

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİYELOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN MEME KANSERİ  
TEDAVİSİNDE KULLANILAN TAMOKSİFENE  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Kimyager Candan ARIÖZ

**FBE Biyomühendislik Bölümünden  
Hazırlanan**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Huriye KUZU (YTÜ)**

**İSTANBUL, 2007**

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİYELOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN MEME KANSERİ  
TEDAVİSİNDE KULLANILAN TAMOKSİFENE  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Kimyager Candan ARIÖZ

FBE Biyomühendislik Bölümünden  
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ



Tez Danışmanı : Prof. Dr. Huriye KUZU (YTÜ)

Prof. Dr. Ayşe Ogan



Prof. Dr. Atila Akhverdizade



İSTANBUL, 2007

## İÇİNDEKİLER

|  | Sayfa |
|--|-------|
| SİMGE LİSTESİ .....  | iv    |
| KISALTIMA LİSTESİ.....   | v     |
| ŞEKİL LİSTESİ.....   | vi    |
| ÇİZELGE LİSTESİ .....  | xi    |
| ÖNSÖZ .....  | xii   |
| ÖZET .....   | xiii  |
| ABSTRACT .....   | xiv   |
| 1. GİRİŞ .....   | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER .....  | 2     |
| 2.1 Meme Kanseri .....   | 2     |
| 2.2 Östrojenler ve Meme Kanserindeki Rollerini .....   | 3     |
| 2.3 Aromataz (Östrojen Sentetaz) Enzimi .....  | 7     |
| 2.4 Meme Kanserinde Endokrin Tedavisi .....  | 8     |
| 2.4.1 Seçimli Östrojen Reseptör Modülatörleri (SERMs).....   | 9     |
| 2.4.2. Aromataz İnhibitörleri .....  | 16    |
| 2.4.2.1 Anastrozol (Arimidex) [2,2'-[5-1H-1,2,4-triazol-1-y-metil)-1,3-fenilen]bis(2-metil propiyononitril)] ..... | 18    |
| 2.5 Sıvı Kromatografisi-tandem Mass Spektrofotometre (LC-MS) Çalışmaları.....                                      | 21    |
| 2.5.1 Tamoksifen ile yapılan LC-MS Çalışmaları .....   | 21    |
| 2.6 Kanseri ve Serbest Radikaller .....  | 25    |
| 2.6.1 Kanseri Oluşumu .....  | 25    |
| 2.6.2 Reaktif Oksijen Türleri (ROS) .....  | 27    |
| 2.6.3 Serbest Radikallerin Vücuttaki Hasarları.....  | 28    |
| 2.6.4 Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Kanseri Oluşumundaki Etkisi .....   | 30    |
| 2.7 Miyeloperoksidaz .....   | 32    |
| 2.7.1 Miyeloperoksidaz ve Polimorfonükleer Lökositler (PMNs).....  | 32    |
| 2.7.2 Miyeloperoksidazın Yapısı .....  | 33    |
| 2.7.3 Miyeloperoksidazın Vücuttaki Önemi.....  | 38    |
| 2.7.4 Vücutta Miyeloperoksidaz Üretimi .....   | 39    |
| 2.7.5 Miyeloperoksidaz Enzimi Tarafından Güçlü Oksidanların Üretimi .....  | 39    |
| 2.7.6 MPO Tarafından Üretilen Diğer Reaktif Oksijen Türleri.....   | 40    |
| 3. DENEYSEL ÇALIŞMA .....  | 42    |
| 3.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler .....   | 42    |
| 3.1.1 Kullanılan Cihazlar .....  | 42    |
| 3.1.2 Kullanılan Malzemeler.....   | 43    |
| 3.1.3 Kullanılan Thermo IEC Marka Soğutmalı Santrifüjün Teçhizat ve Çalışma Parametreleri .....                    | 43    |
| 3.1.4 Kullanılan UV-Vis (JASCO V-530) spektrofotometresinin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri .....                | 43    |
| 3.1.5 Kullanılan UV-Vis (UV-1700 PharmaSpec) spektrofotometresinin Teçhizat ve                                     |       |

|         |  |     |
|---------|--|-----|
|         | Çalışma Parametreleri.....   | 44  |
| 3.1.6   | Kullanılan SHIMADZU Marka LC-MS Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri .....   | 44  |
| 3.1.7   | Kullanılan HPLC Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri.....  | 45  |
| 3.2     | Kullanılan Kimyasallar .....   | 46  |
| 3.3     | Deneylerin Yapılışı.....   | 47  |
| 3.3.1   | Miyeloperoksidaz Enziminin (EC 3.11.1.7) Kan Örneklerinden İzole Edilmesi..  | 47  |
| 3.3.2   | Miyeloperoksidaz Enziminin Saflaştırılması .....   | 47  |
| 3.3.2.1 | Ön Çalışmalar.....   | 47  |
| 3.3.2.2 | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ile çöktürme.....  | 48  |
| 3.3.2.3 | Ultrafiltrasyon işlemi .....   | 48  |
| 3.3.3   | Miyeloperoksidazın Aktivite Tayini.....  | 51  |
| 3.3.4   | Miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisinin UV-Vis Spektrofotometre ile İncelenmesi.....  | 51  |
| 3.3.5   | Miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisinin FT-IR Spektrometresi ile İncelenmesi52  |     |
| 3.3.6   | Miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisinin LC-MS Cihazı ile İncelenmesi .....  | 53  |
| 4.      | SONUÇLAR ve TARTIŞMA .....   | 54  |
| 4.1     | Kan örneklerinden elde edilen liziz çözeltilerine (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi uygulanması .....                 | 54  |
| 4.2     | Kandan izole edilen Miyeloperoksidazın Saflaştırılmasında Kullanılacak Yöntemin Belirlenmesi .....   | 54  |
| 4.2.1   | Asetat tamponu (pH 5.6) ile Yapılan Uygulamalar.....   | 54  |
| 4.2.2   | PBS tamponu (pH 7.0) ile Yapılan Uygulamalar.....  | 56  |
| 4.3     | Miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisinin UV-Vis Spektrofotometre ile İzlenmesi .....   | 58  |
| 4.3.1   | Miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisi .....  | 58  |
| 4.3.2   | Radikal yakalayıcı (Free Radical Trap; 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit) varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisi.....                   | 61  |
| 4.4     | Miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisinin FT-IR Spektrometre ile İncelenmesi64  |     |
| 4.4.1   | Miyeloperoksidazın Tamoksifene Belirli Sürelerde Etkisi.....   | 66  |
| 4.4.2   | Radikal Yakalayıcı (Free Radical Trap; 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit) varlığında Miyeloperoksidazın Tamoksifene Belirli Sürelerde Etkisi..... | 66  |
| 4.5     | Miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisinin LC-MS Sisteminde İncelenmesi .....  | 67  |
| 4.5.1   | Miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisi .....  | 70  |
| 4.5.1.1 | 0 dakika bekleme ile reaksiyon sonuçları .....   | 70  |
| 4.5.1.2 | 60 dakika bekleme ile reaksiyon sonuçları .....  | 73  |
| 4.5.1.3 | 120 dakika bekleme ile reaksiyon sonuçları .....   | 74  |
| 4.5.2   | Radikal Yakalayıcı (Free Radical Trap; 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit) varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisi.....                   | 76  |
| 4.5.2.1 | Radikal yakalayıcı (Free Radical Trap; 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit) varlığında 0 dakika bekleme ile reaksiyon sonuçları .....               | 77  |
| 4.5.2.2 | Radikal yakalayıcı (Free Radical Trap; 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit) varlığında 60 dakika bekleme ile reaksiyon sonuçları .....              | 80  |
| 4.5.2.3 | Radikal yakalayıcı (Free Radical Trap; 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit) varlığında 120 dakika bekleme ile reaksiyon sonuçları .....             | 82  |
|         | KAYNAKLAR.....   | 100 |
|         | İNTERNET KAYNAKLARI.....   | 103 |
|         | ÖZGEÇMİŞ.....  | 104 |

## SİMGE LİSTESİ

|     |                                 |
|-----|---------------------------------|
| °C  | derece santigrad                |
| g   | gram                            |
| L   | litre                           |
| ml  | mililitre                       |
| μ   | mikro                           |
| μl  | mikrolitre                      |
| M   | molar                           |
| mM  | milimolar                       |
| μm  | mikrometre (mikron)             |
| nm  | nanometre                       |
| mm  | milimetre                       |
| cm  | santimetre                      |
| dk  | dakika                          |
| m/z | kütle/yük değeri                |
| g   | relativ santrifüj kuvveti (RCF) |
| kDa | kilodalton                      |
| α   | alfa                            |
| β   | beta                            |

## KISALTMA LİSTESİ

|   |   |
|---|---|
| CYP   | Sitokrom  |
| CYP   | Sitokrom P450 Enzim ailesi                      |
| E1  | Estron  |
| E2  | 17 $\beta$ -Estradiol (Estradiol)               |
| ER  | Östrojen reseptörü                              |
| DNA   | Deoksiribonükleik Asid                          |
| CE  | Katekol östrojenleri                            |
| P450 <sub>arom</sub>                                | Aromataz enzimi                                 |
| MA  | Megesterol asetat                               |
| SERMs   | Seçimli Östrojen Reseptör Modülatörleri         |
| AI  | Aromataz İnhibitörleri                          |
| TAM   | Tamoksifen                                      |
| RAL   | Raloksifen                                      |
| ERE   | Östrojen cevap elemanı                          |
| FDA   | Food and Drug Administration                    |
| MORE  | Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation      |
| UGT   | UDP-glukouronosiltransferaz                     |
| M1  | Raloksifen-6- $\beta$ - glukuronid              |
| M2  | Raloksifen-4'- $\beta$ - glukuronid             |
| PMNs  | Polimorfonükleer Lökositler                     |
| ROS   | Reaktif Oksijen Türleri                         |
| MPO   | Miyeloperoksidaz Enzimi                         |
| EPO   | Eosonofilperoksidaz Enzimi                      |
| TPO   | Tiroidperoksidaz Enzimi                         |
| LPO   | Laktoperoksidaz Enzimi                          |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                       | Hidrojen peroksid                               |
| HOCl  | Hipoklorür asidi                                |
| NaCl  | Sodyum klorür                                   |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat               |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat            |
| EDTA  | Etilendiamintetraasetik asid                    |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>     | Amonyum sülfat                                  |
| NaOH  | Sodyum hidroksid                                |
| HRP   | Horseradish Peroksidaz Enzimi                   |
| PBS   | Fosfat tamponu                                  |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                      | Sülfürik asid                                   |
| Con A   | Concanavalin A-Sepharose 4B                     |
| PES   | Polietersülfon                                  |
| NO <sub>2</sub> Cl                                  | Nitril klorür                                   |
| SCN <sup>-</sup>                                    | Tiyosiyanat                                     |
| Cl <sup>-</sup>                                     | Klor iyonu                                      |
| ·O <sub>2</sub> <sup>-</sup>                        | Süperoksid anyon radikali                       |
| RZ  | Reinheitszahl Değeri                            |
| UV  | Ultraviyole                                     |
| A   | Absorbans                                       |
| HPLC  | Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi            |
| LC-MS   | Sıvı kromatografisi tandem Kütle Spektroskopisi |
| FT-IR   | Fourier Transformed Infrared Spektrometresi     |

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Şekil 2.1  | Östrojenlerin förmülleri [3]. .....   | 3  |
| Şekil 2.2  | Östrojen metabolizması (Mitrunen ve Hirvonen, 2003).....  | 5  |
| Şekil 2.3  | Steroid ve steroid yapıda olmayan aromataz inhibitörleri (Mouridsen vd., 2003)..  | 6  |
| Şekil 2.4  | Aromataz enziminin testestrondan östrojen sentezlemesi ve reseptöre bağlanması[4].....  | 7  |
| Şekil 2.5  | Tedavi görmeyen hastalarda hastalığın tekrarlanma olasılığı [5]. .....  | 8  |
| Şekil 2.6  | Tamoksifenin (Nolvadex) 2 ve 3 boyutlu yapıları [6].....  | 11 |
| Şekil 2.7  | Östrojen reseptörünün sinyal mekanizması (Diez-Perez, 2006).....  | 12 |
| Şekil 2.8  | Raloksifenin molekül yapısı [7].....  | 14 |
| Şekil 2.9  | Raloksifenin 2 ve 3 boyutlu yapısı [6]. .....   | 14 |
| Şekil 2.10 | Raloksifen ve iki glukuronidinin yapıları (M1 ve M2) (Trontelj vd., 2007).....  | 15 |
| Şekil 2.11 | Raloksifen glukouronidasyonu (Wempe vd., 2007).....   | 16 |
| Şekil 2.12 | Menapoz sonrasında aromataz inhibitörleri ve Tamoksifenin etki mekanizmalarının karşılaştırılması (Howell, 2005).....                                 | 17 |
| Şekil 2.13 | Steroid yapıda olmayan dönüşümlü kompetatif aromataz inhibitörleri (Baum, 2005). .....  | 18 |
| Şekil 2.14 | Bir triazol türevi olan Anastrozolün (Arimidex) molekül formülü (Buzdar, 1997).19   |    |
| Şekil 2.15 | Anastrozolün çalışma mekanizması [8].....   | 19 |
| Şekil 2.16 | Aromataz enziminin reaksiyonu (Brodie A., 2002). .....  | 20 |
| Şekil 2.17 | Hormon reseptörü pozitif hastalarda Anastrozol ve Tamoksifen kullanımı ile hastalığın tekrarlanma yüzdelerinin karşılaştırılması (Baum, 2005). .....  | 21 |
| Şekil 2.18 | DNA hasarına yol açabilen Tamoksifen metabolitleri (Lim vd., 1997).....   | 22 |
| Şekil 2.19 | Tamoksifen ve 4-hidroksitamoksifenin metabolik aktivasyon mekanizması (Lim vd., 1997). .....  | 22 |
| Şekil 2.20 | 4-Hidroksitamoksifen metabolitlerinin eş-zamanlı HPLC-ESI-MS kromatogramı (Lim vd., 1997). .....  | 23 |
| Şekil 2.21 | Tamoksifen ve 4-hidroksitamoksifen dimerinin MS yarılmalari (Lim vd., 1997).24  |    |
| Şekil 2.22 | Serbest radikal ürünlerden oluşan 4-hidroksitamoksifen dimerlerinin muhtemel yapıları (Lim vd., 1997). .....  | 24 |
| Şekil 2.23 | Tamoksifen aren oksidlerinin, serbest radikal araürünlerinin ve dimerik metabolitlerin oluşumu (Lim vd., 1997). .....                                 | 25 |
| Şekil 2.24 | Kanser oluşumunda üç aşama ve bu aşamalardaki oksidatif stres seviyeleri (Valko vd., 2006). .....   | 26 |
| Şekil 2.25 | Oksijen indirgenme reaksiyonları (Murray vd.,1991).....   | 27 |
| Şekil 2.26 | Nötrofil fagositozu ve fagolizozomlar içinde bakterinin yok edilmesi için gerçekleşen oksijen-bağımlı miyeloperoksidaz sistemi (Murray vd.,1991)..... | 29 |
| Şekil 2.27 | Farklı enflamasyon türleri ve bunların tümör oluşumundaki etkileri (Aggarwal vd., 2006). .....  | 31 |
| Şekil 2.28 | Miyeloperoksidazın 3 boyutlu yapısı [9].....  | 34 |
| Şekil 2.29 | Miyeloperoksidaz dimer yapısı (Zincirlerarası disülfid bağı (Cys <sub>C</sub> 153-Cys <sub>D</sub> 153) gösterilmiştir) (Fiedler vd., 2000).....      | 34 |
| Şekil 2.30 | Miyeloperoksidaz enziminin monomer yapısı (Fiedler vd., 2000). .....  | 35 |
| Şekil 2.31 | Miyeloperoksidaz enzimi Hem grubu (Fiedler vd., 2000). .....  | 36 |
| Şekil 2.32 | Miyeloperoksidazın Hem grubu ve bağlı aminoasidler (Fiedler vd., 2000).....   | 36 |
| Şekil 2.33 | MPO dimeri (Fiedler vd., 2000).....   | 37 |
| Şekil 2.34 | Miyeloperoksidazın oksidasyon-redüksiyon döngüsü (Arnhold, 2004). .....   | 40 |
| Şekil 2.35 | Miyeloperoksidazın ürünü olan hipoklorür asidinden türeyen reaktif oksijen ve   |    |

|              |   |    |
|--------------|---|----|
|              | azotlu bileşiklerin oluşumu (Arnhold, 2004).....  | 41 |
| Şekil 2.36   | Halojenür iyonlarının hidrojen peroksit ile asidik ortamda olan peroksitasyon reaksiyonu (Fiedler vd., 2000).....   | 41 |
| Şekil 4.1    | Sülfat çöktürmesinin etkisinin UV-Vis spektrofotometrede izlenmesi.....   | 54 |
| Şekil 4.2    | Asetat tamponu (pH 5.6) ile yıkanan örneğin RZ <sub>403</sub> ve RZ <sub>430</sub> değerlerinin yıkama sayıları ile değişmesi. ....   | 54 |
| Şekil 4.3    | Sülfat çöktürmesi yapılmadan önceki havuzun, sülfat çöktürmesi sonrası havuzun, asetat tamponu (pH 5.6) ile bir defa yıkanan örneğin ve membrandan geçen alt fazın absorbanz spektrumları. .... | 55 |
| Şekil 4.4    | Asetat tamponu ile bir çok defa yıkama ile örneğin absorbanz spektrumunda, dolayısıyla RZ değerinde değişme. ....   | 55 |
| Şekil 4.5    | PBS tamponu (pH 7.0) ile yıkanan örneğin RZ <sub>403</sub> ve RZ <sub>430</sub> değerlerinin yıkama ile değişmesi. ....   | 56 |
| Şekil 4.6    | Sülfat çöktürmesi yapılmadan önceki havuzun, sülfat çöktürmesi sonrası havuzun, PBS tamponu (pH 7.0) ile bir defa yıkanan örneğin ve membrandan geçen alt fazın absorbanz spektrumları. ....    | 56 |
| Şekil 4.7    | PBS tamponu (pH 7.0) ile bir çok defa yıkama ile örneğin absorbanz spektrumunda, dolayısıyla RZ değerinde değişme. ....   | 57 |
| Şekil 4.8    | Saflaştırılan miyeloperoksidazın HPLC sisteminde UV detektör ile alınan kromatogramı.....   | 57 |
| Şekil 4.9    | 37°C'da miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 10 dakika süreyle alınan absorbanz spektrumları.....   | 58 |
| Şekil 4.10   | Miyeloperoksidaz enzimi, Tamoksifen ve 37°C'da MPO'nun Tamoksifene 10.dakika süreyle etkisi sonunda alınan absorbanz spektrumları. ....   | 59 |
| Şekil 4.11   | 37°C'da miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika süreyle alınan absorbanz spektrumları.....  | 60 |
| Şekil 4.12   | Radikal yakalayıcı varlığında 37°C'da miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 10 dakika süreyle alınan absorbanz spektrumları. ....  | 61 |
| Şekil 4.13   | Miyeloperoksidaz enzimi, Tamoksifen, 5,5-Dimetil-1-pirolin N-oksit (Free radical trap) ve 37°C'da MPO'nun Tamoksifene 10.dakika süreyle etkisi sonunda alınan absorbanz spektrumları.....       | 62 |
| Şekil 4.14   | 5,5-Dimetil-1-pirolin N-oksit varlığında, 37°C'da miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika süreyle alınan absorbanz spektrumları.....  | 63 |
| Şekil 4.15   | Tamoksifenin FT-IR spektrumu.....   | 64 |
| Şekil 4.16   | MPO enziminin FT-IR spektrumu .....   | 64 |
| Şekil 4.17   | 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksitin (Radikal Yakalayıcı; Free Radical Trap) FT-IR spektrumu .....  | 65 |
| Şekil 4.18   | HEPES'in FT-IR spektrumu .....  | 65 |
| Şekil 4.19   | Miyeloperoksidazın Tamoksifene farklı sürelerde etkisinden sonra örneklerin FT-IR spektrumları .....  | 66 |
| Şekil 4.20   | Radikal yakalayıcı (Free Radical Trap; 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit) varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene farklı sürelerde etkisinden sonra örneklerin FT-IR spektrumları.....           | 66 |
| Şekil 4.21   | Asetonitrilde çözülüp sisteme verilen Tamoksifenin LC-MS cihazında alınmış kromatogramı.....  | 67 |
| Şekil 4.21.1 | Asetonitrilde çözülüp sisteme verilen Tamoksifenin alıkonma zamanı: 25.693-26.360 dk.olan MS yarılmamasının MS kromatogramında belirtilmesi.....  | 67 |
| Şekil 4.21.2 | Asetonitrilde çözülüp sisteme verilen Tamoksifenin alıkonma zamanı: 25.693-26.360 dk.olan MS yarılmaması.....   | 67 |
| Şekil 4.22   | HEPES tamponu içinde çözülmüş Tamoksifenin LC-MS cihazında alınmış kromatogramı.....  | 68 |



|              |  |    |
|--------------|--|----|
| Şekil 4.22.1 | HEPES tamponu içinde çözülmüş Tamoksifenin alıkonma zamanı:<br>2.047 - 3.340 dk olan MS yarılmasının MS kromatogramında belirtilmesi.....  | 68 |
| Şekil 4.22.2 | HEPES tamponu içinde çözülmüş Tamoksifenin alıkonma zamanı: 2.047 -<br>3.340 dk.olan MS yarılması.....   | 68 |
| Şekil 4.22.3 | HEPES tamponu içinde çözülmüş Tamoksifenin alıkonma zamanı:<br>25.780-26.673 dk. olan MS yarılmasının MS kromatogramında belirtilmesi..  | 69 |
| Şekil 4.22.4 | HEPES tamponu içinde çözülmüş Tamoksifenin alıkonma zamanı:<br>25.780-26.673 dk. olan MS yarılması.....  | 69 |
| Şekil 4.23   | Miyeloperoksidazın Tamoksifen etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS<br>cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı.....  | 70 |
| Şekil 4.23.1 | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS<br>cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 7.613 - 7.927 dk.olan MS yarılmasının<br>kromatogramda belirtilmesi.....     | 70 |
| Şekil 4.23.2 | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS<br>cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 7.613 - 7.927 dk.olan MS yarılması   | 70 |
| Şekil 4.23.3 | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS<br>cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 13.760 -14.073 dk.olan MS<br>yarılmasının kromatogramda belirtilmesi .....   | 71 |
| Şekil 4.23.4 | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS<br>cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 13.760 -14.073 dk.olan MS<br>yarılması .....                                 | 71 |
| Şekil 4.23.5 | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS<br>cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.307 - 27.107 dk.olan MS<br>yarılmasının kromatogramda belirtilmesi .....  | 71 |
| Şekil 4.23.6 | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS<br>cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.307 - 27.107 dk.olan MS<br>yarılması .....                                | 72 |
| Şekil 4.23.7 | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS<br>cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 31.613 - 31.973 dk.olan MS<br>yarılmasının kromatogramda belirtilmesi .....  | 72 |
| Şekil 4.23.8 | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS<br>cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 31.613 - 31.973 dk.olan MS<br>yarılması .....                                | 72 |
| Şekil 4.24   | Miyeloperoksidazın Tamoksifen etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS<br>cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı.....   | 73 |
| Şekil 4.24.1 | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS<br>cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 2.180 - 2.673 dk.olan MS<br>yarılmasının kromatogramda belirtilmesi .....   | 73 |
| Şekil 4.24.2 | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS<br>cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 2.180 - 2.673 dk.olan MS<br>yarılması .....                                 | 73 |
| Şekil 4.24.3 | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS<br>cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.320 - 27.253 dk.olan MS<br>yarılmasının kromatogramda belirtilmesi ..... | 74 |
| Şekil 4.24.4 | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS<br>cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.320 - 27.253 dk.olan MS<br>yarılması .....                               | 74 |
| Şekil 4.25   | Miyeloperoksidazın Tamoksifen etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS<br>cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı.....  | 74 |
| Şekil 4.25.1 | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS<br>cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 2.180 - 3.293 dk. olan MS  |    |

|              |   |    |
|--------------|---|----|
|              | yarılmasının kromatogramda belirtilmesi .....   | 75 |
| Şekil 4.25.2 | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 2.180 - 3.293 dk.olan MS yarılması .....   | 75 |
| Şekil 4.25.3 | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.360 - 27.253 dk. olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi .....                              | 75 |
| Şekil 4.25.4 | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.360 - 27.253 dk. olan MS yarılması .....  | 76 |
| Şekil 4.26   | Radikal yakalayıcının LC-MS cihazında alınmış kromatogramı.....   | 76 |
| Şekil 4.26.1 | Radikal yakalayıcının alıkonma zamanı: 2.500 - 3.480 dk.olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi.....  | 76 |
| Şekil 4.26.2 | Radikal yakalayıcının alıkonma zamanı: 2.500 - 3.480 dk.olan MS yarılması .   | 77 |
| Şekil 4.27   | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı .....  | 77 |
| Şekil 4.27.1 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 3.693- 5.700 dk.olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi .....      | 78 |
| Şekil 4.27.2 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 3.693- 5.700 dk.olan MS yarılması.....                                     | 78 |
| Şekil 4.27.3 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 11.220 - 12.960 dk. olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi .....  | 78 |
| Şekil 4.27.4 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 11.220 - 12.960 dk.olan MS yarılması.....                                  | 79 |
| Şekil 4.27.5 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.227 - 27.293 dk. olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi .....  | 79 |
| Şekil 4.27.6 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.227 - 27.293 dk. olan MS yarılması.....                                 | 79 |
| Şekil 4.28   | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı .....   | 80 |
| Şekil 4.28.1 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 3.873 - 5.833 dk. olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi .....   | 80 |
| Şekil 4.28.2 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 3.873 - 5.833 dk. olan MS yarılması.....                                  | 80 |
| Şekil 4.28.3 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 11.487 - 12.867 dk. olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi ..... | 81 |
| Şekil 4.28.4 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 11.487 - 12.867 dk. olan MS yarılması.....                                | 81 |
| Şekil 4.28.5 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.320 - 27.473 dk. olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi ..... | 81 |

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| Şekil 4.28.6 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.320 - 27.473 dk. olan MS yarılması.....                                 | 82 |
| Şekil 4.29   | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı .....   | 82 |
| Şekil 4.29.1 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 4.100 - 5.387 dk. olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi.....    | 83 |
| Şekil 4.29.2 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 4.100 - 5.387 dk. olan MS yarılması.....                                  | 83 |
| Şekil 4.29.3 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 11.847-12.780 dk.olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi.....     | 83 |
| Şekil 4.29.4 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 11.847-12.780 dk. olan MS yarılması.....                                  | 84 |
| Şekil 4.29.5 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.140 - 27.473 dk. olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi ..... | 84 |
| Şekil 4.29.6 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.140 - 27.473 dk. olan MS yarılması.....                                | 84 |
| Şekil 4.30   | Tamoksifen, 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit, HEPES ve Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisi ile oluşacak muhtemel yapıların formülleri .....  | 98 |
| Şekil 4.31   | Miyeloperoksidaz etkisi ile Tamoksifenin yapısında kopması muhtemel bağlar   | 99 |

## ÇİZELGE LİSTESİ

Şekil

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| Çizelge 2.1  | Serbest radikaller ve yarı ömürleri (Bergendi vd., 1999). .....  | 28 |
| Çizelge 3.1  | Kullanılan Kimyasalların Listesi.....  | 46 |
| Çizelge 3.2  | Asetat tamponu (pH 5.6) ile yıkanan örneğin üst ve alt fazlarının $A_{280}$ , $A_{403}$ , $A_{430}$ ve $RZ_{403}$ , $RZ_{430}$ değerleri . ..... | 49 |
| Çizelge 3.3  | PBS tamponu (pH 7.0) ile yıkanan örneğin üst ve alt fazlarının $A_{280}$ , $A_{403}$ , $A_{430}$ ve $RZ_{403}$ , $RZ_{430}$ değerleri.....       | 50 |
| Çizelge 4.1  | Tamoksifenin FT-IR cihazında alınan spektrumunun yorumlanması .....  | 87 |
| Çizelge 4.2  | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinin FT-IR cihazında alınan spektrumunun yorumlanması.....   | 88 |
| Çizelge 4.3  | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinin FT-IR cihazında alınan spektrumunun yorumlanması.....                     | 89 |
| Çizelge 4.4  | Tamoksifenin LC-MS cihazında alınmış kromatogramındaki MS yarımlarının yorumlanması.....   | 91 |
| Çizelge 4.5  | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile elde edilen MS yarımlarının yorumlanması .....                                     | 92 |
| Çizelge 4.6  | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile elde edilen MS yarımlarının yorumlanması .....                                    | 94 |
| Çizelge 4.7  | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile elde edilen MS yarımlarının yorumlanması .....                                   | 94 |
| Çizelge 4.8  | Radikal yakalayıcının MS yarımlarının yorumlanması .....   | 95 |
| Çizelge 4.9  | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile elde edilen MS yarımlarının yorumlanması.....        | 95 |
| Çizelge 4.10 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile elde edilen MS yarımlarının yorumlanması.....       | 96 |
| Çizelge 4.11 | Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile elde edilen MS yarımlarının yorumlanması.....      | 96 |

## ÖNSÖZ

Lisans ve tüm yüksek lisans yaşantım boyunca benden değerli bilgilerini esirgemedi bana her konuda değerli görüşleriyle yol gösteren ve beni hiçbir konuda yalnız bırakmayan, tez çalışmam süresince bana her türlü desteği veren tez yöneticim ve çok değerli hocam Y.T.Ü Biyomühendislik Bölüm Başkanı sayın Prof. Dr. Huriye KUZU'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasında iki buçuk senedir birlikte büyük bir uyumla çalıştığım, çalışma arkadaşım Y.T.Ü Biyomühendislik Bölümü yüksek lisans öğrencilerinden Yeliz BAŞARAN'a;

Bu tezin yapılmasında emeği geçen Y.T.Ü Biyomühendislik Bölümü doktora öğrencilerinden başta Erdem KARABULUT olmak üzere Zafer Ömer ÖZDEMİR ve Kadriye KIZILBEY ATICI ve ayrıca Kimya Mühendisliği'nde görevli sayın Cem ÇAKMAK'a,

Kan örneklerini temin etmede bizden yardımlarını esirgemeyen Y.T.Ü Biyomühendislik Bölümü doktora öğrencilerinden başta Mithat ÇELEBİ olmak üzere Erdem KARABULUT ve Murat TOPUZOGULLARI'na ve ayrıca Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü yüksek lisans öğrencilerinden Aysu YARMAN'a,

Bu mesleği bana sevdiren ve araştırma bilincini bana aşılayan tüm hocalarıma,

Tüm eğitim yaşamım boyunca benden emeklerini esirgemedi karşılıksız olarak yanımda olan aileme,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Candan ARIÖZ

## ÖZET

“Miyeloperoksidaz-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup>” sistemi lökositlerde güçlü antibakteriyel ve sitotoksik etkiye sahiptir. Fizyolojik pH’da Cl<sup>-</sup> iyonlarının Cl<sup>+</sup> iyonlarına yükseltgenmesi ile birlikte miyeleloperoksidaz bazı tehlikeli reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açmaktadır. Fizyolojik koşullarda ROS’ların üretilme ile yok edilme mekanizmaları arasındaki denge bozulursa, vücutta hasar oluşabilir. Hücrede ROS birikimi radikal ilgili DNA, protein, lipid hasarı oluşturarak kanser ve nörodejeneratif bozukluklar gibi yaşa bağlı hastalıkların gelişmesinde önemli olur.

Bu tez çalışmasında Tamoksifene miyeleloperoksidaz -H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup> sisteminin etkisi ile oluşan reaksiyon ürünleri incelendi. Bu maksatla alınan insan kan örneklerinin içerdiği lökositler izole edildi. Liziz işlemiyle parçalanmış lökositlerden izole edilip saflaştırılan miyeleloperoksidazın 37°C’da ve fizyolojik pH’da (pH 7.2-7.3) Tamoksifene etkisi UV-Vis. spektrofotometre ve LC-MS, FT-IR spektrometre sistemleri ile değerlendirildi.

Daha önce yapılan çalışmalarda Tamoksifene karaciğer mikrozomlarının etkisi ile metabolitlerin oluşması ve “Horseradish” peroksidaz katalizi incelenmişti. Yapılan çalışmada ilk defa yeterli miktarda saf halde elde edilen miyeleloperoksidazın daha yüksek konsantrasyonda kullanılması, bu enzimin Tamoksifene etkisinde oluşan ürünlerin çok daha belirgin olarak izlenmesini sağladı. Tamoksifenin yapısında bulunan C-O-C eterik bağının, C=C çiftli bağının ve C-N bağının parçalanması sonucu serbest radikallerin oluştuğu kanaatine varıldı.

**Anahtar kelimeler:** MPO, Tamoksifen, meme kanseri, LC-MS, FT-IR, UV-Vis.

## ABSTRACT

“Myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup>” system has a potent antibacterial and cytotoxic effect in leucocytes. In physiological pHs, myeloperoxidase leads to the production of hazardous reactive oxygen species together with the oxidation of Cl<sup>-</sup> to Cl<sup>•</sup>. Under physiological conditions, if the balance between production and detoxification mechanisms of ROS is imbalanced, then some damages may occur in human body. Accumulation of oxidative damage in a cell causes radical-related damage to DNA, to proteins and to lipids and plays a key role in the development of age-dependent diseases such as cancer and neurodegenerative disorders.

In this thesis, reaction products formed by the effect of myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup> system on Tamoxifen, were studied. For this purpose, leucocytes found in human blood samples were isolated successfully. The effect of the purified myeloperoxidase obtained from leucocytes which was isolated by lysis formerly, on Tamoxifen at 37°C and in physiological pH (pH 7.2-7.3) was evaluated by using UV-Vis. spectrophotometer and LC-MS, FT-IR spectrometer systems.

In previous studies, metabolite formation by the effect of liver microsomes on Tamoxifen and Horseradish peroxidase catalysis was examined. In this study, the very first obtained myeloperoxidase at sufficient quantities and its usage at higher concentrations, provided to monitor products distinctly which were formed in consequence of enzyme acting on Tamoxifen. It was decided that free radicals were formed as a result of broken C-O-C etheral bond, C=C double bond and C-N bond found in Tamoxifen structure.

**Keywords:** MPO, Tamoxifen, breast cancer, LC-MS, FT-IR, UV-Vis.

## 1. GİRİŞ

Dünyada her yıl bir milyondan fazla kadına meme kanseri teşhisi konulmaktadır. Bu hastalık kadınlarda görülen tüm kanser türlerinin ¼'ünü oluşturmaktadır. Meme kanserinin en çok görüldüğü ülkeler arasında yılda 360.000 yeni vâka ile Avrupa ve yılda 200.000 yeni vâka ile U.S.A gibi gelişmiş ülkeler bulunmaktadır. Tüm dünyada meme kanseri görülme yüzdesinin artışına karşın ölüm olayları giderek gelişen görüntüleme sistemleri, erken teşhis olanakları ve tedavideki gelişmeler ile birlikte azalmaktadır. Günümüzde bu gelişmeler sayesinde teşhisten sonra 5 yıllık tedavi sonrası kurtulma oranı %75'lere varmıştır. Erken teşhis yapılmış meme kanseri tedavisi ameliyat (ya meme koruyucu tedavi ya da mastektomi) ile başlar, kemoterapi ve radyoterapi ile devam eder. Hormon reseptörü pozitif (östrojen reseptörü bulunan) olarak saptanan tümörlerde kanserli dokuyu yerinden çıkarma ya da yok etme şeklindeki uygulamayı, hormon tedavisi olarak da adlandırılan işlem izlemektedir (Jonat vd., 2006).

Endokrin tedavisi olarak bilinen hormon tedavisi menapoz sonrasında hormon reseptörü pozitif olan meme kanseri hastalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok meme kanserinin gelişmesi östrojene bağlı olduğundan, östrojen reseptöründe (ER) östrojen aktivitesini bloke eden veya östrojen sentezini inhibe eden endokrin ajanları dizayn edilmiştir. Bu amaçla üretilen ajanlar arasında kısmi agonist aktiviteye sahip olmayan antiöstrojenler ve aromataz inhibitörleri (AIs) bulunmaktadır (Howell, 2005). Bir "antiöstrojen" östrojen reseptörlerini dönüşümsüz olarak kilitler ve östrojenin reseptöre bağlanmasını önler; böylece kanser hücrelerinin bölünmesi için gereken sinyal bu hücrelere iletilemez. Buna karşın aromataz inhibitörleri ise androjenleri östrojene dönüştüren bir enzim olan aromatazı inhibe etmek üzere bu enzime bağlanarak vücuttaki östrojen konsantrasyonunu düşürür (Nicholls, 2002).

Bu tez çalışmasında bir memeli peroksidazı olan miyeloperoksidazın östrojen-bağımlı meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir *Trifeniletillen* bileşiği olan Tamoksifen ([*trans*-1-4-(2-dimetilamino)etoksi]fenil-1,2-difenil but-en) üzerine olan etkisi incelendi. Bu amaçla,

- I) Kandan miyeloperoksidaz enzimi uygun yöntemler ile izole edildi ve saflaştırıldı.
- II) Elde edilen enzim ve Tamoksifen arasındaki etkileşim 37°C'de (vücut sıcaklığı) UV-Vis Spektrofotometre, FT-IR ve LC-MS cihazlarında incelendi.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlarda görülen tüm kanserden ölümlerin %20'sini oluşturmakla birlikte en sık görülen kanser türüdür. Akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Her yıl yaklaşık olarak 180.000 kadına bu hastalık teşhisi konulmakta ve bu sayının 44.000'i de hayatını kaybetmektedir. Bu hastalık üst sosyal-ekonomik sınıftan olan kadınlarda daha sıklıkla görülmektedir.

Meme kanserinin oluşmasında birçok risk faktörü bulunmaktadır;

- Genetik yatkınlık: Birkaç genetik faktörün meme kanseri oluşumunda etkisi olduğu bilinmektedir.
- Birinci dereceden yakında bu hastalığın görülmüş olması
- Aynı hastada diğer memede daha önceden görülen meme kanseri
- Menstrüasyonun erken yaşta başlaması
- Menapozun geç başlaması
- Radyasyona maruz kalma
- Fazla miktarda alkol tüketimi
- Yüksek yağ tüketimi
- Sigara tüketimi
- Obezite
- 30 yaşından sonra ilk hamileliğin yaşanması
- Çok uzun boylu olma [1]

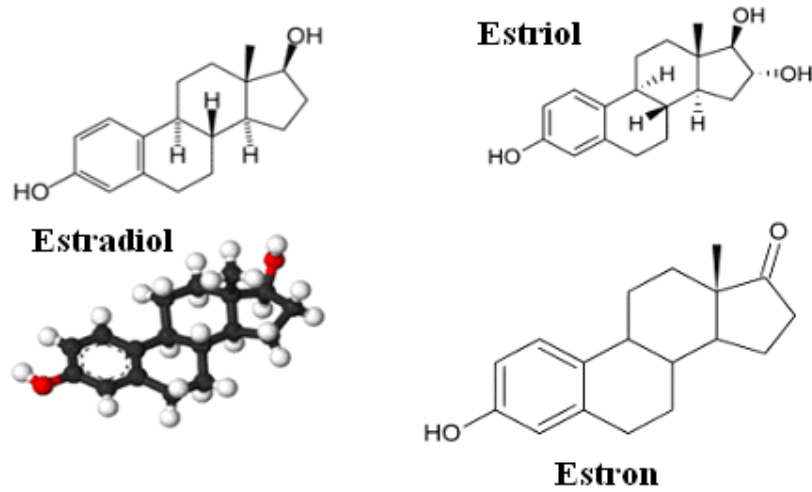
Kadın üreme hormonları olarak da bilinen östrojenlerin meme kanseri gelişiminde, başlama ve ilerlemeyi sağlamakta önemli rol oynadığı bilinmektedir (Monteiro, 2007). Bu hormonlar bazı genlerin transkripsiyon hızında olabilecek bazı değişiklikleri etkilemek üzere kromatinin bazı

spesifik bölgelerine veya DNA'ya (ya da her ikisine) bağlanmayı sağlayan hücre içi reseptörlere bağlanma yoluyla etkili olmaktadır (Murray vd., 1991).

Aromataz (EC 1.14.13) dolaşım halindeki androjenleri meme dokusunda östrojenlere dönüştüren enzimdir. Bu sitokrom P450 (CYP) izoenzimi (CYP19) östrojenlerin fizyolojik roller üstlendiği dokularda bulunmaktadır. Meme tümörlerinde bu enzimin sağlıklı dokuya oranla çok daha yüksek seviyede sentezlendiği görülmüştür. Meme tümörlerinde, epitel hücrelerin aromataz enzimini daha az bulundurduğu bilinmektedir, bunun sebebi ise epitel hücrelerin östrojen üretiminden sorumlu olan temel doku olmasıdır (Monteiro, 2007).

## 2.2 Östrojenler ve Meme Kanserindeki Roller

Östrojenlerin tümü aromatik bir A halkasına, C-3 pozisyonunda fenolik bir hidroksil grubuna ve C-13 pozisyonunda bir metil grubuna sahiptirler. C-17 pozisyonunda hidroksil grubu bulunduran Estradiol (E2) ve bu pozisyonda bir keto grubuna sahip Estron (E1) kandaki başlıca östrojenlerdir. Bunun dışında Estradiol meme dokusunda biyolojik olarak en aktif olan östrojendir (Mitrunen ve Hirvonen, 2003).



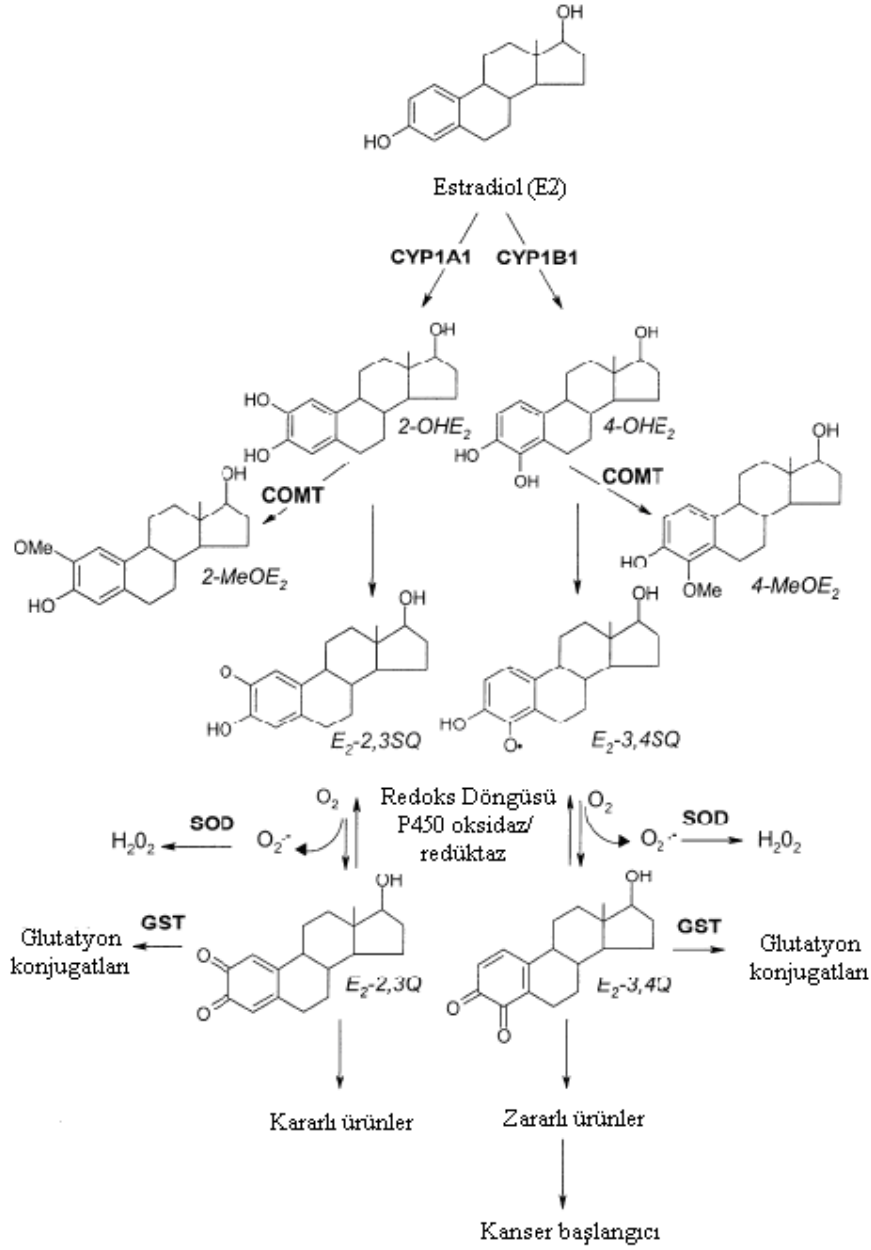
Şekil 2.1 Östrojenlerin förmülleri [3].

