **2008**: 55-89.
  
14. **Kenny P.** *Stages of Cancer Development*. 1<sup>st</sup> Ed., New York: Infobase Publishing, **2007**.
  
15. How many different types of cancer are there?. Erişim: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/cancer-questions/how-many-different-types-of-cancer-are-there> Erişim tarihi:18.07.2014.
  
16. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** *Molecular Biology of Cell*. 5<sup>th</sup> Ed., New York: Garland science, Taylor & Francis Group, LLC, **2003**.
  
17. **Boyle P, Levin B.** *World Cancer Report*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, **2008**: 190-191.
  
18. **Sherr CJ.** Cancer cell cycles. *Science*, **1996**; 274 (5293):1672-1677.
  
19. **Macdonald F, Ford CHJ, Casson AG.** *Molecular Biology of Cancer*. 2<sup>nd</sup> Ed., New York: Taylor & Francis, **2004**:2-4.
  
20. **Reed Sİ.** Cell Cycle. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, Eds. *Cancer*. 6<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Lippicott-Williams&Wilkins, **2008**:79-92.
  
21. **Schwab M.** *Encyclopedia of Cancer Volume 1*. 2<sup>nd</sup> Ed. Heidelberg: Springer, **2008**: 582-85.
  
22. **Forester I.** Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, **2008**; 14(2):144–149.
  
23. **Vermeulen K, VanBockstaele DR, Berneman ZN.** The cell cycle : a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, **2003**; 36(3):131-149.
  
24. **Tang YQ, Sekeran SD.** Evaluation of Phyllanthus, for Its Anti-Cancer Properties. In: Spiess PE Eds. *Prostate Cancer from Bench to Bedside*. 1<sup>st</sup> Ed., Rijeka: In Tech **2011**:305-316.
  
25. **Weber FG.** *Molecular Mechanisms of Cancer*. 1<sup>st</sup> Ed., Dordrecht: Springer, **2007**:7-24.

26. **Devi PU.** Basics of carcinogenesis. *Health Administrator*, **2005**; XVII(1):16-24.
27. **Thompson IM, Thrasher JB, Moyad MA, Sylvester JE.** What Good Is a Prostate , Anyway?. *The In: Grimm PD, Blasko JC, Sylvester JE Eds. Prostate Cancer Treatment Book.* 1<sup>st</sup> Ed., USA: McGraw-Hill Book, **2004**: 4-6.
28. Body Maps. Erişim: Prostate<http://www.healthline.com/human-body-maps/prostate> Erişim Tarihi:17.06.2014.
29. **Marks S.** *Prostate and Cancer.* 4<sup>th</sup> Ed., Cambridge: Da Capo Press, **2009**.
30. Prostate Gland. Erişim: <http://health.howstuffworks.com/sexual-health/male-reproductive-system/prostate-gland-dictionary.htm> Erişim Tarihi:17.06.2014.
31. Türkiye Kanser İstatistikleri Gültekin M, Boztaş G. (2014). Erişim: [http://kanser.gov.tr/Dosya/ca\\_istatistik/2009kanseraporu.pdf](http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2009kanseraporu.pdf) Erişim Tarihi: 18.09.2014.
32. American Cancer Society. Prostate Cancer. Erişim: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003134-pdf.pdf> Erişim Tarihi: 18.08.2014.
33. Avrupa Üroonkoloji Prostat Kanseri Kılavuzu. Derneği Erişim: [http://www.uroonkoloji.net/files/eau\\_pca.pdf](http://www.uroonkoloji.net/files/eau_pca.pdf) Erişim Tarihi: 18.08.2014
34. **Dmjanow I, Mikuz G.** Tumors of the Kidney and the Male Urogenital System. In: Damjanow I, Fang F, Eds. *Cancer Grading Manual.* 1<sup>st</sup> Ed., New York: Springer, **2007**: 57-60.
35. **Gleason DF.** Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Hum Pathol*, **1992**; 23(3):273-279.
36. **Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. Madison.** *Ajcc Cancer Staging Manual.* 7<sup>th</sup> Ed., Heidelberg: Springer, **2010**:447-450.
37. Prostat Kanseri. Erişim: <http://www.fatihug.com/prostat-kanseri.html> Erişim Tarihi: 18.08.2014.
38. **Nelson WG, De Marzo AM.** The Molecular Pathogenesis and Pathophysiology of Prostate Cancer. In: Dawson NA, Kelly WK, Eds. *Prostate Cancer Translational and Emerging Therapies.* 1<sup>st</sup> Ed., New York: Informa Healthcare, **2007**: 11.
39. **Rodríguez-Rasgado JA, Acuña-Macías I, Camacho J.** Eag1 channels as potential cancer biomarkers. *Sensors*, **2012**;12(5):5986-5995.



