

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ASETAZOLAMİD'İN KOLOREKTAL
KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ
(İN VİTRO)**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fuat KARAKUŞ

**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ İLE ANKARA
ÜNİVERSİTESİ FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ
ANABİLİM DALI ORTAK YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Ergül EYOL

MALATYA-2015

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ASETAZOLAMİD'İN KOLOREKTAL
KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ
(İN VİTRO)**

Fuat KARAKUŞ

Danışman Öğretim Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Ergül EYOL

Ortak Tez Danışmanı : Doç. Dr. İlker ATEŞ

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından 2014/29 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA-2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Farmasötik Toksikoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Jüri Başkanı,
Danışman

Yrd.Doç.Dr. Ergül EYOL

Ortak Danışman

Doç. Dr. İlker ATEŞ

Üye

Yrd. Doç. Dr. Songül ÜNÜVAR

ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2015 tarih ve 2015/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgisiyle ve fikirleriyle bize ışık tutan, bilimi bize sevdiren, değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Ergül EYOL'e, laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan doktora öğrencileri Kadir YILMAZ ve Emir TOSUN'a teşekkür ederim.

Ayrıca tezimi maddi olarak destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve hem maddi hem de teknik olarak destekleyen Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Birimine teşekkür ederim.

ÖZET

Kolorektal kanser, sindirim sisteminin parçaları olan kolon ya da rektumda başlayan bir kanserdir. Kolorektal kanser dünya çapında hem erkek hem de kadınlarda en yaygın üçüncü kanserdir ve batı ülkelerinde kanser ile ilişkili ölümlerde ikinci ana nedendir.

Son yıllarda hücrelerin ekstraselüler çevresine yönelik yoğunlaşan çalışmalar, malignant tümörlerde ekstraselüler çevrenin asitleşmesinin, kanser hücrelerinin invazifliğini arttırdığını göstermiştir. Normal dokularda asit üretimi karbonik anhidrazlar tarafından katalizlenir ve karbonik anhidrazların inhibitörlerinden biri de asetazolamiddir.

Bu çalışmanın amacı Asetazolamid'in kolon kanser hücre hatlarında (SW620 ve LS174T) antitümör etkisini araştırmaktır. Bunun için SW620 ve LS174T hücrelerine üç farklı hücre kültür tekniği uygulandı ve elde edilen sonuçların istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0.05$).

Anahtar Kelimeler: Kanser, Kolorektal kanser hücreleri (SW620 ve LS174T), Asetazolamid, Karbonik Anhidraz

ABSTRACT

IN VITRO EFFECT OF ACETAZOLAMIDE ON COLORECTAL CANCER CELLS

Colorectal cancer is a cancer that starts in the colon or the rectum which parts of the digestive system. Colorectal cancer is the third most common type of cancer in both men and women worldwide and the second principal cause of cancer-related death in the western countries.

Studies focusing on acidification of the extracellular milieu of malignant tumors in recent years have shown that it increases the invasive behavior of cancer cells. In normal tissues, production of acid is catalyzed by carbonic anhydrases and one of the inhibitors of carbonic anhydrases is acetazolamide.

The aim of this study was to investigate antitumor effect of acetazolamide on SW620 and LS174T cell lines. For this, it was performed three different cell culture techniques on the cell lines and the obtained results were statistically significant ($P < 0.05$).

Keywords: Cancer, Colorectal cancer cells (SW620 ve LS174T), Acetazolamide, Carbonic Anhydrase

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolorektal Kanser	4
2.1.1. Belirtileri	4
2.1.2. Etyoloji ve Risk Faktörleri	4
2.1.2.1. Genetik Faktörler	5
2.1.3. Teşhisi	7
2.1.4. Tedavisi	8
2.2. Asetazolamid	8
2.3. Karbonik Anhidrazlar	9
2.3.1. Karbonik Anhidraz 9 (CA IX)	10
2.3.1. Karbonik Anhidraz 12 (CA XII)	11
2.4. Akuaporinler	11
2.4.1. Akuaporin 1 (AQP1)	12
2.4.2. Akuaporin 5 (AQP5)	12
2.4.3. Akuaporin 8 (AQP8)	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	14
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri	14
3.2. Kullanılan Kimyasallar	14
3.3. Hücreler (SW620 ve LS174T)	15
3.4. Hücre Kültürü	15

3.5. Hücre Pasajı	15
3.6. Tümör Hücrelerinin Dondurulması	16
3.7. MTT Testi	16
3.8. Koloni Formasyon Testi	18
3.9. Wound Healing (Yara iyileşme) Testi	18
3.10. İstatistiksel Analiz	18
4. BULGULAR	19
4.1. SW620 ve LS174T Hücrelerinin Morfolojisi	19
4.2. MTT Test Sonuçları	19
4.2.1. SW620 Hücre Hattı İçin MTT Assay Sonuçları	20
4.2.2. LS174T Hücre Hattı İçin MTT Assay Sonuçları	24
4.3. Wound Healing Test Sonuçları	29
4.3.1. SW620 Hücre Hattı İçin Wound Healing Assay Sonuçları	30
4.3.2. LS174T Hücre Hattı İçin Wound Healing Assay Sonuçları	31
4.4. Klonogenik Assay Test Sonuçları	32
4.4.1. SW620 Hücre Hattı İçin Klonogenik Assay Sonuçları	32
4.4.2. LS174T Hücre Hattı İçin Klonogenik Assay Sonuçları	33
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	37
6.1. Asetazolamid'in SW620 ve LS174T Hücreleri Üzerine Antiproliferatif etkisi	37
6.2. SW620 ve LS174T Hücreleri için Wound Healing Assay Sonuçları	37
6.3. SW620 ve LS174T Hücreleri için Klonogenik Assay Sonuçları	38
KAYNAKLAR	39
EK: Etik Kurul Onayına Gerek Olmadığına Dair Belge	43
ÖZGEÇMİŞ	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AZA: Asetazolamid

AQP: Akuaporin

APC: Adenamatöz polipozis coli

CA: Karbonik Anhidraz

CARP: Karbonik Anhidraz İlişkili Protein

COX-2: Siklooksijenaz-2

CT : Bilgisayarlı Tomografi

DCC: Deleted in colorectal cancer

DMSO: Dimetilsülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

FAP: Familyal

HNPCC: Kalıtsal Non-polipozis Kolorektal Kanser

TCF: T-cell factor

ŞEKİLLER DİZİNİ

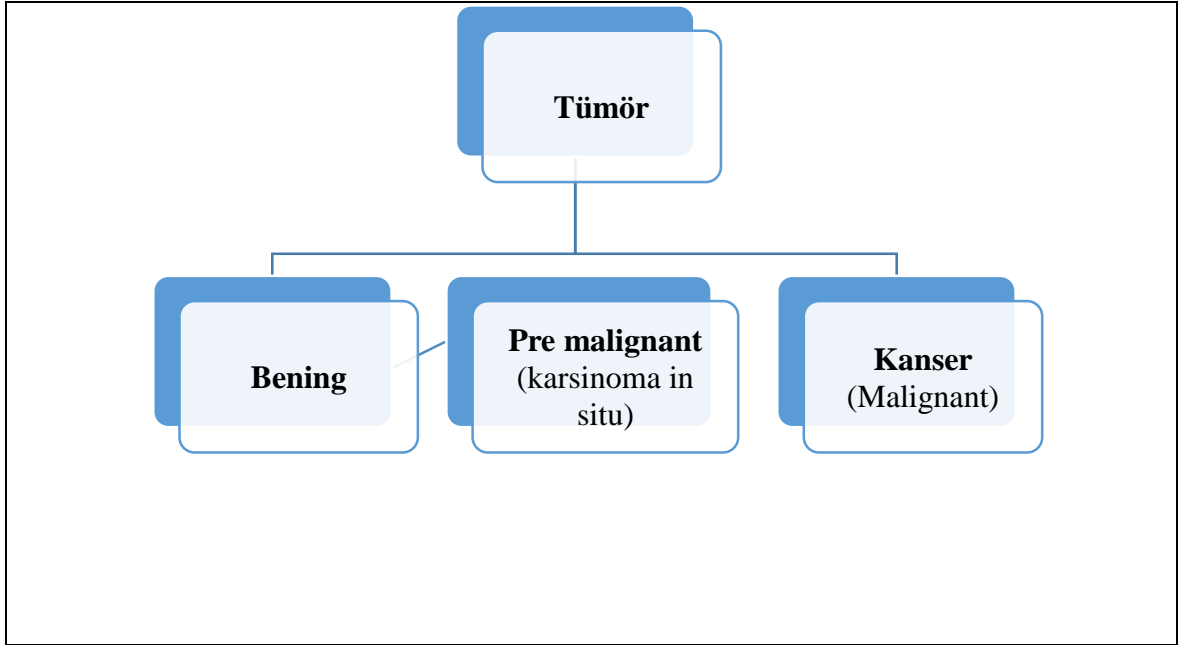
Şekil 1.1 Tümör Çeşitleri	1
Şekil 2.1. Kolonun Anatomisi	3
Şekil 2.2. β -katenin'in regülasyonunda APC, axin ve GSK3 β proteininin fonksiyonu	6
Şekil 2.3. Asetazolamid'in moleküler yapısı	9
Şekil 2.4. Karbonik Anhidraz enzimlerinin katalizlediği reaksiyon	9
Şekil 4.1. A) SW620 Hücreleri B) LS174T Hücreleri	19
Şekil 4.2. MTT Test	20
Şekil 4.3. SW620 Hücresi 24 saat AZA tedavisinden sonra	21
Şekil 4.4. SW620 Hücresi 48 saat AZA tedavisinden sonra	22
Şekil 4.5. SW620 Hücresi 72 saat AZA tedavisinden sonra	23
Şekil 4.6. SW620 Hücresi. 24, 48 ve 72 saatlik yaşam eğrileri	24
Şekil 4.7. LS174T Hücresi 24 saat AZA tedavisinden sonra	25
Şekil 4.8. LS174T Hücresi 48 saat AZA tedavisinden sonra	26
Şekil 4.9. LS174T Hücresi 72 saat AZA tedavisinden sonra	27
Şekil 4.10. LS174T Hücresi. 24, 48 ve 72 saatlik yaşam eğrileri	28
Şekil 4.11. SW620 Hücreleri. Wound healing assay sonuçları	30
Şekil 4.12. LS174T Hücreleri. Wound healing assay sonuçları	31
Şekil 4.13. SW620 Hücreleri. Klonogenik assay sonuçları	32
Şekil 4.14. LS174T Hücreleri. Klonogenik assay sonuçları	33
Şekil 5.1. CAIX ve CAXII'nin kanser hücresinde fonksiyonu	36

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. SW620 Hücre Hattı 24 saat MTT Assay Sonuçları	20
Tablo 4.2. SW620 Hücre Hattı 48 saat MTT Assay Sonuçları	21
Tablo 4.3. SW620 Hücre Hattı 72 saat MTT Assay Sonuçları	22
Tablo 4.4. LS174T Hücre Hattı 24 saat MTT Assay Sonuçları	24-25
Tablo 4.5. LS174T Hücre Hattı 48 saat MTT Assay Sonuçları	25-26
Tablo 4.6. LS174T Hücre Hattı 72 saat MTT Assay Sonuçları	26-27
Tablo 5.1. LS174T Hücre Hattı Koloni Assay Sonuçları	38

1. GİRİŞ

Vücudumuz trilyonlarca hücreden oluşur. Bu hücreler büyür, bölünür ve ölürlere ve bu süreçte birçok kontrol mekanizmasından geçerler. Bu mekanizmaların bozulduğu ve hücrelerin anormal şekilde kontrolsüzce bölüdüğü duruma ise tümör denir. Tümörlerin hepsi kansere neden olmaz.



Şekil 1.1 Tümör Çeşitleri

Tümörlerin bir kısmı çevre dokuları istila etme, kan ve lenf yoluyla vücudun diğer bölümlerine yayılma (metastaz yapma) eğilimindedir. Bu tür tümörlere kanser (malignant tümör) denir. Kanser, tek ve durağan bir hastalık değildir ve 100'den fazla farklı tipi bulunur. Birçok kanser, köken aldığı organa veya hücre tipine göre isimlendirilir.

Kanser tipleri başlıca: karsinoma (epitel hücrelerinden gelişir), sarkoma (kemik ve yumuşak doku hücrelerinden gelişir), lösemi (kemik iliğinde başlar ve beyaz kan hücrelerinin aşırı artmasıyla sonuçlanır), lenfoma (lenfositlerden gelişir), miyeloma (plazma hücrelerinden gelişir) ve merkezi sinir sistemi kanserleri şeklinde gruplandırılabilir (1).

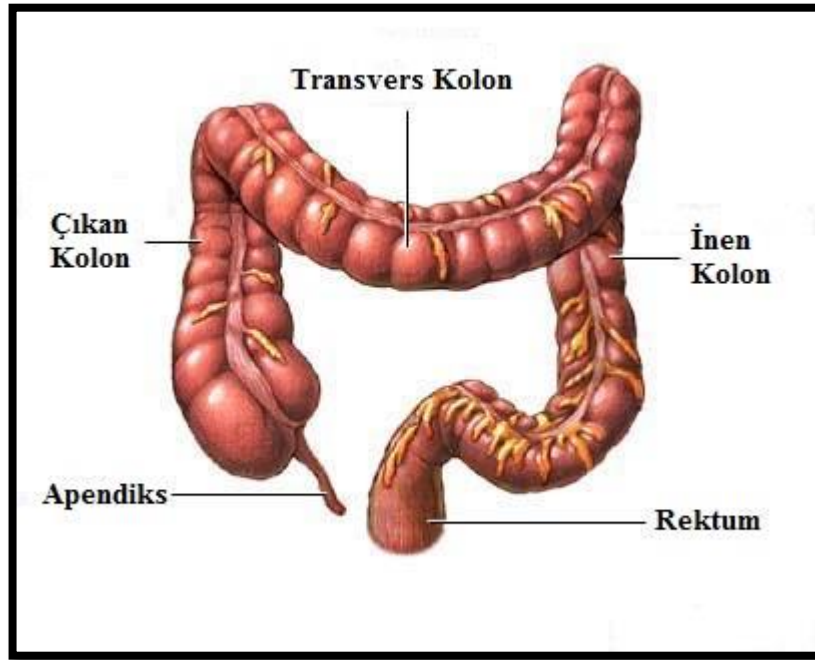
Kanser tedavisinde başlıca cerrahi, radyasyon terapisi ve kemoterapi kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde yeni teknikler ve yeni ilaçlar geliştirmek için birçok in vitro ve in vivo çalışma yapılmaktadır.

