

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİYELOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN LÖSEMİ
TEDAVİSİNDE KULLANILAN DOKSORUBİSİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Kimyager Yeliz BAŞARAN

**FBE Biyomühendislik Anabilim Dalında
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

İSTANBUL, 2007

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİYELOPEROKSİDAZ ENZİMİNİN LÖSEMİ
TEDAVİSİNDE KULLANILAN DOKSORUBİSİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Kimyager Yeliz BAŞARAN

FBE Biyomühendislik Anabilim Dalında
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ



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

Prof. Dr. Ayşe Oğuz


Prof. Dr. Halil Alkaya


İSTANBUL, 2007

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	v
KISALTMA LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ÖNSÖZ	xii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Miyeloperoksidaz	2
2.2 Miyeloperoksidazın Yapısı	2
2.2.1 Miyeloperoksidaz Hem Grubunun Yapısı	6
2.2.2 Miyeloperoksidazın Katalitik Mekanizmaları ve <i>in vivo</i> Substratları	7
2.2.2.1 Bileşik I Oluşumunda Geri Dönüşümlülük (Reversibl olma) ve Katalaz Aktivitesi9	
2.2.3 Miyeloproksidazın Bağışıklık Sistemindeki Yeri	10
2.3 Kanseri	11
2.3.1 Kanseri Hücreleri.....	11
2.3.1.1 Kırık Kromozomlar	12
2.3.1.2 İletişim Kurmada Başarısızlık	13
2.3.1.3 Kanseri Hücrelerinin Diğer Dokularda Kontrolsuz Yayılması	14
2.3.1.4 Tek Bir Mutasyon Yeterli Değildir	15
2.3.2 Lösemi.....	16
2.3.2.1 Anatomi.....	16
2.3.2.2 Risk Faktörleri.....	17
2.3.2.3 Semptomlar	17
2.3.2.4 Teşhis	17
2.3.3 Kanseri Tedavileri	17
2.3.3.1 Kemoterapi.....	18
2.3.3.2 Kemoterapinin Kanseri Hücrelerine Etkileri.....	18
2.3.3.3 Doksorubisin	19
3. DENEYSEL ÇALIŞMA	24
3.1 Materyaller	24
3.1.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	24
3.1.1.1 Kullanılan HPLC Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri.....	25
3.1.1.2 Kullanılan UV-Vis (UV-1700 PharmaSpec) Spektrofotometresinin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri.....	25
3.1.1.3 Kullanılan UV-Vis (JASCO) Spektrofotometrenin Teçhizat ve Çalışma	

	Parametreleri	25
3.1.1.4	Kullanılan SHIMADZU Marka LC-MS Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri	26
3.1.1.5	Kullanılan Thermo IEC Marka Soğutmalı Santrifüjün Teçhizat ve Çalışma Parametreleri	26
3.1.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
3.2	Miyeloperoksidazın Kan Örneklerinden İzolasyonu	28
3.2.1	Kullanılan Çözeltiler.....	28
3.2.2	Miyeloperoksidazın Kan Örneklerinden İzolasyonu İçin Uygulanan İşlem.....	28
3.3	Amonyum Sülfat ile Çöktürme	28
3.4	Miyeloperoksidaz Enziminin Konsantre Edilmesi ve Yıkınması.....	29
3.5	Miyeloperoksidaz Enziminin Aktivitesinin Tayini	29
3.5.1	Kullanılan Çözeltiler.....	29
3.5.2	Deneyin Yapılışı.....	29
3.6	UV-Vis Spektrofotometre ile Miyeloperoksidazın Doksorubisine Olan Etkisinin İncelenmesi.....	30
3.6.1	Kullanılan Çözeltiler.....	30
3.6.2	Deneyin Yapılışı.....	30
3.7	UV-Vis Spektrofotometre ile Serbest Radikal Yakalayıcı (5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit) Varlığında Miyeloperoksidazın Doksorubisine Olan Etkisinin İncelenmesi.....	30
3.7.1	Kullanılan Çözeltiler.....	30
3.7.2	Deneyin Yapılışı.....	31
3.8	FT-IR Spektrometresi ile Miyeloperoksidazın Doksorubisine Olan Etkisinin İncelenmesi.....	31
3.8.1	Kullanılan Çözeltiler.....	31
3.8.2	Deneyin Yapılışı.....	31
3.9	FT-IR Spektrometresi ile Serbest Radikal Yakalayıcı (5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit) Varlığında Miyeloperoksidazın Doksorubisine Olan Etkisinin İncelenmesi.....	32
3.9.1	Kullanılan Çözeltiler.....	32
3.9.2	Deneyin Yapılışı.....	32
3.10	LC-ESI-MS Spektrometresi ile Miyeloperoksidazın Doksorubisine Olan Etkisinin İncelenmesi.....	33
3.10.1	Kullanılan Çözeltiler.....	33
3.10.2	Deneyin Yapılışı.....	33
3.11	LC-ESI-MS Spektrometresi ile Serbest Radikal Yakalayıcı (5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit) Varlığında Miyeloperoksidazın Doksorubisine Olan Etkisinin İncelenmesi.....	33
3.11.1	Kullanılan Çözeltiler.....	33
3.11.2	Deneyin Yapılışı.....	34
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	35
4.1	Kan Örneklerinden İzole Edilen Miyeloperoksidazın Konsantre Etme ve Yıkama Sonuçları	35
4.2	Kan Örneklerinden İzole Edilen Miyeloperoksidazın HPLC Kromatogramı.....	37
4.3	Miyeloperoksidazın Doksorubisine Olan Etkisi ve Örneklerin Absorbans Spektrumları	38
4.3.1	Doksorubisine Miyeloperoksidaz Etkisi UV-Vis Spektrumları.....	38
4.3.2	Serbest Radikal Yakalayıcı (Free Radical Trap) Varlığında Miyeloperoksidazın Doksorubisine Etkisi ve Örneklerin Absorbans Spektrumları	39

4.4	Miyeloperoksidazın Doksorubisine Etkisinin İncelenmesi ile İlgili FT-IR Spektrumları	40
4.4.1	Dokso rubisinin FT-IR Spektrumu	40
4.4.2	Serbest Radikal Yakalayıcının FT-IR Spektrumu	40
4.4.3	Miyeloperoksidazın FT-IR Spektrumu	41
4.4.4	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O'nun FT-IR spektrumu	41
4.4.5	Dokso rubisine Miyeloperoksidaz Etkisi FT-IR Spektrumları	42
4.4.6	Serbest Radikal Yakalayıcı (5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit) Varlığında Miyeloperoksidazın Dokso rubisine Etkisi ve Alınan FT-IR Spektrumları	43
4.5	Miyeloperoksidazın Dokso rubisine Etkisinin LC-ESI-MS Cihazıyla İncelenmesi ile İlgili Sonuçlar	44
4.5.1	Dokso rubisinin LC-MS Kromatogramları	44
4.5.2	Miyeloperoksidazın Dokso rubisine Etkisi 0.dk'daki LC-MS Kromatogramları ..	45
4.5.3	Miyeloperoksidazın Dokso rubisine Etkisi 60.dk'daki LC-MS Kromatogramları	47
4.5.4	Miyeloperoksidazın Dokso rubisine Etkisi 120.dk'daki LC-MS Kromatogramları	49
4.6	Serbest Radikal Yakalayıcı (Free Radical Trap, 5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit) Varlığında Miyeloperoksidazın Dokso rubisine Etkisinin LC-ESI-MS Cihazı ile İncelenmesine ile İlgili Sonuçlar	51
4.6.1	Serbest Radikal Yakalayıcının LC-MS Kromatogramları	51
4.6.2	Serbest Radikal Yakalayıcı Varlığında Miyeloperoksidazın Dokso rubisine Etkisi 0.dk'daki LC-MS Kromatogramı	52
4.6.3	Serbest Radikal Yakalayıcı Varlığında Miyeloperoksidazın Dokso rubisine Etkisi 60.dk'daki LC-MS Kromatogramı	55
4.6.4	Serbest Radikal Yakalayıcı Varlığında Miyeloperoksidazın Dokso rubisine Etkisi 120.dk'daki LC-MS Kromatogramları	57
	KAYNAKLAR	70
	ÖZGEÇMİŞ	73

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
g	gram
L	litre
ml	mililitre
μ	mikro
μl	mikrolitre
mM	milimolar
μM	mikromolar
M	Molar
μm	mikrometre
nm	nanometre
mm	milimetre
mg	miligram
dk	dakika
sn	saniye
g	Rölativ santrifüj kuvveti (RCF)
Å	Angstron
kDa	kilodalton
α	alfa

KISALTMA LİSTESİ

NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat
NaOH	Sodyum hidroksid
EDTA	Etlendiamintetraasetik asid Tetrasodyum tuzu Tetrahidrat
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
NH ₄ Cl	Amonyum klorür
NaHCO ₃	Sodyum hidrojen karbonat
CH ₃ COOH	Asetik asid
HCl	Hidroklorik asid
MgCl ₂ .6H ₂ O	Magnezyum klorür-hegzahidrat
MnCl ₂ .4H ₂ O	Mangan (II) klorür tetrahidrat
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
MPO	Miyeloperoksidaz enzimi
LPO	Laktoperoksidaz enzimi
EPO	Eozinofil peroksidaz
TPO	Tiroid peroksidaz
PMN	Polimorfonükleer lökositler
Cl ⁻	Klor iyonu
PBS	%0.9 NaCl içeren fosfat tamponu
RZ	Reinheit Zahl değeri
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC-MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
FT-IR	Fourier Transform İnfrared Spektrometresi
Br ⁻	Brom iyonu
HOCl	Hipoklorik asid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO	Nitrik oksid
·O ₂ ⁻	Süperoksid anyon radikali
NO ₂ ·	Azot dioksid radikali
ROS	Reaktif oksijen türleri
SCN ⁻	Tiyosiyanat
DOX	Doksorubisin

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 2.1 Doğal homodimerik insan miyeloperoksidazının tam yapısı. Her alt ünite bir hafif zincir (mavi), bir ağır zincirden (kırmızı) oluşmuşmakta ve modifiye bir hem grubu (yeşil) içermektedir. Ek olarak kalsiyum iyonları (sarı küreler) ve glikozlanmış bölgeler gösterilmiştir (Furtmüller vd. , 2006). 3
- Şekil 2.2 Miyeloperoksidazın monomer yapısının şematik olarak gösterilmesi. Hafif zincirin sarmalları mavi, ağır zincirin sarmalları ise kırmızı renktedir. Küçük polipeptidin terminalleri N1 ve C1, büyük polipeptidin terminalleri ise N2 ve C2 simgeleri ile verilmiştir (Furtmüller vd. , 2006). 3
- Şekil 2.3 Miyeloperoksidazdaki kalsiyum iyonunu bağlama bölgesi. Ca^{2+} için ligand gibi davranan Asp96 (262), Thr168 (334), Phe170 (336), Asp172 (338), ve Ser174 (340)'e ek olarak distal His95 (260) ve Asp94 (260) da gösterilmiştir. Asp94 (260) pirol halkalarından C'nin 5-hidroksimetil grubu ile ester bağı oluşturmaktadır (Furtmüller vd. , 2006). 4
- Şekil 2.4 İnsan miyeloperoksidazı (MPO), eozinofil peroksidaz (EPO), laktoperoksidaz (LPO) ve tiroid peroksidazın (TPO) birincil translasyon ürünlerinin amino asid dizilimleri. TPO-spesifik C-terminal uzantısı (750-933 amino asid artıkları) gösterilmemiştir. Olgun MPO bir homodimerdir, her bir monomer bir hafif zincir (106 amino asid, mavi) ve bir ağır zincirden (467 amino asid, kırmızı) oluşmaktadır. Önemli katalitik amino asid artıkları sarı ile ve prostatik grupla kovalent bağ oluşturmakta etkili amino asidler yeşil ile belirtilmiştir. Glikozlanma bölgeleri (asparaginler, N) * ile, alt üniteler arasında disülfid köprüsü oluşturan sistein # ile işaretlenmiş ve kalsiyum iyonu bağlama bölgesindeki ligandların ise altı çizilmiştir (Furtmüller vd., 2006). 5
- Şekil 2.5 (A) İnsan miyeloperoksidazında ve sığır laktoperoksidazında hem grubunun proteine bağlanması. Miyeloperoksidaz enziminde hem grubu iki ester bağı (Asp94 ve Glu242) ve bir sülfonyum iyon bağı (Met243) ile bağlanmıştır. Ek olarak His95, Arg239, ve Gln91 katalitik amino asid artıkları da gösterilmiştir. (B) (WT) tipi rekombinant miyeloperoksidaz (recMPO), sığır laktoperoksidazı (LPO) ve eozinofil peroksidaz (EPO)'ın elektronik absorpsiyon spektrumları verilmiştir (Zederbauer vd. , 2007). 6
- Şekil 2.6 Peroksidazların katalitik döngüsü. Peroksidazlar önce birinci substratları olan H_2O_2 ile reaksiyona girmektedirler ve Bil. I olarak gösterilmiş olan ara ürünü oluşturmaktadırlar. Ortamda aşırı H_2O_2 bulunması durumunda bileşik III (Bil. III) oluşabilmektedir. Bil. I mono-elektronik olarak ikinci bir substratı (organik veya inorganik bir molekül) okside ederek Bil. II olarak adlandırılan ikinci bir ara ürüne indirgenmektedir. Bil. II de bir substrat molekülünü okside edebilir veya H_2O_2 ile reaksiyona girebilir ve Bil. III oluşumuna neden olabilir (Ghibaudi ve Laurenti,2003). 7
- Şekil 2.7 Miyeloperoksidaz'ın peroksidaz döngüsü ve halojenlenmesi. Her iki döngü de doğal enzimi bileşik I'e okside etmek için hidrojen peroksit kullanmaktadır. Burada Por, porfirini göstermektedir. AH_2 ve $\cdot AH$ sırasıyla okside olan substratları ve oluşan radikal ürünleri simgelemektedir. Cl^- yerine diğer halojenler (Br^- , I^-) ve SCN^- de bileşik I tarafından okside edilecektir (Arnhold, 2004). 8
- Şekil 2. 8 Esas substratı olan H_2O_2 varlığında MPO-bileşik I ve II NO 'yu direkt olarak ya da değişik küçük radikal ara ürünlerin (R , R^1 ya da R^*) oluşumuna bağlı olarak okside etmektedir. NO katabolizmasının son ürünü, nitrit de MPO için bir

substrattır ve oksidasyonu sonucunda NO ₂ ⁻ oluşmaktadır. NO ₂ ⁻ güçlü bir oksidleyicidir ve serbest ya da proteine bağlı tirozinin nitrasyonuna sebep olabilmektedir (Lau ve Baldus, 2006).	9
Şekil 2.9 MPO Bil. I oluşumu ve geri dönüşümü (Ghibaudi ve Laurenti,2003).	10
Şekil 2.10 Fagositlerin öldürme mekanizmaları gösterilmiştir.	11
Şekil 2.11 Philadelphia kromozomu (Ph) kromozom 9 ve 22'nin uzun kolları arasındaki translokasyon ile oluşmaktadır. Kısa oklar fragmentasyon noktalarını işaret etmektedir (Panno, 2005).	13
Şekil 2.12 Doksorubisinin açık formülü.	19
Şekil 2.13 Doksorubisinin metabolitleri.	21
Şekil 2.14 Ölüm-ligandı kaynaklı apoptoza karşı Doksorubisinin sebep olduğu duyarlılaşma açıklaması. Reaktif oksijen türlerinin üretilmesi Doksorubisinin demir ile etkileşimi sonucu meydana gelmektedir ve bu etki demir çelatörleri ya da antioksidanlar tarafından düzeltilebilmektedir. Reaktif oksijen türleri, apoptotik yoldaki kaspaz-8 inhibitörü olan cFLIP'in ekspresiyon seviyelerini negatif olarak etkilemektedir. Azalmış cFLIP ekspresiyonu hücrelerin ölüm-ligandı kaynaklı apoptoza karşı savunmasız hale gelmesine sebep olmaktadır (White vd. , 2007).	22
Şekil 4.1 RZ Değerinin yıkama sayısı ile değişmesi.	36
Şekil 4.2 Protein ekstraktının (NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi uygulanmadan önce ve uygulandıktan sonra alınan absorpsiyon spektrumları.	36
Şekil 4.3 Konsantre etme ve yıkama işlemlerinden sonra alınan absorpsiyon spektrumları.	37
Şekil 4.4 Kandan izole edilen miyeloperoksidazın HPLC kromatogramı.	37
Şekil 4.5 Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 16 dakika süreyle 37°C'da alınan absorbans spektrumları.	38
Şekil 4.6 Serbest radikal yakalayıcı varlığında 37°C'da miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 16.dakika süreyle alınan absorbans spektrumları.	39
Şekil 4.7 Doksorubisinin FT-IR spektrumu	40
Şekil 4.8 Serbest radikal yakalayıcının FT-IR spektrumu	40
Şekil 4.9 Saflaştırılan miyeloperoksidazın FT-IR spektrumu	41
Şekil 4.10 PBS tamponu elde etmek için kullanılan NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O'nun FT-IR spektrumu	41
Şekil 4.11 Miyeloperoksidazın Dosorubisine farklı sürelerde (0, 60 ve 120.dk) etkisinden sonra örneklerin alınan FT-IR spektrumları.	42
Şekil 4.12 Serbest radikal yakalayıcı (free radical trap) varlığında miyeloperoksidazın Dosorubisine farklı sürelerde (0, 60 ve 120.dk) etkisinden sonra örneklerin alınan FT-IR spektrumları.	43
Şekil 4.13 PBS tamponunda çözölmüş Doksorubisinin LC-MS cihazında alınmış kromatogramı.	44
Şekil 4.13. (1) PBS tamponunda çözölmüş Doksorubisinin alıkonma zamanı: 22.000-22.887 dk olan MS yarılmasının MS kromatogramında belirtilmesi	44
Şekil 4.13. (2) PBS tamponunda çözölmüş Doksorubisinin alıkonma zamanı: 22.000-22.887 dk olan MS yarılması	44
Şekil 4.14 Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı.	45
Şekil 4.14. (1) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.967-17.853 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	45
Şekil 4.14. (2) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.967-17.853 dk olan MS yarılması	45
Şekil 4.14. (3) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 22.040-22.800 dk olan MS	45

yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	46
Şekil 4.14. (4) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 22.040-22.800 dk olan MS yarılması	46
Şekil 4.14. (5) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.493-28.100 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	46
Şekil 4.14. (6) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.493-28.100 dk olan MS yarılması	47
Şekil 4.15 Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı.....	47
Şekil 4.15. (1) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.967-17.547 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	47
Şekil 4.15. (2) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.967-17.547 dk olan MS yarılması	48
Şekil 4.15. (3) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.673-27.833 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	48
Şekil 4.15. (4) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.673-27.833 dk olan MS yarılması	48
Şekil 4.16 Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı.....	49
Şekil 4.16. (1) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.920-17.633 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	49
Şekil 4.16. (2) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.920-17.633 dk olan MS yarılması	49
Şekil 4.16. (3) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 21.953-23.020 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	50
Şekil 4.16. (4) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 21.953-23.020 dk olan MS yarılması	50
Şekil 4.16. (5) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.940-27.740 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	50
Şekil 4.16. (6) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.940-27.740 dk olan MS yarılması	51
Şekil 4.17 Asetonitrilde çözülmüş serbest radikal yakalayıcının LC-MS cihazında alınmış kromatogramı.....	51
Şekil 4.17. (1) Asetonitrilde çözülmüş serbest radikal yakalayıcının alıkonma zamanı: 2.500-3.480 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	51
Şekil 4.17. (2) Asetonitrilde çözülmüş serbest radikal yakalayıcının alıkonma zamanı: 2.500-3.480 dk olan MS yarılması.....	52
Şekil 4.18 Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı.....	52
Şekil 4.18. (1) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 3.920-5.613 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	52
Şekil 4.18. (2) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 3.920-5.613 dk olan MS yarılması.....	53

Şekil 4.18. (3) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 21.600-23.287 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	53
Şekil 4.18. (4) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 21.600-23.287 dk olan MS yarılması.....	53
Şekil 4.18.(5) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 22.000-22.980 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	54
Şekil 4.18. (6) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 22.000-22.980 dk olan MS yarılması.....	54
Şekil 4.18. (7) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 24.493-27.567 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	54
Şekil 4.18. (8) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 24.493-27.567 dk olan MS yarılması.....	55
Şekil 4.19 Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı.....	55
Şekil 4.19. (1) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.787-17.453 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	55
Şekil 4.19. (2) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.787-17.453 dk olan MS yarılması.....	56
Şekil 4.19. (3) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.787-17.453 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	56
Şekil 4.19. (4) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.787-17.453 dk olan MS yarılması.....	56
Şekil 4.19. (5) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 21.733-23.513 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	57
Şekil 4.19. (6) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 21.733-23.513 dk olan MS yarılması.....	57
Şekil 4.20 Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı.....	57
Şekil 4.20. (1) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 4.053-6.053 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi	58
Şekil 4.20. (2) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 4.053-6.053 dk olan MS yarılması.....	58
Şekil 4.21 LC-MS sistemi sonuçlarının verildiği çizelgelerde simgelerle belirtilen olası yapıların açık formülleri.	69
Şekil 4.22 Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisi.	69

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1	Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerin listesi.....	27
Çizelge 4.1	Ultrafiltrasyon sistemi kullanılarak gerçekleştirilen konsantre etme işlemi ve her bir yıkama işlemi sonrası 280 ve 430 nm'deki absorbans değerleri ve enzimin saflığının bir ölçüsü olarak kabul edilen RZ değerleri.....	35
Çizelge 4.2	Dokso rubisinin FT-IR spektrumunun yorumlanması.....	61
Çizelge 4.3	Miyeloperoksidazın Dokso rubisine etkisinde FT-IR cihazında alınan spekturumunun yorumlanması.....	62
Çizelge 4.4	Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Dokso rubisine etkisinde FT-IR cihazında alınan spekturumunun yorumlanması.....	63
Çizelge 4.5	PBS tamponunda çözölmüş Dokso rubisinin LC-MS sonuçları dikkate alınarak oluştuğı tahmin edilen yapıları.....	64
Çizelge 4.6	Miyeloperoksidazın Dokso rubisine etkisinde 0. dk reaksiyon süresi (reaksiyonun başlaması ile birlikte) uygulanan işlem için LC-MS sistemi sonuçları dikkate alınarak oluştuğı tahmin edilen yapılar	64
Çizelge 4.7	Miyeloperoksidazın Dokso rubisine etkisinde 60. dk reaksiyon süresi (reaksiyonun başlaması ile birlikte) uygulanan işlem için LC-MS sistemi sonuçları dikkate alınarak oluştuğı tahmin edilen yapılar	65
Çizelge 4.8	Miyeloperoksidazın Dokso rubisine etkisinde 120. dk reaksiyon süresi (reaksiyonun başlaması ile birlikte) uygulanan işlem için LC-MS sistemi sonuçları dikkate alınarak oluştuğı tahmin edilen yapılar	65
Çizelge 4.9	Asetonitrilde çözölmüş serbest radikal yakalayıcının LC-MS sistemi sonuçları dikkate alınarak oluştuğı tahmin edilen yapılar	66
Çizelge 4.10	Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Dokso rubisine etkisinde 0. dk reaksiyon süresi (reaksiyonun başlaması ile birlikte) uygulanan işlem için LC-MS sistemi sonuçları dikkate alınarak oluştuğı tahmin edilen yapılar	66
Çizelge 4.11	Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Dokso rubisine etkisinde 60. dk reaksiyon süresi (reaksiyonun başlaması ile birlikte) uygulanan işlem için LC-MS sistemi sonuçları dikkate alınarak oluştuğı tahmin edilen yapılar	67
Çizelge 4.12	Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Dokso rubisine etkisinde 120. dk reaksiyon süresi (reaksiyonun başlaması ile birlikte) uygulanan işlem için LC-MS sistemi sonuçları dikkate alınarak oluştuğı tahmin edilen yapılar	67

ÖNSÖZ

Engin tecrübesi ve yapmış olduğu değerlendirmeler ile tez çalışmam sırasında Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Bölümü'nde yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren her türlü yardım ve imkanı sağlayan; önerileriyle bana yol gösteren tez yöneticim değerli hocam Prof. Dr. Huriye KUZU'ya;

Deneylein başlangıcından tezi teslim edinceye kadar beni yalnız bırakmayan, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum Y.T.Ü. Biyomühendislik Bölümü'ndeki değerli çalışma arkadaşım, Candan ARIÖZ'e;

Deneyleirim için her ihtiyaç duyduğumda hiç çekinmeden kan veren Y.T.Ü. Biyomühendislik Bölümü'ndeki doktora öğrencilerinden Mithat ÇELEBİ başta olmak üzere, Erdem KARABULUT, Murat TOPUZOĞULLARI ve Y.T.Ü. Kimya Bölümü'nden Aysu YARMAN'a;

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Y.T.Ü. Biyomühendislik Bölümü'ndeki doktora öğrencilerinden Erdem KARABULUT, Zafer Ömer ÖZDEMİR, Kadriye KIZILBEY ve Y.T.Ü. Kimya Mühendisliği Bölümü'nde görevli sayın Cem ÇAKMAK'a;

Lisans öğrenimim sırasında bana biyokimyayı sevdiren değerli hocam Prof. Dr. Oktay ARSLAN başta olmak üzere bu aşamaya gelmemde emeği geçen tüm hocalarıma;

Ayrıca tüm hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, her zaman yanımda olan sevgili aileme;

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Miyeloperoksidaz (MPO, EC 1.11.1.7) başlıca polimorfonükleer nötrofillerde, monositlerde ve doku makrofajlarının belirli popülasyonlarında bulunmaktadır. Bu enzim “miyeloperoksidaz-H₂O₂-Cl⁻” reaksiyon sistemi vasıtasıyla zararlı mikroorganizmaları ve belirli tümörleri yok edici etkisi nedeniyle savunma sisteminde önemli bir yere sahiptir. Miyeloperoksidaz ayrıca peroksidasyon yoluyla fenol, anilin ve türevleri ile β-diketonlar gibi birçok maddeyi yükseltgeyerek serbest radikal meydana gelmesine sebep olmaktadır. Bu durum genel olarak belirli ilaçların toksik metabolitlerinin oluşmasını da açıklamaktadır.

Kanser tedavisinde kullanılan bazı ilaçlara karaciğer mikrozomların etkisi ile metabolitlerin oluşması ve ayrıca “Horseradish Peroxidase” etkisi daha önce incelenmiştir. Bu çalışmada ilk defa insan lökositlerinden izole edilip saflaştırılan miyeloperoksidazın lösemi tedavisinde kullanılan Doksorubisine olan etkisi incelendi. Ayrıca miyeloperoksidaz ilk defa laboratuvar koşullarında reaksiyon gerçekleştirmek üzere yeterli miktarda ve aktivitesi korunarak elde edildi. Fizyolojik sıcaklıkta ve pH’da (37°C; pH 7.2-7.3) gerçekleştirilen bu reaksiyonda oluşan ürünler UV-Vis. spektrofotometre, FT-IR ve LC-MS spektrometre sistemleri kullanılarak değerlendirildi. Reaksiyon sonucu Doksorubisinin yapısında bulunan karbonil grubunun kaybolduğu, C-O-C eterik bağının parçalandığı ve serbest radikallerin oluştuğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: Miyeloperoksidaz, Doksorubisin, lösemi, LC-MS, FT-IR, UV-Vis.

ABSTRACT

Myeloperoxidase (MPO, EC 1.11.1.7) is an enzyme found in polymorphonuclear neutrophils and monocytes, and certain populations of tissue macrophages. Myeloperoxidase seems to play an important role in the defense system against invading microorganisms and certain tumor killing actions via myeloperoxidase-H₂O₂-Cl⁻ reaction system. Myeloperoxidase also oxidizes various compounds such as phenols, anilines and their derivatives, and also β -diketons which may lead to the formation of free radicals. In general, this explains the formation of toxic metabolites of certain drugs.

Metabolite production by the effect of liver microsomes on some drugs used in cancer treatment and also the effect of Horseradish Peroxidase was studied previously. In this study, for the first time the effect of isolated and purified myeloperoxidase from human leukocytes, on Doxorubicin, which is used for leukemia treatment, was investigated. In addition, myeloperoxidase was obtained for the first time at adequate amounts and good activity to perform the reaction in laboratory conditions. The products formed in this reaction which was occurred at physiological temperature and pH (37°C; pH 7.2-7.3) were evaluated by using UV-Vis. spectrophotometer, FT-IR and LC-MS spectrometer systems. In consequence, it was observed that the carbonyl group on Doxorubicin had disappeared, C-O-C etheral bonds were broken and free radicals were formed.

Key words: Myeloperoxidase, Doxorubicin, leukemia, LC-MS, FT-IR, UV-Vis.

1. GİRİŞ

Kanser birçok faktörün karmaşık biçimde rol oynadığı bir hastalıklar grubudur. Her yıl milyonlarca insanı vaktinden önce öldüren kanser, kalp hastalıklarının ardından, insan ölümlerinde ikinci sırada yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü, dünyada her yıl yedi milyon insanın kanserden öldüğünü bildirmektedir. Bugün yalnız Amerika Birleşik Devletlerinde beş milyon kanserli hasta yaşamaktadır ve her yıl bir milyon insana kanser tanısı konulmakta ve her yıl yarım milyon insan da kanserden ölmektedir (Alican, 1993). Çocukluk çağındaki kanser vakalarının %35'ini lösemiler oluşturmakta ve birinci sırada yer almaktadır. Türkiye'de her yıl 16 yaşın altında 1200-1500 yeni lösemili çocuk vakası bildirilmektedir [2]. ABD'de her yıl yaklaşık olarak 208 000 insan lösemiye yakalanmaktadır [3].

