

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ SENTEZLENEN MELATONİN ANALOGLARININ AROMATAZ
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Programı

Doktora Tezi

Uzm. Veteriner Hekim
Senem ÖZCAN SEZER

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN

İZMİR
2016

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ SENTEZLENEN MELATONİN ANALOGLARININ AROMATAZ
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Programı

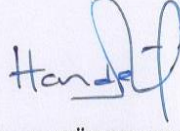
Doktora Tezi

Uzm. Veteriner Hekim
Senem ÖZCAN SEZER

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN

İZMİR
2016

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ



Başkan : Prof. Dr. Hande GÜNER ORHAN

(Danışman) Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji AD



Üye : Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji AD



Üye : Prof. Dr. Sibel SÜZEN

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya AD



Üye : Prof. Dr. Hilmi ORHAN

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji AD



Üye : Doç. Dr. Atilla AKDEMİR

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: 19.07.2016

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca bana yol gösteren, tez konumun seçilmesinde ve çalışmalarım süresince sabırla her an beni destekleyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Hande Gürer Orhan'a en içten dileklerle teşekkür ederim. Doktora eğitimime katkıda bulunan Prof. Dr. Ferzan Lermioğlu Erciyas ve Prof. Dr. Hilmi Orhan'a teşekkür ederim.

Bu çalışma kapsamında test maddelerinin sentezleyen Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya A.D. öğretim üyesi Prof.Dr.Sibel Süzen'e ve test maddelerimin *in silico* değerlendirmesini yapan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji A.D öğretim üyesi Doç.Dr.Atilla Akdemir'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımızda kullandığımız MCF-7/BUS hücre hattını gönderdiği için Ana M. Soto'ya teşekkür ederim.

Çalışma arkadaşlarım Eczacı Elif İnce, Eczacı Alev Taşçıoğlu ve Eczacı Merve Nenni'ye teşekkür ederim. Ayrıca hayatım boyunca maddi ve manevi her zaman beni destekleyen başta anneme, babama, kardeşime, eşim Cavit Sezer'e ve yine manevi desteklerini benden esirgemeyen Rasih Kocagöz'e, İnci Ülkü Çelikel'e, Hüseyin Çakıroğlu'na ve Sinan Okçuoğlu'na çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması 108S202 nolu TÜBİTAK projesi ve 11/ECZ/003 nolu E.Ü. Bilimsel Araştırma projesi ile desteklenmiştir.

İzmir 2016

Senem Özcan Sezer

ÖZET

Yeni Sentezlenen Melatonin Analoglarının Aromataz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Endokrin bozucu (EB) terimi, sağlıklı organizmada veya gelecek nesillerinde advers sağlık etkilerine, endokrin fonksiyonlarda değişikliklere sebep olan ekzojen maddeleri tanımlar. EB bir kimyasal madde hormon reseptörleri ile etkileşerek agonist ya da antagonist etki gösterebileceği gibi steroid hormonların biyosentez ve metabolizma yollarında yer alan enzimlerle etkileşerek fizyolojik hormon düzeylerini değiştirmek yoluyla da etkisini gösterebilmektedir. Dünyada kadınlar arasında insidansının arttığı ve kansere bağlı ölümlerde ilk sırada yer aldığı belirlenen meme kanserinin tedavisinde de bu yaklaşımlardan faydalanılmaktadır. Meme dokusunda yüksek oranda bulunan aromataz enziminin inhibe edilerek östrojenin özellikle postmenopozal dönemde lokal üretiminin engellenmesi hormon bağımlı (östrojen reseptör pozitif; ER+) meme kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda indol yapılı bir hormon olan melatoninin aromataz enzimini inhibe ettiği ve ER (+) meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu engellediği saptanmıştır. Bu tez kapsamında yeni sentezlenen indol türevi melatonin analoglarının aromataz aktivitesi üzerine etkileri iki farklı yöntem ile araştırılmıştır. Bunlardan ilki doğrudan aktivite ölçümü olup floresans substrat ve rekombinant insan enziminin kullanıldığı, enzim aktivitesinin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanan *in vitro* bir hızlı tarama testidir. İkinci yöntem ise insan meme kanseri hücresi olan MCF-7 BUS hücrelerinin östrojensiz ortamda testosteron varlığında proliferasyonu değerlendirilerek enzim aktivitesinin dolaylı olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Öncelikle her iki yöntemin duyarlılığı ve ölçüm başarısı bilinen aromataz inhibitörleri kullanılarak değerlendirilmiş, yöntemlerin laboratuvarımızda kısmi validasyonları yapılmıştır. Ardından yeni sentezlenen melatonin analoglarının olası aromataz inhibitör etkinliği hızlı tarama testi ile araştırılmıştır. Bulgular *in silico* yöntemi ile enzime bağlanmanın özellikleri ortaya konmuştur. Hızlı tarama testi ile aromataz etkileri belirlenen maddelerin (hit) olası etkileri hücre temelli *in vitro* test ile de araştırılmıştır. Bulgularımız hücre içermeyen ve hücre temelli her iki yöntemin de aromataz inhibisyonunu değerlendirmede başarılı olduğunu ancak aktivitenin dolaylı

ölçümünde testi etkileyen birden fazla faktörün bulunduğunu, bunların da değerlendirilmesi ile sağlıklı yorum yapılabileceğini göstermiştir. Tüm bulgular değerlendirildiğinde yeni sentezlenen analoglar arasından aromataz inhibitörü olduğu belirlenenler yeni etkin madde olarak önerilebileceği için ilaç keşif çalışmalarında erken dönem toksisite göstergesi olarak kullanılan sitotoksik etkileri de araştırılmıştır. İnsan meme kanseri hücreleri (MCF-7 BUS) ve sağlıklı over hücrelerinde (Çin hamster over-CHO-K1) canlılık üzerine etkileri araştırılan tüm analoglar arasından 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (3-klorofenil) hidrazon (M5) ve 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (4-klorofenil) hidrazon (M6)'un sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki göstermeksizin aromataz enzim inhibitörü etkileri olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak bu bileşiklerin, özellikle postmenopozal dönemdeki kadınlarda, ER (+) insan meme kanseri hücrelerinin gelişim ve çoğalmasını önlemek suretiyle yeni etkin madde adayı olabilecekleri düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Endokrin bozucular; Aromataz enzimi; ER (+); Meme kanseri; Aromataz inhibitörü, Melatonin

ABSTRACT

Investigation of The Effects of Newly Synthesized Melatonin Analogues on Aromatase Activity

Endocrine disruptors (EDs) are exogenous substances or mixtures that alter function of endocrine system and consequently cause adverse health effects in an intact organism, or subpopulation. An ED can either interact with receptors and act as an estrogen receptor agonist/antagonist or modulate enzymes that involve in biosynthesis and metabolism of steroid hormones and alter physiologic levels of hormones. These mechanisms of ED actions are also used as therapeutical approaches in breast cancer which is the leading cancer site in women and is the leading cause of death among female cancers. Aromatase, a CYP enzyme highly expressed in the breast tissue and responsible for the local estrogen synthesis especially in postmenopausal women, can be inhibited as a treatment strategy in hormone dependent (estrogen receptor positive; ER +) breast cancer therapy. Recent data show that melatonin, an indolic hormone, inhibits aromatase activity and decreases ER (+) breast cancer cell proliferation. In the present study aromatase inhibitory activity of newly synthesized indol derivative melatonin analogues is investigated with two different assays. The first one is a high throughput screening assay where a fluorescence substrate and recombinant human enzyme is used and the enzyme activity is detected directly by spectrophotometer. In the second assay enzyme activity is indirectly evaluated via proliferation of the MCF-7 BUS cells in an estrogen-free medium in the presence of testosterone. First of all the sensitivity and performance of both assays were evaluated by testing known aromatase inhibitors and partial validation of the methods was performed. Potential aromatase inhibitory effect of newly synthesized indole derivatives were investigated by high throughput screening test. The putative ligand-protein binding interactions of the experimentally confirmed hits were investigated with docking studies. The hits that are determined by high throughput screening was further analysed in cell-based indirect measurement assay. Our findings suggest that both assays, cell-free and cell based are successful in evaluating aromatase inhibitory activity but there are many factors affecting the indirect measurement assay and a reliable evaluation can be made after evaluating all these confounding factors. Gathering all data we obtained, some newly synthesized indole derivatives can be suggested as novel active

substances and therefore their cytotoxicity potential is also evaluated as an early stage toxicity indicator. Their cytotoxic potential is investigated both in human breast cancer cells (MCF-7 BUS) and healthy over cells (Chinese hamster ovary-CHO-K1). Among all tested compounds 2-methyl-1-H-indole-3-carboxyaldehyde (3-chlorophenyl) hydrazone (M5) and 2-methyl-1-H-indole-3- carboxyaldehyde (4-chlorophenyl) hydrazone (M6) were found to have no cytotoxic effects in healthy cells but have aromatase inhibitory potential. As a result these two compounds can be suggested as new therapeutic candidates in preventing development and progression of ER (+) human breast cancer, especially in postmenopausal women.

Key Words: Endocrin distrupters; Aromatase enzyme; ER (+); Breast cancer; Aromatase inhibitor, Melatonin

İçindekiler

	Sayfa
Değerlendirme Kurulu Üyeleri.....	III
Önsöz.....	IV
Özet.....	V
Abstract.....	VII
Tablolar dizini.....	XV
Şekiller Dizini.....	XVI
Kısaltmalar.....	XVIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. GENEL BİLGİLER.....	3
1.1.1. ENDOKRİN SİSTEM.....	3
1.1.1.1. Endokrin Bozucular Nelerdir?.....	7
1.1.1.2. Endokrin bozucuların etki mekanizmaları nelerdir?.....	8
1.1.1.3. Endokrin Bozucuları Tayin Yöntemleri.....	11
1.1.1.3.1. <i>İn Vitro</i> Analizler.....	15
1.1.1.3.1.1. Reseptör Bağlanma Analizi.....	16
1.1.1.3.1.2. Transaktivasyon Analizleri.....	17
1.1.1.3.1.3. Hücre proliferasyon yöntemi...	18
1.1.1.3.1.4. Steroidojenez ve Aromataz Aktivitesi.....	18
1.1.1.3.2. <i>İn Vivo</i> Analizler.....	19
1.1.1.3.2.1. Uterotrofik Analiz.....	19
1.1.1.3.2.2. Hershberger Testi.....	20
1.1.1.4. Endokrin Bozucular ve Aromataz.....	20
1.1.2. KANSER TEDAVİSİNDE ANTIÖSTROJENİK YAKLAŞIMLAR	22
1.1.2.1. Selektif Östrojen Reseptör Modülatörleri (SERM'ler).....	22
1.1.2.1.1. Tamoksifen.....	24
1.1.2.1.2. Raloksifen.....	26

	Sayfa
1.1.2.2. Selektif Östrojen-Reseptör Baskılayıcıları (SERD).....	26
1.1.2.2.1. Fulvestran.....	27
1.1.2.3. Selektif Östrojen Enzim Modülatörleri (SEEM)..	27
1.1.2.4. Aromataz İnhibisyonu ve İnhibitörleri.....	28
1.1.2.4.1. Aminoglutetimid.....	30
1.1.2.4.2. Anastrozol.....	31
1.1.2.4.3. Letrazol.....	31
1.1.2.4.4. Eksemestan.....	32
1.1.2.4.5. Aromataz inhibitörlerinin diğer yararlı etkileri.....	32
1.1.3. AROMATAZ AKTİVİTESİ TAYİN YÖNTEMLERİ...	34
1.1.3.1. Aromataz Aktivitesi Ölçüm Yöntemleri.....	34
1.1.3.1.1. Ürün İzolasyon Yöntemi.....	34
1.1.3.1.2. Radyometrik Yöntem.....	34
1.1.3.2. Aromataz İnhibitörleri Çalışmaları İçin <i>İn Vitro</i> Model Sistemler.....	35
1.1.3.2.1. İnsan Plasental Mikrozomal Aromatazın Aktivite Tayini.....	35
1.1.3.2.2. İnsan Hücre Kültürü Sistemleri İle Aromataz Aktivitesi Tayini.....	35
1.1.3.2.3. Aromataz Aktivitesinin Tayininde Kullanılan Diğer <i>İn Vitro</i> Yöntemler.....	36
1.1.3.3. Aromataz İnhibitörü Çalışmaları İçin <i>İn Vivo</i> Model Sistemler.....	36
1.1.3.3.1. Östrojen sentez ve üretiminin inhibisyonunun saptanması.....	37
1.1.3.3.2. Gebe kısırak serum gonadotropini (PMSG) uygulanmış sıçan modeli.....	37
1.1.3.3.3. Normal siklustaki kemiriciler.....	37
1.1.3.3.4. Aromataz <i>knockout</i> modeller.....	38

	Sayfa
1.1.3.3.5. Aromataz İnhibisyonunun Antitümör Etkinliğinin Tespiti İçin Modeller.....	38
1.1.3.3.6. Postmenapozal Meme Kanseri İçin Modeller.....	38
1.1.4. MELATONİN.....	39
1.1.4.1. Melatoninin Terapötik Etkinliği ve Meme Kanserindeki Rolü.....	39
1.1.4.2. <i>İn vitro</i> çalışmalar.....	42
1.1.4.3. <i>İn vivo</i> çalışmalar.....	45
1.1.4.4. İnsan Çalışmaları.....	45
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	46
2.1 GEREÇ.....	46
2.1.1 Kullanılan Kimyasallar.....	46
2.1.2 Kullanılan Gereçler.....	47
2.1.3 Analiz Edilen Melatonin Analogları.....	48
2.1.3.1. M maddeleri	48
2.1.3.2. CH Maddeleri.....	52
2.1.3.3. HD maddeleri.....	56
2.1.4 Kullanılan Çözeltiler.....	60
2.1.4.1. Doğrudan Aktivite Ölçüm Yönteminde Kullanılan Çözeltiler.....	60
2.1.4.1.1. Test kiti bileşenleri.....	60
2.1.4.1.1.1. NADPH-Kofaktör karışımı.....	60
2.1.4.1.1.2. Durdurucu çözelti	60
2.1.4.1.1.3. MFC çözeltisi.....	61
2.1.4.1.1.4. KTZ çözeltisi.....	61
2.1.4.1.1.5. HFC.....	61
2.1.4.1.1.6. Enzim-substrat karışımı.....	61
2.1.4.1.2. Test Maddelerinin Hazırlanması.....	61
2.1.4.2. Dolaylı Aktivite Ölçüm Yönteminde Kullanılan Besi Ortamı ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	61

	Sayfa
2.1.4.2.1. Tam Büyüme Besi Ortamı (complete growth medium).....	61
2.1.4.2.2. Hormon İçermeyen Besi Ortamı	62
2.1.4.2.3. MTT Boyasının Hazırlanması.....	62
2.1.4.2.4. Stok 17- β Östradiolün Hazırlanması.....	62
2.1.4.2.5. Stok Ketokonazol Hazırlanması.....	62
2.1.4.2.6. Stok Testosteronun Hazırlanması.....	62
2.1.4.2.7. Stok Fulvestranın Hazırlanması.....	62
2.1.4.2.8. Melatonin Çözeltilerinin Hazırlanması...	63
2.1.4.2.9. Hücre Canlılığının ATP ölçüm Yöntemi ile Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	63
2.1.4.2.10. Test Maddelerinin Hazırlanması.....	63
2.1.4.3. Sitotoksisite ölçüm yönteminde kullanılan çözeltiler.....	63
2.1.4.3.1. CHO-K1 Hücre Hattı için Besi Ortamının Hazırlanması.....	63
2.1.4.3.2. Test Maddelerinin Hazırlanması.....	64
2.2. YÖNTEMLER.....	64
2.2.1 Doğrudan Aktivite Ölçüm Yöntemi.....	64
2.2.2 Dolaylı Aktivite Ölçüm Yöntemi.....	64
2.2.2.1. MCF-7 BUS Rutin Hücre Kültürü.....	65
2.2.2.2. Hücre Sayımı ve Mikroplakaya Hücre Ekimi.....	65
2.2.2.3. Dolaylı Aktivite ölçüm yöntemi	65
2.2.2.4. Hücre Canlılığının MTT Yöntemi ile Belirlenmesi.....	66
2.2.2.5. Hücre Canlılığının ATP Ölçüm Yöntemi ile Belirlenmesi.....	66
2.2.3 Sitotoksisite ölçüm yöntemi	67
2.2.3.1. CHO-K1 Hücrelerinde Sitotoksisite Değerlendirilmesi.....	67
2.2.3.2. MCF-7 BUS Hücrelerinde Sitotoksisite Değerlendirilmesi.....	68

	Sayfa
2.2.4 Moleküler Modelleme ile Yapı-Aktivite Çalışması.....	68
2.2.5 İstatistiksel Değerlendirme.....	69
3. BULGULAR.....	70
3.1. YÖNTEMLERİN LABORATUVAR KOŞULLARINA UYARLANMASI İLE İLGİLİ BULGULAR.....	70
3.1.1 Doğrudan Aktivite Ölçüm Analizinin Kısmi Validasyonu.....	70
3.1.1.1. Standart Maddelerin IC ₅₀ Değerleri.....	70
3.1.1.2. Doğrudan Aktivite Ölçüm Analizinin “Analiz İçi ve Analizler Arası” Tekrarlanabilirliği.....	71
3.1.2 Dolaylı Aktivite Ölçüm Analizinin Validasyonu.....	71
3.1.2.1. Hücre Canlılığının MTT Yöntemi ile Belirlenmesi	71
3.1.2.1.1. Standart Maddeler ile Yöntemin Yürütülmesi ve Ketokonazolün IC ₅₀ Değeri	71
3.1.2.1.2. Dolaylı Aktivite Yönteminin “Analiz İçi ve Analizler Arası” Tekrarlanabilirliği.....	74
3.1.2.2. Hücre Canlılığının ATP Ölçüm Yöntemi ile Belirlenmesi.....	75
3.1.2.2.1. Standart Maddeler ile Yöntemin Yürütülmesi.....	75
3.1.3 Sitotoksosite Testinin Kısmi Validasyonu.....	76
3.1.3.1. Sitotoksitenin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi.....	76
3.1.3.2. Sitotoksitenin ATP Ölçüm Yöntemi ile Belirlenmesi.....	78
3.2. MELATONİN VE ANALOGLARININ AROMATAZ İNHİBİTÖR ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI.....	80
3.2.1 Doğrudan Aktivite Ölçüm Yöntemi ile Tarama Çalışmaları.....	80
3.2.2 Melatonin Analoglarının IC ₅₀ Değerlerinin Hesaplanması.....	82
3.3. MOLEKÜLER MODELLEME (İN SILICO) ÇALIŞMA SONUÇLARI.....	85

3.4. MELATONİN VE ANALOGLARININ DOLAYLI AKTİVİTE YÖNTEMİ İLE AROMATAZ İNHİBİTÖR ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI.....	87
3.5. SİTOTOKSİSİTE ÖLÇÜM YÖNTEMİ BULGULARI.....	91
3.5.1 MCF-7 BUS Hücrelerinde Sitotoksik Etkinin Değerlendirilmesi.....	91
3.5.2 CHO-K1 Hücrelerinde Sitotoksik Etkinin Değerlendirilmesi.....	94
4. TARTIŞMA.....	97
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	109
6. KAYNAKLAR.....	110
ÖZGEÇMİŞ.....	132

Tablolar Dizini

	Sayfa
Tablo 1.1. Omurgalılarda kimyasal düzenleyiciler, kaynakları, hedefleri ve etkileri.....	3
Tablo 1.2. I. Basamak Test paketi içerisinde yer alan <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> testler.....	12
Tablo 1.3. Endokrin bozucu kimyasalların test edilmesi ve değerlendirilmesi için OECD tarafından hazırlanan kavramsal çerçeve.....	13
Tablo 1.4. Başlıca SERM'lerin kimyasal sınıfı, ticari ismi ve üretici firması.....	24
Tablo 1.5. Tamoksifenin bazı hastalıklarda kullanımı ve etkileri.....	25
Tablo 1.6. Aromataz inhibitörlerinin sınıflandırması.....	29
Tablo 1.7. Tamoksifenin bazı hastalıklarda kullanımı ve etkileri.....	34
Tablo 2.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	46
Tablo 2.2. Kullanılan gereçler.....	47
Tablo 3.1. Ketokonazolün literatürde yer alan ve doğrudan aktivite ölçüm analizinde elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	70
Tablo 3.2. Doğrudan aktivite ölçüm analizinin “analiz içi ve analizler arası” tekrarlanabilirliği.....	71
Tablo 3.3. Bazı önemli deney gruplarının aynı gün içinde dört farklı kuyucuktan elde edilen değerler ile hesaplanan analiz içi tekrarlanabilirlik düzeyleri.....	75
Tablo 3.4. Bazı önemli deney grupları için dört farklı günde yapılan çalışmadan elde edilen analizler arası tekrarlanabilirlik düzeyleri.....	75
Tablo 3.5. Referans maddenin uygulandığı dört farklı hücre kuyucuğundan elde edilen analiz içi tekrarlanabilirlik düzeyleri.....	78
Tablo 3.6. Referans madde için için üç farklı günde yapılan çalışmadan elde edilen analizler arası tekrarlanabilirlik düzeyleri.....	78
Tablo 3.7. Doğrudan aromataz enzim aktivitesi analizi ile elde edilen melatonin analoglarına ait IC ₅₀ değerleri.....	83

Şekiller Dizini

	Sayfa
Şekil 1.1. İnsan vücudunda bulunan endokrin bezler.....	6
Şekil 1.2. İnsan meme dokusunda östrojenlerin biyosentezindeki steroidojenik yolak.....	10
Şekil 1.3. Aromataz enzim reaksiyonu.....	21
Şekil 1.4. 17-Beta östradiolün etki mekanizması.....	23
Şekil 1.5. İnsan hormon bağımlı meme kanser hücrelerinde SEEM tedavi yaklaşımı.....	28
Şekil 1.6. Aromataz inhibitörlerinin farklı sınıflandırılması.....	29
Şekil 1.7. Melatonin kullanımının klinik önemi.....	40
Şekil 1.8. Meme kanserinin östrojen aracılıklı gelişiminde melatoninin etki edebildiği nöroendokrin mekanizmalar.....	42
Şekil 3.1. Ketokonazolün aromataz enzimi üzerine inhibitör etkisi ve IC ₅₀ değeri.....	70
Şekil 3.2. MCF-7 BUS hücrelerinin östradiol (E2), testosteron (TES), östrojen reseptör antagonisti fulvestran (FLV) ve bilinen aromataz inhibitörü ketokonazole (KTZ) yanıtının değerlendirilmesi.....	72
Şekil 3.3. Testosteron (TES), 100 µM aminoglutetimid (AG)'in MCF- 7 BUS hücrelerinde hücre proliferasyonuna etkileri.....	73
Şekil 3.4. Ketokonazolün (KTZ), 10 µM testosteron (TES) varlığında, MCF-7 BUS hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri.....	74
Şekil 3.5. Ketokonazolün dolaylı aromataz aktivite deneyinde aromataz inhibe edici etkisi ve IC ₅₀ değeri.....	74
Şekil 3.6. MCF-7 BUS hücrelerinde dolaylı aromataz aktivitesinin ATP ölçümü ile değerlendirilmesi.....	76
Şekil 3.7. Triton X-100'ün MCF-7 BUS hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	77
Şekil 3.8. Triton X-100'ün CHO-K1 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	77
Şekil 3.9. MCF-7 BUS hücrelerinde hücre canlılığının ATP ölçümü ile değerlendirilmesi.....	79
Şekil 3.10. CHO-K1 hücrelerinde hücre canlılığının ATP ölçümü ile değerlendirilmesi.....	79
Şekil 3.11. Melatoninin (MLT) aromataz aktivitesi üzerine etkisi.....	80
Şekil 3.12. 2-metilindol yapısındaki maddelerin(M) 100 µM konsantrasyonda aromataz aktivitesi üzerine etkileri.....	81
Şekil 3.13. 4-florofenilindol yapısındaki maddelerin (CH) 100 µM konsantrasyonda aromataz aktivitesi üzerine etkileri	81
Şekil 3.14. 1-metilindol yapısındaki maddelerin (HD) 100 µM konsantrasyonda aromataz aktivitesi üzerine etkileri	82

	Sayfa
Şekil 3.15. Yeni sentezlenen melatonin analoglarına ait enzim inhibisyon grafikleri ve IC ₅₀ değerleri.....	84
Şekil 3.16. Tek dozda tarama çalışmalarında inhibitör olduğu gözlenip doza bağımlı anlamlı bir inhibisyon paterni göstermedikleri bulunan M14, M20, CH11 ve CH14 maddelerine ait enzim inhibisyon grafikleri.....	85
Şekil 3.17. M6 bileşiğinin aromataz enziminin aktif bölgesindeki bağlanma pozisyonu.....	86
Şekil 3.18. M5 bileşiğinin aromataz enziminin aktif bölgesindeki bağlanma pozisyonu.....	87
Şekil 3.19. Melatoninin (MLT), MCF-7 BUS hücrelerinde aromataz aktivitesi üzerine etkisinin dolaylı olarak değerlendirilmesi.....	87
Şekil 3.20. Bileşiklerin 10 µM konsantrasyonda ve testosteron (TES) varlığında MCF-7 BUS hücrelerinde aromataz aktivitesi üzerine etkisinin dolaylı olarak değerlendirilmesi.....	88
Şekil 3.21. Bileşiklerin yedi farklı konsantrasyonda (0,5-32 µM) testosteron (TES) varlığında MCF-7 BUS hücrelerinde aromataz aktivitesi üzerine etkisinin dolaylı olarak değerlendirilmesi.....	90
Şekil 3.22. Yeni sentezlenen melatonin analoglarından M5 ve M6 maddelerine ait dolaylı aktivite ölçüm yöntemi ile bulunan IC ₅₀ değerleri ve enzim inhibisyon grafikleri.....	90
Şekil 3.23. Melatoninin MCF-7 BUS hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri.....	91
Şekil 3.24. Maddelerin MCF-7 BUS hücreleri üzerindeki uzun süreli (5 günlük) sitotoksik etkisi.....	92
Şekil 3.25. MCF-7 BUS hücrelerinde CH 16 maddesi ile inkubasyon sonrasında gözlenen sitotoksik etki.....	92
Şekil 3.26. Bileşiklerin yedi farklı konsantrasyonda (0,5-32 µM) MCF-7 BUS hücreleriyle 5gün inkubasyon sonucu hücre canlılığının değerlendirilmesi.....	94
Şekil 3.27. Melatoninin CHO-K1 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri.....	95
Şekil 3.28. Doğrudan aktivite ölçüm yönteminde etkili olduğu saptanan ve tekrarlanabilirliği düşük olan melatonin analoglarının 2 ve 10 µM konsantrasyonlarda CHO-K1 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri.....	96
Şekil 3.29. Doğrudan aktivite ölçüm yönteminde etkili olduğu saptanan ve tekrarlanabilirliği yüksek olan melatonin analoglarının 2 ve 10 µM konsantrasyonlarda CHO-K1 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri.....	96
Şekil 4.1. İlaç keşif ve geliştirme sürecinde <i>in vitro</i> etkinlik ve toksisite testlerinin yeri.....	97

Kısaltmalar

ACTH	Kortikotropin
AF-1	Aktivasyon fonksiyonu-1
AF-2	Aktivasyon fonksiyonu-2
AG	Aminoglutetimid
AhR	Aromatik hidrokarbon reseptörü
AI	Aromataz inhibitörleri
ANP	Atrial natriüretik peptit
ARKO	Aromataz-knockout
AR	Androjen reseptörü
ASD	4-androsten-3-17-dion
AVP	Arjinin vazopresin
AVT	Arjinine vazotosin
BAF	Meme adipoz fibroblastı
BPA	Bisfenol A
Ca ⁺²	Kalsiyum
CAF	Meme kanseri ile birlikteki fibroblastlar
Cd	Kadmiyum
CD-FBS	%10 aktif kömür-dekstran uygulanmış fõtal sığır serumu
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribo nükleik asit
CHO-K1	Çin hamsteri over hücreleri
CRH	Kortikotropin salıcı hormon
CYP450	Sitokrom P450
CYP19-CYP19A- CYP19A1	Aromataz
DHC	1,25-dihidroksikolekalsiferol
DDT	Dikloro difenil trikloroetan
DES	Dietilstilbestrol
DHT	Dihidrotestosteron
DMBA	Dimetilbenzantrasen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit

E	Epinefrin
E2	17- β östradiol
EB	Endokrin bozucu
EDSTAC	Endokrin Bozucular Tarama ve Test Danışma Kurulu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
ER	Östrojen reseptörü
ER (+)	Östrojen reseptörü pozitif
ER-CALUX	Östrojen reseptör aracılıklı kimyasal aktive edilmiş lusiferaz gen ekspresyonu
ERE	Östrojene yanıt veren element
EtOH	Etanol
GnRH	Gonadotropin salıverici hormon
G6PDH	Glikoz 6-fosfat Dehidrogenaz
GH	Büyüme hormonu
GH-RH	Somatokrinin
GIP	Glukoz bağımlı insülinotropik peptit
FBS	Fötal sığır serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FSH	Folikül sitümüle edici hormon
HFC	7-Hidroksitri fluoromeilkumarin
Hg	Civa
HTS	High throughput screening, (<i>In vitro</i> yüksek hızlı tarama testleri)
Huvec	Umblikal ven endotel hücreleri
IARC	Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı
IC ₅₀	İnhibitör konsantrasyon 50
IGFs	İnsulin benzeri büyüme faktörü
K+	Potasyum
KTZ	Ketokonazol
LH	Luteinize edici hormon
MT ₁	Melatonin reseptörü 1
MT ₂	Melatonin reseptörü 2

MEM-NEAA	%1 minimum temel ortam-esansiyel olmayan amino asit
MCF-7 BUS	İnsan meme kanseri hücresi
MFC	7-metoksi-triflorometilkumarin
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MSH	Melanotropin
MTT	[3(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür]
MVLN	MCF-7 hücrelerinden türetilmiş biyoluminesans hücre hattı
NE	Norepinefrin
NMU	Nitozometik üre
OECD	Ekonomik kalkınma ve iş birliği örgütü
OXY	Oksitosin
PAH	Polinükleer aromatik hidrokarbon
PBB	Polibromlubifenil
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PCB	Poliklorlubifenil
PCDD	Poliklorlu dibenzo-p-dioksin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PMSG	Gebe kısırak serum gonadotropini
PR	Progesteron reseptörü
PRIH = dopamin, DA	Prolaktin salıcı-inhibe edici hormon
PRL	Prolaktin
PTH	Paratiroid hormonu
SERD	Selektif Östrojen-Reseptör Baskılayıcıları
SERM	Selektif Östrojen Reseptör Modülatörü
SEEM	Selektif Östrojen Enzim Modülatörü
SS = GH-RIH	Somatostatin
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin
T3	Triiodotironin
T4	Tiroksin -Tetraiodotironin
Tip-1	Steroida inaktivatör
Tip-2	Nonsteroida inhibitör
TRH	Tirotropin salıcı hormon
TSH	Tirotropin

T47D

VIP; PRH

İnsan meme kanseri hücresi

Vazoaktif intestinal peptit



1.GİRİŞ

Endokrin sistem ve sinir sistemi vücudun iki ana iletişim sistemidir. Sinir sisteminde sinir hücresi boyunca elektriksel iletim söz konusu iken, endokrin sistemde hormonlar salgı bezleri tarafından salgılanırlar ve kimyasal haberciler olarak tüm vücudu dolaşarak uygun reseptöre sahip hücrelere sinyal iletirler. Hipofiz bezi, tiroid ve adrenal bez ile dişilerde overler ve erkeklerde testisler, endokrin sistemin ana bileşenleridir. Endokrin sistem, ergenlik döneminden ileri yaşlara kadar beyin, sinir sistemi ve üreme sisteminin büyüme ve fonksiyonlarının gelişimi, metabolizma ve kan şeker seviyesi gibi vücutta gerçekleşen tüm biyolojik süreçler düzenlemektedir. Bu nedenle, endokrin bozukluklar potansiyel olarak vücutta yaygın etkiler oluşturlar.

Endokrin bozucu (EB) terimi, sağlıklı organizmada veya gelecek nesillerinde advers sağlık etkilerine, endokrin fonksiyonlarda değişikliklere sebep olan ekzojen maddeleri tanımlar. Her ne kadar endokrin sistem bileşenlerinden herhangi birinde değişikliğe neden olan kimyasal madde EB olarak tanımlansa da bugün bu kavram en çok östrojenik/antiöstrojenik ya da androjenik/antiandrojenik etkileri ifade etmek için kullanılmaktadır.

Poliklorlubifeniller (PCBler), polibromlubifeniller (PBBler), dioksin, alkilfenol gibi çeşitli endüstriyel kimyasallar, pestisitler, farmasötikler (dietilstilbestrol, tamoksifen vb.), fitoöstrojenler, besin antioksidanları (bütillenmiş hidroksianisol) gibi sentetik ve doğal birçok bileşik EB olarak bilinmektedir. Bu bileşikler etkilerini gerek östrojen reseptörü (ER) ile etkileşerek, gerekse ER'den bağımsız mekanizmalar ile meydana getirebilmektedirler.

EB bir kimyasal madde farklı dokularda reseptörler ile etkileşerek östrojen reseptör agonisti ya da antagonisti (Selektif Östrojen Reseptör Modülatörü -SERM) etki gösterebileceği gibi steroid hormonların biyosentez ve metabolizma yollarında yer alan enzimlerle etkileşerek (Selektif Östrojen Enzim Modülatörü -SEEM) fizyolojik hormon düzeylerini azaltmak ya da arttırmak şeklinde de etkisini gösterebilmektedir. Bu mekanizmalar bazı kimyasalların istenmeyen etkilerine aracılık ettiği gibi bazı hormon ilişkili hastalıkların tedavisi için farmasötiklerin geliştirilmesinde de hedef olarak kullanılabilir. Dünyada kadınlar arasında insidansının arttığı ve kansere bağlı ölümlerde ilk sırada yer aldığı belirlenen meme kanserinin tedavisinde bu yaklaşımlardan faydalanılmaktadır. SEEM yaklaşımı kapsamında, meme dokusunda yüksek oranda bulunan ve lokal östrojen sentezinden

sorumlu aromataz enziminin inhibe edilmesi hormon bağımlı (ER pozitif) meme kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda melatonin hormonunun aromataz enzimini inhibe ettiği ve ER pozitif (ER +) meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu engellediği saptanmıştır. Melatoninin vücutta sınırlı miktarda üretildiği ve vücutta yarılanma ömrünün çok kısa olduğu göz önüne alındığında daha uzun ömürlü melatonin analoglarının ER (+) meme kanserinde tedavi edici etkilerinin araştırılması önem kazanmaktadır.

Bu tez kapsamında yeni sentezlenen melatonin analoglarının aromataz aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Aromataz aktivitesi üzerine etkilerin belirlenmesi amacıyla laboratuvarımızda iki farklı yöntem kullanılmıştır. Bunlardan ilki floresans substrat ve rekombinant insan enziminin kullanıldığı spektrofotometrik olarak doğrudan enzim aktivitesinin ölçülmesine dayanan bir yöntemdir. İkinci yöntem ise ER (+) insan meme kanseri hücresi olan MCF-7 BUS hücrelerinin östrojensiz ortamda testosteron varlığında proliferasyonu değerlendirilerek enzim aktivitesinin dolaylı olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Yöntemlerin her ikisi de *in vitro* test olup hızlı ve kolay uygulanabilir olmaları nedeniyle orta hızlı taramaya da uygundur. Öncelikle her iki yöntemin duyarlılığı ve ölçüm başarısı bilinen aromataz inhibitörleri (AI) kullanılarak değerlendirilmiş, yöntemlerin laboratuvarımızda kısmi validasyonları yapılmıştır. Takiben yeni sentezlenen melatonin analogu indol türevi bileşiklerin aromataz enzimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu aşamada moleküler (*in silico*) modelleme yöntemi ile moleküllerin aromataz enzimine bağlanma ve olası inhibitör etkinlikleri araştırılmış ve doğrudan aktivite ölçüm yöntemi bulguları ile karşılaştırılarak moleküler modellemenin öngörülse toksikolojide yeri ve gücü belirlenmeye çalışılmıştır. Aromataz inhibitör etkinlik zaman zaman istenmeyen, endokrin bozucu bir etki olarak karşımıza çıksa da meme kanseri tedavisinde terapötik amaçla bu etkiye sahip bileşikler kullanılmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında aromataz inhibitör potansiyeline sahip olduğu görülen olası ilaç adayı melatonin analoglarının sitotoksik etkileri de araştırılmıştır. Sitotoksik etki hem insan meme kanseri hücreleri (MCF-7 BUS) hem de sağlıklı çin hamsteri over hücreleri (CHO-K1) üzerinde denenerek kanser hücreleri üzerinde olası sitotoksik etkinliği ve varsa bu etkinin aromataz inhibisyonu ile ilişkili mi yoksa farklı mekanizmalarla mı olduğu yönünde mekanizma aydınlatmaya dönük çalışmalar yapılmıştır.

1.1. GENEL BİLGİLER

1.1.1. ENDOKRİN SİSTEM

Endokrin sistem döllenmeden itibaren yaşlılığa kadar beyin ve sinir sisteminin gelişimi, üreme sisteminin farklılaşması, gelişimi ve fonksiyonları ile metabolizma gibi vücuttaki tüm biyolojik süreçleri düzenlemektedir (1). Hormon adı verilen kimyasal maddeleri sentezleyen ve salgılayan endokrin sistem, vücudun farklı yerlerinde bulunan endokrin bezlerden oluşmaktadır (1-3). Endokrin bezler, genellikle kendilerinden uzaktaki belirli hücrelerin çalışmasını düzenleyen yapılardır (3). Dişilerde ovaryumlar, erkeklerde testisler, epifiz bezi (pineal gland), tiroid bezi ve adrenal bezler endokrin sistemin temel bileşenleridir. Hormonlar organizmadaki bezler tarafından salınmakta, vücudu dolaşmakta ve kimyasal mesajcılar olarak etki etmektedirler (1). Sinir sistemi de nörohormonlar olarak adlandırılan kimyasal düzenleyicileri dolaşıma salmaktadır. Ayrıca, endokrin olarak sınıflandırılmayan yağ dokusu, kalp, karaciğer ve böbrek gibi pekçok organ da çeşitli kimyasal düzenleyicileri üretip kana salabilmektedir (Tablo 1.1) (4).

Tablo 1.1. Omurgalılarda kimyasal düzenleyiciler, kaynakları, hedefleri ve etkileri (4).

Kaynak ve İsim	Hedefleri	Etkileri
Hipotalamus		
Gonadotropin salıverici hormon (GnRH)	Gonadotrop hipofizde	FSH ve LH salınımı
Galanin	Gonadotrop hipofizde	LH salınımı
Tirotropin salıverici hormon (TRH)	Tirotrop hipofizde	TSH salınımı
Kortikotropin salıverici hormon (CRH)	Kortikotrop hipofizde	ACTH salınımı
Somatostatin (SS = GH-RIH)	Somatotrop hipofizde	GH salınımının inhibe edilmesi
Somatokrinin (GH-RH)	Somatotrop hipofizde	SS yokluğunda GH salınımı
Prolaktin salıverici -inhibe edici hormon (PRIH =	Laktotrop hipofizde	PRL salınımının inhibe edilmesi
Vasoaktif intestinal peptit (VIP; PRH)	Laktotrop hipofizde	DA yokluğunda PRL salınımı

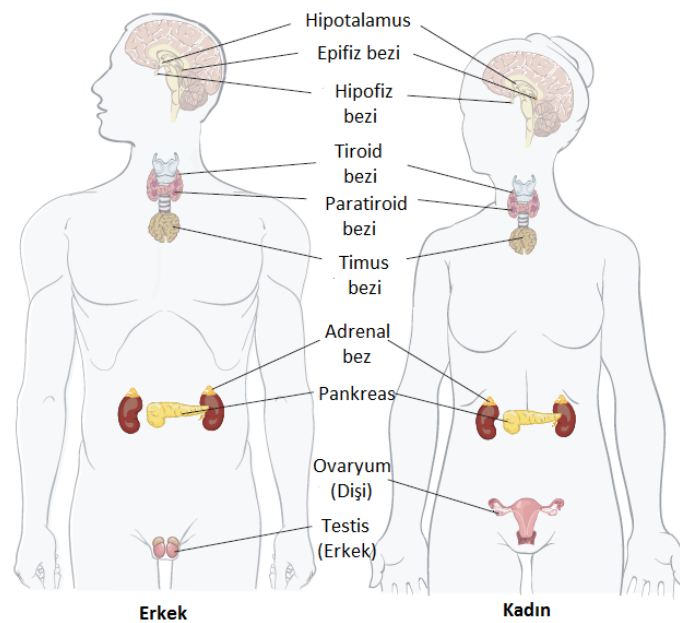
Hipotalamik peptit olmayanlar		
Arjinin vazopresin (AVP)	Böbrek tübülleri	Su reabsorbsiyonunun artışı
Oksitosin (OXY)	Yumurta kanalı/uterus/vas deferens	Gamet transportu
Arjinine vazotosin (AVT)	Böbrek/üreme kanalı	Su dengesi/gamet transportu
Epifiz		
Melatonin	Hipotalamus/reng hücreleri	İnhibitör etkiler
Hipofiz (adenohipofiz)		
Folikül sitümüle edici hormon (FSH)	Gonad	Gamet formasyonu, E2 sentezi
Luteinize edici hormon (LH)	Gonad	Gamet salınımı, androjen sentezi
Tirotropin (TSH)	Tiroid	Tiroid hormon sentezi
Büyüme hormonu (GH)	Karaciğer, kas, kemik	IGF'lerin ve proteinlerin sentezi
Prolaktin (PRL)	Meme bezleri, epididimis	Protein sekresyonunun uyarılması
Kortikotropin (ACTH)	Adrenokortikal hücreler	Kortikosteroidlerin sentezi
Melanotropin (MSH)	Melanin üreten hücreler	Melanin sentezi/translokasyonu
Ovaryum		
Östrojenler (östradiol vb)	Uterus, meme bezi	Proliferasyon
Progesteron	Uterus	Protein sekresyonu
İnhibin	Gonadotrop hipofizde	FSH'ı inhibe ederek GnRH'ı salmak
Testis		
Testosteron, dihidrotestosteron (DHT)	Yardımcı cinsiyet organ/yapıları	Gelişimin uyarılması
Inhibin	Gonadotrop hipofizde	FSH'ı inhibe ederek GnRH'salmak
Tiroid bezi		
Tetraiodotironin (T4 = tiroksin) ve Triiodotironin (T3)	Vücuttaki çoğu doku	Gelişime, metabolizmaya etki etmek
Adrenal bez: Adrenokortikal doku (korteks)		
Kortizol (F) ve/veya kortikosteron (B)	Karaciğer/kas	Glukoneojenez/protein hidrolizi
Aldosteron	Böbrek	Sodyum reabsorpsiyonu

Adrenal bez: Kromafin doku (medulla)		
Epinefrin (E) ve norepinefrin (NE)	Karaciğer/kas/kalp	Kan şekerini yükseltmek/kontraksiyonu arttırmak
Karaciğer		
İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGFs)	Kıkırdak	Matriks sentezinin uyarılması
Böbrek		
Hipoksiye yanıt olarak eritropoietin	Kemik iliği	Kırmızı kan hücreleri üretiminin artışı
1,25-dihidroksikolekalsiferol (DHC)	İnce barsak	Kalsiyum için taşıyıcı proteinlerin üretiminin artışı
Renin	Kanda Renin substratı	Peptid ve anjiotensin 1'in salınımı
Pankreas (adacıklar)		
İnsülin	Karaciğer/adipoz doku	Kan glukozunun ve yağ asitlerinin azaltılması
Glukagon	Karaciğer	Kan şekerini yükseltmek
Somatostatin	Adacıklardaki diğer hücre tipleri	Sekresyonun inhibisyonu
Paratiroid bezleri		
Paratiroid hormonu (PTH)	Kemik/böbrek	Kemik rezorpsiyonu/kalsiyum reabsorpsiyonu
Ultimobrankiyal yapılar		
Kalsitonin	Kemik	PTH etkisinin bloke edilmesi
Gastrointestinal kanal		
Gastrin (mide)	Mide paryetal hücreleri	Mide lümeninde HCl salınımı
Sekretin (ince barsak)	Pankreas	Temel suların salınımı
Kolesitokinin (ince barsak)	Pankreas/safra kesesi	Enzimlerin salınması/kontraksiyon
Glukoz bağımlı insülinotropik peptit (GIP) (ince barsak)	Pankreas	İnsülin salınımının stimüle edilmesi
Vazoaktif barsak peptidi (VIP)	Genişleyen kılcak kan damarları	Barsağa kan akışının artması
Kalp		
Atrial natriüretik peptit (ANP)	Böbrek/beyin	Aldosteron etkisinin inhibe edilmesi/AVP salınımının korunması
Timus		
Timosinler	Dalak, lenf nodülleri	Lenfosit üretiminin artışı

İmmun sistem makrofajları		
İnterlökin 1	Yardımcı T-hücreleri	Aktivasyon
İnterlökin 2	Sitotoksik T-hücreleri	Aktivasyon

Hormonların fizyolojik fonksiyonları genelde dört olayın düzenlenmesine yöneliktir: 1) iç ortamın değişen dış koşullara uygun şekilde optimal düzeyde sürdürülmesi (su ve elektrolit dengesi, asit-baz dengesi, kan basıncı, vücut sıcaklığı, kas, yağ dokusu ve kemik kitlesi gibi) 2) enerji üretimi, kullanımı ve depolanması 3) üreme 4) büyüme ve gelişme (2, 3, 5).