Kanser hücre hatlarıyla yapılan in vitro çalışmalar, 60 yıl önce ilk kanser hücresinin (HeLa), kanserli bir hastadan izole edilip üretilmesiyle başladı ve sonra günümüze kadar yüzlerce insan kanser hücre hattı üretildi. Bu hücre hatlarıyla yapılan çalışmalar, normal hücreler ile kanser hücreleri arasındaki farkların anlaşılmasına yardımcı oldu (2).

Bu çalışmada da kolorektal kanser hücre hatları (SW620 ve LS174T) ile yapılan in vitro çalışmada, kullanılan ajanın (Asetazolamid), bu hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla SW620 ve LS174T hücre hatlarına 3 farklı hücre kültürü tekniği (MTT test, Wound healing: Yara iyileştirme ve Klonogenik assay testi) uygulanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Kolon, sindirim sisteminin son kısmını oluşturur. Anatomisi incelendiğinde, son 20 cm'lik kısmı rektum, buradan ince barsaklara kadar olan kısmı ise kolonu oluşturur. Toplam yaklaşık 1.5 m uzunluğundadır. Kolonun rektumla birleştiği yer sigmoid kolondur. Kolonun ince bağırsakla birleştiği yere çekum adı verilir. Kısmen sindirilmiş gıdalar ince bağırsaktan kolona gelir. Kolon, su ve mineralleri besinden ayırır, geri kalanı anüsten atılmak üzere depolar (3).



Şekil 2.1. Kolonun Anatomisi (4).

2.1. Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser, kolon veya rektum yüzeyini örten epitel hücrelerin anormal büyümesi ile gelişir (5). Kolorektal kanserlerin çoğu, polip denilen ve mukoz membranda anormal büyüme sonucu oluşan doku çıkıntısı ile gelişir. Polipler, kolon ve rektumun iç yüzeyini döşeyen epitel hücrelerden oluşurlar ve genellikle yakınmaya neden olmazlar, ancak kanserleşme eğilimi gösterirlerse çeşitli semptomlara neden olurlar (6).

Kolorektal kanser dünya çapında en yaygın üçüncü kanserdir ve tüm ölüm sebepleri arasında dördüncü sırada yer alır. Kolorektal kanserli hastaların yaklaşık % 50'sinde metastaz gelişmektedir (7). Türkiyede ise Sağlık Bakanlığı'nın 2007-2008 yıllarında on iki ildeki kanser kayıt merkezi verilerine göre, kolorektal kanser görülme sıklığı açısından tüm kanserler içinde % 7,8 ile kadınlarda üçüncü ve % 7,5 ile erkeklerde dördüncü sırada yer almaktadır (8).

2.1.1. Belirtileri

Kolorektal kanserin belirtileri, tümörün barsak içindeki yerine ve metastaz yaptığı organa bağlıdır. Klasik belirtileri arasında (50 yaş üzeri bireylerde): ağırlaşan kabızlık, gaitada kan, gaita çapında azalma, iştahsızlık, kilo kaybı, bulantı ve kusma yer alır (9).

2.1.2. Etyoloji ve Risk Faktörleri

Kolorektal kanserler yaklaşık %75 - %95 oranında 67-74 yaşları arasında sporadik olarak ortaya çıkar. Diğer risk faktörleri içinde ileri yaş, erkek cinsiyet, yüksek oranda yağ, alkol veya kırmızı et tüketimi, obezite, sigara ve hareketsizlik yer alır. Ayrıca bu kanserin etyolojisinde genetik faktörler ve çeşitli inflamatuvar bağırsak hastalıkları (ülseratif kolit ve Crohn's hastalığı) gibi hastalıklar da rol oynamaktadır (9).

2.1.2.1. Genetik Faktörler

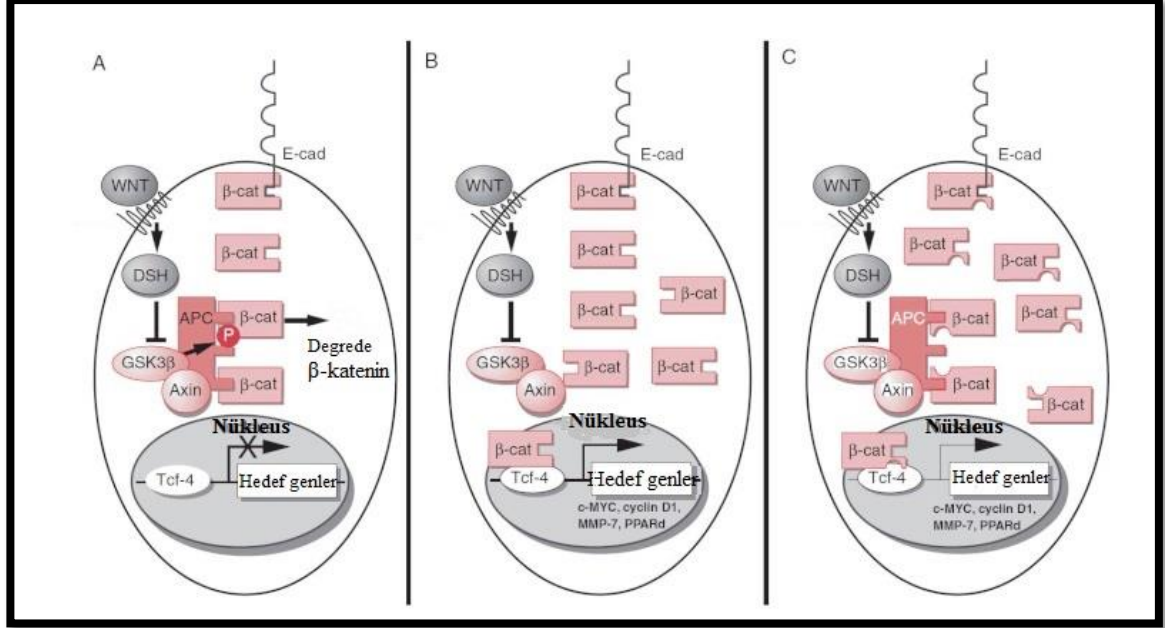
Kolorektal kanser ve diğer birçok kanserin gelişimindeki genetik değişiklikler arasında en başta bazı tümör süpresör genlerin (APC, DCC ve p53) inaktivasyonu gelir. Ayrıca bazı protoonkogenlerde (Ras) ve DNA onarımı ile ilgili genlerdeki değişiklikler de kolorektal kanserin genetik faktörleri arasındadır.

Adenomatöz polipozis coli (APC), insanlarda APC geni tarafından kodlanan ve negatif regülatör olarak görev yapan bir proteindir (2843 aminoasitten oluşmaktadır ve molekül ağırlığı yaklaşık 310 kDa'dır). Hücre adhezyonunda yer alan Beta-katenin konsantrasyonunu kontrol eder ve E-kaderin ile etkileşime girer. Tümör baskılayıcı bir gen olan APC geni insanlarda 5. kromozomun q22.2 bölgesinde yerleşmiştir ve mutasyonu sonucu hastalık oluşturabilmesi için her iki allelde de mutasyon olması gerekmektedir (10). Bu mutasyonlar sonucu APC proteini işlev yapamadığı için yıkıcı kompleksin β -katenin'i fosforilleme etkisi ortadan kalkmakta ve sinyal yolunun kontrolsüz aktivasyonu gerçekleşmektedir (6).

Adenomatöz polipozis coli (APC), hücrede; β -catenin, γ -catenin (plakoglobin), glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β), EB1, hDLG, mikrotübüller, aksin ve konduktin ile ilgili birçok proteine bağlanır. APC geni β -catenin'in regülasyonunda kritik rol oynar. β -catenin hücrede bol bulunan bir proteindir ve Wnt sinyal yolunda sinyal iletiminde görev yapar. Kolorektal kanserde APC geni mutanttır ve β -catenin'in regülasyonunu koordine edemez ve β -catenin sitoplazmada birikir. Sitoplazmada miktarı artan β -katenin, transkripsiyon faktörü olan Tcf (T-cell factor) ve Lenf (lymphoid-enhancer factor) ile kompleks oluşturur ve nükleusa girerek Tcf tarafından regüle edilen genlerin ekspresyonunu aktive eder (11).

Adenomatöz polipozis coli (APC)'nin bir allelinin mutant olarak ebeveynlerden genetik aktarımı ve diğerinin somatik mutasyonla inaktif olması, yani APC geninin her iki allelinin de kayıp olması durumunda, tümör baskılayıcı genlerin kontrolü ortadan kalkar.

APC'nin inaktivasyonu, kolon epitel hücrelerinin anormal çoğalmasına ve çok sayıda polip gelişerek, erken adenom dönemine geçilmesine neden olur (12).



Şekil 2.2. β-katenin'in regülasyonunda APC, axin, ve GSK3β proteinlerinin fonksiyonu. **A)** Normal Hücrelerde **B)** APC mutasyonunun olduğu kolorektal ve diğer kanserlerde **C)** β-katenin de nokta mutasyonlarının ve küçük delesyoların olduğu kanser hücrelerinde (11).

Kolorektal kanserde rol oynayan bir diğer tümör süpresör gen ise DCC (Deleted in Colorectal Cancer) genidir. DCC geninin ürünü olan DCC, transmembran bir proteindir ve netrin-1 reseptörüdür. Netrin-1, nöronal gelişimde aksonların doğru birleşmesinde ve hücre migrasyonunda görev alır. DCC, netrin-1 olmadığı durumlarda apoptozu indüklemektedir. Kolorektal kanserde çoğunlukla bu gen mutanttır veya regülasyonu azalmıştır (13). DCC, hepatik metastazları olan kolorektal kanserlerin birçoğunda tespit edilmiştir. Kromozom 18q21' de heterozigot gen kaybı sonucu adenomlara dönüşüm olur. Bu mutasyonun saptanması 2 ve 3. evredeki kolorektal kanserlerde kötü prognozun kuvvetli belirleyicisidir (6).

Bir başka tümör süpresör gen ise TP53 genidir. Bu gen 17. kromozomun kısa kolunda lokalizedir (17p) ve p53 proteininin sentezinden sorumludur. p53 proteini

nükleusta lokalizedir ve direk olarak DNA'ya bağlanır. DNA hasar durumunda hücrenin onarılmasında ya da apoptoza yönlendirilmesinde önemli rol oynar (6, 14).

TP53 geninin inaktivasyonu adenomun karsinoma dönüşümüne aracılık etmektedir. Bu olay kolorektal karsinogenezin geç dönemlerinde ortaya çıkan önemli bir basamaktır. Kolon kanserinde kromozom 17p nin delesyona uğrayan kısmı TP53 genini içeren kısımdır ve sıklıkla TP53 geninin bir alleli delesyona uğramışken diğer allelde de nokta mutasyonu bulunmaktadır (6).

Kolorektal kanserdeki genetik faktörlerden biri de protoonkogenlerin onkogenlere dönüşümüdür. Protoonkogenler, sinyal iletiminde ve mitogenik sinyallerin düzenlenmesinde görev alırlar. Bunlardan biride Ras genidir. Ras geni 12 nolu kromozomun kısa kolunda (p) yer alır (6). Ras gen ailesinden olan KRAS geninin (Kirsten rat sarcoma) kolorektal tümörlerin %30-50'sinde mutasyona uğradığı bildirilmiştir (15). Yine Ras familyasının üçüncü üyesi olan HRAS genindeki mutasyonlara da kolorektal kanserlerde sık rastlanılmaktadır (16). Ras onkogenlerindeki mutasyonlar ile APC genindeki mutasyonlar ard arda gelince polipler büyür ve parmaklı uzantılara sahip bir hal alır. Bu aşama orta seviye adenom aşamasıdır (6).

Bunlar dışında birkaç genetik sendrom da [(Kalıtsal (Hereditör) Non-polipozis Kolorektal Kanseri (HNPCC) veya Lynch Sendromu, Familial Adenomatöz Polipozisler (FAP), Gardner Sendromu, Turcot Sendromu ve Familial Hamartomatöz Polipozis] artan oranlarda kolorektal kanser ile ilişkilidir.

2.1.3. Teşhisi

Lezyonun yerine bağlı olarak kolorektal kanserlerde tümör biyopsi yoluyla teşhis kolonoskopi ve sigmoidoskopi yolu ile yapılmaktadır. Hastalığın ilerlemiş durumlarında ise teşhis, göğüs, abdomen ve pelvisin CT tarama (X-ray Computed Tomography) yöntemiyle taranmasıyla belirlenmektedir. Diğer görüntüleme yöntemleri olan PET ve MRI'da bazı durumlarda kullanılabilir. İmmünokimyasal olarak ta COX-2

(Siklooksijenaz-2) testi ile belirlenir. Çünkü kolorektal kanser tümörlerinin çoğunun COX-2 pozitif olduğu düşünülmektedir (9).

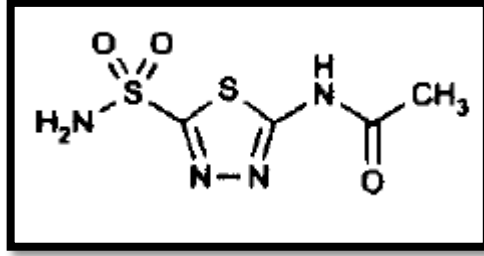
2.1.4. Tedavisi

Birçok kanser türünün tedavisinde olduğu gibi kolorektal kanserin tedavisinde de cerrahi, kemoterapi, radyasyon terapisi, palyatif bakım veya bunların birlikte kullanımı söz konusudur. Kemoterapisinde; 5-FU (Flourouracil), kapesitabin, folinik asit (leucovorin), oksaliptatin, irinotekan, tegafur-urasil veya bunların kombine şekilleri (FOLFOX, FOLFIRI ve CapeOx) kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır (9).

Tedavide göz önünde bulundurulması gereken önemli durumlardan biri de tümör mikroçevresidir. Birçok tümör, hipoksik şartlarda gelişmektedir. Hipoksik şartlar tümör hücrelerinin glikoz metabolizmasını değiştirmesine ve laktik asit oluşturmaya neden olur. Bu durumda tümör hücrelerinin çevresinin normal hücrelere oranla daha asidik olmasına neden olur. Canlı hücre ve dokularda hücre döngüsü, proliferasyonu ve farklılaşma süreci çevresel asiditeden etkilenmektedir. Aynı şekilde onkogenezis, malignant transformasyon, metastaz ve anjiyogenesis te çevresel asiditeden son derece etkilenmektedir. Tümör mikroçevresinin alkil hale gelmesi, tümör gelişimini ve metastazı yavaşlatır (17). Alkilleyici bir ajan olan Asetazolamid'in tümör tedavisinde yardımcı tedavi olarak kullanılıp kullanılmayacağı da bu çalışmanın hipotezini oluşturmuştur.