Lösemi kemik iliğindeki bir hücrede başlamaktadır. Hücre değişikliğe uğramakta ve lösemi hücresi haline gelmektedir. İlik hücresi bir kere lösemik değişim geçirdikten sonra çoğalmaya başlamaktadır. Bu lösemi hücreleri normal hücrelerden daha hızlı çoğalmakta ve uzun süre hayatta kalmakta, zamanla normal hücreleri sıkıştırmakta ve fonksiyonlarını yerine getirmelerine engel olmaktadır. Lösemi tedavisine genellikle kemoterapi ile başlanmaktadır [1-3]. Antrasiklinler en önemli kemoterapi ilaçlarından ve en çok bilineni Doksorubisindir (Dunkern vd., 2003). Bu ilaç akut lösemi, Hodgkin ve Non- Hodgkin lenfoma, meme kanseri ve akciğer kanserini de içeren geniş bir aralıkta anti-tümör aktivitesi göstermektedir ve ayrıca kullanılmakta olan en önemli antikanser ilaçlarından biridir (Liu vd., 2007). Doksorubisin çeşitli mekanizmalarla sitotoksik etkiler de göstermektedir. Örneğin helikazları inhibe ettiği, oksijen radikallerinin oluşumuyla birlikte metabolik aktivasyondan sonra antrasiklin-semikinon radikallerine dönüştüğü, ve ayrıca çekirdek DNA'sına bağlandığı düşünülmektedir (Dunkern vd., 2003).

Endojen fenolik bileşenlerin (antioksidanlar, hidroksillenmiş metabolitler) ve bazı ekzojen bileşiklerin (ilaçlar, çevresel kimyasallar) miyeloperoksidaz tarafından katalizlenen bir elektronlu oksidasyonu ile serbest radikal ara ürünler oluşmaktadır (Kagan vd., 2003).

Bu çalışmada kan örneklerinden izole edilen miyeloperoksidazın lösemi tedavisinde kullanılan Doksorubisine etkisi fizyolojik koşullarda (in vitro) gerçekleştirildi. Reaksiyon sonuçları UV-Vis. spektrofotometre, FT-IR ve LC-MS sistemlerinde incelendi.

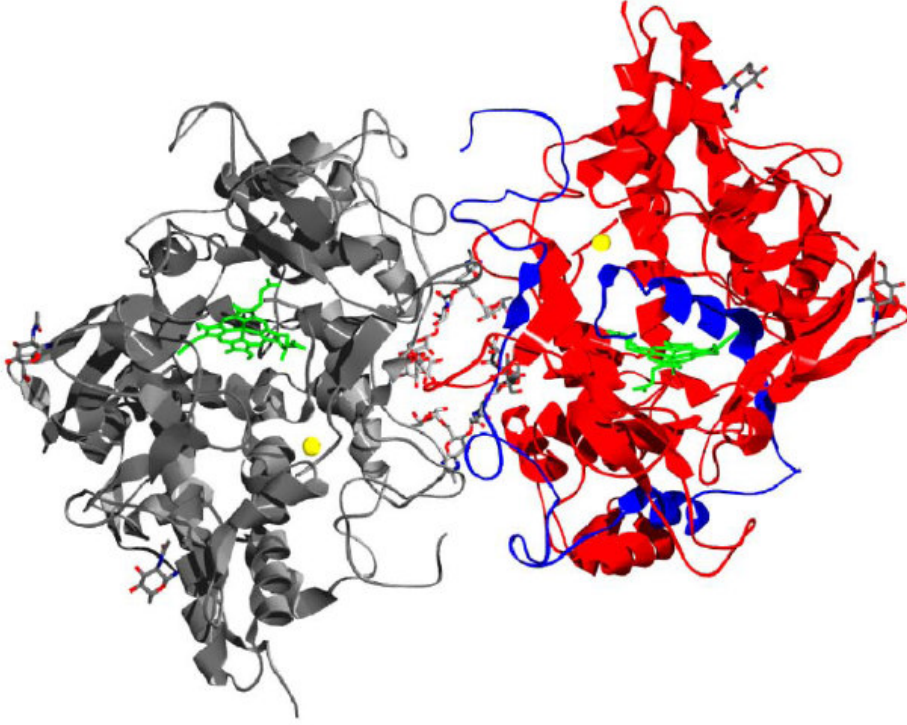
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Miyeloperoksidaz

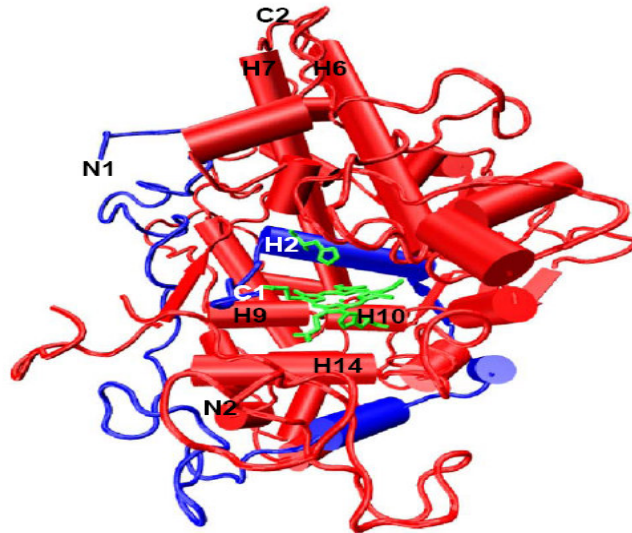
Miyeloperoksidaz (MPO) esas olarak insan polimorfonükleer nötrofillerinde (PMN) yaklaşık olarak % 5 oranında bulunmaktadır. Ayrıca monositlerde (toplam proteinin ~ %1'i) ve doku makrofajlarında MPO varlığı belirlenmiştir. MPO, PMN ve monositlerin azurofilik granüllerinde depolanmış durumdadır. Hücresel aktivasyon ve degranülasyon süresince MPO fagositik vakuollere salındığı gibi ekstraselüler alana da bırakılmaktadır (Lau ve Baldus, 2006).

2.2 Miyeloperoksidazın Yapısı

Memeli peroksidazları arasında sadece miyeloperoksidazın üç boyutlu yapısı bilinmektedir. İnsan miyeloperoksidazının yapısı son olarak 1.8 °Å ve -180°C'de X – ışını kristalografisi kullanılarak incelenmiştir. Miyeloperoksidaz 146 kDa molekül ağırlığında, katyonik özellikte, dimer yapıdadır ve monomerleri (73 kDa) arasında tek bir disülfid köprüsü [Cys153 (319)] bulunmaktadır (Şekil 2.1). Her bir monomer 14.5 kDa ve 58.5 kDa molekül ağırlığında iki polipeptid zincirinden oluşmaktadır, ve büyük polipeptide bağlı glikoz birimleri bulundurmaktadır. Küçük polipeptid 106, büyük polipeptid 467 amino asitten oluşmaktadır. Ayrıca, büyük polipeptidde beş, küçük polipeptidde bir adet zincir içi disülfid bağı yer almaktadır. İkincil yapısı (Şekil 2. 2) ağırlıklı olarak α -sarmal şeklindedir ve boyları 4 – 29 amino asid kalıntısı arasında değişen toplam 22 α -sarmal, bütün molekülün %36'sını oluşturmaktadır. Her monomer altı α -sarmalı (H2, H6, H7, H9, H10, H14) ve bir hem grubu içeren çekirdek benzeri bir birim durumundadır. Bu sarmallardan beş tanesi büyük polipeptidde, bir tanesi ise küçük polipeptidde aittir. Büyük polipeptid katlanarak beş ayrı bölge ve bu merkezi çekirdeği çevreleyen açık bir ilmek oluşturmaktadır. Küçük polipeptid molekülün etrafını sarmalamakta ve C-terminal α -sarmalı (H2) ile molekülün içine girmektedir (Şekil 2. 2). Molekül yüzeyinde bulunan ve kısa bir ilmek ile birleşmiş olan iki uzun amfipatik sarmal H6 ve H7, merkezi çekirdeğin önemli bir parçasını oluşturmakta ve büyük oranda hidrofobik olarak etkileşmektedirler. Hem cebinin distal yüzeyi küçük polipeptidin H2 sarmalı tarafından oluşturulurken, büyük polipeptidin H9 ve H10 sarmalları da proksimal yüzeyi oluşturmaktadır (Şekil 2. 2).



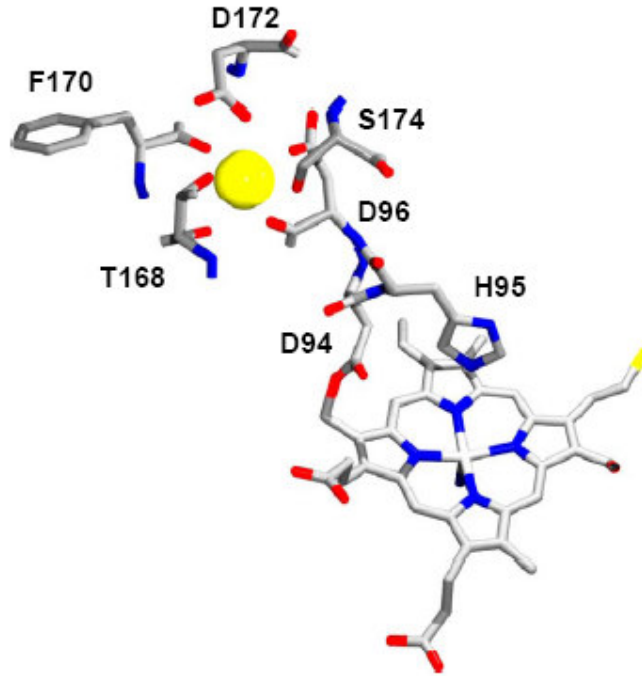
Şekil 2.1 Doğal homodimerik insan miyeloperoksidazının tam yapısı. Her alt ünite bir hafif zincir (mavi), bir ağır zincirden (kırmızı) oluşmuşmakta ve modifiye bir hem grubu (yeşil) içermektedir. Ek olarak kalsiyum iyonları (sarı küreler) ve glikozlanmış bölgeler gösterilmiştir (Furtmüller vd. , 2006).



Şekil 2.2 Miyeloperoksidazın monomer yapısının şematik olarak gösterilmesi. Hafif zincirin sarmalları mavi, ağır zincirin sarmalları ise kırmızı renktedir. Küçük polipeptidin terminalleri N1 ve C1, büyük polipeptidin terminalleri ise N2 ve C2 simgeleri ile verilmiştir (Furtmüller vd. , 2006).

Beş asparagin bağlı glikozlanmış bölge (Asn-X-Ser ve Asn-X-Thr) büyük polipeptidde 157 (323), 189 (355), 225 (391), 317 (483), ve 563 (729) numaralı amino asid artıklarında ortaya çıkmaktadır, yine de birinci ve sonuncu X-ışını kristal yapılarında görülememiştir (Şekil 2. 4 ve Şekil 2.1). Asn157 (Asn323)'nin glikozlanmış olduğuna dair kanıtlar bulunduğu belirtilmekle birlikte henüz yayınlanmamıştır. Asn317 (Asn483)'deki şeker artıkları karşılıklı dimer arayüzeyi ile etkileşmektedir (Şekil 2. 1) ve belki de dimer oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Furtmüller vd. , 2006).

Dimerik miyeloperoksidazın her bir yarısı, hem şeklinde kovalent olarak bağlanmış bir demir ve ayrıca bir kalsiyum iyonu bulundurmaktadır. Kalsiyum bütün memeli peroksidazlarında bulunan büyük polipeptid zincirinin sekiz amino asid kalıntısının (Leu-Thr-Ser-Phe-Val-Asp-Ala-Ser) oluşturduğu bir ilmek içerisinde bağlı durumdadır (Şekil 2. 4).



Şekil 2.3 Miyeloperoksidazdaki kalsiyum iyonunu bağlama bölgesi. Ca^{2+} için ligand gibi davranan Asp96 (262), Thr168 (334), Phe170 (336), Asp172 (338), ve Ser174 (340)'e ek olarak distal His95 (260) ve Asp94 (260) da gösterilmiştir. Asp94 (260) pirol halkarından C'nin 5-hidroksimetil grubu ile ester bağı oluşturmaktadır (Furtmüller vd. , 2006).

Eozinofil peroksidaz (EPO), laktoperoksidaz (LPO) ve tiroid peroksidaz (TPO) ile birlikte miyeloperoksidazın amino asid dizilimleri Şekil 2.4'de verilmiştir.

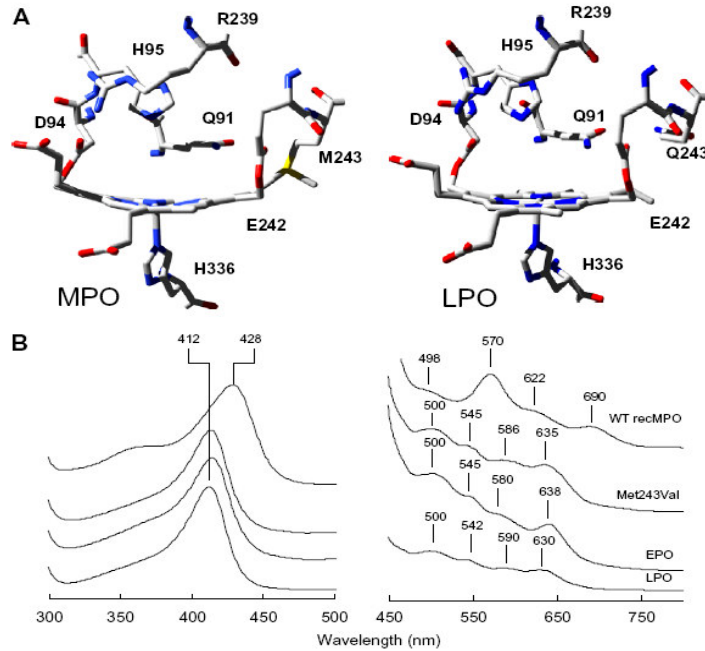
MPO	MGVPPFFSSLRCDVLDGPCWAGGLTAEMKLLALAGLLAILATPQPS---EGAAPAVLGEV	57
EPO	-----MHLLPALAGVLATLVLAQPC---EGTDPASPGAV	31
LPO	-----MRVLLHLPALLASLILLQAA---ASTTRAQT---T	29
TPO	-----MRALAVLSVTLVMACTEAPFFFIISRGKELLWGKP	34
MPO	DTSLVLSSMEEAKQLVDKAYKERRESIKQLRLSGSASPMELLSYFKQPVAATRTAVRAAD	117
EPO	ETSVLRDCIAEAKLLVDAAYNWTQKSIKQLRLSGSASPMDLSSYFKQPVAATRTVVRAAD	91
LPO	RTSAISDTVSQAKVQVNKAFLDSTRTRKLTAMSETPTSRQLSEYKHAQGRTRTAIRNGQ	89
TPO	EBSRVSSVLEESKRLVDLTAMYATMQRLNK--KRGILSPAQLLSFKLPPEPTSGVIAARAE	92
	*	
MPO	YLHVALDLLEKRLSLWRRPFNVTDVLTPAQLNVLSKSSGCAYQDVGVTCPE---QDKYR	174
EPO	YMHVALGLLEKLPQQRSGPFNVTDVLTPEQLRLLSQASGCALRDQAERCS-----DKYR	146
LPO	VWEESLKRRLRQKASLT-----NVTDPSS--LDLTSLSEVGCAPAPVVRCDP---CSPYR	139
TPO	IMETSIQAMKRKVNLTQQSQHPTDALSEDLLSIIANMSGCLPYMLPPKCPNTCLANKYR	152
MPO	TITGMCNNRRSPTLGA SNRAFWRLPAEYEDGFSLPYGWT PGVKRNGF FVALARAVSNEI	234
EPO	TITGRCNNRRPILLAGASNQALARWLPAEYEDGLSLPFGWTPSRRRNGFLLPLVRAVSNQI	206
LPO	TITGDCNNRRKPALGAANRALARWLPAEYEDGLSLPFGWTPGKTRNGFPLPLAREVSNKI	199
TPO	PITGACNNRDHPRWGA SNTALARWLPPVYEDGFSQPRGWNPGFLYNGFPLPPVREVTRHV	212
MPO	VRFPDQDTPDQERSLMFMQWGC LLDD DLDFTPEPAARASFVTG VNCETSCVQPPCFPI	294
EPO	VRFPNERLTSRGRALMFMQWGCQFID DLDSPESPARVAFTAGVDCERTCAQLPPCFPI	266
LPO	VGYLNEEGVLDQNRSLFMQWGCIVDD DLDFAPDTELGSSSEYSKAQCEYCIQGNCFPI	259
TPO	IQVSNEVVTDDDRYSDLLMAWGCYIDDD IAFTPQSTSKAAFGGGADCQMTCEQNPCFPI	272
	#	
MPO	KIPPNDPRIKNQADCI PFFRSCPACPGS-----NITIRNQINALTSFVDASMVYG	344
EPO	KIPPNDPRIKNQDCI PFFRSAPSCPQN-----KNRVRNQINALTSFVDASMVYG	316
LPO	MPPNDPKAGTQGGKMPFRAGFVCPPTP-----YKSLAREQINALTSFLDASVYVS	311
TPO	QLP--BEARPAAGTACL PFYRSSAACGTGQGGALFGLNLSANPRQMQNGLTSFLDASTVYG	331
	*	
MPO	SEEPILARNLRNMSNQLGLLAVNQRFQDNGRALLPFDNLHD----DPCLLTNRSARI PCFL	400
EPO	SEVLSLRRLNRNTNYLGLLAINQRFQDNGRALLPFDNLHD----DPCLLTNRSARI PCFL	372
LPO	SEPSLASRLRNLSSPLGLMAVNQEVSDHGLPYLPYDSKKP-----SPCEFINTTARVPCFL	367
TPO	SSPALERQLRNWNTSAEGLLRVHARLRDGRAYLPFVPPRAPAACAPEPGIPGETRGPCFL	391
MPO	AGDTRSSMEPELTSMHTLLREHNRLATELKSINPRWDGERLYQEARKIVGAMVQIITYR	460
EPO	AGDTRSTETPKLAAMHTLTMREHNRLATELRLNPRWNGDKLYNEARKIMGAMVQIITYR	432
LPO	AGDSASEHILLATSHTLFLREHNRLATELRLNPNQWDEKLYQEARKILGAFVQIITYR	427
TPO	AGDGRASEVPSLTALHTLWLRHNRLAALKAALNAHWSADAVYQEARKVVGALHQIITYR	451
	*	
MPO	DYLPVLVGLPTAMRKYLPTYSYNDSDVPRIANVF-TNAFRYGH TLIQPFMFRLDNRYQPM	519
EPO	DPLPLVLGKARARTLGHYRGYCSNVDPRIANVF-TLAFRFGHTMLQPFMFRLDNRYQPM	491
LPO	DYLPILLG-DHMQKWI PPYQGYSESVDPRISNVF-TFAFRFGHLEVPSMFRLDENRYQPM	485
TPO	DYIPRILGPEAFQYVGPYEGYDSTANPTVSNVFTAAFRFGHATIHPLVRRLDASFOEH	511
MPO	EPNPRVPLSRVFFASWRVVLGGIDPILRGLMATPAKLNQONQIAVDEIRERLFEQVMRI	579
EPO	APNSHVPLSSAFASWRIVYBGGIDPILRGLMATPAKLNQDAMLVDELDRDLFRQVRRRI	551
LPO	GPEPELPLHTLFTNTWRMVKDGGIDPLVRGLLAKKSKLMKQNKMMTGELRNKLFQPTHRI	545
TPO	PDLPLGLWLHQAF FSPWTLRGGGLDPLIRGLLARPALQVQDQLMNEELTERLFLVLSNSS	571
MPO	G-LDLPALAMQSRSDHGLPGYNAWRRFCGLPQPETVQQLGTVLRLNLKARKLMBOYQTPN	638
EPO	G-LDLAALAMQSRSDHGLPGYNAWRRFCGLSQPRNLALQSLRVLKNQDLARKFLNLYGTPD	610
LPO	HGFDLAAINTQRCRDHGLPGYNSWRAPCDLSQPQTLEELNTVLKSKMLAKKLLGLYGTDP	605
TPO	T-LDLASINLQGRDGLPGYNEWREPCGLPRLETPADLSTAIASRSVADKILDLKYHPD	630
MPO	NIDIWMGGVSEPLKRGVGPLLACIIGTOFRKLKRDGRFWWENEGVFSMQOQALAOIS	698
EPO	NIDIWIGATAEPLPGARVGPLLACLFENQFRARDGRFWWQKRGVFTKRQKALSRIS	670
LPO	NIDIWIGATAEPLVERGVGPLLACLLGKQFQQIRDGDRFWWENPGVFTNEQKDSLQKMS	665
TPO	NIDVWLGLAENFLPRARTGPLFACLLIGKMKALRDGDWFWWENSHVFTDAQRRELEKHS	690
	*	
MPO	LPRIICDNTGITTVSR-DIFRANIYPRGFVNC SRIPLNL SAWRG-----	745
EPO	LSRIICDNTGITTVSR-DIFRANIYPRGFVNC SRIPLNL SAWRG-----	715
LPO	FSRLVCDNTRITKVPR-DPFWANSYPYDFVDC SAIDKLDLSPWASVKN-----	712
TPO	LSRVICDNTGLTRVPM-DAFQVGKFPEDFESCDSITGMNLEAWRETFPQDDKCGFPESVE	749

Şekil 2.4 İnsan miyeloperoksidazı (MPO), eozinofil peroksidaz (EPO), laktoperoksidaz (LPO) ve tiroid peroksidazın (TPO) birincil translasyon ürünlerinin amino asit dizilimleri. TPO-spesifik C-terminal uzantısı (750-933 amino asit artıkları) gösterilmemiştir. Olgun MPO bir homodimerdir, her bir monomer bir hafif zincir (106 amino asit, mavi) ve bir ağır zincirden (467 amino asit, kırmızı) oluşmaktadır. Önemli katalitik amino asit artıkları sarı ile ve prostatik grupla kovalent bağ oluşturmakta etkili amino asitler yeşil ile belirtilmiştir. Glikozlanma bölgeleri (asparaginler, N) * ile, alt üniteler arasında disülfid köprüsü oluşturan sistein # ile işaretlenmiş ve kalsiyum iyonu bağlama bölgesindeki ligandların ise altı çizilmiştir (Furtmüller vd., 2006).

2.2.1 Miyeloperoksidaz Hem Grubunun Yapısı

Miyeloperoksidaz enziminde bulunan hem grubu protoporfirin IX türevidir. Piyol halkaları A ve C üzerindeki metil grupları, ağır polipeptiddeki Glu242 (408) ve hafif polipeptiddeki Asp94 (260)'ın karboksil grupları ile ester bağı oluşumuna olanak sağlayacak şekilde modifiye olmuşlardır (Fiedler vd., 2000; Furtmüller vd, 2006). Ek olarak piyol halkası A üzerinde bulunan vinil grubunun β -karbonu ile sülfonyum iyon bağı oluşturarak Met243'ün sülfür atomuna kovalent bağlanmaktadır. Piyol halkaları B ve D neredeyse düzlemsel olduğu halde A halkası ve daha az miktarda da C halkası distal tarafa doğru eğilmiştir. Bunun sonucu hem yapısı yay şeklini almıştır (Furtmüller vd, 2006).

Miyeloperoksidazdaki hem halkası belirtildiği gibi yay-şeklinde bir yapı (Şekil 2.5 A) gösterirken sığır laktoperoksidazında hem daha az eğilmiş durumdadır. Sonuç olarak ferrik miyeloperoksidazın elektronik absorpsiyon maksimumu, eozinofil peroksidaz ve laktoperoksidaz için elde edilenler ile kıyaslandığında (Şekil 2.5 B), uzun dalga boyuna kayma (red-shifted) görülmektedir (Zederbauer vd. , 2007).

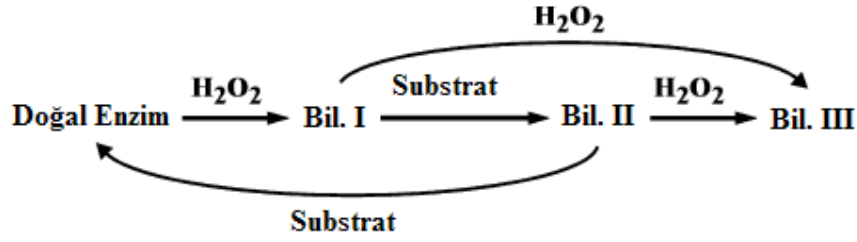


Şekil 2.5 (A) İnsan miyeloperoksidazında ve sığır laktoperoksidazında hem grubunun proteine bağlanması. Miyeloperoksidaz enziminde hem grubu iki ester bağı (Asp94 ve Glu242) ve bir sülfonyum iyon bağı (Met243) ile bağlanmıştır. Ek olarak His95, Arg239, ve Gln91 katalitik amino asit artıkları da gösterilmiştir. (B) (WT) tipi rekombinant miyeloperoksidaz (recMPO), sığır laktoperoksidazı (LPO) ve eozinofil peroksidaz (EPO)'ın elektronik absorpsiyon spektrumları verilmiştir (Zederbauer vd. , 2007).

2.2.2 Miyeloperoksidazın Katalitik Mekanizmaları ve *in vivo* Substratları

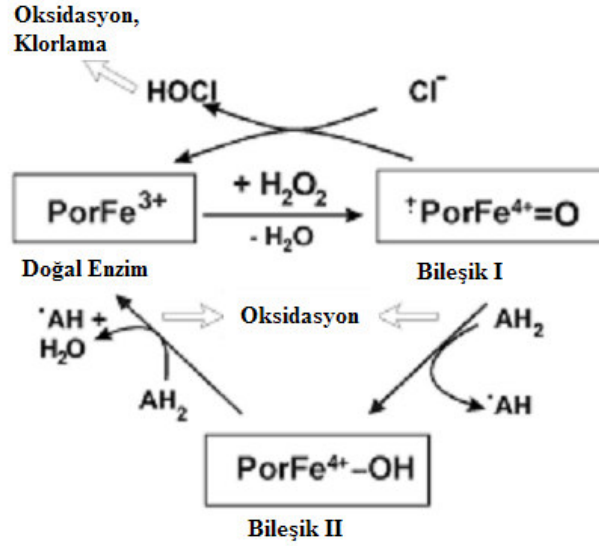
Miyeloperoksidaz, laktoperoksidaz, eozinofil peroksidaz ve tiroid peroksidaz memeliler ailesine aittir. Miyeloperoksidaz için optimum pH 5.5'tir, fakat enzim geniş bir pH aralığında aktif kalmaktadır ve teorik izoelektrik noktası 9.2'dir (Nauseef vd., 1988; Lau ve Baldus, 2006).

Miyeloperoksidazı da içeren peroksidazların katalitik döngüsü aşağıda Şekil 2.6'da verildiği gibi genellikle ardışık üç reaksiyon şeklindedir.



Şekil 2.6 Peroksidazların katalitik döngüsü. Peroksidazlar önce birinci substratları olan H_2O_2 ile reaksiyona girmektedirler ve Bil. I olarak gösterilmiş olan ara ürünü oluşturmaktadırlar. Ortamda aşırı H_2O_2 bulunması durumunda bileşik III (Bil. III) oluşabilmektedir. Bil. I mono-elektronik olarak ikinci bir substratı (organik veya inorganik bir molekül) okside ederek Bil. II olarak adlandırılan ikinci bir ara ürüne indirgenmektedir. Bil. II de bir substrat molekülünü okside edebilir veya H_2O_2 ile reaksiyona girebilir ve Bil. III oluşumuna neden olabilir (Ghibaudi ve Laurenti, 2003).

Tamamlanmış MPO-sistemi olarak adlandırılan sistem, enzim MPO, hidrojen peroksit (H_2O_2), ve okside olabilen kofaktörlerden oluşmaktadır. Temel halde MPO demiri peroksidazlar için esas substrat olan H_2O_2 varlığında yükseltgenen, ferrik formunda bulundurmaktadır. H_2O_2 ile yükseltgenmesi sonrasında MPO, bileşik I (Bil. I) olarak adlandırılan kısa ömürlü bir redoks ara ürününe dönüşmektedir (Lau ve Baldus, 2006). Bileşik I'de hem demiri ferrik (Fe^{4+}) halinde bulunmaktadır ve diğer okside edici eşdeğer ise porfiril radikali formundadır. Bu durumda bileşik I, oksijen atomunun ikili bağ ile demire bağlandığı bir ferrik π -katyon radikal türü ($MPO-Fe(IV)=O^{\cdot+\pi}$) olarak kabul edilebilmektedir (Arnhold, 2004). Bileşik I, halojenler (örneğin Cl^- , Br^- , I^-) ya da SCN^- gibi değişik substratları kolaylıkla yükseltgeyebilmektedir (Şekil 2.7).



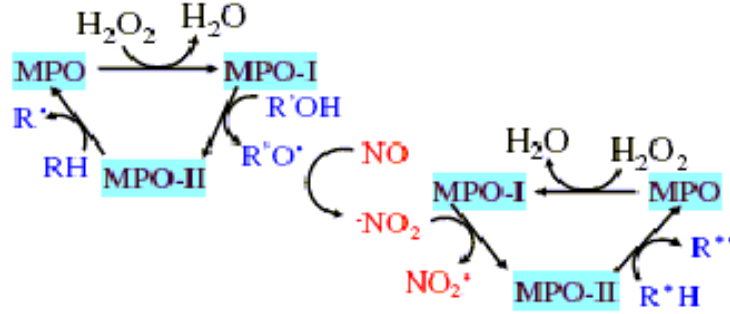
Şekil 2.7 Miyeloperoksidaz'ın peroksidaz döngüsü ve halojenlenmesi. Her iki döngü de doğal enzimi bileşik I'e okside etmek için hidrojen peroksit kullanmaktadır. Burada Por, porfirini göstermektedir. AH_2 ve †AH sırasıyla okside olan substratları ve oluşan radikal ürünleri simgelemektedir. Cl^- yerine diğer halojenler (Br^- , I^-) ve SCN^- de bileşik I tarafından okside edilecektir (Arnhold, 2004).

