

T C
OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

ANTIESTROJENİK İLAÇLARIN
GLİOMA HÜCRE DİZİSİ ÜZERİNE ETKİLERİ

91639

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TC YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Gökçen YAZ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ruhi UYAR

ESKİŞEHİR - 2000

KABUL VE ONAY SAYFASI

Gökçen Yaz'ın YÜKSEKLİSANS TEZİ olarak hazırladığı

“ANTIESTROJENİK İLAÇLARIN GLİOMA HÜCRE DİZİSİ ÜZERİNE

ETKİLERİ” başlıklı çalışma,jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin ilgili

maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

23 /08 / 2000

Prof. Dr. Ergin AÇIKALIN

JÜRİ BAŞKANI

Prof. Dr. Ziya KAYGISIZ

ÜYE

Prof. Dr. Ruhi UYAR

ÜYE

Doç. Dr. Kubilay UZUNER

ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Muhsin ÖZDEMİR

ÜYE

Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 05/10/2000.

tarih ve 491 / 1277 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Yusuf ÖZYÜREK
Enstitü Müdürü

ÖZET

Çalışmamızda ‘antikanserojenik ilaçlardan olan klomifen, nafoxidin, tamoxifen ve 4-hidroksi tamoxifenin insan beyin tümörlerinden glioblastoma multiforme canlı hücre sayısı üzerine olan etkileri’ araştırılmıştır. İlaçlardan klomifen ve nafoxidin 0.1, 1, 10, 15, 25 ve 50 μ M, tamoxifen ve 4-hidroksi tamoxifen 0.1, 1, 10 ve 100 μ M dozlarda uygulandı. Kontrol gruplarına sadece besi yeri, alkol gruplarına da ilaçları çözmede kullanılan alkol ile besi ortamı eklendi. Hücreler 37 ° C, %95 nem, %5 karbondioksit bulunan ortamda çoğaltıldı ve 24 saat sonunda MTT yöntemi uygulandı. Sonuçlar tek yönlü varyans analizi, HSD testine göre değerlendirildi. Buna göre kontrol grupları ile alkol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,01$). Kullandığımız bütün tamoxifen ve 4-OH tamoxifen dozları ile kontrol, nafoxidin ve klomifenin 0.1, 1, 10 μ M dozları ile kontrol grupları arasında istatistiksel bir fark yoktur ($p > 0,01$). Nafoxidin ve klomifenin 15, 25 ve 50 μ M dozlarıyla kontrol grupları arasında %90’a varan anlamlı farklar saptandı ($p < 0,01$). Kullandığımız glioblastoma hücreleri üzerine tamoxifen ve 4-OH tamoxifenin büyümeyi baskılayıcı etkileri gözlenmemiştir. Nafoxidin ve klomifenin ise 15, 25, 50 μ M dozlarında doza bağlı olarak artan oranlarda büyümeyi baskılayıcı etkileri gözlenmiştir. Bu sonuçlar daha önce tamoxifen ve 4-OH tamoxifenin in vivo gliomada elde edilen sonuçlar ile, nafoxidin ve klomifene ait farklı tümör çeşitlerinden elde edilen sonuçları destekler yöndedir. Nafoxidin ile klomifenin glioma hücrelerinde ilk kez denenmiş olması ve bulunan sonucun büyümeyi baskılayıcı yönde olması klinik çalışmalar için umut verici olabilir.

Anahtar kelimeler: Glioblastoma multiforme, antiestrogenik ilaçlar, hücre kültürü, MTT yöntemi.

SUMMARY

The effect of anticancerogenic drugs clomiphene, nafoxidine, tamoxifen and 4-OH tamoxifen were investigated on human glioblastoma multiforme cells in vitro. 0.1, 1, 10, 15, 25 and 50 μ M of clomiphene and nafoxidine, and 0.1, 1, 10 and 100 μ M of tamoxifen and 4-OH tamoxifen were applied to cells. Since the drugs were dissolved in alcohol, the effect of alcohol was also tested, and no difference was found between the control and alcohol groups. The cells were incubated in an atmosphere of 95% humidity in air and 5% carbondioxide with 37 °C for 24 hours and then MTT assay was applied. For the statistical analysis one-way anova test was used. When all tamoxifen and 4-OH tamoxifen doses were compared to the control, there was not any statistical difference ($p>0.01$). There was not any significant difference when 0.1, 1 and 10 μ M nafoxidine and clomiphene doses compared to the control ($p>0.01$). When the doses of clomiphene and nafoxidine were increased to 15, 25 and 50 μ M, there was a dose dependent decrease in cell number up to 90% over the control group ($p<0.01$). Tamoxifen and 4-OH tamoxifen did not change the growth of human glioblastoma multiforme cells. The results obtained with tamoxifen and 4-OH tamoxifen are similar to other studies. Contrary to tamoxifen and 4-OH tamoxifen, nafoxidine and clomiphene showed a dose dependent growth inhibition effect. Since nafoxidine and clomiphene were applied to glioma cells for the first time, we believe that these results will encourage the use of these drugs in clinical applications.

Key words: Glioblastoma multiforme, antiestrogenic drugs, celll culture, MTT assay.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
ÖZET.....	i
SUMMARY.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGE VE KISALTMALAR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGE DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kanser.....	2
2.1.1. Glioblastoma multiforme.....	4
2.2. Estrojenler ve antiestrogenler.....	5
2.2.1. Klomifen.....	17
2.2.2. Nafoxidin	18
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	21
3.1. Hücre ekimi için hazırlıklar ve hücre ekimi.....	21
3.2. Hücrelerin çoğaltılması – Pasajlama – Stoklanması .	22
3.3. Hücrelerin deneye alınması ve ilaç uygulanması.....	22
3.4. MTT yöntemi.....	23
4. BULGULAR.....	24
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	29
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	32
ÖZGEÇMİŞ.....	40

SİMGE VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

GFA

Mer-25

AEBS

PKC

DPPE

4-OH tamoxifen

PI

DAG

EGF

TGF α

TGF β

IGF- I

IGF- II

FGF

PDGF

E

ER

ERE

EGFR

FSH

LH

GnRH

DMEM

F-12

DMSO

PBS

Trypsin-EDTA

MTT

Açıklamalar

Glial fibrilatik asit

Etometoksitritifetalin

Antiestrojen bağlanma bölgeleri

Protein kinaz C

Difenilmetan

4-hidroksi tamoxifen

Fosfotidil inositol

Diaçil gliserol

Epidermal büyüme faktörü

Transforme eden büyüme faktörü α

Transforme eden büyüme faktörü β

İnsüline benzer büyüme faktörü I

İnsüline benzer büyüme faktörü II

Fibroblast büyüme faktörü

Trombositten türeyen büyüme faktörü

Estrojen

Estrojen reseptörü

Estrojenden sorumlu eleman

Epidermal büyüme faktörü reseptörleri

Folikül stimulan hormon

Lüteinizan hormonu

Gonadotropin salgılatıcı hormon

Dulbecco's modified eagle's medium

Nutrient mixture

Dimetil sülfoksit

Fosfat buffered saline

Trypsin-etilendiamintetra asetik asit

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-

difeniltetrazzolum bromid

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa no</u>
2. 2. 1. Steroid hormonların işlevi.....	6
2. 2. 2. Dietilstilbestrol ve etometoksitri fetalın (MER-25) açık formülleri.....	8
2. 2. 3. Trifeniletilen ve pirolidin grubu antiestrogenlerin çeşitli reseptör ve enzim sistemleriyle olan ilişkileri.....	10
2. 2. 4. Tamoxifen ve DPPE' nin açık formülleri.....	11
2. 2. 5. Meme kanseri hücreesindeki çoğalmaya neden olan estrogen hareketi.....	15
2. 2. 6. Klomifenin açık kimyasal formülü.....	17
2. 2. 7. Nafoxidinin açık kimyasal formülü.....	19
4. 1. a) Glioblastoma multiforme hücreleri, b) GFA boyanmış hücreler, c) MTT uygulanmış hücreler.....	24
4. 2. Kontrol grubu ile alkol grubunun karşılaştırılması.....	26
4. 3. Farklı dozlardaki tamoxifen ile kontrol grubunun karşılaştırılması.....	26
4. 4. Uygulanan 4-OH tamoxifen dozları ile kontrol grubunun karşılaştırılması.....	27
4. 5. Kullanılan klomifen dozları ile kontrol grubunun karşılaştırılması.....	27
4. 6. Uygulanan nafoxidin dozları ile kontrol grubunun karşılaştırılması.....	28

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa no

Çizelge 4.1. Kontrol, alkol ve ilaç uygulanan grupların
renk yoğunluklarının rakamsal değerlerinin toplu
gösterimi.....

25



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, günümüzde üzerinde yoğun araştırmaların yapıldığı ve etkileri konusunda çok çeşitli mekanizmalar ileri sürülen bir sorundur. Başlangıçta üzerinde yoğun olarak çalışılan meme kanserinde steroid hormonların büyümeyi stimüle edebileceği düşünülmüş, estrogenle yapılan araştırmalarda estrogenin tümör gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Sonrasında sentetik antiestrogen ilaç grupları geliştirilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız tamoxifen, 4-OH tamoxifen, klomifen ve nafoxidin bu gruba giren ilaçlardandır. Bu ilaçlardan tamoxifen klinikte meme kanseri tedavisinde, klomifen ise antifertilite ajanı olarak kullanılmaktadır. Nafoxidin ile 4-OH tamoxifenin tümör baskılayıcı etkileri laboratuvar çalışmalarıyla gösterilmiş olmasına rağmen klinik kullanımları yoktur. Meme kanseri üzerindeki antiestrogenlerin bu etkilerinin diğer tümörlerde de olup olmayacağı merak edilmiştir. Tamoxifen ile glioblastoma multiforme hücreleri üzerine yapılan az sayıdaki çalışmalarda; kullanılan hücrelerin bazıları üzerinde büyümeyi baskılayıcı etki görülürken, bazılarında görülmemiştir. Bu hücrelerde yapılan antiestrogen ilaçlarla ilgili çalışma tamoxifen ile sınırlı kalmıştır. Çalışmamızda bu ilaçların insan kaynaklı glioblastoma multiforme üzerine nasıl etki göstereceklerini tespit etmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser gelişmesi karmaşık ve çok aşamalı bir süreçtir. Birbirini izleyen aşamalar sonucunda somatik hücrelerin çoğalmasını düzenleyen mekanizmalar bozulur. Hücrede malign fenotipe yol açan genetik bozukluklar, kalıtsal yatkınlık, hücre döngüsü sırasında oluşan DNA değişiklikleri, viral enfeksiyonlar veya iyonizasyon-radyasyon gibi mutajen etkilerle karşılaşma sonucunda ortaya çıkar. Denetimsiz olarak çoğalan, çevresindeki normal dokuları istila eden ve uzak organlara sıçrama özelliklerine sahip malign hücreler oluşur. Merkezi sinir sistemi tümörleri de diğer neoplazmlar gibi klonal özelliktedir, yani bir tek patolojik hücreden gelişir. Ancak neoplastik sürecin sürekliliği sonucunda ortaya çıkan ek mutasyonlarla hücreler heterojenite kazanırlar (24).

Neoplastik hastalıklara özgü bulgu ve semptomlar santral sinir sistemi neoplazilerinde genellikle yoktur. Klinik bulgular kitlelerin irritasyon ve bası gibi yerel etkileriyle, artmış basınç, ödem, hemoraji gibi yaygın etkilerine bağlı olarak ortaya çıkar. Tüm merkezi sinir sistemi neoplazmları potansiyel ve biyolojik açıdan maligndir fakat nöron dışı metastazları nadirdir (8). Merkezi sinir sistemi neoplazmlarının sıklığı yaşla artma eğilimi gösterse de, çocuklukta ikincil sıklıkta görülen tümör grubunu oluştururlar. Çocukluk çağı birincil intrakranial tümörlerinin %70'i serebellar kökenli olup posterior fossada gelişirken, yetişkinlerin birincil intrakraniyal tümörlerinin %70'i supratentorial yerleşimlidir.