2.2. Asetazolamid

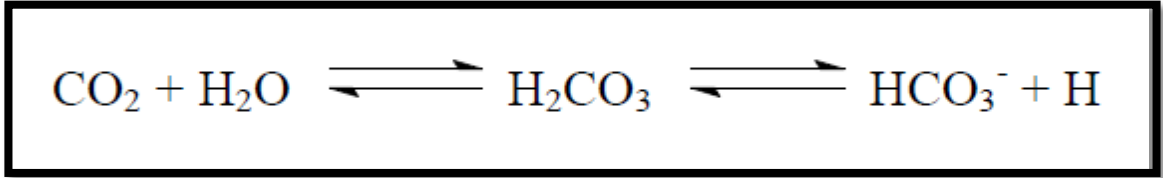
Asetazolamid, Diamox ve Diazomid gibi ticari isimlerle satılan ve glokom, epileptik nöbet, idyopatik intrakraniyal hipertansiyon, yükseklik hastalığı, sistinüri, periyodik paralizi ve merkezi uyku apnesi gibi hastalıklarda kullanılan karbonik anhidraz inhibitörü bir ilaçtır (18).



Şekil 2.3. Asetazolamid'in Moleküler Yapısı

2.3. Karbonik Anhidrazlar

Karbonik anhidraz enzimleri (CA) (Karbonat Hidroliyaz E.C.4.2.1.1), katalitik aktiviteleri için Zn^{2+} (Çinko) iyonu içeren metaloenzimlerdir ve neredeyse bütün organizmalarda bulunmaktadır. İlk olarak, sığır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz, canlılarda CO_2 molekülünün hidrasyonunu ve HCO_3^- iyonunun dehidrasyonunu katalizleyen bir enzimdir (19).



Şekil 2.4. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Katalizlediği Reaksiyon

Memelilerde bulunan ve enzimatik olarak aktif olan 15 farklı CA izoenzimi tespit edilmiştir. Bunların çoğu baskın olarak farklılaşmış hücrelerle ilişkilidir ve çeşitli doku ve organlarda özelleşmiş fonksiyonları yerine getirirler. Beş çeşidi sitoplazmada bulunur (CAI, CAII, CAIII, CAVII ve CAXIII), beş çeşidi hücre membranına bağlı olarak bulunur (CAIV, CAIX, CAXII, CAXIV ve CAXV), iki çeşidinin mitokondriyal enzim olduğu tespit edilmiştir (CAVA ve CAVB). Bir çeşidi ise salgılanan bir enzimdir (CAVI). Ayrıca, henüz sınıflandırılmamış formu olan NonO/p54nrb tanımlanmıştır. Bunun dışında CA gen ailesine dahil üç çeşit karbonik anhidraz ilişkili proteinler (CARP) de bulunmaktadır.

Karbonik anhidraz-IX ve Karbonik anhidraz-XII izoenzimleri tümör hücrelerinde aktivitelerini gösteren buna bağlı olarak da kanserle ilişkili olan izoenzimler olarak tespit edilmişlerdir. Tümörlerdeki CAIX ifadesi tümörün tanısı ve prognozu hakkında bilgi vermektedir. Örneğin beyin ve akciğer kanserlerinde CA-IX varlığı kötü prognoz ile ilişkilidir (19). CA-XII de ilk önce akciğer kanserine spesifik bir protein olarak tanımlansa da sonraları birçok tümör ve normal dokuda da tanımlanmıştır (20).

2.3.1. Karbonik Anhidraz 9 (CA IX)

Karbonik anhidraz-IX (CA-IX), 54 ve 58 kDa ağırlığında bir glikoprotein olup epitel hücrelerin plazma membranında ve bazı durumlarda çekirdekte de salgılandığı bildirilmektedir, ayrıca bu enzimin geni kromozom 17 de haritalanmaktadır. CA-IX membran bağlı izoenzimi normal hücrelerde aktivite göstermeyip tümüyle kanserli hücrelerde salgılanan tümör ilişkili karbonik anhidraz izoenzimidir. Bu özelliği ile potansiyel bir kanser biyogöstergesi olarak önem taşır.

Normal karbonik anhidraz enzim aktivitesinin yanı sıra, hücre adhezyon işleminin düzenlenmesi ve hipoksik çevredeki tümörün ilerleyip hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Karbonik anhidraz-IX (CA-IX) membrana bağlı ve hücre yüzeyinde olan katı tümörlerde görüldüğü için özellikle böbrekle ilgili hücre karsinomlarında (RCC), serviks, over, kolon, baş ve boyun karsinomlarında ekspre olmaktadır. Hücre yüzeyinde aktivite göstermesi, CO₂'in hidratasyon ve dehidratasyonu sonucunda klorür-anyon değiştiricisi olarak hücre membranında yer alması, CA-IX'un HCO₃⁻ anyonlarının tekrar sitoplazmaya taşınmasında önemli bir rol üstlenmektedir. Böylelikle ekstraselüler asiditeyi kontrol ettiği, katepsin B ve matriks metaloproteaz B (MMP-9) gibi hücre yüzey proteazlarının aktivasyonuna etkimesi bu enzimin sadece hipoksi için değil ayrıca kanser terapisi için de önemli olduğunu göstermektedir (21).

2.3.1. Karbonik Anhidraz 12 (CA XII)

Karbonik anhidraz-IX (CA-IX) izoenzimden sonra ikinci olarak tümör ilişkili izoenzim olan CA-XII, böbrek kanser hücrelerinde ekspre edildiği ve ayrıca CA-IX gibi aynı regülasyona sahip olduğu bildirilmiştir. CA-IX gibi hipoksiya ile regüle edilme benzerliği olmasına rağmen etkin oldukları biyokimyasal yolların farklı olduğu anlaşılmaktadır (21).

İlk çalışmalarda CA-XII mRNA'sı düşük seviyelerde normal erişkin böbrek, pankreas, kolon, prostat, over, testis, akciğer ve beyin dokularında tespit edilmiştir. Sıvı konsantrasyonu ve iyon transportunda fizyolojik bir role sahiptir. CA-XII, CAIX izoenzimine göre düşük bir aktiviteye sahiptir ancak kanser tedavisinde önemli bir tümör marker olarak kullanılabilceği yapılan çalışmalarda gösterilmektedir (21).

2.4. Akuaporinler

Akuaporinler su transportunu sağlayan transmembran proteinlerdir. Vücutta birçok dokuda bulunurlar ve transselüler ve transepitelyal su hareketinde önemli rol oynarlar. Memelilerde en az 13 tip akuaporin bulunduğu bildirilmiştir. Akuaporinler hücre göçünde de rol oynarlar. Tümör hücre göçü, tümör büyümesinde ve metastazında önemli bir adımdır (22).

Onkogenik işlemlerde karbonik anhidrazların ve akuaporinlerin öneminin daha fazla kanıtı, bunların inhibitörlerinin kullanılmasından kaynaklanır. Bunlar heterosiklik ve aromatik sülfonamidlerdir ve bunlar içinden öne çıkanı ise Asetazolamid'dir. Malignant tümörlerde ekstraselüler ortamın asitleşmesi kanser hücrelerinin invazifliğini arttırmaktadır. Normal dokularda bu asitleşme karbonik anhidraz enzimleri tarafından sağlanır ($H_2O + CO_2 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$). Asetazolamid de genel bir karbonik anhidraz inhibitörüdür. Bu inhibisyon etkisini, özellikle bazı tümörlerde fazla eksprese olan CA9 enziminin hücre membranının dışında yer alan aktif bölgesine bağlanarak gösterir ve ortamı alkali hale çevirir (23).

2.4.1. Akuaporin 1 (AQP1)

Akuaporin 1 yaygın şekilde eksprese olan ve su transportunu sağlayan bir proteindir ve fizyolojik fonksiyonu tamamen böbrekte karakterize edilmiştir. Proksimal tübüllerin bazolateral ve apikal plazma membranlarında, eritrositlerde, vasküler endotelyumda, gastrointestinal kanalda, ter bezlerinde ve akciğerlerde bulunur (24).

Akuaporin-1 (AQP1)'in, kolon ve akciğer kansrinde, beyin tümörlerinde, koroid pleksus tümörlerinde, hemanjiyoblastomada ve multipl miyelomada fazla eksprese olduğu bildirilmiştir. Kolorektal karsinogenezis sürecinde AQP1 hastalığın erken safhasında indüklenir ve kolon kanser gelişiminin geç safhalarına kadar devam eder. Astrositom gelişiminde de, AQP1 yoğunluğunun düşük seviyeli tümörlerden ilerlemiş tümörlere doğru önemli derecede arttığı bildirilmiştir. Nicchia ve arkadaşları, fare melanoma modelinde AQP1 inhibe ettiklerinde anjiyogenezisin azaldığını rapor etmişlerdir.

AQP1; insan, rat ve tavuk embriyosu korioallontoyik membranında (CAM) tümör mikrodamarlarının artışında yüksek oranda eksprese olur. Ayrıca AQP1 spesifik dsRNA (Double-stranded RNA) oligonkleotidlerinin CAM'da yeni kan damarı oluşumunu önemli derecede azaltmıştır.

AQP1 ekspresyonunun, HT20 kolon kanseri hücrelerinin plazma membranlarında su geçirgenliğini ve migrasyon oranını arttırdığı, yapılan yara iyileşme ve invazyon testleriyle gösterilmiştir (25).

2.4.2. Akuaporin 5 (AQP5)

Akuaporin 5, insanlarda AQP5 geni tarafından kodlanan bir su kanalı proteindir. Tükrük, gözyaşı ve akciğer salgılarının üretiminde rol oynar. Kolon kanseri ile ilişekli bir diğer akuporindir. Ayrıca pankreas kanserinde de ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Kang ve arkadaşları tarafından (26) yapılan çalışmada, AQP5'in kolon kanser hücrelerinde eksprese olduğunu, ayrıca karaciğer ve akciğer metastazlarıyla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Ayrıca AQP5'in kolon kanserinde ilaç direnci ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir. Bu etkiyide Ras/Erk/Rb sinyal yolağı ile etkileşime girerek gösterdiğini söylemişlerdir.

2.4.3. Akuaporin 8 (AQP8)

AQP8 proteini, su-spesifik bir kanal proteindir ve cıva ya karşı duyarlı iken gliserol ve üreye geçirgen değildir. AQP8 mRNA'sı pankreas ve kolon dokularında bulunurken diğer dokularda ekspresyonuna rastlanmamıştır (27). Fischer ve arkadaşları yaptıkları çalışmada AQP8'in insan kolonik epitelyal hücrelerde ve tümör dokularında ekspresyonunu incelemiş ve kolonun lümenine uzanan normal epitel hücrelerde ekspresyonunu ispatlamışlardır. Ancak adenomalarda ve kolorektal kanserlerde AQP8'in ekspresyonuna rastlamamışlardır (28).

2.4.3. Akuaporin 9 (AQP9)

AQP9 çok geniş çapta yüksüz solütlerin geçişine izin veren bir su kanalı proteindir. Ayrıca üre transportunu ve ozmotik su permeabilitesini stimüle eder. İmmünolojik cevapta ve bakteriyel aktivitede de rol oynar. 3. safha kolon kanseri hastalarında yapılan bir başka çalışmada AQP9 ekspresyonunun düşük seviyede olduğu ve standart adjuvant terapiye cevap vermeyen hastaları belirlemede biyomarkır olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (28).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri

- a. Santrifüj (Hettich Universal)
- b. İnkübatör (Thermo Scientific – Heracell 150i*)
- c. Laminar Flow (Thermo Scientific)
- d. Buzdolabı (-20 °C)
- e. Derin Dondurucu (-86 °C) (Nüve)
- f. Mikroskop (Olympus)
- g. Mikroplate-Reader (Biotek)
- h. Mikropipet Seti (Eppendorf)
- i. Steril falcon tüpler (15 ml ve 50 ml)
- j. Steril cam pipetler

3.2. Kullanılan Kimyasallar

- a. RPMI Medyum (Lonza)
- b. DMEM Medyum
- c. FBS (Fetal Bovin Serum)
- d. L-Glutamin
- e. Penicillin/Streptomycin
- f. PBS(Phosphate Buffered Saline)
- g. EDTA (Ethylenediamine-tetraacetic acid)
- h. DMSO (Dimethylsulfoxid)
- i. İzopropanol

- j. Etanol
- k. MTT (3-(4,5-Dimethyl -2 thiazolyl)- 2,5 -diphenyl- 2H-tetrazolium)
- l. HCl
- m. Asetazolamid (Sigma)

3.3. Hücreler (SW620 ve LS174T)

Her iki hücre hattı da insan kalın barsak adenokarsinom hücreleridir. Bu hücreler German Cancer Research Center tarafından, kullanılmak üzere tarafımıza hediye edilmiştir.

3.4. Hücre Kültürü

Bütün hücreler standart şartlarda (%5 CO₂, 37°C) kültür edilmişlerdir. Hücre vasatı olarak tüm hücreler için RPMI1640 medyumunu kullanılmıştır. Bütün hücreler -80°C'de muhafaza edilmiştir. Bu hücreler kullanılmak istendiğinde 37°C çözdürülmüş ve 1500 U/dk da 5 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan hücre pelleti taze medium içine alınarak inkübatöre bırakılmıştır (30).

3.5. Hücre Pasajı

Hücreler; hücre kültürü şişelerindeki sıklıklarına göre 3-5 günde bir pasaj edilmişlerdir. Burada hücrelerin kullandığı medyum dökülerek, hücreler bir kez PBS ile yıkanmış ve sonrasında 3-5 ml Tripsin (% 0,25) ile muamele edilir. Sonrasında 3 dakika inkübatörde bekletilmiştir ve flask içerisine 3-5 ml taze medyum eklenerek tripsinin nötralizasyonu sağlanmıştır. Bu şekilde medyum içine alınan hücreler, tümör hücre süspansiyonunu oluşturur. Hücre süspansiyonu 5 dakika, 1500 U/dak santrifüj edilmiş ve sonrasında 1/10 oranında dilüe edilerek thoma lamında sayılmıştır. (thoma lamının bir tarafına 10 µl'lik hücre süspansiyonu eklenir, lamın ortasında yer alan büyük kare içinde kalan tüm hücreler sayılır ve çıkan sonuç dilüsyon oranında hesaba katılarak 10⁴ ile çarpılır ve toplam hücre sayısı elde edilir. Uygun sayıda hücre alınarak taze hücre medyumuna karıştırılıp yeni deneyler için inkübatöre bırakılmıştır (30).

3.6. Tümör Hücrelerinin Dondurulması

Yukarıda hücre pasajında belirtilen işlemler hücre peleti elde edilene kadar aynı şekilde yürütülmüştür. Bu hücre peleti hazırlanan özel bir dondurma medyum içine (%20 RPMI-1640 Medyum, %70 FBS ve %10 Dimetilsülfoksit) alınır. 1 ml dondurma medyumuna 1.5×10^5 hücre gelecek şekilde hesaplanmıştır ve -81°C derin dondurucuya bırakılarak muhafazası sağlanmıştır (30).

