



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ANTİOKSİDAN AKTİVİTEYE SAHİP SARI
KANTARON (HYPERICUM PERFORATUM)
FLAVONOİDLERİNİN ANTİ-ENFLAMATUAR VE
ANTİ-DEPRESAN ETKİLERİNİN İN VİTRO VE İN
SİLİKO İNCELENMESİ**

İLKNUR YILDIZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

DANIŞMAN
Prof.Dr. Ayşe OGAN

EŞ-DANIŞMAN
Prof. Dr. Safiye ERDEM

İSTANBUL, 2020



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ANTİOKSİDAN AKTİVİTEYE SAHİP SARI
KANTARON (HYPERİCUM PERFORATUM)
FLAVONOİDLERİNİN ANTİ-ENFLAMATUAR VE
ANTİ-DEPRESAN ETKİLERİNİN İN VİTRO VE İN
SİLİKO İNCELENMESİ**

İLKNUR YILDIZ
(520617001)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

DANIŞMAN
Prof.Dr. Ayşe OGAN

EŞ-DANIŞMAN
Prof. Dr. Safiye ERDEM

İSTANBUL, 2020

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, ortaya çıkan her türlü probleme getirmiş olduğu bakış açısı ve yaklaşımları ile bana yol gösteren ve her zaman yanımda olan çok değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Ayşe Ogan'a ve Prof. Dr. Safiye Erdem'e,

Tez çalışmamın bitkiden ikincil metabolitlerin eldesi ve karakterizasyonu bölümünde büyük katkıları olan Organik Kimya Programı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Ümit Salan'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tez çalışmamın antioksidan aktivite ve LOX aktivite ölçümlerini yapmamda bana yol gösteren ve büyük katkıları olan değerli hocam Doç. Dr. Özkan Danış'a,

Yüksek Lisans tez çalışmamı FEN-C-YLP-130219-0035 numaralı proje kapsamında destekleyen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Tüm hayatım boyunca her daim desteğini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve olacaklarını bildiğim canım aileme,

Yüksek Lisans eğitimi almam konusunda beni teşvik eden ve karşıma çıkan tüm engelleri aşmamda bana güç veren merhum dedeme,

Lisans eğitiminden beri yanımda olan sevgili arkadaşlarım Beyza Hamur ve Gamze Koçal'a, ayrıca yüksek lisans eğitimim süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen Lalehan Özalp, Gizem Nur Duran, Berk Orhan ve İlke Demir başta olmak üzere tüm ekip arkadaşlarıma sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz,2020

İlknur YILDIZ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
SEMBOLLER.....	viii
KISALTMALAR.....	x
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
TABLO LİSTESİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	3
1.1. Giriş ve Amaç	3
1.2. Genel Bilgiler.....	7
1.2.1. Sarı kantaron	7
1.2.1.1. Yapısal özellikleri.....	7
1.2.1.2. Fonksiyonel özellikleri ve kullanımı	8
1.2.1.3. Kimyasal özellikleri.....	8
1.2.1.4. Farmakolojik etkileri	12
1.2.2. Flavonoidler	14
1.2.2.1. Flavonoidlerin yapısı ve sınıflandırılması	14
1.2.2.2. Flavonoidlerin farmakolojik özellikleri.....	16
1.2.3. Antioksidan etki	17
1.2.3.1. Serbest radikaller	17
1.2.3.2. Oksidatif stres	18
1.2.3.3. Antioksidan savunma sistemleri.....	18
1.2.3.3. Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi.....	19
1.2.4. Monoamin oksidaz (MAO)	21

1.2.4.1. MAO-A ve MAO-B izoenzimleri.....	21
1.2.4.2. FAD yapısı.....	24
1.2.4.4. MAO'nun aminleri oksitleme mekanizmaları.....	25
1.2.5 Siklooksijenaz (COX)	26
1.2.5.1. COX-1 ve COX-2 izozimleri.....	27
1.2.5.2. COX mekanizması.....	29
1.2.6. Lipooksijenaz (LOX)	32
1.2.6.1. LOX izozimleri.....	33
1.2.6.2. 5-Lipoksijenaz (5-LOX) ve 15-Lipoksijenaz-B (15-LOX-B) izoenzimleri	35
1.2.6.3. 5-LOX ve 15-LOX-B aktif bölgeleri.....	38
1.2.6.4. 5-LOX ve 15-LOX-B mekanizması	40
1.2.7. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı	42
1.2.7.1. Moleküler doking	44
2. MATERYAL VE YÖTEM	45
2.1. HPL Bitkisinin Ekstraksiyonu ve Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması... 45	
2.1.1. HPL bitkisinin ekstraksiyonu	45
2.1.2. HPL Bitkisinin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması	45
2.2. Antioksidan Aktivitenin Tayini	47
2.2.1. DPPH serbest radikali giderme aktivitesi tayini	47
2.2.1.1. Kullanılan çözeltiler	47
2.2.1.2. Yöntem	48
2.3. LOX Enzim Aktivitesinin Tayini	49
2.4. Moleküler Doking.....	50
2.4.1. Enzim dosyalarının hazırlanması	51
2.4.2. Ligand bileşiklerinin hazırlanması	52

2.4.3. Konfigürasyon dosyalarının hazırlanması.....	53
2.4.4. Doking işlemi.....	55
2.4.5. Doking sonuçlarının görüntülenmesi.....	56
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	57
3.1. İkincil Metabolitlerin Tanımlanması	57
3.1.1. Kuersetin	57
3.1.2. Hiperisin.....	58
3.1.3. Kemferol.....	61
3.2. DPPH Serbest Radikali Giderme Aktivitesi Tayini.....	63
3.3. Enzim İnhibisyonu Sonuçları.....	67
3.4 Moleküler Doking Sonuçları	67
3.4.1. Enzim-ligand bağlanma etkileşimlerinin incelenmesi	68
3.4.1.1. MAO-A ve MAO-B doking sonuçları.....	68
3.4.1.2 COX-1 ve COX-2 doking sonuçları	73
3.4.1.3. 5-LOX ve 15-LOXB doking sonuçları.....	78
3.4.1.4. LOX ve COX çift inhibisyonu	81
4.SONUÇLAR.....	87
KAYNAKLAR.....	90
EKLER	102
ÖZGEÇMİŞ	105

ÖZET

Antioksidan Aktiviteye Sahip Sarı Kantaron (*Hypericum Perforatum*) Flavonoidlerinin Anti-enflamatuar ve Anti-depresan Etkilerinin *in vitro* ve *in siliko* İncelenmesi

Tıbbi bitkiler, ulaşılabilirliği ve minimum yan etkileri sebebiyle günümüzde hala popüler bir tedavi yöntemidir. Sarı kantaron (*Hypericum Perforatum* L., HPL), yüzyıllardır bir çok hastalığın tedavisinde tıbbi bitki olarak kullanılmaktadır. Biyolojik makromolekül hasarına ve metabolik işlev bozukluklarına yol açan oksidatif stresle mücadele ederek antioksidan aktivite gösterdiği bilinmektedir. Monoamin oksidaz (MAO) enziminin inhibisyonu yoluyla anksiyete ve hafif-orta şiddette depresyonu tedavi etmesinin yanı sıra anti-enflamatuar ve yara iyileştirici özellikleri için de tercih edilir. Sarı kantaron ekstrelerinin Siklooksijenaz (COX) ve Lipoksijenazı (LOX) inhibe ettiği bilinmektedir. Siklooksijenazın iki izoformu vardır; yapısal olarak ifade edilen siklooksijenaz-1 (COX-1) ve çeşitli uyarımlarla yukarı regüle edilen siklooksijenaz-2 (COX-2). COX-1 inhibitörleri gastrointestinal (GI) yan etkilerle ilişkilendirilirken, COX-2 inhibitörleri nispeten daha az GI yan etkisine sahiptir, ancak daha yüksek kardiyovasküler toksisite gösterir. COX ile benzer şekilde enflamasyona etki eden bir diğer enzim grubu LOX'lardır ancak seçici LOX/COX çalışmaları iyi sonuçlar vermemiştir. Bu nedenle, minimum yan etkileri olan yeni anti-enflamatuar ilaçların keşfi zorunlu hale gelmiştir. Her iki enzimin eşzamanlı inhibisyonuna odaklanmak, daha geniş spektrumlu, azaltılmış yan etkiler ve daha düşük dozajlara sahip yeni anti-enflamatuar ilaçların keşfi için umut vericidir.

Bu tez çalışmasında, sarı kantaron çiçek ve yaprakları etanol ile ekstre edilmiştir metanol ile fraksiyonlanmıştır. Alkol ekstraktının ve fraksiyonların antioksidan aktiviteleri belirlenmiş ve alkol ekstraktından izole edilen bileşikler tanımlanmış, izolatların ve bitki-alkol ekstresinin antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Bitki ekstresinin sentetik antioksidanlara benzer bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Aynı zamanda, bitkinin aktif bileşenleri literatürden seçilerek MAO, COX ve LOX'a bağlanma afiniteleri doking yöntemi ile hesaplanmıştır. Bu bileşiklerin, COX-1 ile karşılaştırıldığında tercihen COX-2'yi inhibe ettiği görülmüştür. Kuersetin seçici MAO-

A aktivitesi gösterirken, hiperisin seçici MAO-B aktivitesi göstermiştir. Hiperisin ve kemferol, etkili ve umut verici çift etkili COX-2/5-LOX inhibitörler olarak gelecekteki çalışmalar için önerilmektedir.



ABSTRACT

***in vitro ve in silico* Investigation on Anti-inflammatory and Anti-depression Effects of *Hypericum Perforatum* flavanoids with Antioxidant Activity**

Medicinal plants today are still popular for treatment of many diseases due to their availability, efficacy and minimal side effects. St. John's Wort (*Hypericum Perforatum* L., HPL) has been used as a medicinal plant for the treatment of many disorders for centuries. It is known to show antioxidant activity by combating oxidative stress leading to biological macromolecule damage and metabolic dysfunctions. It is indicated for the treatment of anxiety and mild to moderately severe depression through the inhibition of the monoamine oxidase (MAO) enzyme and is also preferred for its wound-healing properties due to its anti-inflammatory effect. St. John's Wort extracts have been shown to inhibit Cyclooxygenases (COXs) and Lipooxygenases (LOXs). There are two forms of cyclooxygenases; cyclooxygenase-1 (COX-1), which is constitutively expressed, and cyclooxygenase-2 (COX-2), which is upregulated by diverse stimuli. COX-1 inhibitors have been associated with gastrointestinal (GI) side effects, while COX-2 inhibitors have relatively few GI side effects, but have a higher incidence of cardiovascular toxicity. LOXs are also another group of enzymes that affect inflammation similar to COXs but the selective LOX/COX inhibition studies have not yielded satisfactory results. Hence, the discovery of new anti-inflammatory drugs with minimum side effects is mandatory. Focusing on the simultaneous inhibition of both enzymes is promising for the discovery of new anti-inflammatory drugs with wider spectrum, reduced side effects and lower dosages.

In this thesis study St. John's Wort petals and leaves were extracted by ethanol and further fractionated by methanol. Antioxidant activities of the total extract and the fractions have been determined and the compounds which were isolated from alcoholic extract were identified. The plant extracts have displayed antioxidant activity similar to synthetic antioxidants.

At the same time the binding affinities towards MAO, COX and LOX of the active compounds, which were selected from previous reports, were calculated by the docking method. Those compounds preferentially inhibited COX-2 when compared to COX-1. Quercetin displayed selective MAO-A activity while hypericin showed selective MAO-

B activity. Hypericin and kaemferol are suggested for future studies as effective and promising dual inhibitors for COX-2/5-LOX enzymes.



SEMBOLLER

%	:Yüzde
Å	:Angstrom
°C	:Santigrad Derece
dk	:Dakika
nm	:Nanometre
kDa	:Kilo Dalton
Kcal	: Kilokalori
M	:Molar
g	:Gram
kg	:Kilogram
mg	:Miligram
mM	:Milimolar
mm	:Milimetre
mmol	:Milimol
mL	:Mililitre
µL	:Mikrolitre
µg	:Mikrogram
µm	:Mikrometre
µM	:Mikromolar
ΔG	:Rreaksiyon serbest enerji değışimi
β	:Beta
ω	:Omega

α	:Alfa
δ	:Delta
π	:Pi
λ	:Lambda
pH	:Hidrojen Gücü
V_{max}	:Maksimum Hız
δ (ppm)	:Milyonda bir birim
J (Hz)	:Etkileşim sabiti (hertz)

KISALTMALAR

WHO	:Dünya Sağlık Örgütü
ROT	:Reaktif Oksijen Türleri
RNT	:Reaktif Azot Türleri
RST	:Reaktif Kükürt Türleri
HPL	: <i>Hypericum Perforatum L.</i>
MAO	:Monoamin Oksidaz
FAD	:Flavin Adenin Dinükleotid
HEM	: Protoporfirin IX Fe ³⁺
COX	:Sikloksijenaz
LOX	:Lipoksijenaz
PTGS	:Prostaglandin-Endoperoksit Sentaz
PGs	:Prostaglandin
PGI2	:Prostasiklin
TXA2	:Tromboksan A2
PGH2	:Prostaglandin H2
PGG2	:Prostaglandin G2
ALOX	:Araşidonat Lipoksijenaz
HPETE	:Hidroperoksi-eikosatetraenoik asit
HETE	:Hidroksiyeikosatetraenoik asit
COMT	:Katekol-O-Metil Transferaz
NOS	:Nitrik Oksit Sentaz
XO	:Ksantin oksidaz

MPTP	:1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
5-HT	:Serotonin
DA	:Dopamin
NE	:Norepinefrin
E	:Epinefrin
AA	:Araşidonik Asit
PUFA	:Çoklu Doymamış Yağ Asidi
FLAP	:5-lipoksijenaz Aktive Edici Protein
PLAT	:Polisitin-1-lipoksijenaz α -toksin
LX	:Lipoksin
LT	:Lökotrien
CADD	:Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı
YAI	:Yapı Aktivite İlişkisi
PDB	:Protein Data Bank
MD	:Moleküler Dinamik
PM6	:Parametrik method 6
İTK	:İnce Tabaka Kromatografisi
UV-vis	:Ultraviyole-Görünür Spektroskopisi
FT-IR	:Fourier Transform Infrared Spektrofotometre
NMR	:Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
DPPH	:2,2-difenil-1- pikrilhidrazil
DMSO	:Dimetil Sülfoksit
ATP	:Adenozin Trifosfat

DNA	:Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	:Ribo Nükleik Asit
NDGA	:Nordihidroguaiaretik Asit
BFGS	:Broyden-Flecher-Goldfarb-Shanno
RMSD	:Kök-ortalama-kare sapma
NSA��	:Nan-steroid Anti-inflamatuar �la�lar
SER	:Serin
LYS	:Lizin
THR	:Treonin
TYR	:Tirozin
LEU	:Lösin
GLU	:Glutamik Asit
ARG	:Arjinin
VAL	:Valin
ALA	:Alanin
ILE	:�zol�sin
PHE	:Fenilalenin
GLY	:Glisin
HIS	:Histidin
GLN	:Glutamin
CYS	:Alanin
PRO	:Prolin
MET	:Metyonin

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1.1 Sarı kantaron için şemalar	7
Şekil 1.2 Hiperisin(a) ve Hiperforin(b) yapıları	9
Şekil 1.3 Temel flavonoid halkası	14
Şekil 1.4 (a) ROT 'nin flavonoidler (Fl-OH) ile temizlenmesi, (b) Me^{n+} 'in metal iyonunu gösterdiği iz metaller için bağlanma bölgeleri	20
Şekil 1.5 Reaksiyon kataliz mekanizması	21
Şekil 1.6 a) MAO-A Enzimi (PDB kodu: 2Z5X) ve b) MAO-B Enzimi (PDB kodu: 2XFN) Kristal Yapıları	22
Şekil 1.7 MAO A ve MAO B substrat bağlama bölgelerinin yerleşimi	24
Şekil 1.8 MAO enzimidaki kovalent bağlı FAD yapısı	25
Şekil 1.9 MAO enzim ailesi tarafından amin oksidasyonu için önerilen mekanizmalar	26
Şekil 1.10 a) COX-1 Enzimi (PDB kodu: 1Q4G) ve b) COX-2 Enzimi (PDB Kodu: 3L1N)	27
Şekil 1.11 a) COX-2 aktif bölgesi ve şematik temsili ve b) COX-1 siklooksijenaz ve peroksidaz aktif bölgelerinin modeli	29
Şekil 1.12 COX metabolik yolu	30
ŞEKİL 1.13 Araşidonik asit ve iki oksijen molekülünün PGG ₂ 'ye dönüşümünü gösteren siklooksijenaz reaksiyonu için mekanizma	31
Şekil 1.14 Lipoksijenaz katalizinin basitleştirilmiş şeması	32
Şekil 1.15: Lipoksijenazların biyolojik işlevi	35
Şekil 1.16 İnsan ALOX15 ve ALOX15B'nin reaksiyon spesifikliğı	36
Şekil 1.17 5-LOX (PDB kodu: 3O8Y)	36
Şekil 1.18 15-LOX-B (PDB kodu: 4NRE)	36
Şekil 1.19 Fe substratı	37
Şekil 1.20 15-LOX-2 ve 5-LOX'in üst üste çakıştırılması	38
Şekil 1.21 5-LOX'un 3 boyutlu yapısının gösterimi	39
Şekil 1.22 15-LOX-B aktif bölgesi ve aktif bölge amino asitleri	40
Şekil 1.23 5-LOX ve 15-LOX-B metabolik yolu	41
Şekil 2.1 Kolon kromatografisi için ilk kurulan kaba kolon	46
Şekil 2.2 Tüplere toplanan benzer polaritedeki örnekler	46
Şekil 2.3 İTK sonucu UV lambada izlenen fraksiyonların görüntüsü	47

Şekil 2.4	Preperatif İTK ile saf madde izolasyonu.....	47
Şekil 2.5	<i>Hypericum Perforatum L.</i> bitkisinin bileşenlerinin iki boyutlu yapıları.....	53
Şekil 2.6	Rijid ve esnek doking hesaplamaları için örnek konfigürasyon dosyaları.....	54
Şekil 2.7	Ligandların dok pozisyonları ile kristal yapı pozisyonlarının üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntüleri.....	56
Şekil 3.1	Bileşiklerin görünür ışık ve UV lambadaki görüntüleri.....	57
Şekil 3.2	5 Bileşiğinin ¹ H NMR spekturumu.....	
Şekil 3.3	9bileşiğinin FT-IR spekturumu.....	60
Şekil 3.4	9 bileşiğinin UV-Vis ve Floresans spekturumları.....	61
Şekil 3.5	5 Bileşiğinin ¹ H NMR spekturumu.....	62
Şekil 3.6	DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi tayini için farklı troloks derişimlerine karşı elde edilen absorbans grafiğı	63
Şekil 3.7	DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi tayini için farklı askorbik asit derişimlerine karşı elde edilen absorbans grafiğı	64
Şekil 3.8	HPL etanol ekstresinin derişim -% inhibisyon grafiğı.....	65
Şekil 3.9	HPL bitkisinden izole edilen 10 farklı örneğın derişim-% inhibisyon grafiğı	66
Şekil 3.10	1 ve 5 numaralı örneklerin molarite -% inhibisyon grafikleri.....	66
Şekil 3.11	Kuersetin bileşiğinin MAO-A aktif bölgesine yerleşme pozu.....	70
Şekil 3.12	Kuersetin bileşiğinin MAO-B aktif bölgesine yerleşme pozu.....	70
Şekil 3.13	Hiperisin bileşiğinin MAO-A aktif bölgesine yerleşme pozu.....	71
Şekil 3.14	Hiperisin bileşiğinin MAO-B aktif bölgesine yerleşme pozu.....	72
Şekil 3.15	Amentoflavon bileşiğinin COX-1 aktif bölgesine yerleşme pozu	75
Şekil 3.16	Amentoflavon bileşiğinin COX-2 aktif bölgesine bağlanma pozu	75
Şekil 3.17	Avikularin bileşiğinin COX-2 aktif bölgesine yerleşme pozu.....	77
Şekil 3.18	Kuersetin bileşiğinin COX-1 aktif bölgesine bağlanma pozu	77
Şekil 3.19	Hiperisin bileşiğinin 5-LOX aktif bölgesine bağlanma pozu	80
Şekil 3.20	Hiperisin bileşiğinin 15-LOXB aktif bölgesine bağlanma pozu.....	80
Şekil 3.21	Hiperisin bileşiğinin COX-2 aktif bölgesine bağlanma pozu	83
Şekil 3.22	Kemferol bileşiğinin 5-LOX aktif bölgesine bağlanma pozu	84
Şekil 3.23	Kemferol bileşiğinin COX-2 aktif bölgesine bağlanma pozu.....	85

TABLO LİSTESİ

SAYFA

Tablo 1.1 Bilinen aktif bileşiklerin ait olduğu biyokimyasal sınıflar	11
Tablo 1.2 Flavonoid Yapıları.....	15
Tablo 1.3 Antioksidan Savunma Sistemleri	19
Tablo 1.4 Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı Akış Diagramı	43
Tablo 2.1 DPPH radikali giderme aktivitesi çalışma tablosu	48
Tablo 2.2 Moleküler Doking çalışmasında izlenen Basamaklar	50
Tablo 2.3 MAO-A, MAO-B, COX-1, COX-2, 5-LOX ve 15-LOX-B izozimlerinin aktif bölgesinde yer alan esnek olarak seçilen amino asitler	51
Tablo 2.4. Her izozim için oluşturulan küpün boyutlarını tanımlayan parametreler.....	54
Tablo 3.1 Standart antioksidanlara ait % inhibisyon ve IC ₅₀ değerleri.....	64
Tablo 3.2 Esnek doking sonucu enzim-ligand bağlanma enerjileri (kcal/mol).	68
Tablo 3.3 MAO-A ve MAO-B izozimlerinin ΔG (kcal/mol), K_i (μM) ve SI değerleri. 69	
Tablo 3.4 Kuersetin bileşiğinin MAO-A ve MAO-B enzimi ile yaptığı etkileşimler ...	71
Tablo 3.5 Hiperisin bileşiğinin MAO-A ve MAO-B enzimi ile yaptığı etkileşimler....	72
Tablo 3.6 COX-1 ve COX-2 izozimlerinin ΔG (kcal/mol), K_i (μM) ve SI değerleri....	74
Tablo 3.7 Amentoflavon bileşiğinin COX-1 ve COX-2 izoenzimleri ile yaptığı etkileşimler	76
Tablo 3.8 Kuersetin bileşiğinin COX-1 enzimi, avikularin bileşiğinin COX-2 enzimi ile yaptığı etkileşimler	78
Tablo 3.9 5-LOX ve 15-LOXB izozimlerinin ΔG (kcal/mol), K_i (μM) ve SI değerleri.79	
Tablo 3.10 Hiperisin bileşiğinin 5-LOX enzimi, 15-LOXB enzimi ile yaptığı etkileşimler	81
Tablo 3.11 5-LOX ve COX-2 izozimlerinin ΔG (kcal/mol), K_i (μM) ve SI değerleri. .	82
Tablo 3.12 Hiperisin bileşiğinin 5-LOX enzimi, COX-2 enzimi ile yaptığı etkileşimler	84
Tablo 3.13 Kemferol bileşiğinin 5-LOX enzimi, COX-2 enzimi ile yaptığı etkileşimler	85

1.GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Tıbbi bitkiler, tüm dünyada insanlar tarafından kullanılan, bilinen en eski sağlık ürünleridir ve birçok ülkede uygulanan geleneksel tıp sisteminde kullanılan formülasyonların ana bileşenleridir (Satyapal ve ark., 2011). Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) tanımına göre geleneksel tıp "sağlığın korunmasında, fiziksel ve zihinsel hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılan, farklı kültürlerle özgü teori, inanç ve deneyimlere dayanan bilgi, beceri ve uygulamalardır (World Health Organization, http://www.who.int/topics/traditional_medicine/en/). Ayrıca geleneksel tıp, modern tıbbın oluşumuna rehberlik etmektedir ve günümüzde sentetik ilaçlar kazançlı bir alternatif olarak görülse de, bitkiler sentetik ilaçların bile elde edildiği vazgeçilmez bir kaynak olarak bilinir (Reid ve ark., 2018). DSÖ, dünya nüfusunun %80'inin sağlık sorunlarını ilk etapta bitkilerle gidermeye çalıştıklarını bildirmektedir ayrıca gelişmiş ülkelerde reçeteli ilaçların yaklaşık %25'ini bitkisel kökenli etken maddeler oluşturmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu,2011). Halk tarafından kolay ulaşılabilir olması ve düşük maliyeti sebebiyle geleneksel tıba olan ilgi son yıllarda oldukça artmıştır (Galor ve Benzie, 2011).

Bitkiler, çoğu güçlü antioksidan aktiviteye sahip olan çeşitli fitokimyasalların kaynağıdır ve bu bileşiklerin birçoğu ikincil metabolitlerdir (Paur ve ark., 2011). Biyolojik sistemlerdeki aerobik metabolizma, hem aerobik solunum hem de substrat oksidasyonu sonucunda meydana gelen prooksidanlar olarak bilinen reaktif oksijen türlerini (ROT) oluşturur (Whitehead ve ark, 1995). ROT, birçok molekülün yapısını değiştirerek ciddi metabolik fonksiyon bozukluklarına ve biyolojik makromoleküllerin hasarına yol açan oksidatif strese neden olur. Biyolojik moleküllerin prooksidan hasarına karşı koyabilmesi için endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlara ihtiyacı vardır. Antioksidanlar etkilerini ROT'nin oluşumunu önleyerek veya ROT'ni temizleyerek gösterirler. Eksojen kaynaklı antioksidanların (bazı vitaminler, flavonoidler, polifenoller vb.) birçoğu bugün yaygın olarak kullandığımız gıdalarda ve bitkilerde bulunmaktadır (Stavric, 1995). Serbest radikal süpürme ve metal şelatlama özellikleri nedeniyle güçlü antioksidanlar olarak bilinen flavonoidler, halk arasında

yaygın kullanılan bir bitki olan sarı kantaronun içerisinde bol miktarda bulunmaktadır (Patocka, 2003).

Hypericum Perforatum L. (HPL, St. Jonh Wort), sarı kantaron olarak bilinen; tilki otu, keçi otu ve enola otu isimleriyle de tanınan, Clusiaceae familyasına ait yüzyıllardır tıbbi olarak değer görmüş bir bitkidir (Klemow ve ark, 2011). Dünyanın ılıman bölgelerinde yaklaşık 450 türle dağılmış olan *Hypericum* cinsi Türkiye florasında 89 türle varlığını sürdürmektedir (Altun ve ark, 2013).

HPL'in çeşitli nörolojik hastalıkların (anksiyete, depresyon, uykusuzluk gibi) tedavisi için halk arasında yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir ve depresyona karşı etkinliği standart anti-depresanlarla karşılaştırılabilir olmakla birlikte daha az yan etki ile dikkat çekmektedir (Sosa ve ark., 2007). Geleneksel olarak anti-enflamatuar ve yara iyileştirici özellikleri için kullanılan ve dermatit, yaralar, döküntüler, yanıklar ve yaraların topikal tedavisinde yararlı olduğu bilinen (Sosa ve ark., 2007). HPL' un anti-enflamatuar ve analjezik aktivite gösterdiğine dair bilimsel çalışmalar da mevcuttur (Raso ve ark., 2002). Bu faaliyetinin yanı sıra HPL bitkisinin; belirgin antimikrobiyal, antiviral, anti HIV / anti-AIDS ve antitümoral aktivitelerine sahip olduğu bildirilmiştir (Öztürk ve ark., 2007).

Nörodejeneratif ve nörolojik hastalıklar ile doğrudan ilişkili olan monoamin oksidaz (EC-1.4.3.4, MAO), sistein tortusuna kovalent olarak bağlanan flavin-adenozin-dinükleotid (FAD) içeren; nöroaktif serotonin, norepinefrin ve dopamin gibi biyojenik ve ksenobiyotik aminlerin deaminasyonunu katalize eden, mitokondriyal dış membrana lokalize bir enzimdir. MAO'nun inhibisyonu, merkezi sinir sistemindeki nörotransmitterlerin seviyesini artırır. MAO, %70 aminoasit benzerliği gösteren MAO-A ve MAO-B fonksiyonel izozimlere sahiptir (Son ve ark.,2008).

Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, merkezi sinir sistemindeki bozulmaya bağlı olarak gelişen çoğunlukla geri dönülemez, ilerleyici ve en son aşamada da ölümle sonuçlanan hastalıklardır. Bu hastalıkların tedavisinin aminlerin yıkımında görevli MAO-B enzimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. MAO-A enzimi psikiyatrik durumların ve depresyonun tedavisi ile doğrudan ilişkilidir. MAO inhibitörlerinin hepatoksisite, hipotansiyon, hipertansif kriz gibi ciddi yan etkilere sahip olduğu

görülmüştür. Seçici olmayan ve geri dönüşümsüz enzim inhibisyonu ile ilişkili olduğu düşünülen bu durum yeni MAO inhibitörlerinin bulunmasını zorunlu kılmıştır.

Siklooksijenaz (COX) ve lipoksijenaz (LOX) enzimlerinin enflamatuar mediatör olarak salınmasında rol alırlar(Moroney ve ark.,1988). Anti-enflamatuar özellikgösteren birçok flavonoidin, hem LOX hem de COX aktivitelerini inhibe ederek, eikosanoid sentezini engellediği debildirilmiştir (Formica ve Regelson, 1995).

Prostaglandin-endoperoksit sentaz (PTGS) olarak bilinen siklooksijenazın (EC 1.14.99.1, COX), insanlarda işlevsel olan COX-1 ve COX-2 izozimi prostasiklin ve tromboksan gibi prostaglandinler (PGs) dahil olmak üzere prostanoidlerin oluşumundan sorumlu bir enzimdir. COX tarafından üretilen PG'ler enflamatuar reaksiyonlarda önemli bir rol oynar kızarıklık, ağrı, ödem ve ateşgibi karakteristik enflamatuar semptomlardan sorumludur (Rouzer ve Marnett, 2009).

Lipoksijenazlar (LOX, EC 1.13.11.), hem-olmayan demir içeren dioksijenazların bir ailesidir. Moleküler oksijene, karşılık gelen (1S, 2E, 4Z) -hidroperoksitleri vermek üzere bir veya daha fazla (1Z, 4Z) - pentadien parçaları içerir (Andreou ve Feussner, 2009). İnsanda işlevsel altı izoenzimi (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOXE3, ALOX5) olan LOX'lar, araşidonik asidin metabolik yolunda lökotrien ve lipoksinler gibi eikosanoidlerin biyosentezinde yer alır. (Kuhn ve ark., 2014, Charlier ve Michaux, 2003). LOX'lar, bitkilerde yara iyileşmesi ve savunma işlemlerinde sinyal olarak önemli rol oynarlar, memelilerde enflamasyon, astım ve kalp hastalıkları ile ilgilidir (Andreou ve Feussner, 2009).

Anti-enflamatuarlar dünya çapında en fazla reçete edilen ilaçlardır. Ağrı ve enflamasyon baskılamada görevli herkes tarafından kullanılan bu ilaçlar gastrointestinal sisteme etki ederek ciddi mide sorunlarına, kan hacmini ve kalp atış hızını artırarak kardiyovasküler sorunlara sebebiyet vermektedir. Yan etkilerinden dolayı bu inhibitörlere dair birçok iyileştirme çalışması yürütülmekte ve alternatifler aranmaktadır.

İlaç adayı olabilecek bir öncü bileşiğin sentezlenme aşamasının öncesinde yapılacak bilgisayar destekli ilaç tasarımı aracı olan moleküler dokingile, atomik olarak belirli bir molekülün bir hedefe bağlanıp bağlanmadığını, eğer bağlanıyorsa bağlanma gücünü ve

bağlanma sonucu uzayda tercih ettiği pozisyonları ön görüp zaman ve maliyet kayıplarını en aza indirmek hedeflenmektedir.

Bu tez çalışmasında, halk arasında anti-enflamatuar, analjezik ve anti-depresan etkileri bilinen *Hypericum Perforatum* L. bitkisinin alkol ekstrelerinden izole edilecek ikincil metabolitlerin karakterizasyonu yapıp, bu bileşiklerin antioksidan aktivite tayini ve LOX enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi üzerine *in vitro* ve *in siliko* çalışmalarının yapılması amaçlanmaktadır. Ek olarak bileşiklerin COX enzimine bağlanma afinitelerini *in siliko* olarak hesaplayarak bu bileşiklerin çift etki gösterme olasılıkları üzerinde durulmaktadır. Anti-enflamatuar olarak kullanılabilecek COX ve LOX çift inhibisyonu yapan bileşiklerin aynı zamanda antioksidan etki sağlayarak çift-işlevli olmasının tedavi sürecini hızlandıracağını düşünülmektedir. İzole edilen bileşiklerin MAO izoenzimlerine bağlanma afinitelerini moleküler doking ile hesaplayarak geri dönüşümlü ve seçici MAO inhibisyonunu sağlayacak öncü bileşiklerin araştırılması amaçlanmıştır. MAO inhibitörü olarak önerilecek bu bileşiklerin aynı zamanda antioksidan etki sağlamasıyla tedaviyi olumlu etkileyeceği düşünülmektedir. Akılcı ilaç tasarımı temelinde hem hesapsal hem deneysel olarak tayin edeceğimiz bileşiklerin bu hastalıklarla doğrudan ilişkisi olan enzimler üzerine etkilerinin incelenmesi, yeni öncü bileşikler önerilmesinin yolunu açacaktır. Antioksidan aktivite gösteren bu bileşiklerin COX, LOX ve MAO enzimine etki etmesi ile oluşacak çoklu etki potansiyellerini de araştırarak, bileşiklerin enzimler üzerindeki seçiciliklerini kıyaslama ve bitkinin bu aktivitelere sebep olan ikincil metabolitlerinin hangisi olduğunu bulma şansı kazandırmaktadır.

1.2. Genel Bilgiler

1.2.1. Sarı kantaron

Hypericum Perforatum L. (HPL) yaygın olarak sarı kantaron olarak bilinen; tilki otu, keçi otu ve enola otu isimleriyle de tanınan, Clusiaceae familyasına ait, dünyanın ılıman bölgelerinde 450 den fazla türü bulunan çok yıllık bir bitkidir. Anadolu'da sarı kantaron, binbirdelik otu, kılıç otu, kan otu, mayasıl otu, koyunkıran gibi birçok yerel isimle tanınan *Hypericum* cinsinin Türkiye florasında 89 türü bulunmaktadır (Altun ve ark., 2013).

1.2.1.1. Yapısal özellikleri

HPL, tipik olarak yüksekliği 40 ila 80 cm arasında değişen, serbest dallanan çalı bitkilerindendir. Gövde ve dallar, 1.0-3.0 cm uzunluğunda ve 0.3-1.0 cm genişliğinde dikdörtgen, kenarları pürüzsüz yapraklar ile kaplıdır. Yapraklar, ışığa tutulduğunda belirgin olan yarı saydam noktalar tarafından kesilir. Olgun bitkilerin üst kısımları, tipik olarak 1.0-2.0 cm genişliğinde birkaç düzine beş yapraklı sarı çiçek üretebilir. Yaprakların kenarları genellikle siyah noktalarla kaplıdır. Ezilmiş çiçekler kan kırmızısı bir pigment üretir. Yaz sonunda ise çiçekler düzinelerce minik, koyu kahve renkli tohum üretir (Klemow ve ark., 2011).



Şekil 1.1 Sarı kantaron için şemalar (Klemow ve ark., 2011) (I. Yaprak düzenini gösteren alt sapın bir taslağı, II. Açılmış bir kapsül, III. Çiçeklerle üst sapın taslağı, IV. Bir çiçek yaprağı.)

1.2.1.2.Fonksiyonel özellikleri ve kullanımı

HPL, 2000 yılı aşkın süredir tıbbi olarak değer ve kabul görmüş bir bitkidir. Birinci yüzyılın Yunan doktorları Galen, Dioscorides, Pliny ve Hipokrat, HPL bitkisini idrar söktürücü, yara iyileştirici, adet rahatsızlıkları, bağırsak kurtları ve yılan ısırıkları için tedavi olarak önerdiler (Foster, 2000; Castleman, 2001; Redvers ve ark., 2001). Çok eski yıllarda bitkinin mistik özelliklere de sahip olduğuna inanılıyordu, şeytanlardan korunmak ve kötü ruhları uzaklaştırmak için bitkiler toplanırdı. Hypericum bitkisinin jenerik ismi, bitkinin kötü ruhları engelleme yeteneğine atıfta bulunan Yunanca “hyperikon” yani "hyper" (aşırı anlamında) ve "eikon" ("görüntü veya görünüm" anlamına gelir) kök kelimelerinin birleşiminden gelir (Foster, 2000). İlk Hristiyanlar da bitkinin mistik özelliklere sahip olduğuna inanıyordu. Bir efsaneye göre, en büyük etkinin bitkinin en yoğun çiçeklenme zamanı olan Aziz John Günü'nde (Saint John Wort, 24 Haziran) toplandığı zaman elde edildiğine inanmışlardır (Foster, 2000). Başka bir efsaneye göre de 29 Ağustos'ta Aziz John'un Hristiyanlık propagandası yaptığı gerekçesi ile Romalılar tarafından hapsedildiği gün bitkinin kan kırmızı yağın serbest bıraktığı söylenmektedir (Castleman, 2001).

Bitki, Ortaçağ'da bitkisel bir ilaç olarak kullanılmaya devam edilmiş ve 16. YY'da başta Paracelsus, Gerard ve Culpeper olmak üzere bitki bilimciler yaraları tedavi etmek ve ağrıyı hafifletmek için HPL ekstrelerini önermişlerdir (Foster, 2000; Castleman, 2001). 1525'te Paracelsus, bunu depresyon, melankoli ve aşırı uyarılma için de önermiştir (Clement ve ark., 2006). Avrupa'da HPL'nin şifalı bir bitki olarak kullanımı, 18. YY ve 19. YY yüzyıllar arasında diğer kıtalara yayılarak devam etmiştir. Genel olarak anksiyete, depresyon, uykusuzluk, ödem ve gastrit tedavisi için çay ve tentürler haline getirildi. Yıllar içinde, hemoroit ve iltihap tedavisi için bitkisel yağ da kullanılmıştır. Özellikle sinir hasarı içeren yaraları, kesikleri, küçük yanıkları ve sıyrıkları tedavi etmek için HPL özütleri halen günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (Blumenthal ve ark., 1998; Foster 2000; Foster ve Duke, 2000; Castleman, 2001).

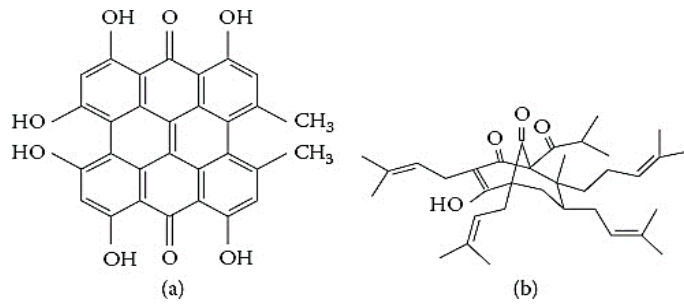
1.2.1.3. Kimyasal özellikleri

Halk arasında en yaygın kullanılan topikal preparatlar, taze veya kurutulmuş çiçeklerden ve bitkinin çiçek açan bölümlerinden yapılan Hypericum yağıdır. Bitki materyalinin 1:4 oranında bitkisel yağda (zeytinyağı, ayçiçeği yağı ya da diğer yağlar)

hazırlanarak şeffaf bir cam içine doldurulur ve fermentasyon için sıcak bir yerde tutulur. Daha sonra bitki materyali ezilir, yağ süzülür ve sulu faz sodyum sülfatla çıkarılır, kapaklı cam bir kap içerisinde tutulur ve yaklaşık 4-6 hafta güneş ışığına maruz kalır. Bu süre zarfında, yağ yoğun bir yakut kırmızısı rengini alır. Ürünü ışıktan korumak için kahverengi cam bir şişeye doldurulur ancak yine de sınırlı bir stabiliteye sahiptir. Görünür ışığa kısa süreli maruz kalma, protoperperini hiperisine dönüştürürken, bu süre birkaç haftaya çıktığında indirgenme olur ve yağdaki hiperisin konsantrasyonu azalır. Hazırlanmış yağın yakut kırmızısı rengi, hiperisinin lipofilik parçalanma ürünlerinden kaynaklanmaktadır. (Wölfler, 2014)

HPL'den hidroalkolik özütlerin analizleri, çok lipofilik olan hiperforini yüksek verimlilikte elde etmek için en az % 60 etanol konsantrasyonunun gerekli olduğunu; mutlak etanol ile hiperforin ekstraksiyonunun maksimal olacağını ancak flavonoidler gibi hidrofilik bileşenlerin büyük ölçüde azalacağını ortaya koymuştur (Wölfler, 2014).