Hormonlar, etkilerini gösterebilmeleri için anahtar-kilit modeli şeklinde ifade edilen tam olarak uyum sağlayabildikleri reseptörlere bağlanmaktadır. Tüm vücuda yayılabilmelerine rağmen ancak uygun reseptörlerin bulunduğu hedef hücreler hormonlara yanıt verebilmektedir. Hormonun reseptöre bağlanmasını takiben hormonun mesajı doğrultusunda reseptör, bağlanan hücrenin proteinlerini değiştirmekte veya protein üreten genleri uyararak yeni proteinler üretilmesini sağlamaktadır (1). Günümüzde insanlarda ve diğer omurgalılarda bilinen yaklaşık 50 adet hormon bulunmaktadır (1, 2). Bu hormonların insanlarda salgılandığı endokrin bezler Şekil 1.1’de gösterilmektedir.



Şekil 1.1. İnsan vücudunda bulunan endokrin bezler (2).

1.1.1.1. Endokrin Bozucular Nelerdir?

Endokrin sistem fonksiyonlarını değiştirerek organizma ve/veya gelecek nesiller üzerinde olumsuz sağlık etkilerine neden olan eksojen madde ya da karışımlar genel olarak EB'lar olarak adlandırılmaktadır (6). Diğer bir ifade ile endokrin bozucu kimyasallar; doğal hormonları taklit eden, onların reseptörlerine bağlanabilen, bu reseptörlerin fonksiyonlarını aktive ya da inhibe eden sentetik ya da doğal kimyasallar olarak tanımlanmaktadır (2, 4, 7). Bu kimyasallar endojen veya eksojen olabilmektedir (4). Kadmiyum (Cd) ve civa (Hg) gibi metaller, yanma ürünleri (polinükleer aromatik hidrokarbonların (PAH), poliklorlu dibenzo-p-dioksinler (PCDDler), dikloro difenil trikloroetan (DDT) ve klordan gibi pestisitler, bitkisel bazı bileşikler ile mantar bileşikleri bilinen endokrin bozucu kimyasallardan bazılarıdır (4).

Östrojeni taklit ederek etki eden hormon benzeri vücuda yabancı tüm kimyasal maddeler ksenoöstrojen olarak adlandırılmaktadır. Poliklorlu bifenillerin (PCB), bisphenol A (BPA)'nın ve fitalatların endüstride yaygın olarak kullanılan sentetik ksenoöstrojenler olduğu bilinmektedir (8).

In vivo ve *in vitro* zayıf östrojenik ve/veya anti östrojenik etkiler gösteren bitkisel kaynaklı östrojenler ise fitoöstrojenler olarak bilinmektedir. Fitoöstrojenler pirinç, çavdar, kepek, nar, elma, buğday, sarımsak, yulaf ezmesi, kahve, rezene-dereotu, meyan kökü, arpa, maydanoz, kiraz, maya, patates, soya fasulyesi ve soya temelli ürünler gibi bitkisel kökenli pek çok besinde doğal olarak bulunmaktadır (9).

Son yıllarda endokrin sistemi etkileyebilecek kimyasallara maruz kalma ile insanlarda ve yaban hayatında oluşabilecek muhtemel advers etkiler konusunda farkındalık gittikçe artmaktadır. Bu etkiler gelişimsel malformasyonlar, üremenin engellenmesi, kanser riskinde artış, immun ve sinir sistemi fonksiyonlarında bozukluklar olabilmektedir (10). Bununla birlikte endokrin bozucu kimyasalların insanlar, hayvanlar ve çevre üzerindeki risklerinin tamamı bilinmemekte ve halen araştırılmaktadır (2).

Neonatal dönemde, potent sentetik östrojen olan dietilstilbestrole (DES) maruziyet sonucunda yetişkinlik döneminde obezite ve insülin direnci meydana gelmektedir. Bu bulgu BPA'nın da aralarında bulunduğu endokrin bozucu kimyasalların obezite ve Tip-2 diyabetin görülme sıklığındaki artışta rolü olabileceğine kanıt olarak gösterilmektedir (11).

Östrojenlerin ve oral kontraseptiflerin kullanımının kanser gelişimindeki olası en büyük etken olduğu belirtilmektedir. Çeşitli hayvanlarda yapılan çalışmalar östrojenlerin meme, uterus, testis, kemik, böbrek ve diğer dokulardaki tümör oluşumunu indüklediğini göstermektedir (12).

Vahşi hayvan popülasyonlarında, hücrelerde ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda DDT, DES, PCB gibi kimyasallara ve belirli plastik ürünlere maruz kalmanın ciddi sağlık problemlerine neden olduğu gözlenmiştir. Bu çevresel östrojenler kadınlarda meme ve üreme yolu kanseri ile endometriozis riskini arttırmaktadır, erkeklerde ise sperm miktarında azalmaya, anormal sperm miktarında artmaya ve erkek üreme sistemi organlarının yetersiz gelişimine neden olduğu belirtilmiştir (2).

1.1.1.2. Endokrin bozucuların etki mekanizmaları nelerdir?

Son yirmi yıldır endojen hormonların biyolojik aktivitesini engelleme ve taklit etme yeteneğine sahip doğal ve sentetik bileşiklerin insanlardaki ve vahşi hayvanlardaki potansiyel advers etkilerine önemli ölçüde dikkat çekilmektedir. Bu doğal ve sentetik bileşikler farklı endokrin hedeflerin gelişimini ve/veya fonksiyonunu bozarak etki göstermektedir (13). Literatürde büyüme döneminde düşük dozda maruz kalınan gelişimsel endokrin bozucuların yetişkinlik döneminde endokrin sistemi ve üreme bozukluklarını “yeniden programladığı” belirtilmektedir (14-16). Yeniden programlama; ileriki yaşamda belirli herhangi bir çevresel kimyasala maruz kalınmasa bile yaşamın erken dönemindeki maruziyetlerin neden olduğu etkilerin ileride sentezlenecek gen veya proteinlerin kapasitesinde değişikliklere yol açabileceğini ifade etmektedir (11).

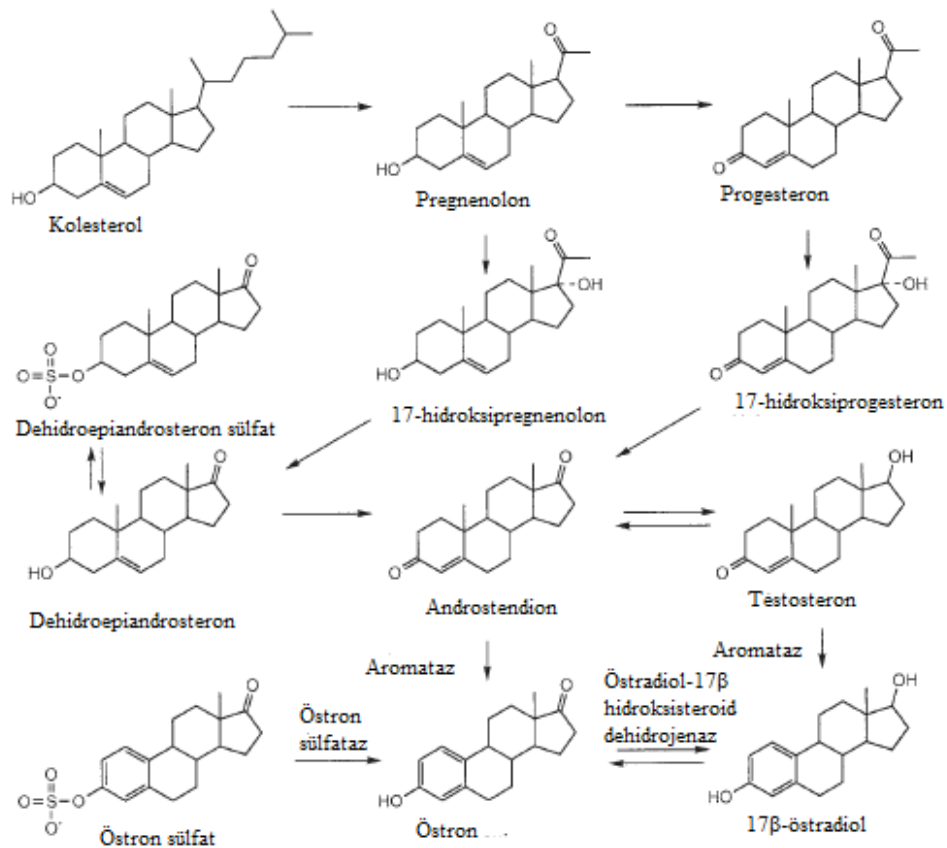
Endokrin bozucular; reseptörlere bağlandıklarında endojen ligandların hareketine benzer şekilde reseptör agonisti olarak hareket edebilmekte, reseptörde değişiklikler oluşturabilmekte ve hücrel cevaba neden olabilmektedirler. Ters olarak, endokrin bozucular reseptöre bağlandıklarında reseptör antagonisti olarak da etki edebilmekte; bu durumda hücrel cevabın oluşumuna neden olan reseptördeki değişikliklerin oluşturulmasında başarısız olmaktadır. Bu nedenle reseptör antagonistlerinin hücrel etkileri, endojen hormonların reseptör bağlanma alanına girişini engelleyerek dolaylı olarak gerçekleşmektedir (4).

Çevresel östrojenler; kopyalama faktörleri olan ve ligand tarafından aktive edilen, hücre membran yüzeyinde bulunan ER α veya ER β olarak adlandırılan 2 nükleer reseptörden birine bağlanmaktadır (4, 12, 17, 18). Ratlarda ER α ve ER β 'nın C-terminal ligand bağlanma bölgesinde ve N-terminal transaktivasyon bölgesinde farklılığa sahip oldukları belirtilmektedir (19). ER α ve ER β farklı genlerin ekspresyonunu düzenlemekte ve farklı dağılım göstermektedirler (4, 12). Ratlarda uterus, testis, hipofiz, ovaryum, böbrek, epididimis ve adrenal bezlerde ER α 'nın, prostat, ovaryum, akciğer, mesane, beyin, uterus ve testislerde ER β 'nın orta-yüksek düzeylerde eksprese edildiği saptanmıştır. Ligandların ER α ve ER β 'ya bağlanma afinitelerindeki farklılıklar ile reseptörlerin doku dağılımlarındaki farklılıklar, ER agonist ve antagonistlerinin farklı dokulardaki selektif etkisine neden olmaktadır (SERM) (19).

Nükleer reseptörlere bağlanan endokrin bozucuların iyi bilinen örnekleri aromatik hidrokarbon reseptörüne (AhR) bağlanarak etki gösteren dioksinler ve bazı PCB'lerdir. Steroid hormon reseptörlerine benzer olarak aktive edilen nükleer AhR, bir dizi genin promotor bölgesine bağlanmaktadır. Bu hedef genler, doğrudan endokrin fonksiyonları değiştirebilmekte veya fenolik bileşikleri metabolize eden enzimlerin ekspresyonunu indüklemektedirler. Endokrin bozucular diğer bazı reseptör tiplerine bağlanarak da endokrin bozucu etkiye neden olabilirler (4). Örneğin, bazı endokrin bozucular plazma membranında bulunan γ adrenerjik reseptör olarak adlandırılan steroid reseptörlere bağlanabilmekte veya bu reseptörler üzerinden etkilerini gösterebilmektedirler (18). Steroid reseptörler endokrin bozuculara karşı özel olarak savunmasız gibi gözükmektedirler (4).

Ksenoöstrojenler başta hücre membranındaki kalsiyum (Ca^{+2})/voltaja hassas potasyum (K^{+}) kanalları olmak üzere iyon kanallarına da bağlanabilmektedir (20). Ayrıca ksenoöstrojenler plazmada bulunan ve cinsiyet hormonlarını bağlayan proteinlere de bağlanabilmekte, bu yolla da dolaşımdaki östrojenlerin aktivitesini değiştirebilmektedirler (21, 22).

Endokrin bozucuların; enzimler, taşıyıcı moleküller veya Deoksiribo nükleik asit (DNA) gibi diğer tip fizyolojik öneme sahip moleküllere bağlanarak hücresel etkilere neden olabilecekleri de diğer bir olasılık olarak düşünülmektedir (4). Yakın bir zamanda nöroendokrin bozukluklar dikkate alınarak endokrin bozucu kimyasalların olası hedeflerinin hipotalamus ve beyin olabileceği belirtilmiştir (11). Başka bir ifadeyle, bir endokrin bozucunun ER'ne bağlanmadan hipotalamus, hipofiz



Şekil 1.2. İnsan meme dokusunda östrojenlerin biyosentezindeki steroidojenik yolak

(9)

Bazı maddeler hormon sentezini etkileyerek (artırarak ya da azaltarak) de endokrin bozucu etki gösterebilirler. Bir steroid olan ve endokrin dokularda depolanan kolesterol, gonadotropik hormonun dokuları stimüle etmesiyle bir dizi enzimatik reaksiyon sonrasında androjenler, östrojen ve progesterona dönüşmektedir (Şekil 1.2) (9, 23). Steroid yapılı cinsiyet hormonlarının kolesterolde sentezi için mitokondri ve düz endoplazmik retikulum arasında iletişim gereklidir ve bu sentez birçok enzimatik adımı kapsamaktadır. Bu enzimatik adımların çoğu sitokrom P450

(CYP450) enzimleri tarafından katalize edilmektedir (24). Yolaktaki CYP450 enzimlerinden bir ya da birkaçını inhibe eden bir madde fizyolojik hormon sentezini bozacak ve plazma hormon düzeylerini azaltarak fizyolojik endokrin etkilerin görülmesini engelleyecektir.

1.1.1.3. Endokrin Bozucuları Tayin Yöntemleri

1998 yılında, Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından toplanan Endokrin Bozucular Tarama ve Test Danışma Kurulu (EDSTAC) ticari ürünlerin östrojen, androjen ve tiroid ile ilişkili etkilerinin değerlendirilmesi için bir dizi aşamalı test paketi yaklaşımı önermiştir (25). Bu aşamalı yaklaşım ana olarak 3 amaca yöneliktir: a) **öncelik sıralaması**, maddelerin ya da karışımların tarama ya da test paketlerinde değerlendirilmesi için gruplanması ve öncelik belirlenmesini amaçlar, b) **tarama**, endokrin sistem üzerine etkili olma potansiyeli olan madde ya da karışımları belirleme aşamasıdır, c) **test etme**, önceki bilgiler ve 1. aşama tarama çalışmaları sonucu belirlenmiş madde ya da karışımların endokrin bozucu özelliklerinin doğasını belirleme, karakterize etme ve kantifiye etmek amaçlanmaktadır. Genel olarak 1. basamakta amaç hassas tarama testleri ile EB'leri saptamak, 2. aşamada ise doz-yanıt, maruziyet yolu, hassas yaşam dönemleri ve advers etkileri belirlemektir.

Hazırlanmış olan “Düşünsel Çerçeve/Sistem”de birkaç karar noktası bulunmaktadır. Bu karar noktalarının her birinde eldeki tüm bilgiler değerlendirilerek bir sonraki aşamaya (aşamalara) geçip geçmemeye karar verilir ya da nasıl geçileceği belirlenir. Bu belirlemeyi yapmak ve kararı vermek için çoğunlukla “kanıtların ağırlığı” (weight of evidence) yaklaşımı kullanılır.

Endokrin sistemin karmaşık oluşu ve potansiyel endokrin bozucu hedeflerin çok oluşundan dolayı kısa ve uzun süreli *in vivo* ve *in vitro* deneylerin birbirini tamamlayıcı olarak yer aldığı paketlerden oluşan basamaklı bir yaklaşım uygulanmaktadır (26). I. aşama test paketi içerisinde yer alan *in vitro* ve *in vivo* testler Tablo 1.2’de gösterilmektedir (27).

Tablo 1.2. I. Basamak Test paketi içerisinde yer alan *in vitro* ve *in vivo* testler (27).

	Doğrudan reseptör				Stereidojenez			
	E ²	Anti E	A ²	Anti A	E üretimi ²	A üretimi ²	HPG aksis ³	HPT aksis ³
<i>İn vitro</i>								
ER bağlanma ¹	x	x ⁴						
ERα TA	x							
AR bağlanma ¹			x	x				
Stereidojenez					x	x		
Aromataz					x			
<i>İn vivo</i>								
Uterotrofik	x							
Hershberger			x	x		x		
Pubertal erkek			x	x		x	x	x
Pubertal dişi	x	x ⁴			x		x	x
Amphibian metamorföz								x
Balık kısa süreli reproduksiyon	x	x ⁴	x	x	x	x	x	

¹Östrojen ve androjen reseptör bağlama; ²östrojen ve androjen; ³hipotalamik-hipofiz-gonadal veya tiroidal aksis; ⁴antiöstrojenleri tespit etmesi beklenen yöntemler

Benzer bir kademeli yaklaşım da Ekonomik Kalkınma ve İş Birliği Örgütü (OECD) tarafından önerilmiş ve “Endokrin Bozucu Bileşiklerin Değerlendirilmesi ve Test Edilmesi için Düşünsel Çerçeve” oluşturulmuştur. OECD bu çerçevenin bir “test stratejisi” olmadığını, bir diğer deyişle her madde için birinci kademedan beşinci kademeye kadar düzenli bir şekilde sıralı olarak tüm testlerin uygulanması zorunluluğu bulunmadığını, ancak hakkında çok az bilgi olan bir kimyasal maddenin endokrin bozucu olma olasılığının belirlenmesinde izlenebilecek yol, sıralama ve öncelikli deneylere karar verilmesinde yol gösterici olacağı ifade edilmiştir (28). Bu yaklaşımda yer alan beş kademenin her birinde amaçlar ve yapılacak çalışmalar/testler şu şekilde özetlenebilir (Tablo 1.3): Birinci kademedede herhangi bir

test yapılmadan maddenin fizikokimyasal özellikleri, vücuttaki yazgısı ve davranışları, kantitatif yapı aktivite çalışma verileri ve var olan toksikolojik ve ekotoksikolojik bilgiler göz önüne alınarak maddelerin sınıflandırılması ve öncelik sıralamasının yapılması amaçlanmaktadır. İkinci kademedede mekanistik veri sağlamak için yapılan *in vitro* testler yer almaktadır. Bunlar reseptöre bağlanma deneyleri, transkripsiyonel aktivasyon, aromataz ve *in vitro* steroidojenez, aril hidrokarbon reseptöre bağlanma, tiroid fonksiyonu, balık hepatosit vitallogenin deneyi ve yüksek hızlı tarama testleridir. Üçüncü kademe tek bir endokrin mekanizma ve etki hakkında veri sağlamayı amaçlayan *in vivo* yöntemlerden oluşmaktadır. Bu testler arasında östrojenik etki değerlendirmek amacıyla yapılan uterotrofik analiz, androjenik etki belirlemek amaçlı Hersberger analizi, balıklarda vitellogenin analizi sayılabilir. Dördüncü kademedede çoklu endokrin mekanizma ve etkinin değerlendirilmesini amaçlayan *in vivo* analizler yer almaktadır. 28-gün tekrarlayan toksisite testi (OECD 407) bu amaçla valide edilmiştir. Endokrin mekanizmalara dayanan hasar parametrelerinin değerlendirilmesi önerilmektedir. Son kademe ise endokrin ve diğer mekanizmalar aracılığı ile oluşan etkiler hakkında veri sağlayan *in vivo* testleri kapsamaktadır. Çoklu jenerasyon çalışmalarını, üreme toksisitesi tarama testini ve kombine 28 gün tekrarlayan toksisite/üreme toksisitesi tarama testini içermektedir.

Tablo1.3. Endokrin bozucu kimyasalların test edilmesi ve değerlendirilmesi için OECD tarafından hazırlanan düşünsel çerçeve (29).

1.Basamak Mevcut veriler ve test dışı bilgiler	Fiziksel ve kimyasal yaklaşımlar, reaksiyona girme kabiliyeti, uçuculuk, biyolojik bozunabilirlik Standardize ve standardize olmayan testlerden elde edilen tüm mevcut (eko)toksikolojik veriler Çapraz okuma (read across), kimyasal katagoriler, QSAR ve diğer <i>in silico</i> öngörülleri, ADME model öngörülleri
2.Basamak Seçilmiş endokrin mekanizmalar/yolaklar hakkında bilgi vere <i>in vitro</i> yöntemler (memeli ve memeli olmayanlar için yöntemler)	ER ve AR reseptör bağlanma affinitesi Östrojen reseptör transaktivasyonu (OECD TG455-OECD TG457) Androjen veya tiroid transaktivasyonu <i>İn vitro</i> steroidojenez (OECD TG 456) MCF-7 hücre proliferasyon yöntemleri (ER antagonist/agonist) Diğer uygun yöntemler

3.Basamak Seçilmiş endokrin mekanizmalar/yolaklar hakkında veri sağlayan <i>in vivo</i> yöntemler¹	Memelilerde toksisite Uterotrofik Yöntem (OECD TG 440) Hershberger Yöntemi (OECD TG 441) Memeli olmayanlarda toksisite Kurbağa embriyo tiroid işaretleme yöntemi (TG mevcut ise) Amfibi metamorfoz yöntemi(OECD TG 231) Balık üreme tarama yöntemi (OECD TG 229) Balık tarama yöntemi (OECD TG 230) Androjenize dişi dikenlibalık tarama (GD 140)
4.Basamak Endokrin ilişkili son noktalardaki advers etkiler hakkında veri sağlayan <i>in vivo</i> yöntemler²	Memelilerde toksisite Tekrarlayan doz 28 gün çalışması (OECD TG 407) Tekrarlayan doz 90 gün çalışması (OECD TG 408) Tek jenerasyon üreme toksikoloji çalışması (OECD TG 415) Erkek pubertal yöntemi (GD 150,)³ Dişi pubertal yöntemi (GD 150)³ Sağlam yetişkin erkek endokrin tarama yöntemi (GD 150) Prenatal gelişimsel toksisite çalışması (OECD TG 414) Kronik toksisite ve karsinojenite testi (OECD TG 451-3) Üreme tarama testi (OECD TG 421 eğer artmışsa) Kombine 28-gün/üreme tarama testi (OECD TG 422 eğer artmışsa) Gelişimsel nörotoksisite (OECD TG 426) Memeli olmayanlarda toksisite Balık cinsiyet gelişimsel testi (OECD TG 234) Balık Üreme Kısmi Ömrü Testi (TG mevcut ise) Amfibi Larva Büyüme Ve Gelişme Testi (TG mevcut ise) Kuş üreme testi (OECD TG 206) Yumuşakça Kısmi Yaşam Deneyleri (TG mevcut ise) ⁴ Chironomid Toksisite testi (TG 218-219) ⁴ Daphnia Üreme testi (Erkeklerde indüksiyon ile) (OECD TG 211) ⁴ Yer solucanı üreme testi (OECD TG 222) ⁴ Enchytraeid üreme testi (OECD TG 220) ⁴ Sedimentli Su Lumbriculus Toksisite Testi (OECD TG 225) Toprakta yırtıcı mite üreme testi(OECD TG 226) ⁴ Toprakta Collembolan üreme testi (TG OECD 232) ⁴

5.Basamak Organizmanın yaşamının daha geniş dönemlerinde endokrin ilgili noktalarda advers etkiler hakkında kapsamlı veri sağlayan <i>in vivo</i> yöntemler ²	Memelilerde toksisite Uzatılmış 1 jenerasyon üreme toksisite çalışması (OECD TG 443) ⁵ 2 jenerasyon üreme toksisite çalışması (Güncellenmiş OECD TG 416)
	Memeli olmayanlarda toksisite FLCTT (Balık yaşam döngüsü toksisite testi) (TG mevcut ise) Medaka Multijenerasyon testi (MMGT) (TG mevcut ise) Kuşlarda 2 jenerasyon üreme toksisitesi testi (TG mevcut ise) Mysid yaşam döngüsü toksisite testi (TG mevcut ise) ⁴ Copepod üreme ve gelişim testi (TG mevcut ise) ⁴ Sediment su Chironomid yaşam döngüsü toksisite testi (OECD TG 233) ⁴ Yumuşakçalar tüm yaşam döngüsü deneyleri testi (TG mevcut ise) ⁴ Daphnia Multijenerasyon testi (TG mevcut ise) ⁴

¹ Bazı yöntemler advers etkiler hakkında bazı kanıtlar sağlayabilmektedir.

² Etkiler birden fazla mekanizmaya duyarlı olabilir ve belki de endokrin bozucu olmayan mekanizmalar nedeniyle oluşabilmektedir.

³ Protokol kullanımına bağlı olarak, bir maddenin bu testlerde bir hormon sistemi ile etkileşime girmesi insan veya ekolojik sistemde advers etkilere neden olacağı anlamına gelmemektedir.

⁴ Günümüzde mevcut omurgasız deneyler bazı endokrin bozuculara ve endokrin bozucu olmayan kimyasallara yanıt verebilen sadece bazı apikal sonuçları içermektedir. Bunlar 4. basamaktaki kısmi yaşam döngüsü testleri ve 5. basamaktaki tam veya çoklu yaşam döngüsü testleridir.

⁵ Uzatılmış 1 jenerasyon üreme toksisitesi çalışması (OECD TG 443), çocuklarda ve F1 yetişkinlerde, 2001 yılında adapte edilen 2-jenerasyon testinde (OECD TG 416) yer almayan, pek çok endokrin ilişkili parametreyi değerlendirmeyi sağladığı için endokrin hasarı belirlemede tercih edilmektedir.

1.1.1.3.1. *İn Vitro* Analizler

Bir ilaç etkin madde adayının olası toksisitesinin belirlenmesinde genel yaklaşım olarak ileri organizmalara geçiş öncesinde canlı organizmadan izole edilmiş hücre/dokular ya da hücreden izole edilmiş alt yapılar (mikrozom, reseptör ya da enzimler gibi) model olarak kullanılarak *in vitro* koşullarda araştırılması benimsenmiştir. Buradan elde edilen veriler ışığında sırası ile deney hayvanı ve ardından da insan çalışmalarına geçmek ve her basamakta eldeki bilgi boşluklarını doldurmak genel kabul gören temel yaklaşımdır. Endokrin bozucuların belirlenmesinde de, benzer şekilde, genel yaklaşım öngörüsül toksikoloji (*in silico*

modelleme) bilgileri ışığında maddeleri olası toksisite etki mekanizmaları açısından taranması (screening) yaklaşımıdır. Burada test edilecek maddenin olası etkileri, tüm endokrin bozucu etki mekanizmaları için var olan *in vitro* modeller kullanılarak araştırılmaktadır. *İn vitro* analizler, eksoöstrojen olduğu iddia edilen maddelerin potansiyel etki mekanizmaları hakkında bilgi sağlamaktadır. Bu yöntemler kompleks karışımlar içindeki östrojenik maddelerin tedavi edici etkisini değerlendirmede de kullanılabilir. Unutulmaması gereken; *in vitro* analizlerin tamamlayıcı analizler olup *in vivo* analizlerin yerine geçmeyecekleri gerçeğidir (30).

1.1.1.3.1.1. Reseptör Bağlanma Analizi

Reseptör-ligand etkileşimlerinin araştırılması amacıyla yapılan bu analizlerde genel olarak işaretli doğal hormonun (östrojenik etkinin belirlenmesinde östradiol kullanılması gibi) tek konsantrasyonunun ilgili reseptöre bağlanması ile test maddesinin artan konsantrasyonlarının yarışma gücü ölçülmektedir. Bağlı referans madde ($^3\text{H-E2}$) miktarının test maddesinin log konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen “yarışmalı bağlanma eğrisi” kullanılarak test maddesinin işaretli doğal hormonun %50’sini reseptörden uzaklaştıran konsantrasyonu (IC_{50}) hesaplanır. Ayrıca analiz edilen kimyasalın IC_{50} değerinin radyoişaretlenmemiş östradiolün IC_{50} değerine oranı ile “rölatif bağlanma afinitesi” de hesaplanabilmektedir (31). Her iki veri yardımı ile test edilen maddelerin östrojenik etki potansiyeli belirlenip, diğer maddeler ile kıyaslanabilir (25).

Reseptöre bağlanma deneylerinde geleneksel olarak radyoişaretli ligandlar (östradiol için ^3H işaretli gibi) kullanılmaktadır (25). Yakın geçmişte ise floresans ligand kullanımı ile yöntemlerin daha kolay ve düşük maliyetle yürütülebilmesi amaçlanmıştır (32- 36).

Reseptör kaynağı olarak genellikle hormona duyarlı dokular (37) (ER için uterus, AR için prostat gibi) kullanılır. Alternatif olarak rekombinant reseptör proteinleri ile ER içeren insan ve/veya hayvan hücre hatlarının sitozolik fraksiyonları da kullanılabilir (31).

Ligand bağlanma deneylerinin potansiyel endokrin bozucu kimyasalların taranmasında etkinliğini kısıtlayan bazı sınırlılıkları bulunmaktadır (26). İlk olarak, EDSTAC tarafından önerilen orijinal bağlanma yöntemlerinde kemirici sitozolik doku homojenatları reseptör kaynağı olarak kullanılmaktadır (25). Ancak farklı ER izoformlarının ($\text{ER}\alpha$ ve $\text{ER}\beta$) dokuya spesifik ekspresyon göstermeleri nedeni ile

(38) bağlanma verisi doku seçimine göre farklı olabilmektedir (25). Rekombinant reseptör izoformlarının kullanılması ile analizin spesifisitesi artacak ve hayvan kullanımı azalacaktır (25). İkincisi, reseptöre bağlanma yöntemleri maddenin reseptöre bağlanma yeteneğini değerlendirmesine rağmen agonist ve antagonistler arasında ayırım yapamamaktadır (25, 31). Ayrıca bu analiz agonist bir maddenin kısmi mi yoksa tam agonist mi olduğunu da ayırt edememektedir (31). Üçüncü dezavantaj, metabolitleri östrojenik veya androjenik olan bileşiklerin (proöstrojenler veya proandrojenler) bu modelde metabolik enzim bulunmayışı nedeniyle saptanamama olasılığıdır (25). Maddenin ER'ye bağlanması sadece maddenin bir eksoöstrojen gibi davranacağını göstermekte, ancak maddenin insan sağlığına veya çevreye advers etkili olup olmayacağı hakkında yeterli kanıt sağlamamaktadır. Ayrıca, bağlanma analizleri otomasyona kolayca cevap vermediğinden hızlı tarama aracı olarak yararlılıkları sınırlıdır (30).

1.1.1.3.1.2. Transaktivasyon Analizleri

Genel prensip olarak ligand bağlanan nükleer hormon reseptörlerinin yapıları değişmekte, dimerize olmakta ve DNA'daki spesifik cevap elementine bağlanarak spesifik genlerin transkripsiyonunu başlatmaktadır (25). Dolayısı ile ligand ile indüklenen ER aracılıklı gen aktivasyonu analizi, ER tamamlayıcı deoksiribo nükleik asit (cDNA) ile östrojene yanıt veren element (ERE) içeren raportör genin hücrelere ko-transfeksiyonu esasına dayanır. Transaktivasyon analizi, endojen olarak ER taşımayan canlı hücreler (maya ya da memeli hücreleri) a) ilgili ER'ı ve b) aktivitesi, bir ya da daha fazla ERE'nin bağlanabileceği promotor bölgesine bağımlı olan bir raportör geni taşıyan ekspresyon plazmidi ile ko-transfekte edilerek yapılır (37). Raportör genin indüksiyonu ER ligandı varlığında gerçekleşir ve doza bağımlı transkripsiyonun indüksiyonu kolaylıkla ölçülebilir (25, 39).

Doğal genotipinde ER taşımayan hücrelerde ER gen ekspresyonunun suni olarak indüklenmesi bu analizin zayıf yönüdür. Bu “zorlama ekspresyon” gerçek fizyolojik bir yanıtı yansıtmıyor olabilir. Dolayısı ile bu endişe transaktivasyon analizlerinin (raportör gen analizi) endojen ER eksprese eden insan meme kanser hücreleri olan MCF-7 ya da T47D hücreleri kullanılması ile giderilmiştir: bu yöntemler sırasıyla MCF-7 hücrelerinden türetilmiş biyoluminesans hücre hattı (MVLN) (40) ve östrojen reseptör aracılıklı kimyasal aktive edilmiş lusiferaz gen ekspresyonu (ER-CALUX) (41) analizleridir. ER eksprese eden hücrelerin

kullanıldığı bu analizlerde östrojen tarafından indüklenebilen bir raportör gen hücrelere transfekte edilir (31, 42). Bu yöntemde geçici ve stabil transfektanlar olmak üzere 2 farklı yaklaşım kullanılmaktadır. Stabil transfektanlar hücrelere bir kez uygulama yapıldıktan sonra stabilitesini sürdürmekte ve kullanıma hazır halde olduklarından daha fazla tercih edilmektedirler (31).

1.1.1.3.1.3. Hücre proliferasyon yöntemi

Hücre proliferasyon yöntemi, endojen ve fonksiyonel ER eksprese eden östrojene duyarlı MCF-7 veya T47D insan meme kanser hücrelerinin kullanıldığı ve östrojenik/antiöstrojenik maddelerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan yöntemdir (30, 43).

E-Screen analizi hedef hücrelerde östrojenlerin proliferatif etkisi olması esasına dayanılarak geliştirilmiş, kimyasalların östrojenik etkilerinin hızlı değerlendirilmesinde kullanılan güvenilir bir analizdir. Bu nicel analizde hücreler hormon içermeyen vasat içerisinde (negatif kontrol) ya da aynı vasat içerisine 17- β östradiol (pozitif kontrol) veya östrojenik olduğundan şüphelenilen kimyasalların artan konsantrasyonları ilave edilerek inkübe edilmekte ve 7 gün sonunda elde edilen hücre sayıları karşılaştırılmaktadır (43). E-Screen olarak isimlendirilen yöntemin en büyük dezavantajı ise ER α ve ER β 'nin rolünü birbirinden ayıramıyor oluşudur (39).

1.1.1.3.1.4. Steroidojenez ve Aromataz Aktivitesi

Endojen steroid hormonların sentezini (steroidojenez) etkileyerek endokrin bozucu etki gösteren maddelerin belirlenmesi için “kıyılmış testis” yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Bu yöntem azalan testosteron düzeylerini ölçmek suretiyle steroid biyosentez yolağında olası enzim inhibisyonlarını belirlemek amacıyla önerilmiştir. Bununla birlikte yüksek oranda hatalı pozitif ve hatalı negatif sonuç saptanması ve testis dokusunun kıyılması/parçalanması sırasında elde edilen hücre karışımları içinde Leydig hücre sitotoksitesinin belirlenmesindeki güçlük nedeniyle tercih edilen bir yöntem olmamıştır (44). Bu nedenle maddelerin steroidojenez üzerine etkisini değerlendirmek üzere insan hücre hattı olan H295R hücrelerinin kullanıldığı bir yöntem önerilmiştir. Bu analiz yönteminde test maddelerinin artan konsantrasyonları varlığında H295R hücrelerinde östradiol ve testosteron düzeyleri ölçülerek steroid biyosentezindeki değişiklikler belirlenmektedir (45). H295R hücrelerinin metabolik kapasitesinin düşük olması

nedeniyle bu test ile sadece ana maddenin steroidojenez üzerine etkisinin değerlendirilebiliyor oluşu yöntemin dezavatajıdır.

Genel olarak steroidojenez yolağının incelenmesinin yanı sıra yolakta yer alan aromataz (CYP19) enziminin ayrı olarak incelendiği bir *in vitro* yöntem de valide edilmiştir. Yöntem enzimin androjenleri östrojenlere dönüştürdüğü reaksiyondan hareketle rekombinant insan aromataz enzimi varlığında ^3H -androstendionun östrona dönüşümü sırasında oluşan $^3\text{H}_2\text{O}$ ölçülmesi esasına dayanmaktadır (45).

1.1.1.3.2. *In Vivo* Analizler

Endokrin bozucuların taranmasında kullanılan ve referans yöntem olarak kabul edilen iki analiz Ütotrofik analiz ve Hershberger analizidir.

1.1.1.3.2.1. Uterotrofik Analiz

Uterotrofik analiz 1930’larda uygulanmaya başlanan kısa süreli *in vivo* bir tarama testi (46) olup östrojenik aktivite için veri sağlamaktadır (47). Uterotrofik analizin hassasiyeti, hipotalamus-hipofiz-ovaryum aksisi fonksiyonel olmayan ve dolaşımdaki endojen östrojen seviyesi düşük olan hayvanlarda güvenilirdir. Bu durum, temel uterus ağırlığının düşük olmasını ve uygulanan östrojenlere verilen yanıtın en yüksek seviyede olmasını sağlamaktadır (47). Bu testte endojen östrojen seviyesi düşük olan (ovaryumları alınmış veya olgunlaşmamış) dişi kemiriciler kullanılmaktadır (37). Kimyasal maddenin, 17β -östradiol gibi doğal östrojenlerin biyolojik aktivitesine neden olma yeteneğini değerlendirmektedir (47). Östrojenik aktivitenin değerlendirilmesinde östrojenik uyarım ile uterus ağırlığındaki artış hasar parametresi olarak kullanılmaktadır (37). Her gruba bir doz test maddesi uygulanacak şekilde en az iki grup deney hayvanı kullanılmaktadır. Test maddeleri günlük olarak, tercihen deri altı enjeksiyonla uygulanmaktadır. Alternatif olarak oral gavaj yolu ile uygulama da yapılabilmektedir (47). Çoğu protokolda test maddesi hayvanlara günlük olarak üç veya dört gün uygulanmaktadır (37, 47). Son uygulamadan 24 saat sonra hayvanların yaşamı sonlandırılarak uterusları çıkartılmakta, yaş/kuru ağırlığı ölçülmekte ve uterus ağırlığındaki artış kontrol grubu ile karşılaştırılarak maddenin olası östrojenik potansiyeli belirlenmektedir (37, 47).

1.1.1.3.2.2. Hershberger Analizi

Hershberger analizi, erkek üreme sistemindeki aksesuar dokuların kullanıldığı kısa süreli bir *in vivo* tarama testidir. Bu analiz; androjen agonisti, antagonisti ve 5 α -redüktaz inhibitörlerini belirlemek için mekanistik bir *in vivo* test olarak kullanılmaktadır (48). İlk olarak 1930’larda uygulanmaya başlanan yöntem 1940’larda erkek üreme sisteminde androjene yanıt veren kasları içeren bir yöntemle modifiye edilmiştir (49-51). 1960’larda 700’den fazla muhtemel androjen madde protokolün standardize versiyonu kullanılarak değerlendirilmiştir (49, 50). Mevcut analiz, kısırlaştırılmış puberta öncesi dönemdeki erkek kemiricilerde beş androjen bağımlı dokunun ağırlığındaki değişimin belirlenmesine dayanmaktadır. Bu androjen bağımlı dokular ventral prostat, seminal, levator ani-bulbokavernoz kası, Cowper bezi ve glans penistir. Potansiyel androjenik aktivite taranmasında test maddeleri en az iki dozda oral gavaj veya deri altı enjeksiyonla 10 gün süreyle hayvanlara uygulanmaktadır. Hayvanlara son dozun uygulanmasından yaklaşık 24 saat sonra nekropsi yapılmaktadır. Çözücü kontrol grubu ile karşılaştırılan test maddeleri grubunda iki veya daha fazla hedef organın ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış oluşması test maddelerinin potansiyel androjenik aktivite için, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oluşması ise test maddelerinin potansiyel antiandrojenik aktivite için pozitif sonuç verdiğini göstermektedir (48).

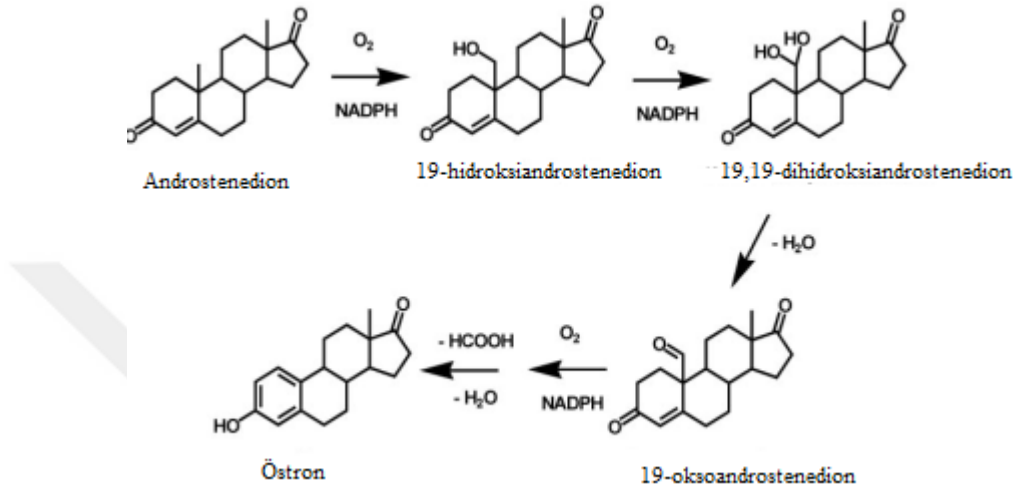
1.1.1.4. Endokrin Bozucular ve Aromataz

Aromataz (CYP19A), östrojenlerin biyosentezinde son basamak olan testosteron ve androstenodion gibi androjenlerin östradiol ve östrona dönüşümünden sorumlu sitokrom P450 enzim kompleksidir (12, 23, 52-54). Aromataz, kadınlardaki östrojen biyosentezinde hız sınırlayıcı enzim olup östrojenlerin düzeyi aromataz enzimi aracılığı ile androjenlerden östrojen biyosentezi ile kontrol edilmektedir (23, 52).

Aromataz; overler, plasenta, testis, beyin, ekstraplandular adipoz dokular (23, 55) deri (55) ve uterus (23) bulunmakta; menopoz öncesi kadınlarda ovaryumlarda (12), hamilelerde plasentada, postmenopozal dönemdeki kadınlar ile erkeklerde ise periferik yağ dokusunda en yüksek seviyede eksprese edilmektedir (56).

Biri sitokrom P450_{arom} diğeri NADPH sitokrom P450 redüktaz olmak üzere iki büyük proteinden oluşan aromataz enzim kompleksi hücrelerin endoplazmik retikulumunda lokalize olmuştur (53, 57). Bir hemoprotein yapısında olan sitokrom

P450_{arom}, C₁₉ steroidlerini (androjenler) fenolik A halkası içeren C₁₈ steroidlerine (östrojenlere) dönüştürmektedir (23, 53, 58-61). Reaksiyon sırasında diğer protein olan NADPH sitokrom P450 redüktaz aracılığı ile NADPH'dan elektron transferi sağlanarak dönüşüm tamamlanmaktadır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Aromataz enzim reaksiyonu (56).

İnsanlarda P450_{arom} ekspresyonu DNA'daki muhtemel değişiklikler aracılığı ile kontrol edilmektedir (62). Çevresel kimyasalların potansiyel endokrin hedeflerinden birinin aromataz enzimi olduğu bilinmektedir. Çevresel ajanlar, toksikanlar ve çeşitli doğal ürünlerle aromataz protein seviyesinin baskılanması veya indüklenmesi dokulardaki östrojenlerin seviyesini ve dolayısı ile hormon etkinliğini değiştirmektedir (23). Ayrıca, gıda ambalaj materyallerinde bulunan kimyasalların ve metabolitlerinin steroidojenezi etkilediği ve CYP19 gen ekspresyonunda artışa neden olarak androjen seviyesini azalttığı, östrojen seviyesini ise arttırdığı tespit edilmiştir (63).

Castro ve ark. (64) yetişkin erkek sıçan prostatında BPA maruziyetinin 5 α -redüktaz izozimleri (5 α -R tip 1, 2, ve 3) ve aromataz üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında BPA'ya temasın aromataz mesajcı ribonükleik asit (mRNA) ve protein düzeylerini artırdığını, plazma östradiol/testosteron oranında artış ile sonuçlanan bu durumun prostat hastalığı ile ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir. Chan ve ark (65) MCF 7 hücrelerinde yaptıkları çalışmada 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-

dioksin (TCDD)'e maruziyetin aromataz aktivitesini zaman ve doza-bağımlı şekilde artırdığını bildirmiştir. Fitoöstrojenler ile birlikte çeşitli fungusit ve organokalay bileşiklerinin de aralarında yer aldığı birçok ksenoöstrojenin CYP19 aktivitesini post-transkripsiyonel düzeyde etkileyerek EB etki gösterdiklerini raporlayan çok sayıda çalışma Cheshenko ve ark. tarafından hazırlanan derlemede toparlanmıştır (66).

1.1.2. KANSER TEDAVİSİNDE ANTIÖSTROJENİK YAKLAŞIMLAR

Bir kimyasal maddenin, reseptör düzeyinde etkileşerek östrojen reseptör agonisti ya da antagonisti etki aracılığı ile olabileceği gibi, steroid hormonların biyosentezi ve metabolizması ile etkileşip fizyolojik hormon düzeylerini azaltarak/artırarak da endokrin bozucu etki gösterebileceğini ifade etmiştik (25, 54). Bu iki mekanizma endokrin bozucu etki mekanizmaları olabildiği gibi aynı zamanda meme kanseri gibi hormon bağımlı kanserlerin tedavisinde de yararlanılan tedavi yaklaşımlarıdır. Bu yaklaşımlardan ilki aracılığı ile yani farklı dokulardaki farklı östrojen reseptörleri ile etkileşerek etki gösteren bileşikler SERM olarak isimlendirilirken etkilerini reseptör düzeyinde değil de lokal östrojen sentezini ya da metabolizmasını değiştirerek gösteren bileşikler ise SEEM olarak isimlendirilmektedir (12, 67).