3.7. MTT Testi

Bu testle SW620 ve LS174T hücrelerinin in vitro proliferasyon yetenekleri belirlenmiştir. Prensip olarak canlı hücrelerin 3-(4,5 Dimetiltiyazol-2-il)5-difeniltetrazolium-bromid (MTT) ile boyanmasına dayanır. Bu boya canlı hücreler tarafından alınarak formazan kristallerine metabolize edilir ve mor renkli kristaller oluşur. Bu oluşan kristaller asidik 2-izopropanol ile çözülür. Bu test, tedaviden sonra yaşayabilen hücrelerin sayısının fotometrik olarak belirlenmesine yardımcı olmaktadır. Test daha önce Eyol (29-31) tarafından bildirilen protokolde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır.

Protokol:

- ❖ Laboratuvarımızda yapmış olduğumuz ön denemelerle 96-kuyucuklu plate'in herbir kuyucuğuna 4000 hücre gelecek şekilde hücre ekimi yapılmıştır. (Ön deneme için 96-kuyucuklu platin herbir kuyucuğuna sırasıyla 1000, 2000, 3000, 4000 ve 5000 hücre gelecek şekilde hücre ekimi yapılır ve 24, 48, 72 ve 96. saatlerde yaşam oranları kontrol edilerek, yapılacak hücre ekiminin sayısı ve MTT testinin kaç gün uygulanacağı belirlenir).
- ❖ 24 saat inkübasyondan (5% CO₂, 37°C) sonra belirlenen konsantrasyonlarda (1µM, 10 µM, 100 µM, 1000 µM) Asetazolamid ile tedavi edilmiştir.

- ❖ Tedaviden sonraki ilk 24 saatten sonra 1. 96 kuyucuklu plate için MTT testi uygulanmıştır. Bunun içinde 96 kuyucuklu plate herbir kuyucuğuna 10 µl steril MTT-çözeltilisi (5 mg/ml PBS'te hazırlanmış) eklenir ve sonrasında inkübatörde 3-4 saat bekletilir.
- ❖ İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki bütün içerik temizlenir ve boyanmış ve yapışık durumdaki hücreleri kaldırmak için herbir kuyucuğa 100 µl izopropanol eklenir. (0,04 N HCl ve 2 –İzopropanol ile hazırlanır)
- ❖ Kuyucuklardaki çözelti çekilip bırakılarak formazan kristallerinin çözünmesi sağlanır.
- ❖ Absorbanslar, mikroplate reader'da 570 nm 'de ölçülür.
- ❖ Tedaviden 48 saat ve 72 saat sonraki plateler içinde aynı işlemler kullanılmıştır. Aynı test 3 kez tekrarlanmıştır.
- ❖ Tedavi edilmeyen kuyucuklarda ki hücreler referans değer olarak (tedavi edilmeyen –Kontrol) belirlenmiştir.

3.8. Koloni Formasyon Testi

Bu testle de bir tek kanser hücresinin koloni oluşturma yeteneği ölçülebilir. Bu test Tekedereli'nin (33) bildirdiği protokolden bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır.

- ✓ 6 kuyucuklu platelerin her birine 2 ml içinde 500 hücre ekilir.
- ✓ 24 saat inkübe edildikten sonra belirlenen konsantrasyonlarda Asetazolamid tedavisi yapılır.
- ✓ Her 5 günde bir hücreler tedavi edilir. (Hücre hattına göre değişebilir.)
- ✓ Yaklaşık 2 hafta sonra hücreler PBS ile yıkanır ve Kristal viyole ile boyanır.
- ✓ 50 hücreden daha fazla hücreye sahip koloniler sayılarak değerlendirilir.

3.9. Wound Healing (Yara iyileşme) Testi

Hücre etkileşimi ve migrasyonunun belirlendiği bir testtir. Bu test daha önce Kaleağasıoğlu'nun (32) bildirdiği protokolda bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır.

- ✓ 24 kuyucuklu platalere hücre ekimi (1 ml içinde 60.000 hücre. Bu sayı hücreden hücreye değişiklik gösterebilir) yapılır.
- ✓ 24 saat inkübasyondan sonra, ya 200µl lik yada 10µl'lik pipet ucu ile kuyucuğun ortasından saat 12 yönünden başlayarak saat 6 yönüne düz bir çizgi çizilir.
- ✓ Sonrasında kuyucuklardaki vasat çekilir ve taze medyum ile birkaç kez yıkama yapılır.
- ✓ Belirlenen konsantrasyonlarda (1µM, 10 µM, 100 µM, 1000 µM) 0.5 ml Asetazolamid tedavisi eklenir.
- ✓ Tedaviden sonraki 0, 24, 48 ve 72. saatlerde fotoğrafları çekilerek değerlendirilir.

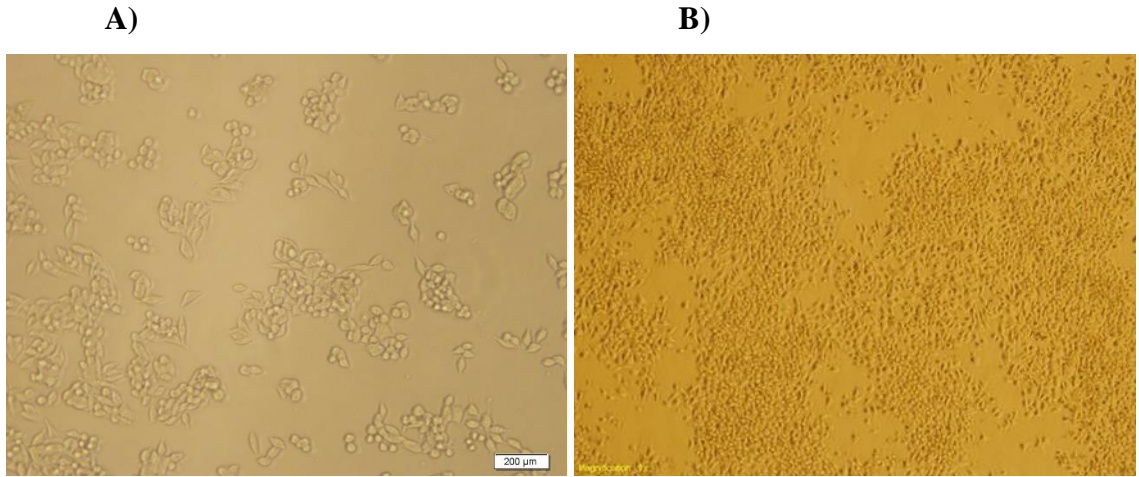
3.10. İstatistiksel Analiz

Araştırma verilerinin değerlendirilmesinde SPSS istatistik programı kullanıldı. Shapiro-Wilk normallik testi ile nicel değişkenlere ilişkin verilerin normal dağılım gösterdiği saptandı ($p>0.05$). Grupların karşılaştırılmasında, bağımsız gruplarda tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı ve IC_{50} hesaplanmasında ise doğrusal regresyon yöntemi kullanıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ($p<0.05$)

4. BULGULAR

4.1. SW620 ve LS174T Hücrelerinin Morfolojisi

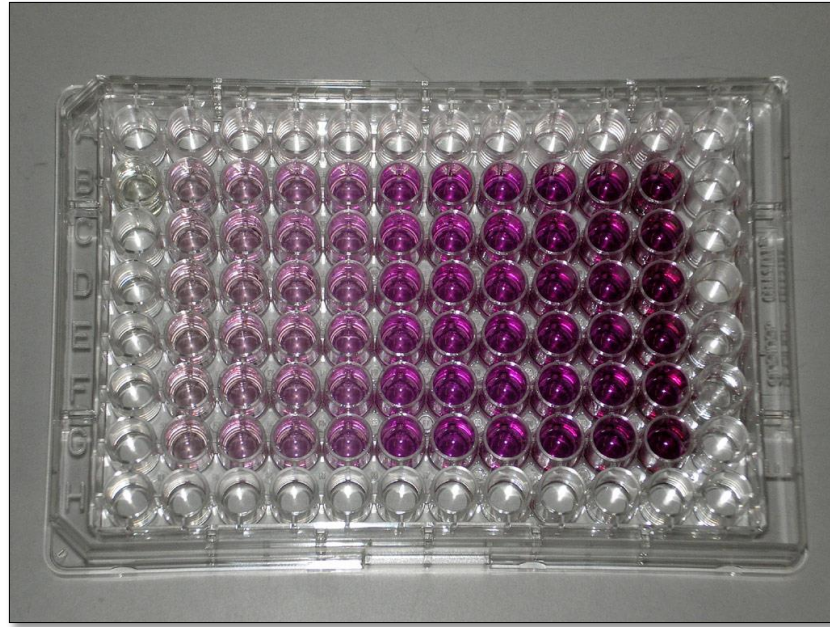
Her iki hücre hattında insan kolon kanser hücreleri olup, hücreler Alman Kanser Enstitüsü'nde (The German Cancer Research Center, Heidelberg, German) çalışan Dr. Berger tarafından bize hediye edilmiştir.



Şekil 4.1. A) SW620 Hücreleri B) LS174T Hücreleri

4.2. MTT Test Sonuçları

Her iki hücre hattı da çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan Asetazolamid ($1\mu\text{M}$ - $10\mu\text{M}$ - $100\mu\text{M}$ - $1000\mu\text{M}$) ile belirli sürelerde (24s-48s-72s) tedavi edilip, hücre proliferasyonu MTT assay ile test edilmiştir.



Şekil 4.2. MTT Test

4.2.1. SW620 Hücre Hattı İçin MTT Assay Sonuçları

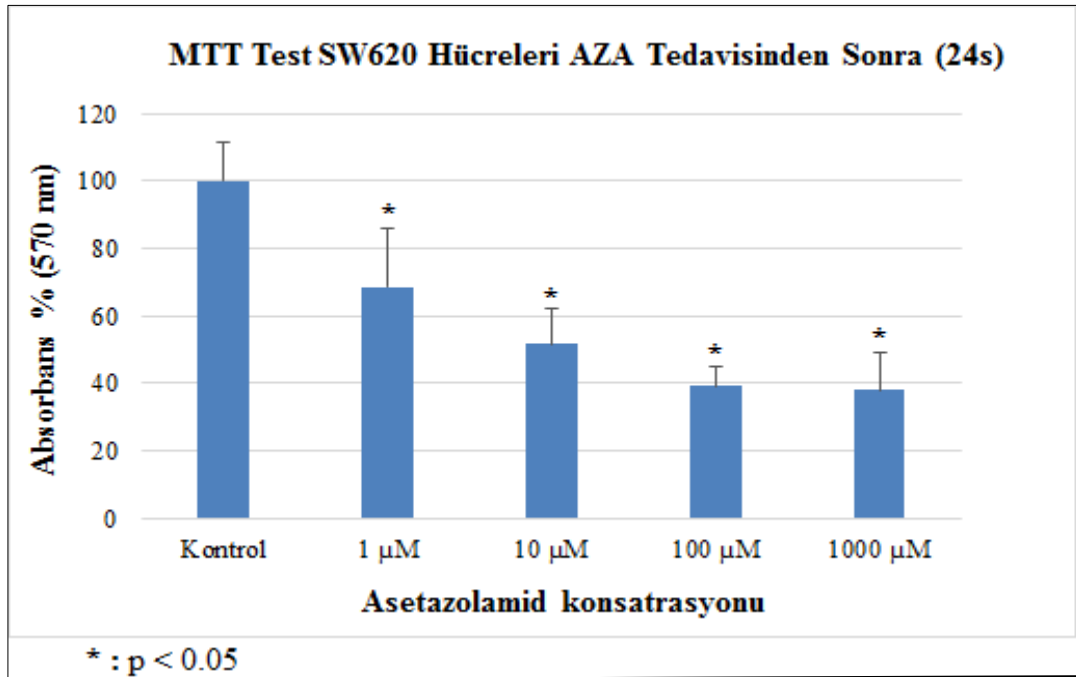
SW620 hücreleri Asetazolamid ile tedavi edilmiş ve 24, 48 ve 72 saat sonra elde edilen verilerin tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonucu tablo 4.1, 4.2 ve 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.1. SW620 Hücre Hattı 24 saat MTT Assay Sonuçları

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.475	4	.119	74.492	.000
Within Groups	.120	75	.002		
Total	.595	79			

Tanımlayıcı istatistikler

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	16	.33431	.039161	.009790	.31345	.35518	.265	.391
1 μ M	16	.22919	.058897	.014724	.19780	.26057	.149	.334
10 μ M	16	.17294	.034702	.008675	.15445	.19143	.130	.252
100 μ M	16	.13119	.019937	.004984	.12056	.14181	.095	.175
1000 μ M	16	.12688	.037015	.009254	.10715	.14660	.074	.190
Total	80	.19890	.086772	.009701	.17959	.21821	.074	.391



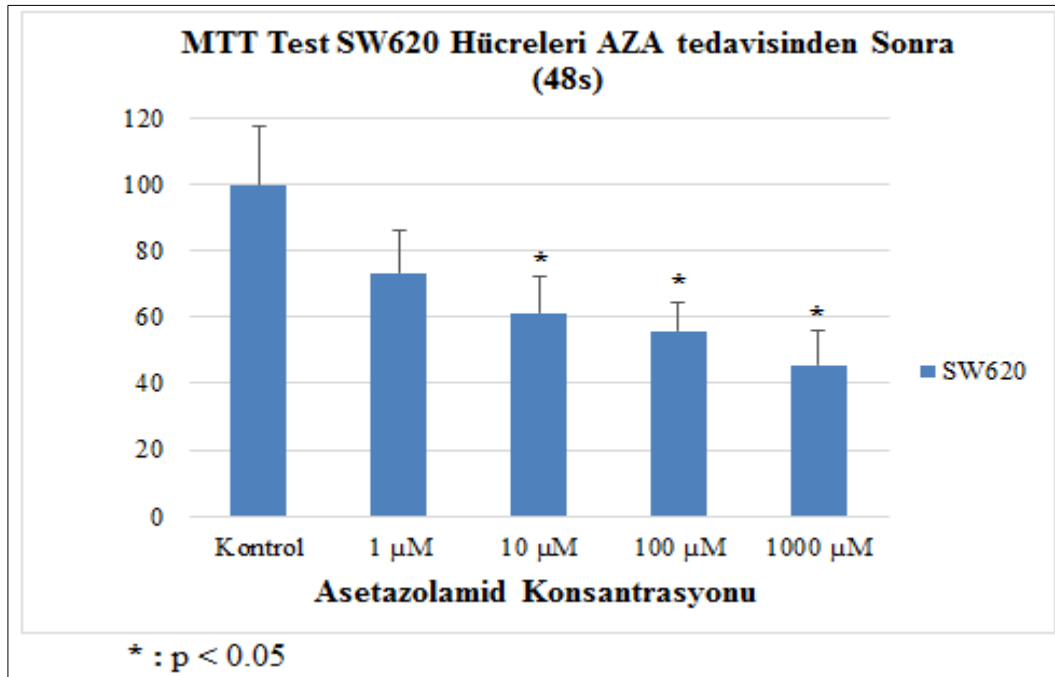
Şekil 4.3. SW620 Hücresi 24 saat AZA tedavisinden sonra