Merkezi sinir sisteminde görülen tümörler genel olarak iki grup altında toplanabilir:

A. Primer nörojenik tümörler:

1. Gliomalar: Ependimom, oligodendrogliom, astrositom ve glioblastoma multiforme bu gruptadır.

2. Nöronal kökenliler: Nöroblastom, medulloblastoma ve retinoblastoma bu gruptaki en önemli tümörlerdir.

3. Primer sinir kılıfı tümörleri: Menenjiom, schwannom (nörinom) ve nörofibrom bu gruptadır.

4. Vasküler tümörler.

5. Hipofiz tümörleri: Eosinofil adenom, basofil adenom ve kromofob adenom.

6. Gelişim bozukluğu tümörleri: Kraniofaringioma.

7. Epifiz bezi tümörleri.

B. Metastatik tümörler: Merkezi sinir sisteminde en sık bronş kanseri metastazı görülür. Meme kanseri ve malign melanom metastazları da sık görülür. Lösemiler %50 oranında beyni tutarlar .

Tümör patogenezinin anlaşılmasında nöropatoloji önemli bir rol oynamaktadır. Gliomaların subtiplerinin ayrımı, bazı immünohistokimyasal yöntemlerle, astroglial tümörler için glial fibrilatik asit (GFA) proteinin tespit edilmesiyle yapılabilir (40). Genel olarak tümörün anaplastik karakteri ile GFA pozitif hücrelerin sayısı arasında ters orantı olduğu bilinmektedir. Bir taraftan tümörlerin astrositik doğaları için daha az farklılaşmış örneklerin belirlenmesi glutamat sentetaz pozitif, zayıf fibrilleşmiş hücreler tarafından olur. Diğer taraftan hematoksilen pozitif fibril yokluğunda bile GFA proteinlerinin varlığı bazı tümör hücrelerinin glial doğasının tanımlanmasında önemlidir (21). Bu fibrillerin görünmesi proteinin varlığına bağlı değildir. GFA proteinin immünohistokimyasal taraması glioblastomanın bazı değişik türleri göz önüne alındığında özellikle önemlidir. Bu çalışmada kullanılan hücrelerin GFA pozitif olduğu Durmaz ve arkadaşları tarafından tespit edilmiştir (14).

2.1.1. Glioblastoma multiforme

Erişkin intrakranial tümörlerinin %25-30'unu, bütün gliomaların %50-55'ini oluşturan son derece malign tümörlerdir. Otuzdan önce daha az olmasına rağmen, hariç tutulan yaş yoktur ve çocuklukta ortaya çıkabilir. Erkeklerde daha fazla görülür ve erkek/kadın oranı 2:1 veya 3:2 şeklindedir (12,40).

Glioblastoma multiforme beyin parankiminden primer olarak başlayabilir yada daha az oranda anaplastik astrositoma, karışık tümör, oligodendroglioma veya ependimomanın malign transformasyonu ile ortaya çıkabilir. Çoğunlukla beyaz cevherden kaynaklanan glioblastoma multiforme ismindeki 'multiforme' heterojeniteden gelmektedir. Küçük nekrotik alanların birleşimleri tümörün merkezinde nispeten nekroz oluşturur. Endotel hücreleri arasındaki bağlantı zayıf olduğu için bu durumda beyin tomografisinde kontrast tutulmasına yol açar.

Tümörün dağılımı geniştir. Özellikle beyin beyaz maddesini kuşatır. Genel olarak beyin ön kısmında arka kısmından daha sık görüldüğü söylenebilir. Frontal lobu en fazla kaplar, ama sadece bir lopta kalmaz, diğer loplarda işgal eder. Derindeki yapılara özellikle corpus collosuma bulaşır. Bazen ganglionlar veya talamusun derinlikleri içinde yerleştiği de görülebilir (40).

Makroskopik görünümde, yanıtıcı düzensiz yapı gösterirler; fakat, çevredeki beyaz ve gri cevhere ileri derecede bir infiltrasyon vardır. Kistik dejenerasyon, nekroz ve hemoraji tümöre alacalı bir renk verir. Mikroskopik olarak nekroz alanları sıklıkla neoplastik hücreler ile çevrilidir. Vasküler ve endotelial proliferasyon, endotelial hiperplazi ve pleomorfik hücre yapısı görülür. Tümörün hormona bağlı olduğu düşünülmektedir (10). Yapılan bir çalışmada 45 hastadan 39' unda estrogen reseptörü olduğu gösterilmiştir (43).

Glioblastoma multiformenin en malign tipi küçük yuvarlak hücreli (globoidal tip) olanıdır. Tedavi edilemeyen vakalarda ortalama yaşam süresi 14 haftadır. Radyasyon tedavisi ile yaşam süresi 10-11 hafta daha uzatılabilir.

Gliomalar hızlı büyürler, DNA replikasyonunun S-fazı 7-10 saat, hücre döngü süresi 2-3 gün, hücre doubling zamanı 13.5-22 gün olmasına rağmen, nekroz nedeni ile tümör doubling zamanı 5-6 haftadır. Gliomalardaki tümör gelişimi, büyüme kinetiği ile yakından ilişkilidir. Tümör büyüme oranı geliştiği bölümün büyüklüğü ile ilgilidir, ama bu oran hücre döngüsü ile bağlantılı değildir.

2.2. Estrojenler ve antiestrogenler

Hormon, bir veya bir grup hücre tarafından vücudun iç sıvılarına salgılanan ve vücudun diğer hücreleri üzerinde fizyolojik kontrol etkisi gösteren bir kimyasal maddedir. Hormonlar kimyasal olarak üçe ayrılır:

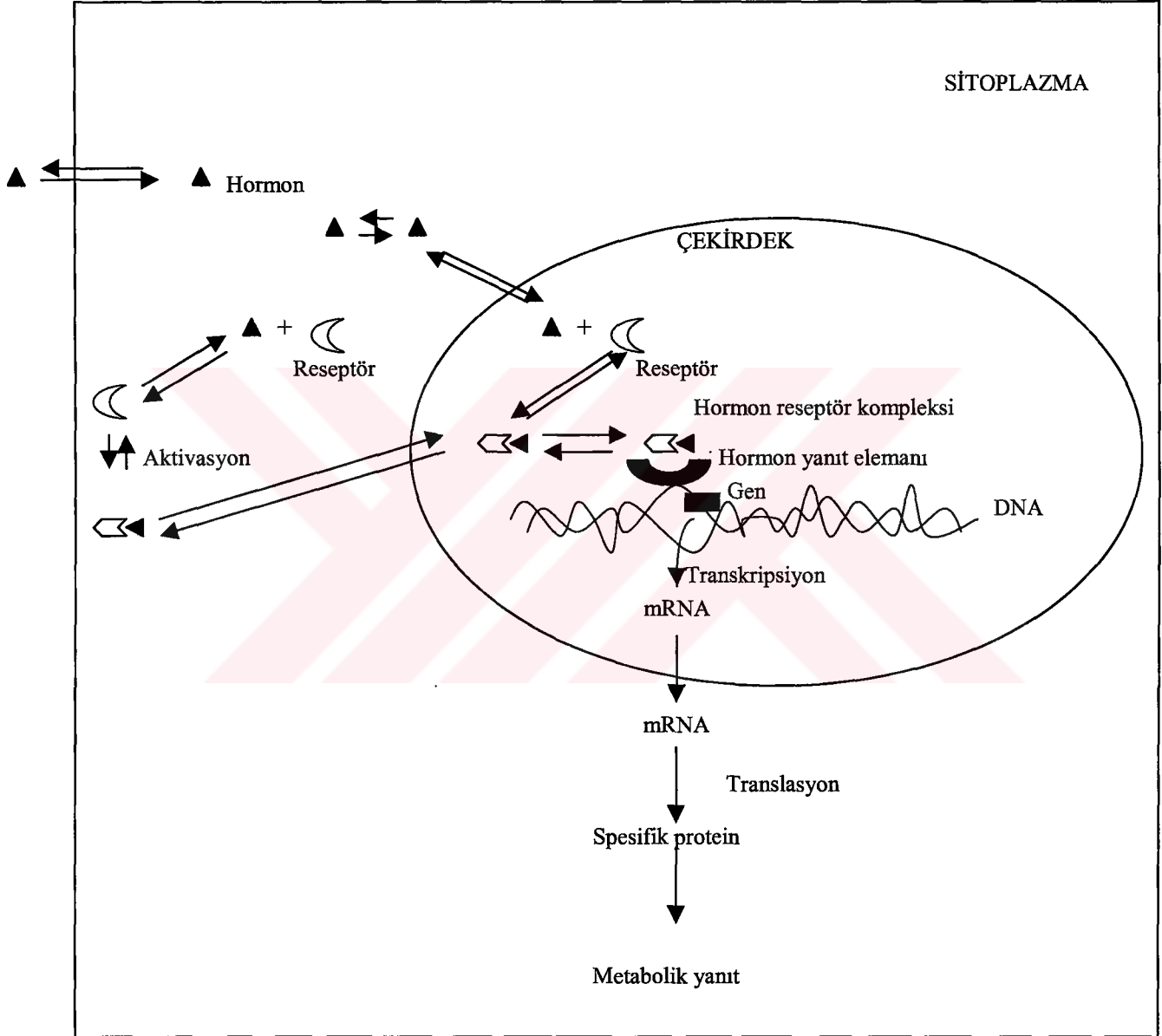
1. Protein veya peptidler: Çoğu önemli endokrin hormonların hepsi ya proteinler, peptidler ya da bunların yakın türevleridir. Ön hipofiz hormonları proteinler veya büyük polipeptidlerdir; arka hipofiz hormonları olan antidiüretik hormon ve oksitosin, her biri yalnızca dokuz aminoasit içeren peptid hormonlardır. İnsülin, glukagon ve parathormon da büyük peptidlerdir (52).

2. Tirozin amino asit türevleri: Tirozin amino asidinden iki grup hormon oluşmaktadır. İki metabolik tiroid hormonu, tiroksin ve triiyodotironin tirozin türevlerinin iyotlanmış şekilleridir. Adrenal medullanın ana hormonları olan epinefrin ve norepinefrin de tirozinden türeyen katekolaminlerdir (52).

3. Steroid hormonlar: Bu hormonların hepsi kolesterolünkine benzer steroid çekirdeğe dayanan bir kimyasal yapıya sahiptir ve çoğunlukla kolesterolün kendisinden

kaynaklanırlar. Çeşitli steroid hormonlar şu bezlerden salgılanır; a) adrenal korteks (kortizol ve aldosteron) b) overler (estrogen ve progesteron) c) testisler (testosteron) ve d) plasenta (estrogen ve progesteron) (52).

HÜCRE ZARI



Şekil 2-2-1. Steroid hormonların işlevi (16).

Steroid hormonları hedef hücrelerde protein sentezine neden olmaktadır. Bu proteinler de, enzimler, taşıyıcı proteinler veya hücrelerin diğer işlevlerini sağlayan yapısal proteinler olarak görev yaparlar. Steroid işlevindeki olayların sırası esas olarak aşağıdaki gibidir:

1. Steroid hormonu hücrenin sitoplazmasına girip özgül bir reseptör proteine bağlanır, hormon reseptör kompleksi bundan sonra aktivasyona uğrar. Bu birleşme aktivasyon olayının sitoplazmada mı çekirdekte mi olduğu kesin olarak bilinmemektedir.