Östrojenler ve progesteron, ilgili olan reseptörlerine bağlanarak oluşturdukları kompleksler ile hücresel işleyişlerini gösterirler. Östrojenin reseptörüne (ER) bağlanma affinitesi,

konsantrasyonu ve çokluk yüzdesi ile belirlenmektedir. Estradiol, ER için en büyük affiniteye sahiptir. ER tümör hücresinde normal dokuya oranla daha yüksek miktarlarda bulunmaktadır. ER $\alpha$ 'ya göre daha farklı bir bağlanma affinitisine ve doku dağılımına sahip başka bir östrojen reseptörü olan ER $\beta$  ise yeni keşfedilmiştir (Mitrunen ve Hirvonen, 2003).

Meme hücresi çoğalmasını arttırdığı için östrojenlerin kanser oluşumunda başlıca rolü üstlendikleri ileri sürülmektedir. Ek olarak bu hücreler ne kadar hızlı çoğalırsa genetik hataların o kadar çok olabileceği belirtilmiştir. Hücre bölünmesi sırasında bulunan tek-sarmallı DNA, çift-sarmallı DNA'ya göre oluşan hasara daha duyarlıdır. Hedef hücreye mutasyonlar tanıtılınca, östrojenler bu genetik hataları taşıyan hücrelerin replikasyonunu arttırmaktadırlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise östrojen metabolitlerinin genetik hataların başlatıcıları olduğu öne sürülmektedir. Östrojenlerin ve metabolitlerinin serbest radikal kaynaklı DNA hasarları arasında tek-sarmal kırıkları, artan 8-hidroksiguanin oluşumu, östrojen-DNA ürünleri (adducts), protein oksidasyonları ve lipid peroksidasyonları bulunmaktadır (Mitrunen ve Hirvonen, 2003).

Östrojenler birçok CYP'ların aktivasyonu ile oksidatif bir metabolizma içine girerler. Molekülün farklı bölgelerinde hidroksil gruplarının oluşması östrojenik, östrojenik olmayan ya da kanserojenik metabolitleri oluşturacak olan östrojen metabolitlerinin biyolojik özelliklerini değiştirmektedir. Estradiol ve Estron A-halkası ya da D-halkası üzerinden hidroksillenme şeklinde iki ana yol ile metabolize edilmektedir. A-halkası üzerinden hidroksillenme ile katekol östrojenlerini (CE) (2- ya da 4-hidroksiestronlar ya da estradioller), D-halkası üzerinden hidroksillenme ile de 16 $\alpha$ -hidroksiestronu oluşturmaktadır. Katekol östrojenler, östrojenin başlıca metabolitleridir (Mitrunen ve Hirvonen, 2003).



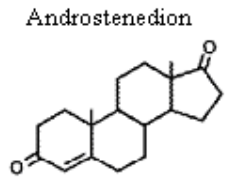
Şekil 2.2 Östrojen metabolizması (Mitrunen ve Hirvonen, 2003).

Östrojen memenin normal biyolojisinde bulunmaktadır. Menapoz öncesi kadınlarda östrojen kaynağı yumurtalıklardır. Östrojenin ve progesteronun yumurtalıkta üretimi menopozdan sonra azalmaktadır, menopoz sonrası kadınlarda yumurtalıklar ve adrenal korteks daha çok androjenleri salgılamaktadır. Androjenler yağ dokusu, deri, karaciğer, kas ve meme dokusu gibi perifer dokularda östrojenlere dönüştürülmektedir (Mouridsen vd., 2003).

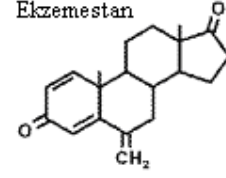
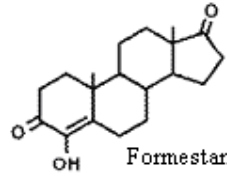
Menapoz sonrası kadınlarda menopoz öncesi kadınlara oranla dolaşımında daha az östrojen bulunur. Buna rağmen perifer dokularda östrojen sentezi arttığından menopoz sonrası kadınlarda da menopoz öncesi kadınlar kadar meme dokusunda östrojen bulunur. Bununla birlikte tümörlerdeki östrojen konsantrasyonu meme yağ dokusunda bulunandan çok daha fazladır. Bu da kısmen meme dokusunun serumdan androjen ve östrojen alımını arttıran gradyenler ve lokal sentezlenmesi nedeniyle olmaktadır. Buna ek olarak, tümörlerde Estron sülfat da östrojene dönüştürülebilir. Östrojenlerin birçok kaynağı menopoz sonrası kadınlarda tümör gelişimini destekleyebilir (Mouridsen vd., 2003).

Endokrin terapisi ile östrojen etkilerinin bloke edilmesi iki farklı yaklaşımı içermektedir. Bunlar antiöstrojenler ile östrojenin inhibisyonu veya östrojen sentetaz (aromataz) enziminin inhibe edilmesi ile östrojen üretiminin önlenmesi şeklindedir. Antiöstrojenler östrojen-bağımlı gen ekspresyonunu önlemek üzere nükleer östrojen reseptörüne (ER) kuvvetli bir biçimde bağlanırlar. Buna rağmen oluşturdukları farmakolojik aktiviteler kanser türüne, dokuya ve aktivitenin ölçüldüğü hücresel sınırlara bağlıdır. Bu ajanlar antagonist, agonist ya da kısmi agonist olarak davrandıklarından ve bir bölgede (tümör vb.) ER'nün inhibisyonunu bir başka bölgede ise (kemik vb.) ER'nün aktivasyonunu sağladıklarından Seçimli Östrojen Reseptör Modülatörleri (SERMs) olarak tanımlanmaktadır (Mouridsen vd., 2003). Steroid yapıda olmayan ve steroidlerle ilgisi bulunmayan aromataz inhibitörleri imidazoller ve triazololler olarak bilinmektedir.

### Androjen Substratı

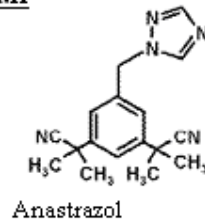
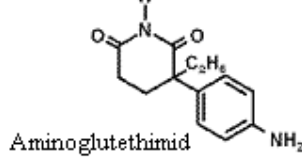


### Steroid İnhibitörler



### Steroid yapıda olmayan

#### İnhibitörler

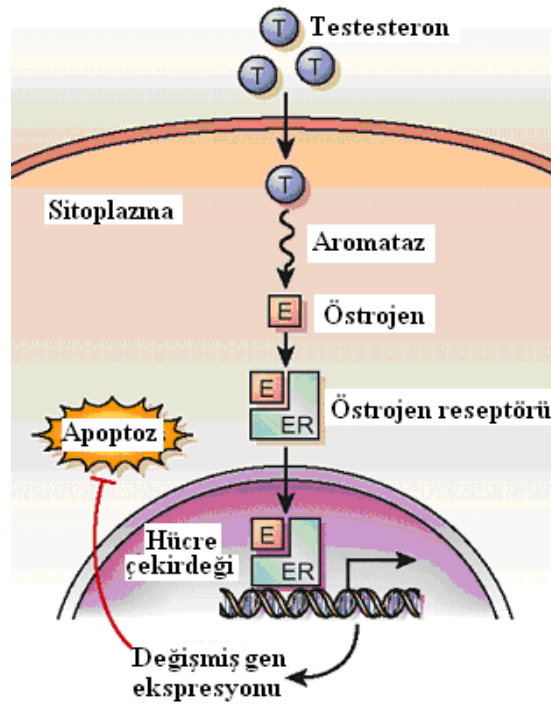


Şekil 2.3 Steroid ve steroid yapıda olmayan aromataz inhibitörleri (Mouridsen vd., 2003).

Yapısal farkları sitokrom P450'nin hem demiri ile koordinasyon bağı oluşturarak steroid hidrosillenmeye karışan azot-içeren heterosiklik kısmı esas alır. Etkili bir biçimde enzimden doğal substrat ve oksijeni uzak tutmaktadırlar. Letrozol ve Anastrozol (Şekil 2.3.) triazololler olarak bilinirler ve aromatazın kompetatif reversible inhibitörleridirler, enzimi inaktive etmezler (Mouridsen vd., 2003).

### 2.3 Aromataz (Östrojen Sentetaz) Enzimi

Androjenlerin östrojenlere aromatikleştirilmesi östrojen biyosentezinde hız belirleyici basamaktır. Aromataz enzimi yapısında sitokrom P450 hemoprotein ( $P450_{\text{arom}}$ ) ve bir flavoprotein, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid difosfat-sitokrom P450 redüktaz içeren membrana bağlı bir enzim kompleksidir. C-19 androjenleri olan androstenedion ve testosteronun C-18 östrojenleri olan Estron ile  $17\alpha$ -estradiole dönüşümü moleküler oksijenden C-19 androjen substratına sitokrom P450'deki bir flavoprotein yardımıyla elektron transferi sayesinde gerçekleşmektedir. Aromataz, sitokrom P450 enzim ailesinin oldukça yüksek korumalı bir üyesidir. İnsanlarda, tek bir gen (kromozom 15) tarafından kodlanan tek tipte aromataz enzimi olduğu düşünülmektedir.

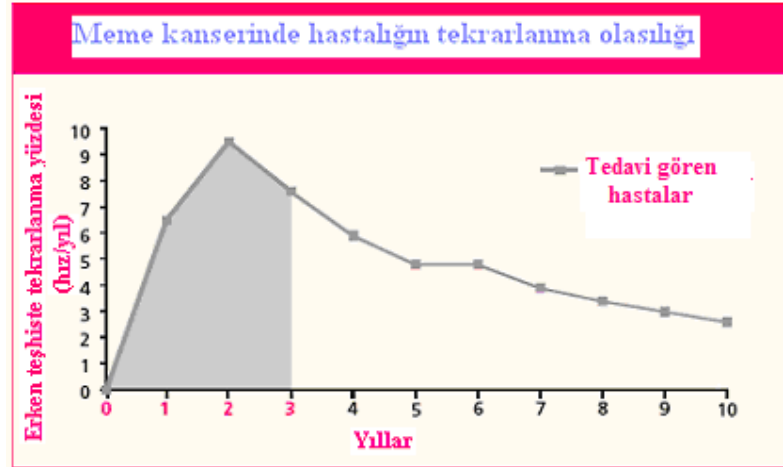


Şekil 2.4 Aromataz enziminin testestrondan östrojen sentezlemesi ve reseptöre bağlanması[4].

Aromataz steroid biyosentezinde son basamak olduğundan inhibisyon için mükemmel bir hedefdir. Bu enzimin (P450<sub>arom</sub>) bloke edilmesi aldosteron ve kortizol gibi diğer steroidlerin üretimini bozmamaktadır (Mouridsen vd., 2003).

## 2.4 Meme Kanserinde Endokrin Tedavisi

Son zamanlarda erken teşhis ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ile meme kanseri tedavisinde büyük ilerlemeler olmuştur. Eski tedavilerde meme kanseri hastalarında yeniden hastalığın görülmesini önlemek ve hastalığın oluşum yüzdesini azaltmak için sadece kanser cerrahisi yeterli görülmekteydi. Yeni tedavilerde ise hormon reseptörü-pozitif meme kanseri hastalarının erken teşhisinde ameliyatı takiben adjuvan kemoterapisi ve/veya antiöstrojen tedavisi uygulanmaktadır. Önerilen 5 yıllık Tamoksifen tedavisi ile, ameliyat sonrasında bu tedaviyi görmeyen hastalara kıyasla hastalığın tekrarlanma oranı 10 yıl için belirgin bir şekilde azaltılmıştır (Mouridsen vd., 2003).



Şekil 2.5 Tedavi görmeyen hastalarda hastalığın tekrarlanma olasılığı [5].

Hormon reseptörü-pozitif hastalarda geleneksel olarak bu hastalık Tamoksifen ile tedavi edilmekteydi. Diğer hastalar ise kemoterapi görmekteydi. Bugüne kadar Tamoksifen menapoz sonrası hormon reseptörü-pozitif tümörlere sahip kadınlarda antiöstrojen olarak kullanılmaktaydı. Tedaviye cevap vermeyen veya Tamoksifene cevap vermeyi durdurmuş hastalar ise progestinler, medroksiprogesteron asetat ya da megesterol asetat (MA) gibi ikincil ve üçüncül endokrin terapileri ile tedavi edilmekteydi. Buna ek olarak, her yeni ilaç kullanımında cevabın azalması veya bir cevap olsa bile her yeni ilaç ile cevabın süresinin kısalması olasıdır. Endokrin terapisi etkili olmadığı zamanlarda ise bir başka seçenek olarak

kemoterapi önerilmektedir. Son zamanlarda antiöstrojenlerden farklı bir çalışma mekanizmasına sahip “saf” antiöstrojenler ve seçimli AI’ler gibi yeni endokrin ajanları geliştirilmiştir (Mouridsen vd., 2003).

#### **2.4.1 Seçimli Östrojen Reseptör Modülatörleri (SERMs)**

Seçimli Östrojen Reseptör Modülatörleri (SERMs) vücutta doku-spesifik olaylarda agonist ve antagonist etkileri olabilen bir grup bileşiği oluşturmaktadırlar. SERM’lerin iki ana grubu vardır. Bu iki grup Tamoksifen, Toremifen veya İdoksifen gibi trifeniletillen türevleri ve en çok bilinen örneği Raloksifen olan benzotiyofenlerdir (Pole vd., 2005).

Meme kanseri gelişiminde özellikle de östrojen reseptörü  $\alpha$ -(ER) üzerinde antagonist etkileri olduğu keşfedildikten sonra trifeniletillenik antiöstrojenlerin mekanizmaları hakkında epeyce bilgi elde edilmiştir. Bu ilaçlar arasında kısmi antiöstrojen Tamoksifen (TAM) yüksek klinik etkinliği ve yan etkilerinin daha az olması nedeniyle çalışmalarda yaygın olarak kullanılmıştır. TAM farklı safhalardaki meme kanseri tedavisinde kullanılan en yaygın antiöstrojendir (Laïos, 2003).

##### **2.4.1.1. Trifeniletillen Türevleri**

*Trifeniletillenler* östrojen-bağımlı meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmişlerdir. Tamoksifen bu anlamda yaygın olarak meme kanseri önleyici ve tedavi edici olarak kullanılan bir bileşiktir. Toremifen de meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere piyasaya sürülmüştür. Tamoksifen kemik yoğunluğuna pozitif katkılar sağlarken, Toremifen kemik yoğunluğunda az da olsa azalmaya neden olmaktadır. Hem Toremifen hem de Tamoksifen rahimde östrojen-agonistik etkiye sahiptir. Diğer trifeniletillen bileşiklerinin araştırmaları sınırlıdır ve bazıları sadece araştırma aşamasında kalmıştır (Diez-Perez, 2006).



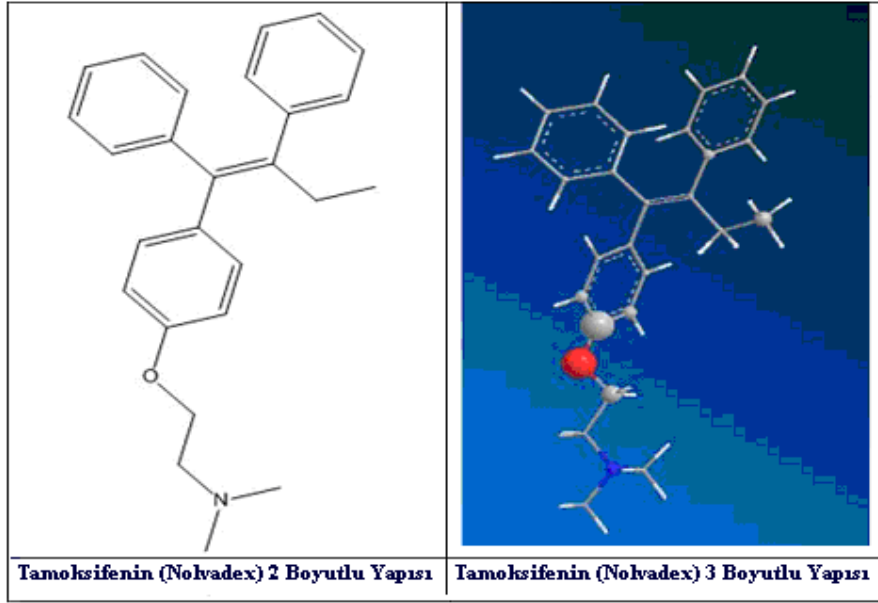
#### 2.4.1.1.1. Tamoksifen [*trans*-1-4-(2-dimetilamino)etoksi]fenil-1,2-difenil but-en

Tamoksifen meme kanseri tedavisinde ilk kez 1971 yılında kullanılmıştır. Günümüzde bu ilaç menapoz öncesi ve sonrası kadınlarda tüm meme kanseri safhalarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Adjuvan tedavisinde TAM'ın antiöstrojen özelliğinin yanında östrojen ile düzenlenen sistemlerde kemik yoğunluğunu korumasıyla ve kalbi koruyucu özellik göstermesiyle östrojen gibi davrandığı görülmüştür (Pole vd., 2005).

Östrojen reseptörü (ER) pozitif olan meme kanserlerinin tüm safhalarında Tamoksifen gibi steroid yapıda olmayan antiöstrojenlerin oral alımı tedavi seçenekleri arasındadır. İnsan ER'ü nükleer hormon reseptörleri ailesine bağlıdır. ER proteini altı farklı fonksiyonel bölgeye ayrılmış yaklaşık 595 aminoasidden oluşur ve 66 kDa molekül ağırlığına sahiptir. ER $\alpha$  en çok bilinen ER'dür; fakat ER $\beta$  da tanımlanmıştır. ER en çok hücrenin çekirdeğinde bulunur (Chawla ve Amiji, 2002).

ER $\alpha$  üreme organlarında (rahim, meme, yumurtalıklar), karaciğerde ve merkezi sinir sisteminde daha çok görülürken, ER $\beta$  ise kemik, endotel doku, akciğerler, idrar yolu, yumurtalıklar, merkezi sinir sistemi ve prostat gibi diğer dokularda daha çok görülmektedir. ER $\alpha$  565 aminoasidden ER $\beta$  ise 530 aminoasidden meydana gelen tek bir polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Östrojen reseptörleri nükleer yerleşim, hormon bağlanması, dimerleşme, DNA bağlanması ve transkripsiyon aktivasyonu için bölgeler içermektedir (Diez-Perez, 2006).

Tamoksifen ağızdan alımı ile iyi biyouyumluluğa sahip ilk Seçimli Östrojen Reseptör Modülatörüdür. Bu nedenle de yüksek risk taşıyan menapoz sonrası kadınların uzun süreli tedavilerinde kullanılmaktadır (Chawla ve Amiji, 2002).



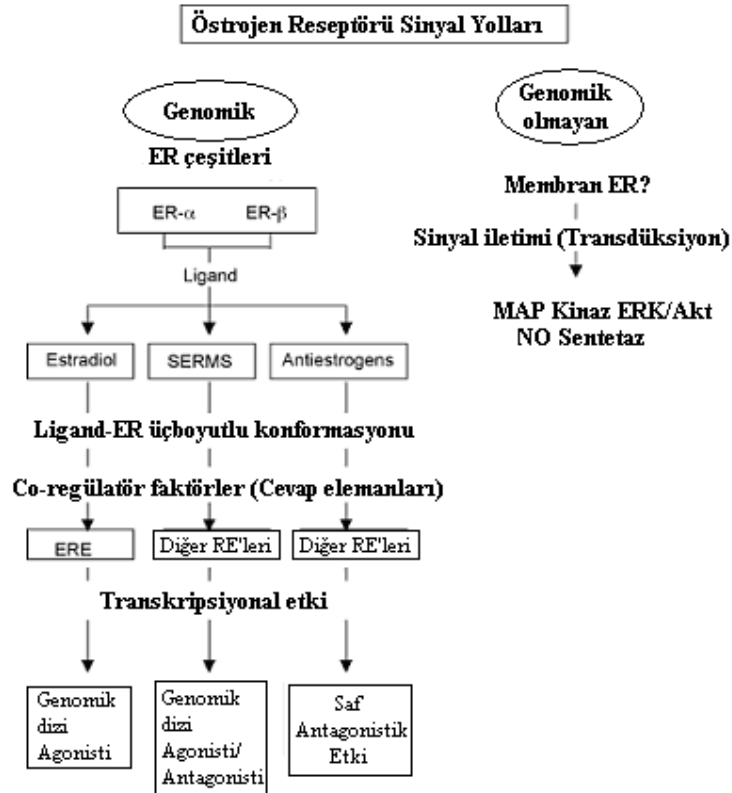
Şekil 2.6 Tamoksifenin (Nolvadex) 2 ve 3 boyutlu yapıları [6].

Tamoksifen bir antiöstrojen olarak östrojen reseptörüne bağlanma yoluyla çalışır. TAM-östrojen reseptör kompleksi DNA'ya bağlanır ve mRNA transkripsiyonunu değiştirebilir ya da bloke edebilir. Bu da daha sonra hücrel apoptoza neden olur. TAM'ın rahimde de östrojenik etkileri bulunmaktadır, bu da TAM'ın rahim kanserine yol açan en belirgin yan etkisidir. Bu yan etkisinin dışında karaciğer kanseri, pulmoner emboli, venous thrombosis ve kornea bozuklukları gibi yan etkilere sahiptir. Bu ilacın yan etki göstermesine sebep olarak ilacın biyolojik olarak aktif metabolitleri ve bunların hedef dokularda birikimi gösterilmektedir (Hu vd., 2006).

TAM kemirgenlerde de kanserojenik etkiler göstermektedir. Sıçanlar ile yapılan çalışmalarda görülen hepatik tümörlerin TAM alımından sonra oluştuğu saptanmıştır. Bu tümörlerin meydana gelmesinin Tamoksifen ve N-desmetiltamoksifenin  $\alpha$ -karbonunun sırayla hidrosillenmesi ve esterleşmesi sonucunda oluşan DNA ürünleri ile alakalı olduğu saptanmıştır. Tamoksifenin karaciğer dokusunda DNA ürünleri (adducts) ve tümörleri oluşturduğu saptandığı halde diğer dokulardaki durumu henüz çok belirgin değildir. Buna ek olarak TAM alımı DNA modifikasyonlarında artışa neden olmaktadır (Gamboa da Costa vd., 2002).

### 2.4.1.1.2. Tamoksifenin Etki Mekanizması

Tamoksifen bazı dokularda (meme dokusu vb.) östrojen-antagonistik, bazı dokularda ise (rahim dokusu vb.) östrojen-agonistik davranan bir ilaçtır. Bu karmaşık özelliğinin nedenleri bilinmemektedir. Beyinde TAM'ın eşit affinite ile bağlandığı iki östrojen reseptörü (nükleer transkripsiyon faktörleri) ER $\alpha$  ve ER $\beta$  bulunmaktadır. Bu iki reseptör biyolojik olayları düzenlemede farklı rollere sahiptir. Bu farklılığın nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. CI-628 ve Raloksifen gibi diğer östrojen antagonistlerinde olduğu gibi Tamoksifenin bu karmaşık etki mekanizması genom alakalı ya da genomla alakası olmayan mekanizmaları içeren farklı östrojen yolları ile ilgilidir. Tamoksifenin bu agonist/antagonist etkileri ER $\alpha$  ve ER $\beta$  dağılımlarındaki farklılık ile açıklanabilir. Bu farklılık da DNA cevap elemanlarında ve düzenlemede önemli olan yardımcı proteinlerdeki farklılıklara yol açmaktadır. ER $\alpha$  ve ER $\beta$  östrojen cevap elemanının (ERE) rol aldığı olaylarda genler benzer şekilde aktive olur. Buna rağmen transkripsiyonun AP-1 cevap elemanı ile düzenlendiği olaylarda 17 $\beta$ -estradiol (E2), transkripsiyonu ER $\beta$  ile değil, ER $\alpha$  ile başlatır (Eberling, 2004).



Şekil 2.7 Östrojen reseptörünün sinyal mekanizması (Diez-Perez, 2006).

Tamoksifen gen aktivitenin olduğu bölge olan ERE'ni kapsayan yollarda antagonist olarak davranır, fakat AP-1 arttırıcı elemanın (ER $\beta$  ve daha az miktarda ER $\alpha$  olduğu zaman) olduğu olaylarda agonist etki yapar. Bu nedenle ER $\alpha$  ve AP-1 cevap elemanı hem östrojenin hem de TAM'in agonist etki gösterdiği durumlarda yer almaktadır. Gen ilgili yollar dışında östrojen ve östrojen antagonistleri, gen ilgili olmayan yollardan da etkiyebilirler (membran ER'leri ve membrana bağlı ER'ler). Bu nedenle de TAM'in agonistik ve antagonistik etkileri üzerine birçok mekanizma bulunmaktadır (Eberling, 2004).

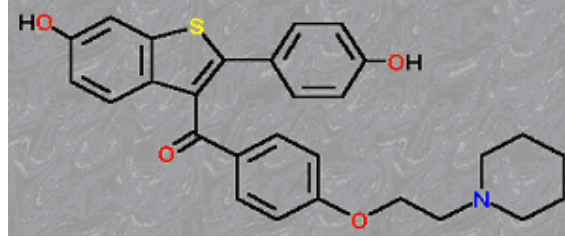
MCF-7 meme kanser hücreleri ile yapılan deneysel çalışmalar TAM ve aktif metaboliti 4-hidroksitamoksifene kısa süre maruz kalınma sonucunda ER miktarının arttığını göstermiştir. Kısmi antiöstrojenler ile yapılan araştırmalar, ER artışının bu tip farmakolojik bileşiklerin bıraktığı iz olarak değerlendirebileceğini göstermiştir. Bu davranış ise reseptör miktarını azaltan diğer ligandlar (östrojenler, saf anti-östrojenler vb.) ile gözlenen davranışlara aykırıdır. TAM tedavisi ile ER artışı nükleer matrikse TAM'in sıkı tutunması ile bağlantılıdır, ki bu sayede 17 $\beta$ -estradiol (E2) bağlama affiinitesini kaybetmesi gerçekleşir. TAM'in "kısmi antiöstrojenliği" E2 bağlayamayan bu reseptör şeklinin östrojenik uyarıcılar karşısında transkripsiyonu yürütemeyeceğini göstermektedir. Bu durumda reseptör peptid büyüme faktörlerinin ürettiği sinyallere cevap verebilmektedir. Diğer taraftan ER'ün birikimi TAM'in sitotoksik etkileri ile direkt olarak ilgili görünmese de bu ilacın yüksek dozlarına dayanıklı MCF-7 hücrelerinde bu ilişki açıkça görülmüştür (Laios, 2003).

#### **2.4.1.2. Benzotiyofen Türevleri**

*Benzotiyofenler* ise Seçimli Östrojen Reseptör Modülatörlerinin (SERMs) ikinci bir grubunu oluşturur. Raloksifen bu sınıfın en önemli molekülü olmakla birlikte en çok osteoporoz (kemik erimesi) tedavisinde ve önlenmesinde kullanılmaktadır. Bu tür SERM'ler kemik üzerinde antiresorptif (antiemilim) etkiye sahiptirler. Bu tür ilaçlar rahim üzerinde stimülatör etki göstermez fakat yağlar üzerinde östrojenik etki gösterirler. Raloksifen ER-pozitif meme kanseri hücrelerinde inhibitör etki göstermektedir. Bir başka SERM olan Arzoksifen ise faz III denemeleri aşamasındadır. Arzoksifen ve Raloksifen iskelet sistemi üzerinde benzer etki göstermekte iken meme kanseri hücrelerinde Arzoksifen Raloksifenden daha etkilidir (Diez-Perez, 2006).

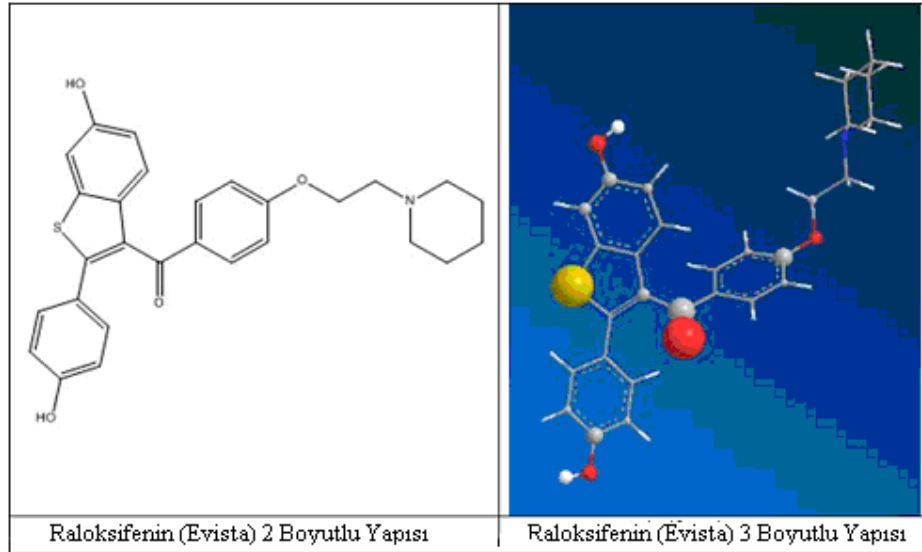
### 2.4.1.2.1. Raloksifen

Raloksifen hidroklorür seçici bir östrojen modülatörüdür. Kemikte ve karaciğerde bir östrojen agonisti gibi davranır ve bu yolla kemik mineral yoğunluğunu artırırken LDL-kolesterolü düşürür (Trontelj vd., 2007).



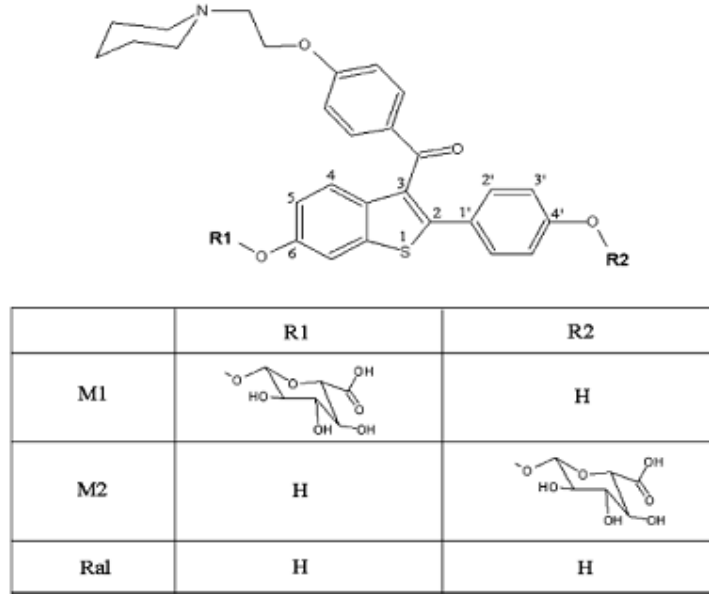
Şekil 2.8 Raloksifenin molekül yapısı [7].

1997 yılında Raloksifen hidroklorür (Evista®, bir Eli Lilly ürünü) osteoporoz (kemik erimesi) tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır. Bu etkilerinin dışında Raloksifenin meme ve rahim östrojen reseptörlerinde antagonist olarak davrandığı ortaya çıkmış ve bu nedenle de meme kanseri riskini azaltabileceği düşünülmüştür. Raloksifenin suda çözünürlüğü oldukça düşüktür ve ağızdan alınımı ile hızlı bir şekilde emilime uğrayarak metabolize olmaktadır (Wempe vd., 2007).



Şekil 2.9 Raloksifenin 2 ve 3 boyutlu yapısı [6].

Raloksifenin tedavide (MORE) meme kanserinde risk azaltıcı olarak en az Tamoksifen kadar etkili olduğu ispatlanmıştır. Raloksifenin farklı dokulardaki etki mekanizması ve farmakokinetiği henüz tam olarak anlaşılammıştır. Alınan Raloksifenin sadece %60'ı emilime uğrarken bunun sadece %2'si sistemik dolaşıma kadar ulaşabilmektedir. Emilimden geriye kalan kısım ise UDP-glukouronosiltransferaz (UGTs) ile Raloksifen glukouronidlerini (başta Raloksifen-4'-β-glukouronid (M2) ve Raloksifen-6-β-glukouronid (M1) olmak üzere) vermek üzere konjugasyona uğramaktadır (Şekil 2.10).

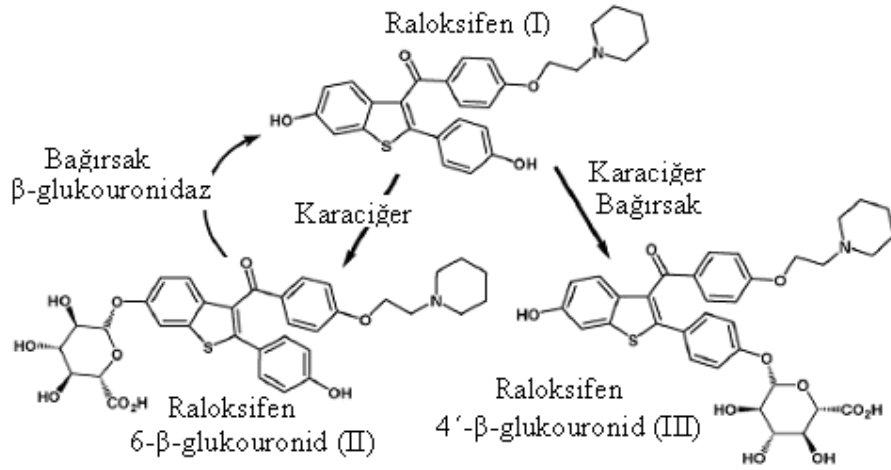


Şekil 2.10 Raloksifen ve iki glukuronidinin yapıları (M1 ve M2) (Trontelj vd., 2007).

Kemik dokusunda bu glukouronidler östrojen reseptörleri için düşük affinite gösterirken aynı metabolitler karaciğer, akciğer, dalak, böbrek ve rahim gibi birçok dokuda aktif Raloksifen türevine dönüştürülürler. Glukouronidler sindirim sistemine salgılanır ve burada bakteriyel flora tarafından Raloksifene parçalanırlar. Bu yolla Raloksifen vücut-içi döngüsünü tamamlar ve bu döngü yakalaşık olarak ~28 saat kadar sürer (Trontelj vd., 2007).

Şekil 2.11'de görüldüğü gibi raloksifen (I) glukouronidleri (II ve III) vermek üzere UDP-glukouronosil transferazlar (UGTs) tarafından metabolize edilirler. UGTs endoplazmik retikulumda bulunan membraniçi proteinlerdir. Raloksifen glukouronidleri sindirim sistemine bağırsak yoluyla ulaştırılır ve bağırsakta bulunan β-glukouronidaz tarafından tekrar Raloksifene dönüştürülür. Raloksifenin plazma konsantrasyonu yüksek pikler çizmektedir, fakat yapılan

araştırmalar Raloksifenin kanda en çok bulunan metabolitinin glukouronid III olduğunu göstermektedir (Wempe vd., 2007).



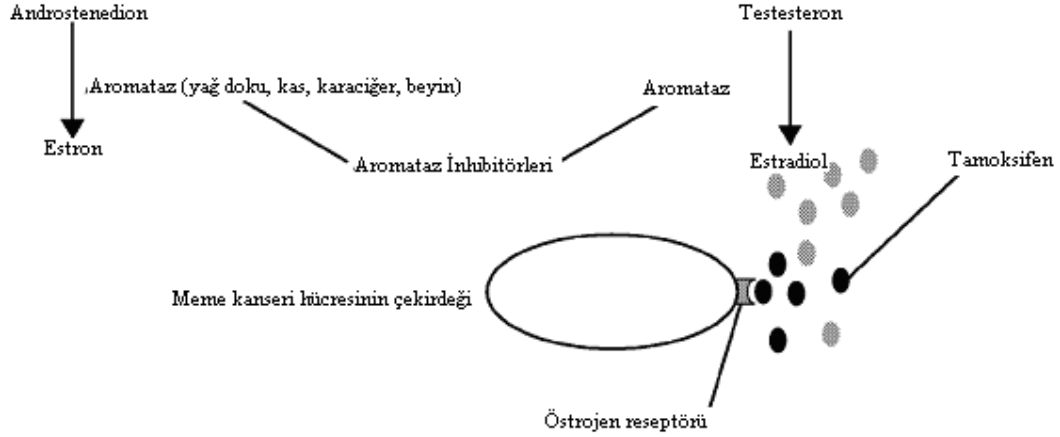
Şekil 2.11 Raloksifen glukouronidasyonu (Wempe vd., 2007).

#### 2.4.2. Aromataz İnhibitörleri

Birçok meme kanseri, büyümede östrojene bağlı olduğundan, endokrin ajanları ya östrojen sentezini bloke etmek ya da östrojen reseptöründe (ER) östrojen aktivitesini inhibe etmek üzere tasarlanmaktadır. Menapoz sonrası kadınlarda meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere yeni geliştirilen yaklaşımlar kısmi agonist aktivitesi taşımayan antiöstrojenleri ve aromataz inhibitörlerini (AIs) kapsamaktadır. Androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalizleyen enzim olan aromataz enzimini bloke eden aromataz inhibitörleri meme kanseri tedavisinde Tamoksifen kullanımının yerini almaktadır (Howell, 2005).

Hem Tamoksifen hem de aromataz inhibitörleri kanser hücrelerinin büyümesini ve bölünerek çoğalmasını sağlayan dişilik hormonu östrojeni bloke ederler. Bu nedenle de sadece östrojen reseptörleri içeren “östrojen pozitif” tümörlerde etkilidirler. Fakat bu iki ilaç östrojen işleyişini farklı iki yoldan durdurmaktadır. Bir “antiöstrojen” olarak bilinen Tamoksifen östrojen reseptörlerini dönüşümsüz olarak kilitler ve östrojenin reseptöre bağlanmasını önler ve bu yolla da kanser hücrelerinin bölünmesi için gereken sinyal belirtilen hücrelere iletilemez. Buna karşın aromataz inhibitörleri androjenleri östrojene dönüştüren bir enzim olan aromatazı inhibe etmek üzere bu enzime bağlanarak vücuttaki östrojen konsantrasyonunu düşürürler. Aromataz inhibitörleri menopoz sonrası kadınlarda daha etkilidir, çünkü menopozdan sonra yumurtalıklar fonksiyonlarını kaybederler ve vücuttaki tek östrojen kaynağı da aromataz enziminin

gerçekleştirdiği yol olur. Fakat aktif yumurtalıklara sahip menapoz öncesi kadınlarda aromataz inhibitörleri tedavi için uygun değildir; çünkü aromataz sentez yolu vücuttaki tek östrojen kaynağı değildir. Bu kadınlarda Tamoksifen gibi ilaçların antiöstrojenik etkisinin bir alternatifi henüz bulunamamıştır (Nicholls, 2002).



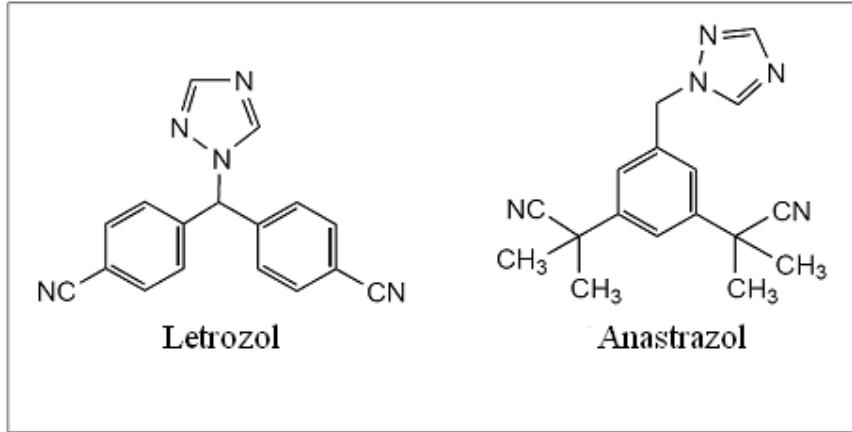
Şekil 2.12 Menapoz sonrasında aromataz inhibitörleri ve Tamoksifenin etki mekanizmalarının karşılaştırılması (Howell, 2005).

Meme kanseri tedavisinde günümüzde kullanılan steroid yapıda olmayan Letrozol ve Anastrozol dışında steroid yapıda olan Ekzemestan (exemestane) da klinik olarak kullanılmaktadır. Steroid yapıda olan ve olmayan aromataz inhibitörleri aromataz enzimini farklı yollarla inhibe etmeleri nedeniyle farklılık gösterirler ama her ikisi de östrojenin azalmasını sağlamaktadır. Steroid yapıda olan aromataz inhibitörleri aromataz enziminin aktif bölgesine bağlanmak üzere endojen ligandlar olan androstenedion ve testesteron ile yarışır ve aktif bölgeye dönüşümsüz olarak bağlanabilen ara ürünlere metabolize olur. Diğer taraftan steroid yapıda olmayan aromataz inhibitörleri aktif bölgedeki hem grubuna yüksek affinite ile dönüşümlü olarak bağlanmaktadır (Howell, 2005).

P-450 enzimlerini inhibe eden antifungal ilaçlardan türetilen birçok non-steroid bileşik de aromataz inhibitörü olarak adlandırılmıştır. Steroid yapıda olmayan inhibitörler azot içeren heterosiklik yapı gibi bir heteroatom içerir (Şekil 2.13). Bu da sitokrom P-450 enziminin hem grubuna bağlanması ile steroid yapıdaki inhibitörlerde gerçekleşen hidroksillenme ile karıştırılır. Aromataz inhibitörleri olarak birçok triazol bileşiği iyi farmakokinetik özelliklerinden dolayı dikkati çekmiştir. Aromataz için oldukça yüksek bir affiniteye sahip olan Anastrozol ve Letrozol



FDA tarafından kortizol, aldosteron ve tiroid hormonları üzerinde herhangi bir klinik etki göstermediğinden birincil tedavide kullanılmak üzere onaylanmıştır (Brodie, 2002).

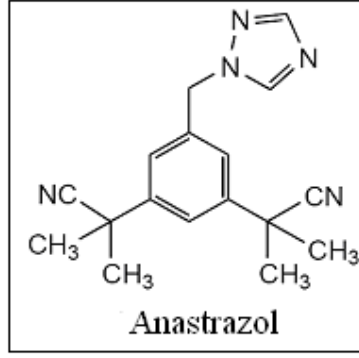


Şekil 2.13 Steroid yapıda olmayan dönüşümlü kompetatif aromataz inhibitörleri (Baum, 2005).