Şekil 1.2'de görüldüğü gibi HPL bitkisinin başlıca aktif bileşenleri hiperisin (a) ve hiperforin (b) olarak kabul edilir (Klemow ve ark., 2011). Bitkinin üst kısımlarından hazırlanan hidroalkolik özütler (% 60 etanol veya % 80 metanol) naftodiantronlar, floroglusinoller, flavonoidler, biflavonlar, fenilpropanlar ve proantosiyanidinler olmak üzere 6 ana doğal ürün grubundan oluşan bir spektrum içerir. Ek olarak, daha az miktarda tanen, ksanton, esansiyel yağ ve amino asit vardır (Patočka, 2003 ve Saddiqe, 2010).



Şekil 1.2 Hiperisin(a) ve Hiperforin(b) yapıları

Naftodiyatronlar, yoğun kırmızı renkli ve fototoksik özellikleri ile Hypericum cinsinin tipik bir örneğidir. Taze örnekte protofitisin, protopseudohiperisin (sırasıyla, hiperisin ve psödohiperisin biyosentetik öncüleri) ve Siklopsudohiperisin (psödohiperisin oksidasyon ürünü) mevcut olduğu belirtilmektedir. Naftodiyatronların

hemen hemen tüm çözücülerde çözünürlüğü sınırlıdır. Hem hiperisin hem de psödohiperisin, ortam sıcaklıklarında suda pratik olarak çözünmez, çözünürlükleri daha yüksek sıcaklıklarda artar. Bu sebeple ancak kaynamış su ile bir çay hazırlanarak bu aktif bileşenler açığa çıkartılmaktadır. Çok sayıda farmakolojik etkisi bilinen hiperisin (HPL ekstresinin %0.1 ila 0.15), bu doğal ürün grubuna dahil olan en ilginç bileşiktir (Barnes ve ark., 2001; Patočka, 2003).

Floroglusinoller, Hiperforin (% 2.0 ila 4.5) ve adiperforin (% 0.2 ila 1.9) bileşikleri bitkinin üreme kısımlarında, çiçek ve meyvelerinde yüksek oranda bulunmaktadır. Standartlaştırılmış ekstrelerde oldukça zengin olan hiperforin lipofiliktir, aynı zamanda ısı ve ışığa karşı oldukça değişkendir. Bu ürün grubunda bulunan ve HPL yapraklarından izole edilen hidroperoksikadiforin, bilinen iskelet yapısına ek olarak hidroperokso grubu içerir. (Barnes ve ark., 2001)

Flavonoidler, flavonoller (kemferol, kuersetin), flavonları (luteolin), glikozitleri (hiperozid, izokuersitrin ve rutin), biflavonları (biapigenin, amentoflavon), miersetin, hiperin, oligomerik ve proantosiyananinleri içerir (Klemow ve ark.,2011). Aglikon olarak kuersetin içeren bu yapılar HPL flavonoidlerinin en bilinenleridir (Patočka, 2003). % 2-4 oranında olan flavonoidler içerisinde bilinen en baskın yapılar kuersetine ek olarak, HPL'nin glikozitleri olan hiperosit, rutin, kuersitrin ve izokuersitrindir (Patočka, 2003; Wölfe, 2014). Bitkinin yapısında bulunan flavonoidlerin, ham Hypericumun terapötik etkinliğinden sorumlu olduğu düşünülmektedir ancak aktivite için konsantrasyonlarının yeterli düzeyde olup olmadığı halen tartışılmaktadır (Patočka, 2003).

Biflavonlar, bazı bitkisel kaynaklarda nadiren bulunan, dimerik flavon grubudur. % 0.1-0.5 oranında 3,8'-biapigenin ve % 0.01-0.05 oranında amentoflavon HPL'de bulunan biflavonlardır. Şimdiye kadar HPL'deki biflavonların terapötik önemi ile ilgili pek fazla veri yoktur. Amentoflavonun ayrıca lipoksijenazı etkilemeden siklooksijenazı inhibe ettiği bulunmuştur. Amentoflavonun anti-enflamatuar ve analjezik aktiviteleri de değerlendirilmiş, güçlü bir anti-enflamatuar ve analjezik aktivite göstermiştir (Patočka, 2003).

Fenilpropanlar, esas olarak bazı bitkilerde pumumarik asit ve kafeik asit gibi hidroksisinamik asit esterleri olarak bulunur. Kahve çekirdeklerinde önemli miktarlarda

bulunduğu bilinen polifenolik bileşik olan klorojenik asidin farmakolojik etkisi çok iyi bilinmektedir ancak HPL özütünde tespit edilen klorojenik asidin konsantrasyonu % 1'in altındadır ve bitkinin farmakolojik etkilerinde rolü tam olarak bilinmemektedir. Buna ek olarak HPL'da hemen hemen saptanamayacak miktarda kafeik asit bulunmaktadır (Patočka, 2003).

Proantosiyanidinler, HPL'nin tanen fraksiyonunda bulunurlar ve kırmızı renkli siyanidinlere dönüşmeleri ile ölçülen bu bileşiklerdir. % 2 ila 4 arasında değişen konsantrasyonlar verirler ve konsantrasyonları çiçeklenme öncesi aşamada en yüksektir. Dimerik prosiyanidin B2, dimeriğin yanı sıra, trimerik ve tetramerik prosiyanidinlerle birlikte izole edilmiştir. Proantosiyanidinler antioksidan, antiviral ve antimikrobiyal dahil olmak üzere birçok biyolojik etki sergiler ancak antidepresan etkiye rastlanmamaktadır (Patočka, 2003).

Esansiyel yağlar, % 0,05 ile % 0,9 arasında değişen konsantrasyonlarda bulunur ve bu yağlar esas olarak mono ve seskiterpenlerden, özellikle 2 metiloktan, nonandan, α ve β pinen, α -terpineol, geranil ve eser miktarda myrecene, limonen ve caryophyllene'den oluşur (Wölflle, 2014 ve Patočka, 2003).

Ek olarak, tanenler (% 3 ila % 16 arasında değişir), ksantanlar (1.28 mg / 100g), ve hiperfolin bulunur. İlave bileşikler asitler (nikotinik, miristik, palmitik ve stearik), karotenoidleri, kolin, pektin, hidrokarbonlar ve uzun zincirli alkoller içerir (Wölflle, 2014).

Tablo 1.1 Bilinen aktif bileşiklerin ait olduğu biyokimyasal sınıflar (Greeson, 2001)

Biyokimyasal Sınıf	%	Aktif Madde	%
Naftodiyatron	0.03 - 3.0 (çiçek/filiz)	Hyperisin	0.09
		Pseudohiperforin	0.23
Floroglusinol	2-5 (çiçek/filiz)	Hiperforin	2.0 - 4.5
		Adhiperforin	0.2 - 1.8
Flavonoid	12 (yaprak)	Kuersetin	2.0
	7 (filiz)	Hiperozid	0.7
	2-4 (kök)	Kuersitrin	0.5
		İsokuersitrin	0.3
		Rutin	0.3
		Kemferol	N/A
		Mirisetin	N/A
		Amentoflavon	0.01 - 0.05
		I3,I18-Biapişenin	0.10 - 0.50

Prosiyanidin	12 (hava kısımları) 8 (çiçek/filiz)	Prosiyanidin Katekin Epikatekin Polimer	N/A N/A N/A
Tannin	6-15	Tannik Asit	N/A
Esansiyel Yağ	0.06 - (çiçek/yaprak)	1.0 Terpen, alkol	N/A
Amino asit	0.01	GABA Sistein Glutamin Lösin Lizin Ornitin Prolin Treonin	0.0007 N/A N/A N/A N/A N/A N/A N/A
Fenilpropan	0.1	Kafeik Asit Klorojenik Asit	0.1 <0.1
Ksanton	0.01(Kök) 0.0004 (Yaprak/Sap)	Kielcorin, Norathyriol	N/A
Diğer (suda çözünenler)	0.5	Organik Asit, peptit ve polisakkaritler	N/A

1.2.1.4.Farmakolojik etkileri

Yüzyıllardır tıbbi olarak değer gören ve günümüzde de oldukça sık kullanılan bir bitki olan HPL farmakolojik aktivitelerine dair çok sayıda çalışmaya sahiptir. HPL'den hazırlanan ekstreler ve tentürlerin etkili olduğu çeşitli olgular vardır. HPL üzerindeki farmakolojik çalışmalar, başlangıçta hiperisin ve hiperforine atfedilen antidepresan aktiviteye odaklanmıştır. Ancak sonralarda in vivo anti-sistemik uygulamayı takiben enflamatuar özelliklerinin araştırılması gündeme gelmiştir (Shipochliev ve ark., 1981; Kumar ve ark., 2001; Raso ve ark., 2002; Abdel-Salam 2005).

Anti-depresan Özelliği; Sarı kantaronun uykusuzluk, tedirginlik, depresif ruh hali için halk arasında çay formuna getirilerek tüketimi yüzyıllarca ilgi görmüş ve şimdilerde, hafif ve orta şiddette depresyona karşı etkinliği ile tekrar ilgi odağı olmuştur, standart antidepresanlarla karşılaştırılabilir olmakla birlikte daha az yan etkisi ile dikkat çekmektedir. Bu yaygın kullanım sebebi ile bitkinin ekstrelerinin ve bileşenlerinin anti-depresan özelliği kapsamlı olarak araştırılmıştır (Sosa ve ark., 2007).

Depresyonun ana biyokimyasal hipotezi, serebral monoamin nörotransmitterlerinin (dopamin, norepinefrin ve serotonin) fonksiyonel eksikliği üzerine kuruludur. HPL

antidepresan aktivitesi Katekol-O-metiltransferaz (COMT) enzimi ile de ilişkilendirilmiş ancak beyindeki nörotransmitterlerin oksidatif deaminasyonunu katalize eden monoamin oksidazların (MAO) inhibisyonu ile gösterilmiştir (Tusevski ve ark., 2018; Mennini ve ark., 2004). HPL'nin antidepresan etkisinin mekanizması ile ilgili başlangıçta hiperisin üzerine odaklanılmıştır sonrasında deneysel ve klinik kanıtlar ile hiperforinin antidepresan aktivitesi için gerekli ana bileşenlerden biri olduğu ortaya konmuştur (Barnes ve ark., 2001; Mennini ve ark., 2004). HPLEkstrelerinin MAO inhibe edici özellikleri üzerine yapılan kapsamlı araştırmalar, bazı flavonollerin ve ksanfonların, önemli antidepresanlar olarak önerilebileceğini göstermiştir. Ek olarak depresyonun, bilişsel anormallik ve nörodejenerasyon ile karakterize olan Alzheimer ve Parkinson hastalıkları ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Tusevski ve ark., 2018).

Anti-enflamatuar ve Analjezik özellikleri; Yüzyıllar önce bitki bilimciler yaraları tedavi etmek ve ağrıyı hafifletmek için HPL ekstrelerini önermişlerdir (Foster, 2000; Castleman, 2001). Sarı kantaronun anti-enflamatuar ve yara iyileştirici özellikleri sebebiyle halk arasında geleneksel olarak kullanımı yaygındır; dermatit, döküntüler, yanıklar, yaraların topikal tedavisinde yararlı olduğu bilinen bitkininkullanımı için en popüler preparat, bitkinin üst kısımlarını bitkisel yağ ile birleştirerek elde edilen sarı kantaron yağıdır (Bombardelli ve Morazzoni, 1995; Schempp ve ark., 2002).

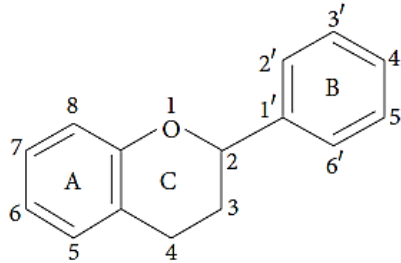
In vitro çalışmalar, HPL ekstraktlarının veya saf bileşenlerinin enflamatuar reaksiyonlarda yer alan bazı olayları inhibe ettiğini göstermiştir. Özellikle, HPL özütlerinin serbest radikal üretimine etki ettiği (Hunt ve ark., 2001) ve myeloperoksidaz (Pabuçcuoğlu ve ark., 2003), siklooksijenaz-1, 5-lipoksijenaz (Albert ve ark., 2002),siklooksijenaz-2 ve nitrikoksitsentaz (NOS) gibi enflamasyonla ilişkili enzimleri inhibe ettiği gösterilmiştir. (Raso ve ark., 2002; Tedeschi ve ark., 2003). Bu faaliyetinin yanı sıra; belirgin antimikrobiyal, antiviral, anti HIV / anti-AIDS ve antitümoral aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Öztürk ve ark., 2007). HPL bitkisinin farklı birçok farmakolojik etkisi araştırılmıştır ve aktivitelerin bir kısmı flavonoidlere atfedilmiştir.

1.2.2. Flavonoidler

Flavonoidler; özellikle meyvelerde, sebzelerde yaygın olarak bulunan polifenolik yapıya sahip önemli bir doğal ürün sınıfıdır (Panche ve ark., 2016). Mevcut raporlar bu ikincil metabolitlerin farmakolojik aktivitelerin çeşitliliğinden sorumlu olduğunu göstermektedir (Mahomoodally ve ark., 2005). Flavonoidler, bir benzo- γ -pirone yapısına sahiptir ve mikrobiyal enfeksiyona cevap olarak bitkiler tarafından sentezlenen hidroksillenmiş fenolik maddelerdir (Dixon ve ark., 1983). Flavonoidlerin faaliyetleri yapılarına bağlıdır. Kimyasal yapıları ise yapısal sınıfları, hidroksilasyon dereceleri, diğer ikamelerin konjugasyonların ve polimerizasyonların dereceleri ile ilişkilidir (Kelly ve ark., 2002). Son dönemde flavonoidlere olan ilgi, bu polifenolik bileşiklerin antioksidan faaliyetlerinden kaynaklanan potansiyel sağlık yararları sebebi ile artmıştır. Bu bileşiklerin fonksiyonel hidroksil grupları serbest radikalleri temizleyerek ve/veya metal iyonlarını şelatlayarak antioksidan etkilere aracılık eder (Kumar ve ark., 2013).

1.2.2.1. Flavonoidlerin yapısı ve sınıflandırılması

Flavonoidler değişken fenolik yapıya sahip, bitkilerde bulunan bir grup doğal bileşiktir. Şimdiye kadar 4000'den fazla flavonoid çeşidi tanımlanmıştır (Lopez ve ark., 2001)



Şekil 1.3 Temel flavonoid halkası (Kumar ve ark., 2013)

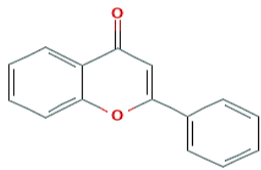
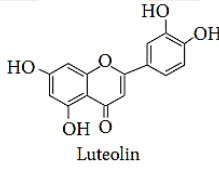
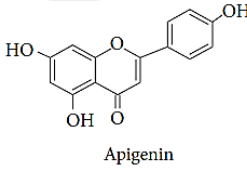
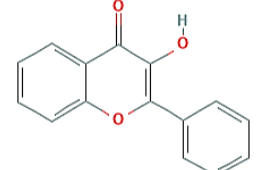
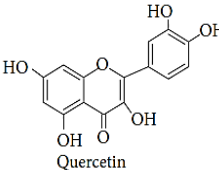
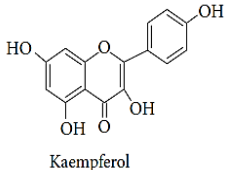
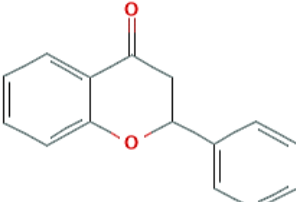
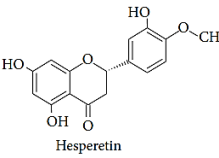
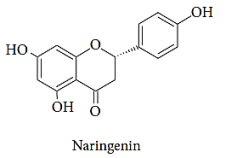
Kimyasal olarak flavonoidler, heterosiklik bir piron halkası (C) ile bağlanmış iki benzen halkasından (A ve B) oluşan on beş karbonlu bir iskelete dayanmaktadır. Genel yapıları Tablo 1.3.'de gösterilmektedir. Flavonoidler C halkasının oksidasyonu ve doymamışlık derecelerine göre alt gruplara ayrılırken, bir sınıf içindeki tek tek bileşiklerde ise A ve B halkalarının ikame modelinde farklılık gösterir (Kumar ve ark., 2013).

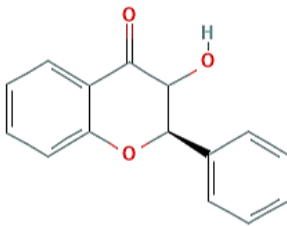
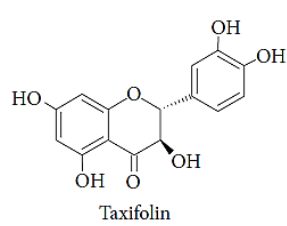
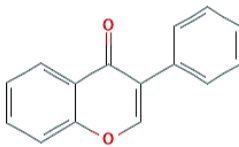
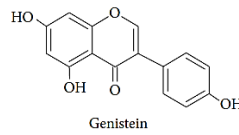
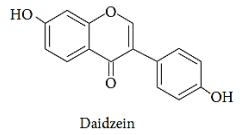
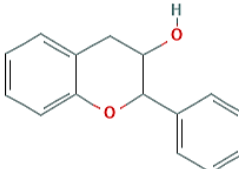
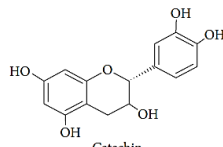
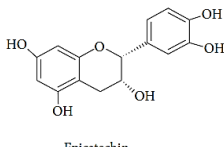
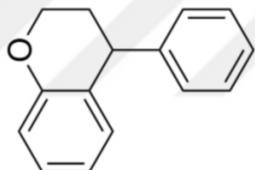
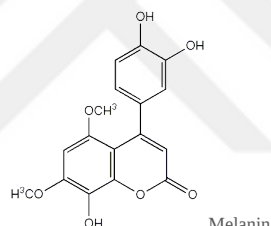
Flavonoidler aglikonlar, glikozitler ve metillenmiş türevler olarak ortaya çıkar. Temel flavonoid yapısı aglikondur, benzen halkası ile yoğunlaştırılmış altı üyeli halka ya α -

pirondur ya da dihidro türevidir (Kumar ve ark., 2013). Yükseltgenme durumu göz önüne alındığında, halka yapısı heterosiklik bir piron veya bir piron olabilir. Heterosiklik pironlar, doymamış bağlara sahip olmayan **flavan-3-ol**'ları veya 2 çift bağ ile **antosiyanidin**leri içerir. Pironlar C4'te bir karbonil kalıntısı ile birlikte C2=C3 çift bağı ve C3'te bir hidroksil grubu içeriyorsa **flavonol**, yalnızca C2=C3 çift bağı içeriyorsa **flavon**, C2=C3 çift bağını içermiyorsa **flavanon**, C2=C3 çift bağına sahip ancak B halkasının C halkasına bağlantısı C2 yerine C3 konumundaysa **izoflavon**, C3=C4 çift bağ ve C4 yerine C3 konumunda karbonil grubu içeriyor ancak B halkasının bağlantısı C4 konumundaysa **neoflavonoid** olarak adlandırılmaktadır (Costa ve ark., 2012).

Sarı kantaron bitkisi flavonoid bakımından oldukça zengindir, %11,71 oranında çiçeklerinde, %7,4 oranında yaprak ve sap kısımlarındadır (Zou ve ark., 2004).

Tablo 1.2 Flavonoid Yapıları (Kumar ve ark., 2013)

Sınıfları	Yapı Omurgası	Örnekler
Flavon		 Luteolin  Apigenin
Flavonol		 Quercetin  Kaempferol
Flavanon		 Hesperetin  Naringenin

Flavanonol		 Taxifolin	
İzoflavon		 Genistein	 Daidzein
Flavan-3-ol		 Catechin	 Epicatechin
Neoflavonoid		 Melanin	

1.2.2.2. Flavonoidlerin farmakolojik özellikleri

Flavonoidler, sağlığa yararlı olan geniş bir etki yelpazesine sahiptir ayrıca çeşitli nutrasötik, farmasötik, tıbbi ve kozmetik uygulamalarda vazgeçilmez bileşenlerdir. Bunun nedeni, temel hücresel enzim fonksiyonlarını modüle etme kapasiteleri ile birlikte serbest radikal süpürücü özelliğiyle güçlü birer antioksidan olmalarıdır (Pache ve ark., 2016). *In vivo* ve *in vitro* olarak yapılan çalışmalar, flavonoidlerin antioksidan aktivitelerinin yanı sıra anti-enflamatuar, antipiretik, antialerjik, antiulser, antibakteriyel, antikanser, antiviral, antiprotozoal, antiplateletler, antiaterojenik aktivitelere de sahip olduğunu ortaya koymuştur (Xiao ve ark.,2016). Alzheimer hastalığı (AD), damar sertleşmesi (ateroskleroz) gibi çeşitli hastalıklarla ilişkili çeşitli olumlu biyokimyasal etkileri vardır ayrıca enflamasyondan sorumlu siklooksijenaz

(COX) ve lipoksijenaz (LOX) gibi enzimler için güçlü inhibitör oldukları bilinmektedir (Pache ve ark., 2016). Birçok farklı aktiviteye sahip olan flavanoidlerin metal şelatlama ve serbest radikal süpürme yeteneği ile en iyi tanımlanan özelliği antioksidan etkisidir.

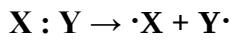
1.2.3. Antioksidan etki

1.2.3.1. Serbest radikaller

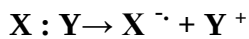
Serbest radikaller insan vücudundaki normal metabolik işlemler sırasında ortaya çıkar veya dış kaynaklardan elde edilir. Serbest radikaller, diğer moleküller ile kimyasal reaksiyonlara giren kararsız ve oldukça aktif eşleşmemiş elektronlu atomlar, moleküller veya iyonlardır (Kostova ve ark., 2011; Altan ve ark., 2006). Biyolojik sistemde serbest radikaller genellikle oksijen, azot ve kükürt içeren moleküllerden türetilir. Bu serbest radikaller; reaktif oksijen türleri (ROT), reaktif azot türleri (RNT) ve reaktif kükürt türleri (RST) olarak adlandırılan molekül gruplarının parçalarıdır (Kostova ve ark., 2011). ROT; süperoksit anyon (O_2^-), perhidroksil radikal ($OOH^\cdot$), hidroksil radikal ($HO^\cdot$), alkoksil ($RO^\cdot$), nitrik oksit (NO), hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (1O_2), hipoklorik asit (CIO) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi serbest radikalleri içerir (Zou ve ark., 2004; Kostova ve ark., 2011). RNT; nitrik oksitten elde edilir. RST; ROT ile reaksiyona girerek tiyollerden kolayca oluşturulur.

Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir (Altan ve ark., 2006):

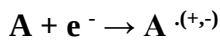
1. Kovalent bağ bulunduran normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar. Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır.



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



1.2.3.2. Oksidatif stres

ROT, hücresel metabolizma ve fonksiyonel faaliyetler sırasında üretilir ve hücre sinyalleme, apoptoz, gen ekspresyonu ve iyon taşınmasında önemli rol oynar. Bununla birlikte aşırı miktarda ROT üretimi proteinler, lipitler, RNA, DNA ve karbonhidratlar dahil birçok molekül üzerinde çok küçük ve çok reaktif oldukları için zararlı etkilere sebep olurlar (Kostova ve ark., 2011). Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır (Mladenovic ve ark., 2011). Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur (Altan ve ark., 2006). Eşzamanlı iyonik dengesizlik, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve kaspaz / kalpin kaskadlarının aktivasyonu hücreleri ölüme sürükler. ‘Oksidatif stres’ olarak adlandırılan ve doku hasarına yol açan bu durum serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizlik olarak özetlenebilir (Altan ve ark., 2006; Kostova ve ark., 2011). Bozulan denge sonucu ortaya çıkan oksidatif stres inflamatuvar hastalık, kardiyovasküler hastalık, kanser, diyabet, Alzheimer hastalığı, katarakt, otizm ve yaşlanma patojenezine önemli ölçüde katkıda bulunur (Kostova ve ark., 2011).

1.2.3.3. Antioksidan savunma sistemleri

Antioksidanlar, radikalın eşleşmemiş halini ortadan kaldırmak için elektron kabul ederek veya vererek serbest radikalleri etkisiz hale getiren moleküllerdir. Antioksidanlar reaktif radikallerle doğrudan reaksiyona girip onları yok edebilirken; nötralize ettikleri radikallerden daha tehlikesiz, aktivitesi düşük, uzun ömürlü yeni serbest radikallere dönüşebilir (Kostova ve ark., 2011).

ROT’ların üretimini ve bunların hücrelerde meydana getirdiği hasarı önlemek amacıyla vücutta “antioksidan savunma sistemleri” olarak bilinen çeşitli savunma mekanizmaları geliştirilmiştir (Altan ve ark., 2006).

Tablo 1.3 Antioksidan Savunma Sistemleri (Altan ve ark., 2006)

Süpürücü Antioksidanlar	Enzimatik Antioksidanlar	Sentetik Antioksidanlar	Önleyici Antioksidanlar
Askorbik Asit	Katalaz	N-asetilsistein	Transferrin
α - tokoferol	Paraoksonaz	Allopurinol	Albümin
Tiyoller	Süperoksit dismutaz	Probakol	Seruloplazmin
Beta-karoten	Glutasyon peroksidaz	Penisilamin	Ferritin
Ürik Asit		Deferoksamin	
Flavonoidler		Butil-Hidroksitoluen	
Ko-enzim Q			

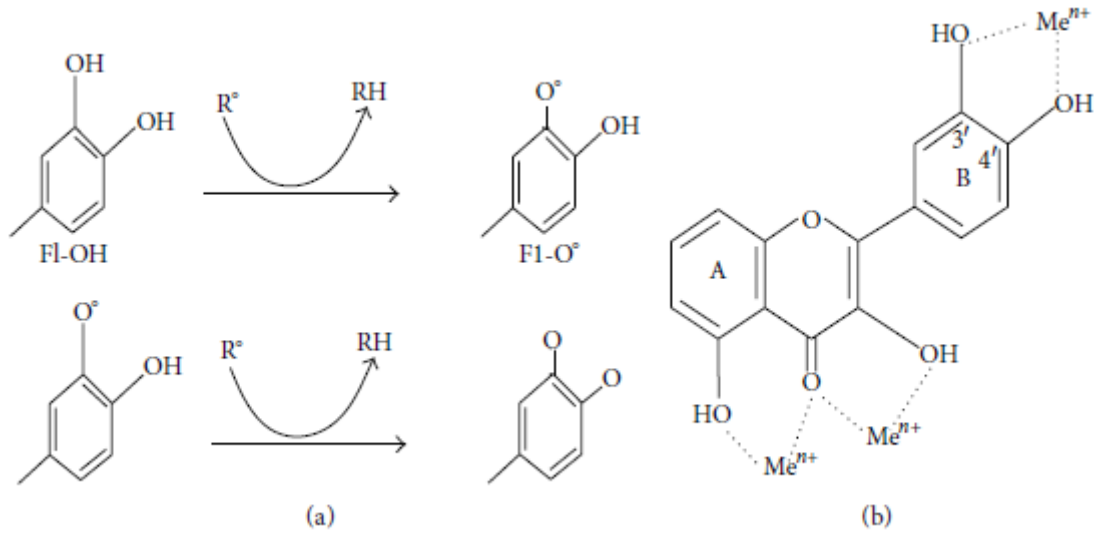
Son yıllarda, antioksidan üzerine yapılan araştırmalar hastalığın önlenmesi ve sağlığın teşviki ve geliştirilmesi konusundaki potansiyel faydası nedeniyle çarpıcı biçimde genişlemiştir (Kostova ve ark., 2011).

1.2.3.3. Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi

Neredeyse her flavonoid grubu antioksidan görevi görme kapasitesine sahiptir. Flavonların ve kateşinlerin, vücudu reaktif oksijen türlerine karşı korumak için en güçlü flavonoidler olduğu bildirilmiştir (Panche ve ark., 2016). Flavonoidler serbest radikallerin neden olduğu hasarı çeşitli şekillerde önleyebilir ve bunlardan biri de serbest radikallerin doğrudan temizlenmesidir. Flavonoidler, radikallerle oksitlenir ve daha stabil, daha az reaktif bir radikal elde edilir, başka bir deyişle flavonoidler radikalın reaktif bileşiği ile reaksiyona girerek reaktif oksijen türlerini stabilize eder (Korkina ve Afanasev, 1997). Epikatekin ve rutin gibi flavonoidlerin güçlü radikal temizleyicileri olduğunu ve rutinın temizleme kabiliyetinin Ksantin oksidaz (XO) enzimi üzerindeki inhibe edici aktivitesinden kaynaklanabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Kerry ve Abbey, 1997). ROT artışı endojen süpürücü bileşiklerin tüketilmesine ve tükenmesine neden olur, flavonoidler ise endojen süpürücü bileşiklere destekleyici etkiye sahiptir (Panche ve ark., 2016).

Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi, fonksiyonel grupların nükleer yapı ile ilgili düzenlenişine bağlıdır. Yapılandırma, ikame ve toplam hidroksil gruplarının sayısı, radikal süpürme ve metal iyonu kenetleme kabiliyeti gibi birçok antioksidan aktivite mekanizmasını büyük ölçüde etkilemektedir (Kelly ve ark., 2002). B halkası hidroksil konfigürasyonu ROT ve RNT 'nin temizlenmesinin en önemli belirleyicisidir çünkü

hidrojenini ve bir elektronunu hidroksil, peroksil ve peroksinit radikallerine bağışlar, stabilize eder ve nispeten stabil bir flavonoid radikali oluşturur (Cao ve ark., 1997). Düşük redoks potansiyelleri nedeniyle flavonoidler (Fl-OH), hidrojen atomu bağışıyla, süperoksit, peroksil, alkoksil ve hidroksil radikalleri gibi yüksek oranda oksitleyici serbest radikalleri (2.13-1.0V aralığında redoks potansiyelleri) azaltabilir (Şekil 1.4-a). Metal iyonlarını (demir, bakır, vb.) şelatlama kapasiteleri nedeniyle, flavonoidler ayrıca serbest radikal oluşumunu da engeller. Özellikle kuersetin, demir şelatlayıcı özellikleriyle iyi bilinmektedir ve iz metaller, flavonoid yapıların farklı halkalarına spesifik bir şekilde bağlanır (şekil 1.4-b) (Kumar ve ark., 2013).



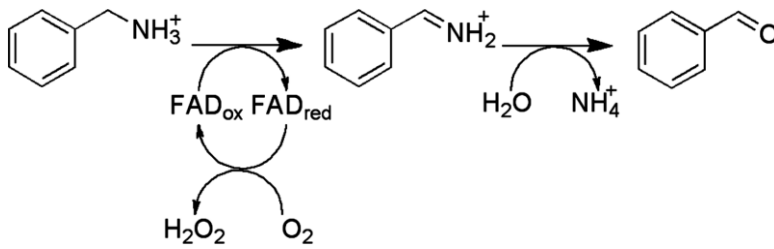
Şekil 1.4 (a) ROT 'nin flavonoidler (Fl-OH) ile temizlenmesi, (b) Me^{n+} 'in metal iyonunu gösterdiği iz metaller için bağlanma bölgeleri (Kumar ve ark., 2013)

B halkasındaki 3', 4'-katekol yapısı, lipid peroksidasyonunun inhibisyonunu kesin olarak artırır. Flavonoidlerin bu özelliği, onları en etkili peroksil, süperoksit ve peroksinit radikal temizleyicileri haline getirir (Kelly ve ark., 2002). Epikateşin ve rutin güçlü radikal temizleyicilerdir ve in vitro lipid peroksidasyon inhibitörleridir (Kerry ve Abbey, 1997). Katekol grubuna sahip olan flavonoidlerin B halkası üzerindeki oksidasyon nedeniyle, kuvvetli temizleyiciler olan oldukça stabil bir semikinon radikal oluşur. Oksidasyonda katekol sistemi bulunmayan flavonlar, dengesiz radikallerin oluşumuna neden olur ve zayıf süpürme potansiyeli gösterir. A ve B halkaları arasındaki birleşme, flavonoid radikale kararlılık sağlayan aromatik çekirdeğin rezonans etkisine de izin verir (Kumar ve ark., 2013).

1.2.4. Monoamin oksidaz (MAO)

Monoamin oksidazlar (MAO; EC 1.4.3.4) primer, sekonder ve tersiyer aminlerin oksidatif deaminasyonunu katalize eden, flavin-adenozin-dinükleotit (FAD) içeren, nöronal, glial ve diğer hücrelerde dış mitokondri zarında bulunan enzimlerdir. 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP), diyet aminler (p-tiramin) ve hormonlar gibi potansiyel toksik eksojen aminlerin metabolizmasında rol oynarlar. Ayrıca, serotonin (5-HT), dopamin (DA), norepinefrin (NE) ve epinefrin (E) gibi monoamin nörotransmitterlerinin konsantrasyonunu kontrol eder ve oksidatif deaminasyonunu katalizler (Carrodori ve Ascenzio, 2014; Abdelhafez ve ark.,2013). Sonuç olarak, reaksiyon aldehit veya hidrojen peroksit ya da amonyak üretir (Herraiz ve ark., 2017).

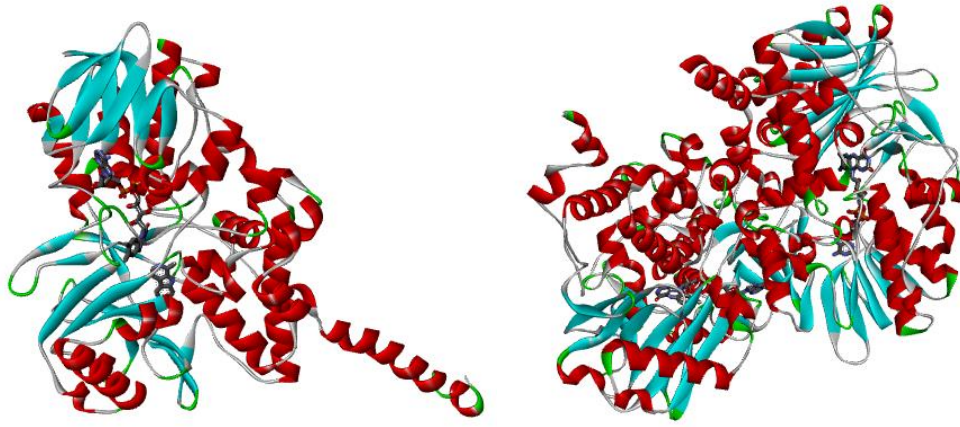
MAO'lar aminlerin karşılık gelen iminlere oksidasyonunu katalize eder ve oksitlenmiş ürünleri enzimatik olmayan şekilde ilgili aldehitler veya ketonlara hidrolize eder (Şekil 1.5). MAO reaksiyonunu içeren metabolik yol, indirgenen flavin kofaktörünün moleküler oksijen tarafından tekrar oksitlenmesi ve hidrojen peroksit çıkışı ile tamamlanır. Açığa çıkan hidrojen peroksit reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açarak mitokondriyal hasara ve nöronların ölümüne neden olabilir (Gaweska ve ark., 2011).



Şekil 1.5 Reaksiyon kataliz mekanizması (Gaweska ve ark., 2011)

1.2.4.1.MAO-A ve MAO-B izoenzimleri

MAO enzimi MAO-A ve MAO-B olarak adlandırılan, farklı genlerden sentezlenen ve yaklaşık olarak % 70 oranında benzer amino asit diziliminde olan iki fonksiyonel izoenzime sahiptir ve enzimin bu iki formu substrat tercihi, inhibitör spesifikliğı, doku dağılımı, immünolojik özellikler ve amino asit dizilerindeki farklılıklar ile ayırt edilebilir (Edmondson ve ark., 2004 ; Youdim ve ark., 2006 ; Abdelhafez ve ark., 2013).



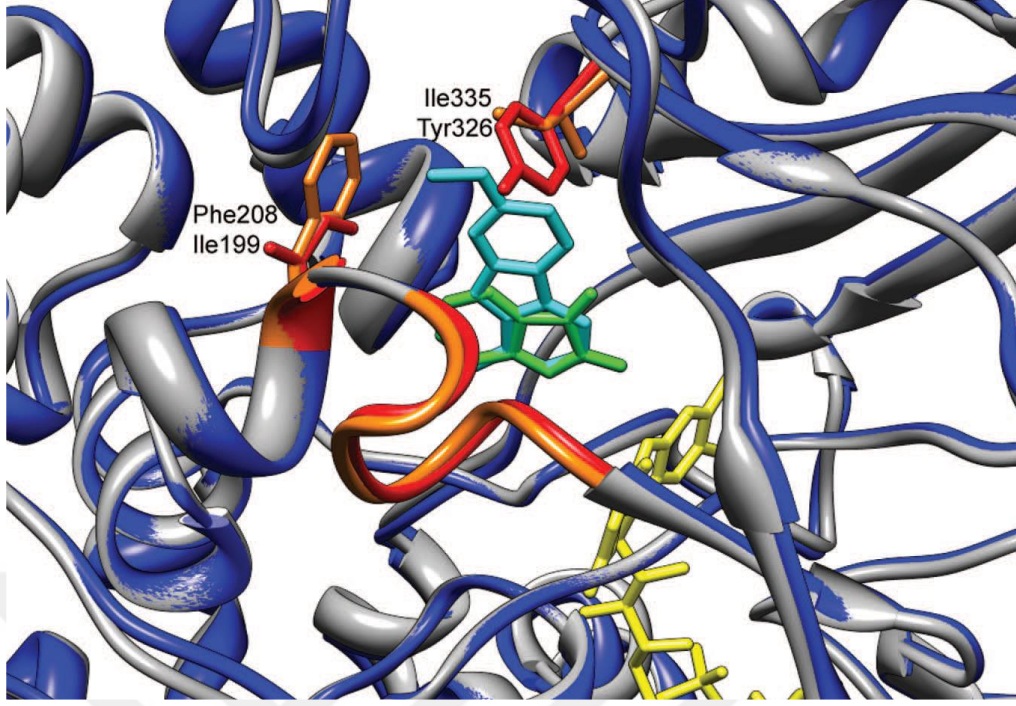
Şekil 1.6 a) MAO-A Enzimi (PDB kodu: 2Z5X) ve b) MAO-B Enzimi (PDB kodu: 2XFN) Kristal Yapıları

X kromozomunda (Xp11.23) bulunan ve her biri aynı intron-ekson organizasyonuna sahip 15 ekzon içeren ayrı genler tarafından kodlanır. Çekirdek promotör bölgelerindeki farklılıklar, bazı hormonların değişken etkilerini ve MAOA – MAOB genlerinin farklı ekspresyonunu açıklayabilir (Youdim ve ark., 2006). Her iki enzim de oksidatif olarak dopamini deamine eder, MAO-A tercihen serotonin, epinefrin ve norepinefrini deamine eder ve seçici olarak klorgilin ile inhibe edilir. MAO-B ise tercihen benzilamin ve b-fenetilamini (PEA) metabolize eder ve seçici olarak selegilin ve rasagilin tarafından inhibe edilir (Abdelhafez ve ark., 2013). MAO-A psikiyatrik durumlar ve depresyonla, MAO-B ise Parkinson ve Alzheimer da dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (Herraiz ve ark., 2017; Larit ve ark., 2018).

MAO-A ve MAO-B'nin substrat bağlama bölgeleri aromatik ve alifatik kalıntılar ile çevrili hidrofobik bir bölgedir. Dikkat çeken bir istisna, flavin kofaktörünün N5 atomunu da bağlayan, bir su molekülü ile de etkileşime giren korunmuş lizindir (MAO-B'de Lys296 ve MAO-A'da Lys305). MAO B'deki Tyr398 ve Tyr435, MAO A'daki Tyr407 ve Tyr444, kovalent olarak bağlı inhibitörlerin ve substratların zıt taraflarında bulunur ve '**aromatik kafes**' oluşturarak bu kalıntıların mutasyonuna etki eder. Bu tirozinlerin, substratı oksidasyona yönlendirmek veya nükleofilikliğini artırarak amini aktif hale getirmek için önerildiği bilinmektedir (Akyüz ve Erdem, 2007; Gaweska ve ark., 2011).

MAO-A ve MAO-B izozimlerinin kristal yapıları farklılık gösterir. MAO-B dimer olarak kristallenirken, MAO-A monomer olarak kristallenir. Kristal yapılarda görülen bu farklılığın temeli MAO-A'daki lizin amino asidinin MAO-B'deki dimer ara yüzeyindeki varlığıdır. 151 nolu pozisyonunda bulunan lizin MAO-A'nın monomer halinde kristallenmesine sebep olur (Youdim ve ark., 2006). Oldukça hidrofobik tek bir substrat bağlanma bölgesi içeren MAO-A'nın kısa ve geniş bir substrat boşluğuna sahip olan aktif bölgesinin hacmi 550 Å³'tür, aktif bölgesi dar ve uzun bir substrat boşluğuna sahip olan MAO-B'nin hacmi ise yaklaşık olarak 700 Å³'tür. MAO B'de, '**giriş boşluğu**' olarak adlandırılan daha küçük ek bir hidrofobik oyuk, ana substrat bağlama bölgesi arasına yerleşir ve protein yüzeyi; bir izolösün kalıntısının (Ile199) döndürülmesiyle iki oyuğun 700 Å³'luk daha büyük bir bölge içinde kaynaşmasına izin verir. Bu yapı ve hacim farklılığı inhibitör seçiminde etkili olduğu düşünülmektedir. MAO A'daki fenilalanin (Phe208), MAO B'nin izolösini (Ile199) ile değişir. İki enzimin substrat bağlanma bölgelerindeki bir başka fark MAO A'da Ile335'e karşılık MAO B'de Tyr326'dır; bu tortular, iki enzimin substrat ve inhibitör seçiciliğine katkıda bulunur (Youdim ve ark., 2006; Gaweska ve ark., 2011).