2. Eğer olay sitoplazmada olduysa reseptör protein/hormon birleşimi çekirdeğe difüzyonla girer veya taşınır.

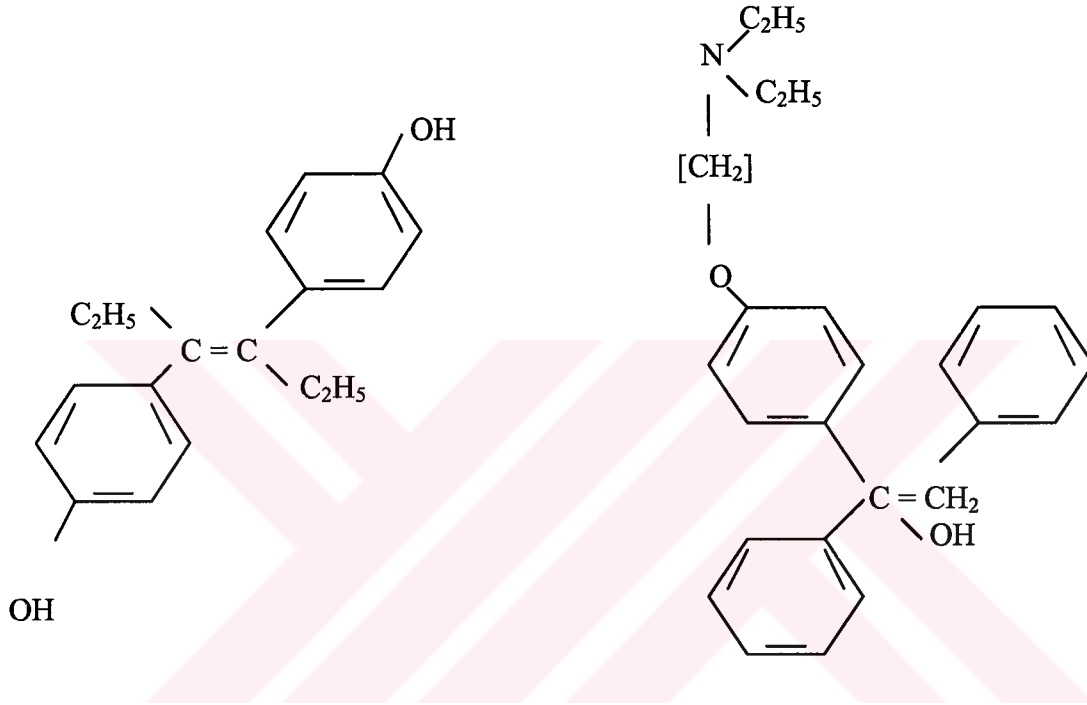
3. Daha sonra bu birleşim kromozomlardaki DNA ipliklerinin özgül noktalarına bağlanır ve haberci RNA' nın yapımı için gerekli özgül genlerin transkripsiyon işlemini aktive eder.

4. Haberci RNA sitoplazmaya difüze olur ve orada ribozomlarda yeni proteinlerin oluşumu için translasyon işlemini başlatır (4,16, 35,52).

Estron, estradiol, estriol olmak üzere üç çeşit estrogen vardır. Bunlardan estron ve estradiol birbirlerine dönüşebilirler, fakat estradiol daha etkili bir hormondur. İdrarda bulunan temel estrogen, estradiol ve estronun metabolizması sonucu oluşan estroldür (47). Estrogen sentezi temelde graffian foliküllerinde olur. Estrogenler dışide sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişimini, özellikle uterus büyümesi, vajinal mukozanın kalınlaşması ve meme gelişimini sağlarlar.

Estrojenik ve antiestrogenik etkiler gösteren ama steroid olmayan sentetik maddeler geliştirilmiştir. Bu maddeler di veya trifenil etilen temel yapısına sahiptir. Dietilstilbestrol (Şekil 2-2-2) ilk olarak 1938'de bulunan yüksek oranda etkiye sahip bir non-steroidal estrojendir. 1958'de geliştirilen etometoksitri fetal (MER-25) farede estradiol

benzoat tarafından oluşturulan utotropik etkiyi antagonize etmektedir. Bu önemli buluş yeni trifeniletilen gruplarının bulunması için önem kazanmıştır (35).



Şekil 2-2-2. Dietilstilbestrol ve etometoksitrifetalin (MER- 25) açık formülleri.

Antiöstrojenik aktiviteye sahip sayısız bileşik sentez edilmiştir ve bunlardan bazılarının klinik uygulamaları da vardır. Bu antagonistlerden çoğu intrasellüler reseptörü için estradiol ile yarışarak etkili olurlar. Steroidal bir bileşik olmayan nafoxidin ve tamoxifen kromatin ile stabil kompleksler oluşturmak için estrogen reseptörü ile birleşirler ve reseptör yeniden devreye giremez. Bu ajanlar estradiol etkisini uzun bir süre kısıtlamış olurlar. Bu antagonistlerden tamoxifen estrojene bağımlı meme kanseri olgularının tedavisinde kullanılır (16,24,26).

Fetal kobayda antiestrogenlerin plazma proteinlerine bağlandığı bulunmuş, benzer veriler insan plazması için de gösterilmiştir (35).

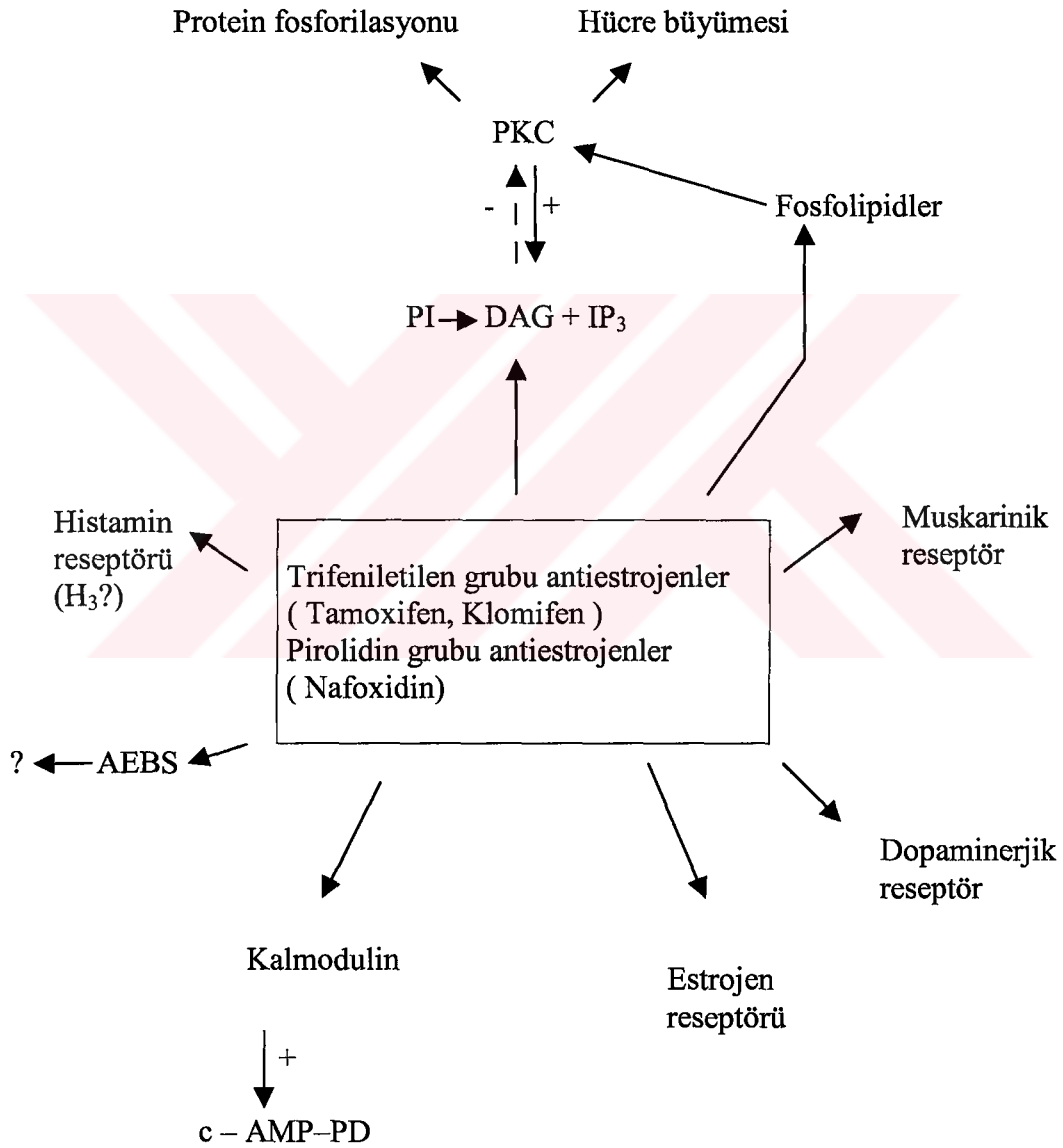
Yapılan bir çalışmada hormona bağlı hücre dizileri (T47D, Z-75, BT-474, MDA-MB361, R-27, LY-2) ve hormona bağlı olmayan hücre dizileri (BT-20, MDA-MB231, HBL-100, Hs0578T) kullanılarak estrogen ve antiestrogenlerin etkileri araştırılmıştır. Antiestrogenlerin farklı hormona bağlı memeli kanser hücre dizilerinde genel olarak hücre büyümesini bloke ettiği gösterilmiştir (35). Fakat bu etki antiestrogen tipine, hücre dizisine ve deneysel koşullara bağlıdır (35).

Progesteron ve sentetik progestinlerin in vivo da olsun, izole edilmiş hücre modellerinde olsun estradiolün etkisini bloke ettiği bilinmektedir. Potansiyel sentetik bir progestin olan R5020nin T47D cell lineinin büyümesi üzerine herhangi bir etkisi olmadığı fakat estradiolün stimüle edici etkisini önlediği gözlenmiştir. R5020, R-27 hücre dizisi üzerinde de estradiolün stimüle edici etkisini önlemiştir. R-27 hücre dizisi tamoxifene direnç göstermektedir. Buradan R5020 ile tamoxifenin etki mekanizmalarının birbirlerinden farklı yollarla olabileceği düşünülmüştür (35).

Hücre döngüsü ile ilgili çalışmalarda tamoxifenin hücre büyümesini, hücre döngüsünü G1 fazında yakaladıysa inhibe ettiği bulunmuş (15,20,28), bu etki diğer antiestrogenler içinde araştırılmış onlarında inhibisyon yaptığı bulunmuştur (34). Tamoxifenin hücre döngüsü üzerine kinetik etkisiyle ilgili karşılaştırmalı çalışmalarda estrogen reseptörü pozitif ve negatif olan hücre dizileri üzerinde tamoxifenin farklı etkisi olduğu gösterilmiştir (27,38).

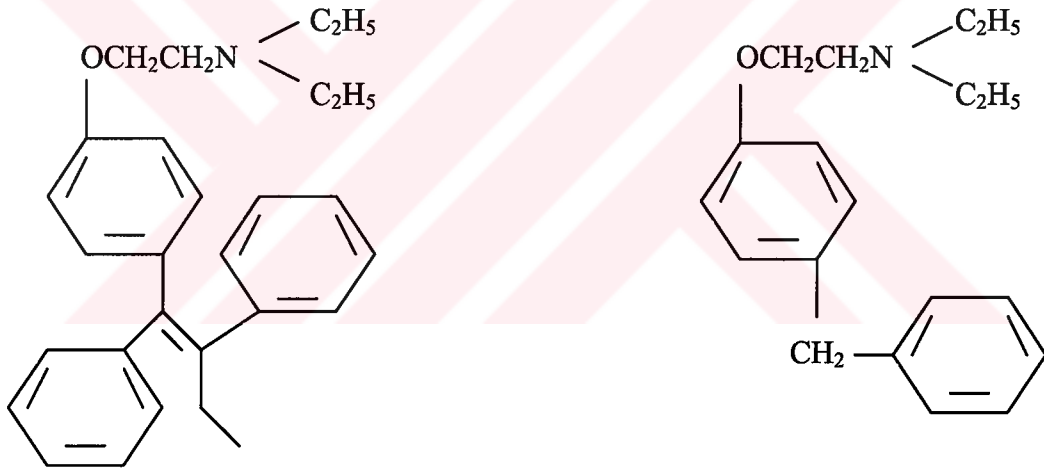
Şekil 2-2-3 bazı antiestrogenlerin reseptör sistemleriyle olan ilişkisini göstermektedir. Ek olarak estrogen reseptörü, antiestrogen bağlanma bölgeleri (AEBS) ve protein kinaz C (PKC) aktivitesini düzenleyen sistemlerde gösterilmiştir. Tamoxifenin

(Şekil 2-2-4) histaminerjik reseptöre bir antihistaminerjik madde olan difenilmetanla (DPPE) (Şekil 2-2-4) yarışmalı olarak bağlandığı ve antagonistik etkiye neden olduğu gözlenmiştir (49). Tamoxifen ile histamin agonist ve antagonistleri arasında yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada, tamoxifenin H₁ ve H₂ reseptörleri dışında H₃ reseptörüne bağlandığı gösterilmiştir (49).