Yeni “üçüncü jenerasyon” aromataz inhibitörleri, aromataz için oldukça spesifikler. Bunların Tamoksifene cevap vermemiş ilerleyen meme kanseri vakalarında, menapoz sonrası ikincil tedavilerde etkili olduğu görülmüştür. Ek olarak Tamoksifen ile karşılaştırıldığında Anastrozol ve Letrozol, ilerlemiş kanser vakalarında daha başarılı sonuç vermiştir. AIs, Tamoksifende olduğu gibi kısmi östrojenik agonist aktivite göstermez, bu nedenle kullanılmaları durumunda daha az yan etki görülür. Bunun sonucunda hormon reseptörü pozitif olan menapoz sonrası kadınlara uygulanan meme kanseri tedavisinde Tamoksifenin yerini almaya adaydır (Baum, 2005).

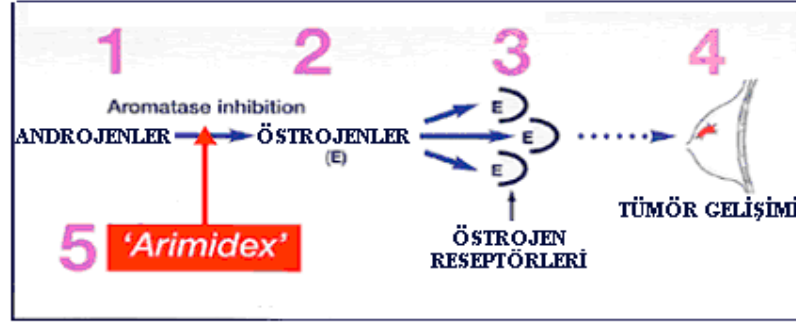
#### 2.4.2.1. Anastrozol (Arimidex) [2,2'-(5-1H-1,2,4-triazol-1-y-metil)-1,3-fenilen]bis(2-metil propiyononitril)]

Anastrozol (ARIMIDEX; Zeneca Pharmaceuticals, Wilmington, DE, U.S.A.) aromataz enzimi için oldukça yüksek ve seçici bir affiniteye sahip yeni “üçüncü jenerasyon” aromataz inhibitörlerindedir (Buzdar, 1997).



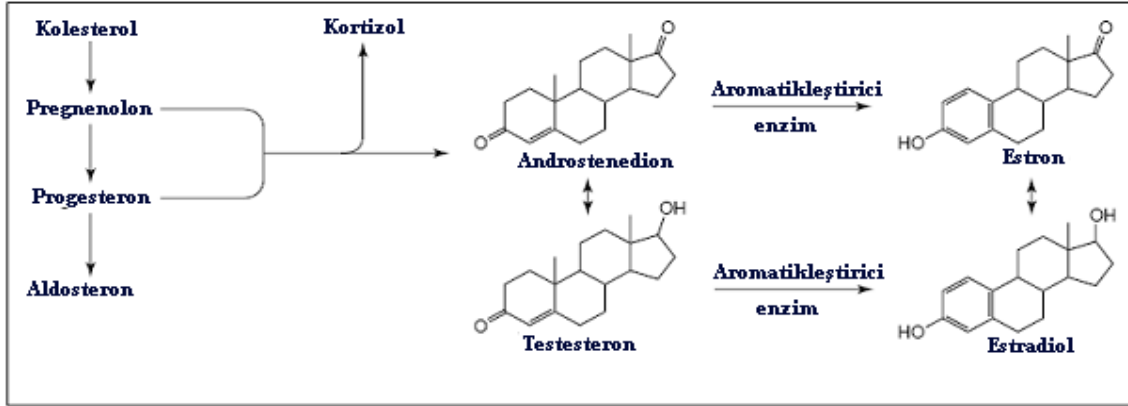
Şekil 2.14 Bir triazol türevi olan Anastrozolün (Arimidex) molekül formülü (Buzdar, 1997).

Menapoz sonrası kadınlarda östrojen sentezinin temel mekanizması androstenedionun aromataz enzimi (östrojen sentetaz) ile Estrona dönüşmesi şeklindedir (Tse E.Y.T. vd., 2004).



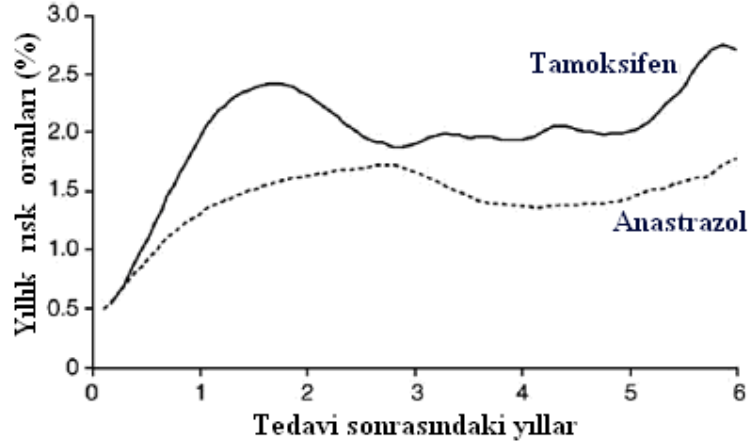
Şekil 2.15 Anastrozolün çalışma mekanizması [8].

Steroid yapıda olmayan Anastrozol (Arimidex) aromataz enzim kompleksinin sitokrom P-450 bileşenini NADPH'dan bir elektron alarak inhibe etmektedir. Estradiol seviyeleri östrojen sentezinin son basamağını inhibe edilmesiyle düşürülebilir. Anastrozolün (Arimidex) hücre içi aromatikleşmeyi %96-97 azalttığı ve plazma östrojen seviyelerini %84-94 baskıladığı görülmüştür (Tse E.Y.T. vd., 2004).



Şekil 2.16 Aromataz enziminin reaksiyonu (Brodie A., 2002).

Anastrazol günde 1 ve 10 mg alındığında aromataz aktivitesini, dolayısıyla endojen Estron ve Estradiol miktarını düşürmede etkilidir. Oldukça seçici olduğundan androjenlerin serumdaki miktarında bir değişikliğe neden olmaz (Tse E.Y.T. vd., 2004). İlacın artan dozu ile birlikte serumdaki konsantrasyonu da doğru orantılı olarak artmaktadır. Anastrazolün serumdaki konsantrasyonu vücuda alındıktan yaklaşık olarak 50 saat sonra yarıya inmektedir (1mg'lık doz için  $t_{1/2} = \approx 40.6$  saattir). Bu ilaç oldukça hızlı metabolize edilmekte ve bir dozun %10'undan azı idrarda değişikliğe uğramamış bir şekilde bulunmaktadır (Buzdar, 1997). Anastrazol ağızdan alındıktan sonra gastrointestinal sistemden emilime uğrar ve  $T_{maks.} > 2$  saattir. İlacın yaklaşık olarak %40'ı serum proteinlerine bağlanmaktadır. Anastrazol içinde CYP1A2, CYP2C9 ve CYP3A'nın da bulunduğu birçok sitokrom (CY) P450 enzimini inhibe etmekte; fakat tedavi süresince eş zamanlı olarak kullanılan CYP-metabolizli ilaçlarla birlikte fizyolojik koşullarda herhangi bir etkileşime girmemektedir (Choueiri, 2004). Anastrazol daha az kilo almaya neden olma, vajinal kanama ve kardiyovasküler rahatsızlıkların daha az görülmesine sebep olma gibi özelliklerinden dolayı Tamoksifenden daha üstün nitelikli olarak değerlendirilir. Bu nedenle gelişmiş ve yayılım gösteren meme kanseri vakalarında birincil ve ikincil tedavilerde kullanılabilir. F.D.A.'nın (U.S. Food and Drug Administration) menapoz sonrası meme kanseri hastalarında kullanımına onay verilen tek aromataz inhibitörüdür (Tse E.Y.T. vd., 2004).

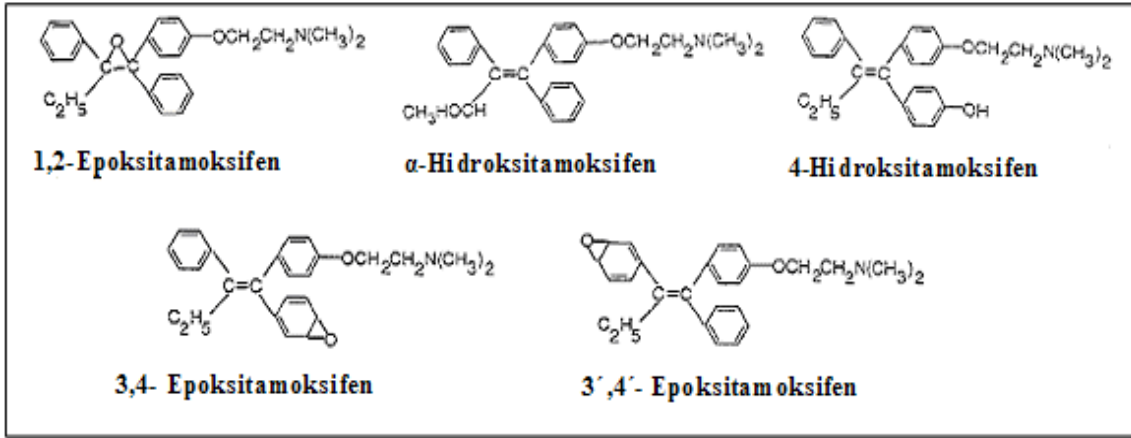


Şekil 2.17 Hormon reseptörü pozitif hastalarda Anastrozol ve Tamoksifen kullanımı ile hastalığın tekrarlanma yüzdelerinin karşılaştırılması (Baum, 2005).

## 2.5 Sıvı Kromatografisi-tandem Mass Spektrofotometre (LC-MS) Çalışmaları

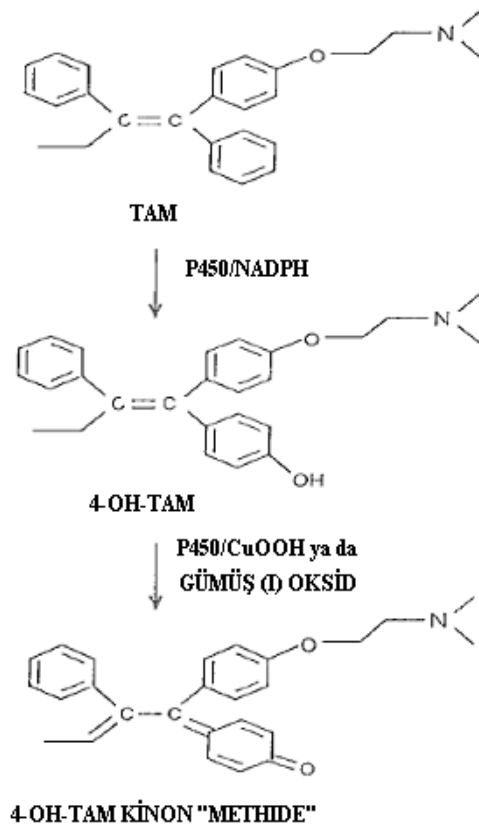
### 2.5.1 Tamoksifen ile yapılan LC-MS Çalışmaları

Tamoksifenin ve DNA-hasarı yapan reaktif metabolitlerinin, DNA'ya bağlanmak üzere (DNA adductlarını vermek üzere) karaciğer tarafından aktive edildiği bilinmektedir. DNA hasarına yol açan bu reaktif metabolitler halen araştırılmakla birlikte, bu metabolitlerin en bilinenleri arasında 1,2-epoksitamoksifen,  $\alpha$ -hidroksitamoksifen, 4-hidroksitamoksifen, 3,4-epoksitamoksifen ve 3'4'-epoksitamoksifen bulunmaktadır. Reaktif metabolitlerin yapıları hakkında birçok varsayım yapılmıştır. Phillips et al. ilk olarak Tamoksifen 1,2-epoksid, daha sonra da  $\alpha$ -hidroksitamoksifen reaktif bir metabolit olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.18). Hidroksitamoksifen hepatositler (karaciğerin detoksifikasyonda etkili hücreleri) tarafından üretilen başlıca metabolittir. Bu ilacı kullanan meme kanseri hastalarının serumlarında en fazla hidroksitamoksifene rastlanmıştır. Ek olarak, ilacı kullanan hastaların idrarlarında  $\alpha$ -hidroksitamoksifen N-oksit ve  $\alpha$ -hidroksi-N-desmetiltamoksifene de rastlanmıştır. Ayrıca  $\alpha$ -Hidroksitamoksifenin oldukça kararlı olduğu görülmüş ve proteinlerle kısmen de olsa reaksiyona girmediği saptanmıştır. Bu nedenle reaktif metabolit olarak değil, detoksifikasyon metaboliti olarak değerlendirildiği bilinmektedir (Lim vd., 1997).



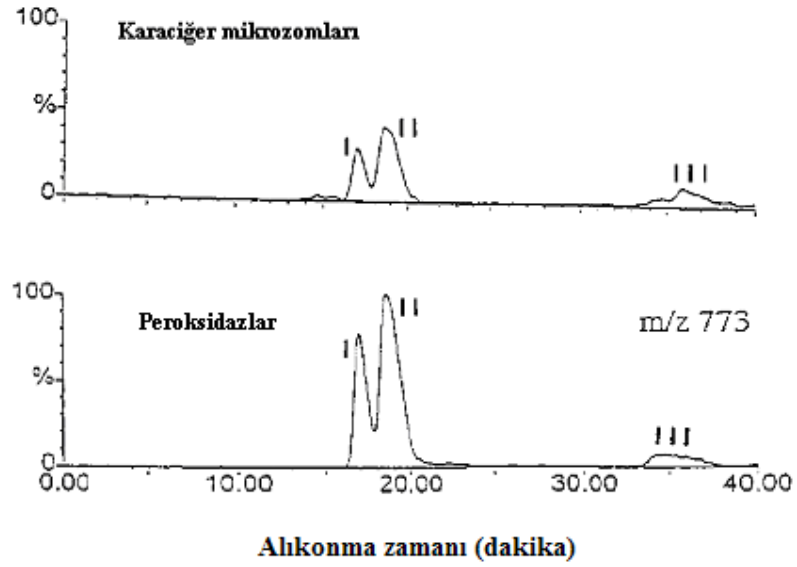
Şekil 2.18 DNA hasarına yol açabilen Tamoksifen metabolitleri (Lim vd., 1997)

Daha yakın bir zamanda Moorthly ve çalışma arkadaşları Şekil 2.19'da verildiği gibi reaktif metabolitin Tamoksifenden 4-hidroksitamoksifen aracılığıyla oluşturulan bir kinon "methide" olduğunu öne sürmüşlerdir (Lim vd., 1997).

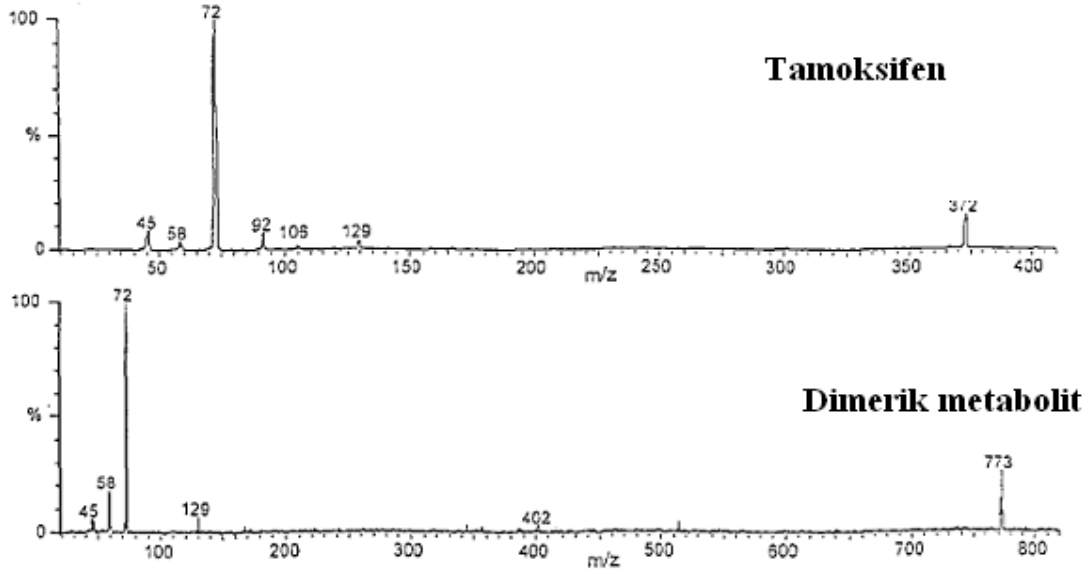


Şekil 2.19 Tamoksifen ve 4-hidroksitamoksifenin metabolik aktivasyon mekanizması (Lim vd., 1997).

Yapılan bir çalışmada Tamoksifenin Horseradishperoksidaz-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sistemi ile arenoksidler ve 4-hidroksitamoksifen üzerinden reaktif metabolitlere aktive edilebileceği kanıtlanmıştır (Lim vd., 1997). Elde edilen sonuçlarda indirgenmiş glutatyon ve serbest radikal yakalayıcı 5-5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit varlığında elektron proton rezonans spektroskopisi ile saptanan serbest radikal ara ürünlerinin bu aktivasyonda rol oynadığı görülmüştür. Serbest radikallerin bu işlemde varlığı, ayrıca serbest radikallerden türeyen 4-hidroksitamoksifen dimerlerinin (m/z 773) HPLC-ESI-MS ile tanımlanmasıyla da desteklenmiştir (Şekil 2.20) (Lim vd., 1997).

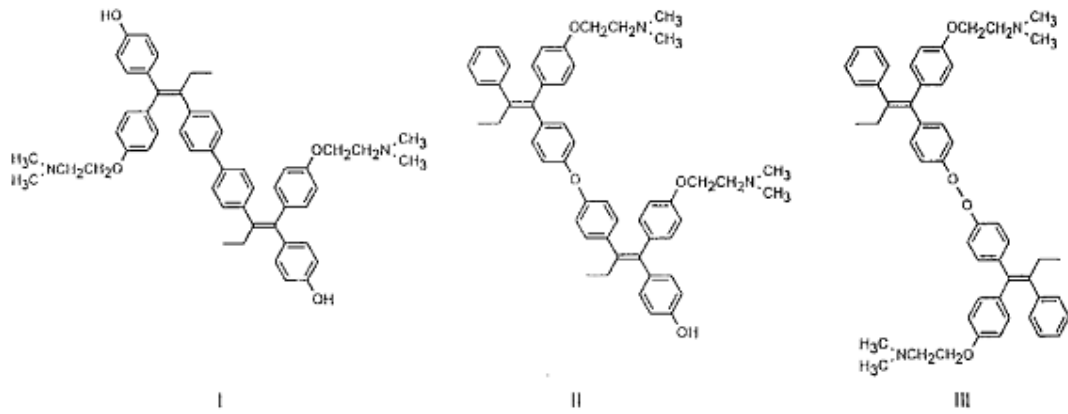


Şekil 2.20 4-Hidroksitamoksifen metabolitlerinin eş-zamanlı HPLC-ESI-MS kromatogramı (Lim vd., 1997).



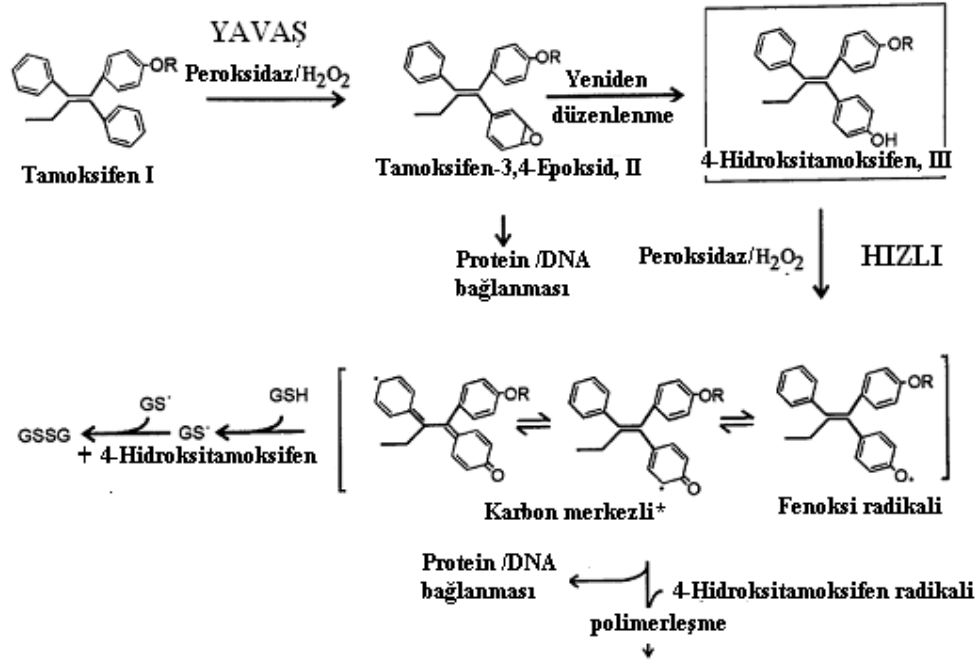
Şekil 2.21 Tamoksifen ve 4-hidroksitamoksifen dimerinin MS yarılımları (Lim vd., 1997).

4-hidroksitamoksifenden türeyen bu dimerler Tamoksifen türevlerinin karakteristiği olan m/z 72, 58 ve 45'te iyonlara parçalanmış ve HPLC elüsyon profillerine uygun olarak kolondan ayrılmışlardır. İki hidroksil grubuna sahip olan dimer I en polar (en az hidrofob) olduğundan, kolondan ilk olarak çıkması beklenir. Dimer II ise tek bir hidroksil grubuna sahip olduğundan (orta polariteye sahiptir) hiçbir hidroksil grubu içermeyen en az polar (en hidrofob) dimer III'ten önce kolondan çıkmalıdır (Lim vd., 1997).



Şekil 2.22 Serbest radikal ürünlerden oluşan 4-hidroksitamoksifen dimerlerinin muhtemel yapıları (Lim vd., 1997).

Eş-zamanlı HPLC-MS çalışma koşullarında Dimer III'ün eşit iki kısma ayrılması bu bileşiğin zayıf -O-O- bağıını içerdiğini göstermiştir, aynı koşullar altında Dimer I ve II ise oldukça kararlı kalmıştır (Lim vd., 1997). Bunlara ilave olarak, insan karaciğer hücreleri ile yapılan çalışmalarda sonuçlara dayanarak, DNA hasarına neden olan esas bileşiklerin arenoksidler olduğu sanılmaktadır. Serbest radikal ara ürünlerinden oluşan epoksidlerin de serbest radikal türlerine parçalanabileceği düşünülmektedir. DNA'ya bağlanmada epoksid öncül maddesi ve/veya metabolik serbest radikal ara ürünlerinin rolü yadsınmaz (Lim vd., 1997).



Şekil 2.23 Tamoksifen aren oksidlerinin, serbest radikal araürünlerinin ve dimerik metabolitlerin oluşumu (Lim vd., 1997).

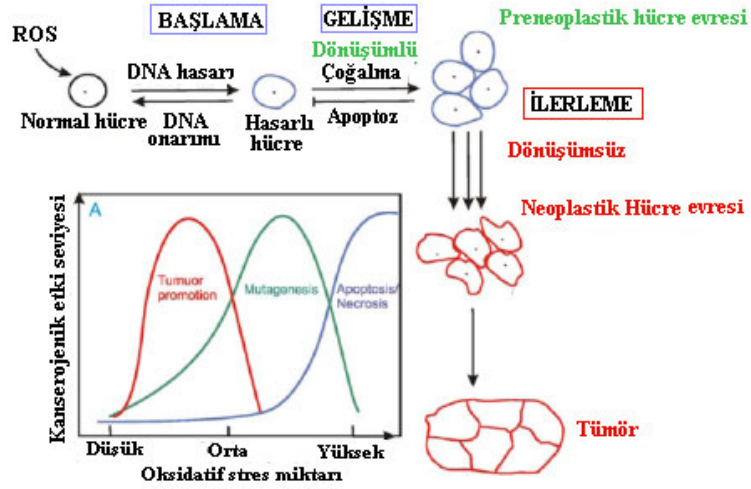
## 2.6 Kanser ve Serbest Radikaller

### 2.6.1 Kanser Oluşumu

Kanserin oluşması birçok aşamada gerçekleşmektedir ve bu aşamaların birçoğunda kimyasal kanserojenler rol oynamakta, hüresel modifikasyonlarda görev almaktadırlar. Genotoksik ajanlar genelde DNA'ya doğrudan zarar verebilen kimyasallardır ve bu hasar da mutasyonlara neden olmaktadır. Kanserojen bileşiklerin ikinci bir sınıfını (genotoksik olmayan) ise, DNA'ya bağlı olmadan veya indirekt-DNA reaksiyon mekanizmaları üzerinden hasar veren bileşikler oluşturmaktadır. Bunların çalışma mekanizmaları halen tam olarak anlaşılamamıştır. Kanserin



gelişmesi tek bir hücrede gerçekleşen çok basamaklı işlemler olarak nitelendirilmekle birlikte, Şekil 2.27’de verildiği gibi başlama, gelişme ve ilerleme olarak üç basamak ile kategorize edilebilir. ROS kanser oluşumunun belirtilen bu üç aşamasında da rol alabilmektedir (Valko vd., 2006).

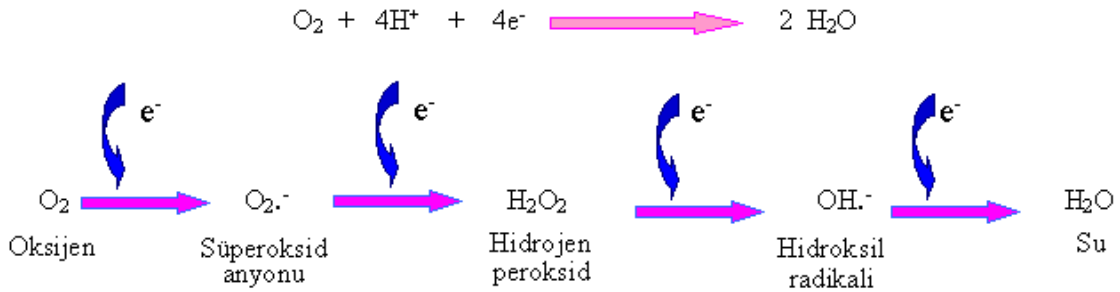


Şekil 2.24 Kanser oluşumunda üç aşama ve bu aşamalardaki oksidatif stres seviyeleri (Valko vd., 2006).

Başlama aşaması hücrede değişikliğe yol açabilecek DNA’da bir mutasyonu ve sonrasında bu hatayı düzeltmek için gerekli işlemleri kapsamaktadır. Oksidatif DNA hasarı Fenton-tipi mekanizma üzerinden türeyen hidroksil radikalleri gibi ROS aracılığıyla olabilmektedir. Gelişme aşaması ise DNA sentezi yeni başlamış hücrelerin çoğalması ve/veya programlı hücre ölümünün (apoptoz) inhibisyonuyla birlikte klonal olarak çoğalmasını kapsamaktadır. Yüksek oksidatif stres hücreye sitotoksik etki yapmakla birlikte düşük oksidatif stres de büyüme aşamasında hücre bölünmesini dolayısıyla da tümör gelişimini sağlamaktadır. Bu ise kanser oluşumundaki ROS üretiminin, ROS-ilişkili tümör gelişimindeki ana basamak olduğunu kanıtlamaktadır. İlerleme aşaması ise kanserojenik işlemde üçüncü ve en son basamaktır. Bu aşama da preneoplastik halden neoplastik hale kadar olan hücresel ve moleküler değişiklikleri içermektedir. Bu aşama dönüşümsüz olarak gerçekleşir ve hücrenin iyi halden kötü hale geçişine yol açan genetik hasarın birikimi ile karakterize edilir (Valko vd., 2006).

### 2.6.2 Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Bir serbest radikal, bir ya da daha fazla sayıda ortaklanmamış elektrona sahip atom ya da molekül olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller anyonik, katyonik ya da nötral olabilirler. Primer moleküllerin serbest radikallere yıkımı için gerçekten de yüksek aktivasyon enerjileri gerekmektedir, daha sonraki ayrışmalar daha az enerji kullanmaktadır. Dallanmış zincir reaksiyonlarını başlatan ve bunu az enerji ile başarabilen serbest radikal reaksiyonları hayvanlar ve bitkiler için çok tehlikeli olabilmektedir (Bergendi vd., 1999). Moleküler oksijen dış orbitalinde iki adet ortaklanmamış elektron içermektedir ve aktivitesi bu biradikal özelliğinden kaynaklanmaktadır. İnsan hücreleri tarafından alınan oksijenin büyük bir kısmı mitokondrideki sitokrom oksidazın etkisiyle suya indirgenir. Bu da her bir oksijen molekülüne dört elektronun eklenmesini gerektirmektedir. Oksijen indirgenme ara basamakları tek, çift ya da üç elektron tarafından indirgenme durumuna göre sırasıyla süperoksit anyonunun, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalinin oluşumu şeklinde verilmektedir (Bergendi vd., 1999).



Şekil 2.25 Oksijen indirgenme reaksiyonları (Murray vd.,1991).

Süperoksit anyonu (Çizelge 2.1.) orbitallerinde (n\*, 2p) üç elektron içermektedir ve organik solventlerde çözüldüğünde oldukça aktiftir. Süperoksitin iki molekülü (iki proton ile) hidrojen peroksitine indirgenir. Fizyolojik pH'da protonların düşük konsantrasyonu bu dönüşüm hızını düşürmektedir. Kontrollü olarak moleküler oksijene elektronların tek tek eklenmesi diğer reaktif ara ürünlerin (Çizelge 2.1.) oluşumunu mümkün kılmaktadır. Hücre içinde oluşan ve süperoksitten muhtemelen daha zararlı olan hidrojen peroksitin, katalaz ve glutatyon peroksitaz gibi enzimlerle uzaklaştırılması kendine özgü işlemlerdir. Suyun yüksek enerjiye maruz bırakılması sonucu oluşan hidroksil radikali oldukça aktiftir (Bergendi vd., 1999).

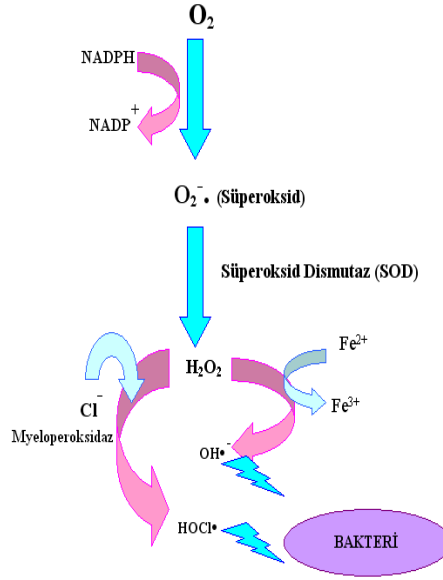
Çizelge 2.1 Serbest radikaller ve yarı ömürleri (Bergendi vd., 1999).

| ARA ÜRÜN                     | FORMÜL                        | YARI-ÖMÜR (SANİYE) |
|------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| Hidroksil radikali           | .OH                           | $10^{-9}$          |
| Alkoksil radikali            | RO.                           | $10^{-6}$          |
| Singlet oksijen              | $^1O_2$                       | $10^{-5}$          |
| Peroksinitrit anyonu         | ONOO <sup>-</sup>             | 0.05-1.0           |
| Peroksil radikali            | ROO.                          | 7                  |
| Nitrik oksid                 | ·NO                           | 1-10 gün           |
| Hidrojen peroksit            | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | ENZİMATİK BOZUNMA  |
| Süperoksit anyonu (radikali) | O <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | ENZİMATİK BOZUNMA  |

### 2.6.3 Serbest Radikallerin Vücuttaki Hasarları

Serbest radikallerde ortaklanmamış elektronların varlığı reaktifliğin yüksek olmasının asıl kaynağını oluşturmaktadır. Oksijenden türeyen radikaller yaşayan sistemlerde üretilen bu türlerin en önemli sınıfını oluşturmaktadır. ROS hem endojen hem de ekzojen olarak vücutta bulunabilir. Potansiyel endojen kaynaklar arasında mitokondri, sitokrom P450 metabolizması, peroksizomlar ve enflammatuvar hücre aktivasyonu bulunmaktadır. Hücresel reaktif oksijen türlerinin endojen kaynaklarına ek olarak nötrofiller, eosinofiller ve makrofajlar verilebilir. Makrofajların aktive edilmesiyle süperoksit anyonu, nitrik oksid ve hidrojen peroksitin de içinde bulunduğu birçok reaktif oksijen türünün üretilmesine yol açan işlemler başlamaktadır (Valko vd., 2006).

Fagositlerdeki (nötrofiller ve makrofajlar) solunum patlaması (respiratory burst), fagositoz olayının tetiklenmesidir. Benzer etki uygun uyarıcı (kemotaktik faktörler gibi) tarafından uyarıldığında elde edilir. Solunum patlaması birçok antimikrobiyel ve sitotoksik ROS'ün üretilmesiyle sonuçlanır (Bergendi vd., 1999).



Şekil 2.26 Nötrofil fagositozu ve fagolizozomlar içinde bakterinin yok edilmesi için gerçekleşen oksijen-bağımlı miyeloperoksidaz sistemi (Murray vd.,1991).

İlk olarak pentoz fosfat yoluyla üretilen NADPH'dan kaynaklanan tek bir elektron ile oksijen molekülünün indirgenmesi sonucu süperoksit oluşur. Bu işlem NADPH oksidaz (EC 1.6.1.1) olarak da bilinen bir multiprotein enzim kompleksi tarafından katalizlenir. NADPH oksidaz ile birleşen birçok protein belirtilmektedir. Normal nötrofillerde bu NADPH oksidaz protein bileşenleri sitoplazmik ve plazma membran bileşenleri içinde yer almaktadır. Süperoksit mikropların öldürülmesinde etkilidir. Diğer etkili ROS'lar hidrojen peroksitten sürekli bozunma ve/veya süperoksit dismutazın katalitik etkisiyle üretilmektedir. Miyeloperoksidaz (EC 3.11.1.7) bağımlı hipoklorür asidi (HOCl) gibi oksihalojenürler,  $H_2O_2$  ile hücre dışındaki sıvıda bulunan  $Cl^-$  iyonlarının reaksiyonu sonucunda üretilir. İkincil klorlu aminler ise HOCl'in azot içeren bileşikler ile reaksiyonu sonucunda oluşur. Miyeloperoksidaz sistemi (MPO- $H_2O_2$ - $Cl^-$ ) insan lökositlerindeki en güçlü antibakteriyel ve sitotoksik sistemdir. Fizyolojik şartlarda süperoksit ve diğer ROS'ların üretilmesi ile yok edilme mekanizmaları arasında bir denge kurulmalıdır. Eğer bu denge bozulursa insan vücudunda bazı hasarlar görülebilir. Bu hasara yol açan faktörler dört gruba ayrılır:

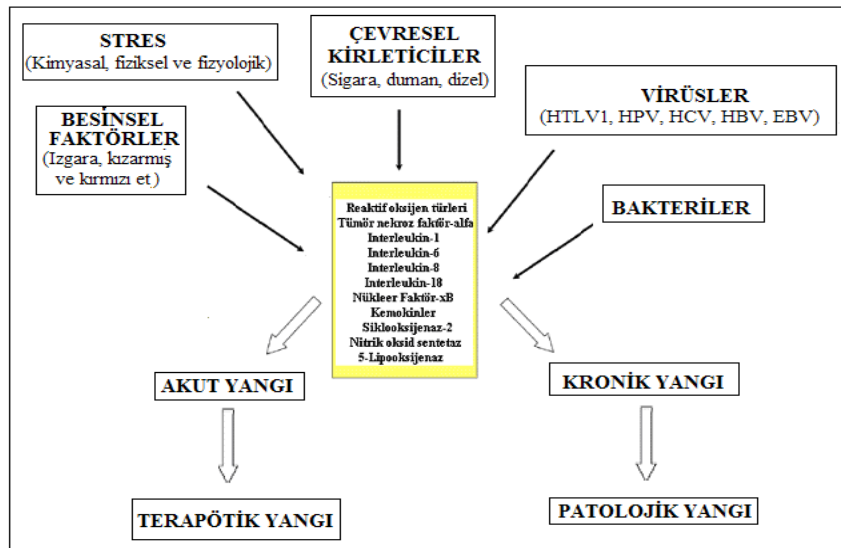
- 1- Genetik faktörler
- 2- Genetik ve çevresel faktörlerin birleşimi
- 3- Çevresel faktörler
- 4- Metabolik sistemlerin düzgün çalışmaması (Bergendi vd., 1999).

#### 2.6.4 Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Kansere Oluşumundaki Etkisi

Genellikle oksidan olarak nitelendirilen reaktif oksijen ara ürünleri süperoksit, hipoklorit asidi, singlet oksijen ve hidroksil radikali gibi moleküler oksijen türevleridir. Normal şartlar altında fagosit kökenli oksidanlar vücuda giren bakteri ve parazitlere karşı koruyucu bir rol üstlenirler. Bunun yanında doku hasarına yol açmak ve içinde kanserin de bulunduğu birçok hastalığın gelişimine katkıda bulunmak gibi zararlı bazı etkileri de bulunmaktadır. Kronik yangı (enflamasyon), dokuda reaktif oksijen ve azotlu ara ürünlerinin üretilmesiyle sonuçlanır. ROS sinyal iletiminde ve NF-kB veya AP-1 gibi ani hücrel stres cevaplarını yürüten transkripsiyon faktörlerinde değişiklikler yaratabilir (Aggarwal vd., 2006). Yüksek konsantrasyonlarda ROS lipidler, membranlar, proteinler ve nükleik asitler gibi hücrel yapılara hasar verebilen bir faktör olabilir ki, oksidatif stres olarak da bilinir. ROS'un zararlı etkileri ise, antioksidan enzimlere ek olarak enzimatik olmayan antioksidanların antioksidan etkileriyle dengelenir. Hücrede ROS'un zararlı etkilerine karşı olan savunma mekanizmasının varlığına karşın, oksidatif hasar hayat döngüsü boyunca birikim gösterir ve radikal ilgili DNA, protein, lipid hasarı yaratarak kanser ve nörodejeneratif bozukluklar gibi yaşa bağlı hastalıkların gelişmesinde önemli olur (Valko vd., 2006).

Reaktif oksijen türlerinin tümör oluşturabilme aktivitesi başta DNA hasarına yol açabilme yeteneğine sahip olmasıyla ilgilidir. Proteinler ve lipidler oksidatif saldırı için belirgin birer hedeftir ve bu moleküllerin modifikasyona uğraması kanser oluşum riskini arttırmaktadır. Reaktif oksijen ara ürünlerini yok eden veya oluşumlarını önleyen ajanlar DNA hasarını, kanser oluşumunu veya enflamatuvar fagositler tarafından gerçekleştirilen değişiklikleri engelleyebilir (Aggarwal vd., 2006). Oksidatif stres normal hücreler ile karşılaştırıldığında, kanserli hücrede daha çok görülen bir hücrel redoks dengesizliğine yol açar ve bu dengesizlik kanser oluşumunun tetiklenmesi ile ilgili olabilir. Oksidatif hasardan kaynaklanan genetik materyalin kalıcı olarak modifikasyonu mutasyonlar, kanser oluşumu ve yaşlanmada ilk basamağı oluşturmaktadır. DNA mutasyonları kanser oluşumunda en kritik basamaktır ve oksidatif DNA hasarı görmüş bölgelerin artışı birçok tümörde izlenmiştir. Bu da kanserin gelişmesinde belirtilen hasarın ne kadar önemli olduğunu kanıtlamaktadır. ROS kaynaklı DNA hasarları arasında tek veya çift sarmallı DNA kırılmaları, pürin, pirimidin ya da deoksiriboz modifikasyonları ve DNA çapraz bağlanmaları bulunmaktadır. DNA hasarı kanser oluşumuyla ilgili olan transkripsiyonun durması ya da artması, transdüksiyon yollarının değişimi, replikasyon hataları ve genomik kararsızlık gibi olaylardan kaynaklanabilir (Valko vd., 2007).

Hidrojen peroksid ve diğer reaktif oksijen türleri mitokondriyal genomun transkripsiyon ve replikasyonunda rol oynayan nükleer genlerin aktivasyonunda yer almaktadır. Tümör hücrelerinin olduğu bölgede mutasyona uğramış mitokondriyal DNA bulunmasına karşın ve kanser oluşumunda ne dereceye kadar mitokondriyal DNA mutasyonunun yer aldığı bilinmemesine karşın, kanser oluşumunda mitokondrinin rolü açıkça bilinmektedir. Bu durum, mitokondriyal DNA'nın bazı kısımlarının nükleer DNA'ya aktarıldığını ve bu yolla da onkogenlerin aktive edilmesi için gereken bir mekanizmayı öne sürmektedir (Valko vd., 2007). Enflamasyon ise bir canlının iç ya da dış çevresinden gelebilecek etkenlere karşı savunma cevabıdır. Bu cevap canlının bu durumla baş edebilmesini temsil eder ve bu cevap çoğunlukla da ateş ile sonuçlanır. Akut enflamasyon ya da ateş kısa bir süre için devam eder, bunun sonucunda da iyileştirici bir etki ortaya çıkar. Buna rağmen, enflamasyon kronik bir hal alırsa veya çok uzun sürerse vücuda zararlı olabilir ve hastalıklara yol açabilir. Enflamasyon biyomarkerlarının henüz çok iyi anlaşılammış olmasına karşın kemokinler, sitokinler ve enflammatuar enzimlerin kronik enflamasyon ile ilgili olduğu bilinmektedir. Kronik enflamasyonun kanser, kalp rahatsızlıkları, diabet, Alzheimer, pulmoner rahatsızlıklar ve otoimmün bozukluklar gibi birçok rahatsızlığa yol açtığı bilinmektedir. Bunun dışında kronik enflamasyonun tümör oluşumunun birçok aşamasında ve kanserin başlama, gelişme, ilerleme ve metastaz (yayılım) aşamalarında rol oynadığı da bilinmektedir. Birçok türde kanserin oluşumunda enflamasyonun taşıdığı büyük risk artık çok açık bir şekilde bilinmektedir (Aggarwal vd., 2006).



Şekil 2.27 Farklı enflamasyon türleri ve bunların tümör oluşumundaki etkileri (Aggarwal vd., 2006).

Enflamasyonda proenflammatuvar sitokinlerin ve enzimlerin tümör oluşumundaki başlıca etkilerinin bilinmesine karşın, bu enflammatuvar yolların bloke edilmesinin de zararlı olduğu kanıtlanmıştır (Aggarwal vd., 2006).

## 2.7 Miyeloperoksidaz

### 2.7.1 Miyeloperoksidaz ve Polimorfonükleer Lökositler (PMNs)

Polimorfonükleer lökositler (PMNs) enfeksiyona karşı immün yanıtta aktive olan ilk hücre türüdür. Bu hücreler kemotaksi sayesinde göç ederek bakterileri ve diğer mikroorganizmaları tanıdıkları ya da fagosite ettikleri yer olan iltihap bölgesine ulaşırlar. Yabancı patojenler hidrolitik enzimlerin, daha önceden granüllerin içinde depolanmış olan “bactericidal” proteinlerin ya da yeni üretilecek reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkisine maruz kalmaktadır (Arnhold, 2004).