Plazma gibi fizyolojik sıvılarda klorürün fazla miktarda bulunması (100 – 140 mM), MPO'nun fizyolojik substratının klorür olduğunu düşündürmektedir. Klorürün H_2O_2 varlığında MPO-katalizli ile 2-elektronlu oksidasyonu hipoklorür asidi (HOCl) oluşumu gerçekleşmektedir. HOCl güçlü bir klorürleyici yükseltgendir ve nötrofillerin mikrop ve virüs öldürücü özelliklerinde son derece önemli olduğuna inanılmaktadır.

Halojenlere ek olarak, mieloperoksidazın bileşik I'i iki aşamada birer elektron transferi ile aromatik amino asitler, indol türevleri gibi sayısız organik ve inorganik substratları da oksidlemektedir. Bu oksidasyon esnasında halojenlerle reaksiyona giremeyen ve amino asit merkezli radikalini kaybetmiş olan ferril hem demir molekülü, bileşik II (Bil. II) (MPO-Fe(IV)=O) oluşmaktadır. İkinci adım, bileşik II'nin temel hale indirgendiği adımdır ve tipik peroksidaz döngüsünün hız sınırlayıcı basamağıdır. Bu adım nötrofillerde bol bulunan süperoksid anyon radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ya da askorbik asit gibi fizyolojik indirgeyiciler ile hızlandırılabilir.

MPO-bileşik I için diğer önemli bir substrat da nitrite (NO_2^-) yükseltgenen nitrik oksiddir (NO). Ancak fizyolojik koşullar altında tirozin ya da askorbat gibi yarışmalı indirgeyicilerin konsantrasyonları NO ile kıyaslandığında 10^3 kat daha yüksektir. Bu nedenle de NO 'nun

MPO-bileşik I ve II tarafından direkt oksidasyonu mümkün görünmemektedir. Bunun yerine MPO'nun esas olarak daha sonra NO'yu okside ederek NO_2^- oluşumuna sebep olacak tirozil ya da askorbil radikalleri gibi küçük ara ürünler oluşturduğu düşünülmektedir (Şekil 2.8).



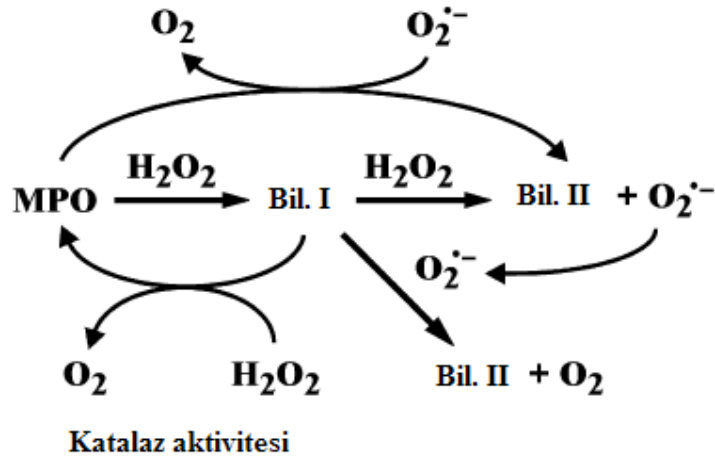
Şekil 2. 8 Esas substratı olan H_2O_2 varlığında MPO-bileşik I ve II NO'yu direkt olarak ya da değişik küçük radikal ara ürünlerin (R , R^1 ya da R^*) oluşumuna bağlı olarak okside etmektedir. NO katabolizmasının son ürünü, nitrit de MPO için bir substrattır ve oksidasyonu sonucunda NO_2^- oluşmaktadır. NO_2^- güçlü bir oksidleyicidir ve serbest ya da proteine bağlı tirozinin nitrasyonuna sebep olabilmektedir (Lau ve Baldus, 2006).

NO_2^- 'nin kendisi de MPO için fizyolojik bir substrattır. NO_2^- biyolojik doku ve sıvılarda 1 – 5 μM seviyelerde bulunmaktadır, ancak enfeksiyon durumunda plazma ve hücre dışı NO_2^- seviyelerinin 200 μM 'ı aştığı belirtilmiştir. MPO ve H_2O_2 varlığında NO_2^- , stabil olmayan bir radikal ve güçlü bir nitratlayıcı tür olan azot dioksit ($\text{NO}_2^\bullet$)'e yükseltgenmektedir. $\text{NO}_2^\bullet$ fizyolojik seviyelerde klorür varlığında bile protein nitratlanmasına ve lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır (Lau ve Baldus, 2006).

2.2.2.1 Bileşik I Oluşumunda Geri Dönüşümlülük (Reversibl olma) ve Katalaz Aktivitesi

Peroksidazlardaki katalaz aktivitesi Bil. I oluşumu reaksiyonun geri dönüşümlülüğü ile sıkı bir şekilde alakalıdır. Uzun bir zamandır bu reaksiyon tam anlamıyla dönüşümsüz olarak dikkate alındığı halde, günümüzde bu ifadeye karşı olan değişik kanıtlar bulunmuştur.

Deneysel bulgulara göre H_2O_2 Bil. I'i iki elektronlu bir reaksiyon ile doğal MPO'ya, ya da bir elektronlu bir reaksiyon ile Bil. II'ye indirgemektedir. İkinci reaksiyon birinci reaksiyona göre iki kat daha yavaştır. Süperoksit, katalaz aktivitesini düzenlemede Bil. II birikimini önleyerek ve ara ürünü doğal formuna indirgeyerek katkıda bulunmaktadır (Ghibaudi ve Laurenti, 2003).



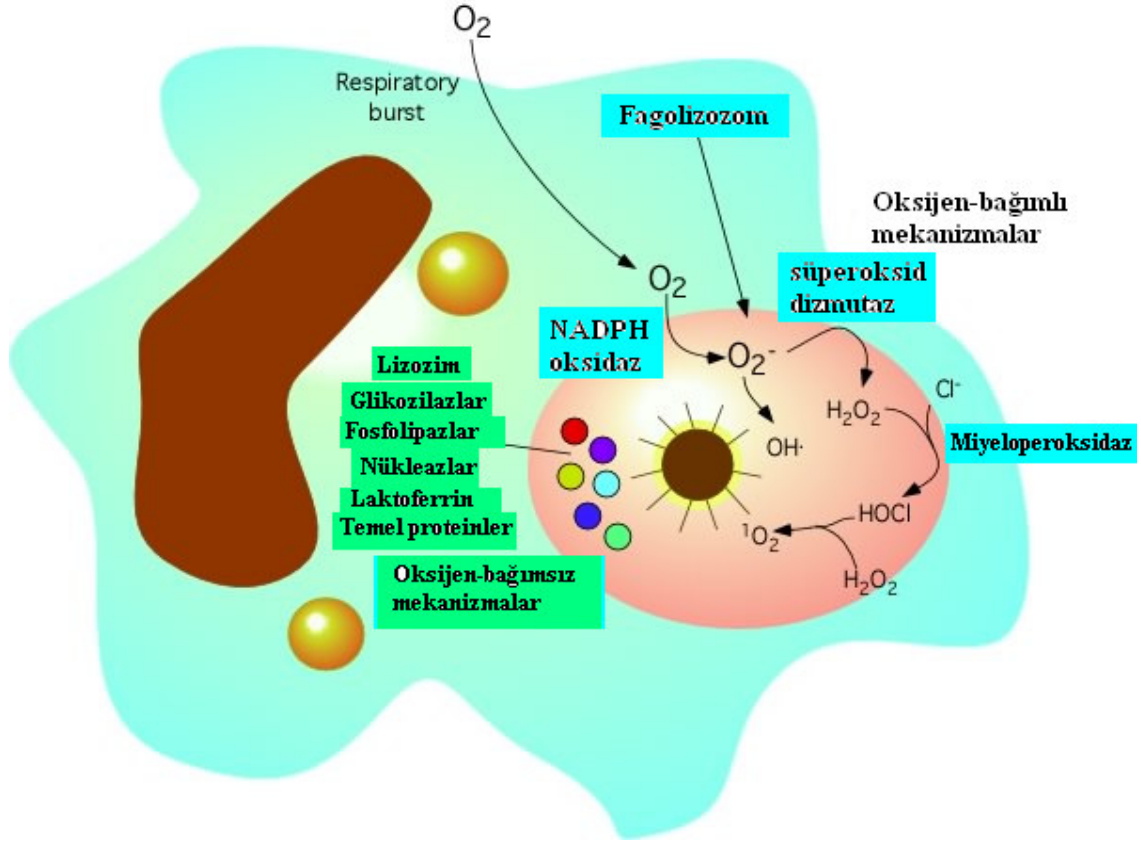
Şekil 2.9 MPO Bil. I oluşumu ve geri dönüşümü (Ghibaudi ve Laurenti,2003).

2.2.3 Miyeloproksidazın Bağışıklık Sistemindeki Yeri

Polimorfonükleer lökositler (PMNs, nötrofiller olarak da adlandırılırlar), enfeksiyona karşı insanlarda, konak bağışıklık savunmasında ilk aktive olan hücre türüdür. Bu hücreler, bakteri ve diğer harici mikroorganizmaları tanıyıp fagosite ettikleri enflamasyon bölgesine göç etmektedirler. Yabancı patojenler, granüller içerisine önceden depolanmış olan hidrolitik enzimler ve bakteri öldürücü proteinlere, ayrıca yeni üretilmiş reaktif oksijen türlerine (ROS) maruz kalmaktadırlar.

PMN'ler, farklı proteinler ve enzimler içeren dört çeşit granül ile donatılmışlardır. Granül içeriği hücrelerin aktivasyonu üzerine, oluşmuş fagozomlara ya da hücre içine yavaş yavaş salınmaktadır. Hücre içi kalsiyumunda yükselme degranülasyonu başlatmaktadır. Salgı keseciklerin ve üçüncül granüllerin içeriğinin salınması için Ca^{2+} seviyesinde orta seviyede ($0.25 \mu\text{M}$) bir artış olması yeterlidir. Bu tür granüller başlıca albümin, jelatinaz (gelatinase), kollajenaz (collagenase), ve diğer proteinleri bulundurmaktadır. Bu proteinler ve enzimler, PMN'lerin sıkıca paketlenmiş doku materyali içerisinden enflamasyon bölgesine ulaşabilmeleride yardımcı olmaktadır.

İkincil ve azurofilik granüllerden içeriğin salınması için hücre içi kalsiyumda daha yüksek bir artış ($0.7 \mu\text{M}$) olması gerekmektedir. Bu enzimler ve proteinlerin çoğu yabancı patojenlere yöneliktir. Burada bakteri duvarı bileşenlerini parçalayan özel enzimler bulunmaktadır.



Şekil 2.10 Fagositlerin öldürme mekanizmaları gösterilmiştir.

PMN'lerin azurofilik granülleri fazla miktarlarda ve benzersiz bir protein içermektedir ki, bu hem içeren enzim miyeloperoksidazdır. NADPH oksidaz ile birlikte miyeloperoksidaz biyolojik materyallerin oksidasyonunda ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunda yer almaktadır. Uyarılmış PMN'lerde NADPH oksidaz moleküler oksijeni süperoksid anyonu radikaline indirgemektedir. Bu tür ve onun dismutasyon ürünü hidrojen peroksid miyeloperoksidazın substratlarıdır (Arnhold, 2004).

2.3 Kanser

2.3.1 Kanser Hücreleri

Kanser hücreleri ve normal hücreler görünüşleri, davranışları ve yaşama süreleri yönünden farklıdır. Doku kültüründe üretilen kanser hücreleri, yaşama ortamı uygun olduğu sürece ölmezler. Diğer taraftan normal hücreler yaklaşık 50 nesil sonra ölmektedirler. Kanser hücrelerinin ölümsüzlüğü ile ilgili en iyi kanıt, Henrietta Lacks isimli bir kadının servikal tümöründen izole edilen ve 1951 yılında kurulan bir kanser hücre hattı olan HeLa

hücrelerinden elde edilmiştir. HeLa hücreleri çok iyi gelişme göstermektedir ve bu sebeple belirtilen hücrelerin kültürleri dünya genelindeki laboratuvarlarda araştırma amacı ile korunmaktadır. Baltimore Marylan’lı Henrietta Lacks, tümör tespit edildiğinde 31 yaşındaydı ve bundan sekiz ay sonra servikal kanser sebebi ile hayatını kaybetti.

Ölümsüzlüğün başarılmasının kötü bir şey olduğunu düşünmek garip bir şey gibi görülebilir. İnsanlarda, eğer bir hücre ölümsüz olursa bütün organizmayı ölümsüz hale getirebileceğine inanma eğilimi vardır. Ancak hayvan vücudu, toplumun iyiliği için düzenli hücre bölünmesi prensibi etrafında tasarlanmıştır. Bir yetişkinin vücudundaki pek çok hücre postmitotiktir, bu da belli bir organ boyutu ve şeklini garantilemektedir. Deri ve kemik iliği hücreleri gibi bazı hücreler bölünebilmektedir ancak bu da sınırlı sayıdadır. Vücutta ölümsüz olan hücreler sadece sperm ve yumurta hücreleridir ki, onlar bile kişi çocuk sahibi olmadığı takdirde öleceklerdir. Kök hücreler de kültür ortamında senelerce bölünebilmektedirler (henüz tam olarak ölümsüz oldukları bilinmemektedir) ve onların medikal tedavilerde kullanılmaları insan ömrünün uzamasını mümkün kılabilir, ancak şimdilik somatik bir hücrenin ölümsüzlük kazanması her zaman soruna yol açabilmektedir.

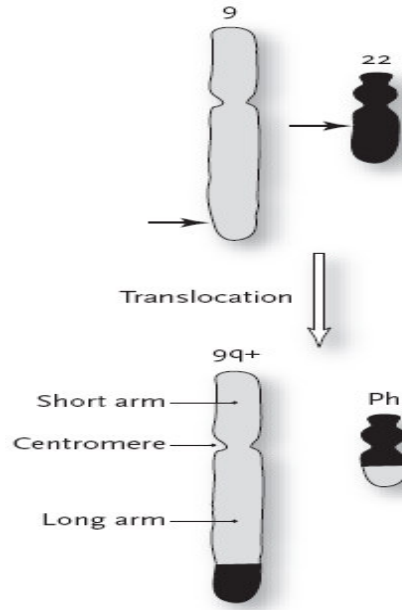
40 yıl boyunca bilim adamları kanser hücrelerinin ölümsüz hale geldiği mekanizmaları anlamaya çalışmışlardır. 1990’larda ilgi, telomer olarak adlandırılan ve kromozomların uçlarında yer alan özel bir DNA sekansına yönelmiştir. DNA her replike olduğunda telomerler küçülmektedir. DNA raplikasyon mekanizmalarını çalışan bilim adamları telomerlerin her bir kromozomun doğru bir şekilde kopyalanmasında hayati bir öneme sahip olduklarına karar vermişlerdir. DNA kopyalanmasındaki hata otomatik olarak hücre döngüsünü sonlandırmaktadır. Normal hücreler eksik telomeraz bulundurmaları sebebiyle sonsuz çoğalma özelliğine sahip değildirler.

2.3.1.1 Kırk Kromozomlar

Ölümsüz hale gelmek bir hücrenin kanserojen olması için gereken pek çok şeyden bir tanesidir. Basit olarak bir hücrenin sayısız bölünmesi bir tümör kütlesi oluşturabilmekte, ancak iyi huylu kaldığı sürece cerrahi yolla alınarak sorun giderilmektedir. Gerçek tehlike bazı kanser hücreleri vücudun başka bölgelerinde koloniler oluşturmak için esas tümörden kaçtıklarında ortaya çıkmaktadır. Metastaz, hücre biyolojisinde pek çok değişikliği gerektiren kompleks bir süreçtir. Bu değişikliklerin kökeninin hücrelerin genlerinde olduğuna ilişkin ilk belirlemeler kanser hücrelerinin histolojik incelemeleri sonucunda ortaya çıkmıştır. Bu

çalışmalar çoğu kanser hücresinin, pek çok kırık kromozomun varlığı ile karakterize edilen anormal bir karyotipe (karyotype) sahip olduklarını göstermiştir.

Philadelphia kromozomu (ilk keşfedildiği şehrin adı verilmiştir), genetik anormallik ve kanser oluşumu arasındaki ilişkiyi gösteren çarpıcı bir örnektir. Bu kromozomal anormallik kromozom 9 ve 22'nin uzun kolları arasında bir translokasyon ile ilgilidir. Bu anormallik kronik miyeloid lösemi ile ilişkilidir ve kanserin bu formuna sahip olan neredeyse bütün hastaların lösemik beyaz kan hücrelerinde görülebilir. Philadelphia kromozomu hücrenin normal gen ekspresyonunu değiştirmektedir ve kansere sebep olabilecek somatik bir mutasyona, ya da genomda değişikliğe örnek oluşturmaktadır.



Şekil 2.11 Philadelphia kromozomu (Ph) kromozom 9 ve 22'nin uzun kolları arasındaki translokasyon ile oluşmaktadır. Kısa oklar fragmentasyon noktalarını işaret etmektedir (Panno, 2005).

2.3.1.2 İletişim Kurmada Başarısızlık

Normal hücreler kültür ortamına yerleştirildiğinde kabın alt tabanını kaplayarak tek bir hücre tabakası oluşturmaya yetecek kadar çoğalırlar. Tek tabaka oluştuğunda ise hücreler temas inhibisyonu (contact inhibition) olarak bilinen bir olaya bağlı olarak büyümeyi keserler. Tek tabakadaki hücreler diğer hücrelerle temas halinde olduklarını bilirler ve bu bilgi, hücrelerin birbiri üzerine yığılmadığından emin olmak amacıyla, çoğalmayı sonlandırma sinyalinin verilmesi için yeterlidir. Kanser hücreleri kültür ortamında temas inhibisyonuna (contact inhibition) uymamaktadırlar. Bunun yerine genellikle büyük hücre kümeleri oluşturarak

büyümeye devam etmektedirler.

Kanser hücrelerindeki temas inhibisyonu başarısızlığı haberleşme başarısızlığıdır ve anormal “glycocalyx”e bağlıdır. Normal hücrelerde “glycocalyx” anten gibi davranan pek çok hücre yüzey glikoproteini içermektedir. Bu antenler başka bir hücrenin “glycocalyx”i ile temas ettiğinde bilgi hücre içerisine, hücreye büyümeyi durdur diyen bir sinyal yolu (pathway) ile iletilmektedir. Kanser hücrelerinde bunların hiçbiri çalışmamaktadır. Antenler ya tamamen yok olmuştur ya da doğru sinyal yoluna bağlı değildirler. Sonuç olarak, kanser hücreleri birbirleri üzerinde büyür ve onların büyümesini sınırlayan tek şey, in vivo ve in vitro olarak, oksijen ve besin varlığıdır. Büyük kümeler halinde yığınlar oluşturdıklarında merkezdeki hücreler bölünmeyi bırakırlar ve belki de besin ve hava istekleri nedeni ile ölebilirler (Panno, 2005).

2.3.1.3 Kanser Hücrelerinin Diğer Dokularda Kontrolsüz Yayılması

Kanser hücrelerinin karakteristiği olan bozuk iletişim kanalları onların kültür ortamında büyürken birbirlerini sıkıştırmasından, ve ayrıca kanser hücrelerinin diğer hücreler için ayrılmış olan dokularda da koloniler oluşturabilmelerinden sorumludurlar. Normal bir kalp hücresi asla beyin ya da karaciğerde koloniler oluşturmaz. Diğer taraftan beyin hücreleri de deri, kemik, ya da başka bir doku türünü istila etmeye çalışmaz.

Eğer normal bir hücre kaza ile bulunduğu organ ya da dokudan başka yabancı bir bölgeye giderse hemen çevresindeki diğer hücrelerden intihar etmesine yol açabilecek sinyaller alacaktır. Hücre intiharına apoptoz denilmektedir ve özel haberleşme yolları tarafından düzenlenmektedir. Kanser hücreleri apoptozu uygulamamaktadırlar. Onlar ya çevrelerindeki hücrelerden gelen sinyalleri yok saymaktadırlar ya da apoptozu düzenleyen yollar çalışmamaktadır. Her iki durumda da ölüm sinyalinin kaybı kanser hücrelerinin her ortamda büyümesine olanak sağlamaktadır.

Bununla birlikte, intihar uygulama emrini yok sayma yeteneği metastas olarak bilinen kompleks sürecin sadece bir parçasıdır. Kanser hücrelerinin başka bir bölgeyi istila etmesi için, tümör kütesinden ayrılmaları, bir kan damarına ulaşana kadar doku veya organ boyunca ilerlemeleri, damar duvarından geçmeleri, dolaşım halindeki kanda taşındıktan sonra da damardan vücudun başka bir tarafında çıkmaları gerekmektedir. Yeni bölgede kolonileşmeye ve tümör oluşturmaya başladıklarında, oksijen ve besin alabilmek için anjiyogenezi, tümör içerisine kan damarlarının büyümesini, aktive etmeleri gerekmektedir. Bu, pek çok sürece bağlı olması sebebi ile başarı olasılığı düşük bir olay gibi görünebilmektedir, ancak kanser

hücreleri bu olayların tamamını düzenleyebilmektedirler ve bunu başardıklarında istedikleri yere gitmekte özgür olmaktadır (Panno, 2005).

2.3.1.4 Tek Bir Mutasyon Yeterli Değildir

Kanser hücreleri genetik mutantlardır ki, bu anormal karyotiplerinden ve iletişim yollarının bozukluklarından açıkça görülebilmektedir. Bu değişiklikler kanser hücreleri için standart bir davranış şablonu oluşturmaktadır. Bunlar;

- Çoğalmayı düzenleyen sinyalleri yok saymaktadırlar.
- Gelişmeleri sırasında var olan sınırlamalara uymazlar.
- Genetik olarak kararsızdırlar.
- Bulundukları dokuyu terk ederler.
- Yabancı dokularda koloniler oluşturmaktadırlar.
- İntihar etmezler, yani ölmezler.

Bu liste, bir kanser hücrelerinin oluşması için birden fazla kusurlu gene ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Kanser hücresi oluşumu için gerekli mutasyon sayısı bilinmemektedir, ancak belki 10 – 20 gen gerekli olmaktadır. Mutasyonlar zamanla, yavaş bir biçimde meydana gelmektedir ve belki de beyin tümörleri, meme kanseri, ve prostat kanserinin yaş ile alakalı olması bundan kaynaklanmaktadır. Bu durum geçtiğimiz 10 yıl boyunca tümör gelişimi üzerine yapılan gözlemlerle uyum göstermektedir. Bu gözlemler vasıtasıyla, biraz anormal olan bir hücrenin daha sonradan metastatik kansere evrimleşecek olan hücreler kolonisi oluşturduğu belirlenmiştir.

Kanserin evrimleşmesinin ardındaki itici güç, bu hücrelerin karakteristiği olan genetik karasızlık gibi gözükmemektedir. Normal hücreler ürünlerinin doğruluğunu, kendi araçlarının çalışmalarını düzenli bir şekilde izleyerek sürekli kontrol etmektedirler. Hücre bölünmesine hazırlanırken DNA çoğalması sırasında regülatörler, izleme sistemi ve tamir enzimleri bu işlem esnasında hata meydana gelmediğinden emin olmak için nöbettedirler. Eğer hata tamir edilemezse hücre ya intiharı gönüllü olarak kabul edecek ya da bağışıklık sistemi tarafından bunu yapmaya zorlanacaktır. Tamir enzimleri ve izleme sistemi kromozomların da doğru bir şekilde ayrılıp ayrılmadığını kontrol etmektedir. Eğer ayrılma anormal ise, yeni oluşmakta olan hücrelerden bir tanesi daha fazla kromozom ile sonlanırken, diğeri daha az kromozoma sahip olacaktır. Böyle bir şey olduğunda apoptoz izleme sistemi tarafından aktivasyon gerçekleştirilmektedir ve böylece her iki hücre de intiharı kabul etmektedir.

Kanser hücreleri kalite kontrolünü hor görür gibi davranmaktadırlar. DNA sentezi esnasında

bir hata meydana gelirse bu hatayı onarmamaktadırlar. Eğer kromozomlar doğru bir şekilde ayrılmazlar ya da anormal bir karyotip geliştirirlerse, oluşan iki yeni hücre intiharı kabul etmemektedirler. Bu yolla, anormal hücre hattı habis hale gelene kadar ya da bağışıklık sistemi tarafından yok edilene kadar pek çok genetik anormalliği biriktirmektedir. Garip bir şekilde kanser hücreleri, genetik çeşitliliğin en üst seviyede olduğu bir durum oluşturmaya çalışmaktadırlar, bu da evrim geçirdikleri oranda bir artış meydana gelmesi ile sonuçlanmaktadır (Panno, 2005).

2.3.2 Lösemi

Çocukluk çağındaki kanser vakalarının %35'ini lösemiler oluşturmaktadır ve birinci sırada yer almaktadır. Türkiye'de her yıl 16 yaşın altında 1200-1500 yeni lösemili çocuk vakası bildirilmektedir [2]. Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl yaklaşık olarak 32000 yetişkin ve 2000 çocuk lösemi (beyaz kan hücreleri kanseri) olduğunu öğrenmektedir (Panno, 2005).

2.3.2.1 Anatomi

Üç değişik tür kan hücresi vardır; kırmızı kan hücreleri (RBC, ya da eritrositler), beyaz kan hücreleri (WBC, ya da lökositler), ve trombositler. Kırmızı kan hücreleri hemoglobin içermektedirler ve onu akciğerden dokulara oksijen taşımak için kullanmaktadırlar. Beyaz kan hücreleri oksijen taşımazlar, vücudun bağışıklık sisteminin bir parçasıdır. Beyaz kan hücreleri ya lenfosit, zamanlarının çoğunu lenfotik sistemde geçirirler ya da miyeloid hücrelerdir ve bunlar da zamanlarının çoğunu kemik iliğinde ya da genel dolaşımda geçirirler. Trombositler tamamlanmış hücreler değildir, belli türlerdeki lenfositlerin oluşturanlarıdır ve kanın pıhtılaşmasında görev almaktadırlar.

Lösemi sadece beyaz kan hücrelerini etkilemektedir, lenfoid hücrelerde (lenfosit lösemi) ve miyeloid hücrelerde (miyeloid lösemi) de ortaya çıkabilmektedir (Panno, 2005). Lösemiler beyaz dizi hücrelerinin (öncü hücrelerin ya da daha olgun hücrelerin) mutasyona uğrayarak habisleşmesi ve kontrol dışı çoğalmaları sonucu meydana gelmektedirler (Berkarda, 2003). Hastalığın akut ve kronik lösemi olmak üzere iki formu vardır. Akut lösemi çok hızlı gelişen, hastanın bağışıklık sistemini yıkan, harap edici bir hastalıktır. Kronik lösemi çok daha yavaş gelişmektedir, ve lökositler dönüşüm geçirdiği halde bazı normal fonksiyonlarını korumaktadırlar. Bu sebeple de bağışıklık sistemi hızlı bir şekilde ya da tamamen yıkılmamaktadır (Panno, 2005).

2.3.2.2 Risk Faktörleri

Ana risk faktörü hastanın yaşıdır. Akut lenfositik lösemi çocuklarda, 65 yaş ve üzeri yetişkinlerde en çok görülen lösemi türüdür. Akut miyeloid lösemi yetişkinlerde ve çocuklarda ortaya çıkmaktadır. Kronik lenfositik lösemi çoğunlukla 55 yaş üzeri yetişkinleri etkilemektedir. Bazen daha genç yetişkinlerde de ortaya çıkmaktadır ancak çocuklarda çok nadir görülmektedir. Kronik miyeloid lösemi genellikle yetişkinlerde görülmektedir. Çok az çocukta löseminin bu türü gelişmiştir (Panno, 2005).

2.3.2.3 Semptomlar

Lösemide ateş, titreme ve diğer grip benzeri semptomlar; zayıflık ve halsizlik; sık enfeksiyonlar; iştah ya da kilo kaybı; şişmiş ya da duyarlı lenf düğümleri, şişmiş veya duyarlı karaciğer ya da dalak; kolay kanama ya da çürüme; deri altında küçük kırmızı lekeler; özellikle geceleri terleme; ve kemik ya da eklem ağrıları görülmektedir. Beyine metastas yapması durumunda baş ağrılarına, kusmaya, kafa karışıklığı, kas kontrolü kaybına ve nöbetlere sebep olmaktadır. Lösemi hücreleri ağrı ve şişmeye sebep olarak testislerde, deri ve gözlerde, vücudun diğer pek çok doku ve organlarında da koloni oluşturabilmektedir (Panno, 2005).

2.3.2.4 Teşhis

Hasta karaciğer, dalak, koltukaltları, boynundaki ve kasıklarındaki lenf düğümlerinde şişme yönünden incelenmektedir. Kan örneği mikroskop altında, anormal beyaz kan hücreleri aramak için değerlendirilmektedir. En kesin test kemik iliği biyopsisinin mikroskopik incelenmesidir (Panno, 2005).

2.3.3 Kanser Tedavileri

Kanser hücrelerinin çok yönlülüğü, adapte olabilme yeteneği ve aşırı akıllılığı bilim adamlarının bu hastalığı kontrol altına alabilmek ya da tamamen yok edebilmek için bir yöntem geliştirmesini çok zorlaştırmaktadır. Bütün kanser tedavileri, normal hücrelere zarar vermemek için, kanser hücrelerine has olan özellikleri hedeflemeye çalışmaktadırlar. Bunlar, mutasyona uğratılmış bir protein, hücre bölünmesi oranındaki artış ya da kanser hücrelerinin yüksek metabolik aktivitelerini desteklemek için oksijen talebindeki artış gibi kanser hücrelerine has olan davranış şekilleri olabilir (Panno, 2005). Kanser tedavisinde aşağıda verilen yöntemler kullanılmaktadır.