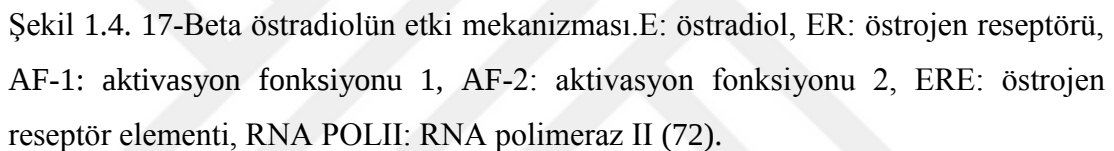
1.1.2.1. Selektif Östrojen Reseptör Modülatörleri (SERM'ler):

SERM'ler dokuya spesifik östrojenik etkilere neden olabilen ajanlar olarak tanımlanmaktadır (12, 68). SERM'ler ER'lara subnanomolar konsantrasyonlarda yüksek afinite gösteren ligandlar olup etki ettikleri dokuya bağlı olarak östrojen agonist veya antagonist etkileri tetikleme özelliğine sahiptirler (69).

Selektif östrojen reseptör modülatörlerinin farmakolojisi birbiri ile ilişkili üç farklı mekanizma ile açıklanabilmektedir: hedef dokudaki ER ekspresyonunda farklılık, ligandın bağlanması noktasında ER konformasyonundaki farklılık, koregülatör proteinlerin ekspresyonu ve ER'ne bağlanmasındaki farklılık (70).

Bir agonist veya antagonist maddenin ER'ne bağlanmasıyla reseptör üzerinde yapısal değişiklikler meydana gelmektedir (70). Östradiolün ve SERM'lerin östrojen reseptörlerinin östrojen bağlama bölgesine bağlanması, reseptörlerin yapısındaki değişmeyi ve reseptör dimerizasyonunu içeren bir seri olayı başlatmaktadır.

ER'ler bir dizi amino asitten oluşan aktivasyon fonksiyonu-2 (AF-2) olarak adlandırılan ligand bağlanma alanı içermektedir (Şekil 1.4). AF-2'nin, meme ve uterus gibi üreme dokularında östrojenin etkisine aracılık eden genlerin aktivasyonu için temel olduğu belirtilmektedir (71).



SERM'lerin farmakolojik hedefinin postmenopozal dönemdeki hormon tedavisi süresince kemik, beyin, karaciğer gibi belirli dokularda yararlı östrojenik etkilerin devamının sağlanması olduğu belirtilmektedir (12). SERM'ler östrojen yetersizliği ile oluşan osteoporoz gibi hastalıkların tedavisinde veya bu hastalıklardan korunma amacıyla kullanılabilir (70). Diğer taraftan, SERM'ler selektif östrojen antagonist yaklaşımları nedeniyle meme kanseri gibi verildiği dokuda östrojen agonist aktivitenin istenmediği hastalıklardan korunmak amacıyla veya bu hastalıkların tedavisinde de kullanılabilirler (12, 70).

23

Yakın zamanda ABD’de bu sınıf içerisinde onaylanan ilaçların tamoksifen sitrat, raloksifen hidroklorür ile kimyasal yapısı ve etkisi bakımından tamoksifenle benzer özelliklere sahip toremifen olduğu bildirilmiştir (12, 70). Başlıca SERM’lerin kimyasal sınıfı, ticari ismi ve üretici firması Tablo 1.4’de gösterilmektedir.

Tablo 1.4. Başlıca SERM’lerin kimyasal sınıfı, ticari ismi ve üretici firması

Kimyasal sınıf	SERM	Üretici Firma
Trifeniletilenler	Tamoxifen*	AstraZeneca
	Clomifene*	
	Toremifene*	Orion
	Droloxifene#	Pfizer
	Miproxifene (TAT-59)#	Taiho Pharm
	Idoxifene#	SmithKline Becham
	Ospemifene (FC-1271a)†	Hormos Medical Corp
	Fispemifene	Hormos Medical Corp
	GW5638	Duke University
	MDL 103,323	Hoechst-Marion-Roussel
Benzotiofenler	Raloxifene (keoxifene)*,†	Eli Lilly & Co
	Arzoxifene†	Eli Lilly & Co
	LY-117018	Eli Lilly & Co
Naftilenler	Lasofoxifene (CP-336, 156)†	Pfizer
	Nafoxidine	
	Trioxifene#	
Indoller	Bazedoxifene (WAY-140424)†	Wyeth
	Pipendoxifene (ERA-923)†	Wyeth/Ligand
Benzopiranlar	EM-800 (SCH57050)†	Schering Plough
	Acolbifene (EM-652)†	Schering Plough
	SP-500263	Celgene Corp
	Ormeloxifene* (centchroman)	Indian Drug Research Inst.
	Levormeloxifene#	Novo-Nordisk
	NNC 45-0781 ve türevleri	Novo-Nordisk

* Farklı bulgular için geliştirilmiştir: meme kanseri tedavisi, doğum kontrolü, ovulasyon indüklenmesi, menopoz sonrası osteoporosisin önlenmesi ve tedavisi

† Faz III klinik araştırma aşamasında

Klinik gelişimi iptal edildi (69).

1.1.2.1.1. Tamoksifen

İlk olarak 1966’da oral kontraseptif olarak sentezlenen tamoksifenin daha sonra ovulasyonu indüklediği tespit edilmiştir (12). Tamoksifen, neoplastik meme hücrelerinde endojen östrojenlerin östrojen reseptörlerine bağlanmasını bloke ettiği için antiöstrojen olarak kabul edilmektedir (69). Tamoksifen sadece ER (+) meme

tümörlerini küçültmekte, ER (-) tümörlere etki etmemektedir (73- 75). Tamoksifen otuz yıldan daha uzun bir süredir yüksek risk grubundaki hastalarda meme kanserinden korunmak için, erken dönemdeki meme kanserinde destekleyici tedavi olarak ve ileri meme kanserinde tedavi amacıyla reçetelenmektedir (12). Bunun dışında östrojen bağımlı diğer tümörlerden, postmenopozal osteoporozdan, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklardan korunmada büyük bir potansiyele sahip olduğu da belirtilmektedir (69).

Tamoksifenin yaygın advers reaksiyonlarının vazomotor semptomlar (ateş basması), saç dökülmesi, mide bulantısı ve kusma olduğu belirtilmektedir (12). Hastanın menopoz dönemine bağlı olarak menstural düzensizlikler, vajinal kanama, sıklıkla oluşan dermatit nedeniyle vulvada kaşıntı görülmektedir (76). Tamoksifen kullanımının erken dönemlerinde endometriyal kanser oluşumu gözlenmiştir (73, 77).

Tamoksifenin bazı hastalıklarda kullanımı ve kullanım sonucu gözlenen etkiler Tablo 1.5'te gösterilmiştir.

Tablo 1.5. Tamoksifenin bazı hastalıklarda kullanımı ve etkileri (78).

Hastalık adı	Gözlenen etki
Endometriyum kanseri	Etkili
Prostat kanseri	Düşük etki
Ovaryum kanseri	Sınırlı sayıdaki denemede etkili
Böbrek kanseri	Düşük etkili
Melanoma	Etkisiz
Kolorektal tümörler	Düşük etkili
Gastrik kanser	Etkisiz
Özofagus kanseri	Etkisiz
Pankreas kanseri	Düşük etkili
Karaciğer kanseri	Etkisiz
Meningioma	Olası stabilizasyon
Hipofiz tümörü	Bazı prolaktinomalarda etkili
Desmoid tümörler	Tümörde azalma
Dişilerde infertilite	Bazı hastalarda etkili
Erkeklerde infertilite	Bazı hastalarda etkili
İyi huylu beyin hastalıkları	Etkili
Laktasyonun baskılanması	Etkili
Jinekomasti	Etkili
Menometroraji	Etkili
Gecikmiş ergenlik	Etkili

1.1.2.1.2. Raloksifen

Tamoksifen endometriyumunu stimüle ederken raloksifenin yüksek risk grubundaki kadınlarda meme kanserini önlemekle birlikte endometrial kanser görülme sıklığında bir artışa neden olmaması raloksifenin meme kanserinin tedavi ve önlenmesinde daha fazla tercih edilmesine neden olmuştur (70, 79). Cummings ve ark. çalışmalarında raloksifenin ER(+) meme kanseri üzerine etki gösterdiğini, ER(-) meme kanseri üzerine etkisiz olduğunu göstermiştir. Advers etkilerinin ateş basması, bacak krampları, derin damar trombozu ile pulmoner embolide 3 kat artış olduğu belirtilmiştir (80).

Tamoksifen ve toramifen meme kanserinde tedavi amacıyla kullanılırken raloksifen öncelikle osteoporozun tedavisinde ve osteoporozdan korunma amacıyla kullanılmaktadır (12, 70).

1.1.2.2. Selektif Östrojen-Reseptör Baskılayıcıları (SERD)

“Saf antiöstrojenler” olarak da tanımlanan SERD’ler SERM’lerin aksine östrojen agonisti bir aktiviteye sahip değildirler (12).

SERD’lerin etki mekanizması; ER aracılıklı östrojen etkisinin yarışmalı inhibisyonuna dayanmaktadır. Ayrıca SERD’ler östrojen tarafından indüklenen transkripsiyonu tamamen bloke etmektedirler (81). Östrojen reseptörlerine bağlanarak reseptörlerin aktivasyon fonksiyonlarını (AF-1 ve AF-2) inhibe etmekte, ER’lerin dimerizasyonunu ve hücre çekirdeğindeki lokalizasyonunu bozmaktadırlar (72).

SERD’lerin saf ER antagonistik etkileri nedeniyle SERM’lerden daha hızlı etki gösterdikleri, daha uzun etki süresine ve güvenli profile sahip oldukları varsayılmaktadır (81).

In vivo yapılan çalışmalarda saf antiöstrojenlerin östrojen bağımlı hücrelerin tamamen gerilemesinde tamoksifen gibi kısmi agonist antiöstrojenlerden daha başarılı olduğu gözlenmiştir. İnsan meme kanser hücreleri ile yapılan model çalışmalarda saf antiöstrojenlerin mevcut tedavi yöntemlerine göre daha etkili olduğu belirtilmektedir. Özellikle tamoksifen tedavisi süresince tekrarlayan meme tümörlerinin bir bölümünün saf antiöstrojenlerin antitümör etkisine duyarlı olabildiği ve ileri derecedeki meme tümörlerinin tedavisinde tamoksifenden daha etkili oldukları saptanmıştır. Bu etkinlikleri nedeniyle daha hızlı, daha eksiksiz veya uzun süre devam eden tümör baskılanması gözlenmiştir (81). Yapılan hayvan

alışmalarında bu mekanizma aracılığıyla saf antiöstrojenlerin tümör büyümesini tamoksifenden daha fazla baskıladığı ve tamoksifene direnç gösteren tümörlerde de antitümör özellik gösterebildiğı gözlenmiştir (72).

SERD'ler arasında yaygın kullanılan fulvestran, RU 58668, SR 16234, ZD 164384 ve ZK 191703 bileşikleri sayılabilir (12).

1.1.2.2.1. Fulvestran

Fulvestran (Faslodeks) ileri seviyedeki meme kanserinin tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmış bir bileşik olup (12, 72) menopoz sonrası dönemdeki ER (+) metastatik meme kanserli kadınlarda tamoksifen gibi ilk basamak antiöstrojen tedavisinde ilerleme sağlandıktan sonra kullanılmaktadır (12, 82).

Fulvestran, ER'üne tamoksifenden 100 kat fazla afinite ile bağlanmakta (12) ve bağlanması ile birlikte reseptörün hızla yıkımı başlatılmaktadır. Fulvestran, aktivitesindeki bu farklılık nedeniyle tamoksifene dirençli meme kanseri tedavisinde etkili olmaktadır (83).

Ancak fulvestranın tamoksifenden daha etkili antiöstrojen aktivite gösterdiği hipotezi klinik denemelerde kanıtlanmamıştır (84). Daha önce kemoterapi veya endokrin terapi görmeyen; ER (+) veya progesteron reseptörü (PR) pozitif metastatik meme kanserli menopoz sonrası dönemdeki kadınlarda fulvestran ve tamoksifen karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda tüm hastalarda hastalığın ilerleme süresinde herhangi bir farklılık saptanmamıştır (85).

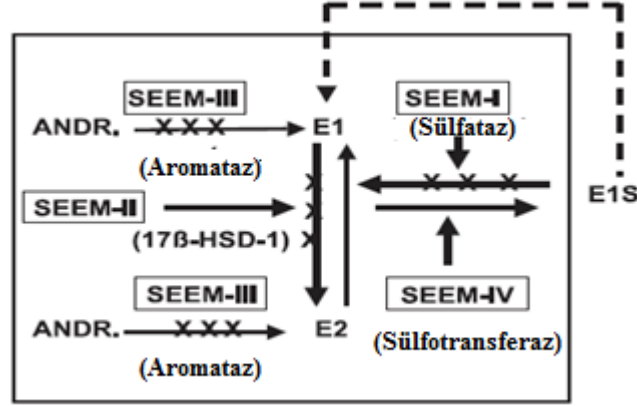
Tamoksifen ile karşılaştırıldığında fulvestranın toksisitesinin daha düşük olduğu da bildirilmiştir (84). Yaygın görülen advers etkiler bulantı, halsizlik, ağrı, ateş basması, baş ağrısı olarak belirtilmiştir (85).

1.1.2.3. Selektif Östrojen Enzim Modölatörleri (SEEM)

Hormon bağımlı meme kanserinde östrojenlerin formasyon ve transformasyonunda yer alan enzimler üzerinde inhibitör ve/veya stimölatör etkiler SEEM olarak adlandırılmaktadır (86, 87). SEEM'nin etki ettikleri basamaklara ait şema Şekil 1.5'de gösterilmektedir (86).

Biyokimyasal ve immunositokimyasal çalışmalar meme kanseri dokusundaki adipoz stromal hücrelerde aromatazin varlığını ortaya koymuştur. Meme dokusunda aromataz aktivitesinin seviyesi oldukça düşük olmasına rağmen östrojenlerin bu

alandaki lokal üretimi östrojen bağımlı meme kanserinin patojenezine katkıda bulunabilmektedir (86).



Şekil 1.5. İnsan hormon bağımlı meme kanser hücrelerinde SEEM tedavi yaklaşımı. SEEM, sülfataz yolağının aromatazdan daha yüksek olduğu meme kanser hücrelerinde östrojenlerin formasyonunu ve transformasyonunu içeren enzimatik mekanizmayı kontrol edebilmektedir. SEEM-I östron sülfatazı, SEEM-II 17h-HSD-1'i, SEEM-III aromataz aktiviteyi inhibe ederken SEEM-IV östron sülfotransferaz aktiviteyi stimüle etmektedir. Bu durum E1S'in hücre dışındaki tümörde mevcut olup hücre içinde bulunan östron sülfataz ile temasa geçtiği hücre membranına ulaştığını göstermektedir. ANDR.: androjenler; E1: östron; E2: östradiol; E1S: östron sülfat (86).

1.1.2.4. Aromataz İnhibisyonu ve İnhibitörleri

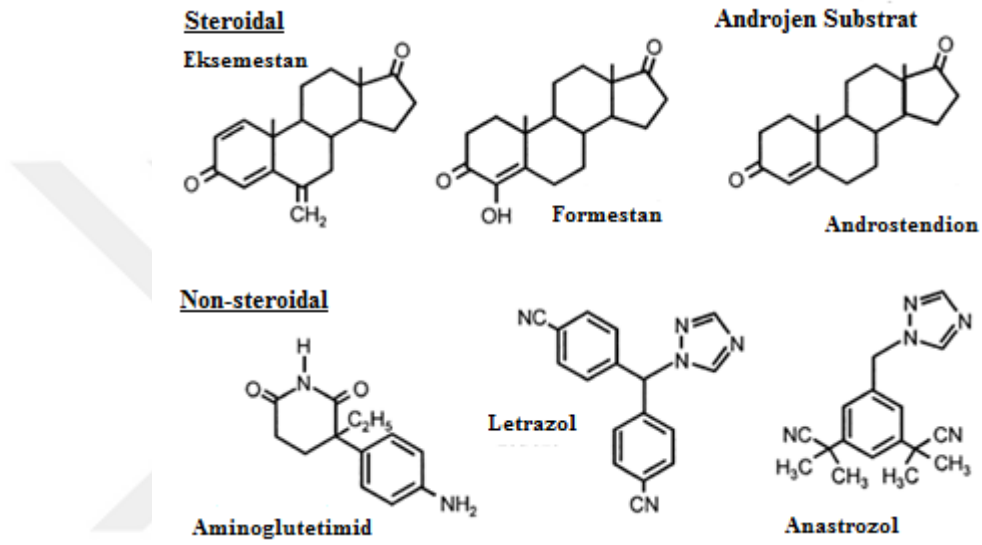
Meme kanseri ile ilişkili aromataz promotörleri aracılığı ile aromataz ekspresyonunun inhibisyonu; meme kanserinde lokal aromataz inhibisyonunun ve böylece östrojen sentezinin selektif olarak bloke edilmesinde kullanışlı bir stratejidir. Meme kanserinin tarihinde aromataz inhibitörleri ile yapılan tedavinin en etkili endokrin tedavisi olduğu belirtilmektedir (88).

Yüksek etkili, iyi tolere edilebilen, oral yoldan aktivite gösteren aromataz inhibitörlerinin geliştirilmesi hedefi 20 yıl önce meme kanseri ilacı olan aminoglutetimid (AG)'in etki mekanizmasının keşfedilmesinden sonra oluşturulmuştur (89). Böylece östrojen biyosentezi azaltılmakta ve meme tümörünün gerilemesi indüklenmektedir (90).

Aromataz inhibitörleri, östrojen bağımlı meme kanserinde östrojenlerin büyümeyi stimüle edici etkilerini azaltmak amacıyla terapötik ajanlar olarak geliştirilmişlerdir (23). Menapoz sonrası dönemdeki kadınlarda AI periferik aromataz

aktivitesini büyük oranda baskılayabilmekte ve yoğun östrojen ihtiyacına neden olabilmektedir (12).

Aromataz inhibitörleri geliştirilme zamanına göre birinci, ikinci ve üçüncü kuşak olarak sınıflandırılırken etki mekanizmalarına göre de tip-1 (steroidal inaktivatör) veya tip-2 (nonsteroidal inhibitör) aromataz inhibitörleri olarak gruplandırılmaktadırlar (Şekil 1.6 ve Tablo 1.6) (91).



Şekil 1.6. Aromataz inhibitörlerinin sınıflandırılması. Steroidal inhibitörler androjen analoglarıdır; non-steroidal inhibitörler ise azol yapısındadır (78).

Tablo1.6. Aromataz inhibitörlerinin sınıflandırılması (78).

	İnhibitör		
	Birinci Kuşak	İkinci Kuşak	Üçüncü Kuşak
Tip-1 (Steroidal)	Testololakton	Formestan	Eksemestan
Tip-2 (Non Steroidal)	Aminoglutetimid	Fadrozol	Anastrozol
			Letrozol

Tip-1 inhibitörler androstendionların steroidal analogları olup, aromataz molekülünde andostenadion ile aynı bölgeye bağlanmalarına rağmen

andostenadiondan farklı olarak aromataza geri dönüşümsüz bağlanmaktadır. Bu nedenle genellikle aromataz inaktivatörleri olarak bilinmektedirler (91). Steroidal inhibitörler olarak da adlandırılmaktadırlar (78). Tip-2 inhibitörler ise nonsteroidal yapıda olup enzimin hem grubuna azot atomlarından geri dönüşümlü olarak bağlanmaktadır. Anastrozol ve letrozol bu grupta yer alan üçüncü kuşak inhibitörler olup enzime triazol gruplarından bağlanmaktadır (91).

Tip-1 inhibitörler genellikle tip 2'lerden daha spesifik inhibitörlerdir (78). Formestan ve eksemestan gibi tip-1 inhibitörlerin kendileri önemsiz inhibitör aktiviteye sahiptirler ancak enzimin katalitik bölgesine bağlandıklarında metabolize oldukları ara ürünler enzime geri dönüşümsüz olarak bağlanarak enzim aktivitesini bloke edebilmektedir (92). Enzim kendi katalize ettiği reaksiyon sonucunda oluşan metabolitler tarafından inaktive edildiği için bu grup maddeler “intihtar inhibitörleri” olarak da adlandırılmaktadırlar. Tip-2 inhibitörler ise enzimi tahrip etmemekte, etkileri genellikle geri dönüşümlü olup inhibisyon için maddenin sürekli ortamda bulunması gerekmektedir (78).

İkinci kuşak aromataz inhibitörleri arasında tip-1 steroidal inaktivatör olan formestan (4-hidroksiandrostendion), tip-2 imidazol olan fadrazol ve yapısal olarak AG'ye benzeyen tip-2 inhibitör roglutimid (piridoglutetimid) yer almaktadır (12).

Üçüncü kuşak aromataz inhibitörleri ise 1990'lı yıllarda geliştirilmiş olup aralarında tip-1 steroidal ajan olan eksemestan, tip-2 nonsteroidal imidazol olan anastrozol ve letrozol sayılabilir (12). Bu yeni ajanların AG'den daha potent, menapoz sonrası kadınlarda serum östrojen seviyesini azaltmada daha etkili oldukları bildirilmiştir (93, 94). Oral olarak aktif, potent ve selektif olan üçüncü kuşak aromataz inhibitörlerinin gelişimi hormon duyarlı meme kanserinin tedavisinde önemli bir ilerleme olmuştur ve günümüzde erken ve gelişmiş dönemdeki meme kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (12, 89).

1.1.2.4.1. Aminoglutetimid

Birinci kuşak Tip-2 aromataz inhibitörü olan AG esas olarak antikonvülzan olarak geliştirilmiştir (12). Ancak tesadüfi olarak adrenakortikal steroidlerin sentezini inhibe ettiği bulunmuştur (12). AG'in kullanımındaki temel amaç, postmenopozal dönemdeki kadınlarda plazma östrojenleri periferel dokuda aromataz enzimi ile adrenal androjenlerden üretildiğinden bu androjenlerin ortadan kaldırılması ile meme kanserinde östrojenik stimülasyonun zayıflatılmasıdır (95). Santen ve ark. (1978)

AG'nin postmenopozal dönemdeki meme kanserli kadınlarda aromataz aktivitesini etkin bir şekilde baskıladığını bildirmişlerdir (96). AG antikonvülzan ekisi ile bağlantılı olarak belirgin toksisiteye sahip olması ve aromataz inhibitör etkisinin zayıf olması nedeniyle kullanımdan kaldırılmıştır (12).

1.1.2.4.2. Anastrozol

Anastrozol (Arimidex™, 2,2[5-(1H-1,2,4- triazol-1-il-metil)-1,3-fenilen]-bis(2 metilpropionitril)), potent ve selektif bir benziltriazol türevi olup glukokortikoid ve mineralokortikoid sentezini değiştirmeden spesifik olarak östrojen biyosentezini bloke etmek üzere tasarlanmıştır (12, 97). Anastrozol letrazole benzer şekilde CYP19'un hem grubuna yarışmalı ve spesifik olarak bağlanmaktadır (12). Anastrozol; postmenopozal dönemdeki, ER (+) erken aşamadaki meme kanserli kadınların adjuvan tedavisinde oral yoldan kullanım amacıyla onaylanmıştır (98).

Anastrozol kullanımının düşük oranda vajinal kanamaya, vajinal kuruluğa, ateş basmasına, endometriyal kansere, iskemik serebrovasküler olaylara, venöz tromboembolik olaylara, pulmonar embolizmi içeren derin venöz damar trombozuna neden olduğu belirtilmiştir (98).

Tamoksifen ile karşılaştırıldığında anastrozolün advers etkilerinin daha az olduğu belirlenmiştir (98). Erken dönemde meme kanserinde anastrozol kullanımı sonrasında tümörün yeniden oluşum süresinin tamoksifen kullanımına göre daha uzun olduğu ve primer kontralateral tümör oluşum oranının daha az olduğu belirtilmektedir (99). Tamoksifen alırken meme kanseri ilerleyen postmenopozal dönemdeki kadınlarda yapılan deneysel çalışmalarda anastrozolün tamoksifene kıyasla hayatta kalış süresini istatistiksel olarak önemli derecede uzattığı gözlenmiştir (12).

1.1.2.4.3. Letrazol

Letrazolün nonsteroidal yapılı, oldukça spesifik ve potent bir aromataz inhibitörü olduğu belirtilmektedir. Letrazol etkin olması, tolere edilebilirliğinin yüksek olması, uygun fiyatlı olması nedenleri ile ileri meme kanserinde ilk basamak tedavi olarak önerilmektedir. Antiöstrojen tedavinin uygulanması sonucunda ilerleyen meme kanserinde standart ikinci basamak terapi olarak da etkinlik göstermektedir (100).

Letrazol, primer meme kanserli postmenopozal dönemdeki kadınlarda tüm vücut aromatzasyonunu inhibe etmekte ve tümör içerisindeki lokal aromatzasyonu azaltmakta ancak vücuttaki diğer hormonların seviyesini değiştirmemektedir (12).

Antiöstrojenler ile tedavi edilen meme kanserli postmenopozal dönemdeki kadınlarda yapılan bir çalışmada letrazolün anastrazol veya megastrol asetat kadar iyi, hatta bu ilaçlardan daha iyi tolere edilebildiği saptanmıştır (12, 100). Letrazolün 5 yıl destekleyici tamoksifen tedavisinden sonra kullanımı meme kanserinin yeniden oluşum süresini geciktirmektedir (100, 101).

Letrazol kullanımı ile oluşan en yaygın advers etkilerin ateş basması, mide bulantısı, osteoporoz, baş ağrısı, saçlarda azalma olduğu belirtilmektedir. Meme kanserli postmenopozal dönemdeki kadınlarda yapılan geniş denemelerde letrazolün en az tamoksifen, anastrazol ve megastrol asetat kadar iyi tolere edildiği; anastrazol ve tamoksifene benzer advers etkilere neden olduğu saptanmıştır (100).

1.1.2.4.4. Eksemestan

Aromatazın doğal substratı olan androstenadionun analoğu olan eksemestanın postmenopozal dönemdeki meme kanserli kadınlarda plazma ve idrar östrojen düzeylerini etkili olarak baskılayan, iyi tolere edilebilen bir aromataz inhibitörü olduğu belirtilmektedir (12, 102). Geri dönüşümlü yarışmalı inhibitör olan anastrazol ve letrazolün aksine eksemestan aromatazı geri dönüşümsüz olarak inaktive etmekte ve “intihar substratı” olarak adlandırılmaktadır (12).

Eksemestan kullanımı ile görülen advers etkilerin ateş basması, mide bulantısı, yorgunluk, terlemede artış, periferel ödem, iştah artışı olduğu belirtilmiştir. Eksemestanın tamoksifenden daha sık artraljiye, diyareye, görsel bozukluklara ve osteoporozda artışa neden olduğu, tamoksifenin ise eksemestandan daha sık jinekolojik semptomlara, tromboembolik olaylara, vajinal kanamaya, kas kramplarına neden olduğu belirtilmektedir (103).

1.1.2.4.5. Aromataz inhibitörlerinin diğer yararlı etkileri

Aromataz inhibitörlerinin meme kanseri tedavisindeki kullanımlarının dışında östrojenin rol aldığı diğer bazı hastalıklarda hastalığın oluşumu, gelişimi ve seyri üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Aromataz inhibitörlerinin meme kanseri dışındaki malign hastalıklarda büyük bir etki göstermediği, ovaryum ve endometriyum kanserlerinde düşük etkili olduğu belirtilmektedir. Ancak, ER (+)

ovaryum ve endometriyum kanserli hastaların aromataz inhibitörlerine daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Daha önce tedavi uygulanmayan ovaryum kanserli hastalar ile progesteron tedavisi uygulanmayan endometriyum kanserli hastaların aromataz inhibitörlerine daha fazla duyarlılık gösterdikleri bildirilmektedir. Ovaryum fonksiyonu çok az olan veya hiç olmayan endometriyoz hastalarında aromataz inhibitörlerinin etkili olduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Aromataz inhibitörleri endometriyal stromal sarkomanın tedavisinde etkili olurken karaciğer ve prostat kanseri tedavisinde etki göstermemektedirler. Multinodüler tiroid olgularında ise aromataz inhibitörleri etki göstermemektedir (78).

Aromataz inhibitörleri dişilerde infertilitenin tedavisinde rol oynamaktadır. Antiöstrojenler sınırlı bir endometriyum büyümesine neden olurken aromataz inhibitörleri ovulasyonu indüklemekte ve endometriyumun tam olarak gelişmesini sağlamaktadırlar (78).

Aromataz inhibitörleri erkeklerde dolaşımdaki LH ve testosteron seviyesinde artışa yol açarken östrojen seviyesinde azalmaya neden olmaktadır. Bu tedavi bazı infertil erkeklerde ve testis fonksiyonu azalmış ileri yaştaki erkeklerde önemli olabilmektedir (78).

Aromataz inhibitörleri androjenler ile birlikte kullanıldığında ergenliği geciken gençlerde etki göstermektedir. Dişilerde erkeksi özelliklerin gelişimine neden olmakta ancak epifizin kapanmasını geciktirerek boyun tahmin edilenden daha fazla uzamasına neden olmaktadır (78).

Aromataz inhibitörleri iyi tolere edilmelerine rağmen kemik rezorpsiyonunu arttırmaları, kardiyovasküler sisteme ve bilişsel fonksiyona olası etkileri nedeniyle tolere edilebilirlikleri tartışılmaktadır. Yapılan çalışmaların çoğu aromataz inhibitörlerinin kemik döngüsünü arttırdığını, kemik mineral yoğunluğunu azalttığını ancak kemiklerin kırılma oranını arttırmadığını göstermektedir. Kalsiyum, vitamin D ve bis-fosfonatlar oluşan kemik kaybını onarabilmekte veya kemik kaybına karşı koruyucu olabilmektedirler. Aromataz inhibitörlerinin bilişsel fonksiyona etkilerini gösteren sınırlı bilgiler bu etkinin ciddi bir etki olduğuna dair bir bulgu sağlamamaktadır (78).

Malign hastalıklarda aromataz inhibitörlerinin risk/yarar oranının oldukça düşük olduğu belirtilmektedir (78). Aromataz inhibitörlerinden tamoksifenin bazı hastalıklarda kullanımı ve kullanım sonucu gözlenen etkiler Tablo1.7.'de gösterilmiştir.

Tablo1.7. Tamoksifenin bazı hastalıklarda kullanımı ve etkileri (78).

Hastalık adı	Gözlenen etki
Endometriyum kanseri	Etkili
Prostat kanseri	Düşük etki
Ovaryum kanseri	Sınırlı sayıdaki denemede etkili
Böbrek kanseri	Düşük etkili
Melenoma	Etkisiz
Kolorektal tümörler	Düşük etkili
Gastrik kanser	Etkisiz
Özofagus kanseri	Etkisiz
Pankreas kanseri	Düşük etkili
Karaciğer kanseri	Etkisiz
Meningioma	Olası stabilizasyon
Hipofiz tümörü	Bazı prolaktinomalarda etkili
Desmoid tümörler	Tümörde azalma
Dişilerde ve erkeklerde infertilite	Bazı hastalarda etkili
İyi huylu beyin hastalıkları	Etkili
Laktasyonun baskılanması	Etkili
Jinekomasti	Etkili
Gecikmiş ergenlik	Etkili

1.1.3. AROMATAZ AKTİVİTESİ TAYİN YÖNTEMLERİ

1.1.3.1. Aromataz Aktivitesi Ölçüm Yöntemleri

Aromataz aktivitesi tayini için uygulanmakta olan birçok *in vitro* ve *in vivo* yöntem vardır ve bu yöntemler genellikle iki mekanizma temellidir (23);

- Ürün izolasyon yöntemi
- Radyometrik yöntem

1.1.3.1.1. Ürün İzolasyon Yöntemi

Bu yönteme göre substrat *in vitro* ya da *in vivo* sisteme uygulanır, planlanan süre boyunca inkübe edilir, oluşan östrojen ürünleri izole edilir ve düzeyleri ölçülür. Sıklıkla radyoişaretlenmiş substrat (^3H ya da ^{14}C) kullanılarak, aromataz katalizörlüğünde oluşan radyoişaretli steroidler izole edilir ve kromatografik yöntemler ile ya da sintilasyon sayımı ile ürünlerin miktar tayini yapılır. Ürün izolasyon yönteminde miktar tayini yapmak için kullanılan diğer yöntemler; kütle spektroskopisi, radyoimmün test, ELISA testidir.

1.1.3.1.2. Radyometrik Yöntem

$^3\text{H}_2\text{O}$ yöntemi de denmektedir. Bu yöntem ile $1\beta\text{-}^3\text{H}$ -androstendion substratının aromataz katalizörlüğünde gerçekleşen reaksiyonda yan ürün olarak

açığa çıkan $^3\text{H}_2\text{O}$ düzeyi ölçülür. Ürün izolasyon yöntemine oldukça benzer bir yöntemdir ancak ürün miktar tayini için kromatografik yöntemler kullanılmaz ve oluşan steroidal ürünlerin ayrımı yapılmaz. Bu metod insan plasenta mikrozomları, yumurtalık dokusu ve mikrozomları, hücre kültürü çalışmaları (insan meme kanseri hücreleri ve insan koriokarsinoma hücreleri de dahil olmak üzere), izole edilmiş insan yumurtalık ve meme hücreleri kullanılarak tasarlanmış *in vitro* aromataz tayin yöntemi olarak onaylanmıştır (23).

Aromataz aktivitesinin değil ancak protein düzeylerinin (ekspresyonunun) belirlenmesi amacıyla westernblot analizi yapılabilir. Ayrıca aromataz gen ekspresyonunun downregülasyonunun ortaya konması amacıyla mRNA düzeylerinin ölçüldüğü ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) çalışmalarının yapıldığı çalışmalar da mevcuttur (104; 105).

1.1.3.2. Aromataz İnhibitörleri Çalışmaları İçin *In Vitro* Model Sistemler

1.1.3.2.1. İnsan Plasental Mikrozomal Aromatazın Aktivite Tayini

Aromataz enzimi, gebelik döneminde koriyonik villilerin dış katmanında bulunan sinsityotrofoblastlardan yüksek oranda eksprese edilir (106). Plasenta doğumdan sonra atılıma uğrayan bir doku olduğundan, plasental mikrozomlar kolay ulaşılabilen ve enzim içeriğince zengin olduğundan aromataz kaynağı olarak kullanılmaktadır (78).

Bu yöntem ilk olarak 1959 yılında K.J. Ryan tarafından uygulanmıştır ve günümüzde halen çeşitli endokrin bozucuların aromataz inhibisyonunun ortaya konmasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Potansiyel steroidal ya da non-steroidal aromataz inhibisyonunun araştırılması amacıyla akademik araştırmalarda ve farmasötik endüstride de bu yöntemden faydalanılmaktadır (23).

Aromataz enzimi üzerine etkisi araştırılan madde, mikrozomlar ile inkübe edildikten sonra radyometrik ya da ürün izolasyon ölçüm yöntemleri kullanılarak katalitik aktivite tayini gerçekleştirilir. Bu yöntem insan rekombinant mikrozomları (CYP19+) kullanılarak da gerçekleştirilebilir. *In vitro* yöntem EPA tarafından da onaylanmıştır (107).

1.1.3.2.2. İnsan Hücre Kültürü Sistemleri İle Aromataz Aktivitesi Tayini

İnsan JEG-3 ve JAR koriokarsinoma hücre hatları, malign plasenta dokusundan izole edilmiş sitotrofoblastlardır ve bileşiklerin aromataz aktivitesine etkilerinin

araştırılması için kullanılmaktadır. Bu hücre hatlarından, bileşenin plasenta üzerine olası toksik etkilerinin belirlenmesinde de yararlanılır.

Aromataz ekspresyonu ve aromataz enzim düzeyleri dokular arası farklılık göstermektedir. Bu nedenle yapılacak çalışmanın dizaynına göre aromataz ekspresyonu yapan diğer insan hücre hatlarında (MCF-7, SK-BR-3, H295R gibi) da aromataz aktivitesi tayini yapılmaktadır (108, 109).

1.1.3.2.3. Aromataz Aktivitesinin Tayininde Kullanılan Diğer *İn Vitro* Yöntemler

Aromataz aktivitesinin tayininde rekombinant insan aromataz enzimi kullanılarak kimyasalların aromataz aktivitesi üzerine inhibitör etkinliklerinin değerlendirilmesine dayanan *in vitro* bir analiz yer almaktadır. Bu yöntemde florometrik bir substrat olan 7-metoksi-triflorometikkumarin (MFC) kullanılmaktadır. CYP19, NADPH üreten bir sistemde MFC substratını demetilizasyona uğratarak floresans şiddetini azaltır ve buna bağlı olarak enzim aktivitesi hesaplanır (110).

1.1.3.3. Aromataz İnhibitörü Çalışmaları İçin *İn Vivo* Model Sistemler

Türler arası endokrin farklılıklara bağlı olarak dolaşımdaki steroid hormonal konsantrasyonları da türden türe farklılık göstermektedir. Bu farklılığın en önemli sebeplerinden biri aromataz enziminin organizmalardaki düzeylerinde farklılıklar olmasıdır. Bu nedenle aromataz aktivitesinin *in vivo* analizlerle ortaya konması zordur. Ayrıca, östrojenin ekstraplandular dokularda üretimi bazı türler için önem taşımaktadır. Ekstraplandular dokularda aromataz aktivitesi ile östrojen üretimi, lokal olarak o dokuda patolojik yanıtların gelişmesine neden olmaktadır. Örneğin, insan adipoz dokularında aromataz aktivitesinin görülmesi meme tümörlerinin oluşumuna sebep olmaktadır (111).

Hipofiz bezinden salgılanan gonadotropinler östrojen düzeylerinin artışına yol açabilmektedir. Bu etki aromataz enzim aktivitesinden bağımsızdır. *İn vivo* çalışmalarda östrojen düzeylerindeki değişimin aromataz aktivitesinin inhibisyonu ile olup olmadığının ayırt edilmesi önem taşır.

İn vitro tarama testleri ile elde edilen sonuçlardan yola çıkarak, kimyasal maddelerin aromataz aktivitesi üzerine etkileri, türler arası farklılıklar ve hipotalamus-hipofiz-ovaryum ekseninden kaynaklanan değişiklikler göz önüne alınarak, *in vivo* deneylerle ortaya konmalıdır (23).

1.1.3.3.1. Östrojen sentez ve üretiminin inhibisyonunun saptanması

İnsan plasental mikrozomlarında aktif inhibitörlerin tespit edilmesinden sonra bu bileşiklerin östrojen üretimini inhibe etme yeteneklerini *in vivo* olarak belirlemek için hayvan modellerindeki çalışmalar önemli hale gelmiştir. Bu amaçla bir dizi kemirici ve insan olmayan primat modelleri geliştirilmiştir. Bu modeller endokrin sistemde ve östrojen üretiminde inhibitörün etkilerini, bileşiğin antitümör etkisini belirlemeyi de kapsamaktadır (78).

1.1.3.3.2. Gebe kısrak serum gonadotropini (PMSG) uygulanmış sıçan modeli

PMSG enjeksiyonu ile hipofiz bezinden Luteinize edici hormon (LH) ve Folikül sitümüle edici hormon (FSH) salgısı inhibe edilerek, organizmadaki östrojen üretiminin hipofiz bağımlı yollardan olmaması amaçlanmıştır (78). Aromataz inhibitörlerinin *in vivo* östrojen sentezini ve üretimini inhibe edip etmediğini belirlemek amacıyla östrojen üretimi ovariyal venden toplanan kandan; aromataz aktivitesi ise PMSG enjeksiyonu sonrasında farklı zamanlarda hazırlanan ovariyal mikrozomlardan ölçülmüştür. Yöntemde 12 gün süre ile PMSG uygulanmış kemiriciler kullanılmıştır (112).

Bu modelde aromataz inhibitörlerinin ovaryum aromatzasyonunu doğrudan inhibe etmesiyle, *in vivo* östrojen sekresyonundaki değişimler araştırılabilmektedir (78).

1.1.3.3.3. Normal siklustaki kemiriciler

Brodie ve ark. (1978), yaptıkları çalışmada aromataz inhibitörlerinin östrus siklusun erken döneminde dişi kemiricilere uygulanması ile ovulasyonun inhibe olduğunu gözlemlemiştir. Aromataz inhibitörünün uygulanmasından 3 saat sonra ovaryum venasından alınan kanda östrojen sekresyonunun azaldığı, preovulator LH artışının inhibe edildiği ve ovulasyonun önlendiği tespit edilmiştir. Ovulasyon inhibisyonunun geçici olduğu ve uygulamadan 8 gün sonra fertilitenin normale döndüğü gözlenmiştir. Östrojenin aromataz inhibitörleri tedavisine ek olarak verilmesiyle etkilerin tersine döndüğü ve normal beklenen zamanda çiftleşmenin olduğu gözlenmiştir (112). Bu çalışma, ovulasyon sırasında inhibe edilen östrojenin etkisi ile ilgili bilgi sağlamaktadır. Bu yöntemin insanlarda kısa süreli aromataz inhibitörü uygulanmasının varolan fertilitte kontrol yöntemlerine alternatif bir yöntem olabileceği belirtilmiştir (78).

1.1.3.3.4. Aromataz knockout modeller

Östrojenlerin farklı hedef dokulardaki etkileri ile ilgili bilgi aromataz ve ER geninin çıkarılması (knockout modeller) ile elde edilmektedir. Bu amaçla pek çok model geliştirilmiştir. Bu modellerden bazıları Fisher ve arkadaşlarının (1998) kullandığı aromataz-knockout (ARKO) modeli, Course ve arkadaşlarının (1999) kullandığı ER α 'nın olmadığı α ERKO fare modeli, ER β 'nin olmadığı β ERKO fare modeli ve hem ER α hem de ER β 'nin olmadığı α/β ERKO fare modelleridir (113, 114). Bu model sistemler aromataz enziminin ve bireysel ER'lerin fonksiyonlarının *in vivo* olarak araştırılması bakımından önem kazanmaktadır (78).

1.1.3.3.5. Aromataz İnhibisyonunun Antitümör Etkinliğinin Tespiti İçin Modeller

Hormon bağımlı meme tümörleri üzerine yapılan çalışmalarda, Sprague-Dawley sıçanlarında dimetilbenzantrasen (DMBA) ve nitrozometik üre (NMU) ile kanser oluşumu indüklenerek sıçan modelleri oluşturulmaktadır (78). Broide ve ark. 1982 yılında yaptığı bir araştırmada, DMBA ile indüklenmiş meme tümörlü sıçan modelinde FSH, LH ve prolaktin hormonları bazal düzeyde bulunmuştur. Bu nedenle bu modellerde östrojen üretiminin hipofiz kaynaklı olmayacağı bilinmektedir. Aminoglutetimid uygulaması ile sıçanların tümör regresyonuna neden olduğu ortaya konmuştur, bu da östrojen üretiminin aromataz inhibisyonu ile baskılanmasıyla meme kanserinde tedavi adımı olarak kullanılabileceğini ispatlamıştır (115). Bu *in vivo* modelin, aromataz inhibitörlerinin *in vivo* etkinliğinin araştırılmasında kullanılabilecek bir yöntem olduğu görülmektedir.

1.1.3.3.6. Postmenapozal Meme Kanseri İçin Modeller

Yöntemde, insan plasental aromataz geni ile transfekte edilmiş MCF-7 hücreleri ya da plazmid vektör (MCF-7Cc hücreleri) ile transfekte edilmiş hücrelerin aşılandığı Matrigelli nude fareler kullanılmaktadır (116).

Yue ve arkadaşlarının (1994) uyguladığı model (116), aromataz inhibitörleri, östrojen reseptör antagonistleri, diğer hormonal aktif ajanlar için uygun bir yöntemdir. Ayrıca postmenopozal dönemdeki meme kanserli hastalarda aromataz inhibitörleri ve antiöstrojenlerin etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılabileceği, böylece de postmenopozal dönemde oluşan meme kanserinin tedavisinin geliştirilmesine yardımcı olabileceği belirtilmiştir (78).