40. **Hemmerlein B, Weseloh RM, Mello de Queiroz F, Knötgen H, Sánchez A, Rubio ME, Martin S, Schliephacke T, Jenke M, Heinz-Joachim-Radzun, Stühmer W, Pardo LA.** Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Mol Cancer* (Electronic Journal), **2006**; Oct 5;5:41.  
Erişim: <http://www.molecular-cancer.com/content/5/1/41>
41. **Amina N, Hussain MM.** Ion channels and channelopathies. *Pak J Physiol*, **2010**; 6(1):54-57.
42. **Hille B.** *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2<sup>nd</sup> Ed. Sunderland: Sinauer Associates **1992**.
43. **Fermini B.** Recent Advances in Ion Channel Screening Technologies. In: Fermini B, Priest BT, Eds. *Ion Channels*. 1<sup>st</sup> Ed., Heidelberg: Springer, **2008**: 1-23.
44. **Molleman A.** *Patch Clamping an Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology*. 1<sup>st</sup> Ed., West Sussex: John Wiley&Sons, **2003**.
45. ion channels. Erişim: <http://www.tocris.com/pharmacologicalBrowser.php?ItemId=5030#.U1jFvFdpcQg>  
erişim tarihi: 24.04.2014
46. **Bagal SK, Brown AD, Cox PJ, Omoto K, Owen RM, Pryde DC, Sidders B, Skerratt SE, Stevens EB, Storer RI, Swain NA.** Ion channels as therapeutic targets: A drug discovery perspective. *J Med Chem*, **2013**; 56(3):593-624.
47. **Palmer LG.** Ion Channels in Epithelial Cells. In: Chung SH, Andersen OS, Krishnamurthy V. Ed. *Biological Membrane Ion Channels*. 1<sup>st</sup> Ed., New York: Springer, **2007**: 425-441.
48. **King RJB, Robins MW.** *Cancer Biology*. 3<sup>rd</sup> Ed. London: Pearson Education Limited, **2006**: 1-3.
49. **Le Guennec JY, Ouadid-Ahidouch H, Soriani O, Besson P, Ahidouch A, Vandier C.** Voltage-gated ion channels, new targets in anti-cancer research. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, **2007**; 2(3):189-202.
50. **Lehen'kyi V, Shapovalov G, Skryma R, Prevarskaya N.** Ion channels and transporters in cancer. 5. Ion channels in control of cancer and cell apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2011**; 301(6):1281-1289.
51. **Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M.** Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev*, **2000**; 52(4):557-94.
52. **Felipe A, Vicente R, Villalonga N, Roura-Ferrer M, Martínez-Mármol R, Solé L, Ferreres JC, Condom E.** Potassium channels: New targets in cancer therapy. *Cancer Detect Prev*, **2006**; 30(4):375-385.