- Anjiyogenez Engelleyiciler

- Biyoterapiler
- Kemik İliği Transplantasyonu
- Kemoterapi
- Kriyocerrahi
- Gen Terapisi
- Lazer Terapi
- Fotodinamik Terapi
- Radyoterapi
- Kök Hücre Terapisi

2.3.3.1 Kemoterapi

Kemoterapi kanserin ilaç ile tedavisidir. İnsanlar kanseri yokedecek bir ilaç beklemektedirler. Fakat kemoterapistler, tüm kanserleri yok edecek bir ilaçtan umutlarını kesmişlerdir. Bunun nedeni kanserin heterojen bir hastalıklar grubu oluşudur (Alican, 1993).

2.3.3.2 Kemoterapinin Kanser Hücrelerine Etkileri

Kanser kemoterapisinde kullanılan sitotoksik (hücre öldürücü) ilaçların birçoğu DNA ya da RNA üzerine etkiyle protein sentezini bozmaktadır. Bunlar kanser hücrelerine de normal hücrelere de aynı etkiyi yapmaktadırlar. Kanser hücrelerinin daha fazla etkilenmelerinin nedeni normal dokulardan daha hızlı çoğalmalarıdır. Kemik iliği, gastrointestinal sistem mukozası ve saç follikülleri gibi hızlı çoğalan normal dokuların hücreleri de zarar görmektedir ancak bunlar kanser hücrelerinden daha çabuk toparlanabilmektedirler.

Bir kanser yaygınlaştığında, vücutta yaklaşık olarak bir trilyon kanser hücresi bulunmaktadır. Hastanın kurtulması için bunların hepsinin ölmesi gerekmektedir. Bu yapılamaz da, sadece sayıları azaltılırsa, palyasyon sağlanmış olur; sayıları ne kadar azaltılırsa hastanın yaşamı da o kadar uzar.

Bir sitotoksik ilaç verildiği zaman tümörün büyüklüğü, içindeki hücrelerin sayısı ne olursa olsun, bu hücre popülasyonunun ancak belirli bir yüzdesini öldürmektedir. Bir kemoterapi kürü yapıldığında kanser hücrelerinin belirli bir yüzdesini öldürdüğünü varsayalım. Bir süre sonra aynı ilaçla yapılan kemoterapi yine aynı yüzdeyi öldürecektir; fakat bu sefer ölen

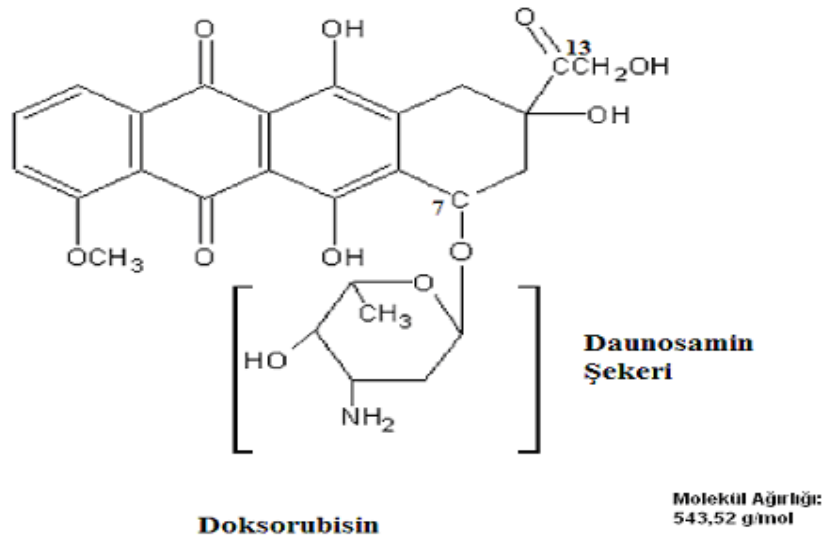
hücrelerin sayısı çok daha az olacaktır.

Çeşitli sitotoksik ilaçlar kanser hücrelerinin çoğalma döngülerinin farklı fazlarında etki yapmaktadırlar. Bununla birlikte, bir kanser kitlesindeki hücrelerin hepsinin çoğalma siklusları de senkronize değildir. Bundan dolayı bir ilacın belirli aralıklarla verilmesi uygundur, çünkü bir verilişinde yakalayamadığı hücreleri öteki verilişinde yakalayabilmektedir. Birkaç ilacın birlikte kullanılması da akla yatkındır. Böylece hem toksisite azalmaktadır hem de hücre çoğalma siklusu daha fazla etkilenebilmektedir. Her bir ilacın dozu tek başına verildiğindeki dozdan az olabilir.

Birlikte kullanılacak ilaçların sözkonusu tümöre karşı aktif olması, hepsinin etki mekanizmalarının farklı olması, toksisite spektrumlarının da farklı olması gerekmektedir. Bu şekilde tümör hücrelerinin direnç kazanması önlenabilir. Genellikle birkaç haftalık aralıklarla birkaç gün ilaç verilmektedir ki böyle aralıklı olarak bir iki yıl süren tedaviler, normal dokuların toparlanması için de uygundur (Alican, 1993).

2.3.3.3 Doksorubisin

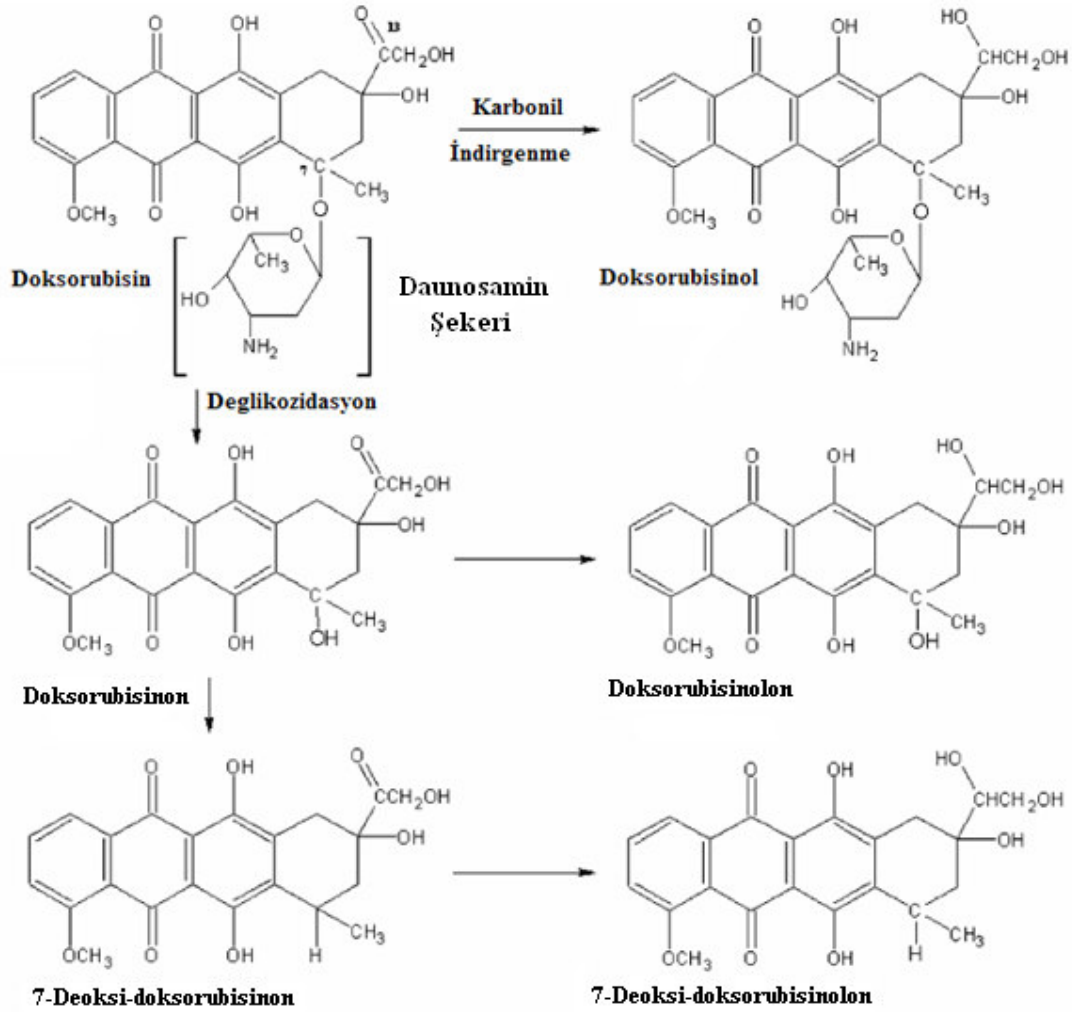
Doksorubisin esas olarak *Streptomyces peucetius*'un *caesius* türü tarafından üretilen bir glikozid antrasiklin antibiyotikidir (Liu vd. , 2007). Doksorubisin, 7. karbon atomundan *O*-glikozidik bağ ile daunosamin (daunosamine) şekerine bağlanmış bir aglikon (aglycone) iskeletten oluşmaktadır (Şekil 4.1).



Şekil 2.12 Doksorubisinin açık formülü.

Doksorubisinin enzim-kaynaklı indirgenme ve deglikozidasyonu yapısal olarak benzerdir, birkaç hidroksillenmiş ve aglikon metabolitin oluşması ile sonuçlanmaktadır (Şekil 4.2). Ana metabolit doksorubisinol, sitozolik karbonil redüktaz enzimi vasıtası ile C-13 pozisyonunda bulunan karbonil kısmının NADPH-bağımlı aldo-keto redüksiyonu sonucu meydana gelmektedir. C-7 pozisyonundaki daunosamin şekerinin deglikozidasyonu doksorubisinon ve doksorubisinolon oluşturmaktadır. Oluşan hidroksil grubu 7-deksidoksorubisinon ya da 7-deksidoksorubisinolon haline metabolize olabilmektedir.

Doksorubisin metabolitlerinin biyolojik aktiviteleri ve toksisiteleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Doksorubisinol Doksorubisinden daha az aktif olmakla birlikte klinik olarak önemlidir. Doksorubisinol ve benzer metabolitler reaktif serbest radikallerin oluşumunu arttırabilmekte ve belki de doz-sınırlayıcı kardiotoksositeye katkıda bulunmaktadır (Arnold vd. , 2004).

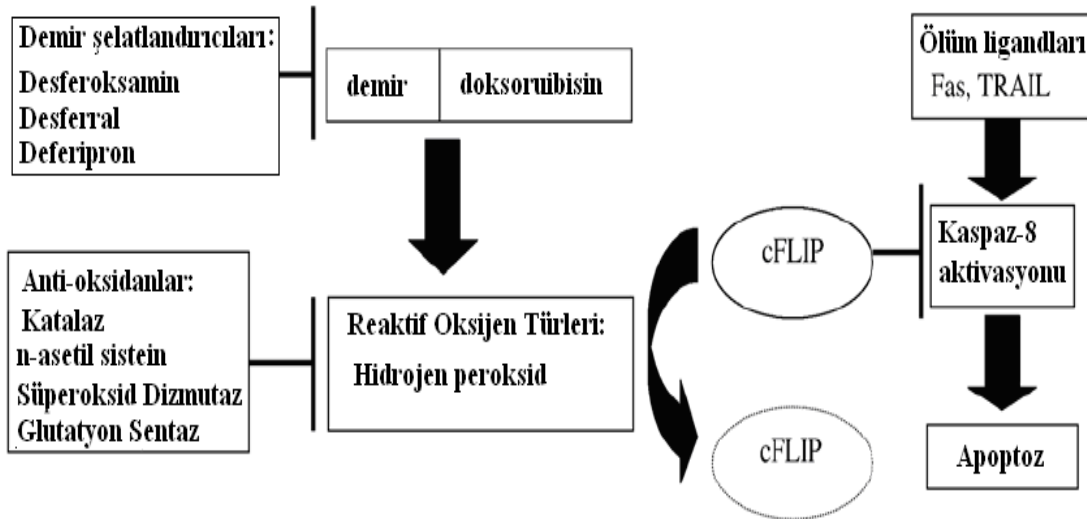


Şekil 2.13 Doksorubisinin metabolitleri.

Doksorubisin onlarca yıldır kemoterapide yer almıştır (White vd. , 2007). Bu ilaç akut lösemi, meme kanseri, akciğer kanseri ve sarkomları da içeren geniş bir aralıkta anti-tümör aktivitesi göstermektedir. Kullanılmakta olan anti-kanser ajanlarının en önemlilerinden biridir (Liu vd. , 2007). Doksorubisin tedavisi gören kanser hastalarında, saç dökülmesi, anemi, mide bulantısı, azalmış bağışıklık, ve genel yorgunluk gibi pek çok yan etki görülebilmektedir. Ağır vakalarda, Doksorubisin yan etkisi kardiyak toksisiteyi de kapsayabilmektedir (White vd. , 2007). Doksorubisin-kaynaklı kardiyotoksikite için varsayılan temel mekanizma, ilacın hücre içi metabolizması boyunca serbest radikal üretmesi şeklindedir. Serbest radikaller, kalp dokusundaki kritik hücresel komponentlerde ve membranlarda değişik oksidatif hasarlara neden olmaktadır. Kalp oksidatif strese çok duyarlı bir dokudur. Çünkü kendisinin yüksek oranda oksidatif bir metabolizması vardır ve karaciğer gibi diğer dokular ile kıyaslandığında

çok düşük bir antioksidan savunması bulunmaktadır (Choi vd. , 2007).

Doksozobisinin etki mekanizması DNA hasarına, topoizomeraz inhibisyonuna, demire bağlanarak serbest radikal oluşmasına sebep olma şeklindedir. Doksozobisinin DNA hasarı oluşturmaması, ilacın iyileştirici ve zararlı etkilerinin yaygın olarak kabul edilen açıklaması olduğu halde son zamanlarda pek çok grup serbest radikal hipotezini tekrar gündeme getirmiştir. Doksozobisin vücuda verildiğinde selüler demire bağlanmaktadır ve hidrojen peroksidi de içeren serbest radikaller oluşturmaktadır. Bu serbest radikallerin antiapoptotik protein cFLIP'i doğrudan bozundurduğuna (degrade ettiğine) ve bu sebeple de tedavi edilmiş hücrelerin apoptoza karşı daha savunmasız hale geldiklerine inanılmaktadır (White vd. , 2007).



Şekil 2.14 Ölüm-ligandı kaynaklı apoptoza karşı Doksozobisinin sebep olduğu duyarlılaşma açıklaması. Reaktif oksijen türlerinin üretilmesi Doksozobisinin demir ile etkileşimi sonucu meydana gelmektedir ve bu etki demir çelatörleri ya da antioksidanlar tarafından düzeltilebilmektedir. Reaktif oksijen türleri, apoptotik yoldaki kaspaz-8 inhibitörü olan cFLIP'in ekspresiyon seviyelerini negatif olarak etkilemektedir. Azalmış cFLIP ekspresiyonu hücrelerin ölüm-ligandı kaynaklı apoptoza karşı savunmasız hale gelmesine sebep olmaktadır (White vd. , 2007).

Doksozobisin (DOX) uzun zamandan beri mutajen ve kanserojen olarak tanımlanmıştır. Doksozobisinin tümör hücreleri için sitotoksitesi belki de ilacın, DNA-DOX-topoizomeraz II ayrılabilir komplekslerinin oluşumunu da içeren mutajenik potansiyeli ve DNA helikazların Doksozobisin kaynaklı inhibisyonları ile ilgilidir. Doksozobisin ayrıca, moleküler oksijen ve geçiş metalleri özellikle de demir varlığında reaktif oksijen türlerinin oluşumuna sebep olan flavin dehidrogenazların yükseltgenme ve indirgenme döngülerinin de hedefidir, veya bu

döngülerine de maruz kalmaktadır. Reaktif oksijen türleri (süperoksit anyonu, $O_2^{\cdot-}$, hidrojen peroksit, H_2O_2 , hidroksil radikali, $\cdot OH$) normal selüler metabolizma tarafından yan ürün olarak oluşturulmaktadır, bununla birlikte Doksorubisine maruz bırakma intraselüler reaktif oksijen oluşumunu çok fazla arttırabilmektedir.

Reaktif oksijen türleri nükleer ve mitokondriyal DNA'ya zarar verebilmektedir. Hidroksil radikalleri DNA bazlarından veya şekerlerinden bir hidrojen çıkartabilir ya da DNA bazlarının ikili bağlarına katılabilir. Bu şekilde oluşmuş kararsız ara ürünler, ardışık moleküler transformasyonlar sonucunda kararlı modifiye DNA bazları oluşturabilmektedirler. Hidroksil radikalının saldırısı sonucu oluşmuş DNA baz radikalleri kovalent DNA-protein çapraz bağları oluşturmak için komşu proteinlerin amino asidleri ile reaksiyona girebilmektedir. Benzer DNA hasarlarının etkili ve doğru tamiri, kanser oluşumunu başlatabilecek mutasyonların oluşumunun engellenmesinde çok önemlidir. Habis olmayan dokular reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu DNA hasarlarını sınırlandırmak amacı ile antioksidan moleküller, reaktif oksijen türleri katalitik enzimleri, ve DNA tamir enzimlerinin oluşturduğu geniş bir sistemden yararlanmaktadırlar (Gajewski vd. , 2007).

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

3.1 Materyaller

3.1.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

- Precisa BJ 6100D, Kaba terazi
- Precisa XB 220A, Hassas terazi
- Millipore F4SN77678, Saf su cihazı
- Heidolph MR 3001, Manyetik karıştırıcı
- Inolab, pH metre cihazı
- JASCO V-530, UV-Visible Spektrofotometre
- UV-1700 PharmaSpec, UV-Visible Spektrofotometre
- Millipore Stirred Ultrafiltration Cell Model 8010, Ultrafiltrasyon Sistemi
- GFL 1086, Çalkalamalı su banyosu
- Telstar Cryodos, Liyofilizatör
- Shimadzu Program Class VP, HPLC sistemi
- Shimadzu Marka LC-MS Sistemini
- Perkin Elmer, FTIR
- Perkin Elmer, Universal ATR Sampling Accessory
- Soğutmalı Santrifüj

Kullanılan malzemeler:

- Otomatik pipet: Finn timer 0–50 µl, 100–1000 µl
- Beher: 50ml, 100 ml, 500 ml, 1 L
- Deney tüpleri
- Eppendorf kapaklı tüp (2 ml)

3.1.1.1 Kullanılan HPLC Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

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

3.1.1.2 Kullanılan UV-Vis (UV-1700 PharmaSpec) Spektrofotometresinin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

Optik Sistem	: Filtre
Detektör	: Fotodiod dedektör
Işık kaynağı	: Deuterium (D2) lamba : 190-350 nm Halojen lamba : 390-1100 nm

3.1.1.3 Kullanılan UV-Vis (JASCO) Spektrofotometrenin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

Optik Sistem	: Monokromatör
Dedektör	: Silikon fotodiod (S1337)
Işık kaynağı	: Döteryum lamba: 190–390 nm Halojen lamba: 390–1100 nm.

3.1.1.4 Kullanılan SHIMADZU Marka LC-MS Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

Kolon	: C18 N43296 kolon
Akış hızı	: 0,2ml/dak
Boyut	: 5 µm 20 cm x 0,21 cm
Mobil faz	: Asetonitril/Su: %10/90- %70/30-%30/70
Kolon sıcaklığı	: 25 °C
Detektör	: UV254 nm
Dalga boyu	: 254 nm

3.1.1.5 Kullanılan Thermo IEC Marka Soğutmalı Santrifüjün Teçhizat ve Çalışma Parametreleri

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

3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çizelge 3.1 Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerin listesi.

Kimyasal Maddeler	Üretici Firma	Lot No.
NH_4Cl	Horasan Kimya	17088
NaHCO_3	Fluka	71627
EDTA	Fluka	03699
TritonX-100	Fluka	93443
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Riedel-de Haen	04269
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Fluka	71647
NaCl	Fluka	71376
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Carlo Erba Reagenti	420777
CH_3COOH	Riedel-de Haen	27225
CaCl_2	Riedel-de Haen	12095
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Applchem	A1036.1000
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Riedel-de Haen	31422
NaOH	Riedel-de Haen	06203
HCl	Merck	1.00314.2500
H_2O_2	Fluka	95321
o-Dianisidin	Fluka	33430
H_2SO_4	Merck	K31996213315
Polietir Sülfon Ultrafiltrasyon Membranı NMWL:10000	Millipore	PBGC02510
Doksorubisin hidroklorür	Sigma	D1515
5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit	Fluka	41568

3.2 Miyeloperoksidazın Kan Örneklerinden İzolasyonu

3.2.1 Kullanılan Çözeltiler

- 1) 10 mM PBS (pH 7; pH 7.2 olan tampon çözeltiler hazırlandı)
- 2) % 0.2 (v/v) Triton X-100 Çözeltisi
- 3) 75 mM Amonyum Klorür Liziz Çözeltisi

3.2.2 Miyeloperoksidazın Kan Örneklerinden İzolasyonu İçin Uygulanan İşlem

Miyeloperoksidaz enzimini izole etmek üzere EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri kullanıldı. Otomatik pipet ile Ependorf tüplerine aktarılan 50 µl kan örneği üzerine 2000 µl amonyum klorür liziz çözeltisi (75 mM NH₄Cl + 10 mM NaHCO₃ + 10 mM EDTA, pH 7.3) eklendi. 10 dakika bekleme süresi sonrasında ependorf tüpleri 5 dakika süreyle santrifüj (550×g, 10°C) edildi. Süpernatant atıldı, kalıntının üzerine 1000 µl yıkama çözeltisi (10 mM PBS, pH 7.2) ilave edildi ve tekrar 5 dakika süreyle aynı koşullarda santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra elde edilen pellete 50 µl (0.2 %) Triton X-100 eklendi. 5 dakika bekleme süresi sonunda 250 µl PBS (10 mM, pH 7) eklendi ve 5 dakika süreyle santrifüj (850×g, 10°C) uygulandı. Süpernatant otomatik pipet ile ependorflar içerisinden bir behere alındı. Bu işlem toplam kan örneğini değerlendirmek üzere tekrarlandı (Kuzu-Karsilayan vd., 2002). Sonuçta yaklaşık olarak 32 ml örnek, hücre ekstraktı elde edildi, spektrumu alındıktan (Şekil 6.1) sonra amonyum sülfat çöktürmesi işlemi uygulandı.

3.3 Amonyum Sülfat ile Çöktürme

Hücre ektratlarında istenmeyen proteinleri gidermek amacıyla %100 Amonyum sülfat ile çöktürme yapıldı. Çöktürme işlemi için gerekli amonyum sülfat miktarı aşağıdaki gibi hesaplandı;

$$V_{\text{örnek}} \times 0.697g = \% 100 \text{ doygunluk için gerekli amonyum sülfat miktarı (Cutler, 2004)}$$

$$V_{\text{örnek}} = 32 \text{ ml}$$

$$32 \times 0.697g = 22.304g \text{ amonyum sülfat}$$

Yukarıda hesaplanan miktarda amonyum sülfat tartıldı ve +4°C'de, manyetik karıştırıcı ile 100 rpm'de karıştırılan protein ekstraktına yavaş yavaş eklendi. Tartılan miktarın tamamı çözüldükten sonra manyetik karıştırıcı kapatıldı ve 1 saat bekletildi. Bekleme süresi

sonrasında beherde bulunan protein ekstraktı ependorflara aktarıldı ve santrifüj edildi (10000×g, 20 dakika, +4°C). Süpernatant ayrıldı. Toplanan süpernatantlardan bir havuz elde edildi ve değerlendirilmek üzere absorbands spektrumu alındı (Şekil 6.1).

3.4 Miyeloperoksidaz Enziminin Konsantre Edilmesi ve Yıkaması

Amonyum sülfat ile çöktürme işleminden sonra elde edilen havuz ultrafiltrasyon sistemi kullanılarak konsantre edildi. Konsantre örnek asetat tamponu (pH 5.6) ile 5 defa ve devamında PBS (pH 7.3) ile 2 defa yıkandı. Yapılan her yıkamada membrandan geçen kısmın ve üstte kalan kısmın spektrumları alındı, 430 ve 280 nm'deki absorbandsları kaydedildi, RZ değerleri hesaplandı (Çizelge 6.1).

3.5 Miyeloperoksidaz Enziminin Aktivitesinin Tayini

3.5.1 Kullanılan Çözeltiler

- 1) 10 mM PBS (pH 7.3)
- 2) 5 mM o-Dianisidine Çözeltisi
- 3) %3 (v/v) Hidrojen Peroksit Çözeltisi
- 4) 4N H₂SO₄ Çözeltisi
- 5) 0.23 mg/ml Miyeloperoksidaz Çözeltisi

3.5.2 Deneyin Yapılışı

Aktivite tayini (37°C) sabit sıcaklıkta, çalkalamalı su banyosunda ve her defasında üç örnek ile çalışılarak gerçekleştirildi. Her bir deney tüpü içerisine;

- 1) PBS (pH 7.3)'den 805 µl,
- 2) Miyeloperoksidaz çözeltisinden 100 µl,
- 3) O-Dianisidine çözeltisinden 10 µl,
- 4) Hidrojen peroksit çözeltisinden 10 µl (başlatıcı)

eklendi. Hidrojen peroksidin ilavesinden tam 10 dakika sonra,

- 5) Sülfürik asit çözeltisinden 75 µl eklendi ve reaksiyon durduruldu.

Tüplerin 400 nm'de absorbandsları okundu.

3.6 UV-Vis Spektrofotometre ile Miyeloperoksidazın Doksorubisine Olan Etkisinin İncelenmesi

3.6.1 Kullanılan Çözeltiler

- 1) 10 mM, PBS (pH 7.3)
- 2) 0.08 mM Doksorubisin Çözeltisi (pH 7.2)
- 3) 0.23 mg/ml Miyeloperoksidaz Çözeltisi
- 4) %3 (v/v) Hidrojen Peroksit Çözeltisi

3.6.2 Deneyin Yapılışı

- 1) 750 µl Doksorubisin çözeltisi
- 2) 226 µl Miyeloperoksidaz Çözeltisi
- 3) 14 µl PBS

Yukarıda belirtilen çözeltiler belirtilen miktarlarda, sırasıyla kuvartz UV-Vis. Spektrofotometre küvetine alındı, küvetin ağzı kapatılarak karıştırıldı.

- 4) 10 µl Hidrojen Peroksit Çözeltisi (Reaksiyon Başlatıcı)

eklendi, aynı anda kronometre çalıştırıldı, küvetin ağzı kapatıldı ve karıştırıldı, hemen ardından cihaza yerleştirildi ve ölçüm (spektrum) alındı. Ölçümler, ilk 30 dakika boyunca 2 dakikada bir, daha sonra ise 10 dakikada bir olmak üzere 120 dakika boyunca alındı ve spektrumları kaydedildi. Bu ölçümlerin tamamı 37°C’de gerçekleştirildi.

3.7 UV-Vis Spektrofotometre ile Serbest Radikal Yakalayıcı (5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit) Varlığında Miyeloperoksidazın Doksorubisine Olan Etkisinin İncelenmesi

3.7.1 Kullanılan Çözeltiler

- 1) 10 mM, PBS (pH 7.3)
- 2) 0.08 mM Doksorubisin Çözeltisi (pH 7.2)
- 3) 0.23 mg/ml Miyeloperoksidaz Çözeltisi
- 4) %3 (v/v) Hidrojen Peroksit Çözeltisi
- 5) 10 mM Serbest Radikal Yakalayıcı (5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit) Çözeltisi

3.7.2 Deneyin Yapılışı

- 1) 750 µl Doksorubisin Çözeltisi
- 2) 203 µl Miyeloperoksidaz Çözeltisi
- 3) 27 µl PBS
- 4) 10 µl Serbest Radikal Yakalayıcı (5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit) Çözeltisi

Yukarıda belirtilen çözeltiler belirtilen miktarlarda UV-Vis Spektrofotometre küvetine alındı, küvetin ağzı kapatılarak karıştırıldı.

- 5) 10 µl Hidrojen Peroksit (Reaksiyon Başlatıcı) Çözeltisi

eklendi, aynı anda kronometre çalıştırıldı, küvetin ağzı kapatıldı ve karıştırıldı, hemen ardından cihaza yerleştirildi ve ölçüm (spektrum) alındı. Ölçümler, ilk 30 dakika boyunca 2 dakikada bir, daha sonra ise 10 dakikada bir olmak üzere 120 dakika boyunca alındı ve spektrumları kaydedildi. Bu ölçümlerin tamamı 37°C'de gerçekleştirildi.

3.8 FT-IR Spektrometresi ile Miyeloperoksidazın Doksorubisine Olan Etkisinin İncelenmesi

3.8.1 Kullanılan Çözeltiler

- 1) 10 mM, PBS (pH 7.3)
- 2) 0.08 mM Doksorubisin Çözeltisi (pH 7.2)
- 3) 0.52 mg/ml Miyeloperoksidaz Çözeltisi
- 4) %3 (v/v) Hidrojen Peroksit Çözeltisi

3.8.2 Deneyin Yapılışı

- 1) 750 µl Doksorubisin çözeltisi
- 2) 160 µl Miyeloperoksidaz Çözeltisi
- 3) 80 µl PBS

Yukarıda belirtilen çözeltilerden belirtilen miktarlarda 3 ayrı cam deney tüpüne alındı ve bu tüpler 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosuna yerleştirildi.

- 4) 10 µl Hidrojen Peroksit (Reaksiyon Başlatıcı) Çözeltisi

eklendi ve aynı anda kronometre çalıştırıldı. Tüplerden bir tanesi hemen banyodan alındı ve donduruldu (0. dk örneği). Diğer tüpler de sırasıyla 60 dk ve 120 dk sonra su banyosundan alındı ve donduruldu. Bu örnekler daha sonra liyofilizatörde kurutuldu ve FT-IR spektrumları alındı.