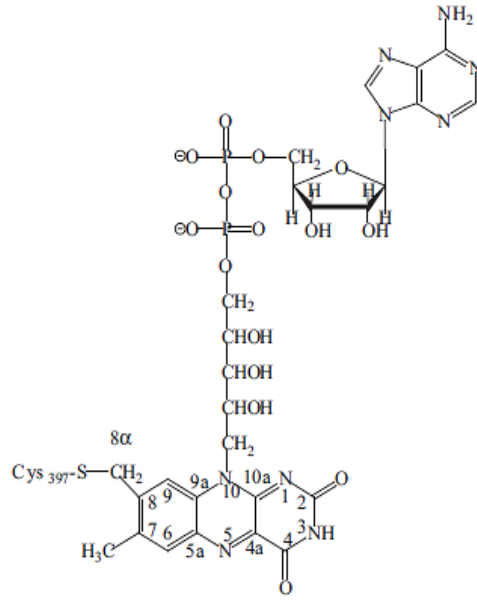
İnsan MAO-A ve MAO-B'sinin aktif bölgesinde 20 adet amino asit bulunmaktadır. Her iki izoenzimde aktif bölgeyi oluşturan bu amino asitlerden sadece 7 tanesi farklılık göstermektedir. Substrat spesifikliğini etkileyen iki enzimin aktif bölgelerindeki kalıntı farklılıklarını vurgulamak ve iki enzimde korunmuş görünen substratavite oluşturma döngüsünü daha iyi tanımlamak için iki izozim üst üste çatıştırılıp renklendirilerek gösterilmiştir (Şekil1.7). MAO-B izozimi mavi renk ile, MAO-A izozimi gri renk ile, inhibitör olan isatin yeşil renk ile, flavin kofaktörü ise sarı renk ile gösterilmiştir. MAO B kalıntıları (Ile199 ve Tyr326) kırmızı, MAO A kalıntıları (Phe208 ve Ile335) turuncu renktedir (Gaweska ve ark., 2011; Edmonson ve ark., 2004).



Şekil 1.7MAO A ve MAO B substrat bağlama bölgelerinin yerleşimi (Gaweska ve ark., 2011)

1.2.4.2. FAD yapısı

Hem MAO-A hem de MAO-B, kataliz için kesinlikle gerekli olan tek redoks kofaktörü olarak kovalent bağlı FAD içerir, yapısı Şekil 1.8’de verilmiştir. Flavin'in her iki enzime kovalent bağlanma bölgesi, bir sisteinil kalıntısı ve izoalloksazin halkasının 8 α -metilen arasındaki tiyoeter bağı üzerinden ilerler. Sistein kaynaklı disülfid bağı MAO-B'de Cys397, MAO-A'da Cys406 kalıntısı ile ilişilidir. Her iki enzimde bu kovalent bağlanma bölgesi molekülün C terminal kısmına doğru uzanır. Karboksil terminal bölgesinin (kalıntı 461-520), 27 nolu kalıntısının bir membran α -sarmalından membran bağlama bölgesi olduğu tahmin edilmektedir (Edmondson ve ark., 2004).

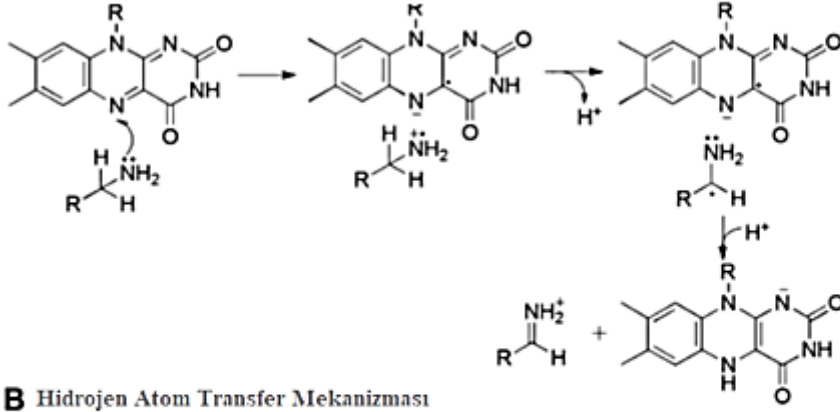


Şekil 1.8 MAO enzimidaki kovalent bağlı FAD yapısı (Edmonson ve ark., 2004)

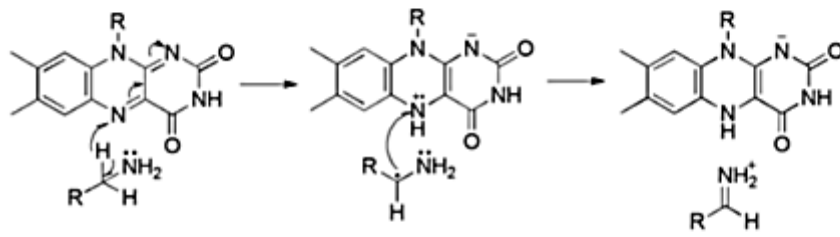
1.2.4.4.MAO'nun aminleri oksitleme mekanizmaları

Flavin kofaktörünün bir veya iki elektronu kabul etme kabiliyeti nedeniyle, elektronların substrattan kofaktöre aktarılması için birkaç mekanizma önerilmiştir (Şekil 1.8). Tek elektron transfer mekanizması (Şekil 1.9A), daha sonra bir hidrojen atomu eşdeğerinin transferiyle birlikte, semikuinon (iki oksijen atomundan birinin iyonize edildiği veya bir hidrojen atomuna bağlı olduğu bir kinondan türetilmiş bir bileşik) flavin ve aminium katyon radikal ara maddelerin oluşumunu içerir (Silverman ve ark., 1980). Substrat α -karbondan flavine direkt olarak veya flavin olmayan bir radikal yoluyla doğrudan hidrojen atomu transferi (Şekil 1.9B) substrat oksidasyonu için bir başka olası mekanizmadır (Edmondson, 1995). Substratın amino grubunun flavinin C4a'sına saldırdığı, kovalent bir ara madde oluşturan, ardından bir aktif bölge bazı tarafından proton soyutlamasını yapan nükleofilik mekanizmanın (Şekil 1.9C) varyasyonları da önerilmiştir (Kim ve ark., 1993; Erdem ve ark., 2006; Atalay ve Erdem, 2013). Son olarak, reaksiyon substrattan flavin'e doğrudan hidrür transferi (Şekil 1.9D) ile gerçekleşebileceği belirtilmiştir (Fitzpatrick, 2010; Akyüz ve Erdem, 2013; Cakir ve ark., 2016)

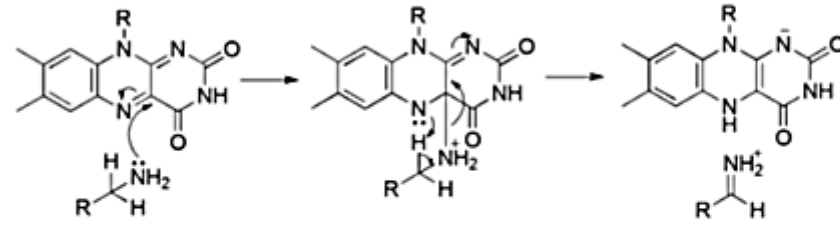
A Tek Elektron Transfer Mekanizması



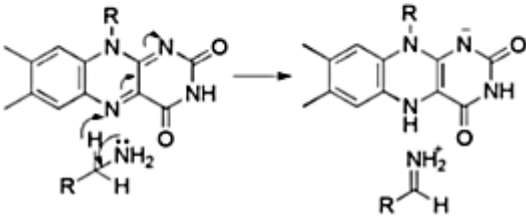
B Hidrojen Atom Transfer Mekanizması



C Nükleofilik Mekanizma



D Hidrür Transfer Mekanizması



Şekil 1.9MAO enzim ailesi tarafından amin oksidasyonu için önerilen mekanizmalar (Gaweska ve ark., 2011)

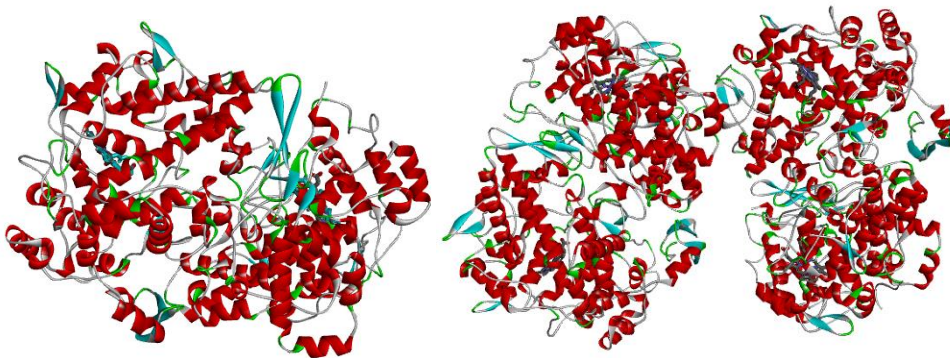
1.2.5 Siklooksijenaz (COX)

Siklooksijenaz (COX, EC 1.14.99.1) prostaglandin endoperoksit sentaz (PTGS) olarak bilinen, prostasiklin ve tromboksan gibi prostaglandinler dahil olmak üzere prostanoidlerin öncüsü olan araşidonik asidin prostaglandin H2'ye (PGH2) dönüşümünden sorumlu bir membran enzimidir (Rouzer and Marnett 2009; Chubb ve ark., 2006). Bu lipid araçları, mitojenez, ateş oluşumu, ağrı tepkisi, lenfosit kemotaksisi,

doğurganlık ve vazokonstriksiyon (damar büzülmesi) ve vazodilatasyon (damar genişlemesi) gibi çelişkili uyarıların yanı sıra, trombosit toplanması ve durması gibi normal fizyolojide de görevlidir. COX enzimi; iltihap, kolon, akciğer ve meme kanseri, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığına ek olarak ateroskleroz (damar sertliği), tromboz (pıhtı kaynaklı damar tıkanması), miyokard enfarktüsü (kalp krizi) ve inme dahil olmak üzere çok sayıda kardiyovasküler hastalığın patolojisinde yer almaktadır (Chubb ve ark., 2006). "Prostaglandin sentaz (PHS)", "Prostaglandin sentetaz (PHS)" isimleri hala kullanılan eski terimleridir. Bu proteinler ailesi tıpta "COX" kök sembolü olarak karşımıza çıkarken, genetikte "PTGS" kökü kullanılmaktadır (Rouzer ve Marnett, 2009).

1.2.5.1. COX-1 ve COX-2 izozimleri

COX-1 enzimi 1970'lerde ilk defa sığır veziküler bezlerinden saflaştırılmıştır. PGHS-1 geni tarafından kodlanan 574 amino aside sahip olan COX-1enzimi keşfedildikten sonra 1991 yılında PGHS-2 geni tarafından kodlanan 587 aminoaside sahip COX-2 formu keşfedilmiş (Şekil 1.9) ve her iki form için birçok biyokimyasal çalışma yapılmıştır (Rouzer and Marnett, 2009; Smith ve Murphy 2016). Bilinen 3 izozimden COX-1 ve COX-2 insanda işlevseldir, bir de PTGS1 (COX1) geni tarafından kodlanan, ancak insanlarda işlevsel olmayan COX-3 enzimi mevcuttur (Rouzer and Marnett 2009). Aynı türden PGHS-1 ve PGHS-2, % 60 oranında özdeş olan amino asit dizilerine sahiptir. İzofomlar arasındaki ana dizi farklılıkları, sinyal peptitlerinde ve membran bağlama alanlarındadır (Smith ve Murphy, 2016).



Şekil 1.10a) COX-1 Enzimi (PDB kodu: 1Q4G) ve b) COX-2 Enzimi (PDB Kodu: 3L1N)

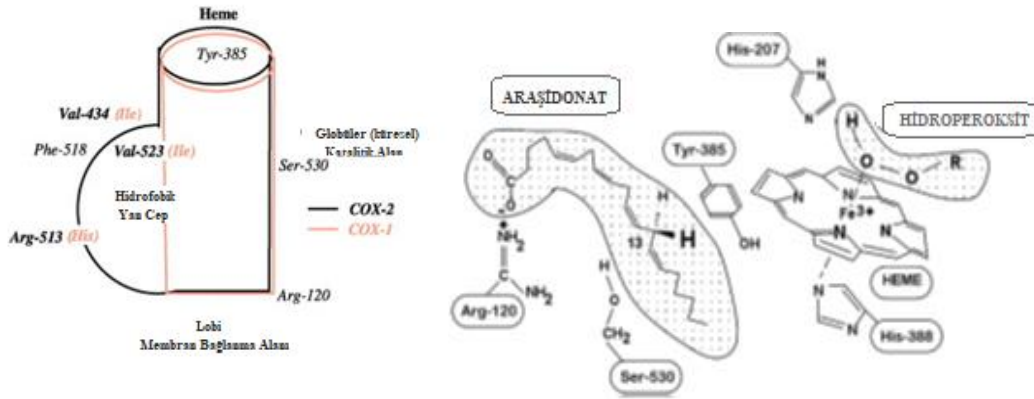
İzozim COX-1, çoğu dokularda yapısal olarak ifade edilir ve trombosit agregasyonu ve mide-barsak yolu ile böbreğin homeostazı gibi fizyolojik işlevlerinin düzenlenmesinde yer alır. Buna karşılık ikinci izoform olan COX-2 ise indüklenebilir. Sağlıklı insanda neredeyse tespit edilemeyen sitokinler, büyüme faktörleri, tümör destekleyici ajanlar, bakteriyel endotoksin gibi pro-inflamatuar uyaranlara yanıt olarak enflamatuar hücrelerde COX-2'nin ekspresyonu hızla indüklenir. Özetle COX-1, enflamasyon süreçlerine katkıda bulunabilirken, COX-2, birkaç doku ve organda yapısal olarak eksprese edilebilir (Charlier ve Michaux, 2003).

Her ne kadar PGHS-1 ve PGHS-2 integral membran proteinleri olsa da, membranlarla etkileşimleri tipik transmembran heliksleri içermez. Bunun yerine, kristal yapıların ve membran alanı etiketleme çalışmalarının analizi, COX'ların membran çift tabakanın sadece bir yüzeyi ile monotopik olarak etkileşime girdiğini ortaya koymuştur (Smith ve ark, 2011). Etkileşim, membran bağlayıcı alanda mevcut olan dört kısa amfipatik a-heliksi içerir. Bu helikslerin bir yüzeyinde yer alan hidrofobik artıkların yan zincirleri, COX'ları membrana birleştirir ve tutturur (Smith ve Murphy, 2016).

Deterjanla çözünen PGHS'lerin her ikisi de tüm kristal yapılarda görülen ve yaklaşık 72 kDa'lık alt birim moleküler kütlelere sahip homodimerlerdir. Her iki izoform, bir protoporfirin IX prostetik grubu içeren hemoproteinlerdir (Smith ve Murphy; 2016). ve protein katlanmasını kolaylaştıran üç yüksek mannoz oligosakkariti içerir sadece COX-2'de enzimin bozunmasını düzenleyen dördüncü bir oligosakkarit bulunur (Rouzer ve Marnett, 2009). Dimerin her bir alt birimi üç ana katlanma alanından; yaklaşık 50 amino asitlik bir N-terminal epidermal büyüme faktörü benzeri bölge (kalıntı 34-72), membran bağlama bölgesi olarak görev yapan yaklaşık 70 amino asit içeren bir bitişik bölgeden (kalıntı 73- 116) ve hem prostetik grubunun her iki tarafında siklooksijenaz ve peroksidaz aktif bölgelerini içeren bir C-terminal küresel katalitik bölgesinden oluşur (Rouzer ve Marnett 2009; Smith ve Murphy, 2016).

Her iki izozimde oldukça benzer olan COX aktif bölgesi, membran bağlama bölgesinden katalitik alanın çekirdeğine uzanan, uzun dar hidrofobik kanaldan oluşur (Şekil 1.11a). Araşidonat bağlanma bölgesi, kanalın üst yarısında Arg-120'den Tyr-385'e kadar bulunur. Kanalın ortasına yerleştirilen Ser-530 ise ligand ile asetilasyon alanıdır (Charlier ve Michaux, 2003). COX-1'in aspirin ile asetilasyon bölgesi olan Ser-

530, Şekil 1.11b'de COX aktif bölgesi içerisinde gösterilmiştir. Aynı zamanda, AA'nın karboksilat grubu için karşı iyon veya hidrojen bağlanma ortağı olarak görev yapan Arg-120'nin guanidino grubu da gösterilmiştir (Smith ve Murphy, 2016).



Şekil 1.11a) COX-2 aktif bölgesi ve şematik temsili (Charlier ve Michaux; 2003) ve b) COX-1 siklooksijenaz ve peroksidaz aktif bölgelerinin modeli (Smith ve Murphy, 2016).

Benzerliklerine rağmen, COX-2 aktif bölgesi yaklaşık % 20 daha büyüktür ve COX-1'den biraz farklı bir şekle sahiptir. Bu boyut ve şekil farklılıkları esas olarak aminoasit dizisindeki iki değişiklikten kaynaklanmaktadır. COX-1 de Ile-523, COX-2'deki bir valin ile değişmiştir. Bu fark, ana kanaldan küçük bir hidrofilik yan cep açar ve COX-2 aktif alanın hacmini önemli ölçüde artırır. Bu cebe erişim, COX-1'de Ile-523'ün uzun yan zinciri tarafından sterik olarak engellenir. Buna ek olarak, COX-2'deki bir valin için Ile-434'ün değişimi, bir komşu Phe-518 tortusunun alandan çıkışına izin vererek yan boşluğa daha fazla erişimi mümkün kılar (Charlier ve Michaux, 2003). İki izoform arasındaki bir başka temel aminoasit farkı COX-2'nin yan cebinde, COX-1'deki His-513 yerine polar kısımlarla etkileşime girebilen bir arginindir ve bu fark ligand bağlama bölgesinin şeklini değiştirmez, bunun yerine kimyasal ortamını değiştirir (Loll ve ark., 1995).

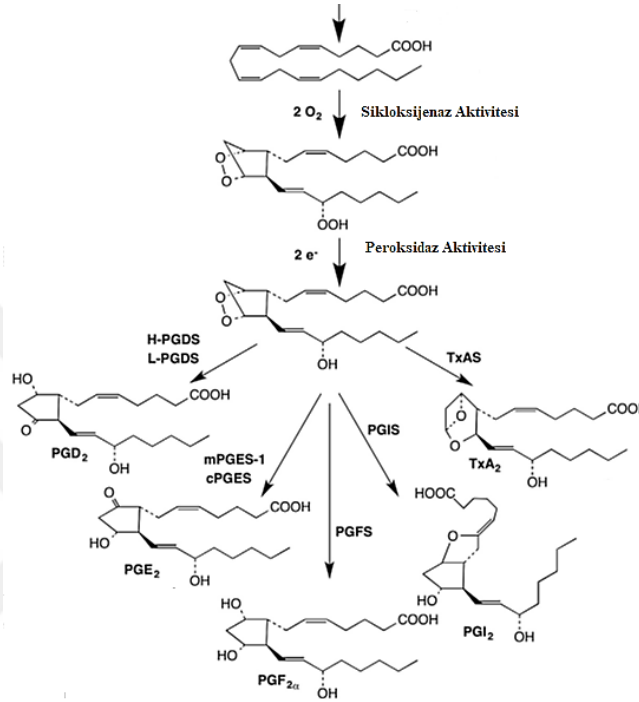
1.2.5.2. COX mekanizması

Siklooksijenaz enziminin iki farklı katalitik aktivitesi vardır:

1. Siklooksijenaz aktivitesi: Araşidonik asidi (AA) hidroperoksi-endoperoksit PGG₂'ye oksitler.

2. Peroksidaz aktivitesi: PGG₂'yi hidroksi-endoperoksit PGH₂'ye indirger.

Daha sonra, kararsız PGH₂ dokuya özgü farklı sentezler ve izomerazlar tarafından prostanoidlere dönüştürülür (Şekil 1.12). Prostanoidler, prostaglandinleri (PGD₂, PGE₂ ve PGF_{2α}), prostasiklin (PGI₂) ve tromboksan A₂'yi (TXA₂) içerir (Charlier ve Michaux, 2003).



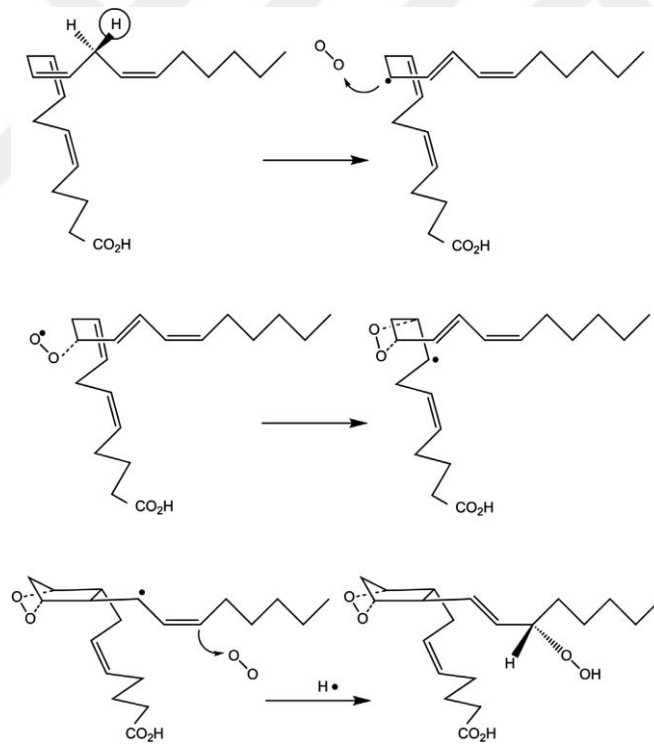
Şekil 1.12 COX metabolik yolu

COX'in çalışması için bir hidroperoksitin peroksidaz aktif bölgesinde bulunan hem prostetik grubunu bir okso-ferif hem radikal katyonuna oksitlemesi gerekmektedir. Bu oksitlenmiş hem ara maddesi, COX aktif bölgesinde bulunan Tyr-385'ten bir elektronu soyutlar. Elde edilen Tyr-385 tirozil radikali, COX reaksiyonunu başlatan 13-pro-S hidrojeni AA'dan soyutlar. COX reaksiyonu başladığında, yeni oluşan PGG₂ aktive edici hidroperoksitin kaynağı olarak görev yapabilir. PGG₂ oluşumundan önce, iltihaplanma sırasında oluşan hidroperoksitleri ve peroksinit, hem oksidasyonunu ve COX katalizini başlatmaya yarar (Smith ve Murphy, 2016).

Peroksidaz aktif bölgesi, sıg bir yarığın tabanında konumlandırılmış hem'den oluşur ve proteinin membrana bağlanma bölgesinin karşı tarafındadır. Bu yapı, yarığın bir kısmının üzerinde bir kubbe oluşturan birkaç hidrofobikamino asit kümesinin dışında, hem'e önemli ölçüde çözücü erişimi sağlar. Aktif alanın yapısı, çok çeşitli birincil ve ikincil organik hidroperoksitleri azaltan COX peroksidazın sert substrat spesifitesini

açıklamaya yardımcı olur. Hidrofobik kubbe, peroksidazın H_2O_2 üzerindeki organik peroksitler için tercihini açıklıyor gibi görünse de, kubbe kalıntılarının alanine mutasyonu peroksidaz aktivitesi veya substrat spesifikliğı üzerinde çok az etkiye sahiptir (Rouzer ve Marnett, 2009).

Siklooksijenaz aktif bölgesi, membran bağlanma alanından kaynaklanan L-şeklindeki bir kanalın üst kısmında bulunan peroksidaz aktif bölgesinin karşı tarafında yer alan Hem bölgesine kadar uzanır. Substratların veya inhibitörlerin daha derine geçebilmesi için kanalın ağzı, önce büyük bir hacimle başlayıp gittikçe daralır. Daralmanın üzerinde kanal, neredeyse dik açılı ve dar terminale doğru bükülmüş hidrofobik kalıntılar ile çevrelenmiştir. Araşidonik asit siklooksijenaz aktif bölgesine bağlandığında, kanalın dar ucundaki karboksil grubu ve v-metil grubuna doğru uzanır. Bu siklooksijenaz reaksiyonu için kritik bir katalitik aminoasit olan **Tyr-385'e** yakın kanalın büküldüğü yerdeki AA karbon-13'ü gösterir (Rouzer ve Marnett, 2009).



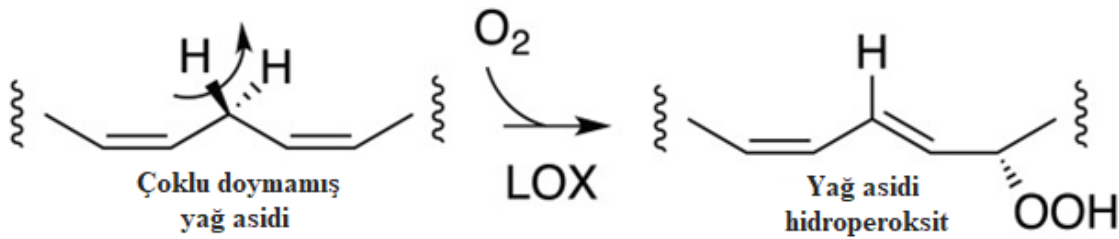
ŞEKİL 1.13 Araşidonik asit ve iki oksijen molekülünün PGG₂'ye dönüşümünü gösteren siklooksijenaz reaksiyonu için mekanizma (Smith ve Murphy, 2016)

COX reaksiyonundaki ilk adım, 13-pro-S hidrojenin AA'dan stereospesifik çıkarılmasıdır. Şekil 1.13'de gösterildiği gibi, bir AA molekülü COX aktif bölgesinde

C-9'daki karbon zincirinde bir bükülme ile yönlendirilir. 13-pro-S hidrojenin soyutlanması ve ardından izomerizasyon, C-11'de karbon merkezli bir radikalin oluşmasına ve C-11'de moleküler oksijenin, hidrojen soyutlamanıkinden zıt taraftan salınmasına yol açar. Elde edilen 11-hidroperoksil radikali, C-9'daki çift bağa eklenir, bu da bisiklik bir endoperoksit yapısına intramoleküler yeniden düzenlemeye ve C-15'te başka bir karbon merkezli radikal oluşumuna yol açar. Bu radikal daha sonra başka bir oksijen molekülü ile reaksiyona girer ve PGG₂ üretmek için indirgenir ve protonlanır. PGG₂'nin 15-hidroperoksil grubu, PGHS'lerin peroksidaz aktivitesi veya diğer mevcut hücrel peroksidazlar tarafından katalizlenen bir reaksiyonda PGH₂ veren bir alkole iki elektron indirgemesine maruz kalır (Smith ve Murphy, 2016).

1.2.6. Lipooksijenaz (LOX)

Lipooksijenazlar (LOX, EC 1.13.11.-), regio ve stereospesifik olarak karşılık gelen hidroperoksi türevlerini üretmek için 1,4 cis-pentadien kısmı içeren poli doymamış yağ asitlerinin dioksijenasyonunu katalize eden, heme içermeyip sadece demir içeren dioksijenaz enzimlerdir (Sadeghian ve Jabbari, 2015; Kuhn ve ark., 2014). LOX'lar, atmosferik oksijenin ikinci substrat olarak görev yaptığı reaksiyonda en az bir 1,4-pentadien sistemi içeren polenoik yağ asitlerini karşılık gelen kiral hidroperoksi türevlerine dönüştürür (Şekil 1.14) ve LOX yolunun ana ürünleri daha sonra lökotrienler, lipoksinler, hepoksilinler, eoksinler, çözücüler, korinler içeren geniş bir dizi biyoaktif lipid arabulucusuna dönüştürülür (Kuhn ve ark., 2014; Newcomer ve Brash, 2015).



Şekil 1.14 Lipooksijenaz katalizinin basitleştirilmiş şeması (Kuhn ve ark., 2014; Newcomer ve Brash, 2015).

LOX enzimi, substrat yağ asidi ve moleküler oksijen arasında bir serbest radikal reaksiyonu başlatır, kontrol eder ve sonlandırır. LOX katalizi her zaman bir çift cis çift

bağı ($\text{CH} = \text{CH} = \text{CH}_2 = \text{CH} = \text{CH}$) arasında bir CH_2 metilen ile beş karbonlu bir ünite etrafında merkezlenir. Hem-olmayan demir, reaksiyonu yağ asidinin bir yüzünde stereoselektif H-soyutlaması ile başlatır ve sonrasında karşı yüzdeki oksijen reaksiyona girer. Moleküler oksijen, pentadienin (regiospesifiklik) bir ucunda veya diğer ucunda R veya S konfigürasyonunda (stereospesifiklik) verilir. Yağ asidinin O_2 ile reaksiyonu kovalent olarak tamamlanır ($\text{RH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{ROOH}$) ve bu nedenle indirgeyici kofaktör gerekmez (Newcomer ve Brash, 2015; Kuhn ve ark., 2014).

1.2.6.1. LOX izozimleri

Lipoksijenaz, yaklaşık 100 yıl önce ilk olarak bitkilerde keşfedilmiştir ve yakın zamanda mercan, yosun, mantarlar ve bir dizi bakteride de tespit edilmiştir. LOX süper ailesinin farklı üyeleri prokaryotik, bitki, mantar, omurgasız veya omurgalı / memeli hayvanlarının tümünde aynı amino asitleri katalitik merkezde tutarak ortak bir yapısal çevreyi paylaşır (Kuhn ve ark., 2002; Neau ve ark., 2014; Glickman ve Klinman, 1996). LOX türevli yağ asidi hidroperoksitleri bitkilerde uçucu aldehitler ve jasmonatlar, mantarlarda diol ve laktonlarve memelilerde lipoksinler ve lökotrienler halinde metabolize edilebilir (Andreou ve Feussner, 2009). Bu moleküller, mantarlarda mikotoksin üretiminin ve yaşam döngüsünün düzenlenmesinde rol oynarlar, bitkilerde yağ asidi dönüşümünün ilk aşamalarını katalize ederek çimlenmeye yardımcı olur ve yağ asidi kaynaklı yara tepkisi ve jasmonik asit gibi haşere engelleyici ürünlerin sentezine katılırlar (Glickman ve Klinman, 1996; Andreou ve Feussner, 2009; Ivanov ve ark., 2005). LOX enzim ailesi; epitelyal, endotelyal ve bağışıklık hücreleri dahil olmak üzere çok sayıda hücre tipinde eksprese edilir ve cilt bariyeri oluşumu, hücre farklılaşması ve bağışıklık dahil romatoid artrit, iltihaplı bağırsak hastalığı, ülseratif kolit, astım, sedef hastalığı ve alerjik rinit gibi birçok enflamatuar hastalık ve alerjik rahatsızlığın önemli araçları olarak kabul edilmiştir (Kuhn ve ark., 2014; Snodgrass ve ark., 2019).

Tüm memeli LOX'lar, iki bölgeli bir yapıya katlanan tekli polipeptit zincir proteinleridir. Daha küçük N-terminal alanı, aktiviteyi düzenleyen ve membran bağlanmasını kolaylaştıran birkaç paralel ve anti-paralel tabakadan (sheet) oluşur. C-terminal katalitik alanı birkaç sarmaldan oluşur ve varsayılan substrat bağlama cebinde lokalize olan hem-olmayan katalitik demiri içerir (Kuhn ve ark., 2014; Snodgrass ve

ark., 2019). Memeli LOX enzimlerinin genel yapısı benzer gibi görünse de her izoformun substrat özgüllüğü gibi benzersiz özellikleri vardır. Çoğu durumda, yapı substrat boşluğunun şekline ve histidin kalıntılarının koordinasyonuna veya katalitik merkezdeki demir atomuna bağlıdır (Mashima ve Okuyama, 2015).

İnsan genomu, her biri farklı LOX izoformunu kodlayan altı fonksiyonel LOX genini (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOXE3, ALOX5) içerir. Kromozom 10 ile eşleştirilen ALOX5 geni dışında diğer tüm LOX genleri kromozom 17 üzerindeki bir ortak gen kümesinde lokalize olmuştur (Snodgrass ve ark., 2019; Kuhn ve ark., 2014). Şimdiye kadar, AA oksijenasyonunun konumsal özelliklerine göre sınıflandırılmış insanlarda işlevsel üç ana izozim gözlemlenmiştir: AA'nın C-5, -12 ve -15 konumlarındaki 5-, 12- ve 15-LOX O₂ eklenmesiyle, sırasıyla ve 5-, 12- ve 15-HPETE (hidroperoksi-eikosatetraenoik asit) üretir (Charlier ve Michaux, 2003). 5-, 12 ve 15-LOX arasında yaklaşık % 60 oranında bir dizi benzerliği vardır ve her insan lipoksijenazı bitki lipoksijenazlarına yaklaşık % 25 oranında özdeştir (Ford-Hutchinson ve ark., 1994).

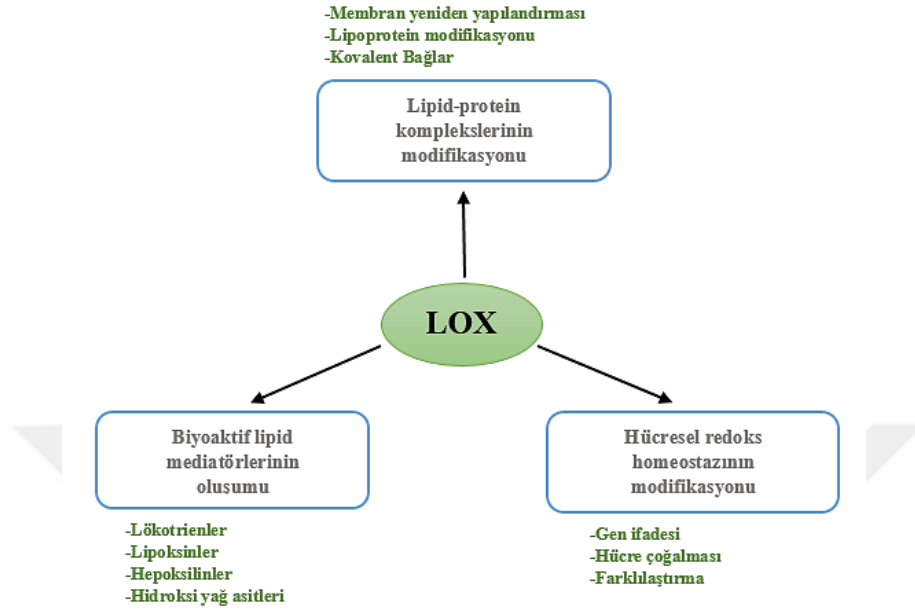
Lipoksijenazlar biyolojik fonksiyonlarını üç farklı mekanik senaryo ile gösterebilirler. Temelde fonksiyonel fenotipini düzenleyen lipid mediatörlerinin oluşumu yoluyla biyolojik etkinliklerini sergilerler. Bununla birlikte, LOX işlevselliğini açıklamak için iki alternatif kavram ortaya konmuştur:

i) Birkaç LOX izoformu, kompleks ester lipidlerini ve hatta lipid-protein düzeneklerini (biyo-zarlar, lipoproteinler) yapısal ve fonksiyonel parametrelerini değiştirerek oksitleyebilmektedir. Bu kavram, en azından kısmen eritropoez, epidermal farklılaşma ve aterogenezdeki farklı LOX izoformlarının rolleri için uygulanabilir.

ii) LOX'lar lipid peroksitleyici enzimlerdir ve lipid peroksitleri oluşturarak hücrel redoks durumunu değiştirirler. Hücrel redoks dengesi, hücre çoğalmasının ve gen ekspresyonunun önemli bir düzenleyicisi olduğundan, hücre içi LOX aktivitesi hücre işlevselliğini etkileyebilir.

LOX'ler, hücrel redoks durumunu değiştiren tek enzimler değildir, memeli hücrelerinde çok sayıda pro- ve oksidatif enzim vardır. Bununla birlikte LOX'in

katalitik aktivitesi, hücrel redoks homeostazına açıkça katkıda bulunur (Kuhn ve ark., 2014).



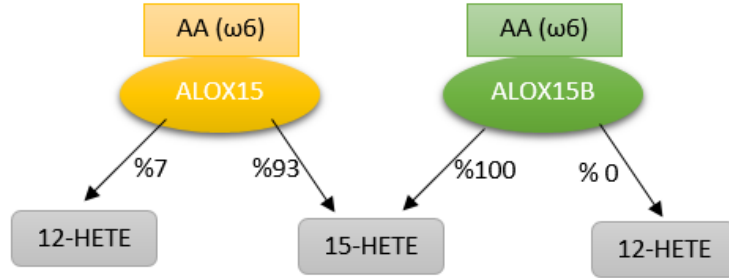
Şekil 1.15:Lipoksijenazların biyolojik işlevi(Kuhn ve ark., 2014).

1.2.6.2. 5–Lipoksijenaz (5-LOX) ve 15-Lipoksijenaz-B (15-LOX-B) izoenzimleri

İnsanda işlevsel lipoksijenazlar arasından en önemlisi araşidonat-5-lipoksijenazdır (ALOX5), 3 boyutlu yapısı Şekil 1.16’de ki gibidir. Yaklaşık 673 amino asit içeren 75-80 kDa’lık bir monomerik protein olan 5-LOX, araşidonik asidin C5’ine saldırarak 5-hidroperoksiyeikosatetraenoik asite (HPETE) dönüşür ve lökotrienlerin biyosentezinden sorumludur. İnsanda 5-LOX’a en yakın homolog 15-LOXB’dir (Kobe ve ark., 2014).

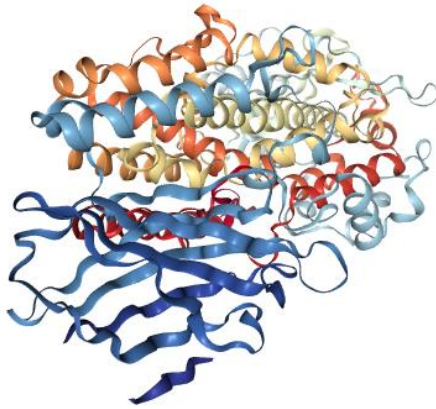
İlk olarak tavşan retikülositlerinde fosfolipidleri ve biyomembranları oksitleyebilen 15 LOX tanımlanmıştır sonrasında ikinci bir 15-LOX tipi insan saç köklerinden klonlanmıştır. Epidermis-tipi 15-LOX, 15 LOX-2 ya da 15-LOX-B olarak adlandırılan bu enzim, retikülosit-tipi 15-LOX ile düşük dereceli bir dizi homolojisini paylaşır. 15-LOX linoleik asidi iyi metabolize ederken, 15-LOX-B’nin araşidonik asidi çok daha iyi metabolize eder. Yaklaşık 676 amino asit içeren ve tahmin edilen molekül ağırlığı 76 kDa’luk bir monomerik protein olan 15-LOX-B enzimi (Şekil 1.17), araşidonik asiti 15-hidroperoksiyeikosatetraenoik aside (15-HPETE) dönüştürür ve 15-HETE ya da lipoksinlerin biyosentezinden sorumludur (Snodgrass ve ark., 2018; Kuhn ve ark., 2002; Leone ve ark., 2007).

ALOX15 çift reaksiyon özgülüğü sergilerken ALOX15B, araşidonik asit oksijenasyonunda tekil reaksiyon özgülüğünü gösterir. ALOX15 ve ALOX15B'nin ω -6 serbest çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) substratı ile enzimatik aktivitesi Şekil 1.16'da gösterilmiştir (Snodgrass ve ark.,2019; Kobe ve ark., 2014).

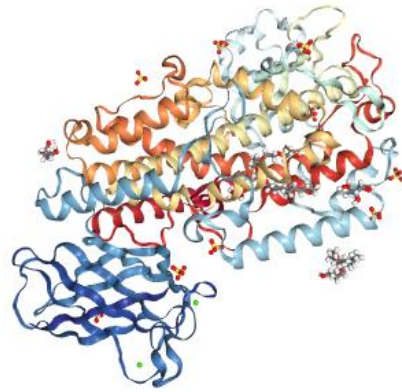


Şekil1.16 İnsan ALOX15 ve ALOX15B'nin reaksiyon spesifikliğı (Snodgrass ve ark.,2019)

Kristalografik verilere dayanarak farklı LOX enzimlerinin iki ayrı birimden oluşan genel bir katlama modelini paylaştığı bilinmektedir: C ile olan benzerliğine göre lipidlerle etkileşime girmesi önerilen küçük bir N-terminali ve esasen α -helislerden oluşan daha büyük bir C-terminal katalitik domaini, ve katalitik heme-olmayan demir atomlu aktif bölgeyi içerir (Charlier ve Michaux, 2003).