1.1.4. MELATONİN

En kompleks organizmadan en basit organizma olan bakteriye kadar pek çok organizmada bulunan melatonin ana olarak epifizden üretilen ve salıverilen indol yapısında, lipofilik bir hormondur (2, 117-120) Aynı zamanda retinada ve birçok organda daha üretilmektedir (118). Canlı hücrelerin hem lipid hem de su bazlı kompartmanlarında çözünebilen melatonin, bu özelliği sayesinde hücre membranı da dâhil tüm bariyerleri kolayca geçebilmektedir (117). Melatonin gece, karanlıkta salgılanmaktadır (2, 117). Gece boyunca ışığın yeterli yoğunlukta, dalga boyunda ve sürekli olmasının melatonin üretimini baskıladığı bildirilmiştir (117, 121). Kış mevsimi süresince gün içerisindeki karanlık süresinin uzaması nedeniyle daha fazla melatonin salgılanmaktadır (2). İnsanlarda gece saat 2-3 civarında kandaki en yüksek konsantrasyon düzeylerine (60–80 pg/mL) ulaşan melatoninin, kandaki yarılanma ömrü yaklaşık 50-60 dakikadır ve gün içerisinde çok zor tespit edilebilecek düzeylere düşmektedir (117) Kandaki konsantrasyonu gece 10^{-9} - 10^{-11} M olmakta ve bu konsantrasyon fizyolojik konsantrasyon olarak kabul edilmektedir (122). Karaciğerdeki ilk geçiş metabolizması sonucunda melatoninin %90'ı 6-sülfatoksimeatonin'e katabolize olmakta ve idrar yoluyla vücuttan atılmaktadır. Melatoninin yaklaşık %70'i albümine bağlı olarak dolaşımda bulunmaktadır (117).

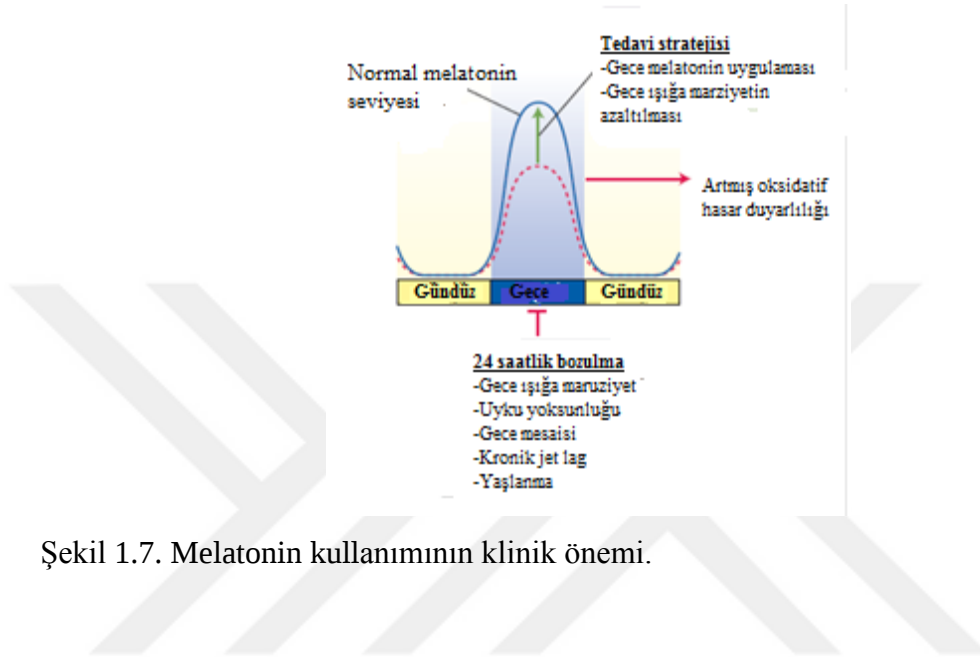
Melatoninin bilinen ana fonksiyonu sirkadyen ritmi düzenlemektir (2, 117). Günlük uyku/uyanıklık döngüsünün yanı sıra vücut sıcaklığı, mevsimsel üreme ritmi, retinal fizyoloji, immun aktivite, kanser gelişimi ve büyümesi, antioksidan sistem, mitokondriyal aktivite gibi birden fazla fizyolojik olay ve savunma sisteminde önemli role sahip olduğu bildirilmektedir (117, 118, 123).

Yaşlandıkça vücudun daha az melatonin ürettiği ve az melatonin üretiminin de yaşlanmanın nedenlerinden biri olduğu yönünde görüşler bulunmak ve melatonin düzeylerinde gözlenen bu azalmanın yaşlılıktaki uyku azalması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (2, 124). Melatonin, başta hormon bağımlı meme kanserleri olmak üzere farklı tümörlerde onkostatik amaçla kullanılmaktadır (125).

1.1.4.1. Melatoninin Terapötik Etkinliği ve Meme Kanserindeki Rolü

Melatoninin terapötik etkinliğe sahip olduğu sirkadyen ritm bozuklukları olan uykusuzluk, jet lag, vardiyalı çalışanlarda ve körlerde gözlenen uyku/uyanıklık döngüsü bozukluklarının tedavisi ile kanıtlanmıştır (124). Bu terapötik amaçlarla kullanımı için birçok ülkede gıda destek ürünü olarak piyasada yer almaktadır.

Melatonin ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi ilk ortaya koyan Cohen ve ark. olmuştur. Bu araştırmacılar 1978 yılında epifiz bezi fonksiyonunun azalmasına bağlı olarak melatonin salgısındaki azalmanın hiperöstrojenizme neden olduğunu, bunun da meme kanserinin indüksiyonu ile sonuçlandığını ileri sürmüşlerdir (126).



Şekil 1.7. Melatonin kullanımının klinik önemi.

Şekil 1.7’de görüldüğü gibi gece ışığa maruz kalma, uyku yetersizliği, vardiyalı çalışma, kronik jet lag ve yaşlanma gibi faktörler sirkadyen ritmi bozmaktadır. Bu ritmin bozulması gece boyunca olan melatonin sekresyonunun baskılanmasına neden olarak oksidatif hasara duyarlılığı arttırabilmektedir. Tedavideki hedef, gece melatonin takviyesi yapılması ve gece maruz kalınan ışığın azaltılmasıyla gece boyunca melatonin seviyesinin normale döndürülmesi olabilmektedir (127).

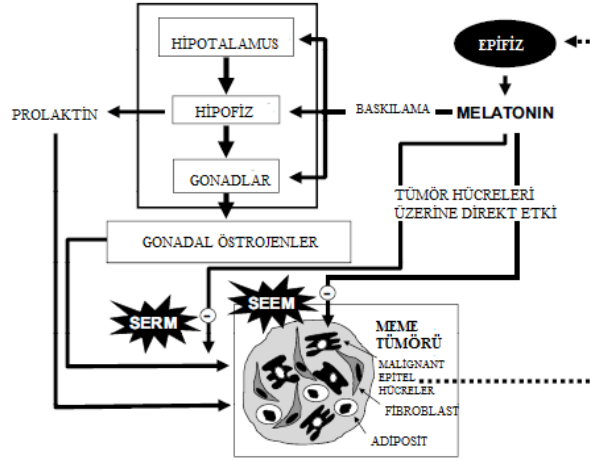
Stevens 1987 yılında, endüstriyel toplumlarda meme kanserinin artan insidansının gece boyunca yüksek seviyede ışığa maruz kalma ile ilişkili olduğu hipotezini ortaya atmıştır (128). Çoğunlukla gece boyunca çalışan kadınlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar bu kadınlarda meme kanseri riskinde artış olduğunu göstermiştir (117, 129, 130).

Coleman ve Reiter 1992 yılında geliştirdikleri hipotezde erken yaşlarda oluşan körlüğün epifiz bezinden yüksek miktarda melatonin salgılanmasına neden olduğunu ve bunun da meme kanser riskini azalttığını belirtmişlerdir (131). Tüm bu gözlemler

ve bulgular vardiyalı çalışma gibi gece melatonin düzeylerini azaltan durumların meme kanser riskinde artışa neden olduğu hipotezini doğurmuş ve bunun yansıması olarak Uluslararası kanser araştırma ajansı (IARC) “vardiyalı çalışma”yı insanlar için karsinogenik risk olarak değerlendirmiştir (132).

Melatonin meme kanseri hücreleri üzerinde çeşitli moleküler yollarla etkileşerek inhibitör ve proapoptatik etkilerini göstermektedir (120). Aromataz inhibitörü de olduğu gösterilen melatoninin meme kanseri tedavisinde iki farklı mekanizma aracılığı ile kullanılabileceği bildirilmektedir (105). Bu yaklaşımlar SERM ve SEEM etkileri üzerinden açıklanabilir (105, 120, 125).

Melatonin SERM etkisini östrojen bağımlı hücre proliferasyonunu düzenleyerek; östrojen reseptör ekspresyonunu, büyüme faktörlerinin ve protoonkogenlerin salınımını ve yayılmasını artırarak göstermektedir (105). Melatoninin östradiol (E2)’ün ER’e bağlanma aktivitesini ve ER- α ekspresyonunu azalttığı, başka bir deyişle reseptör afinitesini değil ancak sayısını azaltarak etki gösterdiği ifade edilmektedir. Melatoninin E2 tarafından ER- α transaktivasyonunu da azalttığı ve E2-ER- α kompleksinin DNA üzerindeki ERE’e bağlanmasını inhibe ettiği de bildirilmektedir (133-136). Melatoninin aromatazin, östrojen sülfatazin ve tip1,17 β -hidroksisteroid dehidrojenazın aktivitesini ve ekspresyonunu inhibe etmesi ve östrojen sülfotransferazı stimüle etmesi ise SEEM etkisinin sonucudur (87, 105, 125) Melatoninin bu her iki etki mekanizması ve ER α için spesifik oluşu meme kanseri tedavisinde melatonine potansiyel avantaj sağlamaktadır (105). Melatoninin SERM ve SEEM etki mekanizması Şekil 1.8’de gösterilmektedir.



Şekil 1.8. Meme kanserinin östrojen aracılıklı gelişiminde melatoninin etki edebildiği nöroendokrin mekanizmalar: dolaylı nöroendokrin mekanizmalar, nöroendokrin üreme ekseninin melatoninle baskılanması ve patolojik büyümeden sorumlu östrojenik hormonların azalması ve tümör hücresi ile doğrudan melatonin etkileşimleri (137).

Sadece ER α (+) meme tümör hücre hattının büyümesinin melatoninin fizyolojik konsantrasyonları ile inhibe edilebildiği; ER α (-) hücre hattında ise melatoninin etkisiz bulunduğu bildirilmektedir (138, 139). Bununla birlikte melatoninin ER α için seçici olduğu, Er β bulunduran hücrelerde benzer etkileri göstermediği bildirilmiştir (105).

Melatoninin hücre siklusunu durdurduğu ve apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (140, 141). Melatoninin efektif doz aralığının 1-100 mM olduğu ve 1mM konsantrasyonda hücre ölümünü %75 indüklediği saptanmıştır (141).

Meme kanseri hücrelerinde aromataz ekspresyonu arttığı ve meme bezinde yüksek seviyede östradiol sentezlendiği için aromataz aktivitesinin melatonin ile inhibisyonunun tümör büyümesinin kontrolünde önemli bir mekanizma olabileceği düşünülmektedir (120).

1.1.4.2. *İn vitro* çalışmalar

MCF-7 hücrelerinde yapılan ilk *in vitro* deneyler melatoninin fizyolojik konsantrasyonunda direkt olarak kanser hücre büyümesini baskıladığını göstermiştir (122, 142).

Melatonin, gece boyunca fizyolojik seviyelerde kanser hücrelerinde onkostatik etkiyi indüklerken farmakolojik düzeyde kanser hücrelerinde sitotoksik etki göstermektedir (117). ER (+) MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde yapılan *in vitro* deneylerde fizyolojik konsantrasyondaki (1 nM) melatoninin serum veya östradiol varlığında (a) hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, (b) hücre siklusu uzunluğunu düzenlediği, (c) MCF-7 hücrelerinin metastatik kapasitesini azalttığı ve östradiolün hücre çoğalmasını stimüle edici etkisini ortadan kaldırdığı gözlenmiştir (122, 136, 143).

Melatonin, malign epitel hücreleri ve proksimal endotel hücreleri arasında yer alan parakrin etkileşimlerde rol oynayabilmektedir. Ayrıca, vasküler endotelial büyüme faktörünü baskılayarak endotel hücrelerin proliferasyonunu, invazyonunu ve migrasyonunu azaltmada önemli olabilmektedir (144).

Del Rio ve ark. (2004) melatonin ve türevlerinin güçlü etki gösterirken toksisiteye neden olmadığını ifade etmişlerdir. Ayrıca melatoninin ilerlemiş meme, ovaryum ve kolon tümörlerinde ER α 'ya inhibitör ajan olarak etki etme potansiyeline sahip olduğunu göstermişlerdir (145).

Melatoninin onkostatik etkileri hem kimyasallar ile indüklenen rat meme tümörlerinin kullanıldığı *in vivo* modellerde hem de MCF-7 insan meme kanser hücrelerinin kullanıldığı *in vitro* modellerde tespit edilmiştir. Melatoninin sitostatik etkileri genellikle indolaminin hem ER reseptörleri ile hem de melatonin reseptörleri ile etkileşimi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Son dönemde bazı reseptörden ve östrojenden bağımsız sinyal yollarının melatonin ile aktive edildiği keşfedilmiştir (120).

Scott ve ark. (2001)'ı, Cucina ve ark.(2009), Mao ve ark. (2010), Ram ve ark. (2002) ile Gonzalez ve ark. (2007) melatoninin MCF-7 hücrelerinde hücre proliferasyonu inhibisyonuna neden olduğunu saptamışlardır (146-150).

Papazisis ve ark.(1998)'nın yaptığı çalışmada ise fizyolojik dozda kullanılan melatoninin MCF-7 ve T47D hücrelerinde herhangi bir inhibitör etkiye neden olmadığı, yüksek dozda kullanımında ise (1 mM) meme kanseri hücre tipi veya reseptör çeşidinden bağımsız olarak sitotoksik etkiye neden olduğu gözlenmiştir (151).

Chottanapund ve ark.'nın (2014) yaptığı çalışmada T47D kanser hücreleri ile ko-kültüre edilen insan meme adipoz fibroblastarında(BAF) melatoninin aromataz inhibitörü olarak etki ettiği gösterilmiştir (152) .

Cui ve arkadaşlarının melatonin ile konsantrasyonlarda umbilikal ven endotel hücrelerinde (HUVEC) yaptığı çalışmada fizyolojik konsantrasyondan düşük olan 0.1 nM konsantrasyonda kullanılan melatonin istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir oranda hücre proliferasyonunu arttırdığı, fizyolojik konsantrasyona yakın bir konsantrasyonda kullanıldığında hücre proliferasyonunda bir değişiklik oluşturmadığı, 10nM'den yüksek konsantrasyonda kullanıldığında ise hücre proliferasyonunu önemli oranda azaltarak, hücresel apoptozu arttırdığı ve hücre siklusu uzunluğunu düzenlediğini tespit etmişlerdir (153)

Cui ve ark. (2008) melatonin 1mM ve 100 nM konsantrasyonlarda HUVEC proliferasyonunu azalttığını tespit etmişlerdir (154).

Knower ve ark (2012) BAF primer meme fibroblastları ve meme kanseri ile birliktaki fibroblastlar (CAF) ile yaptıkları çalışmada melatoninin farmakolojik (10 μ M), fizyolojik (1 nM) ve sub-fizyolojik (10 pM) konsantrasyonlarda CYP19A1 transkripsiyonunu ve aromataz aktivitesini baskıladığını bulmuşlardır (155).

Gonzalez ve ark. (2007) melatoninin farmakolojik konsantrasyonda (1mM) aromataz enziminin aktivitesini ve ekspresyonunu inhibe ederek östrojen reseptörlerini eksprese eden ve androjenlerden östrojen sentezleyebilen C6 glioma hücrelerinin büyümesini azalttığını tespit etmişlerdir (156)

Izykowska ve ark. (2009) insan melanoma hücrelerinde yaptıkları çalışmalarında melatoninin fizyolojik konsantrasyonda herhangi bir onkostatik etki göstermezken farmakolojik konsantrasyonda hücre proliferasyonunu stimüle ettiğini, ayrıca hücreleri UVA ve UVB etkisinden koruduğunu tespit etmişlerdir (157).

Chottanapund,ve ark. (2014)'ı yaptıkları çalışmada melatoninin letrozol kadar güçlü bir aromataz inhibitörü olduğunu ve 20 nM konsantrasyonda ortamda bulunan testosteronun proliferatif etkisini tamamen ortadan kaldırdığını tespit etmişlerdir (152).

Melatonin; meme, prostat, ovaryum, karaciğer, endometriyal, koryokarsinoma, melanom, kolon ve idrar kesesi kanser hücreleri gibi pek çok hücre hattı kanserinin proliferasyonunu *in vitro* olarak inhibe etmektedir. Melatonin, tek başına veya diğer ajanlarla birlikte apoptatik kanser hücre ölümünü indüklemektedir (117).

1.1.4.3. *İn vivo* alışmalar

Melatonin, sıçanlarda 12-dimetilbenz[*a*]antrasen (DMBA) veya *N*-nitrosometilüre (NMU) ile indüklenen meme kanserinde tümör insidensini ve büyüklüğünü önemli ölçüde azaltmaktadır (158-160).

Cos ve ark. (2006) kemiricilerde yaptıkları çalışmada melatoninin tümöral dokudaki aromataz aktivitesini inhibe ederek hormon bağımlı meme tümörleri üzerinde anti-tümöral etki gösterebileceğini saptamışlardır (161).

1.1.4.4. İnsan alışmaları

Farklı türdeki kanser hastalarında melatonin ile yapılan klinik çalışmalar melatonin terapisinin yararlı etkileri olduğunu göstermiştir. Melatonin (a) birkaç metastazlı hastada hayatta kalmayı arttırmış, (b) kanserin ilerlemesini engellemiş, (c) yaşam kalitesini ve performansı arttırmış, (d) geleneksel tedavilerle oluşan bazı yan etkilerin (hipotansiyon, trombositopeni, miyelodisplastik sendrom, lenfositopeni) ciddiyetini ve insidensini azaltmıştır (162-165). Melatonin destek tedavisinin sadece kemoterapi veya radyoterapi gören hastalara kıyasla hayatta kalmayı 1 yıl uzattığı gözlenmiştir. Klinik denemeler melatoninin kemoterapinin, immunoterapinin ve/veya radyoterapinin toksisitesini azalttığını da göstermektedir. Kanser hastalarında melatoninin farmakolojik dozunun güvenli ve iyi tolere edilebilir olduğu da gözlenmiştir (117).

Seabra ve ark.(2000)'nın yaptığı çalışmada melatonin 4 hafta süre ile sağlıklı gönüllülere oral yoldan 10 mg/kg/gün dozda uygulandığında herhangi bir toksik etki gözlenmediği bildirilmiştir (166).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal maddeler Tablo 2.1’de belirtilmiştir.

Tablo 2.1. Kullanılan kimyasal maddeler

<u>Kimyasal madde</u>	<u>Firma adı</u>
%10 aktif kömür-dekstran uygulanmış fetal sıgır serumu (CD-FBS)	Sigma F6765
Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM)	İnvitrogen 41966-029
DMEM (fenol kırmızısı içermeyen)	İnvitrogen 21063029
DMEM F12	Sigma D8062
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Merck 8.02912.2500
Etanol (EtOH)	Merck K41392783037
Fetal sıgır serumu (FBS)	Hyclone FBS SH30070.03
Isıyla inaktive edilmiş FBS	Gibco 10500-064
Minimum temel ortam-esansiyel olmayan amino asit (MEM-NEAA)	Gibco 11140
L-Glutamin	Gibco 25030-024
17 β -östradiol	Sigma E8875
Sodyum pirüvat	Sigma P5280
Tripsin- Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	İnvitrogen 25300
[3(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] (MTT)	Molecular Probes Inc M6494
BD CYP 19 kit	Gentest 459520
ATP kit	Promega G7472 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay
CHO-K1 Çin Hamster Over hücreleri	ATCC CCL-61
MCF-7 BUS hücreleri	Prof. A. Soto’dan temin edildi.

Fosfat tampon çözeltisi (PBS)	İnvitrogen 10010-015
Testosteron	Sigma 86500
Fulvestran	Sigma I4409
Ketokonazol	Sigma K1003
Triton X- 100	Sigma T8787

2.1.2. Kullanılan Gereçler

Tez çalışması kapsamında kullanılan gereçler Tablo 2.2’de belirtilmiştir.

Tablo 2.2. Kullanılan gereçler

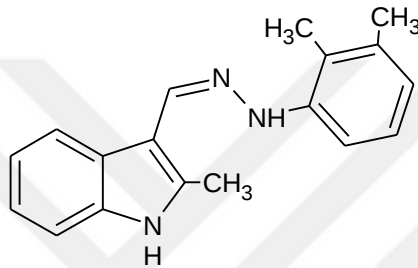
<u>Makine ve teçhizat</u>	<u>Firma adı ve modeli</u>
Buzdolabı	Ariston hotpoint
75 cm ³ flask	Santa-cruz sc-200263
25 cm ³ flask	Santa-cruz sc-200262
İnkübatör	Nuaire nu-5510e
Laminar akımlı kabin	Shinsaeng scbn 1013/1300
Mikroskop	Olympus ckx41
Hemositomete	Marienfeld 0640110
Otomatik mikropipet (0.5-10 μ)	Brand ve Eppendorf
Otomatik mikropipet (10-100 μ l)	Brand ve Eppendorf
Otomatik mikropipet (100-1000 μ l)	Brand ve Eppendorf
8 kanallı otomatik mikropipet	Brand 703708
Otomatik pipetör	Brand
Steril filtre	Minisart NML Syringe Filters 16534
96 kuyucuklu plaka	Costar 3599 Greiner bio one 655-209
Spektrofotometre	Thermo Scientific Varioskan Flash plaka okuyucu
Su banyosu	Wisabath wb-22
Terazi	Sartorius BI610 ve GP1200P
Vorteks	Nüvenm110 velpscientifica 2x3

2.1.3. Analiz edilen Melatonin Analogları

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sibel Süzen tarafından sentezlenen ve bu çalışmada kullanılan melatonin analogları kimyasal yapılarına göre 3 gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar 2-metilindol yapısındaki M maddeleri, 4-florofenilindol yapısındaki CH maddeleri ve 1-metilindol yapısındaki HD maddeleridir.

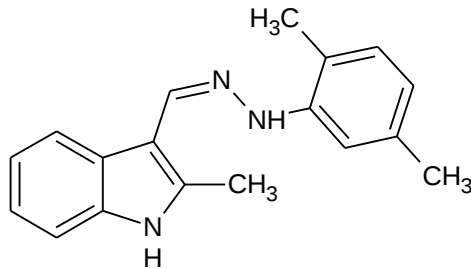
2.1.3.1. M maddeleri

M1 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (2,3-dimetilfenil) hidrazon



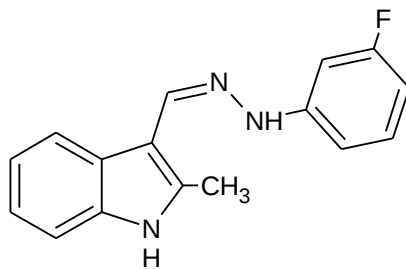
Molekül ağırlığı: 278 g/mol

M2 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (2,5-dimetilfenil) hidrazon



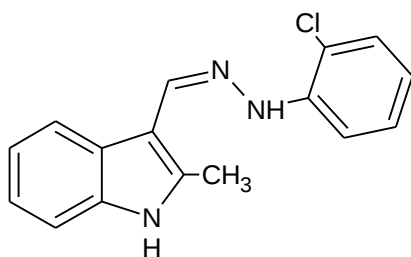
Molekül ağırlığı: 319 g/mol

M3 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (3-florofenil) hidrazon



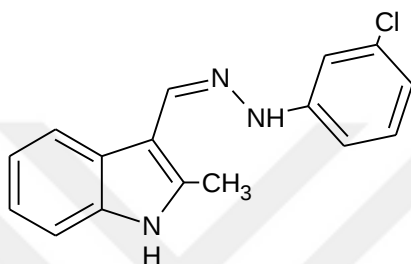
Molekül ağırlığı: 269 g/mol

M4 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (2-klorofenil) hidrazon



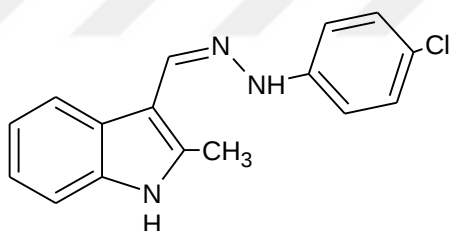
Molekül ağırlığı: 286 g/mol

M5 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (3-klorofenil) hidrazon



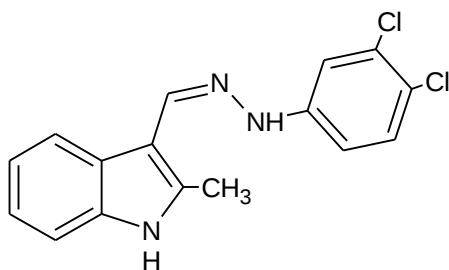
Molekül ağırlığı: 286 g/mol

M6 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (4-klorofenil) hidrazon



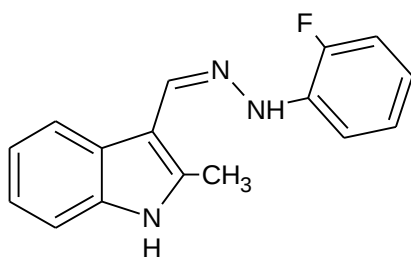
Molekül ağırlığı: 286 g/mol

M7 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (3,4-diklorofenil) hidrazon



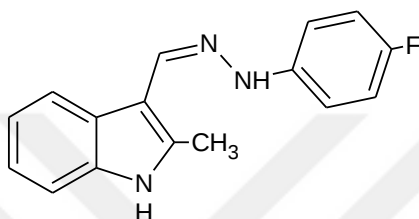
Molekül ağırlığı: 320 g/mol

M12 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (2-florofenil) hidrazon



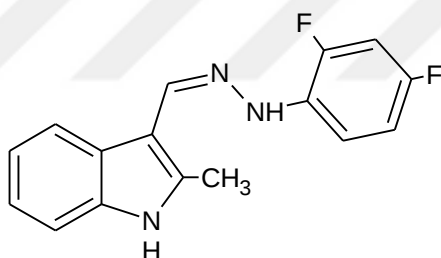
Molekül ağırlığı: 269 g/mol

M13 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (4-florofenil) hidrazon



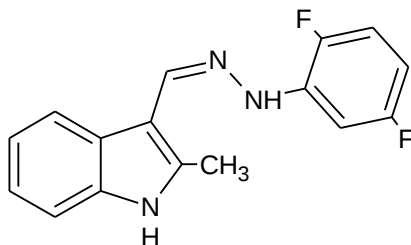
Molekül ağırlığı: 269 g/mol

M14 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (2,4-diflorofenil) hidrazon



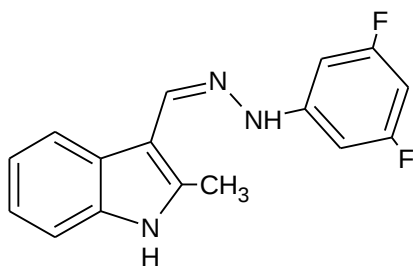
Molekül ağırlığı: 286 g/mol

M15 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (2,5-diflorofenil) hidrazon



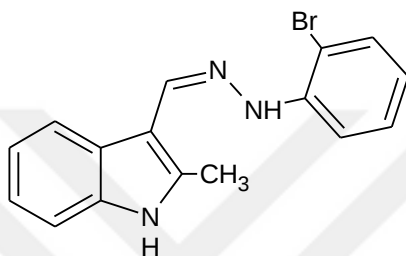
Molekül ağırlığı: 287 g/mol

M16 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (3,5-diflorofenil) hidrazon



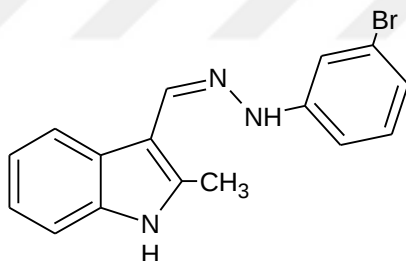
Molekül ağırlığı: 287 g/mol

M17 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (2-bromofenil) hidrazon



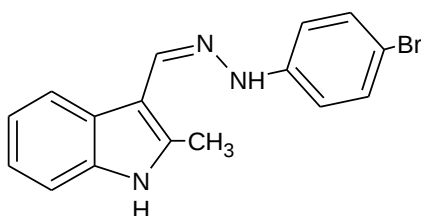
Molekül ağırlığı: 329 g/mol

M18 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (3-bromofenil) hidrazon



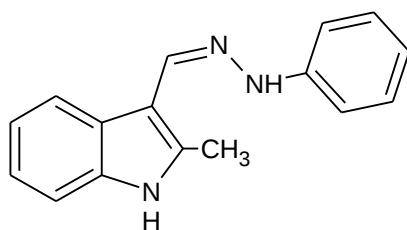
Molekül ağırlığı: 329 g/mol

M19 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (4-bromofenil) hidrazon



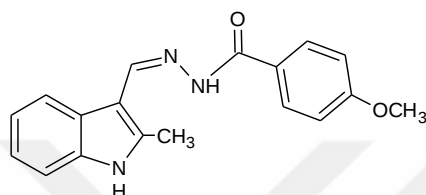
Molekül ağırlığı: 329 g/mol

M20 2-metilindol-3-karboksialdehit fenil hidrazon



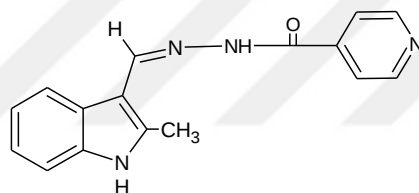
Molekül ağırlığı: 251 g/mol

M22 N- (4 metoksibenzoil) – N' - (2-metilindolil-3-metilen) hidrazon



Molekül ağırlığı: 308 g/mol

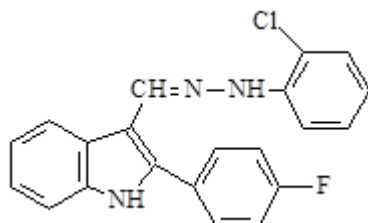
M23 2-metilindol-3-karboksialdehit izonikotinoil hidrazon



Molekül ağırlığı: 280 g/mol

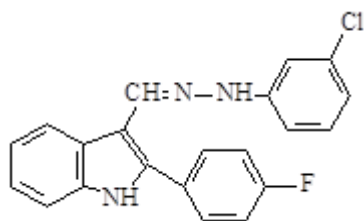
2.1.3.2. CH Maddeleri

CH1 3-((2-(2-klorofenil)hidrazon)metil)-2-(4-florofenil)-1H-indol



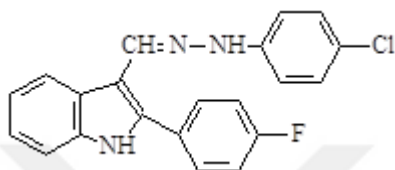
Molekül ağırlığı: 363,82 g/mol

CH2 3-((2-(3- klorofenil)hidrazon)metil)-2-(4-florofenil)-1H-indol



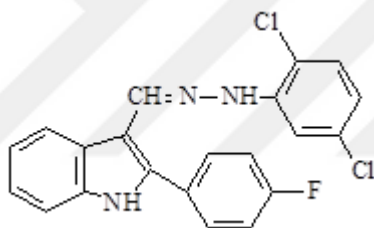
Molekül ağırlığı: 363,09 g/mol

CH3 3-((2-(4-klorofenil)hidrazon)metil)-2-(4-florofenil)-1H-indol



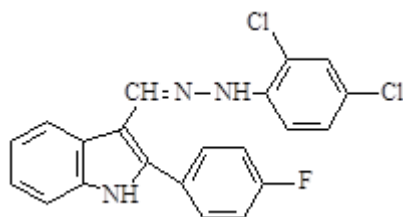
Molekül ağırlığı: 363,82 g/mol

CH4 3-((2-(2,5- diklorofenil)hidrazon)metil)-2-(4-florofenil)-1H-indol



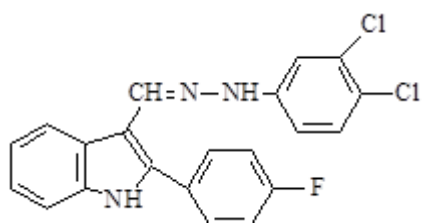
Molekül ağırlığı: 398,26 g/mol

CH5 3-((2-(2,4-diklorofenil)hidrazon)metil)-2-(4-florofenil)-1H-indol



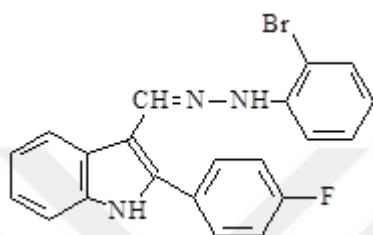
Molekül ağırlığı: 398,26 g/mol

CH6 3-((2-(3,4-diklorofenil)hidrazon)metil)-2-(4-florofenil)-1H-indol



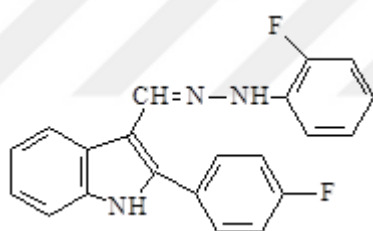
Molekül ağırlığı: 398,26 g/mol

CH8 3-((2-(2-bromofenil)hidrazon)metil)-2-(4-florofenil)-1H-indol



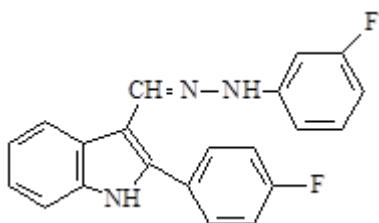
Molekül ağırlığı: 408,27 g/mol

CH11 2-(4-florofenil)-3-((2-(2-florofenil)hidrazon)metil)-1H-indol



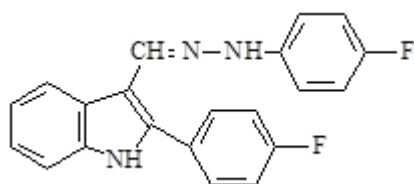
Molekül ağırlığı: 347,36 g/mol

CH12 2-(4-florofenil)-3-((2-(3-florofenil)hidrazon)metil)-1H-indol



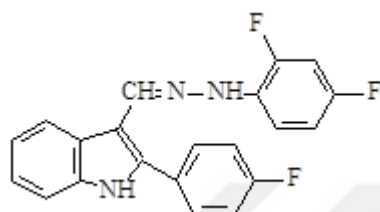
Molekül ağırlığı: 347,36 g/mol

CH13 2-(4-florofenil)-3-((2-(4-florofenil)hidrazon)metil)-1H-indol



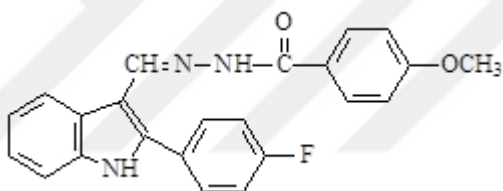
Molekül ağırlığı: 347,36 g/mol

CH14 3-((2-(2,4-diflorofenil)hidrazon)metil)-2-(4-florofenil)-1H-indol



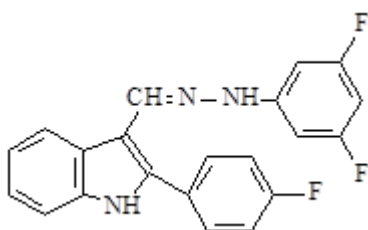
Molekül ağırlığı: 365,35 g/mol

CH16 N'-((2-(4-florofenil)-1H-indol-3-yl)metilen)-4-metoksibenzohidrazid



Molekül ağırlığı: 387,41 g/mol

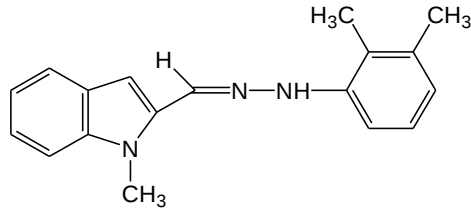
CH20 3-((2-(3,5-diflorofenil)hidrazon)metil)-2-(4-florofenil)-1H-indol



Molekül ağırlığı: 365,35 g/mol

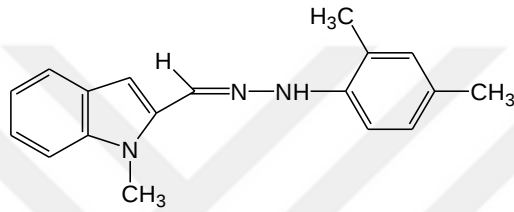
2.1.3.3. HD maddeleri

HD1 1-Metilindol-2-karboksaldehit (2,3-dimetil fenil) hidrazin



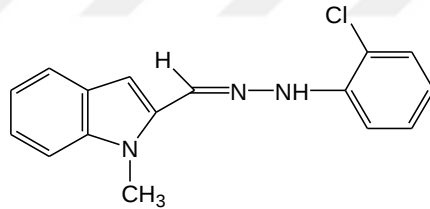
Molekül ağırlığı: 277 g/mol

HD2 1-Metilindol-2-karboksaldehit (2,4-dimetil fenil) hidrazin



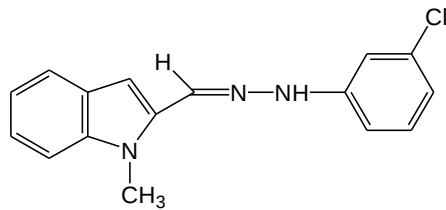
Molekül ağırlığı: 277 g/mol

HD3 1-Metilindol-2-karboksaldehit (2-klorofenil) hidrazin



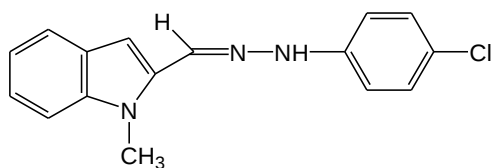
Molekül ağırlığı: 283,5 g/mol

HD4 1-Metilindol-2-karboksaldehit (3-klorofenil) hidrazin



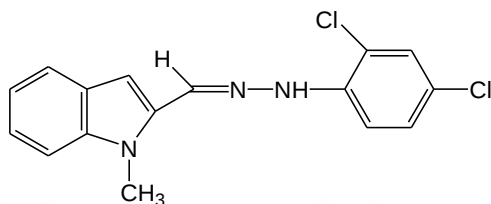
Molekül ağırlığı: 283,5 g/mol

HD5 1-Metilindol-2-karboksaldehit (4-klorofenil) hidrazin



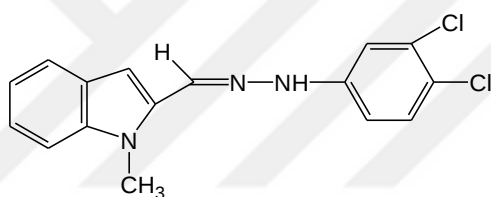
Molekül ağırlığı: 283,5 g/mol

HD6 1-Metilindol-2-karboksaldehit (2,4-Diklorofenil) hidrazin



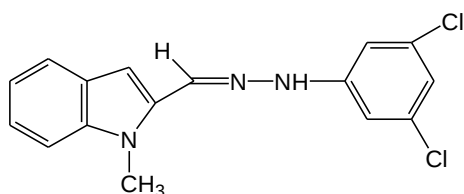
Molekül ağırlığı: 318 g/mol

HD7 1-Metilindol-2-karboksaldehit (3,4-Diklorofenil) hidrazin



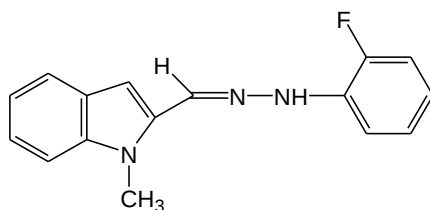
Molekül ağırlığı: 318 g/mol

HD8 1-Metilindol-2-karboksaldehit (3,5-Diklorofenil) hidrazin



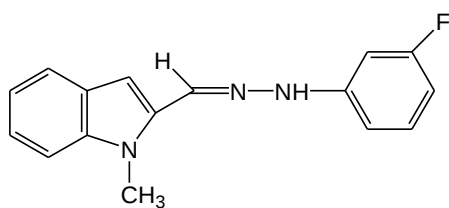
Molekül ağırlığı: 318 g/mol

HD9 1-Metilindol-2-karboksaldehit (2-Florofenil) hidrazin



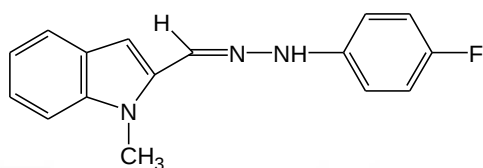
Molekül ağırlığı: 267 g/mol

HD10 1-Metilindol-2-karboksaldehit (3-Florofenil) hidrazin



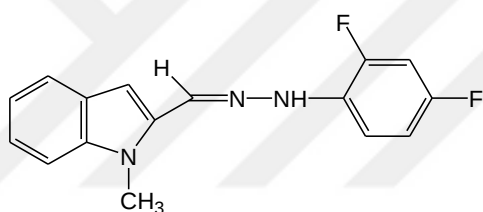
Molekül ağırlığı: 267 g/mol

HD11 1-Metilindol-2-karboksaldehit (4-Florofenil) hidrazin



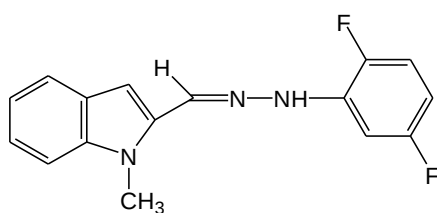
Molekül ağırlığı: 267 g/mol

HD12 1-Metilindol-2-karboksaldehit (2,4-Diflorofenil) hidrazin



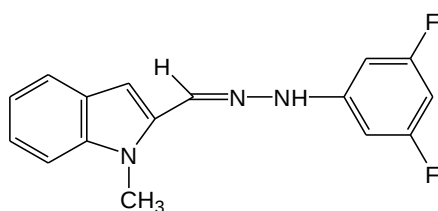
Molekül ağırlığı: 285 g/mol

HD13 1-Metilindol-2-karboksaldehit (2,5-Diflorofenil) hidrazin



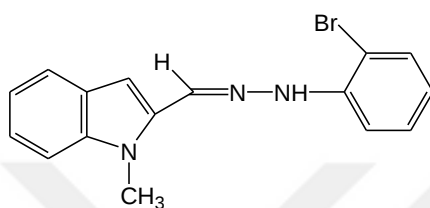
Molekül ağırlığı: 285 g/mol

HD14 1-Metilindol-2-karboksaldehit (3,5-Diflorofenil) hidrazin



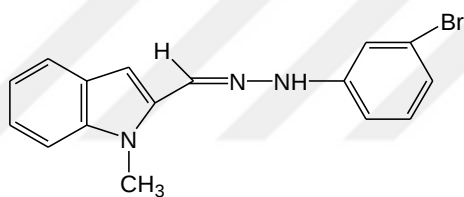
Molekül ağırlığı: 285 g/mol

HD15 1-Metilindol-2-karboksaldehit (2-Bromofenil) hidrazin



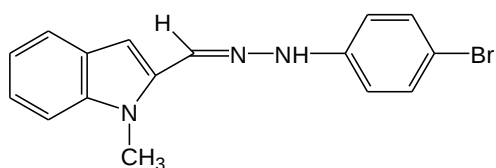
Molekül ağırlığı: 328 g/mol

HD16 1-Metilindol-2-karboksaldehit (3-Bromofenil) hidrazin



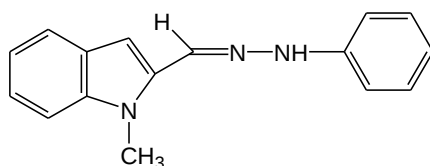
Molekül ağırlığı: 328 g/mol

HD17 1-Metilindol-2-karboksaldehit (4-Bromofenil) hidrazin



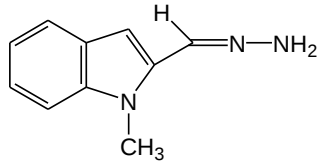
Molekül ağırlığı: 328 g/mol

HD18 1-Metilindol-2-karboksaldehit fenil hidrazin



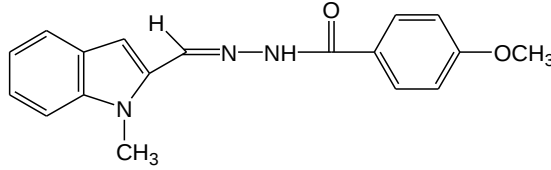
Molekül ağırlığı: 249 g/mol

HD19 1-Metilindol-2-karboksaldehit hidrazon



Molekül ağırlığı: 173 g/mol

HD21 N-(4-metoksibenzoil)-N'-(1-metilindol-2-metilen)-hidrazon



Molekül ağırlığı: 307 g/mol

2.1.4. Kullanılan Çözeltiler

2.1.4.1. Doğrudan Aktivite Ölçüm Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

2.1.4.1.1. Test kiti bileşenleri

- HTS-760 (CYP19) Aromataz enzimi
- Hücre membran proteini (kontrol proteini)
- Potasyum fosfat tamponu (pH 7.4)
- Tris Base durdurucu çözelti
- NADP⁺, MgCl₂ ve Glukoz 6-fosfat karışımı kofaktör
- Glukoz 6-fosfat Dehidrojenaz (G6PDH)
- MFC
- Ketokonazol (KTZ)
- 7-Hidroksi triflorometilkumarin (HFC)

2.1.4.1.1.1. NADPH-Kofaktör karışımı

Her 96 kuyucuklu test plakası için 187,5 µl kofaktör, 150 µl G6PDH, 100 µl kontrol proteini ve 37 C°'deki 14,56 ml distile su ile karıştırılır.

2.1.4.1.1.2. Durdurucu çözelti

Kullanmadan önce durdurucu çözeltiye 72 ml asetonitril eklenir ve oda sıcaklığında saklanır.