3.9 FT-IR Spektrometresi ile Serbest Radikal Yakalayıcı (5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit) Varlığında Miyeloperoksidazın Doksorubisine Olan Etkisinin İncelenmesi

3.9.1 Kullanılan Çözeltiler

- 1) 10 mM, PBS (pH 7.3)
- 2) 0.08 mM Doksorubisin Çözeltisi (pH 7.2)
- 3) 0.52 mg/ml Miyeloperoksidaz Çözeltisi
- 4) %3 (v/v) Hidrojen Peroksit Çözeltisi
- 5) 10 mM Serbest Radikal Yakalayıcı (5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit) Çözeltisi

3.9.2 Deneyin Yapılışı

- 1) 750 µl Doksorubisin çözeltisi
- 2) 160 µl Miyeloperoksidaz Çözeltisi
- 3) 70 µl PBS
- 4) 10 µl Serbest Radikal Yakalayıcı (5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit) Çözeltisi

Yukarıda belirtilen çözeltilerden belirtilen miktarlarda 3 ayrı cam deney tüpüne alındı ve bu tüpler 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosuna yerleştirildi.

- 5) 10 Hidrojen Peroksit (Reaksiyon Başlatıcı) Çözeltisi

eklendi ve aynı anda kronometre çalıştırıldı. Tüplerden bir tanesi hemen banyodan alındı ve donduruldu (0. dk örneği). Diğer tüpler de sırasıyla 60 dk ve 120 dk sonra su banyosundan alındı ve donduruldu. Bu örnekler daha sonra liyofilizatörde kurutuldu ve FT-IR spektrumları alındı.

3.10 LC-ESI-MS Spektrometresi ile Miyeloperoksidazın Doksorubisine Olan Etkisinin İncelenmesi

LC-MS sistemi ile gerçekleştirilen deneylerde kullanılan mobil faz gradyen (%10/%90-%70/%30-%70/%30) oluşturmak üzere enasetonitril-su içermektedir. LC-MS sisteminde ters faz (C18) kolon kullanılmış ve akış hızı 0.2 ml/dk olarak ayarlanmıştır.

3.10.1 Kullanılan Çözeltiler

- 1) 10 mM, PBS (pH 7.3)
- 2) 0.08 mM Doksorubisin Çözeltisi (pH 7.2)
- 3) 0.23 mg/ml Miyeloperoksidaz Çözeltisi
- 4) %3 (v/v) Hidrojen Peroksit Çözeltisi

3.10.2 Deneyin Yapılışı

- 1) 750 µl Doksorubisin çözeltisi
- 2) 226 µl Miyeloperoksidaz Çözeltisi
- 3) 14 µl PBS

Yukarıda belirtilen çözeltilerden belirtilen miktarlarda 3 ayrı cam deney tüpüne alındı ve bu tüpler 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosuna yerleştirildi.

- 4) 10 µl Hidrojen Peroksit (Reaksiyon Başlatıcı) Çözeltisi

eklendi ve aynı anda kronometre çalıştırıldı. Tüplerden bir tanesi hemen banyodan alındı ve LC-MS spektrometresine verildi (0. dk örneği). Diğer tüpler de sırasıyla 60 dk ve 120 dk sonra su banyosundan alındı ve LC-MS spektrometresine verildi ve kromatogramları alındı.

3.11 LC-ESI-MS Spektrometresi ile Serbest Radikal Yakalayıcı (5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit) Varlığında Miyeloperoksidazın Doksorubisine Olan Etkisinin İncelenmesi

3.11.1 Kullanılan Çözeltiler

- 1) 10 mM, PBS (pH 7.3)
- 2) 0.08 mM Doksorubisin Çözeltisi (pH 7.2)
- 3) 0.23 mg/ml Miyeloperoksidaz Çözeltisi

- 4) %3 (v/v) Hidrojen Peroksit Çözeltisi
- 5) 10 mM Serbest Radikal Yakalayıcı (5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit) Çözeltisi

3.11.2 Deneyin Yapılışı

- 1) 750 µl Doksorubisin çözeltisi
- 2) 215 µl Miyeloperoksidaz Çözeltisi
- 3) 15 µl PBS
- 4) 10 µl Serbest Radikal Yakalayıcı (5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit) Çözeltisi

Yukarıda belirtilen çözeltilerden belirtilen miktarlarda 3 ayrı cam deney tüpüne alındı ve bu tüpler 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosuna yerleştirildi.

- 5) 10 µl Hidrojen Peroksit (Reaksiyon Başlatıcı) Çözeltisi

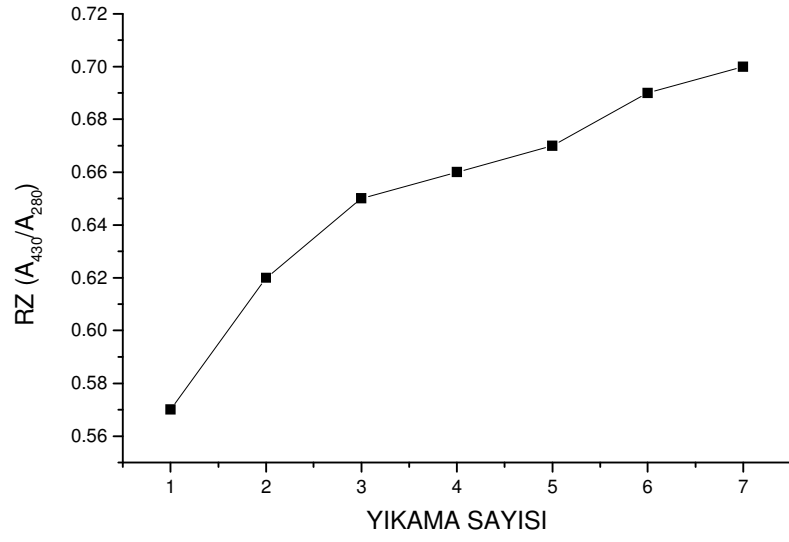
eklendi ve aynı anda kronometre çalıştırıldı. Tüplerden bir tanesi hemen banyodan alındı ve LC-MS spektrometresine verildi (0. dk örneği). Diğer tüpler de sırasıyla 60 dk ve 120 dk sonra su banyosundan alındı ve LC-MS spektrometresine verildi ve kromatogramları alındı.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

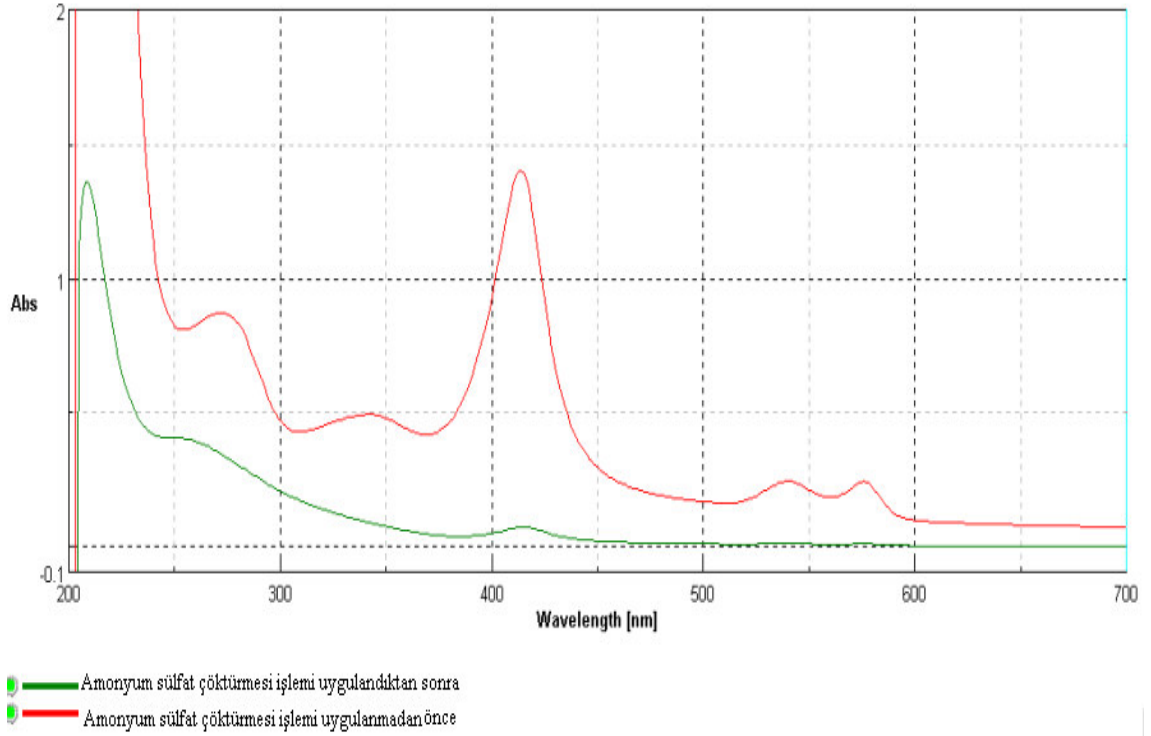
4.1 Kan Örneklerinden İzole Edilen Miyeloperoksidazın Konsantre Etme ve Yıkama Sonuçları

Çizelge 4.1 Ultrafiltrasyon sistemi kullanılarak gerçekleştirilen konsantre etme işlemi ve her bir yıkama işlemi sonrası 280 ve 430 nm'deki absorbans değerleri ve enzimin saflığının bir ölçüsü olarak kabul edilen RZ değerleri.

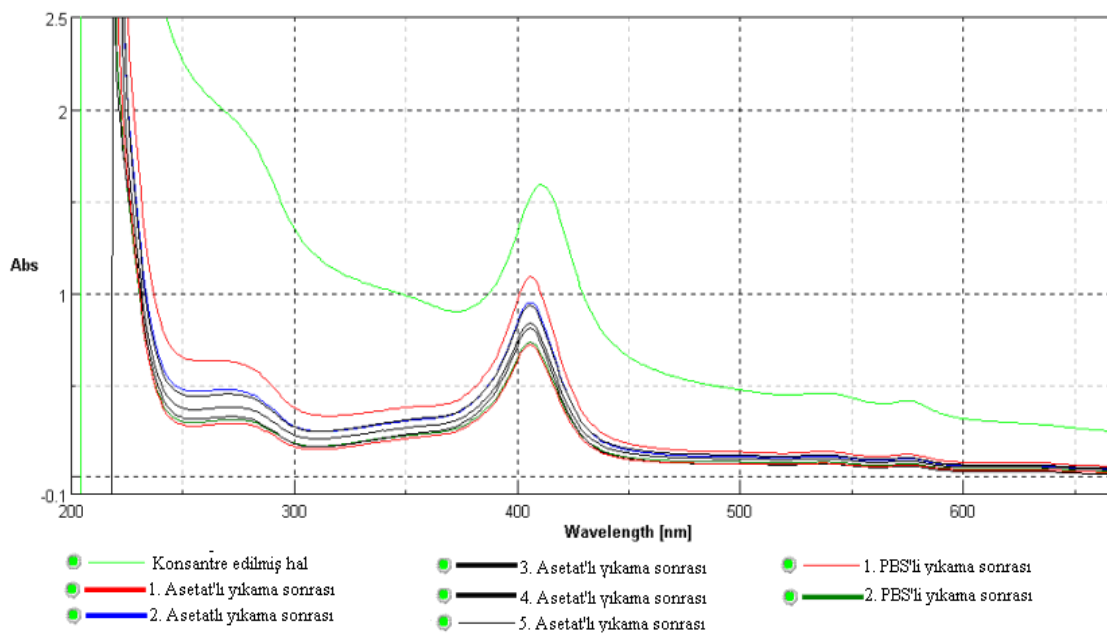
	A ₂₈₀	A ₄₃₀	RZ ₄₃₀
(NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi yapılmadan önce	0,834	0,672	0,81
(NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi yapıldıktan sonra	0,307	0,045	0,15
Konsantre Kendisi	1,846	0,982	0,53
Konsantre Alta Geçen	0,179	-	-
1. Asetat ile Yıkama Sonrası Kendisi	0,601	0,341	0,57
1. Asetat ile Yıkama Sonrası Alta Geçen	0,065	0,005	-
2. Asetat ile Yıkama Sonrası Kendisi	0,456	0,283	0,62
2. Asetat ile Yıkama Sonrası Alta Geçen	0,042	0,008	-
3. Asetat ile Yıkama Sonrası Kendisi	0,438	0,285	0,65
3. Asetat ile Yıkama Sonrası Alta Geçen	0,027	0,008	-
4. Asetat ile Yıkama Sonrası Kendisi	0,371	0,245	0,66
4. Asetat ile Yıkama Sonrası Alta Geçen	0,014	0,005	-
5. Asetat ile Yıkama Sonrası Kendisi	0,319	0,213	0,67
5. Asetat ile Yıkama Sonrası Alta Geçen	-	-	-
1. PBS ile Yıkama Sonrası Kendisi	0,286	0,197	0,69
1. PBS ile yıkama sonrası alta geçen	-	-	-
2. PBS ile Yıkama Sonrası Kendisi	0,305	0,212	0,70
2. PBS ile yıkama sonrası alta geçen	0,001	-	-



Şekil 4.1 RZ Değerinin yıkama sayısı ile değişmesi.



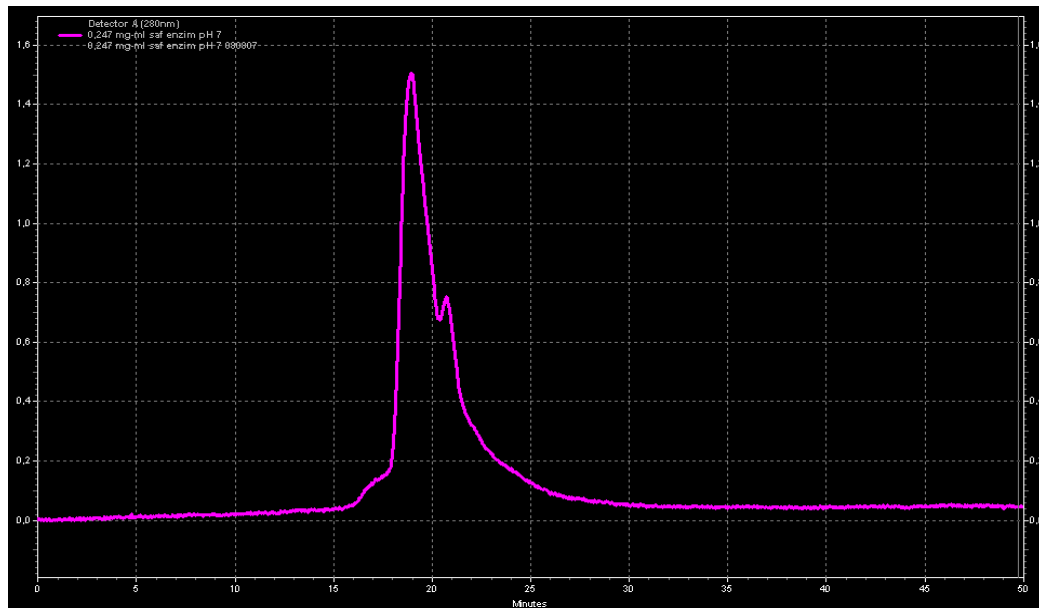
Şekil 4.2 Protein ekstraktının $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi uygulanmadan önce ve uygulandıktan sonra alınan absorpsiyon spektrumları.



Şekil 4.3 Konsantre etme ve yıkama işlemlerinden sonra alınan absorpsiyon spektrumları.

4.2 Kan Örneklerinden İzole Edilen Miyeloperoksidazın HPLC Kromatogramı

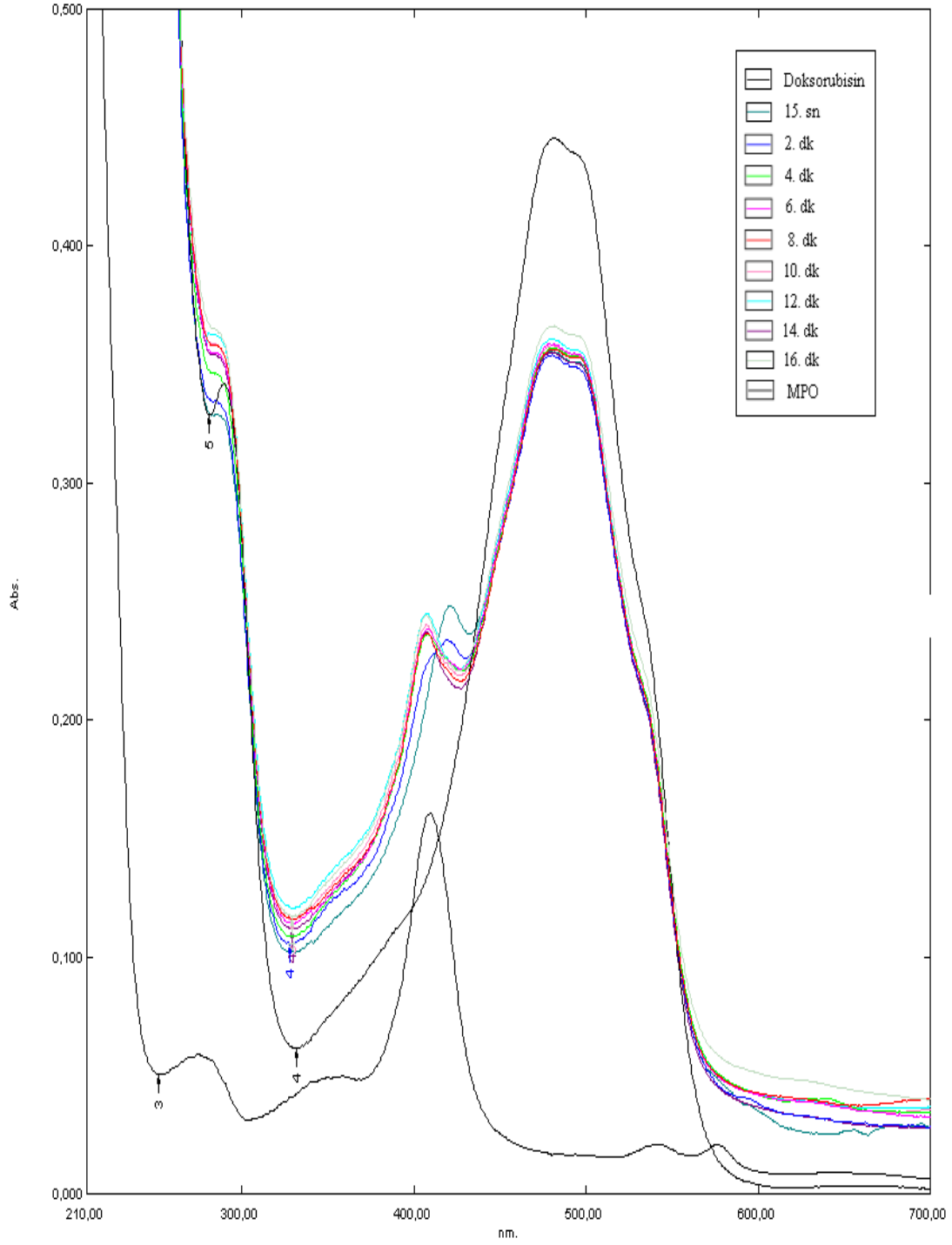
Yapılan saflaştırma işleminden sonra saflık kontrolü amacı ile HPLC cihazına örnek verilip kromatogram alındı.



Şekil 4.4 Kandan izole edilen miyeloperoksidazın HPLC kromatogramı.

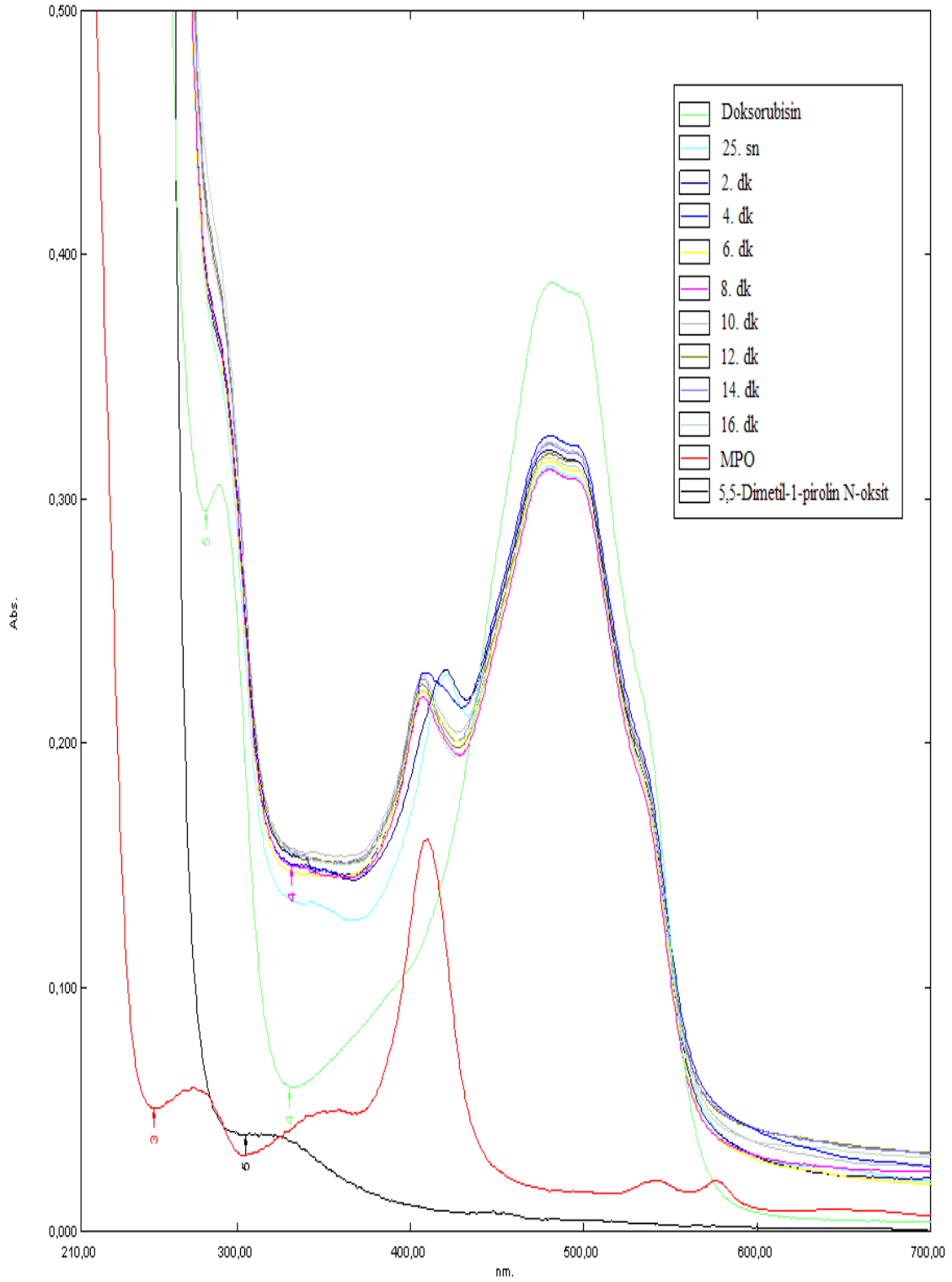
4.3 Miyeloperoksidazın Doksorubisine Olan Etkisi ve Örneklerin Absorbans Spektrumları

4.3.1 Doksorubisine Miyeloperoksidaz Etkisi UV-Vis Spektrumları



Şekil 4.5 Miyeloperoksidazın Dokсорubisine etkisinde 16 dakika süreyle 37°C’da alınan absorbans spektrumları.

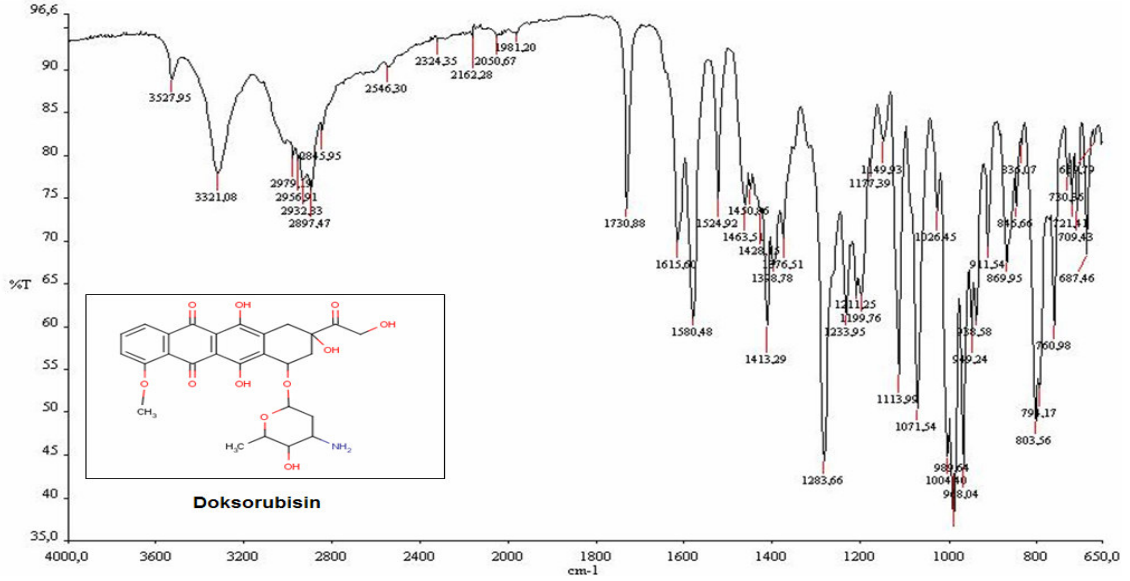
4.3.2 Serbest Radikal Yakalayıcı (Free Radical Trap) Varlığında Miyeloperoksidazın Dokсорubisine Etkisi ve Örneklerin Absorbans Spektrumları



Şekil 4.6 Serbest radikal yakalayıcı varlığında 37°C’da miyeloperoksidazın Dokсорubisine etkisinde 16.dakika süreyle alınan absorbans spektrumları.