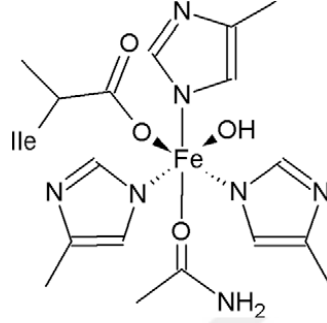
Şekil 1.17 5-LOX (PDB kodu: 3O8Y)



Şekil 1.18 15-LOX-B (PDB kodu: 4NRE)

Demir aktif bölge metali (Şekil 1.19), üç korunmuş histidin yan zinciri ve ayrıca C terminalinin ana zincir karboksilatı ile su veya hidroksit ligandı tarafından koordine edilen, bir hem olmayan demirdir (Andreou ve Feussner, 2009; Gilbert ve ark., 2011). LOX yapıları, katalitik demiri konumlandıran amino asitlerin pentadieni moleküler oksijenden koruduğu gibi bunun neden gerekli olduğunu öngören bir çevre sağlar.

Katalitik demiri yerinde tutan ve pentadieni saldırı için konumlandıran amino asitler, hem aktif bölgeler için ortaktır hem de değişmeyen yüksek oranda korunmuş amino asitlerden oluşur. 15-LOX-2 aktif bölgesinin karboksil ucundaki boşlukları karşılaştırmak mümkün değildir, çünkü bu uç 5-LOX'ta Phe177 ve Tyr181 tarafından sıkıca tıkanmıştır (Gilbert ve ark., 2011; Kobe ve ark., 2014).



Şekil1.19 Fe substratı (Andreou ve Feussner, 2009)

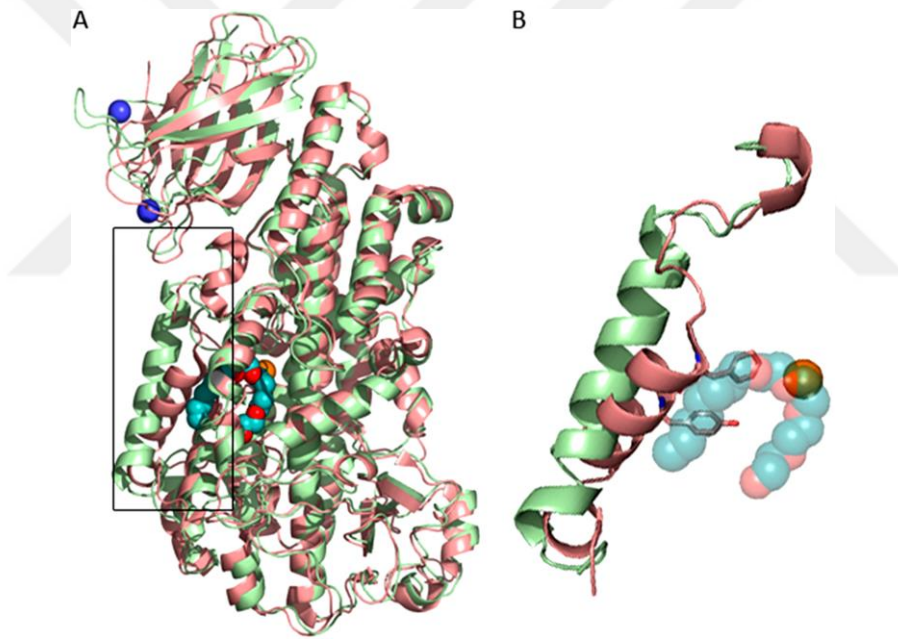
Diğer izoformların aksine, 5-LOX ve 15-LOX-B kalsiyum ile aktive edilir. N-terminal alanı aracılığıyla iki kalsiyum iyonunu geri dönüşümlü bir şekilde bağlar. Bu enzim ayrıca Ca^{2+} varlığında (kostimülatör etki) ATP tarafından, lipid hidroperoksitleri ve fosfatidilkolin ile uyarılmaktadır. Hücre aktive edildikçe ve Ca^{2+} 'nin hücre içi hızı arttıkça, hücresel lokalizasyonundan bağımsız olarak enzim nükleer zarfın yerini değiştirir. Daha sonra, aktive edici protein veya FLAP olarak adlandırılan 18 kDa'lık küçük bir membran proteini ile etkileşime girer. Etki mekanizması hala belirsiz kalmasına rağmen, bu proteinin AA substratını enzime aktardığı görülmektedir, enzim ve FLAP arasındaki bu etkileşim lökotrien ve lipoksin biyosentezi için çok önemlidir (Kobe ve ark., 2014; Charlier ve Michaux, 2003).

15-LOX-2'de PLAT alanı (Polisitin-1-lipoksijenaz α -toksin), birincisi (Ca-1) 39-44 amino asitlerinde sırayla bulunan iki belirgin Ca^{2+} bağlama bölgesi içerir. Ca-1'deki Ca^{2+} , Asp39 ve Glu44 ile Asn40 ve Gly42'nin ana zincir karbonilleri ve bir su molekülü tarafından koordine edilir. İkinci bölge (Ca-2), Pro74-Ala86'da, yığılmış kısımların iki tarafından bağlanan bir 12-amino asit halkasını stabilize ediyor gibi görünmektedir. Bu prolin açısından zengin hidrofobik ilmek, zar bağlanma alanından 20 Å'yi saç tokası benzeri bir yapı olarak yansıtır. Asp85 tarafından koordine edilen Ca-2 bölgesinin, Ala86, Gly15, Gly17 ve bir su molekülünün ana zincir karbonilleri, saç tokası döngüsünün C-terminal bölgesini tutturduğu görülmektedir. 5-LOX, PLAT bölgelerinde

yüksek oranda korunmuş kalsiyum bağlanma bölgeleri içerir. Dizi homolojisi düşük olmasına rağmen, 15-LOX-2 Ca-1 ve Ca-2 bağlanma sahaları, Ca^{2+} 'ye bağlı membran bağlanma sergileyen 5-LOX'unkilerle eşdeğer konumlardadır. Ca^{2+} bağlama sahaları, katalitik bölgeye girişi barındıran uzun molekülün aynı yüzü üzerinde PLAT alanının bir kenarı boyunca konumlandırılır (Kobe ve ark., 2014).

1.2.6.3.5-LOX ve 15-LOX-B aktif bölgeleri

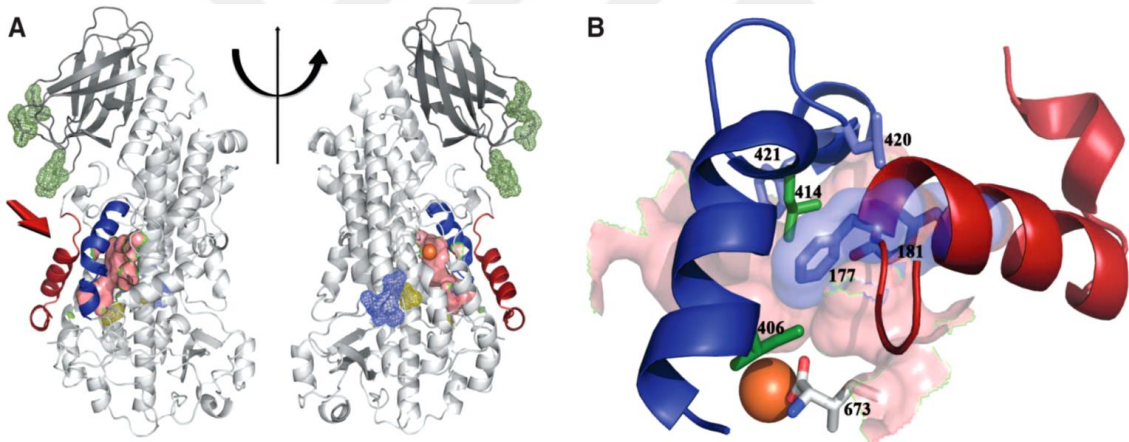
5-LOX ve 15-LOX-2 en yakın homologlar olduğundan ortak bir çerçeveyi, ortak bir katalitik çekirdeği ve ortak bir substratı paylaşır. İki enzim arasındaki en büyük fark, 5-LOX boşluğunun 2 atipik yerleşimi ile kapatılması, 15-LOX-2'de ise çözücüye açık olmasıdır. Şekil 1.20'de iki enzimi karşılaştırmak için üst üste çakışma görüntüsü verilmiştir.



Şekil 1.20 15-LOX-2 ve 5-LOX'in üst üste çakıştırılması. 15-LOX-2 yeşil ve 5-LOX pembe olarak gösterilmiştir (Kobe ve ark., 2014)

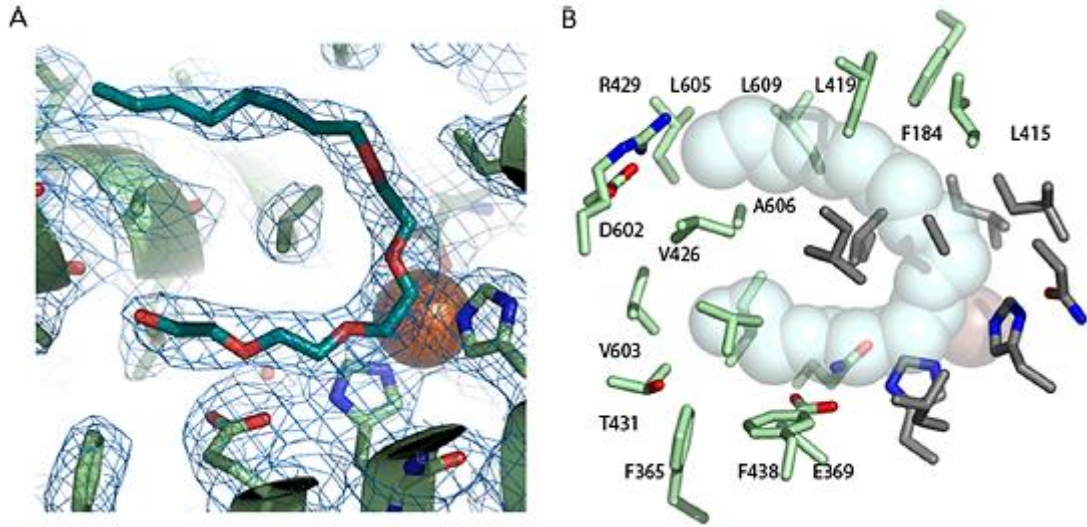
5-LOX'ta aktif bölgesi, hem değişmeyen hem de 5-LOX'a özgü amino asitlerle kaplı toplu çözücüye açık erişimi olmayan uzun bir oyuktur. Lösin 368, 373, 414, 607 ve Ile406 tüm AA metabolize edici lipoksijenazlarda korunur ve pentadienin kataliz için konumlandırılması gereken bölgeyi saran yapısal olarak benzer bir dallanmış hidrofobik yan zincir oluşturur. Tyr181, Ala603, Ala606, His600 ve Thr364, 5-LOX sekanslarına özgüdür ve Ala603 ve Ala606'nın küçük yan zincirlerinin Phe177 ile birlikte bir

ucundaki boşluğu doldurması Tyr181'in konformasyonu için gerekli görülmektedir. Bu durum FY (Phe ve Thr) tıkaçı olarak nitelendirilir. Tyr181 amino asidi Ala603 ile van derWaals etkileşimi yapar ve hem Ala603 hem de Ala606'nın küçük yan zincirleri her iki hacimli aromatiklerin (Phe177 ve Tyr181) çözücünden korunabilecekleri boşlukta kalmalarına izin verilir. 5-LOX-spesifik bir aminoasit olan Trp599 FY tıkaçını sabitler. Asn407 ve His432 ayrıca aktif bölgeyi tanımlamaya yardımcı olan amino asitlerdir. Bu tıkaç aktif bölge boşluğunu kaplayan ve aksi halde açık bir U şekilli bölgeyi tıkayan hacimli, aromatik amino asitlere katkıda bulunan bir "kırık" sarmal olarak 5-LOX'a özgü olarak gözlenmiştir. 15-LOX-B gibi tıpa edilmemiş LOX'lar, aktif bölge girişinde aromatik halkaları barındırabilir. Belirleyici faktörün, helezon $\alpha 2$ 'de aromatik bir amino asit olmadığını, ancak $\alpha 2$ 'nin, aromatik yan zincirlerin boşluk girişine yakın olacak şekilde "kırılmış" olup olmadığını gösterebilir (Newcomer ve Brash, 2015; Gilbert ve ark., 2011).



Şekil 1.21 5-LOX'un 3 boyutlu yapısının gösterimi (Gilbert ve ark.,2011)

Şekil 1.21'deki görünümde, enzimin dikey çizgi etrafındaki 180° döndürmeyle birbirinden farklıdır. N-terminali C2 benzeri etki alanı koyu gri ve katalitik etki alanı açık gri renktedir. Ayırt edici kemerli sarmal mavi renkte ve $\alpha 2$ heliks sarmal kırmızıdır. İç boşluk pembe renktedir ve Fe turuncu küre şeklindedir. (B) Kemerli sarmal ve $\alpha 2$ heliks sarmalin (A) 'daki kırmızı okla gösterilen perspektiften bakıldığında aktif bölgeyle ilişkisinin detaydır. Çubuk oluşturmada, kemerli sarmalın amino asitleri 406, 414, 420 ve 421 ve $\alpha 2$ heliks sarmal 'de Phe177 ve Tyr181 (saydam yüzey işleme ile) gösterilmektedir. Phe177 ve Tyr181 amino asitleri, boşluğa erişimi engeller. Ile673'ün C terminalinin donmuş porta yakınlığı açıktır (Gilbert ve ark., 2011).



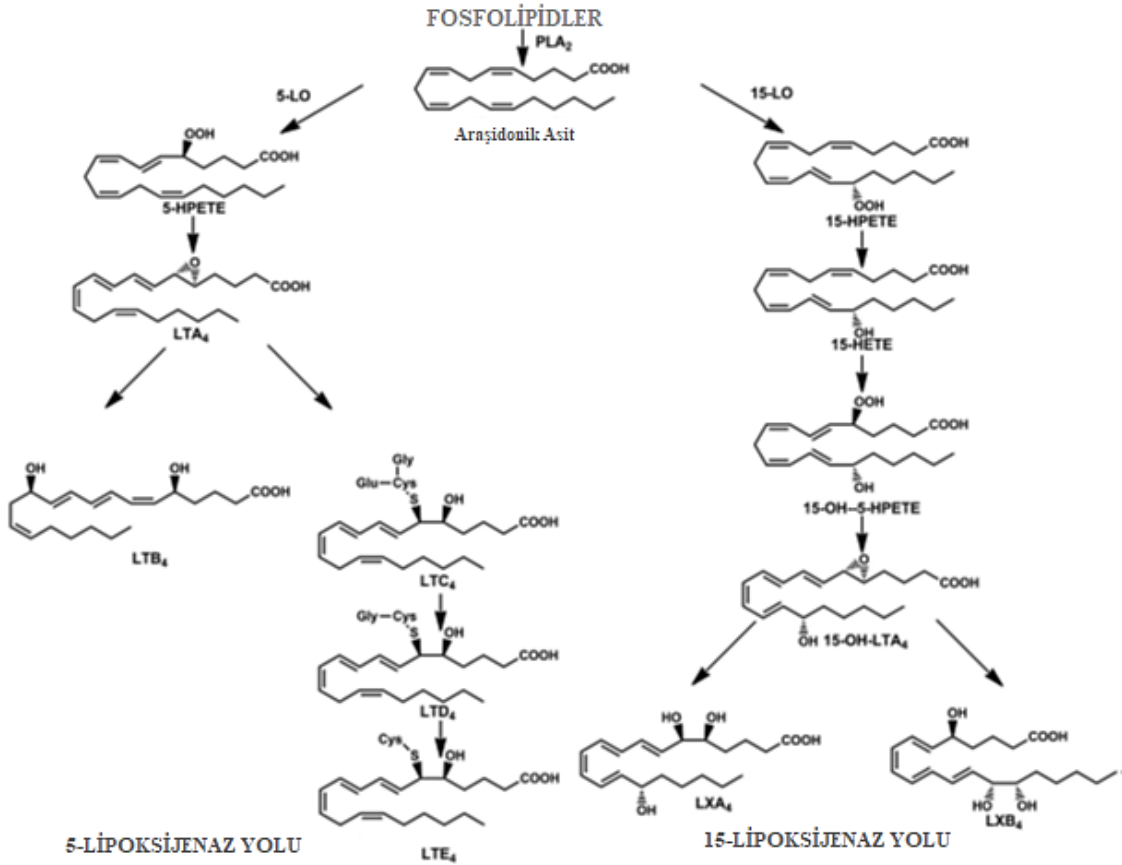
Şekil 1.22 15-LOX-B aktif bölgesi (A) ve aktif bölge amino asitleri (B)(Gilbert ve ark., 2011)

15-LOX-B aktif bölgesinde ligandlar, boşlukta U-şekilli bir konformasyonda oturur ve Şekil 1.22’de görüldüğü gibi hidrofobik amino asitlerin yan zincirleri ile çevrilidir. "U" tabanının proksimalinde, değişmez histidinler 373, 378 ve 553 tarafından yerinde tutulan katalitik demir bulunur. 5-LOX ve 15-LOX-B izoenzimlerinin aktif bölgeleri birbirinden oldukça farklıdır ve bu durum izoforma özgü spesifik inhibitör seçimi için yol gösterici olacaktır (Kobe ve ark., 2014).

1.2.6.4. 5-LOX ve 15-LOX-B mekanizması

LOX reaksiyonunun ayrıntılı mekanizması hala tartışmalıdır, ancak radikal doğası genel olarak üzerinde anlaşmaya varılmıştır. Ardışık üç adımdan oluşur:

1. İki kat allel metilen grubundan stereo-seçici hidrojen soyutlama,
2. Radikal yeniden düzenleme ve
3. Moleküler oksijenin stereo-spesifik olarak yerleştirilmesi ve hidroperoksi radikal ara ürününün karşılık gelen anyona indirgenmesi (Charlier ve Michaux, 2003).



Şekil 1.23 5-LOX ve 15-LOX-B metabolik yolu (Weinberg ve ark., 2015)

Şekil1.23'deki araşidonik asidin 5-LOX etkisiyle lökotrienlere biyosentezinde, 5-HPETE vermek üzere AA'nın C-5'te oksidasyonu ve bu hidroperoksidin daha sonra dehidrasyonunu takiben ana ara ürün LTA₄ oluşumu şeklindedir (Şekil 1.17). Mevcut enzimlere bağlı olarak, bu oldukça dengesiz epoksit ya LTA₄ hidrolaz tarafından dihidroksi asit LTB₄ içinde enzimatik hidrolize olabilir ya da LTC₄ sentaz tarafından LTC₄ oluşturmak için glutatyon ile konjuge edilebilir. Bu son bileşik, sırasıyla bir glutamil transferaz ve spesifik bir dipeptidazın etkisiyle, glutamik asit ve glisin art arda atılmasıyla LTD₄ ve LTE₄'e metabolize edilebilir. Bu bileşiklere (LTC₄, D₄ ve E₄) toplu olarak sisteinil veya peptido-LT'ler denir (Charlier ve Michaux, 2003).

Şekil 1.22'de görüldüğü gibi 15-LOX etkisiyle 15-HPETE ürünü vermek üzere araşidonik asidin C-15'te oksidasyonu anti-enflamatuar etkiler uygulayan lipoksinlerin (lipoksinA₄ (LXA₄), lipoksin B₄(LXB₄)) oluşumuna yol açan bir dizi reaksiyonun ilk adımıdır (Weinberg ve ark., 2015; Snodglass ve ark., 2019; Leone ve ark., 2007).

ALOX enzimatik aktivitesi doku dağılımı ve hücre tipi ile düzenlenir. ALOX15B deri ve diğer epitel hücrelerinde ifade edilirken, ALOX5 hematopoietik / bağışıklık hücrelerinde ifade edilir. Ateroskleroz, nöronal bozukluk, bağışıklık modülasyonu, cilt hastalıkları ve epitelin korunmasında rol oynarlar (Mashima ve Okuyama, 2015).

LOX reaksiyonunun katalitik döngüsü, ardışık dört temel reaksiyonu içerir:

1. Karbon merkezli bir yağ asiti kökünü oluşturan bir bisalilik metilenden hidrojen soyutlaması,
2. Yağ asiti kökünün yeniden düzenlenmesi,
3. Moleküler dioksijeni oluşturuca oksijen merkezli bir peroksi radikali,
4. Hidroperoksi radikale karşılık gelen anyona indirgenmesi.

Hidrojen soyutlaması, katalitik döngünün hız sınırlayıcı adımı olarak görünmektedir ve bu temel reaksiyon hidrojen tüneline içermektedir. Dolayısıyla, LOX'lar kuantum kimyasal enzimler olarak kabul edilebilir ve reaksiyon mekanizmalarının bazı yönleri geleneksel termodinamik kullanılarak yeterince açıklanamaz (Kuhn ve ark., 2014).

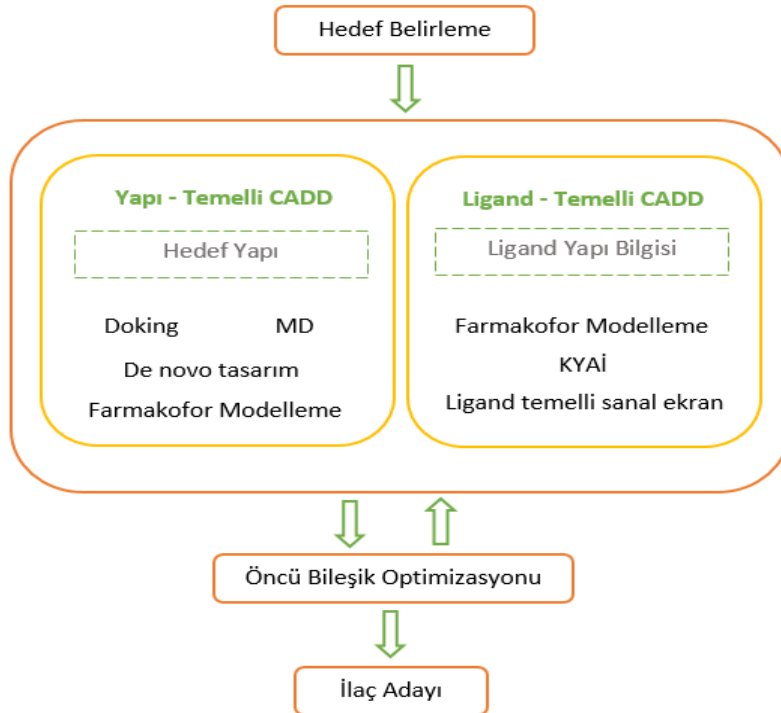
1.2.7. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı (CADD: Computer Aided Drug Design), terapötik olarak önemli küçük moleküllerin geliştirilmesinde büyük rol oynamıştır. İlaç adayı olabilecek bir öncü bileşiğin sentezlenmesi zaman ve maliyet gerektirir, öncesinde yapılacak olan ilaç tasarımı ile atomik seviyede yapı-aktivite ilişkisi (YAI) üreterek, belirli bir molekülün bir hedefe bağlanıp bağlanmadığı, eğer bağlanıyorsa bağlanma gücünü ön görüp bu zaman ve maliyet kayıpları en aza indirilmektedir. Öncü bileşikler ve biyolojik hedefleri arasındaki molekülerin etkileşim gücü hesaplarında moleküler mekanik veya moleküler dinamik kullanılır. Bu yöntemler sayesinde önerilen öncü bileşiklerin konformasyonunu tahmin etmek mümkündür (Macalino ve ark., 2015).

Tablo 1.4'de bilgisayar destekli ilaç tasarımı için temel adımlar verilmiştir. Yapı temelli (structure-based) CADD, yeni ilaç benzeri moleküller için etkileşim enerjilerini hesaplamakta ilgili makro moleküler hedefin protein yapısının bilgisine dayanırken, ligand temelli (ligand-based) CADD, bilinen benzer ve aktif olmayan moleküllerin bilgisini kimyasal benzerlik tahminine dayalı, kantitatif yapı-aktivite ilişkisinin oluşturulması yoluyla kullanır. Ligand temelli CADD'da farmakofor analizi ve

kantitatif yapı-aktivite ilişkileri (KYAİ) gibi yaygın olarak kullanılan ligand bazlı yöntemler öne çıkmaktadır ve önceden bilinen aktif ligandlarla olan benzerliğine / farklılığına bağlı olarak aktiviteyi öngörmek için sadece ligand yapısının bilinmesi yeterlidir. Yapı temelli yöntemlerin en bilinenleri ligand yerleştirme (Moleküler Doking) ve Moleküler Dinamik (MD) simülasyonudur, hem hedef hem de ligand yapılarının bilinmesi zorunlu olduğundan yüksek verimli tarama yapar. Yapı temelli CADD genellikle hedef proteinin yüksek çözünürlüklü yapısal verilerinin, yani kolayca kristalleşebilen çözünür proteinler için mevcut olduğu durumlarda tercih edilir ve yapısal bilgi Protein Data Bank (PDB)'dan temin edilir. Eğer aranan yapı bulunamıyorsa, PDB'de bulunan ilgili yapıları kullanarak bir homoloji modeli oluşturmak mümkün olabilir (Macalino ve ark., 2015; Khanna ve ark., 2018; Sliwoski ve ark., 2013).

Tablo 1.4Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı Akış Diagramı



Bir tıbbi ürünün hastalara ulaşması için ilaç geliştirme sürecinin tamamlanması 8 yıldan fazla zaman ve milyonlarca dolar yatırım gerektirmektedir. Ayrıca, her yıl laboratuvarlarda binlerce yeni ilaç adayı keşfedilmesine rağmen, klinik araştırmayı yalnızca bir kaçı tamamlayabilir ve ilaç düzenleme kurumunun sıkı denetimini

geçebilir. Bununla birlikte hesaplamalı kimya ve bilgisayar destekli ilaç tasarımı (CADD) gibi teknolojik gelişmeler, terapötik keşiflerin bazı sınırlayıcı faktörlerine de hızlı alternatif bir yol sunmaktadır. İlaç adaylarının yapısını incelemek ve biyolojik aktivitesini tahmin etmek için tıbbi kimya tekniklerine “*silico*” alternatifini sunan bilgisayar destekli ilaç tasarımı (CADD), hem hız hem de düşük maliyet avantajlarına sahiptir bu sebeple büyük ilaç endüstrisinin vazgeçilmez programı haline gelmiştir (Roy ve ark. 2015; Huang ve ark., 2010).

1.2.7.1. Moleküler doking

Doking, bir molekülün hedef makromoleküle (reseptör) nonkovalent bağlanarak kararlı bir kompleks oluşturmasını, buna bağlı moleküllerin uzayda tercih ettikleri pozisyonu, aktif bölgede bağlanmaya etki eden amino asitleri ve bağlanma ilgilerini (afinitelerini) tahmin ederek, ilgili terapötik yanıtta altta yatan etki mekanizmasının anlaşılmasına katkıda bulunan reseptör-ligand bağlanma doğasını incelemek için kullanılan bir moleküler modelleme yöntemidir (Macalino ve ark., 2015; Roy ve ark., 2015; Khanna ve ark., 2018; Taft ve ark., 2015). Moleküler doking ligand türüne göre; protein-ligand, protein-nükleik asit, protein-protein olmak üzere üç temel sınıfa ayrılır: Protein-ligand doking, ligand-protein komplekslerinin serbest bağlanma enerjisine klasik moleküler mekanik fonksiyonlarını kullanarak elektrostatik ve van der Waals etkileşimi ile yaklaşan, proteinleri potansiyel olarak inhibe edebilecek molekülleri öngörmede basit ve iyi bir kaynaktır. Buna karşın proteinlerin esnek olmaları ve konformasyonel alanlarının oldukça geniş olması sebebiyle protein-protein doking daha karmaşıktır (Roy ve ark., 2015; Taft ve ark., 2015).

2. MATERİYAL VE YÖTEM

2.1. HPL Bitkisinin Ekstraksiyonu ve Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması

2.1.1. HPL bitkisinin ekstraksiyonu

Hypericum perforatum L. bitkisi Mersin-Silifke-Kavak Köy mevki tarla içi ve yol kenarından 1450 m rakımdan çiçeklenme döneminde 2019 yılı Haziran ayında Şehbal Kurtar tarafından toplanmıştır ve bitkinin teşhisi İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Botanik Anabilim dalından Onur Altınbaşak tarafından yapılmıştır. *Hypericum perforatum* L. (sarı kantaron) bitkisi herbaryum numarası ISTE117003'tür.

Bitkinin toprak üstü kısımları gölgede havadar bir ortamda demetler halinde kurutulmuştur. Kurutulan bitkisel materyal ufak parçalar halinde kesilmiştir. 500 g toz halindeki bitki materyaline üstünü örtecek kadar %100 metanol eklenerek maserasyon yöntemi ile ekstre edilmiştir. 2 gece maserasyonda süresi ile bu işlem 3 kez tekrarlanıp elde edilen tüm ekstratlar vakum altında yoğunlaştırılarak denemeler boyunca buzdolabında (+4°C) saklanmıştır.

2.1.2. HPL Bitkisinin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması

Yüksek oranda hidrokarbon içerdiğini bildiğimiz bitki materyalini bu yapıdan arındırmak için kurutulan bitki ekstresinden petri kabına alınarak az miktarda kloroformda çözülerek elde edilen vizkoz karışıma 2 spatul silika ilave edilerek çeker ocak altında kuruluğa kadar kurutularak tüm ekstrenin silika tarafından absorplaması sağlanmıştır. %100 metanol ekstresi, absorban olarak silika jel kullanılan kolon kromatografisi yönteminde mobil faz olarak kloroformdan başlayarak artan oranda (%2, %4, %8...%100) etanol ile polaritesi arttırılarak elüe edilmiştir. Benzer polaritedeki yürümler Şekil 2.2'deki görüldüğü gibi tüplere toplanmıştır.

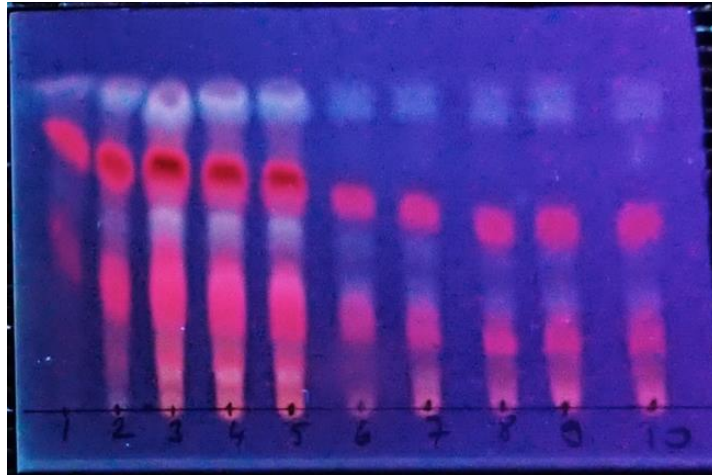


Şekil 2.1 Kolon kromatografisi için ilk kurulan kaba kolon



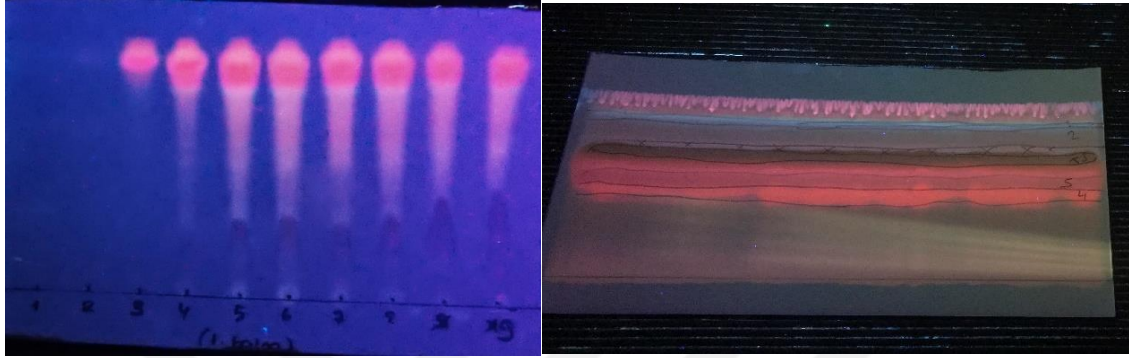
Şekil 2.2 Tüplere toplanan benzer polaritedeki örnekler

İnce tabaka kromatografisi (İTK) ile genellikle kloroform, etanol ya da kloroform-etanol (farklı oranlarda) sistemler kullanılarak yürütme işlemi yapılmıştır. Görünür ışık ve UV lambada (254 nm) fraksiyonlar izlenmiştir ve benzer olanlar birleştirilip daha küçük kolon kullanılarak ayırım yapılmıştır.



Şekil 2.3 İTK sonucu UV lambada izlenen fraksiyonların görüntüsü

Kaba ayrımı gerçekleştirilen fraksiyonlar İTK sonuçlarına göre birleştirilip her bir fraksiyona, saf maddelerin izolasyonu için preparatif İTK uygulanmıştır. Benzer fraksiyonlar ile preparatif İTK işleminde örnek ekiminin UV lambadaki görüntüsü Şekil 2.4’de gösterildiği gibidir. Gerekğinde bu işlemler birkaç kez tekrarlanmıştır.



Şekil 2.4 Preparatif İTK ile saf madde izolasyonu

İTK sonucunda saf olarak izole edilen sekonder metabolitlerin yapı tayinlerinde UV-Vis, Floresans, FT-IR, ve ^1H NMR spektroskopik yöntemlerinden yararlanılmıştır.

2.2. Antioksidan Aktivitenin Tayini

2.2.1. DPPH serbest radikali giderme aktivitesi tayini

Bu yöntem doğal ekstraktların antioksidan kapasitesini ölçmede sık kullanılan bir metottur ve yöntem için gerekli kimyasal, ticari olarak elde edilebilen, DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil) stabil organik nitrojen radikalidir.

2.2.1.1. Kullanılan çözeltiler

DPPH çözeltisi: 0,00392 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil 100 mL’lik balon jöjeye konularak metanol ile hacme tamamlanmıştır. Her tayin öncesi çözelti taze olarak hazırlanıp tayin süresince karanlık ve soğuk ortamda bekletilmiştir.

Standart çözelti: Standart olarak askorbik asit ve troloks 0,0010 g alınarak 100 μL DMSO (Dimetil sülfoksit) ile hazırlanan çözeltileri kullanılmıştır.

2.2.1.2. Yöntem

DPPH serbest radikali giderme aktivitesi Parejo ve arkadaşlarının metoduna göre tayin edilmiştir (Parejo ve ark., 2000). Metod ekstrelerin bir elektron veya proton verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH çözeltisinin rengini açması esasına dayanır. Denemede kullanılan örnekler ve standartlar 1:100 oranında DMSO ile seyreltilmiştir. Elde edilen metanol ve DMSO ekstrelerinin ortama ilave edilen 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini giderme etkisini saptamak için ependorf tüplerinin içerisinde stoktan 1-5 µL arasında ve 1:10 seyreltmeden 1-10 µL arasında farklı konsantrasyonlarda seri seyreltmeler hazırlanmıştır ve toplam hacim metanol ile 250 µL'ye tamamlanmıştır. Standart antioksidan çözeltilerinden (1:10 oranında seyreltilmiş) de seri standartlar hazırlanarak 250 µL'ye tamamlanmıştır. Ependorf tüplerine hazırlanan serilere Tablo 2.1' de belirtilen miktarlar eklenerek vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır.

Tablo 2.1DPPH radikali giderme aktivitesi çalışma tablosu

	Neg. Kontrol	Standart	Örnek
Toplam Hacim	250 µL metanol	250 µL	250 µL
DPPH çözeltisi	1000 µL	1000 µL	1000 µL

Reaksiyonun tamamlanabilmesi için oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Standart ve örneklerin **517nm**' deki absorbansları fotometrik olarak metanole karşı okunmuştur. Deney iki paralel olarak tekrarlanmıştır. DPPH radikal süpürme aktivitesi, reaksiyonu inhibe etme yüzdesi şeklinde ifade edilmek üzere aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% inhibisyon = \frac{A_K - A_O}{A_O} \times 100$$

A_K : Kontrol (antioksidan içermeyen) örneğin absorbansı

A_O : Örneğin(antioksidan içeren) absorbansı

Antioksidan derişimlerine karşı hesaplanan % inhibisyon değerleri ile çizilen grafikler %50 inhibisyonu sağlayan antioksidan derişimleri (IC₅₀) okunup sonuçlar IC₅₀ =µg/mL olarak verilmiştir.

2.3. LOX Enzim Aktivitesinin Tayini

Hypericum Perforatum L. bitkisinden saf olarak izole edilen maddelerin LOX enzimi üzerine etkileri Cayman Chemical Co (USA) firmasından temin edilen Lipoksijenaz İnhibitör Tarama Kiti kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. (<https://www.caymanchem.com/pdfs/760700.pdf>). Kitin içeriğinde aktivite ölçümü için gerekli olan Lipoksijenaz çalışma tamponu (10X), LOX enzimi, substrat olarak araşidonik asit ve linoleik asit, pozitif kontrol olarak kullanılacak olan nordihidroguaiaretik asit (NDGA), substrat çözücüsü olarak potasyum hidroksit (POH) verenkendirme işlemi için kromojen oluşturacak iki ayrı reaktif bulunmaktadır. Aktivite çalışmaları kitin içerisinde bulunan 96 kuyulu mikrolakalarda, Epoch çoklu plaka okuyuculu spektrofotometre (Biotek) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

HPLikincil metabolitlerinin LOX aktivitesi üzerine etkisinin incelenebilmesi için öncelikle LOX enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. 1µL NDGA, 9 µL çalışma tamponu ve 90 µL LOX enzimi plakalara konularak oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 10 µL substrat (araşidonik asit veya linoleik asit) eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika boyunca hızla karıştırılmıştır. Kuyulara 100 µL kromojen eklenerek çoklu mikrolakanın karıştırma işlemine 5 dakika daha devam edildi ve enzim aktivitesi **490 nm**'de absorbans ölçümü alınarak belirlenmiştir. HPL'den saflaştırılan yapıların çözünmesi için kullanılan DMSO'nun enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla deneme 1 µL NDGA yerine DMSO kullanılarak tekrarlanmıştır.

HPL sekonder metabolitlerinin LOX aktivitesini belirlemek için 1µL örnek (DMSO ile çözünmüş, son konsantrasyon 1µM), 90 µL LOX enzimi ve 9 µL çalışma tamponu 96 kuyulu mikrolakaya konularak oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir, 10 µL substrat eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika boyunca karıştırılmıştır ve kuyulara 100 µL kromojen eklenerek karıştırma işlemine 5 dakika daha devam edilip 590 nm'de absorbans ölçümleri alınmıştır.

Her bir HPL sekonder metaboliti için yüzde inhibisyonu değerleri aşağıda verilen denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\% inhibisyon = \frac{IA - A_{inh}}{IA} \times 100$$

IA: İnhibitörsüz enzim aktivitesi (ilk aktivite)

A_{inh}: İnhibitör varlığında enzim aktivitesi

2.4. Moleküler Doking

Bu çalışmada Scripps Araştırma Enstitüsü'ndeki Olson'ın laboratuvarı tarafından geliştirilen, küçük esnek ligandları sabit bir 3 boyutlu hedef yapıya yerleştirmeyi sağlayan AutoDock Vina yazılımı kullanılmıştır (Trott ve Olson, 2010). Doking işlemi sırasında takip edilen akış diagramı Tablo 2.2'de belirtildiği şekildedir. Mevcut versiyonda lineer regresyonun ötesine geçilerek, X-score puanlamadan esinlenilip hibrit bir puanlama sistemi kullanılmıştır. Vina'nın geliştirilmesinde genetik algoritmalar, parçacık yığın optimizasyonunda dahil çeşitli değişken küresel optimizasyon yaklaşımlarına yer verilmiştir. Uygulamada etkin bir yarı Newton yöntemi olan yerel optimizasyon için Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) yöntemi kullanılmıştır. BFGS, diğer yarı Newton optimizasyon yöntemleri gibi sadece puanlama fonksiyonunun değerini değil aynı zamanda gradyanını yani puanlama fonksiyonlarının argümanlarına göre türevlerini kullanır. AutoDock uygulamalarının çalışma alanı, bilgisayar destekli yapı bazlı ilaç tasarımı, X-ışını kristalografisi analizi, yüksek verimli sanal tarama, kombinatoriyal kütüphane tasarımı ve protein-protein etkileşimi çalışması dahil oldukça geniştir (Trott ve Olson, 2010; Huang ve ark., 2010).