Şekil 2-2-3. Trifeniletilen ve pirolidin grubu antiestrogenlerin çeşitli reseptör ve enzim sistemleriyle olan ilişkileri.

Fare beyrinde tamoxifenin dopaminerjik reseptörüne dopamin ile yarışmalı olarak bağlandığı gösterilmiştir (18). Antiöstrojenlerin dopaminerjik reseptörlere bağlanması, bu ilaçların emetik etkilerinin bir açıklaması olabilir. Antiöstrojenlerin muskarinik reseptöre bağlandığı ise klomifen ile gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada bu ilaçların antikolinergik bir yan etki oluşturabileceği düşünülmüştür (49). Bir başka çalışmada tamoxifen kalmodulin antagonisti olarak kullanılmıştır (25). Kalmodulin hücrel Ca^{2+} reseptörü ve kalsiyuma bağlı bir çok olayın düzenleyicisidir. At beyrinde yapılan bu çalışmada antiöstrojenlerin kalmoduline bağlı c-AMP fosfodiesteraz aktivitesini inhibe ettikleri gösterilmiştir (25). Tamoxifen tarafından kalmoduline bağlı bir protein kinaz olan miyozin hafif zincir kinazın aktivitesinin de inhibe edildiği gözlenmiştir (42). Antiöstrojenlerin biyolojik etki mekanizması oldukça karmaşıktır. Bu



Şekil 2-2-4. Tamoxifen ve DPPE' nin açık formülleri.

fonksiyon; deney şartlarına, çalışılan parametreye, düşünülen organ veya hayvan dokusuna göre değişir (47).

Antiöstrojenler; a) östrojen reseptör molekülüne, b) özel makromoleküllere: antiöstrojen bağlanma bölgelerine (AEBS) bağlanarak, c) protein kinaz C (PKC) yoluyla, d)

büyüme faktörlerinin inhibisyonu veya büyümeyi inhibe eden faktörlerin stimülasyonu ile antikanser etki gösterirler. Bunun dışında emetik gibi farklı etkileri de vardır (35).

a) Antiestrojenlerin estrogen reseptörlerine bağlanması; radyoaktif tamoxifen ile metabolitleri 4- hidroksi tamoxifen (4-OH) ve N- desmetil tamoxifen veya diğer antiestrogenler (CI628, nafoxidin, LY1120181) hedef dokulardaki estrogen reseptörlerine yüksek afiniteyle ve spesifik olarak bağlanırlar. Hedef dokular farklı hayvanlardan elde edilmiştir. Ayrıca bu bağlanma in vitro ortamda kanser hücre dizilerinde de görülür. Bununla birlikte, antiestrogenlerin estrogen reseptörüne bağlanması doğal estrogenin bağlanmasına göre fizikokimyasal farklılık gösterdiği belirtilmiştir (35). Bu farklılık antiestrogenlerin nasıl olupta hem antagonist hem de agonist etki gösterdiğini anlamamıza yardım edebilir. Antiestrogenler estrogen reseptörünü aktive edebilir, fakat bu etkisi estrogeninki kadar değildir. Antiestrogen tarafından reseptörün indüklenmesi reseptörün aktivitesini değiştirir. Reseptör aktivitesinin değişimi estradiolden çok, farklı antiestrogenlerin estrogen reseptör kompleksinin kromozomlardaki DNA ipliklerinin özgül noktalarına zayıf bağlanmasındandır. Klomifenin, estrogenin reseptöre bağlanmasını ve reseptörün aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. 4-hidroksi tamoxifen tarafından aktive edilen reseptör estradiole göre DNA ipliğindeki özgül noktalarına düşük afinite gösterir (7,35).

Monoklonal antikorlar reseptörlerin antijenik determinantlarına göre tanımlamada kullanışlı araçlardır. Ayrıca ligandlar veya farklı deneyler sonucu reseptörlerde meydana gelen konfigürasyonel değişiklikleri de göstermede kullanılırlar. Tamoxifenin bağlı olduğu estrogen-reseptör kompleksi de monoklonal antikorlar tarafından gösterilebilir. Antikorum tamoxifen-estrogen reseptörü kompleksine bağlanması, estrogenin estrogen-reseptör kompleksine bağlanmasından daha zayıftır. Bunun sebebi tamoxifen reseptöre bağlandığında reseptörün yapısında değişiklik oluşturduğundan olabilir (35).

b) Antiestrojen bağlanma bölgeleri (AEBS); sıçan uterusu ve civciv fallop tüpünde yapılan bir çalışmada estrogen reseptörleri radyoaktif olmayan estradiolle, spesifik olmayan bağlanma bölgeleri de radyoaktif olmayan tamoxifen ile doyurulmuş ve daha sonra tritiated tamoxifenin estrogen reseptörlerinden farklı bir bölgeye spesifik olarak, yüksek afiniteyle bağlandığı gözlenmiştir (35). Daha sonra bu bölgeler kobay fetal uterusunda, meme tümöründe ve insan dokularında da bulunmuştur. Aynı yıllarda benzer bulgular 4-OH için insan meme kanserinde bulunmuştur (35). Hücrelerdeki bu noktalar antiestrogen bağlanma bölgeleri olarak adlandırılmıştır. Bu bölgelerin nonsteroidal antiestrogenlerin selektif olarak bağlanmasından başka bir fonksiyonlarının olup olmadığı bilinmemektedir (44). Trifeniletilenlerin AEBS'e bağlanma afiniteleri sabittir. Genel olarak estrogen reseptörüne bağlanma afiniteleri AEBS'den daha yüksektir (35). Bununla birlikte, kobay fetal uterusunda antiestrogenlerin AEBS'e bağlanma afinitesi daha fazladır (35). AEBS stoplazmada, nukleusda, mikrozomlarda, mitokondride ve birçok dokuda bulunur. Konsantrasyonu hedef doku ile hedef olmayan dokularda değişkendir. Estrogen reseptörü ve AEBS konsantrasyonları arasında ilişki görülmüştür. Kobayın fetal uterusunda ikiside çok yüksek seviyedeyken doğumdan sonra yenidoğanda ve yetişkin hayvanda birbirlerine paralel azalma gözlenmiştir (35).

Antiestrojenlerin farklı modellerde farklı hareket ederek gerçek estrogen agonisti, kısmen agonistik veya antagonist etki göstermesi estrogen reseptörlerine ek olarak, AEBS'e de bağlı olabilir (33).

c) Protein kinaz C' nin inhibisyonu;

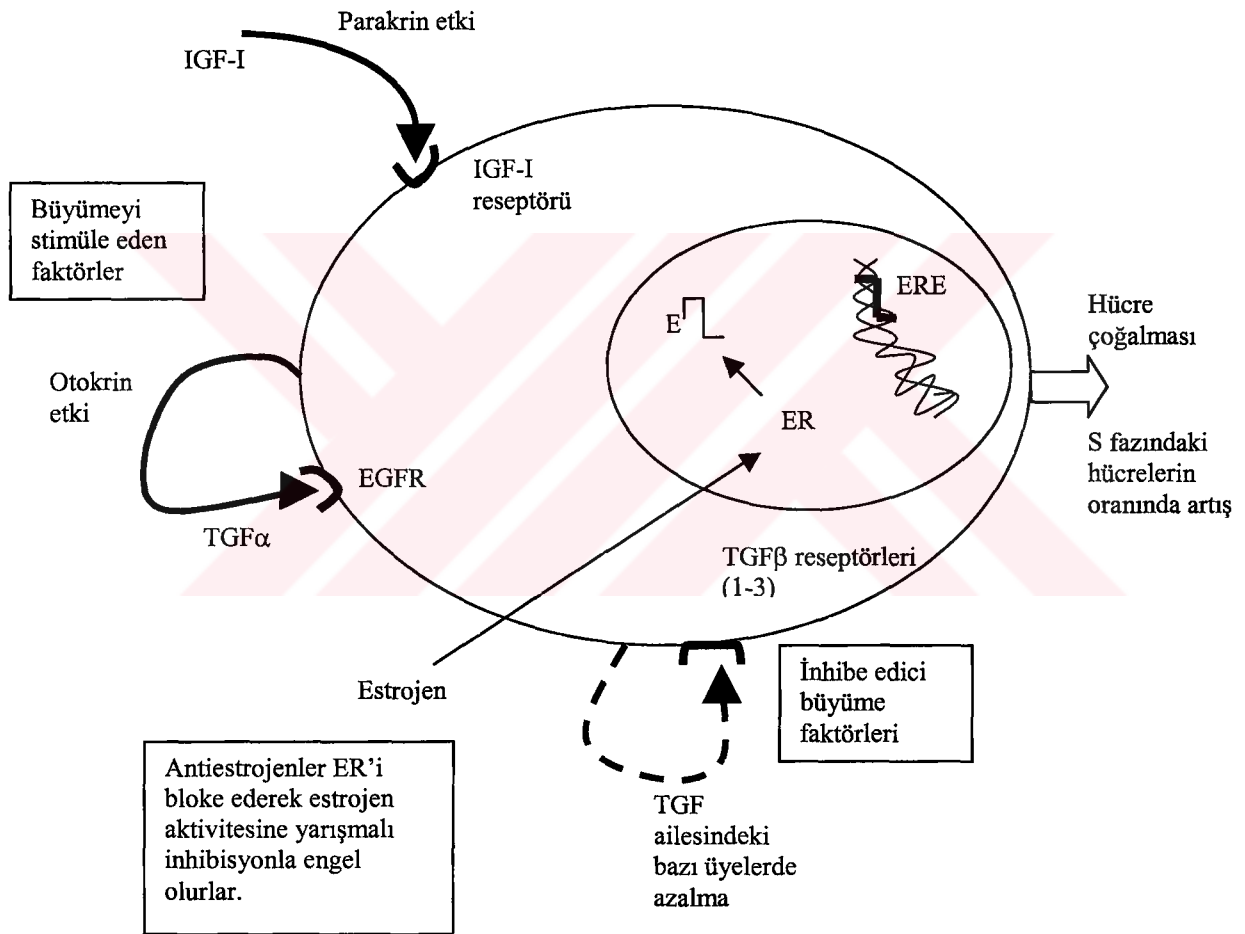
PKC, protein fosforilasyonunda anahtar rol oynayan bir enzimdir. Protein fosforilasyonundan hücre bölünmesi dahil pek çok önemli hücresel olaylar etkilenir. PKC' nin protein fosforilasyonuna katılması için aktive eden etkenlerden birisi fosfotidil inositol (PI) döngüsüdür. Fosfotidil inositolün hidroliziyle açığa çıkan ürünler diaçil gliserol (DAG) ve Ca^{2+} PKC' nin aktivatörleridir (3, 30). Antiöstrojenler PI döngüsünü bozarak PKC inhibisyonu yapabilirler (1). Tamoxifen ile metabolitleri 4-hidroksi tamoxifen ve N-des-metil tamoxifen, ayrıca klomifenin PKC aktivitesini düşürdüğü ve hücre büyümesini inhibe ettikleri, birkaç hücre tipinde gösterilmiştir (17,32). Ayrıca antiöstrojenlerin PKC aktivatörü olarak bilinen forbol esterlerinin bağlanmasını (29,32) ve hücre büyümesinde etkisi olan PKC' yi inhibe ettikleri bilinmektedir (5).

d) Antiöstrojenlerin büyüme faktörleriyle olan ilişkileri;

Östrojenler hücre yenilenmesinden sorumlu mitotik büyüme faktörlerini ve/veya reseptörlerinin sentezini stimüle ederler. Daha sonra bu mitojenler meme kanseri hücreleri üzerinde otokrin veya parakrin etki oluşturarak hücre büyümesini stimüle ederler. Antiöstrojenler ise büyümeyi inhibe eden faktörlerin üretimini artırıp, büyümeyi stimüle eden faktörlerin üretimini azaltıcı yönde etki ediyor olabilirler (11,36,48).