PMN farklı protein ve enzimleri içeren dört tür granül içermektedir. Bu tür granüller çoğunlukla albumin, jelatinaz, kollajenaz olmak üzere diğer proteinleri de içermektedir. Bu proteinler ve enzimler iltihap bölgesine giden kapalı ve sıkı doku malzemesini PMN için açmakta yardımcı olma rolünü üstlenmektedirler. PMN’de bulunan azurofilik granüller eşsiz bir protein olan ve hem içeren Miyeloperoksidazın büyük miktarını bulundurmaktadırlar. Membranda bulunan NADPH oksidaz ile birlikte Miyeloperoksidaz reaktif oksijen türlerinin oluşumunda ve biyolojik materyalin oksidasyonunda rol almaktadır. Aktif PMN’de NADPH oksidaz moleküler oksijeni indirgeyerek süperoksid anyonu radikalini oluşturmaktadır. Bu radikal ve bu radikalden türeyen hidrojen peroksid ( $H_2O_2$ ), miyeloperoksidazın substratlarıdır (Arnhold, 2004). Miyeloperoksidaz (MPO: donör, hidrojen peroksid oksidoredüktaz, EC 1.11.1.7) sadece nötrofillerde ve monositlerde bulunmaktadır. Monositler PMN’de bulunan MPO’ın sadece 1/3 ünü içermektedir (Arnhold, 2004).

Fagositoz ile aktive olan nötrofiller “respiratory burst” olarak adlandırılan bir işleme girerler. “Respiratory burst” mikroplar için toksik etkisi olan süperoksid, hidrojen peroksid ve diğer reaktif oksijen türlerinin üretilmesine neden olmaktadır. Bu işlemler sırasında granüllerin içindekiler fagolizozomlara salınır ve hücre dışında bulunan herhangi bir mikrobun salınan maddeler ile temas etmesi sağlanır. MPO ise hidrojen peroksid ile klorür iyonlarının ( $Cl^-$ ) hipoklorür asidine dönüşmesini katalizlemektedir. Hipoklorür asidi mikrobiyal öldürmede hidrojen peroksidden 50 kat daha güçlü bir maddedir. MPO ayrıca fagositoza uğramış bakteri hücrelerini direkt olarak klorlandırmaktadır ve ayrıca “MPO- $H_2O_2$ - $Cl^-$ ” sisteminin mikrop

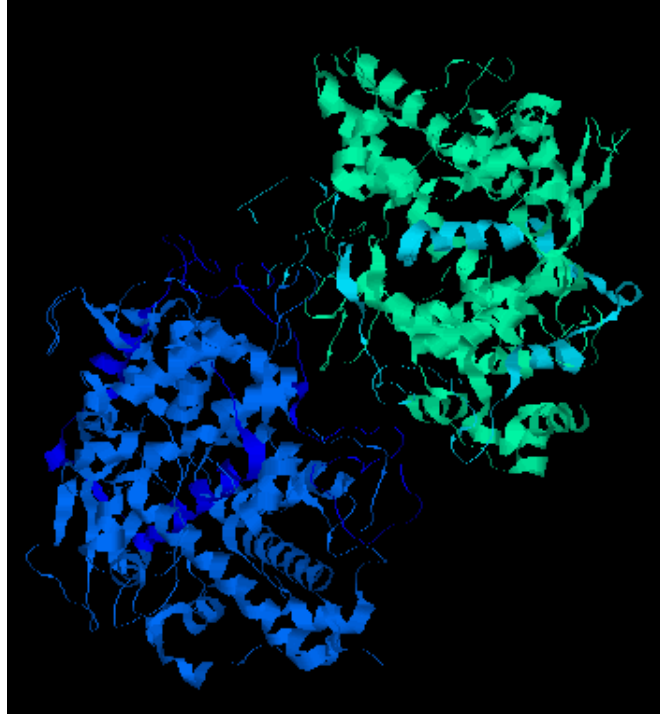
öldürmede çok önemli rolü olduğu bilinmektedir. Bakterileri öldürmenin yanı sıra “MPO–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–Cl” sisteminin mantarların, parazitlerin, protozoaların, virüslerin, tümör hücrelerinin, akyuvarların (natural killer hücreleri “NK”), alyuvarların ve trombositlerin yok edilmesinde de rolü olduğuna inanılmaktadır. Bu belirtilen sistemin “respiratory burst” olayını sonlandırdığına da inanılmaktadır, nedeni ise MPO bozukluğu olan hastalarda durdurulamayan “respiratory burst” olaylarının görülmesidir. “MPO–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–Cl” sistemi ayrıca enflammatuvar cevabın düzenlenmesinde de rol oynayabilmektedir. Ek olarak bu sistemin, akyuvarları ((NK) hücreleri) yönettiği, kemotaktik reseptörlere peptid bağlanmasını azalttığı ve α1-proteinaz inhibitörü ve kemotaksinler gibi PMNs ürünlerini ya inaktive ya da otookside ettiği bilinmektedir (Arnhold, 2004).

MPO’nun diğer fonksiyonları arasında tirozil radikali üretimi, β2-integrinler yoluyla miyeloid hücrelerin adezyonunun sürdürülmesi ve serum lipoproteinlerinin yükseltgenmesi de bulunmaktadır. MPO’nun aterosklerozda, karsinogenezde ve dejeneratif nörolojik hastalıklarda rol oynadığı sanılmaktadır. MPO biyolojisi henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir ve birçok yönüyle halen araştırılmaktadır [2].

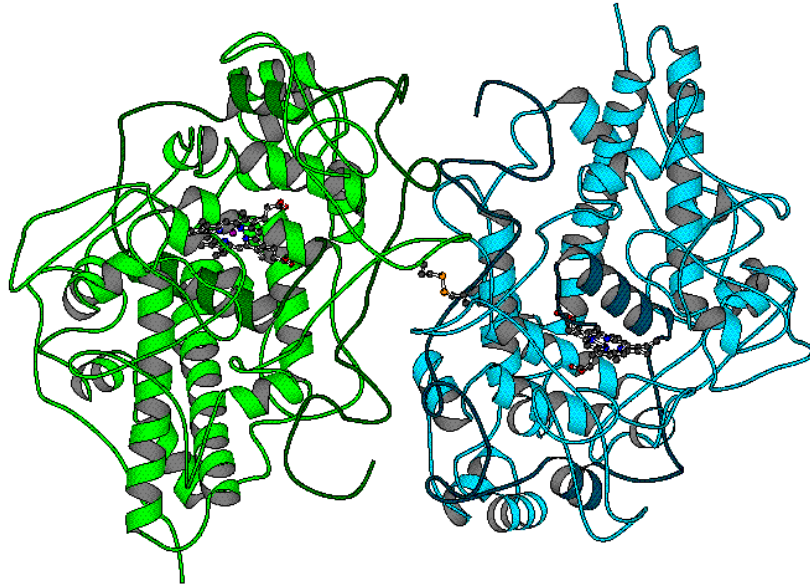
### **2.7.2 Miyeloperoksidazın Yapısı**

MPO yapısında glukoz bulunduran, moleküler ağırlığı 144 kD olan katyonik özellikte bir proteindir. Bir disülfid köprüsüyle birbirine bağlı durumda iki benzer dimerden oluşmaktadır. MPO’ın bu iki alt ünitesini birbirine bağlayan disülfid bağının seçici olarak parçalanması enzimin spektral ve katalitik özelliklerinden pek de farklı olmayan hemi-enzimi (yarı-enzimi) verir (Fiedler vd., 2000). MPO her bir dimer yapıda, merkezi demir atomu içeren protoporfirin IX grubu bulunduran bir hafif bir de ağır alt üniteden (herbiri 108 ve 466 aminoasidden oluşmaktadır) oluşmaktadır. MPO’nun her iki hem grubu fonksiyonel olarak aynıdır. Hem grupları apoprotein ile iki ester bağı ve bir sülfonyum iyon bağı ile bağlanmıştır. Hemin bu üçlü bağlantı şekli diğer hem proteinleri ile karşılaştırıldığında kendine özgü olmaktadır. Bu da porfirin halkasının biraz da olsa eğilmesine sebep olmakta ve Soret bandının MPO için 428 nm’ye kaymasının “red shift” yapmasının nedeni olarak gösterilmektedir (Arnhold, 2004). Bu kayma da enzimin karakteristik yeşil renginden sorumlu olan UV bölgede güçlü bir absorpsiyon bandı vermektedir (Fiedler vd., 2000).



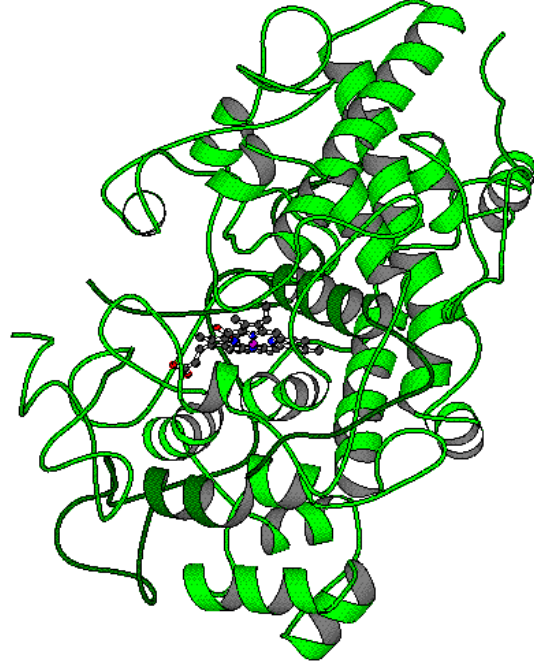


Şekil 2.28 Miyeloperoksidazın 3 boyutlu yapısı [9].



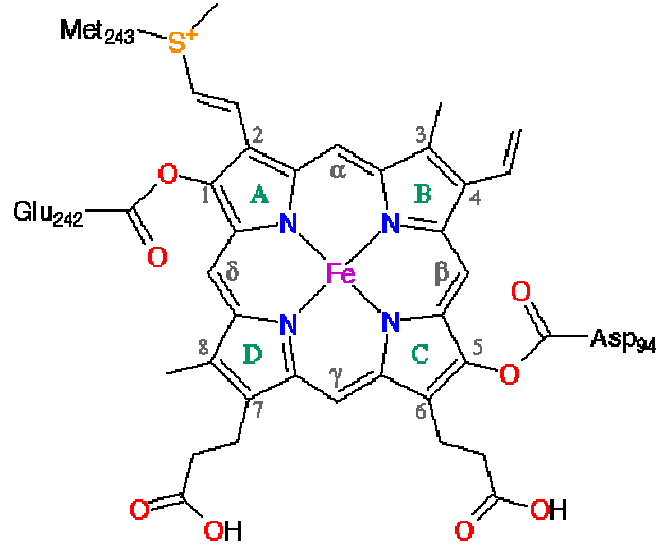
Şekil 2.29 Miyeloperoksidaz dimer yapısı (Zincirlerarası disülfid bağı (Cys<sub>C</sub>153-Cys<sub>D</sub>153) gösterilmiştir) (Fiedler vd., 2000).

Dimerik enzimin ikiz yarı-enzimleri birbirine non-kristalografik çiftli aksis ve Cys153'deki kovalent disülfid köprüsüyle bağlanmıştır. İkincil yapı çoğunlukla  $\alpha$ -Heliks yapısında ve çok azda olsa  $\beta$ -katlanmış yaprak yapısı bulunmaktadır. Her bir yarı-enzim beş tane heliksli merkezi bir çekirdekten ve kovalent olarak bağlı bir hem grubundan meydana gelmiştir (Fiedler vd., 2000).



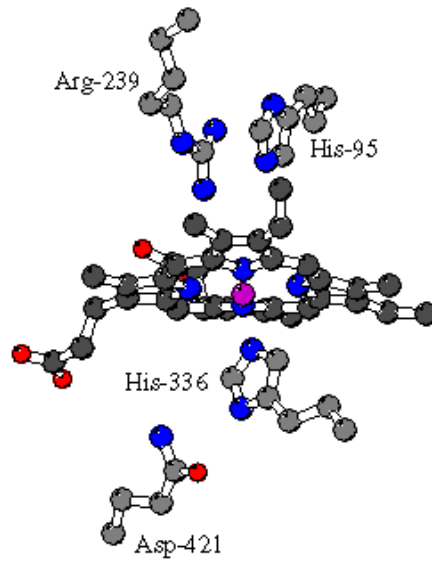
Şekil 2.30 Miyeloperoksidaz enziminin monomer yapısı (Fiedler vd., 2000).

Şekilde görülen helikslerden dördü büyük polipeptid, beşinci ise küçük polipeptidden oluşmaktadır. Büyük polipeptidden arta kalan kısım farklı dört bölge üzerine ve merkezi çekirdeği saran tek bir ilmik üzerine katlanmaktadır. Küçük polipeptid molekül yüzeyini merkezi çekirdekte yer edinmek üzere içeri doğru uzanarak sadece karboksi terminalinden kaplamaktadır. MPO ile katalitik bölgelerindeki protein katlanması çok benzer olan bir membran enzimi olan prostaglandin H sentaz, %22'lik bir dizilim benzerliği göstermektedir. Yapı analizleri kalsiyum-bağlanma bölgelerini, asparagin-İlgili üç glukozlanma bölgesini (Asn189, Asn225 ve Asn317) ayrıca proksimal His336 ve distal His95 davranışlarını doğrulamıştır (Fiedler vd., 2000).



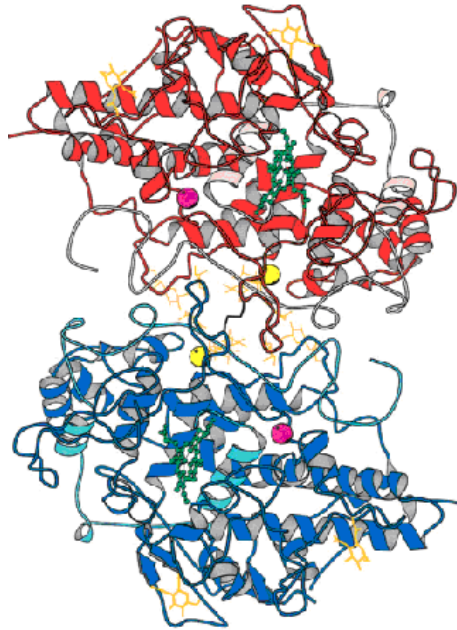
Şekil 2.31 Miyeloperoksidaz enzimi Hem grubu (Fiedler vd., 2000).

MPO'daki hem, Glu242 ve Asp94 ile ester bağlarının oluşumuyla A ve C pirol halkarındaki metil gruplarının modifiye edildiği protoporfirin IX türevi olarak nitelendirilmektedir. Üçüncü kovalent bağlanma ise Met243'ün sülfür atomu ile pirol halkasındaki vinil grubunun  $\beta$ -karbon terminali arasında olan sülfonyum iyon bağı ile gerçekleşmektedir (Fiedler vd., 2000).



Şekil 2.32 Miyeloperoksidazın Hem grubu ve bağlı aminoasidler (Fiedler vd., 2000).

Hem-peroksidazları ile hidrojen peroksid arasında olan reaksiyon yükseltgeyicilerin oksiferril Fe IV  $\Pi$ -kasyon radikali olarak depolandığı Form I'in oluşması ile sonuçlanmaktadır. MPO'da enzimin bu yükseltgenmiş formu, halojenür iyonlarının iki-elektronlu peroksidasyonunun ve birçok aromatik alkol ve aminin tek-elektronlu oksidasyonunun gerçekleştirilmesini sağlamaktadır. MPO'ın halojenür peroksidasyonunu katalizlediği mekanizma karmaşıktır. Bunun nedeni ise hem  $H_2O_2$ 'nin hem de halojenürün inhibitör özellik taşımasıdır. Halojenür inhibisyonu  $H_2O_2$ 'ye göre yarışmalıdır ve her pH değeri için halojenürün bir optimum konsantrasyonu vardır:  $H_2O_2$  konsantrasyonu maksimum reaksiyon hızıyla doğru orantılıdır.  $H_2O_2$ 'nin MPO ile olan Form I oluşum reaksiyonu pH bağımsız olarak meydana gelmektedir. Enzimin üzerinde pK 4.0-4.3 olan bir grubun (Bu grubun distal histidine olduğu kabul edilmektedir)  $H_2O_2$  bağlanmasının gerçekleşebilmesi için proton vermesi (deprotonlanması) gerekmektedir. Bunun tersi olarak bu grup düşük pH'da protonlandığında halojenür bağlanması gerçekleşmektedir. Spektral değişimler ile halojenürlerin MPO'ya bağlanmaları izlenebilmektedir. Florür, klorür, bromür ve iyodür Soret maksimumunun 428 nm'den sırasıyla 435, 434, 432 ve 423 nm'ye kaymasını (red shift) yapmasını sağlamaktadır. Belirtilen spektral değişimler halojenürün enzime bağlanmasının pH'a olan bağımlılığı saptamada kullanılmaktadır (Fiedler vd., 2000).



Şekil 2.33 MPO dimeri. İki yarığın büyük polipeptidleri kırmızı ve mavi renkte gösterilirken, kısa polipeptidler aynı renklerin daha açık tonları ile verilmiştir. Hem grubu yeşil, karbonhidrat turuncu, kalsiyum mor ve klorür sarı renkte belirtilmiş, molekülün merkezindeki disülfid bağı siyah ile gösterilmiştir (Fiedler vd., 2000).

Yukarıdaki modelde 10 307 adet hidrojen atomu dışında birçok atom bulunmakta ve bunların başlıcalarını 1140 amino asid, 2 hem, 16 şeker, 2 kalsiyum iyonu, 2 klorür iyonu, 4 sülfat, 6 asetat ve 838 su molekülü oluşturmaktadır. MPO molekülündeki iki yarım parça kristal içerisinde farklı ortamlarda bulunduğundan, molekül yüzeyindeki eşdeğer yan zincirlerinin konformasyonlarında bazı farklılıklar olabilmektedir (Fiedler vd., 2000).

### 2.7.3 Miyeloperoksidazın Vücuttaki Önemi

Birçok çalışmada MPO'nun eşsiz antimikrobiyal özelliğinin hipoklorür asidi ve diğer toksik ajanların üretiminden kaynaklandığı ve bunun da nötrofil fagolisosomlarının içindeki mikrop inhibisyonu veya öldürücü özelliği yaratan ortamı oluşturduğu belirtilmektedir. MPO hedef moleküllerin translasyon sonrası modifikasyonlarını etkilemek için  $H_2O_2$ 'i kullanmaktadır. Fizyolojik pH'da  $Cl^-$ 'in  $Cl^+$ 'e yükseltgenmesi MPO'a özgü olmasına rağmen bu işlemi tüm hayvan peroksidaz ailesi tarafından kullanılan bir yol izler. MPO'nun fagosoma salınımından sonra fagositlerin NADPH-bağımlı oksidazı HOCl üretimi için MPO'a gereken  $H_2O_2$ 'i üretmek üzere aktive olur. Hayvan peroksidazlarından olan tiroid peroksidaz (TPO), laktoperoksidaz (LPO) ve eosinophil peroksidaz (EPO) da farklı  $H_2O_2$  kaynağı kullanarak aynı yolu izler. HOCl ve türevleri dokulara zarar verdiği için MPO-kaynaklı hasar fagozom içindeki mikroplarla sınırlı değildir. Bu nedenle MPO atherosklerozun, merkezi sinir sistemindeki hasar sonucu görülen rahatsızlıkların ve bazı tümör türlerini içeren farklı enflammatuvar hastalıkların sebeplerinden biri olarak görülmektedir (Fiedler vd., 2000).

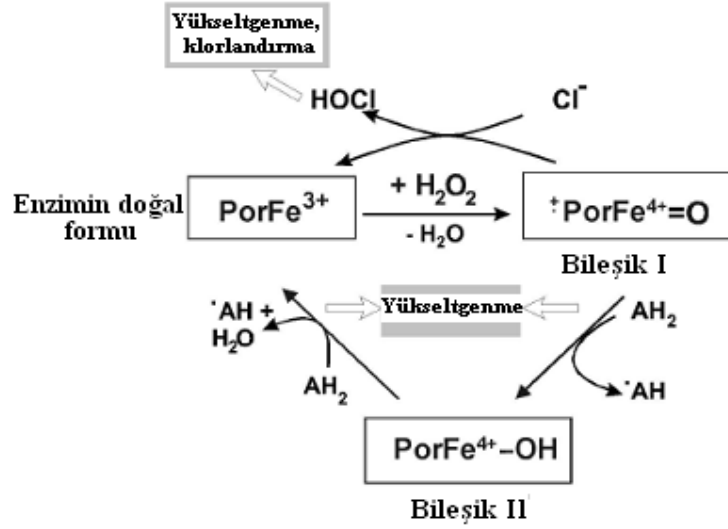
Vücuttaki toksisite desteği ile tirozil radikali oluşumu, klorlandırma, tirozin peroksid üretimi ve serum lipoproteinlerinin oksidasyonu gibi MPO-katalizli modifikasyonlarının varlığı bilinmektedir. MPO'nun enflammatuvar hastalıklardaki rolü, yapı üzerindeki çalışmalar ve peroksidaz ailesinin fonksiyonu ile ilgili birikim, birçok hastalığın oluşumuyla ilgili bilgi sağlamak, bu hastalıkların oluşmadan önlenmesinde ayrıca tanı ve tedavisinde rol oynamaktadır (Fiedler vd., 2000).

#### 2.7.4 Vücutta Miyeloperoksidaz Üretimi

MPO bir çift uzun ve kısa zincirden oluşan ve iki tane demir atomuna sahip dimerik bir moleküldür. MPO'yu kodlayan gen 17q 22-23 bandı üzerinde bulunmaktadır. MPO sadece bir gene sahiptir ve bu nedenle enzimin kendisi tek bir polipeptid ürününden sentezlenir. Bu genin ekspresyonu ve dolayısıyla MPO sentezi azurofilik granül gelişimi ile eş-zamanlı miyeloid gelişiminin promiyelositik aşamasında olmaktadır. MPO geni, enzimatik olarak inaktif bir ön-madde olan apopro-MPO'yu vermek üzere glukozlanan primer translasyon ürününü kodlamaktadır. Enzimatik olarak aktif bir ön-madde olan pro-MPO'yu vermek üzere hem daha sonra yapıya katılır. Pro-MPO'ya olan bu dönüşüm Endoplazmik Retikulumda gerçekleşir. Pro-MPO daha sonra birçok karmaşık dönüşüme uğrar ve sonunda azurofilik granüllerde olgun MPO halini alır. MPO farklı bir gen tarafından kodlanan farklı bir enzim olan eosinophil peroksidaz (EPO) ile karıştırılmamalıdır. MPO bozukluğuna sahip hastaların nötrofillerinde ve monositlerinde düşük MPO aktivitesi belirlenirken, bu hastaların eosinofillerinde EPO'nun normal seviyeleri görülmüştür [2].

#### 2.7.5 Miyeloperoksidaz Enzimi Tarafından Güçlü Oksidanların Üretimi

MPO pek çok oksidanın üretilmesinde rol oynamaktadır. Bununla birlikte enzimin aktif formları (çoğunlukla form I, ve form II de) farklı substratları oksidleyebilmektedir. Doğal formunda MPO'nun hem demiri ferrik ( $Fe^{3+}$ ) haldedir. Doğal MPO süperoksid anyonu ve hidrojen peroksid bağlayabilmektedir. İlk olarak enzimin üçüncü formu oluşmaktadır ki bu form aromatik substratların hidrosillenmesinde rol oynamaktadır. Hidrojen peroksidin suya indirgenmesi doğal MPO üzerinden form I oluşumuyla gerçekleşmektedir. Form I'deki hem demiri ferril formundadır ( $Fe^{4+}$ ) ve başka bir okside edici porfiril radikali olarak bulunmaktadır. Bu nedenle de Form I oksijen atomunun demire çiftli bir bağ ile bağlandığı ferril  $\Pi$ -katyon radikal türü olarak nitelendirilebilmektedir. MPO'nun Form I'i doğal formuna, (pseudo) halojenürlerden iki elektronun uzaklaşması ya da Form II'nin oluşumu ile iki elektronun tek tek koparılması ile indirgenmektedir (Arnhold, 2004).

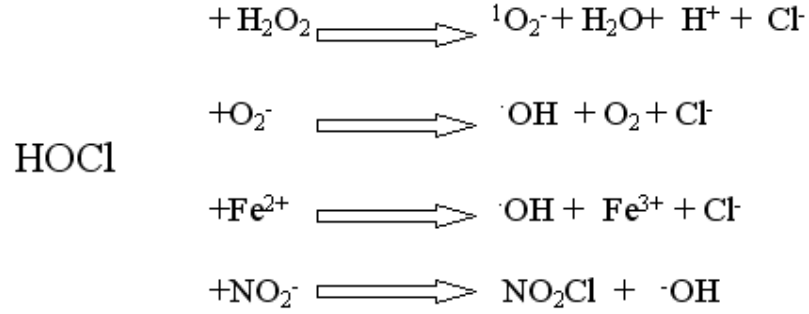


Şekil 2.34 Miyeloperoksidazın oksidasyon-redüksiyon döngüsü (Arnhold, 2004).

İlk basamakta (pseudo)halojenürler (pseudo)hipoklorür aside dönüşürler. Miyeloperoksidaz katalizi ile oluşan hipoklorür asidi ve hiposiyanat, özellikle fizyolojik şartlarda çok büyük önem taşımaktadır. Form I'in (düşük hızda da olsa Form II tarafından da) radikal ürünlerinin oluşumunda sadece tek bir elektron kopararak oksidlediği birçok substrat bilinmektedir. Bu substratlar tirozin, triptofan, sülfidriller, fenol ve indol türevleri olmakla beraber, bunların yanında nitrit, hidrojen peroksit ve ksenobiyotikler de bulunmaktadır. (Pseudo)hipoklorür asid ve diğer ürünler gibi, birçok radikal ürün biyolojik makromoleküllerin zarar görmesinde ve doku hasarında rol oynamaktadır. Ferrik miyeloperoksidazın diğer reaksiyonları ise ferro haline indirgenmesi, nitrik monoksit ya da süperoksit anyonik radikali ile olan reaksiyonlarıdır (Arnhold, 2004).

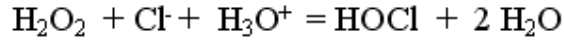
### 2.7.6 MPO Tarafından Üretilen Diğer Reaktif Oksijen Türleri

Hipoklorür asidinin bazı reaksiyonları, doku hasarında yüksek potansiyele sahip reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesine neden olmaktadır. Hipoklorür asidi hidrojen peroksit ile singlet oksijen vermek üzere reaksiyon verir. Hidroksil radikalleri sadece Fenton reaksiyonu sonucunda oluşmaz, bunun dışında süperoksit anyonu veya Fe(II) ile reaksiyona girmeleri sonucunda hipoklorür asidinden türetilirler. Hipoklorür asidi nitrit ile güçlü bir klorlandırma ve nitritlendirme bileşiği olan NO<sub>2</sub>Cl vermek üzere reaksiyona girer (Arnhold, 2004).



Şekil 2.35 Miyeloperoksidazın ürünü olan hipoklorür asidinden türeyen reaktif oksijen ve azotlu bileşiklerin oluşumu (Arnhold, 2004).

Miyeloperoksidaz (MPO, EC 1.11.1.7) memeli nötrofillerinde bulunan halojenür iyonlarının ve pseudohalojenür tiyosiyanatın hidrojen peroksid ile olan peroksidasyonunu katalizleyen hem-içerikli bir enzimdir (Fiedler vd., 2000).



Şekil 2.36 Halojenür iyonlarının hidrojen peroksid ile asidik ortamda olan peroksidasyon reaksiyonu (Fiedler vd., 2000).

Bu reaksiyonların ürünleri ve ikincil metabolitleri fagositoza uğramış bakteri ve virüslerin yok edilmesinde görevlidir. Miyeloperoksidaz enzimi eosinofil peroksidaz (EPO), laktoperoksidaz (LPO), tiroid peroksidaz (TPO), ve prostaglandin H sentazın da içinde bulunduğu memeli peroksidaz ailesinin bir üyesidir (Fiedler vd., 2000).



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMA

#### 3.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

##### 3.1.1 Kullanılan Cihazlar

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| Kaba terazi                 | : Precise BJ 6100D   |
| Hassas terazi               | : Precise XB 220A  |
| Manyetik karıştırıcı        | : Heidolph MR 3001   |
| Vorteks                     | : Heidolph Type REAX top   |
| Çalkalamalı su banyosu      | : GFL 1086   |
| Soğutmalı santrifüj         | : ThermoIEC (Micromax RF) Model 230  |
| Su saflaştırma cihazı       | : Millipore F4SN77678  |
| Liyofilizatör               | : Telstar Cryodos  |
| pH metre cihazı             | : Inolab   |
| HPLC sistemi                | : Shimadzu Program Class VP.   |
| UV Visible Spektrofotometre | : Model V-530 JASCO Program<br>Model UV-1700 PharmasPEC                                |
| Ultrafiltrasyon sistemi     | : Model 8010 “Stirred Ultrafiltration Cell” Millipore                                  |
| LC-MS Sistemi               | : SHIMADZU LCMS-2010 EV Liquid Chromatograph<br>Mass Spectrometer                      |
| FT-IR Spektrometre          | : “Pelkin Elmer SpectrumOne” FT-IR spektrometre ve<br>Universal ATR Sampling Accessory |

### 3.1.2 Kullanılan Malzemeler

- Otomatik pipet : Gilson 100-1000 $\mu$ l; Finnpiette 100-1000  $\mu$ l;  
Finnpiette 5-50  $\mu$ l; Eppendorf 100-1000  $\mu$ l;  
Eppendorf 10-100  $\mu$ l
- Eppendorf tüpleri : 2000  $\mu$ l
- Beher : 10 ml, 50ml, 100 ml, 500 ml, 1 L, 2 L
- Balonjojeler : 50 mL, 100 mL
- Penisilin şişeleri
- Mezür :10 mL, 50 mL, 100 mL
- Deney tüpleri
- Manyetik karıştırıcı magnetleri

### 3.1.3 Kullanılan Thermo IEC Marka Soğutmalı Santrifüjün Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

|                  |                     |
|------------------|---------------------|
| Model            | : Micromax RF       |
| Devir aralığı    | : 300-23300 rpm     |
| Sıcaklık aralığı | : (-9°C) – (+40 °C) |

### 3.1.4 Kullanılan UV-Vis (JASCO V-530) spektrofotometresinin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

|              |   |
|--------------|---|
| Optik Sistem | : Single monochromator  |
| Detektör     | : Silikon fotodiod (S1337)  |
| Işık kaynağı | : Deuterium (D2) lamba : 190- 350 nm<br>Halojen lamba : 390-1100 nm |

### 3.1.5 Kullanılan UV-Vis (UV-1700 PharmaSpec) spektrofotometresinin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

|              |  |
|--------------|--|
| Optik Sistem | : Filtre   |
| Detektör     | : Fotodiod detektör  |
| Işık kaynağı | : Deuterium (D2) lamba : 190-350 nm<br>Halojen lamba : 390-1100 nm |

### 3.1.6 Kullanılan SHIMADZU Marka LC-MS Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

|                 |                                  |
|-----------------|----------------------------------|
| Kolon           | : Ters faz C18 kolon             |
| Akış hızı       | : 0,2ml/dk                       |
| Boyut           | : 5 µm 20 cm x 0,21 cm           |
| Mobil faz       | : Asetonitril/Su: %10/90- %70/30 |
| Kolon sıcaklığı | : 25 °C                          |
| Detektör        | : UV254 nm                       |
| Dalga boyu      | : 254 nm                         |

**3.1.7 Kullanılan HPLC Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri**

|                 |   |
|-----------------|---|
| Kolon           | : Silika jel kolon<br>( LC column Shim Pack Diol-300) |
| Boyut           | : 7,9mm x 50cm  |
| Akış hızı       | : 1 ml/dk   |
| Dedektör        | : UV-VIS detektör (SPD-10AV)                          |
| Mobil faz       | : PBS; pH= 7,0; %0,05 NaN <sub>3</sub>                |
| Akış hızı       | : 1ml / dakika  |
| Kolon sıcaklığı | : 25 °C   |
| Dalga boyu      | : 280 nm  |

### 3.2 Kullanılan Kimyasallar

Çizelge 3.1 Kullanılan Kimyasalların Listesi

| Kimyasal Maddeler                                     | Üretici Firma       | Lot No.      |
|---|---------------------|--------------|
| Tamoksifen %99  | Sigma               | T5648        |
| HEPES   | Fluka               | PO4644       |
| NH <sub>4</sub> Cl                                    | Horasan Kimya       | 17088        |
| NaHCO <sub>3</sub>                                    | Fluka               | 71627        |
| EDTA (Etilendiamintetraasetik Asid)                   | Fluka               | 03699        |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O   | Riedel-de Haen      | 04269        |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O   | Fluka               | 71647        |
| NaCl  | Riedel-de Haen      | 13423        |
| TRITON X-100  | Fluka               | 93443        |
| o-dianisidin  | Fluka               | 33430        |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                         | Fluka               | 95321        |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                        | Merck               | K31996213315 |
| NaOH  | Riedel-de Haen      | 06203        |
| HCl   | Merck               | 1.00314.2500 |
| CH <sub>3</sub> COOH                                  | Riedel-de Haen      | 27225        |
| Polietersülfon Ultrafiltrasyon Membranı<br>NMWL:10000 | Millipore           | PBGC02510    |
| 5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksid                         | Fluka               | 41568        |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O                  | Riedel-de Haen      | 31422        |
| MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O                 | Applichem           | A1036.1000   |
| CaCl <sub>2</sub>                                     | Riedel-de Haen      | 12095        |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | Carlo Erba Reagenti | 420777       |

### 3.3 Deneylerin Yapılışı

#### 3.3.1 Miyeloperoksidaz Enziminin (EC 3.11.1.7) Kan Örneklerinden İzole Edilmesi Kullanılan Reaktifler

75 mM NH<sub>4</sub>Cl

10 mM NaHCO<sub>3</sub>

10 mM EDTA (Etilendiamintetraasetik Asid)

10 mM PBS (pH 7.20)-Yıkama tamponu

10 mM PBS (pH 7.00)

TRITON X-100

#### Deneyin Yapılışı

EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Eppendorf tüplerinde 75 mM, 2000µl NH<sub>4</sub>Cl liziz çözeltilisi (pH 7.30) üzerine 50 mikrolitre kan örneği ilave edildi. Tüp içeriği karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletilerek kırmızı kan hücrelerinin “lysis” (parçalanma) işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemden sonra eppendorf tüpleri soğutmalı santrifüje konuldu ve 10<sup>0</sup>C'da 550g hızda 5 dakika santrifüj edildi. Tüplerin dibinde elde edilen, beyaz kan hücrelerini içeren pelletler üzerinde kalan sıvı dekante edildi. Geri kalan eritrositleri uzaklaştırmak amacıyla yapılan yıkama işleminde, tüplere 10 mM PBS (pH 7.20) 1000 µl eklendi, karıştırıldıktan sonra soğutmalı santrifüje konularak 550g hızda 10<sup>0</sup>C'da 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelletler üzerinde kalan sıvı dekante edildikten sonra tüplere % 0.2 TRITON X-100 çözeltilisinden 50 µl konularak 5 dakika bekletildi. Bu işlemle pelletlerin içerdiği lökositlerin parçalanması “lysis” ve dolayısıyla miyeloperoksidazın sulu ortama aktarılması sağlandı (Kuzu-Karşıl原因an vd., 2002). Tüplere 250 µl 10 mM PBS (pH 7.00) tamponu eklendi, vorteks kullanılarak tüp içeriği karıştırıldı ve sonra soğutmalı santrifüjde 850 g'de 10<sup>0</sup>C sıcaklıkta 5 dakika santrifüj yapıldı. Böylece hücre kalıntılarının tüp çeperlerine yapışması sağlandıktan sonra otomatik pipet ile miyeloperoksidazı da içeren hücre içerikleri alınarak havuz yapıldı.

#### 3.3.2 Miyeloperoksidaz Enziminin Saflaştırılması

##### 3.3.2.1 Ön Çalışmalar

Yapılan literatür çalışması değerlendirilerek (Hope vd., 2000; Olsen ve Little, 1983) Con A

dolgu maddesinin kullanıldığı affinite kromatografi yöntemi ile miyeloperoksidazın saflaştırılması denendi. Ancak bu yöntem ile başarılı sonuç alınamadı.

Hücre içeriğinin  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ile çöktürülmesini takiben (Cutler, 2004) ultrafiltrasyon sistemi kullanılarak miyeloperoksidazın saflaştırılması sağlandı.

### 3.3.2.2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürme

Elde edilen hücre içeriği havuzunun hacmi bir mezür yardımı ile ölçüldü ve UV spektrofotometrede absorpsiyon spektrumları alınarak  $A_{280}$ ,  $A_{403}$  ve  $A_{430}$  değerleri okundu. Ölçülen hacim daha önceden belirlenmiş %100 doygunluk için gereken 0.697 gr/ml sayısı ile çarpılarak çöktürme için gereken  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  miktarı belirlendi (Cutler, 2004).

$$m_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} = 0.697 \text{ gr/ml} \cdot V_{\text{örnek}}$$

Hesaplanan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tartıldı,  $+4^0\text{C}$ 'de yavaş yavaş ve karıştırma sağlanarak hücre içeriği havuzuna eklendi ve çözünmesi sağlandı. Bu örnekte bulunan diğer proteinlerin çökmesi için karıştırma yapılmaksızın 1 saat beklendi. Bu süre sonunda örnek 2000 $\mu\text{l}$ 'lik eppendorflara konuldu ve soğutmalı santrifüjde  $+4^0\text{C}$ 'da 10 000 g hızda 20 dakika santrifüj edildi. Bu işlem berrak örnek elde etmek üzere iki defa tekrarlandı. Elde edilen çözeltilerin UV spektrofotometrede absorpsiyon spektrumları alınarak  $A_{280}$ ,  $A_{403}$  ve  $A_{430}$  değerleri okundu.

### 3.3.2.3 Ultrafiltrasyon işlemi

Elde edilen berrak örnekler “ Polyethersulfone Membrane” kullanılan Millipore marka Model 8010 Stirred Ultrafiltration Cell sisteminde, PBS tamponu (pH 7.0) ve asetat tamponu (pH 5.6) kullanılarak, yüksek RZ değeri elde etmek üzere yıkandı. Defalarca yapılan her yıkamadan önce ve sonra hem membrandan geçen alt fazın hem de üst fazın spektrumları alınarak  $A_{280}$ ,  $A_{403}$  ve  $A_{430}$  değerleri okundu. Bu iki tampon ile yapılan uygulamalar değerlendirildikten sonra her uygulamada asetat tamponu ile 5 defa ve bunu takiben tampon değiştirme amacıyla PBS ile de iki defa yıkama yapıldı. Enzim içerdiği hem grubundan dolayı absorpsiyon spektrumunda 280 nm'den başka 403nm'de MPO'ya özgü maksimum vermektedir. 403nm ve 430 nm'de absorbans değerinin 280nm'dekine oranı RZ değeri (Reinheitszahl ratio) olarak bilinir ve enzimin saflığının bir göstergesidir (Leon vd., 2002; Franco Fragus vd., 2004).

Çizelge 3.2. Asetat tamponu (pH 5.6) ile yıkanan örneğin üst ve alt fazlarının  $A_{280}$ ,  $A_{403}$ ,  $A_{430}$  ve  $RZ_{403}$ ,  $RZ_{430}$  değerleri .

|                             | $A_{280}$ | $A_{403}$ | $A_{430}$ | $RZ_{403}$ | $RZ_{430}$ |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| Yıkamadan önce üst faz      | 0.553     | 0.222     | 0.174     | 0.4        | 0.32       |
| Yıkamadan önce alt faz      | 0.233     | 0.0025    |           |            |            |
| 1. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.636     | 1.077     | 0.441     | 1.69       | 0.69       |
| 1. Yıkamadan önce alt faz   | 0.136     | 0.003     |           |            |            |
| 2. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.555     | 1.096     | 0.429     | 1.98       | 0.77       |
| 2. Yıkamadan önce alt faz   | 0.552     | 0         |           |            |            |
| 3. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.464     | 1.037     | 0.358     | 2.24       | 0.77       |
| 3. Yıkamadan önce alt faz   | 0.016     | 0         |           |            |            |
| 4. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.451     | 1.009     | 0.354     | 2.24       | 0.79       |
| 4. Yıkamadan önce alt faz   | 0.022     | 0         |           |            |            |
| 5. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.425     | 1.029     | 0.346     | 2.42       | 0.82       |
| 5. Yıkamadan önce alt faz   | 0.001     | 0         |           |            |            |
| 6. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.523     | 1.281     | 0.432     | 2.45       | 0.83       |
| 6. Yıkamadan önce alt faz   | 0.009     | 0         |           |            |            |
| 7. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.370     | 0.992     | 0.311     | 2.68       | 0.84       |
| 7. Yıkamadan önce alt faz   | 0.003     | 0         |           |            |            |
| 8. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.352     | 0.985     | 0.299     | 2.80       | 0.85       |
| 8. Yıkamadan önce alt faz   | 0         | 0         |           |            |            |
| 9. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.348     | 0.998     | 0.262     | 2.87       | 0.75       |
| 9. Yıkamadan önce alt faz   | 0.003     | 0         |           |            |            |
| 10. Yıkamadan sonra üst faz | 0.330     | 0.899     | 0.247     | 2.72       | 0.75       |
| 10. Yıkamadan önce alt faz  | 0         | 0         |           |            |            |
| 11. Yıkamadan sonra üst faz | 0.314     | 0.870     | 0.231     | 2.77       | 0.74       |
| 11. Yıkamadan önce alt faz  | 0.001     | 0         |           |            |            |



Çizelge 3.3 PBS tamponu (pH 7.0) ile yıkanan örneğin üst ve alt fazlarının  $A_{280}$ ,  $A_{403}$ ,  $A_{430}$  ve  $RZ_{403}$ ,  $RZ_{430}$  değerleri.

|                             | $A_{280}$ | $A_{403}$ | $A_{430}$ | $RZ_{403}$ | $RZ_{430}$ |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| Yıkamadan önce üst faz      | 1.293     | 0.865     | 0.569     | 0.67       | 0.44       |
| Yıkamadan önce alt faz      | 0.22      | 0         | 0         |            |            |
| 1. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.564     | 0.951     | 0.307     | 1.69       | 0.54       |
| 1. Yıkamadan önce alt faz   | 0.122     | 0         | 0         |            |            |
| 2. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.495     | 1.029     | 0.315     | 2.08       | 0.64       |
| 2. Yıkamadan önce alt faz   | 0.063     | 0.002     | 0         |            |            |
| 3. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.469     | 1.026     | 0.329     | 2.19       | 0.70       |
| 3. Yıkamadan önce alt faz   | 0.032     | 0.004     | 0.003     |            |            |
| 4. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.496     | 1.057     | 0.368     | 2.13       | 0.74       |
| 4. Yıkamadan önce alt faz   | 0.010     | 0         | 0         |            |            |
| 5. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.399     | 0.957     | 0.290     | 2.40       | 0.73       |
| 5. Yıkamadan önce alt faz   | 0.002     | 0         | 0         |            |            |
| 6. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.434     | 0.977     | 0.327     | 2.25       | 0.75       |
| 6. Yıkamadan önce alt faz   | 0.002     | 0         | 0         |            |            |
| 7. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.427     | 0.982     | 0.328     | 2.30       | 0.77       |
| 7. Yıkamadan önce alt faz   | 0         | 0         | 0         |            |            |
| 8. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.379     | 0.933     | 0.284     | 2.46       | 0.75       |
| 8. Yıkamadan önce alt faz   | 0.009     | 0.004     | 0.002     |            |            |
| 9. Yıkamadan sonra üst faz  | 0.381     | 0.970     | 0.292     | 2.55       | 0.77       |
| 9. Yıkamadan önce alt faz   | 0.001     | 0         | 0         |            |            |
| 10. Yıkamadan sonra üst faz | 0.400     | 0.991     | 0.309     | 2.48       | 0.77       |
| 10. Yıkamadan önce alt faz  | 0         | 0.001     | 0         |            |            |
| 11. Yıkamadan sonra üst faz | 0.394     | 0.957     | 0.301     | 2.43       | 0.76       |
| 11. Yıkamadan önce alt faz  | 0         | 0         | 0         |            |            |

### 3.3.3 Miyeloperoksidazın Aktivite Tayini

#### Kullanılan Reaktifler

10 mM PBS (pH 7.00)

Miyeloperoksidaz enzim örneği (0.294 mg/ml)

5 mM o-dianisidin

%3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

#### Deneyin Yapılışı

805 µl PBS içeren, 37°C'daki çalkalamalı su banyosunda bekletilen deney tüplerine sırası ile, 10 µl o-dianisidin, 100 µl enzim örneği konuldu ve 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek reaksiyon başlatıldı. 10 dakika reaksiyon süresi sonunda 75 µl 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve UV spektrofotometrede absorpsiyon spektrumları alınarak A<sub>400</sub> değerleri okundu.