Tablo 2.2 Moleküler Doking çalışmasında izlenen Basamaklar



2.4.1. Enzim dosyalarının hazırlanması

MAO-A için 2.2 Å çözünürlükteki 2Z5X kristal yapısı, MAO-B için 1.6 Å çözünürlükteki 2XFN kristal yapısı, COX-1 için 2.4 Å çözünürlükteki 3LN1 kristal yapısı, COX-2 için 2.0 Å çözünürlükteki 1Q4G kristal yapısı, 5-LOX için 2.4 Å çözünürlükteki 3O8Y kristal yapısı, 15-LOX-B için 2.63 Å çözünürlükteki 4NRE kristal yapısı protein veri bankasından pdb formatında indirilmiştir. Dimer halde bulunan enzimlerin zincirlerinden biri silinerek monomerik yapı elde edilmiştir. MAO izozimlerindeki FAD (Flavin Adenin Dinükleotit) yapısına, COX izozimlerindeki HEM (Protoporfirin IX Fe³⁺) yapısına ve LOX izozimlerindeki serbest Fe²⁺ metale dokunulmadan her bir enzimin kristal yapısında bulunan inhibitör, deterjan ve su molekülleri silinip gerekli düzeltmeler yapılmış, aktif bölgesi temizlenen enzimler pdb formatında kaydedilmiştir. Elde edilen pdb formatındaki enzim dosyaları rijid doking işlemi için AutodockTools 1.5.6 programında (Morris ve ark., 2009) açılarak pdbqt formatına dönüştürülerek doking işlemine hazır hale getirilmiştir.

Esnek (flex) doking işlemi için esnek olarak seçilen amino asitler belirlenmiş ve Tablo 2.3’de verilmiştir. Pdb formatında kaydedilen aktif bölgesi boş olan enzim dosyaları AutodockTools 1.5.6 programında açılıp aktif bölge amino asitleri doking işleminde esnek olarak seçilmiş, dönebilen bağ sayıları tanımlanmış ve pdbqt formatında kaydedilmiştir.

Tablo 2.3 MAO-A, MAO-B, COX-1, COX-2, 5-LOX ve 15-LOX-B izozimlerinin aktif bölgesinde yer alan esnek olarak seçilen amino asitler

MAO-A	MAO-B	COX-1	COX-2	5-LOX	15-LOXB
Tyr69	Tyr60	Val116	Arg106	Trp147	Glu369
Asn181	Cys172	Arg120	Gln178	Phe177	His373
Ile207	Ile198	Val349	Val335	Tyr181	His378
Phe208	Gln206	Leu352	Leu338	Thr364	Leu415
Gln215	Lys296	Tyr355	Ser339	Asn407	Leu419
Lys335	Tyr326	Ile523	Leu370	Leu420	Val426
Phe352	Phe343	Ala527	Tyr371	Phe421	Thr431
Cys406	Cys397	Ser530	Trp373	His432	Leu605
Tyr407	Tyr398		Arg499	Trp599	Ala606

Tyr444

Tyr435

Val509

His600

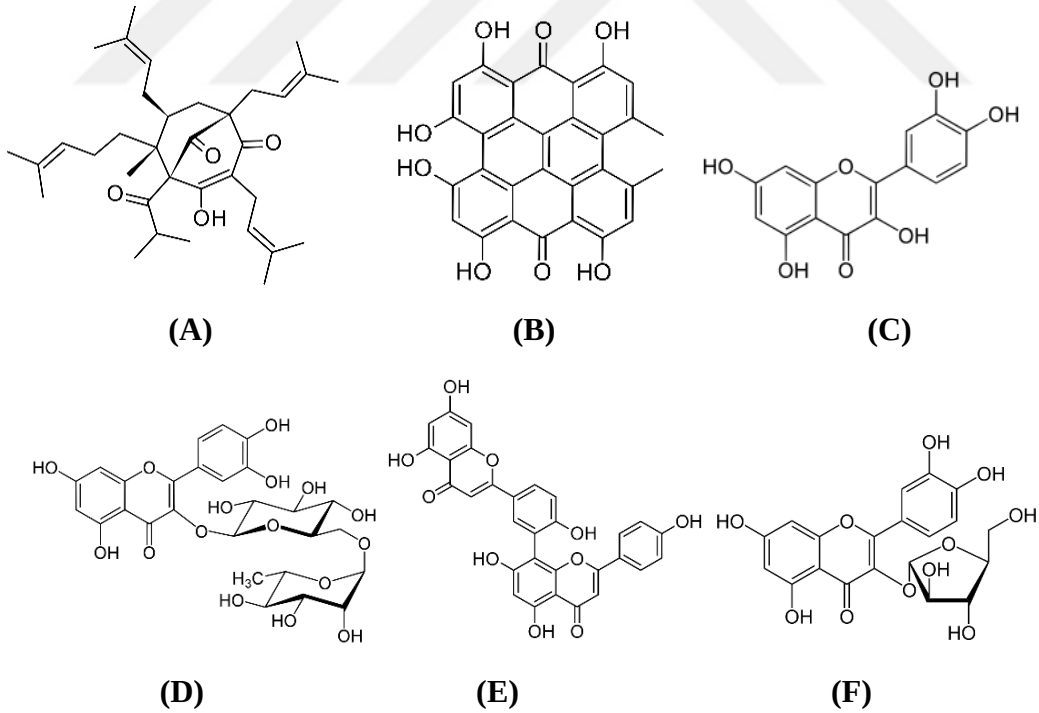
Leu609

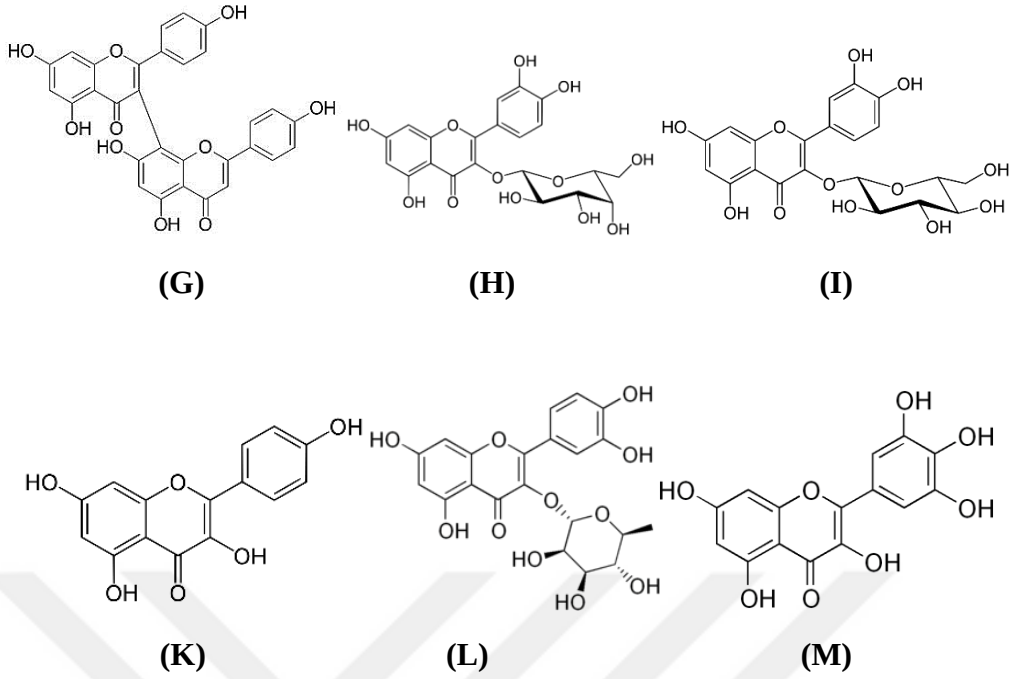
Ala513

Leu517

2.4.2. Ligand bileşiklerinin hazırlanması

İnhibitör özelliklerini araştırmak üzere *Hypericum Perforatum L.* bitkisinin temel bileşenleri ile MAO, COX ve LOX izozimlerinin x ışını kristal yapılarında bulunan ligandların üç boyutlu yapıları SPARTAN'16 (Wavefunction Inc., 2016) programında çizilmiştir. SPARTAN'16 programındaki Moleküler Mekanik yöntemi ile konformer taraması yapıp, tüm konformerler arasından en iyi 50 yapı seçilerek yarı-deneyssel PM6 yöntemi ile her bir bileşik için en kararlı konformasyonlar seçilmiştir. Birbirine yakın enerjideki konformerler arasında daha ayrıntılı bir enerji iyileştirme işlemi için M06-2X yöntemi kullanılmıştır ve optimize edilmiş bileşikler pdb formatında kaydedilmiştir. AutodockTools programı kullanılarak her bir ligand yapısı doking işlemine hazırlanarak pdbqt formatında kaydedilmiştir. Veri setini oluşturan bileşiklerin iki boyutlu yapıları Şekil 2.5'de verilmiştir.





Şekil 2.5 *Hypericum Perforatum L.* bitkisinin en bilinen bileşenlerinden Hiperforin (A), Hiperisin (B) ve bitki içeriğinde en fazla karşılaşılan flavanoid türlerinden Kuersetin (C), Rutin (D), Amentoflavon (E), Avikularin (F), 1,8'-Biapigenin (G), Hiperisit (H), İzokuarsetin (I), Kemferol (K), Kuersitrin (L) ve Mirisetin (M) iki boyutlu yapıları

2.4.3. Konfigürasyon dosyalarının hazırlanması

Doking hesaplamalarının yapılabilmesi için, protein ve ligand molekülleri hazırlandıktan sonra komut istemini çalıştırmak için konfigürasyon dosyalarının hazırlanması gerekir. Konfigürasyon dosyası; doking işlemine hazırlanan ligand ve protein moleküllerinin adı, proteinin aktif bölgesinde bağlanmanın gerçekleştiği atom merkez alınarak oluşturulan küpün boyutlarını ve merkez koordinatlarını tanımlayan parametrelerden oluşur. AutoDock Vina programı kullanılarak yapılacak olan rijid ve esnek doking hesaplamalarında kullanılacak örnek konfigürasyon dosyaları Şekil 2.6'dedir.

```

receptor = protein.pdbqt
ligand = ligand.pdbqt

center_x = 34.176
center_y = 31.342
center_z = -14.785

size_x = 40
size_y = 40
size_z = 40

```

(a)

```

receptor = rigid.pdbqt
flex = flex.pdbqt
ligand = ligand.pdbqt

center_x = 34.176
center_y = 31.342
center_z = -14.785

size_x = 40
size_y = 40
size_z = 40

```

(b)

Şekil 2.6 Rijid (a) ve esnek (b) doking hesaplamaları için örnek konfigürasyon dosyaları

Rijid ve esnek doking hesaplamalarının konfigürasyon dosyasında kullanılmak üzere oluşturulan grid için her izozimin kendine özgü küpünün x,y,z boyut ve koordinat bilgileri Tablo 2.4'te belirtildiği gibidir. Oluşturulan küp içerisinde ligandların enzime bağlanması sağlanmıştır.

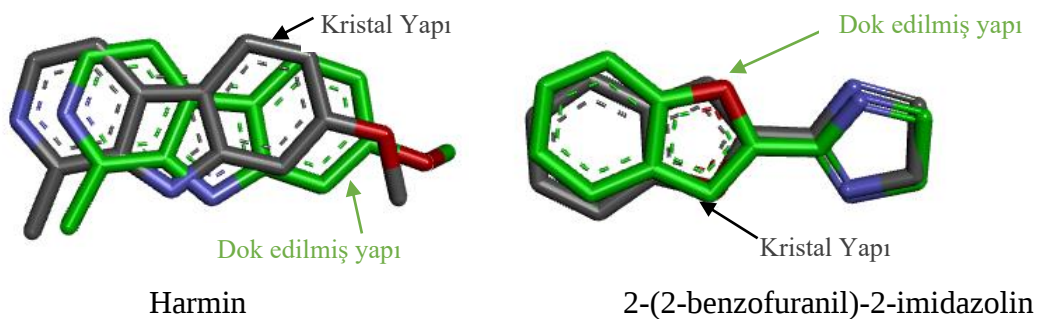
Tablo 2.4. Her izozim için oluşturulan küpün boyutlarını tanımlayan parametreler

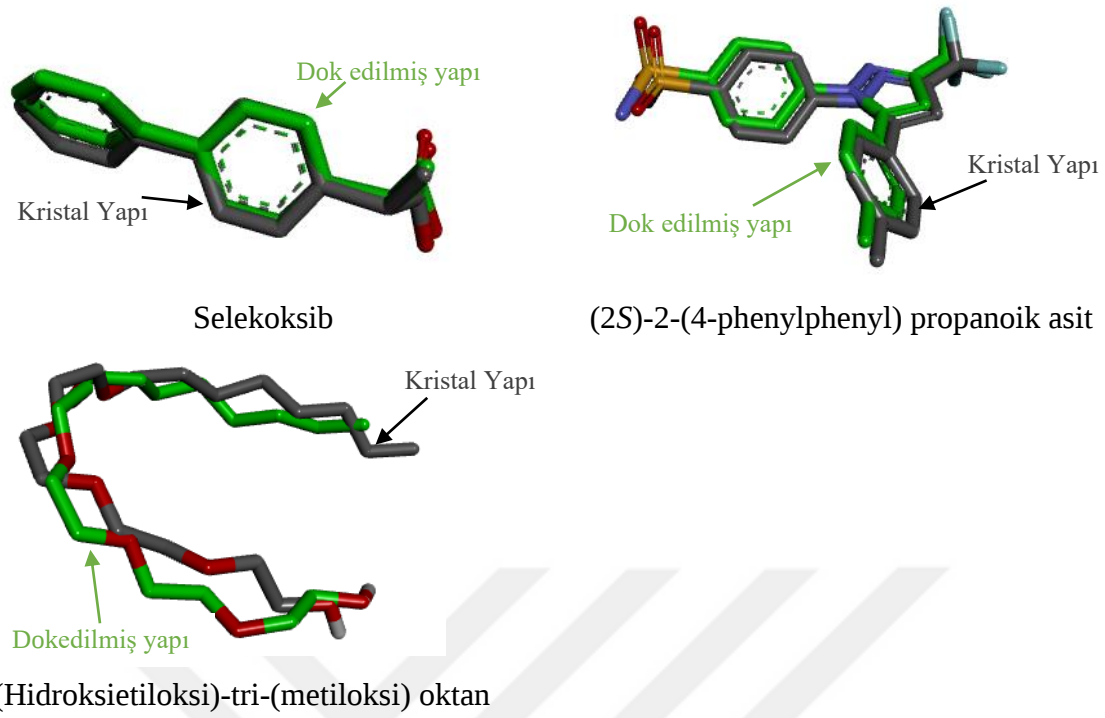
İzozim	x, y, z boyutu (Å)	x, y, z koordinatları
MAO-A	40x40x40	x:34.176
		y:31.342
		z:-14.785
MAO-B	40x40x40	x:55.199
		y:150.457
		z:21.281
COX-1	40x40x40	x:26.108
		y:35.061
		z:197.448
COX-2	40x40x40	x:30.518
		y:-21.298
		z:-16.690
5-LOX	40x40x40	x:-4.583
		y:25.920
		z:-0.113
15-LOXB	40x40x40	x:11.484
		y:-55.195
		z:-23.606

2.4.4. Doking işlemi

Konfigürasyon dosyalarının hazırlanmasının ardından, AutodockVina programı ile protein ve ligand pdbqt dosyaları açılarak komut istemi çalıştırılmış ve doking işlemi yapılmıştır. Hesaplama sonucunda ligandın enzime bağlanabileceği farklı konformasyon ve bağlanma enerjileri elde edilmiştir. Her bileşik için bu hesaplama 10 kez tekrar edilmiştir.

AutoDockVina programının validasyonu, enzimlerin kristal yapısında var olan inhibitörlerinin enzimlerine doklanması ile elde edilen konformasyonlarının X-ray yapısından sapması (RMSD, Root Mean Square Deviation) incelenerek yapılır. Bu sebeple kullanılan kristal yapıların harmin (MAO-A), 2-(2-benzofuranil)-2-imidazolin (MAO-B), Selekoksib (COX-1), (2S)-2-(4-fenilfenil) propanoik asit(COX-2),(Hidroksietiloksi)-tri-(metiloksi) oktan (15-LOX-B) inhibitörleri enzimlerine dok edilmiştir. 5-LOX kristal yapısı içerisinde inhibitör bulunmadığından validasyon işlemi atlanmıştır. Kristal yapı pozisyonları ile dok pozisyonları BIOVIA Discovery Studio Visualizer 4.5 - 2016 programı (Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2016, San Diego: Dassault Systèmes, 2016) kullanılıp üst üste çakıştırılarak hata payının RMSD < 2 kriterini sağlayıp sağlamadığı kontrol edilmiştir. RMSD hesapları sonucunda RMSD değerleri MAO-A inhibitörü için 1.194, MAO-B inhibitörü için 1.594, COX-1 inhibitörü için 1.245, COX-2 inhibitörü için 1.146, 15-LOX-B inhibitörü için 1.726 olarak hesaplanmıştır. Kristal yapı pozisyonları ve dok pozisyonlarının üst üste çakıştırılmış görüntüleri Şekil 2.7’de gösterildiği gibidir. Bu sonuçlar RMSD < 2 ölçütünü sağlayarak kullanılan yöntemin doğru olduğunu gösterir.





Şekil 2.7 Ligandların dok pozisyonları (C atomları yeşil) ile kristal yapı pozisyonlarının (C atomları gri) üst üste çakıştırılmasından elde edilen görüntüleri

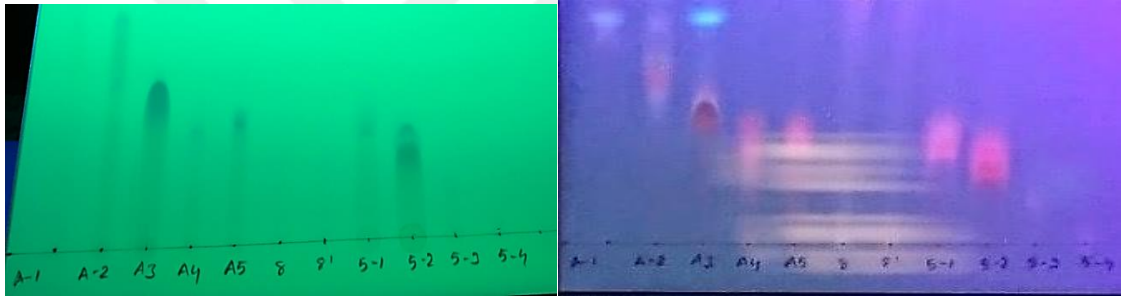
2.4.5. Doking sonuçlarının görüntülenmesi

Doking işleminin ardından program tarafından yapılan hesaplamalar sonucunda rijid dokingde ligandın enzime bağlanabileceği konformasyonlar ile her birine ait bağlanma enerjilerinin olduğu pdbqt formatında out dosyası, bağlanma enerjilerini ve bu enerjilerin karşılaştırmalarını içeren txt formatında log dosyası elde edilmiştir. Esnek dokingde ise bu dosyalara ek olarak esnek seçilen amino asitlerin bulunduğu pdbqt formatında flexible dosyası ve esnek seçilen amino asitlerin dışında kalan amino asitleri içeren pdbqt formatında rigid dosyası oluşmuştur. Rijid dokingde oluşan out dosyasından farklı olarak esnek doking out dosyası esnek seçilen aminoasitlerin de konformasyonlarını içermektedir. Elde edilen sonuçlar AutoDockTools ile görüntülendikten sonra her bir ligand için en iyi bağlanan konformasyonlar seçilmiştir ve Discovery Studio görüntüleme programı ile enzim-ligand etkileşimleri (etkileşim mesafeleri, etkileşim çeşidi vs.) incelenmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. İkincil Metabolitlerin Tanımlanması

Sabit faz olarak silika jel, hareketli faz olarak kloroformdan başlanarak artan polaritede kloroform-etanol karışımı ile kaba kolon kurulup, %100 metanoldeki HPL ekstresi yürütülmüştür. Tüplere toplanan örneklere İTK ile farklı polaritedeki sistemlerde yürütme işlemi yapılmış, yürümeler görünür ışık ve UV lambada izlenmiştir. İTK’ndeki yürüme benzerliklerine göre birleştirilerek, saf maddelerin izolasyonu için preparatif İTK uygulanmıştır. Bu işlem birkaç kez tekrarlanarak toplamda 10 madde izole edilmiştir. Preparatif İTK ile izole edilen tüm bileşiklere tekrar İTK yapılarak benzerlikler ve safsızlıklar aranmıştır. İzole edilen bileşiklerin görünür ışık ve UV lamba görüntüleri Şekil 3.1’dedir.



Şekil 3.1Bileşiklerin görünür ışık ve UV lambadaki görüntüleri

UV-Vis, Floresans, FT-IR, ve ^1H NMR spektroskopik yöntemleri kullanılarak izole edilen bileşiklerin yapı tayini gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Kuersetin

Kuersetin [2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one] (4.92 mg) – Sarı toz halde; Molekül Formülü $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$, m.p. > 300 °C. Çözünürlük: Etanol, Metanol, FT-IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3160, 1750, 1610, 1250; ^1H -NMR (500 MHz): δH 7.65 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.50 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.20 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H).

Sarı toz halde bulunan **1** bileşiğinin erime noktası 400 °C nin üzerindedir. FT-IR spekturumunda 3160cm^{-1} ’de gözlenen yayvan (broad) band hidroksil grubunun, 1710, 1650 ve 1610cm^{-1} ’de gözlenen keskin bandlar ise sırasıyla karbonil ve karbon karbon çifte bağlarının varlığını göstermektedir.

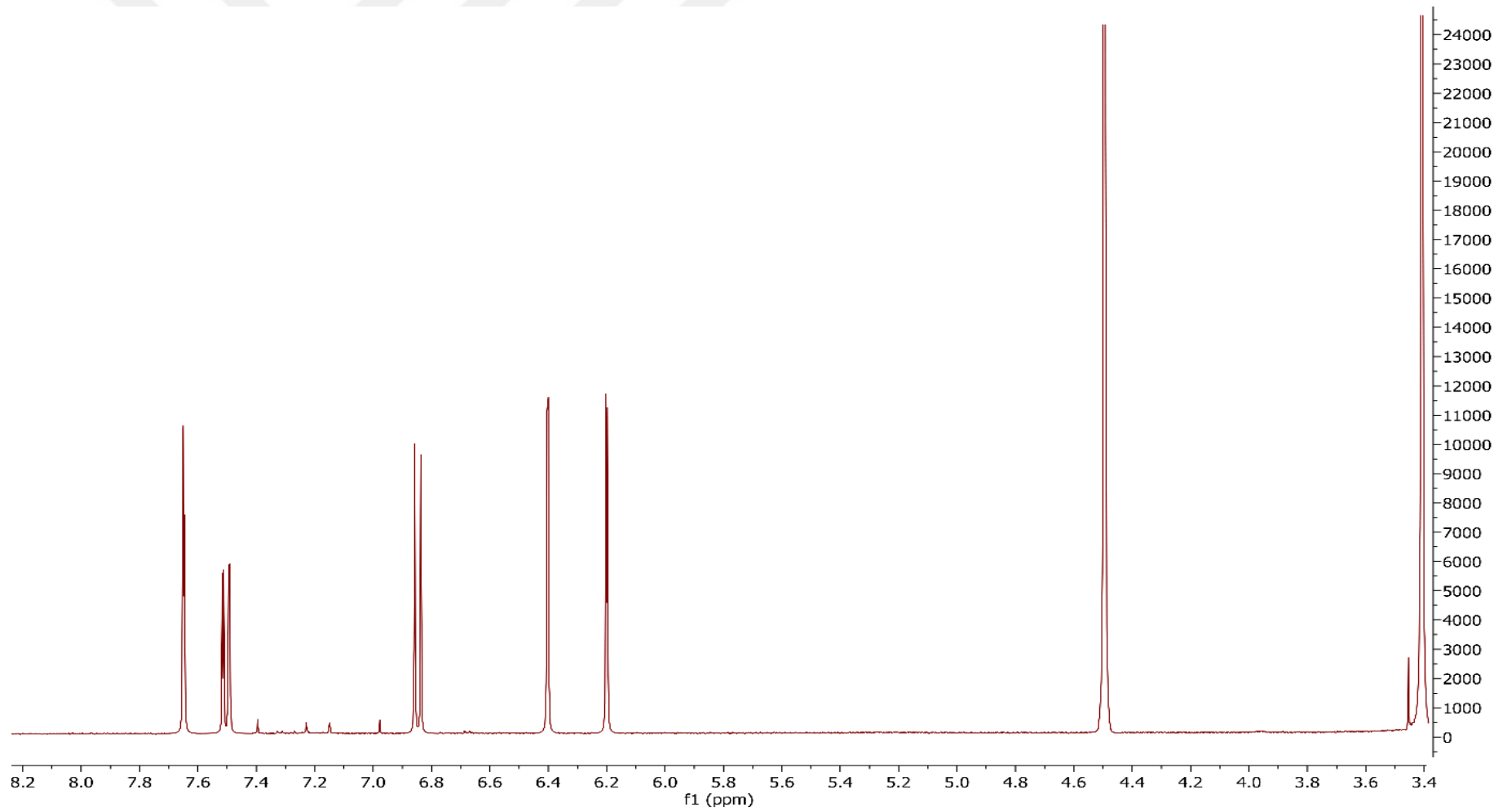
İzole edilen **1** bileşiminin Şekil 3.2'deki ^1H NMR spekturumunda H_b protonu 6.40 ppm de 2.0 Hz lik eşleşme sabiti ile dublet olarak gözlenirken H_a protonu 6.20 ppm de 2.0 Hz lik eşleşme sabiti ile dublet olarak gözlenmiştir. H_c protonu 7.50 ppm'de sırasıyla H_e ve H_d protonuna 8.4 ve 2.1 ppm eşleşme sabiti ile bölünmüştür. H_d protonu 7.65 ppm de 2.1 Hz lik meta bölünme vermiştir. H_e protonu ise 6.85 ppm de 8.4 Hz'lik orto bölünme vermiştir. ^1H NMR'da gözlenen kimyasal kayma değerleri, eşleşme sabitleri ve integrasyon sonuçları bileşiğin Kuersetin olduğunu göstermektedir.

Hypericum Perforatum L. bitkisinden izole edilen **1** bileşiği içi literatür çalışmaları ve İTK'de standart madde ile değişik çözücü sistemlerinde yapılan Rf karşılaştırmalarında yapının kuersetin olduğunu doğrulamıştır.

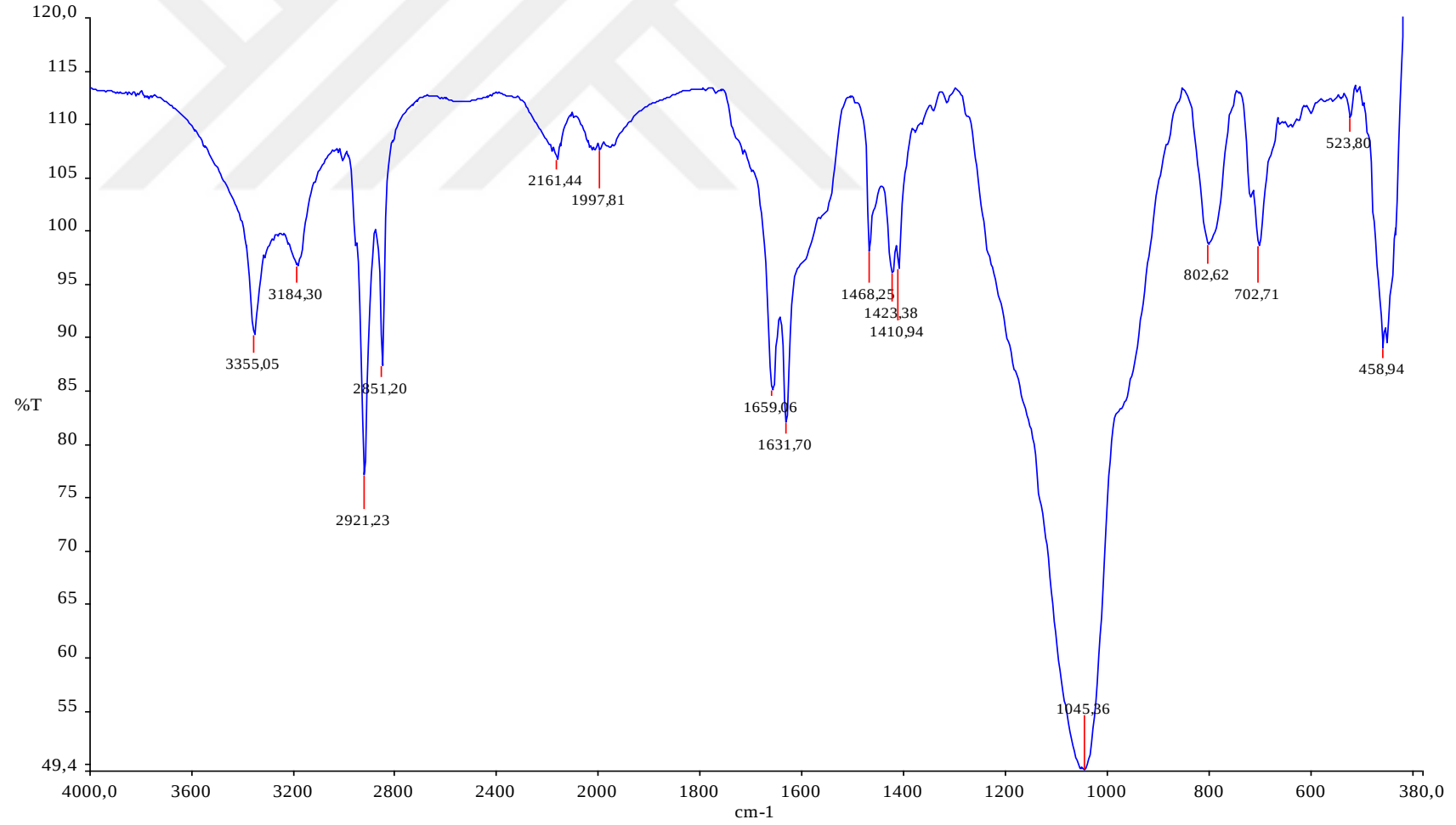
3.1.2. Hiperisin

Hiperisin[1,3,4,6,8,13-hexahydroxy-10,11-dimethylphenanthro[1,10,9,8-opqra]perylene-7,14-dione] (4.63 mg)) –kırmızı katı; Molekül Formülü $\text{C}_{30}\text{H}_{16}\text{O}_8$, m.p. $> 300^\circ\text{C}$. Çözünürlük: Etanol, Metanol, Dimetilsülfoksit (DMSO). UV-Vis v_{max} (nm), EtOH: 590 nm. FT-IR (KBr) $v_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3355, 3184, 2921, 2851, 1659, 1631, 1045; ^1H -NMR (500 MHz): δH 2.10 (s).

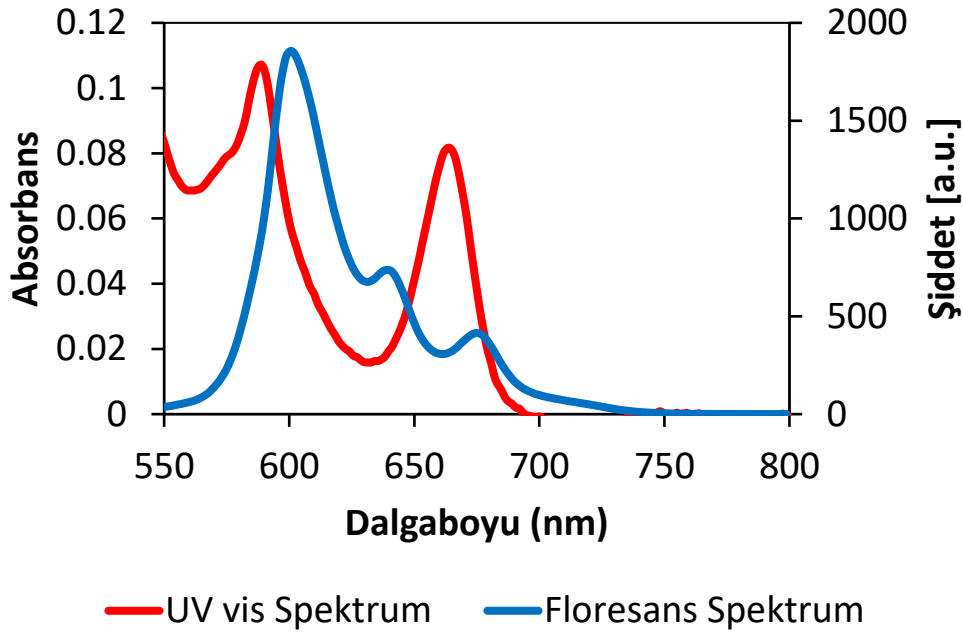
Kırmızı katı olarak izole edilen **9** bileşiminin erime noktası 400°C nin üzerindedir. Şekil3.3'deki FT-IR spekturumunda $3355, 3184\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen yayvan (broad) band hidroksil grubunun, $2921, 2851\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen bandlar sp^3 hibritleşmesi yapmış C-H bandlarını, 1650 ve 1610 cm^{-1} ' de gözlenen keskin bandlar ise karbon karbon çift bağlarının varlığını göstermektedir. ^1H NMR spekturumunda sadece 2.10 ppm de keskin singlet gözlenmiştir. Bu değer allilik protonların varlığını göstermektedir. 400-800 nm aralığında alınan UV-Vis spektroskopisinde gözlenen 590 nm deki band ile Floresans Spekturumunda gözlenen 600 nm deki band yapının hiperisin olduğunu doğrulamaktadır ve Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.21 Bileşiğinin ^1H NMR spekturumu



Şekil 3.3 9 bileşiğinin FT-IR spekturumu



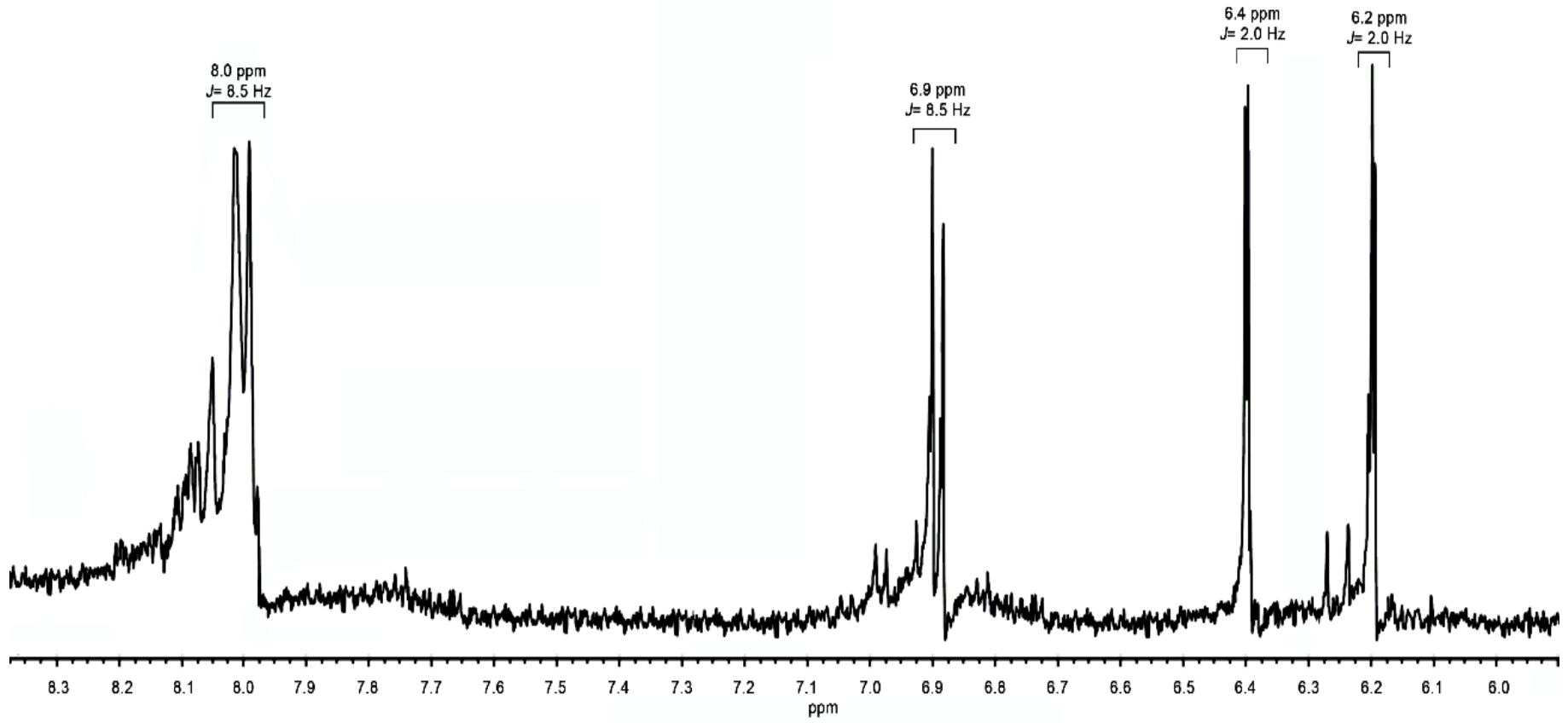
Şekil 3.4 9 bileşiğinin UV-Vis ve Floresans spekturumları

Yapılan literatür taraması sonucunda FT-IR, ^1H NMR, UV-Vis ve Floresans Spekturumlarından elde edilen datalar literatür ile tam bir uyum içinde bulunmuştur. İzole edilen 9 bileşiği hipericin olarak tanımlanmıştır.

3.1.3. Kemferol

Kemferol [3,4',5,7-Tetrahydroxyflavone, 3,5,7-Trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one] (4.49 mg) – Sarı toz halde; Molekül Formülü $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$, m.p.= 276-278 °C. Çözünürlük: Etanol, Metanol, FT-IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3400, 1700, 1640, 1610, 1250; ^1H -NMR (500 MHz): δ_{H} 6.21 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.41 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 8.01 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H).

Sarı toz halde bulunan 5 bileşiğinin erime noktası 276-278 °C'dir. FT-IR spekturumunda 3400 cm^{-1} 'de gözlenen yayvan (broad) band hidroksil grubunun, 1700 cm^{-1} 'de gözlenen band karbonil grubunu, 1640 ve 1610 cm^{-1} 'de gözlenen keskin bandlar ise karbon karbon çifte bağlarının varlığını göstermektedir. Şekil 3.5'deki bileşiğin ^1H NMR'da gözlenen kimyasal kayma değerleri, eşleşme sabitleri ve integrasyon sonuçları literatür değerleri ile uyumlu olup yapının kemferol olduğunu doğrulamaktadır.



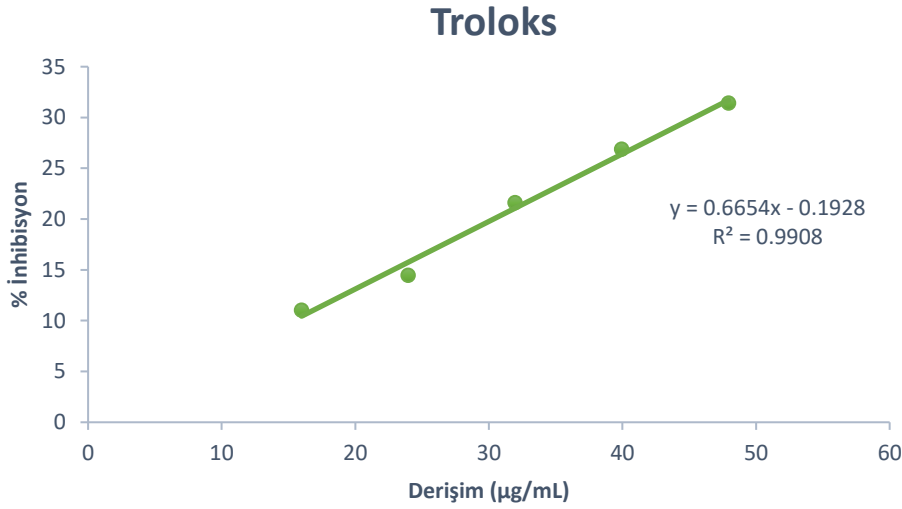
Şekil3.5 5 Bileşiğinin ^1H NMR spekturumu

HPL bitki ekstresinin farklı fraksiyonlarından izole ettiğimiz 10 farklı maddeden 1, 5 ve 9 numaralı maddelerin yapı tanımlanması yapılabilmektedir. Antioksidan aktivitesi iyi olan 4 numaralı bileşiğin izokuersetin olduğunu düşünmekteyiz. Ancak izole ettiğimiz madde miktarının oldukça az olması ve safsızlık içermesi sebebiyle düzgün bir ^1H NMR sonucu elde edilememiştir ve madde tanımlanamamıştır.