53. **Fiske JL, Fomin VP, Brown ML, Duncan RL, Sikes RA.** Voltage-sensitive ion channels and cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **2006**; 25(3):493-500.
54. **Huang X, Jan LY.** Targeting potassium channels in cancer. *J Cell Biol*, **2014**; 206(2):151–162.
55. **Pardo LA, del Camino D, Sanchez A, Alves F, Bruggemann A, Beckh S, Stühmer W.** Oncogenic potential of Eag K<sup>+</sup> channels. *EMBO J*, **1999**; 18(20):5540–5547.
56. **Mu D, Chen L, Zhang X, See LH, Koch CM, Yen C, Tong JJ, Spiegel L, Nguyen KCQ, Servoss A, Peng Y, Pei L, Marks JR, Lowe S, Hoey T, Jan LY, McCombie WR, Wigler MH, Powers S.** Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell*, **2003**;3(3):297–302.
57. **Pei L, Wiser O, Slavin A, Mu D, Powers S, Jan LY, Hoey T.** Oncogenic potential of TASK3 (Kcnk9) depends on K<sup>+</sup> channel function. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2003**; 100(3):7803–7807.
58. **Abdul M, Santo A, Hoosein N.** Activity of potassium channel blockers in breast cancer. *Anticancer Res*, **2003**; 23(4):3347–3351.
59. **Abdul M, Hoosein NM.** Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer. *Cancer Lett*, **2002**; 186(1): 99-106.
60. **Abdul M, Hoosein NM.** Voltage-gated potassium ion channels in colon cancer. *Oncology Rep*, **2002**; 9(5):961-964.
61. **Ouadid-Ahidouch H, Chaussade F, Roudbaraki M, Slomianny C, Dewailly E, Delcourt P, Prevarskaya N.** KV1.1 K(+) channels identification in human breast carcinoma cells: involvement in cell proliferation. *Biochem Biophys Res, Commun* **2000**; 278(2):272–277.
62. **Preussat K, Beetz C, Schrey M, Kraft R, Wöfl S, Kalff R, Patt S.** Expression of voltage-gated potassium channels Kv1.3. and Kv1.5 in human gliomas. *Neuroscience Letters*, **2003**; 346(1-2):33–36.
63. **Lastraioli E, Guasti L, Crociani O, Polvani S, Hofmann G, Witchel H, Bencini L, Calistri M, Messerini L, Scatizzi M, Moretti R, Wanke E, Olivotto M, Mugnai G, Arcangeli A.** hERG1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. *Cancer Res*, **2004**; 64(2): 606–611.
64. **Cherubini A, Taddei GL, Crociani O, Paglierani M, Buccoliero AM, Fontana L, Noci I, Borri P, Borrani E, Giachi M, Becchetti A, Rosati B, Wanke E, Olivotto M, Arcangeli A.** HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium. *Br J Cancer*, **2000**; 83(12):1722–1729.

65. **Crociani O, Guasti L, Balzi M, Becchetti A, Wanke E, Olivotto M, Wymore RS, Arcangeli A.** Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1B isoforms in tumor cells. *J Biol Chem*, **2003**; 278(5):2947–2955.
66. **Bianchi L, Wible B, Arcangeli A, Tagliatela M, Morra F, Castaldo P, Crociani O, Rosati R Faravelli L, Olivotto M, Wanke E.** hERG encodes a K<sup>+</sup> current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells?. *Cancer Res*, **1998**; 58(4):815–822.
67. **Pillozzi S, Brizzi MF, Balzi M, Crociani O, Cherubini A, Guasti L, Bartolozzi B, Becchetti A, Wanke E, Bernabei PA, Olivotto M, Pegoraro L, Arcangeli A.** HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic hemopoietic progenitors. *Leukemia*, **2002**; 16(9):1791–1798.
68. **Smith GAM, Tsui HW, Newell EW, Jiang X, Zhu XP, Tsui FWL, Schlichter LC.** Functional up-regulation of HERG K<sup>+</sup> channels in neoplastic. *J Biol Chem*. **2002**; 277(21):18528–18534.
69. **Sakai H, Shimizu T, Hori K, Ikari A, Asano S, Takeguchi N.** Molecular and pharmacological properties of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels of human lung cancer cells. *Eur J Pharmacol*, **2002**; 435(2-3):125–133.
70. **Plummer 3rd HK, Yu Q, Cakir Y, Schuller HM.** Expression of inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) and beta-adrenergic regulation of breast cancer cell lines. *BMC Cancer*, **2004**; 4:93.
71. **Plummer 3rd HK, Dhar MS, Cekanova M, Schuller HM.** Expression of G-protein inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) in lung cancer cell lines. *BMC Cancer*, **2005**; 5:104.
72. **Stringer BK, Cooper AG, Shepard SB.** Overexpression of the Gprotein inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1) in primary breast carcinomas correlates with axillary lymph node metastasis. *Cancer Res*, **2001**;61:582–8.
73. **Liu X, Chang Y, Reinhart PH, Sontheimer H, Chang Y.** Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells. *J Neurosci*, **2002**; 22(5):1840–1849.
74. **Basrai D, Kraft R, Bollensdorff C, Liebmann L, Benndorf K, Patt S.** BK channel blockers inhibit potassium-induced proliferation of human astrocytoma cells. *Neuroreport*, **2002**; 13(4):403–407.
75. **Ransom CB, Sontheimer H.** BK channels in human glioma cells. *J Neurophysiol*, **2001**; 85(2):790–803.
76. **Parihar AS, Coghlan MJ, Gopalakrishnan M, Shieh CC.** Effects of intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel modulators on human prostate cancer cell proliferation. *Eur J Pharmacol*, **2003**; 471(3):157–164.