Meme kanserinin gelişiminde büyüme faktörlerinin etkisini gösteren bir çok çalışma vardır. Bu büyüme faktörlerinden epidermal büyüme faktörünün (EGF), transforme eden büyüme faktörü α ve β ($TGF\alpha$ ve $TGF\beta$)' nin ve insülin benzer büyüme faktörü I ve II (IGF-I ve IGF-II)'nin etkisi olduğu bulunmuştur (52). Glioma hücrelerinde ise EGF, fibroblast büyüme faktörüne (FGF), IGF-I ve IGF-II faktörleri ile trombositlerden türeyen büyüme faktörüne (PDGF) rastlanmıştır (50). Bunun yanında östrojen reseptöründen (ER) bağımsız olarak tümör hücresi gelişiminde bu büyüme faktörlerinin etkisi olduğu da

bulunmuştur (52). ER pozitif olduğu bilinen bir meme kanseri hücre dizisi olan T47D' de TGF β reseptörüne rastlanmamış ve bu hücre dizisinin antiestrojenlere duyarlı olmadığı bulunmuştur. Bunun tersine yine ER pozitif olan MCF-7 meme kanseri hücre dizisinin ise TGF β reseptörü taşıdığı ve bu reseptörden dolayı MCF-7' nin büyüme inhibisyonuna duyarlı olduğu bulunmuştur (19,20,53).



Şekil 2-2-5. Meme kanseri hücresindeki çoğalmaya neden olan estrojen hareketi.

Estrojen (E), estrojen reseptörüne (ER) DNA bağlanma bölgesini ortaya çıkarmak için bağlanır. Bu bölge estrojene duyarlı genlerin transkripsiyonunu başlatmak için DNA'daki estrojenden sorumlu elemanlara (ERE) bağlanır. Estrojen $TGF\alpha$ 'nın üretimini artırabilir, bu da muhtemelen otokrin döngüdeki epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR) ile aralarındaki etkileşimdenidir. Benzer olarak, estrojen $TGF\beta$ ailesindeki bazı elemanlarda azalmaya neden olur. Antiestrojenler hücrenin biyokimyasındaki estrojene bağlı değişiklikleri önlemek için, estrojen reseptörüne estrojen bağlanmasının yarışmalı inhibitörü olarak rol oynayabilirler. IGF- I parakrin büyüme faktörü olarak veya uzaktaki organlardan endokrin faktör olarak hareket eder (23).

Antiestrojenlerin aktivitesini etkileyen çok sayıda faktör olduğu görülmektedir. Bu etkilerini kısaca şöyle özetleyebiliriz;

1) Tamoxifen insan ve hayvanlarda iki önemli metaboliti olan 4-OH ile N-desmetil tamoxifene metabolize edilir. Tamoxifen gibi metabolitleri de antiestrojenik etkiye sahiptir. Buradan, tamoxifen metabolizması boyunca da muhtemelen etkilidir.

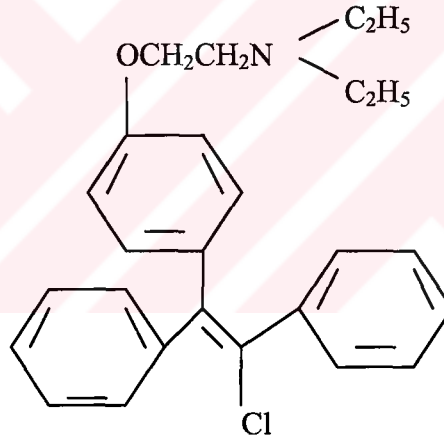
2) Estrojenler reseptörlere bağlanarak etki gösterir. Antiestrojenler aynı reseptör bağlanma bölgelerine estrojenlerle yarışmalı olarak bağlanıyor olabilir. Sonrasında oluşan fizikokimyasal değişikliklerle, estrojen- ve antiestrojen- reseptör komplekslerinin davranışında oluşan farklılıklar açıkça gösterilmiştir. Fakat ortaya çıkan yanıtların karmaşıklığı yüzünden antiestrojenlerin agonist veya antagonist özelliklerinin nedenini açıklayan yeterli veri yoktur.

3) Antiestrojenler PKC aktivitesini düzenleyen sistemleri baskılayarak protein sentezini ve hücre büyümesini engellemektedir.

4) Antiestrojenler, spesifik proteinlerin estrojen oluşturmalarını veya büyüme faktörlerinin inhibisyonu ya da büyümeyi baskılayan faktörlerin uyarılması şeklinde hareket edebilirler.

2.2.1. Klomifen

Klomifen, E-2(p(2-chloro-1,2-diphenylvinil)fenoksi)triethylamin(E-CLO) ve geometrik izomerleri karışımıdır (39). Cis-formu zudomiphene, trans-formu enclomiphene adını alır (51). Ovulasyon göstermeyen bayanlarda ovulasyon sağlayıcı ajan (fertilite ajanı) olarak klinikte kullanılmaktadır. Estrojenlerin yaptığı inhibisyonu kaldırarak gonadotropinlerin salımını artırır. Mekanizması bilinmemekle beraber amenoreli ve anovulatuvar sikluslu kadınlarda ovulasyonu başlattığı gösterilmiştir (19). Klinik kullanımda günde 50-100 mg olarak 5 gün verildikten birkaç gün sonra plazmada folikül stimulan hormon (FSH) ve lüteinizan hormonu (LH) düzeylerinin arttığı, ovülasyon olduğu ve gonadotropinlerin seviyesinde ikinci bir yükselmenin olduğu görülür.



Şekil 2-2-6. Klomifenin açık kimyasal formülü.

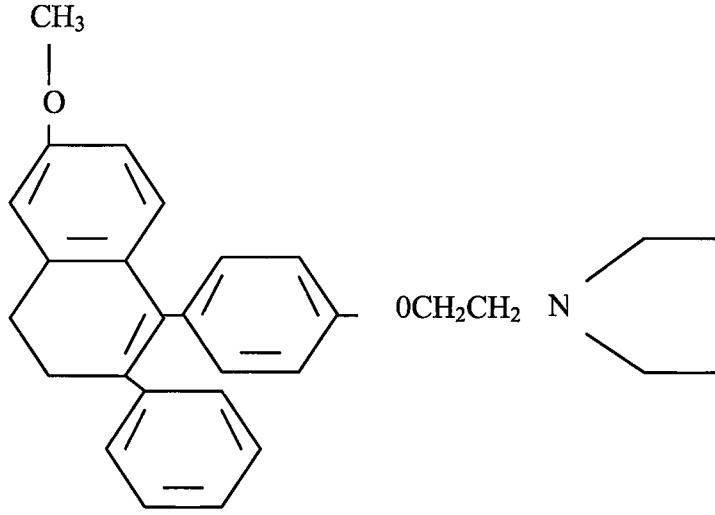
Klomifen agonistik ve antagonistik özelliklerinin ikisini de göstermektedir. Yetişkin olmayan farede, klomifen izomerleri uterus büyümesini stimüle etmiş, fakat estrojenin ürettiği stimulasyonu kısmen antagonize etmiştir. Ayrıca, klomifen tek başına

yavru farelerin uterus ağırlığını estradiol kadar artırabilmiştir (35). Histolojik olarak, klomifen, stroma ve miyometrium üzerinde orta derecede etki gösterirken, luminal epiteli tamamen stimule etmektedir. Klomifen ovaryumu çıkarılmış fare uterusunda RNA polimeraz II' nin aktivitesini artırabilmektedir. Buna karşın RNA polimeraz I' in aktivitesini uzun süreli artıramamaktadır (35). Benzer şekilde, sitozol progesteron reseptör konsantrasyonu klomifen tarafından artırılabilir, ama bu etkisi estradiole göre daha azdır (41).

Klinik olarak klomifen meme kanseri hastalarının %39'unda etkili bulunmuştur. Hormona bağlı fare meme kanserlerinde büyümeyi baskılayıcı antitümöral etkisi görülmüştür (35). Klomifenin etki mekanizması bilinmemektedir ama yapılan çalışmalar estrojenik ve antiestrojenik etkisi olduğunu göstermiştir. Örneğin; estradiole benzer bir şekilde ön hipofiz bezi hücrelerinin gonadotropin salgılatıcı (GnRH) hormona karşı ilgisini artırmıştır (35). Klomifen sitratın hipotalamustaki östrojen reseptörlerine belirli bir affinitesi vardır. Klomifen başlangıçta bir antifertilite ilacı olarak planlanmış, ancak ilginç olan nokta bugün bu ilacın tamamen zıt bir etki için kullanılmasıdır. Klomifen, hipotalamik reseptör bölgeleri için estradiol ile yarışır; böylece GnRH salınımı kısıtlanmaz ve sonuçta LH ile FSH'ın aşırı miktarları açığa çıkar. Klomifene yanıt olarak genellikle çok sayıda follikül bir arada olgunlaşır, bunu da çoğul hamilelikler izleyebilir (16).

2.2.2. Nafoxidin

Difenil-dihidro naftaline türevi olan nafoxidin 1963 yılında Duncan ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (44). Antiestrojenik özelliği araştırmalarda ve klinik olarak kullanılmasına yol açmıştır. Etki bakımından nafoxidin klomifene benzerlik



Şekil 2-2-7. Nafoxidinin açık kimyasal formülü.

gösterir. Luminal epitel üzerindeki büyük bir stimulasyon, stroma ve miyometriumda da az etki göstermiştir (37). Bir çalışmada fare uterusundaki tipik estrogenik ve antiestrogenik etkisi gösterilmiştir. Nafoxidin her gün verildiğinde uterotropik etki üzerinde kısmen agonistik kısmen de antagonistik davranmaktadır. Etkisinin bir tek enjeksiyondan sonra estradiole iyi bir agonistik , ikinci enjeksiyondan sonra ise antagonistik etki olduğu gösterilmiştir (dozları verilmemiş) (35).