### 3.3.4 Miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisinin UV-Vis Spektrofotometre ile İncelenmesi

#### Kullanılan Reaktifler

50 mM HEPES (%0.9 NaCl) (pH 7.25)

Miyeloperoksidaz enzim örneği (0.294 mg/ml)

0.0048 mM Tamoksifen çözeltisi [50 mM HEPES (%0.9 NaCl) (pH 7.25)]

10 mM 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit çözeltisi [50 mM HEPES (%0.9 NaCl) (pH=7.25)]

%3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### Deneyin Yapılışı

37°C'ye ayarlanmış su banyosu olan UV-Vis Spektrofotometrede 50 mM HEPES (%0.9 NaCl) (pH 7.25) tamponunda hazırlanan 0.0048 mM Tamoksifen çözeltisinden 1000 µl küvete alınıp ilacın absorpsiyon spektrumu alındı. Daha sonra küvetten 210 µl alınıp bu hacmin yerine 200 µl miyeloperoksidaz enzim örneğinden (0.294 mg/ml) konuldu ve reaksiyon 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

eklenerek başlatıldı. Farklı zamanlarda UV spektrofotometrede absorpsiyon spektrumları alınarak reaksiyonun yürüyüşü 120 dakika boyunca izlendi. Bu işlemlerin herbiri hem radikal yakalayıcı (Free Radical Trap “5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit”) varlığında hem de radikal yakalayıcı kullanılmadığı durumda gerçekleştirildi.

### **3.3.5 Miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisinin FT-IR Spektrometresi ile İncelenmesi**

#### **Kullanılan Reaktifler**

Miyeloperoksidaz enzimi örneği (0.294 mg/ml)

0.0048 mM Tamoksifen çözeltisi [50 mM HEPES (%0.9 NaCl) (pH 7.25)]

10 mM 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit çözeltisi [50 mM HEPES (%0.9 NaCl) (pH 7.25)]

%3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### **Deneyin Yapılışı**

37°C'daki su banyosunda 790 µl 50 mM HEPES (%0.9 NaCl) (pH 7.25) tamponunda hazırlanan 0.0048 mM Tamoksifen çözeltisine enzim örneğinden 200 µl (0.294 mg/ml) eklendi ve 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Reaksiyonun başlatılmasından 0 dakika, 60 dakika ve 120 dakika sonra örnekler hızla dondurularak durduruldu. Bu işlemlerin herbiri radikal yakalayıcı (Free Radical Trap) olarak bilinen 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit varlığında ve bu madde kullanılmadan gerçekleştirildi. Elde edilen örnekler FT-IR spektrometresi ile incelendi.

### 3.3.6 Miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisinin LC-MS Cihazı ile İncelenmesi

#### Kullanılan Reaktifler

Miyeloperoksidaz enzim örneği (0.294 mg/ml)

0.0048 mM Tamoksifen çözeltisi [50 mM HEPES (%0.9 NaCl) (pH 7.25)]

10 mM 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit çözeltisi [50 mM HEPES (%0.9 NaCl) (pH 7.25)]

%3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### Deneyin Yapılışı

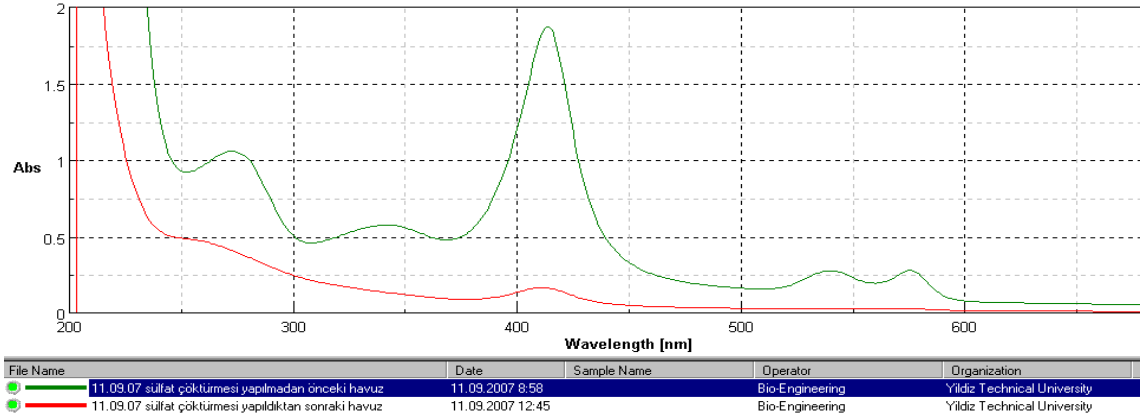
37°C'daki su banyosunda, 50 mM HEPES (%0.9 NaCl) (pH 7.25) tamponunda hazırlanan 0.0048 mM Tamoksifen çözeltisinin 790 µl'sine miyeloperoksidaz enzimi örneğinden (0.294 mg/ml) 200 µl eklendi ve 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilavesiyle reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon başlatıldıktan hemen sonra (0.dakika), 60 dakika ve 120 dakika sonra sonlandırılarak LC-MS (Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi) cihazında örnekler incelendi. Bu işlemlerin herbiri radikal yakalayıcı (Free Radical Trap) olarak bilinen 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit varlığında ve reaksiyon ortamında 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit olmadan gerçekleştirildi.

Bu örneklerin herbiri daha sonra oda sıcaklığında LC-MS sistemine uygun gradyen oluşturularak verildi. Burada gradyen ise mobil faz oranının önce %10:90 asetonitril:su'dan %70:30 asetonitril:su'ya değiştirilmesi ve en sonunda bu oranın %30:70 asetonitril:su'ya değiştirilmesi şeklinde oluşturuldu. Mobil fazın akış hızı 0.2 ml/dk olarak ayarlandı.

## 4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

### 4.1 Kan örneklerinden elde edilen liziz çözeltilerine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi uygulanması

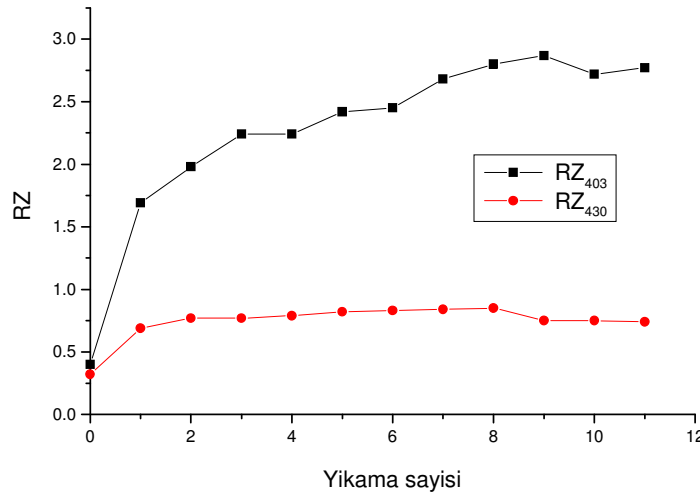
Bu işlemten önce ve sonra örneklerin absorbans spektrumları alınarak kıyaslandı.



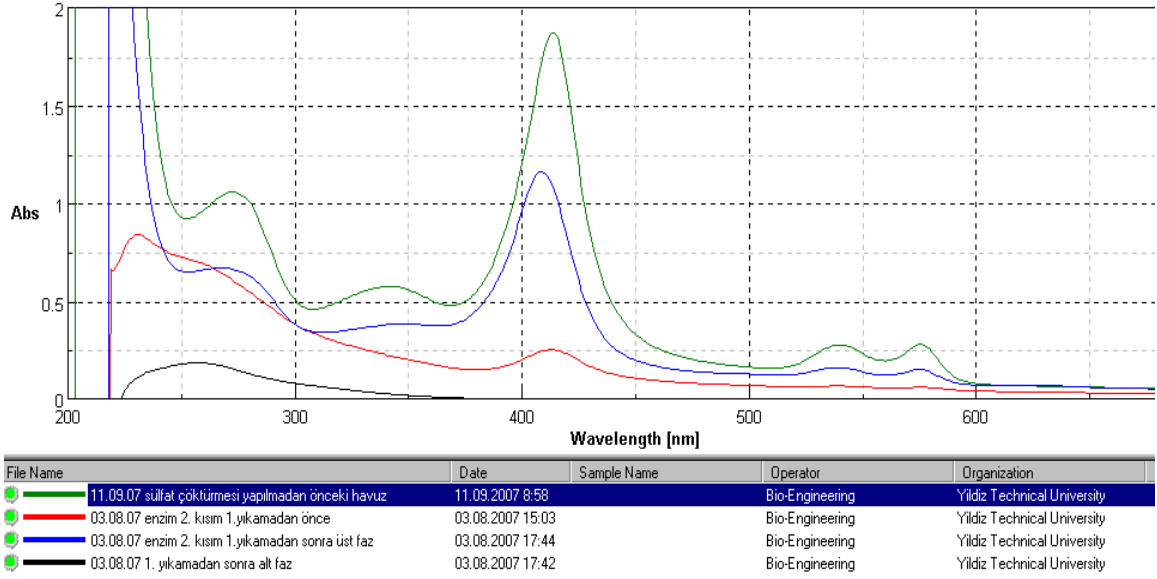
Şekil 4.1 Sülfat çöktürmesinin etkisinin UV-Vis spektrofotometrede izlenmesi

### 4.2 Kandan izole edilen Miyeloperoksidazın Saflaştırılmasında Kullanılacak Yöntemin Belirlenmesi

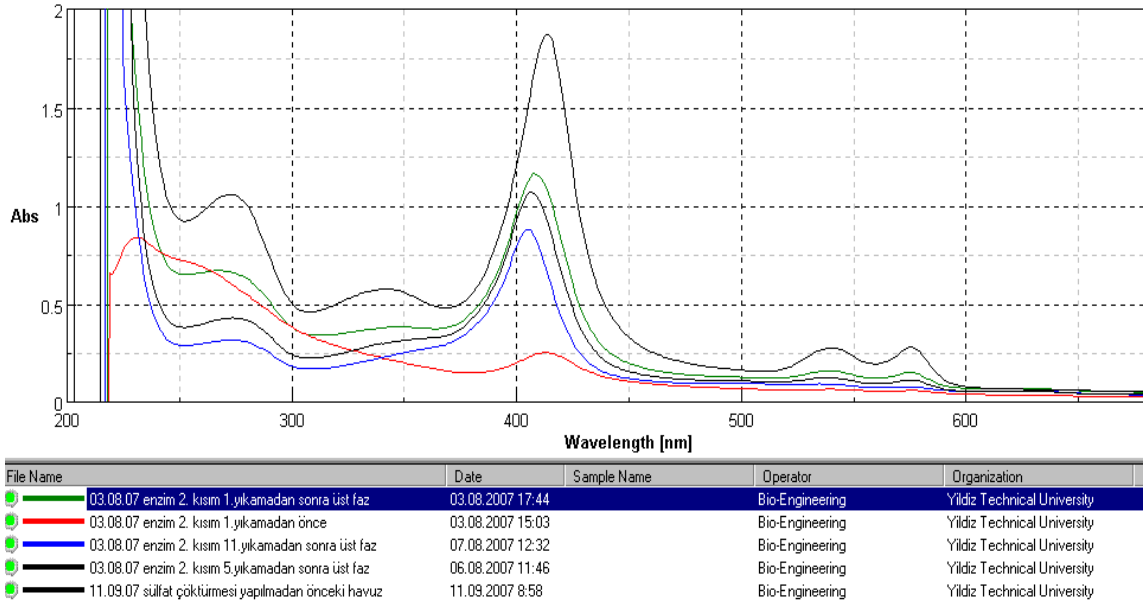
#### 4.2.1 Asetat tamponu (pH 5.6) ile Yapılan Uygulamalar



Şekil 4.2 Asetat tamponu (pH 5.6) ile yıkanan örneğin  $\text{RZ}_{403}$  ve  $\text{RZ}_{430}$  değerlerinin yıkama sayıları ile değişmesi.

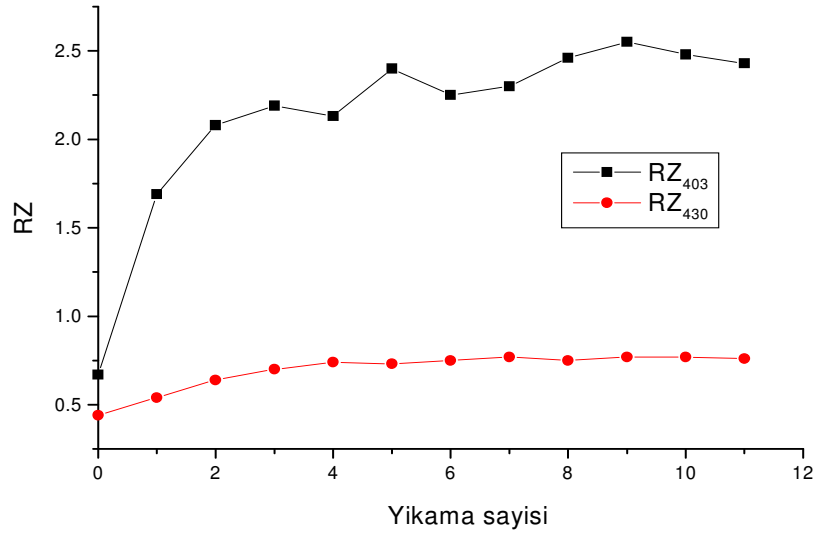


Şekil 4.3 Sülfat çöktürmesi yapılmadan önceki havuzun, sülfat çöktürmesi sonrası havuzun, asetat tamponu (pH 5.6) ile bir defa yıkanan örneğin ve membrandan geçen alt fazın absorbanans spektrumları.

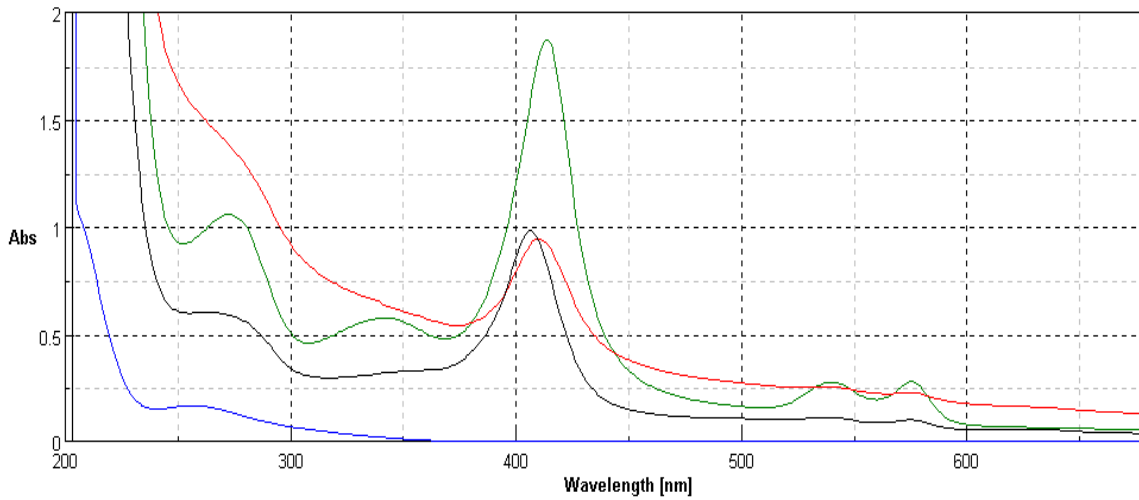


Şekil 4.4 Asetat tamponu ile bir çok defa yıkama ile örneğin absorbanans spektrumunda, dolayısıyla RZ değerinde değişme.

#### 4.2.2 PBS tamponu (pH 7.0) ile Yapılan Uygulamalar

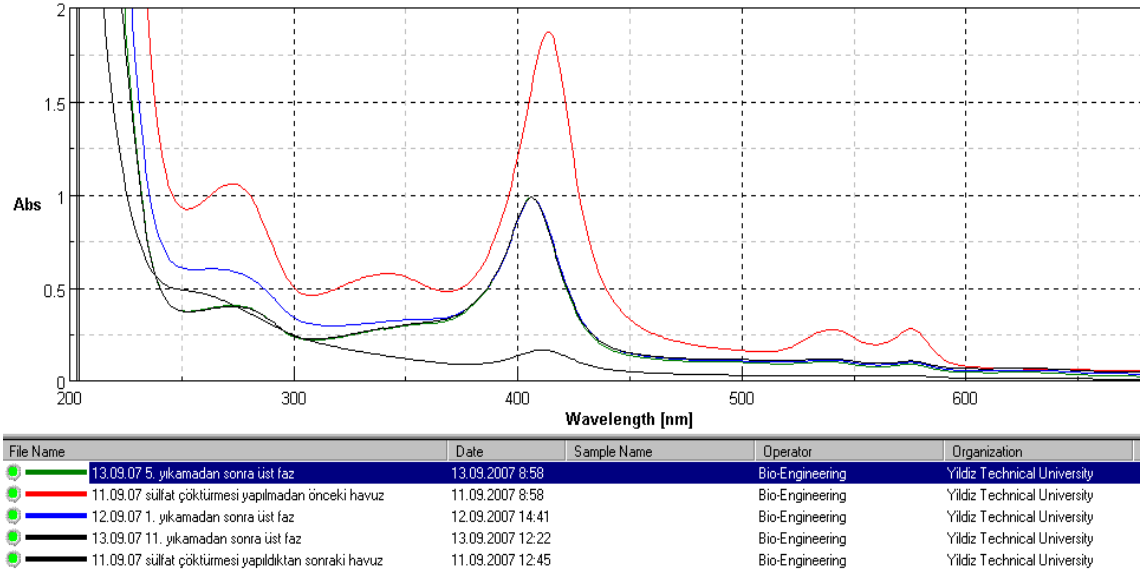


Şekil 4.5 PBS tamponu (pH 7.0) ile yıkanan örneğin RZ<sub>403</sub> ve RZ<sub>430</sub> değerlerinin yıkama ile değişmesi.

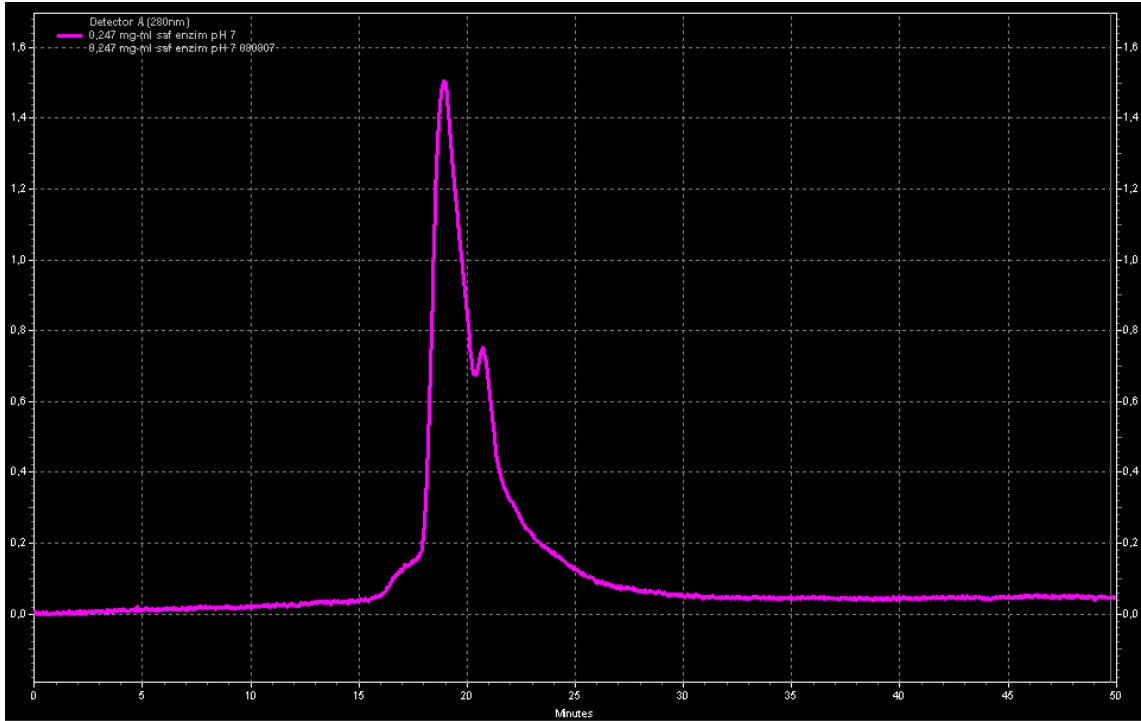


| File Name  | Date             | Sample Name | Operator        | Organization                |
|--|------------------|-------------|-----------------|-----------------------------|
| 11.09.07 sülfat çöktürmesi yapılmadan önceki havuz | 11.09.2007 8:58  |             | Bio-Engineering | Yıldız Technical University |
| 12.09.07 1. yıkamadan önce üst faz                 | 12.09.2007 13:41 |             | Bio-Engineering | Yıldız Technical University |
| 12.09.07 1. yıkamadan sonra alt faz                | 12.09.2007 14:37 |             | Bio-Engineering | Yıldız Technical University |
| 12.09.07 1. yıkamadan sonra üst faz                | 12.09.2007 14:41 |             | Bio-Engineering | Yıldız Technical University |

Şekil 4.6 Sülfat çöktürmesi yapılmadan önceki havuzun, sülfat çöktürmesi sonrası havuzun, PBS tamponu (pH 7.0) ile bir defa yıkanan örneğin ve membrandan geçen alt fazın absorbanans spektrumları.



Şekil 4.7 PBS tamponu (pH 7.0) ile bir çok defa yıkama ile örneğin absorbanans spektrumunda, dolayısıyla RZ değerinde değişme.

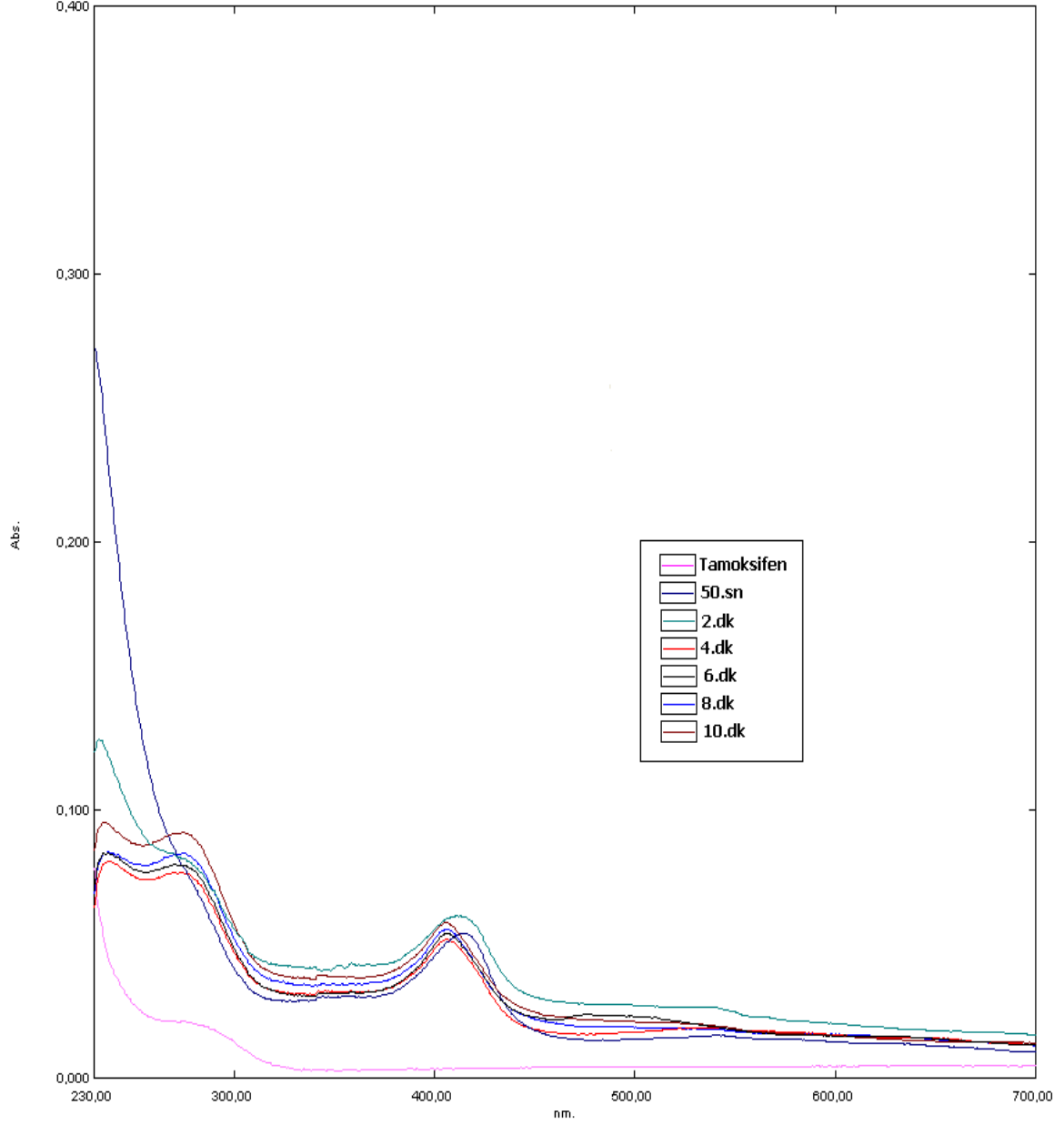


Şekil 4.8 Saflaştırılan miyeloperoksidazın HPLC sisteminde UV detektör ile alınan kromatogramı

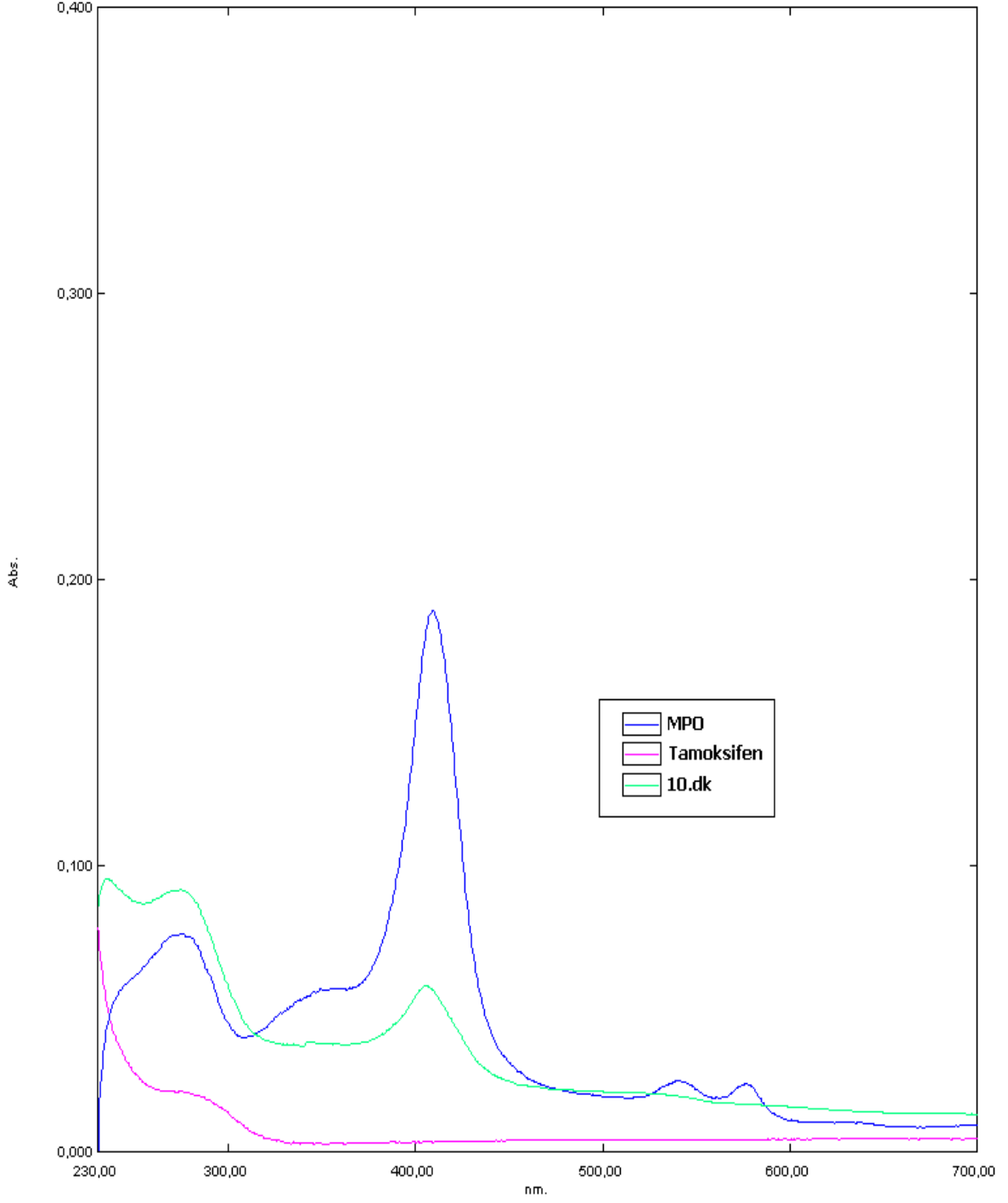


### 4.3 Miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisinin UV-Vis Spektrofotometre ile İzlenmesi

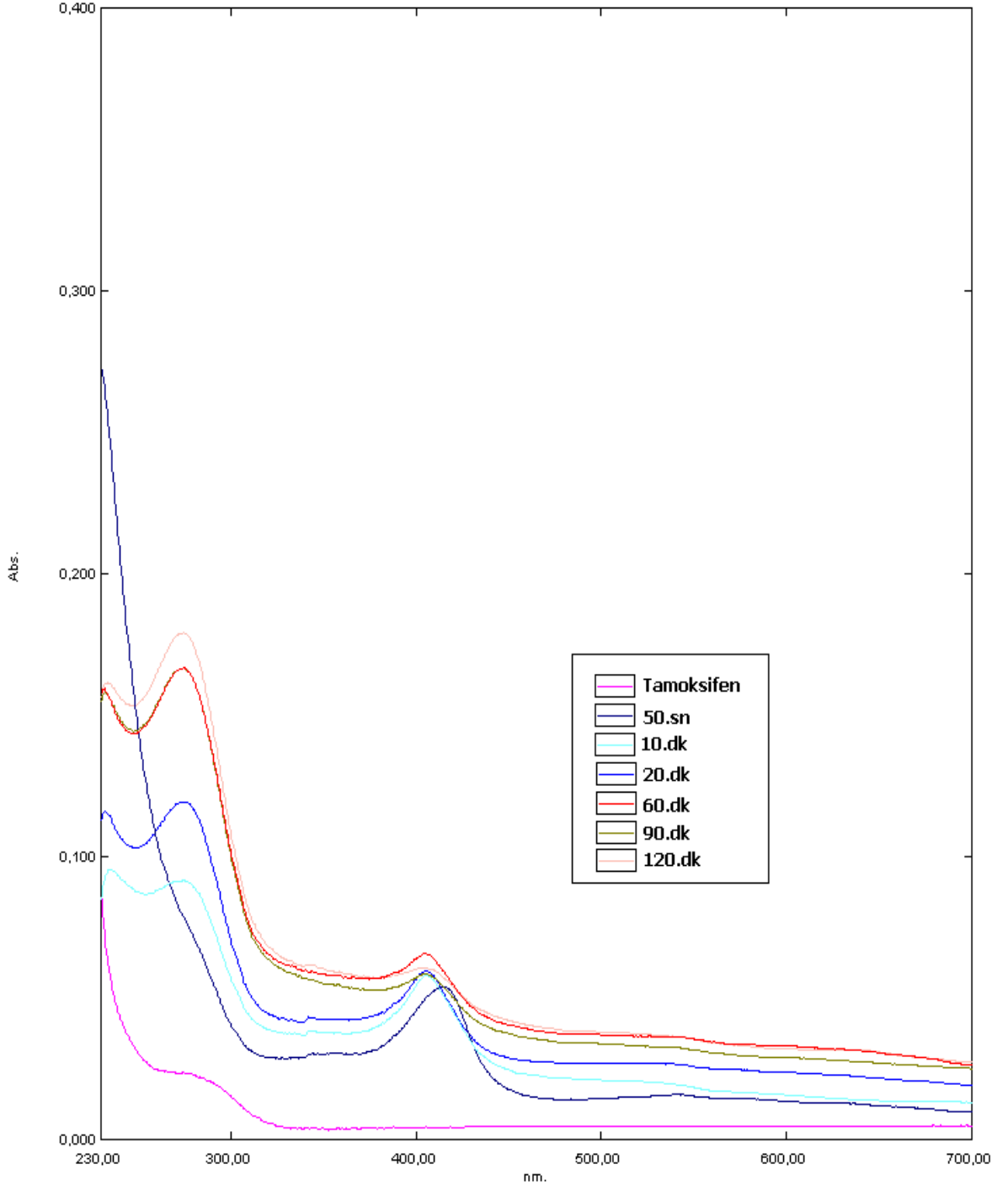
#### 4.3.1 Miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisi



Şekil 4.9 37°C'da miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 10 dakika süreyle alınan absorbanans spektrumları.

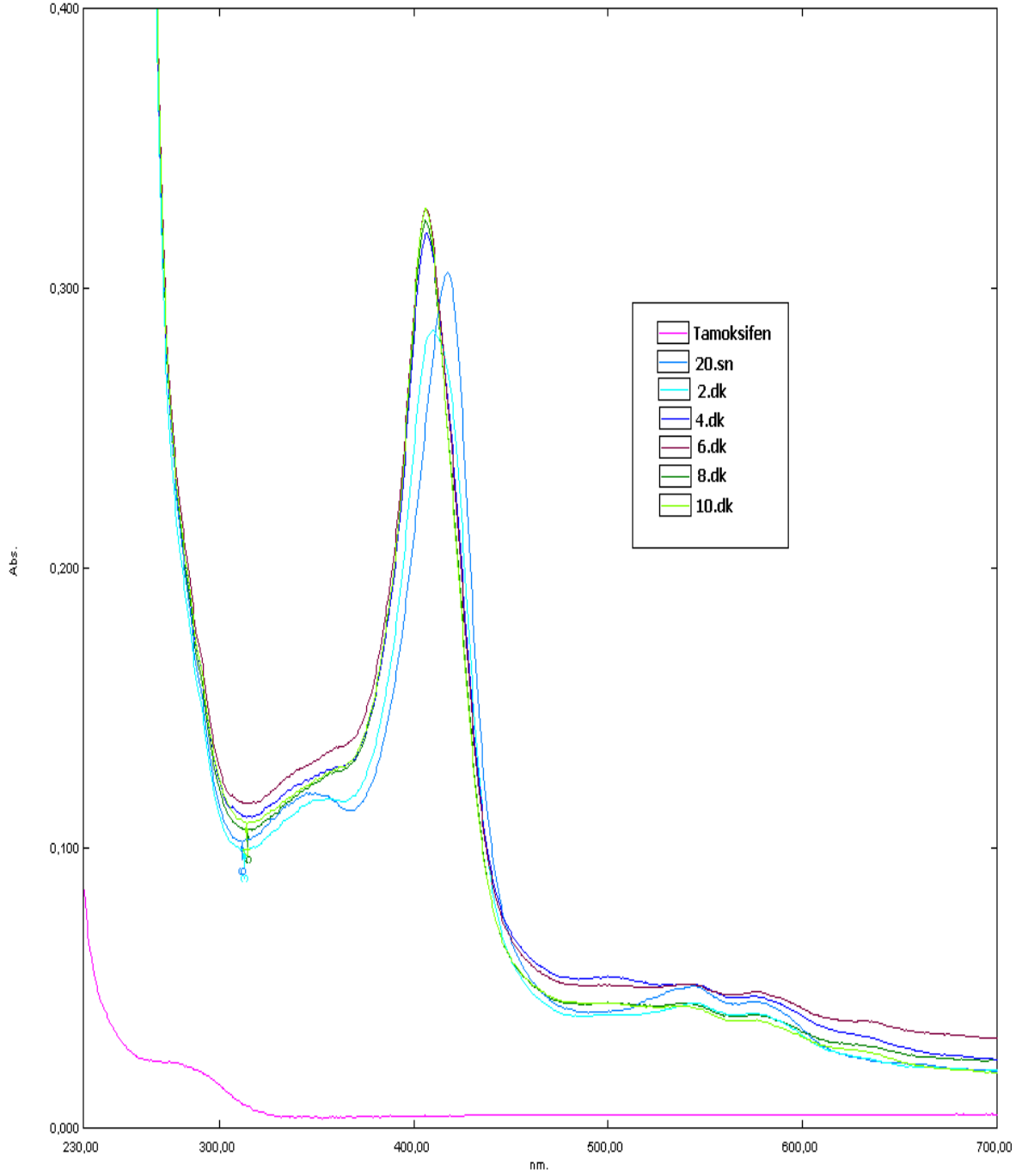


Şekil 4.10 Miyeloperoksidaz enzimi, Tamoksifen ve 37°C'da MPO'nun Tamoksifene 10.dakika süreyle etkisi sonunda alınan absorbans spektrumları.

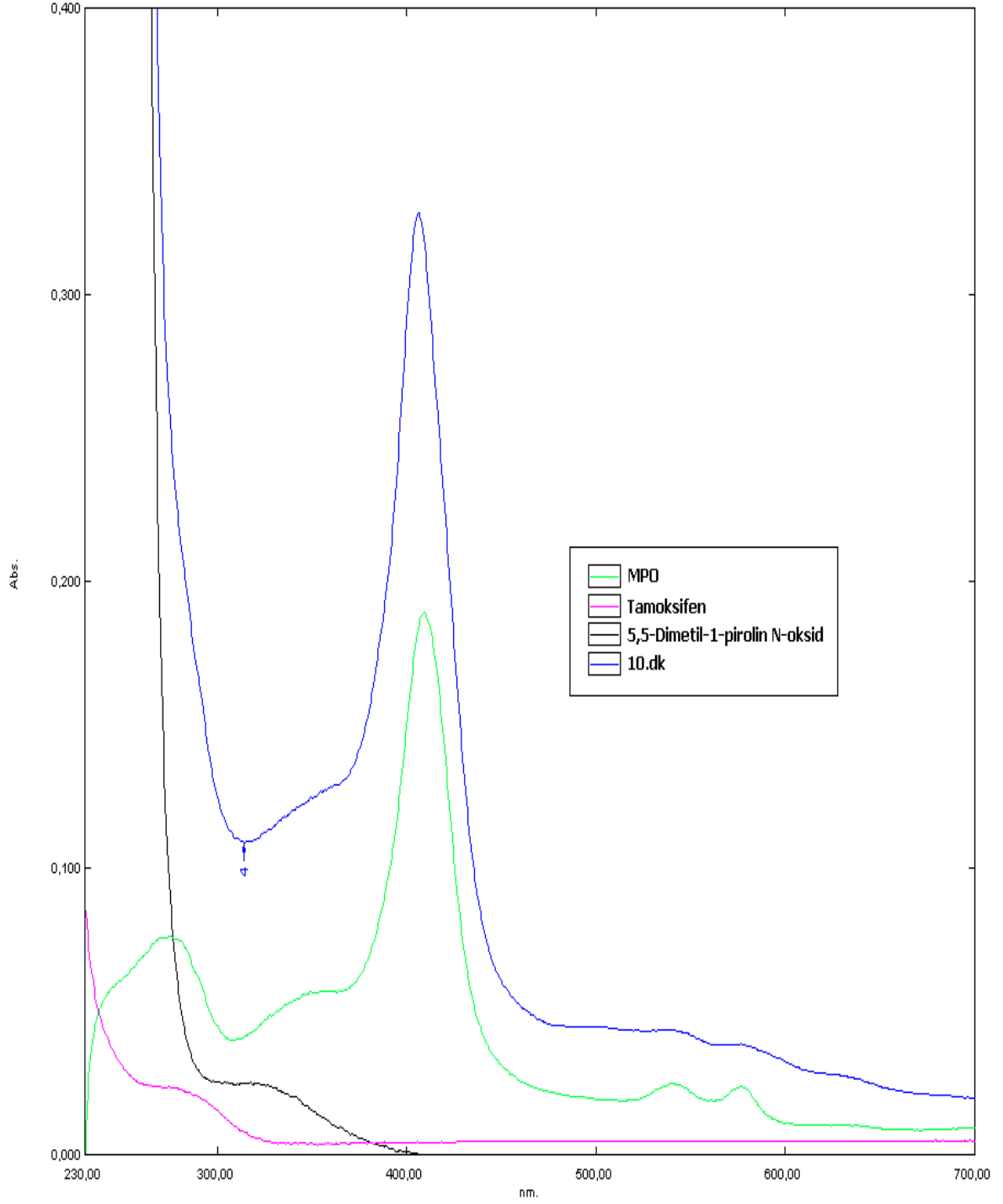


Şekil 4.11 37°C'da miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika süreyle alınan absorbans spektrumları.