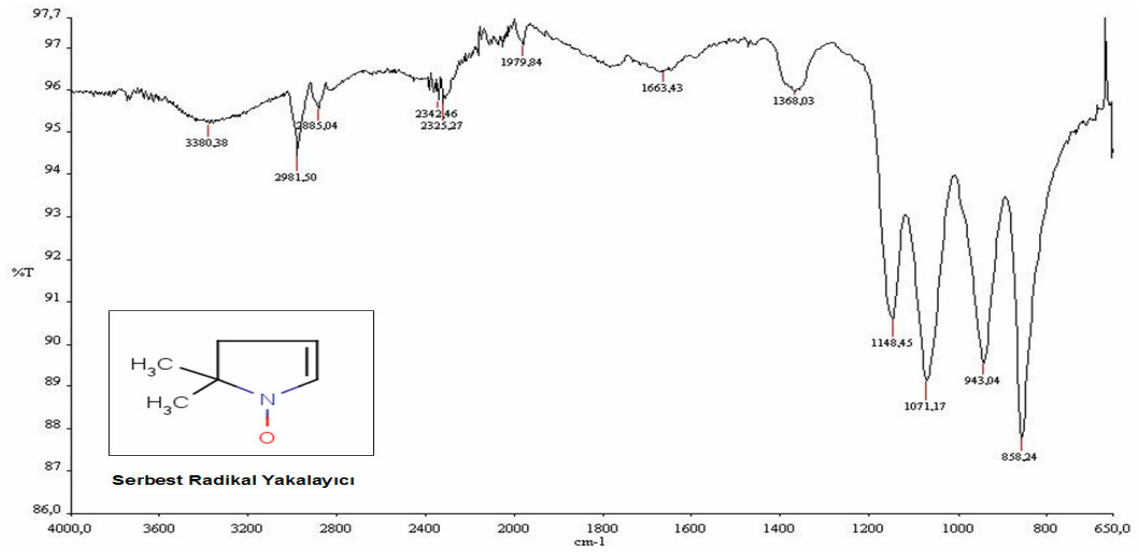
4.4 Miyeloperoksidazın Doksorubisine Etkisinin İncelenmesi ile İlgili FT-IR Spektrumları

4.4.1 Doksorubisinin FT-IR Spektrumu



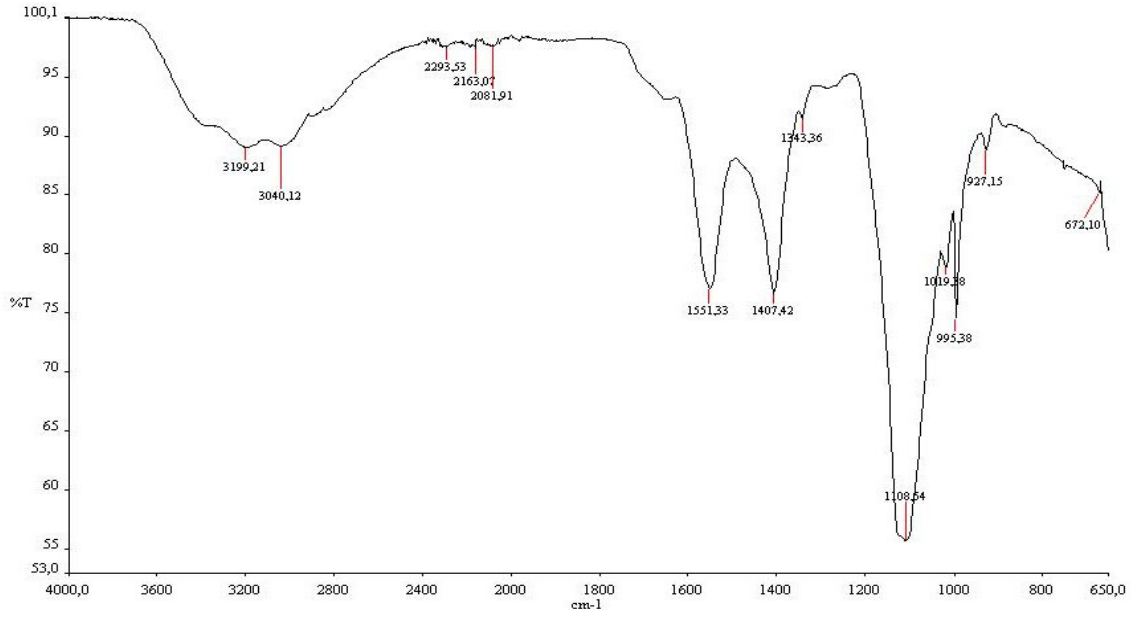
Şekil 4.7 Doksorubisinin FT-IR spektrumu

4.4.2 Serbest Radikal Yakalayıcının FT-IR Spektrumu



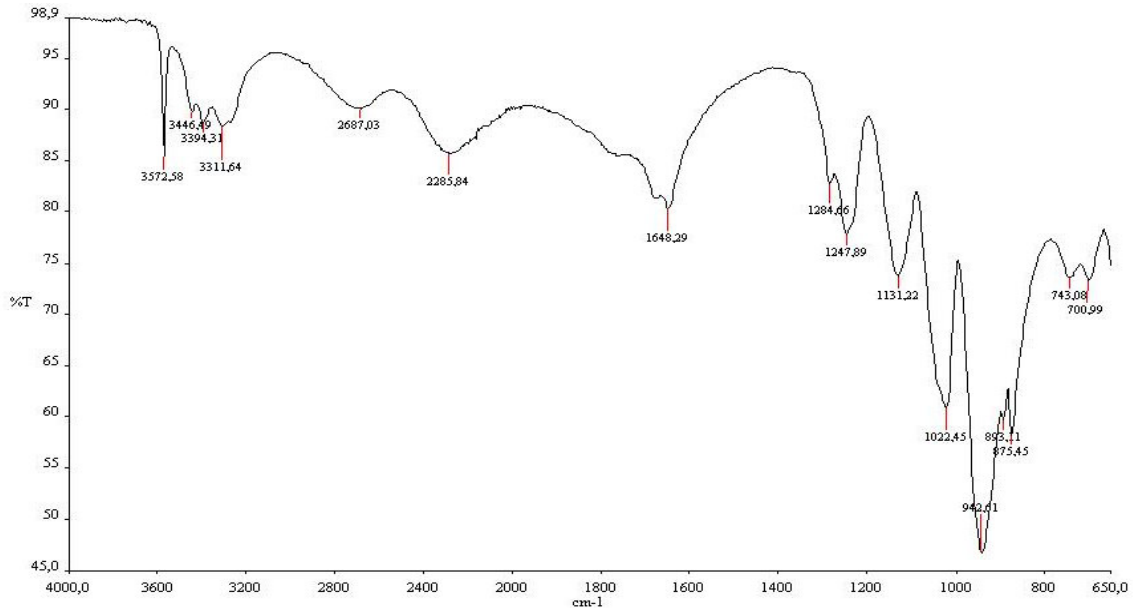
Şekil 4.8 Serbest radikal yakalayıcının FT-IR spektrumu

4.4.3 Miyeloperoksidazın FT-IR Spektrumu



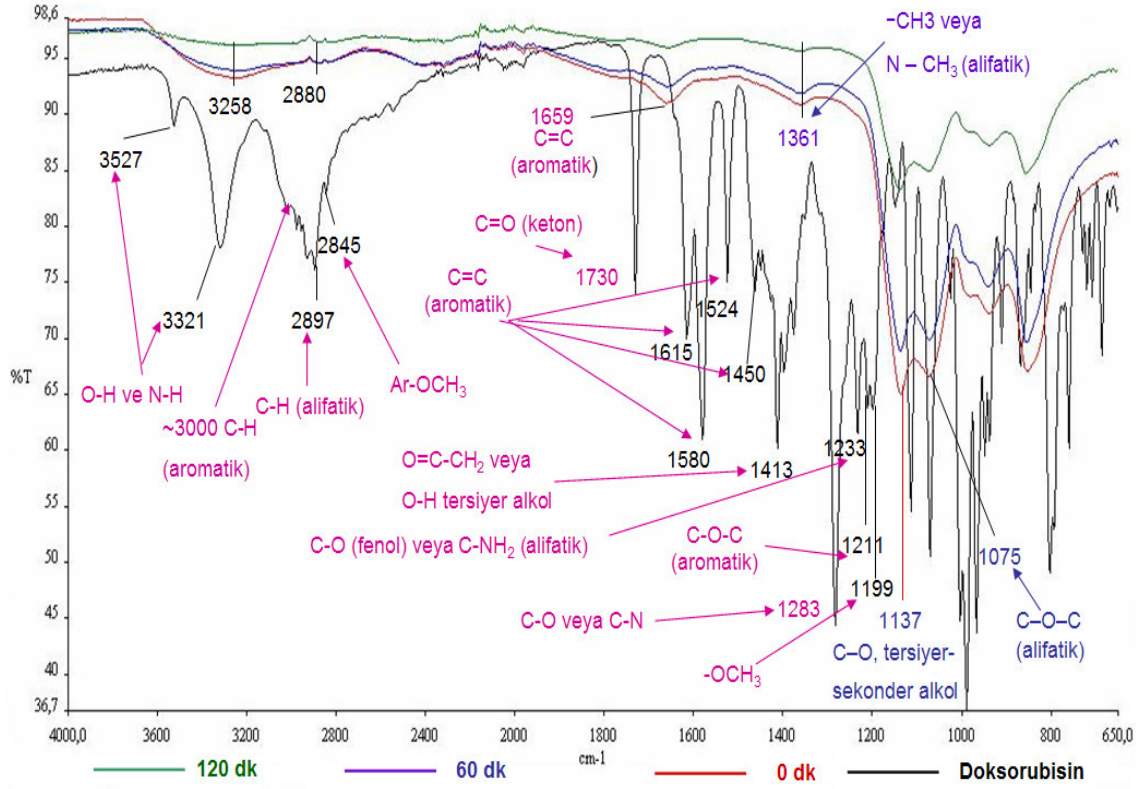
Şekil 4.9 Saflaştırılan miyeloperoksidazın FT-IR spektrumu

4.4.4 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'nun FT-IR spektrumu



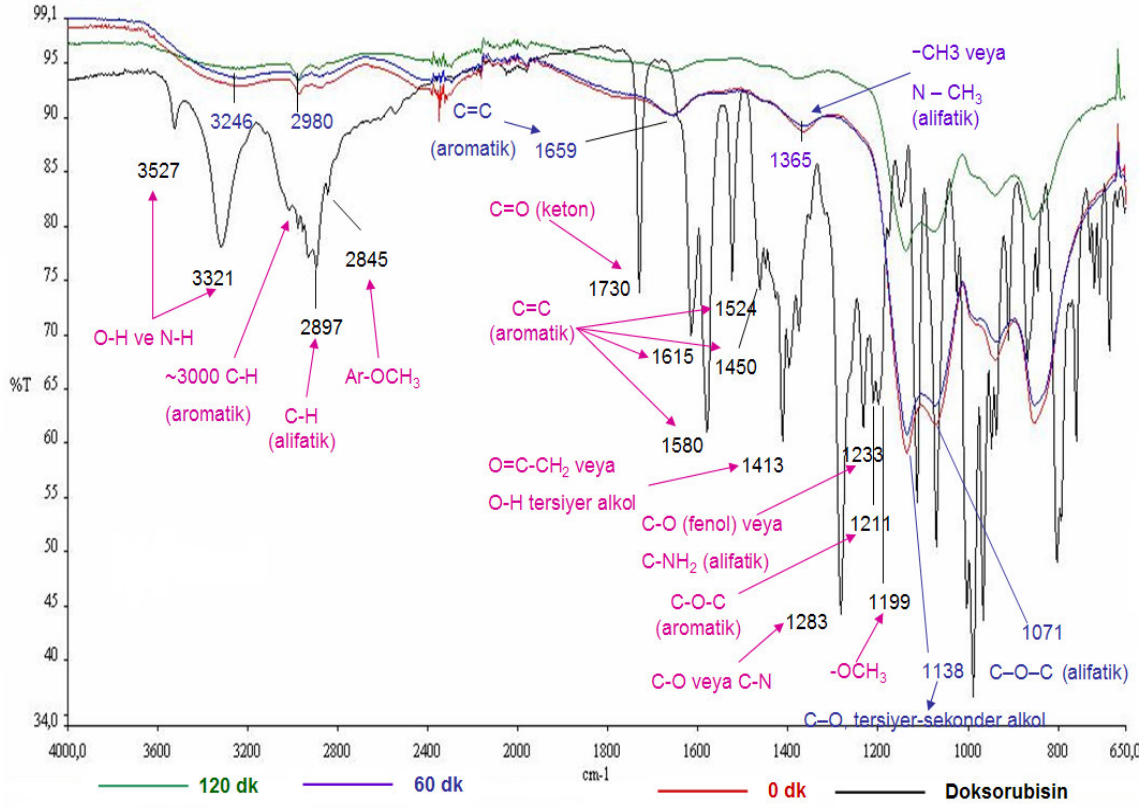
Şekil 4.10 PBS tamponu elde etmek için kullanılan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'nun FT-IR spektrumu

4.4.5 Doksorubisine Miyeloperoksidaz Etkisi FT-IR Spektrumları



Şekil 4.11 Miyeloperoksidazın Doksorubisine farklı sürelerde (0, 60 ve 120.dk) etkisinden sonra örneklerin alınan FT-IR spektrumları.

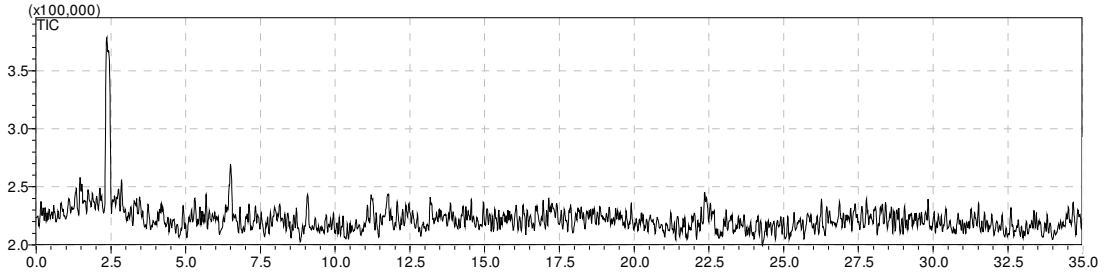
4.4.6 Serbest Radikal Yakalayıcı (5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit) Varlığında Miyeloperoksidazın Doksorubisine Etkisi ve Alınan FT-IR Spektrumları



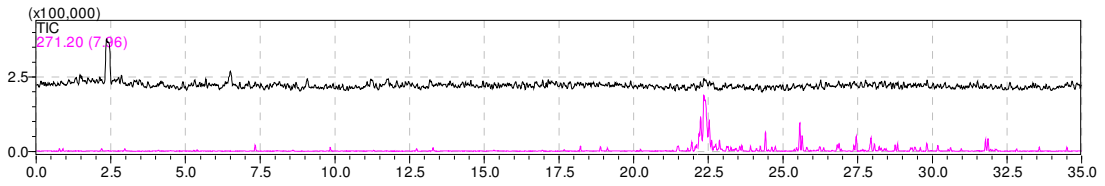
Şekil 4.12 Serbest radikal yakalayıcı (free radical trap) varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine farklı sürelerde (0, 60 ve 120.dk) etkisinden sonra örneklerin alınan FT-IR spektrumları.

4.5 Miyeloperoksidazın Doksorubisine Etkisinin LC-ESI-MS Cihazıyla İncelenmesi ile İlgili Sonuçlar

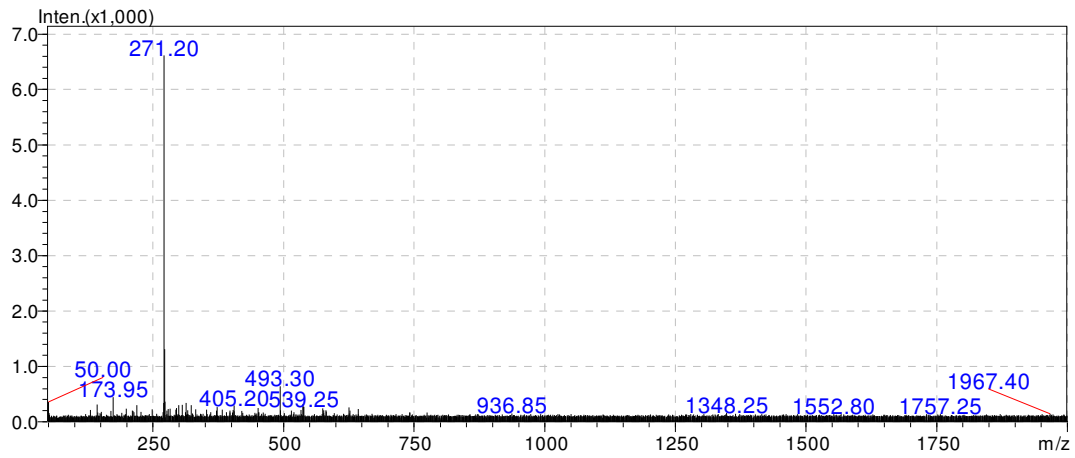
4.5.1 Doksorubisinin LC-MS Kromatogramları



Şekil 4.13 PBS tamponunda çözölmüş Doksorubisinin LC-MS cihazında alınmış kromatogramı

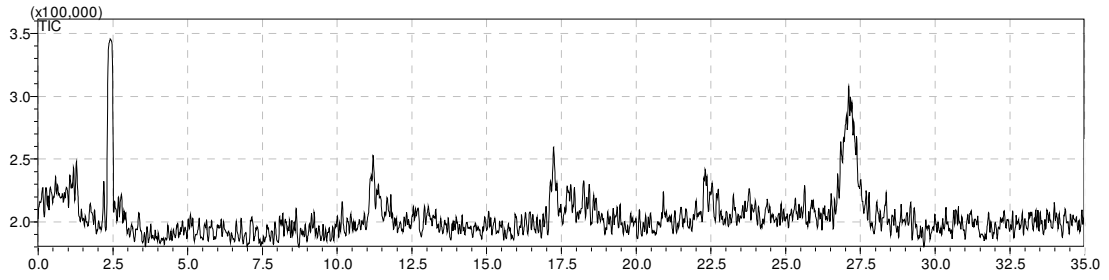


Şekil 4.13. (1) PBS tamponunda çözölmüş Doksorubisinin alıkönma zamanı: 22.000-22.887 dk olan MS yarılmasının MS kromatogramında belirtilmesi

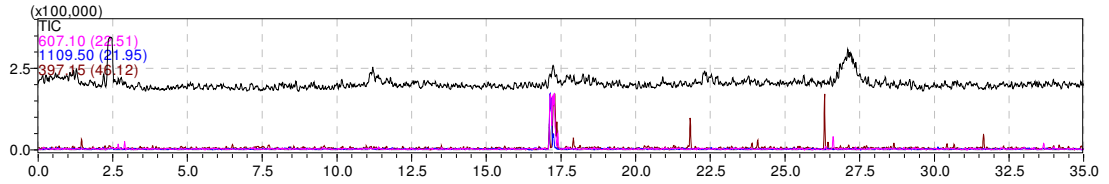


Şekil 4.13. (2) PBS tamponunda çözölmüş Doksorubisinin alıkönma zamanı: 22.000-22.887 dk olan MS yarılması

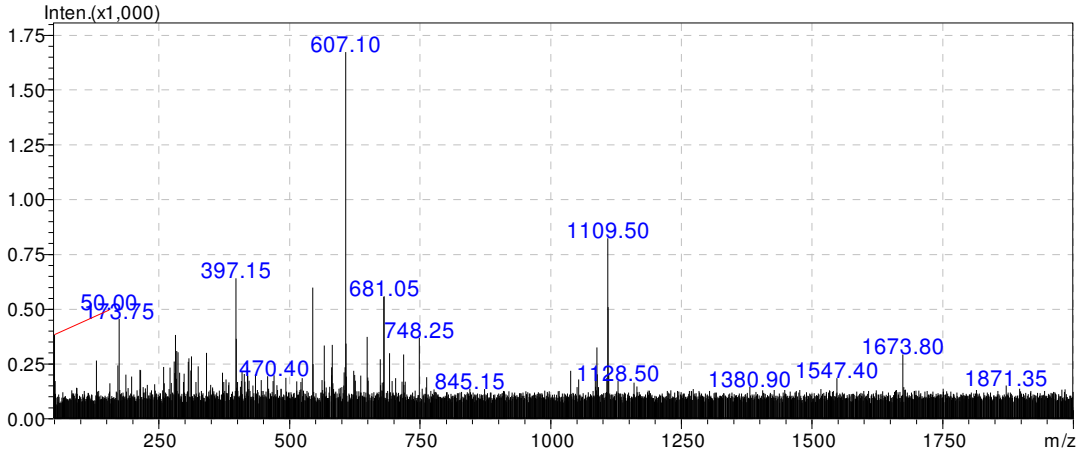
4.5.2 Miyeloperoksidazın Doksorubisine Etkisi 0.dk'daki LC-MS Kromatogramları



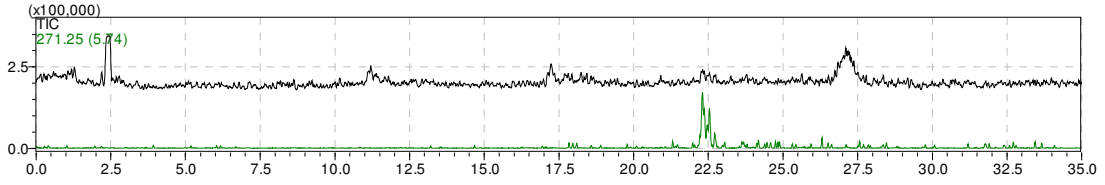
Şekil 4.14 Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı



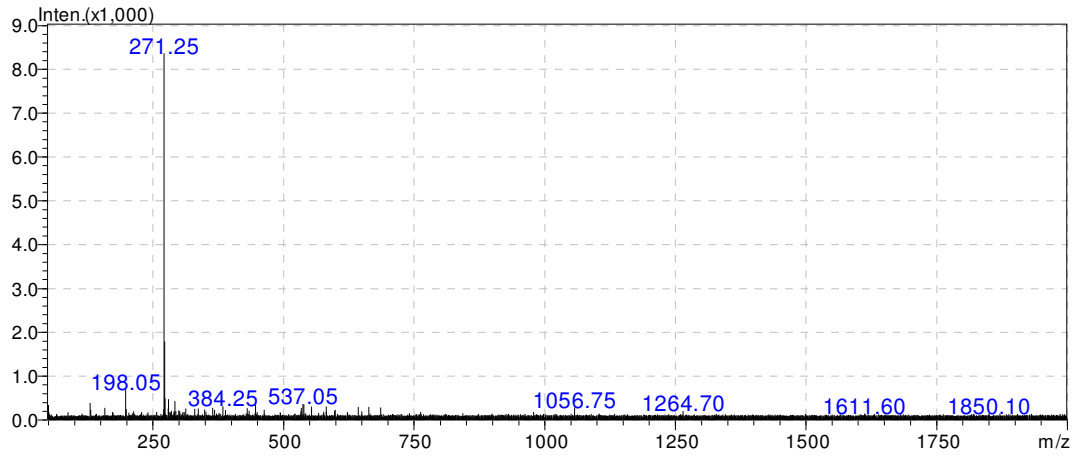
Şekil 4.14. (1) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.967-17.853 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi



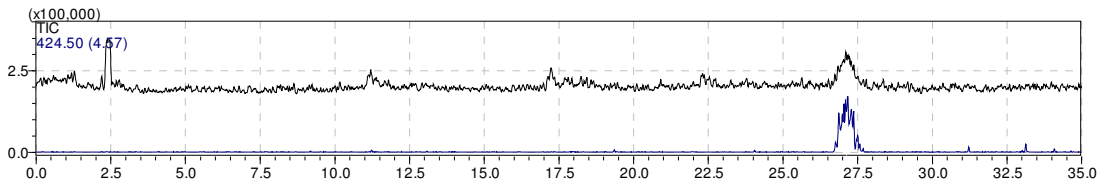
Şekil 4.14. (2) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.967-17.853 dk olan MS yarılması



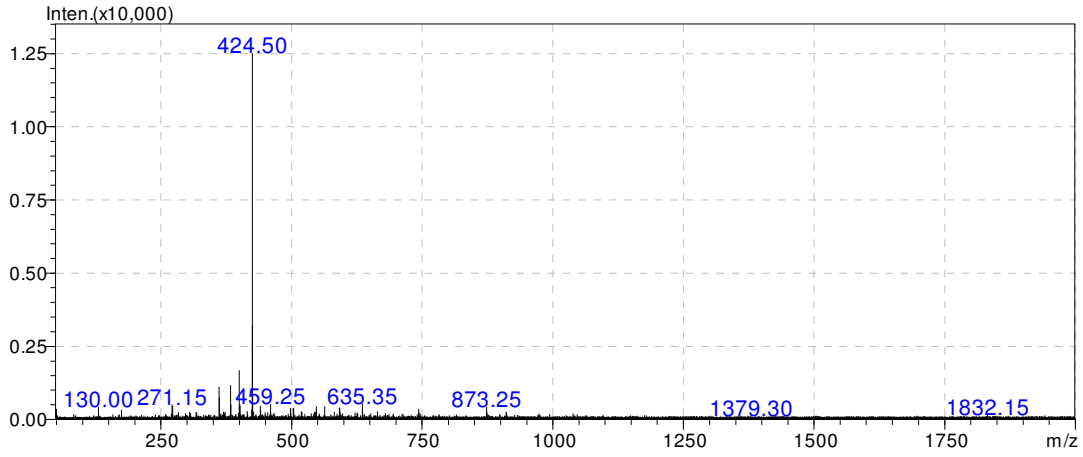
Şekil 4.14. (3) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 22.040-22.800 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi



Şekil 4.14. (4) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 22.040-22.800 dk olan MS yarılması

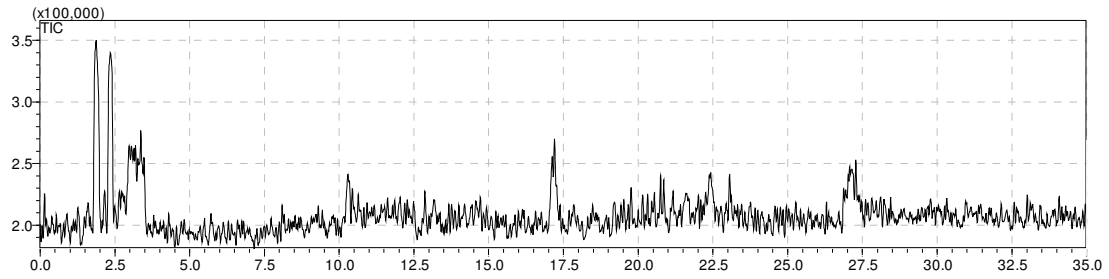


Şekil 4.14. (5) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.493-28.100 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi

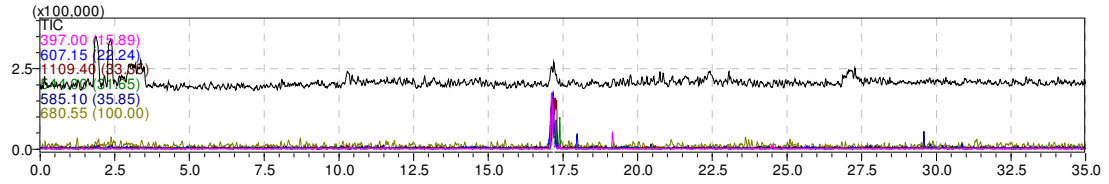


Şekil 4.14. (6) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.493-28.100 dk olan MS yarılmaları

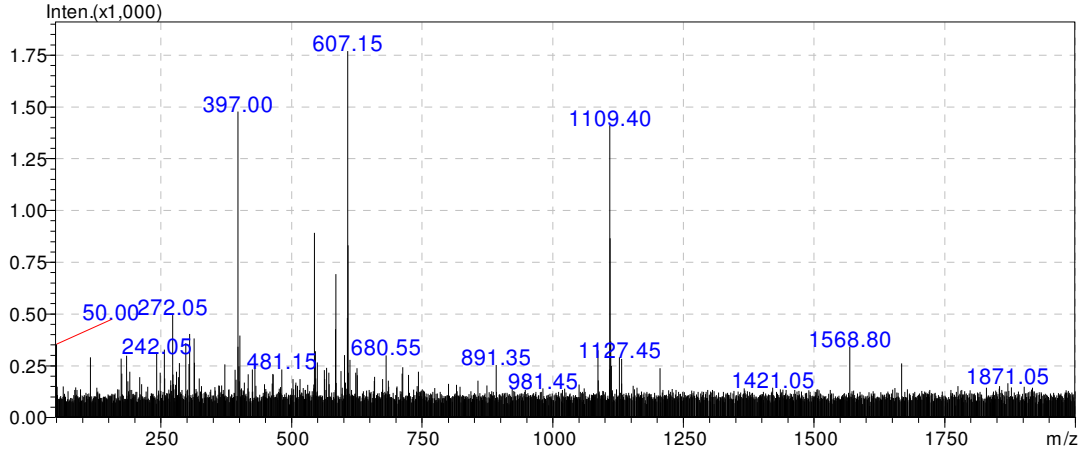
4.5.3 Miyeloperoksidazın Doksorubisine Etkisi 60.dk'daki LC-MS Kromatogramları



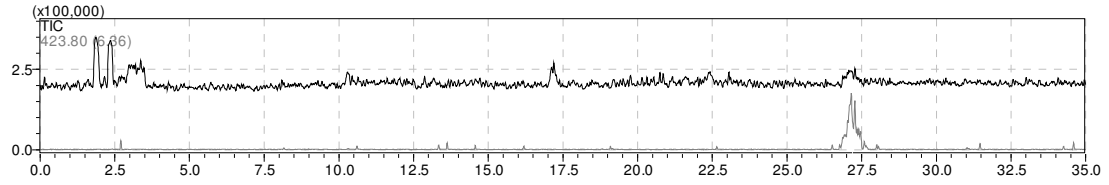
Şekil 4.15 Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı



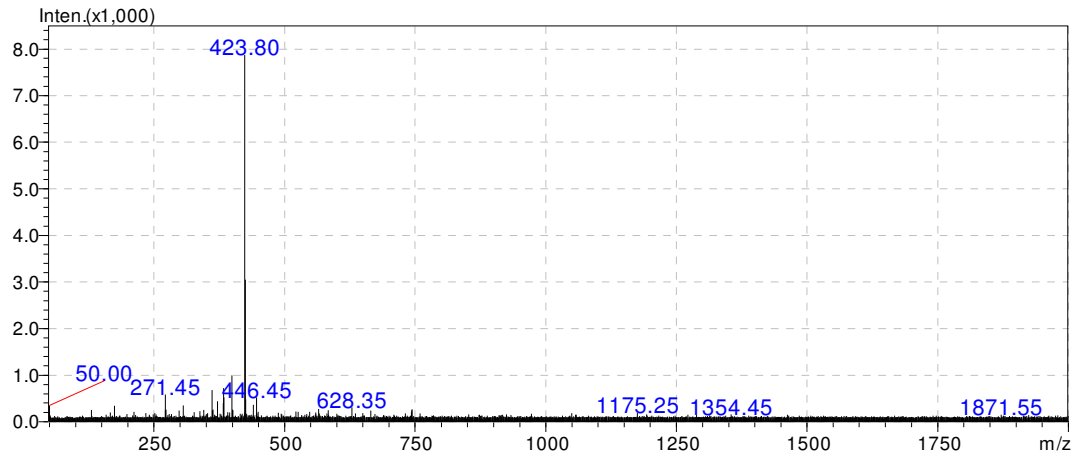
Şekil 4.15. (1) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.967-17.547 dk olan MS yarılmalarının kromatogramda belirtilmesi



Şekil 4.15. (2) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.967-17.547 dk olan MS yarılmısı

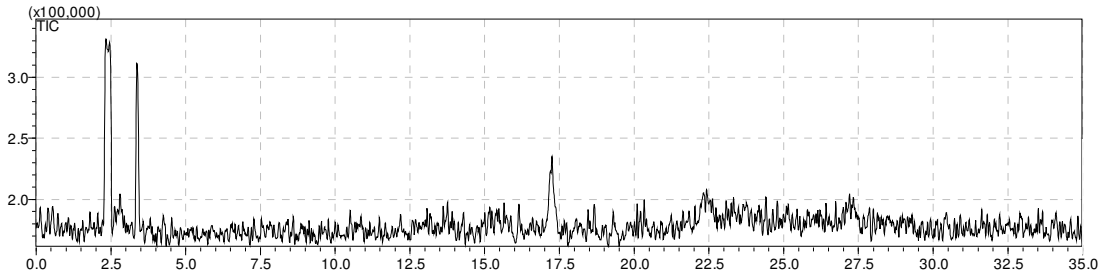


Şekil 4.15. (3) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.673-27.833 dk olan MS yarılmısının kromatogramda belirtilmesi

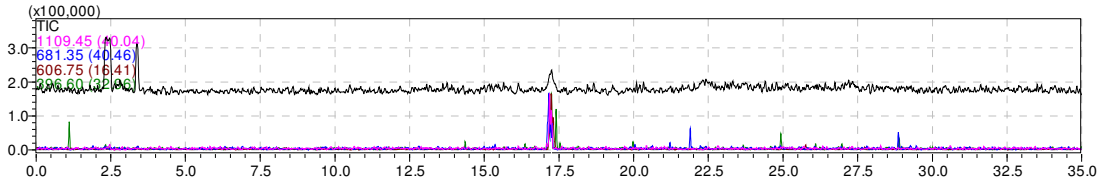


Şekil 4.15. (4) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.673-27.833 dk olan MS yarılmısı