77. **Goldin AL.** Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol*, **2001**; 63: 871-894.
78. **Lee JY, Park SJ, Park SJ, Lee MJ, Rhim H, Seo SH, Kim KS.** Growth inhibition of human cancer cells in vitro by T-type calcium channel blockers. *Bioorg Med Chem Letters*, **2006**; 16(19):5014-5017.
79. **Catterall W.** From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, **2000**; 26(1):13-25.
80. **Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN Catterall WA.** Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, **2000**; 28(2):365-368.
81. **Grimes JA, Fraser SP, Stephens GJ, Downing JEG, Laniado ME, Foster CS, Abel PD, Djamgoz MBA.** Differential expression of voltage-activated Na<sup>+</sup> currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Letters*, **1995**; 369(2-3):290-294.
82. **Laniado ME, Lalani EN, Fraser SP, Grimes JA, Bhangal G, Djamgoz MB, Abel PD.** Expression and functional analysis of voltage-activated Na<sup>+</sup> channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *Am J Pathol*, **1997**; 150(4): 1213-1221.
83. **Mycielska M, Djamgoz M.** Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. *J Cell Science*, **2004**; 117(Pt 9):1631-1639.
84. **Fraser S, Grimes J, Djamgoz M.** Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: comparison of strongly and weakly metastatic cell lines. *Prostate*, **2000**; 44(1): 61-76.
85. **Djamgoz MBA, Onkal R.** Persistent current blockers of voltage-gated sodium channels: a clinical opportunity for controlling metastatic disease. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, **2013**; 8(1):66-84.
86. Potier, M, Joulin, V, Vandier, C.: EP06118417.2 (2006) Erişim: <http://www.google.com/patents/EP1884774A1?cl=en> Erişim tarihi: 18.08.2014.
87. **Panner A, Wurster RD.** T-type calcium channel and tumour proliferation. *Cell Calcium*, **2006**; 40(2): 253-259.
88. **Gray LS, Perez-Reyes E, Gamorra JC, Haverstick DM, Shattock M, McLatchie L, Harper J, Brooks G, Heady T, Macdonald TL.** The role of voltage gated T-type Ca<sup>2+</sup> channel isoforms in mediating "capacitive" Ca<sup>2+</sup> entry in cancer cells. *Cell Calcium*, **2004**; 36(6):489-497.

89. **Asaga S, Ueda M, Jinno H, Kikuchi K, Itano O, Ikeda T, Kitajima M.** Identification of a new breast cancer-related gene by restriction landmark genomic scanning. *Anticancer Res*, **2006**; 26(1A):35- 42.
90. **Mariot P, Vanoverberghe K, Lalevée N, Rossier MF, Prevarskaya N.** Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J Biol Chem*, **2002**; 277(13):10824-10833.
91. **Gruber AD, Pauli BU.** Tumorigenicity of human breast cancer is associated with loss of the Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channel CLCA2. *Cancer Res* **1999**; 59(21): 5488-5491.
92. **Bustin SA, Li SR, Dorudi S.** Expression of the Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channel genes CLCA1 and CLCA2 is downregulated in human colorectal cancer. *DNA Cell Biol.* **2001**; 20(6):331-338.
93. **Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B.** Molecular Diversity of K<sup>+</sup> Channels. *Ann N Y Acad Sci.* **1999**; 868:233-285.
94. **Choe S.** Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci*, **2002**; 3(2):115-121.
95. **Bezaniilla F, Armstrong CM.** Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *J Gen Physiol*, 1972; 60 (5):588–608.
96. **Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X.** International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*, **2005**; 57(4): 473-508.
97. **Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarriubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, Wymore RS.** International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev*, **2003**; 55(4):583-586.
98. **Warmke J, Drysdale R, Ganetzky B.** A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. *Science*, **1991**; 252(5012):1560-1562.
99. **Warmke JW, Ganetzki B.** A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1994**; 91(8):3438–3442.
100. **Kaplan WD, Trout WE 3rd.** The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*. *Genetics*, **1969**; 61(2):399-409.