2.1.4.1.1.3. MFC çözeltisi

MFC aromataz enziminin floresans substratıdır. Kullanımdan önce 1,21 mg MFC'ye 200 µl asetonitril eklenerek final konsantrasyonu 25 mM olacak çözelti elde edilir. -20 C°'de saklanır.

2.1.4.1.1.4. KTZ çözeltisi

CYP19 inhibitörü olan KTZ pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 0,032 mg KTZ'ye 30 µl asetonitril eklenerek -20 C°'de saklanır. Final konsantrasyon 2 mM'dır.

2.1.4.1.1.5. HFC

Standart metabolit olan HFC'nin konsantrasyonu pH'sı 9,0 olan 0,1M'lık Tris içerisinde 0,25mM'dır.

2.1.4.1.1.6. Enzim-substrat karışımı

CYP19 enzimi MFC'yi HFC'ye dönüştürmektedir. 96 kuyucuklu her plaka için 7,83 ml 37 C°'deki distile su, 150 µl HTS-760 (CYP19), 20 µl 25 mM MFC ve 2 ml tampon iyice karıştırılır.

2.1.4.1.2. Test Maddelerinin Hazırlanması

Test edilecek her örnekten 0.001 g tartılmıştır. Final konsantrasyonları 3×10^{-4} M olacak şekilde asetonitril eklenerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. 10^{-4} M final konsantrasyonda aktivite gösteren örneklerden 0.001 g tartılıp 15×10^{-3} M final konsantrasyon olacak şekilde asetonitrilde çözülmüştür. Test maddelerinin gerekli dilüsyonlar yapılarak hazırlanan 3×10^{-4} M, 1×10^{-4} M, $33,33 \times 10^{-6}$ M, $11,11 \times 10^{-6}$ M, $3,7 \times 10^{-6}$ M, $1,23 \times 10^{-6}$ M, $0,41 \times 10^{-8}$ M ve $0,14 \times 10^{-8}$ M konsantrasyonlarında olası inhibitör etkinlikleri araştırılmıştır.

2.1.4.2. Dolaylı Aktivite Ölçüm Yönteminde Kullanılan Besi Ortamı ve Çözeltilerin Hazırlanması

2.1.4.2.1. Tam Büyüme Besi Ortamı (complete growth medium)

Ticari olarak satılan 500 ml'lik fenol kırmızısı içeren DMEM içerisine %10 FBS eklenerek DMEM tam büyüme besi ortamı hazırlanmıştır.

2.1.4.2.2. Hormon İçermeyen Besi Ortamı

Fenol kırmızısı içermeyen DMEM içerisine %10 CD-FBS, %1 MEM-NEAA ve %1 sodyum pirüvat eklenerek “hormon içermeyen besi ortamı” hazırlanmıştır.

2.1.4.2.3. MTT Boyasının Hazırlanması

5 mg MTT üzerine 1 ml PBS eklenmiş, vortekslenerek tamamen çözününceye kadar karıştırılmıştır. Filtre edilerek steril hale getirilmiştir. Boya çözeltisinin, ışıktan etkilenmemesi için şişe alüminyum folyo ile kaplanmıştır.

2.1.4.2.4. Stok 17- β Östradiolün Hazırlanması

1 mg östradiol 0,184 ml etanolde çözülerek 2×10^{-2} M konsantrasyonda stok östradiol çözeltisi hazırlanmıştır. Steril etanol kullanılarak ana stoktan 2×10^{-4} M, 2×10^{-6} M, 2×10^{-7} M konsantrasyonlarda standart E2 çözeltileri hazırlanmıştır. Deneyde 2×10^{-7} M konsantrasyondaki çözeltinin besiyeri ile 1:10 oranında dilüe edilmesiyle elde edilen 2×10^{-8} M konsantrasyondaki çözelti kullanılmış ve östradiolün deney ortamındaki final konsantrasyonu 10^{-9} M olmuştur.

2.1.4.2.5. Stok Ketokonazol Hazırlanması

1 mg ketokonazol 0,941 ml DMSO'da çözülerek 2×10^{-3} M konsantrasyonda stok ketokonazol çözeltisi hazırlanmıştır. Steril DMSO kullanılarak ana stoktan 1×10^{-3} M konsantrasyonda ketokonazol çözeltisi hazırlanmıştır. Yöntem validasyonu için $0,05 \times 10^{-6}$ M, $0,16 \times 10^{-6}$ M, $0,49 \times 10^{-6}$ M, $1,478 \times 10^{-6}$ M, $4,43 \times 10^{-6}$ M, $13,3 \times 10^{-6}$ M ve 20×10^{-6} M final konsantrasyonda ketokonazol çözeltisi kullanılmıştır.

2.1.4.2.6. Stok Testosteronun Hazırlanması

1 mg testosteron 1,734 etanolde çözülerek 2×10^{-3} M konsantrasyonda stok testosteron çözeltisi hazırlanıp filtre edilerek sterilize edilmiştir. Pozitif kontrol olarak 10^{-5} M (MTT yöntemi) veya 10^{-6} M (ATP ölçümü) final konsantrasyonda testosteron çözeltisi kullanılmıştır.

2.1.4.2.7. Stok Fulvestranın Hazırlanması

1 mg fulvestran 0,824 ml etanolde çözülerek 2×10^{-3} M konsantrasyonda stok fulvestran çözeltisi hazırlanmıştır. Steril etanol kullanılarak ana stoktan 2×10^{-4} M konsantrasyonda fulvestran çözeltisi hazırlanmıştır. 2×10^{-4} M konsantrasyondaki

fulvestran ise besiyeri içerisinde 1:10 oranında dilüe edilerek 2×10^{-5} M konsantrasyonunda fulvestran çözeltisi hazırlanmıştır. Yöntemde final konsantrasyonu 10^{-6} M olan fulvestran çözeltisi kullanılmıştır.

2.1.4.2.8. Melatonin Çözeltilerinin Hazırlanması

1 mg melatonin 2,152 ml DMSO'da çözülerek 2×10^{-3} M konsantrasyonda stok melatonin çözeltisi hazırlanarak filtrede sterilize edilmiştir. Daha sonra steril DMSO ile dilüsyonlar yapılarak 2×10^{-7} M konsantrasyonda melatonin çözeltisi hazırlanmıştır. 2×10^{-7} M konsantrasyondaki melatoninin besi ortamı içerisinde 1:10 oranında dilüe edilmesiyle hazırlanan 2×10^{-8} M konsantrasyondaki melatonin çözeltisi kullanılmış ve melatoninin deney ortamında final konsantrasyonu 10^{-9} M olmuştur.

2.1.4.2.9. Hücre Canlılığının ATP ölçüm Yöntemi ile Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

The CellTiter-Glo® Luminesans hücre canlılığı ölçüm kiti kullanılmıştır. Kit bileşiminde CellTiter-Glo tampon ve CellTiter-Glo substrat (liyofilize) bulunmaktadır. Tampon çözeltisi liyofilize substrat içerisine aktararak liyofilize enzim/substrat karışımı elde edilmiştir.

2.1.4.2.10. Test Maddelerinin Hazırlanması

10^{-4} M final konsantrasyonda aktivite gösteren örneklerden 0.001 g tartılarak final konsantrasyonları 3×10^{-4} M olacak şekilde DMSO'da çözülerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. Gerekli dilüsyonlar yapılarak hazırlanan $0,5 \times 10^{-6}$ M, 1×10^{-6} M, 2×10^{-6} M, 4×10^{-6} M, 8×10^{-6} M, 16×10^{-6} M, 32×10^{-6} M ve 50×10^{-6} M konsantrasyonlarda test maddelerinin etkileri araştırılmıştır.

2.1.4.3. Sitotoksisite ölçüm yönteminde kullanılan çözeltiler

2.1.4.3.1. CHO-K1 Hücre Hattı için Besi Ortamının Hazırlanması

DMEM-F12 içerisine %10 FBS, %1 L-Glutamin ve %1 Na-pirüvat eklenerek besi ortamı hazırlanmıştır.

2.1.4.3.2. Test Maddelerinin Hazırlanması

10^{-4} M final konsantrasyonda aktivite gösteren örneklerden 0.001 g tartılarak final konsantrasyonları 3×10^{-4} M olacak şekilde DMSO eklenerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. Gerekli dilüsyonlar yapılarak hazırlanan $0,5 \times 10^{-6}$ M, 1×10^{-6} M, 2×10^{-6} M, 4×10^{-6} M, 8×10^{-6} M, 16×10^{-6} M, 32×10^{-6} M ve 50×10^{-6} M konsantrasyonlarda test maddelerinin etkileri araştırılmıştır.

2.2. YÖNTEMLER

Melatonin analoglarının aromataz aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesinde enzim aktivitesinin doğrudan ve dolaylı ölçülmesi olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır.

2.2.1. Doğrudan Aktivite Ölçüm Yöntemi

Doğrudan aktivite ölçümünde aromataz enziminin floresans özelliğe sahip bir substratı olan MFC kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plaka formatında yüksek hızlı taramaya olanak veren bu yöntemde MFC aromataz enzimiyle HFC'e dönüşür ve floresans şiddetindeki azalma belirlenerek inhibitör aktivite değerlendirilir.

Test edilecek 57 melatonin analogu önce 10^{-4} M konsantrasyonda taranmış, bu konsantrasyonda aktivite gösteren 11 maddenin final konsantrasyonları sırasıyla **300 μ M, 100 μ M, 33,33 μ M, 11,11 μ M, 3,70 μ M, 1,23 μ M, 0,41 μ M ve 0,14 μ M** olacak şekilde toplam 8 farklı konsantrasyonda da aktiviteleri araştırılmıştır.

Yönteme göre her bir kuyucuğa final hacmi 100 μ l olan, test maddelerinin farklı konsantrasyonunu içeren NADPH-kofaktör karışımı eklenmiştir. 37 °C'de 10 dakika inkubasyon sonrasında tüm kuyucuklara 100 μ l enzim-substrat karışımı eklenmiş ve 37 °C'de 30 dakika inkubasyona bırakılmıştır. Inkubasyon sonrasında kuyucuklara 75 μ l durdurucu çözelti eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak aromataz inhibitörü olan ketokonazolün farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Reaksiyonun sonlandırılmasının ardından floresans şiddeti 409 nm eksitasyon ve 530 nm emisyon dalga boyunda ölçülmüş ve inhibitör aktivite değerlendirilmiştir.

2.2.2. Dolaylı Aktivite Ölçüm Yöntemi

Dolaylı aromataz enzim aktivitesi östrojeniz ortamda, testosteron varlığında ER (+) insan meme kanseri hücresi olan MCF-7 BUS hücrelerinin proliferasyonu belirlenerek değerlendirilmiştir. Hücrelerde aromataz enzim aktivitesiyle testosteron

östradiole dönüştürülür ve oluşan östradiole bağlı olarak hücre proliferasyonu gerçekleşir.

2.2.2.1. MCF-7 BUS Rutin Hücre Kültürü

MCF-7 BUS hücre hattı Tufts Enstitüsü'nden Prof. Ana Soto'dan temin edilmiştir. Analizlerde laboratuvar şartlarımıza adapte olmuş 30.-60. pasaj arasındaki hücreler kullanılmıştır. MCF-7 BUS hücreleri, 25 cm²'lik flasklarda %10 FBS içeren DMEM ile idame ettirilmiştir. Hücreler 37 °C'de %5 CO₂'li atmosfer ortamında inkübe edilmiştir.

Alt kültürlenme protokolünün ilk basamağı devam ettirme ortamının flasktan uzaklaştırılmasıdır. Besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra flask bir kez PBS ile yıkanmıştır. Bu yıkama işlemiyle ortamda bulunan ölü hücreler ve kalan besi ortamı uzaklaştırılmış, daha sonra eklenecek tripsin-EDTA çözeltisinin etkisi de attırılmıştır. 1,5 ml tripsin-EDTA çözeltisi ile yüzeyden uzaklaştırılan hücrelere tripsinin aktivitesini durdurmak için 4,5 ml DMEM eklenmiştir. Elde edilen bu hücre süspansiyonu steril bir tüpe alınarak 153xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atılıp, hücreler 2 ml besi ortamında süspande edilmiş ve hemositometrede sayım sonrası bir kısmı taze besi ortamı içeren flaskta aktarılmıştır.

2.2.2.2. Hücre Sayımı ve Mikroplakaya Hücre Ekimi

Hücrelerin tripsinizasyonu sonrası elde edilen hücre süspansiyonu santrifüj edilerek üst faz atılmış ve hücreler taze besi ortamında süspande edilerek hemositometrede mikroskop altında sayılmıştır. 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğunda 6000 hücre olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan gerekli miktar alınarak kuyucuklara ekim yapılmıştır.

2.2.2.3. Dolaylı Aktivite ölçüm yöntemi

MCF-7 BUS hücreleri tam büyüme besi ortamı içinde 6000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekildikten sonra hücrelerin kuyucuk yüzeyine tutunmaları için 48 saat beklenmiştir. Bu sürenin sonunda kuyucuklardaki besi ortamı uzaklaştırılmış ve hormon içermeyen besi ortamı kuyucuklara eklenmiştir. Her bir plakada, negatif kontrol olarak hormon içermeyen besi ortamı ve 5 farklı kontrol grubu kullanılmıştır;

1. E2 (10⁻⁹ M)

2. Testosteron (10^{-5} M)
3. E2 (10^{-9} M) + Fulvestran (10^{-4} M)
4. Testosteron (10^{-5} M) + Ketokonazol (5×10^{-6} M)
5. %0,5 EtOH + %0,5 DMSO içeren çözücü kontrolü

Test edilen bileşiklerin grafiklerde belirtilen farklı konsantrasyonları ile dolaylı aromataz aktivitesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Hem kontrol hem de test maddeleri en az 3 farklı kuyucukta çalışılmıştır. Kuyucuklara 180 µl hormon içermeyen besi ortamı ve 10 µl test maddesi ve 10 µl testosteron (10^{-5} M) eklenmiştir. Test maddeleriyle 5 gün inkubasyondan sonra analiz ortamının kuyucuklardan uzaklaştırılmasıyla deney sonlandırılmıştır.

2.2.2.4. Hücre Canlılığının MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

Suda çözünebilen bir tetrazolyum tuzu olan MTT, mitokondrideki süksinat dehidrojenaz enzimiyle mor renkli formazan kristallerine dönüşmektedir. Analiz sonlandırıldıktan sonra kuyucuklar 37 C°'deki PBS ile bir kez yıkanarak besi ortamı içerisindeki proteinler ve ölü hücreler uzaklaştırılmıştır. Yıkama sonrasında 40 µl hormon içermeyen besi ortamı ve 10 µl MTT boyası kuyucuklara eklenmiş ve 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda ortam uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 150 µl DMSO eklenmiş ve boyanın çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra renk şiddeti 490 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve hücre canlılığı değerlendirilmiştir.

2.2.2.5. Hücre Canlılığının ATP Ölçüm Yöntemi ile Belirlenmesi

The CellTiter-Glo® Luminesans hücre canlılığı ölçüm kiti kullanılmıştır. Bu yöntemde lusiferin ortamda ATP varlığında lusiferaz enzimi aracılığıyla luminesans veren metabolitine dönüşür ve luminesans şiddetinin ölçülmesiyle hücre canlılığı değerlendirilir. Hücrelerin metabolik olarak aktif olduğunun bir göstergesi olduğundan, ortamdaki ATP miktarı ile canlı hücre sayısı paralellik gösterir. Reaksiyon sırasında, stabil luminesans sinyali oluşurken hücre lizisi sırasında salınan ATP'nin hatasız ölçümünü engelleyen ATPaz gibi endojen enzimler kendiliğinden inhibe edilmektedir.

Yönteme göre tampon çözeltisi liyofilize substrat içerisine aktararak liyofilize enzim/substrat karışımı elde edilmiştir. Karışım homojen olana kadar vortekslenmiştir.

96 kuyucuklu plakaya ekilmiş ve test maddeleriyle muamele edilmiş 6000 hücre içeren 100µl deney ortamına, 100µl enzim-substrat karışımı eklenmiştir. Hücrelerin lizise uğraması için plakalar 2 dakika karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra luminesans sinyalin stabilize olması için plaka oda ısısında 10 dakika inkübe edilmiştir. Ortamda var olan ATP düzeyini belirleyerek canlı hücre miktarını saptamak amacıyla luminesans şiddeti ölçülmüş ve hücre canlılığı değerlendirilmiştir.

2.2.3. Sitotoksikite Ölçüm Yöntemi

2.2.3.1. CHO-K1 Hücrelerinde Sitotoksikite Değerlendirilmesi

Test maddelerinin olası sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için CHO-K1 hücre hattı kullanılmıştır. Analizlerde laboratuvar şartlarımıza adapte olmuş 24.-60.pasaj arasındaki hücreler kullanılmıştır. CHO-K1 hücreleri, 25 cm²'lik flasklarda %10 FBS, %1 L-Glutamin ve %1 Na-Pirüvat içeren DMEM-F12 besi ortamında ve 37 °C'de %5 CO₂'li atmosfer ortamında inkübe edilmiştir. Aktivite kaybına neden olmamak için hücreler haftada üç kez pasajlanmıştır.

Alt kültürleme protokolünün ilk basamağında besi ortamı uzaklaştırılmış ve flask bir kez PBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından hücreler 1,5 ml tripsin-EDTA çözeltisi ile yüzeyden uzaklaştırılmıştır. Daha sonra tripsinin aktivitesini durdurmak için 4,5 ml besi ortamı eklenmiş ve bu hücre süspansiyonu 153 xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atılıp hücreler 3 ml besi ortamında süspande edilmiş ve hemositometrede sayım sonrası hücrelerin bir kısmı taze besi ortamı içeren yeni flaska aktarılmıştır. Hücrelerin diğer bir kısmı ise 96 kuyucuklu plakaya 6000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş ve hücreler kuyucuk yüzeyine tutunmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Bu sürenin sonunda kuyucuklardaki ekim ortamı uzaklaştırılmış ve içerisinde kontrol ya da test maddeleri bulunan taze besi ortamı kuyucuklara eklenmiştir. Her bir plakada, negatif kontrol olarak sadece besi ortamı, çözücü kontrol grubu olarak % 0,5 DMSO içeren besi ortamı ve pozitif kontrol grubu olarak 171 µM Triton X-100 kullanılmıştır. Test maddelerinin grafiklerde belirtilen farklı konsantrasyonlarında sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Hem kontrol hem de test maddeleri en az 3 farklı kuyucukta çalışılmıştır. Sitotoksik etkinin belirlenebilmesi için kuyucuklara 190 µl besi ortamı ve 10 µl test maddesi eklenmiştir. Test maddeleriyle 24 saat inkübasyonun ardından analiz ortamının uzaklaştırılmasıyla deney sonlandırılmıştır.

Kuyucuklar PBS ile bir kez yıkandıktan sonra 40 µl besi ortamı ve 10 µl MTT boyası kuyucuklara eklenip 4 saat 37 C°'de inkubasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda ortam uzaklaştırılıp oluşan formazan kristalleri 150 µl DMSO ile çözülmüştür. Oluşan renk şiddeti 490nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve hücre canlılığı değerlendirilmiştir.

2.2.3.2. MCF-7 BUS Hücrelerinde Sitotoksikite Değerlendirilmesi

MCF-7 BUS hücreleri 6000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekildikten sonra hücrelerin kuyucuk yüzeyine tutunmaları için 48 saat beklenmiştir. Bu sürenin sonunda ekim ortamı uzaklaştırılmış ve “tam büyüme besi ortamı” kuyucuklara eklenmiştir. Her bir plakada, negatif kontrol olarak sadece besi ortamı, çözücü kontrol grubu olarak % 0,5 DMSO içeren besi ortamı ve pozitif kontrol olarak 171 µM Triton X-100 kullanılmıştır. Sitotoksik etkinin belirlenebilmesi için kuyucuklara 190 µl besi ortamı ve 10 µl test maddesi eklenmiştir. Test maddelerinin grafiklerde belirtilen farklı konsantrasyonlarında sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Hem kontrol hem de test maddeleri en az 3 farklı kuyucukta çalışılmıştır. Test maddeleriyle 5 gün inkübasyon sonrası deney ortamının uzaklaştırılmasıyla deney sonlandırılmıştır.

Analiz sonlandırıldıktan sonra kuyucuklar PBS ile bir kez yıkanarak besi ortamı içerisindeki proteinler ve ölü hücreler uzaklaştırılmıştır. Yıkama sonrasında kuyucuklara 40 µl “tam büyüme besi ortamı” ve 10 µl MTT boyası eklenmiş ve 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda ortam uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 150 µl DMSO eklenmiş ve boyanın çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra renk şiddeti 490 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve hücre canlılığı değerlendirilmiştir.

2.2.4. Moleküler Modelleme ile Yapı-Aktivite Çalışması

Proje kapsamında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Atilla Akdemir ile işbirliği yapılmıştır. Enzim inhibisyon deneylerinde CYP19A1 inhibisyonu gösteren bileşiklerin muhtemel ligand-protein bağlanma ilişkilerini hakkında bilgi edinmek için docking çalışmaları yürütülmüştür.

Docking çalışmalarında kullanılan insan CYP19A1 kristal yapısının hazırlanması amacıyla aromataz inhibitörü olan inhibitor 4-androsten-3-17-dion

(ASD) ile kompleks yapıdaki insan plasental CYP19A1 (hCYP19A1)'in kristal yapısı Protein Data Bank (pdb giriş: 3s79, 2.75 Å)'dan elde edildi. Hidrojen atomları, MOE bilgisayar programı (v2015.10, Chemical Computing Group, Inc, Montreal, Kanada) “protonate 3D” aracı kullanılarak eklenmiştir. Tüm su molekülleri, tampon molekülleri ve ligandlar silinerek protein mol-2 dosyası olarak kaydedilmiştir.

Docking çalışmalarında kullanılacak ligandların hazırlanması amacıyla tüm ligandlar için 3 boyutlu moleküler yapılar MOE bilgisayar programı kullanılarak hazırlanmıştır. Tüm kuvvetli bazlar protonlandı ve tüm kuvvetli asitler protosuzlaştırılmıştır. Daha sonra MMFF94x forcefield kullanılarak steepes+descent enerji minimizasyon protokolü uygulandı. Ligandlar mol-2 dosyası olarak kaydedilmiştir.

Docking alışmaları için tüm ligandlar, Gold Suite bilgisayar programı dahilinde ki P450 enzim ayarları ve GoldScore fonksiyonu kullanılarak hCYP19A1 yapısına (pdb giriş: 3s79) dock yapılmıştır. Her bir ligand için belirtilen ayarlar ile 50 docking uygulanmıştır. Kokristalize inhibitör ASD'nin C10 atomunun (koordinatlar X: 86.009; Y: 52.398, Z: 46.001) 12 Å veya daha kısa mesafede bulunan tüm amino asitler bağlanma bölgesi olarak tanımlanmıştır.

2.2.5. İstatistiksel Değerlendirme

İn vitro aromataz aktivitesi ölçümü ve sitotoksisite testlerinde grupların ortalamaları arasındaki farkın anlamlılığının değerlendirilmesinde student t-testi uygulanmıştır.

3. BULGULAR

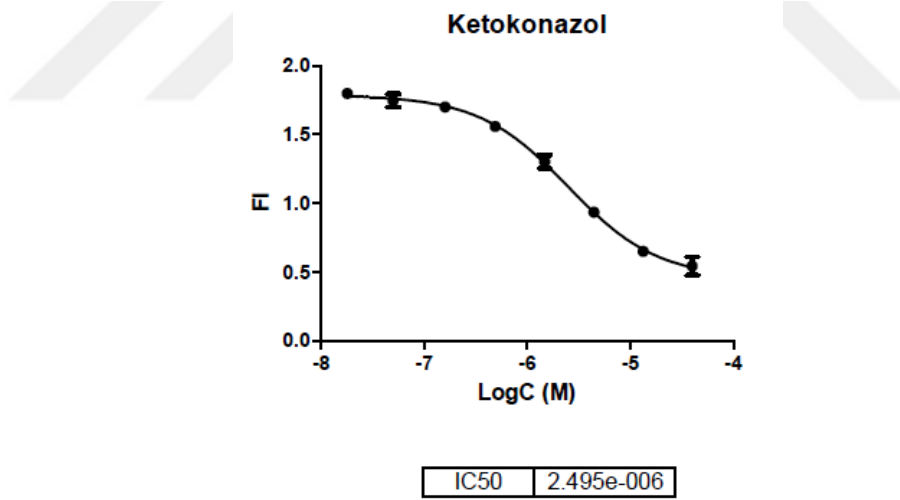
3.1. YÖNTEMLERİN LABORATUVAR KOŞULLARINA UYARLANMASI İLE İLGİLİ BULGULAR

3.1.1. Doğrudan Aktivite Ölçüm Analizinin Kısmi Validasyonu

3.1.1.1. Standart Maddelerin IC_{50} Değerleri

Yöntemin kısmi validasyon çalışmaları kapsamında standart maddeler ile yöntemin performansı değerlendirilmiştir. Ketokonazolün farklı konsantrasyonlarında aromataz aktivitesi üzerine inhibitör etkinliğini gösteren grafik Şekil 3.1’de verilmiştir. Ketokonazolün aromataz aktivitesini başarılı bir şekilde inhibe ettiği gözlenmiştir (Şekil 3.1).

Farklı günlerde yapılan deneylerin sonucunda ketokonazolün ortalama IC_{50} değeri $2,39 \times 10^{-6} \pm 0,18 \times 10^{-6}$ bulunmuş ve literatürdeki IC_{50} değeri (167) ile karşılaştırıldığında çalışmamızda elde edilen değer literatür ile uyumlu olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.1).



Şekil 3.1. Ketokonazolün aromataz enzimi üzerine inhibitör etkisi ve IC_{50} değeri.

Tablo 3.1. Ketokonazolün literatürde yer alan ve doğrudan aktivite ölçüm analizinde elde edilen IC_{50} değerleri

Standart Madde	Referans IC_{50}	IC_{50}
Ketokonazol	2×10^{-6} M	$2,39 \times 10^{-6} \pm 0,18 \times 10^{-6}$ M

3.1.1.2. Doğrudan Aktivite Ölçüm Analizinin “Analiz İçi ve Analizler Arası” Tekrarlanabilirliği

Doğrudan aktivite ölçüm yönteminin validasyonu için yöntemin analiz içi ve analizler arası tekrarlanabilirliği araştırılmıştır. Bilinen aromataz inhibitörü ketokonazol ile yapılan çalışma verileri yöntemin validasyonu için kullanılmış ve yöntemin analiz içi ve analizler arası tekrarlanabilirlik verisi Tablo 3.2’de verilmiştir. Analiz içi tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesi için aynı gün içinde yapılan 8 farklı kuyucuktaki enzim aktiviteleri, analizler arası tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesi için ise 5 farklı günde ölçülen aynı miktarda enzim aktivitesi alınarak ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Tablo 3.2’de görüldüğü gibi analiz içi %2,5’lik, analizler arası %10’luk varyasyon katsayısı elde edilmiştir. Yaptığımız çalışmada analiz içi ve analizler arası tekrarlanabilirliğin yüksek olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre yöntemin başarılı bir şekilde çalıştığı sonucuna varılmıştır.

Tablo 3.2. Doğrudan aktivite ölçüm analizinin “analiz içi ve analizler arası” tekrarlanabilirliği.

	Analiz içi tekrarlanabilirlik	Analizler arası tekrarlanabilirlik
Ortalama % kontrol $\pm$ SS	1,88 $\pm$ 0,04 (n=8)	1,95 $\pm$ 0,21 (n=5)
% Varyasyon katsayısı	2,5	10

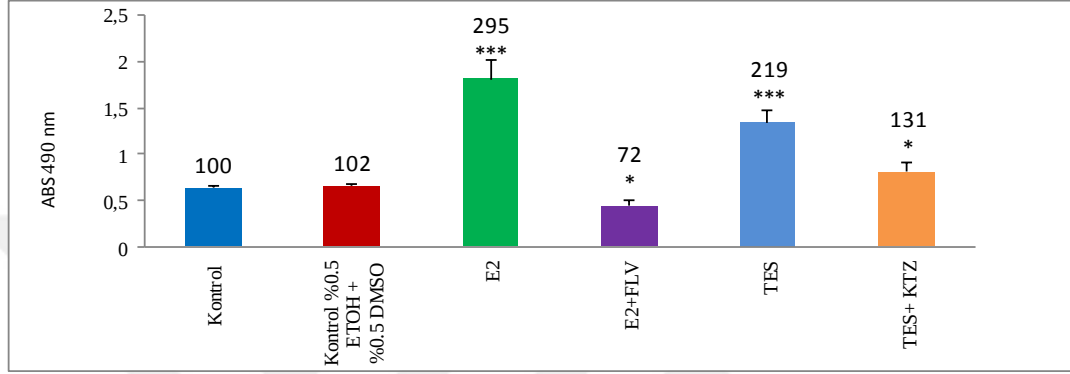
3.1.2. Dolaylı Aktivite Ölçüm Analizinin Validasyonu

3.1.2.1. Hücre Canlılığının MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

3.1.2.1.1. Standart Maddeler ile Yöntemin Yürütülmesi ve Ketokonazolün IC₅₀ Değeri

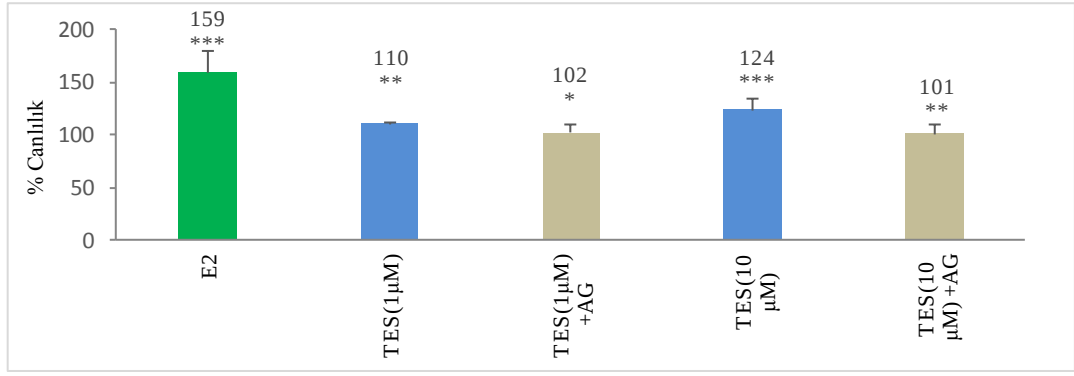
Yöntemin kısmi validasyon çalışmaları kapsamında standart maddeler ile yöntemin performansı değerlendirilmiştir. MCF-7 BUS hücrelerinin proliferasyonu için gerekli olduğu bilinen 17- β -östradiol (1nM), ER antagonisti fulvestran (1 μ M) varlığında ya da tek başına uygulanarak hücre proliferasyonu incelenmiştir. Östrojensiz ortamda aromataz enzimi ile östrojene dönüşerek hücre proliferasyonunu sağlayan testosteron (1 μ M) tek başına ve güçlü bir aromataz inhibitörü olan

ketokonazol (5 μ M) ile birlikte uygulanarak hücre proliferasyonu değerlendirilmiştir. 17- β -östradiol ve testosteron MCF-7 BUS hücrelerinin başarılı bir şekilde proliferasyonunu sağlarken, fulvestran ve ketokonazolün 17- β -östradiol ve testosteron varlığında indüklenen proliferasyonu, beklendiği gibi, inhibe ettikleri gözlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. MCF-7 BUS hücrelerinin östradiol (E2), testosteron (TES), östrojen reseptör antagonisti fulvestran (FLV) ve bilinen aromataz inhibitörü ketokonazole (KTZ) yanıtının değerlendirilmesi. Barlar üzerindeki değerler çözücü kontrol grubuna göre hesaplanmış % değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

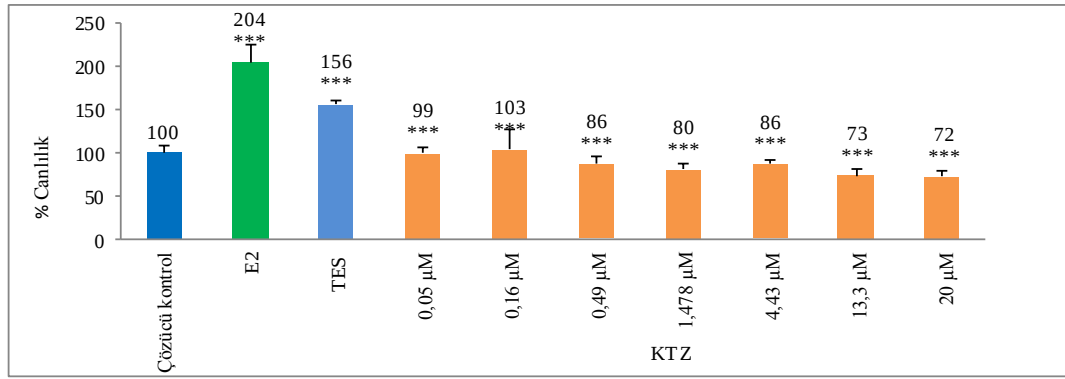
MCF-7 BUS hücrelerinde 17- β -östradiol, testosteron tek başına; ya da aromataz inhibitörü olan aminoglutetimid ile birlikte eklenerek hücre canlılığı değerlendirilmiştir. 17- β -östradiol ve testosteron MCF-7 BUS hücrelerinin proliferasyonunda artışa neden olurken, aminoglutetimidin testosteron ile görülen hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir (Şekil 3.3).



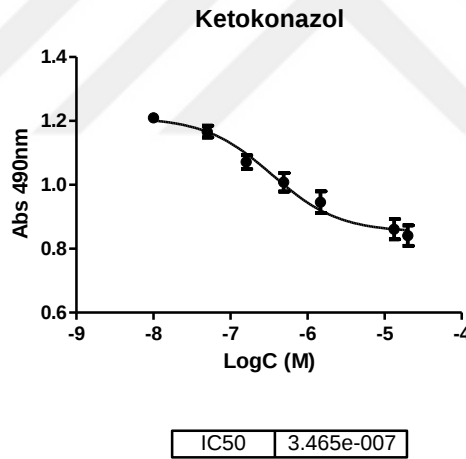
Şekil 3.3. Testosteron (TES) ve 100 µM aminoglutetimid (AG)'in MCF- 7 BUS hücrelerinde hücre proliferasyonuna etkileri. Barlar üzerindeki değerler çözücü kontrol grubuna kıyasla % canlılık değerlerini ifade etmektedir. E2 ve TES gruplarının istatistiksel değerlendirmesi çözücü kontrol grubuna göre, aminoglutetimid gruplarının istatistiksel değerlendirmesi ise testosteron kontrol gruplarına göre yapılmıştır. *p<0,05, **p <0,005, *** p<0,001.

Testosteronun 10 µM konsantrasyonda hücre proliferasyonunu daha yüksek oranda artırması nedeni ile çalışmamızda bu konsantrasyonda testosteronun kullanılmasına karar verilmiştir. Doğrudan aktivite ölçüm yönteminde inhibitör olarak ketokonazolün kullanılması nedeni ile dolaylı aktivite ölçüm yönteminde de inhibitör olarak ketokonazol ile çalışmamıza devam edilmiştir.

Hücrelerin östradiole doğrudan ve dolaylı (testosteron varlığında aromataz enzimi tarafından sentezlenen) temas ile proliferasyon olduklarının gözlenmesini takiben dolaylı yoldan aromataz aktivitesinin ölçümünün hassasiyetini belirlemek amacıyla hücrelere 7 farklı konsantrasyonda eklenerek hücre proliferasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır (Şekil 3.4). Ketokonazolün 0,05-20 µM aralığındaki konsantrasyonlarda testosteronun oluşan hücre proliferasyonunu doza bağımlı bir şekilde inhibe ettiği gözlenmiştir. Elde edilen veriler GraphPad Prism programı ile grafiğe geçirilerek ketokonazolün dolaylı aktivite yönteminde gözlenen IC₅₀ değeri hesaplanmış (Şekil 3.5), IC₅₀ değeri 3,465x10⁻⁷ M olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.4. Ketokonazolün (KTZ), 10 µM testosteron (TES) varlığında, MCF-7 BUS hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. E2 ve TES gruplarının istatistiksel değerlendirmesi çözücü kontrol grubuna göre, KTZ gruplarındaki istatistiksel farkın anlamlılığının değerlendirmesi ise testosteron grubuna göre yapılmıştır. 1 nM E2 pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. ***p<0,001.



Şekil 3.5. Ketokonazolün dolaylı aromataz aktivite deneyinde aromataz inhibe edici etkisi ve IC₅₀ değeri

3.1.2.1.2. Dolaylı Aktivite Yönteminin “Analiz İçi ve Analizler Arası” Tekrarlanabilirliği

Dolaylı aktivite ölçüm yönteminin validasyonu için yöntemin analiz içi ve analizler arası tekrarlanabilirliği araştırılmıştır. Bazı önemli deney gruplarının aynı gün içinde farklı kuyucuklardan elde edilen değerleri kullanılarak analiz içi

tekrarlanabilirlik hesaplanmıştır (Tablo 3.3). Testosteronun ve östradiolün analiz içi ortalama % kontrol $\pm$ SS değerleri sırasıyla 134 ± 4 ve 202 ± 15 olarak tespit edilmiş; bu değerler kullanıldığında % varyasyon katsayıları sırasıyla 2,7 ve 7,4 olarak saptanmıştır.

Dört farklı çalışmada elde edilen referans madde deney grupları için analizler arası tekrarlanabilirlik % varyasyon katsayısı olarak bildirilmiştir (Tablo 3.4). Elde edilen sonuçlara göre testosteron ve östradiolün ortalama % kontrol $\pm$ SS değerleri sırasıyla 134 ± 3 ve 199 ± 5 olarak hesaplanmış; bu değerler kullanıldığında % varyasyon katsayıları sırasıyla 2,5 ve 2,6 olarak belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre yöntemin yüksek tekrarlanabilirliğe sahip olduğu ve başarılı bir şekilde çalıştığı sonucuna varılmıştır.

Tablo 3.3. Bazı önemli deney gruplarının aynı gün içinde dört farklı kuyucuktan elde edilen değerler ile hesaplanan analiz içi tekrarlanabilirlik düzeyleri

	% Kontrol (ortalama $\pm$ SS)	% varyasyon katsayısı
Testosteron (10^{-5} M)	134 ± 4	2,7
Östradiol (10^{-9} M)	202 ± 15	7,4

Tablo 3.4. Bazı önemli deney grupları için dört farklı günde yapılan çalışmadan elde edilen analizler arası tekrarlanabilirlik düzeyleri

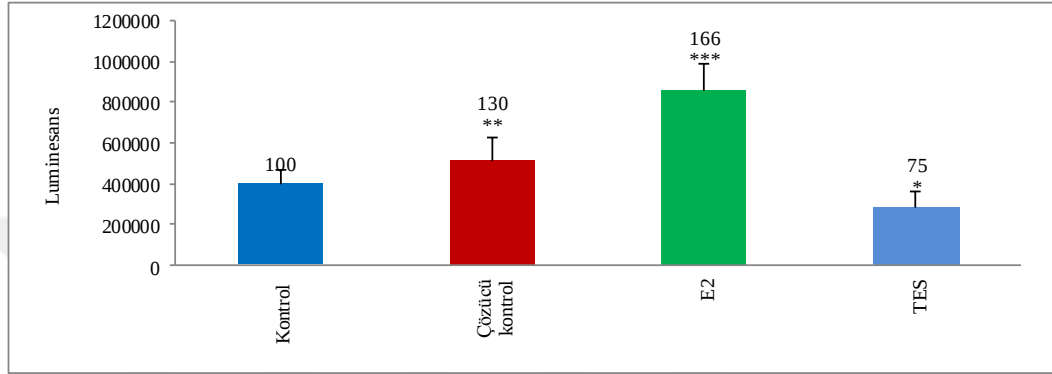
	% Kontrol (ortalama $\pm$ SS)	% varyasyon katsayısı
Testosteron (10^{-5} M)	134 ± 3	2,5
Östradiol (10^{-9} M)	199 ± 5	2,6

3.1.2.2. Hücre Canlılığının ATP Ölçüm Yöntemi ile Belirlenmesi

3.1.2.2.1. Standart Maddeler ile Yöntemin Yürütülmesi

Hücre temelli dolaylı aromataz aktivitesi ölçüm yönteminin hassasiyetini artırmak ve yöntemde daha hızlı sonuç alınabilmesini sağlamak amacıyla deney sonunda hücre canlılığının ATP ölçümü yolu ile belirlenmesi şeklinde bir modifikasyon yapılması düşünülmüştür. Kontrol grupları ve standart maddeler (10^{-9}

M E2 ve 10^{-6} M TES) ile yapılan ölçümlerde standart sapma değerlerinin (analiz içi tekrarlanabilirlik göstergesi olarak % varyasyon katsayısı 22 bulunmuştur) çok yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.6). Bu verilere göre yöntemin tekrarlanabilirliğinin kabul edilebilir aralıkta olmaması nedeniyle kullanımından vazgeçilmiştir.

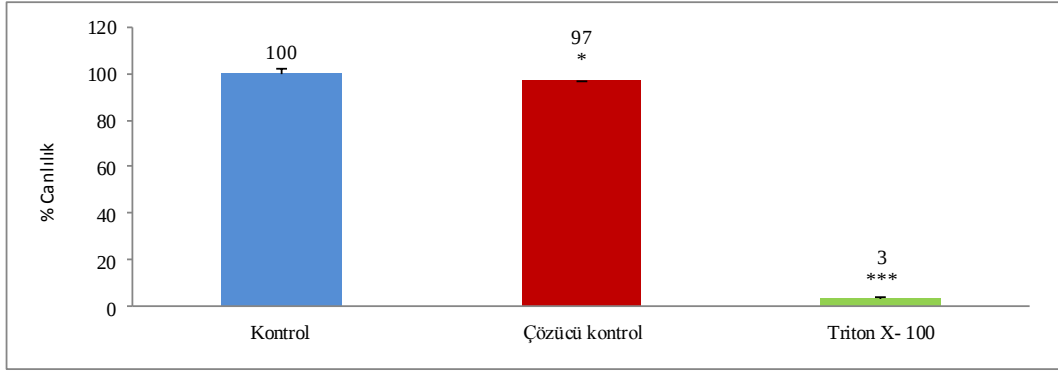


Şekil 3.6. MCF-7 BUS hücrelerinde dolaylı aromataz aktivitesinin ATP ölçümü ile değerlendirilmesi. Barlar üzerindeki değerler kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. Test maddelerinin istatistiksel değerlendirilmesi çözücü kontrol grubuna göre, çözücü kontrol grubunun istatistiksel değerlendirilmesi ise sadece besi ortamı içeren kontrol grubuna göre yapılmıştır. E2: östradiol, TES: testosteron. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$.

3.1.3. Sitotoksikite Testinin Kısmi Validasyonu

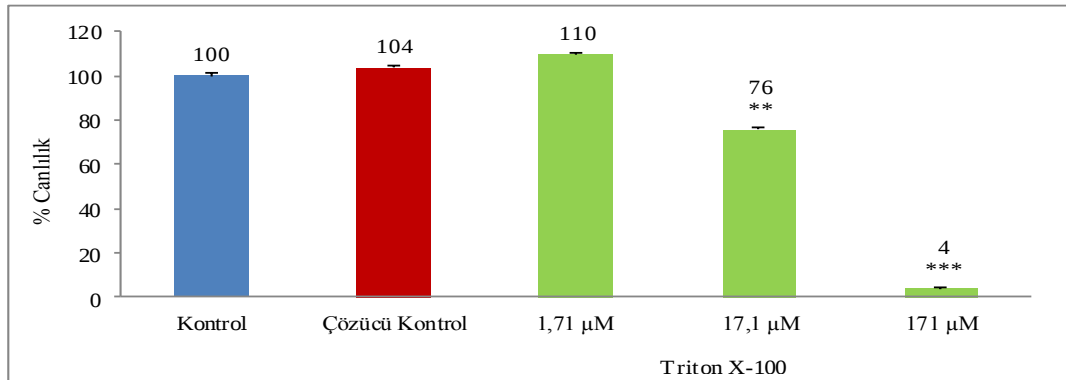
3.1.3.1. Sitotoksitenin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

Sitotoksitenin belirlenmesi amacıyla kullanılan MTT yönteminin başarısını belirlemek için bilinen sitotoksik bir bileşik olan Triton X-100 kullanılmış ve bu bileşiğin MCF-7 BUS hücreleri üzerine sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmamızda $171\mu\text{M}$ konsantrasyonda kullanılan Triton X-100'ün MCF-7 BUS hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Triton X-100'ün MCF-7 BUS hücreleri üzerine sitotoksik etkisi. Barlar üzerindeki değerler kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. Triton X-100'ün istatistiksel değerlendirmesi çözücü kontrol grubuna göre, çözücü kontrol grubunun istatistiksel değerlendirmesi ise sadece besi ortamı içeren kontrol grubuna göre yapılmıştır. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Benzer çalışma CHO-K1 hücrelerinde de 3 farklı konsantrasyonda (1,71-171 μM) Triton-X 100 varlığında gerçekleştirilmiş ve yöntemde bilinen sitotoksik bir bileşiğin hücre canlılığını doza bağımlı bir şekilde azalttığı başarı ile saptanmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Triton X-100'ün CHO-K1 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi. Barlar üzerindeki değerler kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır. ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$.