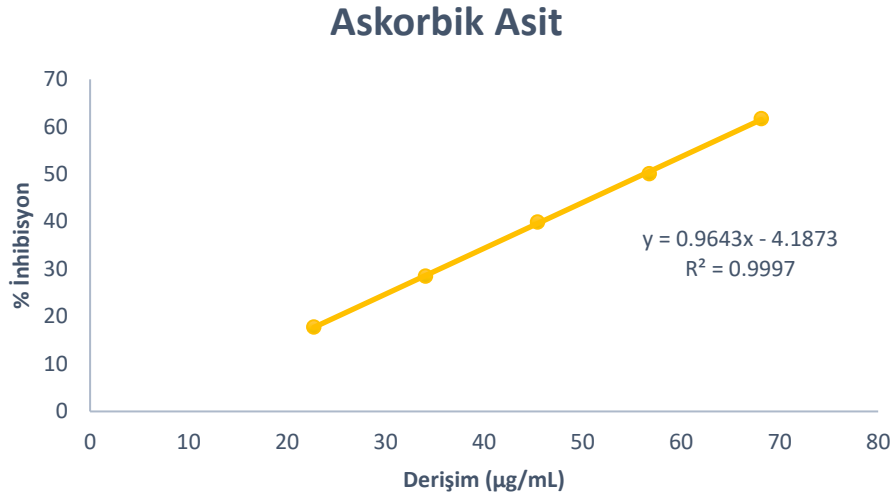
3.2. DPPH Serbest Radikalı Giderme Aktivitesi Tayini

Kararlı bir serbest radikal olan DPPH'nin antioksidan ile oluşturduğu reaksiyona ait okunan absorbans ne kadar düşükse antioksidanın serbest radikal giderme aktivitesi de o kadar yüksektir. Absorbansın düşmesinin temelinde, antioksidan moleküllerinin radikal ile reaksiyonu sonucu oluşan hidrojen bağlanması ile radikali giderme vardır.

DPPH yöntemi ile çalışılan standart antioksidanlardan olan askorbik asit ve troloksun derişime karşı %inhibisyon grafikleri çizilmiştir. Elde edilen grafikler Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.6 DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi tayini için farklı troloks derişimlerine karşı elde edilen absorbans grafiğı



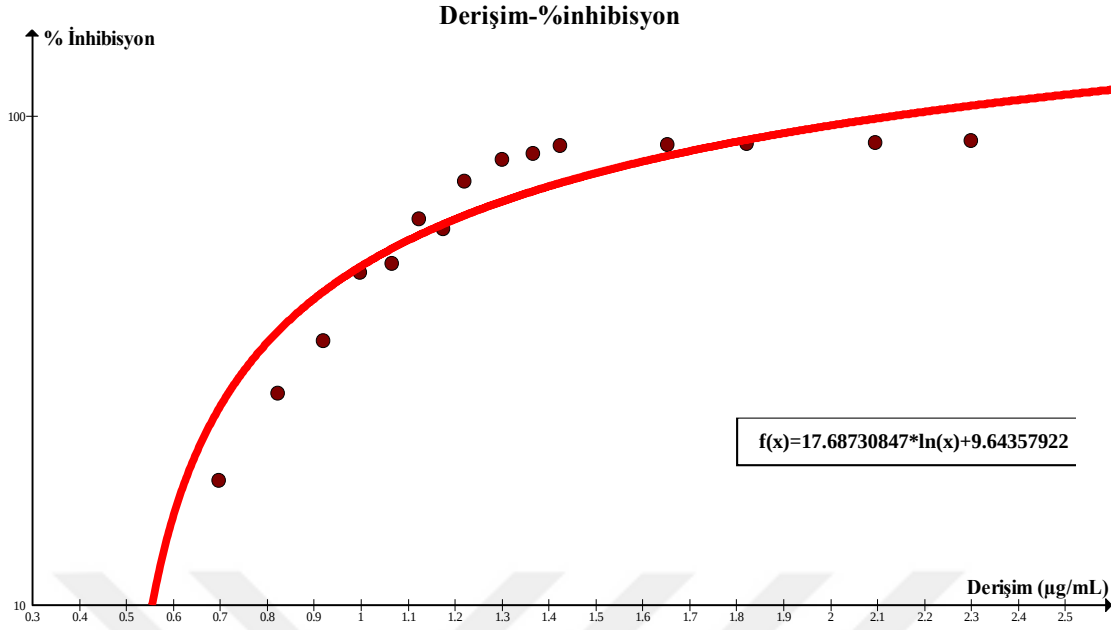
Şekil 3.7 DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi tayini için farklı askorbik asit derişimlerine karşı elde edilen absorbans grafiğı

Standart antioksidanlara ait % inhibisyon ve DPPH radikali absorbansını %50 düşüren konsantrasyon değeri olarak ifade edilen IC₅₀ değeri Tablo 3.1’de verilmiştir. IC₅₀ değeri ne kadar düşükse radikal süpürme gücü o kadar yüksektir.

Tablo 3.1 Standart antioksidanlara ait % inhibisyon ve IC₅₀ değeri

Standart Antioksidan	% İnhibisyon					IC ₅₀ değeri	
	4 µg/mL	6 µg/mL	8 µg/mL	10 µg/mL	12 µg/mL	(µM)	(µg/mL)
Troloks	13,60799	28,4644	39,3258	51,06117	63,54557	62,039	3,88
Askorbik A.	17,7686	28,5124	39,9449	50,13774	61,70799	56,1902	2,47

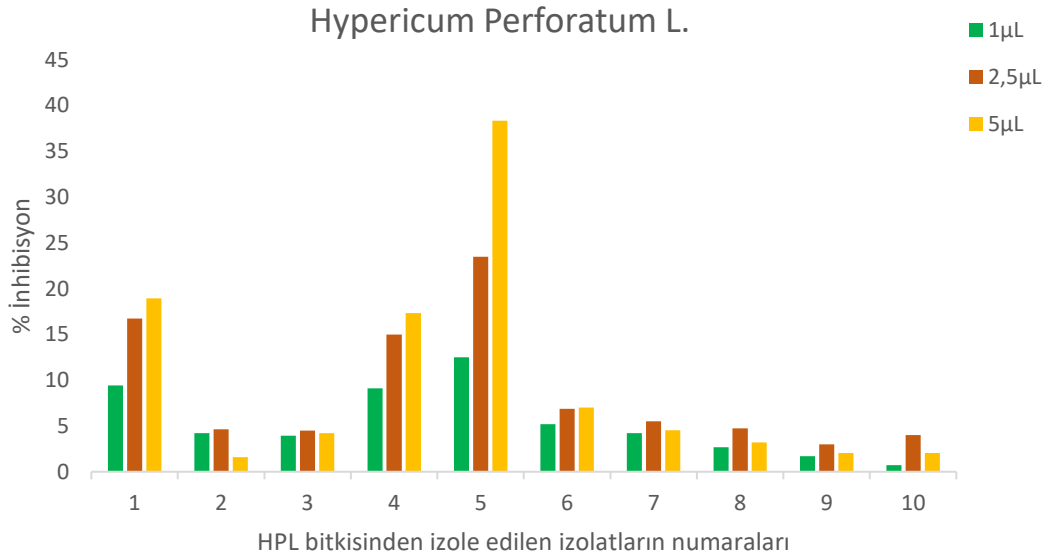
Etanol ile hazırlanan HPL ekstresinin farklı konsantrasyonlarına deney prosedürü uygulanmış, ölçülen absorbanslar ile % inhibisyon değeri hesaplanmıştır. Etanol ekstresinin konsantrasyon artışına bağılı % inhibisyon grafiğı Şekil 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.8 HPL etanol ekstresinin derişim (µg/mL)-% inhibisyon grafiğı

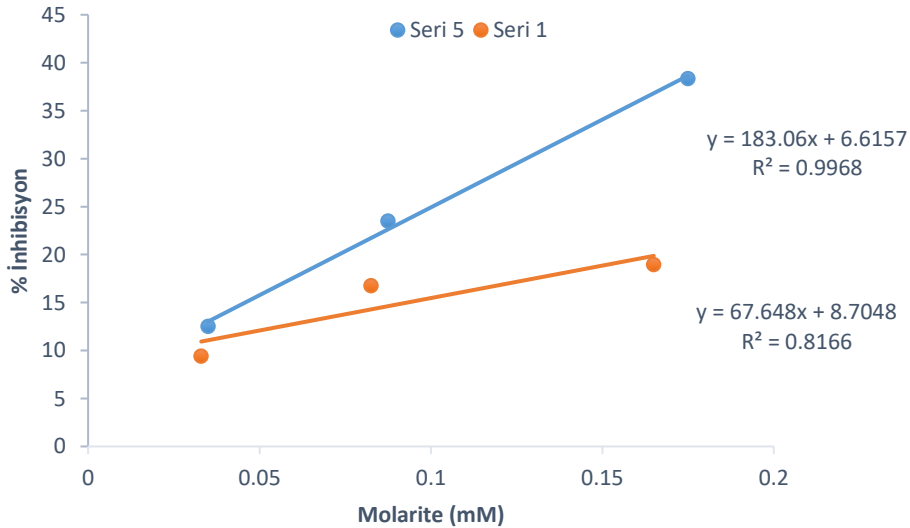
Bitki ekstresinin farklı derişimlerine ait % inhibisyon grafiğınden, absorbansını %50 düşüren konsantrasyon değeri olarak ifade edilen IC_{50} değeri 2,28 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Tablo 3.1'deki sentetik antioksidanların IC_{50} değeri ile karşılaştırıldığında trolok > HPL > askorbik asit şeklinde bir sıralama yapılabilir. HPL'nin alkol ekstresinin IC_{50} değeri sentetik antioksidanlara yakın bir antioksidan aktivite gösterdiği söylenebilir.

HPL bitkisinden izole edilen bileşikler derişimleri 10µg/mL olacak şekilde DMSO ile çözünerek ana örnekler oluşturulmuş, 1:10 oranında seyreltilip derişimi 1µg/mL yapılarak, 1µL, 5µL ve 10µL alınarak deney prosedürü uygulanmış ve ölçülen absorbans değeri ve hesaplanan % inhibisyon sonuçları kabul edilemeyecek kadar düşük bulunmuştur. Bu sebeple denemelerana örneklerden (10µg/mL) 1µL, 2,5µL ve 5µL alınıp deney prosedürü uygulanarak tekrarlanmıştır ve derişim artışına bağı % inhibisyon değeriinde meydana gelen değışim Şekil 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3.9 10 farklı HPL izolatının konsantrasyon olarak değişen % inhibisyon grafiği

Şekil 3.9’da her bir madde için konsantrasyon artışına bağlı % inhibisyon değerlerindeki değişimi incelediğimizde 1 ve 5 numaralı örneklerin belirli bir düzende artış gösterdiği ve % inhibisyon değerlerinin diğer örneklerle göre daha iyi olduğu görülmektedir. 1 ve 5 numaralı izolatlara ait derişim-% inhibisyon grafiği şekil 3.10’da verilmiştir.



Şekil 3.10 1 ve 5 numaralı izolatların molarite -%inhibisyon grafikleri

Molariteye karşı % inhibisyon değerleriyle oluşturulan grafikten, 1 numaralı örnek olan kuersetin maddesinin IC_{50} değeri 610,44 μ M, 5 numaralı örnek olan Kemferol

maddesinin IC₅₀değeri 236,70 µM olarak hesaplanmıştır. Kemferol maddesinin kuersetine göre daha iyi bir antioksidan aktivitesi gösterdiği ancak Tablo 3.1’de IC₅₀ değerleri verilen troloks ve askorbik asite göre düşük antioksidan aktivitesi gösterdiği görülmüştür.

3.3. Enzim İnhibisyonu Sonuçları

Enzim aktivitesi çalışmalarında 20 dakika sonunda 490 nm’de kitin içerisinde bulunan her iki substrat ile (linoleik asit ve arskorbik asit) farklı konsatrasyonlarda absorbands ölçümleri yapılmış, enzim aktivitesi üzerine flavonoidlerin çözünmesinde kullanılan DMSO’nun kullanıldığı konsantrasyondaki etkisine bakılmıştır. Aktivite çalışmalarını prosedüre uygun olarak yürütmemize rağmen kitin içerisinde bulunan standart olarak kabulettiğimiz inhibitör, enzim inhibisyonuna etki etmemiştir. Bitkiden izole ettiğimiz 10 maddenin de enzimin absorbands değerlerine etkisi incelenmiş ancak LOX kitindeki problem sebebiyle düzgün bir absorbands değeri okunamamış, % inhibisyon hesaplanamamıştır.

3.4 Moleküler Doking Sonuçları

MAO-A, MAO-B, COX-1, COX-2, 5-LOX ve 15-LOXB enzimleri ile yapılan rijid ve esnek doking çalışmaları her bir ligand için 10 kez tekrarlanmıştır. Rijid ve esnek doking çalışmalarından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, esnek dokingde enzimin aktif bölgesindeki amino asitlerin esnek seçilmesine bağlı olarak amino asitlerin konformasyonlarında meydana gelen değişiklikler sonucunda, ligandların enzimin aktif bölgesindeki amino asitlerle rijid dokinge göre daha fazla sayıda etkileşim yaparak yerleşmesini sağlamıştır. Dolayısıyla bu durum esnek dokingde ligandların enzimin aktif bölgesine daha yüksek afinite ile bağlanmasına ve bağlanma enerjisi değerlerinin iyileşmesine sebep olmuştur.

Esnek doking sonucu enzime en iyi afinite ile bağlanan konformasyonların bağlanma enerjileri Tablo 3.2’de verilmiştir. *Hypericum Perferatum* L. bitkisinin ana aktif bileşenlerinden olan hiperisin, hiperforin ve flavanoidlerden ligand olarak seçilen tüm bileşiklerde kuvvetli bağlanma enerjileri göze çarpmaktadır. Her bir enzim için bağlanma enerjisi < -8.0 kcal/mol olan kuersetin, amentoflavon, kemferol ve mirisetin güçlü çoklu-hedefli bileşikler olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.2 Esnek doking sonucu enzim-ligand bağlanma enerjileri (kcal/mol).

Ligand	MAO-A	MAO-B	COX-1	COX-2	5LOX	15LOXB
Hiperforin	-6.0	-6.0	-6.9	-9.2	-7.8	-9.2
Hiperisin	-8.4	-9.2	-8.7	-10.0	-10.0	-11.8
Kuersetin	-10.7	-8.1	-9.6	-10.1	-8.1	-8.2
Rutin	-7.8	-7.4	-8.8	-11.9	-9.0	-8.9
Amentoflavon	-8.1	-8.8	-10.4	-13.2	-9.9	-10.6
Avikularin	-7.8	-7.3	-7.4	-10.8	-7.7	-8.5
Biapigenin	-7.2	-7.4	-8.8	-9.5	-9.4	-9.6
Hiperozid	-7.2	-7.4	-8.8	-11.6	-7.7	-8.6
Izokuersetin	-7.3	-7.1	-9.4	-10.8	-8.3	-8.4
Kemferol	-10.3	-8.1	-9.3	-10.0	-9.8	-9.0
Kuersitrin	-7.8	-7.3	-7.9	-10.8	-7.7	-8.9
Mirisetin	-10.6	-8.0	-9.2	-10.3	-8.0	-8.0

3.4.1. Enzim-ligand bağlanma etkileşimlerinin incelenmesi

Esnek doking çalışmaları sonucunda yüksek bağlanma afinitesine sahip bileşiklerin, enzimler ile gösterdiği etkileşimler BIOVIA Discovery Studio Visualizer 4.5 - 2016 programı kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışmada her bir bileşiğin MAO-A, MAO-B, COX-1, COX-2, 5-LOX ve 15-LOXB inhibitör potansiyelleri araştırılmıştır ve tüm bu enzimler için yüksek afiniteye sahip bileşikler; hiperisin, kuersetin, amentoflavon, kemferol ve mirisetin olarak belirlenmiştir. Bu bileşikler MAO enzim ailesi için seçicilik açısından değerlendirilmiş, anti-enflamatuar etki aradığımız COX ve LOX enzim aileleri için seçiciliğin aksine ikili etki açısından değerlendirilmiştir. Bu bileşiklerin bağlanma mekanizmaları aşağıda detaylı bir şekilde incelenmiştir.

3.4.1.1. MAO-A ve MAO-B doking sonuçları

MAO-A ve MAO-B enzimlerinin ligandlara bağlanma enerjilerinden (ΔG), K_i değerleri $\Delta G = RT \ln K_i$ ($R=1,988$ kcal/mol.K, $T=298K$) formülü kullanılarak hesaplanmış ve iki izoenzim arasındaki seçicilik indeksi olan SI (MAO-A'nın K_i değerinin MAO-B K_i değerine oranı) değerleri Tablo 3.3'de verilmiştir. Bileşiklerin MAO-A izoenzimine bağlanma afiniteleri ($-6.0 \geq \Delta G \geq -10.7$ kcal / mol), MAO-B izoenzimin bağlanma afinitelerinden ($-6.0 \geq \Delta G \geq -9.2$ kcal / mol) daha iyidir. Kuersetin, kemferol ve mirisetin bileşikler MAO-A'ya seçici olarak ve çok güçlü afinite ($-10.3 \geq G \geq -10.7$ kcal / mol) ile bağlanır. Hiperisin, kuersetin, amentoflavon, kemferol ve mirisetin bileşikler

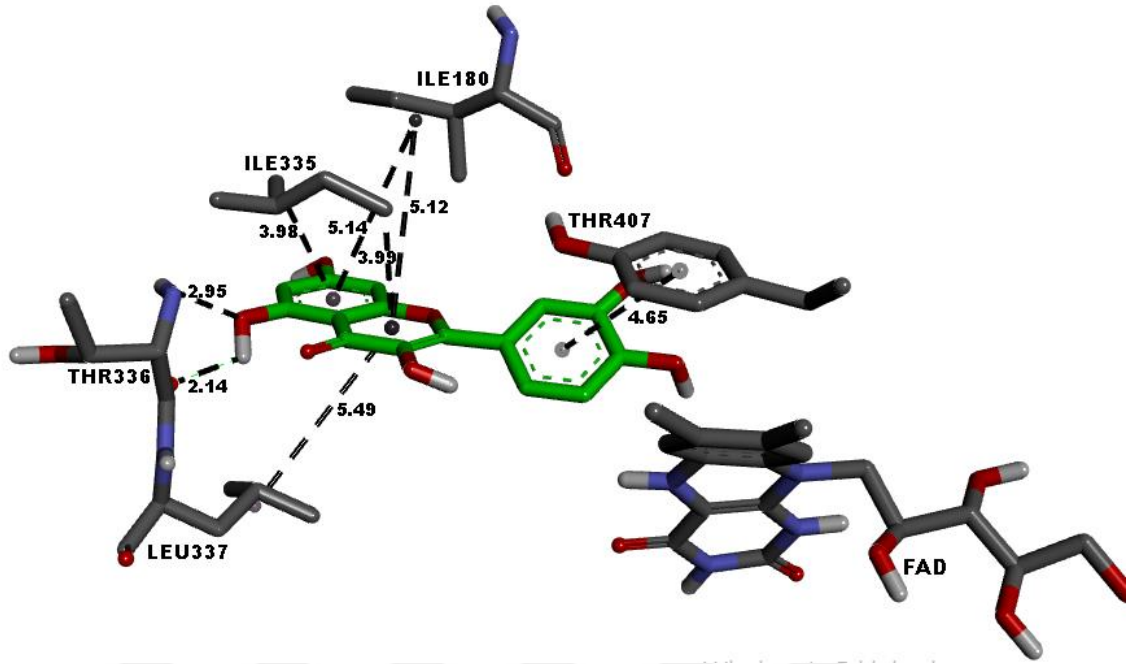
MAO-B'nin güçlü afinite ile bağlanan ($-8,0 \geq \Delta G \geq -9,2$ kcal / mol) en iyi inhibitörleridir, aralarında hiperisin ve amentoflavon bileşikleri MAO-B'ye seçicidir.

Tablo 3.3 MAO-A ve MAO-B izozimlerinin ΔG (kcal/mol), K_i (μ M) ve SI değerleri.

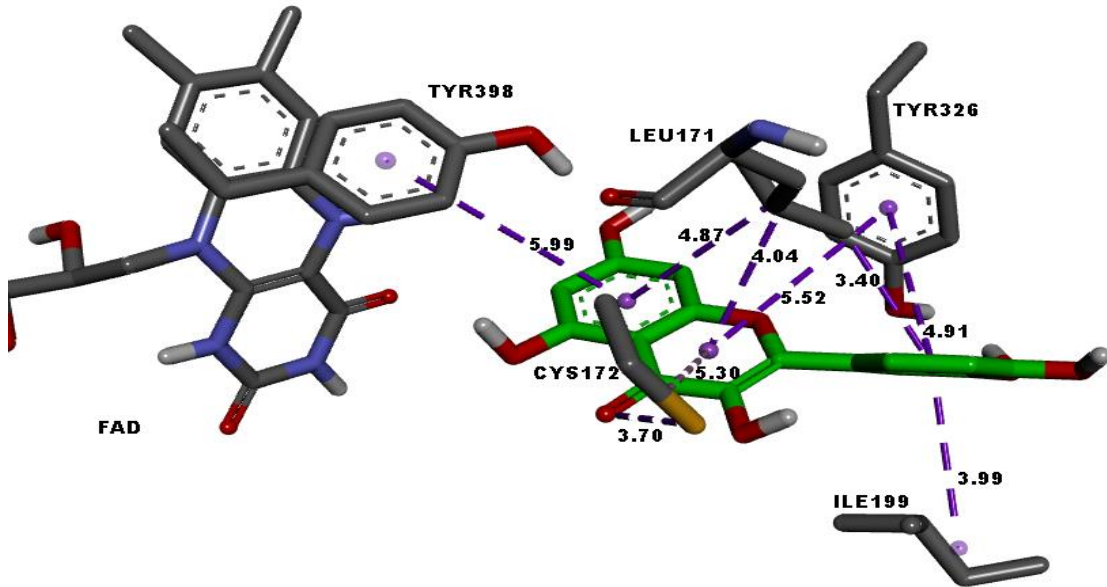
Bileşik	MAO-A		MAO-B		SI
	ΔG	K_i	ΔG	K_i	
Hiperforin	-6.0	39.95	-6.0	39.95	1
Hiperisin	-8.4	0.695	-9.2	0.180	3.861
Kuersetin	-10.7	0.014	-8.1	1.154	0.012
Rutin	-7.8	1.914	-7.4	3.76	0.509
Amentoflavon	-8.1	1.153	-8.8	0.354	3.257
Avikularin	-7.8	1.914	-7.3	4.452	0.429
Biapigenin	-7.2	5.270	-7.4	3.76	1.402
Hiperozid	-7.2	5.270	-7.4	3.76	1.402
Izokuersetin	-7.3	4.452	-7.1	6.239	0.714
Kemferol	-10.3	0.028	-8.1	1.154	0.024
Kuersitrin	-7.8	1.914	-7.3	4.452	0.430
Mirisetin	-10.6	0.017	-8.0	1.366	0.012

Geçmişte klinik olarak uygulamaya sokulan MAO inhibitörlerinin hepatoksisite, ortostatik hipotansiyona etkiramın içeren yiyeceklerle birlikte alındığında ortaya çıkan “peynir etkisi” olarak adlandırılan hipertansif kriz gibi yan etkilere sahip oldukları görülmüştür. İki izoformun farklı hücre ve dokularda ekspresyonu nedeniyle MAO-A inhibitörlerinde daha büyük bir tiramin etkisi görülür. Seçici olmayan MAO inhibisyonun tiramin kuvvetlenmesine neden olduğu düşünüldüğünden MAO inhibitörlerinde seçicilik aranması gerekli hale gelmiştir (Finber ve Gillman, 2011; Abdelhafez ve ark., 2013).

Tablo 3.3'deki SI değerlerini incelediğimizde kuersetin, kemferol, mirisetin bileşiklerini seçici MAO-A inhibitörü olarak önerilebilirken, hiperisin ve amentoflavon bileşiklerini seçici MAO-B inhibitörü olarak önerilebilir. Kuersetin bileşiğinin MAO-A'ya bağlanma görüntüsü Şekil 3.11'de, MAO-B'ye bağlanma görüntüsü Şekil 3.12'de verilmiştir. Kuersetin bileşiğinin MAO izoenzimleri ile yaptığı etkileşimler detaylı olarak Tablo 3.4'tedir. Hiperisin bileşiğinin MAO-A'ya bağlanma görüntüsü Şekil 3.13'de, MAO-B'ye bağlanma görüntüsü Şekil 3.14'de verilmiştir, Hiperisinin MAO izoenzimleri ile yaptığı etkileşimler Tablo 3.5'tedir.



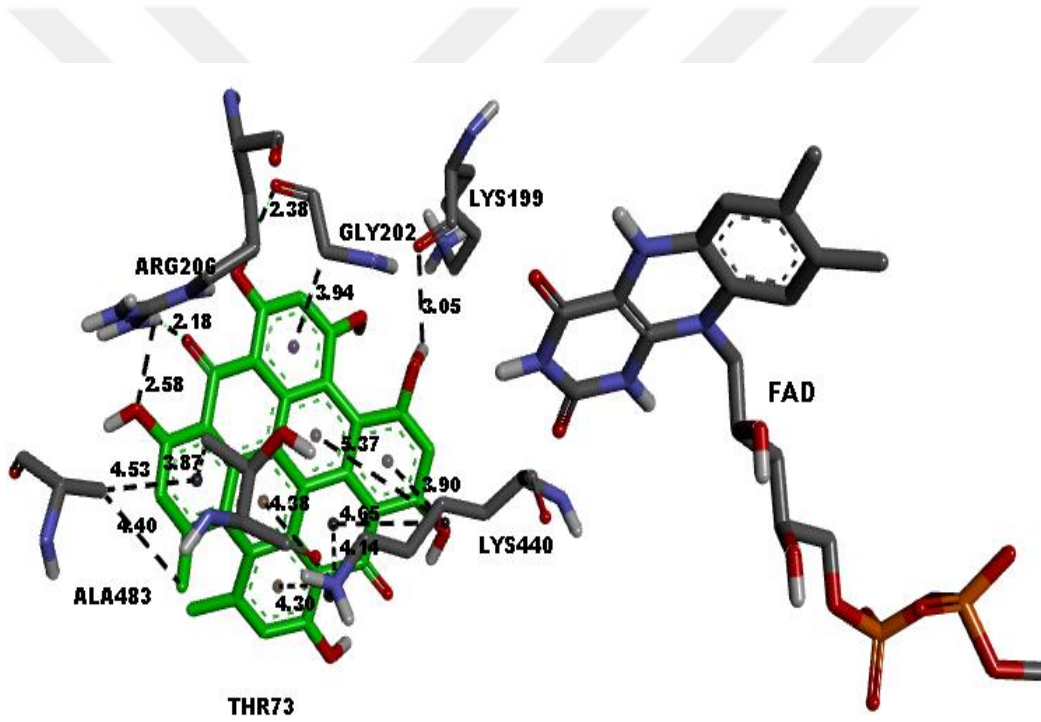
Şekil 3.11 Kueretin bileşiğinin MAO-A aktif bölgesine yerleşme pozü.



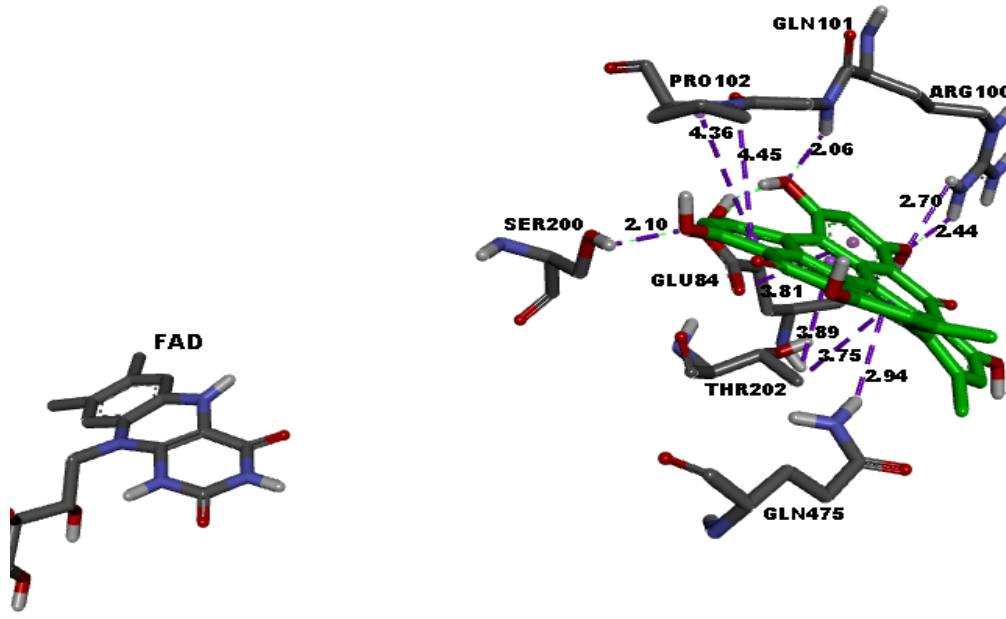
Şekil 3.12 Kueretin bileşiğinin MAO-B aktif bölgesine yerleşme pozü.

Tablo 3.4Kuersetin bileşiğinin MAO-A ve MAO-B enzimi ile yaptığı etkileşimler

Doking Etkileşimleri	
MAO-A ile Kuersetin (-10.7 kcal/mol)	MAO-B ile Kuersetin(-8.1 kcal/mol)
TYR407...LigC (π - π stacked=4.65)	ILE199...LigC (π -alkil=3.99)
ILE180...LigC (π -alkil=5.12)	TYR326...LigC (π - π shaped=4.91)
ILE335(C)...LigC (π -sigma=3.99)	TYR326...LigC (π - π shaped=5.52)
ILE180...LigC (π -alkil=5.14)	LEU171(C)...LigC (π -sigma=3.40)
ILE335(C)...LigC (π -sigma=3.98)	LEU171...LigC (π -alkil=4.04)
THR336(HN)...LigC (H bağı=2.95)	LEU171...LigC (π -alkil=4.87)
THR336(O)...LigC (H bağı=2.14)	CYS172...LigC (π -alkil=5.30)
LEU337...LigC (π -alkil=5.49)	CYS172(S)...LigC(O) (H bağı=3.76)
	TYR398...LigC (π - π stacked=5.99)



Şekil 3.13 Hiperisin bileşiğinin MAO-A aktif bölgesine yerleşme pozunu.



Şekil 3.14 Hiperisin bileşiğinin MAO-B aktif bölgesine yerleşme pozunu.

Tablo 3.5 Hiperisin bileşiğinin MAO-A ve MAO-B enzimi ile yaptığı etkileşimler

Dokimg Etkileşimleri	
MAO-A ile Hiperisin (-8.4 kcal/mol)	MAO-B ile Hiperisin(-9.2 kcal/mol)
GLY202(O)...LigB(H) (H bağı=2.38)	SER200(H)...LigB(O) (H bağı=2.10)
GLY202(C)...LigB (π -sigma=3.94)	THR202(C)...LigB (π -sigma=3.89)
LYS199(O)...LigB (H bağı=3.05)	THR202(C)...LigB (π -sigma=3.75)
ARG206(H)...LigB(O) (H bağı=2.18)	GLN475(H)...LigB (H bağı=2.94)
ARG206(H)...LigB(O) (H bağı=2.58)	GLU84(O)...LigB (π -anyon=3.81)
THR73(C)...LigB (π -sigma=3.87)	ARG100(H)...LigB(O) (H bağı=2.44)
ALA483...LigB (π -alkil=4.53)	ARG100(H)...LigB(O) (H bağı=2.70)
ALA483...LigB(C)(Alkil etkileşimi=4.40)	GLY101(HN)...LigB(O) (H bağı=2.06)
LYS440(N)...LigB (π -katyon=4.30)	GLY101:C,PRO102:N...LigB
LYS440(N)...LigB (π -katyon=4.38)	(Amid- π =4.45)
LYS440(N)...LigB (π -katyon=4.14)	PRO102...LigB (π -alkil=4.36)
LYS440...LigabdB (π -alkil=4.65)	
LYS440...LigB (π -alkil=5.37)	
LYS440...LigB (π -alkil=3.90)	

Bileşiklerin bağlanmalarını sağlayan etkileşimlerin genellikle enzimdeki aromatik rezidülerin π -elektronları ile oluşan π -hidrofobik çekimleri ve çeşitli rezidülerle oluşan H-bağları olduğu görülmüştür. Ligand-enzim bağlanmalarında en fazla rolü olan

rezidüer MAO-A için Phe208, Tyr407, Lys440 ve Tyr444 MAO-B için Cys172, Tyr326 ve Tyr398 olduğu söylenebilir.

Kuersetin bileşinin (C16 atomunun), MAO-A enzimindeki FAD yapısına (N5 atomuna) uzaklığı 4.15Å iken, MAO-B enzimindeki FAD yapısına (N5 atomuna) uzaklığı 13.84Å'dur. Kuersetinin MAO-A enzimi ile daha iyi bir bağlanma enerjisi vermesi, bileşinin aktif bölge boşluğundaki FAD yapısına yaklaşarak daha iyi bir yerleşim-etkileşim göstermesinden kaynaklanabilir.

Hiperisin halkalı ve büyük yapılı bir bileşiktir, döneabilen bağ sayısı oldukça azdır. Bu nedenle her iki enzimde de FAD halkasının önündeki asıl aktif bölge boşluğuna ulaşamamış, ancak daha gerisine bağlanmıştır. Hiperisinin MAO-B enzimi ile daha iyi bir bağlanma göstermesi MAO-B enziminin hiperisinin bağlandığı bölgede bir diğer bağlanma boşluğunun (aktif bölge giriş boşluğu) bulunmasıdır (Colibus ve ark., 2005). Hiperisin buraya 5 adet H-bağı yaparak kuvvetli etkileşimlerle bağlanabilmiştir. MAO-A enzimi ile ise genellikle hidrofobik etkileşimler yaparak bağlanmış olup H-bağlarının daha zayıf olduğu görülmektedir.

HPL bitkisinin MAO aktivitesi başlarda hiperisine atfedilmiş olsada bitkinin alkol ekstreleri ile yapılan çalışmalar sonucu diğer bileşenlerinin özellikle de flavonoid grubunun inhibisyona katkıda bulunduğu görülmüştür (Blandt ve Wagner, 1994; Thiede ve Walper, 1994). Keşkek (2016) tez çalışmasında HPL flavonoidlerinin MAO-A inhibitör potansiyellerini *in vitro* ve *in siliko* olarak karşılaştırdığında en iyi aktivite gösteren bileşikler olarak kuersetin, kemferol ve mirisetini önermiştir. Herraiz ve Guillen (2018) *in vitro* MAO enzim inhibisyonu çalışmasında kuersetin bileşinin orta derece etkili bir MAO-A inhibitörü olduğu, MAO-B'ye kıyasla daha düşük konsantrasyonda ekti gösterdiğini bildirmiştir. Ayrıca antioksidan aktiviteye sahip kuersetin bileşiği MAO-A inhibisyonunun yanı sıra peroksidaz substratının oksidasyonunu inhibe ederek iyi bir MAO-A inhibitör potansiyeli göstermektedir.

3.4.1.2 COX-1 ve COX-2 doking sonuçları

COX-1 ve COX-2 enzimlerinin ligandlara bağlanma enerjilerinden (ΔG), K_i değerleri hesaplanmış ve iki izoenzim arasındaki seçicilik indeksi olan SI (COX-1'in K_i değerinin COX-2 K_i değerine oranı) değerleri Tablo 3.6'de verilmiştir. Bileşiklerin COX-2

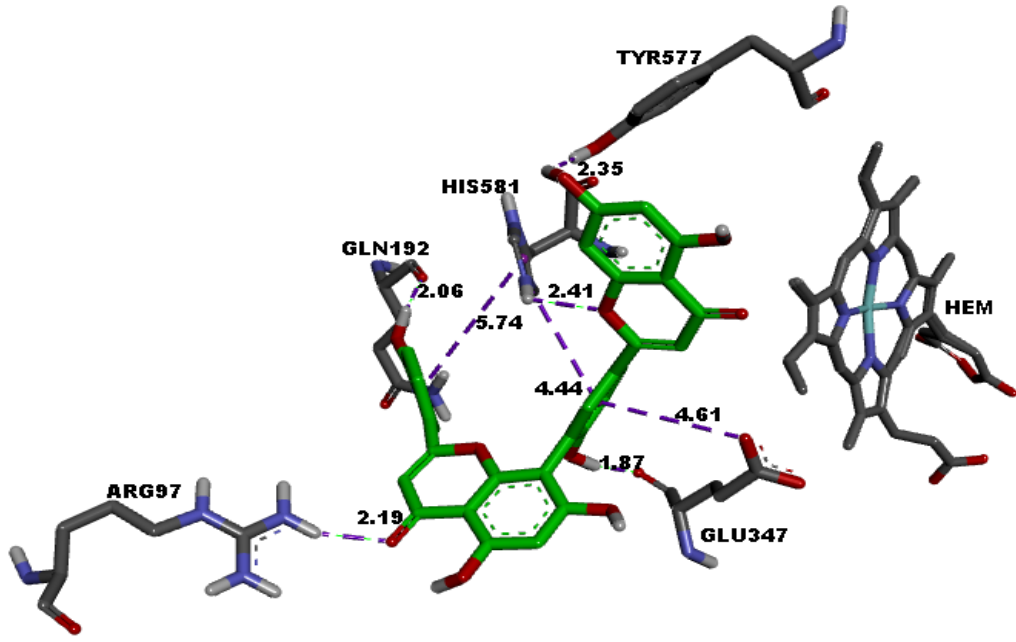
izoenzimine bağlanma afiniteleri ($-9.2 \geq \Delta G \geq -13.2$ kcal/mol), COX-1 izoenzimin bağlanma afinitelerinden COX-1 ($-6.9 \geq \Delta G \geq -10.4$ kcal/mol) daha iyidir. COX-1 izoenzimine hiperforin ve amentoflavon bileşikler zayıf afinite ile bağlanırken diğer bileşikler güçlü afinite ile bağlanır. Hemen hemen tüm bileşikler COX-2 ile seçicilik gösterir ve çok güçlü afinite ile bağlanır.

Tablo 3.6 COX-1 ve COX-2 izozimlerinin ΔG (kcal/mol), K_i (μM) ve SI değerleri.

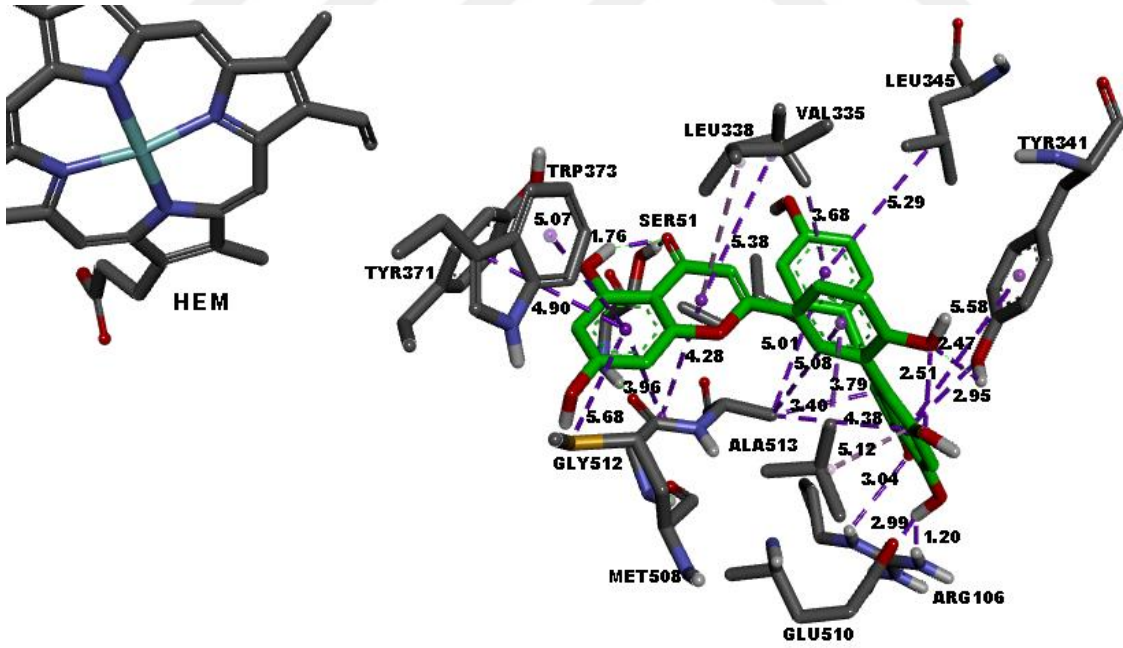
Bileşik	COX-1		COX-2		SI
	ΔG	K_i	ΔG	K_i	
Hiperforin	-6.9	8.740	-9.2	0.180	0.00002
Hiperisin	-8.7	0.419	-10.0	0.046	0.1098
Kuersetin	-9.6	0.092	-10.1	0.039	0.4239
Rutin	-8.8	0.354	-11.9	0.0019	0.0054
Amentoflavon	-10.4	0.024	-13.2	0.0002	0.0083
Avikularin	-7.4	3.760	-10.8	0.012	0.000003
Biapigenin	-8.8	0.354	-9.5	0.109	0.3079
Hiperozid	-8.8	0.354	-11.6	0.003	0.0084
Izokuersetin	-9.4	0.129	-10.8	0.012	0.0930
Kemferol	-9.3	0.152	-10.0	0.047	0.3092
Kuersitrin	-7.9	1.617	-10.8	0.012	0.000007
Mirisetin	-9.2	0.180	-10.3	0.028	0.1555

Konstitütif COX-1 izoformu, mide mukozasının korunması ve trombosit agregasyonu gibi fizyolojik fonksiyonların korunmasından sorumludur. COX-2 izoformu akut ve kronik enflamasyon, ağrı ve onkogeneiz sırasında indüklenebilir ve önemli ölçüde yukarı regüle edilir. Seçici COX-2 inhibitörleri (koksibler), NSAİİ'lerle (COX-1 inhibitörleri) aynı anti-enflamatuar aktiviteye sahiptir ancak COX-1 enziminin inhibisyonu yoluyla ortaya çıkan gastroindestinal toksisite riskini en az indireceğinden oldukça cazip hale gelmiştir (Alsayed ve ark., 2016).