Antiestrojenlerin (örneğin; nafoxidin) DNA polimeraz aktivitelerini azalttığı bulunmuştur (35). Bu etkinin DNA polimeraz alpha üzerine olabileceği düşünülmüştür, çünkü DNA polimeraz beta'nın miktarı bu sistemde kayda değer bir değişiklik göstermemiştir. DNA polimeraz alpha enzimi DNA replikasyonunda görev alan enzimlerden biridir (35). başka bir çalışmada hamster uterusunda artan progesteron reseptör konsantrasyonuna kısmen agonistik etki gösterdiği bulunmuştur (41). Fetal kobay uterusunda, nafoxidin kendi başına tamamen agonist veya seçilen parametreye göre kısmen agonist etki göstermiştir (37). Nafoxidinin uterus ağırlığını estradiole denk oranda artırdığı,

fakat, hamsterde, sadece kısmen progesteron reseptör konsantrasyonunu stimüle ettiği bulunmuştur. Nafoxidinin ileri derece meme kanserinde antiestrojenik etkisi araştırılmış, tümör küçülmesinde klomifene benzer oranda %35-37 etkili görölmüştür (35).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hücre ekimi için hazırlıklar ve hücre ekimi

Besi ortamı 1:1 oranında Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Sigma), nutrient mixture (F-12, Sigma) ile % 10 veya % 5 fetal calf serumu (FCS, Sigma), % 1 penisilin+ streptomisin (Sigma) içerir ve pH= 7-7,2' e ayarlanır. Çalışmamızda glioblastoma multiformeli insandan ameliyatla alınan tümör dokusu çoğaltılarak ve daha sonra dondurularak saklanan hücreler kullanıldı. Dondurma işlemi, sağlıklı hücrelerin soğuktan koruyucu madde olan dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma) ile birlikte sıvı nitrojen (-180 derece) içine konmasıdır. DMSO yağda çözünebilen küçük bir moleküldür. Hücre zarını difüzyonla hızlı bir şekilde geçer ve hücrelerin su içeriğini azaltır. DMSO' nun ortamda bulunmaması hücre içinde buz kristallerinin oluşmasına ve hücre zarının parçalanmasına yol açar. Nitrojen tankından çıkarılan hücreler 37 derecelik su banyosuna alındı. Hücreler erir erimez besi ortamı içeren 10 mililitrelik santrifüj tüpüne aktarıldı. 1000 devirde 4 °C de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücreler taze 5 ml besi ortamıyla homojen olacak şekilde karıştırıldıktan sonra 25 cm² 'lik flaska ekildi. İnkübatöre kaldırıldı ve hücrelerin tabana tutunabilmesi için flask en az 24 saat kıpırdatılmadı. Hücreler tabana tutunduktan sonra 2 günde bir besi ortamı değiştirildi. İnkübatörün iç ortamı %95 nem, %5 karbondioksit ve 37 derecedir.

3.2. Hücrelerin çoğaltılması - pasajlama - stoklanması

Deneyler esnasında çok hücreye ihtiyaç duyulduğu için pasajlama işlemiyle hücre sayısı artırıldı. Hücreler flaskın tabanını tamamen kapladıysa pasajlamaya hazırdır. Flasktaki besi ortamı uzaklaştırılarak fosfat buffered saline

(PBS) ile birkaç kez yıkandı ve üzerine %0,25 tripsin-etilendiamintetraasetik asit (tripsin-EDTA, Sigma) eklendi. Flask inkübatöre kaldırılarak yaklaşık 5 dk beklendi. Hücreler tabandan tamamen ayrılınca, üzerine tripsini inhibe etmek için besi ortamı kondu. Karışım 1000 devirde 21°C 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak üzerine 3-4 ml besi yeri eklendi ve homojen bir dağılım sağlamak için 1 mililitrelik pipet ile karıştırıldı. Coulter counter' da sayım yapıldı. 25 cm² flaska 1x10⁵ hücre düşecek şekilde ekim yapıldı ve 2 günde bir besi ortamı değiştirildi.

Hücreler pasajlandıkça transforme oldukları için hücreler çoğaltıldıktan sonra tekrar stoklandı. Hücreleri stoklama işlemine hücrelerin dondurulması denilebilir. Bunun için hücrelerin sağlıklı görünümde ve miktarlarının yeterli olması gerekir. Hücreler tripsine edilip, 1000 devirde 4 °C' de 5 dk santrifüj edilerek, sayım yapıldı. Bir tüpte 1x 10⁶ hücre/ml olacak şekilde hesaplanarak her tüpe %90 besi ortamı, %10 DMSO kondu. Tüpler hücreler eklendikten sonra, önce 4-6 °C' de 30 dk , sonra -20 °C' de 3 saat bekletildi. Daha sonra -80 °C' de 2 saat bekletilerek en son nitrojen tankına kaldırıldı.

3.3. Hücrelerin deneye alınması ve ilaç uygulanması

Hücreler deneye alınırken, hücreleri pasajlarken yapılan işlemlere benzer işlemler yapıldı. Bu sefer hesaplama 96 kuyucuk için, kuyucuk başına 30.000 hücre düşecek şekilde yapıldı. Otomatik pipetör yardımıyla her bir kuyucuğa 250 µl hücre+ besi ortamı karışımından konuldu. İşlem sonunda hücreler inkübatöre kaldırılıp 24 saat beklendi ve bu süre sonunda ilaç uygulandı. İlaçlar için çözücü olarak absölü alkol kullanıldı. Hazırlanan stok çözeltiden 37 °C ısıtılmış F-12 ile yapılan dilüsyonlarla kullanılacak olan ilaç dozlarına erişildi. Nafoxidin (Sigma) ve klomifen (Sigma) için; 0.1µM, 1µM, 10 µM, 15 µM, 25 µM ve 50µM dozlar hazırlandı. Tamoxifen (Sigma) ve 4-hidroksi tamoxifen

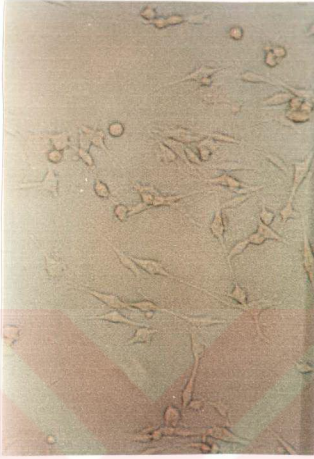
(Sigma) için 0.1µM, 1 µM, 10 µM ve 100 µM dozlar besi ortamına eklendi. İlaç uygulanması hücreler ekildikten 24 saat sonra yapıldı. Her bir deneyde her bir doz en az 6 kuyucuğa ekildi. Deneyler her ilaç ve her ilaç dozu için en az 3 kez tekrar edildi.

3.4. MTT yöntemi

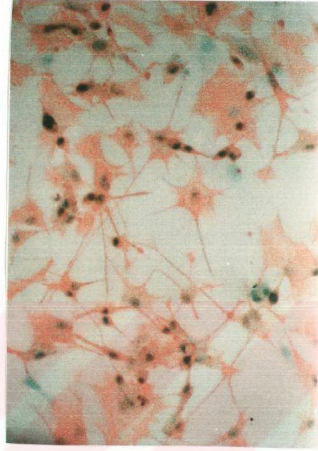
3-(4,5- dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid (MTT, Sigma), hücelere aktif olarak absorbe olur ve mitokondriye bağlı bir reaksiyonla renkli, suda çözünmeyen ürün olan formazana indirgenir. Formazan hücre zarını geçemediğinden hücre içinde toplanır. DMSO veya diğer uygun çözücü ilavesiyle ürün çözünüp, serbest kalabilir ve kolorimetrik olarak tespit edilebilir hale gelir (6). Hücrelerin MTT indirgeme özelliği mitokondrinin sağlamlığı ve aktivitesinin tanımlanmasını sağlar. Bu da hücre canlılığının ölçüsü olarak alınır. Bu method daha çok hızlı çoğalan ve mitokondrial aktivitesi yüksek olan hücre dizileri için uygundur (6).

İlaç verildikten 24 saat sonra MTT uygulanmaya başlandı. Kültür kabındaki kuyucuklardan besi ortamı alınarak % 0,5 MTT içeren yeni besi ortamı eklenip 4 saat 37 °C' de inkübe edildi. Bu sürenin sonunda besi ortamı uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi. 5 dk kadar ışıktan koruyarak beklendi ve 550 nm'de spektrofotometrede okutuldu (2,9,13,46). İstatistiksel değerlerin saptanması için tek yönlü varyans analizi, HSD testi uygulandı.

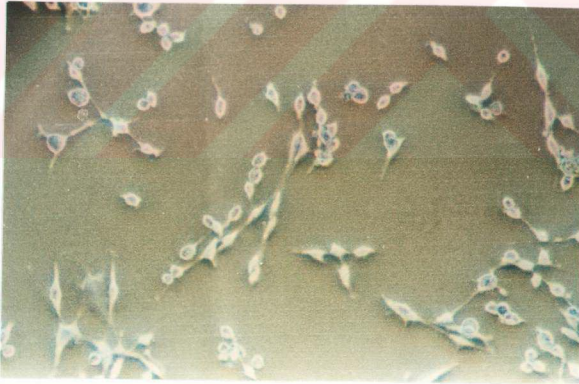
4. BULGULAR



a



b



c

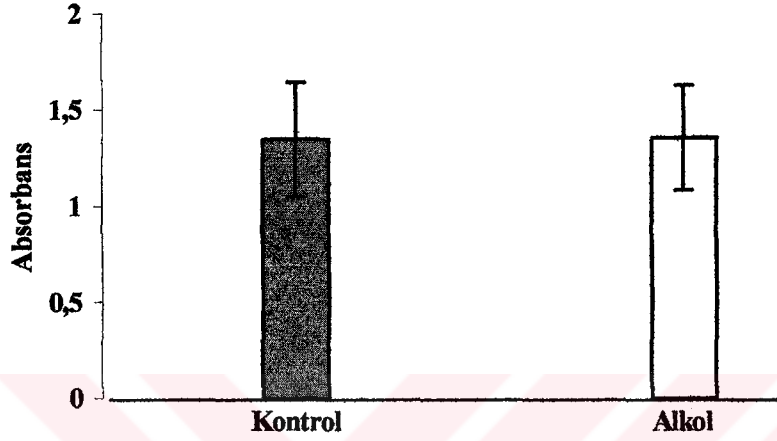
Şekil 4.1.1 a) Glioblastoma multiforme hücreleri,
b) GFA boyanmış hücreler,
c) MTT uygulanmış hücreler.

0.1, 1, 10 ve 100 μM dozlarda tamoxifen ile 4- hidroksi tamoxifen; 0.1, 1, 10, 15, 25, 50 μM dozlarda klomifen ile nafoxidin ilaçlarının uygulandığı deney grupları ve sadece besi ortamı eklenen kontrol grupları ile ilaçları çözmede kullanılan alkolün eklendiği grupların renk yoğunluğuna göre dağılımı çizelge 4.1.' de gösterilmiştir.

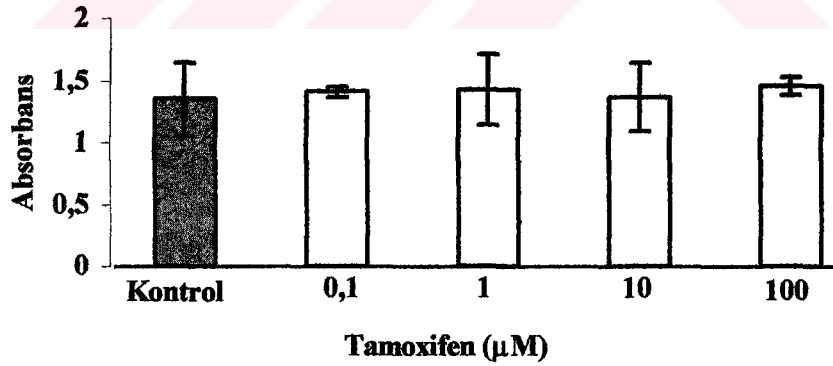
Kontrol	1,347 $\pm$ 0,296; n= 306			
Alkol	1,358 $\pm$ 0,271; n= 253			
Dozlar	Tamoxifen	4-hidroksi Tamoxifen	Klomifen	Nafoxidin
0.1 μM	1,405 $\pm$ 0,042 n= 16	1,414 $\pm$ 0,06 n= 16	1,423 $\pm$ 0,177 n= 64	1,440 $\pm$ 0,267 n= 64
1 μM	1,421 $\pm$ 0,286 n= 30	1,463 $\pm$ 0,257 n= 32	1,445 $\pm$ 0,172 n= 64	1,354 $\pm$ 0,327 n= 64
10 μM	1,365 $\pm$ 0,275 n= 30	1,311 $\pm$ 0,209 n= 30	1,443 $\pm$ 0,240 n= 64	1,436 $\pm$ 0,340 n= 64
15 μM			0,746 $\pm$ 0,088 n= 32	0,788 $\pm$ 0,126 n= 64
25 μM			0,161 $\pm$ 0,019 n= 32	0,153 $\pm$ 0,021 n= 24
50 μM			0,142 $\pm$ 0,008 n= 32	0,132 $\pm$ 0,009 n= 32
100 μM	1,454 $\pm$ 0,072 n= 30	1,450 $\pm$ 0,083 n= 30		

Çizelge 4.1. Kontrol, alkol ve ilaç uygulanan grupların renk yoğunluklarının rakamsal değerlerinin toplu gösterimi.