Tablo 4.2. SW620 Hücre Hattı 48 saat MTT Assay Sonuçları

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.410	4	.103	44.472	.000
Within Groups	.173	75	.002		
Total	.583	79			

Tanımlayıcı istatistikler

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	16	.38294	.067698	.016924	.34686	.41901	.293	.544
1 µM	16	.28044	.048720	.012180	.25448	.30640	.206	.346
10 µM	16	.23438	.043373	.010843	.21126	.25749	.166	.300
100 µM	16	.21356	.033825	.008456	.19554	.23159	.136	.270
1000 µM	16	.17431	.039386	.009847	.15332	.19530	.135	.271
Total	80	.25713	.085929	.009607	.23800	.27625	.135	.544



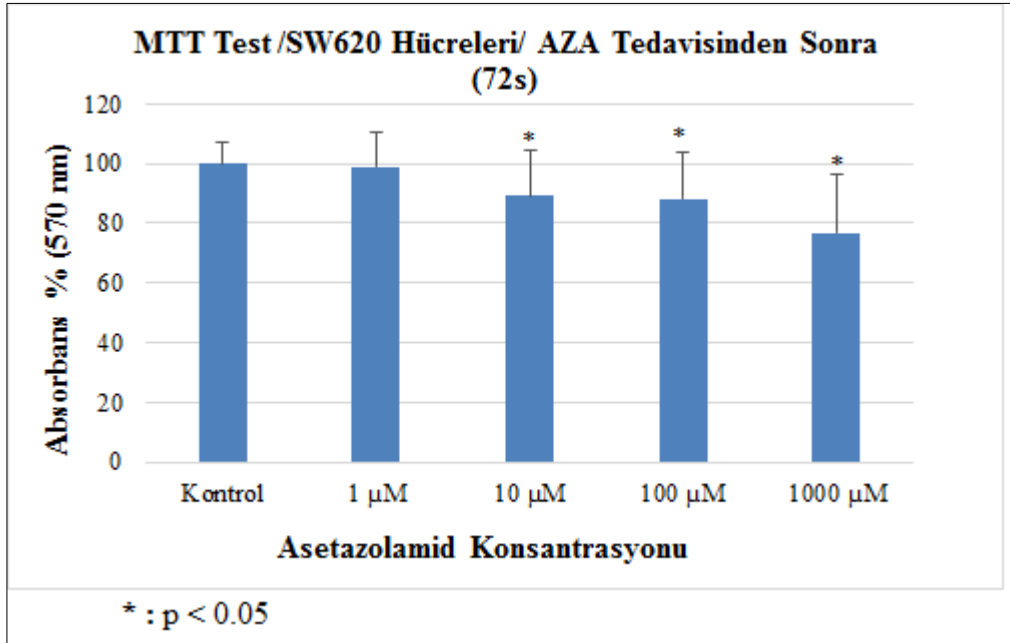
Şekil 4.4. SW620 Hücresi 48 saat AZA tedavisinden sonra

Tablo 4.3. SW620 Hücre Hattı 72 saat MTT Assay Sonuçları

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.141	4	.035	6.781	.000
Within Groups	.390	75	.005		
Total	.531	79			

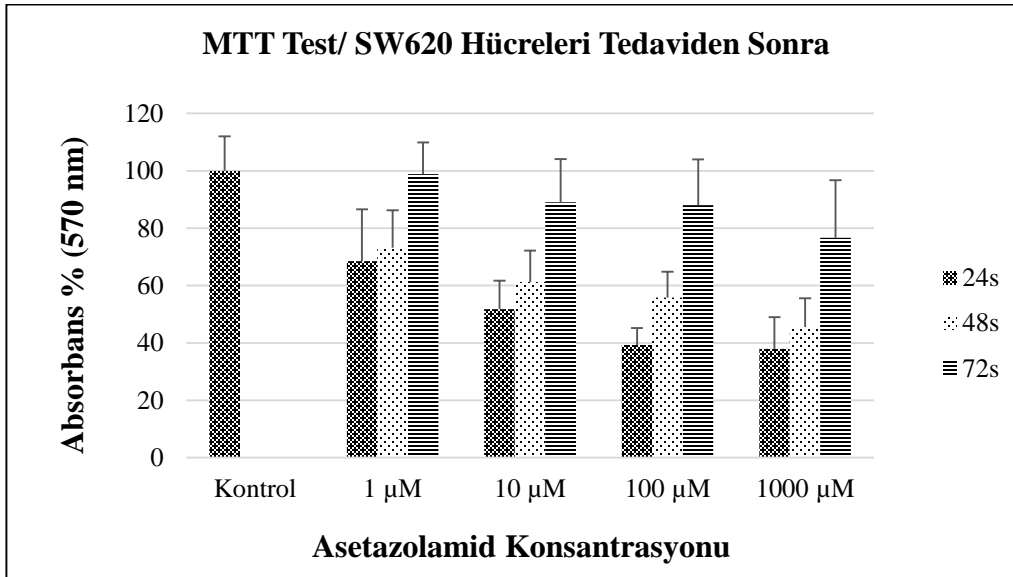
Tanımlayıcı İstatistikler

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	16	.49775	.036285	.009071	.47842	.51708	.448	.573
1 µM	16	.49213	.057186	.014297	.46165	.52260	.419	.623
10 µM	16	.44325	.075321	.018830	.40311	.48339	.311	.581
100 µM	16	.44213	.078748	.019687	.40016	.48409	.316	.580
1000 µM	16	.38175	.097590	.024397	.32975	.43375	.265	.615
Total	80	.45140	.081965	.009164	.43316	.46964	.265	.623

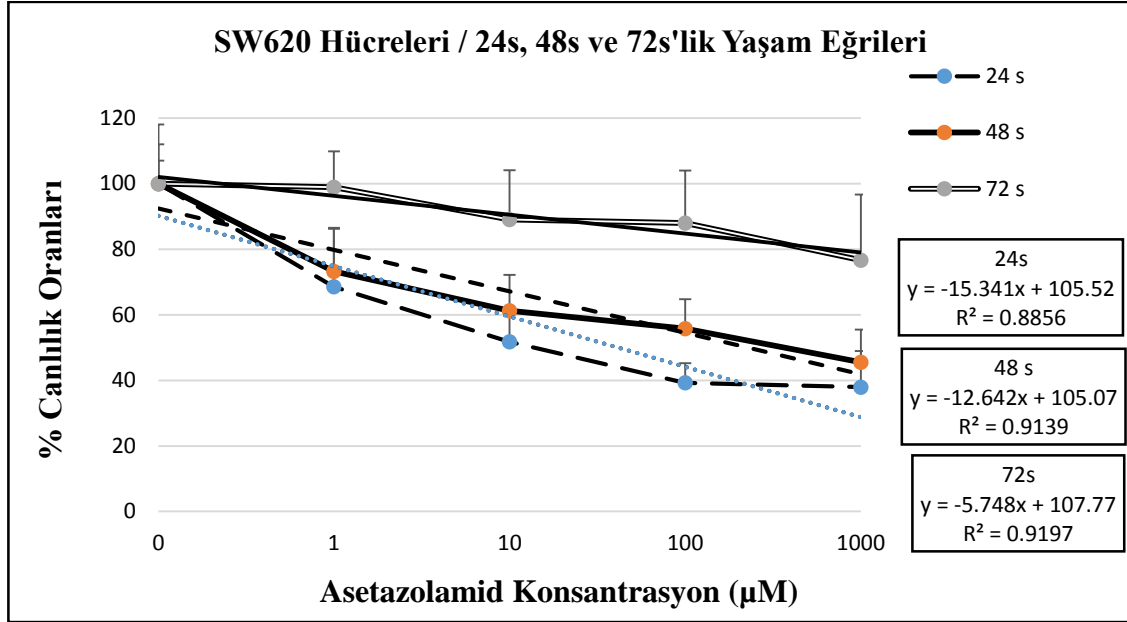


Şekil 4.5. SW620 Hücresi 72 saat AZA tedavisinden sonra

A)



B)



Şekil 4.6. A) 24s, 48s ve 72s'lik tedaviden sonra doza bağlı hücre proliferasyonu. B) 24s, 48s ve 72s'lik tedaviden sonra canlılık oranı. IC₅₀ değerleri doğrusal regresyon analizi ile 24s ve 48s'lik tedavi için sırasıyla 528 µM ve 795 µM olarak bulunmuştur.

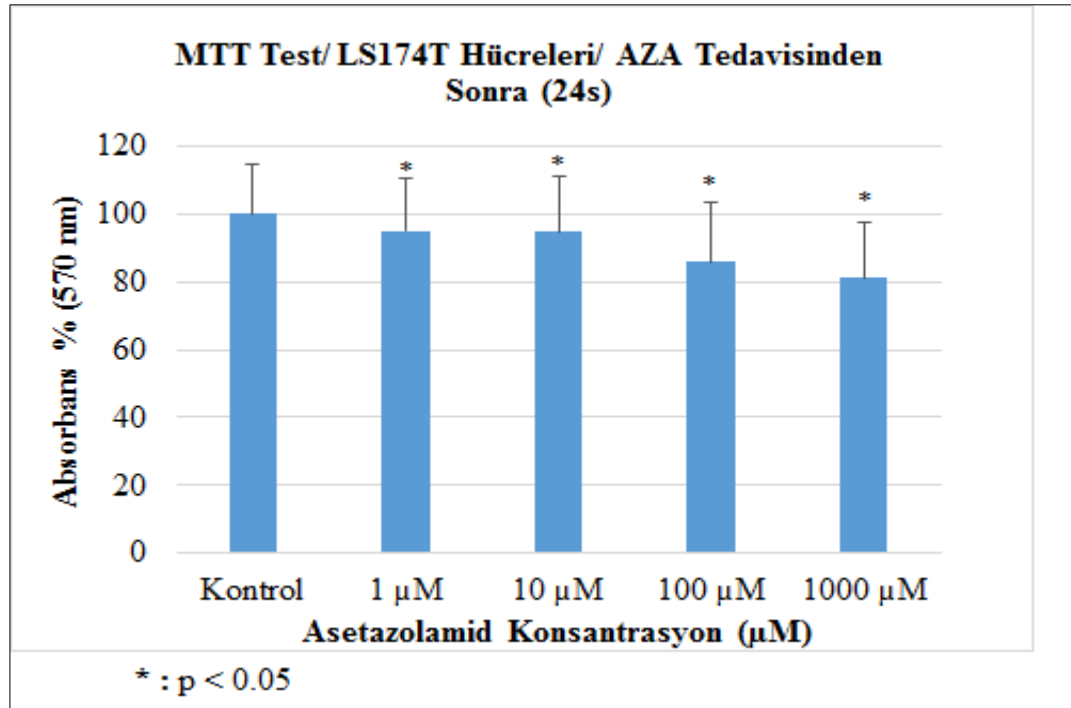
4.2.2. LS174T Hücre Hattı İçin MTT Assay Sonuçları

LS174T hücreleri farklı doz ve saatlerde asetazolamid ile tedavi edilmiş ve elde edilen verilerin ANOVA test sonuçları Tablo 4.4, 4.5 ve 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.4. LS174T Hücre Hattı 24 saat MTT Assay Sonuçları

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.067	4	.017	3.725	.008
Within Groups	.337	75	.004		
Total	.404	79			

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	16	.41938	.060142	.015035	.38733	.45142	.263	.523
1 μ M	16	.39869	.064746	.016187	.36419	.43319	.303	.533
10 μ M	16	.39750	.068037	.017009	.36125	.43375	.289	.547
100 μ M	16	.35944	.073427	.018357	.32031	.39856	.219	.460
1000 μ M	16	.34000	.068050	.017012	.30374	.37626	.191	.443
Total	80	.38300	.071498	.007994	.36709	.39891	.191	.547

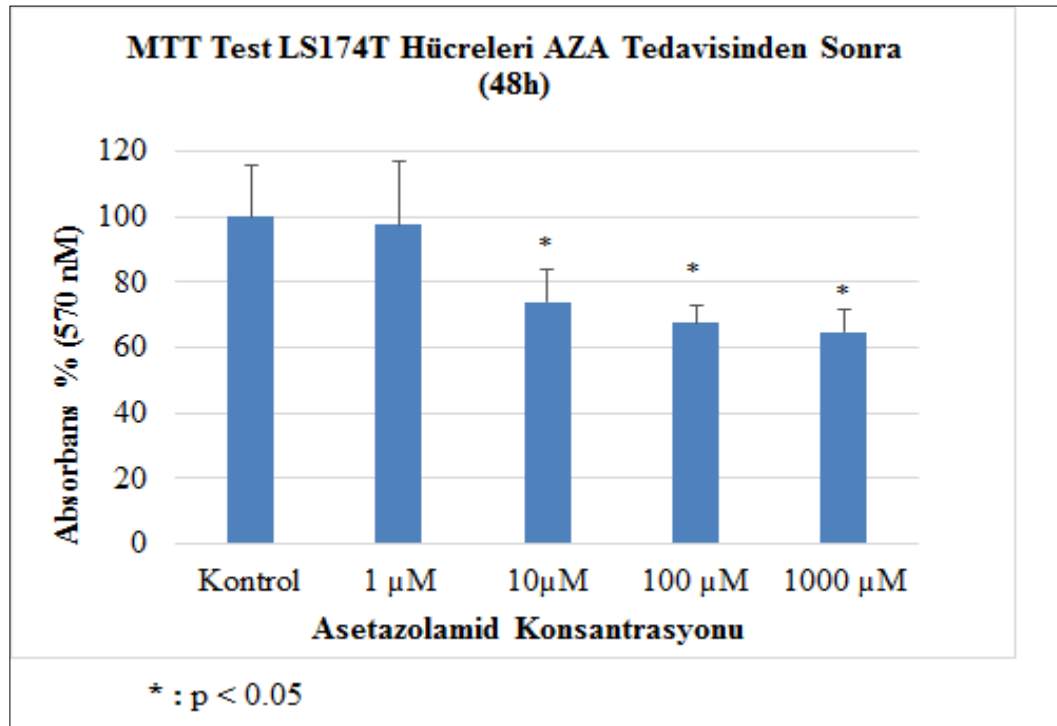


Şekil 4.7. LS174T Hücresi 24 saat AZA tedavisinden sonra

Tablo 4.5. LS174T Hücre Hattı 48 saat MTT Assay Sonuçları

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.174	4	.043	20.557	.000
Within Groups	.116	55	.002		
Total	.290	59			