Sitotoksosite testinin validasyonu için yöntemin analiz içi ve analizler arası tekrarlanabilirliği araştırılmıştır. Referans sitotoksik madde ile aynı gün içinde farklı kuyucuklarda yapılan çalışmalardan elde edilen veriler kullanılarak analiz içi (Tablo 3.5), farklı günlerde yapılan çalışmalardan elde edilen değerler kullanılarak ise analizler arası (Tablo 3.6) tekrarlanabilirlik hesaplanmış; % varyasyon katsayısı olarak bildirilmiştir. Referans maddenin analiz içi ve analizler arası % varyasyon katsayısının düşük olduğu saptanmış ve yöntemin başarılı bir şekilde çalıştığı sonucuna varılmıştır.

Tablo 3.5. Referans maddenin uygulandığı dört farklı hücre kuyucuğundan elde edilen analiz içi tekrarlanabilirlik düzeyleri

	% Kontrol (ortalama $\pm$ SS)	% varyasyon katsayısı
Triton X-100	3,6 $\pm$ 0,14	3,9

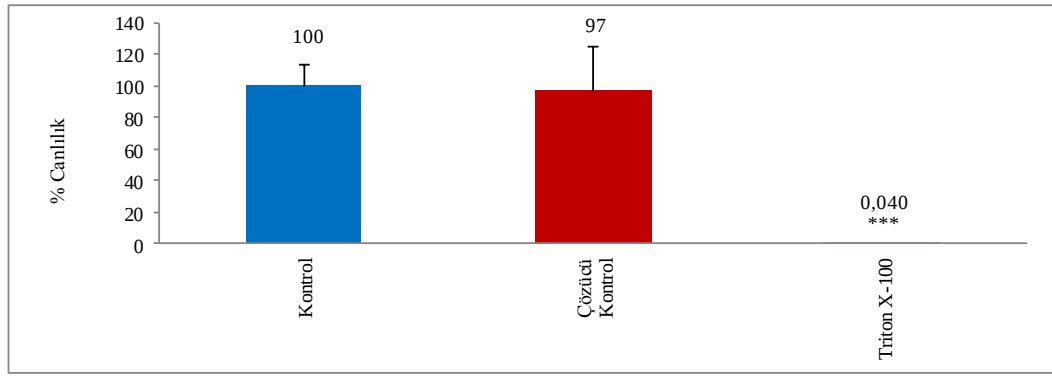
Tablo 3.6. Referans madde için üç farklı günde yapılan çalışmadan elde edilen analizler arası tekrarlanabilirlik düzeyleri

	% Kontrol (ortalama $\pm$ SS)	% varyasyon katsayısı
Triton X-100	3,2 $\pm$ 0,28	8,9

3.1.3.2. Sitotoksitenin ATP Ölçüm Yöntemi ile Belirlenmesi

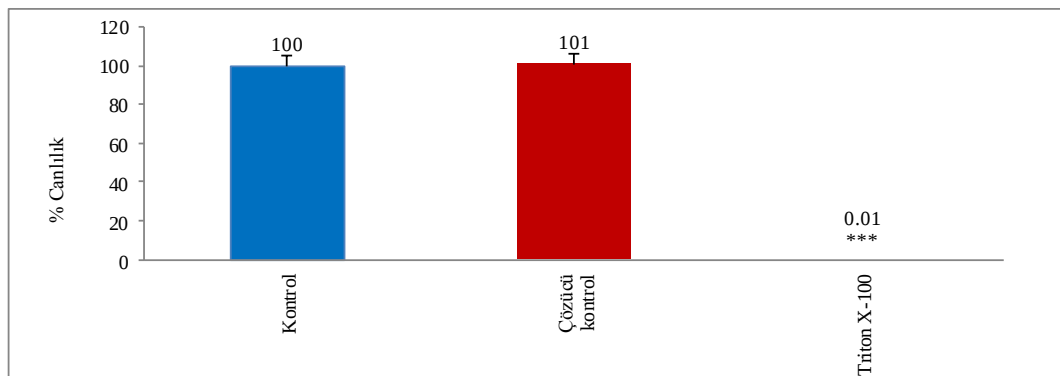
Sitotoksitenin belirlenmesi yöntemin hassasiyetini artırmak ve daha hızlı sonuç alınarak tarama çalışmalarındaki verimi artırmak amacıyla MCF-7 BUS ve CHO-K1 hücrelerinde canlılık ATP ölçümü yoluyla da değerlendirilmiştir.

MCF-7 BUS hücrelerinde kontrol grupları (Kontrol, çözücü kontrol ve sitotoksik pozitif kontrol olarak Triton X-100) ile yapılan ölçümlerde standart sapma değerlerinin (analiz içi tekrarlanabilirlik göstergesi olarak % varyasyon katsayısı 29,4 bulunmuştur) çok yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.9). Elde edilen sonuçlara göre yöntemin başarılı bir şekilde çalışmadığı sonucuna varılarak kullanımından vazgeçilmiştir.



Şekil 3.9. MCF-7 BUS hücrelerinde hücre canlılığının ATP ölçümü ile değerlendirilmesi. Barlar üzerindeki değerler kontrol grubuna göre hesaplanmış % canlılık değerleridir. İstatistiksel değerlendirme çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır. *** $p < 0,001$.

CHO-K1 hücrelerinde kontrol grupları (Kontrol, çözücü kontrol ve sitotoksik pozitif kontrol olarak Triton X-100) ile yapılan ölçümlerde standart sapma değerlerinin (analiz içi tekrarlanabilirlik göstergesi olarak % varyasyon katsayısı 5,38 bulunmuştur) normal olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.10). Ancak yöntem MCF-7 hücrelerinde başarılı bir şekilde çalışmadığı için her iki hücre tipinde karşılaştırma yapılamayacağından kullanımından vazgeçilmiştir.



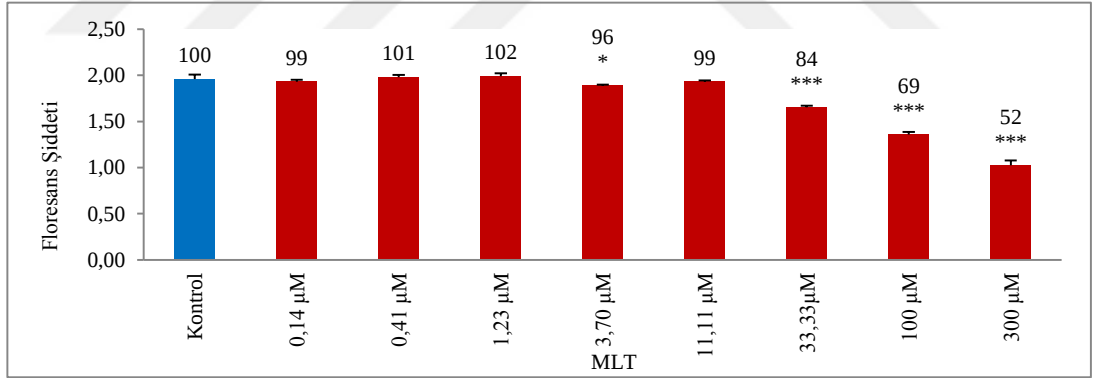
Şekil 3.10. CHO-K1 hücrelerinde hücre canlılığının ATP ölçümü ile değerlendirilmesi. Barlar üzerindeki değerler kontrol grubuna göre hesaplanmış % canlılık değerleridir. İstatistiksel değerlendirme çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır. *** $p < 0,001$.

3.2.MELATONİN VE ANALOGLARININ AROMATAZ İNHİBİTÖR ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

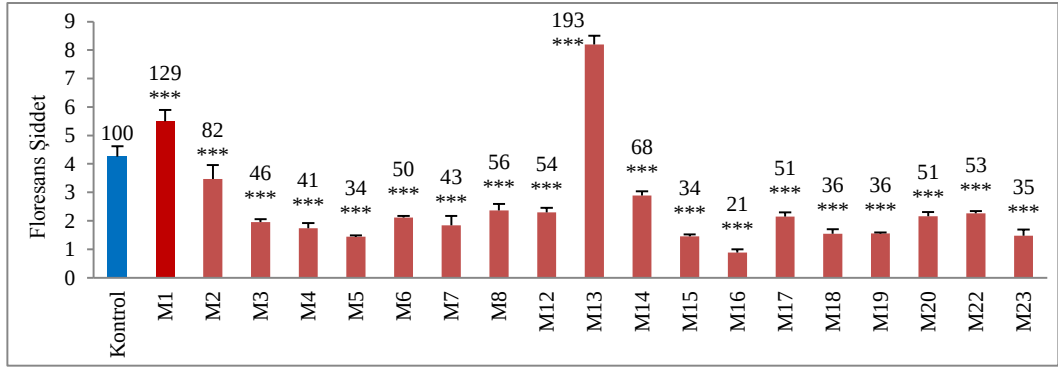
3.2.1. Doğrudan Aktivite Ölçüm Yöntemi ile Tarama Çalışmaları

Yeni sentezlenen bileşiklerin ana maddesi olarak melatoninin 0,14-300 μM aralığında 8 farklı konsantrasyonda aromataz enzimi üzerine etkisi doğrudan aktivite ölçüm yöntemi ile değerlendirilmiştir (Şekil 3.11). Melatoninin 3,70 μM konsantrasyonda ve 33,33-300 μM doz aralığında aromataz enzim aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiği gözlenmiştir.

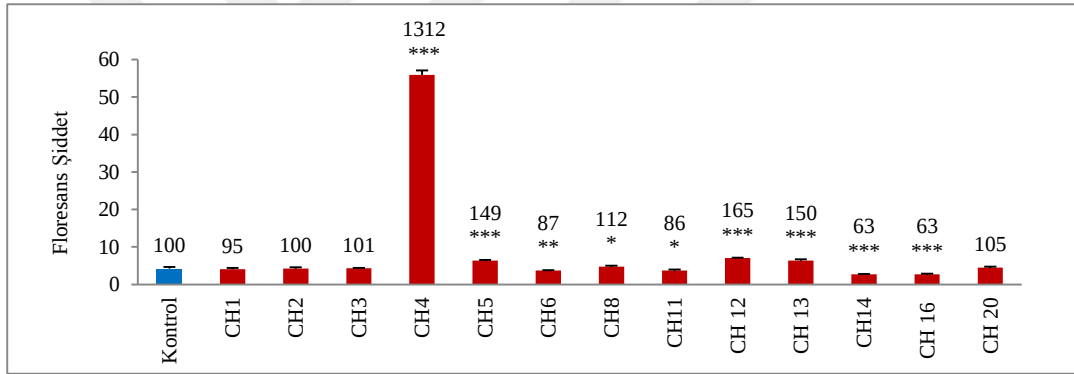
Melatonin analoglarının 100 μM konsantrasyonda aromataz enzim aktivitesi üzerine doğrudan etkileri araştırılmıştır (Şekil 3.12, 3.13 ve 3.14). 2-metilindol yapısındaki maddelerden M1 ve M13 dışında diğer maddelerin aromataz enzim aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiği gözlenmiştir. 4-florofenilindol yapısındaki maddelerden CH14 ve CH16'nın; 1-metilindol yapısındaki maddelerden ise HD19'un aromataz enzim aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiği gözlenmiştir.



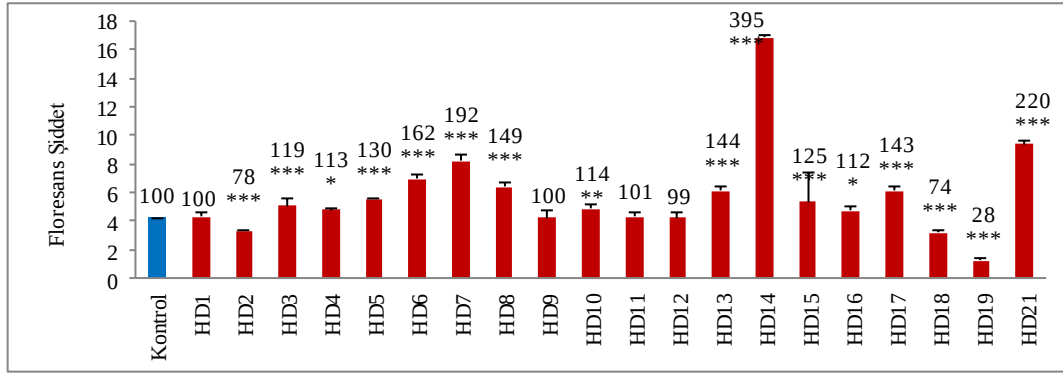
Şekil 3.11. Melatoninin (MLT) aromataz aktivitesi üzerine etkisi. Barlar üzerindeki değerler kontrol grubuna göre hesaplanmış % değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır. * $p<0,05$, *** $p<0,001$.



Şekil 3.12. 2-metilindol yapısındaki maddelerin (M) 100 μ M konsantrasyonda aromataz aktivitesi üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler kontrol grubuna göre hesaplanmış % değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır. ***p<0,001.



Şekil 3.13. 4-florofenilindol yapısındaki maddelerin (CH) 100 μ M konsantrasyonda aromataz aktivitesi üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler kontrol grubuna göre hesaplanmış % değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0,05, ***p<0,001.



Şekil 3.14. 1-metilindol yapısındaki maddelerin (HD) 100 μ M konsantrasyonda aromataz aktivitesi üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler kontrol grubuna göre hesaplanmış % değerlerdir. İstatistiksel değerlendirme kontrol grubuna göre yapılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$.

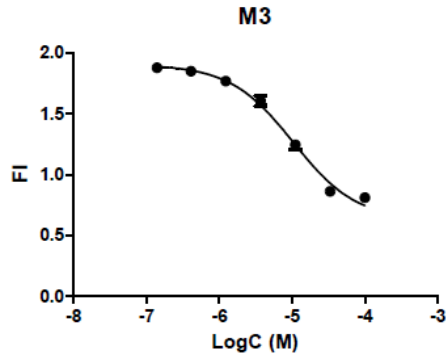
3.2.2. Melatonin Analoglarının IC_{50} Değerlerinin Hesaplanması

2.2.1. bölümünde ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde doğrudan aktivite ölçüm yöntemi ile 2-metil, 4-florofenil ve 1-metil indol türevlerinin aromataz inhibitör etkileri 100 μ M konsantrasyonda tarandıktan sonra inhibitör etkinliğinin yüksek olduğu gözlenen 9 maddenin aromataz aktivitesi üzerine etkileri daha geniş konsantrasyon aralığında araştırılmıştır. Bu örnekler 8 farklı konsantrasyonda birbirinden bağımsız en az 3 gün çalışılmıştır. Yapılan deneylerden elde edilen verilerden maddelerin IC_{50} değerleri hesaplanmış ve farklı günlerde hesaplanan IC_{50} değerlerinin ortalaması alınmıştır. Melatonin analoglarına ait birer enzim inhibisyon grafiği Şekil 3.15’de ve hesaplanan IC_{50} değerleri Tablo 3.7’de gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre **M3, M5, M6, M16 ve M23** maddelerinin tekrarlanabilir ve istatistiksel olarak anlamlı şekilde aromataz enzimini inhibe ettikleri bulunmuştur (Tablo 3.7). M14, M20, CH11 ve CH14 maddelerinin doz-yanıt ilişkilerine bakıldığında doza bağımlı anlamlı bir inhibisyona neden olmadıkları görülmüştür (Şekil 3.16). Tekrarlanabilir sonuçlar da elde edilemediği için bu maddeler Tablo 3.7’ye eklenmemişlerdir.

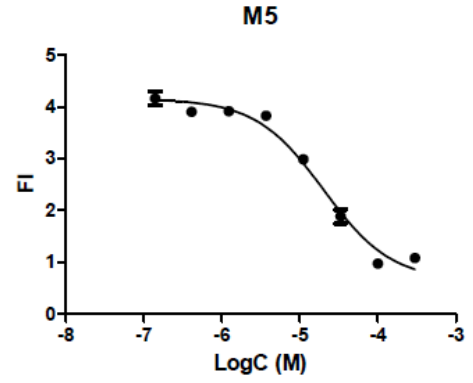
Tablo 3.7. Melatonin analoglarının doğrudan aromataz enzim aktivitesi analizi ile hesaplanan IC₅₀ değerleri.

	IC ₅₀ (M)	SS	%VK
M 3	1,15 E-05	1,58E-06	14
M 5	1,91E-05	1,47E-06	8
M 6	8,67E-06	6,50E-08	1
M 12	1,49E-05	5,01E-06	34
M 15	8,02E-06	7,49E-06	93
M 16	1,30E-05	8,34E-07	6
M 23	1,63E-05	1,95E-06	12
HD 19	7,52E-06	2,77E-07	37
CH16	9,97E-06	7,81E-06	78

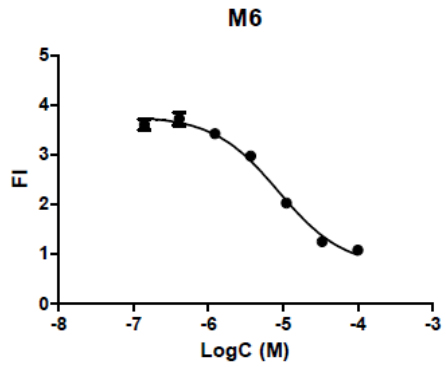
SS: Standart Sapma, VK: Varyasyon Katsayısı



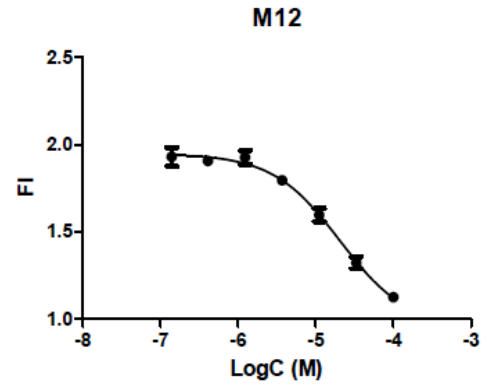
IC50 1.046e-005



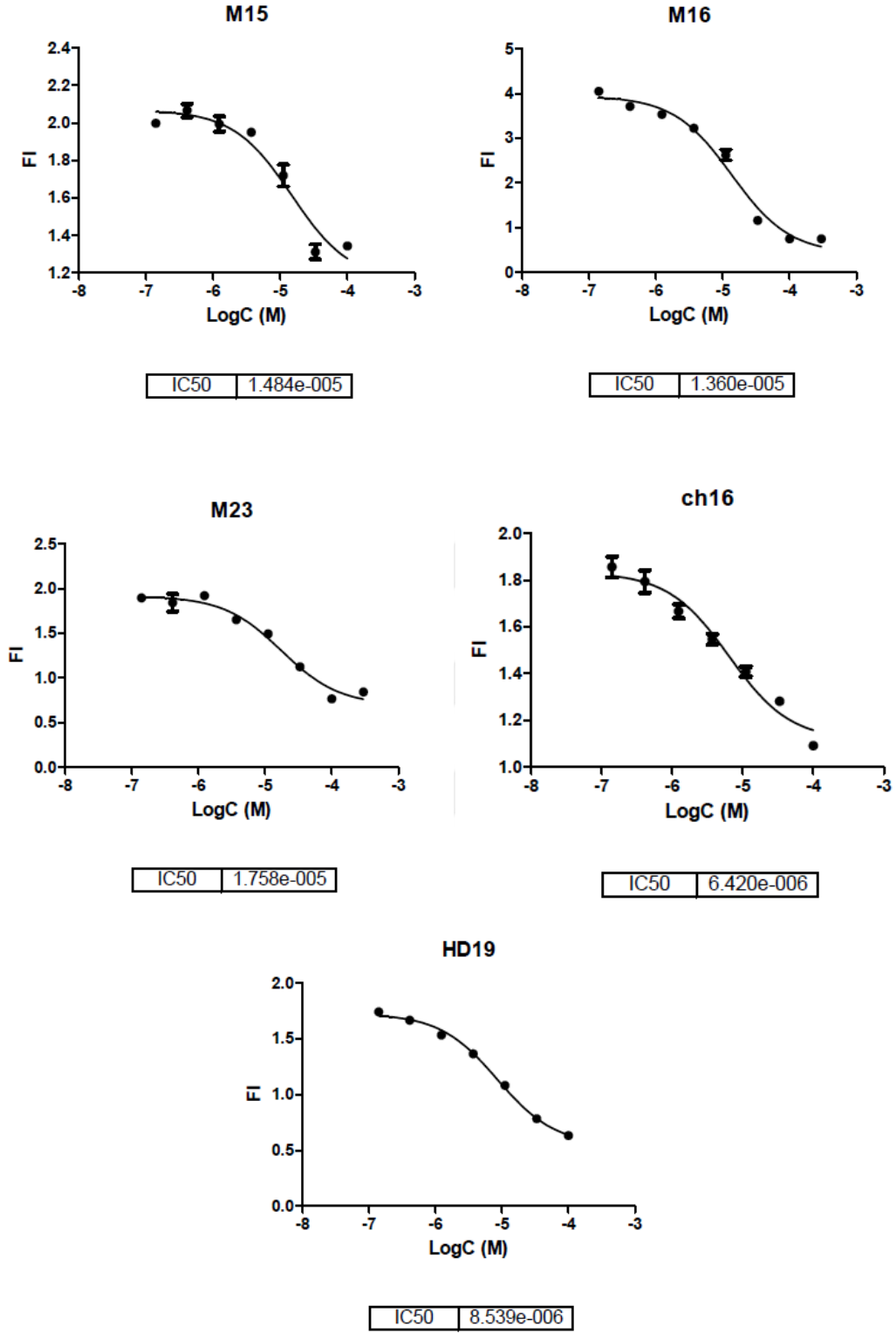
IC50 2.019e-005



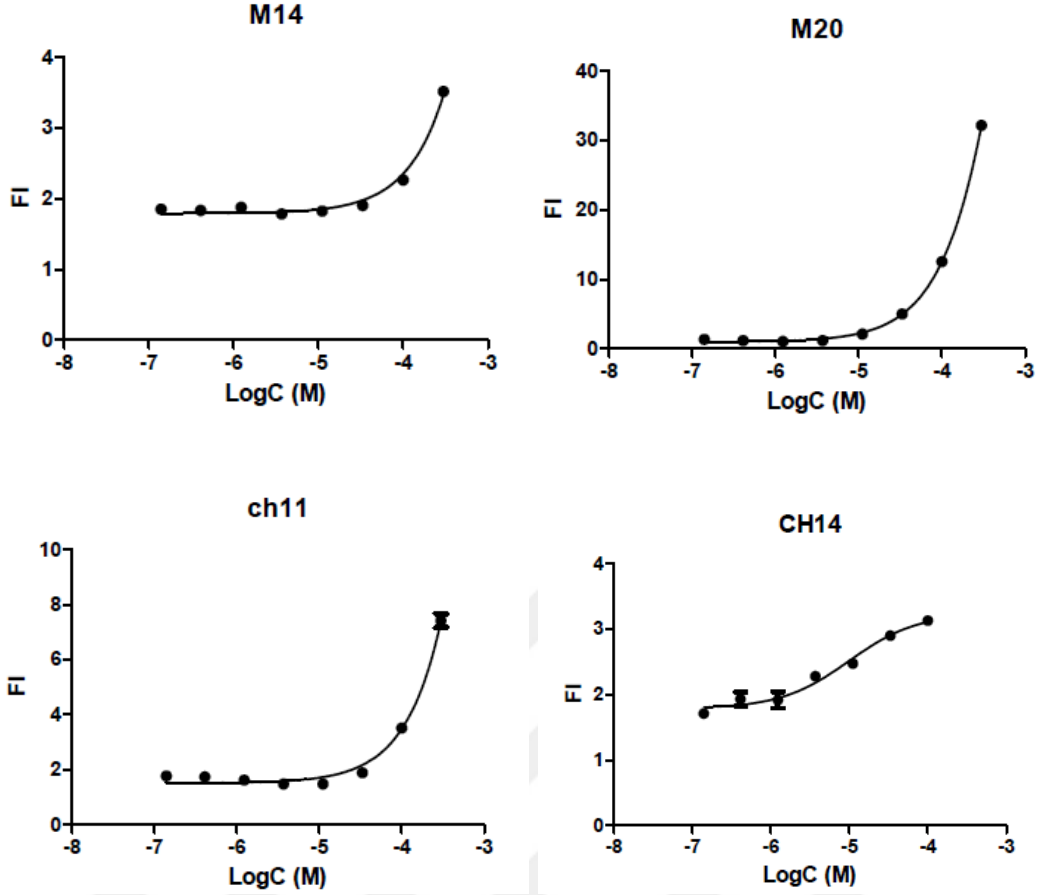
IC50 8.718e-006



IC50 2.057e-005



Şekil 3.15. Yeni sentezlenen melatonin analoglarına ait enzim inhibisyon grafikleri ve IC₅₀ değerleri. FI: Floresans şiddeti.



Şekil 3.16. Tek dozda tarama çalışmalarında inhibitör olduğu gözlenip doza bağımlı anlamlı bir inhibisyon paterni göstermedikleri bulunan M14, M20, CH11 ve CH14 maddelerine ait enzim inhibisyon grafikleri. FI: Floresans şiddeti.

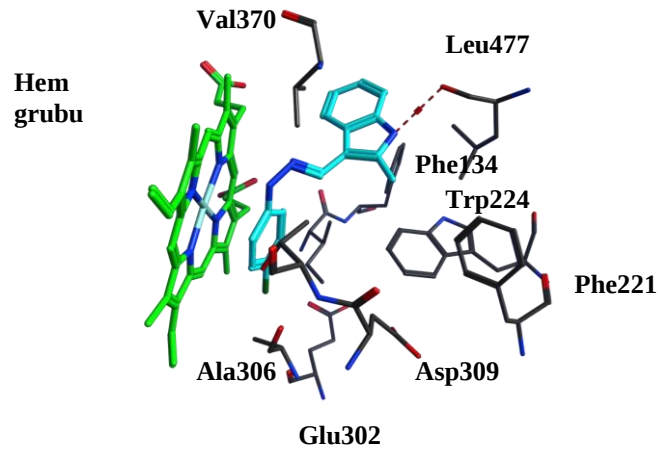
3.3.MOLEKÜLER MODELLEME (*İN SİLİCO*) ÇALIŞMA BULGULARI

Tez çalışması kapsamında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Atilla Akdemir ile işbirliği yapılmıştır. Bu kapsamda aromataz aktivitesi üzerine etkilerini *in vitro* olarak araştırdığımız melatonin analoglarının aromataz enzimi ile muhtemelen kurdukları ligand-protein bağlanma ilişkileri Doç.Dr. Akdemir tarafından docking çalışmaları ile araştırılmıştır.

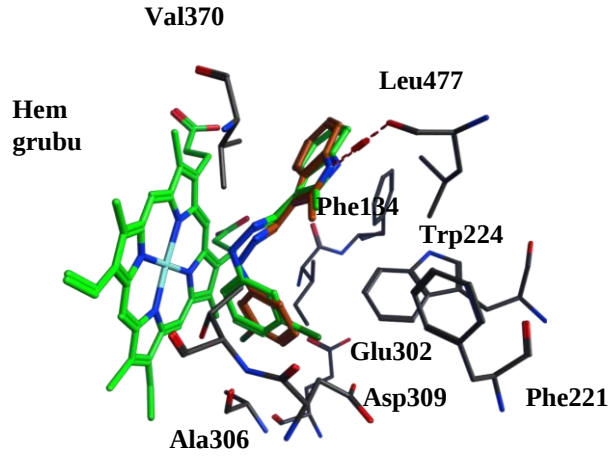
Enzim inhibisyon deneyleriyle taradığımız yeni etken madde adayları arasında M6 bileşiğinin insan aromataz enzimi için en düşük IC_{50} değerine sahip olduğu görülmüştür (Tablo 3.7). Docking çalışmalarıyla elde edilen ligand-protein bağlanma ilişkilerine göre bileşik M6'nın indol azot atomu ile Leu477'nin karbonil grubu arasında bir hidrojen bağının oluşumunun mümkün olduğu tespit edilmiştir (Şekil

3.17). Bu indol grubu; ayrıca Phe134, Phe221, Trp224, Val370 ve Leu477 amino asitleri ile hidrofobik etkileşimler kurmaktadır. İndol yapısının metil substitüenti Phe221 ve Asp309 gibi rezüdülerle kaplanmış aktif bölgenin girişine yönelmektedir. Fenil substitüenti hidrofobik etkileşimleri oluşturmak için hemen hemen hem grubuna paralel olarak hizalanmıştır. Fenil grubunun para pozisyonundaki klor substitüenti Ile133, Glu302, Ala306 ve hem grubu tarafından oluşturulan küçük cepçiğe yönelmektedir. Fenil grubundaki halojen substitüentinin bu bileşiğin aktivitesi için önemli olduğu görülmektedir. Para kloro substitüentinin daha küçük flor veya daha büyük brom substitüenti ile yer değiştirmesi enzimin aktivitesinde azalma ile sonuçlanmaktadır (Tablo 3.7). Orto pozisyonundaki substitüentlere de sterik uyuşmazlıklar nedeniyle izin verilmemektedir. Meta pozisyonundaki substitüentlere izin verilmektedir, ancak bunun için Leu477'nin karbonil grubu ile hidrojen bağı yapmasına izin verecek (Şekil 3.18) şekilde ligand oryantasyonunda minör değişikliğe ihtiyaç vardır.

M5 bileşiğinin indol yapısı M6 bileşiğinin indol grubu ile aynı bölgeye bağlanmaktadır. Fenil halkasının meta substitüenti ya M6 bileşiğinde gözlenen benzer pozisyona yerleşmekte ya da Asp309'a yönelmektedir. Enzimin aktif bölgesi ile sterik uyuşmazlığa neden olduğu için fenil halkasının orto pozisyonundaki substitüsyonlara izin verilmemektedir. Benzer şekilde, HD ve CH serisi bileşikler enzimin aktif bölgesi ile sterik uyuşmazlığa neden olmaktadır.



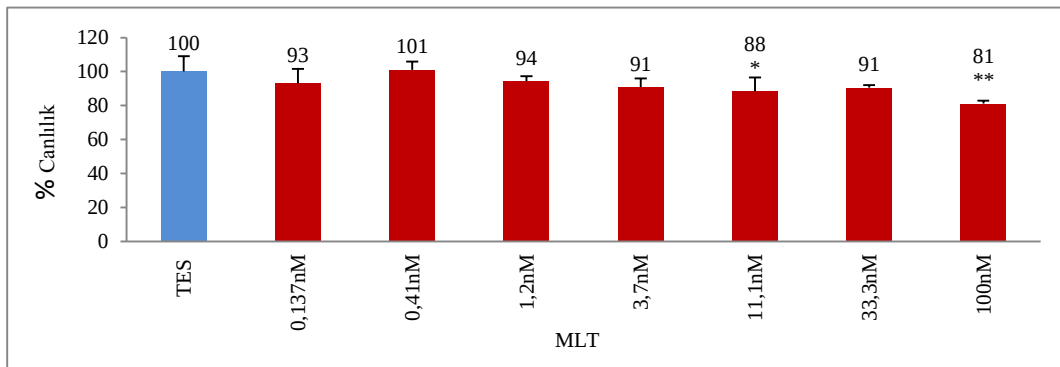
Şekil 3.17. M6 bileşiğinin aromataz enziminin aktif bölgesindeki bağlanma pozisyonu



Şekil 3.18. M5 bileşiğinin aromataz enziminin aktif bölgesindeki 2 adet bağlanma pozisyonu

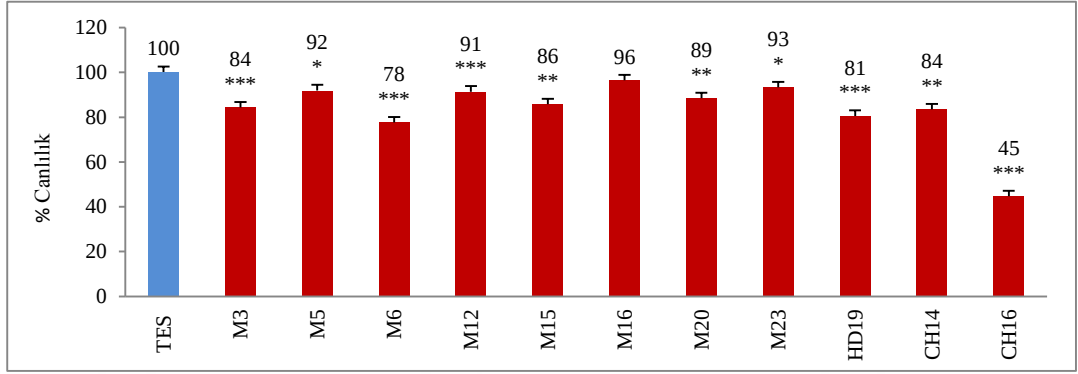
3.4. MELATONİN VE ANALOGLARININ DOLAYLI AKTİVİTE YÖNTEMİ İLE AROMATAZ İNHİBİTÖR ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Östrojensiz ortamda testosteron varlığında melatonin /melatonin analoglarının MCF-7 BUS hücre proliferasyonuna etkileri ölçülerek maddelerin aromataz aktivitesi üzerine etkileri dolaylı olarak belirlenmiştir (Şekil 3.19, 3.20 ve 3.21). Melatonin 100 nM konsantrasyonda, testosteron varlığında MCF-7 BUS hücrelerinin proliferasyonunu anlamlı bir şekilde inhibe etmiştir (Şekil 3.19).



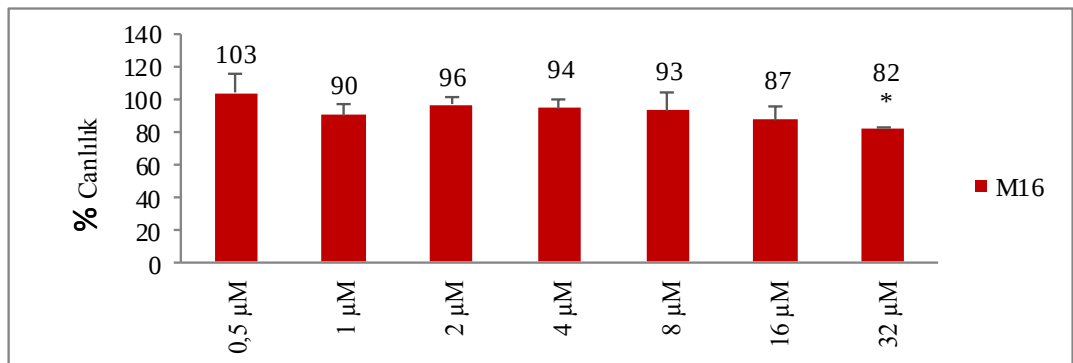
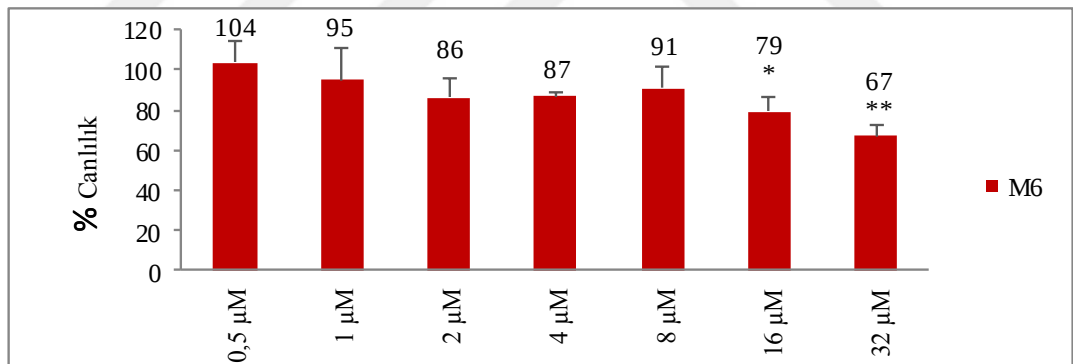
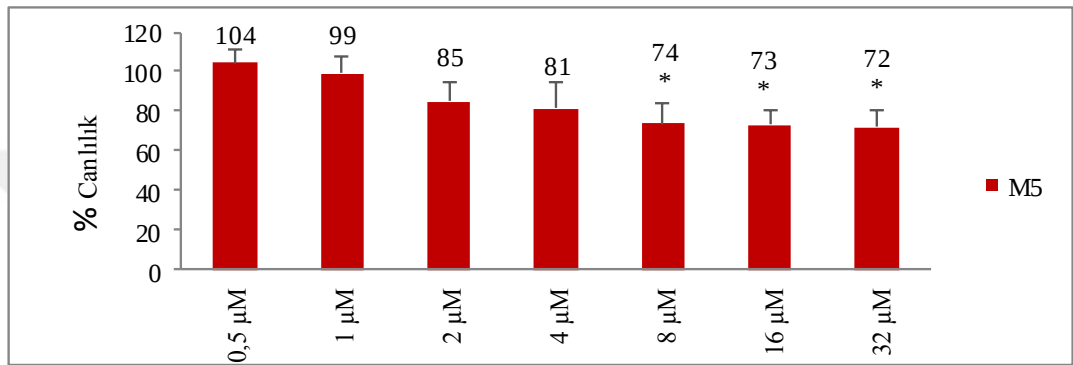
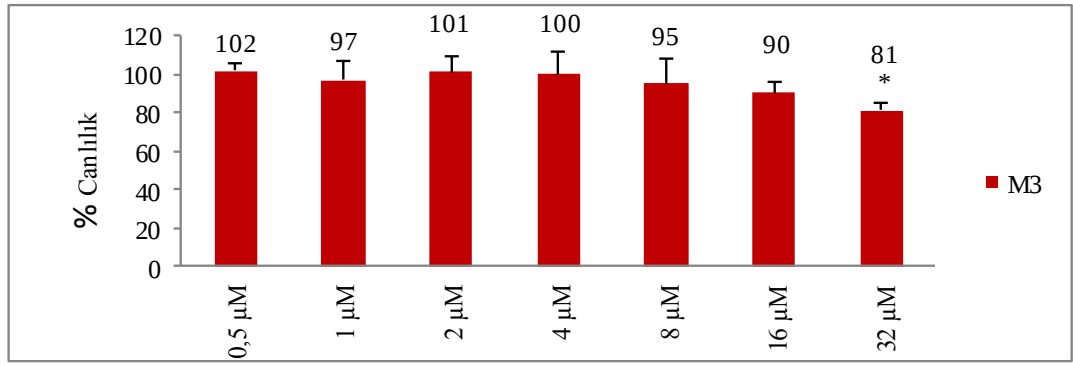
Şekil 3.19. Melatoninin (MLT) MCF-7 BUS hücrelerinde aromataz aktivitesi üzerine etkisinin dolaylı olarak değerlendirilmesi. Barlar üzerindeki değerler testosteron (TES) grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme testosteron grubuna göre yapılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

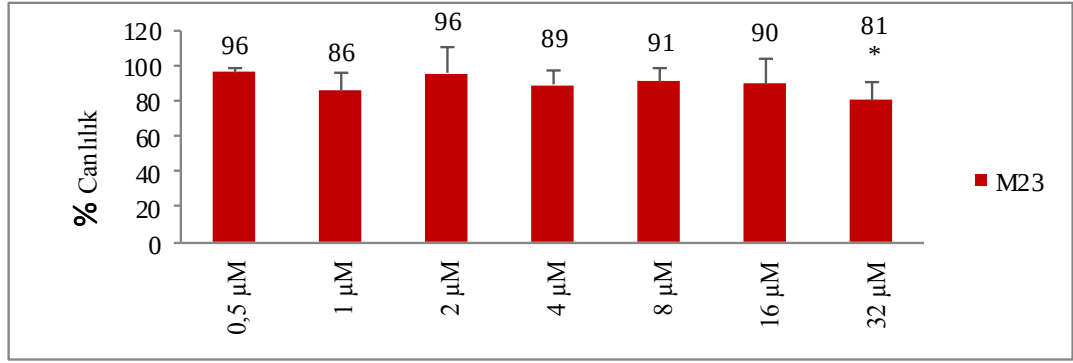
Bileşiklerin 10 μ M konsantrasyonda ve testosteron varlığında MCF-7 BUS hücrelerinde aromataz aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettikleri gözlenmiştir (Şekil 3.20).



Şekil 3.20. Bileşiklerin 10 μ M konsantrasyonda ve testosteron (TES) varlığında MCF-7 BUS hücrelerinde aromataz aktivitesi üzerine etkisinin dolaylı olarak değerlendirilmesi. Barlar üzerindeki değerler testosteron grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme testosteron grubuna göre yapılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$.

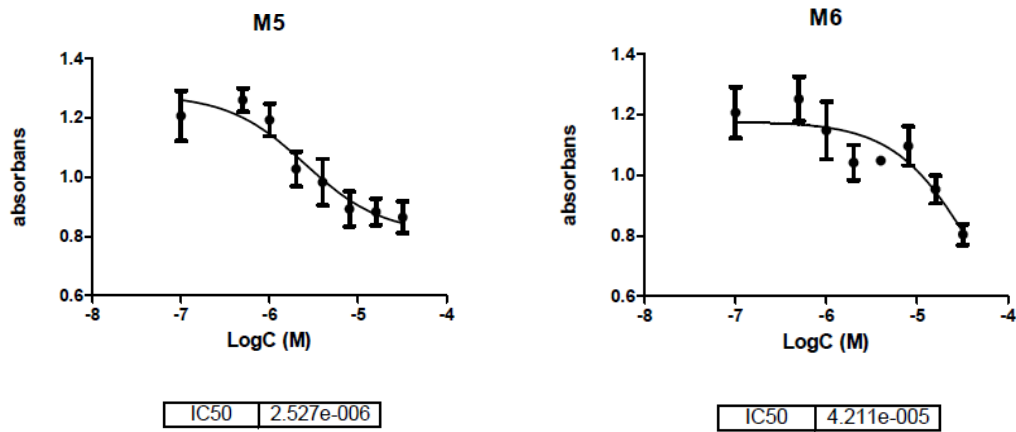
Doğrudan aromataz aktivitesi ölçüm yönteminde inhibitör etkinliğinin tekrarlanabilir olduğu gözlenen M3, M5, M6, M16 ve M23 maddelerinin dolaylı aromataz aktivitesi üzerine etkileri 0,5- 32 μ M konsantrasyon aralığında taranmıştır (Şekil 3.21). Bileşikler, çözünabildikleri en yüksek konsantrasyon olan 50 μ M konsantrasyonda sitotoksik etki gösterdiklerinden taramada en yüksek 32 μ M konsantrasyonda çalışılmıştır. Elde edilen verilere göre M3, M16 ve M23 maddeleri sadece 32 μ M konsantrasyonda aromataz aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe ederken; M5 en düşük 8 μ M, M6 ise en düşük 16 μ M konsantrasyondan başlayarak aromataz aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe etmiştir.





Şekil 3.21. Bileşiklerin yedi farklı konsantrasyonda (0,5-32 µM) testosteron varlığında MCF-7 BUS hücrelerinde aromataz aktivitesi üzerine etkisinin dolaylı olarak değerlendirilmesi. Barlar üzerindeki değerler testosteron grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme testosteron grubuna göre yapılmıştır. *p<0,05, **p<0,005.

Aromataz aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe eden M5 ve M6 maddeleri ile yapılan deneyden elde edilen verilerle maddelerin IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Bu maddelere ait enzim inhibisyon grafikleri Şekil 3.22’de gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre M5 maddesinin IC₅₀ değeri 2,5 µM, M6 maddesinin IC₅₀ değeri ise 42,1 µM olarak bulunmuştur.



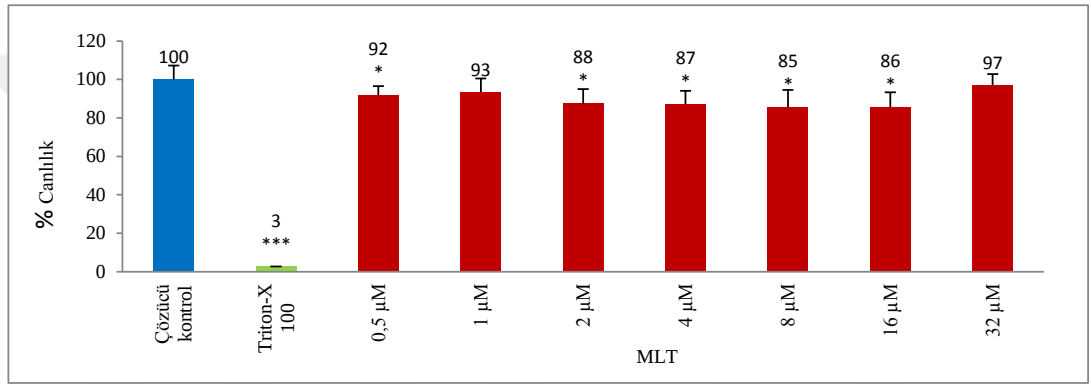
Şekil 3.22. Yeni sentezlenen melatonin analoglarından M5 ve M6 maddelerine ait dolaylı aktivite ölçüm yöntemi ile elde edilen enzim inhibisyon grafikleri ve IC₅₀ değerleri.