Çizelge 4.1.'de görüldüğü gibi kontrol grubu ile alkol grubu birbirleriyle karşılaştırıldıklarında istatistiksel bir fark bulunmamıştır ($p > 0,01$). Bu sonuç çözücü olarak kullanılan alkol dozunun hücre yaşamını etkilemediği anlamına gelir.

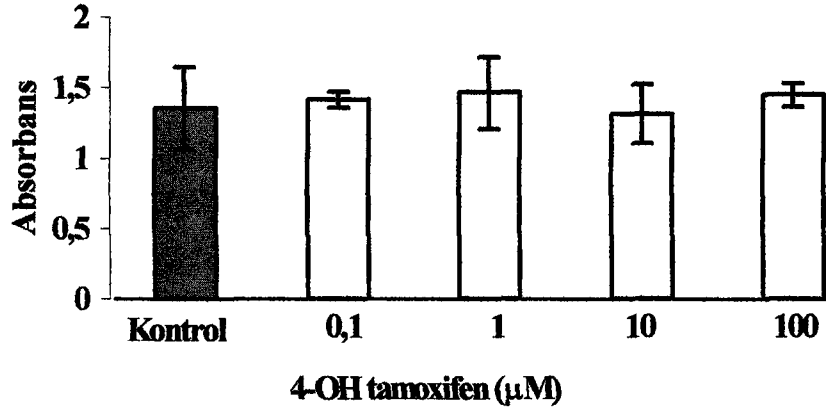


Şekil 4.2. Kontrol ile alkol grubunun karşılaştırılması.



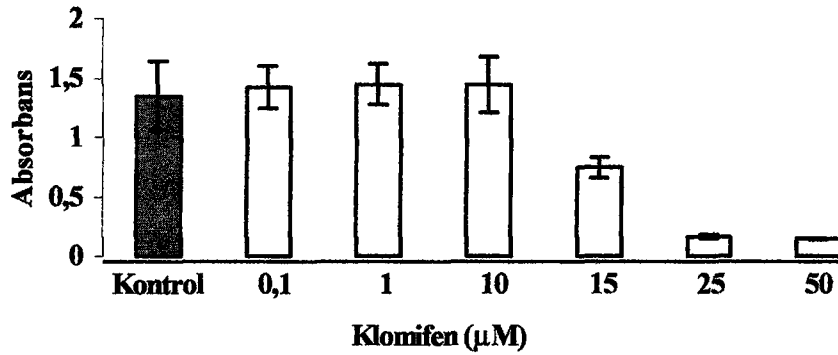
Şekil 4.3. Farklı dozlardaki tamoxifen ile kontrol grubunun karşılaştırılması.

Tamoxifenin 0.1, 1, 10 ve 100 µM dozları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,01$).



Şekil 4.4. Uygulanan 4- hidroksi tamoxifen dozları ile kontrol grubunun karşılaştırılması.

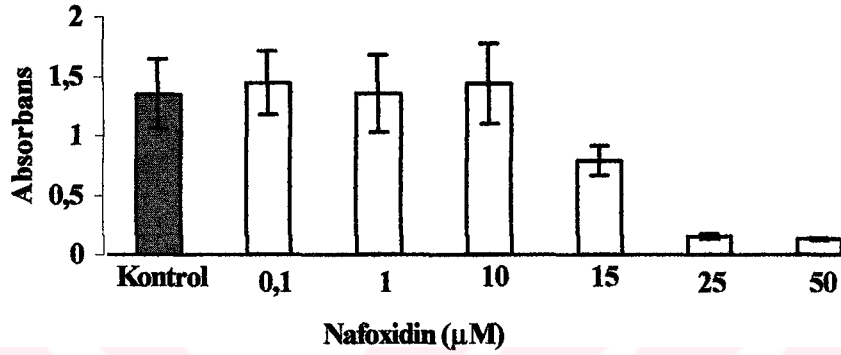
4- hidroksi tamoxifenin 0,1, 1, 10 ve 100 μM dozları ile kontrol grubu arasında istatistiksel farklılık yoktur ($p > 0,01$).



Şekil 4.5. Kullanılan klomifen dozları ile kontrol grubunun karşılaştırılması.

Benzer şekilde, klomifenin 0,1, 1 ve 10 μM dozları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,01$). Fakat 15 μM dozundan itibaren 25 ve 50 μM dozları kontrole göre renk yoğunluğunda önemli bir azalma gözlenmiştir. Klomifenin 15, 25 ve 50 μM dozları ile kontrol grubu arasında anlamlı fark

bulunmuştur ($p < 0,01$). 15 μM ' da kontrol grubuna göre %45 azalma, 25 μM ' da %88 azalma ve 50 μM ' da %89 azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.6. Uygulanan nafoxidinin dozları ile kontrol grubunun karşılaştırılması.

Nafoxidinin 0.1, 1 ve 10 μM dozları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,01$). 15 μM dozundan itibaren 25 ve 50 μM dozları kontrole göre renk yoğunluğunda önemli bir azalma gözlenmiştir. Nafoxidinin 15, 25 ve 50 μM dozları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,01$). 15 μM ' da kontrol grubuna göre %41 azalma, 25 μM ' da %88 azalma ve 50 μM ' da %90 azalma gözlenmiştir.

Klomifenin kontrole göre anlamlı fark gösteren 15, 25, 50 μM dozları kendi aralarında karşılaştırıldığında 15 μM ile 25 ve 50 μM arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p < 0,01$). 25 μM ile 50 μM arasında anlamlı bir fark yoktur ($p > 0,01$). Nafoxidinin kontrole göre anlamlı fark gösteren 15, 25, 50 μM dozları kendi aralarında karşılaştırıldığında 15 μM ile 25 ve 50 μM arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p < 0,01$). 25 μM ile 50 μM arasında anlamlı bir fark yoktur ($p > 0,01$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tamoxifen ve nafoxidin estrogen reseptörü pozitif meme kanseri ve bazı uterus kanserlerinin tedavisinde (31), klomifen ise antifertilite ajanı olarak kullanılmaktadır (16,17). Ayrıca tamoxifen, metaboliti 4-OH tamoxifen, nafoxidin ve klomifenin in vivo ile in vitro ortamlarda çeşitli tümörlerde antikanserojen oldukları gösterilmiştir. Ancak bu ilaçlardan 4-OH tamoxifen ve tamoxifenin glioblastoma multiforme hücreleri üzerinde yapılmış az sayıda çalışma vardır. Nafoxidin ve klomifen ise glioma tümör hücreleri ile yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Antiöstrojenler laboratuvar çalışmalarında hormona bağlı tümörlerin bazısında etkili, bazısında ise etkisiz bulunmuştur. Neye göre etkili, neye göre etkisiz olduklarına dair tam bir açıklama yapılmamış ve etki mekanizmalarıyla ilgili çelişkili varsayımlar öne sürülmüştür. Yaygın olarak öne sürülen hipotezler şöyle özetlenebilir: estrogenle yarışmalı olarak inhibisyon, PKC yolunun inhisiyonu, kalmodulinle yarışmalı inhibisyon, estrogen reseptöründen bağımsız antiöstrojen bağlanma bölgeleri yoluyla, büyüme faktörlerinin inhibisiyonu, hücre döngüsünün G₁ fazı üzerine inhibisyon ve dopamin reseptörü inhibisiyonu gibi. Bu kadar çok hipotez arasından ortak bir genelleme yapmanın mümkün olmadığını bu çalışmaları yapanlarda kabul etmektedir.

Tamoxifen, 4-OH tamoxifen, klomifen ve nafoxidinin sıçan uterusunda ve MCF-7 hücre dizisinde estrogen reseptörüne bağlanarak büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiştir (35). Buna karşın ER negatif ovaryum kanser hücre dizisinde ise tamoxifenin yine inhibisyon yaptığı gözlenmiştir. Tamoxifenin bu etkisinin 10 µM dozda ve hücre döngüsünün G₁ safhasında olduğu bildirilmiş, ancak neden böyle etki yaptığına dair tatmin edici bir açıklama yapılmamıştır (15,28). Meme kanserinde 4-OH tamoxifen ve tamoxifen ile yapılan bir başka çalışmada, bu ilaçlar estrogenin aktivitesini engellemelerinin yanında, ER' e bağlı olarak büyüme faktörlerinin etkisini önledikleri saptanmış, fakat ER negatif hücre dizileri üzerinde böyle bir etki göstermemişlerdir (19).

Antiestrojenlerin estrogen reseptörlerinden farklı bölgelere (AEBS) de bağlandıkları ama bu bölgelerin ilaçların farmakolojik etkilerindeki rolünün bilinmediği söylenmiştir (42). Büyümeyi inhibe eden mekanizmalardan birinin de PKC inhibisyonu yoluyla olabileceği belirtilmiştir. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalardan birinde insan korpus luteumu ile sıçan uterusunda 100 μ M dozlarda tamoxifen, 4-OH tamoxifen ve klomifenin PKC aktivitesini tamamen inhibe ettiği gözlenmiştir. Bulunan sonucun hastaların tedavisi üzerinde farmakolojik etkilerinin açıklaması olup olmayacağını bilmediklerini belirtmişlerdir (17). Bir diğer çalışmada, fare beyinde 30 μ M'lık tamoxifenin PKC aktivitesini önlediği (42), yine fare beyinde yapılan benzer bir çalışmada tamoxifenin 100 μ M' da PKC inhibisyon gösterdiği (38), insan kaynaklı glioma hücre dizilerinden biri olan U138 ile yapılan bir başka çalışmada çok daha düşük dozda (50 ng/ml) PKC inhibisyonu gösterdiği gözlenmiştir (36). Bunun nedeninin PKC' nin en az 7 alt ünitesi olduğu, belki de U138 hücrelerinde tamoxifene en duyarlı olan PKC alt ünitelerinden birinin varolabileceği öne sürülmüştür (36). Ne var ki bir başka çalışmada A172, U251, U87, U373, U563 düşük pasajlı glioma hücre dizileri kullanılmış ve A172 dışında diğerlerinde tamoxifen PKC inhibisyonu göstermemiştir (5). Bu son çalışmanın bir devamı olarak yapılan iki ayrı çalışmada glioblastoma multiformlu hastalara tamoxifen tedavisi uygulanmıştır. Çalışmanın birinde hastalardan bazıları tedaviye olumlu cevap verirken, diğer çalışmada kullanılan iki hastaya yüksek dozda tamoxifen verilmesine karşın olumlu bir yanıt alınamamıştır (5). Bu durumun açıklaması olarak da tamoxifenin bazı gliomalarda etkisiz olabileceği ileri sürülmüştür (5). Çalışmamızda yüksek doz olarak kabul edilen 100 μ M'lık dozda dahi tamoxifen ve 4-OH tamoxifen herhangi bir inhibisyon göstermemiştir. Ayrıca, tamoxifenin deri kanserinde (45) ve Z-75 hücre dizisinde (35) de etkisiz olduğunun gösterilmiş olması sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Çelişen bu sonuçların aydınlatılması için yeni çalışmaların yapılması gerektiğine inanıyoruz.

Nafoxidin, klomifen ve tamoxifen ile ilgili lösemide yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada tamoxifenin etkisinin diğerlerine göre çok az olduğu, nafoxidinin ise en çok

etkili olduğu gözlenmiştir (22). Nafoxidin ve klomifen ile meme kanseri ve ovaryum kanseri üzerine yapılan çalışmalarda tümörü küçültücü yönde etkili oldukları gösterilmiştir (kullanılan doz verilmemiş) (35, 39). Bizim çalışmamızda nafoxidin ve klomifen 15µM'lık dozlardan sonra glioma hücrelerinde inhibe edici etki göstermiştir. İlaçların etkili olduğu dozun yüksek olmaması yapılabilecek in vivo çalışmaları için umut vericidir. İlaçların bu etkilerinin hangi yolla olduğu hala esrarını korumaktadır. Ancak şunu söyleyebiliriz nonsteroidal ilaçların antiestrogen etkileri kullanılan parametreye ve deney şartlarına bağlıdır.