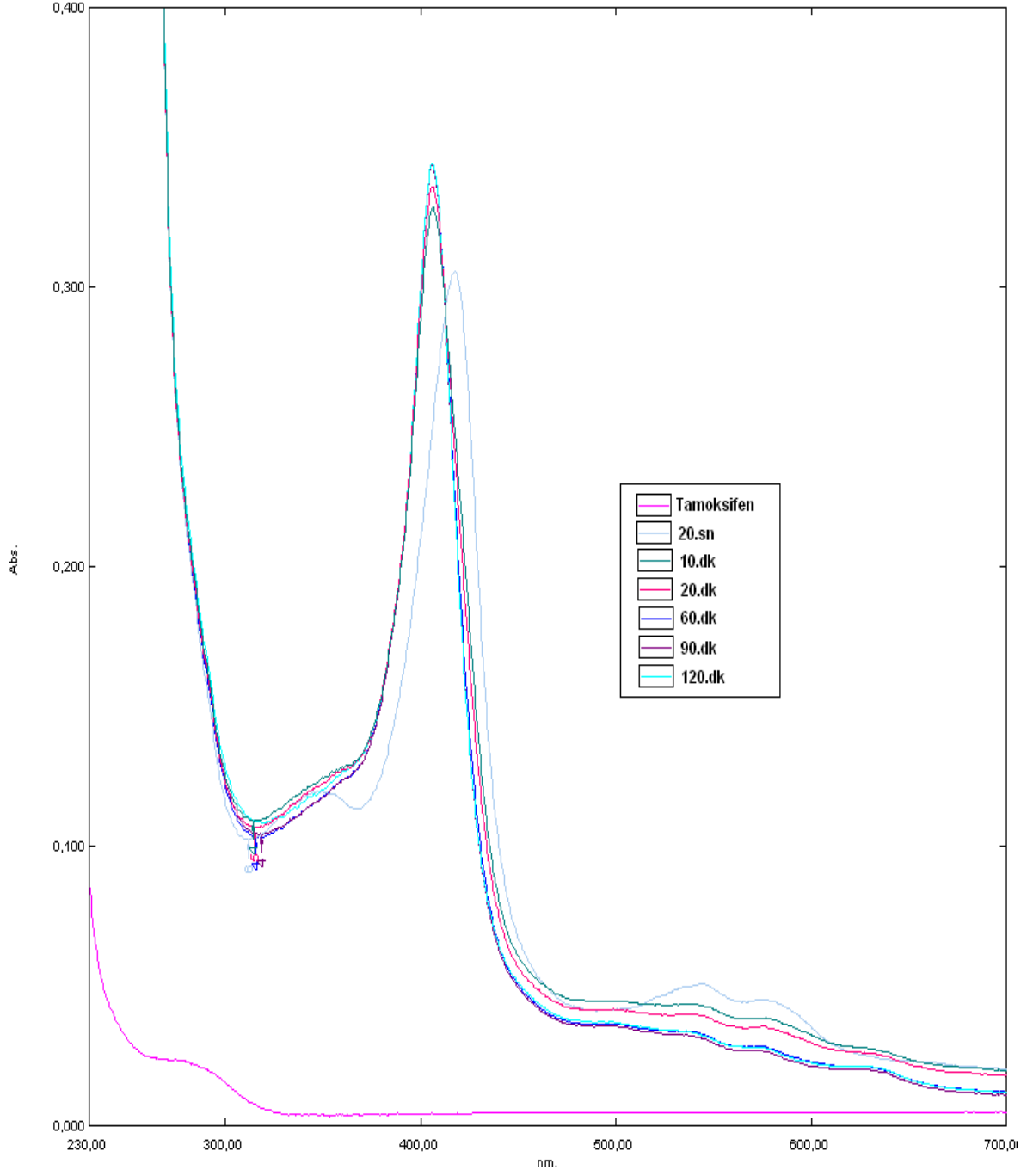
### 4.3.2 Radikal yakalayıcı (Free Radical Trap; 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksidi) varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisi



Şekil 4.12 Radikal yakalayıcı varlığında 37°C'da miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 10 dakika süreyle alınan absorbans spektrumları.

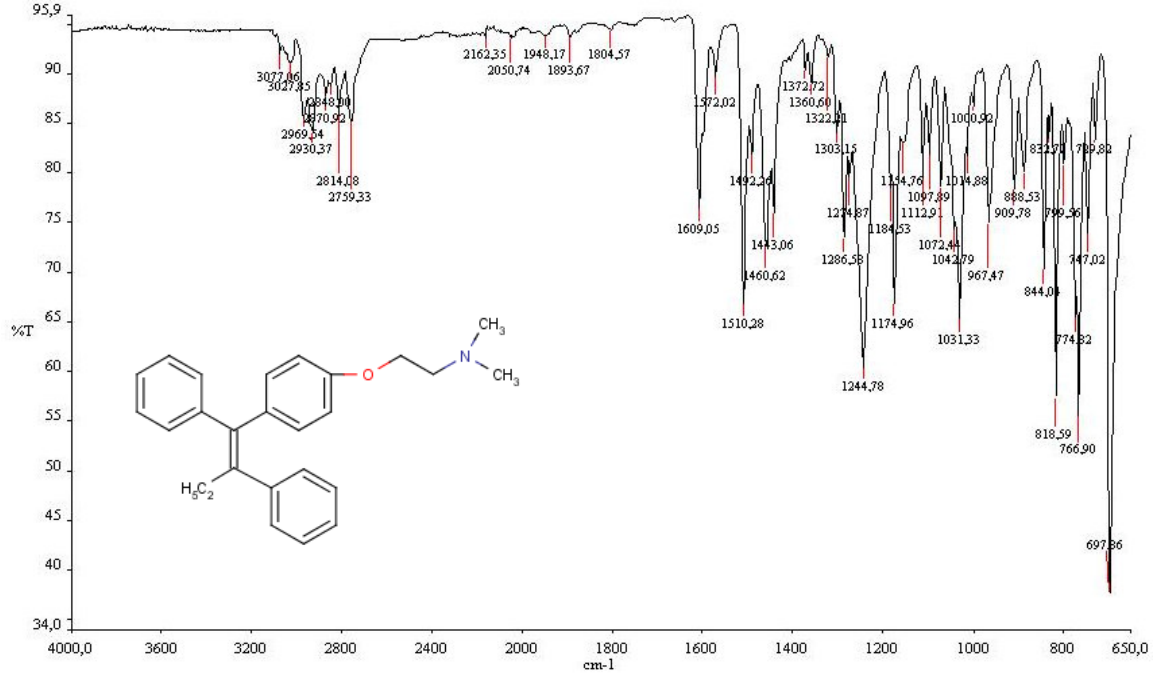


Şekil 4.13 Miyeloperoksidaz enzimi, Tamoksifen, 5,5-Dimetil-1-pirolin N-oksidi (Free radical trap) ve 37°C'da MPO'nun Tamoksifene 10.dakika süreyle etkisi sonunda alınan absorbans spektrumları.

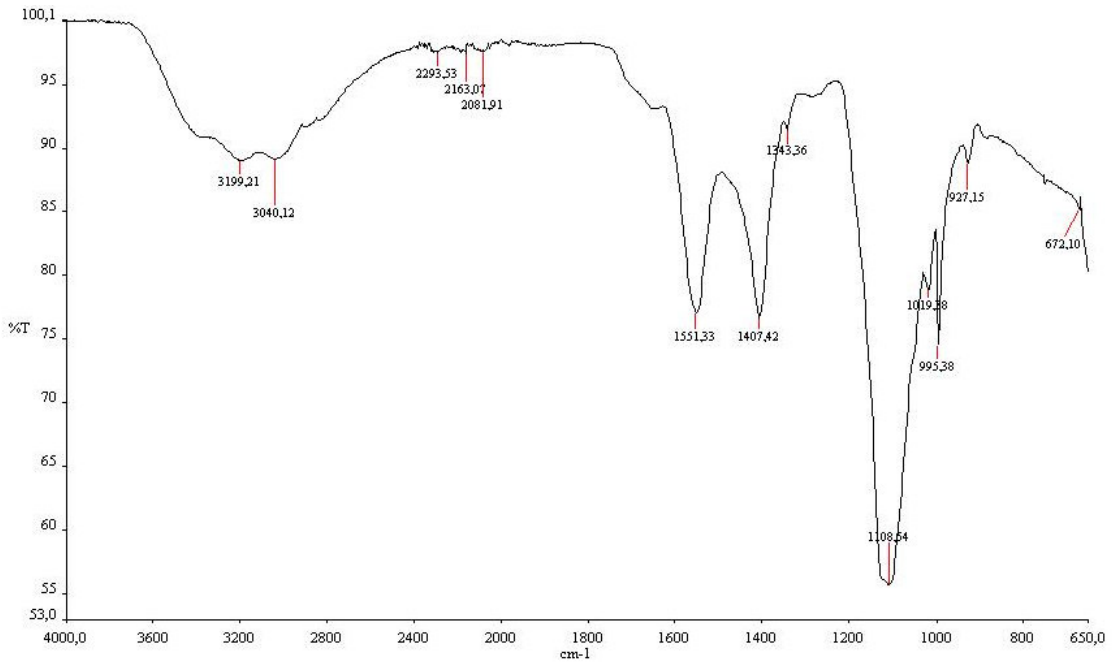


Şekil 4.14 5,5-Dimetil-1-pirolin N-oksit varlığında, 37°C'da miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika süreyle alınan absorban spektrumları.

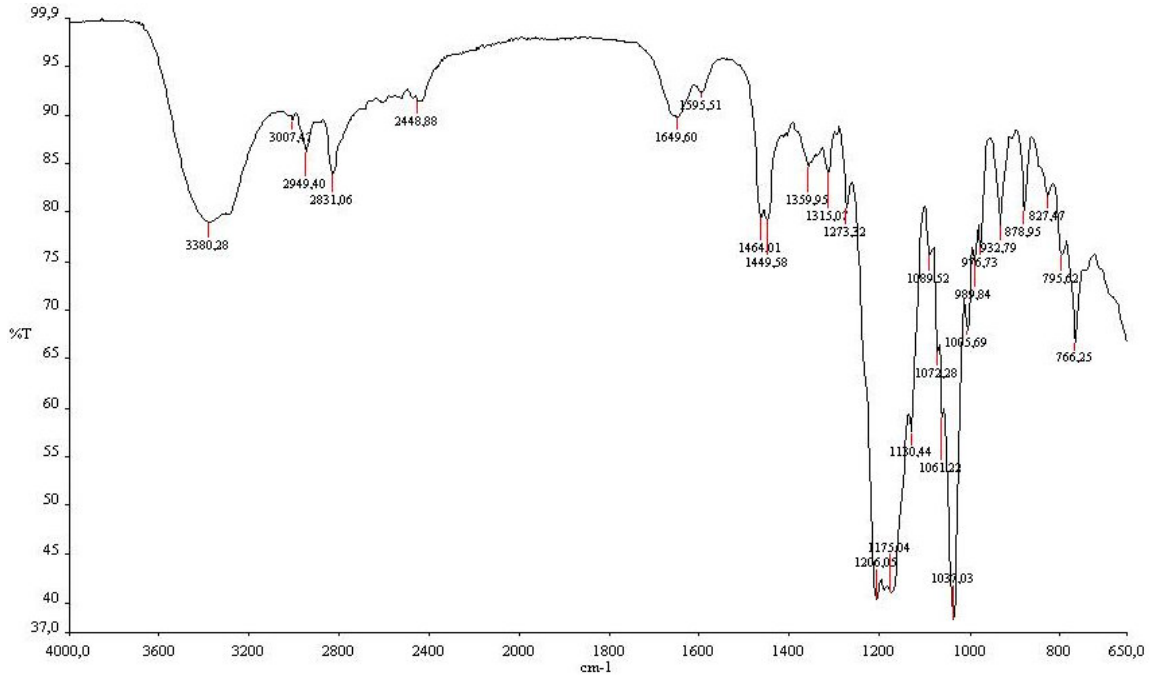
#### 4.4 Miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisinin FT-IR Spektrometre ile İncelenmesi



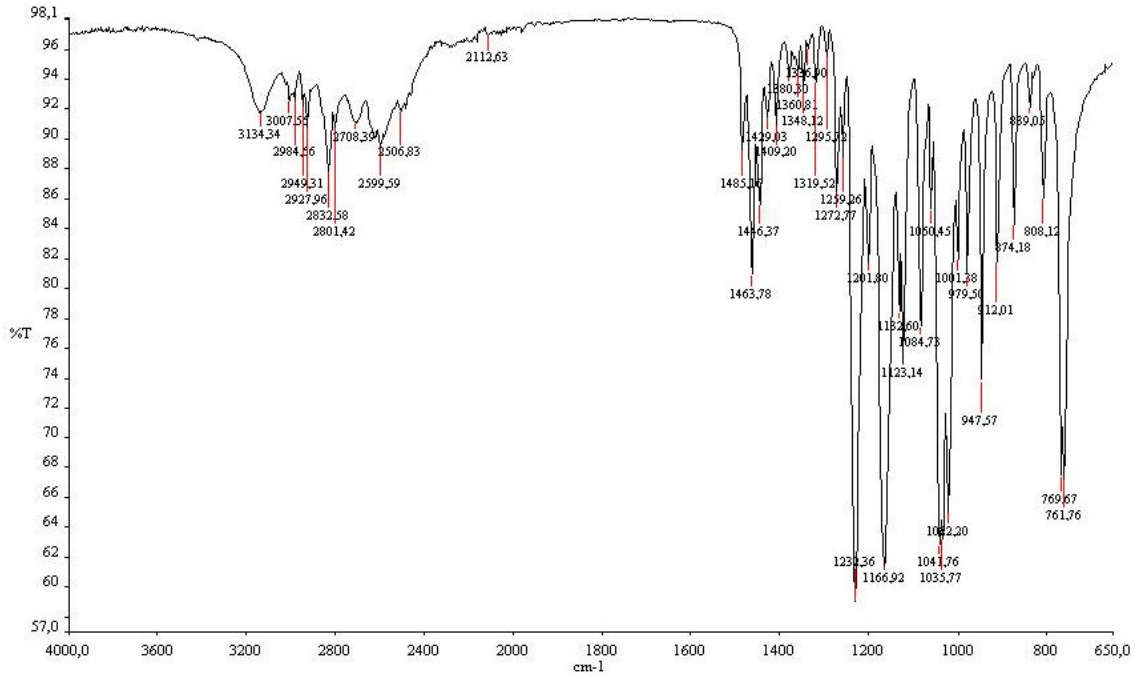
Şekil 4.15 Tamoksifenin FT-IR spektrumu



Şekil 4.16 MPO enziminin FT-IR spektrumu



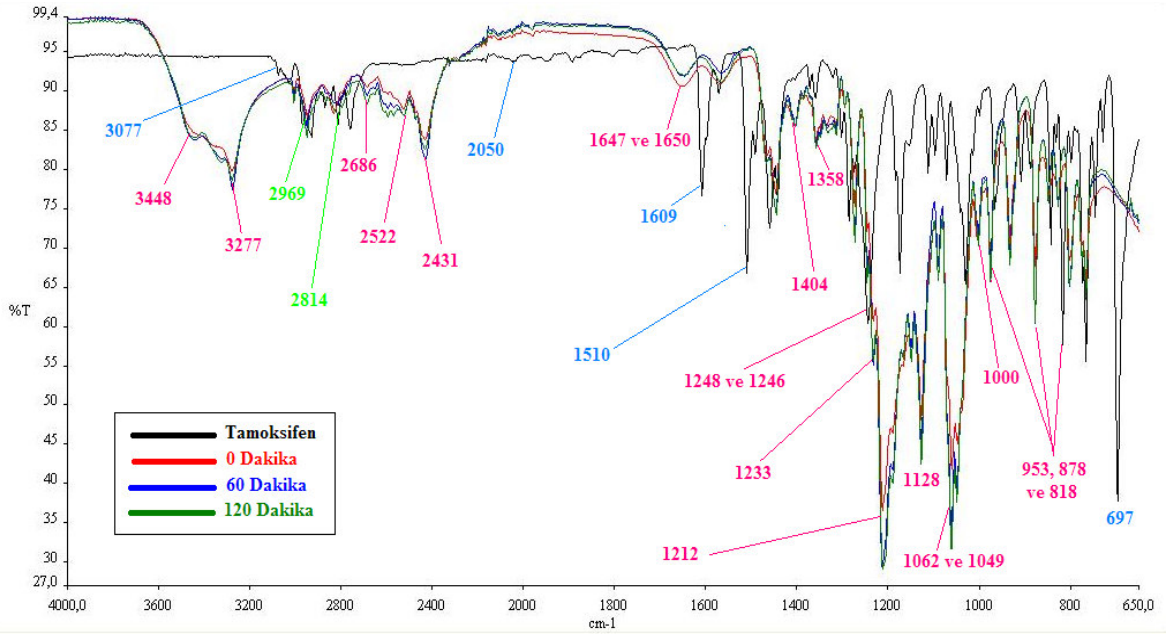
Şekil 4.17 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksidin (Radikal Yakalayıcı; Free Radical Trap) FT-IR spektrumu



Şekil 4.18 HEPES'in FT-IR spektrumu

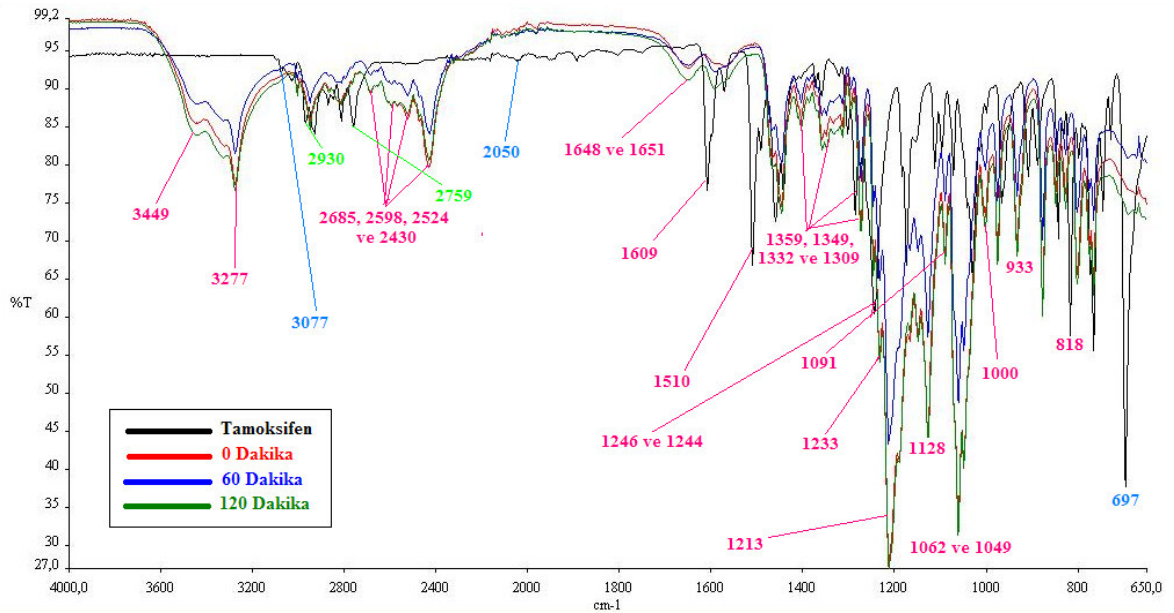


#### 4.4.1 Miyeloperoksidazın Tamoksifene Belirli Sürelerde Etkisi



Şekil 4.19 Miyeloperoksidazın Tamoksifene farklı sürelerde etkisinden sonra örneklerin FT-IR spektrumları

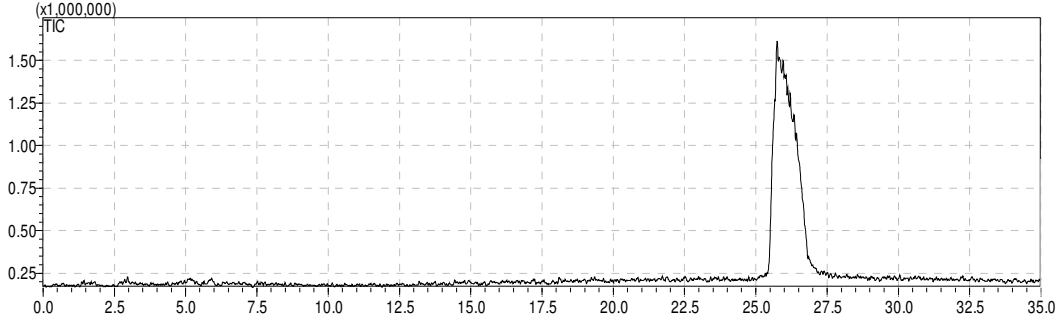
#### 4.4.2 Radikal Yakalayıcı (Free Radical Trap; 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksidi) varlığında Miyeloperoksidazın Tamoksifene Belirli Sürelerde Etkisi



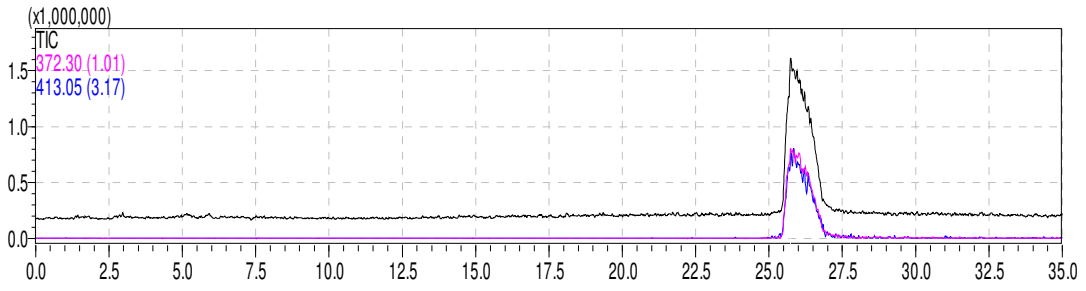
Şekil 4.20 Radikal yakalayıcı (Free Radical Trap; 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksidi) varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene farklı sürelerde etkisinden sonra örneklerin FT-IR spektrumları

#### 4.5 Miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisinin LC-MS Sisteminde İncelenmesi

Bu çalışmada LC-ESI-MS (Elektrospray iyonlaşmalı-kütle spektrometrisi) kullanıldı. Akış hızı 0.2 ml/dk olarak örnekler sisteme verildi ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi.



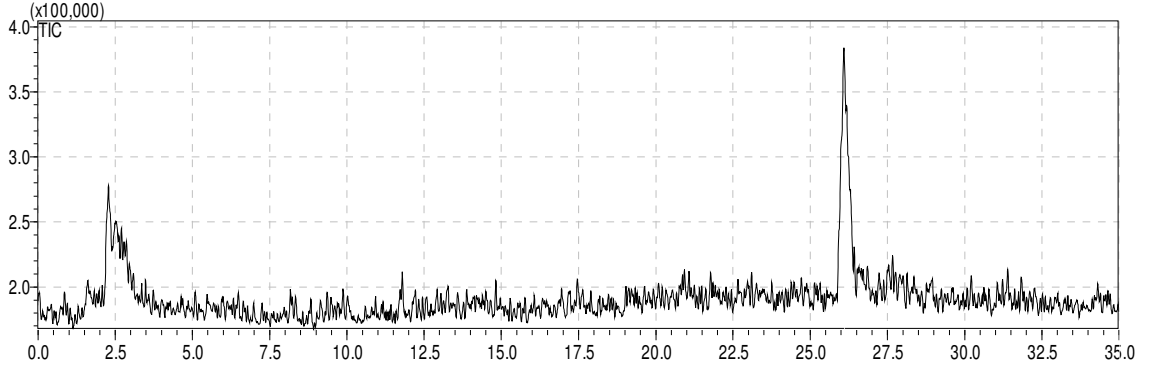
Şekil 4.21 Asetonitrilde çözülüp sisteme verilen Tamoksifenin LC-MS cihazında alınmış kromatogramı



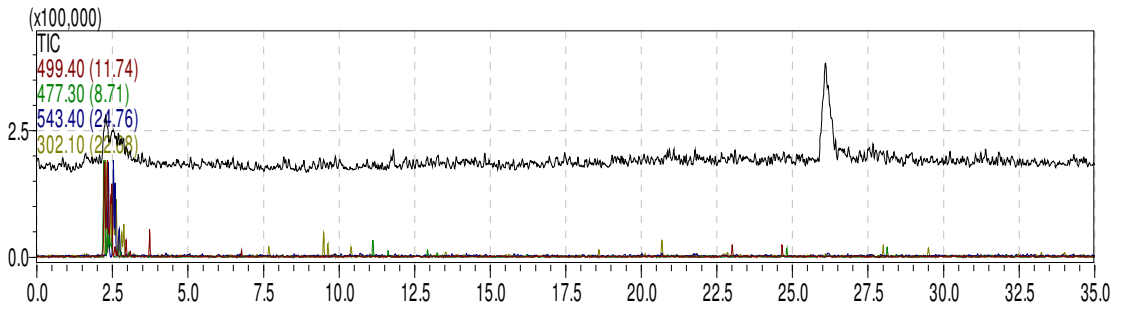
Şekil 4.21.1 Asetonitrilde çözülüp sisteme verilen Tamoksifenin alıkönma zamanı: 25.693-26.360 dk.olan MS yarıllamasının MS kromatogramında belirtilmesi



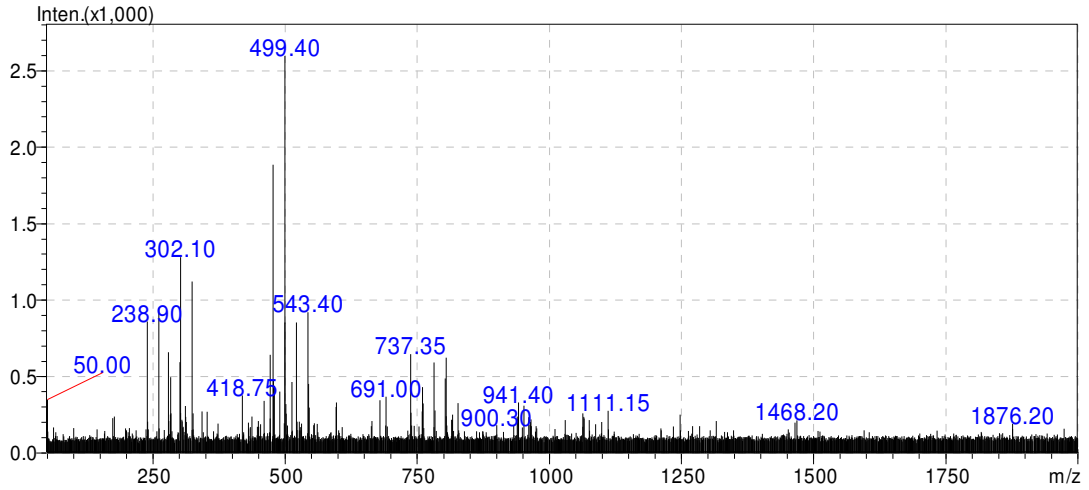
Şekil 4.21.2 Asetonitrilde çözülüp sisteme verilen Tamoksifenin alıkönma zamanı: 25.693-26.360 dk.olan MS yarıllaması



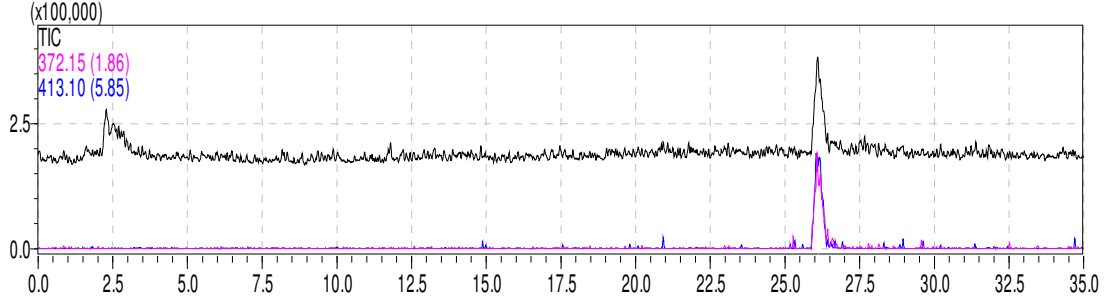
Şekil 4.22 HEPES tamponu içinde çözülmüş Tamoksifenin LC-MS cihazında alınmış kromatogramı



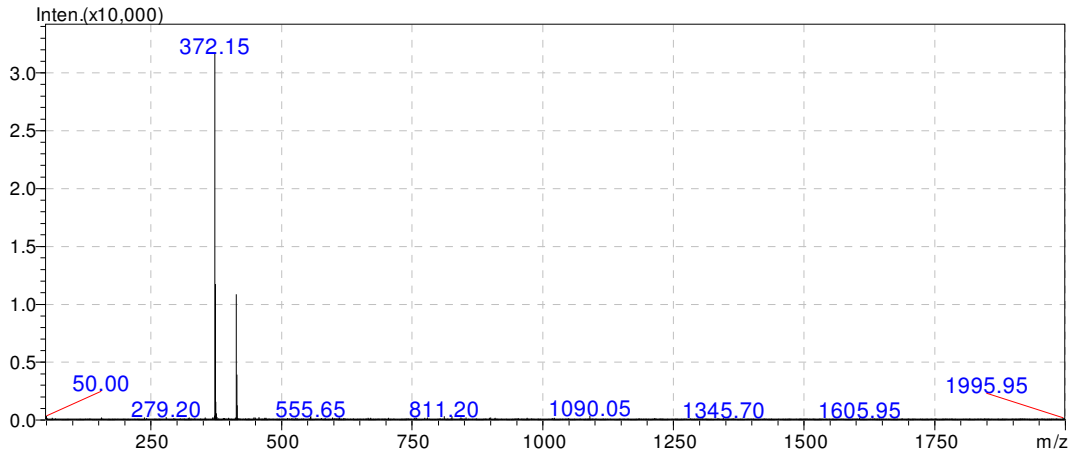
Şekil 4.22.1 HEPES tamponu içinde çözülmüş Tamoksifenin alıkonma zamanı: 2.047 - 3.340 dk olan MS yarılmasının MS kromatogramında belirtilmesi



Şekil 4.22.2 HEPES tamponu içinde çözülmüş Tamoksifenin alıkonma zamanı: 2.047 - 3.340 dk.olan MS yarılması



Şekil 4.22.3 HEPES tamponu içinde çözülmüş Tamoksifenin alıkonma zamanı:  
25.780-26.673 dk. olan MS yarılmasının MS kromatogramında belirtilmesi

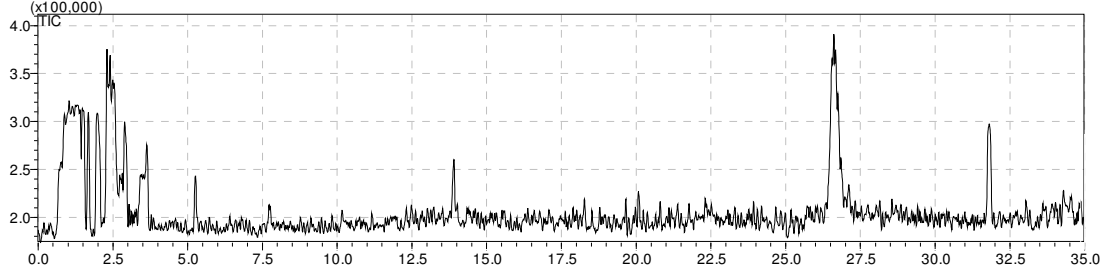


Şekil 4.22.4 HEPES tamponu içinde çözülmüş Tamoksifenin alıkonma zamanı:  
25.780-26.673 dk. olan MS yarılması

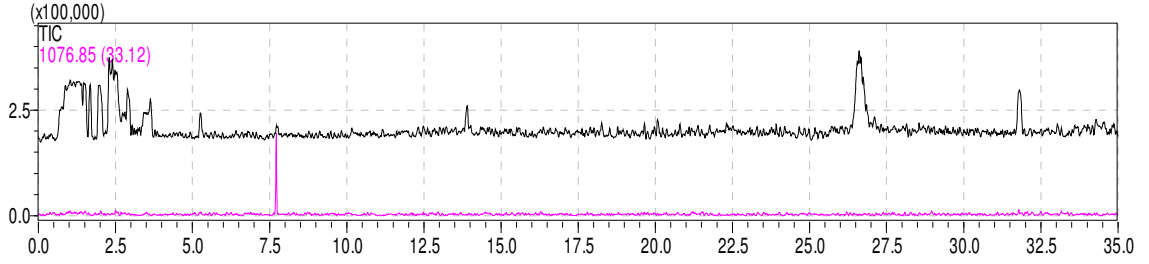
#### 4.5.1 Miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisi

##### 4.5.1.1. 0 dakika bekleme ile reaksiyon sonuçları

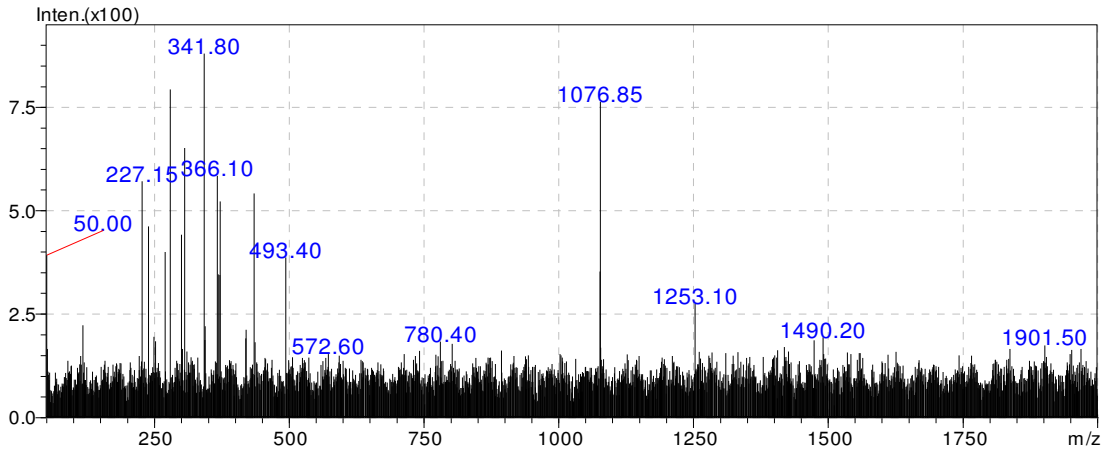
Miyeloperoksidazın Tamoksifendeki bazı bağları parçalayacağı düşünülerek reaksiyon başlatıldı ve reaksiyon başlatıldıktan hemen sonra LC-MS sistemine verildi.



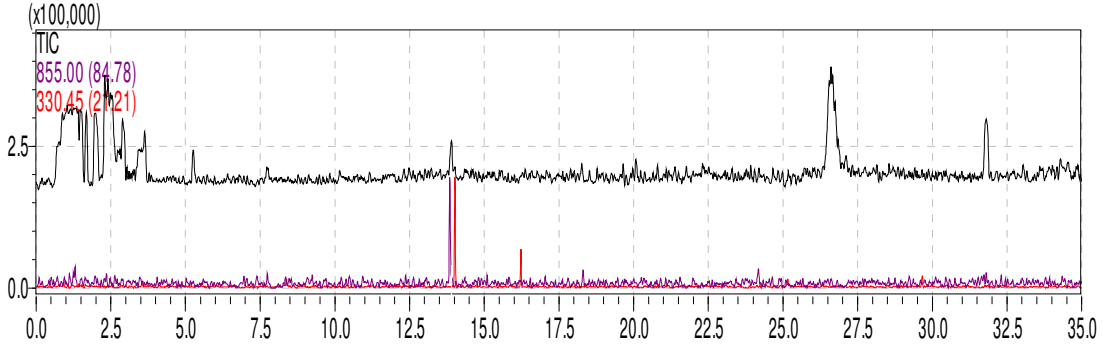
Şekil 4.23 Miyeloperoksidazın Tamoksifen etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı



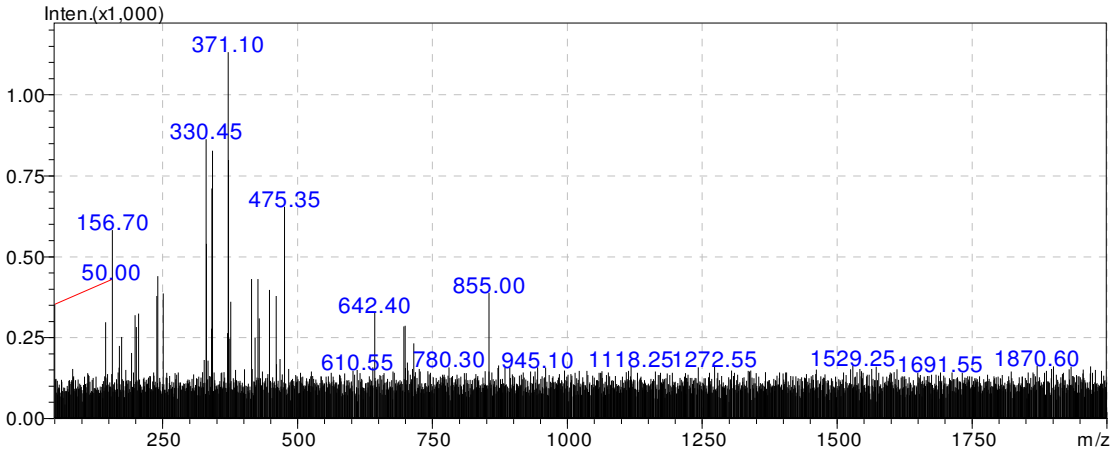
Şekil 4.23.1 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 7.613 - 7.927 dk.olan MS yarılmalarının kromatogramda belirtilmesi



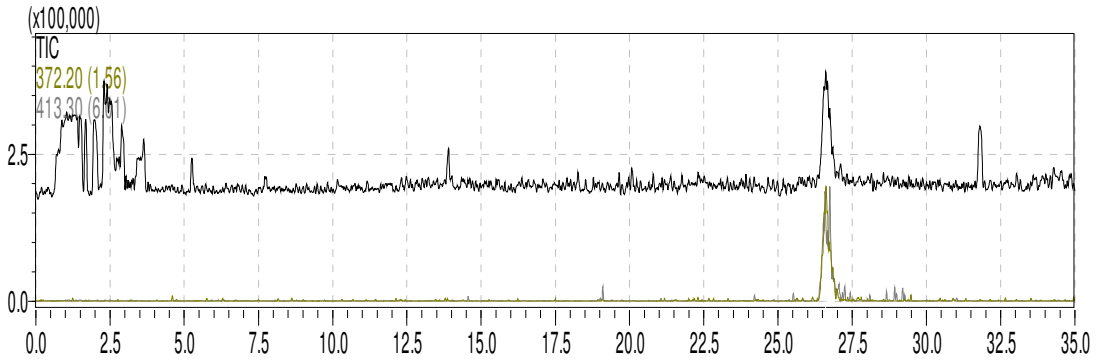
Şekil 4.23.2 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 7.613 - 7.927 dk.olan MS yarılmaları



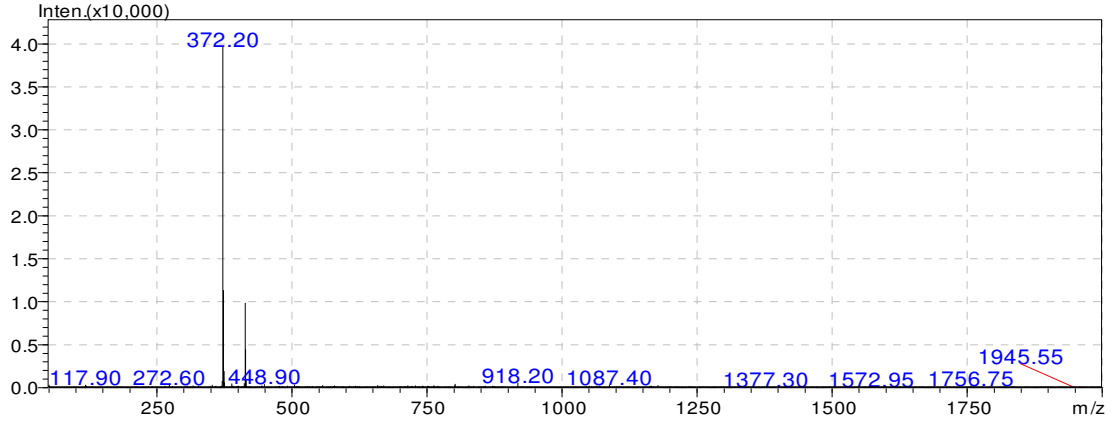
Şekil 4.23.3 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 13.760 -14.073 dk.olan MS yarılmalarının kromatogramda belirtilmesi



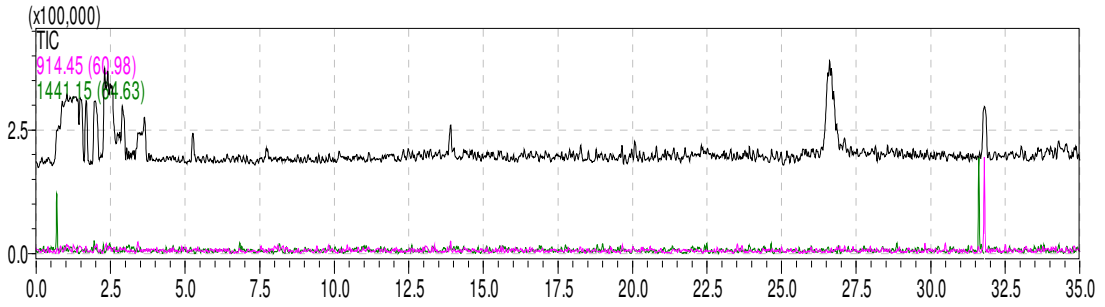
Şekil 4.23.4 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 13.760 -14.073 dk.olan MS yarılmaları



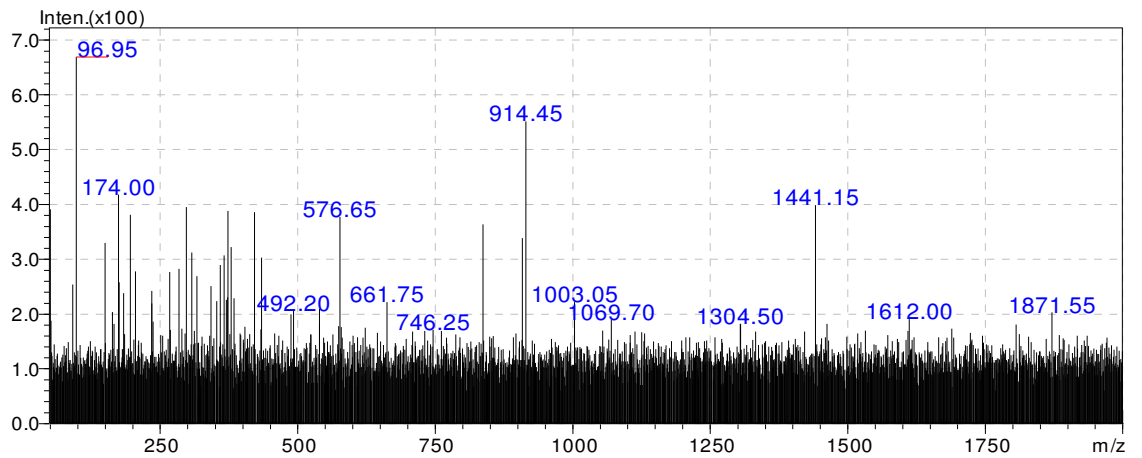
Şekil 4.23.5 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.307 - 27.107 dk.olan MS yarılmalarının kromatogramda belirtilmesi



Şekil 4.23.6 Miyeloperksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.307 - 27.107 dk.olan MS yarılması



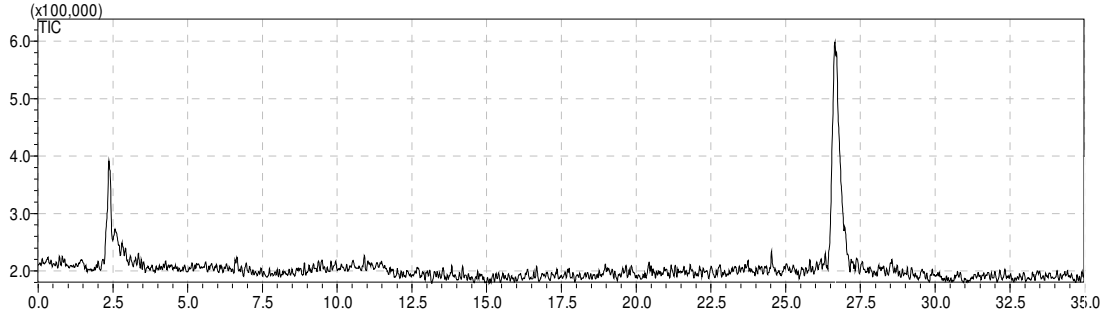
Şekil 4.23.7 Miyeloperksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 31.613 - 31.973 dk.olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi



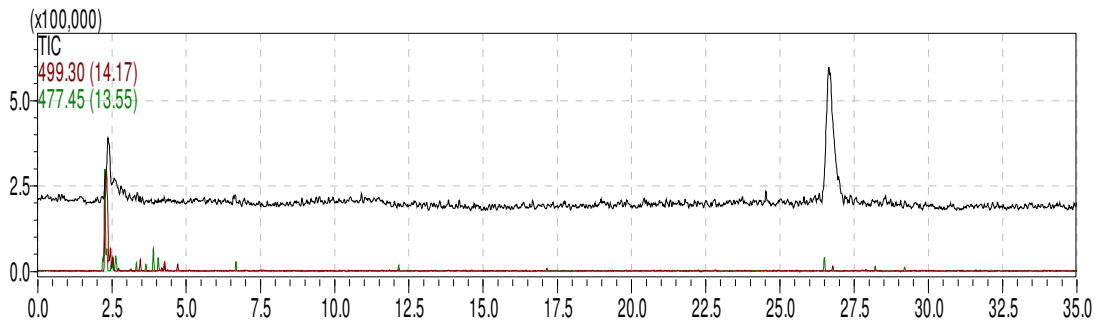
Şekil 4.23.8 Miyeloperksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 31.613 - 31.973 dk.olan MS yarılması

#### 4.5.1.2. 60 dakika bekleme ile reaksiyon sonuçları

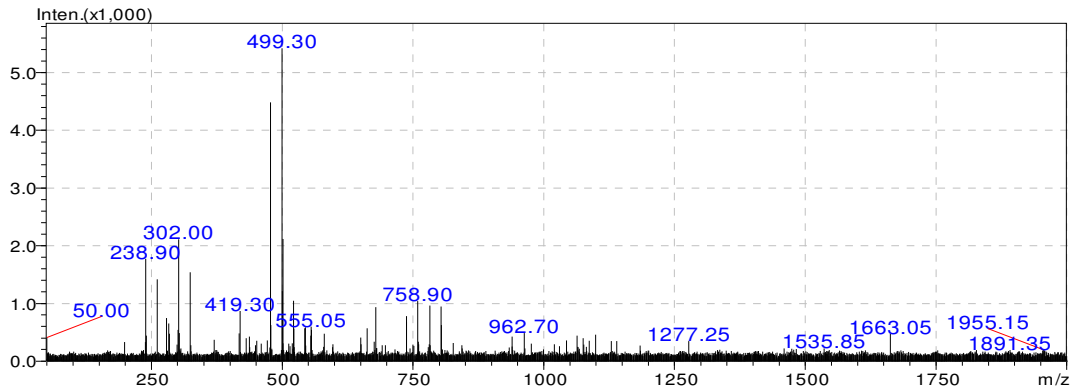
Miyeloperoksidazın Tamoksifenindeki bazı bağları parçalayacağı düşünülerek reaksiyon başlatıldı ve reaksiyon başlatıldıktan 60 dakika sonra LC-MS sistemine verildi.