101. **Pardo LA, Stühmer W.** Eag1 as a cancer target. *Expert Opin Ther Targets*, **2008**; 12(7):837-843.
102. **Brelidze TI, Carlson AE, Davies DR, Stewart LJ, zagotta WN.** Identifying Regulators for EAG1 Channels with a Novel Electrophysiology and Tryptophan Fluorescence Based Screen. *PLoS ONE*, **2010**; 5(9):e12523.
103. **Morais Cabral JH, Lee A, Cohen SL, Chait BT, Li M, Mackinnon R.** Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell*, **1998**; 95(5):649–655.
104. **Taylor BL, Zhulin IB.** PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev*, **1999**; 63(2):479–506.
105. **Guy HR, Durell SR, Warmke J, Drysdale R, Ganetzky B** Similarities in amino acid sequences of *Drosophila* eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Science*, **1991**; 254(5032):730.
106. Erişim: [http://www.sfb604.uni-jena.de/sfb604media/Bilder/scheme/Heinemann\\_Scheme-width-1200-height-489.jpeg](http://www.sfb604.uni-jena.de/sfb604media/Bilder/scheme/Heinemann_Scheme-width-1200-height-489.jpeg) Erişim tarihi: 18.08.2014.
107. **Bauer CK, Schwarz JR.** Physiology of EAG K<sup>+</sup> Channels. *J Membr Biol*, **2001**; 182(1):1-15.
108. Camacho J. Ether a go-go potassium channels and cancer. *Cancer Lett*, 2006; 233(1):1–9.
109. **Ousingsawat J, Spitzner M, Puntheeranurak S, Terracciano L, Tornillo L, et al.** Expression of voltage-gated potassium channels in human and mouse colonic carcinoma. *Clin Cancer Res*, **2007**; 13(3): 824–831.
110. **Gavrilova-Ruch O, Schönherr K, Gessner G, Schönherr R, Klapperstück T, Wohlrab W, Heinemann SH.** Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *J Membr Biol*, **2002**; 188(2):137–149.
111. **Gomez-Varela D, Zwick-Wallasch E, Knotgen H, Sanchez A, Hettmann T, et al.** Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity. *Cancer Res*, **2007**; 67(15):7343–7349.
112. **Mello de Queiroz F, Suarez-Kurtz G, Stuhmer W, Pardo LA.** Ether a go-go potassium channel expression in soft tissue sarcoma patients. *Mol Cancer*, **2006**; 5: 42.
113. **Weber C, Mello de Queiroz F, Downie BR, Suckow A, Stuhmer W, et al.** Silencing the activity and proliferative properties of the human Eag1 potassium channel by RNA interference. *J Biol Chem*, **2006**; 281(19): 13030–13037.