Tablo 3.6'daki SI değerleri incelendiğinde tüm bileşiklerin COX-2 izoenzimine seçici olarak bağlandığı görünmektedir. Her iki enzim için en iyi afiniteye ve düşük SI (0.0083) değerine sahip amentoflavon bileşiğinin COX-1 aktif bölgesine bağlanma görüntüsü Şekil 3.15'de, COX-2 aktif bölgesine bağlanma görüntüsü Şekil 3.16'da verilmiştir. Bu bileşiğin izoenzimlerle yaptığı etkileşimler detaylı olarak Tablo 3.7'de verilmiştir. Görüldüğü gibi COX-2 enzimi ile yaptığı kararlılık kazandırıcı etkileşimlerin sayısı COX-1 enzimindekilerden çok daha fazladır ve bileşiğin COX-2 seçiciliğinin nedenini açıklamaktadır.



Şekil 3.15 Amentoflavon bileşiğinin COX-1 aktif bölgesine yerleşme pozunu

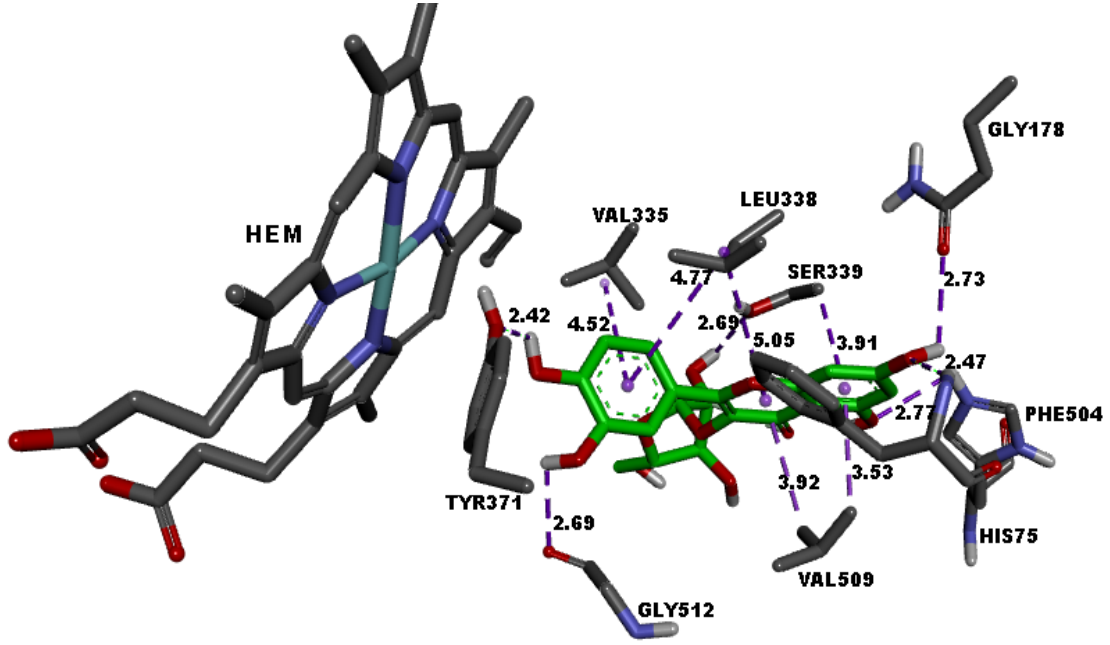


Şekil 3.16 Amentoflavon bileşiğinin COX-2 aktif bölgesine bağlanma pozunu

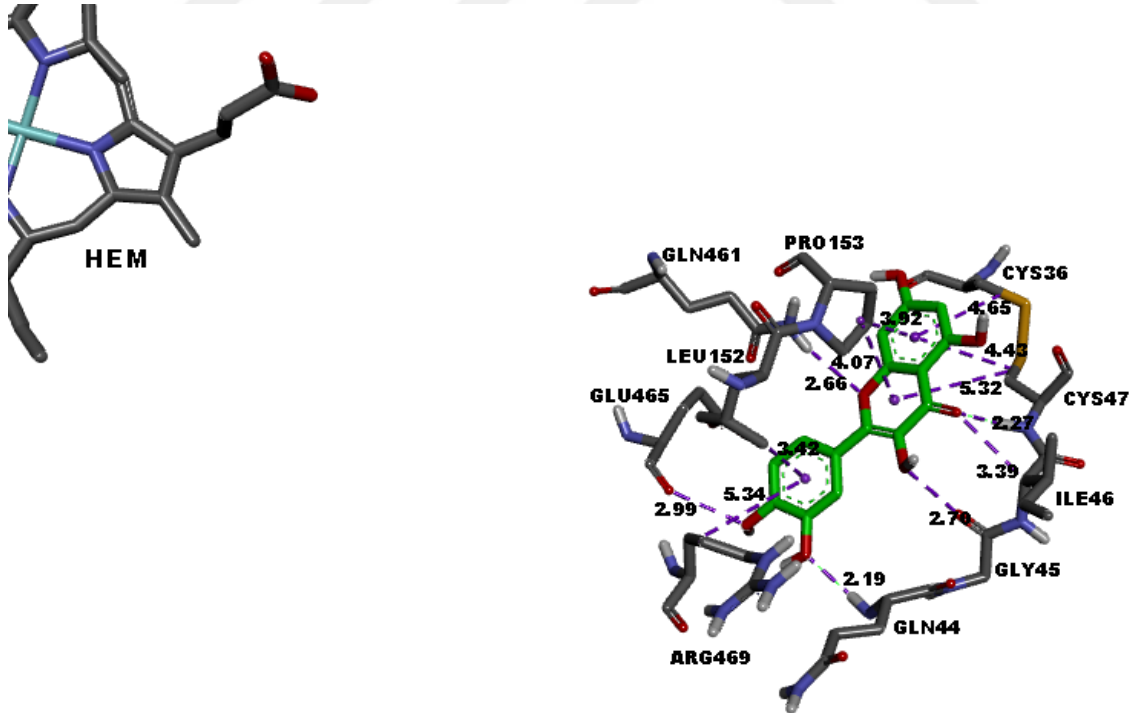
Tablo 3.7 Amentoflavon bileşiğinin COX-1 ve COX-2 izoenzimleri ile yaptığı etkileşimler

Doking Etkileşimleri	
COX-1 ile Amentoflavon (-10.4 kcal/mol)	COX-2 ile Amentoflavon (-13.2 kcal/mol)
ARG67(H)...LigE(O) (H bağı=2.19)	TYR371...LigE (π - π shaped=4.90)
GLN192(O)...LigE(H) (H bağı=2.06)	TRP373...LigE (π - π T-shaped=5.07)
HIS581...LigE (π - π stacked=5.74)	MET508(S)...LigE (π -sülfür=5.68)
HIS581...LigE (π -katyon=4.44)	GLY512:C,O;Ala513:N...LigE (π -Amid- π stacked=3.96)
HIS581(H)...LigE(O) (H bağı=2.41)	SER516(H)...LigE(O) (H bağı=1.85)
TYR577(H)...LigE(H) (Unfavorable=2.35)	LEU338...LigE (π -alkil=5.10)
GLU347(O)...LigE (π -anyon=4.61)	VAL335...LigE (π -alkil=5.38)
GLU347(O)...LigE(H) (H bağı=1.87)	VAL335(C)...LigE (π -sigma=3.68)
	LEU345...LigE (π -alkil=5.29)
	LEU517(C)...LigE (π -sigma=3.65)
	ALA513...LigE (π -alkil=5.01)
	ALA513...LigE (π -alkil=3.49)
	ALA513...LigE (π -alkil=4.38)
	VAL509(C)...LigE (π -sigma=3.79)
	VAL509...LigE (π -alkil=5.12)
	ARG106(H)...LigE(O) (H bağı=3.04)
	GLU510(O)...LigE(H) (H bağı=2.99)
	ARG106(H)...LigE(H) (Unfavorable=1.20)
	TYR341...LigE (π - π T-shaped=5.58)
	TYR341(OH)...LigE (π -Lone Pair=2.95)
	TYR341(H)...LigE(O) (H bağı=2.47)

En yüksek COX-2 seçiciliği veren (SI=0.000003) ve çok güçlü afiniteye sahip avikularin bileşiğinin enzim aktif bölgesine bağlanma pozunu Şekil 3.17’de, yaptığı etkileşimler Tablo 3.8’de verilmiştir. COX-1 için en iyi seçiciliği veren (SI=0.4239) ve enzime güçlü afinite ile bağlanan kuersetin bileşiğinin aktif bölge bağlanma pozunu Şekil 3.18’de, yaptığı etkileşimler Tablo 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.17 Avikularin bileşiğinin COX-2 aktif bölgesine yerleşme pozunu



Şekil 3.18 Kuersetin bileşiğinin COX-1 aktif bölgesine bağlanma pozunu

Tablo 3.8 Kuersetin bileşiğinin COX-1 enzimi, avikularin bileşiğinin COX-2 enzimi ile yaptığı etkileşimler

Doking Etkileşimleri	
COX-1 ile Kuersetin (-9.6 kcal/mol)	COX-2 ile Avikularin (-10.8 kcal/mol)
GLU465(O)...LigC(O) (Unfavorable=2.99)	TYR341(OH)...LigF(H) (H bağı=2.42)
ARG469...LigC (π -alkil=5.34)	VAL335...LigF (π -alkil=4.52)
LEU152(C)...LigC (π -sigma=3.42)	LEU338...LigF (π -alkil=4.77)
GLN44(HN)...LigC (H bağı=2.19)	GLY512(O)...LigF(H) (H bağı=2.69)
GLN461(H)...LigC(O) (H bağı=2.66)	SER339(O)...LigF(H) (H bağı=2.69)
GLY45(O)...LigC(O) (Unfavorable=2.70)	LEU338...LigF (π -alkil=5.05)
PRO153...LigC (π -alkil=4.07)	VAL509(C)...LigF (π -sigma=3.92)
PRO153...LigC (π -alkil=3.92)	VAL509(C)...LigF (π -sigma=5.53)
CYS36...LigC (π -alkil=4.65)	SER339(C)...LigF (π -sigma=3.91)
CYS47...LigC (π -alkil=4.43)	GLN178(O)...LigF (H bağı=2.73)
CYS47...LigC (π -alkil=5.32)	PHE504(HN)...LigF(O) (H bağı=2.47)
CYS47(HN)...LigC(O) (H bağı=2.27)	HIS75(H)...LigF(O) (H bağı=2.77)
ILE46(C)...LigC(O) (H bağı=3.39)	

Bileşiklerin bağlanmalarını sağlayan etkileşimlerin genellikle enzimdeki aromatik rezidülerin π -elektronları ile oluşan π -hidrofobik çekimleri ve çeşitli rezidülerle oluşan H-bağları olduğu görülmüştür. Ligand-enzim bağlanmalarında en fazla rolü olan rezidüler COX-1 için Ile46, Pro153, Glu347 ve Arg469, COX-2 için Arg106, Leu338, Ser339, Tyr341, Val509 ve Ala513 olduğu söylenebilir.

COX-1 enziminden farklı olarak, COX-2 aktif bölgesinde bulunan hidrofobik cep sayesinde bağlanma alanının genişlemesi, bileşiklerin COX-2 seçiciliğini açıklayabilir. Genel olarak tüm bileşiklerin COX-1 ve COX-2 bağlanma modları incelendiğinde hepsinin enzimlerin sikloksijenaz bağlanma bölgesine yerleştiği, hem varlığı sebebiyle peroksidaz aktif bölgesini tercih etmedikleri görülmüştür.

Literatürün genelinde HPL bitkisinin anti-enflamatuar aktivitesi COX enzimine atfedilmiştir. Bu aktivitenin kuersetin dahil bitkinin yüksek konsantrasyondaki fenolik maddelerden kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Raso ve ark., 2002).

3.4.1.3. 5-LOX ve 15-LOXB doking sonuçları

5-LOX ve 15-LOXB enzimlerinin ligandlara bağlanma enerjilerinden (ΔG), K_i değerleri hesaplanmış ve iki izoenzim arasındaki seçicilik indeksi olan SI (5-LOX K_i değerinin 15-LOXB K_i değerine oranı) değerleri Tablo 3.9’da verilmiştir. Ligandların 15-LOXB izoenzimine bağlanma afiniteleri ($-8.2 \geq \Delta G \geq -11.8$ kcal / mol), 5-LOX izoenzimine

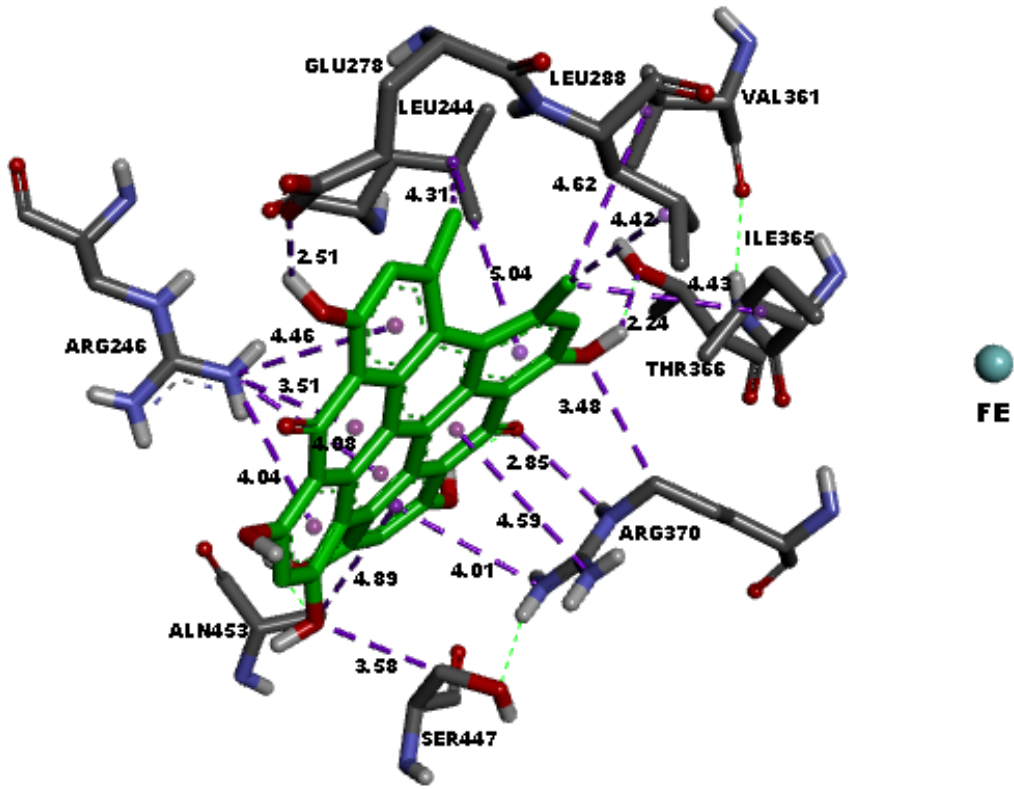
bağlanma afinitelerinden ($-7.7 \geq \Delta G \geq -10.0$ kcal / mol) daha iyidir. Rutin ve kemferol bileşiği 5-LOX'a seçici olarak güçlü afinite ($-9.0 \geq \Delta G \geq -9.8$ kcal / mol) ile bağlanır. Kuersetin, izokuersetin ve biapigeninin seçicilikleri çok zayıf olup, mirisetin ise seçici değildir; diğer tüm bileşikler 15-LOXB izoenzimine seçici olarak bağlanır. Aralarından hiperisin ve amentoflavon bileşikler çok güçlü afinite ($-10.6 \geq \Delta G \geq -11.8$ kcal / mol) ile bağlanırken, hiperforin, avikularin, hiperozid ve kuersitrin bileşikler güçlü afinite ($-8.5 \geq \Delta G \geq -9.2$ kcal / mol) gösterir.

Tablo 3.9 5-LOX ve 15-LOXB izozimlerinin ΔG (kcal/mol), K_i (μM) ve SI değerleri.

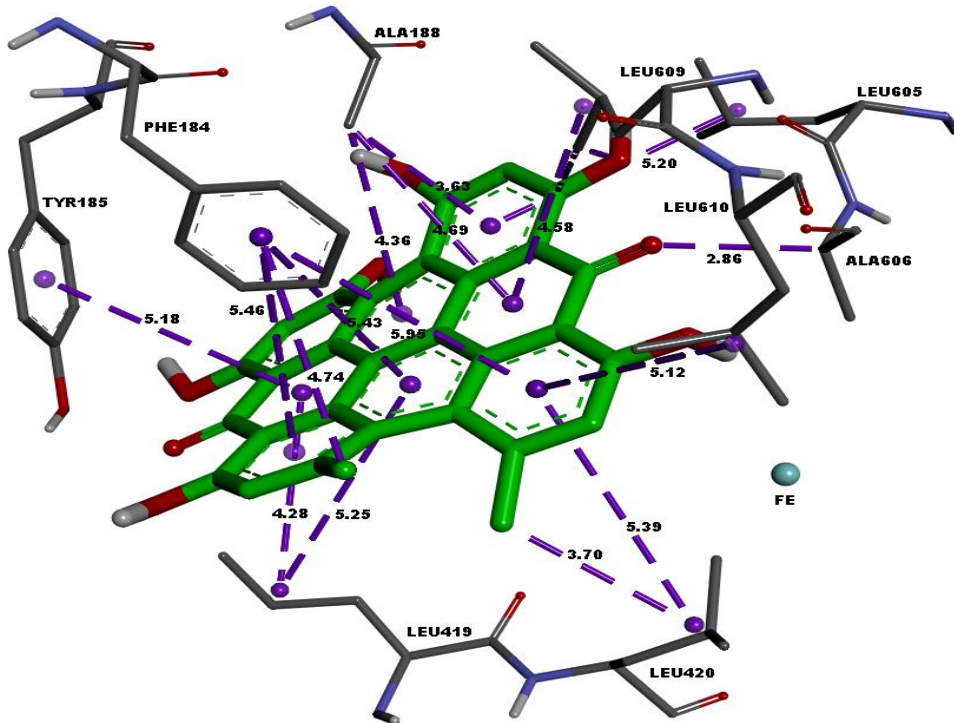
Bileşik	5-LOX		15-LOXB		SI
	ΔG	K_i	ΔG	K_i	
Hiperforin	-7.8	1.910	-9.2	0.180	10.61
Hiperisin	-10.0	0.047	-11.8	0.002	23.50
Kuersetin	-8.1	1.153	-8.2	0.974	1.18
Rutin	-9.0	0.253	-8.9	0.299	0.85
Amentoflavon	-9.9	0.056	-10.6	0.017	3.29
Avikularin	-7.7	2.266	-8.5	0.587	3.89
Biapigenin	-9.4	0.129	-9.6	0.092	1.40
Hiperozid	-7.7	2.266	-8.6	0.496	4.57
Izokuersetin	-8.3	0.823	-8.4	0.695	1.18
Kemferol	-9.8	0.065	-9.0	0.253	0.26
Kuersitrin	-7.7	2.266	-8.9	0.299	7.58
Mirisetin	-8.0	1.366	-8.0	1.366	1

AA'nin LOX yolları pro- veya anti-enflamatuar bileşikler üretir. 5-LOX tek başına pro-enflamatuar lökotrienlerin sentezinden sorumludur ancak anti-enflamatuar lipoksinler 15- ve 5-LOX'un kombine aktiviteleri ile sentezlenebilir. İnsanda 5-LOX'a en yakın homolog 15-LOXB'dir. Beklendiği gibi 5-LOX ve 15-LOXB ortak bir çevreyi, ortak bir katalitik çekirdeği ve ortak substratı paylaşır. İkisi arasındaki en belirgin fark aktif bölgeleridir bu da inhibitör seçiciliği oluşturur (Kobe ve ark., 2014; Roschek ve ark., 2009).

Tablo 3.9'daki SI değerleri incelendiğinde rutin ve kemferol bileşikler seçici 5-LOX inhibitörü olarak önerilirken, mirisetin hariç diğer tüm bileşiklerde 15-LOXB izoenzimine seçicilik görünmektedir. Bunlar arasında 5-LOX'a en iyi bağlanan hiperisin bileşiğinin bağlanma görüntüsü Şekil 3.19'da, 15-LOXB'ye en iyi bağlanan hiperisin bileşiğinin bağlanma görüntüsü Şekil 3.20'de verilmiştir. Bu bileşiklerin izoenzimlerle yaptığı etkileşimler detaylı olarak Tablo 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.19 Hiperisin bileşiğinin 5-LOX aktif bölgesine bağlanma pozu



Şekil 3.20 Hiperisin bileşiğinin 15-LOXB aktif bölgesine bağlanma pozu

Tablo 3.10 Hiperisin bileşiğinin 5-LOX enzimi, 15-LOXB enzimi ile yaptığı etkileşimler

Doking Etkileşimleri	
5-LOX ile Hiperisin (-9.6 kcal/mol)	15-LOXB ile Hiperisin (-10.8 kcal/mol)
SER447(C)...LigB(O) (H bağı=3.58)	LEU420...LigB(C) (Alkil etkileşimi=3.70)
ALA453...LigB (π -alkil=4.89)	LEU420...LigB (π -alkil=5.39)
ARG370(NH2)...LigB (π -katyon=4.01)	LEU610...LigB (π -alkil=5.12)
ARG370(H)...LigB(O) (H bağı=2.85)	ALA606(C)...LigB(O) (H bağı=2.86)
ARG370(NH)...LigB (π -katyon=4.59)	LEU605...LigB (π -alkil=5.20)
ARG370(C)...LigB(O) (H bağı=3.48)	LEU609...LigB (π -alkil=4.58)
THR366(O)...LigB(H) (H bağı=2.25)	ALA188(C)...LigB (π -sigma=3.63)
ILE365...LigB(C) (Alkil etkileşimi=4.43)	ALA188...LigB (π -alkil=4.69)
VAL361...LigB(C) (Alkil etkileşimi=4.62)	ALA188...LigB (π -alkil=4.36)
LEU288...LigB(C) (Alkil etkileşimi=4.42)	PHE184...LigB (π - π T-shaped=5.95)
LEU244...LigB (π -Alkil=5.04)	PHE184...LigB (π - π T-shaped=5.43)
LEU244...LigB (Alkil etkileşimi=4.31)	PHE184...LigB(C) (π -alkil=4.74)
GLU287(O)...LigB(H) (H bağı=2.51)	PHE184...LigB (π - π T-shaped=5.46)
ARG246(NH2)...LigB (π -katyon=4.46)	TYR185...LigandB (π - π T-shaped=5.18)
ARG246(NH2)...LigB (π -katyon=3.51)	LEU419...LigB (π -alkil=4.28)
ARG246(NH2)...LigB (π -katyon=4.08)	LEU419...LigB (π -alkil=5.25)
ARG246(NH2)...LigB (π -katyon/H bağı=4.04)	

Bileşiklerin bağlanmalarını sağlayan etkileşimlerin genellikle enzimdeki aromatik rezidülerin π -elektronları ile oluşan π -hidrofobik çekimleri, hidrofobik alkil etkileşimleri ve çeşitli rezidülerle oluşan H-bağları olduğu görülmüştür. Ligand-enzim bağlanmalarında en fazla rolü olan residüler 5-LOX için Arg246, Thr364 ve Ala453 iken 15-LOX-B için Leu419, Val426, Leu605, Ala606 ve Leu609 olduğu söylenebilir.

Hiperforin bileşiğinin 5-LOX enzimini inhibe ettiği *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile bildirilmiştir (Feişt ve ark., 2009). Kuersetin bileşiğinin de 15-LOX aktivitesi gösterdiğine dair bulgular vardır (Schneider ve Bucar, 2005). Ancak literatürde bitkinin tüm bileşenlerinin LOX kaynaklı anti-enflamatuar aktivitesine dair kapsamlı bir çalışma ile karşılaşılmamıştır.

3.4.1.4. LOX ve COX çift inhibisyonu

Araşidonik asit sadece prostanooidlerin (tromboksan, prostasiklin ve prostaglandin) COX aracılı sentezi için öncü olarak değil, aynı zamanda lökotrien ve lipoksin gibi önemli metabolitlerin LOX aracılı sentezinde de öncüdür. Klasik NSAİİ'lara kıyasla daha düşük gastrointestinal yan etkileri sebebiyle tercih edilen coksiblerinde kardiyovasküler yan

etkiler gösterdiği bildirilmiştir. COX inhibisyonu, LOX yolağında olan lökotrienlerin daha fazla birikmesine de sebebiyet verir. Bu nedenle hem COX hem de LOX yollarının birlikte inhibisyonudaha düşük yan etkileri olan güçlü anti-enflamatuar etkiler sunacaktır (Jahng ve ark., 2004; Leone ve ark., 2007; Charlier ve Michaux, 2003; Roschek ve ark., 2009; Chaaban ve ark., 2018).

Son zamanlarda anti-enflamatuar ilaçlar konusunda yapılan araştırmalarda COX-2 ile 5-LOX'un dual etkisine odaklanılmıştır (Leval ve ark., 2002; Charlier ve Michaux, 2003; Irrera ve Bitto, 2017; Jacob ve ark., 2018; Martel-Pelletier ve ark., 2003; Leone ve ark.,2007; Chabaan ve ark., 2018). 5-LOX ve COX, düşük redoks potansiyeline sahip bileşikler tarafından inhibisyona açıktır. Bu bileşiklerdeki bağlanma gevşek olarak adlandırıldığından, bu tür "redoks inhibitörleri" genellikle siklooksijenazlara göre 5-lipoksijenaz için zayıf seçicilik gösterir. Bu sebeple seçici 5-LOX inhibitörlerinin araştırılmasından çok daha verimli olacağından, aynı zamanda COX enzimini inhibe eden bileşiklere odaklanılmıştır. 5-LOX enziminin ürünü olan lökotrienler ayrıca pro-enflamatuardır, prostaglandinler lökotrien kaynaklı enflamasyonu arttıracığından bir bileşiğin her iki aktiviteye sahip olması da avantajlıdır. Ayrıca spesifik bir 5-LOX inhibitörünün kendi başına etkisiz konsantrasyonları, COX inhibitör etkisini önemli ölçüde güçlendirmektedir (Leone ve ark., 2007).

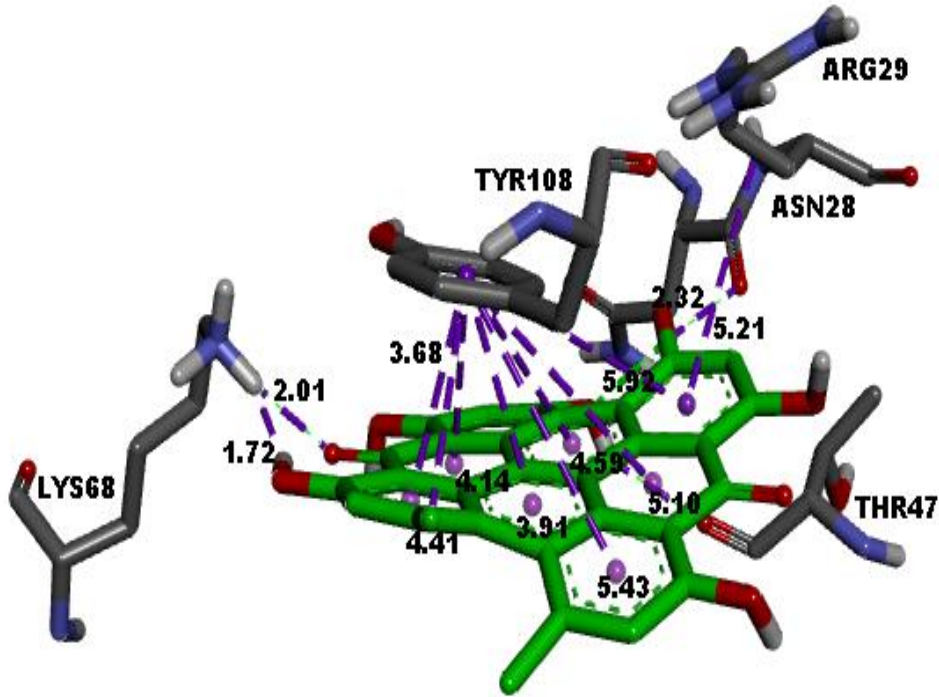
5-LOX ve COX-2 enzimlerinin arasındaki seçicilik indeksi olan SI (5-LOX K_i değerinin COX-2 K_i değerine oranı) değerleriTablo 3.11'de verilmiştir. Ligandların COX-2 enzimine bağlanma afiniteleri ($-9.2 \geq \Delta G \geq -13.2$ kcal / mol), 5-LOX enzimine bağlanma afinitelerinden ($-7.7 \geq \Delta G \geq -10.0$ kcal / mol) daha iyidir.

Tablo 3.115-LOX ve COX-2 izozimlerinin ΔG (kcal/mol), K_i (μM) ve SI değerleri.

Bileşik	5-LOX		COX-2		SI
	ΔG	K_i	ΔG	K_i	
Hiperforin	-7.8	1.910	-9.2	0.180	10.611
Hiperisin	-10.0	0.047	-10.0	0.047	1.000
Kuersetin	-8.1	1.153	-10.1	0.039	29.564
Rutin	-9.0	0.253	-11.9	0.0019	133.158
Amentoflavon	-9.9	0.056	-13.2	0.0002	280
Avikularin	-7.7	2.266	-10.8	0.012	188.833
Biapigenin	-9.4	0.129	-9.5	0.109	1.184
Hiperozid	-7.7	2.266	-11.6	0.003	755.33
Izokuersetin	-8.3	0.823	-10.8	0.012	68.583
Kemferol	-9.8	0.065	-10.0	0.047	1.383

Kuersitrin	-7.7	2.266	-10.8	0.012	188.833
Mirisetin	-8.0	1.366	-10.3	0.028	48.786

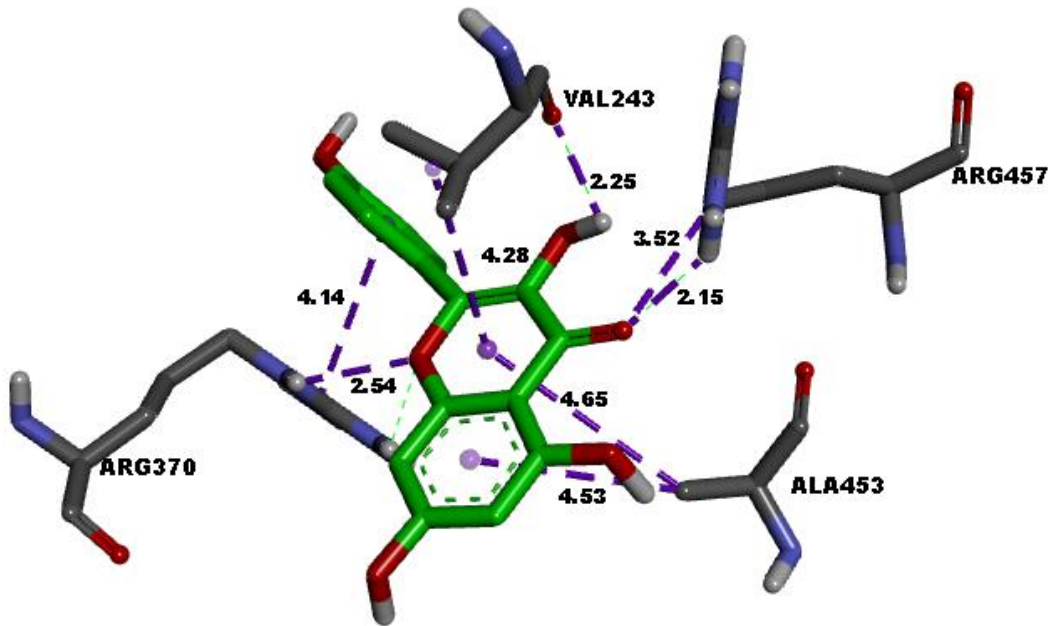
İkili enzim inhibisyonu aradığımız için seçicilik yerine SI değeri 1'e en yakın olan ve birbirine benzer inhibisyon değerleri veren ligandlar seçilmiştir. 5-LOXve COX-2 enzimlerine -10 kcal / mol ile güçlü bağlanan hiperisin bağlama görüntüleri sırasıyla Şekil 3.19 ve Şekil 3.21'de verilmiştir. Bu bileşiğin enzimlerle yaptığı etkileşimler detaylı olarak Tablo 3.12'de verilmiştir. 5-LOX enzimine -9.8 kcal / mol ve COX-2 enzimine -10 kcal / mol ve ile güçlü bağlanma gösteren kemferol bileşiğinin bağlanma görüntüleri sırasıyla Şekil 3.22 ve Şekil 3.23'de verilmiştir. Bu bileşiğin enzimlerle yaptığı etkileşimler detaylı olarak Tablo 3.13'de verilmiştir.



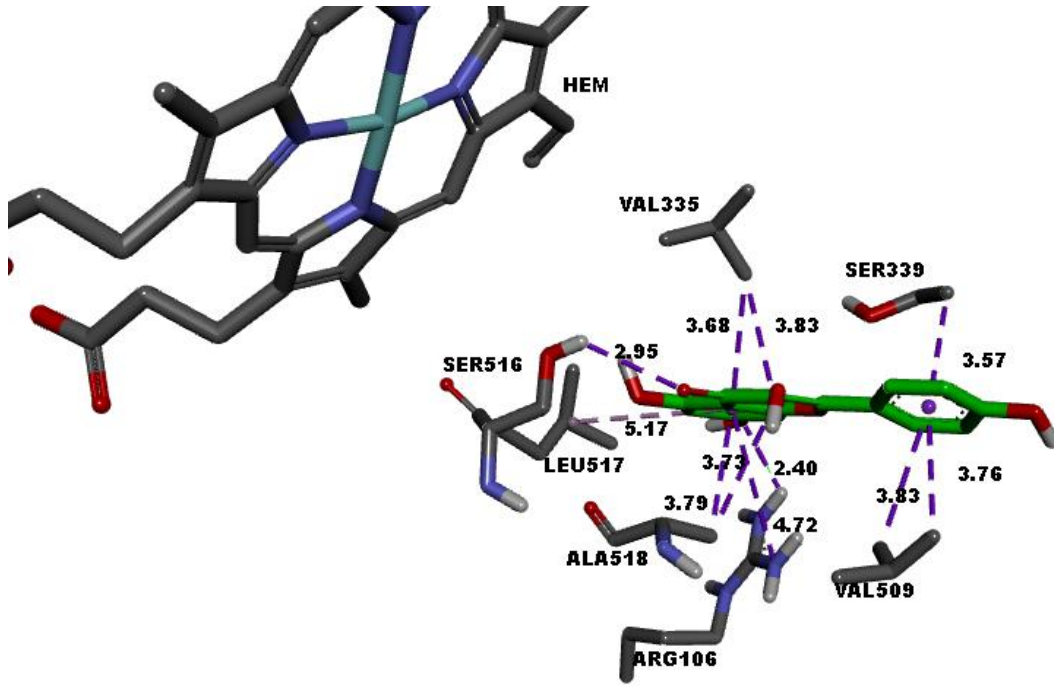
Şekil 3.21 Hiperisin bileşiğinin COX-2 aktif bölgesine bağlanma pozunu

Tablo 3.12 Hiperisin bileşiğinin 5-LOX enzimi, COX-2 enzimi ile yaptığı etkileşimler

Doking Etkileşimleri	
5-LOX ile Hiperisin (-10 kcal/mol)	COX-2 ile Hiperisin (-10 kcal/mol)
SER447(C)...LigB(O) (H bağı=3.58)	LYS68(H)...LigB(H) (Unfavorable=1.72)
ALA453...LigB (π -alkil=4.89)	TYR108...LigB (π - π stacked=3.68)
ARG370(NH2)...LigB (π -katyon=4.01)	TYR108...LigB (π -alkil=4.41)
ARG370(H)...LigB(O) (H bağı=2.85)	TYR108...LigB (π - π stacked=4.04)
ARG370(NH)...LigB (π -katyon=4.59)	TYR108...LigB (π - π stacked=3.91)
ARG370(C)...LigB(O) (H bağı=3.48)	TYR108...LigB (π - π stacked=5.43)
THR366(O)...LigB(H) (H bağı=2.25)	TYR108...LigB (π - π stacked=4.59)
ILE365...LigB(C) (Alkil etkileşimi=4.43)	TYR108...LigB (π - π stacked=5.10)
VAL361...LigB(C) (Alkil etkileşimi=4.62)	TYR108...LigB (π - π stacked=5.92)
LEU288...LigB(C) (Alkil etkileşimi=4.42)	ARG29...LigB (π -alkil=5.21)
LEU244...LigB (π -Alkil=5.04)	ASN28(O)...LigB(H) (H bağı=2.32)
LEU244...LigB (Alkil etkileşimi=4.31)	THR47(O)...LigB(H) (H bağı=2.35)
GLU287(O)...LigB(H) (H bağı=2.51)	
ARG246(NH2)...LigB (π -katyon=4.46)	
ARG246(NH2)...LigB (π -katyon=3.51)	
ARG246(NH2)...LigB (π -katyon=4.08)	
ARG246(NH2)...LigB (π -katyon/H bağı=4.04)	



Şekil 3.22 Kemferol bileşiğinin 5-LOX aktif bölgesine bağlanma pozunu



Şekil 3.23 Kemferol bileşiğinin COX-2 aktif bölgesine bağlanma pozunu

Tablo 3.13 Kemferol bileşiğinin 5-LOX enzimi, COX-2 enzimi ile yaptığı etkileşimler

Doking Etkileşimleri	
5-LOX ile Kemferol (-9.8 kcal/mol)	COX-2 ile Kemferol (-10 kcal/mol)
ARG370(H)...LigK(O) (H bağı=2.54)	SER516(H)...LigandK(O) (H bağı=2.95)
ARG370(NH1)...LigK (π -katyon=4.14)	LEU517...LigandK (π -alkil=5.17)
VAL243...LigK (π -alkil=4.28)	VAL335(C)...LigandK (π -sigma=3.68)
VAL243(O)...LigK(H) (H bağı=2.25)	VAL335(C)...LigandK (π -sigma=3.83)
ARG457(C)...LigK(O) (H bağı=3.52)	ALA513(C)...LigandK (π -sigma=3.79)
ARG457(H)...LigK(O) (H bağı=2.15)	ALA513(C)...LigandK (π -sigma=3.93)
ALA453...LigK (π -alkil=4.53)	ARG106(NH)...LigandK(π -katyon=4.72)
ALA453...LigK (π -alkil=4.65)	ARG106(H)...LigandK(O)(H bağı=2.40)
	VAL509(C)...LigandK (π -sigma=3.83)
	VAL509(C)...LigandK (π -sigma=3.76)
	SER339(C)...LigandK (π -sigma=3.57)

Bileşiklerin 5-LOX ve COX-2 enzimlerine bağlanma enerjilerini karşılaştırdığımızda neredeyse tümünde COX-2 seçiciliği göze çarpmaktadır. Kemferol bileşiğinin 5-LOX'a bağlanma mekanizmasında ligandın oksijen atomlarının enzim ile yaptığı H-bağları etkili iken, COX-2 enzimine bağlanmasında ise π -sigma hidrofobik etkileşimleri baskın rol oynamaktadır.

Albert ve ark. (2002) alışmasında, HPL bitkisinin temel bileşenlerinden biri olan hiperforini COX-2 ve 5-LOX enzimleri için dual inhibitör olarak önermiştir ancak bitkinin tüm bileşenlerinin dual inhibitör potansiyellerini kıyaslayan çalışmaya rastlanmamıştır.