Şekil 4.24 Miyeloperoksidazın Tamoksifen etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı

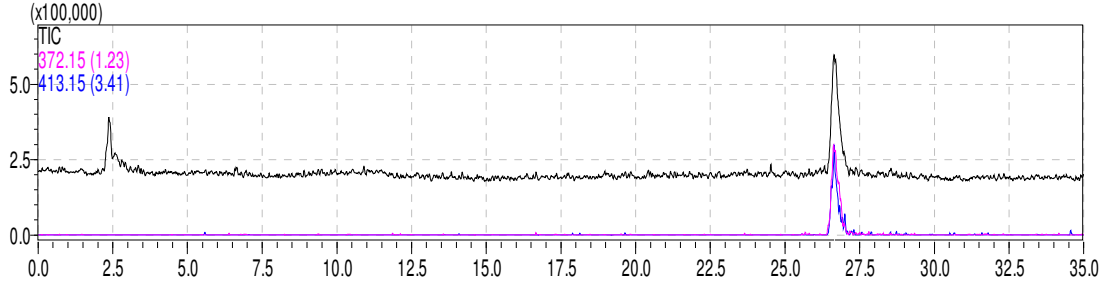


Şekil 4.24.1 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 2.180 - 2.673 dk.olan MS yarılmalarının kromatogramda belirtilmesi

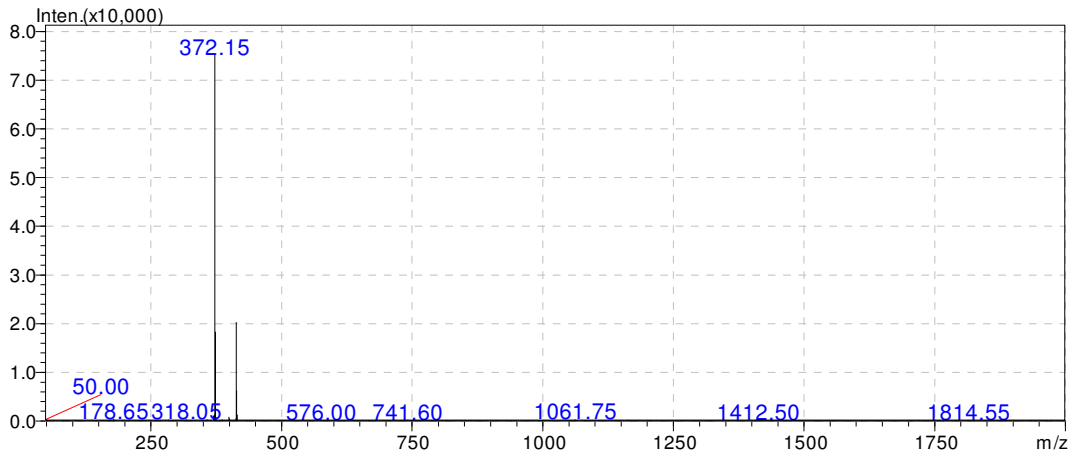


Şekil 4.24.2 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 2.180 - 2.673 dk.olan MS yarılmaları





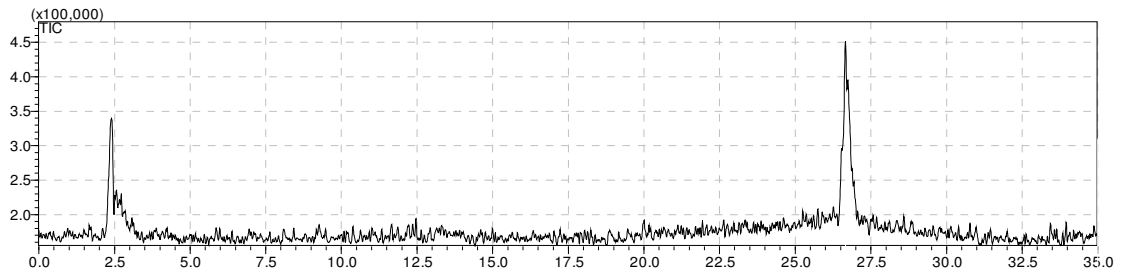
Şekil 4.24.3 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.320 - 27.253 dk.olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi



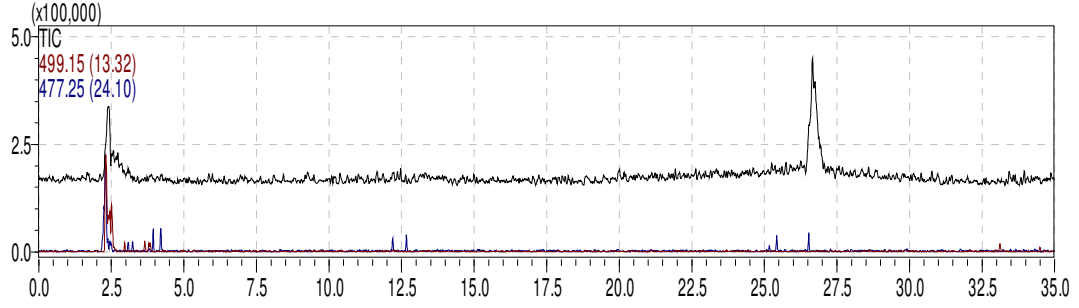
Şekil 4.24.4 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.320 - 27.253 dk.olan MS yarılması

#### 4.5.1.3. 120 dakika bekleme ile reaksiyon sonuçları

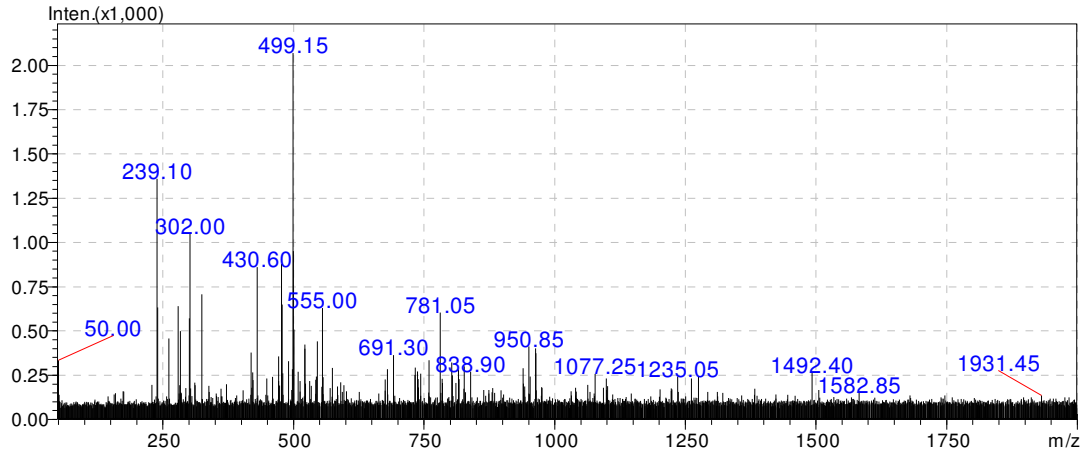
Miyeloperoksidazın Tamoksifendeki bazı bağları parçalayacağı düşünülerek reaksiyon başlatıldı ve reaksiyon başlatıldıktan 120 dakika sonra LC-MS sistemine verildi.



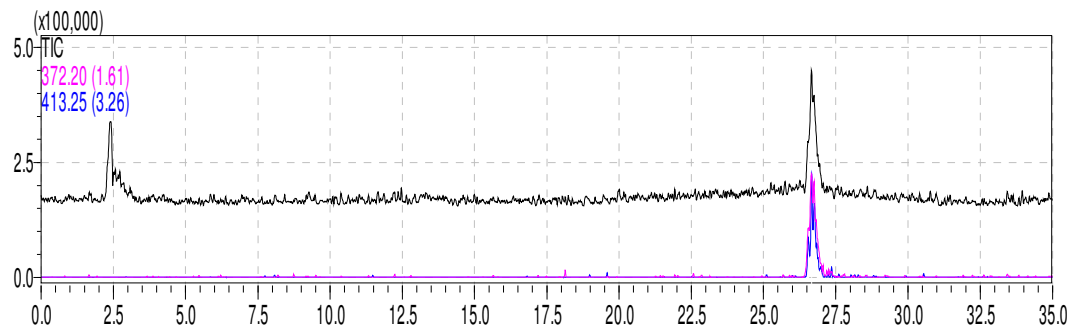
Şekil 4.25 Miyeloperoksidazın Tamoksifen etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı



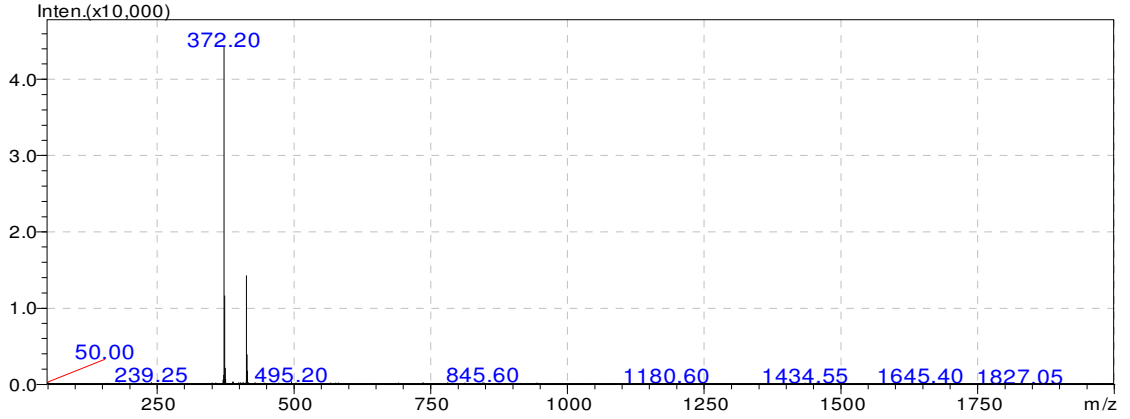
Şekil 4.25.1 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 2.180 - 3.293 dk. olan MS yarılmalarının kromatogramda belirtilmesi



Şekil 4.25.2 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 2.180 - 3.293 dk. olan MS yarılmaları

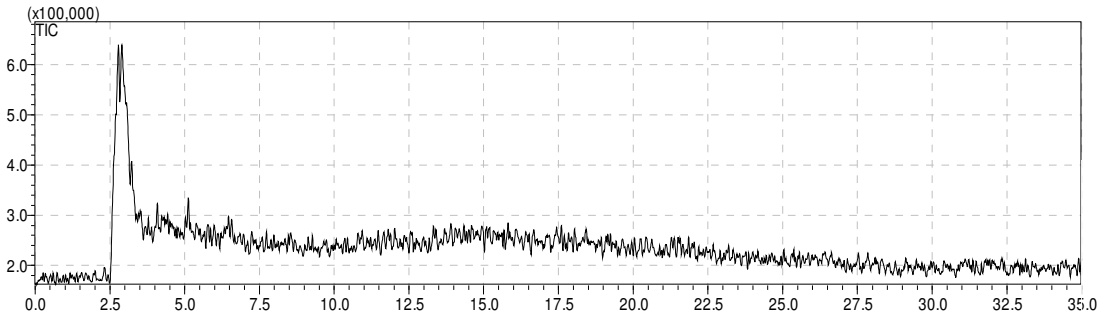


Şekil 4.25.3 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.360 - 27.253 dk. olan MS yarılmalarının kromatogramda belirtilmesi

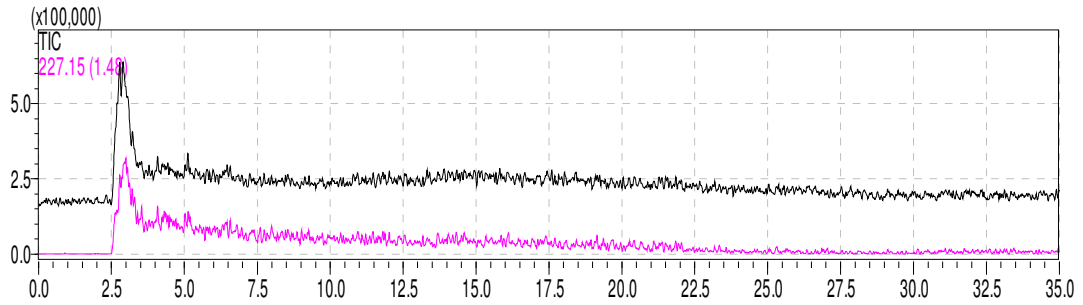


Şekil 4.25.4 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.360 - 27.253 dk. olan MS yarılması

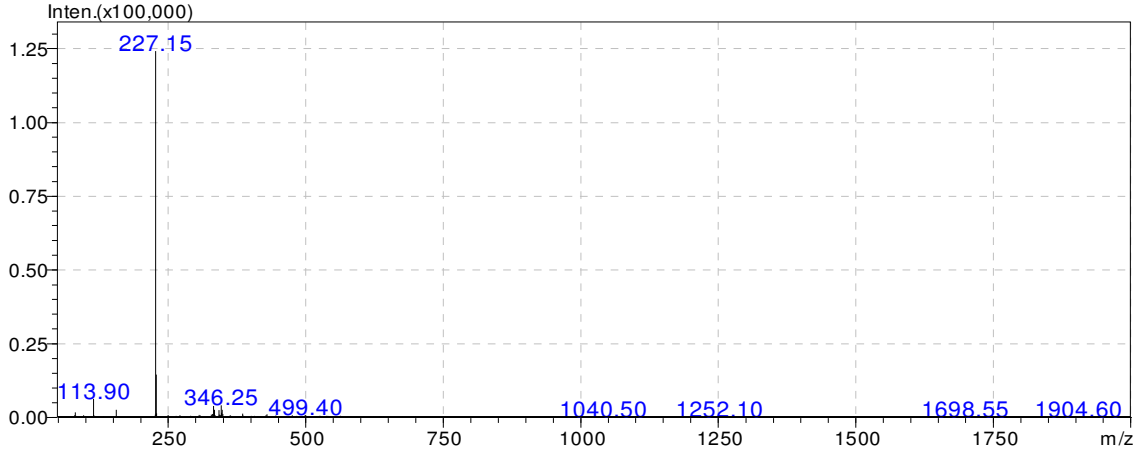
#### 4.5.2. Radikal Yakalayıcı (Free Radical Trap; 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksidi) varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene Etkisi



Şekil 4.26 Radikal yakalayıcının LC-MS cihazında alınmış kromatogramı



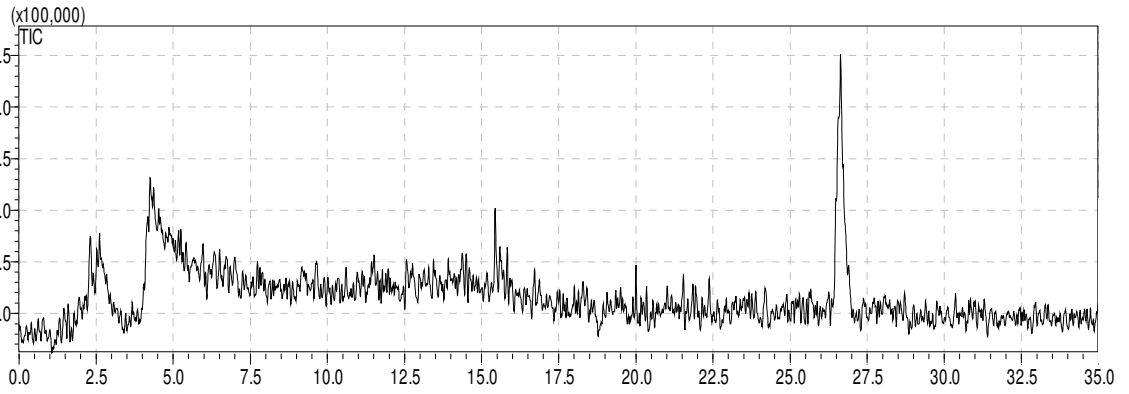
Şekil 4.26.1 Radikal yakalayıcının alıkonma zamanı: 2.500 - 3.480 dk. olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi



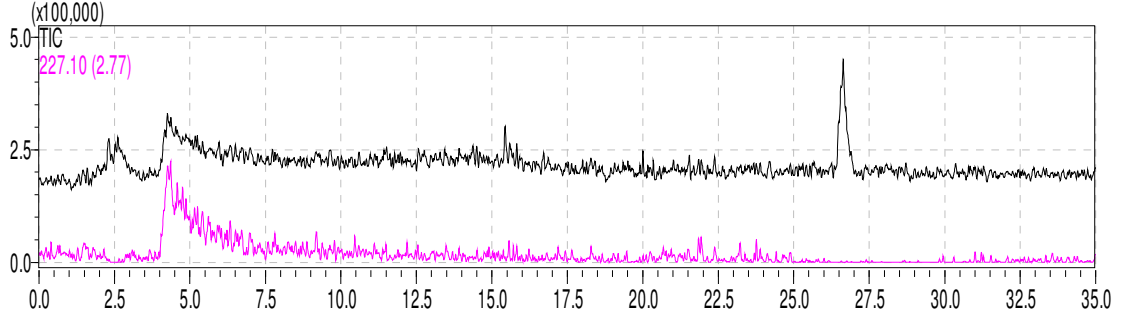
Şekil 4.26.2 Radikal yakalayıcının alıkonma zamanı: 2.500 - 3.480 dk.olan MS yarılması

#### 4.5.2.1. Radikal yakalayıcı (Free Radical Trap; 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit) varlığında 0 dakika bekleme ile reaksiyon sonuçları

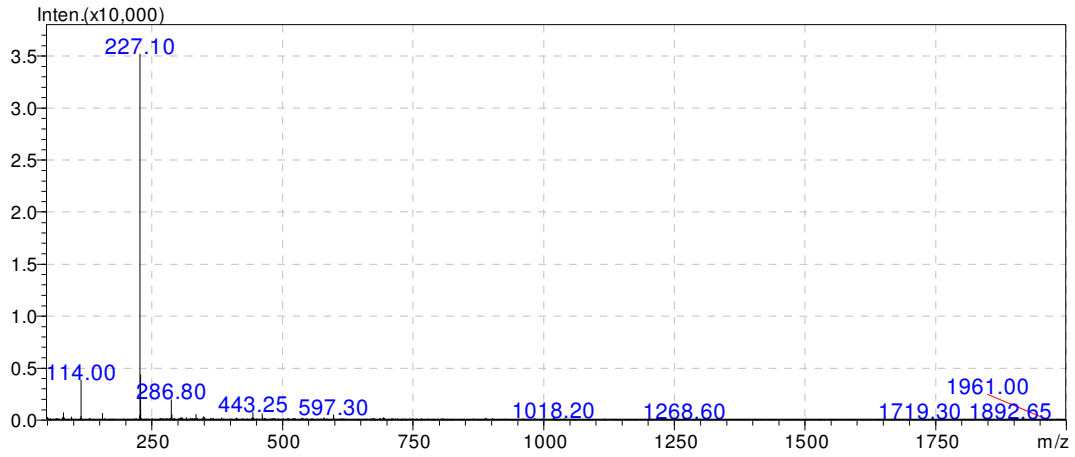
Miyeloperoksidazın Tamoksifendeki bazı bağları parçalayacağı düşünülerek reaksiyon 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit varlığında başlatıldı ve reaksiyon başlatıldıktan 0 dakika sonra LC-MS sistemine verildi.



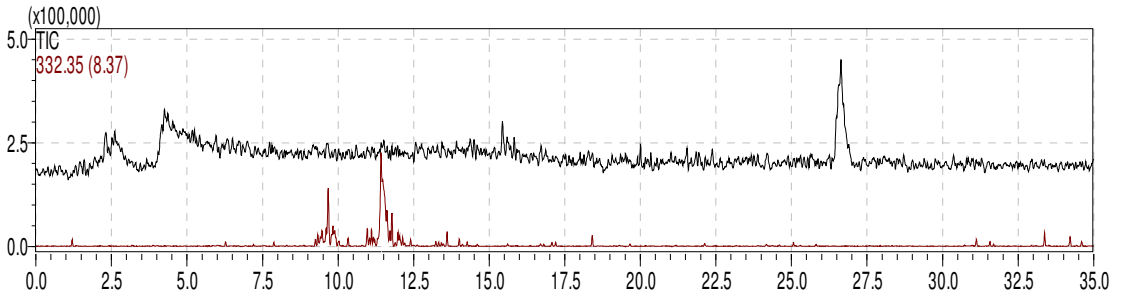
Şekil 4.27 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı



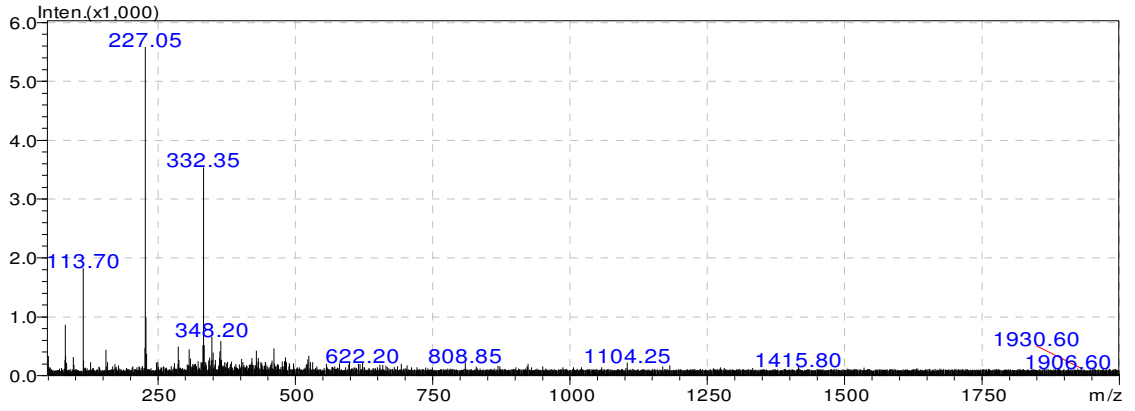
Şekil 4.27.1 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 3.693- 5.700 dk.olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi



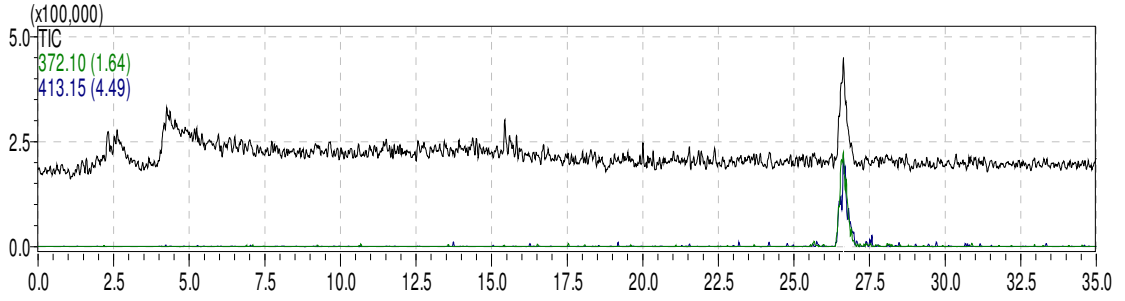
Şekil 4.27.2 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 3.693- 5.700 dk.olan MS yarılması



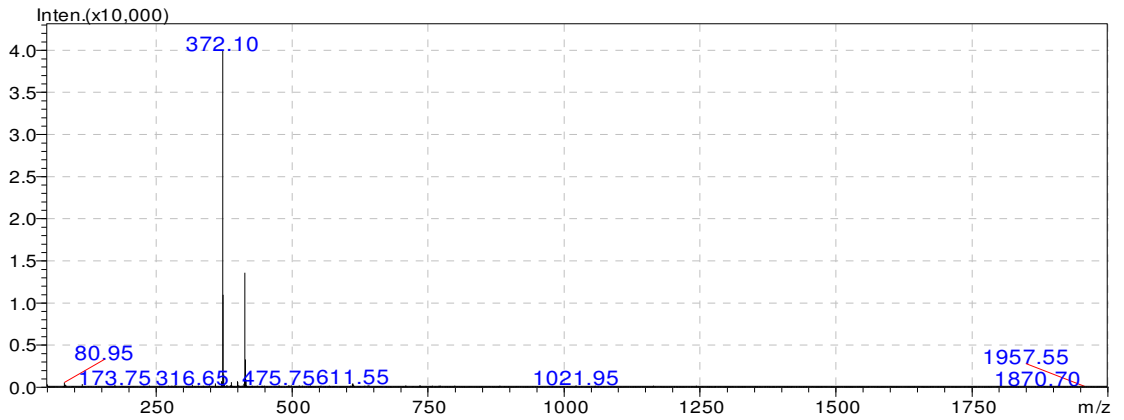
Şekil 4.27.3 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 11.220 - 12.960 dk. olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi



Şekil 4.27.4 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 11.220 - 12.960 dk. olan MS yarılması



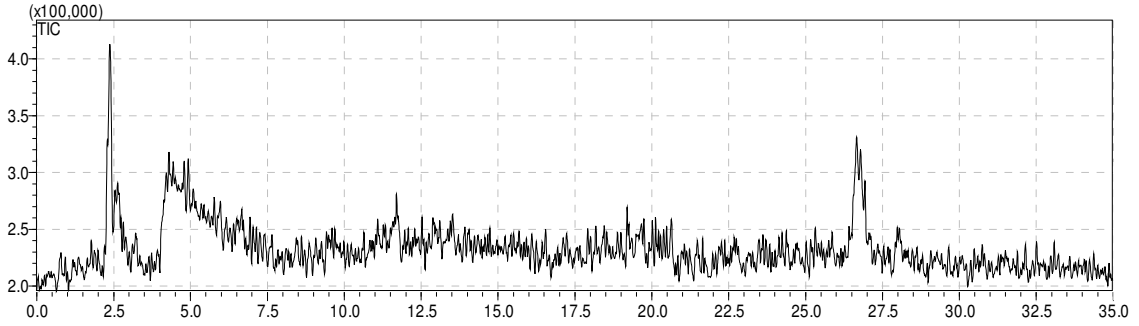
Şekil 4.27.5 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.227 - 27.293 dk. olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi



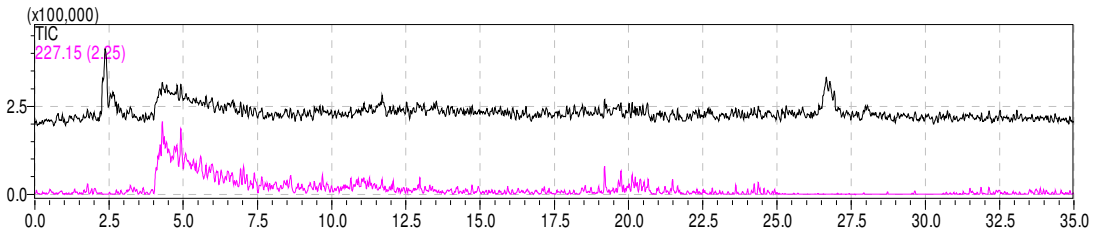
Şekil 4.27.6 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.227 - 27.293 dk. olan MS yarılması

#### 4.5.2.2. Radikal yakalayıcı (Free Radical Trap; 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksidi) varlığında 60 dakika bekleme ile reaksiyon sonuçları

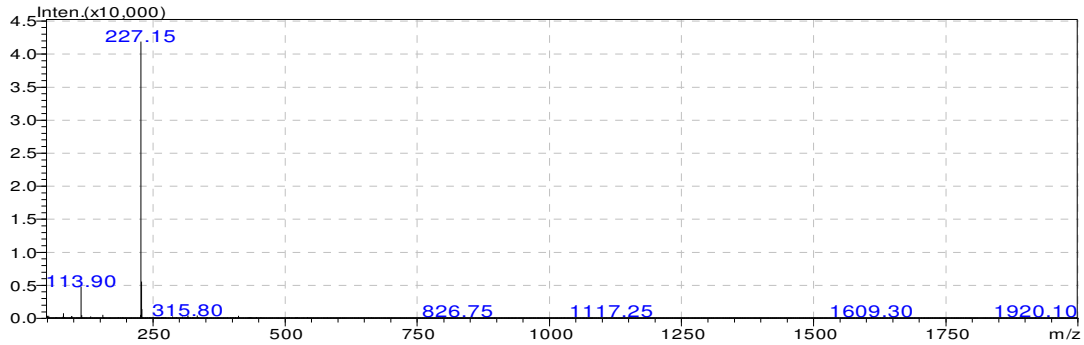
Miyeloperoksidazın Tamoksifendeki bazı bağları parçalayacağı düşünülerek reaksiyon 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksidi varlığında başlatıldı ve reaksiyon başlatıldıktan 60 dakika sonra LC-MS sistemine verildi.



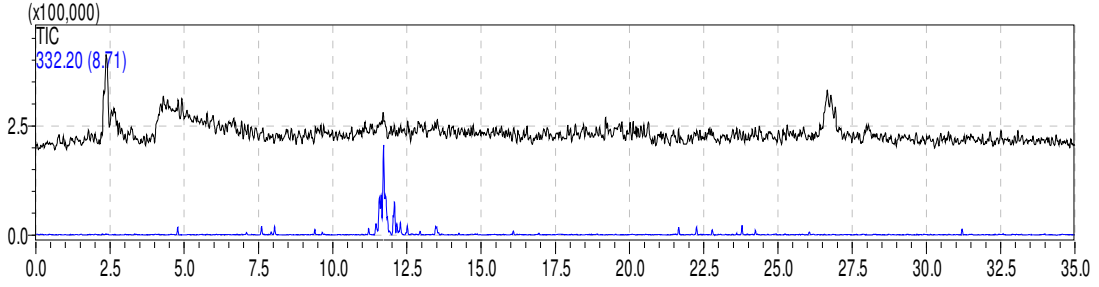
Şekil 4.28 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı



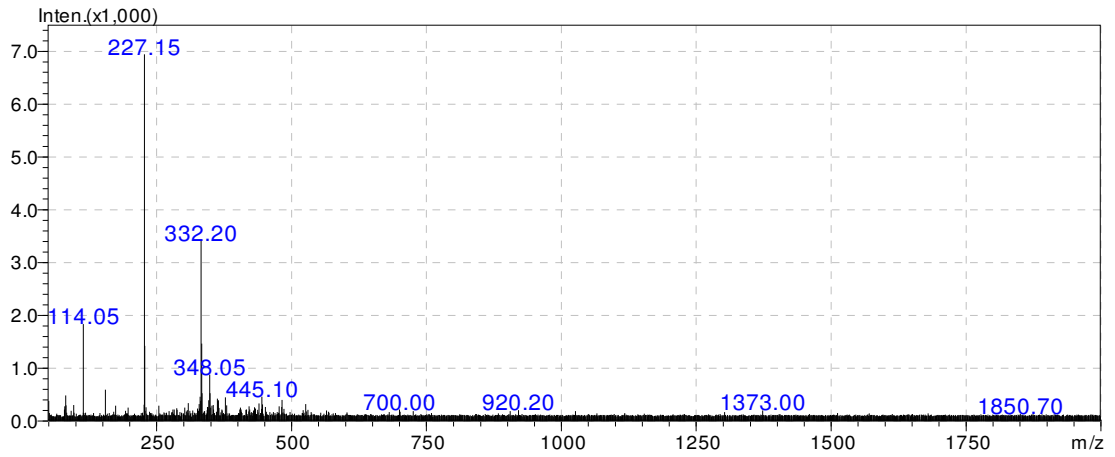
Şekil 4.28.1 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 3.873 - 5.833 dk. olan MS yarılmalarının kromatogramda belirtilmesi



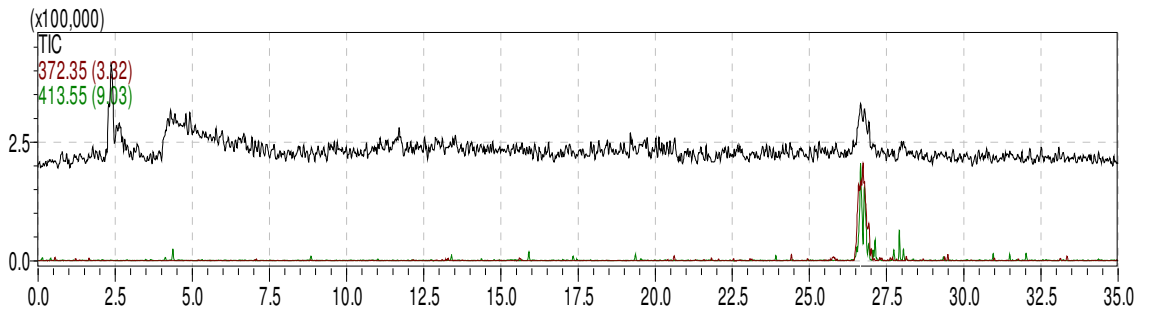
Şekil 4.28.2 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 3.873 - 5.833 dk. olan MS yarılmaları



Şekil 4.28.3 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 11.487 - 12.867 dk. olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi

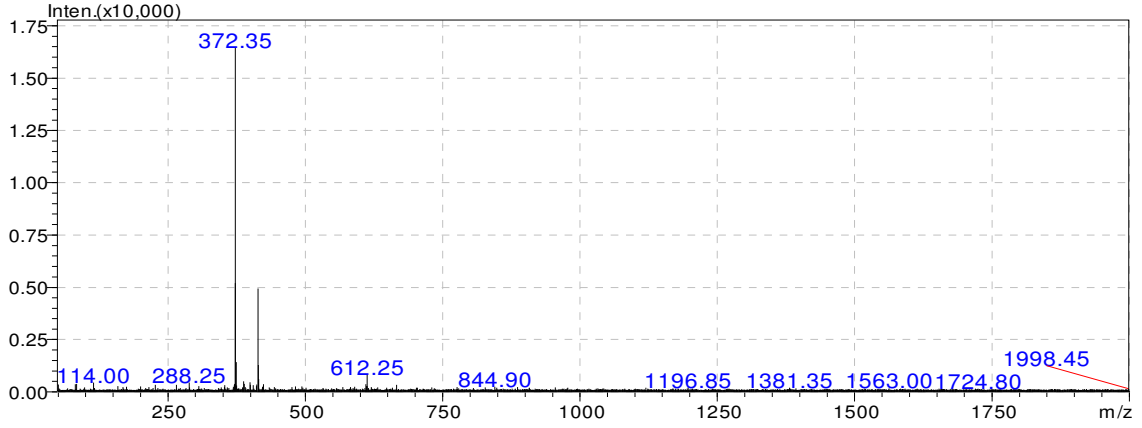


Şekil 4.28.4 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 11.487 - 12.867 dk. olan MS yarılması



Şekil 4.28.5 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.320 - 27.473 dk. olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi

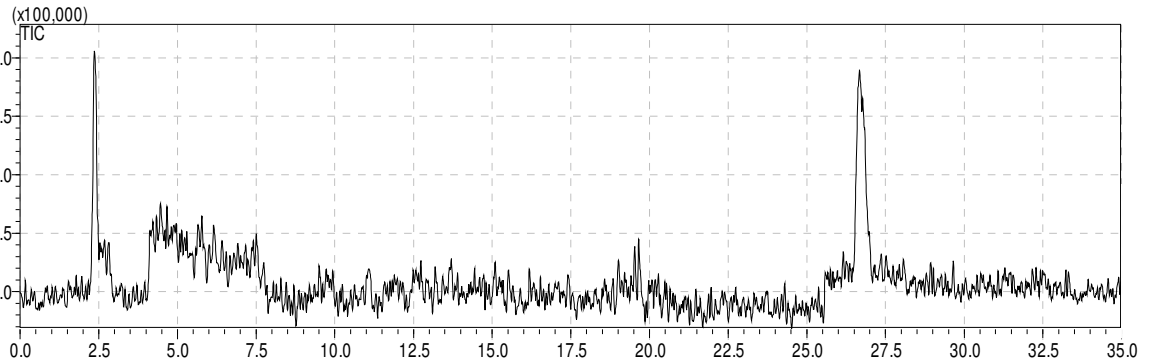




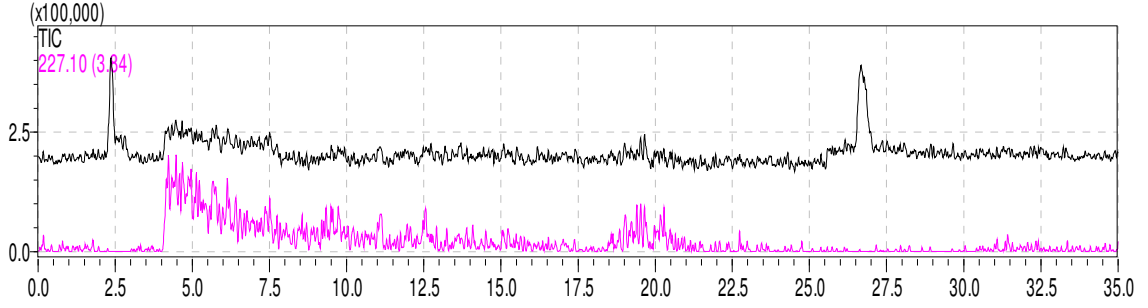
Şekil 4.28.6 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınma zamanı: 26.320 - 27.473 dk. olan MS yarılmaması

#### 4.5.2.3. Radikal yakalayıcı (Free Radical Trap; 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit) varlığında 120 dakika bekleme ile reaksiyon sonuçları

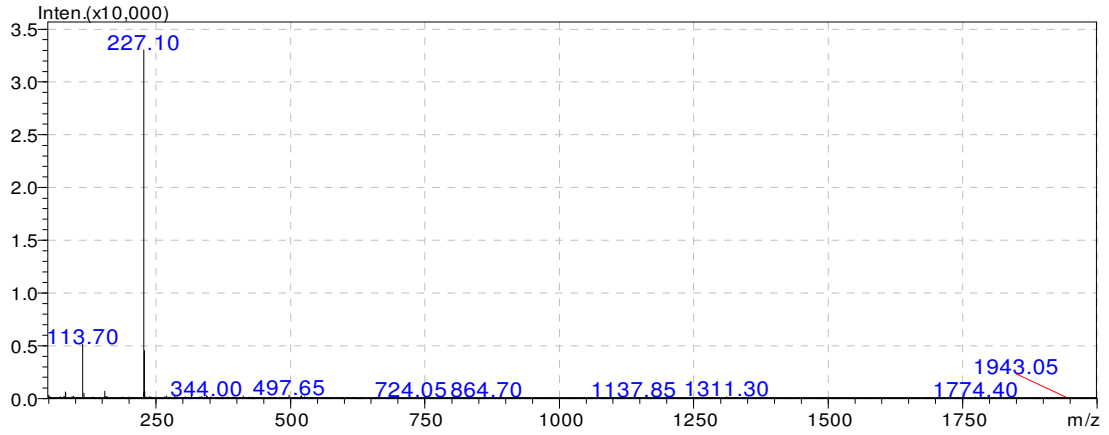
Miyeloperoksidazın Tamoksifendeki bazı bağları parçalayacağı düşünülerek reaksiyon 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksit varlığında başlatıldı ve reaksiyon başlatıldıktan 120 dakika sonra LC-MS sistemine verildi.