3.5. SİTOTOKSİSİTE ÖLÇÜM YÖNTEMİ BULGULARI

3.5.1. MCF-7 BUS Hücrelerinde Sitotoksik Etkinin Değerlendirilmesi

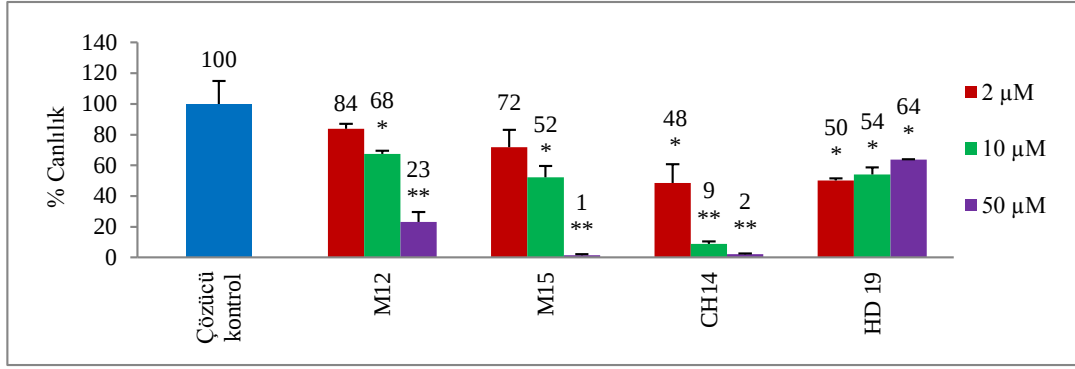
Normal besi ortamı içerisinde MCF-7 BUS hücrelerinin melatoninle farklı konsantrasyonlarda 5 gün inkübasyonu sonrasında hücre canlılığı değerlendirildi. Kontrole göre % canlılık değerleri hesaplandı (Şekil 3.23).

Melatoninin, 1 ve 32 μM konsantrasyonları dışındaki konsantrasyonlarda MCF-7 BUS hücrelerinde canlılıkta istatistiksel olarak anlamlı düşüşe neden olduğu gözlenmiştir.



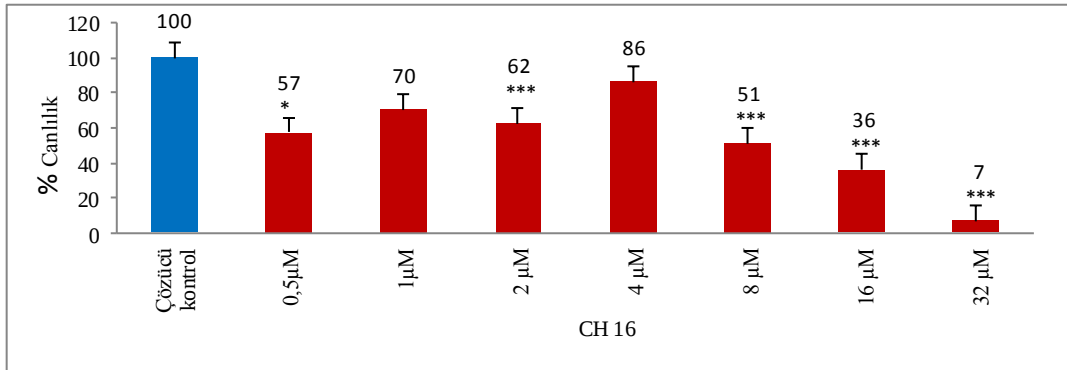
Şekil 3.23. Melatoninin (MLT) MCF-7 BUS hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler çözücü kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır. * $p<0,05$, *** $p<0,001$.

Doğrudan aromataz aktivitesi ölçüm yönteminde tekrarlanabilir olmadığı tespit edilen M12, M15, CH14 ve HD19 maddelerinin dolaylı aromataz aktivitesinin de yürütüldüğü 5 günlük inkübasyon süresinde maddelerin hücreler üzerindeki uzun süreli sitotoksik etkisi araştırıldı (Şekil 3.24). M12 ve M15 maddelerinin 2 μM konsantrasyonları dışında maddelerin tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde sitotoksik oldukları gözlenmiştir.



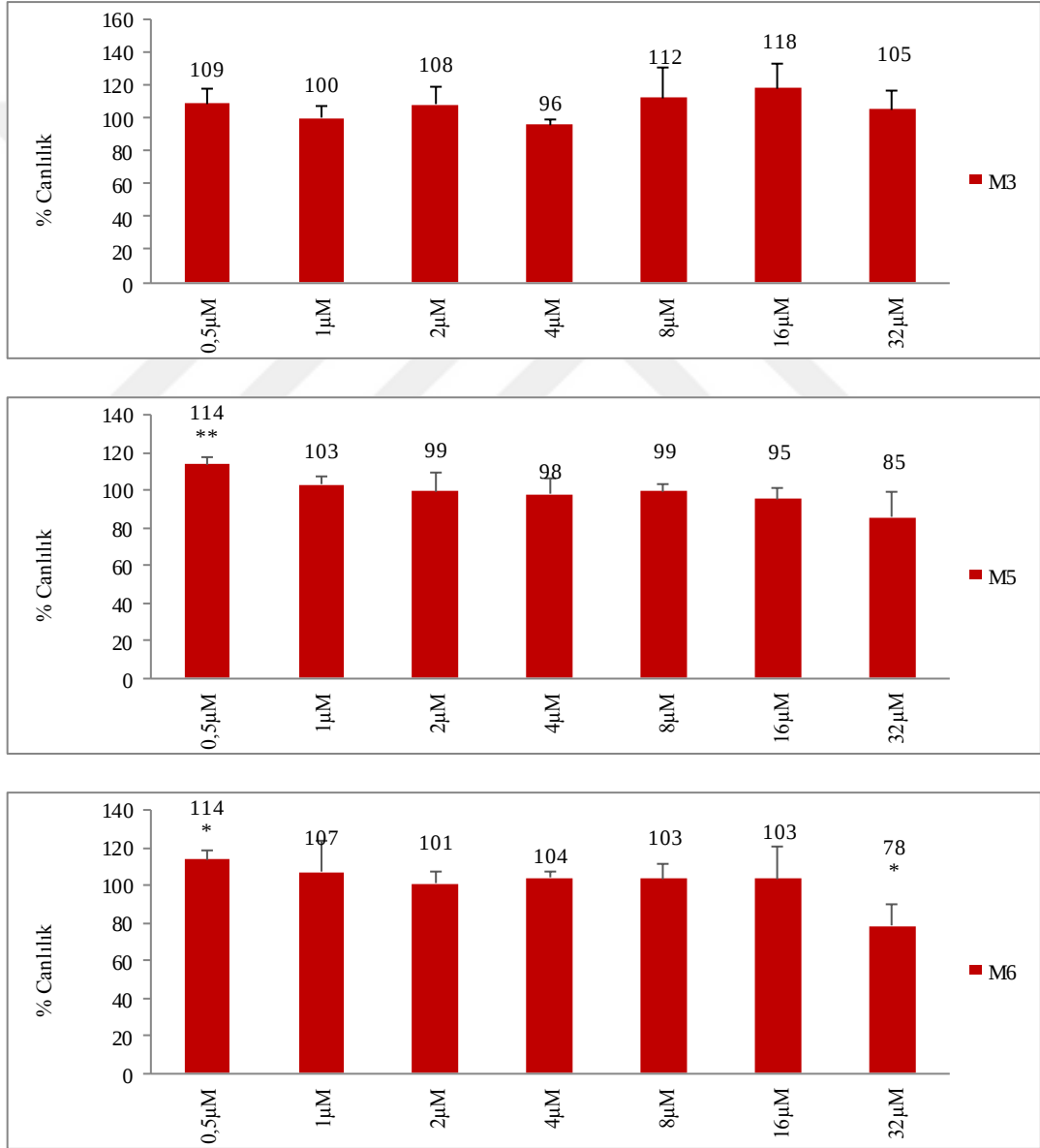
Şekil 3.24. Maddelerin MCF-7 BUS hücreleri üzerindeki uzun süreli (5 günlük) sitotoksik etkisi. Barlar üzerindeki değerler çözücü kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0,05, **p<0,005.

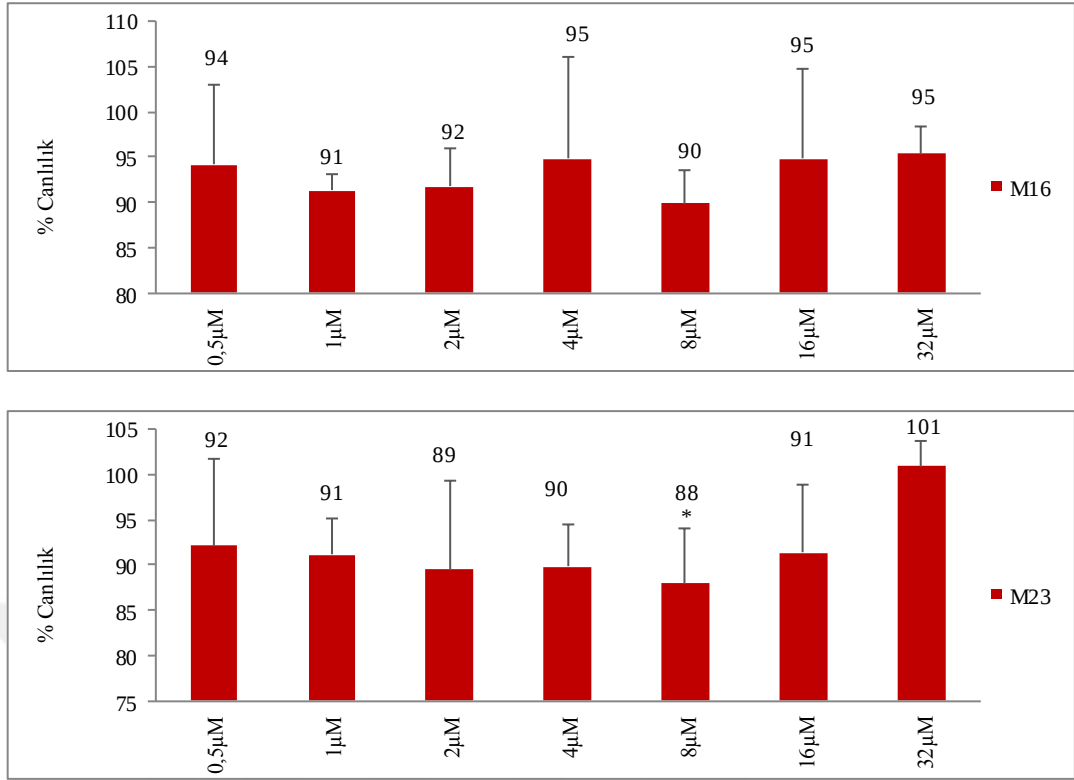
Aromataz aktivitesini inhibe ettiğini düşündüğümüz CH16 maddesinin, farklı konsantrasyonlarda MCF-7 BUS hücreleriyle 5 gün inkubasyonu sonrasında hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirilmiştir (Şekil 3.25). 1 ve 4 µM konsantrasyonu dışındaki konsantrasyonlarda CH16 maddesinin MCF-7 BUS hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde sitotoksikiteye neden olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.25. MCF-7 BUS hücrelerinde CH 16 maddesi ile inkubasyon sonrasında gözlenen sitotoksik etki. Barlar üzerindeki değerler çözücü kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0,05, ***p<0,001.

Doğrudan aromataz aktivitesi ölçüm yönteminde tekrarlanabilir olduğu tespit edilen M3, M5, M6, M16, M23 maddelerinin dolaylı aromataz aktivitesinin de yürütüldüğü 5 günlük inkubasyon ile maddelerin hücreler üzerindeki uzun süreli sitotoksik etkisi 7 farklı (0,5-32 μ M) konsantrasyonda araştırılmıştır (Şekil 3.26). M3, M5, M16 ve M23 maddelerinin sitotoksik etki göstermedikleri, M6 maddesinin ise 32 μ M konsantrasyonda MCF-7 BUS hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde hücre canlılığını azaltarak sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur.



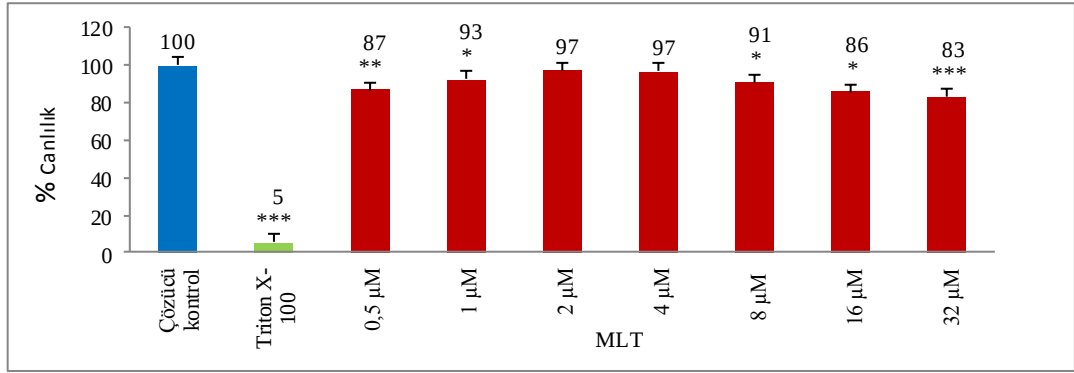


Şekil 3.26. Bileşiklerin yedi farklı konsantrasyonda (0,5-32 µM) MCF-7 BUS hücreleriyle 5 gün inkubasyon sonucu hücre canlılığının değerlendirilmesi. Barlar üzerindeki değerler çözücü kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır. *p<0,05, **p<0,005.

3.5.2. CHO-K1 Hücrelerinde Sitotoksik Etkinin Değerlendirilmesi

MCF-7 BUS gibi östrojene bağımlı bir kanser hücresinden farklı olarak sağlıklı bir over hücresinde de melatonin ve analoglarının sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Çin hamster over hücreleri (CHO-K1) kullanılmıştır. CHO-K1 hücrelerinin test maddeleriyle 24 saat inkübasyonu sonrasında hücre canlılığı ölçülerek melatonin ve analoglarının sitotoksik etki potansiyelleri belirlenmiştir (Şekil 3.27 ve 3.28).

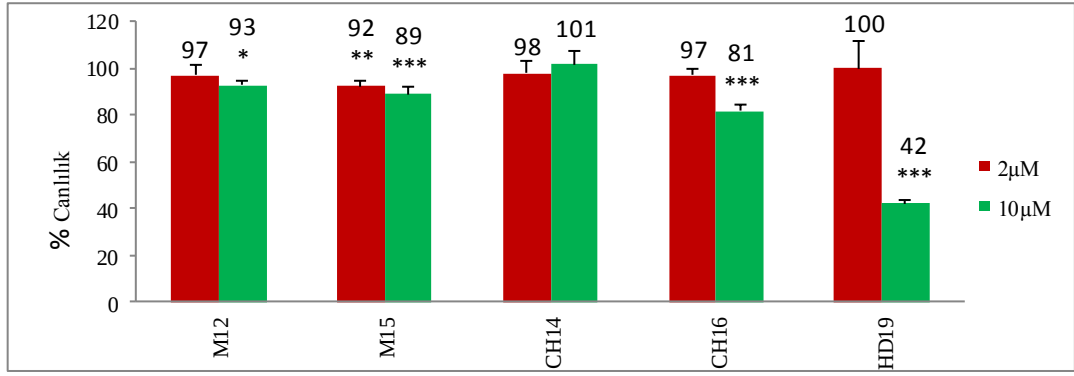
Melatoninin, farklı (0,5-32 µM) konsantrasyonlarda CHO-K1 hücrelerinde sitotoksitesi değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre melatoninin 2 ve 4 µM konsantrasyonları dışındaki konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde CHO-K1 hücrelerinde sitotoksik olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.27. Melatoninin CHO-K1 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler çözücü kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır. MLT: Melatonin. * $p<0,05$, ** $p<0,005$, *** $p<0,001$.

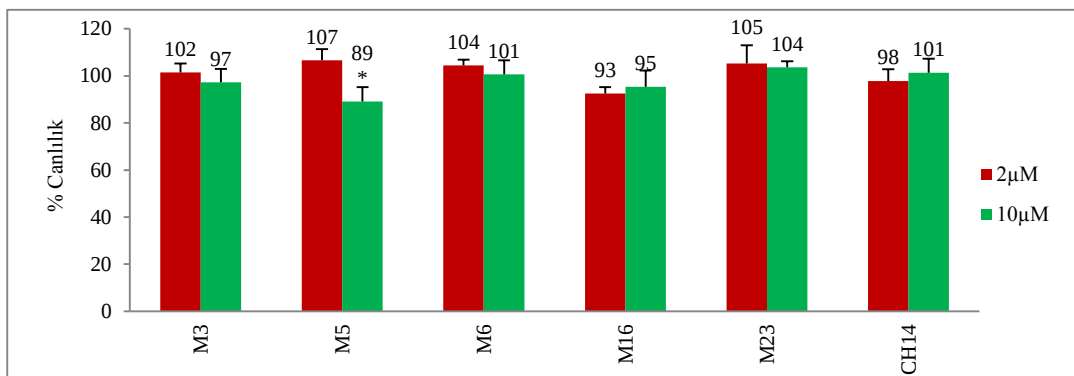
Test maddeleriyle, 2, 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda 24 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığı değerlendirilerek kontrole göre % canlılık değerleri hesaplandı (Şekil 3.28 ve 3.29). Ancak, maddelerin 50 μM konsantrasyonunda neredeyse tümünde sitotoksikite görüldüğü için bu veriler grafiğe eklenmedi.

Elde edilen verilere göre doğrudan aktivite ölçüm yönteminde etkili olduğu saptanan ve tekrarlanabilirliği düşük olan maddelerden M15 maddesinin tüm konsantrasyonlarda; M12, CH16 ve H19 maddelerinin ise 10 μM konsantrasyonda CHO-K1 hücrelerinde sitotoksik oldukları gözlenmiştir (Şekil 3.28).



Şekil 3.28. Doğrudan aktivite ölçüm yönteminde etkili olduğu saptanan ve tekrarlanabilirliği düşük olan melatonin analoglarının 2 ve 10 μ M konsantrasyonlarda CHO-K1 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler çözücü kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme çözücü kontrole göre yapılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$.

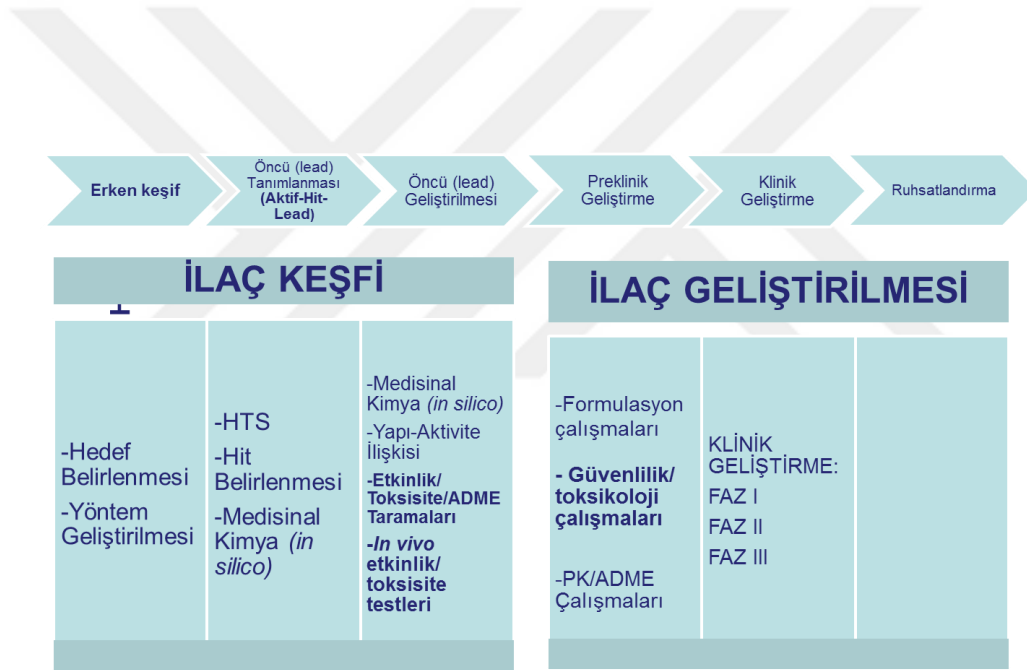
Doğrudan aktivite ölçüm yönteminde etkili olduğu saptanan ve tekrarlanabilirliği yüksek olan maddelerden M3, M6, M16, M23 ve CH14'ün CHO-K1 hücrelerinde sitotoksik etkileri gözlenmezken, M5 maddesi 10 μ M konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı derecede hücre canlılığını azaltmıştır (Şekil 3.29).



Şekil 3.29. Doğrudan aktivite ölçüm yönteminde etkili olduğu saptanan ve tekrarlanabilirliği yüksek olan melatonin analoglarının 2 ve 10 μ M konsantrasyonlarda CHO-K1 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler çözücü kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini ifade etmektedir. İstatistiksel değerlendirme çözücü kontrole göre yapılmıştır. * $p < 0,05$.

4. TARTIŞMA

İlaç keşif ve geliştirme sürecine bakıldığında ilk basamakta muhtemel terapötik bir hedef belirlemenin ve bu hedefin söz konusu hastalıktaki rolünü ortaya koymanın yer aldığı görülmektedir. Zaman zaman bir hastalıkta tedavi yaklaşımı için yeni bir hedef belirlenip hastalıkla ilişkisi ve ardından da bu hedefin validasyonu sürecine gidilse de çoğunlukla belirli hastalıklar için daha önce belirlenmiş hedeflere dönük yeni etkin maddelerin araştırılması ve önerilmesi yolu izlenmektedir. Hedef ve hedefe dönük geliştirilecek terapötik ajanların test edilmesi için kullanılacak ölçüm yöntemi belirlendikten sonra aktif moleküllerin belirlenmesi aşamasına geçilir (Şekil 4.1) (168, 169).



Şekil 4.1. İlaç keşif ve geliştirme sürecinde *in vitro* etkinlik ve toksisite testlerinin yeri (168-169'dan uyarlanmıştır).

Günümüzde çok sayıda sentetik aday molekül arasından en etkin ve en az advers etkiye sahip olanların hızlı ve düşük maliyetle saptanabilmesi ve daha az deney hayvanı kullanılması amacıyla *in vitro* yüksek hızlı tarama testleri (high throughput screening, HTS) kullanılmaktadır. Bu çalışmalara paralel olarak bilgisayar tabanlı *in silico* modelleme çalışmaları ile olası ilaç etkin maddelerinin

hedef molekül üzerindeki (enzim inhibisyonu ya da reseptör agonist/antagonist etki gibi) etkinliği ve/veya olası advers etkileri de öngörölmeye çalışılmaktadır. Bu moleküler modelleme çalışmaları da daha düşük maliyet ve daha az sayıda deney hayvanı kullanılarak olası ilaç etkin madde öncüllerini daha erken evrelerde belirlemeye olanak vermektedir (168-170).

Bu tez çalışması kapsamında östrojen reseptörü pozitif meme kanserinin gelişiminin önlenmesi ve tedavisine yönelik olarak yeni sentezlenen bazı bileşiklerin erken keşif, hit yakalanması ve hitten öncü moleküle geçilmesi çalışmalarının küçük bir bölümünün gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

Meme kanseri tüm dünyada insidansı artan, kadınlar arasındaki kanser vakalarında ilk sırada yer alan ve gelişmiş ölkelerde her 8 kadından birinde göröleceğı öngörölen kanser türüdür (171). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından 2012 yılında yayımlanan istatistik verilerinde dünyada meme kanseri insidansındaki artışa dikkat çekilmektedir (172). Verilere göre meme kanseri insidansı gelişmiş ölkelerde gelişmekte olan ölkelere göre daha yüksek, meme kanserinden ölüm ise gelişmiş ölkelerde gelişmekte olan ölkelere göre daha düşüktür (173). Bu veri meme kanserinden korunmanın ve tedavisinin mümkün olduğunun en önemli kanıtıdır. T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yayımlanan 2013 yılı Türkiye Kanser İstatistiklerine göre ölkemizde de kadınlar arasında gözlenen kanser vakaları arasında meme kanseri (%24) ilk sırada yer almakta, kanser tanısı konmuş her 4 kadından birinin meme kanseri olduğü bildirilmektedir. 2013 yılı içinde toplam 17.531 kadına meme kanseri teşhisi konduğü da raporda belirtilmiştir (174).

Meme kanserinin nedenleri araştırıldığında yapılan epidemiyolojik ve klinik çalışmalar östrojene temas ile meme kanseri riski arasında pozitif bir ilişki olduğünü, uzun süreler yüksek konsantrasyonlarda endojen östrojenlere maruz kalmanın (erken ergenlik, geç menopoz, hiç doğum yapmamak gibi) insanlarda meme kanseri riskini artırıcı faktörler arasında olduğünü göstermektedir (175, 176). Endojen östrojenlerin biyosentezi, steroidojenez yolağında kortikosteroidden başlayarak son basamakta androjenlerin aromataz enzimi ile dönüştürölmesi sonucunda gerçekleşir (Şekil 1.2).

Aromataz bir sitokrom P450 enzimi olup overler, plasenta, uterus, testis, beyin ve ekstrasglandular adipoz dokularda bulunmaktadır. Menopoz öncesi gebe olmayan kadınlarda dolaşımdaki östrojenlerin ana kaynağı overler iken menopoz sonrası kadınlarda ana östrojen kaynağının diğör dokular olmaya başladığı ifade edilmektedir

(177, 178). Aromataz meme dokusunda da bulunmakta ve özellikle postmenopozal meme dokusunda lokal östrojen üretiminde önemli rol oynadığı ve bu östrojenin de lokal karsinogenezi indüklediği bildirilmektedir. Östrojen varlığında hızla çoğalan meme kanser hücrelerinin tedavisinde aromataz inhibitörleri etkili terapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır (179).

Melatonin, epifizde (pineal glanddan) sentezlenerek salgılanan, esas olarak günlük biyolojik ritmin, uyku/aktivite döngüsünün düzenlenmesinden sorumlu, indolamin yapılı endojen bir hormondur (180, 181). Bu fizyolojik fonksiyonlarının yanı sıra melatoninin çeşitli kanser türlerinde koruyucu ve terapötik etkileri olduğu da bildirilmektedir (125). Melatonin lipofilik özelliği nedeniyle membranları hızla aşarak vücutta kolayca dağılabilmekte ve neredeyse tüm hücre içi kompartmanlara ulaşabilmektedir. Melatoninin antikarsinojenik etki mekanizmalarından biri ve üzerinde en çok araştırma yapılanı farklı birçok mekanizma aracılığı ile antioksidan etki gösteriyor oluşudur (182). Melatoninin meme kanserindeki koruyucu etkisinin olası bir mekanizmasının da aromataz inhibisyonu olduğu; melatoninin meme kanseri hücrelerinde aromataz aktivitesini ve enzimin ekspresyonunu azaltabildiği bildirilmektedir (125, 183). Toksisitesinin çok düşük olması da antioksidan ve antikarsinojenik ajan olarak önem kazanmasını sağlamakla birlikte düşük yarılanma ömrüne sahip oluşu ve vücutta hızlı metabolizması sonucu inaktive oluşu ilaç olarak kullanımını sınırlandırmaktadır. Araştırmacılar daha uzun yarılanma ömrüne sahip melatonin analoglarının sentezlenmesinin tedavide başarıyı artıracığını belirtmektedir (184).

Bugüne kadar Prof. Dr. Sibel Süzen ve grubu ile yürüttüğümüz araştırmalarda melatonin türevi indol temelli hidrazid ve hidrazon bileşiklerini radikal süpürücü ve okside bileşikleri indirgeyici etkileri yönünden taramış ve olası antioksidan etki potansiyellerini araştırmıştık. Son yıllardaki çalışmalarda aromataz inhibitörü olduğu gösterilen melatoninin meme kanseri tedavisinde selektif östrojen enzim modülatörü (SEEM) etkisi ile de kullanılabileceği (91) bilgisinden hareketle bu tez çalışması kapsamında yeni sentezlenen melatonin türevi indol bileşiklerinin aromataz aktivitesini inhibe edici etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla 2-metilindol (M maddeleri), 4-florofenilindol (CH maddeleri) ve 1-metilindol hidrazid/hidrazon yapısındaki (HD maddeleri) toplam 52 yeni melatonin analogu indol türevinin rekombinant insan aromataz enzimi ve floresans özelliğe sahip bir ligandın kullanıldığı *in vitro* yöntem ile doğrudan aromataz aktivitesi üzerine etkileri

araştırılmıştır. Bu yöntem floresans ligand kullanılarak optik saptama temeline dayandığı için 96 kuyucuklu plaka formatına minyatürize edilip orta hızlı çıktılı tarama çalışmalarına olanak veren bir yöntem olup (185) daha önce farklı gruplar tarafından da yeni aromataz inhibitörlerinin geliştirilmesi çalışmalarında kullanılmıştır (110). Yöntemin öncelikle laboratuvarımız şartlarında kısmi validasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bilinen aromataz inhibitörü ketokonazolün farklı konsantrasyonlarında aromataz aktivitesi üzerine etkisi araştırılmış, inhibisyon grafiği aracılığı ile hesaplanan IC_{50} değerinin ($2,4 \times 10^{-6}$ M) literatürde ketokonazolün aromataz enzimi için bildirilen değer ($2,0 \times 10^{-6}$ M) ile benzer olduğu gözlenmiştir (167). Yöntemin analiz içi ve analizler arası tekrarlanabilirliğinin de yüksek olduğunun görülmesi ile yeni sentezlenen maddelerin tek konsantrasyonda ($100 \mu\text{M}$) aromataz enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılmasına geçilmiştir. 1-metilindol hidrazid/hidrazon yapısındaki bileşikler arasından sadece 1-Metilindol-2-karboksaldehit hidrazon (HD19) yapısında olan bileşiğin, 4-florofenilindol türevleri arasında ise 3-((2-(2,4-diflorofenil)hidrazon)metil)-2-(4-florofenil)-1H-indol (CH14) ile N'-((2-(4-florofenil)-1H-indol-3-yl)metilen)-4-metoksibenzohidrazid (CH16) bileşiklerinin enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir. 2-metilindol yapısındaki hidrazon bileşiklerinin ise çoğunun, farklı oranlarda da olsa, aromataz enzimini inhibe ettikleri gözlenmiştir. İlk basamakta yapılan bu tarama çalışması sonucunda;

1. İndol halkası üzerinde 2. pozisyondan bağlanan florofenil gibi bir yapının ve beraberinde 3. pozisyondan bağlanan substitüe fenil hidrazon grubunun varlığının enzim inhibitör etkiyi azalttığı,
2. İndol halkası üzerinde 2. pozisyondan bağlanan karboksaldehit fenil hidrazin gibi bir yapının olmasının da inhibitör etkiyi ortadan kaldırdığı, fenil substitüsyonu olmayan 2-karboksaldehit hidrazon bileşiğinin ise az da olsa aktivite gösterdiği,
3. İndol halkası üzerinde 2. pozisyonda metil grubu gibi küçük bir grubun bulunması ve 3. pozisyonda substitüe fenil hidrazon grubunun olması durumunda aktivite görüldüğü belirlenmiştir.

Takiben inhibitör etkisi olduğu gözlenen 13 hit maddenin enzim aktivitesi üzerine etkileri 8 farklı konsantrasyonda doğrudan aktivite ölçüm yöntemi ile

incelenmiş ve en az 3 farklı günde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda maddelerin enzim inhibisyon grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Bu çalışmaların sonucunda maddelerden 9 tanesi ile doza bağımlı inhibisyon grafiği elde edilirken (Şekil 3.15), 4 madde ile anlamlı inhibisyon grafikleri elde edilememiştir (Şekil 3.16). Doza bağımlı inhibisyon grafiği elde edilen maddelerle yapılan ileri çalışmalarda sadece 5 madde ile gözlenen etkinin tekrarlanabilir olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.7). Bunlardan aromataz inhibitör etki bakımından en potent olanın $8,7 \times 10^{-6}$ M IC₅₀ değerine sahip olan 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (4-klorofenil) hidrazon (M6) bileşiğinin olduğu gözlenmiştir.

Bu aşamada istatistiksel olarak tekrarlanabilir inhibisyona neden olan 5 adet 2-metilindol hidrazon türevinin aromataz enzimine bağlanma potansiyeli moleküler modelleme tekniği ile MOE yazılımı kullanılarak Doç. Dr. Atilla Akdemir tarafından araştırılmıştır. Biyolojik aktivite testi bulgularımız ile benzer şekilde M5 ve M6 maddelerinin enzime bağlanarak inhibe edeceği, M6 bileşiğinin indol azot atomu ile Leu477'nin temel karbonil grubu arasında bir hidrojen bağı oluşturacak şekilde bağlanma pozisyonun mevcut olduğunu belirlenmiştir (Şekil 3.17). Bu indol grubunun Phe134, Phe221, Trp224, Val370 ve Leu477 grupları ile ek hidrofobik etkileşimlere neden olduğu, indol yapısının metil substitüentinin Phe221 ve Asp309 gibi rezüdülerle kaplanmış aktif bölgenin girişine yöneldiği belirlenmiştir. Fenil substitüentinin hidrofobik etkileşimleri oluşturmak için hem grubuna hemen hemen paralel olarak hizalandığı, fenil grubunun para pozisyonundaki klor substitüentinin Ile133, Glu302, Ala306 ve hem grubu tarafından oluşturulan küçük cepçiğe yöneldiği de gözlenmiştir. Fenil grubundaki halojen substitüentinin bu bileşiğin aktivitesi için önemli olduğu görülmüş; para kloro substitüentinin daha küçük flor veya daha büyük brom substitüenti ile yer değiştirmesinin enzimin aktivitesinde azalma ile sonuçlandığı belirlenmiştir (Tablo 3.7). Orto pozisyonundaki substitüentlere de sterik uyuşmazlıklar nedeniyle izin verilmediği; meta pozisyonundaki substitüentlere izin verilmekte olduğu, ancak bunun için Leu477'nin karbonil omurgası ile hidrojen bağı yapmasına izin verecek (Şekil 3.18) şekilde ligand oryantasyonunda minör değişikliğe ihtiyaç olduğu belirlenmiştir.

M5 bileşiğinin indol yapısının da M6 bileşiğinin indol grubu ile aynı bölgeye bağlandığı, fenil halkasının meta substitüentinin ya M6 bileşiğinde gözlenen benzer pozisyona yerleşmekte ya da Asp309'a yönelmekte olduğu tesbit edilmiştir. Enzimin aktif bölgesi ile sterik uyuşmazlığa neden olduğu için fenil halkasının orto

pozisyonundaki substitüsyonlara izin verilmediği de belirlenen bir diğer yapı aktivite ilişkisi olmuştur. Benzer şekilde, HD ve CH serisi bileşiklerin enzimin aktif bölgesi ile sterik uyumsuzluğa neden olduğu da moleküler modelleme çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular olmuştur.

Moleküler modelleme ile elde edilen bağlanma verilerinin biyolojik aktivite bulguları ile benzer olmasının, yeni analoglar arasından bazılarının hit olarak seçilip öncü belirlenmesi aşamasına geçilmesine yeterli kanıt oluşturmak bakımından değerli olduğu düşünülmüştür. Moleküler modelleme çalışmaları ile *in vitro* yüksek hızlı tarama testlerinin (HTS) ilaç keşif ve geliştirme çalışmalarının erken evrelerinde birlikte uygulanması kabul gören bir yaklaşımdır. Bu şekilde ilaç adaylarının etkinlik ve/veya toksik etkileri erken evrede yakalanabilmektedir (186). İlerideki çalışmalarımızda, moleküler modelleme ile belirlenen yapı aktivite ilişkilerinden hareketle, terapötik etkinliğe sahip indol türevi bileşiklerin optimize edilmesi ile daha güçlü inhibitör bileşiklerin öngörülerek sentezlenebileceği düşünülmüştür.

Tez çalışmasının bir sonraki basamağında aromataz enzim aktivitesinin dolaylı olarak ölçümü için hücre temelli *in vitro* bir yöntemin laboratuvarımızda yürütülmesi ve üstünlük/sınırlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla östrojene duyarlılıklarının yüksek olduğu bilinen, ER (+) insan meme kanser hücreleri olan MCF-7 BUS hücreleri model olarak kullanılmıştır. Bu hücreler östrojene bağımlı olup proliferere olabilmeleri için ortamda östrojen ya da östrojenik bileşikler olması gerekmektedir. Yöntemin esası, tamamen hormon içermeyen bir ortamda ekilen hücrelerde ortama eklenen testosteronun aromataz enzimi aracılığı ile östradiole dönüşmesi ve bu lokal sentezlenen östradiol varlığında hücrelerin proliferere olmasına dayanmaktadır. Literatürde aromataz enziminin bu hücrelerde eksprese edildiğini bildiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (65, 89, 108, 183). Bu bilgiden hareketle öncelikle yöntemin enzim aktivitesini belirleme kapasitesinin ve ölçüm hassasiyetinin belirlenmesi için kısmi validasyon çalışmaları yapılmıştır. Beklendiği üzere, dolaylı aromataz aktivitesi ölçümü yönteminde MCF-7 BUS hücreleri hormon içermeyen besi ortamında testosteron varlığında 5 gün süre ile inkübe edildiklerinde testosteronun proliferasyonu arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 3.2 ve 3.3). Bu proliferatif etkinin testosteronun artan konsantrasyonları ile artması gözlenen etkinin aromataz enzimi aracılığı ile testosterondan sentezlenen östradiole yanıt olarak geliştiğini düşündürmüştür. Hücrelerin östradiole duyarlılığının göstergesi olarak hücreler

östradiol ile inkübe edilerek proliferasyon değerlendirilmiş ve testosteron ile elde edilenin yaklaşık 1,3 katı proliferasyon gözlenmiştir. E2 ile indüklenen bu proliferasyonun östrojen reseptör baskılayıcı bir ajan olan fulvestran varlığında inhibe edilmesi de proliferasyonun östrojenin ER'e bağlanması ile tetiklendiğinin kanıtı olmuştur (Şekil 3.2). Cos ve arkadaşları daha önce dolaylı aromataz aktivitesini uyguladıkları çalışmalarında (183) gözlenen proliferatif etkinin androjen reseptörü aracılıklı olup olmadığını test etmek amacıyla ortama testosteron varlığında bir androjen reseptör antagonisti (siproteron asetat) eklemişler, testosteron ile indüklenen proliferasyonun maddenin artan konsantrasyonlarında doza bağımlı bir şekilde azalmadığını görerek etkinin androjen reseptöründen bağımsız gerçekleştiği sonucuna varmışlardır. Ortama artan konsantrasyonlarda eklenen ER antagonisti tamoksifenin eklenmesi ile testosteron tarafından indüklenen hücre proliferasyonu geri dönmüştür ve bu bulgu proliferasyonun aromataz aktivitesi ile testosterondan sentezlenen östrojenin bağlandığı östrojen reseptörü aracılığı ile gerçekleştiğinin kanıtı olarak sunulmuştur (183). Bu tez çalışması kapsamında da testosteronun hücre proliferasyonunu stimüle edici etkisi, aromataz inhibitörü ketokonazol varlığında kısmen, daha spesifik aromataz inhibitörü olan aminoglutetimid varlığında (Şekil 3.2. ve 3.3) ise neredeyse tama yakın oranda geri dönmüştür. Bu bulgu, gözlenen hücre proliferasyonunun testosteron varlığında hücrelerdeki aromataz enzimi aracılığı ile oluşan östrojene bağlı olduğu öngörüsünü güçlendirmiştir. Aminoglutetimid ve ketokonazolün hücre proliferasyonu üzerine inhibitör etkilerinin doza bağımlı bir şekilde artması da bu etkinin aromataz enzim inhibisyonu aracılıklı olduğunu doğrulamıştır (Şekil 3.2 ve 3.4).

Yöntemin analiz içi ve analizler arası tekrarlanabilirliğinin de yüksek olduğunun gözlenmesini takiben yöntemin sonunda hücre canlılığını belirleme testinde modifikasyon yapılması düşünülmüştür. Cos ve ark (183) tarafından önerilen dolaylı aromataz aktivitesi analizinde hücre proliferasyonu MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. MTT analizi canlı hücrelerin mitokondrisinde yer alan süksinat dehidrojenaz enzimi aracılığı ile sarı renkli tetrazolyum tuzu olan MTT'nin mor renkli formazan kristallerine dönüşmesi ve bu formazan kristallerinin DMSO içinde çözülerek renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Yöntemde MTT boyasının hücre içine girmesi ve enzimatik olarak dönüşümü için yaklaşık 4 saatlik bir inkübasyon ve ardından da oluşan formazan kristallerinin çözündürülmesi basamağı bulunmakta, bu süreç analiz süresini uzatmakta ve

yöntemin orta hızlı çıktılı tarama üstünlüğünü zayıflatmaktadır. Ortamdaki ATP miktarı hücrelerin metabolik olarak aktif olduğunun bir göstergesi olduğundan hücre canlılığının ATP ölçümü yolu ile belirlenmesine karar verilmiştir. Bu yöntemde ortama konan lusiferin ATP varlığında lusiferaz enzimi aracılığıyla luminesans veren metabolitine dönüşür ve luminesans şiddetinin ölçülmesiyle hücre canlılığı değerlendirilir. Söz konusu dönüşüm ve oluşan luminesansın stabil hale gelmesi için sadece 10 dakika inkübasyon gerektiği için yöntemin daha hızlı sonuç alınabilir hale getirilmesi amaçlanmıştır. Ancak yapılan çalışmalar sonunda luminesans ölçümünde olası kuyucuklar arası girişimler nedeniyle ya da hücre sayısı ve inkübasyon süresi gibi tüm koşulların baştan bu yöneme göre optimize edilmemesi nedeniyle yöntemde tekrarlanabilirlik yönünden başarı elde edilemediği görülmüş ve dolaylı aromataz aktivitesi ölçüm yönteminde hücre canlılığının belirlenmesine MTT yöntemi ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Dolaylı aktivite tayininde maddelerin yüksek konsantrasyonlarında çözünürlük sorunu ile karşılaşılması nedeniyle doğrudan aktivite yöntemine göre çok daha düşük konsantrasyonları ile çalışılması gerekmiştir. Bununla birlikte doğrudan aktivite testinde etkili bulunan 11 maddeden 5 tanesinin 10 μ M konsantrasyonlarında istatistiksel olarak güçlü anlamlılık düzeyinde ($p < 0,005$) enzim aktivitesini inhibe ettikleri gözlenmiştir. Doğrudan aktivite testinde tekrarlanabilir inhibitör etkileri saptanan M3, M5, M6, M16 ve M23 maddelerinin artan 7 farklı konsantrasyonda aromataz üzerine etkileri araştırıldığında M5 ve M6 maddelerinin daha düşük konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunu inhibe etmeye başladıkları, dolayısı ile aromataz inhibitör etkileri yönünden daha potent oldukları sonucuna varılmıştır. Doğrudan aktivite yönteminde IC_{50} değerleri sırasıyla 19,1 μ M ve 8,7 μ M olarak bulunan M5 ve M6 maddeleri dolaylı aromataz ölçüm yönteminde dolaylı olarak hesaplanan IC_{50} değerleri sırasıyla 2,5 μ M ve 42,1 μ M bulunmuştur. Doğrudan aromataz aktivite ölçüm yönteminde enzim ile direkt temas eden madde konsantrasyonu ile hücre-temelli dolaylı aktivite ölçüm yönteminde hücre vasatına eklenen madde konsantrasyonunun birebir karşılaştırılması doğru değildir. Zira hücre temelli aktivite ölçüm testinde hücre içerisine girme/membran geçme ve kısmen de olsa metabolizma basamaklarının var olduğu unutulmamalıdır. Bunun ötesinde dolaylı aromataz aktivitesinde kantitatif değerlendirme amacıyla kullanılan hücre proliferasyonu, bilindiği üzere çok farklı faktörlerin kontrolü altındadır. Öncelikle maddelerin çok farklı mekanizma ile sitotoksik etkileri olabileceği ve bu etkinin

aromataz inhibisyonundan tamamen bağımsız olarak gerçekleşebileceği unutulmamalıdır. Bu tez çalışması kapsamında da bu olasılık araştırılmıştır ve sonuçlar yorumlanırken maddelerin sitotoksik etkileri göz önünde bulundurularak aromataz inhibitör etkileri konusunda yorum yapılmıştır. Bunun ötesinde maddelerin östrojen reseptör antagonisti (SERM) etkiye sahip olmaları durumunda aromataz aktivitesi sonucunda kontrol grubunda olduğu düzeyde östrojen sentezleniyor olsa bile östrojen reseptörüne bağlanıp hücre proliferasyonu gerçekleşemeyeceği için “hatalı pozitif” sonuç elde edilebilecektir. Yöntemde gözlenen hücre proliferasyonundaki değişimin yorumlanmasında dikkat edilmesi gereken bir diğer faktör maddelerin aromataz enzim aktivitesi değil ancak enzim ekspresyonu üzerine olası etkileri (ekspresyonu arttırma ya da baskılama yönünde) olabileceğidir. Gerçekten de yapılan bazı çalışmalarda, örneğin melatoninin, enzim inhibitörü etkisinin yanı sıra enzim ekspresyonunu da azaltabildiği gösterilmiştir (144, 183). Tüm bu nedenlerle bu tez çalışması kapsamında kısmi validasyonu yapılan hücre–temelli dolaylı aromataz aktivite ölçüm yönteminin tek başına maddelerin aromataz enzim aktivitesi üzerine etkilerini araştırma amacıyla kullanılmasının hatalı yorumlara neden olabileceği düşünülmüştür. Yöntem ancak, bu çalışmada da kısmen uygulandığı gibi, bazı testler ile birlikte (sitotoksikite, ER antagonisti etki, enzim ekspresyonu üzerine etki gibi) uygulanarak sonuçlar yorumlandığı durumda yorumlardaki hata payı azalacaktır.