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	12	.35908	.056531	.016319	.32317	.39500	.274	.427
1 μ M	12	.34983	.071380	.020606	.30448	.39519	.239	.454
10 μ M	12	.26517	.036915	.010656	.24171	.28862	.236	.342
100 μ M	12	.24233	.018622	.005376	.23050	.25417	.210	.282
1000 μ M	12	.23308	.023796	.006869	.21796	.24820	.202	.271
Total	60	.28990	.070109	.009051	.27179	.30801	.202	.454

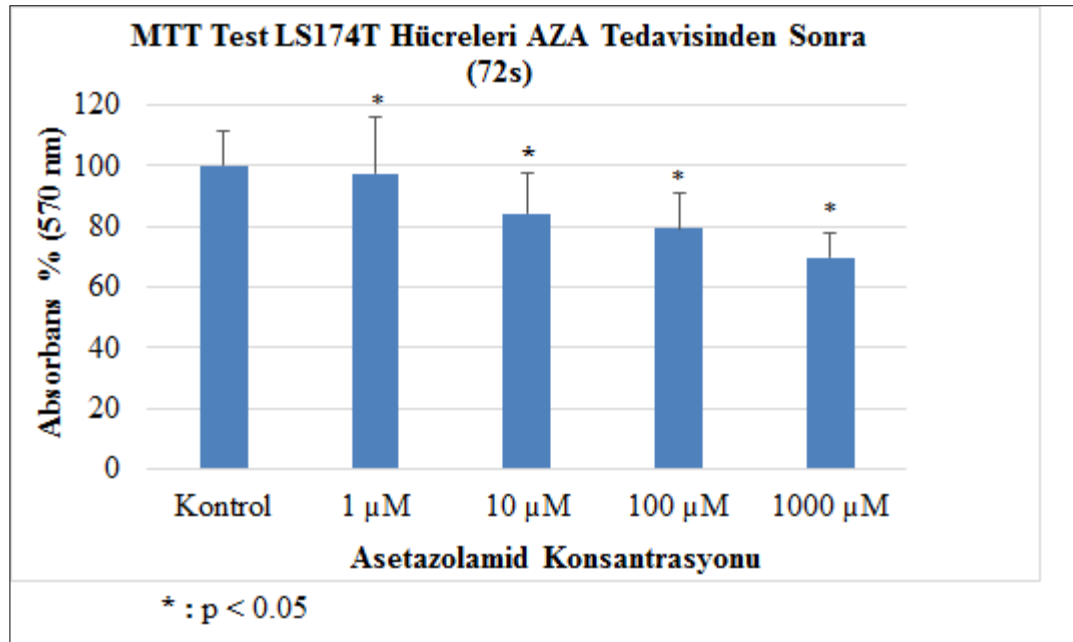


Şekil 4.8. LS174T Hücresi 48 saat AZA tedavisinden sonra

Tablo 4.6. LS174T Hücre Hattı 72 saat MTT Assay Sonuçları

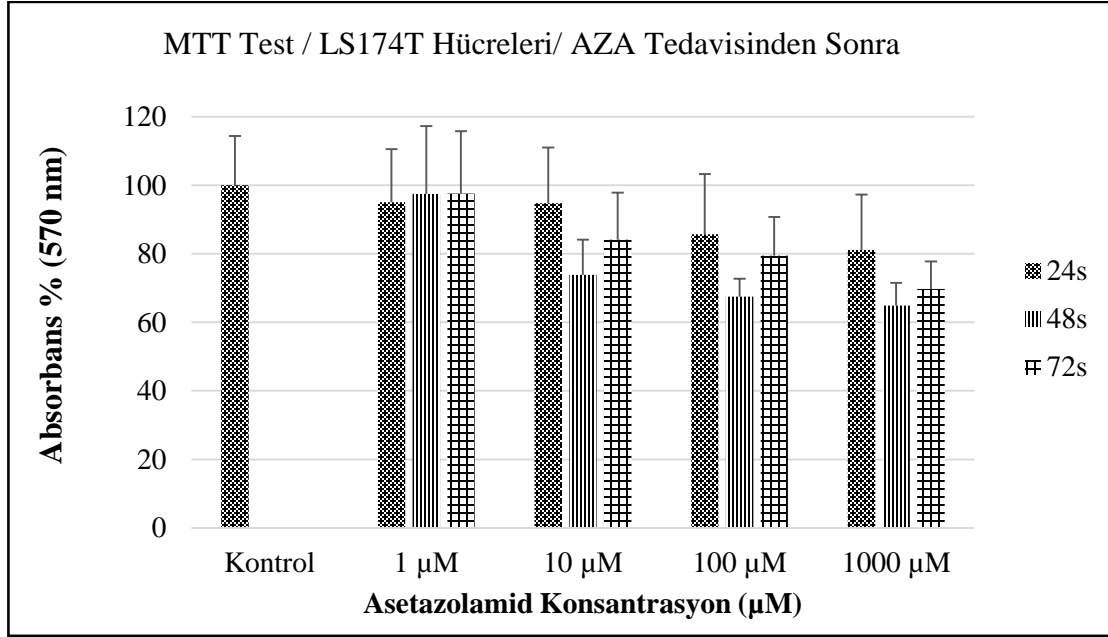
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.669	4	.167	15.119	.000
Within Groups	.829	75	.011		
Total	1.498	79			

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	16	.80863	.093583	.023396	.75876	.85849	.673	1.011
1 μ M	16	.78863	.147710	.036927	.70992	.86733	.566	1.103
10 μ M	16	.68019	.110561	.027640	.62127	.73910	.511	.986
100 μ M	16	.64213	.091380	.022845	.59343	.69082	.511	.837
1000 μ M	16	.56419	.064256	.016064	.52995	.59843	.484	.738
Total	80	.69675	.137693	.015395	.66611	.72739	.484	1.103

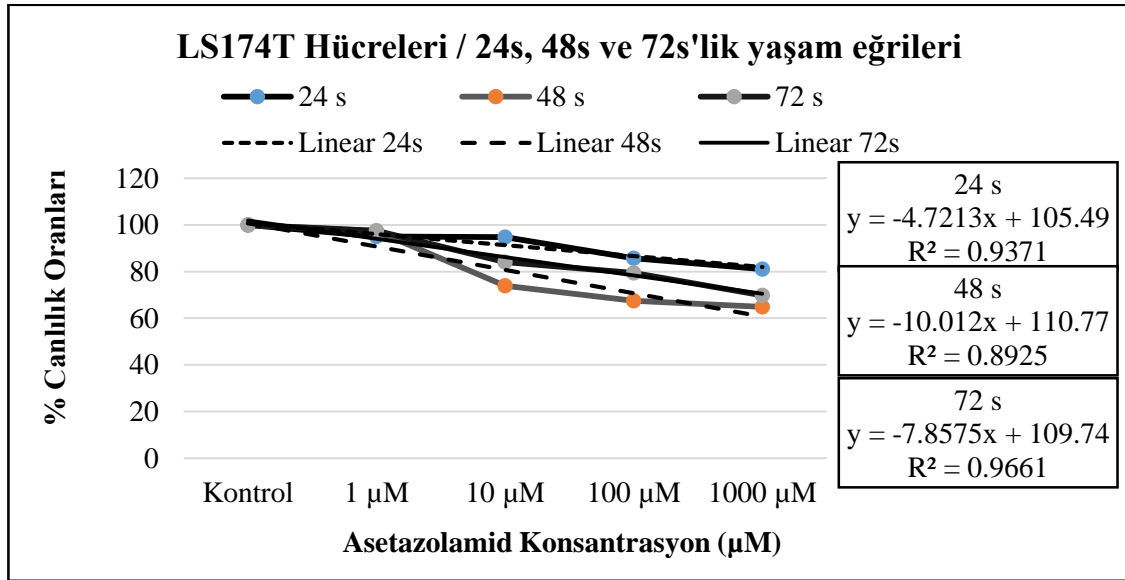


Şekil 4.9. LS174T Hücresi 72 saat AZA tedavisinden sonra

A)



B)

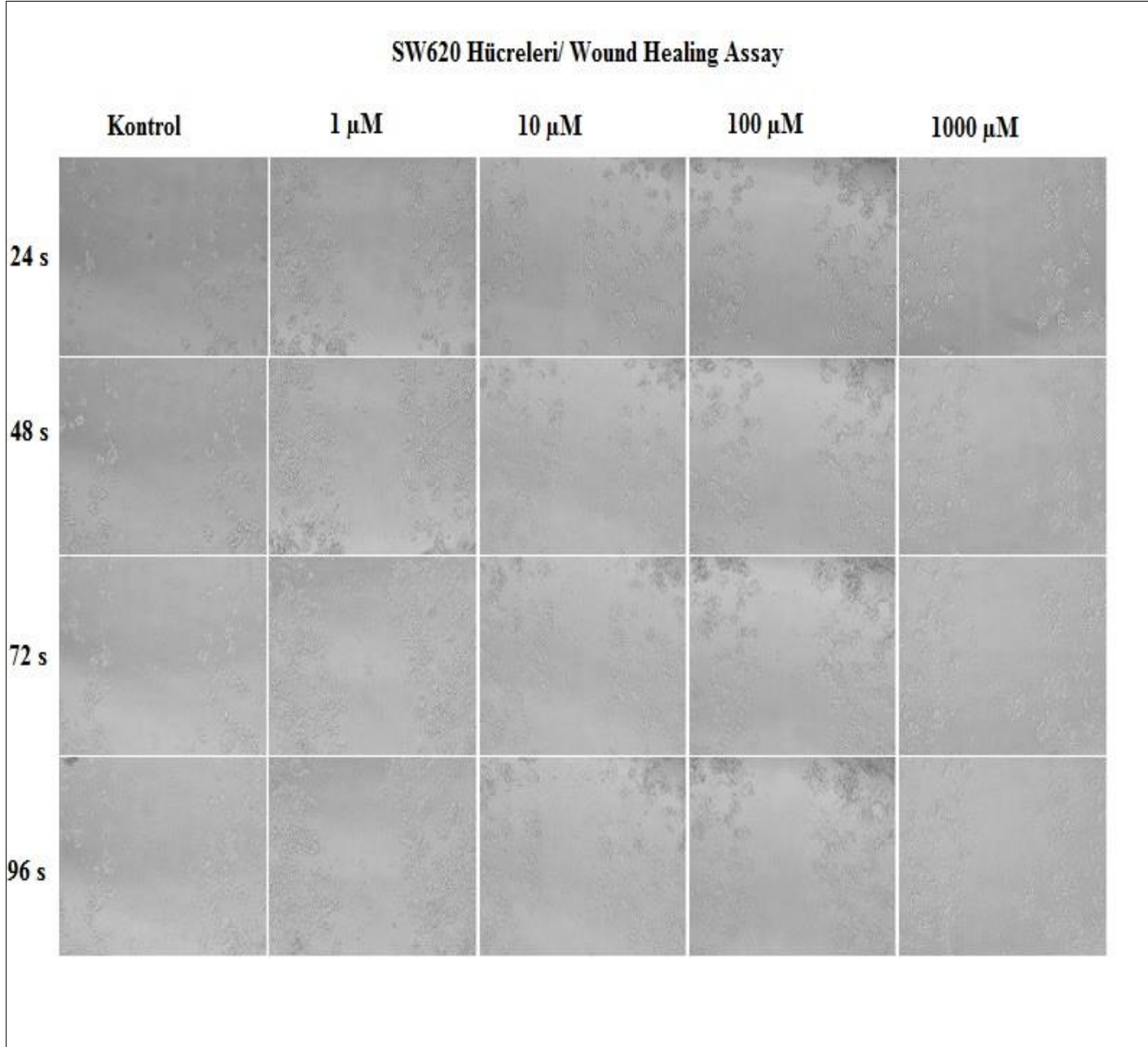


Şekil 4.10. A) 24s, 48s ve 72s'lik tedaviden sonra doza bağlı hücre proliferasyonu. B) 24s, 48s ve 72s'lik tedaviden sonra canlılık oranları.

4.3. Wound Healing Test Sonuçları

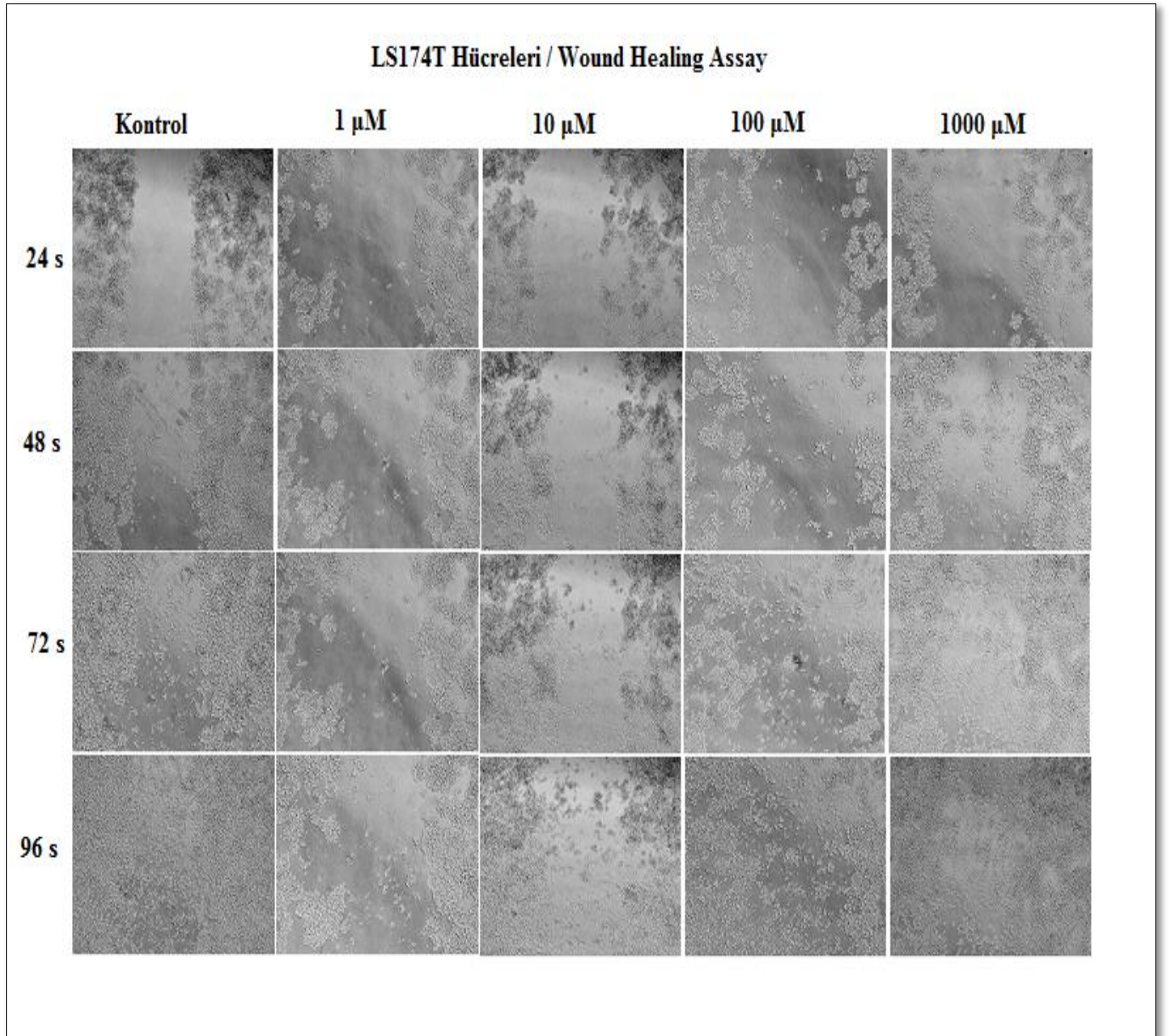
Hücreler ekildikten 24 saat sonra tek bir tabaka halinde 24 kuyucuklu plakanın yüzeyini kapladı ve hücre tabakası 10 µl veya 200 µl'lik pipet ucu ile saat 12 yönünden başlayarak saat 6 yönüne doğru düz bir çizgi ile yarık açıldı. Çizildikten sonra serum içermeyen medyumla yıkandı ve farklı konsantrasyonlardaki asetazolamid ile tedavi edildi. Devamında ise 24., 48., 72. ve 96. saatlerde fotoğraflanmıştır. Elde edilen fotoğraflar Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.'de verilmiştir.