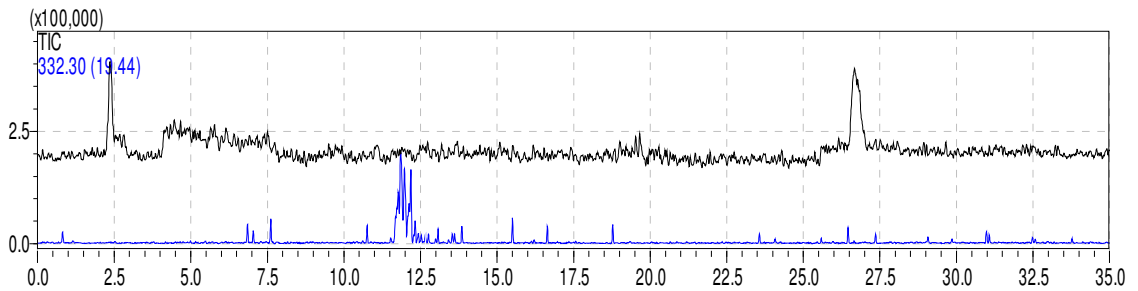
Şekil 4.29 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı



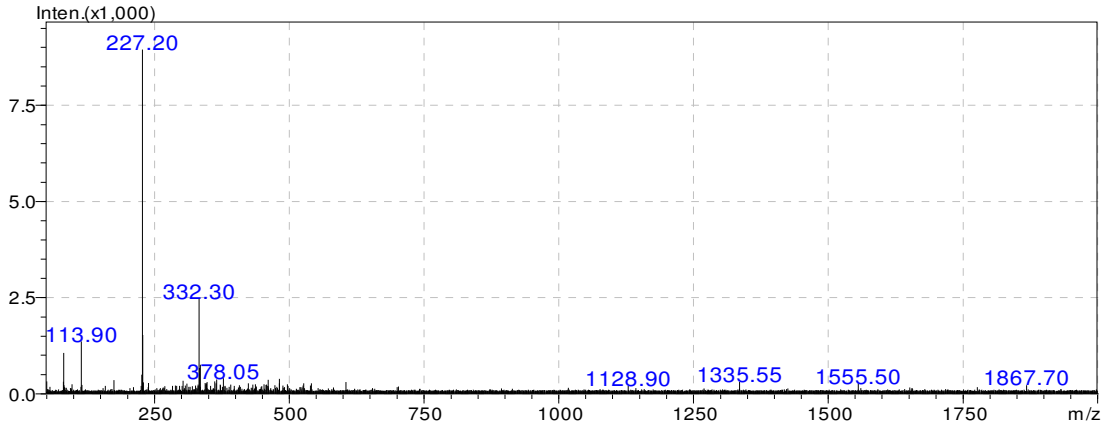
Şekil 4.29.1 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 4.100 - 5.387 dk. olan MS yarılmalarının kromatogramda belirtilmesi



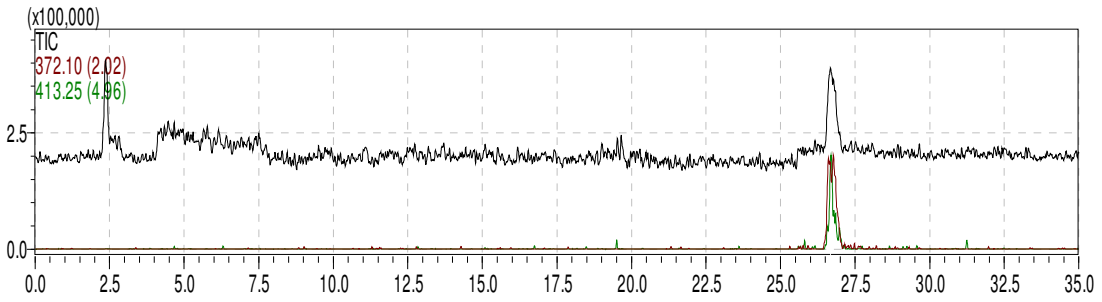
Şekil 4.29.2 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 4.100 - 5.387 dk. olan MS yarılmaları



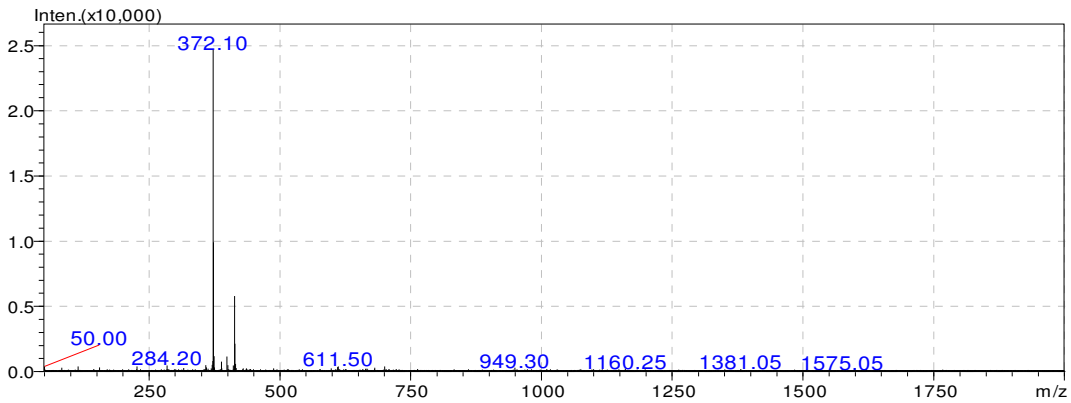
Şekil 4.29.3 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 11.847- 12.780 dk.olan MS yarılmalarının kromatogramda belirtilmesi



Şekil 4.29.4 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 11.847- 12.780 dk. olan MS yarılmaları



Şekil 4.29.5 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.140 - 27.473 dk. olan MS yarılmalarının kromatogramda belirtilmesi

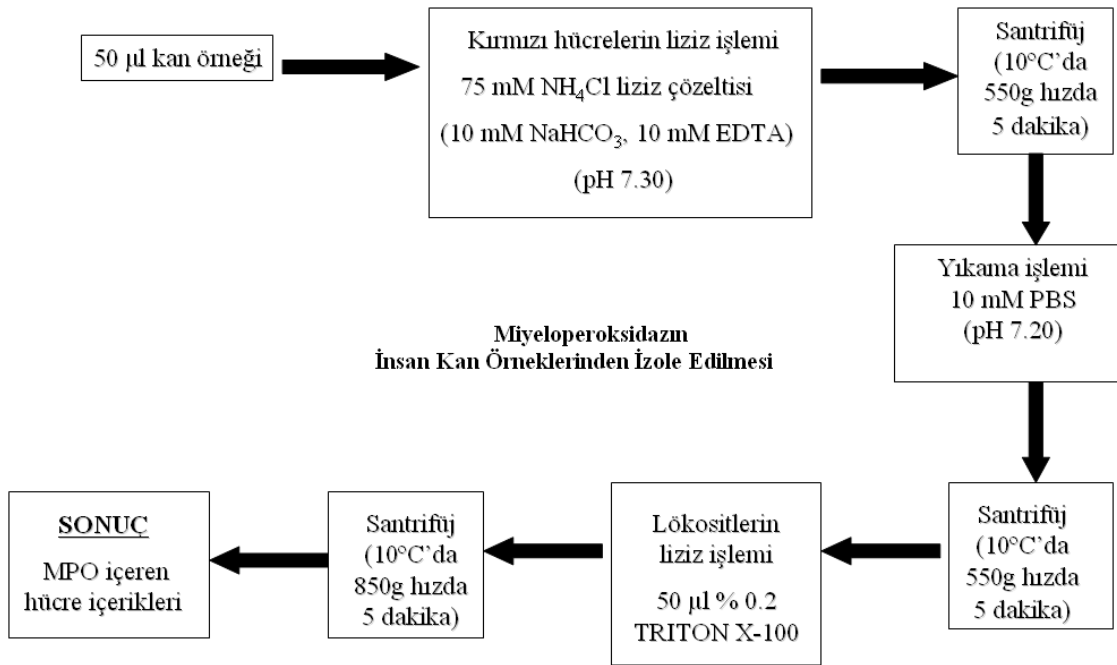


Şekil 4.29.6 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.140 - 27.473 dk. olan MS yarılmaları

### Sonuçların değerlendirilmesi;

Meme kanseri tedavisinde kullanılan ilaçların insan vücudunda oluşan metabolitlerinin, yapılarına bağlı olarak bunlarının zararlı etkilerinin incelenmesi amacıyla kan ve idrar örneklerinde HPLC sistemi kullanılarak tayinlerini ve karakterizasyonlarını içeren çalışmalar yapılmıştır (Gamboa da Costa vd., 2007). Karaciğer mikrozomlarının meme kanseri tedavisinde kullanılan Tamoksifen ile Raloksifene etkisi sonucu oluşan metabolitlerin LC-MS sistemi ile belirlenmesi de bazı araştırmacılar tarafından çalışılmıştır (Lim vd., 1998; Lim vd., 1997). “Horseradish” peroksidaz enziminin Tamoksifene etkisi ve meydana gelen aktif ürünlerin LC-MS sistemi ile değerlendirilmesi de literatürde yer almıştır (Davies vd., 1996).

Bu çalışmada, miyeloperoksidaz enzimi insan kan örneklerinden yüksek aktiviteye sahip ve laboratuvarında deney yapmaya yeterli miktarda ilk defa izole edildi ve saflaştırıldı. Bu amaçla yapılan çalışmada önce aşağıda verilen işlemler uygulanarak lökosit hücre içeriğini bulunduran havuz elde edildi.



Hücre içeriklerinden oluşan havuzda istenmeyen proteinleri uzaklaştırmak üzere %100 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile çöktürme yapıldı. Santrifüj işleminden sonra süpernatantlar ile oluşturulan havuz deneysel kısımda verildiği şekilde asetat ve PBS tamponları ile polietersülfon membran kullanılarak yıkandı ve bu işlemler Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de verilen

UV-Vis. absorpsiyon spekturumları ve hesaplanan RZ sayıları ile değerlendirildi (Çizelge 3.2, Çizelge 3.3, Şekil 4.2 ve Şekil 4.5). Miyeloperoksidazın saflık durumu HPLC sistemi ile kontrol edildi (Şekil 4.8). Bu çalışmada, miyeloperoksidaz enzimi insan kan örneklerinden yüksek aktiviteye sahip ve laboratuvarında deney yapmaya yeterli miktarda ilk defa izole edildi ve saflaştırıldı.

Saflaştırılan miyeloperoksidazın meme kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlardan Tamoksifene etkisi fizyolojik sıcaklık ve pH'da (37°C; pH 7.2-7.3) incelendi. Reaksiyonun gerçekleştiği öncelikle absorpsiyon spektrumlarında meydana gelen değişimler vasıtasıyla izlendi (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14). Miyeloperoksidaz ve Tamoksifen deneylerde yüksek konsantrasyonda kullanıldığından, reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin FT-IR ve LC-MS sistemleri ile karakterizasyonu daha net olarak yapılabilirdi.

Tamoksifenin, radikal yakalayıcı varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilen reaksiyonları sonucu oluşan ürünlerin FT-IR spekturumları Çizelge 4.1, Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'de yorumlandı.

Çizelge 4.1 Tamoksifenin FT-IR cihazında alınan spekturumunun yorumlanması

| Teorik Frekans, (cm <sup>-1</sup> ) | Alınan Frekans, (cm <sup>-1</sup> ) | Açıklamalar   |
|-------------------------------------|-------------------------------------|---|
| 3200-3000                           | 3077                                | Aromatik C-H gerilmesi.   |
| 3080-3020                           | 3077                                | Alkenlere özgü pik.   |
| 3200-3000                           | 3027                                | Aromatik C-H gerilmesi.   |
| 3080-3020                           | 3027                                | Alkenlere özgü pik.   |
| 2960-2850                           | 2930                                | Alifatik C-H gerilmesi.   |
| 2830-2815                           | 2814                                | Metil Eter Bandı.   |
| 3500-2000                           | 2162                                | N-H, N <sup>+</sup> -H gerilmesi.   |
| 1750-1500                           | 1510                                | C-N gerilmesi.  |
| 1650-1600                           | 1609                                | C=C gerilmesi (alken).  |
| 1600 ve 1500 aynı anda              | 1609 ve 1510 aynı anda              | Aromatik halkalar.  |
| 1450-1375                           | 1460                                | - CH <sub>3</sub> eğilmesi.   |
| 1370-1310                           | 1372                                | N-CH <sub>3</sub> grupları.   |
| 1275-1175                           | 1244                                | Süstitüe Benzen.  |
| 1400-1000                           | 1244, 1286 ve 1174                  | C-O gerilmesi.  |
| 1150-1100                           | 1154                                | C-N-C'de (Alifatik) C-N gerilmesi.  |
| 1150-1070                           | 1072                                | Alifatik C-O-C asimetrik gerilmesi.<br>Eterik bağın varlığını gösterir.           |
| 1300-1000                           | 1031                                | C-O, C-N gerilmesi. Bu bölgede orta şidette pikin olması eter varlığını gösterir. |
| 1040                                | 1031                                | Benzen halkası.   |
| 690                                 | 697                                 | cis-1,2-disüstitüe alkene verilirse de pek güvenilirmez.                          |

Çizelge 4.2 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinin FT-IR cihazında alınan spekturumunun yorumlanması

| Teorik Frekans, (cm <sup>-1</sup> ) | Alınan Frekans, (cm <sup>-1</sup> ) | Açıklamalar  |
|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| 3500-3450                           | 3448                                | Alkoller-dimer. Literatürde verilen 4-Hidroksitamoksifen oluşumunu desteklemektedir.           |
| 3500-3100                           | 3277                                | N-H, N-H <sup>+</sup> gerilmesi. (Yeni oluşum).  |
| 3080                                | 3077                                | Alkenlere özgü pik kayboluyor.   |
| 2990-2850                           | 2969                                | -CH <sub>3</sub> ve -CH <sub>2</sub> -. Bu grupların halen yapıda var olduğunu göstermektedir. |
| 2820-2760                           | 2814                                | N-Metilaminler.  |
| 2700-2250                           | 2686, 2522 ve 2431                  | N-H gerilmesi. (Yeni oluşum).  |
| 2000-1600                           | 2050                                | Benzen süstitüsyon piki. (Yok olan pik)  |
| 1750-1500                           | 1510                                | C-N gerilmesi. Buradaki pikin yok olması C-N bağının parçalandığını gösterir.                  |
| 1655-1635                           | 1647 ve 1650                        | Kinonlar (Yeni oluşum). (Literatürü destekliyor)   |
| 1650-1600                           | 1609                                | C=C gerilmesi. Buradaki pikin yok olması C=C arasındaki ikili bağın koptuğunu gösterir.        |
| 1400-1000                           | 1404                                | Ar-O veya R-O bağlarındaki C-O gerilmesi.  |
| 1360-1250                           | 1358                                | Aromatik aminler (Yeni oluşum).  |
| 1300-1000                           | 1212 ve 1128                        | C-O ve C-N gerilmesi (Yeni oluşum).  |
| 1250                                | 1248 ve 1246                        | Epoksitler (1.Band) (Yeni oluşum- Literatürü destekliyor)                                      |
| 1230                                | 1233                                | Fenoller (Yeni oluşum).  |
| 1065-1015                           | 1062 ve 1049                        | Siklik alkoller (Yeni oluşum).   |
| 1050-700                            | 1002                                | N-O gerilmesi (Yeni oluşum).   |
| 950-810                             | 953, 878 ve 818                     | Epoksitler (2.Band). (Yeni oluşum- Literatürü destekliyor)                                     |

Çizelge 4.3 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinin FT-IR cihazında alınan spekturumunun yorumlanması

| Teorik Frekans, (cm <sup>-1</sup> ) | Alınan Frekans, (cm <sup>-1</sup> ) | Açıklamalar  |
|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| 3500-3450                           | 3449                                | Alkoller-dimer. Literatürde verilen 4-Hidroksitamoksifen oluşumunu desteklemektedir.           |
| 3500-3100                           | 3277                                | N-H, N-H <sup>+</sup> gerilmesi. (Yeni oluşum).  |
| 3080                                | 3077                                | Alkenlere özgü pik kayboluyor.   |
| 2990-2850                           | 2930                                | -CH <sub>3</sub> ve -CH <sub>2</sub> -. Bu grupların halen yapıda var olduğunu göstermektedir. |
| 2820-2760                           | 2759                                | N-Metilaminler.  |
| 2700-2250                           | 2685, 2598, 2524 ve 2430            | N-H gerilmesi. (Yeni oluşum).  |
| 2000-1650                           | 2050                                | Benzen süstitüsyon piki kayboluyor.  |
| 1655-1635                           | 1648 ve 1651                        | Kinonlar (Yeni oluşum) (Literatürü destekliyor).   |
| 1750-1500                           | 1510                                | C-N gerilmesi. Burdaki pikin yok olması C-N bağının parçalandığını gösterir.                   |
| 1650-1600                           | 1609                                | C=C gerilmesi. Burdaki pikin yok olması C=C arasındaki ikili bağın parçalandığını gösterir.    |
| 1400-1000                           | 1213, 1128 ve 1091                  | Ar-O veya R-O bağlarındaki C-O gerilmesi.  |
| 1360-1250                           | 1359, 1349, 1332 ve 1309            | Aromatik aminler. (Yeni oluşum).   |
| 1250                                | 1246 ve 1244                        | Epoksitler (1. Band). (Yeni oluşum-Literatürü destekliyor)                                     |
| 1230                                | 1233                                | Fenoller. (Yeni oluşum).   |
| 1065-1015                           | 1062 ve 1049                        | Siklik alkoller. (Yeni oluşum).  |
| 1050-700                            | 1000 civarında belirginleşme        | N-O gerilmesi. (Yeni oluşum).  |
| 950-810                             | 933 ve 818                          | Epoksitler (2. Band). (Yeni oluşum-Literatürü destekliyor)                                     |



LC-MS cihazında gradyan (%10:90 asetonitril:su; %70:30 asetonitril:su; %30:70 asetonitril:su) oluşturmak üzere asetonitril içeren mobil faz kullanıldı. Asetonitril reaksiyonların durdurulmasını da sağladı. Radikal yakalayıcı olmaksızın ve radikal yakalayıcı varlığındaki reaksiyonların gerçekleştirilmesinden sonra alınan kromatogramlar incelendi ve kıyaslandı. Sonuçlar değerlendirildi ve miyeloperoksidazın meme kanseri tedavisinde kullanılan Tamoksifene etkisi ile, aşağıda verilen şekilde belirtildiği gibi (Şekil 4.31) parçalandığı ve Çizelge 4.4., Çizelge 4.5., Çizelge 4.6., Çizelge 4.7., Çizelge 4.8., Çizelge 4.9., Çizelge 4.10., Çizelge 4.11.'de açıklanan radikallerin, bileşiklerin oluştuğu kanaatine varıldı.

Çizelge 4.4 Tamoksifenin LC-MS cihazında alınmış kromatogramındaki MS yarılımlarının yorumlanması

| Alınma Zamanı<br>(RT-Retention time) | m /z<br>değeri | Tamoksifenin LC-MS sonucunda<br>dayanarak oluştuğu tahmin<br>edilen muhtemel yapıları   | Verilerin alındığı<br>şekil |
|--------------------------------------|----------------|---|-----------------------------|
| 25.693-26.360 dk                     | 372.30         | X+Y+Z   | 4.21.1                      |
| 25.693-26.360 dk                     | 413.05         | a) Z+Y+Y<br>b) (X+Y+Z-1H <sup>+</sup> ) + (P-2H <sup>+</sup> )  | 4.21.1                      |
| 2.047 - 3.340 dk.                    | 499.40         | a) (X+Y-1H <sup>+</sup> ) + (X+Y+Z-1H <sup>+</sup> ) + X  | 4.22.1                      |
| 2.047 - 3.340 dk.                    | 477.30         | a) HEPES+(T-1H <sup>+</sup> )+X +3H <sup>+</sup><br>b) P+Z+(T-1H <sup>+</sup> )+ P+1H <sup>+</sup><br>c) N+ M+ (T-1H <sup>+</sup> )+ N+ 2H <sup>+</sup><br>d) R + (T-1H <sup>+</sup> ) + Y+ 1H <sup>+</sup> | 4.22.1                      |
| 2.047 - 3.340 dk.                    | 543.40         | a) HEPES+(Z+X)+5H <sup>+</sup><br>b) (Z+ 1H <sup>+</sup> )+ (Z+1H <sup>+</sup> )<br>c) R+W+2H <sup>+</sup>  | 4.22.1                      |
| 2.047 - 3.340 dk.                    | 302.10         | a) (Z+X)+2H <sup>+</sup><br>b) O+3H <sup>+</sup><br>c) N+R<br>d) N+Z+N+1H <sup>+</sup>  | 4.22.1                      |
| 25.780-26.673 dk.                    | 372.15         | X+Y+Z   | 4.22.3                      |
| 25.780-26.673 dk.                    | 413.10         | a) Z+Y+Y<br>b) (X+Y+Z-1H <sup>+</sup> ) + (P-2H <sup>+</sup> )  | 4.22.3                      |

Çizelge 4.5 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile elde edilen MS yarımlarının yorumlanması

| Alıkonma Zamanı (RT-Retention time) | m /z değeri | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisi ile oluşacak muhtemel yapıların formülleri  | Verilerin alındığı şekil |
|-------------------------------------|-------------|---|--------------------------|
| 7.613 - 7.927 dk.                   | 1076.85     | a) HEPES+M+(W-1H <sup>+</sup> )+W+3H <sup>+</sup><br>b) T+ M+O+M+3H <sup>+</sup><br>c) (X+R+Y)+(X+R+Y)+O+2H <sup>+</sup><br>d) (X+R+Y)+R+M+Y+1H <sup>+</sup>  | 4.23.1                   |
| 13.760 -14.073 dk.                  | 855.00      | a) W+Z+( M+1H <sup>+</sup> )+1H <sup>+</sup><br>b)(X+Y-1H <sup>+</sup> )+(X+Y+Z-2H <sup>+</sup> )+(X-1H <sup>+</sup> )+(M+X)<br>c) HEPES+O+Z+P+3H <sup>+</sup><br>d) W+ M+(Z+1 H <sup>+</sup> )+1H <sup>+</sup><br>e) (O+1 H <sup>+</sup> )+O+( W+2H <sup>+</sup> )<br>f) N+O+R+W | 4.23.3                   |
| 13.760 -14.073 dk.                  | 330.45      | a) M+2H <sup>+</sup><br>b)(X+O)+ 2H <sup>+</sup><br>c) (Y+2H <sup>+</sup> )+(W+2H <sup>+</sup> )<br>d) N+Z+P<br>e) N+R+X<br>f) P+R  | 4.23.3                   |
| 26.307 - 27.107 dk.                 | 372.20      | X+Y+Z   | 4.23.5                   |
| 26.307 - 27.107 dk.                 | 413.30      | a) Z+Y+Y<br>b) (X+Y+Z-1H <sup>+</sup> ) + (P-2H <sup>+</sup> )  | 4.23.5                   |

|                     |         |  |        |
|---------------------|---------|--|--------|
| 31.613 - 31.973 dk. | 914.45  | a) HEPES+M+O+P+3H <sup>+</sup><br>b) (M+1H <sup>+</sup> )+M+W+3H <sup>+</sup><br>c) P+M+R+W<br>d) Y+Z+Z+Z+X<br>e) (O+1H <sup>+</sup> )+O+O+(N+1H <sup>+</sup> )<br>f) R+O+M<br>g) (N+1H <sup>+</sup> )+Z+M+O<br>h) (X+R+Y)+Z+W+1H <sup>+</sup><br>i) (X+Z)+(M+X-1H <sup>+</sup> )+W+4H <sup>+</sup>  | 4.23.7 |
| 31.613 - 31.973 dk. | 1441.15 | a) (X+Y+Z-1H <sup>+</sup> )+(M+X-1H <sup>+</sup> )+<br>(Z+Y-1H <sup>+</sup> )+(X+Y+Z)<br>b) (X+Y+Z-1H <sup>+</sup> )+M+(X+Y+Z-2H <sup>+</sup> )+(X+Y+Z)<br>c) (Z+1H <sup>+</sup> )+O+O+O+(Z+1H <sup>+</sup> )<br>d) W+Z+Z+(T-1H <sup>+</sup> )+Z+W+3H <sup>+</sup><br>e) (M+1H <sup>+</sup> )+Z+O+Z+(Z+1H <sup>+</sup> )<br>f) (X+R+Y)+M+M+(X-1H <sup>+</sup> )+W+(T-1H <sup>+</sup> ) | 4.23.7 |

Çizelge 4.6 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile elde edilen MS yarılımlarının yorumlanması

| Alıkonma Zamanı<br>(RT-Retention time) | m /z<br>değeri | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisi ile oluşacak muhtemel yapıların formülleri  | Verilerin alındığı şekil |
|--|----------------|---|--------------------------|
| 2.180 - 2.673 dk.                      | 499.30         | a) $(X+Y-1H^+) + (X+Y+Z-1H^+) + X$  | 4.24.1                   |
| 2.180 - 2.673 dk.                      | 477.45         | a) $HEPES+(T-1H^+)+X +3H^+$<br>b) $R + (T-1H^+) + Y+ 1H^+$<br>c) $P+Z+(T-1H^+)+ P+1H^+$<br>d) $N+ M+ (T-1H^+)+ N+ 2H^+$ | 4.24.1                   |
| 26.320 - 27.253 dk.                    | 372.15         | $X+Y+Z$   | 4.24.3                   |
| 26.320 - 27.253 dk.                    | 413.15         | a) $Z+Y+Y$<br>b) $(X+Y+Z-1H^+) + (P-2H^+)$  | 4.24.3                   |

Çizelge 4.7 Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile elde edilen MS yarılımlarının yorumlanması

| Alıkonma Zamanı<br>(RT-Retention time) | m /z<br>değeri | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisi ile oluşacak muhtemel yapıların formülleri  | Verilerin alındığı şekil |
|--|----------------|---|--------------------------|
| 2.180 - 3.293 dk.                      | 499.15         | a) $(X+Y-1H^+) + (X+Y+Z-1H^+) + X$  | 4.25.1                   |
| 2.180 - 3.293 dk.                      | 477.25         | a) $HEPES+(T-1H^+)+X +3H^+$<br>b) $R + (T-1H^+) + Y+ 1H^+$<br>c) $P+Z+(T-1H^+)+ P+1H^+$<br>d) $N+ M+ (T-1H^+)+ N+ 2H^+$ | 4.25.1                   |
| 26.360 - 27.253 dk..                   | 372.20         | $X+Y+Z$   | 4.25.3                   |
| 26.360 - 27.253 dk..                   | 413.25         | a) $Z+Y+Y$<br>b) $(X+Y+Z-1H^+) + (P-2H^+)$  | 4.25.3                   |

Çizelge 4.8 Radikal yakalayıcının MS yarılmalarının yorumlanması

| Alıkonma Zamanı (RT-Retention time) | m /z değeri | 5-5'-Dimetil-1-pirolin N-oksidin LC-MS sonucunda dayanarak oluştuğu tahmin edilen muhtemel yapısı | Verilerin alındığı şekil |
|-------------------------------------|-------------|---|--------------------------|
| 2.500 - 3.480 dk.                   | 227.15      | C-C   | 4.26.1                   |

Çizelge 4.9 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 0 dakika bekleme ile elde edilen MS yarılmalarının yorumlanması

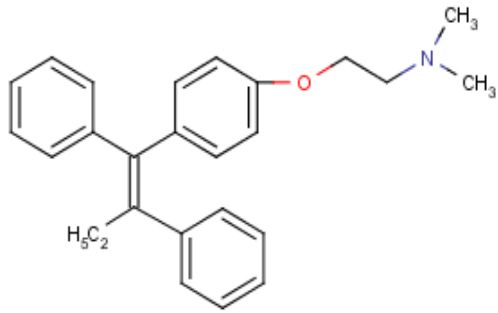
| Alıkonma Zamanı (RT-Retention time) | m/z değeri | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisi ile oluşacak muhtemel yapıların formülleri  | Verilerin alındığı şekil |
|-------------------------------------|------------|---|--------------------------|
| 3.693- 5.700 dk.                    | 227.10     | C-C   | 4.27.1                   |
| 11.220 - 12.960 dk.                 | 332.35     | a) $M+4H^+$<br>b) $(Z+X)+(X-1H^+)+4H^+$<br>c) $(C-1H^+)+(T-1H^+)+(X-1H^+)+Y+3H^+$ | 4.27.3                   |
| 26.227 - 27.293 dk.                 | 372.10     | X+Y+Z   | 4.27.5                   |
| 26.227 - 27.293 dk.                 | 413.15     | a) Z+Y+Y<br>b) $(X+Y+Z-1H^+) + (P-2H^+)$  | 4.27.5                   |

Çizelge 4.10 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 60 dakika bekleme ile elde edilen MS yarılmalarının yorumlanması

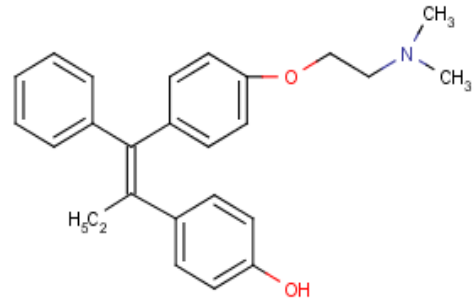
| Alınma Zamanı (RT-Retention time) | m /z değeri | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisi ile oluşacak muhtemel yapıların formülleri  | Verilerin alındığı şekil |
|-----------------------------------|-------------|---|--------------------------|
| 3.873 - 5.833 dk.                 | 227.15      | C-C   | 4.28.1                   |
| 11.487 - 12.867 dk.               | 332.20      | a) $M+4H^+$<br>b) $(Z+X)+(X-1H^+)+4H^+$<br>c) $(C-1H^+)+(T-1H^+)+(X-1H^+)+Y+3H^+$ | 4.28.3                   |
| 26.320 - 27.473 dk.               | 372.35      | X+Y+Z   | 4.28.5                   |
| 26.320 - 27.473 dk.               | 413.55      | a) Z+Y+Y<br>b) $(X+Y+Z-1H^+) + (P-2H^+)$  | 4.28.5                   |

Çizelge 4.11 Radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisinde 120 dakika bekleme ile elde edilen MS yarılmalarının yorumlanması

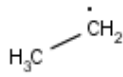
| Alınma Zamanı (RT-Retention time) | m /z değeri | Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisi ile oluşacak muhtemel yapıların formülleri  | Verilerin alındığı şekil |
|-----------------------------------|-------------|---|--------------------------|
| 4.100 - 5.387 dk.                 | 227.10      | C-C   | 4.29.1                   |
| 11.847- 12.780 dk.                | 332.30      | a) $M+4H^+$<br>b) $(Z+X)+(X-1H^+)+4H^+$<br>c) $(C-1H^+)+(T-1H^+)+(X-1H^+)+Y+3H^+$ | 4.29.3                   |
| 26.140 - 27.473 dk.               | 372.10      | X+Y+Z   | 4.29.5                   |
| 26.140 - 27.473 dk.               | 413.25      | a) Z+Y+Y<br>b) $(X+Y+Z-1H^+) + (P-2H^+)$  | 4.29.5                   |



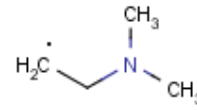
TAMOKSİFEN  $M_A=372$  gr/mol  
X+Y+Z YAPISI



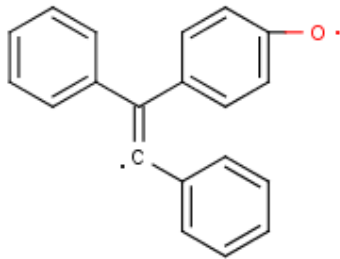
4-OH TAMOKSİFEN  $M_A=388$  gr/mol



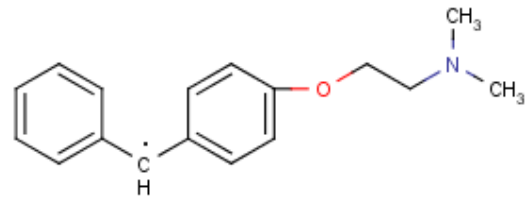
X YAPISI  $M_A=29$  gr/mol



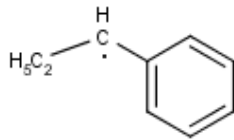
Y YAPISI  $M_A=72$  gr/mol



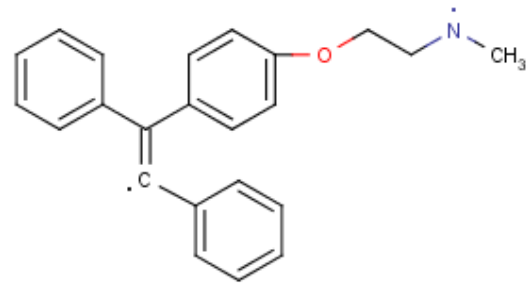
Z YAPISI  $M_A=271$  gr/mol



W YAPISI  $M_A=254$  gr/mol



T YAPISI  $M_A=118$  gr/mol

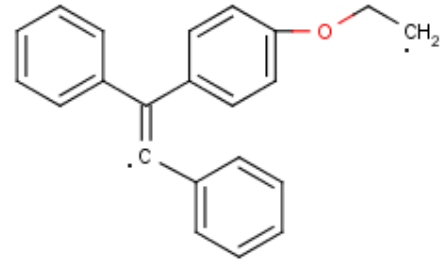


M YAPISI  $M_A=328$  gr/mol

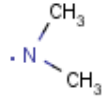




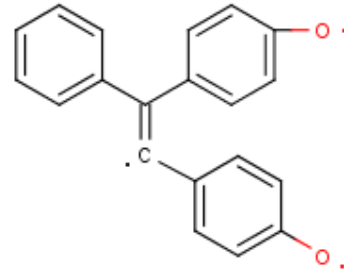
N YAPISI  $M_A=15$  gr/mol



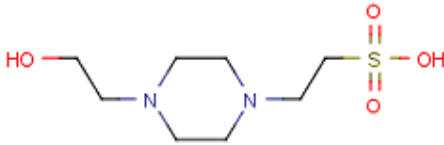
O YAPISI  $M_A=299$  gr/mol



P YAPISI  $M_A=44$  gr/mol

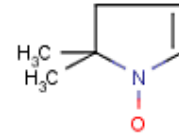


R YAPISI  $M_A=287$  gr/mol



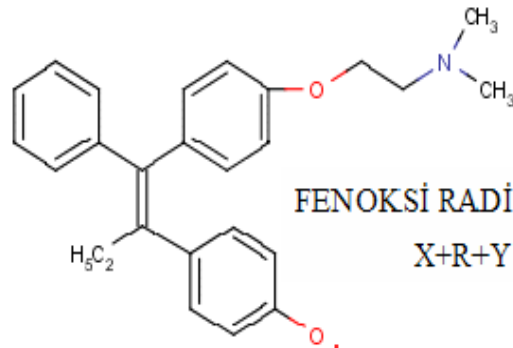
HEPES

$M_A=238.31$  gr/mol



5,5-Dimetil-1-pirolin N-oksüd

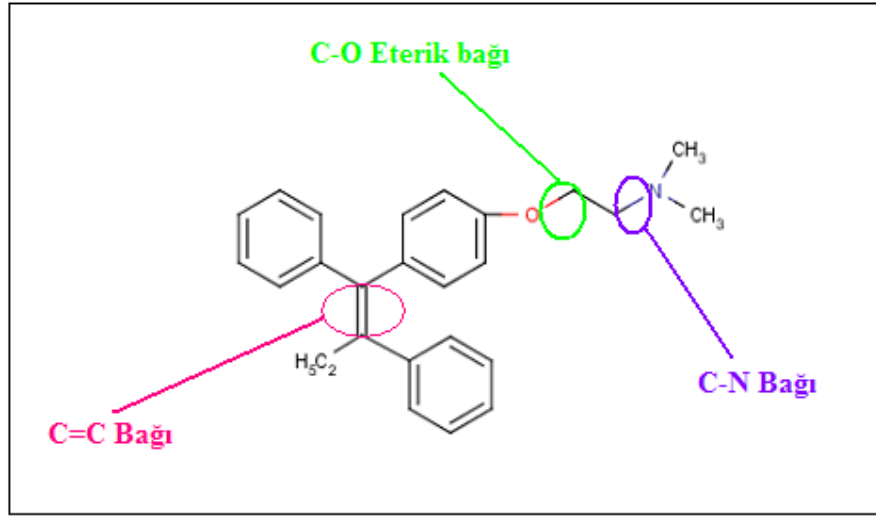
C Yapısı  $M_A=113.2$  gr/mol



FENOKSİ RADİKALİ  $M_A=359$  gr/mol

X+R+Y YAPISI

Şekil 4.30 Tamoksifen, 5,5'-Dimetil-1-pirolin N-oksüd, HEPES ve Miyeloperoksidazın Tamoksifene etkisi ile oluşacak muhtemel yapıların formülleri



Şekil 4.31 Miyeloperoksidaz etkisi ile Tamoksifenin yapısında kopması muhtemel bağlar

**KAYNAKLAR**

Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Sandur, S.K., Pandey, M.K., Sethi, G., (2006), "Inflammation and cancer: How hot is the link?", *Biochemical Pharmacology*, 72, 1605-1621.

Arnhold, J., (2004), "Free Radicals- Friends or Foes?- Properties, Functions, and Secretion of Human Myeloperoxidase"; *Biochemistry (Moscow)*, 69, 4-9.

Baum, M., (2005), "Adjuvant endocrine therapy in postmenopausal women with early breast cancer: Where are we now?", *European Journal of Cancer*, 41, 1667-1677.

Bergendi, L., Beneš, L., Duračková, L., Ferenčík, M., (1999), "Chemistry, Physiology and Pathology of Free Radicals", *Life Sciences*, 65, 1865-1874.

Brodie, A., (2002), "Aromatase inhibitors in breast cancer", *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*, 13, 61-65.

Buzdar, A.U., Jonat, W., Howell, A., Plourde, P.V., (1997), "ARIMIDEX: a Potent and Selective Aromatase Inhibitor for the Treatment of Advanced Breast Cancer", *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 61, 145-149.

Chawla, J.S., Amiji, M.M., (2002), "Biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles for tumortargeted delivery of tamoxifen", *International Journal of Pharmaceutics*, 249, 127-138.

Choueiri, T.K., Alemany, C.A., Abou-Jawde, R.M, Budd, G.T., (2004), "Role of Aromatase Inhibitors in the Treatment of Breast Cancer", *Clinical Therapeutics*, 26, 1199-1214.

Cutler, P., Ed. (2004), *Protein Purification Protocols*, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey

Davies, A.M., Malone, M.E., Martin, E.A., Jones, R.M., Jukes, R., Lim, C.K., Smith, L.L., White, I.N.H., (1997), "Peroxidase Activation of 4-hydroxytamoxifen to free radicals detected by EPR spectroscopy", *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 423-431.

Diez-Perez, A., (2006), "Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMS)", *Arq Bras Endocrinol. Metab.*, 50, 720-734.

Eberling, J. L., Wu, C., Tong-Turnbeaugh, R., Jagust, W. J., (2004), "Estrogen- and tamoxifen-associated effects on brain structure and function", *NeuroImage*, 21, 364-371.

Fiedler, T.J., Davey, C.A., Fenna, R.E., (2000), "X-ray Crystal Structure and Characterization of Halide-binding Sites of Human Myeloperoxidase at 1.8 Å Resolution", *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 11964-11971.

Franco Fragus, L., Batista-Viera, F., Carlsson, J., (2004), "Preparation of high-density Concavalin A adsorbent and its use for rapid high-yield purification of peroxidase from horseradish roots", *J. Chromatogr. B.*, 803, 237-241.

Gamboa da Costa, G., Manjanatha, M. G., Marques, M. M., Beland, F. A., (2002), "Induction of *lacI* mutations in Big Blue rats treated with tamoxifen and  $\alpha$ -hydroxytamoxifen", *Cancer Letters*, 176, 37-45.

Gamboa da Costa, G., Marques, M. M., Xin, F., Churchwell, M.I., Wang, Y.P., Doerge, D.R., Beland, F. A., (2007-Article in press), "Effect of N,N-didesmethyltamoxifen upon DNA adduct formation by tamoxifen and  $\alpha$ -hydroxytamoxifen", *Cancer Letters*.

- Hope, H.R., Remsen, E.R., Lewis, C., Heuvelman, D.M., Walker, M.C., Jennings, M. Ve Connolly, D.T., (2000), "Large-scale purification of Myeloperoxidase from HL60 promyelocytic cells: Characterization and comparison to human neutrophil myeloperoxidase", *Protein Expression and Purification*, 18, 269-276.
- Howell, A., (2005), "New developments in the treatment of postmenopausal breast cancer", *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 16, November 2005, 420-428.
- Hu, F.X., Neoh, K.G., Kang, E.T., (2006), "Synthesis and in vitro anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles", *Biomaterials*, 27, 5725-5733.
- Jonat, W., Gnant, M., Boccardo, F., Kaufmann, M., Rubagotti, A., Zuna, I., Greenwood, M., Jakesz, R., (2006), "Effectiveness of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole in postmenopausal women with hormonesensitive early-stage breast cancer: a meta-analysis", *Lancet Oncol*, 7, 991-996.
- Kuzu-Karşilayan, H., Eryılmaz, E., Yıllar, G., Günnur D., Yanıkkaya-Demirel, G., (2002), "Spectrophotometric determination of leukocytes in blood", *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16, 1-4.
- Laïos, I., Journe, F., Laurent, G., Nonclercq, D., Toillon, R. A., Seo, H.S., Leclercq, G., (2003), "Mechanisms governing the accumulation of estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells treated with hydroxytamoxifen and related antiestrogens", *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 87, 207-221.
- Leon, J.C., Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., Galaev, I.Y., Csoregi, E., Sakharov, I.Y., (2002), "Purification and Substrate Specificity of Peroxidase from Sweet Potato Tubers", *Plant Science*, 163, 1011-1019.
- Lim, C.K., Yuan, Z.X., Jones, R.M., White, I.N.H., Smith, L.L., (1997), "Identification and mechanism of formation of potentially genotoxic metabolites of tamoxifen: study by LC-MS/MS", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15, 1335-1342.
- Lim, H.K., Stellingweef, S., Sisenwine, S., Chan, K.W., (1999), "Rapid drug metabolite profiling using fast liquid chromatography, automated multiple-stage mass spectrometry and receptor-binding<sup>1</sup>", *Journal of Chromatography*, 831, 227-241.
- Mitrunen, K., Hirvonen, A., (2003), "Molecular epidemiology of sporadic breast cancer -The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism", *Mutation Research*, 544, 9-41.
- Monteiro, R., Faria, A., Azevedo, I., Calhau, C., (2007), "Modulation of breast cancer cell survival by aromatase inhibiting hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids", *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 105, 124-130.
- Mouridsen, H.T., Rose, C., Brodie, A. H., Smith, I. E., (2003), "Challenges in the endocrine management of breast cancer", *The Breast Supplement*, 2, 2-19.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., Ed. (1991), *Harper's Biochemistry*, Appleton & Lange, Connecticut, U.S.A.
- Nicholls, H., (2002), "Aromatase inhibitors continue their ATAC on tamoxifen", *Trends in Molecular Medicine*, 8, 12-13.
- Olsen, R.L., Little, C., (1983), "Purification and some properties of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase from human blood", *Biochem. J.*, 209, 781-787.

Pole, J.C.M., Gold, L.I., Orton, T., Huby, R., Carmichael, P.L., (2005), "Gene expression changes induced by estrogen and selective estrogen receptor modulators in primary-cultured human endometrial cells: signals that distinguish the human carcinogen tamoxifen", *Toxicology*, 206, 91–109.

Trontelj, J., Bogataj, M., Marc, J., Mrhar, A., (2007), "Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for determination of raloxifene and its metabolites in human plasma", *Journal of Chromatography B*, 855, 220–227.

Tse, E.Y.T., Loo, W.T.Y., Cheung, M.N.B., Chow, L.W.C., Cheng, C.W., (2004), "Arimidex inhibition on proliferation of human breast solid tumors measured by ATP bioluminescence", *Life Sciences*, 76, 827–834.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., (2006), "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer", *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1–40.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser J., (2007), "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84.

Wempe, M.F., Wachter, V.J., Ruble, K.M., Ramsey, M.G., Edgar, K.J., Buchanan, N.L., Buchanan, C.M., (2007-Article in Press), "Pharmacokinetics of raloxifene in male Wistar–Hannover rats: Influence of complexation with hydroxybutenyl-beta-cyclodextrin", *International Journal of Pharmaceutics*.

**İNTERNET KAYNAKLARI**

- [1] [worldofscience.blogcu.com/CANCER/](http://worldofscience.blogcu.com/CANCER/)
- [2] [Sheikh J., ” Myeloperoxidase Deficiency”](#); [www.emedicine.com](http://www.emedicine.com)
- [3] <http://en.wikipedia.org/wiki/Estradiol>
- [4] [www.nature.com](http://www.nature.com)
- [5] [www.breastcancerprofessional.com/.../adj/adj.asp](http://www.breastcancerprofessional.com/.../adj/adj.asp)
- [6] <http://wdv.com>
- [7] [www.ch.ic.ac.uk](http://www.ch.ic.ac.uk)
- [8] [www.arimidex.net](http://www.arimidex.net)
- [9] <http://en.wikipedia.org>

**ÖZGEÇMİŞ**

|               |   |
|---------------|---|
| Doğum tarihi  | 25.04.1983  |
| Doğum yeri    | İstanbul/TÜRKİYE  |
| Lise          | 1994-2001 BEYOĞLU ANADOLU LİSESİ<br>(English High School-EHSG)  |
| Lisans        | 2001-2005 Yıldız Teknik Üniversitesi<br>Fen-Edebiyat Fakültesi<br>Kimya Bölümü<br>(Bölüm İkincisi-Fakülte Üçüncüsü) |
| Yüksek Lisans | 2005-2007 Yıldız Teknik Üniversitesi<br>Kimya-Metalurji Fakültesi<br>Biyomühendislik Bölümü                         |

**Çalıştığı kurum(lar)**

2007-Devam ediyor YTÜ Kimya-Metalurji Fak. Araştırma Görevlisi