Sınırlılıklarını yukarıda sıraladığımız bu yöntemin doğrudan aktivite testine kıyasla avantajı ise metabolik aktiviteye sahip olması nedeniyle maddelerin olabileceği kadar olası aktif metabolitlerinin de etkisini görme imkanı sağlaması, fizyolojik durumu daha gerçekçi olarak yansıtabilme kapasitesine sahip olmasıdır.

Bu çalışma kapsamında ketokonazolün IC_{50} değeri doğrudan aktivite ölçüm yönteminde 2,5 μM bulunurken dolaylı aromataz aktivitesinde bu değer 0,35 μM olarak yaklaşık 10 kat düşük bulunmuştur. Dolayısı ile etkinliğindeki gözlenen bu farkın ketokonazolün olası metabolitlerinin inhibitör etkinliği olabileceği şeklinde yorumlamak mümkündür. Bununla birlikte literatürde sıçan primer karaciğer hücreleri ile yapılan bir çalışmada ketokonazolün ana metaboliti olan N-deasetile ketokonazolün ketokonazolden daha potent sitotoksik etkiye neden olduğu MTT testi ile gösterilmiştir (187). Dolayısı ile bu çalışmada dolaylı aktivite testi ile belirlenen farklı IC_{50} değerlerinin (ketokonazol ve M5 ile M6 için hesaplanan) doğrudan aktivite testinde elde edilen IC_{50} değerlerinden farklı oluşu maddelerin

metabolizması sonucu oluşan metabolitlerinin aromataz enzimi üzerine etkisinden kaynaklanıyor olabileceği gibi metabolitlerin olası sitotoksik, ER antagonisti ya da aromataz ekspresyonu modülatörü etkilerinden de kaynaklanıyor olabilir. Nitekim Yan ve arkadaşları (188) tarafından ketokonazolün japon balıklarında CYP19 gen ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Bu çalışma kapsamında hücre temelli yöntemde ketokonazol ile gördüğümüz düşük IC₅₀ değerinin nedeni maddenin aromataz enzim inhibisyonu ve enzimin gen ekspresyonunu baskılaması şeklindeki ikili etkisinin sonucu olabilecektir. Tüm bunların aydınlatılarak sonuçların doğru yorumlanabilmesi için dolaylı aromataz aktivitesi ile birlikte destekleyici testlerin de yapılması gerektiği görünmektedir.

Yeni ilaç etkin maddelerinin %30'unun terk edilmesinin nedeni, bu maddelere bağlı ortaya çıkan toksik yan etkilerin erken saptanamamasına bağlanmakta ve bu nedenle ilaç keşfinin erken evrelerinde sitotoksik etkinin belirlenmesinin en kritik basamaklardan biri olduğu ifade edilmektedir (170, 185). Bu tez çalışması kapsamında da olası aromataz enzimi inhibitör etkileri olduğu belirlenen maddelerin sitotoksik etki potansiyelleri insan meme kanseri hücreleri olan MCF-7 BUS ve Çin hamsteri over hücrelerinde MTT testi ile araştırılmıştır. MCF-7 BUS hücrelerinde sitotoksik etki dolaylı aromataz enzim aktivite ölçüm yöntemi ile aynı koşullarda (inkübasyon süresi vs), sadece ortamda hücrelerin normal üremesine olanak verecek hormon içeren FBS varlığında uygulanmış, böylece sonuçların dolaylı aromataz enzim aktivitesi verilerinin yorumlanmasında da kullanılması amaçlanmıştır. Doğrudan aktivite testi ile yapılan tarama çalışmalarında aromataz enzimi üzerine etkisi olduğu belirlenen maddelerle yapılan çalışmada M12, M15, CH14, CH16 ve HD19 maddelerinin doza bağlı sitotoksik etkileri olduğu (Şekil 3.24 ve 3.25) bulunmuştur. İnsan meme kanseri hücrelerinde gözlenen bu sitotoksik etki istenen bir durum olabilecek iken sağlıklı over hücreleri (CHO-K1) üzerinde yapılan MTT testinde de bu maddelerin (CH14 hariç) sitotoksik olduğunun görülmesi (Şekil 3.28) maddelerin erken evrede saptanan ilk toksik etkileri olup bu maddeler ile ileri araştırmalara devam edilmemesi yönünde görüş oluşturmıştır. Bununla birlikte M3, M5, M16 ve M23 maddelerinin MCF-7 BUS hücrelerinde sitotoksik etki göstermedikleri, M6 maddesinin ise 32 µM konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sitotoksik etkiye neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.26). Bu maddelerin CHO-K1 hücrelerinde sitotoksik etkileri araştırıldığında M3, M6, M16 ve M23'ün sitotoksik etkileri gözlenmezken M5 maddesinin 10 µM konsantrasyonda

hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.29). Sitotoksikite verilerini aromataz aktivitesi üzerine etkileri ile birlikte değerlendirdiğimizde 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (4-klorofenil) hidrazon (M6) maddesinin en düşük IC₅₀ değeri ile (8,7 µM Şekil 3.15) bir aromataz inhibitörü aday bileşiği olabileceği, ER (+) meme kanseri hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarında sitotoksik, sağlıklı over hücrelerinde ise hiç sitotoksik etkisi olmayışı nedeni ile de ilk basamakta güvenli oluşu ile diğer hit maddeler arasından öncü madde olarak tanımlanıp ileri çalışmalara geçilebileceği sonucuna varılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında aromataz inhibe edici etkilerini araştırdığımız sırasıyla 2-metilindol yapısındaki M maddeleri, 4-florofenilindol yapısındaki CH maddeleri ve 1-metilindol hidrazid/hidrazon yapısındaki HD maddeleri daha önce grubumuz tarafından antioksidan etkinlikleri yönünden taranmış maddelerdir (189-191, M maddelerine ait veriler henüz yayımlanmamıştır). Bunlar arasından bazı türevlerin hidrojen peroksit tarafından indüklenen oksidasyonu indirgeme ve membran stabilize edici etki mekanizmaları ile güçlü antioksidan etkiye sahip oldukları gözlenmiştir. Söz konusu antioksidan potansiyelleri nedeniyle bu bileşiklerin oksidatif stres ile ilişkili olduğu düşünülen kanser dâhil diyabet, ateroskleroz gibi birçok hastalıkta destekleyici tedavi ajanı olarak önerilebileceği de ifade edilmiştir. Diğer taraftan yeni bir ilaç etkin maddesi geliştirilirken etkinliği kadar ve hatta ondan daha çok güvenliliğinin, yani insan sağlığı üstünde toksik etki potansiyelinin de araştırılması kaçınılmazdır. Yukarıda bu kapsamda gerçekleştirdiğimiz ilk basamak toksisite göstergesi olan sitotoksik etki araştırmasının önemi ve sonuçlarımızı tartışmıştık. Bununla birlikte ilaç güvenliliği değerlendirilirken ileri basamaklarda özel toksik etkiler de araştırılmaktadır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından Endüstri Çalışanlarına yönelik hazırlanmış “Endokrin-İlişkili İlaç Toksisitesinin Klinik dışı Değerlendirilmesi Kılavuzu” kapsamında (192) ilaç etkin madde adaylarının endokrin ilişkili advers etkilerinin belirlenmesinde izlenebilecek bir test yaklaşım önerisinde bulunmuşlardır. Burada prelinik, çoğunlukla *in vitro* testlerden oluşan test paketi yaklaşımı ile söz konusu etkilerin araştırılması tavsiye edilmiştir. Bu çerçevede bakıldığında, bu tez çalışması kapsamında araştırılan indol bileşiklerinin bazılarının güçlü antioksidan etkileri nedeniyle aralarında kanserin de yer alacağı oksidatif stresle ilişkili bazı hastalıklardan korunma ve tedavide antioksidan ajan olarak kullanılabilecekleri önerilirken bu çalışma kapsamında gözlenen aromataz inhibe edici etkilerinin advers

etkisi şeklinde ortaya çıkabileceği görülmektedir. Bu nedenle, bu bileşiklere özellikle erkek bebeklerin spesifik perinatal periyotta annelerinin antioksidan etki amaçlı kullanımı sonucu maruz kalmaları morfolojik, fizyolojik ya da davranışsal demaskülinizasyona neden olabilecektir, advers endokrin bozucu etki dikkate alınmalıdır.

Melatoninin antikanserojenik etkilerini membranda yer alan iki tip melatonin reseptörüne (MT₁ ve MT₂) bağlanarak da gösterebildiği bildirilmektedir (193). Farklı insan meme tümörlerinde ve meme kanseri hücre hatlarında MT₁ reseptörünün ER α ve PR ile ters korelasyon gösterdiği, MT₁ ekspresyonunun arttığı durumlarda melatoninin ER α (+) hücrelerdeki antiproliferatif etkinliğinin arttığı gösterilmiştir (105). Bu etki mekanizması göz önüne alınarak uyku düzensizlikleri, sirkadyen bozukluklar, uykusuzluk ve buna bağlı anksiyete ile major depresyon tedavisinde bazı melatoninerjik bileşiklerin (melatonin reseptör agonistleri) etkili olabileceği düşünülmüş ve bu hedefe yönelik Ramelteon ve Agomelatin gibi moleküller sentezlenip ruhsat almıştır (184). Dolayısı ile ileriki çalışmalarımızda bu tez çalışması kapsamında test edilen indol temelli melatonin analogları ve/veya moleküler modelleme çalışmalarında belirlenecek ideal melatonin reseptör agonisti yapıların sentezlenmesini takiben meme kanseri hücreleri üzerindeki etkileri de araştırılabilecektir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında taranan yeni sentezlenmiş indol bileşiklerinden 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (3-klorofenil) hidrazon (M5) ve 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (4-klorofenil) hidrazon (M6) maddelerinin aromataz enzim inhibitörü etkileri olduğu *in vitro* olarak ve moleküler modelleme çalışmaları ile gösterilmiştir. Bu etkileri ile söz konusu bileşiklerin, özellikle postmenopozal dönemdeki kadınlarda ER (+) insan meme kanseri hücrelerinin gelişim ve çoğalmasını önlemek suretiyle yeni etkin madde adayı olabilecekleri düşünülmüştür. ER (+) meme kanserinin tedavisinde aromataz inhibitörlerinin SERM'e üstünlüğü var olan östrojenlerin reseptöre bağlanmasını engelleyerek proliferasyonu önlemek değil, baştan östrojen sentezini inhibe ederek hem östrojen bağımlı proliferasyonu hem de östrojenlerin reaktif metabolitleri aracılığı ile genotoksik etki oluşturmalarını önleyebiliyor olmalarıdır (78). Aromataz etkinliğini gözlemiş olduğumuz iki ajanın önceki çalışmalarımızda gördüğümüz antioksidan etki potansiyellerinin de olması (yayımlanmamış veri) oksidatif stresin de rol aldığı düşünülen hormon bağımlı meme kanseri tedavisinde çifte etki ile potent koruyucu/tedavi edici ajan olabileceklerini düşündürmektedir.

İleri çalışmalarımızda öncü olabilecekleri belirlenen indol türevlerinin aromataz inhibitör etkilerinin daha ayrıntılı, farklı modeller kullanılarak değerlendirilmesi, doğrudan aktivite üzerine etkilerinin yanı sıra enzim ekspresyonu üzerine olası etkilerinin de araştırılması, meme kanseri hücreleri ile sağlıklı meme hücreleri üzerindeki toksik etkilerinin araştırılması, moleküler modelleme çalışmaları ile aromataz enzim etkinliği açısından test ettiğimiz model bileşiklerin optimize edilmesi planlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- 1-EPA Web site [homepage on the Internet]. US Environmental Protection Agency. (cited 2016 June 08). Available from: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-system>
- 2-Rushton L. The human body how it Works: The Endocrine System. New York: Chelsea House Publishing; 2009: p. 32-68.
- 3-Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Hacettepe Taş Yayınları; 2010:10.baskı.
- 4-Norris DO, Carr JA, editors. Endocrine Disruption: Biological Basis for Health Effects in Wildlife and Humans. New York: Oxford University Press; 2006:p. 161-162
- 5-Hall J.E., Guyton A.C. Tıbbi Fizyoloji. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri; 2007;11. basım sf:906
- 6-Waring RH, Harris RM. Endocrine disruptors: a human risk? Mol Cell Endocrinol 2005;244:2-9.
- 7-Safe S. Clinical Correlates of environmental endocrine disruptors. Trends Endocrin Metabol 2005;16:139-144.
- 8-Wikipedia Web site [homepage on the Internet]. The Wikimedia Foundation. (cited 2016 March 05). Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Endocrine_disruptor
- 9-Metzler M, editor. Endocrine Disruptors Part II Handbook of Environmental Chemistry. Springer; 2002
- 10-EPA Web site [homepage on the Internet]. US Environmental Protection Agency (cited 2016 March 05). Available from: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-disruption>

11-Bourguignon JP, Jegou B, Kerdelhue B, Toppari J, Christen Y. Multi-System Endocrine Disruption. Heidelberg: Springer; 2011

12-Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editors, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics Eleventh Edition. Mcgraw-Hill Medical Publishing Division; 2006;p.1382-1558.

13-Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ Jr et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. Environ Health Perspect 1996;104 (Suppl 4):741–803.

14-Dumesic DA, Abbott DH, Padmanabhan V. Polycystic ovary syndrome and its developmental origins. Rev Endocr Metab Disord 2007;8:127–141

15-Steinberg RM, Juenger TE, Gore AC. The effects of prenatal PCBs on adult female paced mating reproductive behaviors in rats. Horm Behav 2007;51:364–372

16-Steinberg RM, Walker DM, Juenger TE, Woller MJ, Gore AC. Effects of perinatal polychlorinated biphenyls on adult female rat reproduction: development, reproductive physiology, and second generational effects. Biol Reprod 2008;78:1091–1101

17-Watson CS, Campbell, CH, Gametchu B. Membrane estrogen receptors on rat pituitary tumour cells: Immuno- identification and responses to oestradiol and xenoestrogens. Exp Physiol 1999;84:1013–1022

18-Nadal A, Ropero AB, Laribi O, Maillet M, Fuentes E, Soria B. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:11603–11608.

19-Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S et al. Comparison Of The Ligand Binding Specificity and Transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . Endocrinology 1997;138:863–870.

20-Dick GM, Rossow CF, Smirnov S, Horowitz B, Sanders KM. Tamoxifen activates smooth muscle BK channels through the regulatory beta 1 subunit. *J Biol Chem* 2001;276:34594–34599.

21-Dechaud H, Ravard C, Claustrat F, De la Perriere AB, Pugeat M. Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids* 1999;64:328–334

22-Nagel SC, Vom Saal FS, Welshons WV. Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an in vitro assay incorporating modification of cell uptake by serum. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69:343–357.

23-EPA final detailed review paper on Aromatase Epa contract number 68-w-01-023 Work assignments 2-7 and 5-5, task 2 March 2005 Columbus, OH

24-Whitehead SA, Rice S. Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006;20(1):45-61.

25-Charles GD. In Vitro models in Endocrine Disrupter Screening. *ILAR Journal* 2004;Volume 45,Number 4:494-501

26-Zacharewski T. Identification and Assessment of Endocrine Disruptors: Limitations of in Vivo and in Vitro Assays *Alternative Testing Methodologies. Environmental Health Perspectives* April 1998;106(Suppl 2):577–582

27-EPA Web site [homepage on the Internet]. US Environmental Protection Agency (cited 2016 June 09). Available from: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-program-tier-1-battery-assays#assay-selection>

28-OECD Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (April 2012).

29-OECD Web site [homepage on the Internet]. The Organisation for Economic Co-operation and Development (cited 2016 June 06). Available from: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD%20Conceptual%20Framework%20for%20Testing%20and%20Assessment%20of%20Endocrine%20Disrupters%20for%20the%20public%20website.pdf>

30-Zacharewski T. In vitro bioassays for assessing estrogenic substances. *Environ Sci Technol* 1997;31:613-623

31-Soto AM, Maffini MV, Schaeberle CM, Sonnenschein C. Strengths and weaknesses of in vitro assays for estrogenic and androgenic activity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20(1):15-33

32-Bolger R, Wiese TE, Ervin K, Nestich S, Checovich W. Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environmental Health Perspectives* 1998;106:551-557.

33-Mueller SO, Kling M, Arifin Firzani P, Mecky A, Duranti E, Shields- Botella J et al. Activation of estrogen receptor α and ER β by 4- methylbenzylidene-camphor in human and rat cells: comparison with phyto- and xenoestrogens. *Toxicology Letters* 2003;142.

34-Ohno K, Suzuki S, Fukushima T, Maeda M, Santa T, Imai K. Study on interactions of endocrine disruptors with estrogen receptor using fluorescence polarization. *Analyst* 2003;128:1091-1096.

35-Saito K, Tomigahara Y, Ohe N, Isobe N, Nakatsuka I, Kaneko H. Lack of significant estrogenic or antiestrogenic activity of pyrethroid insecticides in three in vitro assays based on classic estrogen receptor α -mediated mechanisms. *Toxicol Sci* 2000;57:54-60.

36-Shirinzadeh H, Eren B, Gurer-Orhan H, Suzen S and Özden S. Novel Indole-Based Analogs of Melatonin: Synthesis and in vitro Antioxidant Activity Studies. *Molecules* 2010;15:2187-2202.

37-Reel JR, Lamb IV JC and Neal BH. Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam Appl Toxicol* 1996;34:288 - 305

38-Weihua Z, Andersson S, Cheng G, Simpson ER, Warner M, Gustafsson JA. Update on estrogen signaling. *FEBS Lett* 2003;546:17-24.

39-Saarinen NM, Bingham C, Lorenzetti S, Mortensen A, Makela S, Penttinen P et al. Tools to evaluate estrogenic potency of dietary phytoestrogens: A consensus paper from the EU thematic network "Phytohealth" (Qlki-2002-2453). *Genes & Nutrition* 2006;Vol.1 No.3/4: pp. 143-158.

40-Demirpence E, Pons M, Balaguer P, Gagne D. Study of an antiestrogenic effect of retinoic acid in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Feb 28;183(1):100-6.

41-Legler J, Van den Brink CE, Brouwer A, Murk AJ, Van Der Saag PT, Vethaak AD et al. Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol Sci* 1999;48:55-66.

42-OECD Environment, health and safety publications series on testing and assessment No. 97 Detailed review paper on the use of metabolising systems for in vitro testing of endocrine disruptors. Paris 2008.

43-Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano F. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives* 1995;103:113-122

44-Powlin SS, Cook JC, Novak S, O'Connor JC. Ex vivo and in vitro testis and ovary explants: utility for identifying steroid biosynthesis inhibitors and comparison to a Tier I screening battery. *Toxicol Sci* 1998 Nov;46(1):61-74.

45-In Influence of Cell Passage and Freeze/Thaw Events on Basal Production of 17b-Estradiol and Testosterone by H295R Cells. (Document on the internet). Hecker M, Giesy JP, Jones PD, Higley EB, Newsted JL and Mehrle P. Interim Draft Report, Contract Code # GS-10F-0041L. ENTRIX, Inc. September, 2006 (Cited August 13, 2010). Available from: www.epa.gov/endo/pubs/appendix_i-h295r_culture_protocol.pdf.

46-Bulbring E, and Burn JH. The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J Physiol 1935;85:320 – 333

47-EPA. Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1600: Uterotrophic Bioassay EPA 740-C-09-0010 October 2009

48-EPA. Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1400: Hershberger Bioassay EPA 740-C-09-008 October 2009

49-Dorfman RI. Standard methods adopted by official organization. Academic Press NY. 1962

50-Hilgar AG, Vollmer EP. Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service 1964

51-Dorfman RI. Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York Academic Press, 1969;151-220

52-Charlotte van Daele Effects of Isoflavones on Estrogen Receptor Mediated Estrogenicity and Aromatase Activity. Utrecht University (IRAS) -2012

53-Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Corbin CJ, Mendelson CR. Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 expression. J Steroid Biochem Mol Biol 1993;44:321–330

54-Whitehead SA, Rice S. Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2006;20:45-61

55-Bulun SE, Chen D, Lu M, Zhao H, Cheng Y, Demura M. et al. Aromatase excess in cancers of breast, endometrium and ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;106(1-5):81–96.

56-Brueggemeier RW, Hackett JC and Diaz-Cruz ES. Aromatase Inhibitors in the Treatment of Breast Cancer. *Endocrine Reviews* 2005;26(3):331–345

57-Simpson ER, Clyne C, Rubin G, et al. Aromatase—A brief overview. *Annu Rev. Physiol* 2002;64:93–127.

58-Thompson Jr EA, Siiteri PK. The involvement of human placental microsomal cytochrome P450 in aromatization. *J Biol Chem* 1974;249:5373-5378

59-Simpson ER, Davis SR. Minireview: Aromatase and the Regulation of Estrogen Biosynthesis—Some New perspectives *endocrinology*. August 2001;142(11):4589–4594

60-Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 1994;15:342–355.

61-Kellis JT, Vickery LE. Purification and characterization of human placental aromatase cytochrome P-450. *J Biol Chem* 1987;262:4413–4420

62-Bulun SE, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Yilmaz B, Sebastian S. Organization of the human aromatase p450 (CYP19) gene. *Semin Reprod Med* 2004;22:5–9

63-Rosenmai AK, Nielsen FK, Pedersen M, Hadrup N, Trier X, Christensen JH. et al. Fluorochemicals used in food packaging inhibit male sex hormone synthesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2013;266 :132–142

64-Castro B, Sanchez BCP, Torres JM, Preda O, del Moral RG. Bisphenol A Exposure during Adulthood Alters Expression of Aromatase and 5 α -Reductase Isozymes in Rat Prostate. PLoS ONE 2013;8(2):e55905

65-Chan MY, Huang H, Leung LK. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-para-dioxin increases aromatase (CYP19) mRNA stability in MCF-7 cells. Molecular and Cellular Endocrinology 2010;317: 8–13.

66-Cheshenko K, Pakdel F, Segner H, Kah O, Eggen RI. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. Gen Comp Endocrinol Jan 1 2008;155(1):31-62

67-Basly JP, Lavier MCC. Dietary Phytoestrogens: Potential Selective Estrogen Enzyme Modulators. Planta Med 2005;71:287-294

68-Smith CL and O'Malley BW. Coregulator Function: A Key to Understanding Tissue Specificity of Selective Receptor Modulators. Endocrine Reviews 2004;25(1):45–71.

69-Sanchez CA, Alsina C J, Dueñas-Díez JL, editors. Selective Estrogen Receptor Modulators A New Brand of Multitarget Drugs. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 2006

70-Riggs BL and Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators mechanisms of action and application to clinical practice. N Engl J Med 2003;348:618–629

71-Díez-Pérez A. Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMS) Arq Bras Endocrinol Metab Agosto 2006;vol 50 no 4

72-Robertson J. Estrogen receptor Downregulators: New Antihormonal Therapy for Advanced Breast Cancer. Clinical Therapeutics 2002;Vol 24 Suppl, A

73-Fisher B, Costantino JP, Wickerham D L, Redmond C K, Kavanah M, Cronin WM et al. Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. J Natl Cancer Inst September 16, 1998;Vol. 90, No. 18.

74-Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Lancet 1998;351:1451–67

75-Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Decker DA and Hortobagyi GN. Use of tamoxifen for breast cancer: twenty-eight years later. J Clin Oncol 1995;13:513–529

76-Day R, Ganz PA, Costantino JP et al. Health-related quality of life and tamoxifen in breast cancer prevention: a report from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. J. Clin Oncol 1999;17:2659–2669.

77-Lahti E, Blanco G, Kauppila A et al. Endometrial changes in postmenopausal breast cancer patients receiving tamoxifen. Obstet Gynecol 1993;81:660–664.

78-Furr BJA, editor. Aromatase Inhibitors. 2.revised edition Germany: Birkhäuser; 2008

79-O'Regan R, Jordan VC. Tamoxifen to Raloxifene and beyond. Seminars in oncology June 2001;Vol 28, No 3 pp: 260-273.

80-Cummings SR, Eckert S, Krueger KA et al. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation JAMA 1999;281:2189–2197

81-Wakeling A. The Future of New Pure Antiestrogens in Clinical Breast Cancer. Breast Cancer Research and Treatment 1993;25:1-9

82-Strasser-Weippl K and Goss PE. Counteracting Estrogen as Breast Cancer Prevention. In Kelloff GJ, Hawk ET and Sigman CC, editors. Volume 2: Strategies for Cancer Chemoprevention. Totowa, NJ: Humana Press, 2005;pp. 249–264.

83-Howell SJ, Johnston SRD, Howell A. The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 2004;18:No. 1, pp. 47–66

84-Howell A, Robertson JF, Abram P et al. Comparison of fulvestrant versus tamoxifen for the treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women previously untreated with endocrine therapy: a multinational, double-blind, randomized trial. *J Clin Oncol* 2004;22:1605–1613.

85-Vergote I and Robertson JF. Fulvestrant is an effective and well-tolerated endocrine therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: results from clinical trials. *Br J Cancer* 2004;90:S11–S14.

86-Pasqualini JR. The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004;1654:123– 143

87-Gonzalez A, Cos S, Martinez-Campa C, Alonso Gonzalez C, Sanchez-Mateos S, Mediavilla M. D et al. Selective estrogen enzyme modulator (SEEM) actions of melatonin in human breast cancer cells. *J Pineal Res* 2008;45:86–92

88-Chen D, Reierstad S, Lu M, Lin Z, Ishikawa H, Bulun SE. Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters. *Cancer Letters* 2009;273:15–27.

89-Miller WR, Santen R J, editors. *Aromatase Inhibition and Breast Cancer*. United Kingdom: Marcel Dekker; 2001:p.3-12

90-Brodie AMH, Garrett WM, Hendrickson JR, Tsai-Morris CH. Effects of 4-hydroxyandrostenedione and other compounds in the DMBA breast carcinoma model. *Cancer Res* 1982;42:3360s–3364s.

91-Smith IE and Dowsett M. *Aromatase Inhibitors in Breast Cancer*. *Engl J Med* 2003;348:2431-42

92-Johnston JO, Metcalf BW. Aromatase: a target enzyme in breast cancer. In: Sunkara P (ed.): Novel approaches to cancer chemotherapy. Academic Press, London 1984;307–328

93-Plourde PV, Dyroff M, Dukes M. Arimidex; a potent and selective fourth generation aromatase inhibitor. Breast Cancer Res Treat 1994;30:103.111.

94-Evans TRJ, Di Salle E, Ornati G, Lassus M, Benedetti MS, Pianezzola E et al. Phase I endocrine study of exemestane (FCE 24304), a new aromatase inhibitor, in postmenopausal women. Cancer Res 1992;52:5933.5939

95-Griffiths CT, Hall TC, Saba Z, Barlow JJ, Nevinny HB. Preliminary trial of aminoglutethimide in breast cancer. Cancer Res 1973;32:31.37

96-Santen RJ, Santner S, Davis B, Veldhuis J, Samojlik E, Ruby E. Aminoglutethimide inhibits extraglandular estrogen production in postmenopausal women with breast carcinoma. J Clin Endocr Metab 1978;46:1066.1074.

97-Koberle D, and Thurlimann B. Anastrozole: pharmacological and clinical profile in postmenopausal women with breast cancer. Expert Rev Anticancer Ther 2001;1:169–176

98-Wellington K, Faulds DM Anastrozole In Early Breast Cancer. Drugs 2002; 62(17): 2483-2490

99-Baum M, Budzar AU, Cuzick J et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. Lancet 2002;359:2131–2139

100-Simpson D, Curan MP and Perry CM. Letrozole A Review of its Use in Postmenopausal Women with Breast Cancer. Drugs 2004;64 (11):1213-1230

101-Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med* 2003;349:1793–1802

102-Johannessen DC, Engan T, Di Salle E et al. Endocrine and clinical effects of exemestane (PNU 155971), a novel steroidal aromatase inhibitor, in postmenopausal breast cancer patients: A phase I study. *Clin Cancer Res* 1997;3:1101-1108.

103-Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, et al. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med* 2004 March 11 350;11:1081–1092.

104-Fitzpatrick SL, Carlone DL, Robker RL and Richards JS. Expression of aromatase in the ovary: Down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge. *Steroids* 1997;62:197-206

105-Sanchez-Barcelo EJ, Mediavilla MD, Alonso-Gonzalez C, Rueda N. Breast Cancer Therapy Based on Melatonin. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 2012;6,108-116.

106-Inkster SE, Brodie AMH. Immunocytochemical studies of aromatase in early and full term human placental tissues: comparison with biochemical assays. *Biol Reprod* 1989;41:889–898.

107-Aromatase Assay (Human Recombinant) OCSPP Guideline 890.1200 Standard Evaluation Procedure (SEP) ENDOCRINE DISRUPTOR SCREENING PROGRAM U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC 20460 July 2011

108-Catalano S, Barone I, Andò S. Rapid Estrogen Effects on Aromatase Phosphorylation in Breast Cancer Cells. In Castoria G and Auricchio F, editors. *Steroid Receptors: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media New York, 2014;vol. 1204

109-Caron-Beaudoin E, Denison M S, and Sanderson J T. Effects of Neonicotinoids on Promoter-Specific Expression and Activity of Aromatase (CYP19) in Human Adrenocortical Carcinoma (H295R) and Primary Umbilical Vein Endothelial (HUVEC) Cells Toxicological Sciences 2016;149(1):134–144

110-Bonfield K, Amato E, Bankemper T, Agard H, Steller J, Keeler JM, et al. Development of a new class of aromatase inhibitors: Design, synthesis and inhibitory activity of 3-phenylchroman-4-one (isoflavanone) derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2012;20:2603–2613

111-Miller WR, O'Neill J The importance of local synthesis of estrogen within the breast. Steroids 1987 Oct-Dec;50(4-6):537-48.

112-Brodie AMH, Wu JT, Marsh DA, Brodie HJ. Aromatase inhibitors III. Studies on the antifertility effects of 4-acetoxy-4-androstene-3,17-dione. Biol Reprod 1978;18:365–370

113-Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the CYP19 gene. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:6965–6970

114-Couse JF and Korach KS. Estrogen Receptor Null Mice: What Have We Learned and Where Will They Lead Us? Endocrine Reviews 1999;20(3):358–417

115-Brodie AM, Brodie HJ, Garrett WM, Hendrickson JR, Marsh DA, Tsai-Morris CH. Effect of an aromatase inhibitor, 1,4,6-androstatriene-3,17-dione, on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors in the rat and its mechanism of action in vivo. Biochem Pharmacol 1982 Jun 1;31(11):2017-23.

116-Yue W, Zhou DJ, Chen S, Brodie AMH. A new nude mouse model for post-menopausal breast cancer using MCF-7 cells transfected with the human aromatase gene. Cancer Res 1994;54:5092–5095

117-Schwab M, editor. Encyclopedia of Cancer (2nd edition) Germany: Springer; 2008;p.1815- 1818

118-Reiter RJ, Tan D, Mayo JC, Sainz RM, Leon J and Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica* 2003;Vol. 50 No. 4:1129–1146

119-Sanchez-Barcelo EJ, Cos S, Fernandez R and Mediavilla MD. International congress on hormonal steroids and hormones and cancer melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocrine-Related Cancer* 2003;10:153–159

120-Watson RR, editor. Melatonin in the Promotion of Health Second Edition. United States of America: CRC PressTaylor & Francis Group; 2012

121-Graham C, Cook Mr, Gerkovich MM, Sastre A. Examination of the melatonin hypothesis in women exposed at night to EMF or bright light. *Environ Health Perspect* 2001;109: 5

122-Hill SM, Blask DE. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res* 1988;48:6121–6126

123-Karasek M, Reiter RJ. Melatonin and aging. *Neuro Endocrinol Lett* 2002;23(1):14–1601–507

124-Bartsch C, Bartsch H, Karasek M. Melatonin in clinical oncology. *Neuro Endocrinol Lett* 2002;23 Suppl 1: 30-38.

125-Cos S, Gonzalez A, Martinez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-Gonzalez C, Sanchez-Barcelo EJ. Melatonin as a Selective Estrogen Enzyme Modulator. *Current Cancer Drug Targets* 2008;8,691-702

126-Cohen M, Lippman M, Chabner B. Role of pineal gland in aetiology and treatment of breast cancer. *Lancet* 1978;2:814–816

127-Grant SG, Melan MA, Latimer JJ, Witt-Enderby PA. Melatonin and breast cancer: Cellular mechanisms, clinical studies and future perspectives. *Expert Rev Mol Med* 2009;11:e5.

128-Stevens RG. Electric power use and breast cancer: A hypothesis. *Am J Epidemiology* 1987;125.4:556–561.

129-Davis S, Mirick DK, Stevens RG. Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1557–1562.

130-Davis S, Mirick DK. Circadian disruption, shift work and the risk of cancer: A summary of the evidence and studies in Seattle. *Cancer Causes Control* 2006;17:539–545

131-Coleman MP, Reiter RJ. Breast cancer, blindness and melatonin. *Eur J Cancer* 1992;28:501–503

132-IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Painting, Firefighting, and Shiftwork. Lyon, 2010;Volume 98

133-Kiefer T, Ram PT, Yuan L, Hill SM. Melatonin inhibits estrogen receptor transactivation and cAMP levels in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2002;71:37-45.

134-Kubatka P, Bojkova B, Kalicka K et al. Preventive effects of raloxifene and melatonin in N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis in female rats. *Neoplasma* 2001;48(4):313–319.

135-Lawson NO, Wee BE, Blask DE, Castles CG, Spriggs LL, Hill SM. Melatonin decreases estrogen receptor expression in the medial preoptic area of inbred (LSH/SsLak) golden hamsters. *Biol Reprod* 1992;47:1082–1090

136-Sanchez-Barcelo EJ, Cos S, Fernandez R, Mediavilla MD. Melatonin and mammary cancer: A short review. *Endocr Relat Cancer* 2003;10:153–159

137-Cos S, Martínez-Campa C, González AV, Alvarez-García V, Alonso-González C, Mediavilla M D, et al. Melatonin and Aromatase in Breast Cancer. *Clinical Cancer Drugs* 2014;1:54-64

138-Hill SM, Spriggs LL, Simon MA, Muraoka H, Blask DE. The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. *Cancer Lett* 1992;64:249–256.

139-Sanchez-Barcelo EJ, Cos S, Mediavilla D, Martinez-Campa C, Gonzalez A. and Alonso-Gonzalez C. Melatonin–estrogen interactions in breast cancer. *J Pineal Res* 2005;38:217–222

140-Martin-Renedo J, Mauriz JL, Jorquera F, Ruiz-Andres O, Gonzalez P, Gonzalez-Gallego J. Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line. *J Pineal Res* 2008;45:532–540

141-Garcia-Santos G, Antolin I, Herrera F, Martin V, Rodriguez-Blanco J, Del Pilar Carrera M et al. Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells. *J Pineal Res* 2006;41:130–135.

142-Hill SM, Blask DE. Physiological concentrations of melatonin inhibit the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Endocr Soc* 1985;1010:253

143-Cos S, Mediavilla MD, Fernandez R, Gonzalez-Lamuno D, Sanchez-Barcelo EJ. Does melatonin induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro? *J Pineal Res* 2002;32:90-96.

144-Alvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C, Cos S. Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvasc Res* 2013;87:25-33

145-Del Rio B, Pedrero JMG, Martinez-Campa C, Zuazua P, Lazo PS. and Ramos S. Melatonin, an Endogenous-specific Inhibitor of Estrogen Receptor α via Calmodulin. J Biological Chem September 10 2004;Vol. 279, No. 37 pp. 38294–38302

146-Scott AE, Cosma GN, Frank AA, Wells RL and Gardner HS Jr. Disruption of Mitochondrial Respiration by Melatonin in MCF-7 Cells. Toxicology and Applied Pharmacology 2001;171:149–156

147-Rama PT, Daia J, Yuana L, Donga C, Kieferb TL, Laia L, et al. Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer. Cancer Letters 2002;179:141–150

148-Gonzalez A, Martinez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-Gonzalez C, Sanchez-Mateos S, Hill SM et al. Effects of MT1 melatonin receptor overexpression on the aromatase-suppressive effect of melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. Oncology Reports 2007;17:947-953

149-Mao L, Yuan L, Slakey LM, Jones FE, Burow ME, Hill SM. Inhibition of breast cancer cell invasion by melatonin is mediated through regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. Breast Cancer Res 2010;12:R107

150-Cucina A, Proietti S, D'Anselmi F, Coluccia P, Dinicola S, Frati L et al. Evidence for a biphasic apoptotic pathway induced by melatonin in MCF-7 breast cancer cells. J Pineal Res 2009;46:172–180

151-Papazisis KT, Kouretas D, Geromichalos GD, Sivridis E, Tsekrelis OK, Dimitriadis KA et al. Effects of melatonin on proliferation of cancer cell lines. J Pineal Res 1998;25:211-218.

152-Chottanapund S, Van Duursen MBM, Navasumrit P, Hunsonti P, Timtavorn S, Ruchirawat M et al. Anti-aromatase effect of resveratrol and melatonin on hormonal positive breast cancer cells co-cultured with breast adipose fibroblasts. Toxicology in Vitro 2014;28:1215–1221

153-Cui P, Luo Z, Zhang H, Su Y, Li A, Li H et al. Effect and mechanism of melatonin's action on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells. J Pineal Res 2006;41:358–362

154-Cui P, Yu M, Luo Z, Dai M, Han J, Xiu R et al. Intracellular signaling pathways involved in cell growth inhibition of human umbilical vein endothelial cells by melatonin. J Pineal Res 2008;44:107–114

155-Knowler KC, To SQ, Takagi K, Miki Y, Sasano H, Simpson ER et al. Melatonin suppresses aromatase expression and activity in breast cancer associated fibroblasts. Breast Cancer Res Treat 2012;132:765–771

156-Gonzalez A, Martinez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-Gonzalez C, Sanchez-Barcelo EJ and Cos S. Inhibitory effects of pharmacological doses of melatonin on aromatase activity and expression in rat glioma cells. British J Cancer 2007;97:755 – 760

157-Izykowska I, Gebarowska E, Cegielski M, Podhorska-Okolow M, Piotrowska A, Zabel M et al. Effect of Melatonin on Melanoma Cells Subjected to UVA and UVB Radiation in *In Vitro* Studies. In vivo 2009;23:733-738

158-Tamarkin L, Cohen M, Roselle D, Reichert C, Lippman M, Chabner B. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7–12 dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat. Cancer Res 1981;41:4432–4436.

159-Cos S & Sanchez-Barcelo EJ. Melatonin and mammary pathological growth. Frontiers in Neuroendocrinology 2000a;21:133– 170.

160-Cos S & Sanchez-Barcelo EJ. Melatonin—experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. Histology and Histopathology 2000b;15:637–647.

161-Cos S, Gonzalez A, Güezmes A, Mediavilla M D, Martinez-Campa C, Alonso-Gonzalez C et al. Melatonin inhibits the growth of DMBA-induced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activity. *Int J Cancer* 2006;118:274–278

162-Lissoni P, Barni S, Crispino S, Tancini G, Frascini F. Endocrine and immune effects of melatonin therapy in metastatic cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989;25:789–795.

163-Lissoni P, Barni S, Tancini G et al. Clinical study of melatonin in untreatable advanced cancer patients. *Tumori* 1987;73:475–480.

164-Lissoni P, Barni S, Ardizzoia A et al. Randomized study with the pineal hormone melatonin versus supportive care alone in advanced nonsmall cell lung cancer resistant to a first-line chemotherapy containing cisplatin. *Oncology* 1992;49:336–339.

165-Mills E, Wu P, Seely D, Guyatt G. Melatonin in the treatment of cancer: A systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. *J Pineal Res* 2005;39:360–366.

166-Seabra MLV, Bignotto M, Pinto LR Jr, Tufik S. Randomized, doubleblind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment. *J Pineal Res* 2000;29:193–200

167-Wouters W, De Coster R, Goeminne N, Beerens D, Van Dun J. Aromatase inhibition by the antifungal ketoconazole *J Steroid Biochem* 1988;30 (1-6):387-9.

168- Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of Early Drug Discovery, *British Journal of Pharmacology* 2011; 162: 1239–1249.

169-Sasseville VG, Lane JH, Kadambi VJ, Bouchard P, Lee FW, Balani SK et al. Testing paradigm for prediction of development-limiting barriers and human drug toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 2004;150: 9–25.

170-Hughes JD, Blagg J, Price DA, Bailey S, Decrescenzo GA, Devraj RV et al. Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2008;18:4872–4875.

171-"Breast Cancer Facts". (Document on the Internet). National Breast Cancer Foundation Inc (Cited 2016 March 3). Available from: <http://www.nationalbreastcancer.org/breast-cancer-facts>.

172-"GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality And Prevalence Worldwide In 2012". (Document on the Internet). World Health Organization, International Agency For Research On Cancer. Cited 2016 March 3. Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

173-Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):E359-86.

174-"Yeni Dünya Kanser İstatistikleri Yayınlandı". Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı (10 Haziran 2016). Mevcut: <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/860-yeni-d%C3%BCnya-kanser-istatistikleriyay%C4%B1nland%C4%B1.html>.

175-Yager JD. Mechanisms of estrogen carcinogenesis: The role of E2/E1-quinone metabolites suggests new approaches to preventive intervention. *Steroids* 2015;99 (Pt A):56–60.

176-Yue W, Yager JD, Wang JP, Jupe ER, Santen RJ. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids* 2013;78(2):161–170.

177-Bulun SE, Zeitou K, Sasono H. Aromatase in aging women. *Semin Reprod Endocrinol* 1999;17:349-358.

178-Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Davis S et al. Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocrine-Related Cancer* 1999;6:131-137.

179-Buzdar AU, Robertson JFR, Eiermann W, Nabholz JM. An Overview Of The Pharmacology And Pharmacokinetics Of The Newer Generation Aromatase Inhibitors Anastrozole, Letrozole And Exemestane. *Cancer* 2002;95(9):2006-2016.

180-Karasek M, Reiter RJ. Melatonin And Aging. *Neuro Endocrinology Letters* 2002;23(1):14–16.

181-Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Ann. NY. Acad. Sci* 1998;854:410-24.

182-Manchester LC, Coto-Montes A, Boga JA, Andersen LPH, Zhou Z, Galano A et al. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *J. Pineal Res* 2015;59: 403–419.

183-Cos S, Martinez-Campa C, Mediavilla MD and Sanchez-Barcelo E.J. Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Pineal Res* 2005;38:136–142

184-Sanchez-Barcelo EJ, Martinez-Campa CM, Mediavilla MD, Gonzalez A, Alonso-Gonzalez C, Cos S. Melatonin and Melatonergic Drugs as Therapeutic Agents: Ramelteon and Agomelatine, the Two Most Promising Melatonin Receptor Agonists. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* June 2007;Volume 1, Number 2:pp. 142-151(10).

185-Zang R, Li D, Tang I-C, Wang J and Yang S. Cell-Based Assays in High-Throughput Screening for Drug Discovery. *Int J Biotechnology for Wellness Industries* 2012;1:31-51.

186-Lill M. Virtual Screening in Drug Design In: In Silico Models for Drug Discovery Ed: Sandhya Kortagere, Springer Protocols, Humana Press 2013.

187-Rodriguez RJ, Acosta D Jr. N-deacetyl ketoconazole-induced hepatotoxicity in a primary culture system of rat hepatocytes. *Toxicology* 1997 Feb 28;117(2-3):123-31.

188-Yan Z, Lu G, Ye Q, Liu J. Modulation of 17 β -estradiol induced estrogenic responses in male goldfish (*Carassius auratus*) by benzo[a]pyrene and ketoconazole. *Environ Sci Pollut Res* 2016;23:9036-9045.

189-Süzen S, Tekiner Gülbaş B, Sirinzadeh H, Uslu D, Gurer-Orhan H, Gümüştas M et al. Antioxidant activity of indole-based melatonin analogues in erythrocytes and their voltammetric characterization. *J Enzyme Inhibition and Medicinal Chem* 2013;28:6,1143-1155.

190- Yılmaz AD, Karaaslan C, Shirinzadeh H, Ozcan S, Gurer Orhan H and Suzen S. New Antioxidant Drug Development Studies on Neurohormone Melatonin and Synthetic Analogues. *Academic J Science* 2014;03(02):51–56

191-Gurer-Orhan H, Karaaslan C, Ozcan S, Firuzi O, Tavakkoli M, Saso L et al. Novel indole-based melatonin analogues: Evaluation of antioxidant activity and protective effect against amyloid β -induced damage. *Bioorg Med Chem* 2016;24(8):1658-1664.

192-“Nonclinical Evaluation of Endocrine-Related Drug Toxicity Guidance for Industry” (document on the internet). U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) (cited September 2015). Available from: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm369043.pdf>

193-Hill SM, Belancio VP, Dauchy RT, Xiang S, Brimer S, Mao L et al. Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2015;22:R183–R204

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında İstanbul’da doğdum. 1996 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesinde başladığım lisans eğitimimi 2002 yılında tamamladım. Şubat 2007’de Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim dalında yüksek lisans eğitimimi tamamladım. Şubat 2009 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı’nda doktora çalışmalarına başladım.

Email: senem_ozcan@yahoo.com