KAYNAKLAR

1. Acevedo-Duncan M., Zhang R., Cooper D. R. and Greenberg H. M.: Effects of interferon and PKC modulators on human glioma protein kinase C, cell proliferation, and cell cycle, *Neurochemical research*, 22(7), 775-784, (1997).
2. Alley M. C., Scudiero D. A., Monks A, Hursey M. L., and Czerwinski M. J.: Feasibility of drug screening with panels of human tumour cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Research*, 48, 589-601, (1988).
3. Asaoka Y., Nakamura S., Yoshida K. and Nishizuka Y.: Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation, *Trends Biochemical Science*, 17, 414-418, (1992).
4. Atagündüz P.: Farmakoloji, (Berkman K., Oktay Ş., Onat F. ve Gören Z., türkçe çeviri editörleri), Böl: 27, 263-278, Nobel Kitabevi, İstanbul, (1997).
5. Baltuch H. G., Couldwell T. W. and Villemure J.: Protein kinase C inhibitors suppress cell growth in established and low-passage glioma cell lines. A comparison between Staurosporine and Tamoxifen, *Neurosurgery*, 33(3), (1993).
6. Barile F.A.: In vitro methods in pharmaceutical research, (Castell V. J.ed.), Vol:3, 3-33, Academic press, California, USA, (1997).
7. Beekman J.M., Allan G. F., Tsai S. Y. and O'Malley B. W.: Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational

change in the ligand binding domain, *Molecular Endocrinology*, 7(10), 1266-1274, (1993).

8. Breakfield X. O. and Stern D. S. F.: Oncogenes in neural tumours, *Trends Neuroscience*, 9, 150-155, (1986).

9. Carmichael J., DeGraff W. G., Gazdar A. F., Minna J. D. and Mitchell J. B.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing,, *Cancer Research*, 47, 936-942, (1987).

10. Carroll R. S., Zhang J. and Dashner K.: Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms, *Neurosurgery*, 37(3), 496-503, (1995).

11. Cupis A. and Favoni R. E.: Oestrogen/growth factor cross-talk in breast carcinoma: a specific target for novel antioestrogens, *TIPS*, 18, 245-251, (1997).

12. Darling J. L.: Human cancer in primary culture, (Masters J. R. W., ed.), Vol: 10, 231-251, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, (1991).

13. Denizot F. and Lang R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *Journal of immunological methods*, 89,271-277, (1989).

14. Durmaz R., Deliorman S., Uyar R., Işıksoy S., Erol K., Tel E.: The effects of anticancer drugs in combination with nimodipin and verapamil on cultured cells of glioblastoma multiforme, *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 101, 238-244, (1999).

15. Ercoli A., Scambia G., Fattorossi A., Raspaglio G., Battaglia A. and Cicchillitti L.: Comparative study on the induction of cytostasis and apoptosis by ICI 182.780 and Tamoxifen in an oestrogen receptor- negative ovarian cancer cell line, *Int. J. Cancer*, 76, 47-54, (1998).
16. Ersöz B.: Harper' in *Biyokimyası*, Böl: 45- 51, (581-594), (648-665), Barış Kitabevi, İstanbul, (1993).
17. Eyster M.K. and Clark M. R.: Nonsteroidal antiestrogen inhibition of protein kinase C in human corpus luteum and placenta, *Biochemical Pharmacology*, 38(20), 3497-3503, (1989).
18. Ferreti C., Blengio M., Ghi P., Racca S., Genazzani E. and Portaleone P.: Tamoxifen counteracts estradiol induced effects on striatal and hyphyseal dopamine receptors, *Life Sciences*, 42, 2457-2465, (1988).
19. Freiss G., Prebois C. and Rochefort H.: Anti-steroidal and anti-growth factor activities of antiestrogens, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 37(6), 777-781, (1990).
20. Goustin A. S., Leof E. B. and Shipley G. D.: Growth factors and cancer, *Cancer Research*, 46, 1015-1029, (1986).
21. Gullotta F., Schindler F., Schmutzler R. ve Weeks S. A.: GFAP in brain tumour diagnosis: possibilities and limitations, *Pathol. Res. Pract.*, 180(1), 54-60, (1985) (abstract).
22. Hayon T., Dvilansky A., Oriev L. ve Nathan I.: Nonsteroidal antiestrogens induce apoptosis in HL60 and MOLT3 leukemic cells and protein kinase C, *Anticancer Research*, 19(3A), 2089-2093, (1999) (abstract).

- 23.** Jordan C. V. and Murphy C. S.: Endocrine pharmacology of antiestrogens as antitumour agents, *Endocrine Reviews*, 11(4), 578-610, (1990).
- 24.** Kayaalp O.: Rasyonel tedavi yönteminden tıbbi farmakoloji, Böl:41, 1007-1080, Güneş Kitabevi, İstanbul, (1994).
- 25.** Lam P.: Tamoxifen is a calmodulin antagonist in the activation of cAMP phosphodiesterase, *Biochemical and biophysical research communications*, 118(1), 27-32, (1984).
- 26.** Loğoğlu G.: Tıbbi Fizyoloji, (Doğan A., türkçe çeviri ed.), Böl:23, 449-495, Barış Kitabevi, İstanbul, (1995).
- 27.** Miller M. A. and Katzenellenbogen B. S.: Characterization and quantitation of antiestrogen binding sites in estrogen receptor-positive and – negative human breast cancer cell lines, *Cancer research*, 43, 3094-3100, (1983).
- 28.** Musgrove A. E., Wakeling A. E. and Sutherland R. L.: Points of action of estrogen antagonists and a calmodulin antagonist within the MCF-7 human breast cancer cell cycle, *Cancer research*, 49, 2398-2404, (1989).
- 29.** Nakadate T., Jeng A. Y. and Blumberg P. M.: Comparison of protein kinase C functional assays to clarify mechanisms of inhibitor action, *Biochemical Pharmacology*, 37(8), 1541-1545, (1988).
- 30.** Nishizuka Y.: The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation, *Nature*, 334, 661-665, (1988).

31. Nola M., Jukic S., Ilic F. J., Babic D. ve Uzaveric B.: Effects of tamoxifen on steroid hormone receptors and hormone concentration and results of DNA analysis by flow cytometry in endometrial carcinoma, *Gynecol. Oncol.*, 72(3), 331-336, (1999) (abstract).
32. O' Brian A. C.: Inhibition of protein kinase C by Tamoxifen, *Cancer Research*, 45, 2462-2465, (1985).
33. O'Brian C. A., Liskamp R. M., Solomon D. H., and Weinstein I. B.: Antiestrogen binding sites: general and comparative properties, *J. Steroid Biochem.*, 31(4B), 665-669, (1988).
34. Osborne C. K., Boldt D. H. and Estrada P.: Human breast cancer cell cycle synchronization by estrogens and antiestrogens in culture, *Cancer research*, 44, 1433-1439, (1984).
35. Pasqualini J. R., Sumida C. and Giambiagi N.: Pharmacodynamic and biological effects of anti-estrogens in different models, *J. Steroid Biochem.*, 31, 613-643, (1988).
36. Pollack F. I., Randall M. S., Kristofik M. P., Kelly R. H. and Selker R. G.: Effect of Tamoxifen on DNA synthesis and proliferation of human malignant glioma lines in vitro, *Cancer Research*, 50, 7134-7138, (1990).
37. Quarmby V. E., Fox-Davies C. and Newbold R. R.: Response of the mouse uterus to nafoxidine stimulation: agonism and antagonism, *Biology of Reproduction*, 38, 945-954, (1988).

38. Reddel R.R., Murphy L. C., Hall R. H. and Sutherland R. L. Differential sensitivity of human breast cancer cell lines to the growth-inhibitory effects of tamoxifen, *Cancer Research*, 45, 1525-1531, (1985).
39. Ruenitz C. P., Bagley J. R. and Mokler C. M.: Metabolism of Clomiphene in the rat, oestrogen receptor affinity and antiestrogenic activity of Clomiphene metabolites, *Biochemical Pharmacology*, 32(19), 2941-2947, (1983).
40. Russell S. D. ve Rubinstein J. L.: Pathology of tumours of the nervous systems, 219-247, London, (1989).
41. Shughrue P.J., Lane M. V. and Merchenthaler I.: Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the rat medial preoptic nucleus by estrogenic and antiestrogenic compounds: an in situ hybridization study, *Endocrinology*, 138(12), 5476-5484, (1997).
42. Su H., Mazzei G. J., Vogler W. R. and Kuo J. F.: Effect of Tamoxifen, a nonsteroidal antiestrogen, on phospholipid/calcium-dependent protein kinase and phosphorylation of its endogenous substrate proteins from the rat brain and ovary, *Biochemical Pharmacology*, 34(20), 3649-3653, (1985).
43. Sun-KH: Estrogens receptors in patients with brain tumours, *Chung-Hua-Wai-Ko-Tsa-Chih.*, 27(5), 299-300, (1989) (abstract).
44. Tang B. L., Teo C. C., Sim K. Y. and Kon O. L.: Cytostatic effect of antiestrogens in lymphoid cells: relationship to high affinity antiestrogen-binding sites and cholesterol, *Biochimica et biophysica acta*, 1014(2), 162-172, (1989).

45. Toma S., Ugolini D. ve Palumbo R.: Tamoxifen in the treatment of metastatic malignant melanoma: still a controversy ? (review), *Int. J. Oncol.*, 15(2), 321-337, (1999) (abstract).
46. Tsuruo T., Lida H. and Sakurai Y.: Circumvention of Vincristine and Adriamycin resistance in vitro and in vivo by calcium influx blockers, *Cancer Research*, 43, 2905-2910, (1983).
47. Tuncel P.: Klinik biyokimya, (Ulukaya E., türkçe çeviri ed.), Böl: 16, 225-240, Nobel Kitabevi, Bursa, (1998).
48. Vignon F., Bouton M. M. And Rochefort H.: Antiestrogens inhibit the mitogenic effect of growth factors on breast cancer cells in the total absence of estrogens, (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*), 146, 1502-1508, (1987).
49. Weiss J. D. and Gurpide E.: Non-genomic effects of estrogens and antiestrogens, *J. Steroid Biochem.*, 31(4B), 671-676, (1988).
50. Westphal M. and Herrmann H.: Growth factor biology and oncogene activation in human gliomas and their implications for specific therapeutic concepts, *Neurosurgery*, 25(5), 681-694, (1989).
51. Young R. L., Goldzieher J. W., Chakraborty P. K. and Bridges C. N.: Qualitative differences in estrogenic/ antiestrogenic effects of clomiphene and zuclomiphene, *Int. J. Fertil.*, 36(5), 291-295, (1991).
52. Yörükhan S., Balkancı D. ve Finci S.: Tıbbi Fizyoloji, (Çavuşoğlu H., türkçe çeviri ed.), Böl: 74, 925-932, Nobel kitabevi, (1996).

53. Zhou-Li F., Alabaladejo V., Joly-Pharaboz M. O. and Andre J.: Antiestrogens prevent the stimulatory effect of L-Tri-iodothyronine on cell proliferation, *Endocrinology*, 130(3), 1145-1152, (1992).



ÖZGEÇMİŞ

Mayıs, 1975 Eskişehir’ de doğdu. Orta öğretimini ve liseyi aynı şehirde tamamladı. 1992 yılında Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesini kazandı. 1996 yılında aynı bölümden mezun oldu. Temmuz, 1996’ dan itibaren 1 yıl İngiltere’ de yabancı dil eğitimi gördü. Eylül, 1997 yılında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalı’ nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Aralık, 1998’ de Eskişehir SSK Hastanesi’ne Eczacı olarak girdi. Halen aynı görevde çalışmasını sürdürmektedir.