114. **Brüggemann A, Stühmer W, Pardo LA.** Mitosis-promoting factor-mediated suppression of a cloned. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1997**; 94(2):537-542.
115. **García-Ferreiro RE, Kerschensteiner D, Major F, Monje F, Stühmer W, Pardo LA.** Mechanism of block of hEag1 K<sup>+</sup> channels by imipramine and astemizole. *J Gen Physiol*, **2004**;124(4):301-317.
116. **Carlson AE, Brelidze TI, Zagotta WN.** Flavonoid regulation of EAG1 channels. *J Gen Physiol*, **2013**;141(3):347-358.
117. **Conley EC, Brammar WJ.** *The Ion Channel Factsbook IV Voltage-Gated Channels*. 1<sup>st</sup> Ed., California: Academic Press, **1999**:275-322.
118. **Esperanca M, Gerrard JW.** Nocturnal enuresis: comparison of the effect of imipramine and dietary restriction on bladder capacity. *Can Med Assoc J*, **1969**; 101(12):65-68.
119. **Peghini PL, Katz PO, Castell DO.** Imipramine decreases oesophageal pain perception in human male volunteers. *Gut*, **1998**; 42(6):807-813.
120. Imipramine Erişim: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00458%20> Erişim tarihi: 18.08.2014.
121. Imipramine Hydrochloride tablet. Erişim: <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=6f2f356f-e777-4edd-94d2-e52ae9273131> Erişim tarihi: 18.08.2014.
122. **Okada Y.** *Patch Clamp Techniques from Beginning to Advanced Protocols*. Academic Press, **2012**: 1-17.
123. **Neher E, Sakmann B.** Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, **1976**; 260(5554):799-802.
124. **Neher E.** Ion channels in communication between and within cells. *Science*, **1992**; 256(5056):498-502.
125. **Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ.** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, **1981**; 391(2):85-100.
126. **Kakei M, Noma A, Shibasaki T.** Properties of adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol*, **1985**; 363:441-462.
127. **Levitan ES, Kramer RH.** Neuropeptide modulation of single calcium and potassium channels detected with a new patch clamp configuration. *Nature*, **1990**; 348(6301):545-547.

128. **Horn R, Marty A.** Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol*, **1988**; 92(2):145–159.
129. **Williams M.** Real-time Polymerase Chain Reaction. In: Bustin SA Eds. *The PCR Revolution Basic Technologies And Applications*. 1<sup>st</sup> Ed., New York: Cambridge University Press. **2010**:3-12.
130. **Pfaffl MW.** Relative quantification. In: Dorak T Eds. *Real-time PCR*. 1<sup>st</sup> Ed., New York: Taylor & Francis Group **2006**: 1-37.
131. **Plumb JA.** Cell Sensitivity Assay: The MTT Assay. In: Langdon SP Eds. *Cancer Cell Culture*. 1<sup>st</sup> Ed., New Jersey: Humana Press **2004**:165-169.
132. **Li M, Xiong ZG.** Ion channels as targets for cancer therapy. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, **2011**; 3(2):156–166.
133. **Fraser SP, Ozerlat-Gunduz I, Brackenbury WJ, Fitzgerald EM, Campbell TM, Coombes RC, Djamgoz MBA.** Regulation of voltage-gated sodium channel expression in cancer: hormones, growth factors and auto-regulation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **2014**; 369(1638):20130105.
134. **Santoni G, Farfariello V.** TRP channels and cancer: New targets for diagnosis and chemotherapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, **2011**;11(1):54-67.
135. **Terstappen GC, Pula G, Carignani C, Chen MX, Roncarati R.** Pharmacological characterisation of the human small conductance calcium-activated potassium channel hSK3 reveals sensitivity to tricyclic antidepressants and antipsychotic phenothiazines. *Neuropharmacology*, **2001**; 40(6):772-783.
136. **Shimizu M, Nishida A, Fukuda H, Saito H, Yamawaki S.** Inhibitory effect of imipramine on depolarization-induced increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> of rat cortical neurons. *Eur J Pharmacol*, **1994**; 268(1):65-71.
137. **Sontheimer H, Olsen ML.** Whole-Cell Patch-Clamp Recordings. In: Walz W. Eds. *Patch-Clamp Analysis, Advanced Techniques*. 2<sup>nd</sup> Ed., New Jersey: Humana Press Inc **2007**: 35-67.
138. **Mukherjee S, Mukherjee B, Mukhopadhyay R, Naskar K, Sundar S, Dujardin JC, Das AK, Roy S.** Imipramine is an orally active drug against both antimony sensitive and resistant *Leishmania donovani* clinical isolates in experimental infection. *PLoS Negl Trop Dis*, **2012**; 6(12):e1987.



## ÖZGEÇMİŞ

22 Ağustos 1978 yılında İzmir’de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İzmir’de tamamladı. 1995-2000 yılları arasında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Fizik Bölümü’nde lisans eğitimini tamamladıktan sonra 2003 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans eğitimini 2007 yılında tamamladı. Aynı yıl doktora eğitimine aynı anabilim dalında başladı. Yabancı dil olarak İngilizce bilmektedir.