4.SONUÇLAR

Halk arasında iltihaplanma olarak bilinen enflamasyon, birçok hastalığın patolojik temelini oluşturmaktadır. En fazla reçete edilen ilaç grubu olan anti-enflamatuarların, yan etki profilleri sebebi ile yeni ilaç arayışı devam etmektedir. Enflamasyon, yangı, ateş, ağrı gibi semptomların giderilmesinde COX inhibitörleri ön plandadır. COX enzimi gibi enflamasyona araşidonik asidin ürünlerini inhibe ederek etki gösteren bir diğer enzim de lipoksijenazdır. Aynı anda her iki enzimin inhibisyonuna odaklanmak, daha düşük konsantrasyonlardaki aktif madde ile yan etkileri azaltılmış anti-enflamatuar ilaçların keşfi için umut vadetmektedir. Son yıllarda en az yan etkiye sahip ve daha ulaşılabilir olması sebebiyle tıbbi bitkiler ön plana çıkmıştır. Sarı kantaron (*Hypericum Perforatum L.*), birçok biyolojik aktivite gösteren halk arasında anti-enflamatuar ve yara iyileştirici özellikleri için yaygın olarak kullanılan tıbbi bir bitkidir. Bitkinin nörolojik hastalıkların tedavisinde yararlı olduğu düşünülerek yüzyıllardır bitkisel bir anti-depresan olarak kullanıldığı ve MAO enzimini inhibe ettiği bilinmektedir. Depresyon tedavisinde kullanılan ilaçların seçicilik göstermemesi ve geri dönüşümsüz enzim inhibisyonu sebebi ile yeni ilaç keşfine açık bir alandır. Aynı zamanda antioksidan aktivite gösterdiği bilinen bu bitkinin, biyolojik makromolekül hasarına ve metabolik fonksiyon bozukluklara yol açan oksidatif stresle mücadele ederek anti-depresan ve anti-enflamatuar etkileri destekleyeceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, sarı kantaron bitkisinin temel bileşenleri olan hiperisin, hiperforin ve flavanoid grubunun COX, LOX ve MAO enzimlerine bağlanma afinitelerini doking ile hesaplayarak enzimlere olan ilgisi tespit edilmiş ve bağlanma doğası incelenmiştir. Mersin bölgesinden toplanan sarı kantaron bitkisinin alkol ekstresinden, kromatografik yöntemler ile izole edilen bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemler ile tanımlanmıştır. Bu bileşiklerin antioksidan aktiviteleri DPPH yöntemi ile hesaplanmış, LOX enzimi için *in vitro* enzim inhibisyonu çalışmaları yapılmıştır.

Mersin bölgesinden toplanan ve havadar bir ortamda demetler halinde kurutulan *Hypericum Perforatum L.* bitkisi toz haline getirilmiş ve % 100 metanol eklenip meserasyon yöntemi ile ekstre elde edilmiştir. Elde edilen ekstre absorban olarak silika jel, mobil faz olarak kloroformdan başlayarak artan oranda etanol ile polaritesi artırılarak kolon kromatografisi yöntemiyle elüe edilmiştir. Benzer polaritedeki

yürümeler toplanarak ince tabaka kromatografisi ile uygun mobil faz sistemleri kullanılarak yürütülmüştür. Görünür ışık ve UV lambada fraksiyonlar izlenerek benzer olanlar birleştirilip kaba ayırım tamamlanmıştır. Saf maddelerin izolasyonu için preparatif İTK uygulanıp 10 farklı madde elde edilmiştir. IR ve ¹H NMR yöntemi ile kuersetin (1), kemferol (5) ve hiperisin (9) maddeli tanımlanmış, 4 numaralı örneğin izokuersetin olabileceği düşünülmüş ancak diğer maddeler gibi tam temizlenmemiş (saflaştırılamamış) olması sebebi ile tanımlanamamıştır.

Ekstreden saflaştırılan 10 örnek ve bitkinin %100 alkol ekstresi için DPPH yöntemi ile antioksidan tayini yapılmıştır. Bitkinin alkol ekstresinin IC₅₀ değeri troloks ve askorbik asit ile karşılaştırıldığında sentetik antioksidanlara yakın bir antioksidan aktivite gösterdiği söylenebilir. Ekstreden saflaştırılan maddelerin konsantrasyon artışına bağlı % inhibisyon değişimi incelendiğinde 1,4 ve 5 numaralı örneklerin diğerlerine göre daha tutarlı değerler verdiği görülmüştür. 1 numaralı örnek olan kuersetin, ve 5 numaralı örnek olan kemferolün IC₅₀ değerleri sentetik antioksidanlara kıyasla biraz yüksektir.

in vitro test Cayman Chemical Co (USA) firmasından temin edilen Lipoksijenaz İnhibitör Tarama Kiti kullanılarak, firma talimatlarına uygun gerçekleştirilmiştir. Ancak enzim, kitin içerisinde bulunan pozitif kontrol olan nordihidroguaiaretik asit (NDGA) ile çalışmamış, maddelerin % inhibisyonları hesaplanamamıştır. Enzim kitinin koşullara uygun saklanmadığı için bozulmuş olabileceğini düşünmekteyiz.

Bitki ekstraksiyonundan madde saflaştırma ve biyolojik aktivite tayinleri ile eş zamanlı olarak, HPL bitki bileşenlerinin kapsamlı sınıflandırmasını yapan Greeson ve ark. (2001) çalışmasından flavonoid sınıfına ait yapılar seçilerek MAO, COX ve LOX enzimlerine bağlanma doğasını incelemek ve moleküler düzeyde etkileşimlerini görmek için doking çalışmaları yapılmıştır. Her üç enzim grubu için <-8.0 kcal/mol aktivite gösteren bileşikler kuersetin, kemferol, amentoflavon ve mirisetindir. HPL'nin ana aktif bileşiklerinden biri olan hiperisin (-9.2 kcal/mol) MAO-B için seçici ve güçlü bağlanma afinitesi gösterir. MAO-A enzimini seçici ve çok güçlü bağlanma afinitesi aynı zamanda antioksidan aktiviteye sahip olması sebebiyle kuersetinin (-10.7 kcal/mol) bitkinin antidepresan aktiviteden sorumlu bileşiklerinden en etkilisi olduğu söylenebilir. COX enzim ailesi incelendiğinde tüm bileşiklerin COX-2 enzimini seçici olarak inhibe

etmesi, COX-1 enzim inhibitörlerine bağlı gastrointestinal yan etkileri azaltacağı düşünülebilir. Her iki izoenzim ile en güçlü bağlanma afinitesi gösteren (COX-1 için -10.4 kcal/mol, COX-2 için -13.2 kcal/mol) amentoflavon bileşiği göze çarpmaktadır. Bileşiklerin, enflamasyondan sorumlu diğer enzim grubu olan LOX ailesine olan bağlanma ilgisini incelediğimizde, 15-LOXB izoenzimine 5-LOX izoenzimine göre daha iyi bir afinite ile bağlandığı görülmüştür. 15LOXB için en iyi bağlanma afinitesi (-11,8 kcal/mol) gösteren bileşik hiperisin, 5-LOX için en iyi bağlanma afinitesi (-9,8 kcal/mol) gösteren bileşik kemferoldür.

COX inhibisyonunun lökotrienlerin daha fazla birikmesine sebep olması, aynı zamanda birçok bileşiğin gevşek bağlanma ile 5-LOX için zayıf seçilicilik göstermesi enzimlerin seçici inhibisyonu yerine, hem COX hem de LOX yollarının birlikte inhibisyonun daha düşük yan etkileri olan güçlü anti-enflamatuar etkiler sunacağı düşünülmüştür (Jahng ve ark., 2004; Leone ve ark., 2007; Roschek ve ark., 2009; Chaaban ve ark., 2018). Ek olarak, dual inhibitörlerin COX inhibitörlerinin etkisiz olduğu 5-LOX ürün aracılı enflamasyonu inhibe ederek daha geniş bir spektrumda anti-enflamatuar aktivite sergileyebileceği düşünülmektedir (Fiorucci ve ark., 2001). Bu sebeple son zamanlarda anti-enflamatuar ilaçlar konusunda yapılan araştırmalarda COX-2 ile 5-LOX'un dual etkisine odaklanılmıştır (Brune, 2004; Leval ve ark., 2002; Charlier ve Michaux, 2003; Irrera ve Bitto, 2017; Jacob ve ark., 2018; Martel-Pelletier ve ark., 2003; Chabaan ve ark., 2018). Farklı bileşik gruplarının dual inhibitör potansiyelleri araştırmalara konu olmuş, Albert ve ark. (2002) bu çalışmayı HPL bitkisinin ana bileşenlerinden biri olan hiperforin için gerçekleştirmiştir. Bu çalışmalardan yola çıkarak, bitkisinin temel bileşenleri hiperisin ve hiperforine ek olarak bitkinin flavanoid grubuna ait bileşiklerin dual inhibitör potansiyellerini karşılaştırdık. Hiperisin (her iki enzim için -10,0 kcal/mol) ve kemferol (5-LOX için -9.8 kcal/mol, COX-2 için -10.0 kcal/mol) bileşikleri her iki enzim ile güçlü bağlanma afinitesi göstermiştir ve dual inhibitör potansiyelleri sebebiyle umut vadetmektedir.

Bu çalışmalar değerlendirildiğinde, farklı biyolojik aktiviteleri olduğu bilinen bir grup HPL bileşeninin MAO ve COX inhibisyonunun yanı sıra COX-2 / 5-LOX dual inhibitör potansiyelleri olabileceği düşünülmektedir. Daha ileri *in vitro* ve *in siliko* çalışmalarının gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdelhafez O.M., Amin K.M., Ali H.I., Abdalla M.M., Batran R.Z., (2013) Monoamine oxidase A and B inhibiting effect and molecular modeling of some synthesized coumarin derivatives *Neurochemistry International* 62 198–209
- Abdel-Salam, O. M. (2005) Anti-inflammatory, antinociceptive, and gastric effects of *Hypericum perforatum* in rats. *Sci. World J.* 5: 586–595
- Akyüz M.A., Erdem S.S., (2013) Computational modeling of the direct hydride transfer mechanism for the MAO catalyzed oxidation of phenethylamine and benzylamine: ONIOM (QM/QM) calculations, *J Neural Transm* 120:937–945
- Akyüz M.A., Erdem S.S., Edmondson D. E., (2007) The aromatic cage in the active site of monoamine oxidase B: effect on the structural and electronic properties of bound benzylamine and p-nitrobenzylamine, *J Neural Transm* 114: 693–698
- Albert D., Zündorf I., Dingermann T., Müller W.E., Steinhilber D., Werz O., (2002) Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase, *Biochemical Pharmacology* 1767-1775
- Alsayed S.S.R., Elshemy H.A.H., Abdelgawad M.A., Abdel-Latif M.S., Abdellatif K.R.A., (2016) Design, synthesis and biological screening of some novel celecoxib and etoricoxib analogs with promising COX-2 selectivity, anti-inflammatory activity and gastric safety profile, *Bioorganic Chemistry*, YBIOO 1986
- Altan N., Dinçel A.Ş., Koca C., (2006), Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres, *Turkish Journal of Biochemistry*, 31 (2); 51–56
- Altun M. L., Yılmaz B. S., Orhan I. E., Citoglu G. S., (2013) Assessment of cholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant effects of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort), *Industrial Crops and Products*, 43 87–92
- Andreou A., Feussner I., (2009) Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism, *Phytochemistry* Volume 70, Issues 13–14, Pages 1504-1510

- Atalay V.E., Erdem S.S., (2013) A comparative computational investigation on the proton and hydridetransfer mechanisms of monoamine oxidase using model molecules, *Computational Biology and Chemistry* 47 181–191
- Barnes J., Anderson L.A. and Phillipson J.D., (2001) St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties *Journal of Pharmacy and Pharmacology JPP*, 53: 583±600
- Bladt S. and Wagner H.,(1994) Inhibition of MAO by Fractions and Constituents of *Hypericum* Extract, *J Geriatr Psychiatry Neurol* x 7: S57
- Blumenthal, M., Busse W.R., Goldberg A., (1998) *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. Boston: American Botanical Council.
- Bombardelli, E., Morazzoni, E. (1995) *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia* LXVI: 43–68
- Brune K. (2004) Safety of anti-inflammatory treatment—new ways of thinking, *Rheumatology*,43(Suppl. 1):i16–i20
- Cakir K., Erdem S.S., and Atalay V.E., (2016) ONIOM calculations on serotonin degradation by monoamine oxidase B: insight into the oxidation mechanism and covalent reversible inhibition, *Org. Biomol. Chem.*, 14, 9239
- Cao G., Sofic E. and Prior R. L., (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radical Biology and Medicine*, vol.22,no.5,pp.749–760.
- Carradori S., Ascenzio M.D., (2014) Selective MAO-B inhibitors: a lesson from natural products, *Mol Divers* 18:219–243
- Castleman, M. (2001) *The New Healing Herbs: The Classic Guide to Nature's Best Medicines Featuring the Top 100 Time-Tested Herbs*. Emmaus, PA: Rodale Press.
- Chaaban I., Rizk O.H., Ibrahim T.M., Henen S.S., El-Khawass E.M., Bayad A.E., El-Ashmawy I.M., Nematalla H.A., (2018) Synthesis, anti-inflammatory screening, molecular docking, and COX-1,2/-5-LOX inhibition profile of some novel quinoline derivatives, *Bioorganic Chemistry* 78 220–235

Charlier C., Michaux C., (2003) Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs, *European Journal of Medicinal Chemistry* 38, 645/659

Chubb A.J., Fitzgerald D.J., Nolan K.B., and Moman E., (2006) The Productive Conformation of Prostaglandin G2 at the Peroxidase Site of Prostaglandin Endoperoxide H Synthase: Docking, Molecular Dynamics, and Site-Directed Mutagenesis Studies, *Biochemistry*, 45, 811-820

Clement, K., Covertson C., Johnson M.J., and Dearing K., (2006) St. John's wort and the treatment of mild to moderate depression: A systematic review. *Holist Nurs Pract* 20(4):197–203.

Colibus L.D., Lit M., Binda C., Lustig A., Edmondson D.E., and Mattevi A., (2005) Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): Relation to the structures of rat MAO A and human PNAS, 102, 12684–12689

Costa G., Francisco V., Lopes M.C., Cruz M.T., and Batista M.T., (2012) Intracellular Signaling Pathways Modulated by Phenolic Compounds: Application for New Anti-Inflammatory Drugs Discovery, *Current Medicinal Chemistry* 19, 2876-2900

Dixon R.A., Dey P.M., and Lamb C.J., (1983) Phytoalexins: enzymology and molecular biology," *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, vol. 55, pp. 1–136

Edmondson D.E., Mattevi A., Binda C., Li M., and Hubálek F., (2004) Structure and Mechanism of Monoamine Oxidase, *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1983-1993

Edmondson DE. (1995) Aminium cation radical mechanism proposed for monoamine oxidase B catalysis: are there alternatives? *Xenobiotica*, 25: 735–53.

Erdem S.S., Karahan Ö., Yıldız İ., Yelekçi K., (2006) A computational study on the amine-oxidation mechanism of monoamine oxidase: Insight into the polar nucleophilic mechanism, *Org. Biomol. Chem.*, 4, 646–658

Faydaoğlu E., Sürücüoğlu M.S., (2011) Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi, *Kastamonu Univ., Journal of Forestry Faculty*, 11 (1): 52 – 67

Feißt C., Pergola C., Rakonjac M., Rossi A., Koeberle A., Dodt G., Hoffmann M., Hoernig C., Fischer L., Steinhilber D., Franke L., Schneider G., Ra°dmark O., Sautebin L., Werz O., (2009) Hyperforin is a novel type of 5-lipoxygenase inhibitor with high efficacy in vivo. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66:2759–2771

Finberg J. P.M. and Gillman K. (2011) Selective Inhibitors Of Monoamine Oxidase Type B And The “Cheese Effect”, *International Review Of Neurobiology*, VOL. 100 p:169-190

Fiorucci S., Meli R., Bucci M., Cirino G., (2001) Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy?, *Biochemical Pharmacology* 62 1433–1438

Fitzpatrick PF., (2010) Oxidation of amines by flavoproteins. *Arch Biochem Biophys*; 493: 13

Ford-Hutchinson A. W., Gresser M., and Young R. N., (1994) 5-Lipoxygenase, *Annu. Rev. Biochem.* 63:383-417

Formica J.V. and Regelson W., (1995) Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids, *Food Chem Toxicol.* 33(12):1061-80

Foster, S., and J. A. Duke. 2000. *Eastern/Central Medicinal Plants and Herbs*. The Peterson Field Guides Series. New York: Houghton Mifflin Company.

Galor S.W., Benzie I.F.F., (2011) Herbal Medicine: An Introduction to Its History, Usage, Regulation, Current Trends, and Research Needs, *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. Chapter-1 Page 1-11

Gaweska H. and Fitzpatrick P.F.,(2011) Structures and mechanism of the monoamine oxidase family, *BioMol Concepts*, Vol. 2 pp. 365–377

Gilbert N.C.,Bartlett S.G., Waight M.T., Neau D.B., Boeglin W.E., Brash A.R., and Newcomer M.E., (2011) The structure of human 5-lipoxygenase, *Science*, 331(6014): 217–219

Greeson J.M., Sanford B., Monti D.A., (2001) St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature, *Psychopharmacology* 153:402–414

Herraiz T., Flores A., Fernández L., (2017) Analysis of monoamine oxidase (MAO) enzymatic activity by highperformance liquid chromatography-diode array detection combined with an assay of oxidation with a peroxidase and its application to MAO inhibitors from foods and plants, *Journal of Chromatography B* 20947

Herraiz T., Guillén H., (2018) Monoamine Oxidase-A Inhibition and Associated Antioxidant Activity in Plant Extracts with Potential Antidepressant Actions, *Biomed Res Int* 15;2018:4810394

Hung-Jin Huang H.J., Yu H.W., Chen C.Y., Hsu C.H., Chen H.Y., Lee K.J., Tsai F.J., Chen C.Y.C., (2010) Current developments of computer-aided drug design, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 41 623–635

Hunt, E. J., Lester, C. E., Lester, E. A., (2001) Effect of St. John's wort on free radical production. *Life Sci.* 69: 181–190

Irrera N., Bitto A. (2017) Evidence for using a dual COX 1/2 and 5-LOX inhibitor in neurodegenerative diseases, *Neural Regen Res* 12(7):1077-1078.

Ivanov I., Saam J., Kuhn H. and Holzhütter H.G., (2005) Dual role of oxygen during lipoxygenase reactions, *FEBS Journal* 272 2523–2535

Jacob P.J., Manju S.L., Ethiraj K.R., Elias G., (2018) Safer anti-inflammatory therapy through dual COX-2/5-LOX inhibitors: A structure-based approach, *Eur J Pharm Sci*, 121:356-381

Jahng Y., Zhao L.X., Moon Y.S., Basnet A., Kim E., Chang H.W., Ju H.K., Jeong T.C., and Lee E.S., (2004) Simple aromatic compounds containing propenone moiety show

K. Roy, S. Kar, ve R. N. Das, Other Related Techniques. *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*, 357–425. (2015)

Kelly E.H., Anthony R. T., and Dennis J.B., (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 13, no. 10, pp. 572–584

Kerry N. and Abbey M. (1997) Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 135, 93 –102.

Keşkek, Y. (2016) Kantaron Flavonoidlerinin Moleküler Modelleme ve Deneysel Çalışmalar İle Depresyon Tedavisinde Kullanılacak Yeni Mao-A İnhibitörlerinin Tasarlanması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 69-100.

KhannaV., Ranganathan S. ve PetrovskyN..(2018) Rational Structure-Based Drug Design. Reference Module in Life Sciences.

Kim J-M, Bogdan MA, Mariano PS., (1993) Mechanistic analysis of the 3-methylflavin-promoted oxidative deamination of benzylamine. A potential model for monoamine oxidase catalysis. *J Am Chem Soc.* 115: 10591–5.

Klemow K.M., Bartlow A., Crawford J., Kocher N., Shah J., Ritsick M., (2011) Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*), *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, Chapter-11 Page 211-239

Kobe M.J., Neau D.B., Mitchell C.E., Bartlett S.G., and Newcomer M.E., (2014) The Structure of Human 15-Lipoxygenase-2 with a Substrate Mimic, *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 289, No. 12, pp. 8562–8569

Korkina L. and Afanasev I. (1997) Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol* 38, 151–163

Kostova I., Bhatia S., Grigorov P., Balkansky S., Parmar V.S., Prasad A.K. and Saso L., (2011) Coumarins as Antioxidants, *Current Medicinal Chemistry*, 18, 3929-3951

Kuhn H., Banthiya S., Leyen K., (2014) Mammalian lipoxygenases and their biological relevance, *Biochimica et Biophysica Acta*, pages: 23; 4C: 3, 7, 11

Kuhn H., Walther M., Kuban R.J., (2002) Mammalian arachidonate 15-lipoxygenases Structure, function, and biological implications, Prostaglandins & other Lipid Mediators 68–69 263–290

Kumar S. and Pandey A.K., (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview, The ScientificWorld Journal Article ID 162750, 16 pages

Kumar V., Singh P.N., Battacharya S.K., (2001) Anti-inflammatory and analgesic activity of Indian Hypericum Perforatum L., Indian Journal of Experimental Biology 39, 339-343

Larit F., Elokely K.M., Chaurasiya N.D., Benyahia S., Nael M.A., León F., Abu-Darwish M.S., Efferth T., Wang Y.H., Belouahem-Abed D., Benayache S., Tekwani M.L., Cutler S.J., (2018) Inhibition of human monoamine oxidase A and B by flavonoids isolated from two Algerian medicinal plants, Phytomedicine 40 27–36

Leone S., Ottani A. and Bertolini A. (2007) Dual Acting Anti-Inflammatory Drugs, Current Topics in Medicinal Chemistry, 7, 265-275

Leval X.D., Julémont F., Delarge J., Pirotte B. and Dogné J.M. (2002) New Trends in Dual 5-LOX/COX Inhibition, Current Medicinal Chemistry, 9, 941-962

Loll P.J., Picot D., Garavito R.M., (1995) The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H₂ synthase, Nature Structural Biology volume 2, pages 637–643

Lopez M., Martinez F., Valle C.D., Orte C., and Miro M., (2001) Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography A, vol. 922, no. 1-2, pp. 359–363

Macalino S. J. Y., Gosu V., Hong S., Choi S., (2015) Role of computer-aided drug design in modern drug Discovery. The Pharmaceutical Society of Korea

Mahomoodally M.F., Gurib-Fakim A., and Subratty A.H., (2005) Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of Mauritius, Pharmaceutical Biology, vol. 43, no. 3, pp. 237–242

- Martel-Pelletier J., Lajeunesse D., Reboul P., Pelletier J.P., (2003) Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Ann Rheum Dis* 2003;62:501–509
- Mashima R., Okuyama T., (2015) The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives, *Redox Biology* 6 297–310
- Mennini T., Gobbi M., (2004) The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*, *Life Sciences* 75 1021–1027
- Michael H. Glickman[‡] and Judith P. Klinman (1996) Lipoxygenase Reaction Mechanism: Demonstration That Hydrogen Abstraction from Substrate Precedes Dioxygen Binding during Catalytic Turnover, *Biochemistry*, 35, 12882-12892
- Mladenović M., Mihailović M. , Bogojević D., Matic S., Nićiforović N., Mihailović V., Vuković N., Sukdolac S. and Solujić S.,(2011) In Vitro Antioxidant Activity of Selected 4-Hydroxy chromene-2-one Derivatives—SAR, QSAR and DFT Studies *Int. J. Mol. Sci.* 12, 2822-2841
- Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, Hoult JR., (1988) Selectivity of Neutrophil 5-Lipoxygenase and Cyclo-oxygenase Inhibition by an Anti-inflammatory Flavonoid Glycoside and Related Aglycone Flavonoids. *J Pharm Pharmacol.* 40(11):787-92
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, *J. Computational Chemistry*, 16, 2785-91
- Newcomer M.E. and Brash A.R. (2015) The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis, *Protein Science* 2-42
- Oztürk N., Korkmaz S., Oztürk Y., (2007) Wound-healing activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on chicken embryonic fibroblasts, *J Ethnopharmacol.* 20;111(1):33-9
- Pabuccuoglu A, Konyalioğlu S, Bas Meral, Meral GE. The in vitro effects of *Hypericum* species on human leukocyte myeloperoxidase activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 87: 89-92.

Panche A.N., Diwan A.D. and Chandra S. R., (2016) Flavonoids: an overview, Journal of Nutritional Science, vol. 5, e47, page 1 of 15

Parejo I, Codina C, Petrakis C, Kefalas P. (2000) Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH* (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. J Pharmacol Toxicol Methods. Nov-Dec;44(3):507-12.

Patočka J., (2003) The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L., Journal of Applied Biomedicine, 61-70

Paur I., Carlsen M.H., Halvorsen B.L., Blomhoff R., (2011) Antioxidants in Herbs and Spices, Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects., Chapter-2, Page 11-37.

Raso GM, Pacilio M, Di Carlo G, Esposito E, Pinto L, Meli R. (2002) In-vivo and in-vitro anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*, J Pharm Pharmacol., 54(10):1379-83

Redvers, A., Laugharne R., Kanagaratnam G., and Srinivasan G., (2001) How many patients self-medicate with St John's wort? Psychiatr Bull 25:254–6.

Reid A.M., Oosthuizen C. B., Bianca D., Fibrich D., Twilley, Lambrechts Is A., Canha M.N., Rademan S., Lall N., (2018) Traditional Medicine: The Ancient Roots of Modern Practice” Chapter 1, Medicinal Plants for Holistic Health and Well-Being, Pages 1-11

Roschek B., Fink R.C., Li D., McMichael M., Tower C.M., Smith R.D., and Alberte R.S., (2009) Pro-Inflammatory Enzymes, Cyclooxygenase 1, Cyclooxygenase 2, and 5-Lipoxygenase, Inhibited by Stabilized Rice Bran Extracts, J Med Food 12 (3), 615–623

Rouzer CA, Marnett LJ., (2009) Cyclooxygenases: structural and functional insights, J Lipid Res. 50 Suppl:S29-34

Saddiqe Z, Naeem I, Alya Maimoona A., (2010) A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. Journal of Ethnopharmacology 131, 511–521

Sadeghian H., Jabbari A., (2015) 15-Lipoxygenase inhibitors: a patent review, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 1744-7674

Satyapal N.T., Yadav S., (2017) Contributions of Indian Council of Medical Research (ICMR) in the area of Medicinal plants/Traditional medicine, *J Ethnopharmacol*, 2;197:39-45

Schempp, C. M., Winghofer, B., Lüdtkke, R., Simon-Haarhaus, B., Schöpf, E., Simon, J. C. (2000) Topical application of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells. *Br. J.Dermatol.* 142: 979–984

Schneider I., Bucar F., (2005) Lipoxygenase Inhibitors from Natural Plant Sources. Part 2: Medicinal Plants with Inhibitory Activity on Arachidonate 12-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and Leukotriene Receptor Antagonists., *Phytother. Res.* 19, 263–272

Shipochliev, T., Dimitrov, A., Aleksandrova, E. (1981) Anti-inflammatory action of a group of plant extracts. *Vet. Med. Nauki* 18: 87–94

Silverman RB, Hoffman SJ, Catus WB. (1980) A mechanism for mitochondrial monoamine oxidase catalyzed amine oxidation. *J Am Chem Soc* 102: 7126–8.

Sliwoski G., Kothiwale S., Meiler J., ve Lowe E. W.. (2013) Computational Methods in Drug Discovery. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics

Smith W.L., Murphy R.C., (2016) The Eicosanoids: Cyclooxygenase, Lipoxygenase and Epoxygenase Pathways, *Biochemistry of Lipids*, Chapter-9 Lipoproteins and Membranes 260-296

Snodgrass R.G., and Brüne B., (2019) Regulation and Functions of 15-Lipoxygenases in Human Macrophages, *Front. Pharmacol.* 10:719

Son SY, Ma J, Kondou Y, Yoshimura M, Yamashita E, Tsukihara T., (2008) Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substrates/inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;105(15):5739-44

- Sosa S., Pace R., Bornancin A., Morazzoni P., Riva A., Tubaro A., and Loggia R.D., (2007) Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L., *J Pharm Pharmacol.* 59(5):703-9
- Stavric B., (1994) Role of chemopreventers in human diet, *Clin. Biochem.* 27(5):319-332.
- Taft C. A., Silva V. B. Da, Silva C. H. Da., (2007) Current Topics in Computer-Aided Drug Design. Published online in Wiley InterScience
- Tedeschi, E., Menegazzi, M., Margotto, D., Suzuki, H., Förstermann, U., Kleinert, H. (2003) Anti-inflammatory actions of St. John's Wort: inhibition of human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1 α (STAT-1 α) activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307: 254–261
- Thiede H.-M. and Walper A., (1994) Inhibition of MAO and COMT by *Hypericum* Extracts and Hypericin, *J Geriatr Psychiatry Neurol Suppl* 1:S54-6.
- Trott, O., Olson, A.J. (2010) Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading, *J Comput Chem*, 31, 455–461
- Tusevski O., Krstikj M., Stanoeva J.P., Stefova M., Gadzovska S., (2018) Phenolic profile and biological activity of *Hypericum perforatum* L.: Can roots be considered as a new source of natural compounds?, *South African Journal of Botany* 117 301–310
- Weinberger B., Hirsch D., Yin K, Spur B.W., (2015) Lipid Mediators and Lung Function, *Comparative Biology of the Normal Lung*, Chapter-21, 404-420
- Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, and Hale A., (1995) Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum, *Clin. Chem.* 41/1 : 32-35.
- Wölfl U., Seelinger G., Schempp C.M., (2014) Topical Application of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) *Planta Med*, 80: 109–120
- Xiao X., Wang X., Gui X., Chen L. and Wiley B.H., (2016) Natural Flavonoids as Promising Analgesic Candidates: A Systematic Review - *Zurich Chem. Biodiversity*, 13, 1427 – 1440

Youdim M.B.H., Edmondson D., and Tipton K.F., (2006) The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors, *Nat Rev Neurosci* (4):295-309.

Zou Y, Lu Y, Wei D. (2004) Antioxidant Activity of a Flavonoid-Rich Extract of *Hypericum perforatum* L. in Vitro. *J Agric Food Chem.* 11;52(16):5032-9

<http://www.stevenfoster.com/photography/imageviewsh/hypericum/perforatum/p/index.php> (e.t. 17.02.2020)

<https://www.caymanchem.com/pdfs/760700.pdf> (e.t. 21.06.2019)

<http://193.255.8.8/herbaryum/dyn/tr/search/isteNo> (e.t. 09.04.2020)

Wavefunction Inc2014. Spartan 14, Irvine, CA, USA. Available from: <http://www.wavefun.com> (e.t. 12.04.2019)

Traditional, Complementary and Integrative Medicine:
http://www.who.int/topics/traditional_medicine/en/ (e.t. 26.09.2019)

EKLER

Tablo Ek-1.Her bileşik için MAO-A ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bileşik										
Hiperforin	-5.4	-5.5	-5.3	5.1	-6.0	-6.0	-5.4	-6.0	-5.1	-5.9
Hiperisin	-8.1	-8.1	-8.1	-8.4	-8.1	-8.1	-8.2	-8.1	-8.1	-8.1
Kuersetin	-10.7	-10.7	-10.7	-6.5	-10.7	-10.7	-10.7	-10.7	-10.7	-10.7
Rutin	-7.2	-7.0	-7.6	-7.2	-7.0	-7.0	-7.6	-7.2	-7.6	-7.8
Amentoflavon	-8.0	-8.1	-8.0	-7.9	-8.0	-8.1	-8.0	-8.1	-8.1	-8.0
Avikularin	-7.8	-6.3	-6.6	-6.9	-7.6	-7.8	-6.7	-7.8	7.6	-7.6
Biapigenin	-6.9	-6.8	-6.7	-6.7	-6.9	-6.8	-6.7	-7.2	-7.0	-6.7
Hiperozid	-7.2	-6.6	-7.2	-7.2	-7.2	-6.6	-6.6	-7.2	-6.6	-6.5
İzokuersetin	-7.1	-7.3	-7.1	-7.2	-7.3	-7.3	-6.6	-6.8	-7.3	-6.6
Kemferol	-10.3	-10.3	-6.4	-10.3	-10.3	-10.3	-10.2	-10.3	-10.3	-6.5
Kuersitrin	-7.8	-7.7	-7.8	-7.8	-7.8	-7.2	-7.8	-7.8	-7.2	-7.1
Mirisetin	-10.6	-10.6	-10.6	-10.6	-10.5	-10.6	-10.5	-10.6	-10.6	-6.8

Tablo Ek-2.Her bileşik için MAO-B ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bileşik										
Hiperforin	-5.6	-5.9	-5.8	-5.9	-5.9	-6.0	-5.8	-5.3	-5.8	-5.8
Hiperisin	-9.2	-9.2	-9.2	-9.1	-9.2	-8.6	-9.2	-9.1	-8.2	-9.2
Kuersetin	-7.9	-7.5	-8.0	-7.9	-8.1	-6.4	-7.5	-6.4	-7.5	-7.5
Rutin	-7.4	-7.4	-7.1	-7.4	-7.4	-7.4	-7.4	-7.3	-7.3	-7.4
Amentoflavon	-8.8	-8.6	-7.5	-8.3	-8.3	-8.7	-8.0	-8.8	-8.8	-8.6
Avikularin	-6.8	-6.7	-6.9	-6.9	-7.0	-7.3	-6.9	-6.9	-6.9	-6.9
Biapigenin	-7.4	-7.2	-7.2	-7.4	-7.2	-7.3	-7.4	-7.4	-7.4	-7.4
Hiperozid	-6.7	-7.4	-7.0	-7.3	-6.9	-6.7	-6.7	-6.7	-7.3	-7.1
İzokuersetin	-7.1	-7.0	-6.8	-6.9	-6.9	-6.8	-6.9	-6.9	-6.9	-6.8
Kemferol	-7.2	-8.1	-7.9	-7.9	-8.1	-7.9	-8.1	-8.0	-8.1	-7.9
Kuersitrin	-7.3	-7.0	-7.3	-7.3	-7.3	-7.1	-7.0	-7.3	-7.1	-7.3
Mirisetin	-8.0	-8.0	-8.1	-7.6	-8.0	-8.0	-8.0	-7.4	-6.4	-8.0

Tablo Ek-3.Her bileşik için COX-1 ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı Bileşik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hiperforin	-6.9	-6.8	-6.9	-6.9	-6.8	-6.9	-6.9	-6.8	-6.9	-6.8
Hiperisin	-8.3	-8.3	-8.5	-8.5	-8.7	-8.7	-8.5	-8.5	-8.6	-8.6
Kuersetin	-9.4	-9.6	-7.8	-7.7	-9.4	-9.6	-9.4	-9.4	-9.4	-9.4
Rutin	-8.6	-8.8	-8.7	-8.8	-8.7	-8.7	-8.8	-8.8	-8.8	-8.7
Amentoflavon	-10.1	-10.1	-10.1	-10.1	-10.1	-10.1	-10.1	-10.4	-10.1	-10.1
Avikularin	-7.8	-7.8	-7.8	-7.9	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8	-7.5
Biapigenin	-8.7	-8.8	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7
Hiperozid	-8.1	-8.1	-8.1	-8.8	-7.9	-8.0	-8.1	-8.1	-8.0	-8.1
İzokuersetin	-7.6	-9.4	-7.7	-8.2	-7.9	-7.6	-7.6	-7.9	-8.0	-8.1
Kemferol	-9.3	-8.2	-7.2	-7.2	-7.2	-7.2	-9.3	-9.3	-8.1	-9.3
Kuersitrin	-7.8	-7.9	-7.8	-7.8	-7.7	-7.8	-7.3	-7.8	-7.8	-7.8
Mirisetin	-8.6	-7.7	-8.6	-9.2	-7.7	-9.2	-7.7	-9.2	-9.2	-7.7

Tablo Ek-4.Her bileşik için COX-2 ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı Bileşik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hiperforin	-8.2	-8.1	-6.8	-8.2	-6.9	-8.2	-6.7	-9.2	-6.9	-6.9
Hiperisin	-9.8	-10.0	-9.9	-10.0	-9.9	-9.9	-9.9	-9.7	-9.9	-9.8
Kuersetin	-10.0	-9.9	-10.1	-9.9	-9.9	-9.8	-9.2	-9.9	-10.0	-9.9
Rutin	-7.8	-11.7	-10.7	-11.8	-10.7	-11.5	-8.0	-11.7	-11.9	-11.8
Amentoflavon	-11.6	-11.7	-13.2	-9.5	-11.6	-11.3	-11.7	-11.7	-10.3	-11.7
Avikularin	-10.6	-10.7	-10.1	-10.4	-10.8	-7.7	-10.5	-10.6	-10.7	-10.6
Biapigenin	-9.5	-9.5	-9.5	-9.5	-9.1	-9.5	-9.4	-9.5	-9.5	-9.5
Hiperozid	-8.0	-10.0	-11.6	-11.4	-9.7	-10.3	-11.1	-8.3	-10.4	-10.2
İzokuersetin	-10.5	-10.8	-10.3	-10.6	-7.7	-8.1	-9.8	-10.6	-8.2	-10.6
Kemferol	-9.9	-9.4	-9.6	-9.9	-9.5	-9.4	-9.4	-10.0	-9.9	-9.6
Kuersitrin	-10.5	-10.8	-10.5	-10.5	-10.6	-8.5	-10.7	-8.0	-10.4	-10.7
Mirisetin	-10.1	-9.1	-9.3	-10.1	-10.0	-10.3	-9.2	-7.4	-10.1	-9.2

Tablo Ek-5.Her bileşik için 5-LOX ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı Bileşik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hiperforin	-7.5	-7.8	-7.8	-7.8	-7.7	-5.9	-6.0	-7.8	-7.8	-7.8
Hiperisin	-10.0	-10.0	-10.0	-10.0	-10.0	-10.0	-10.0	-8.4	-8.4	-10.0
Kuersetin	-7.9	-7.7	-7.4	-7.4	-6.5	-7.9	-8.1	-7.4	-8.1	-7.9
Rutin	-8.9	-8.9	-8.9	-9.0	-7.0	-9.0	-7.0	-8.9	-9.0	-8.5
Amentoflavon	-8.3	-9.8	-9.8	-8.3	-9.8	-9.9	-8.3	-9.8	-9.6	-9.8
Avikularin	-7.7	-7.5	-7.5	-7.6	-7.3	-7.5	-7.5	-6.4	-7.5	-7.2
Biapigenin	-8.6	-9.4	-9.4	-8.2	-8.5	-9.4	-9.4	-9.3	-8.9	-9.4
Hiperozid	-7.7	-7.7	-7.7	-7.7	-7.7	-7.7	-7.0	-6.7	-7.7	-7.7
İzokuersetin	-8.0	-8.2	-8.3	-7.9	-7.5	-7.6	-7.4	-8.1	-6.7	-7.2
Kemferol	-7.2	-7.4	-7.2	-6.8	-7.7	-6.4	-7.6	-7.6	-7.8	-7.8
Kuersitrin	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.7	-6.5
Mirisetin	-7.7	-7.7	-7.7	-7.7	-8.0	-7.7	-7.7	-7.7	-7.7	-8.0

Tablo Ek-6.Her bileşik için 15-LOX-B ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı Bileşik	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hiperforin	-8.8	-8.6	-7.8	-8.4	-9.2	-8.5	-8.7	-8.3	-8.5	-8.4
Hiperisin	-9.3	-11.5	-9.5	-9.5	-9.5	-9.4	-11.8	-11.5	-11.8	-9.4
Kuersetin	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2	-7.9	-8.2	-8.2	-8.2
Rutin	-8.9	-8.8	-8.9	-8.9	-8.8	-8.7	-8.7	-8.9	-8.8	-8.9
Amentoflavon	-10.5	-10.5	-10.4	-10.5	-10.4	-10.5	-10.5	-10.3	-10.3	-10.6
Avikularin	-8.5	-8.4	-8.5	-8.5	-8.5	-8.5	-8.1	-8.4	-8.1	-8.5
Biapigenin	-9.3	-9.3	-9.3	-9.3	-9.3	-9.2	-9.3	-9.6	-9.3	-9.3
Hiperozid	-8.6	-8.1	-8.6	-8.6	-8.6	-8.6	-8.1	-8.1	-8.6	-8.6
İzokuersetin	-8.1	-8.3	-8.2	-8.4	-8.2	-8.1	-8.1	-8.2	-8.3	-8.0
Kemferol	-8.1	-9.0	-8.0	-8.2	-8.0	-8.1	-7.9	-8.1	-8.0	-8.0
Kuersitrin	-8.9	-8.9	-8.9	-8.9	-8.9	-8.9	-8.9	-8.9	-8.9	-8.9
Mirisetin	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.8	-8.0	-7.9

ÖZGEÇMİŞ

Ad,Soyad : İlknur YILDIZ
Doğum tarihi : 10.05.1993
E-posta : ilknuryildiz@marun.edu.tr

EĞİTİM

Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi – Biyokimya Programı (2017-2020)
Lisans	Marmara Üniversitesi –Kimya Bölümü (2011-2016)
Lise	Hacı Fahri Zümbül Anadolu Lisesi

Sözlü Bildiri ve Poster Bildiri:

Yıldız İ., Erdem S.S., Ogan A.(2020) Investigation on Anti-Inflammatory Effects of Hypericum Perforatum L. Flavonoids with Molecular Docking COXs and LOXs.5th Advanced in silico Drug Design Workshop/Challenge. 3-7 February, Olomouc/Czech Republic (Poster Bildiri)

Yıldız İ., Erdem S.S., Ogan A. (2018) In Silico Investigation on Anti-Depression Effects of Hypericum Perforatum Flavonoids: Molecular Docking with Monoamine Oxidases. 1. Eurasia Biochemical Approaches & Technologies (1. EBAT) Congress 27-30 October, Antalya (Sözlü Bildiri)