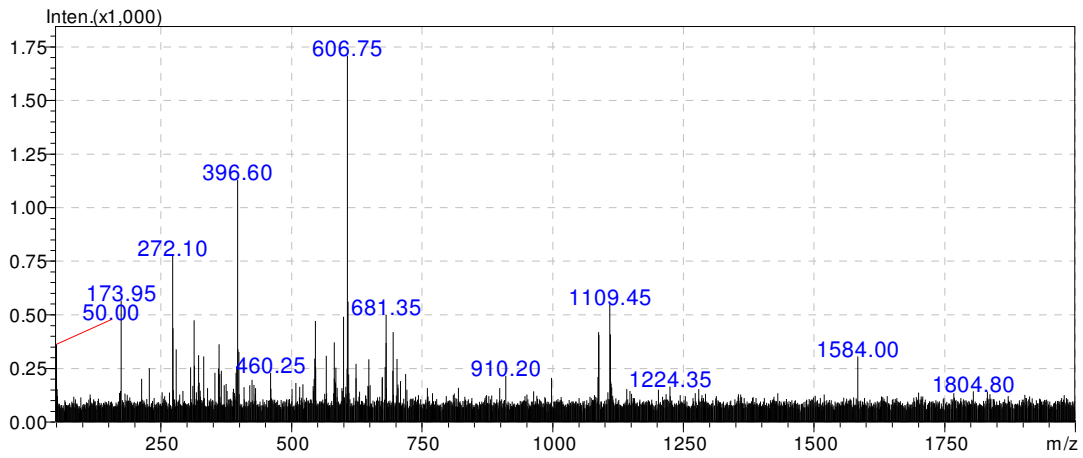
4.5.4 Miyeloperoksidazın Doksorubisine Etkisi 120.dk'daki LC-MS Kromatogramları



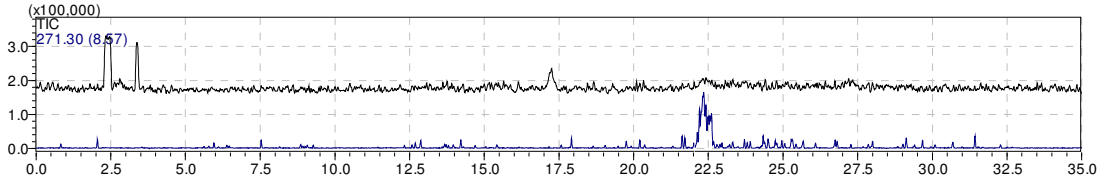
Şekil 4.16 Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı



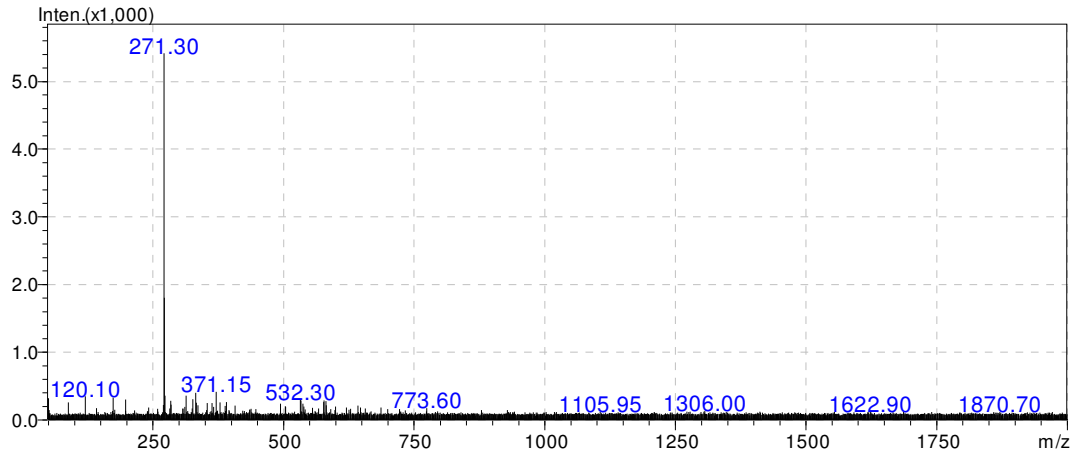
Şekil 4.16. (1) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.920-17.633 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi



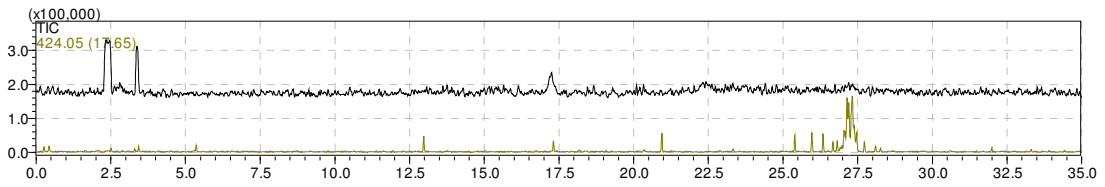
Şekil 4.16. (2) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.920-17.633 dk olan MS yarılması



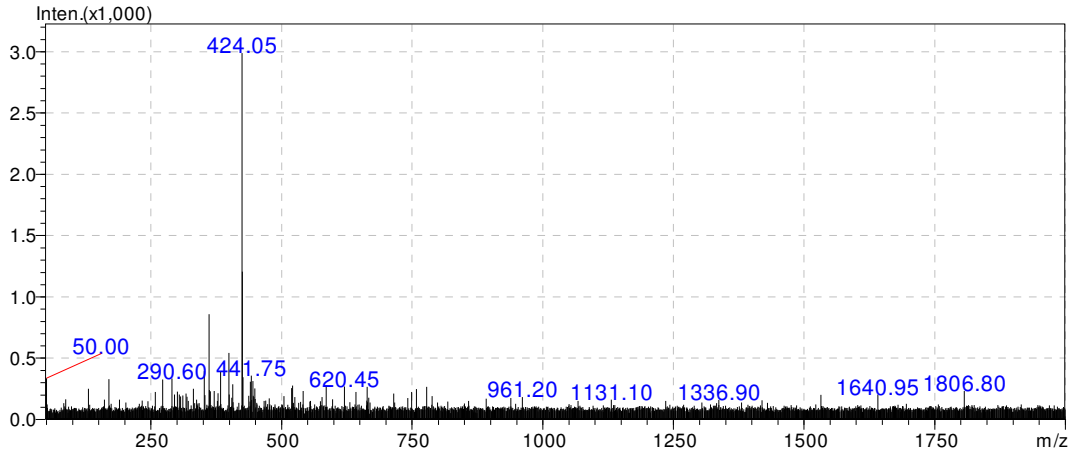
Şekil 4.16. (3) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 21.953-23.020 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi



Şekil 4.16. (4) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 21.953-23.020 dk olan MS yarılması



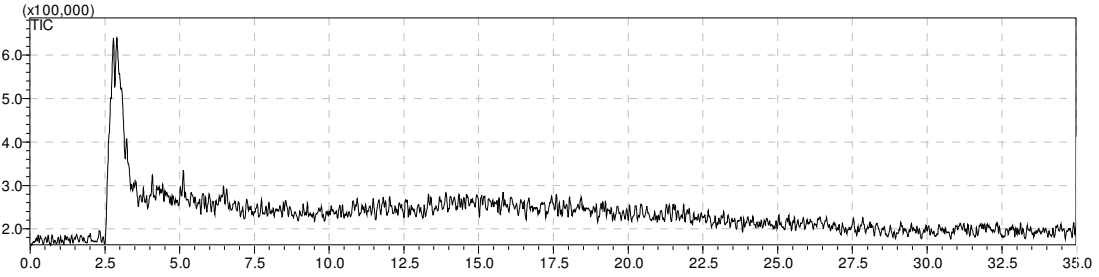
Şekil 4.16. (5) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.940-27.740 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi



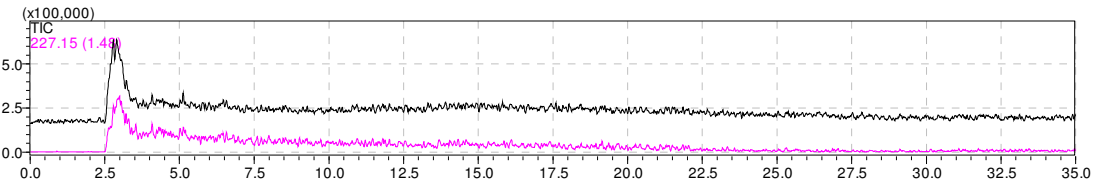
Şekil 4.16. (6) Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 26.940-27.740 dk olan MS yarılmısı

4.6 Serbest Radikal Yakalayıcı (Free Radical Trap, 5,5-Dimetil-1-Pirolin N-Oksit) Varlığında Miyeloperoksidazın Doksorubisine Etkisinin LC-ESI-MS Cihazı ile İncelenmesine İle İlgili Sonuçlar

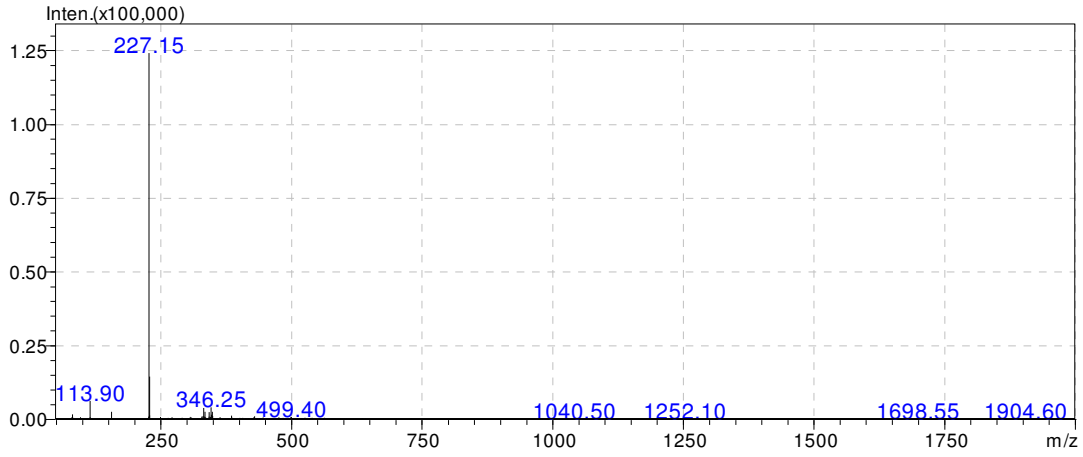
4.6.1 Serbest Radikal Yakalayıcının LC-MS Kromatogramları



Şekil 4.17 Asetonitrilde çözülmüş serbest radikal yakalayıcının LC-MS cihazında alınmış kromatogramı

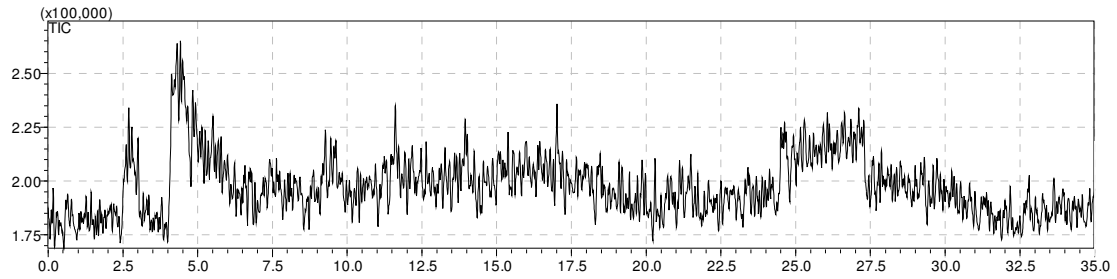


Şekil 4.17. (1) Asetonitrilde çözülmüş serbest radikal yakalayıcının alıkonma zamanı: 2.500-3.480 dk olan MS yarılmısının kromatogramda belirtilmesi

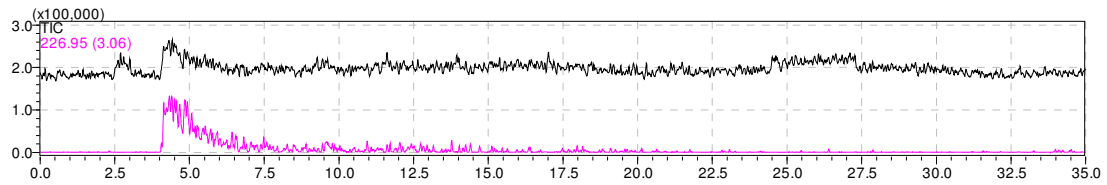


Şekil 4.17. (2) Asetonitrilde çözülmüş serbest radikal yakalayıcının alıkonma zamanı: 2.500-3.480 dk olan MS yarılması

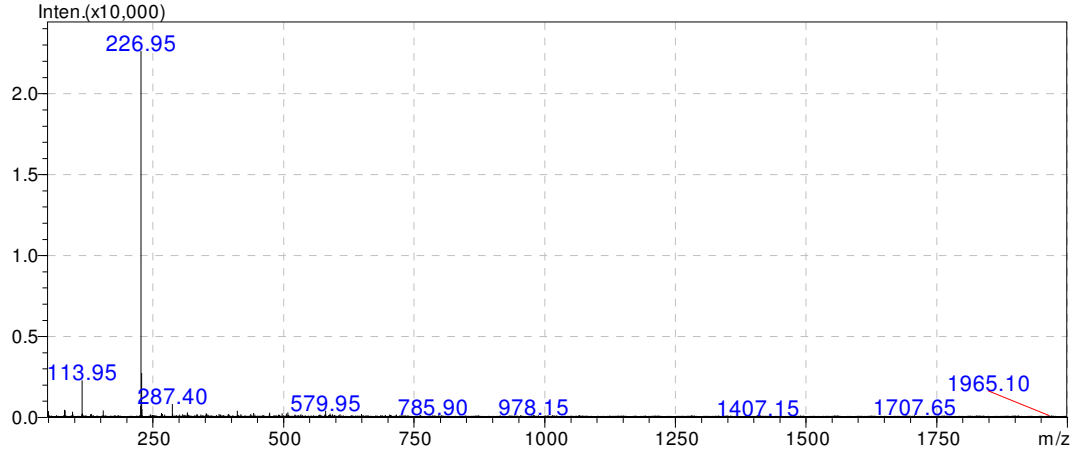
4.6.2 Serbest Radikal Yakalayıcı Varlığında Miyeloperoksidazın Doksorubisine Etkisi 0.dk'daki LC-MS Kromatogramı



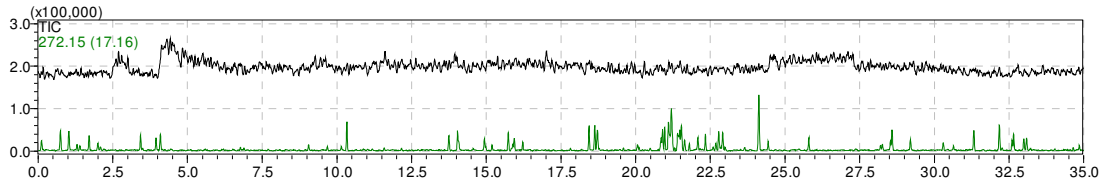
Şekil 4.18 Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı



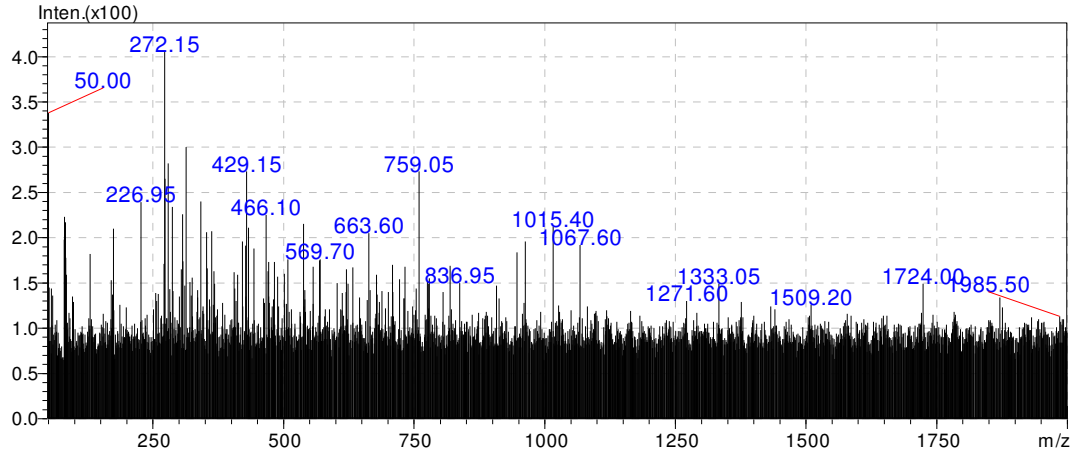
Şekil 4.18. (1) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 3.920-5.613 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi



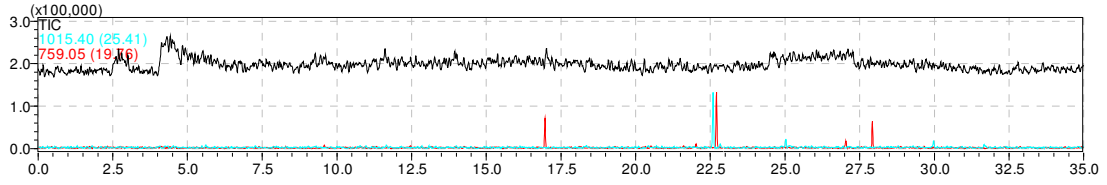
Şekil 4.18. (2) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 3.920-5.613 dk olan MS yarılmaları



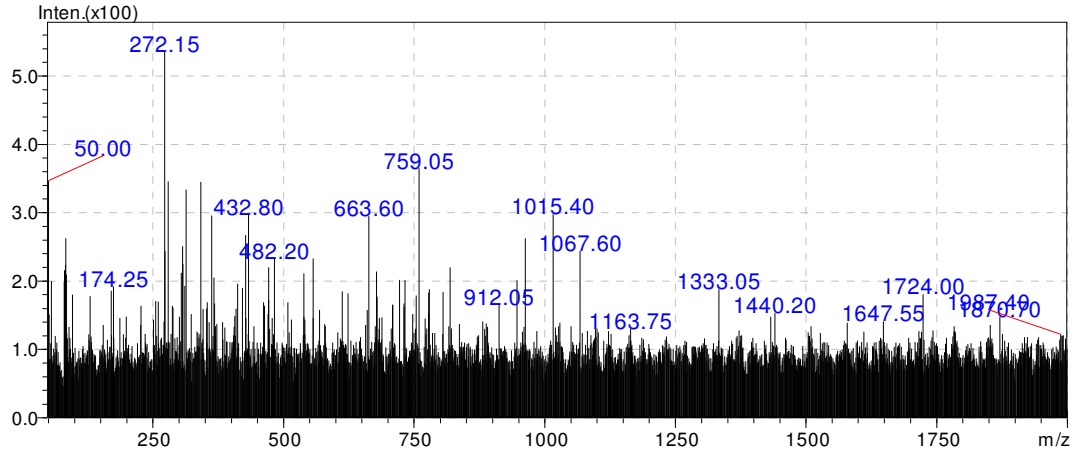
Şekil 4.18. (3) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 21.600-23.287 dk olan MS yarılmalarının kromatogramda belirtilmesi



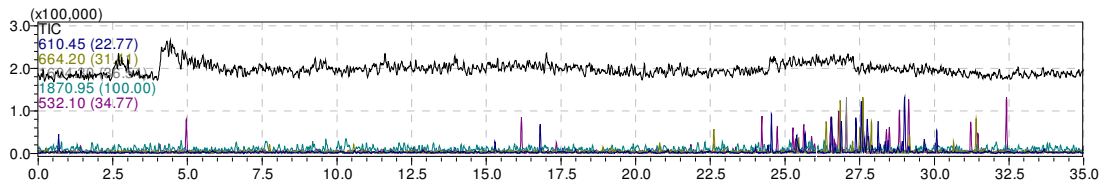
Şekil 4.18. (4) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 21.600-23.287 dk olan MS yarılmaları



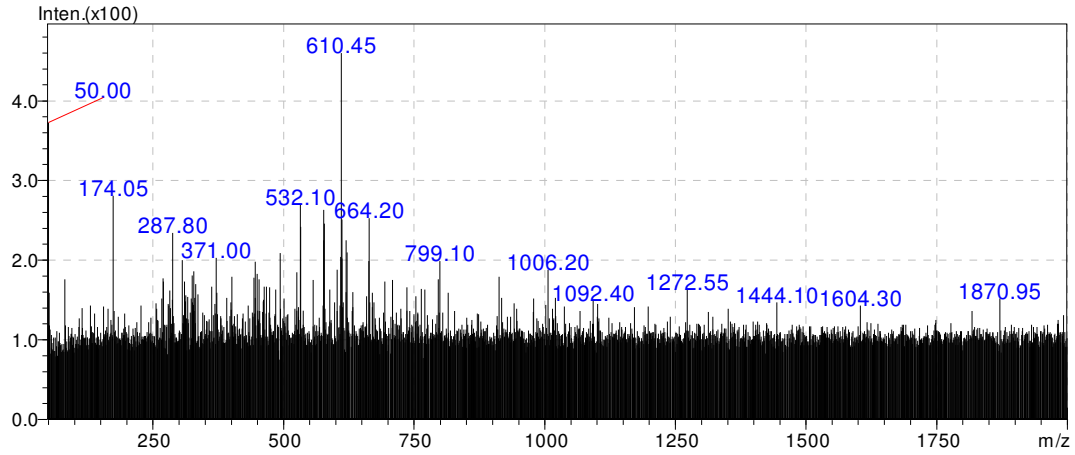
Şekil 4.18.(5) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 22.000-22.980 dk olan MS yarılmalarının kromatogramda belirtilmesi



Şekil 4.18. (6) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 22.000-22.980 dk olan MS yarılmaları

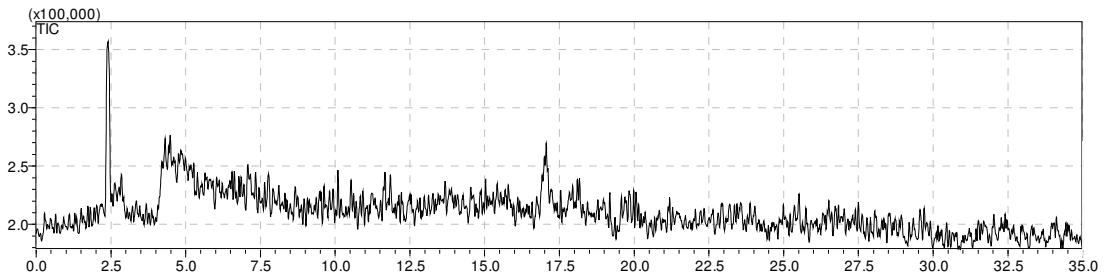


Şekil 4.18. (7) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 24.493-27.567 dk olan MS yarılmalarının kromatogramda belirtilmesi

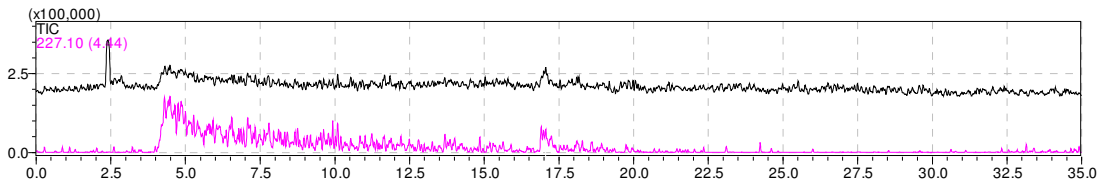


Şekil 4.18. (8) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 24.493-27.567 dk olan MS yarılması

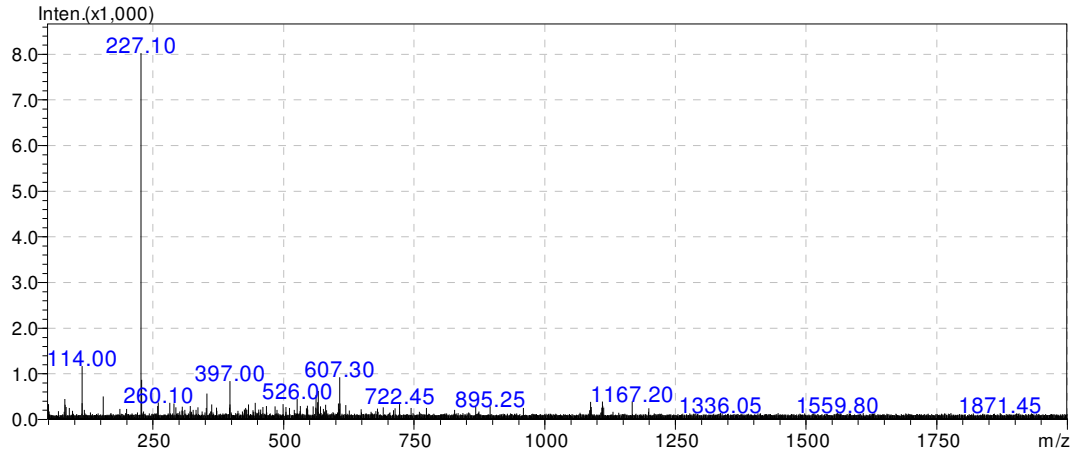
4.6.3 Serbest Radikal Yakalayıcı Varlığında Miyeloperoksidazın Doksorubisine Etkisi 60.dk'daki LC-MS Kromatogramı



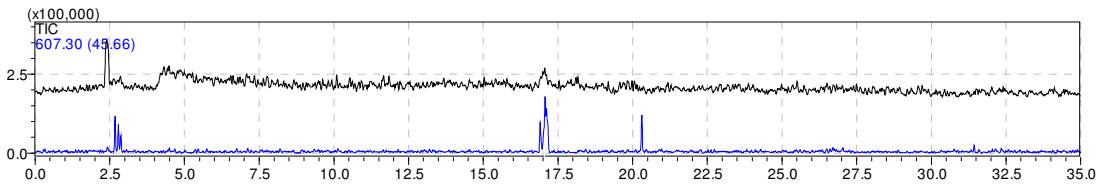
Şekil 4.19 Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı



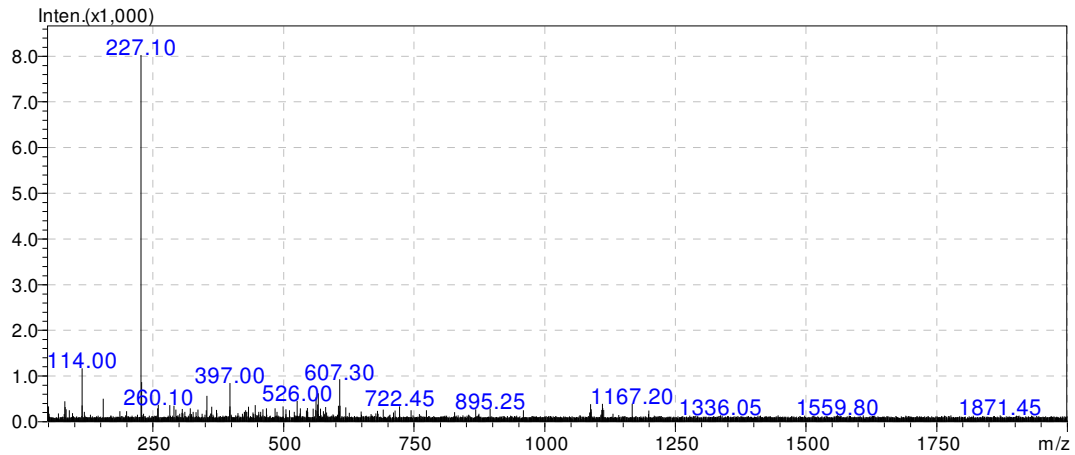
Şekil 4.19. (1) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.787-17.453 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi



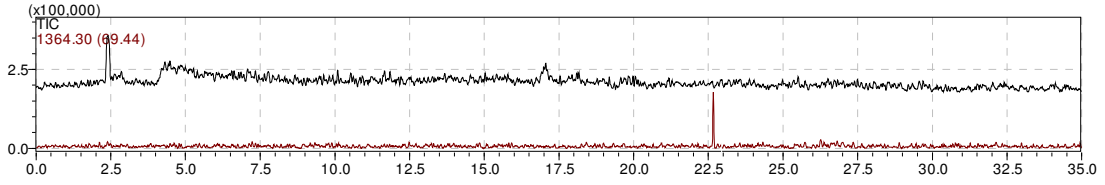
Şekil 4.19. (2) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.787-17.453 dk olan MS yarılması



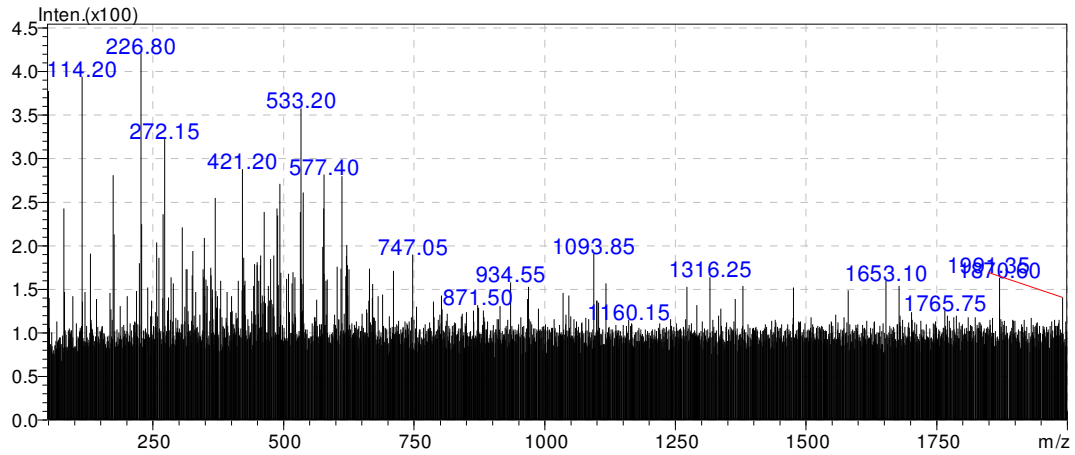
Şekil 4.19. (3) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.787-17.453 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi



Şekil 4.19. (4) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 16.787-17.453 dk olan MS yarılması