4.3.1. SW620 Hücre Hattı İçin Wound Healing Assay Sonuçları



Şekil 4.11. SW620 Hücreleri. Wound healing assay sonuçları.

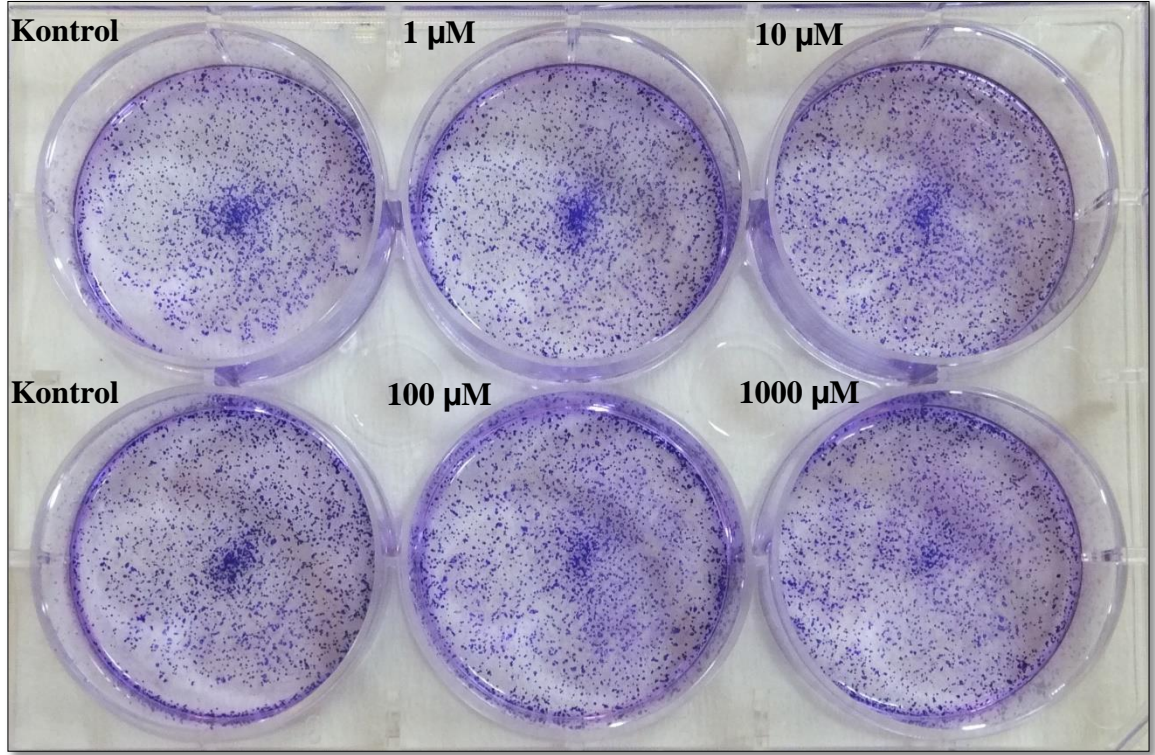
4.3.2. LS174T Hücre Hattı İçin Wound Healing Assay Sonuçları



Şekil 4.12. LS174T Hücreleri. Wound healing assay sonuçları.

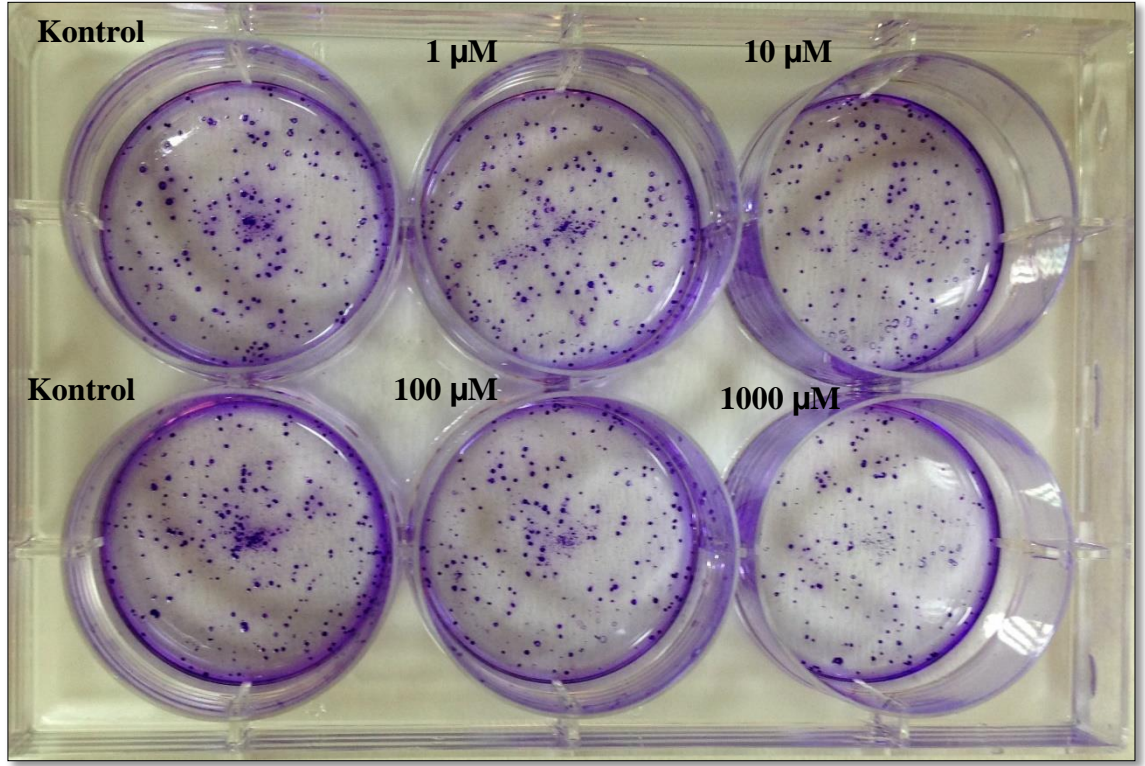
4.4. Klonogenik Assay Test Sonuçları

4.4.1. SW620 Hücre Hattı İçin Klonogenik Assay Sonuçları



Şekil 4.13. SW620 Hücreleri. Klonogenik assay sonuçları.

4.4.2. LS174T Hücre Hattı İçin Klonogenik Assay Sonuçları



Şekil 4.14. LS174T Hücreleri. Klonogenik assay sonuçları.

5. TARTIŞMA

Asetazolamid klinik olarak glokom tedavisinde, intraoküler basıncı düşürmek için kullanılan bir ilaçtır. Teicher ve arkadaşları (1993) asetazolamidin kanser kemoterapisinde yardımcı olarak kullanılmasının faydalı olacağını ileri sürmüşlerdir. Bu etkiyi, birçok kanserde fazla eksprese olan bazı karbonik anhidraz enzimleri (CAIX, CAXII) ve su kanalı protein olan bazı akuporinleri (AQP1 gibi) inhibe ederek gösterdiği rapor edilmiştir (23, 34).

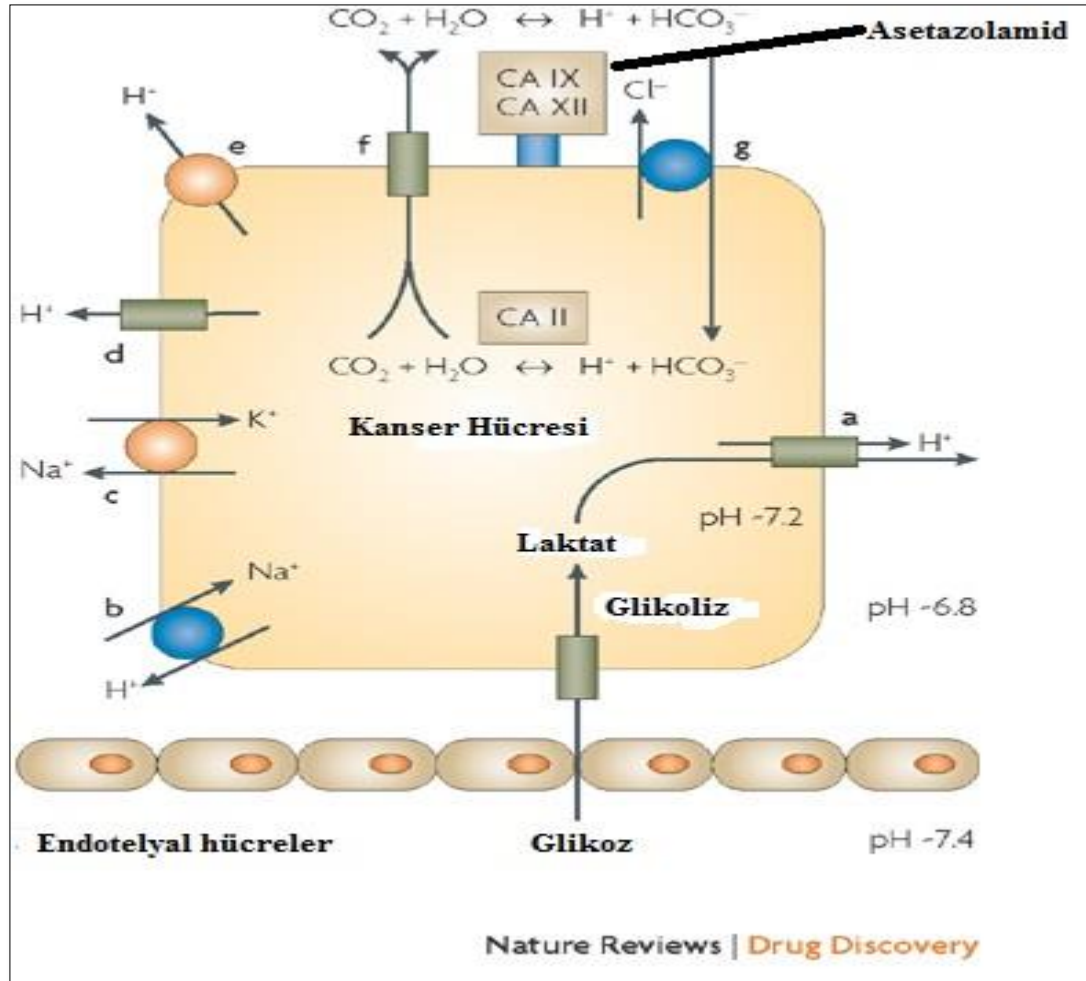
Karbonik anhidrazlar (CA) tüm organizmalarda bulunan metalloenzimlerdir ve birçok izoformu bulunur. Bunlar arasından CAIX ve CAXII'nin birçok tümörde fazla eksprese olduğu bildirilmiştir (19-21). CAIX ve CAXII membran bağımlı karbonik anhidrazlardır ve normal dokuda asit üretimini ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$) gerçekleştirirler. Bu şekilde hücrelerin ekstraselüler kısmının asidik olmasını sağlarlar. Ekstraselüler ortamın asidik olmasının, malignan tümörlerde hücrelerin invazifliğini arttırdığı bildirilmiştir (23).

Karbonik anhidraz-IX (CAIX)'un birçok malignan tümörde (akciğer, servikal karsinoma, özofagus, mesane, göğüs ve kolorektal kanser) aşırı eksprese olduğu, immünohistokimyasal olarak ve western blot çalışmalarıyla saptanmıştır. İlerlemiş tümörlerde CAIX'un ekspresyonu başlangıçtakine göre daha da yükselmiştir. Aynı zamanda CAIX'un tümör hücrelerinde ekstraselüler pH'ın daha asidik olmasına katkı sağladığından dolayı, kemoterapiye direnç geliştirdiği (artan ekstraselüler pH, kemoterapi ilaçlarının absorpsiyonunu azaltır) rapor edilmiştir (35). CAIX'un inhibe edilmesi anti-VEGF antikoru ile anti-anjiyogenik terapinin etkinliğini de arttırdığı düşünülmektedir (36).

Diğer tümör ilişkili karbonik anhidraz olan CAXII de sadece gastrik, kolorektal kanser ve meme kanserinde değil, ALL (Akut lenfoblastik lökemi) hastalarının T hücrelerinde de aşırı eksprese olmaktadır (37). Hsieh ve ark. (2010) meme kanseri hücresinde (MDA-MB-231) yapmış oldukları çalışmada, CAXII'yi eksprese eden geni baskıladıklarında, p38/MAPK yolağını engelleyerek migrasyonu ve invazyonu azalttığını bildirmişlerdir (38).

Suyun plazma membranı boyunca transportunu sağlayan, membranı transport proteinleri olan aquaporinler de tümör ile ilişkilidir. Aquaporinler arasından tümör ile ilişkili olarak öne çıkanlar ise AQP1, ve AQP5'tir. Yapılan in vitro bir çalışmada AQP1 aracılıklı plazma membranın su geçirgenliğinin kolon kanser hücreleri için önemli olduğu, tümör invazyon ve metastazı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca doku mikro-array analizi kolon kanserli hastalarda yapılan çalışmada, AQP1'in ileri düzey kolon kanseri için prognostik faktör olduğunu rapor etmişlerdir (39). Bir diğer su kanalı proteini olan AQP5'in kolon kanser hücresinde (HT-29 hücreleri) multidrag direncini düzenlediği bildirilmiştir (40). Yine birçok insan kanser hücre hattında AQP5'in aşırı ekspresyonu, bu hücrelerin proliferasyonunu, invazyonunu ve migrasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (41).

Bu çalışmada da kolorektal kanser ile ilişkili karbonik anhidrazların (CAIX ve CAXII) ve su kanalı proteinlerinin (AQP1 ve AQP5) inhibitörü olan asetazolamid kullanıldı. Bu proteinlerin ekspresyonunu baskılayarak tümör hücrelerinin mikroçevresi alkali hale getirilip, hücrelerin migrasyonu ve invazyonu baskılanmaya çalışıldı.



Şekil 5.1. CAIX ve CA XII'nin kanser hücresinde fonksiyonu (42).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

6.1. Asetazolamid'in SW620 ve LS174T Hücreleri Üzerine Antiproliferatif etkisi

Asetazolamid'in SW620 ve LS174T hücreleri üzerine antiproliferatif etkisini tespit etmek için, MTT testi uygulandı. MTT testi için herbir kuyucuğa ekilecek hücre sayısı, başlangıçta bu hücrelerin büyüme eğrisi yapılarak belirlendi. Bunun için her iki hücreden de herbir kuyucuğa 3000, 4000 ve 5000 hücre gelecek şekilde ayrı ayrı 96-well platelere hücre ekildi ve hücre proliferasyonu 72 saat takip edildi. Bu süre sonunda herbir kuyucuğa ekilecek hücre sayısı 4000 olarak belirlendi. Her iki hücre hattı, çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan Asetazolamid (1 μ M-10 μ M-100 μ M-1000 μ M) ile tedavi edildi ve 24. 48. ve 72. saatlerde MTT testi ile hücre proliferasyonu belirlendi. Elde edilen bulgular Şekil 4.3-Şekil 4.10.'da verilmiştir. MTT test sonuçları ANOVA testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi ve her iki hücre hattı içinde 24. 48. ve 72. saatlerde elde edilen sonuçlar anlamlı bulundu ($P<0.05$). Her iki hücre hattında da Asetazolamid'in inhibisyon etkisi ilk 48 saatte belirgin olarak tespit edilirken, 72. saatte inhibisyon azalmıştır. Bu durumun hücrelerin normal yaşamına devam etmesi için inkübatöre sağlanan % 5'lik CO₂ oranından dolayı olduğu düşünülmektedir. Çünkü her ne kadar Asetazolamid ile alkali ortam sağlansa da CO₂ bu durumu tersine tamponlamış olabilir. Bu durumun daha net olarak belirlenebilmesi için Asetazolamid'in in vivo olarak hayvan deneyleri yapılabilir.

6.2. SW620 ve LS174T Hücreleri için Wound Healing Assay Sonuçları

Her iki hücre hattı için 24 kuyucuklu platelere 0.5 ml içinde 40000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı ve 24 saat sonra belirtilen konsantrasyonlar ile tedavi edildi.

Sonrasında 24., 48., 72. ve 96. saatlerde hücrelerin fotoğrafı çekildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’ verilmiştir. Sonuçlar MTT test sonuçlarını desteklemektedir. Yani Wound healing assay sonuçlarında da ilk 24. ve 48. saatlerde açılan yarık en az seviyede kapanma göstermiştir ve hücrelerin göç yeteneği engellenmiştir.

6.3. SW620 ve LS174T Hücreleri için Klonogenik Assay Sonuçları

Her iki hücre hattı için de 6 kuyucuklu platelere 2 ml içinde 500 hücre ekilmiş ve 24 saat sonra belirtilen konsantrasyonlarda Asetazolamid ile tedavi edilmiştir. 5 gün sonra tedavi tekrarlanmış ve 10. günde test sonlandırılmıştır. Kristal viyole boyamasından sonra çekilen fotoğraflar Şekil 4.13 ve Şekil 4.14’de verilmiştir. Test sonucu LS174T hücre hattı için 50 hücreden fazla hücre sayısına sahip koloniler sayılmış ve bu sayılar Tablo 5.1. de verilmiştir. SW620 hücre hattı böyle bir sayıya uygun olmadığı için hücre yoğunluğu fotoğrafla ortaya konmuştur.

Tablo 5.1. LS174T Hücre Hattı Koloni Assay Sonuçları

Gruplar	Koloni Sayısı	Kontrole göre azalma (%)
Kontrol	130	0
1 μ M	100	%23.1
10 μ M	75	%42.8
100 μ M	59	%54.7
1000 μ M	38	%70.8

KAYNAKLAR

1. National Cancer Institute. Erişim: 21 Haziran 2014, <http://www.cancer.gov>.
2. Methods in Molecular Medicine™. (2004). *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. USA: Humana Press.
3. Kalın Bağırsak Kanseri. Erişim: 26 Haziran 2014, <http://kanser.gov.tr/>
4. Large Bowel Resection. Erişim: 26 Haziran 2014, www.nlm.nih.gov/medlineplus.
5. Colorectal Cancer. Erişim: 26 Haziran 2014, <http://www.roche.com>.
6. Topal, H. (2014). **Kolorektal Kanserli Hastalarda pre-miR-423 ve pre-miR-608 Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması**. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin.
7. Nielsen, DL., Palshof, JA., Larsen, FO., Jensen, BV. And Pfeiffer, P. (2014). A systematic review of salvage therapy to patients with metastatic colorectal cancer previously treated with fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan +/- targeted therapy. *Cancer Treatment Reviews*, 40(6):701-715.
8. Türk Halk Sağlığı Kurumu. **Kolorektal Kanser Taramaları**. Kanser Daire Başkanlığı.
9. Colorectal Cancer. Erişim: 03 Temmuz 2014, wikipedia.org/wiki/Colorectal_cancer
10. Adenomatous polyposis coli. Erişim: 06 Temmuz 2014, [wikipedia.org/Adenomatous polyposis coli](http://wikipedia.org/Adenomatous_polyposis_coli)
11. Park, BH. and Vogelstein, B. (2003). *The APC Gene*. Kufe, DW. Pollock, RE. Weichselbaum, RR. ve diğerleri (Ed.). *Holland-Frei Cancer Medicine 6th Edition*. Amerika : BC Decker.

12. Demirel, H.S. (2013). **Kolorektal Kanser Riski ile Hipoksiyle İndüklenen faktör-1Alfa (HIF-1 α) ve Von Hippel Lindau (VHL) gen polimorfizmleri arasındaki İlişki.** Doktora Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Konya.
13. DCC gene. Erişim: 07 Temmuz 2014, <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/DCC>
14. TP53 gene. Erişim: 07 Temmuz 2014, <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53>
15. Colorectal cancer and KRAS/BRAF. Erişim: 07 Temmuz 2014, <http://emedicine.medscape.com/article/1690010-overview>
16. Douillard, JY., Oliner, K.S., Siena S., ve diğerleri. (2013). Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 369: 1023-1034.
17. Song, CW., Griffin, R. and Park, HJ. (2006). Influence of Tumor pH on Therapeutic Response. B. Teicher (Ed.). *Cancer Drug Discovery and Development: Cancer Drug Resistance*. USA: Humana Press Inc.
18. Acetazolamide. Erişim: 14 Temmuz 2014, en.wikipedia.org/wiki/Acetazolamide
19. Yıldırım, H. (2009). **Karbonik Anhidraz 9 Geninin Transkripsiyonel Kontrolünün Moleküler Analizi**, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir.
20. Potter, CPS. and Harris, AL. (2003). Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer. *Br J Cancer*, 89(1): 2–7.
21. Özensoy, Ö. (2006). Kanser İlişkili Karbonik Anhidraz IX ve XII İzoenzimlerinin (CA-IX, CA-XII) Ekspresyonu, Saflaştırılması ve Bazı Bileşiklere Karşı İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir.
22. Nico, B. and Ribatti, D. Aquaporins in tumor growth and angiogenesis. (2010). *Cancer Letters*, 294 (2): 135–138.
23. Parkkila, S. ve arkadaşları (2000). Carbonic Anhydrase inhibitor suppresses invasion of renal cancer cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(5): 2220–2224.
24. Aquaporin 1. Erişim: 04 Ağustos 2014, http://en.wikipedia.org/wiki/Aquaporin_1
25. Ribatti, D., Ranieri, G., Annese, T. and Nico, B. Aquaporins in cancer. (2014). *Biochim Biophys Acta*, 1840 (5):1550-1553.

26. Kang, SK., Chae YK., Woo, J., Kim, MS., Park, JC., Lee, J., Soria, JC., Jang, SJ., Sidransky, D. and Moon C. (2008) Role of Human Aquaporin 5 in Colorectal Carcinogenesis. *Am J Pathol* 173(2):518-525.
27. AQP8 Protein (Aquaporin 8). Erişim: 12 Ağustos 2014. <http://www.rprotein.com/protein/AQP8>
28. Fischer, H., Stenling, R., Rubio, C. and Lindblom, A. (2001) Differential expression of Aquaporin 8 in human colonic epithelial cells and colorectal tumors. *BMC Physiology* 1:1.
29. Uhlman, ME., Georges, RB., Boleij, A., Eyol, E., Kubarenko, A., Adwan, H. and Berger, MR. (2011). Influence of osteopontin expression on the metastatic growth of CC531 rat colorectal carcinoma cells in rat liver. *Cancer Gene Ther*, 18(11):795-805.
30. Eyol E. (2014). **Kukurbitasin I'nin Anti Kanserojen Etkisinin Karaciğere Metastaz Yapmış CC531 Rat Modelinde Araştırılması** (Rapor No: Tübitak:). Ankara: Tübitak.
31. Eyol, E., Murtaga, A., Zhivkova-Galunska, M., Georges, R., Zepp, M., Djandji, D., Kleeff, J., Berger, MR. and Adwan, H. (2012). Few genes are associated with the capability of pancreatic ductal adenocarcinoma cells to grow in the liver of nude rats. *Oncol Rep*, 28(6):2177-87.
32. Kaleağasioğlu, F. and Berger, MR. (2014). Differential effects of erufosine on proliferation, wound healing and apoptosis in colorectal cancer cell lines. *Oncol Rep*, 31(3):1407-1416.
33. Tekedereli, I., Alpay, SN., Akar, U., Yuca, E., Ayugo-Rodriguez, C., Han, HD., Sood, AK., Lopez-Berestein, G., Ozpolat, B. (2013). Therapeutic Silencing of Bcl-2 by Systemically Administered siRNA Nanotherapeutics Inhibits Tumor Growth by Autophagy and Apoptosis and Enhances the Efficacy of Chemotherapy in Orthotopic Xenograft Models of ER (-) and ER (+) Breast Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*, doi: 10.1038/mtna.2013.45.
34. Xiang, Y., Ma, B., Li, T., Gao, J., Yu, H., Li, XJ. (2004). Acetazolamide inhibits aquaporin-1protein expression and angiogenesis. *Acta Pharmacol Sin*, 25(6):812-816

35. Spugnini, E.P, Sonveaux, P., Stock, C., Sayans, M.P., Milito, A.D., Avnet, S. ve diğerleri. (2014). Proton channels and exchangers in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) –Biomembranes*, DOI:10.1016/j.bbamem.2014.10.015 Erişim: 17 Kasım 2014, ScienceDirect.
36. Pastorek, J., and Pastorekova, S. (2014). Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: From biology to clinical use *Seminars in Cancer Biology*, doi: 10.1016/j.semcancer.2014.08.002. Erişim: 17 Kasım 2014, ScienceDirect.
37. Monte, C.D., Carradori, S., Secci, D., D'Ascenzio, M., ve diğerleri. (2014). Cyclic tertiary sulfamates: Selective inhibition of the tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII by N- and O-substituted acesulfame derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84, 240-246. Erişim: 17 Kasım 2014, ScienceDirect.
38. Hsieh, MJ., Chen, KS., Chiou HL. And Hsieh, YS. (2010). Carbonic anhydrase XII promotes invasion and migration ability of MDA-MB-231 breast cancer cells through the p38 MAPK signaling pathway. *European Journal of Cell Biology*, 89(8):598-606. Erişim: 24 Kasım 2014, Pubmed.
39. Yoshida, T., Hojo, S., Sekine, S., Sawada, S., ve diğerleri. (2013) Expression of aquaporin-1 is a poor prognostic factor for stage II and III colon cancer. *Molecular Clinical Oncology*, 1(6): 953-958. Erişim: 24 Kasım 2014, Pubmed.
40. Shi, X., Wu, S., Yang, Y., ve diğerleri. (2014). AQP5 silencing suppresses p38 MAPK signaling and improves drug resistance in colon cancer cells. *Tumour Biology*, 35(7):7035-45. Erişim: 24 Kasım 2014, Pubmed.
41. Yan, C., Zu, Y., Zhang, X., Chen, X., Zheng, W. and Yang, J. (2014). Down-regulated aquaporin 5 inhibits proliferation and migration of human epithelial ovarian cancer 3AO cells *Journal of Ovarian Research*. 7(1):78. Erişim: 24 Kasım 2014, Pubmed.
42. Supuran, C.T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 168-181. Erişim: 24 Kasım 2014, Nature.

EK: Etik Kurul Onayına Gerek Olmadığına Dair Belge

13 Nisan 2013 tarih ve 28617 sayı ile T.C. Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik'in Birinci Bölümünün 2. Maddesinin 1. Fıkrası (Bu Yönetmelik biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlilik çalışmaları dahil, ruhsat veya izin alınmış olsa dahi insanlar üzerinde yapılacak olan ilaç, tıbbi ve biyolojik ürünler ile bitkisel ürünlerin klinik araştırmaları, klinik araştırma yerlerini ve bu araştırmaları gerçekleştirecek gerçek veya tüzel kişileri kapsar) gereğince tezimin bir klinik araştırma değil sadece laboratuvar çalışması olması sebebiyle Etik kurul kararına gerek bulunmamaktadır.

ÖZGEÇMİŞ

Lisans	Harran Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2004-2008)
Yüksek Lisans	Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilimdalı (2008-2010)
Yüksek Lisans	İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Anabilimdalı (2013-2015)