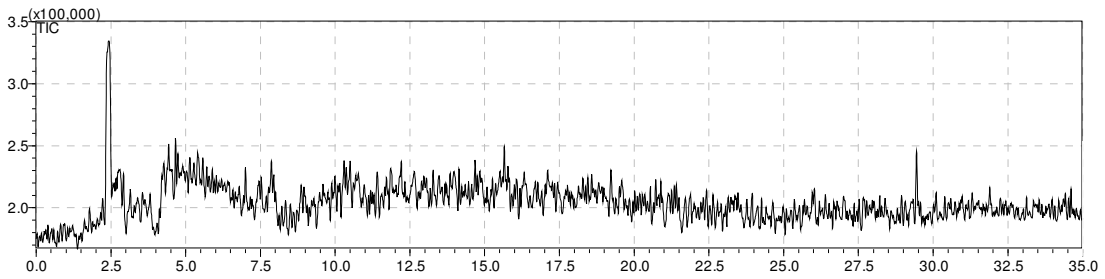


Şekil 4.19. (5) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 21.733-23.513 dk olan MS yarılmasının kromatogramda belirtilmesi

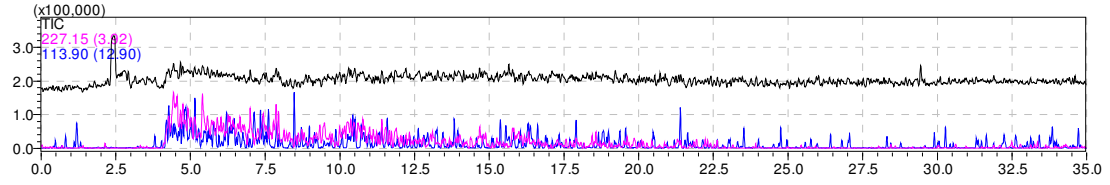


Şekil 4.19. (6) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 21.733-23.513 dk olan MS yarılması

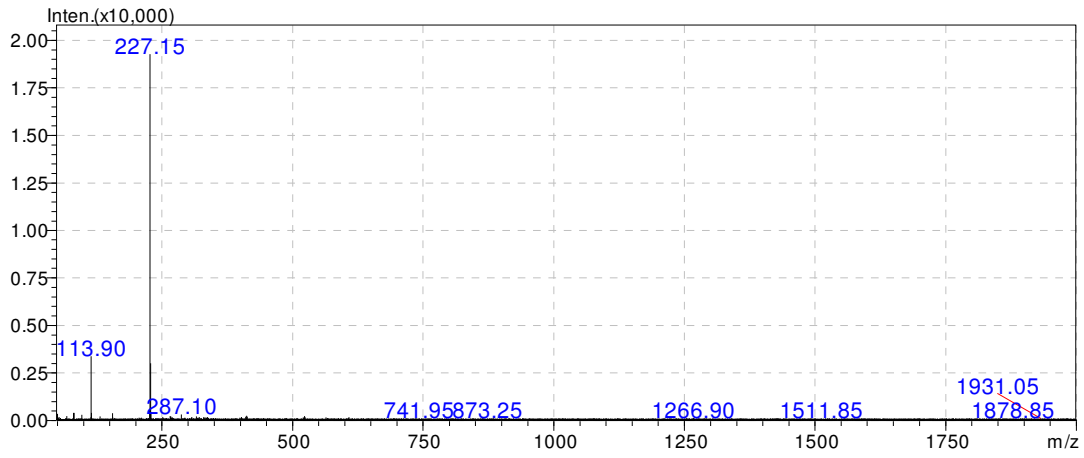
4.6.4 Serbest Radikal Yakalayıcı Varlığında Miyeloperoksidazın Doksorubisine Etkisi 120.dk'daki LC-MS Kromatogramları



Şekil 4.20 Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alınmış kromatogramı



Şekil 4.20. (1) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 4.053-6.053 dk olan MS yarılmalarının kromatogramda belirtilmesi

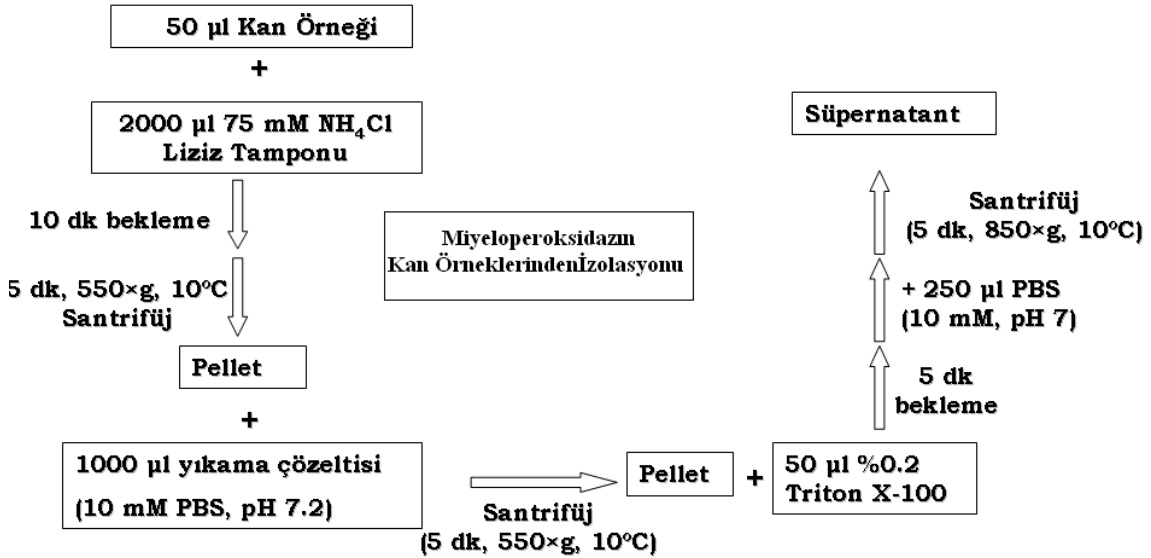


Şekil 4.20. (2) Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk bekleme ile LC-MS cihazına verilmesinde alıkonma zamanı: 4.053-6.053 dk olan MS yarılmaları

Sonuçların Değerlendirilmesi;

Karaciğer mikrozomları, “Horseradish” peroksidaz ve diğer peroksidazların ilaç aktif maddelerine etkisi ile zararlı radikallerin oluştuğu ve bu radikallerin proteinlere, lipidlere ya da DNA’ya bağlanarak vücuda hasar verdiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Gamboa da Costa vd., 2007; Lim vd., 1998; Davies vd., 1996). Bu çalışmada miyeloperoksidazın lösemi tedavisinde kullanılan Doksorubisin üzerine etkisi ilk defa incelendi. Miyeloperoksidazın bu çalışmayı laboratuarda gerçekleştirmek üzere yeterli miktarda izolasyonu ve saflaştırılması da ilk defa yapıldı.

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 (NH₄)₂SO₄ 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 4.2 ve Şekil 4.3’de verilen UV-Vis. absorpsiyon spekturumları ve hesaplanan RZ sayıları ile değerlendirildi (Çizelge 4.1, Şekil 4.1 ve Şekil 4.3). Miyeloperoksidazın saflık durumu HPLC sistemi ile kontrol edildi (Şekil 4.4). Bu çalışmada, miyeloperoksidaz enzimi insan kan örneklerinden yüksek aktiviteye sahip ve laboratuvarında deney yapmaya yeterli miktarda ilk defa izole edildi ve saflaştırıldı.

Saflaştırılan miyeloperoksidazın lösemi tedavisinde kullanılan ilaçlardan Doksorubisine etkisi fizyolojik sıcaklık ve pH’da (37°C; pH 7.2-7.3) incelendi. Reaksiyonun gerçekleştiği

öncelikle absorpsiyon spektrumlarında meydana gelen değişmeler vasıtasıyla izlendi Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Miyeloperoksidaz ve Doksorubisin deneylerde yüksek konsantrasyonda kullanıldığından, reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin FT-IR ve LC-MS sistemleri ile karakterizasyonu daha net olarak yapılabildi.

Doksorubisinin, radikal yakalayıcı varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilen reaksiyonları sonucu oluşan ürünlerin FT-IR spekturumları Çizelge 4.2, Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4’de yorumlandı.

Çizelge 4.2 Doksorubisinin FT-IR spektrumunun yorumlanması

Teorik Kırmızı Ötesi Frekansları (cm ⁻¹)	Spektrumda Alınan Frekanslar (cm ⁻¹)	Açıklamalar
3600-3400	3527	O – H gerilmesi
3400-3200	3321	N – H gerilmesi
3100-3000	~3000	C – H gerilmesi (aromatik)
3000-2800	2979- 2897	C – H gerilmesi (alifatik)
2830-2815	2845	Metil Eter Bandı, Ar-OCH ₃ varlığında 2850 cm ⁻¹ 'e kayma
1720-1700	1730	C=O gerilmesi keton grubu, α -karbonuna bağlı oksijen ve halojen varlığında frekansta 20 cm ⁻¹ kadar artma
1650-1600	1615	Kondense sistemler C=C gerilmesi
1630-1575	1580	Kondense sistemler C=C gerilmesi (fenil grubu çift bağ ile konjuge ise görülür)
1525-1450	1524	Kondense sistemler C=C gerilmesi
1450	1450	Fenil C=C gerilmesi
~1425	1428	CH ₂ -C=O
1410	1413	Karbonile komşu metilen veya
1410-1310		O – H eğilme tersiyer alkol ve fenol
1450-1375	1376	-CH ₃ eğilme veya
1370-1310		N – CH ₃ (alifatik)
1300-1000	1283	C – O veya C – N piki
1230 veya 1230-1030	1233	C – O gerilmesi (fenol) veya C – NH ₂ (alifatik)
1275-1200	1211	C – O – C, asimetrik gerilme (aromatik)
1190	1199	- OCH ₃
1150	1149	C – O gerilmesi, tersiyer alkol
1140-1090	1113	C – O gerilmesi, tersiyer - sekonder alkol
1150-1070	1071	C – O – C, asimetrik gerilme (alifatik)
1075-1020	1026	C – O – C, simetrik gerilme
1065-1015		Siklik alkol

Çizelge 4.3 Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde FT-IR cihazında alınan spekturumunun yorumlanması

Teorik Kırmızı Ötesi Frekansları (cm⁻¹)	Spekturumda varlığını sürdüren, yok olan veya oluşan Frekanslar (cm⁻¹)	Açıklamalar
3600-3200	3258	O – H ve N – H gerilmeleri
3000-2800	2880	-CH ₃ ve -CH ₂ -. Bu grupların halen yapıda var olduğunu göstermektedir.
1720-1700	1730	Karbonil piki kaybolmuş.
1650-1600	1659	C=C gerilmesi (aromatik)
1450	1450	Fenil C=C gerilmesi kaybolmuş.
~1425	1428	Karbonile komşu metilen grubu piki kaybolmuş.
1450-1375	1361	-CH ₃ eğilme veya N – CH ₃ (alifatik) pik şiddetinde azalma olduğu halde varlığını korumakta.
1300-1000	1283	C – O veya C – N piki kaybolmuş.
1275-1200	1211	C – O – C asimetrik gerilme (aromatik)'nin kaybolması aromatik halkaya bağlı eter bağının kopmuş olabileceğini göstermektedir.
1230 1230-1030	1233	C – O gerilmesi, fenol C – NH ₂ (alifatik) kaybolmuş.
1190	1199	- OCH ₃ kaybolması bu grubun yapıdan ayrılmış olabileceğini göstermektedir.
1140-1090	1137	C – O gerilmesi, tersiyer-sekonder alkol piki belirginleşmiş.
1150-1070	1075	C – O – C, asimetrik gerilme (alifatik), varlığını korumaktadır.

Çizelge 4.4 Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde FT-IR cihazında alınan spekturumunun yorumlanması

Teorik Kırmızı Ötesi Frekansları (cm⁻¹)	Spekturumda varlığını sürdüren, yok olan veya oluşan Frekanslar (cm⁻¹)	Açıklamalar
3600-3200	3258	O – H ve N – H gerilmeleri
2980-2900	2980	-CH ₃ ve -CH ₂ -. Bu grupların halen yapıda var olduğunu göstermektedir.
1720-1700	1730	Karbonil piki kaybolmuş.
1650-1600	1659	C=C gerilmesi (aromatik)
1450	1450	Fenil C=C gerilmesi kaybolmuş.
~1425	1428	Karbonile komşu metilen grubu piki kaybolmuş.
1450-1375	1365	-CH ₃ eğilme veya N – CH ₃ (alifatik) pik şiddetinde azalma olduğu halde varlığını korumakta.
1300-1000	1283	C – O veya C – N piki kaybolmuş.
1275-1200	1211	C – O – C asimetrik gerilme (aromatik)'nin kaybolması aromatik halkaya bağlı eter bağının kopmuş olabileceğini göstermektedir.
1230 1230-1030	1233	C – O gerilmesi, fenol C – NH ₂ (alifatik) kaybolmuş.
1140-1090	1138	C – O gerilmesi, tersiyer-sekonder alkol piki belirginleşmiş.
1150-1070	1071	C – O – C, asimetrik gerilme (alifatik), varlığını korumaktadır.

- Saflaştırılmış miyeloperoksidaz ile 37°C'da, pH 7.2-7.3'te serbest radikal yakalayıcının bulunmadığı ve bulunduğu koşullarda gerçekleştirilen reaksiyonların 0, 60 ve 120. dakikalarında örnekler LC-MS sistemine verildi, kromatogramları alındı ve kıyaslandı.

Elde edilen sonuçlar dikkate alınarak, miyeloperoksidazın lösemi tedavisinde kullanılan Doksorubisine etkisi ile parçalanarak Çizelge 4.5, Çizelge 4.6, Çizelge 4.7, Çizelge 4.8, Çizelge 4.9, Çizelge 4.10, Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12'de verilen radikaller ve dolayısıyla

bileşikler oluştuğu ve bu ilaç aktif maddesinin aşağıda verilen Şekil 4.22’de belirtildiği gibi parçalandığı kanaatine varıldı.

Çizelge 4.5 PBS tamponunda çözölmüş Doksorubisinin LC-MS sonuçları dikkate alınarak oluştuğu tahmin edilen yapıları

Alıkonma Zamanı (dk)	M/Z Değerleri	Doksorubisinin LC-MS sonucu dikkate alınarak oluştuğu düşünölen yapısının formölü	Verinin alındığı şekil
22.000-22.887	271.20	$X + R + 2H^+$	Şekil 4.13. (2)

Çizelge 4.6 Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk reaksiyon süresi (reaksiyonun başlaması ile birlikte) uygulanan işlem için LC-MS sistemi sonuçları dikkate alınarak oluştuğu tahmin edilen yapılar

Alıkonma Zamanı (dk)	M/Z Değerleri	Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisi ile oluşın olası yapıların formöllerii	Verinin alındığı şekil
16.967-17.853	607.10 1109.50 397.15	$(Z - H^+) + X + 3R$ $3X + (Y - H^+) + (L - H^+) + N + 2H^+$ A	Şekil 4.14.(2)
22.040-22.800	271.25	$X + R + 2H^+$	Şekil 4.14. (4)
26.493-28.100	424.50	a) $X + (L - H^+) + H_2O + 2H^+$ b) $X + (L - H^+) + R + H^+$	Şekil 4.14. (6)

Çizelge 4.7 Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk reaksiyon süresi (reaksiyonun başlaması ile birlikte) uygulanan işlem için LC-MS sistemi sonuçları dikkate alınarak oluşturduğu tahmin edilen yapılar

Ahkonma Zamanı (dk)	M/Z Değerleri	Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisi ile oluşan olası yapıların formülleri	Verinin alındığı şekil
16.967-17.547	397.00 607.15 1109.40 544.00 585.10 680.55	A $(Z - H^+) + X + 3R$ $3X + (Y - H^+) + (L - H^+) + N + 2H^+$ $X + (Y - H^+) + (L - H^+) + R$ $X + (N - H^+) + R + H^+$ $(2Z - H^+) + (N - H^+)$	Şekil 4.15. (2)
26.673-27.833	423.80	a) $X + (L - H^+) + H_2O + 2H^+$ b) $X + (L - H^+) + R + H^+$	Şekil 4.15. (4)

Çizelge 4.8 Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk reaksiyon süresi (reaksiyonun başlaması ile birlikte) uygulanan işlem için LC-MS sistemi sonuçları dikkate alınarak oluşturduğu tahmin edilen yapılar

Ahkonma Zamanı (dk)	M/Z Değerleri	Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisi ile oluşan olası yapıların formülleri	Verinin alındığı şekil
16.920-17.633	1109.45 681.35 606.75 396.60	$3X + (Y - H^+) + (L - H^+) + N + 2H^+$ $(2Z - H^+) + (N - H^+)$ $(Z - H^+) + X + 3R$ A	Şekil 4.16. (2)
21.953-23.020	271.30	$X + R + 2H^+$	Şekil 4.16. (4)
26.940-27.740	424.05	a) $X + (L - H^+) + H_2O + 2H^+$ b) $X + (L - H^+) + R + H^+$	Şekil 4.16. (6)

Çizelge 4.9 Asetonitrilde çözülmüş serbest radikal yakalayıcının LC-MS sistemi sonuçları dikkate alınarak olduğu tahmin edilen yapılar

Alıkonma Zamani (dk)	M/Z Değerleri	Serbest Radikal Yakalayıcının LC-MS sonucu dikkate alınarak olduğu düşünülen yapısının formülü	Verinin alındığı şekil
2.500-3.480	227.15	2C	Şekil 4.17. (2)

Çizelge 4.10 Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 0. dk reaksiyon süresi (reaksiyonun başlaması ile birlikte) uygulanan işlem için LC-MS sistemi sonuçları dikkate alınarak olduğu tahmin edilen yapılar

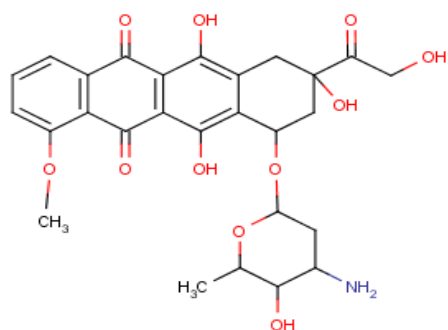
Alıkonma Zamani (dk)	M/Z Değerleri	Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisi ile oluşan olası yapıların formülleri	Verinin alındığı şekil
3.920-5.613	226.95	2C	Şekil 4.18. (2)
21.600-23.287	272.15	$X + R + 2H^+$	Şekil 4.18. (4)
22.000-22.980	1015.40	$4X + 4H^+$	Şekil 4.18. (6)
	759.05	3X	
24.493-27.567	610.45	$X + 3C + H_2O$	Şekil 4.18. (8)
	664.20	$X + 2(Y - H^+) + (L - H^+)$	
	1604.30	$5X + 2C + N + 3R + H^+$	
	1870.95	$5X + 5C + 2R$	
	532.10	$Z + 2C$	

Çizelge 4.11 Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 60. dk reaksiyon süresi (reaksiyonun başlaması ile birlikte) uygulanan işlem için LC-MS sistemi sonuçları dikkate alınarak oluştuğu tahmin edilen yapılar

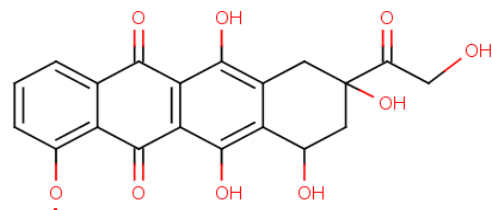
Alıkonma Zamanı (dk)	M/Z Değerleri	Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisi ile oluşan olası yapıların formülleri	Verinin alındığı şekil
16.787-17.453	227.10	2C	Şekil 4.19. (2)
16.787-17.453	607.30	$(Z - H^+) + X + 3R$	Şekil 4.19. (4)
21.733-23.513	1364.30	$3X + 4C + (L - H^+)$	Şekil 4.19. (6)

Çizelge 4.12 Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisinde 120. dk reaksiyon süresi (reaksiyonun başlaması ile birlikte) uygulanan işlem için LC-MS sistemi sonuçları dikkate alınarak oluştuğu tahmin edilen yapılar

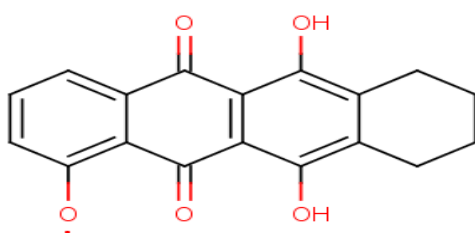
Alıkonma Zamanı (dk)	M/Z Değerleri	Serbest radikal yakalayıcı varlığında miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisi ile oluşan olası yapıların formülleri	Verinin alındığı şekil
4.053-6.053	227.15	2C	Şekil 4.20. (2)
	113.90	C	



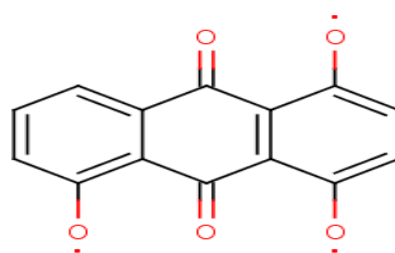
Doksorubisin “(A-H⁺) + (Y-H⁺) + R” Yapısı
(M_A=543.525 g/mol)



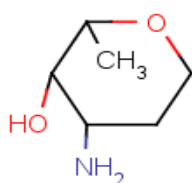
“A” Yapısı (M_A=399.331 g/mol)



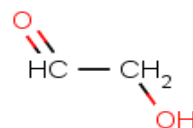
“Z” Yapısı (M_A=309.297 g/mol)



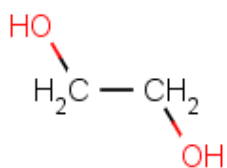
“X” Yapısı (M_A=253.189 g/mol)



“Y” Yapısı (M_A=131.175 g/mol)



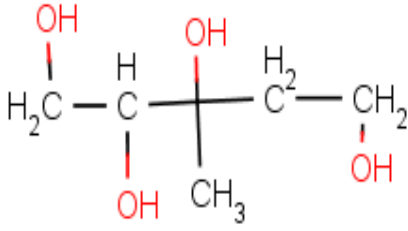
“M” Yapısı (M_A=60.052 g/mol)



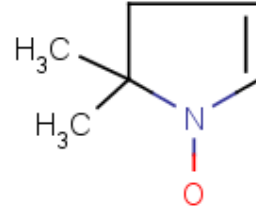
“N” Yapısı (M_A=62.068 g/mol)



“R” Yapısı (M_A=15.053 g/mol)



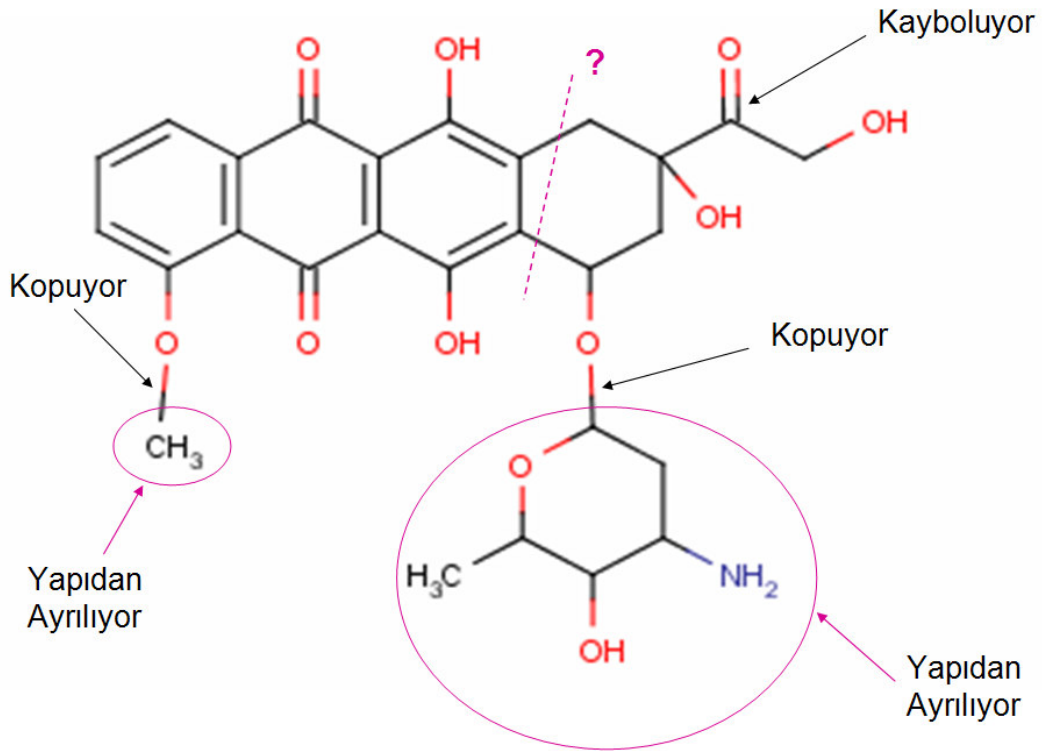
“L” Yapısı (MA=150.174 g/mol)



Serbest Radikal Yakalayıcı

“C” Yapısı (MA=113.664 g/mol)

Şekil 4.21 LC-MS sistemi sonuçlarının verildiği çizelgelerde simgelerle belirtilen olası yapıların açık formülleri.



Şekil 4.22 Miyeloperoksidazın Doksorubisine etkisi.

KAYNAKLAR

Alican, F., (1993), KANSER, AFA MATBAACILIK, İstanbul.

Arnhold, J., (2004), "Properties, Functions, and Secretion of Human Myeloperoxidase", Biochemistry (Moscow), Vol. 69, 4-9.

Arnold, D., R., Slack, E., J., Straubinger, M., R., (2004), "Quantification of Doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy", Journal of Chromatography B, 808, 141-152.

Berkarda, B., (2003), KAN HASTALIKLARI, İ. Ü. Basım ve Yayınevi Müdürlüğü, İstanbul.

Cutler, P., Ed. (2004), Protein Purification Protocols, Humana Press INC., Totova, New Jersey

Dunkern, R., T., Wedemeyer, I., Baumgärtner, M., Fritz, G., Kaina, B., (2003), "Resistance of p53 Knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling", DNA Repair, 2, 49-60.

Fiedler, J., T., Davey, A., C., and Fenna, E., R., (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.

Furtmüller, G., P., Zederbauer, M., Jantschko, W., Helm, J., Bogner, M., Jakopitsch, C., Obinger, C., (2006), "Active site structure and catalytic mechanisms of humanperoxidases", Archives of Biochemistry and Biophysics, 445, 199-213.

Gajewski, E., Gaur, S., Akman, A., S., Matsumoto, L., van Balgooy, A., N., J., Doroshow, H., J., (2007), "Oxidative DNA base damage in MCF-10A breast epithelial cells at clinically achievable concentrations of doxorubicin", BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, 73, 1947-1956.

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 a-hydroxytamoxifen", Cancer Letters.

Ghibaudi, E., Laurenti, E., (2003), "Unraveling the catalytic mechanism of lactoperoxidase and myeloperoxidase", Eur. J. Biochem. , 270, 4403–4412.

Kagan, E., V., Kuzmenko, I., A., Shvedova, A., A., Kisin, R., E., Li, R., Martin, I., Quinn, J., P., Tyurin, A., V., Tyurina, Y., Y., Yalowich, C., J., (2003), "Direct evidence for recycling of myeloperoxidase-catalyzed phenoxyl radicals of vitamin E homologue, 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-hydroxy chromane, by ascorbate/dihydrolipoate in living HL-60 cells", Biochimica et Biophysica Acta, 1620, 72-84.

Kuzu-Karsilayan, H., Eryılmaz, E., Yıllar, G., Deniz, G., Yanıkkaya-Demirel, G., (2002), "Spectrophotometric Determination of Leukocytes in Blood", Journal of Clinical Laboratory Analysis, 16, 1-4.

Lau, D., Baldus, S., (2006), "Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease", Pharmacology & Therapeutics, 111, 16-26.

- 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-binding¹", *Journal of Chromatography*, 831, 227-241.
- Liu, Y., Yang, Y., Liu, X., Jiang, T., (2007), "Quantification of pegylated liposomal doxorubicin and doxorubicinol in rat plasma by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy: Application to preclinical pharmacokinetic studies", *Talanta*, xxx, xxx-xxx (article in press).
- Nauseef, W., M., Olsson, I., Arnlijots, K., (1988), "Biosynthesis and processing of myeloperoxidase: a marker for myeloid cell differentiation", *Eur. J. Haematol.*, 40, 97-110.
- Pano, J., (2005), *CANCER: The Roles of Genes, Lifestyle & Environment*, Facts On File, Inc.
- Soyer, Z., Bas, M., Pabuccuoglu, A., Pabuccuoglu, V., (2005), "Synthesis of Some 2(3H)-Benzoxazolone Derivatives and their in-vitro Effects on Human Leukocyte Myeloperoxidase Activity", *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 338, 405-410
- White, J., S., Kasman, M., L., Kelly, M., M., Lu, P., Spruill, L., McDermott, J., P., Voelkel-Johnson, C., (2007), "Doxorubicin generates a proapoptotic phenotype by phosphorylation of elongation factor 2", *Free Radical Biology & Medicine*, 43, 1313-1321.
- Zederbauer, M., Furtmüller, G., P., Ganster, B., Moguilevsky, N., Obinger, C., (2007), "The vinyl-sulfonium bond in human myeloperoxidase: Impact on compound I formation and reduction by halides and thiocyanate", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356, 450-456.

İNTERNET KAYNAKLARI

- [1] <http://www.medicinenet.com/leukemia/page6.htm>
- [2] <http://www.losev.org.tr/turkce/t-losemi1.html>
- [3] http://www.leukemia-lymphoma.org/attachments/National/br_1172501426.pdf

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	06.07.1981
Doğum yeri	Kardjali/Bulgaristan
Lise	1996-2000 Orhan Cemal Fersoy Lisesi
Lisans	2000-2004 Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	2005- Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı