



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**BAZI KUMARİNLERİN SALGI FOSFOLİPAZ $A_2(sPLA_2)$ VE
SİKLOOKSİGENAZ-2 (COX-2) ENZİMLERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Oğuz KURT

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN**

**II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Sabriye PERÇİN ÖZKORUCUKLU**

Haziran, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 24.06.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Ayşe DAUT ÖZDEMİR
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 57790 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca her aşamada tecrübeleriyle bana yol gösteren, bilimsel gelişimime büyük katkıda bulunan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Keriman GÜNEYDİN'a

Tezimin başlangıcından bitimine kadar bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Prof. Dr. Sabriye PERÇİN ÖZKORUCUKLU'ya

Tezimin istatistiksel analizinde bana yardımcı olan sevgili arkadaşım MSc Ece UZUNSAKAL'a

Hayatım boyunca beni maddi manevi destekleyen ve beni bu günlere getiren sevgili annem Reyhan KURT'a, sevgili babam Demir KURT'a, bana yol gösteren ve hayat tecrübelerini benimle paylaşan sevgili abim Kaan KURT'a ve çok sevdiğim destekçim sevgili kardeşim Asya KURT'a

Tez sürecimde bilgilerini benimle paylaşan, yardımlarını esirgemeyen, zor zamanlarımda hep yanımda olan ve beni bir an bile yalnız bırakmayan MSc Handenur GÖKTAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Haziran 2019

Oğuz KURT

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. ENFLAMASYON.....	3
2.2. FOSFOLİPAZLAR.....	4
2.3. SİKLOOKSİGENAZLAR.....	8
2.3.1. Genel Yapıları	10
2.3.2. Substrat ve Ürün Kompleksleri	11
2.3.3. Substratın İnhibitör Bağlanma Modu	14
2.3.4. Siklooksigenaz İnhibisyon Mekanizması	15
2.4. <i>Ammi majus</i> (AM).....	18
2.5. <i>Ammi visnaga</i> (AV).....	18
2.6. <i>Anethum graveolens</i> (AG).....	19
2.7. <i>Angelica sylvestris</i> (AS).....	19
2.8. <i>Apium graveolens</i> (APG)	20
2.9. <i>Petroselinum crispum</i> (PC)	20
2.10. KUMARİNLER	20
2.10. 1. 7-hidroksikumarin (Umbelliferon)	22
2.11. ENZİM İNHİBİSYONU	25
2.11.1. Dönüşümsüz inhibisyon	25
2.11.2. Dönüşümlü inhibisyon.....	25

2.11.2.1. Kompetitif (Yarışmalı) İnhibisyon.....	25
2.11.2.2. Nonkompetitif (Yarışmasız) inhibisyon	27
2.11.2.3. Semi-kompetitif (Yarı Yarışmalı) İnhibisyon	28
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	30
3.1. BİTKİ EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI.....	30
3.2. ENZİM İNHİBİSYONU	30
3.2.1. sPLA ₂ İnhibitör Tarama Test Kiti	31
3.2.1.1. Ön Hazırlıklar	31
3.2.1.2. Deney Protokolü.....	31
3.2.1.3. Analiz.....	33
3.2.2. COX-2 İnhibitör Tarama Test Kiti	33
3.2.2.1. COX-2 Reaksiyon Prosedürü	33
3.2.2.2. ELISA Prosedürü	34
3.2.2.3. Analiz.....	38
4. BULGULAR.....	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ.....	68

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Fosfolipazların hidroliz bölgeleri.....	5
Şekil 2.2: Memeli sPLA ₂ 'sinin farklı etki mekanizmaları ve bunlarla ilişkili fonksiyonel rolleri (39).....	8
Şekil 2.3: Araşidonik asitin COX enzimi ile prostaglandinlere dönüşümü.	10
Şekil 2.4: COX-2'nin homodimer yapısı (19).	11
Şekil 2.5: Substrat ve siklooksigenaz enzimlerinin ürün kompleksleri (19).	13
Şekil 2.6: Siklooksigenaz reaksiyonu sırasında AA'nın PGG ₂ 'ye dönüşümündeki kimyasal değişiklikler (19).	14
Şekil 2.7: COX inhibisyonu için çoklu dengelerin kurulduğu genel model (19).	17
Şekil 2.8: Kumarin türevlerinin terapötik uygulamaları (146).....	22
Şekil 2.9: UBF'nin kimyasal yapısı	24
Şekil 2.10: UBF'nin biyosentezi.	25
Şekil 2.11: Enzimin ve yarışmalı inhibitörün enzime bağlanış şekilleri.....	27
Şekil 2.12: Enzim-substrat ve enzim-inhibitör komplekslerinin denge reaksiyonu. E: Enzim, S: Substrat, ES: Enzim-substrat kompleksi, EI: Enzim-inhibitör kompleksi, Ü: Ürün, k: Denge sabiti (34)	28
Şekil 2.13: Yarışmalı bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Micheales- Menten ve Lineweaver–Burk grafiği; V_{max} sabit durumdayken K_m artış gösterir	29
Şekil 2.14: Nonkompetitif inhibisyonda substrat ve inhibitörün enzimin farklı yerlerine bağlanışları	29
Şekil 2.15: Yarışmasız inhibisyondaki ES ve EI denge reaksiyonları	30
Şekil 2.16: Yarışmasız bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Micheales-Menten ve Lineweaver-Burk eğrisi; V_{max} azalırken K_m aynı kalır. Substrat ve inhibitör enzimin farklı bölgelerine bağlanır. Bu yüzden iki çeşit inaktif kompleks oluşur (EI ve ESI)	30
Şekil 2.17: Semi-kompetitif inhibisyondaki denge reaksiyonları	31

- Şekil 2.18:** Unkompetitif bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik bir reaksiyon hızının Linewaver-Burk eğrisi; $V_{\max}$ ve K_m aynı oranda azalır. $[I]$ artsa dahi doğruların eğimi aynıdır (34).....31
- Şekil 3.1:** Numune ve inhibitör plate düzeni. BW: Arka plan kuyucukları, A: %100 başlangıç aktivitesi kuyucukları, P: Pozitif inhibitör kuyucukları, 1-29: Test bileşiği kuyucukları.34
- Şekil 3.2:** Örnek ve inhibitör plate düzeni. Blk: Kör (Boşluk) kuyucukları, TA: Total aktivite kuyucuğu, NSB: Spesifik olmayan bağlanma kuyucukları, B_0 : Maksimum bağlanma kuyucukları, S1-S8: Standart kuyucukları, BC: Arka plan COX-2 kuyucukları, +: %100 Başlangıç aktivitesi örnekleri (IA2 ve IA3), H: COX-2 inhibitör örnekleri (C2 ve C3).....38
- Şekil 4.1:** AM_k konsantrasyonuna bağlı sPLA₂ inhibisyon yüzdesi. 51

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1: sPLA ₂ inhibitör taraması için ELISA Reader’da okunan absorbands değerleri.....	43
Tablo 4.2: sPLA ₂ inhibitör taraması için ELISA Reader’da okunan ikinci absorbands değerleri.....	46
Tablo 4.3: sPLA ₂ inhibitör taraması için ELISA Reader’da okunan üçüncü absorbands değerleri.....	47
Tablo 4.4: sPLA ₂ inhibitör taraması için ELISA Reader’da okunan dördüncü absorbands değerleri.....	49
Tablo 4.5: sPLA ₂ inhibitör taraması için ELISA Reader’da okunan beşinci absorbands değerleri.....	50
Tablo 4.6: COX-2 inhibitör taraması için ELISA Reader’da okunan absorbands değerleri.....	52

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
C	: Karbon
Ca ²⁺	: Kalsiyum iyonu
N	: Azot
O	: Oksijen
H	: Hidrojen
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
KCl	: Potasyum klorür
KOH	: Potasyum hidroksit
HCl	: Hidroklorik asit
SnCl ₂	: Kalay klorür
Co ³⁺	: Kobalt iyonu
°C	: Santigrat derece
%	: Yüzde
~	: Yaklaşık
Å	: Angström
rmsd	: Kök-ortalama-kare sapma
α	: Alfa
γ	: Gamma
ω	: Omega

Kisaltmalar	Açıklama
DNA	: Deoksiribonükleik asit
AM	: <i>Ammi majus</i>
AV	: <i>Ammi visnaga</i>
AG	: <i>Anaethum graveolens</i>
AS	: <i>Angelica sylvestris</i>
APG	: <i>Apium graveolens</i>
PC	: <i>Petroselinum crispum</i>
M	: Molar

mM	: Milimolar
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
ng	: Nanogram
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DTNB	: 5,5-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit
log	: Logaritma
7-OHC	: 7-hidroksikumarin
UBF	: Umbelliferon
PAF	: Platelet aktive edici faktör
PAL	: Fenilalanin amonyak liyaz
TAL	: Tirozin amino liyaz
C4H	: 4-sinnamik asit hidroksilaz
CYP	: Sitokrom P-450
PAF-AH	: Platelet aktive edici faktör-asetil hidrolaz
PL	: Fosfolipaz
PLA	: Fosfolipaz A
PLB	: Fosfolipaz B
PLC	: Fosfolipaz C
PLD	: Fosfolipaz D
sPLA₂	: Salgı fosfolipaz A ₂
cPLA₂	: Sitozolik fosfolipaz A ₂
iPLA₂	: Ca ²⁺ 'den bağımsız fosfolipaz A ₂
PNPLA	: Patatin bezneri fosfolipaz A
COX	: Siklooksijenaz
LOX	: Lipoksijenaz
AA	: Araşidonik asit
PGH₂	: Prostaglandin H ₂
NSAID	: Nonsteroidal antienflamatuar ilaçlar
PG	: Prostaglandin
kDa	: Kilodalton
Arg	: Arjinin
Tyr	: Tirozin
Ser	: Serin

His	: Histidin
Gly	: Glisin
Met	: Metiyonin
Thr	: Treonin
Ala	: Alanin
Leu	: Lösin
Ile	: İzölösın
Lys	: Lizin
Val	: Valin
Phe	: Fenilalanin
V_{max}	: Maksimum hız
K_M	: Hız sabiti
K_d	: Disosiyasyon sabiti (afinite)
k	: Denge sabiti
ES	: Enzim-substrat kompleksi
EI	: Enzim-inhibitör kompleksi
HETE	: 15-(<i>R</i>)-hidroksieikosatetraenoik asit
DHLA	: Dihidrolipoik asit
EPA	: Eikosapentaenoik asit

ÖZET

**BAZI KUMARİNLERİN SALGI FOSFOLİPAZ A₂ (sPLA₂) ve
SİKLOOKSİGENAZ-2 (COX-2) ENZİMLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Oğuz KURT

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN

II. Danışman : Prof. Dr. Sabriye PERÇİN ÖZKORUCUKLU

Enflamasyon çeşitli sebeplerle oluşabilen fizyolojik bir süreçtir. Genel anlamda fosfolipitlerin fosfolipazlar ile araşidonik aside, araşidonik asidin de siklooksigenaz (COX) enzimleri ile pro-enflamatuar mediatörlere enzimatik olarak metabolize edilmesiyle oluşur.

Fosfolipaz A₂ (PLA₂)'ler gliserofosfolipitlerin *sn*-2 pozisyonundaki ester bağının hidrolizini katalizler. Bu reaksiyonun sonucunda araşidonik asit meydana gelir. PLA₂ ailesi iki enzim sınıfını kapsamaktadır: hücre içi (sitzozolik) PLA₂'ler ve salgılanan PLA₂ (sPLA₂)'ler.

COX araşidonik asidin prostaglandinlere olan metabolik dönüşümünde hız sınırlayıcı bir enzimdir. Prostaglandin sentezinin biyosentetik yolağında anahtar rol oynar. COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki çeşidi vardır.

Bu çalışmada fosfolipazlardan sPLA₂ ve siklooksigenazlardan COX-2, enflamasyon yolağında anahtar rol oynadıkları için, Umbelliferae familyasından bazı kumarin sınıfı bileşikler içeren bitki ekstraktlarının, sPLA₂ ve COX-2 enzimleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amacı güdülmüştür.

Çalışmada sPLA₂ ve COX-2 enzim aktivitesi ve inhibitör taraması için uygun olan kitler esas alınarak spektrofotometrik analizler yapılmıştır. ELISA Reader’da substratın enzim ile reaksiyonu sonucunda absorpsiyondaki değişimler dikkate alınarak çeşitli kumarin sınıfı bileşikler ile etkileştirilen enzimlerin aktiviteleri değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuçlardan, *Ammi majus* bitki ekstresinin sPLA₂ enzimi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) inhibisyon etkisinin olduğu görülmüş (%84.7717), diğer ekstrelerin inhibisyon etkisine sahip olmadığı belirlenmiştir. Aynı şekilde çalışmada kullanılan tüm bitki ekstrelerinin COX-2 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermediği belirlenmiştir.

Çalışmanın özgün yanı, literatürde kumarin sınıfı bileşiklerin sPLA₂ ve COX-2 enzimlerinin her ikisinin de üzerindeki etkileri dolayısıyla bir bütün olarak anti enflamatuvar etkinliğinin saptanmış olmamasıdır. Ayrıca *Ammi majus* bitki ekstresi genelde sıçanlarda pençe ödemi metoduyla gözlemsel olarak incelenmiştir, enzimatik olarak değerlendirilmemiştir. Bu çalışmada ise *Ammi majus*’un sPLA₂ ve COX-2 üzerindeki inhibisyon etkinliği enzimatik olarak araştırılmıştır.

Haziran 2019, 85 sayfa.

Anahtar kelimeler: Enflamasyon, sPLA₂, COX-2, kumarin, *Ammi majus*.

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME COUMARINS ON SECRETORY PHOSPHOLIPASE A₂ (sPLA₂) AND CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2) ENZYMES

M.Sc. THESIS

Oğuz KURT

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN

Co-Supervisor : Prof. Dr. Sabriye PERÇİN ÖZKORUCUKLU

Inflammation is a physiological process that may occur for various reasons. Generally, phospholipids are formed by phospholipases and arachidonic acid, and enzymatic metabolism of arachidonic acid with cyclooxygenase (COX) enzymes and pro-inflammatory mediators.

Phospholipase A₂ (PLA₂) catalyzes the hydrolysis of the ester linkage at the *sn*-2 position of the glycerophospholipids. As a result of this reaction arachidonic acid occurs. The PLA₂ family comprises two classes of enzymes. These are intracellular (cytosolic) PLA₂s and secreted PLA₂ (sPLA₂)s.

COX is a speed-limiting enzyme in the metabolic conversion of arachidonic acid to prostaglandins. It plays a key role in the biosynthetic pathway of prostaglandin synthesis. There are two types of COX-1 and COX-2.

In this study, it was aimed to investigate the effects of some coumarin class compounds in the family Umbelliferae on sPLA₂ and COX-2 enzymes because sPLA₂ and COX-2 enzymes play a key role in the inflammation pathway.

In this project, spectrophotometric analysis were performed using kits suitable for sPLA₂ and COX-2 enzyme activity and inhibitor screening. In ELISA Reader, the activity of enzymes activated by various coumarin class compounds was evaluated by considering the changes in absorption as a result of reaction of substrate with enzyme.

According to the results, it was observed that *Ammi majus* plant extract had statistically significant ($p < 0.05$) inhibition effect (%84.7717) on sPLA₂ enzyme. The inhibition effect of other extracts could not be evaluated. Similarly, the inhibition effect of all plant extracts which used in the study on COX-2 enzyme could not be evaluated.

The original side of the work is that in the literature, anti-inflammatory activity of coumarin class compounds as a whole has not been determined due to their effects on both sPLA₂ and COX-2 enzymes. In addition, *Ammi majus* plant extract is generally observed observationally by paw edema method in rats, it has not been evaluated enzymatically. In this study, the inhibitory activity of *Ammi majus* on sPLA₂ and COX-2 was investigated enzymatically.

June 2019, 85 pages.

Keywords: Inflammation, sPLA₂, COX-2, coumarin, *Ammi majus*.

1. GİRİŞ

Enflamasyon normal şartlarda bakteriyel veya viral enfeksiyonlar gibi organizmaya yönelik tehditleri ortadan kaldırmak için bir savunma mekanizmasıdır. Enflamasyon enfeksiyon veya doku hasarının sonrasında proenflamatuarları aktive eden proenflamatuar sitokinler gibi mediatörlerin senteziyle başlar (Ala ve diğ., 2003). Romatoid artrit, sistemik lupus eritematosus gibi bazı hastalıklarda görülen kontrolsüz iltihaplanma ise bu hastalıkların patogeneğinde önemli rol almaktadır (Dinauer, 1993, Kolaczowska ve Kubes, 2013). Enflamasyon olayında temel metabolik süreç araşidonik asit (AA) yolağıdır. Bu yolda öncelikle fosfolipaz enzimleri fosfolipitleri katalize eder ve AA oluşur. Oluşan bu ürün siklooksigenaz-2 (COX-2) enziminin substratı olur ve bu enzim tarafından katalizlenerek prostaglandin (PG) gibi enflamasyon başlatıcı mediatörlerin oluşumuna sebep olur (Dennis ve diğ., 2011).

Kumarin ilk defa tonka fasulyesinden elde edilen bir bileşiktir. Kimyasal yapısından dolayı terapötik bir ajandır ve bir çok tıbbi ilaç araştırmasında yer almaktadır (Kontogiorgis ve diğ., 2012). Anti enflamatuar, anti kanser ve anti viral özellikleri dahil olmak üzere çok yönlü biyoaktif bir bileşiktir (Huang ve diğ., 2012, Liu ve diğ., 2012, Sancho ve diğ., 2004). Deoksiribonükleik asit (DNA) hedefleme ajanları ve boyalar gibi kullanım alanları da vardır (Whittaker ve diğ., 1998, Hara ve diğ., 2005).

Umbelliferon (UBF), bitkilerde yaygın olarak bulunan ve doğada benzopiron şeklinde bulunan bir kumarindir. UBF, farmakolojik olarak aktif bir ajan olan 7-hidroksikumarin'dir. Kumarin bileşiğinin 7 numaralı karbonuna bir hidroksil grubunun bağlanmasıyla oluşur (Mazimba, 2017). Yapısı basit olduğu için daha karmaşık kumarin türevlerinin sentezinde ana bileşik olarak kullanılır (Mazimba, 2017, Lee ve diğ., 2006). UBF'nin iyi bir COX-2 inhibisyonu gösterdiği yapılan çalışmalarda görülmüştür (Kaur ve diğ., 2012).

Bazı tıbbi bitkilerin anti enflamatuar etkinliği çeşitli araştırmalara konu olmuştur. *Ammi majus* bitki ekstresinin furanokumarinlerce zengin olduğu görülmüştür. İzole edilen kumarinlerin yüksek derecede anti enflamatuar etkinliği saptanmıştır (Selim ve Ouf, 2012). *Ammi visnaga* bitki ekstresinde bir furokumarin olan visnagin tespit edilmiştir. Visnagin, pro-enflamatuar sitokinlerin ekspresyonu üzerinde inhibe edici etkisinin olduğu görülmüştür (Cells ve diğ., 2010). *Anethum graveolens* bitkisinin biyoaktif içeriği araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre

bu bitkinin antienflamatuar maddeler bakımından zengin bir içerikte olduğu sonucuna varılmıştır (Kazemi, 2015). Bu bitkinin tohum ekstresinin, farelerde enflamasyon ve ağrıda önemli bir azalmaya neden olduğu ortaya konmuştur. Bir çok *Angelica* türünün karragenan tarafından indüklenen enflamasyon kaynaklı ödemi azalttığı gözlenmiştir (Liu ve diğ., 2008). Bazı çalışmalarda, *Angelica pubescens* bitki ekstresinin COX-1 ve 5-lipoksigenaz (5-LOX) üzerinde inhibitör etki gösterdiği görülmüştür (Liu ve diğ., 2008).

Fosfolipaz (PL)'lar fosfolipitlerin ester bağının hidrolizini katalize ederler. PL enzimleri PL A, B, C ve D olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır. PLA₂'ler fosfolipitlerin *sn*-2 pozisyonundaki ester bağının hidrolizini katalizleyerek AA salınımını sağlar. PLA₂'ler, PG'ler, lökotrienler ve tromboksanlar da dahil olmak üzere çeşitli enflamatuar mediatörler üreten, COX'lara, LOX'lara ve sitokrom P450 enzimlerine serbest yağ asitleri sağlayan eikosanoid kaskadının düzenleyicileridir (Nikolaou ve diğ., 2019).

COX enzimleri, AA'ın PG ve tromboksanın ortak biyosentetik öncüsü olan prostaglandin H₂'ye (PGH₂) dönüşümünü katalize eder (Kurumbail ve diğ., 2001). Oluşan bu biyoaktif lipidler, ağrı, ateş, enflamasyon (iltihaplanma) gibi çok sayıda fizyolojik ve patofizyolojik etkilere aracılık eder. COX-2, esas olarak sitokinlere, mitojenlere ve endotoksinlere cevap olarak ekspresyonu çeşitli hücrelerde aktive edilen (beyinde ve böbrekte temel olarak eksprese edilen) indüklenebilir bir enzimdir.

Bu çalışmada *Ammi majus*, *Ammi visnaga*, *Anethum graveolens*, *Angelica sylvestris*, *Apium graveolens*, *Petroselinum crispum* bitki ekstrelerinin sPLA₂ ve COX-2 enzimlerinin üzerinde bir bütün olarak etkisi araştırılmıştır. Literatürde enflamasyonu baskılamak için seçilen inhibitör örneklerinin, inhibisyon etkinliği bu iki enzimden yalnızca biri üzerinde değerlendirilmiştir. Ayrıca *Ammi majus* bitki ekstresinin antienflamatuar etkisi genel olarak farelerde pençe ödemi metoduyla görsel olarak analiz edilmiştir. Bu çalışmada bu bitkinin ekstresinin antienflamatuar etkinliği enzimatik olarak araştırılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1.ENFLAMASYON

Akut bir enflamatuvar yanıtın aktivasyonu, bakteriyel veya viral enfeksiyonlar gibi ev sahibi organizmaya yönelik tehditleri ortadan kaldırmak için temel bir savunma mekanizmasıdır. Enflamasyonun (iltihaplanma) başlaması, enfeksiyonun veya doku hasarının ardından, yerleşik bağışıklık hücreleri tarafından, Toll benzeri reseptörler gibi patojen tanıma reseptörleri aracılığıyla, proenflamatuvarları aktive eden proenflamatuvar sitokinler gibi mediatörlerin senteziyle başlar (Ala ve diğ., 2003). Aynı zamanda enflamasyonun başlaması, dolaşımdaki lökositler ve endotel hücreleri üzerindeki hücre adezyon moleküllerinin düzenlenmesi, granülositlerin ve mononükleer fagositlerin kandan akışını teşvik eder. Nötrofiller gibi granülositler fagositoz işlevini yerine getirerek doku hasarından kaynaklanan doku kalıntılarını veya mikroorganizmaları ortadan kaldırır (Kolaczowska ve Kubes, 2013).

Kontrolsüz iltihaplanma, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus ve kronik granülomatöz hastalık dahil olmak üzere çok sayıda kronik hastalığın patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (Dinauer, 1993, Morgenstern ve diğ., 1997). Geçtiğimiz süreçte, bu hastalıkların tedavisi için ağırlıklı olarak steroid olmayan anti enflamatuvar ilaçlar (NSAID'ler) ve antitümör nekroz faktörü (TNF) gibi antisitokin tedavileri içeren ilaçlar kullanılmaktaydı (Feehan ve Gilroy, 2019).

Enflamasyon olayında temel metabolik süreç araşidonik asit (AA) yolağıdır. AA yolağı, pro-enflamatuvar biyokimyasal mediatörlerin oluşumuna yol açar ve enflamasyonun kritik bir bileşenidir. Bu yolun aktivasyonundaki ilk ve kilit adım, fosfolipaz A₂ (PLA₂) etkisiyle büyük bir AA havuzunun membran fosfolipitlerinden üretilmesidir. Daha sonra, AA, lipoksigenaz (LOX), siklooksigenaz (COX) ve bunların aşağı akış enzimleriyle, lökotrienler, prostaglandinler (PG) ve tromboksanlar gibi eikosanoidlerin üretilmesiyle metabolize edilir (Dennis ve diğ., 2011). Bunlardan, bir LOX izoformu olan 5-LOX ve bir COX izoformu olan COX-2, çeşitli enflamatuvar uyarıcılara cevap olarak uyarılabilir. Bu nedenle, 5-LOX ve COX-2 enflamasyonu tedavi etmek için potansiyel ilaçların ana hedefleridir (Radmark ve diğ., 2015, Steinhilber ve Hofmann, 2014, Maloney ve diğ., 1998, Blobaum ve Marnett, 2007). 5-LOX/COX-2'yi beraber inhibe eden inhibitörlerin, seçici 5-LOX veya COX-2 inhibitörlerinin aksine iltihaplanmanın tedavisinde etkinliğin arttığını göstermiştir (Steinhilber ve Hofmann,

2014, Charlier ve Michaux, 2003). Bununla birlikte, ne seçici ne de ikili 5-LOX/COX-2 inhibitörleri, enflamatuar koşullar altında regüle edildiği bilinen PLA₂ aktivitesini bloke edemez (Dennis ve diğ., 2011, Quach ve diğ., 2014). PLA₂ aktivitesi, AA'nın yanı sıra iltihabın ilerlemesine katkıda bulunabilen lizofosfolipid ve platelet (trombosit) aktive edici faktör (PAF) gibi ek enflamatuar mediatörlerin oluşumuyla ilişkilidir (Dennis ve diğ., 2011). Bilinen bazı memeli PLA₂'leri arasında, salgılanan PLA₂ IIA grubu (sPLA₂IIA), iltihaplanma sırasında aşırı AA ve daha sonra eikosanoid üretimine katkıda bulunur (Yedgar, 2000, Reid, 2005). Bu nedenle, 5-LOX ve COX-2'ye ek olarak sPLA₂IIA'yı hedef alan çoklu enzim inhibitörleri, AA yolağının aracılık ettiği enflamasyonu baskılamada büyük bir avantaja sahiptir (Quach ve diğ., 2014, Yedgar, 2000, Joshi ve diğ., 2016).

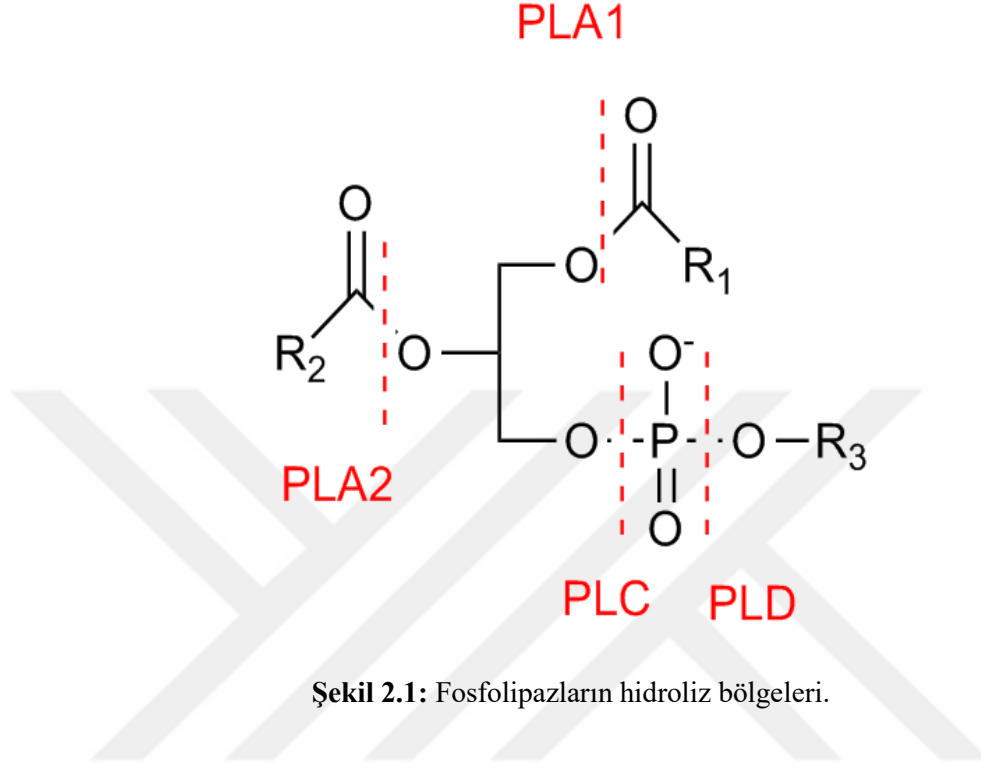
Bu şekildeki bir inhibisyon mekanizması için bitki kaynaklı bileşikler, yeni ve etkili anti-enflamatuar ajanları tanımlamak için önemli bir kaynaktır (Nanjundaiah ve diğ., 2013, Cao ve diğ., 2010).

2.2. FOSFOLİPAZLAR

Bu enzimler üst grup olarak lipazlara, lipazlar da bir üst grup olan hidrolazlara dahildir. Hidrolazlar, bir bağın hidrolizini su ilavesiyle katalize eden enzimlerdir (Litwack, 2008). C-halojenür, glikozid, ester, P-N, eter, anhidrit veya peptid bağlarına su ilave ederek bu bağları kırarlar (Korkmaz ve diğ., 2012). Lipazlar olarak da adlandırılan trigliserol asilhidrolazları, önemli bir hidrolitik enzim sınıfıdır. Doğada her yerde, uzun zincirli asilgliserollerin ester bağının hidrolizini katalize ederler (Atalah ve diğ., 2019). Bu enzimler, stereospesifiklik, regioselektivite, geniş bir substrat aralığı ve sulu-apolar ara yüzünde heterojen reaksiyonları da katalize etmek gibi çeşitli biyokatalitik özellikler gösterir (Lajis ve diğ., 2017).

Fosfolipazlar (PL) genel olarak fosfolipitlerin ester bağının hidrolizini katalize ederler. Bu enzim grubunun 4 ana izoformu tanımlanmıştır. Bunlar; PL A, B, C ve D'dir. Fosfolipaz A (PLA), PLA₁ ve PLA₂'yi içerir. PLA₁'ler gliserofosfolipitlerin *sn*-1 pozisyonundaki ester bağının hidrolizini katalizlerken, PLA₂'ler *sn*-2 pozisyonundaki ester bağının hidrolizini katalizleyerek AA salınımını sağlar. Fosfolipaz B (PLB) söz konusu bileşiğin hem *sn*-1 hem *sn*-2 pozisyonundaki asil zincirlerini hidroliz eder ve bu enzim aynı zamanda lizofosfolipaz olarak bilinir. Fosfolipaz C (PLC) fosfat grubundan öncesini katalizler ve diasilgliserol ve bir

fosfat içeren baş grubun salınmasına neden olur. Fosfolipaz D (PLD) ise fosfat grubundan sonrasını hidrolizleyerek fosfatidik asit ve bir alkol salınmasını sağlar (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Fosfolipazların hidroliz bölgeleri.

PLA₂'ler, PG'ler, lökotrienler ve tromboksanlar da dahil olmak üzere çeşitli enflamatuar mediatörler üreten COX'lara, LOX'lara ve sitokrom P450 enzimlerine serbest yağ asitleri sağlayan eikosanoid kaskadının düzenleyicileridir (Nikolaou ve diğ., 2019). Çok sayıda enflamatuar hastalığın gelişimine ve ilerlemesine katılmaları nedeniyle (Manuscript ve diğ., 2012, Murakami ve diğ., 2011), PLA₂'ler uzun yıllardır tıbbi hedefler olarak büyük ilgi görmüştür.

Daha önce de belirtildiği gibi PLA₂, serbest yağ asitlerini ve lizofosfolipitleri serbest bırakmak için membran gliserofosfolipidlerinin *sn*-2 pozisyonunun hidrolizini katalize eder (Murakami ve diğ., 2010). Bugüne kadar, PLA₂ veya ilgili aktiviteyi sergileyen 30'dan fazla enzim, memelilerde tanımlanmış ve yapıları, katalitik mekanizmaları, hücre içi veya hücre dışı lokalizasyonları ve evrimsel ilişkileri esas alınarak birkaç sınıfa ayrılmıştır (Burke ve Dennis, 2009). 11-12 izoformun tanımlandığı memeli sPLA₂ familyası, düşük molekül ağırlıklı, Ca²⁺ gerektiren hücre dışı enzimlerden oluşur (Valentin ve Lambeau, 2000, Murakami ve Kudo, 2001, Lambeau ve Gelb, 2008). Sitozolik PLA₂ (cPLA₂) ailesi, hücresel membranlarla Ca²⁺'ye

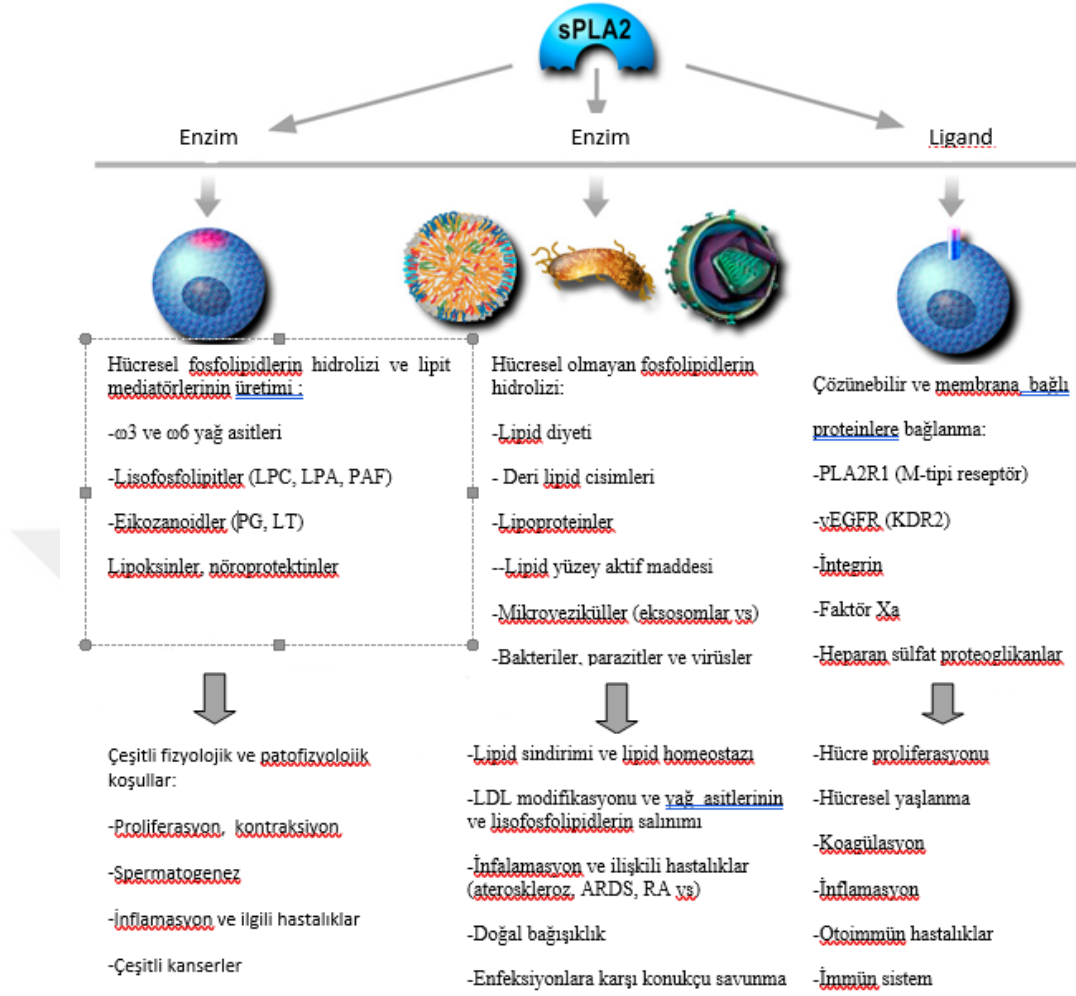
bağlı tipik olarak bir N-terminal C2 alanına sahip olan 6 enzimden oluşur (Kita ve diğ., 2006, Ghosh ve diğ., 2006). Ca^{2+} 'den bağımsız PLA_2 (i PLA_2) veya patatin (patateste bulunan bir glikoprotein) benzeri fosfolipaz bölgesi içeren PNPLA familyası ise, bazıları fosfolipazlar, bazıları da diğer lipazlar olarak çalışan 9 enzim içerir (Wilkins ve Barbour, 2008, Hooks ve Cummings, 2008, Cedars ve diğ., 2009, Kienesberger ve diğ., 2009). PAF asetilhidrolaz (PAF-AH) familyası PAF ve/veya okside fosfolipidlere karşı benzersiz substrat spesifitesi sergileyen 4 enzimi içerir (Arai, 2002, McIntyre ve diğ., 2009). Ek olarak, iki ayrı lizozomal PLA_2 (Fisher ve diğ., 2005, Abe ve diğ., 2004) ve bir adipoz spesifik fosfolipaz (Duncan ve diğ., 2008), yeni PLA_2 sınıfları olarak tanımlanmıştır.

Bu moleküler çeşitlilik nedeniyle, PLA_2 enzimlerinin AA metabolizması ve membran (zar) yeniden şekillenmesindeki rolleri ve bu süreçlerde çeşitli biyokimyasal işlemlerde yer alması çok dikkat çekmektedir. Transgenik ve nakavt (genlerinin bir kısmı susturulmuş) farelerin kullanımı ile birkaç farklı PLA_2 'nin in vivo fonksiyonları son yıllarda keşfedilmiştir. c $\text{PLA}_2\alpha$ (grup IVA PLA_2)'nın biyoaktif PG'ler ve lökotrienlerin öncüsü olan AA'nın hücre zarlarından salınmasında büyük rol oynayan bir enzim olduğu bilinmektedir (Murakami ve diğ., 2010). c $\text{PLA}_2\alpha$ 'dan (*Pla2g4a*^{-/-}) yoksun olan fareler, PG -ve/veya lökotrien- kaynaklı yollardaki bozulmalarla açıklanabilen birkaç önemli fenotip sergiler (Kita ve diğ., 2006, Ghosh ve diğ., 2006, Kienesberger ve diğ., 2009, Arai, 2002, Bonventre ve diğ., 1997, Klivenyi ve diğ., 1998). i $\text{PLA}_2\beta$ veya grup VIA PLA_2 (*Pla2g6*^{-/-}) içermeyen fareler, erkek üreme sisteminde, pankreas β -hücrelerinde, vasküler düz kas ve iskelet kası fizyolojisinde, kemik morfolojisi ve nöronal dejenerasyonda birçok farklı fenotip sergiler (Bao ve diğ., 2004, Bao ve diğ., 2008, Moon ve diğ., 2008, Carper ve diğ., 2008, Malik ve diğ., 2008, Ramanadham ve diğ., 2008). *PLA2G6* mutasyonlarından kaynaklanan nörodejeneratif hastalıklar da insanlarda bulunmuştur (Morgan ve diğ., 2006).

Fosfolipid substratlarının *sn*-2 pozisyonunda AA için belirgin bir spesifikliğe sahip olan c PLA_2 'lerin aksine, s PLA_2 'ler yağ asil zincirlerinin *sn*-2 pozisyonu için belirgin bir tercih göstermezler. Bununla birlikte, fosfolipid substratların belirli baş grupları için bir miktar özgüllükleri vardır (Manuscript ve diğ., 2012). Genel olarak, s PLA_2 'lerin çoğu, fosfatidilgliserol, fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserin gibi anyonik fosfolipidlerle daha yüksek aktivite gösterir.

Hem elektrostatik hem de hidrofobik etkileşimler, sPLA₂'nin anyonik fosfolipid membranlara arayüzey bağlanmasına katkıda bulunur. Bağlanma yüzeyindeki bazik rezidüer (kalıntılar) ile anyonik veziküller arasındaki etkileşim, arayüzey bağlanmasında önemli bir rol oynar (Winget ve diğ., 2006). Bir pre-misel kompleksinde tanımlanmış GIB sPLA₂ kristal yapısı, enzimin, anyonik arayüze bağlanmak için hidrofilik rezidüer olarak arjinin-6 (Arg-6) ve lizin-10 (Lys-10)'i kullandığını göstermiştir (Pan ve Bahnson, 2010).

sPLA₂'ler salgılandığından ve Ca²⁺'nin yüksek konsantrasyonlarını (mM derecesinde) gerektirdiğinden, birincil spesifik hedefleri (membranöz veya çözünür) hücre dışı alandır. İn vitro çalışmalardan elde edilen veriler, sPLA₂'lerin, hücrelerin dışında bir dizi birincil hedefle etkileşime girebilen çok yönlü enzimler olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, sPLA₂ fonksiyonlarıyla çalışılırken bazı özelliklerin göz önünde bulundurulması gerekir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Memeli sPLA₂'sinin farklı etki mekanizmaları ve bunlarla ilişkili fonksiyonel rolleri (Murakami ve diğ., 2010).

İlk olarak, sPLA₂'ler sadece AA gibi ω -6 yağ asitlerini değil, aynı zamanda anti-enflamatuar lipid mediatörlerinin öncülleri olan oleik asit, linoleik asit ve ω -3 yağ asitleri [örneğin eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA)] gibi diğer doymamış yağ asitlerini de serbest bırakabilir. sPLA₂'ler ayrıca lizofosfatidilkolin (LPC) ve lizofosfatidik asit (LPA) gibi lizofosfolipidlerin üretiminde ve PAF'ın bozulmasında da rol oynar (Singer ve diğ., 2002, Gora ve diğ., 2006, Mitsuishi ve diğ., 2006, Mitsuishi ve diğ., 2007).

İkincisi, sPLA₂'ler yalnızca hüresel zarlarda değil, aynı zamanda yabancı mikrobiyal zarlarda olduğu gibi sPLA₂ hareketine bağlı olarak farklı biyolojik etkileri olan çeşitli fosfolipid substrat tipleri üzerinde örneğin, mikroveziküller, eksozomlar, pulmoner sürfaktanlar (yüzey aktif cisimcikleri) ve lipoproteinler gibi hüresel olmayan fosfolipidler üzerine de etki edebilirler

(Fourcade ve diğ., 1995, Hanasaki ve diğ., 2002, Chabot ve diğ., 2003, Karabina ve diğ., 2006, Oorni ve Kovanen 2009).

Üçüncü olarak, sPLA₂'ler enzimatik aktivitelerinden bağımsız olarak reseptörler veya bağlayıcı proteinler vasıtasıyla işlev gösterebilirler (Valentin ve Lambeau, 2000, Lambeau ve Lazdunski, 1999, Valentin ve Lambeau, 2000, Mounier ve diğ., 2001, Pungercar ve Krizaj, 2007). sPLA₂ geni susturulmuş farelerde görüntülenen fenotiplerdeki değişiklikler göz önüne alındığında bunların, sadece lipid mediatör sinyalindeki ve daha özel olarak eikosanoid sinyalindeki değişikliklerin bir yansıması değil, yukarıdaki özelliklerin birinden veya kombinasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu hedef çeşitliliği, moleküler evrimin, yukarıda açıklandığı gibi çoğu hücre içi olmak üzere birçok diğer PLA₂'nin varlığının yanı sıra, farklı lokalizasyonlara ve substrat özelliklerine sahip bir dizi memeli sPLA₂'sini neden arttırdığını açıklar niteliktedir (Murakami ve diğ., 2010).

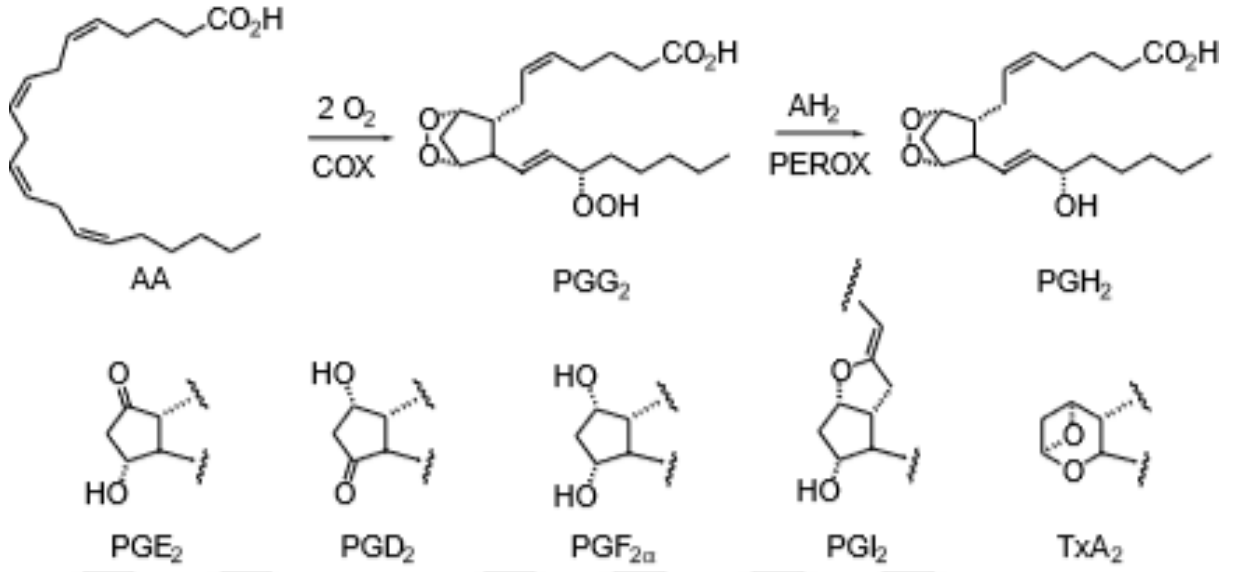
Son yıllarda, çeşitli sPLA₂ enzimlerinin bazı fizyolojik ve patofizyolojik fonksiyonlarının, farelerde gen susturma yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarla tanımlanmıştır.

2.3. SİKLOOKSİGENAZLAR

Bu enzimler üst grup olarak oksidoredüktazlara dahildir. Oksidoredüktaz enzimleri, normal ve neoplastik hücrelerde oksijen kullanım yollarındaki anahtar enzimlerdir. Moleküler oksijenin oksijensiz radikallere, süperoksit, hidroperoksit, singlet oksijene ve hidrojen peroksit dönüşürülmesini sağlarlar. Bu aktif oksijen formları lipidleri, proteinleri, deoksiribonükleik asiti (DNA) ve karbonhidratları değiştiren oksidatif strese katkıda bulunur. Oksidoredüktazlar ayrıca, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksit gibi çok önemli serbest radikal temizleyici sistemleri oluşturur (Bellisola ve diğ., 1987).

COX enzimleri, AA'nın PG ve tromboksanın ortak biyosentetik öncüsü olan prostaglandin H₂'ye (PGH₂) dönüşümünü katalize eder (Şekil 2.3) (Kurumbail ve diğ., 2001).

Bu biyoaktif lipidler, ağrı, ateş, enflamasyon, hemostaz, böbrek fonksiyonunun düzenlenmesi ve midede mukozal bütünlüğün korunması dahil olmak üzere çok sayıda fizyolojik ve patofizyolojik etkilere aracılık eder.



Şekil 2.3 : Araşidonik asitin COX enzimi ile prostaglandinlere dönüşümü.

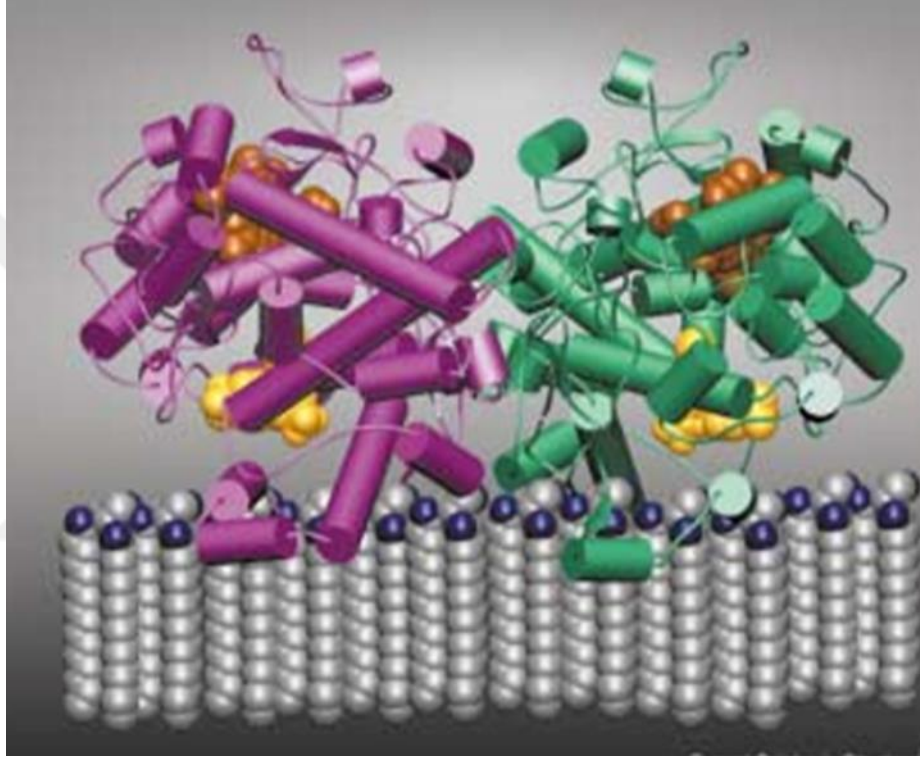
NSAID'lerin farmakolojik etkileri, COX enzimlerinin inhibisyonundan kaynaklanmaktadır (Marnett ve Kalgutkar, 1999).

Farklı genler tarafından kodlanan iki COX izoformu tanımlanmıştır (Smith ve diğ., 2000). COX-1, çoğu dokuda yapısal olarak eksprese edilir ve vücuttaki temel üretim işlevlerinde yer alan PG'lerin üretimi için gereklidir. COX-2, esas olarak sitokinlere, mitojenlere ve endotoksinlere cevap olarak ekspresyonu çeşitli hücrelerde aktive edilen (beyinde ve böbrekte temel olarak eksprese edilen) indüklenebilir bir enzimdir. Bu iki enzim, yüksek derecede amino asit sekansı kimliğini (~% 60) ve yapısal homolojiyi (rmsd <1.0 Å) paylaşır (Picot ve diğ., 1994, Kurumbail ve diğ., 1996, Luong ve diğ., 1996). 1990'ların başında COX-2'nin varlığı keşfedilmiştir ve ekspresyon profilinin COX-1'inkinden daha farklı olduğu görülmüştür. Böylece COX-2'nin spesifik inhibisyonunun antienflamatuar ve analjezik olacağı, ancak bununla ilişkili klasik NSAID'ler ile gastrik toksisiteden yoksun olacağı hipotezine yol açmıştır (Masferrer ve diğ., 1994). Mevcut kanıtlar, klasik NSAID'lerin antienflamatuar etkisinin, COX-2'nin inhibisyonundan kaynaklandığını gösterirken, ülserojenik yan etkiler COX-1'in inhibisyonundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca, normal klinik dozlarda ortaya çıkan NSAID'lerin ciddi gastrointestinal toksisitesi, COX-1 ve COX-2'nin seçici olmayan inhibisyonlarından kaynaklanmaktadır. COX-2 hipotezi artrit hayvan modellerinde ve insan klinik denemelerinde

incelenmiştir ve COX-2 enzimine özgü selekoksib ve rofekoksib gibi inhibitörler tarafından doğrulanmıştır (Bjarnason, 2003).

2.3.1. Genel Yapıları

COX-1 ve COX-2, monomer başına yaklaşık 70 kDa'lık bir moleküler kütleye sahip homodimerler olarak bulunurlar (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: COX-2'nin homodimer yapısı (Kurumbail ve diğ., 2001).

İki enzimin tersiyer (üçüncül) ve kuarterner (dördüncül) yapıları hemen hemen aynıdır. Her alt birim, üç farklı yapısal alandan oluşur. Birincisi kısa bir N-terminal epidermal büyüme faktörü (EGF) alanı, ikincisi bir α -heliks membran bağlama motifi ve son olarak bir C-terminali katalitik bölgesidir.

COX enzimleri monotopik membran proteinleridir yani membran bağlama alanı, membran mono katmanına maruz bırakılan birkaç hidrofobik amino aside sahip bir dizi amfipatik α -heliksinden oluşur (Picot ve diğ., 1994). COX-1 ve COX-2, uzamsal olarak farklı fakat mekanik olarak bağlanmış aktif bölgelerde iki sıralı kimyasal reaksiyon gerçekleştiren iki fonksiyonlu

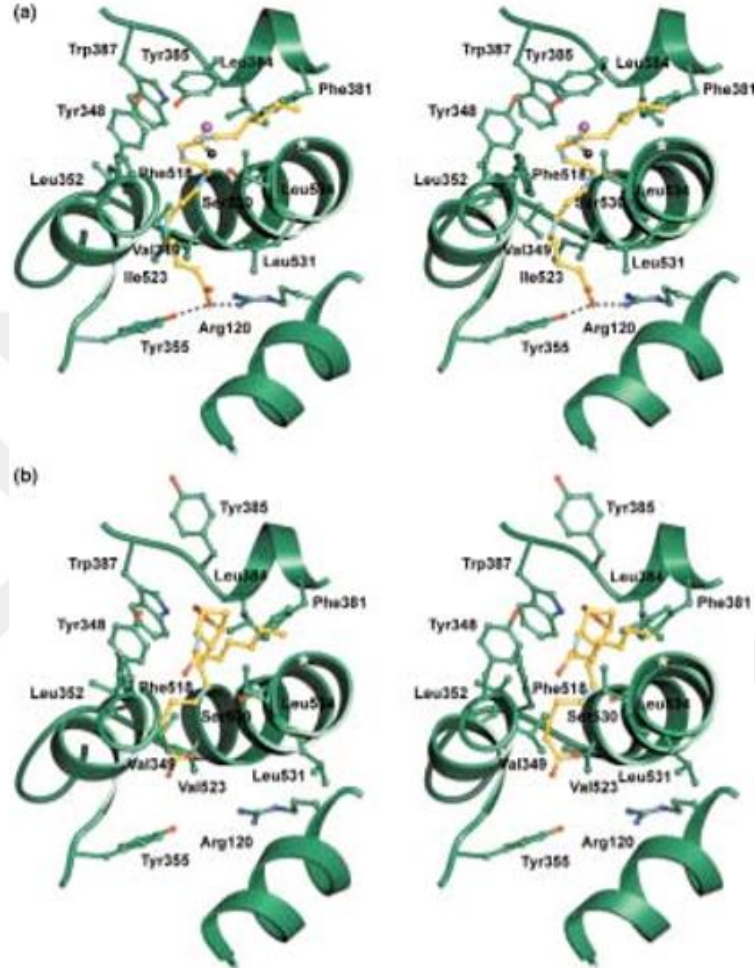
enzimlerdir. Hem COX hem de peroksidaz aktif bölgesi, proteinin yaklaşık %80'ini oluşturan katalitik alanda bulunur. Katalitik bölge, miyeloperoksidaz gibi memeli peroksidazlarına oldukça homologtur (Picot ve diğ., 1994).

COX aktif bölgesi, membran bağlama alanı yakınında geniş olan uzun bir hidrofobik kanalın sonunda bulunur ve proteinin içine doğru uzanırken daralır. Arg120, tirozin (Tyr355) ve glutamat (Glu524)'tan oluşan bir daralma, membran bağlama alanını, üzerinde bulunan COX aktif bölgesinden ayırır. Peroksidaz aktif bölgesi, heme (demir) kofaktörünün yakınındaki proteinin yüzeyinde bulunur. COX aktif bölgesi, büyük ölçüde hidrofobik olan ve daha küçük bir amfipatik yan cep olan ana kanala yani substrat bağlama kanalına bölünebilir. Genel olarak COX-1 ve COX-2'nin yapıları 1 Å rmsd kadar değişebilse de, COX aktif bölgesi yüksek oranda korunur (0.2 Å rmsd). Benzer şekilde, iki enzimin peroksidaz aktif bölgeleri de büyük ölçüde korunmuştur. Bu verilerle tutarlı olarak, iki enzim, AA'nın oksijenlenmesi için karşılaştırılabilir kinetik parametrelere (V_{max} ve K_M) sahiptir (Smith ve diğ., 2000, Kulmacz, 1998, Marnett ve diğ., 1999). Bununla birlikte, yan cebindeki amino asit farklılıkları ve ana kanal etrafındaki ikinci bir kalıntı kabuğu nedeniyle, COX-2 aktif alanının hacmi, COX-1 aktif alanından yaklaşık %20 daha büyüktür. Bu durumun sebebi, farklı zincir uzunluklarına sahip olan yağ asidi substratları için COX-2 artışının nedeni ve COX-2'nin AA'nın daha büyük, nötr türevlerini metabolize etme kabiliyetidir (Laneuville ve diğ., 1995). Ek olarak, COX-1'in aspirin asetilasyonu, oksijenaz aktivitesini tamamen ortadan kaldırırken, COX-2'nin asetilasyonu, ürün profilini birincil olarak PGH₂'den, sadece 15-(R)-hidroksieikosatetraenoik asite (HETE; AA'nın mono-oksijenli bir metaboliti) kaydırır (Lecomte ve diğ., 1994, Mancini ve diğ., 1997). Bu durum, COX-2'nin daha büyük siklooksijenaz aktif bölgesinin, bir asetil grubunun enzim aktif bölgesine kovalent eklenmesinden sonra bile AA'yı bağlayabildiğini ve metabolize edebildiğini göstermektedir. Ayrıca, COX-2'de 523 pozisyonunda daha küçük bir amino asitin varlığı [COX-2'de valin (Val); COX-1'de izölösün (Ile)], yan cebin boyutunda ve biçiminde belirgin bir farkla sonuçlanır. Bu durumun, bazı inhibitör sınıflarının seçicilik profili için önemli etkisi vardır (Kurumbail ve diğ., 1996).

2.3.2. Substrat ve Ürün Kompleksleri

AA veya dihomog- γ -linolenik asit (DHGA) ile komplekslenmiş Co³⁺ içeren sığırdan elde edilen COX-1'in kristal yapıları aydınlatılmış durumdadır (Malkowski ve diğ., 2000, Thuresson ve

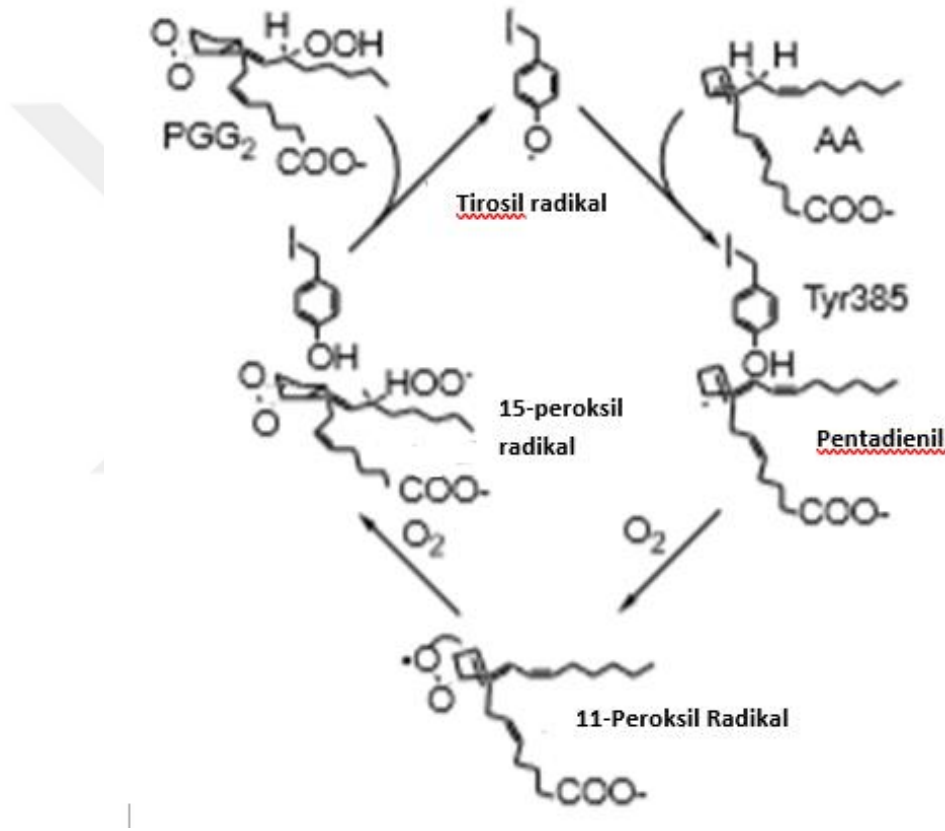
diğ., 2001). Yağ asidi substrat molekülleri, iki iç bükülme ile L şeklinde uzatılmış bir konformasyonda bağlanır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Substrat ve siklooksigenaz enzimlerinin ürün kompleksleri (Kurumbail ve diğ., 2001).

Substratın karboksilatı, korunmuş bir Arg120 guanidinyum grubu ile bir iyon çifti oluşturur ve COX aktif bölgesinin dip kısmında Tyr355 ile bir hidrojen bağı oluşturur (Malkowski ve diğ., 2000). Daha sonra AA'nın orta kısmı (C7 – C14), Serin-530 (Ser530)'un yan zincirinde kıvrılan bir S şeklini alır. Ayrıca C11'in üzerindeki moleküler oksijenin bağlanması için yeterli alan mevcuttur. 19 kadar protein rezidüsü substratla yakın temas kurduğundan, bunların büyük çoğunluğu van der Waals etkileşimlerini içerir. Altı aromatik amino asit ile çevrili substratın ω -ucu, Tyr385 ve Ser530 arasındaki boşluğu geçen aktif bölgenin tepesindeki dar bir kanala

bağlanır. Gly533'ün üst kanalında Val'e veya löisine (Leu) mutasyonu, kanalı kapatır ve AA'nın oksijenlenmesini tamamen inhibe eder, fakat daha kısa yağ asitlerininkini inhibe etmez (Rowlinson ve diğ., 1999). Kristal yapılarda gözlemlenen substratların üretken konformasyonu, 13-*pro(S)* hidrojeni, Tyr385'in (2.3 Å uzakta) fenolik oksijenine yakın konumlandırır. Bu nedenle, AA oksijenasyonunda ilk adım olan bu Tyr'nin radikal türevi ile soyutlanması için ideal bir konumda bulunur (Şekil 2.6) (Rowlinson ve diğ., 2000, Thuresson ve diğ., 2001, Shimokawa ve diğ., 1990).



Şekil 2.6: Siklooksigenaz reaksiyonu sırasında AA'nın PGG₂'ye dönüşümündeki kimyasal değişiklikler (Kurumbail ve diğ., 2001).

Tyr radikali, heme kofaktörünün bir ferril-okso türevi ile intramoleküler (molekül içi) oksidasyon yoluyla üretilir (Kulmacz, 1998, Chen ve diğ., 1999, Tsai ve diğ., 1999). Böylece AA'nın C13'ünde üretilen serbest radikal daha sonra bir pentadienil radikalini oluşturan C11'e göç eder (Peng ve diğ., 2001, Tsai ve diğ., 1998). Daha sonra moleküler oksijenin saldırısı, siklizasyon ve ikinci bir oksijen molekülünün eklenmesi ile, PG'nin oluşumu sonuçlanır. Tyr385 ile bir hidrojen bağı oluşturan Tyr348'e ait yan zincir, AA'nın C12-C14 ile çok sayıda

temasını sağlar. Tyr348 aynı zamanda, C13'ün hidrojen soyutlanması amacıyla doğru konumlandırılması için önemli görünmektedir. Bu da sahaya yönelik mutagenез çalışmalarıyla doğrulanmıştır (Thuresson ve diğ., 2001).

COX-1 ile komplekslenmiş DHLA'nın yapısı, AA kompleksinden çıkan bulguların birçoğunu doğrular (Thuresson ve diğ., 2001). Hem DHLA hem de AA'nın karboksilat grubu ve C11-C20 karbonları, COX aktif bölgesi içinde benzer pozisyonları alır (rmsd 0,45 Å). Bununla birlikte, iki substratın C2-C10'u çok farklı konformasyonlardadır (rmsd 1.1 Å). C5-C6'daki çift bağın bulunmamasından dolayı, DHLA'nın karboksilatının yarısı daha kompakt ve kıvrılmış bir yapıya sahiptir ve AA'ya kıyasla protein atomları (<4.0 Å) ile 12 ek etkileşime girmektedir.

Murin apo COX-2'nin daha önce bildirilen kristal yapısı, COX aktif bölgesinde bağlanmış bir substrat ve ürün karışımını göstermektedir (Kiefer ve diğ., 2000). Beklendiği gibi, PGH₂'nin karboksilatı, Arg120 ve Tyr355 yakınında konumlandırılmıştır. ω-ucu, COX-1 kompleksindeki AA'nın ω-terminalinin konumuna benzer şekilde üst kanala bağlanır. Köprülenmiş endoperoksit halkası, her biri COX-1 ve COX-2 arasında korunmuş olan triptofan (Trp387), Tyr385, fenilalanin (Phe381) ve Leu384'ün yan zincirleriyle sıkı van der Waals etkileşimlerini oluşturur. Trp387'nin indol yan zinciri, 11-peroksil radikalinin C9'unda siklizasyon için en uygun bir konformasyonda konumlandırılması amacıyla gerçekleşecek etkileşimin büyük kısmını sağlar. COX-2'nin Trp387Phe mutantı AA'yı neredeyse sadece PGH₂ yerine 11-HETE'ye oksijenlendirir (Kiefer ve diğ., 2000). Benzer şekilde, COX-1'de Val349 ve Leu534'ün mutasyonu, ürün oranını HETE'ler lehine değiştirir. Bu çalışmalar, bazı hidrofobik amino asitlerin endoperoksit sentezine yol açan AA'nın konformasyonunu dengelemesinde kritik rol oynadığı bilgisini doğrular niteliktedir. Doğal COX-1 ve COX-2 tarafından üretilen küçük miktarlarda monohidroksile edilmiş ürünlerin, O₂'nin aktif bölgedeki farklı biçimlerde radikal türevlerle reaksiyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Thuresson ve diğ., 2000). Aktif bir bölgedeki protein atomlarının karmaşık düzeni bile bir akiral substratı sınırlandırır ve kiral merkezde tam stereokimyaya sahip bir ürün verecek konformasyona neden olur (Hamberg ve Samuelsson, 1967).

2.3.3. Substratın İnhibitör Bağlanma Modu

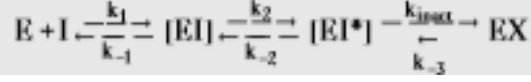
AA ve EPA ile birlikte COX-2 komplekslerinin yüksek çözünürlüklü kristal yapıları, aktif maddenin ve ek materyalinin içinde substratın beklenmedik bir şekilde bağlanma modunu

ortaya çıkarmaktadır (Kiefer ve diğ., 2000). Yapılan bir çalışmada, AA kompleksi, peroksidaz aktivitesinde eksik olan histidin-alanin (His207Ala) COX-2 varyantı ile elde edilmiştir ve EPA içeren kompleks için yabani tip Co^{3+} -heme- içeren COX-2 kullanılmıştır (Landino ve diğ., 1997). Her iki yapıda da, yağ asidi moleküllerinin karboksilat grupları, Tyr385 ve Ser530 ile hidrojen bağları oluşturarak COX aktif alanının tepe kısmına yakın bağlanır. Bu durum, mutagenез ve kimyasal etiketleme deneylerinden çıkarıldığı gibi bazı inhibitörler tarafından oluşturulan etkileşimlere benzer. Örneğin, COX-2'nin Tyr385Phe mutantı, aspirin ile etkin bir şekilde asetillenmez, bu olay, Tyr385'in fenolik oksijeninin, aspirin asetil grubunun pozisyonlanmasında önemli bir rol oynadığını ve Ser530 ile kimyasal reaktivitesini arttırdığını gösterir (Hochgesang ve diğ., 2000). Ayrıca, Mancini ve arkadaşları Ser530 COX-2'nin fenamat inhibitörleri, diklofenak ve meklofenamik asit ile etkileşimi için önemini göstermiştir (Mancini ve diğ., 1997). COX-2'nin COX aktif bölgesindeki bu yağ asitlerinin beklenmedik yönelimlerinde, Arg120'nin yan zinciri COX-1'de görülen karboksilat ile iyon çifti yerine, yağ asidinin ω -yarısı ile Van Der Waals etkileşimlerini oluşturur. Diğer mekanistik çalışmalara dayanarak, COX-2 aktif bölgesinde AA'nın gözlenen bu konformasyonunun kataliz için uygun olmadığı anlaşılmaktadır (Malkowski ve diğ., 2000, Shimokawa ve diğ., 1990, Thuresson ve diğ., 2001). Doğrudan ligand bağlama çalışmaları, AA'nın, AA için bilinen K_M 'sinden tahmin edilenden 10 ila 100 kat daha yüksek bir afinite (K_d) ile COX-2'ye bağlandığını göstermektedir (Kiefer ve diğ., 2000). Kristal yapıda gözlenen inhibitör substrat bağlanma modu bu farklılığı açıklamaktadır.

2.3.4. Siklooksigenaz İnhibisyon Mekanizması

Daha güvenli bir NSAID beklentisi ve yakından ilişkili aktif bölgeler arasında ayrım yapabilen bir bileşiğin geliştirilmesindeki zorluklar, ilaç endüstrisinde bir yarış oluşturmuştur. Bu durum aynı zamanda, COX inhibisyonu ve inhibitör seçiciliği mekanizmasının moleküler temelini anlamaya yönelik çalışmalara yol açmıştır.

Serbest enzim, inhibitör ve iki veya üç enzim-inhibitör kompleksi arasında çoklu dengelerin kurulduğu bir COX inhibisyonu için genel bir model ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.7) (Rome ve Lands, 1975, Walker ve diğ., 2001).



Şekil 2.7: COX inhibisyonu için çoklu dengelerin kurulduğu genel model (Kurumbail ve diğ., 2001).

Şekil 6’da k_1 , k_2 ve k_{inact} , genel reaksiyonun üç ayrı basamağı için ileri hız sabitlerini temsil ederken, k_{-1} ve k_{-2} ve k_{-3} , geri hız sabitlerini temsil eder. E ve I sırasıyla serbest enzimi ve inhibitörü temsil eder. Enzim kinetiği ile tanımlanan üç farklı enzim-inhibitör kompleksi, [EI], [EI*] ve [EX] ile temsil edilir.

En güçlü inhibitörler, çok kararlı kompleksler oluşturan yavaş, sıkı bağlanma inhibitörleridir. COX-1 ve COX-2’ye bağlı yavaş, sıkı bağlanma inhibitörlerinin (örneğin indometasin veya flurbiprofen) kristal yapılarının, en stabil kompleksleri yansıttığı varsayılmaktadır (Picot ve diğ., 1994, Kurumbail ve diğ., 1996, Loll ve diğ., 1996). Bununla birlikte, flurbiprofen ve metil flurbiprofen (rekabetçi inhibitörler), COX aktif bölgesinde benzer konformasyonlar sergiler ve bu komplekslerdeki proteinlerin yapıları neredeyse üst üste binebilir (Selinsky ve diğ., 2001). Bu nedenle, yavaş, sıkı bir bağlayıcı inhibitör veya rekabetçi bir inhibitör içeren COX-1 komplekslerinde yapısal farklılıklar görülmemektedir.

Yapılan çalışmalarda bazı diarilheterosiklik bileşiklerin COX-1’in rekabetçi inhibitörleri olduğu sanılsa da zamana bağımlı COX-2 inhibisyonu gösterdikleri anlaşılmıştır (Walker ve diğ., 2001, Copeland ve diğ., 1994, Gierse ve diğ., 1999). Flüoresans söndürme analizi, diariloksazol (SC-299)’un her iki enzime bağlandığını ve flüoresans bozunum kinetiğinin, karşılaştırılabilir oranlarda meydana gelen sıralı bimoleküler ve unimoleküler adımları ortaya çıkardığını göstermektedir (Lanzo ve diğ., 2000). Üçüncü bir unimoleküler adım sadece COX-2 ile gözlenir. Her iki enzime bağlanmadaki ilk iki adım kolayca geri dönüşümlüdür, oysa COX-2’ye bağlanmadaki üçüncü adım psödo (yalancı) geri dönüşsüzdür. Flüoresan olmayan önemli bir inhibitör olan flurbiprofen fazlalığının varlığında flüoresansın geri kazanılması, COX-2 ile üç saatlik bir süre alır, oysa COX-1 ile 40 saniye içinde tamamlanır. SC-299’un COX-2 seçiciliği, inhibitörün iki enzimle birleşme oranlarındaki küçük farklarla ilişkili değildir, ancak enzimden salınma oranlarındaki farklarla çok yakından ilişkilidir.

İndometasin ve diğer karboksilat içeren NSAID’ler, yağ asidi substratlarına benzer şekilde Arg120 ile bir iyon çifti oluşturur (Picot ve diğ., 1994, Kurumbail ve diğ., 1996, Malkowski ve

diğ., 2000, Loll ve diğ., 1996). Arg120'nin COX-1'deki bölgeye yönelik mutajenezi AA için K_M 'yi 600 kat artırırken, COX-2'deki aynı mutasyonun K_M üzerinde etkisi yoktur (Bhattacharyya ve diğ., 1996, Rieke ve diğ., 1999, Kozak ve diğ., 2001, Mancini ve diğ., 1995, Greig ve diğ., 1997). Bu farkın moleküler temeli açıklanmamıştır, ancak yapılan çalışmalar bazı seçici olmayan NSAID'lerin COX-2 seçici inhibitörlerine dönüştürülmesi için bir strateji önermiştir (Kalgutkar ve diğ., 2000). Nötr ester veya amid türevleri, COX-2'ye oldukça iyi bağlanır, ancak COX-1'e çok iyi bağlanmaz (Kozak ve diğ., 2001, Kozak ve diğ., 2000). Bu seçicilik en çok indometasin ve meklofenamik asit ile belirgindir. COX-2'ye bağlı zomepirakin bir asilsülfonamid konjugatı yapısı ile bu esterlerin ve amidlerin bağlanması için bir model oluşturulmuştur (Luong ve diğ., 1996). Oluşturulan modelde zomepirakin zincirlenmiş, nötr bir türevi olan bir bileşik, COX aktif bölgesinin tabanında Arg120, Tyr355 ve Glu524'ten oluşan daralmayı artırır ve üst kısma (lobiye) uzanır. Buna benzer şekilde, indometasin konjugatlarının ester ve amid fonksiyonları da lobiye yansıtılmaktadır.

COX aktif bölgesinin en ilgi çekici yönlerinden biri, PG'lerin biyosentezi için gereken kimyasal hassasiyet ile enzimlerin bir dizi substrat metabolize edilmesidir. COX enzimleri, stereospesifik olarak esnektir, bir akiral substratı beş kiral merkeze sahip bir ürüne dönüştürür. Bu reaksiyon normal koşullarda sentetik organik kimya ile in vitro olarak çoğaltılması zor olan bir reaksiyondur (James Corey, 1991). Aynı zamanda, enzimler ayrı olarak az miktarda üç monohidroksillenmiş ürün (HETE'ler) üretir. Bu durum, substratın aynı aktif alan içerisinde iki veya üç üretken konformasyon kazanması olasılığını artırır (Thuresson ve diğ., 2000). Ek olarak, AA, COX-2 yağ asidi komplekslerinin yapısı ile gösterildiği gibi bir inhibitör konformasyonuna da bağlanabilir (Kiefer ve diğ., 2000). Ayrıca, COX aktif bölgesi, aktif olarak kullanılan NSAID'lerden anlaşılacağı gibi, çeşitli kimyasal serilerden çok çeşitli bileşikleri barındırabilir.

Membran proteinleri, deneysel biyokimya ve yapısal biyoloji çalışmaları açısından oldukça karmaşıktır. COX hakkındaki bazı çalışmalar sonucunda, enzimin ikili işlevselliği, iki aktif bölgenin yakın eşleşmesi, substrat tarafından inaktive edilmesi ve serbest radikal kimyasıyla daha da karmaşık hale gelmiştir (Kurumbail ve diğ., 2001). Buna rağmen, son yıllarda substrat kataliz ve inhibisyon mekanizmalarının anlaşılmasında çok ilerleme kaydedilmiştir. Protein kristalografisi, bölgeye yönelik mutajenez, spektroskopik ve kinetikten elde edilen son sonuçlar, bu iki enzimin daha yapışık yani bağlı bir resmini çizmeye başlamıştır. Son yapısal ve

fonksiyonel çalışmalar, AA oksijenasyonunun regiokimyası, stereokimyasını ve inhibitörlerin bağlanmasını anlamada kilit amino asitlerin oynadığı roller hakkında güçlü bilgiler sağlamıştır. Ek olarak, yapısal biyoloji, yeni substratların tanımlanmasında ve seçici inhibitörlerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamıştır (Kurumbail ve diğ., 2001).

Son zamanlarda yağ asidi substratları ile kompleks haline getirilmiş koyun seminal vezikülündeki COX-1'in iki ilave kristal yapısı aydınlatılmıştır (Malkowski ve diğ., 2001). Linoleik asit kompleksinin kristal yapısı, daha önce AA ve DHLA komplekslerinin aydınlatılmış yapılarıyla tutarlıdır. Buna karşılık, EPA kompleksi, COX-1'in COX aktif bölgesi içindeki yağ asidi molekülünün gergin bir konformasyonunu ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, substrat, Tyr385 katalitik rezidüsüne göre yanlış hizalanmıştır. Schneider ve arkadaşları, Ser530'un COX enzimlerinin, PG sentezi sırasında C-15 hidroksil grubunun doğru S stereokimyasını sürdürmedeki rolünü tanımlamışlardır (Schneider ve diğ., 2002). Ser530'un COX-2'deki metiyonin (Met), treonin (Thr) veya Val'e mutasyonu baskın olarak 15-R PG'lerin oluşmasına neden olmaktadır. Val349, C-15'teki doğru stereokimya için daha düşük bir ölçüde olmasına rağmen, önemli görünmektedir. Jorgensen ve arkadaşları tarafından yapılan moleküler modelleme çalışmaları, selekoksib ve ilgili diarilheterosiklik inhibitörlerin COX-2 seçiciliği için yapısal temel konusunda önemli fikirler vermektedir (Plount Price ve Jorgensen, 2000, Price ve Jorgensen, 2001). Bu araştırmacılar Monte Carlo simülasyonlarıyla birlikte karmaşık serbest enerji pertürbasyon metotlarını kullanmışlardır. Bu çalışmalar, selekoksibin COX-2 seçiciliğinin kilit katkısının, 523. pozisyonda Val yerine geçen Ile olduğunu göstermektedir.

2.4. *Ammi majus* (AM)

AM bitkisinden metanol ekstresi alındığında ekstrenin furanokumarinler ve flavonoidlerce zengin olduğu görülmüştür (Elgamal ve diğ., 1993). AM % 1 amorf glukozit, % 0,45 tanen, % 4,76 oleoresin, % 3,2 asidik yağ, % 12,92 sabit yağ, % 13,83 protein ve % 22,4 selüloz içermektedir. Bununla birlikte, AM'nin ana bileşenleri, ksantoksin (metoksialen, 8-metoksipsoralen, ammoidin,% 1.15'e kadar), imperatorin (ammidin,% 0.75'e kadar) ve bergapten (heraklin, majudin, 5-metoksipsoralen, % 1.88'e kadar), % 0.25 marmesin, % 0.01 izoimperatorin, % 0.07 heraklenin ve % 0.01 izopimpinellin içeren furanokumarinlerdir (Majus ve diğ., 2017). İzole edilen kumarinlerin yüksek derecede anti enflamatuar etkinliği saptanmıştır (Selim ve Ouf, 2012). Bu etki, AM'nin geleneksel tıptaki tıbbi kullanımını açıklar

niteliktedir. Sentezlenen bileşiklerin anti enflamatuar aktivitesi, sıçan pençesi ödemi metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 0.01 mg/100 g doz seviyesinde % 87'ye varan ödem inhibisyonu gözlemlenmiştir (Selim ve Ouf, 2012).

2.5. *Ammi visnaga* (AV)

Yapılan birçok çalışmada AV bitkisinin çeşitli kısımlarında visnagin isimli bir furanokumarin tespit edilmiştir. Visnagin, TNF- α , IL-1 β ve IFN γ gibi pro-enflamatuar sitokinlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Araştırmanın sonuçlarına göre bu sitokinlerin ekspresyonları 100 μ M visnagin konsantrasyonunda önemli ölçüde inhibe edilmiştir. Aynı çalışmada visnagin antienflamatuar etkisini doğrulamak için, visnagin diğer enflamatuar ilişkili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. COX-2 mRNA'sı ve protein seviyeleri üzerine bir etkisinin olmadığı görülmüştür. IL-10 antienflamatuar sitokin ekspresyonunu önemli ölçüde arttırmıştır. Bu sonuçlar birlikte ele alındığında, visnagin proenflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu azaltabileceğini ve antienflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu indükleyebileceğini göstermektedir (Cells ve diğ., 2010).

2.6. *Anethum graveolens* (AG)

Kazemi (2015)'nin yaptığı çalışmada AG'nin GC/MS analizi, bitkinin toplam yağının % 68,18'ini oluşturan 16 bileşik ortaya koymuştur. Bunların başında timol (% 20.07), ardından limonen (% 16.31), α -pinen (% 8.65) ve karvakrol (% 8.34) gelmektedir (Kazemi, 2015). Farklı bir çalışmada furanokumarinlerin ve polifenollerin de varlığı saptanmıştır (Al-snafi, 2017). Bitkiden elde edilen bu ekstrenin antienflamatuar etkinliği nitrik oksiti inhibe etme potansiyeline göre değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre AG'nin antienflamatuar maddeler bakımından zengin bir içerikte olduğu sonucuna varılmıştır (Kazemi, 2015). AG tohumlarının hidro alkolik ekstresi, farelerde enflamasyon ve ağrıda önemli bir azalmaya neden olmuştur. Sıçanların pençe hacminde diklofenak ile karşılaştırıldığında daha fazla azalma göstermiştir (Naseri ve diğ., 2012). AG meyvelerinin etanol ekstraktının, farelerin kulağının iç ve dış yüzeyine tek bir topikal uygulaması, kulak iltihabını % 60 oranında inhibe etmiştir (Matsuda ve diğ., 1998). Bir başka çalışmada da AG ekstresinin Tip-2 diyabette enflamatuar biyomarker'larını önemli ölçüde düşürdüğü gözlemlenmiştir (Payahoo ve diğ., 2014).

2.7. *Angelica sylvestris* (AS)

A. acutiloba, *A. dahurica*, *A. koreana*, *A. pubescens*, *A. sinensis* gibi birçok *Angelica* türü analjezik ve antienflamatuar aktiviteye sahiptir. UBF, skopoletin, falkarinol, falkarindiol, falkarinolon, kolin ve vanillik asit gibi bileşikler bu cinsin çeşitli bölgelerinden izole edilmiştir. *Angelica pubescens*'in çeşitli ekstreleri analjezik ve antienflamatuar aktivite açısından test edilmiş ve metanol, kloroform ve etil asetat ekstraktlarının % 3 formalin veya % 1,5 karragenan tarafından indüklenen enflamasyon kaynaklı ödemi azalttığı gözlenmiştir (Chen ve diğ., 1995). Başka bir çalışmada, *A. pubescens*, COX-1 ve 5-LOX üzerinde inhibitör etki göstermiştir (Liu ve diğ., 2008). *A. dahurica*'nın, insan pulmoner epitel hücre hattında (A549) interlökin-1 beta ile indüklenen COX-2 ekspresyonunu ve PGE₂ salınımını konsantrasyona bağlı olarak inhibe ettiği bulunmuştur.

2.8. *Apium graveolens* (APG)

APG'nin tohum ve yapraklarından elde edilen ekstraktlarında fenoller, flavonoidler ve furokumarinler gibi çeşitli kumarinlerin varlığı saptanmıştır. APG, fare kulağı testinde ve karragenan kaynaklı sıçan pençesi ödemeine karşı antienflamatuar etkiler göstermiştir, bu nedenle APG, araştırmacılar tarafından artrit ve sırt ağrısında önerilmiştir. Çeşitli çalışmalarda bu bitkinin ekstraktı makrofajlarda nitrik oksit üretimi üzerindeki inhibitör etkileri için de test edilmiştir. Elde edilen verilere göre nitrik oksit üretimini azaltarak enflamasyonu baskılamıştır (Zhu ve diğ., 2017).

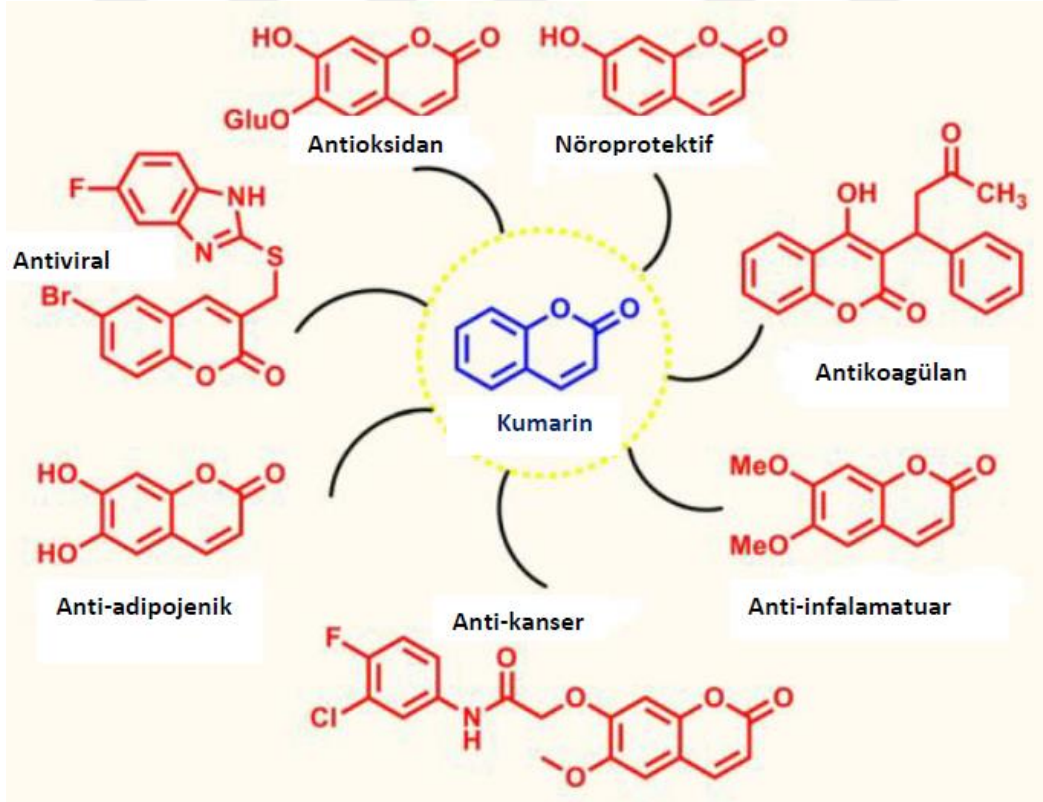
2.9. *Petroselinum crispum* (PC)

Flavonoidler bu bitkinin baskın bileşikleridir (Papay ve diğ., 2012). Psoralen, izopimpinellin, 8-metoksipsoralen, 5-metoksipsoralen ve imperatorin, PC'nin yaprağından ve kökünden izole edilen furokumarinlerdir (Chaudhary ve diğ., 1986). Yapılan bir çalışmada PC ekstraktı 3 saat uygulamadan sonra sıçan pençelerindeki ödem oluşumunu önemli ölçüde inhibe etmiştir (Rafatullah, 2003). Ayrıca, ekstraktın sıçanlarda granülom oluşumunu önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Küçük kan damarlarının çoğalması ve aynı zamanda fibroblastların çoğalması, iltihabın onarım aşamasındaki karakteristik özellikleridir. Bu proliferatif hücreler, granülasyon dokusu olarak bilinen oldukça vaskülerize bir kızarıklık kütle oluşturur. PC ekstresi, iltihaplanma sürecinin proliferatif fazındaki aktivitesini ortaya koyan pellet granülomunu etkili bir şekilde azaltmıştır (Rafatullah, 2003).

2.10. KUMARİNLER

Kumarin (2H1-benzopiran-2-on), 1820'de "coumarou" adı verilen tonka fasulyesinden izole edilen heterosiklik bir bileşiktir. Kumarinler ayrıca, bir benzen halkasının bir piron halkası ile bağlandığı benzopiron bileşikler ailesini oluşturan, birçok bitki türünde doğal olarak oluşan fitokimyasallardır (Ojala, 2001). Benzopiron, kumarin ana sınıfı olan benzo- α -pironlara ve büyük ölçüde flavonoidlerden oluşan benzo- γ -pironlara bölünmüştür. Benzen ve α -pironun bu füzyonu, π - π konjugasyonuna ve özellikle tıbbi ilaçlar olarak kullanımına olanak sağlar.

Kumarin terapötik etkinliğiyle araştırma ve geliştirme çalışmalarının hedefi haline gelmiştir (Kontogiorgis ve diğ., 2012, Bairagi ve diğ., 2014). Kumarin, antienflamatuar (Huang ve diğ., 2012), antioksidan (Basile ve diğ., 2009), anti-adipogenik (Shin ve diğ., 2010), antikanser (Liu ve diğ., 2012, Luo ve diğ., 2011, Wang ve diğ., 2015, Jamier ve diğ., 2014), antiviral (Sancho ve diğ., 2004), antikoagülan (Hirsh ve diğ., 2001) ve nöroprotektif (Wang ve diğ., 2012) özellikler dahil olmak üzere önemli biyolojik aktivitelerin bir miselini gösteren önemli bir kondanse heterosiklikler sınıfını temsil eder (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Kumarin türevlerinin terapötik uygulamaları (Jameel ve diğ., 2016).

Bu bileşiklerin çok iyi derecedeki biyolojik etkileri kumarinik çekirdek yapısıyla ilişkilidir. Kumarinler ayrıca, yanıklar, brusella, kardiyovasküler ve romatizmal hastalıklarda da faydalıdır (Murray ve diğ., 1982). Bunlara ek olarak, ilaçlar (Kampranis ve diğ., 1999, Kock ve diğ., 2005), DNA hedefleme ajanları (Whittaker ve diğ., 1998) ve boyalar (Hara ve diğ., 2005) gibi farklı yönlerde geniş uygulamalara sahiptirler.

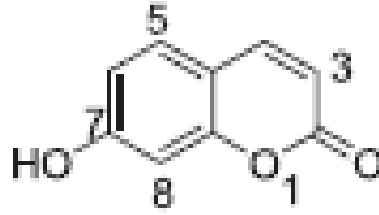
Kumarin bitkiler aleminde bulunan büyük bir bileşik sınıfıdır. Kolayca ve tamamen metabolize edilir (Lake, 1999). Polar olmayan kumarin, lipit çift katmanlarını pasif difüzyon ile kolayca geçebilir (Cooke, 1998). Günümüzde kumarinin bir ilaç öncülü olduğu ve 7-hidroksikumarin (7-OHC)'in yaygın adıyla bilinen umbelliferonun (UBF) birincil terapötik aday olduğu bilim insanları tarafından desteklenmektedir. Sitokrom P-450 bağlantılı mono-oksigenaz (CYP2A6), 7-OHC'yi oluşturacak şekilde karaciğer mikrozomlarındaki kumarin metabolizmasını başlatır. C-3, 4, 5, 6, 7 ve 8 pozisyonlarında da hidroksilasyon mümkün olsa da, 7-hidroksilasyon insanlarda ana metabolik yoldur (Lake, 1999, Sproll ve diğ., 2008). Bu aktif kumarin formu daha sonra glukuronid konjuge ürünü oluşturur. 7-hidroksilaz aktivitesinin, diğer hayvanların karaciğerlerinin aktivitesine karşı analiz edildiği gibi insan karaciğer mikrozomlarında oldukça yüksek olduğu ve oluşumunun insanlarda ana metabolik yol için önemli olduğu bulunmuştur. Bu durumun tersine, kumarin 3-hidroksilaz aktivitesinin, kemirgen mikrozomlarında çok yüksek olduğu, fakat insan mikrozomlarında bulunmadığı ortaya konmuştur. CYP ekspresyonu bireyler arasında büyük ölçüde değişiklik gösterir ve kumarin bazlı ilaçların farklı derecede metabolizasyonu sonuçlanır (Itsaine, 2001). Çeşitli inhibitörlerin in vitro ve in vivo olarak CYP2A6 ile metabolize edildiği bilinmektedir (Pelkonen ve diğ., 2000).

2.10. 1. 7-hidroksikumarin (Umbelliferon)

Umbelliferon, bitkilerde yaygın şekilde bulunan ve doğada benzopiron olarak var olan bir kumarindir. Umbelliferae (Apiaceae) familyası, *Sanicula*, *Smyrnum olusatrum*, *Angelica*, *Ferula assa-foetida*, *Apium graveolens*, *Cuminum cyminum*, *Foeniculum vulgare*, *Petroselinum sativum* ve dev domuz otu gibi ekonomik açıdan önemli bitkileri içerir. Öte yandan UBF adı, umbelliferae bitki familyasından türetilmiştir. Ayrıca şemsiye şeklindeki salkımlarından dolayı bu isim verilmiştir (Kataranovski ve diğ., 2003, Mazimba, 2017). Apiacea için ana özellik, şemsiye benzeri bir çiçeklenme olan umbels bileşiği içinde toplanan çiçeklenmedir.

Bitkiden türetilen fenolik kumarinlerin meyve ve sebzelerde insan beslenmesinde tüketilmeleri nedeniyle diyet antioksidanları olarak rol oynadığı düşünülürken, UBF'nin ayrıca antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir ve güneşten koruyucu ajan olarak ve tekstilde optik parlaticı göreviyle kullanılır (Hoult ve Paya, 1996, Lino ve diğ., 1997).

UBF, farmakolojik olarak aktif bir ajan olan 7-OHC'dir. Kumarin bileşiğinin 7 numaralı karbonuna bir hidroksil grubunun bağlanmasıyla oluşur (Şekil 2.9) (Mazimba, 2017).

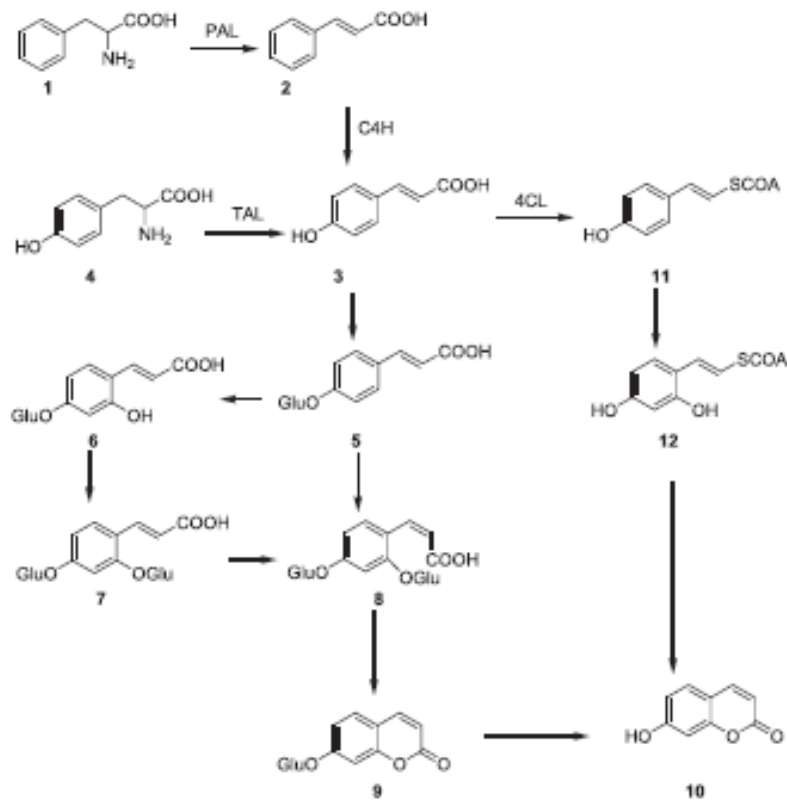


Şekil 2.9: UBF'nin kimyasal yapısı.

Yapısal basitliğinden dolayı, 7-OHC genel olarak daha karmaşık kumarinler için ana bileşik olarak kabul edilmiştir ve daha geniş bir yelpazedeki kumarin-heterosikliklerin sentezi için yaygın şekilde kullanılmaktadır (Mazimba, 2017, Lee ve diğ., 2006).

UBF sarımsı beyaz kristaller şeklindedir, sıcak suda hafifçe çözünür, ancak etanolde iyi çözünürlüğe sahiptir (Vasconcelos ve diğ., 2009).

Kumarinlerin ve UBF'nin sentezi için fenilpropanoid biyosentetik yolağı literatürde tartışılmıştır. UBF kumarin biyosentezindeki kilit adımlar, sinamik asit sentezi veya para ve orto hidroksilasyonları, çift bağın trans-cis izomerizasyonu ve son olarak laktonizasyondur (Şekil 2.10) (Mazimba, 2017).



Şekil 2.10: UBF'nin biyosentezi.

Sinamik asit 2, fenilalanin amonyak liyaz (PAL) etkisiyle fenilalanin 1'den türetilirken, para-hidroksi sinamik asit (para-kumarik asit) 3, tirozin amino liyaz (TAL) kullanılarak tirozin 4'den türetilir. *p*-Kumarik asit 3 ayrıca bir P540 bağımlı enzim olan, 4-sinamik asit hidroksilaz (C4H) kullanılarak doğrudan sinamik asitten de türetilir. Bu süreçte para-hidroksilasyon, orto-hidroksilasyonun ön şartıdır (Austin ve Meyers, 1965, Brown ve diğ., 1960, Brown, 1962, Kindl, 1971).

Yapılan bir çalışmada UBF, hidrojen peroksitin indüklenme faktörünün % 68.99 ve 4-nitrokinilin oksidin % 59.71 oranında azaltılmasıyla gösterilen antigenotoksik aktivite sergilemiştir (Mazimba, 2017). Ayrıca iyi bir COX-2 (% 95.7) ve COX-1 (% 56.91) inhibisyonu sergilemektedir (Kaur ve diğ., 2012). *D. takeshima* kökü metil alkol ekstraktından izole edilen bu kumarin, kısmen eikosanoidlerin üretilmesi inhibisyonu yoluyla meydana gelen antienflamatuar aktiviteye işaret eden COX-2/5-LOX ikili inhibitör aktivitesini göstermiştir (Kim ve diğ., 2006). 7-HOC ile muamele edilmiş sPLA₂'nin spektroskopi verileri, enzimin

katalitik bölgesindeki alfa heliks sarmalının sekonder yapısında modifikasyonlara sebep olarak, enzimin inhibe olduğunu göstermiştir (Toyama ve diğ., 2009). *T. domingensis*'ten izole edilen UBF, astımlı farelerdeki bronkoalveoler lavaj sıvılarında gözeneklilik ve eozinofil sayısında belirgin bir azalmaya neden olmuştur. Bu kumarin, farelerde ovalbümin uygulaması ile indüklenen bir alerjik hava yolu enflamasyon modelinde mukus üretimini ve akciğer iltihabını azaltmıştır (Vasconcelos ve diğ., 2009). Ayrıca yapılan çalışmalarda UBF'nin anti bakteriyel, anti fungal, antioksidan ve anti kanser özellikleri saptanmıştır (Mazimba, 2017). Araştırmacılar tarafından UBF'nin gelecekte hepatoksisite tedavisinde uygun bir aday olacağı da düşünülmektedir.

2.11. ENZİM İNHİBİSYONU

Enzimlerin aktivitelerinin belirli bileşikler yoluyla azaltılması ya da tamamen durdurulması olayına inhibisyon denir. Bu durumu sağlayan maddelere inhibitör adı verilir. İnhibitörler genel olarak küçük boyutludurlar. Enzim aktivitesinin inhibisyonu ile hücrede meydana gelen kimyasal olaylar kontrol edilebilir duruma gelir. Enzimatik inhibisyon dönüşümlü ve dönüşümsüz inhibisyon olmak üzere 2 ana grupta incelenebilir (Korkmaz ve diğ., 2012).

2.11.1. Dönüşümsüz inhibisyon

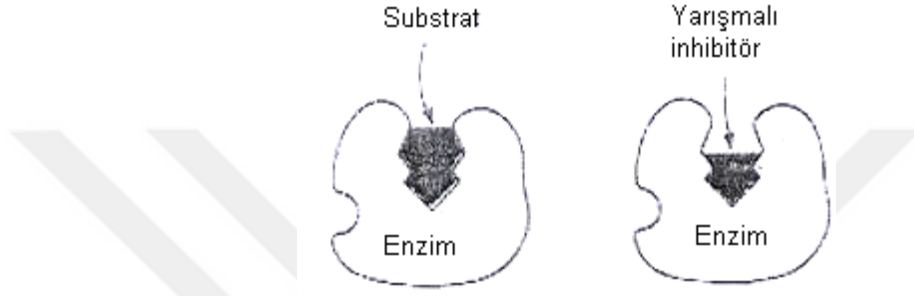
Dönüşümsüz inhibisyon sürecinde inhibitör madde, enzime tekrar ayrılması olanaksız olacak şekilde bir kovalent bağ ile bağlanır ya da ayrışması çok zor olan bir kompleks oluşturur. Asetil kolin esteraaz enzimi sinir uyarılarının iletilmesinde görev alır, bu enzimin sinir gazı ile inhibisyonu dönüşümsüz inhibisyona örnek gösterilebilir. Sinir gazlarından olan diizopropilfluorofosfat, enzimin aktif bölgesinde bulunan Ser aminoasidi ile tepkimeye katılarak, inaktif bir kompleks oluşturur (Korkmaz ve diğ., 2012).

2.11.2. Dönüşümlü inhibisyon

Bu inhibisyon tipinde enzim ve inhibitörün etkileşmesi bir denge halindedir. Dönüşümlü inhibisyon üç gruba ayrılır.

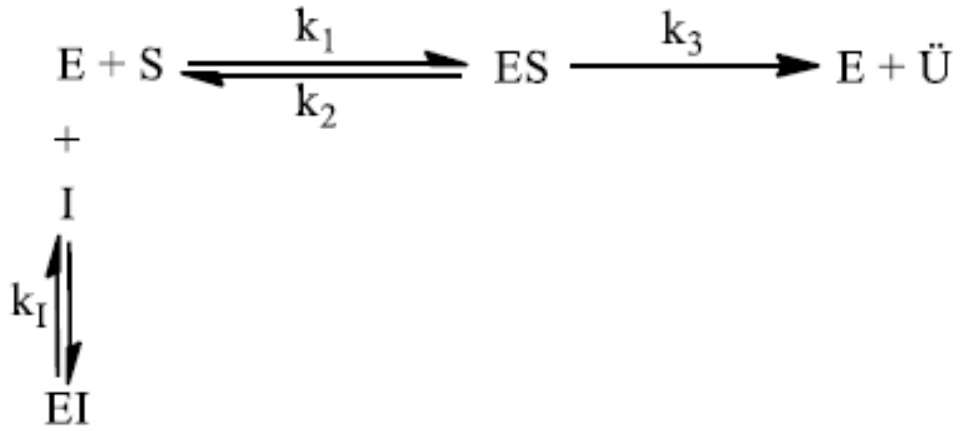
2.11.2.1. Kompetitif (Yarışmalı) İnhibisyon

Yarışmalı inhibitör yapı olarak normal şartlarda enzime bağlanacak olan substrata çok benzemektedir ve enzimin tam olarak aktif bölgesine bağlanır (Şekil 2.11) (Korkmaz ve diğ.,2012).



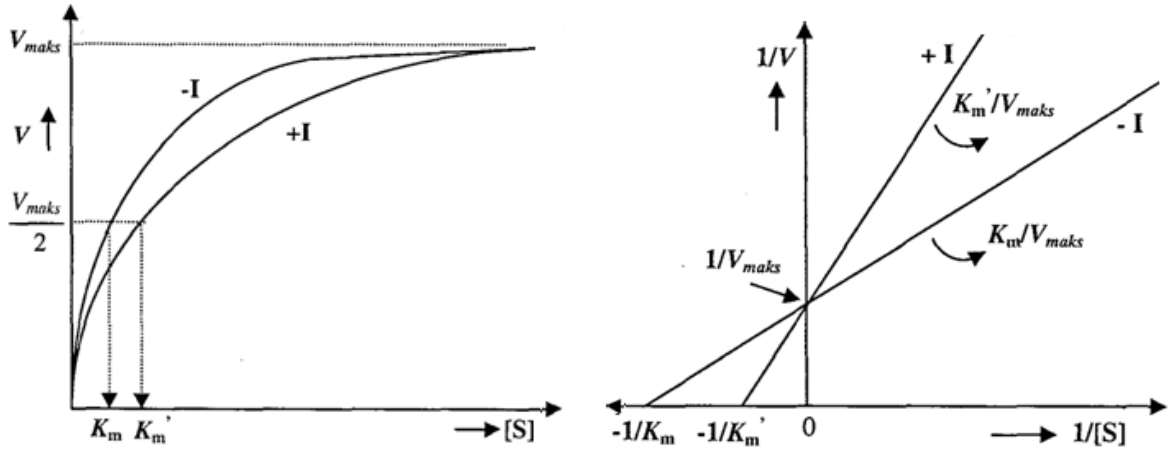
Şekil 2.11: Enzimin ve yarışmalı inhibitörün enzime bağlanış şekilleri.

Bu durumda substratın enzime bağlanması inhibitör tarafından engellenmiş olur. İnhibisyon etkisinin ortadan kaldırılması için substrat konsantrasyonunu arttırmak gerekmektedir. Dolayısıyla enzimin V_{max} değerinde bir değişim söz konusu olmaz. Bunun sebebi enzim-substrat (ES) ve enzim-inhibitör (EI) komplekslerinin birer denge tepkimesi olmasıdır ve substrat miktarı artarsa dengenin enzim-substrat kompleksi tarafına kayması mümkün olur (Şekil 2.12).



Şekil 2.12: Enzim-substrat ve enzim-inhibitör komplekslerinin denge reaksiyonu. E: Enzim, S: Substrat, ES: Enzim-substrat kompleksi, EI: Enzim-inhibitör kompleksi, Ü: Ürün, k: Denge sabiti (Korkmaz ve diğ., 2012)

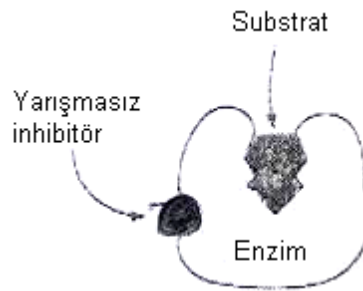
Yarışmalı inhibitör ES kompleksi miktarını oransal olarak düşürür. Bunun sonucunda katalizin hızı azalır, dolayısıyla enzimin K_m değeri artış göstermiş olur. Değişik substrat ve inhibitör konsantrasyonlarında yapılmış durumda olan enzimli reaksiyon hızlarının ölçümlerinden aşağıdaki grafikler elde edilir (Şekil 2.13) (Korkmaz ve diğ., 2012).



Şekil 2.13: Yarışmalı bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Micheales-Menten ve Lineweaver-Burk grafiği; V_{maks} sabit durumdayken K_m artış gösterir.

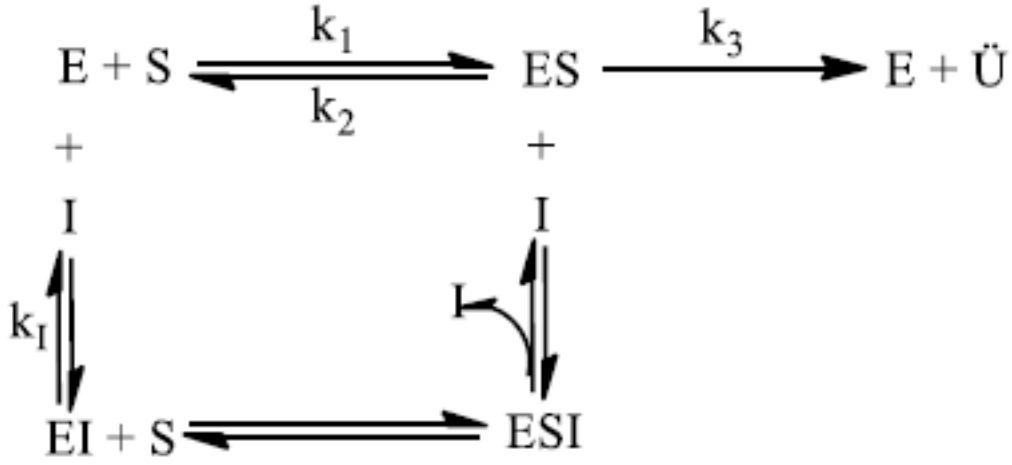
2.11.2.2. Nonkompetitif (Yarışmasız) inhibisyon

Bazı durumlarda inhibitör ve substrat enzime aynı zamanda bağlanmış durumda olabilmektedir. Yani inhibitör ve substrat enzimin farklı yerlerine bağlanır. Bu durumda inhibitörün enzimin aktif bölgesi haricinde bir yere bağlandığı sonucuna varılır (Şekil 2.14) (Korkmaz ve diğ., 2012).



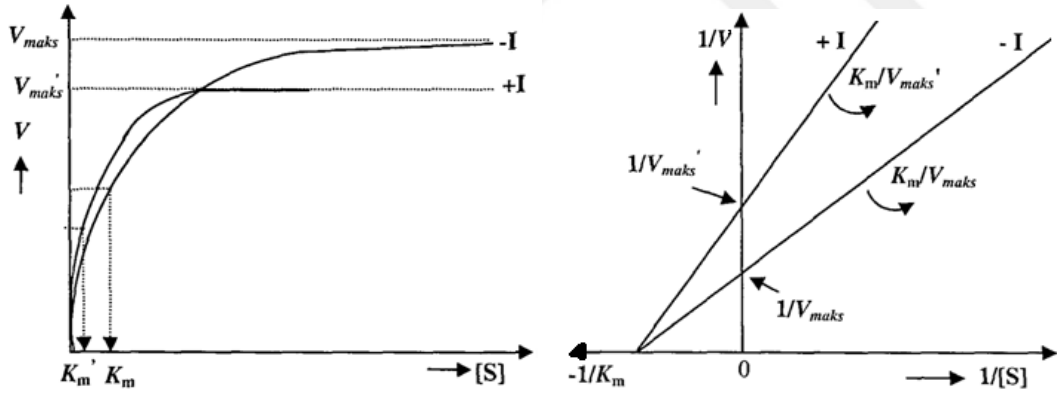
Şekil 2.14: Nonkompetitif inhibisyonunda substrat ve inhibitörün enzimin farklı yerlerine bağlanışları.

Bu inhibisyon tipinde substrat miktarını arttırmak inhibisyonu etkilemez. Yarışmasız inhibisyonundaki denge reaksiyonları aşağıda görülmektedir (Şekil 2.15) (Korkmaz ve diğ., 2012).



Şekil 2.15: Yarışmasız inhibisyondaki ES ve EI denge reaksiyonları

Bu inhibisyon mekanizmasındaki Micheales-Menten ve Lineweaver–Burk eğrisi de Şekil 2.16’de gösterilmiştir (Korkmaz ve diğ., 2012).



Şekil 2.16: Yarışmasız bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Micheales- Menten ve Lineweaver–Burk eğrisi; $V_{\max}$ azalırken K_m aynı kalır. Substrat ve inhibitör enzimin farklı bölgelerine bağlanır. Bu yüzden iki çeşit inaktif kompleks oluşur (EI ve ESI).

2.11.2.3. Semi-kompetitif (Yarı Yarışmalı) İnhibisyon

Semi-kompetitif inhibisyon mekanizmasında inhibitör enzim yerine ES’ye bağlanmış durumdadır (Şekil 2.17) (Korkmaz ve diğ., 2012).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada VELP SCIENTIFICA SER 148 Solvent Extractor, BUCHI R-210 Rotavapor, Eppendorf 2-20 µl mikropipet, hassas terazi, ELISA Reader, 10004883 katalog numaralı Cayman Chemical sPLA₂ (Type V) Inhibitor Screening Assay Kit, 702000 katalog numaralı Cayman Chemical COX-2 (ovine) Inhibitor Screening Assay Kit kullanılmıştır.

3.1. BİTKİ EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI

Ammi majus kök ve tohum (AM_k, AM_t), *Angelica sylvestris* çiçek ve yaprak (AS_ç, AS_y), *Ammi visnaga* tohum (AV_t), *Anethum graveolens* yaprak ve çiçek+tohum (AG_y, AG_{ç+t}), *Petroselinum crispum* yaprak (PC_y) ve *Apium graveolens* yaprak (APG_y) olmak üzere çalışmada kullanılan bitkilerin çeşitli kısımları hassas terazide tartıldı. Kullanılan bitkiler İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Biyoorganik Kimya Laboratuvarının koleksiyonundan temin edildi. Bitkiler kurutulmuş durumdaydı.

Tartılan bitki kısımlarının her biri solvent ekstraktör cihazının kartuşlarına yerleştirildi ve üzerlerine 70 ml metanol ilave edildi. Metanolün kaynama sıcaklığına uygun olarak ekstraktör 45 dakika boyunca çalıştırıldı.

Elde edilen çözeltilerdeki fazlalık solvent (metanol) evaporatörde uzaklaştırıldı. Sonuç olarak AG 15 ml diğer bitkiler 10'ar ml olacak şekilde ekstrateler elde edilmiş oldu.

Elde edilen bu bitki ekstrateleri enzim inhibisyonu aşamasında inhibitör olarak kullanıldı.

3.2. ENZİM İNHİBİSYONU

Elde edilen bitki ekstratelerinin sPLA₂ enzimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için Cayman Chemical 10004883 katalog nolu sPLA₂ (Tip V) İnhibitör Tarama Test Kiti, COX-2 enzimi üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi için de Cayman Chemical 702000 katalog nolu COX-2 (koyun) İnhibitör Tarama Test Kiti kullanıldı.

3.2.1. sPLA₂ İnhibitör Tarama Test Kiti

3.2.1.1. Ön Hazırlıklar

Kit bileşenlerinden bazıları liyofilize veya konsantre formdadır ve kullanımdan önce sulandırılması veya seyreltilmesi gerekmektedir.

Reaktif Hazırlama:

Deney Tamponu (10X):

2 ml deney tamponu konsantresi 27 ml distile su ile seyrelti. Bu son deney tamponu [10 mM CaCl₂, 100 mM KCl ve 0.3 mM Triton X-100 içeren 25 mM Tris-hidroklorik asit (HCl), pH 7.5], substratın yeniden oluşturulması ve suda çözünür inhibitörlerin seyreltilmesi için kullanıldı.

DTNB [Ellman's reaktifi (5,5-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit)]:

Bir flakonun içeriği 1.0 ml distile su ile 0.4 M Tris-HCl, pH 8.0 içerisinde 10 mM DTNB verecek şekilde sulandırıldı.

Diheptanoil Tiyo-PC (Substrat):

Diheptanoil Tiyo-PC'nin etanolik çözeltisi buharlaştırıldı. 1.66 mM'lik bir konsantrasyon elde etmek için her bir flakonun içeriği 12 ml seyreltilmiş deney tamponu ile sulandırıldı. Substrat solüsyonu temizlenene kadar vortekslendi.

İnsan (Tip V) sPLA₂:

20 µl enzim 980 µl seyreltilmiş deney tamponu ile seyreltilti.

3.2.1.2. Deney Protokolü

Plate'in Dizaynı:

Öncelikle %100 başlangıç aktivitesi olarak belirlenmiş iki kuyucuk, pozitif kontrol inhibitör kuyucuğu olarak belirlenmiş iki kuyucuk ve arka plan kuyucukları olarak belirlenmiş iki

kuyucuk oluşturuldu. Üçlü olarak ölçülecek tipik bir numune ve inhibitör düzeni Şekil 3.1'de verilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BW	BW	BW	6	6	6	14	14	14	22	22	22
B	A	A	A	7	7	7	15	15	15	23	23	23
C	P	P	P	8	8	8	16	16	16	24	24	24
D	1	1	1	9	9	9	17	17	17	25	25	25
E	2	2	2	10	10	10	18	18	18	26	26	26
F	3	3	3	11	11	11	19	19	19	27	27	27
G	4	4	4	12	12	12	20	20	20	28	28	28
H	5	5	5	13	13	13	21	21	21	29	29	29

Şekil 3.1: Numune ve inhibitör plate düzeni. BW: Arka plan kuyucukları, A: %100 başlangıç aktivitesi kuyucukları, P: Pozitif kontrol inhibitör kuyucukları, 1-29: Test bileşiği kuyucukları

Testin gerçekleştirilmesi:

% 100 başlangıç aktivitesi kuyucukları: 10 μ l sPLA₂ ve 10 μ l solvent (çözücü) (inhibitörü çözmek için kullanılan aynı solvent) üç kuyucuğa eklendi.

Pozitif kontrol inhibitör kuyucukları: Üç kuyucuğa 10 μ l sPLA₂ ve 10 μ l Tiyoeteramid-PC eklendi. Pozitif kontrol kuyucuklarındaki Tiyoeteramid-PC'nin son konsantrasyonu 100 μ M'dir.

İnhibitör kuyucukları: Üç kuyucuğa 10 μ l sPLA₂ ve 10 μ l inhibitör eklendi.

Arka plan kuyucukları: 10 μ l deney tamponu ve 10 μ l solvent (inhibitörü çözmek için kullanılan aynı solvent) üç kuyucuğa eklendi.

Kullanılan tüm kuyucuklara 200 μ l substrat solusyonu eklendi. Daha sonra reaksiyonu başlatmak için tüm kuyucuklara 10 μ l DTNB eklendi. Sonrasında karıştırmak için plaka dikkatlice 10 saniye çalkalandı ve plaka kapağıyla örtüldü. 25 ° C'de 15 dakika inkübe edildi.

ELISA Reader'da 410 nm dalga boyunda absorbans okundu.

3.2.1.3. Analiz

Hesaplamalar:

Her numunenin ortalama absorbansı belirlendi.

Arka plan kuyucuklarının absorbansı % 100 başlangıç aktivitesinin ve inhibitör kuyucuklarının absorbansından çıkarıldı.

Her numune için inhibisyon yüzdesi belirlendi. Bunu yapmak için, her inhibitör örnek değeri % 100 başlangıç aktivite örnek değerinden çıkarıldı. Sonuç % 100 başlangıç aktivite değerine bölündü ve ardından yüzde inhibisyonu vermek için 100 ile çarpıldı.

IC₅₀ değerini (% 50 inhibisyonun olduğu konsantrasyon) belirlemek için inhibitör konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak inhibisyon yüzdesi grafiği çizildi.

3.2.2. COX-2 İnhibitör Tarama Test Kiti

3.2.2.1. COX-2 Reaksiyon Prosedürü

COX-2 Reaktif Hazırlama:

Reaksiyon tamponu (10X): 5 ml reaksiyon tamponu konsantresi 45 ml ultra saf suyla seyreltildi. Bu son reaksiyon tamponu (5 mM EDTA ve 2 mM fenol içeren, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0), COX reaksiyonlarında ve Heme'nin seyreltilmesi için kullanıldı.

COX-2 (koyun): Her vial, bir COX-2 çözeltisi içermektedir. 80 µl enzim, 320 µl seyreltilmiş reaksiyon tamponuyla seyreltildi ve buzda saklandı.

Heme: Bu vial, dimetilsülfoksit (DMSO) içinde bir Heme çözeltisi içerir. Kullanımdan önce 40 µl Heme 960 µl 1X reaksiyon tamponuyla seyreltildi.

AA (Substrat): Bu vial etanol içerisinde AA çözeltisi içermektedir. Substrattan 50 µl başka bir viala aktarıldı, 50 µl potasyum hidroksit (KOH) eklendi, vortekslendi ve 2 mM'lik bir son konsantrasyon elde etmek için 400 µl ultra saf su ile seyreltildi. Hazırlanan substratın 10 µl'lik bir kısmı, reaksiyonda 100 µM'lik bir son konsantrasyon vermektedir.

Kalay Klorür (SnCl_2): Bu şişe kristal kalay klorür içerir. Şişeye 5 ml 1 M hidroklorik asit ilave edildi ve doymuş bir SnCl_2 çözeltisi üretmek için vortekslendi.

COX Reaksiyonlarının Gerçekleştirilmesi:

Arka plan tüpleri: 500 µl mikrofuge tüpe 20 µl seyreltilmiş COX-2 aktarıldı ve tüp üç dakika kaynar suda bekletildi. İki reaktif tüpüne 160 µl 1X reaksiyon tamponu, 10 µl Heme ve 10 µl aktif olmayan COX-2 şeklinde reaktifler eklendi.

COX-2 %100 Başlangıç Aktivite Tüpleri: iki reaksiyon tüpüne 160 µl 1X reaksiyon tamponu, 10 µl Heme ve 10 µL COX-2 eklendi.

COX-2 İnhibitör Tüpleri: 160 µl 1X reaksiyon tamponu, 10 µl Heme ve 10 µl COX-2 altı reaksiyon tüpüne eklendi.

% 100 başlangıç aktivite, arka plan ve COX-2 inhibitör tüplerine 10 µl inhibitör eklendi.

Tüpler 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi.

Tüm reaksiyon tüplerine 10 µl AA ekleyerek reaksiyon başlatıldı. Hızlıca karıştırıldı ve 37 °C'de 2 dakika boyunca inkübe edildi.

Enzim katalizini durdurmak için her reaksiyon tüpüne 30 µl doymuş SnCl_2 çözeltisi eklendi. Tüpler su banyosundan çıkartıldı ve vortekslendi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.

3.2.2.2. ELISA Prosedürü

ELISA Tamponu Hazırlanması:

ELISA Tamponu: Bir vial ELISA tampon konsantresi (10X) içeriği 90 ml ultra saf su ile seyreltildi.

Yıkama tamponu: Yıkama tamponu konsantresi vialinin (400X) içeriği ultra saf su ile toplam 2 litre hacme kadar seyreltildi ve 1 ml Polisorbata 20 eklendi.

Deneye Spesifik Reaktiflerin Hazırlanması:

PG Tarama Standardı: Liyofilize PG tarama ELISA standardını 1 ml ELISA tamponunda çözüldü. Bu çözeltinin konsantrasyonu (toplu standart) 10 ng/ml olmuştur.

ELISA'da kullanılacak standardı hazırlamak için 8 temiz test tüpü 1 ile 8 arasında numaralandırıldı. 800 µl ELISA tamponu tüp 1'e ve 500 µl ELISA tamponu 2-8 tüplerine alikotlandı (porsiyonlandı). Toplu standardın 200 µl'si (10 ng/ml) tüp 1'e aktarıldı ve iyice karıştırıldı. Tüp 1'den 500 µl alarak ve tüp 2'ye aktarıldı ve standart seri olarak seyreltildi ardından iyice karıştırıldı. Sonra, tüp 2'den 500 µl alındı ve tüp 3'e yerleştirildi, iyice karıştırıldı. 4-8 numaralı tüpler için bu işlemi tekrarlandı.

Prostaglandin Tarama AChE Tracer: 100 dtn PG tarama AChE tracer 6 ml ELISA tampon ile sulandırıldı.

Prostaglandin Tarama ELISA Antiserumu: 100 dtn PG tarama ELISA antiserumu 6 ml ELISA tamponuyla sulandırıldı.

COX-2 Reaksiyon Dilüsyonları:

Arka Plan Örnekleri: BC etiketli temiz bir test tüpüne 990 µl ELISA tamponu eklendi. BC etiketli tüpe 10 µl arka plan COX-2 eklendi ve iyice karıştırıldı.

COX-2 % 100 Başlangıç Aktivite Örnekleri: Örnek başına üç temiz test tüpü IA1'den IA3'e kadar numaralandırıldı. IA1 tüpüne 990 µl ELISA tampon alikotu, 10 µl COX-2 % 100 başlangıç aktivite numunesi eklendi ve iyice karıştırıldı. Tüp IA2'ye 950 µl ELISA tamponu alikotu konuldu ve 50 µl tüp IA1'den alınarak IA2'ye eklendi ve iyice karıştırıldı. Tüp IA3'e 500 µl ELISA tamponu alikotu konuldu ve tüp IA2'den tüp IA3'e 500 µl eklendi ve iyice karıştırıldı.

COX-2 İnhibitör Örnekleri: Örnek başına üç temiz test tüpü C1 ile C3 olarak numaralandırıldı. 990 µl ELISA tamponu alikotu tüp C1'e konuldu, 10 µl örnek eklendi ve iyice karıştırıldı. Tüp C2'ye 950 µl ELISA tampon alikotu konuldu ve 50 µl tüp C1'den alınarak tüp C2'ye eklendi ve iyice karıştırıldı. Tüp C3'e 500 µl ELISA tamponu alikotu konuldu ve 500 µl tüp C2'den tüp C3'e eklendi ve iyice karıştırıldı.

Plate'in Dizaynı:

Her plaka, en az iki kör (Blk), iki spesifik olmayan bağlanma kuyucuğu (NSB), iki maksimum bağlanma kuyucuğu (B₀), bir toplam aktivite kuyucuğu (TA) ve duplike (çift) olarak sekiz nokta standart eğri kuyucuğu içermelidir. Önerilen bir plate formatı, Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	BC	BC	H	H	H	H	H	H	H
B	Blk	S2	S2	‡	‡	H	H	H	H	H	H	H
C	NSB	S3	S3	‡	‡	H	H	H	H	H	H	H
D	NSB	S4	S4	H	H	H	H	H	H	H	H	H
E	B ₀	S5	S5	H	H	H	H	H	H	H	H	H
F	B ₀	S6	S6	H	H	H	H	H	H	H	H	H
G	B ₀	S7	S7	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	TA	S8	S8	H	H	H	H	H	H	H	H	H

Şekil 3.2: Örnek ve inhibitör plate düzeni. Blk: Kör (Boşluk) kuyucukları, TA: Total aktivite kuyucuğu, NSB: Spesifik olmayan bağlanma kuyucukları, B₀: Maksimum bağlanma kuyucukları, S1-S8: Standart kuyucukları, BC: Arka plan COX-2 kuyucukları, ‡: % 100 Başlangıç aktivitesi örnekleri (IA2 ve IA3), H: COX-2 inhibitör örnekleri (C2 ve C3).

ELISA'nın Gerçekleştirilmesi:

Reaktiflerin Eklenmesi:

ELISA Tamponu: NSB kuyucuklarına 100 µl, B₀ kuyucuklarına 50 µl ELISA tamponu eklendi.

PG Tarama ELISA Standardı: En düşük standart kuyucuklarının (S8) ikisine de 8 numaralı tüpten 50 µl eklendi. Sonraki iki standart kuyucuğun (S7) her birine tüp 7'den 50 µl eklendi. Tüm standartlar eşitleninceye kadar bu işleme devam edildi.

Arka Plan Örnekleri (Test Tüpü BC): Kuyucuk başına 50 µl örnek eklendi. Her örnek iki kopya halinde test edildi.

COX-2 % 100 Başlangıç Aktivite Örnekleri (IA2 ve IA3 Test Tüpleri): Kuyucuk başına 50 µl örnek eklendi. Her numune iki dilüsyonda test edildi.

COX-2 İnhibitör Örnekleri (C2 ve C3 test tüpleri): Kuyucuk başına 50 µl örnek eklendi. Her örnek iki dilüsyonda test edildi.

PG Tarama AChE İzleyici: TA ve Blk kuyucukları hariç her kuyucuğa 50 µl PG tarama AChE tracer eklendi.

PG Tarama ELISA Antiserum: TA, NSB ve Blk kuyucukları hariç her kuyucuğa 50 µl PG tarama ELISA antiserumu eklendi.

Plate'in inkübasyonu:

Her plate plastik film ile örtüldü ve orbital bir karıştırıcıda oda sıcaklığında 18 saat inkübe edildi.

Plate'in Gelişimi:

Plate gelişimi hazır olduğunda, 100 ml'lik bir Ellman's reaktifi viali 20 ml ultra saf su ile sulandırıldı.

Kuyucuklar boşaltıldı ve yıkama tamponu ile beş kez durulandı.

Her kuyucuğa 200 µl Ellman's reaktifi eklendi.

TA kuyucuklarına 5 µl tracer eklendi.

Plate plastik film ile örtüldü. Plate'in karanlıkta oluşmasını sağlamak için geniş, düz bir örtü ile donatılmış orbital bir çalkalayıcı kullanılarak optimum gelişme elde edildi. Bu deneme 75 dakika sürdü.

Plate'in Okunması:

Plate 410 nm dalga boyunda ELISA Reader'da okundu.

3.2.2.3. Analiz

Veriler, 4 parametrelili bir lojistik veya log-logit eğrisi kullanılarak logaritma (log) konsantrasyonuna karşı % B/B₀ olarak çizildi.

Hesaplamalar:

Datanın Hazırlanması:

NSB kuyucuklarındaki absorbands okumalarının ortalaması alındı.

B₀ kuyucuklarındaki absorbands okumalarının ortalaması alındı.

NSB ortalaması B₀ ortalamasından çıkartıldı.

Kalan kuyucuklar için % B/B₀ hesaplandı. Bunu yapmak için, ortalama NSB absorbandsı S1 absorbandsından çıkartıldı ve düzeltilmiş B₀ ile bölündü.

% B/B₀ elde etmek için 100 ile çarpıldı. S2-S8 ve tüm örnek kuyucukları için tekrarlandı.

Standart Eğri Çizme:

Lineer (y) ve log (x) eksenlerini kullanarak PG konsantrasyonuna karşı S1-S8 standartları için % B/B₀ çizildi ve 4 parametrelili lojistik uyum gerçekleştirildi.

Örnek Konsantrasyonunu Belirleme:

Her örnek için % B/B₀ değeri hesaplandı.

Standart egridde % B/B₀ değerini belirleyerek ve x eksenindeki karşılık gelen değerleri okuyarak her bir numunenin konsantrasyonunu belirlendi. COX-2 örnekleri uygun dilüsyon faktörüyle çarpıldı (BC = 100; IA2 ve C2 = 2000; IA3 ve C3 = 4000).

Arka plan değerleri (BC) % 100 başlangıç aktivite ve COX-2 inhibitör örneklerinden çıkarıldı.

Her inhibitör numunesi % 100 başlangıç aktivite numunesinden çıkartıldı, daha sonra % 100 başlangıç aktivite numunesine bölündü ve yüzde inhibisyonu vermek için 100 ile çarpıldı.

IC₅₀ değerini (% 50 inhibisyonun olduğu konsantrasyon) belirlemek için inhibitör konsantrasyonuyla inhibisyon yüzdesi grafik olarak çizildi.



4. BULGULAR

Kurutulmuş bitkilerin tartım sonuçları aşağıdaki gibidir:

10.15 g AM_k

13.096 g AM_t

7.47 g AS_ç

3.47 g AS_y

25.702 g AV_t

9.139 g AG_y

9.752 g AG_{ç+tt}

6.323 g PC_y

2.52 g APG_y

Elde edilen bitki ekstraktlarının (inhibitörlerin) sPLA₂ enzimi üzerindeki inhibisyon etkisinin belirlenebilmesi için yöntem kısmında da açıklandığı üzere kit protokolü esas alınarak aşağıdaki gibi plate dizaynı yapıldı.

ELISA Reader'da okunan absorbans değerleri aşağıdaki gibi elde edildi.

Tablo 4.1: sPLA₂ inhibitör taraması için ELISA Reader’da okunan absorbans değerleri.

	1	2	3	4
A	0.114	0.1136	1.063 (AM _k)	1.065 (AM _k)
B	1.102	1.199	2.658 (AG _y)	2.685 (AG _y)
C	0.2	0.24	2.715 (PC _y)	2.736 (PC _y)
D	2.91 (AM _t)	2.935 (AM _t)	2.134 (APG _y)	2.169 (APG _y)
E	1.3354 (AS _ç)	1.352 (AS _ç)		
F	2.834 (AV _t)	2.854 (AV _t)		
G	2.559 (AG _{ç+t})	2.581 (AG _{ç+t})		
H	2.34 (AS _y)	2.581 (AS _y)		

Daha sonra her duplike kuyucuğun ortalaması alındı:

$$BW_{ort} = 0.1275$$

$$A_{ort} = 1.181$$

$$P_{ort} = 0.22$$

$$AM_{t\,ort} = 2.9275$$

$$AS_{\zeta \text{ ort}} = 1.2555$$

$$AV_{t \text{ ort}} = 2.846$$

$$AG_{\zeta+t \text{ ort}} = 2.5715$$

$$AS_{y \text{ ort}} = 2.35$$

$$AM_{k \text{ ort}} = 1.024$$

$$AG_{y \text{ ort}} = 2.6785$$

$$PC_{y \text{ ort}} = 2.728$$

$$APG_{y \text{ ort}} = 2.1585$$

BW_{ort} değeri A_{ort} değerinden ve $1-9_{\text{ort}}$ değerlerinden çıkarıldı:

$$A_{\text{ort}} - BW_{\text{ort}} = 1.0535$$

$$AM_{t \text{ ort}} - BW_{\text{ort}} = 2.8$$

$$AS_{\zeta \text{ ort}} - BW_{\text{ort}} = 1.128$$

$$AV_{t \text{ ort}} - BW_{\text{ort}} = 2.7185$$

$$AG_{\zeta+t \text{ ort}} - BW_{\text{ort}} = 2.444$$

$$AS_{y \text{ ort}} - BW_{\text{ort}} = 2.2225$$

$$AM_{k \text{ ort}} - BW_{\text{ort}} = 0.8965$$

$$AG_{y \text{ ort}} - BW_{\text{ort}} = 2.551$$

$$PC_{y \text{ ort}} - BW_{\text{ort}} = 2.6005$$

$$APG_{y \text{ ort}} - BW_{\text{ort}} = 2.031$$

Her numunenin inhibisyon yüzdesinin belirlenmesi için her inhibitör örnek değeri % 100 başlangıç aktivite örnek değerinden çıkarıldı. Sonuç % 100 başlangıç aktivite değerine bölündü ve ardından yüzde inhibisyonu vermek için 100 ile çarpıldı:

$$AM_t: 1.0535 - 2.8 / 1.0535 \times 100 = -165.7807$$

$$AS_ç: 1.0535 - 1.128 / 1.0535 \times 100 = -7.0717$$

$$AV_t: 1.0535 - 2.7185 / 1.0535 \times 100 = -158.0446$$

$$AG_{ç+t}: 1.0535 - 2.444 / 1.0535 \times 100 = -131.9886$$

$$AS_y: 1.0535 - 2.2225 / 1.0535 \times 100 = -110.9635$$

$$AM_k: 1.0535 - 0.8965 / 1.0535 \times 100 = 14.9027$$

$$AG_y: 1.0535 - 2.551 / 1.0535 \times 100 = -142.1452$$

$$PC_y: 1.0535 - 2.6005 / 1.0535 \times 100 = -146.8439$$

$$APG_y: 1.0535 - 2.031 / 1.0535 \times 100 = -92.786$$

Yapılan hesaplamalar ile oluşturulan sonuçlara göre AM_k ekstresi dışındaki örneklerden negatif sonuçlar elde edildi dolayısıyla bu örneklerin enzim üzerinde inhibisyon etkisinin olmadığı sonucuna varıldı. AM_k ekstresinin $sPLA_2$ enzimi üzerinde % 14.9027 oranında inhibisyon etkisi olduğu görüldü.

Bu nedenle diğer ölçümlere AM_k ekstresi üzerinden devam edildi. 10 ml'lik AM_k ekstresi çözücüsü otomatik evaporatörde uzaklaştırılarak sırasıyla 8, 6, 4 ve 2 ml'ye kadar derişiklendirildi.

8 ml'lik konsantreden alınan örnek ile plate tekrar hazırlandı. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki gibidir.

Tablo 4.2: sPLA₂ inhibitör taraması için ELISA Reader’da okunan ikinci absorbans değerleri.

	1	2	3	4
A	0.113	0.1135		
B	1.106	1.193		
C	0.22	0.25		
D				
E			0.835	0.854
F				
G				
H				

Her kuyucuğun ortalaması alındı:

$$BW_{ort} = 0.1133$$

$$A_{ort} = 1.1495$$

$$P_{ort} = 0.235$$

$$AM_{k\ ort} = 0.8445$$

BW_{ort} değeri A_{ort} değerinden ve P_{ort} değerinden çıkarıldı:

$$A_{ort} - BW_{ort} = 1.0362$$

$$AM_{k\ ort} - BW_{ort} = 0.7312$$

İnhibitör örnek değeri % 100 başlangıç aktivite örnek değerinden çıkarıldı. Sonuç % 100 başlangıç aktivite değerine bölündü ve ardından yüzde inhibisyonu vermek için 100 ile çarpıldı:

$$1.0362 - 0.7312 / 1.0362 \times 100 = 29.4345$$

Yapılan hesaplardan 8 ml'lik AM_k ekstresinin enzim üzerinde % 29.4345 oranında bir inhibisyon oluşturduğu görülmüştür.

6 ml'lik konsantreden alınan örnek ile plate tekrar hazırlandı. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki gibidir.

Tablo 4.3: sPLA₂ inhibitör taraması için ELISA Reader'da okunan üçüncü absorbans değerleri.

	1	2	3	4
A	0.114	0.1132		
B	1.103	1.195		
C	0.23	0.25		
D				
E				
F			0.8001	0.8008
G				
H				

Her kuyucuğun ortalaması alındı:

$$BW_{ort} = 0.1136$$

$$A_{ort} = 1.149$$

$$P_{ort} = 0.24$$

$$AM_{k\ ort} = 0.8005$$

BW_{ort} değeri A_{ort} değerinden ve 6_{ort} değerinden çıkarıldı:

$$A_{ort} - BW_{ort} = 1.0354$$

$$AM_{k\ ort} - BW_{ort} = 0.6869$$

İnhibitör örnek değeri % 100 başlangıç aktivite örnek değerinden çıkarıldı. Sonuç % 100 başlangıç aktivite değerine bölündü ve ardından yüzde inhibisyonu vermek için 100 ile çarpıldı:

$$1.0354 - 0.6869 / 1.0354 \times 100 = 33.6585$$

Yapılan hesaplamadan 6 ml'lik AM_k ekstresinin enzim üzerinde % 33.6585 oranında bir inhibisyon oluşturduğu görülmüştür.

4 ml'lik konsantreden alınan örnek ile plate tekrar hazırlandı. Elde edilen absorbens değerleri aşağıdaki gibidir.

Tablo 4.4: sPLA₂ inhibitör taraması için ELISA Reader’da okunan dördüncü absorbands değerleri.

	1	2	3	4
A	0.110	0.1125		
B	1.101	1.165		
C	0.25	0.23		
D				
E				
F				
G			0.661	0.663
H				

Her kuyucuğun ortalaması alındı:

$$BW_{ort} = 0.1113$$

$$A_{ort} = 1.133$$

$$P_{ort} = 0.24$$

$$AM_{k\ ort} = 0.662$$

BW_{ort} değeri A_{ort} değerinden ve P_{ort} değerinden çıkarıldı:

$$A_{ort} - BW_{ort} = 1.0217$$

$$AM_{k\ ort} - BW_{ort} = 0.5507$$

İnhibitör örnek değeri % 100 başlangıç aktivite örnek değerinden çıkarıldı. Sonuç % 100 başlangıç aktivite değerine bölündü ve ardından yüzde inhibisyonu vermek için 100 ile çarpıldı:

$$1.0217 - 0.5507 / 1.0217 \times 100 = 40.0996$$

Yapılan hesaplardan 4 ml’lik AM_k ekstresinin enzim üzerinde % 40.0996 oranında bir inhibisyon oluşturduğu görülmüştür.

2 ml’lik konsantreden alınan örnek ile plate tekrar hazırlandı. Elde edilen absorbands değerleri aşağıdaki gibidir.

Tablo 4.5: sPLA₂ inhibitör taraması için ELISA Reader’da okunan beşinci absorbans değerleri.

	1	2	3	4
A	0.117	0.1164		
B	1.105	1.126		
C	0.2	0.23		
D				
E				
F				
G				
H			0.2684	0.2692

Her kuyucuğun ortalaması alındı:

$$BW_{ort} = 0.1167$$

$$A_{ort} = 1.1155$$

$$P_{ort} = 0.215$$

$$AM_{k\ ort} = 0.2688$$

BW_{ort} değeri A_{ort} değerinden ve 6_{ort} değerinden çıkarıldı:

$$A_{ort} - BW_{ort} = 0.9988$$

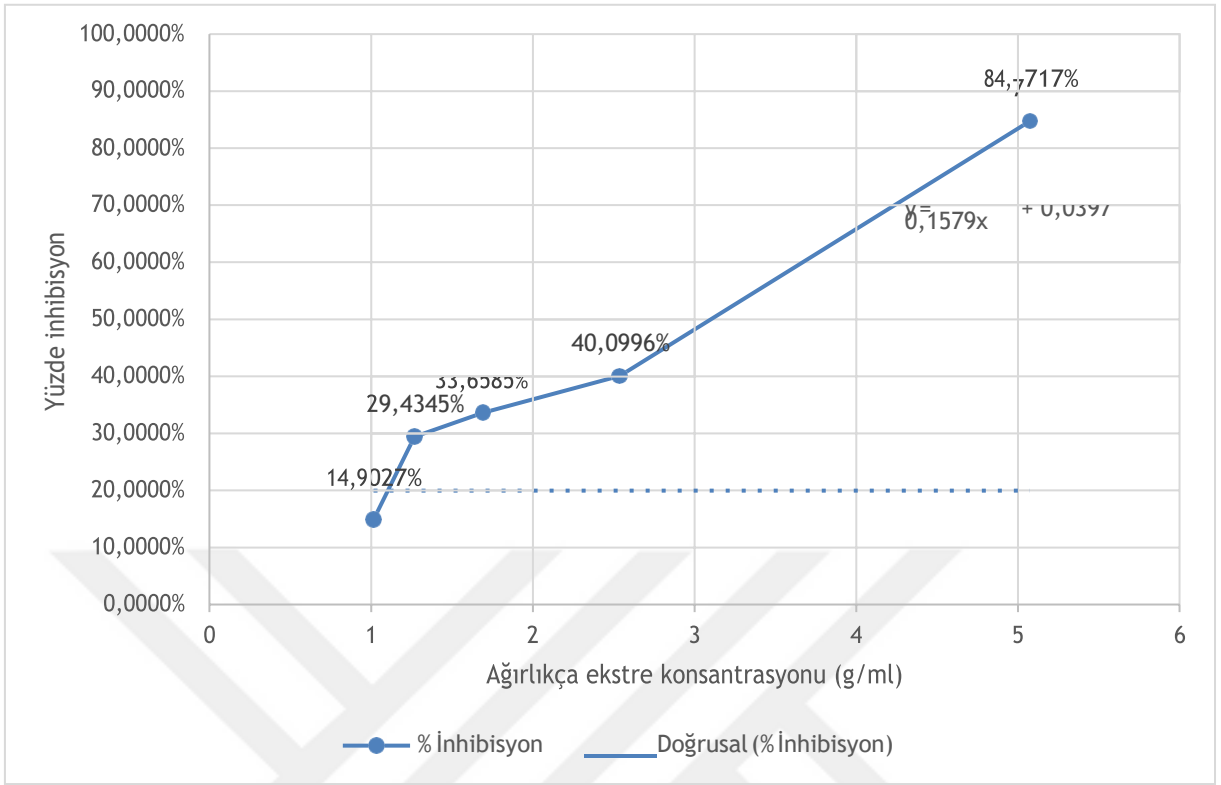
$$AM_{k\ ort} - BW_{ort} = 0.1521$$

İnhibitör örnek değeri % 100 başlangıç aktivite örnek değerinden çıkarıldı. Sonuç % 100 başlangıç aktivite değerine bölündü ve ardından yüzde inhibisyonu vermek için 100 ile çarpıldı:

$$0.9988 - 0.1521 / 0.9988 \times 100 = 84.7717$$

Yapılan hesaplardan 2 ml’lik AM_k ekstresinin enzim üzerinde % 84.7717 oranında bir inhibisyon oluşturduğu görülmüştür.

Elde edilen inhibisyon yüzdelerine karşı örnek konsantrasyonu değerleri aşağıdaki gibi bir grafiğe aktarıldı.



Şekil 4.1: AM_k konsantrasyonuna bağlı sPLA₂ inhibisyon yüzdesi.

Grafikten $y = 0.1579x + 0.0397$ şeklinde bir denklem elde edildi. Bu denklemde y yerine 0.5 konulduğunda hesaplanan x değeri % 50 inhibisyonun gerçekleştiği konsantrasyondur.

$$0.5 = 0.1579x + 0.0397$$

$$x = 2.9151$$

Örneğin % 50 inhibisyon gerçekleştirdiği değer yani IC₅₀ değeri 2.9151 g/ml olarak hesaplandı.

Tüm örnek konsantrasyonlarındaki inhibisyon değerleri bir arada Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildiğinde p değeri 0.041 olarak belirlendi. Bu p değeri 0.05'ten küçük olduğu için elde edilen inhibisyon değerleri istatistiksel olarak anlamlıdır.

Elde edilen bitki ekstratlarının (inhibitörlerin) COX-2 enzimi üzerindeki inhibisyon etkisinin belirlenebilmesi için yöntem kısmında da açıklandığı üzere kit protokolü esas alınarak aşağıdaki gibi plate dizaynı yapıldı.

ELISA Reader’da okunan absorbands değ erleri aşağıdaki gibi elde edildi.

Tablo 4.6: COX-2 inhibitör taraması için ELISA Reader’da okunan absorbands değ erleri.

	1	2	3	4	5	6	7
A	0.028	0.189	0.203	0.155	0.128	0.652 (AM _k)	0.6515 (AM _k)
B	0.028	0.126	0.128	0.1405	0.164	0.7385 (AG _y)	0.772 (AG _y)
C	0.2405	0.247	0.174	0.16	0.119		
D	0.316	0.214	0.2685	0.829 (AM _t)	1.089 (AM _t)	1.2175 (AM _t)	0.9405 (AM _t)
E	1.525	0.212	0.2625	1.08 (AS _�)	1.058 (AS _�)	1.2215 (AS _�)	1.058 (AS _�)
F	1.1545	0.184	0.1835	0.9105 (AV _t)	0.95 (AV _t)	1.022 (AV _t)	1.1505 (AV _t)
G	1.199	0.1155	0.1745	0.8205 (AG _{�+t})	0.8005 (AG _{�+t})	1.021 (AG _{�+t})	0.8635 (AG _{�+t})
H	1.9475	0.1275	0.1465	0.1905 (AS _y)	0.228 (AS _y)	0.295 (AS _y)	0.249 (AS _y)

NSB kuyucuklarındaki absorbands okumalarının ortalaması alındı:

$$NSB_{ort} = 0.2783$$

B₀ kuyucuklarındaki absorbands okumalarının ortalaması alındı:

$$B_{0ort} = 1.3398$$

NSB ortalaması B_0 ortalamasından çıkartıldı:

$$1.3398 - 0.2783 = 1.0615$$

Kalan kuyucuklar için % B/B₀ hesaplandı. Bunu yapmak için, ortalama NSB absorbansı ilgili tüm kuyucukların absorbansından çıkartıldı ve düzeltilmiş B_0 ile bölündü ardından 100 ile çarpıldı.

$$S_1: 0.196 (S_{1ort}) - 0.2783 / 1.0615 \times 100 = -7.7532$$

$$S_2: 0.127 (S_{2ort}) - 0.2783 / 1.0615 \times 100 = -14.2534$$

$$S_3: 0.2105 (S_{3ort}) - 0.2783 / 1.0615 \times 100 = -6.3872$$

$$S_4: 0.2413 (S_{4ort}) - 0.2783 / 1.0615 \times 100 = -3.4856$$

$$S_5: 0.2373 (S_{5ort}) - 0.2783 / 1.0615 \times 100 = -3.8672$$

$$S_6: 0.1838 (S_{6ort}) - 0.2783 / 1.0615 \times 100 = -8.9025$$

$$S_7: 0.145 (S_{7ort}) - 0.2783 / 1.0615 \times 100 = -6.665$$

$$S_8: 0.137 (S_{8ort}) - 0.2783 / 1.0615 \times 100 = -13.3114$$

Hesaplamalardan elde edilen sonuçlara göre standart kuyucuklarındaki % B/B₀ değerleri negatif olarak belirlendi. Bu sebeple standart eğrisi çizilemedi ve örneklerin COX-2 enzimi üzerindeki inhibisyon etkinliği belirlenemedi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akut şekilde oluşan enflamatuvar yanıtın aktivasyonu, mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar gibi organizmaya yönelik tehditleri ortadan kaldırmak için temel bir savunma mekanizmasıdır. Enflamasyonun başlaması, enfeksiyonun veya doku hasarının ardından, proenflamatuvarları aktive eden proenflamatuvar sitokinler gibi mediatörlerin senteziyle başlar (Ala ve diğ., 2003). Nötrofiller gibi granülositler fagositoz işlevini yerine getirerek doku hasarından sonra oluşan doku kalıntıları veya mikroorganizmaları ortadan kaldırır (Kolaczowska ve Kubes, 2013). Bununla birlikte kontrolsüz iltihaplanma, romatoid artrit de dahil olmak üzere çok sayıda kronik hastalığın seyrinde önemli rol oynamaktadır (Dinauer, 1993, Morgenstern ve diğ., 1997). Enflamasyon olayında en önemli metabolik süreç AA yolğıdır. Bu yolakta öncelikle sPLA2 enziminin aktivasyonu ile gliserofosfolipitlerden AA oluşur. Daha sonra oluşan bu ürün COX-2 enziminin substratı olur ve COX-2 aktivasyonu neticesinde lökotrienler, PG'ler ve tromboksanlar gibi eikosanoidler üretilir (Dennis ve diğ., 2011). Bu nedenle, sPLA2 ve COX-2, enflamasyonu baskılamak için üretilmeye çalışılan ilaçların temel hedefleridir (Radmark ve diğ., 2015, Steinhilber ve Hofmann, 2014). AA yolğında bu iki enzim korele şekilde çalıştığından her iki enzimi de inhibe eden inhibitörler büyük avantaja sahiptir (Quach ve diğ., 2014, Yedgar, 2000, Joshi ve diğ., 2016).

Kumarin terapötik etkinliğı nedeniyle ilaç çalışmalarının hedefi haline gelmiştir (Kontokiorgis ve diğ., 2012, Bairagi ve diğ., 2014). Benzen ve α -pironun bu füzyonu, özellikle tıbbi ilaçlar olarak kullanımına olanak sağlar. Kumarinin, antienflamatuvar (Huang ve diğ., 2012), antioksidan (Basile ve diğ., 2009), antikanser (Liu ve diğ., 2012, Luo ve diğ., 2011) ve daha bir çok biyoaktif özelliğı çeşitli araştırmalarda gözlemlenmiştir. Bitkiler aleminin büyük bir kısmında bulunmaktadır. UBF, kumarin bileşğinin 7. pozisyonundaki karbonuna bir hidroksil grubunun bağlanmasıyla meydana gelir ve farmakolojik olarak aktiftir (Mazimba, 2017). Umbelliferae familyasında yer alan bitkilerde bulunur ve ismini de buradan almıştır. Yapılan çalışmalarda iyi bir COX-2 (% 95.7) inhibisyonu gösterdiği ortaya konmuştur (Kaur ve diğ., 2012). Ayrıca bir çalışmada 7- HOC ile inkübe edilmiş sPLA2'nin spektroskopi verileri, enzimin inhibe olduğunu göstermektedir (Toyama ve diğ., 2008). Bu kumarin, farelerde ovalbümin uygulaması ile indüklenen bir enflamasyon modelinde mukus üretimini ve akciğer iltihabını azaltmıştır (Vasconcelos ve diğ., 2009).

AM bitk ekstresinin furanokumarinler ve flavonoidlerce zengin olduğu görülmüştür (Elgamal ve diğ., 1993). Bu bitkiden izole edilen kumarinlerin yüksek derecede anti enflamatuar etkinliği araştırmalar sonucunda saptanmıştır (Selim ve Ouf, 2012). Sentezlenen bileşiklerin anti enflamatuar aktivitesi, sıçan pençesi ödemi metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Selim ve Ouf, 2012). Yapılan birçok çalışmada AV bitkisinde visnagin isimli bir bileşik bulunmuştur. Visnagin kuromon ve furanın bir türevi olan bir furanokromondur. Çalışmaların sonuçları birlikte ele alındığında, visnagin proenflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu azaltabileceğini göstermektedir (Cells ve diğ., 2010). Yine farklı bir çalışmada AG bitkisinde furanokumarinlerin ve polifenollerin de varlığı saptanmıştır (Al-Snafi, 2017). Bitkiden elde edilen ekstrenin antienflamatuar etkinliği nitrik oksiti inhibe etme potansiyeline göre değerlendirilmiştir ve inhibisyon gözlenmiştir (Kazemi, 2015). Birçok Angelica türünde kumarin türevleri olan skopoletin ve UBF tespit edilmiştir ve bu cinse ait bitkilerin karregenana kaynaklı enflamasyonu inhibe ettiği görülmüştür (Chen ve diğ., 1995). APG'nin tohum ve yapraklarından elde edilen ekstralarında fenoller, flavonoidler ve furokumarinler gibi çeşitli kumarinlerin varlığı saptanmıştır. Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre bu bitkinin ekstresi nitrik oksit üretimini azaltarak enflamasyonu baskılamıştır (Zhu ve diğ., 2017). PC bitkisinin psoralen, izopimpinellin, 8-metoksipsoralen, 5-metoksipsoralen ve imperatorin gibi furanokumarinlerce zengin bir içerikte olduğu görülmüştür (Chaudhary ve diğ., 1986). PC ekstresi, iltihaplanma sürecinin proliferatif fazındaki aktivitesini ortaya koyan pellet granülomunu etkili bir şekilde azaltmıştır (Rafatullah, 2003). Görüldüğü gibi bu çalışmada ele alınan bitkilerin hepsinin antienflamatuar etkinliği söz konusudur. Ayrıca bu bitkilerin tamamının kumarin sınıfı bileşikleri içerdiği ortaya konmuş durumdadır.

Bu çalışmada kumarin sınıfı bazı bileşiklerin sPLA2 ve COX-2 enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri dolayısıyla da enflamasyondaki rolleri araştırılmıştır. AM kök ekstresinin sPLA2 enzimi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon ($p < 0.05$) gerçekleştirildiği görülmüştür. İnhibisyon yüzdesi %84.771'dir. sPLA2 enflamasyon sürecinde kilit rol oynayan bir enzimdir. Dolayısıyla genel anlamda enflamasyonun baskılanması sonucu literatür ile uyum sağlamaktadır. Ayrıca AM'nin antienflamatuar etkinliği, literatürde sıklıkla karregenana benzeri etkenlerle fare pençesi ödemi metoduyla belirlenmiştir. Bu çalışmada diğer bitkiler dahil AM'nin antienflamatuar etkinliği, enflamasyon sürecinde önemli rolleri olan sPLA2 ve COX-2 üzerinde enzimatik olarak belirlenmeye çalışılmıştır. Bu durum çalışmanın özgün yanını ortaya koymaktadır. Ayrıca literatürde sıklıkla kumarin sınıfı bileşiklerin sPLA2 ve COX-2

enzimlerinden yalnızca biri üzerindeki inhibisyonu vurgulanmıştır. Oysa ki bu iki enzim enflamasyon sürecinde birlikte rol almaktadırlar. Birinin ürünü diğerinin substratı durumundadır. Bu da çalışmanın özgün taraflarından bir diğeridir.

Çalışmanın sonucunda diğer bitkilerin sPLA2 üzerinde ve AM dahil tüm bitkilerin COX-2 üzerinde bir inhibisyon yaratmadığı görülmüştür. AM dışındaki bitkilerin ekstreleri renkli AM'ninki ise beyazdı. Bu bitkilerin içeriğinde kumarin sınıfı bileşiklerin haricinde renk veren bileşiklerin de olması mümkün görünmektedir. ELISA Reader'da ölçümler 410 nm dalga boyunda yani görünür bölgede yapıldı. Bu dalga boyundaki radyasyonu, bitki ekstrelerinin içindeki kumarin sınıfı bileşiklerin dışındaki bileşiklerin absorplaması söz konusu olabilir. Bu durumda da ölçüm sonucu negatif değerler almış olabiliriz düşüncesindeyiz. Bunun önüne geçmek için ilgili bitki ekstrelerinde fraksiyonlandırma çalışmalarının yapılması gerektiği kanısındayız. Fraksiyonlandırma yapıldığı takdirde kumarin sınıfı bileşikler daha saf halde elde edilebilir ve görünür bölgede ilgili enzimler üzerinde enzimatik çalışmalar daha mümkün hale gelebilir düşüncesindeyiz. AM dışındaki bitkilerin sPLA2 ve COX-2 enzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin belirlenebilmesi için fraksiyonlandırma dahil olmak üzere daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği ve bu çalışmanın daha detaylı çalışmalara zemin hazırlayacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Abe, A., ve diğ., 2004, Lysosomal phospholipase A2 is selectively expressed in alveolar macrophages, *The Journal of biological chemistry*, 279 (41), 42605–42611.
- Al-snafi, A., 2014, The pharmacological importance of *Anethum graveolens*, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 65, 14–17.
- Ala, A., Dhillon, AP., Hodgson, HJ., 2003, Role of cell adhesion molecules in leukocyte recruitment in the liver and gut, *International journal of experimental pathology*, 84 (1) 1–16.
- Arai, H., 2002, Platelet-activating factor acetylhydrolase, *Prostaglandins and other lipid mediators*, 68–69, 83–94.
- Atalah, J., ve diğ., 2019, Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts, *Bioresource Technology*, 280, 478–488.
- Austin, DJ., Meyers, MB., 1965, Studies on glucoside intermediates in umbelliferone biosynthesis, *Phytochemistry*, 4 (2), 255–262.
- Bairagi, S., ve diğ., 2014, Medicinal Significance of Coumarins: A Review, *International Journal of Pharmaceutical Research*, 4, 141–143.
- Bao, S., ve diğ., 2004, Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility, *The Journal of biological chemistry*, 279 (37), 38194–38200.
- Bao, S., ve diğ., 2008, Glucose homeostasis, insulin secretion, and islet phospholipids in mice that overexpress iPLA2beta in pancreatic beta-cells and in iPLA2beta-null mice, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 294 (2), E217–29.
- Basile, A., ve diğ., 2009, Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae), *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14 (3), 939–952.
- Bellisola, G., ve diğ., 1987, Catalase activity in human hepatocellular carcinoma (HCC), *Clinical biochemistry*, 20 (6), 415–417.
- Bhattacharyya, DK., ve diğ., 1996, Involvement of arginine 120, glutamate 524, and tyrosine 355 in the binding of arachidonate and 2-phenylpropionic acid inhibitors to the cyclooxygenase active site of ovine prostaglandin endoperoxide H synthase-1, *The Journal of biological chemistry*, 271 (4), 2179–2184.
- Bjarnason, I., 2003, Therapeutic Roles of Selective COX-2 Inhibitors, *William Harvey Press*, 52 (5), 773.
- Blobaum, AL., Marnett, LJ., 2007, Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition, *Journal of medicinal chemistry*, 50 (7), 1425–1441.
- Bonventre, J V., ve diğ., 1997, Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice

deficient in cytosolic phospholipase A2, *Nature*, 390 (6660), 622–625.

Brown, SA., 1962, Biosynthesis of coumarin and herniarin in lavender, *Science*, 137 (3534), 977–978.

Brown, SA., Towers, GH., Wright, D., 1960, Biosynthesis of the coumarins. Tracer studies on coumarin formation in *Hierochloe odorata* and *Melilotus officinalis*, *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 38, 143–156.

Burke, JE., Dennis, EA., 2009, Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling, *Journal of lipid research*, 50, 237–42.

Cao, H., ve diğ., 2010, Discovery of cyclooxygenase inhibitors from medicinal plants used to treat inflammation, *Pharmacological research*, 61 (6), 519–524.

Carper, MJ., ve diğ., 2008, Skeletal muscle group VIA phospholipase A2 (iPLA2beta): expression and role in fatty acid oxidation, *Biochemistry*, 47 (46), 12241–12249.

Cedars, A., ve diğ., 2009, Calcium-independent phospholipases in the heart: mediators of cellular signaling, bioenergetics, and ischemia-induced electrophysiologic dysfunction, *Journal of cardiovascular pharmacology*, 53 (4), 277–289.

Cells, B-M., ve diğ., 2010, Anti-inflammatory Effect of Visnagin in Lipopolysaccharide-stimulated, *Archives of Pharmacal Research*, 33 (11), 1843–1850.

Chabot, S., ve diğ., 2003, Inhibitory effects of surfactant protein A on surfactant phospholipid hydrolysis by secreted phospholipases A2, *Journal of immunology*, 171 (2), 995–1000.

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 (7–8), 645–659.

Chaudhary, SK., ve diğ., 1986, Oxypeucedanin, a Major Furocoumarin in Parsley, *Petroselinum crispum*, *Planta medica*, 6, 462–464.

Chen, W., Pawelek, TR., Kulmacz, RJ., 1999, Hydroperoxide dependence and cooperative cyclooxygenase kinetics in prostaglandin H synthase-1 and -2, *The Journal of biological chemistry*, 274 (29), 20301–20306.

Chen, YF., Tsai, HY., Wu, TS., 1995, Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*, *Planta medica*, 61 (1), 2–8.

Cooke, D., 1998, *Studies on The Mode of Action of Coumarins (Coumarin, 6-Hydroxycoumarin, 7-Hydroxycoumarin and Esculetin) At a Cellular Level*, Thesis (PhD), Dublin City University.

Copeland, RA., ve diğ., 1994, Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (23), 11202–11206.

Dennis, EA., ve diğ., 2011, Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention, *Chemical reviews*, 111 (10), 6130–6185.

Dennis, EA., 2011, Phospholipase A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention, *National Institutes of Health*, 111 (10), 6130–6185.

Dinauer, MC., 1993, The respiratory burst oxidase and the molecular genetics of chronic granulomatous disease, *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 30 (4), 329–369.

Duncan, RE., ve diğ., 2008, Identification and functional characterization of adipose-specific phospholipase A2 (AdPLA), *The Journal of biological chemistry*, 283 (37), 25428–25436.

Elgamal, MH., ve diğ., 1993, Coumarins and coumarin glucosides from the fruits of *Ammi majus*, *Phytochemistry*, 34, 819–823.

Feehan, KT., Gilroy, DW., 2019, Is Resolution the End of Inflammation?, *Trends in molecular medicine*, 25 (3), 198–214.

Fisher, AB., ve diğ., 2005, Altered lung phospholipid metabolism in mice with targeted deletion of lysosomal-type phospholipase A2, *Journal of lipid research*, 46 (6), 1248–1256.

Fourcade, O., ve diğ. 1995, Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells, *Cell*, 80 (6), 919–927.

Ghosh, M., ve diğ. 2006, Properties of the Group IV phospholipase A2 family, *Progress in lipid research*, 45 (6), 487–510.

Gierse, JK., ve diğ. 1999, Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases, *The Biochemical journal*, 339 (3), 607–614.

Gora, S., ve diğ., 2006, The proinflammatory mediator Platelet Activating Factor is an effective substrate for human group X secreted phospholipase A2, *Biochimica et biophysica acta*, 1761 (9), 1093–1099.

Greig, GM., ve diğ., 1997, The interaction of arginine 106 of human prostaglandin G/H synthase-2 with inhibitors is not a universal component of inhibition mediated by nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Molecular pharmacology*, 52 (5), 829–838.

Hamberg, M., Samuelsson, B., 1967, On the mechanism of the biosynthesis of prostaglandins E-1 and F-1-alpha, *The Journal of biological chemistry*, 242 (22), 5336–5343.

Hanasaki, K., ve diğ., 2002, Potent modification of low density lipoprotein by group X secretory phospholipase A2 is linked to macrophage foam cell formation, *The Journal of biological chemistry*, 277 (32), 29116–29124.

Hara, K., ve diğ., 2005, Oligothiophene-containing coumarin dyes for efficient dye-sensitized solar cells, *The journal of physical chemistry*, 109 (32), 15476–15482.

Hirsh, J., ve diğ., 2001, Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range, *Chest*, 119 (1) ss. 8-21.

Hochgesang, GP., Rowlinson, SW., Marnett, LJ., 2000, Tyrosine-385 Is Critical for Acetylation of Cyclooxygenase-2 by Aspirin, *Journal of the American Chemical Society*, 122 (27), 6514–6515.

Hooks, SB., Cummings, BS., 2008, Role of Ca²⁺-independent phospholipase A2 in cell growth and signaling, *Biochemical pharmacology*, 76 (9), 1059–1067.

Hoult, JR., Paya, M., 1996, Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential, *General pharmacology*, 27 (4), 713–722.

Huang, G-J., ve diğ., 2012, Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 participate in anti-inflammatory activity of imperatorin from *Glehnia littoralis*, *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (7), 1673–1681.

Jameel, E., Umar, T., Hoda, N., 2016, Coumarin : A Privileged Scaffold for the Design and Development of Antineurodegenerative Agents, *Chemical Biology and Drug Design*, 1, 21–38.

James Corey, E., 1991, The Logic of Chemical Synthesis: Multistep Synthesis of Complex Carbogenic Molecules, *Nobel Lecture*, 30 (5), 455-465.

Jamier, V., ve diğ., 2014, Chalcone-Coumarin derivatives as potential anti-cancer drugs: an in vitro and in vivo investigation, *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 14 (7), 963–974.

Joshi, V., ve diğ., 2016, Dimethyl ester of bilirubin exhibits anti-inflammatory activity through inhibition of secretory phospholipase A2, lipoxygenase and cyclooxygenase, *Archives of biochemistry and biophysics*, 598, 28–39.

Kalgutkar, AS., ve diğ., 2000, Biochemically based design of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: facile conversion of nonsteroidal antiinflammatory drugs to potent and highly selective COX-2 inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (2), 925–930.

Kampranis, SC., ve diğ., 1999, Probing the binding of coumarins and cyclothialidines to DNA gyrase, *Biochemistry*, 38 (7), 1967–1976.

Karabina, S-A., ve diğ., 2006, Atherogenic properties of LDL particles modified by human group X secreted phospholipase A2 on human endothelial cell function, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20 (14), 2547–2549.

Kataranovski, M., ve diğ., 2003, Immunotoxicity of epicutaneously applied anticoagulant rodenticide warfarin: evaluation by contact hypersensitivity to DNCB in rats, *Toxicology*, 188 (1), 83–100.

Kaur, P., ve diğ., 2012, Amelioration of oxidative stress induced by oxidative mutagens and COX-2 inhibitory activity of umbelliferone isolated from *Glycyrrhiza glabra* L., *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (1), 120-126.

Kazemi, M., 2015, Chemical composition and antimicrobial , antioxidant activities and anti-inflammatory potential of *Achillea millefolium* L ., *Anethum graveolens* L ., and *Carum copticum* L . essential oils, *Perspectives in Medicine*, 5 (4), 217–222.

Kiefer, JR., ve diğ., 2000, Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction, *Nature*, 405 (6782), 97–101.

Kienesberger, PC., ve diğ., 2009, Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions, *Journal of lipid research*, 50, 63-8.

Kim, JS., ve diğ., 2006, Chemical constituents of the root of *Dystaenia takeshimana* and their anti-inflammatory activity, *Archives of pharmacal research*, 29 (8), 617–623.

Kindl, H., 1971, Ortho-hydroxylation of aromatic carboxylic acids in higher plants, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie*, 352 (1), 78–84.

Kita, Y., ve diğ., 2006, Biochemical properties and pathophysiological roles of cytosolic phospholipase A2s, *Biochimica et biophysica acta*, 1761 (11), 1317–1322.

Klivenyi, P., ve diğ., 1998, Mice deficient in group IV cytosolic phospholipase A2 are resistant to MPTP neurotoxicity, *Journal of neurochemistry*, 71 (6), 2634–2637.

Kock, I., ve diğ. 2005, Synthesis and biological evaluation of 11-substituted 6-aminobenzo[c]phenanthridine derivatives, a new class of antitumor agents, *Journal of medicinal chemistry*, 48 (8), 2772–2777.

Kolaczowska, E., Kubes, P., 2013, Neutrophil recruitment and function in health and inflammation, *Nature reviews. Immunology*, 13 (3), 159–175.

Kontogiorgis, C., Detsi, A., Hadjipavlou-Litina, D., 2012, Coumarin-based drugs: a patent review, *Expert opinion on therapeutic patents*, 22 (4), 437–454.

Korkmaz H., 2012, *Biyokimya-1*, <https://www.researchgate.net/publication/283898484>, [Ziyaret tarihi: 22 Mart 2019].

Kozak, KR., ve diğ., 2001, Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylethanolamide, *The Journal of biological chemistry*, 276 (32), 30072–30077.

Kozak, KR., Rowlinson, SW., Marnett, LJ., 2000, Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylethanolamide, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2, *The Journal of biological chemistry*, 275 (43), 33744–33749.

Kulmacz, RJ., 1998, Cellular regulation of prostaglandin H synthase catalysis, *FEBS letters*, 430 (3), 154–157.

Kurumbail, RG., ve diğ., 1996, Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents, *Nature*, 384 (6610), 644–648.

- Kurumbail, RG., Kiefer, JR., Marnett, LJ., 2001, Cyclooxygenase enzymes : catalysis and inhibition, *Current Opinion in Structural Biology*, 11, 752–760.
- Lajis, A., ve diğ., 2017, Lipase-Catalyzed Synthesis of Kojic Acid Derivative in Bioreactors and the Analysis of Its Depigmenting and Antioxidant Activities, *Cosmetics*, 4, 22.
- Lake, BG., 1999, Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment, *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 37 (4), 423–453.
- Lambeau, G., Gelb, MH., 2008, Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A₂, *Annual review of biochemistry*, 77, 495–520.
- Lambeau, G., Lazdunski, M., 1999, Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂, *Trends in pharmacological sciences*, 20 (4), 162–170.
- Landino, LM., ve diğ., 1997, Mutational analysis of the role of the distal histidine and glutamine residues of prostaglandin-endoperoxide synthase-2 in peroxidase catalysis, hydroperoxide reduction, and cyclooxygenase activation, *The Journal of biological chemistry*, 272 (34), 21565–21574.
- Laneuville, O., ve diğ., 1995, Fatty acid substrate specificities of human prostaglandin-endoperoxide H synthase-1 and -2. Formation of 12-hydroxy-(9Z, 13E/Z, 15Z)-octadecatrienoic acids from alpha-linolenic acid, *The Journal of biological chemistry*, 270 (33), 19330–19336.
- Lanzo, CA., ve diğ., 2000, Fluorescence quenching analysis of the association and dissociation of a diarylheterocycle to cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2: dynamic basis of cyclooxygenase-2 selectivity, *Biochemistry*, 39 (20), 6228–6234.
- Lecomte, M., ve diğ., 1994, Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin, *The Journal of biological chemistry*, 269 (18), 13207–13215.
- Lee, JH., ve diğ., 2006, A Convenient Total Synthesis of (+) -Decursinol from Resorcinol, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 27 (12), 2104–2106.
- Lino, CS., ve diğ., 1998, Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone, *Phytotherapy Research*, 11 (3), 211–215
- Litwack G., 2008, *Human Biochemistry and Disease*, Academic Press of Elsevier, China, ISBN: 978-0-12-452815-4.
- Liu, JH., ve diğ., 2008, Comparison of *Radix Angelicae pubescentis* and Substitutes - Constituents and Inhibitory Effect on 5-lipoxygenase and Cyclooxygenase, *Pharmaceutical Biology*, 36, 207–216.
- Liu, W., ve diğ., 2012, Synthesis and in vitro antitumor activity of novel scopoletin derivatives, *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 22 (15), 5008–5012.

Loll, P.J., ve diğ., 1996, Synthesis and use of iodinated nonsteroidal antiinflammatory drug analogs as crystallographic probes of the prostaglandin H₂ synthase cyclooxygenase active site, *Biochemistry*, 35 (23), 7330–7340.

Luo, K., ve diğ., 2011, Anticancer effects of imperatorin isolated from *Angelica dahurica*: induction of apoptosis in HepG2 cells through both death-receptor- and mitochondria-mediated pathways, *Chemotherapy*, 57 (6), 449–459.

Luong, C., ve diğ., 1996, Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2, *Nature structural biology*, 3 (11), 927–933.

Majus, A., Review, AVA., Al-snafi, AE., 2013, Chemical constituents and pharmacological activities of *Ammi majus* and *Ammi visnaga*, *International Journal of Pharmacy and Industrial Research*, 3 (3), 257-265.

Malik, I., ve diğ., 2008, Disrupted membrane homeostasis and accumulation of ubiquitinated proteins in a mouse model of infantile neuroaxonal dystrophy caused by PLA2G6 mutations, *The American journal of pathology*, 172 (2), 406–416.

Malkowski, M.G., ve diğ., 2000, The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase, *Science*, 289 (5486), 1933–1937.

Malkowski, M.G., ve diğ., 2001, Structure of eicosapentaenoic and linoleic acids in the cyclooxygenase site of prostaglandin endoperoxide H synthase-1, *The Journal of biological chemistry*, 276 (40), 37547–37555.

Maloney, C.G., ve diğ., 1998, Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils, *Journal of immunology*, 160 (3), 1402–1410.

Mancini, J.A., ve diğ., 1995, Arginine 120 of prostaglandin G/H synthase-1 is required for the inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing a carboxylic acid moiety, *The Journal of biological chemistry*, 270 (49), 29372–29377.

Mancini, J.A., ve diğ., 1997, Altered sensitivity of aspirin-acetylated prostaglandin G/H synthase-2 to inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Molecular pharmacology*, 51 (1), 52–60.

Marnett, L.J., ve diğ., 1999, Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition, *The Journal of biological chemistry*, 274 (33), 22903–22906.

Marnett, L.J., Kalgutkar, A.S., 1999, Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future, *Trends in pharmacological sciences*, 20 (11), 465–469.

Masferrer, J.L., ve diğ., 1994, Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (8), 3228–3232.

Matsuda, M., ve diğ., 1998, Studies on cancer chemoprevention by traditional folk medicines. XIX. Anti-tumor promoting activities of Kampo prescriptions composed of “Huangqin”, *Natural Medicines*, 52, 502-509.

- Mazimba, O., 2017, Umbelliferone : Sources , chemistry and bioactivities review, *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 55 (2), 223-232.
- McIntyre, TM., Prescott, SM., Stafforini, DM., 2009, The emerging roles of PAF acetylhydrolase, *Journal of lipid research*, 50, 255-9.
- Mitsuishi, M., ve diğ., 2006, Group V and X secretory phospholipase A2 prevents adenoviral infection in mammalian cells, *The Biochemical journal*, 393 (1), 97–106.
- Mitsuishi, M., ve diğ., 2007, Human group III phospholipase A2 suppresses adenovirus infection into host cells. Evidence that group III, V and X phospholipase A2s act on distinct cellular phospholipid molecular species, *Biochimica et biophysica acta*, 1771 (11), 1389–1396.
- Moon, SH., ve diğ., 2008, Smooth muscle cell arachidonic acid release, migration, and proliferation are markedly attenuated in mice null for calcium-independent phospholipase A2beta, *The Journal of biological chemistry*, 283 (49), 33975–33987.
- Morgan, NV., ve diğ., 2006, PLA2G6, encoding a phospholipase A2, is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron, *Nature genetics*, 38 (7), 752–754.
- Morgenstern, DE., ve diğ., 1997, Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*, *The Journal of experimental medicine*, 185 (2), 207–218.
- Mounier, CM., Bon, C., Kini, RM., 2001, Anticoagulant venom and mammalian secreted phospholipases A(2): protein- versus phospholipid-dependent mechanism of action, *Haemostasis*, 31 (3–6), 279–287.
- Murakami, M., ve diğ., 2010, Biochimie Emerging roles of secreted phospholipase A 2 enzymes : Lessons from transgenic and knockout mice, *Biochimie*, 92 (6), 561–582.
- Murakami, M., ve diğ., 2011, Recent progress in phospholipase A(2) research: from cells to animals to humans, *Progress in lipid research*, 50 (2), 152–192.
- Murakami, M., Kudo, I., 2001, Diversity and regulatory functions of mammalian secretory phospholipase A2s, *Advances in immunology*, 77, 163–194.
- Murray, J., 1982, The natural coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry, *Book Reviews*, 435.
- Nanjundaiah, SM., Astry, B., Moudgil, KD., 2013, Mediators of inflammation-induced bone damage in arthritis and their control by herbal products, *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2013, 518094.
- Naseri, M., ve diğ., 2012, The Study of Anti-Inflammatory Activity of Oil-Based Dill (*Anethum graveolens* L.) Extract Used Topically in Formalin-Induced Inflammation Male Rat Paw, *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 11 (4), 1169–1174.
- Nikolaou, A., Kokotou, MG., Kokotos, G., 2018, Small-molecule inhibitors as potential therapeutics and as tools to understand the role of phospholipases A2, *BBA - Molecular and*

Cell Biology of Lipids, 1864 (2019), 941–956.

Ojala, T., 2001, Biological Screening of Plant Coumarins, *University of Helsinki*, 23, 45-54.

Oorni, K., Kovanen, PT., 2009, Lipoprotein modification by secretory phospholipase A(2) enzymes contributes to the initiation and progression of atherosclerosis, *Current opinion in lipidology*, 20 (5), 421–427.

Pan, YH., Bahnson, BJ., 2010, Structure of a premicellar complex of alkyl sulfates with the interfacial binding surfaces of four subunits of phospholipase A2, *Biochimica et biophysica acta*, 1804 (7), 1443–1448.

Papay, ZE., ve diğ., 2012, Pharmaceutical and formulation aspects of *Petroselinum crispum* extract, *Acta pharmaceutica Hungarica*, 82 (1), 3–14.

Payahoo, L., ve diğ., 2014, *Anethum graveolens* L . supplementation has anti-inflammatory effect in type 2 diabetic patients, 13, 461–465.

Pelkonen, O., ve diğ., 2000, CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase, *Toxicology*, 144 (1–3), 139–147.

Peng, S., ve diğ., 2001, Structural characterization of a pentadienyl radical intermediate formed during catalysis by prostaglandin H synthase-2, *Journal of the American Chemical Society*, 123 (15), 3609–3610.

Picot, D., Loll, PJ., Garavito, RM., 1994, The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1, *Nature*, 367 (6460), 243–249.

Plount Price, ML., Jorgensen, WL., 2000, Analysis of Binding Affinities for Celecoxib Analogues with COX-1 and COX-2 from Combined Docking and Monte Carlo Simulations and Insight into the COX-2/COX-1 Selectivity, *Journal of the American Chemical Society*, 122 (39), 9455–9466.

Price, ML., Jorgensen, WL., 2001, Rationale for the observed COX-2/COX-1 selectivity of celecoxib from Monte Carlo simulations, *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 11 (12), 1541–1544.

Pungercar, J., Krizaj, I., 2007, Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2, *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 50 (7), 871–892.

Quach, ND., Arnold, RD., Cummings, BS., 2014, Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease, *Biochemical pharmacology*, 90 (4), 338–348.

Radmark, O., ve diğ., 2015, 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease, *Biochimica et biophysica acta*, 1851 (4), 331–339.

Rafatullah, S., 2003, Preliminary evaluation of the anti-inflammatory and anti-hepatotoxic activities of ‘ Parsley ’ *Petroselinum crispum* in rats, *Journal of Natural Remedies*, 54, 54–62.

Ramanadham, S., ve diğ., 2008, Age-related changes in bone morphology are accelerated in group VIA phospholipase A2 (iPLA2beta)-null mice, *The American journal of pathology*, 172 (4), 868–881.

Reid, RC., 2005, Inhibitors of secretory phospholipase A2 group IIA, *Current medicinal chemistry*, 12 (25), 3011–3026.

Rieke, CJ., ve diğ., 1999, The role of arginine 120 of human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in the interaction with fatty acid substrates and inhibitors, *The Journal of biological chemistry*, 274 (24), 17109–17114.

Rome, LH., Lands, WE., 1975, Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72 (12), 4863–4865.

Rowlinson, SW., ve diğ., 1999, The binding of arachidonic acid in the cyclooxygenase active site of mouse prostaglandin endoperoxide synthase-2 (COX-2). A putative L-shaped binding conformation utilizing the top channel region, *The Journal of biological chemistry*, 274 (33), 23305–23310.

Rowlinson, SW., ve diğ., 2000, Spatial requirements for 15-(R)-hydroxy-5Z,8Z,11Z, 13E-eicosatetraenoic acid synthesis within the cyclooxygenase active site of murine COX-2. Why acetylated COX-1 does not synthesize 15-(R)-hete, *The Journal of biological chemistry*, 275 (9), 6586–6591.

Sancho, R., ve diğ., 2004, Imperatorin inhibits HIV-1 replication through an Sp1-dependent pathway, *The Journal of biological chemistry*, 279 (36), 37349–37359.

Schneider, C., ve diğ., 2002, Control of prostaglandin stereochemistry at the 15-carbon by cyclooxygenases-1 and -2. A critical role for serine 530 and valine 349, *The Journal of biological chemistry*, 277 (1), 478–485.

Selim, YA., Ouf, NH., 2012, Anti-inflammatory new coumarin from the Ammi majus L, *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 2 (1), 1.

Selinsky, BS., ve diğ., 2001, Structural analysis of NSAID binding by prostaglandin H2 synthase: time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations, *Biochemistry*, 40 (17), 5172–5180.

Shimokawa, T., ve diğ., 1990, Tyrosine 385 of prostaglandin endoperoxide synthase is required for cyclooxygenase catalysis, *The Journal of biological chemistry*, 265 (33), 20073–20076.

Shin, E., ve diğ., 2010, Inhibitory effects of coumarins from the stem barks of Fraxinus rhynchophylla on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells, *Biological and pharmaceutical bulletin*, 33 (9), 1610–1614.

Singer, AG., ve diğ., 2002, Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2, *The Journal of biological chemistry*, 277 (50), 48535–48549.

Smith, WL., DeWitt, DL., Garavito, RM., 2000, Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology, *Annual review of biochemistry*, 69, 145–182.

Sproll, C., ve diğ., 2008, HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods, *Food chemistry*, 109 (2), 462–469.

Steinhilber, D., Hofmann, B., 2014, Recent advances in the search for novel 5-lipoxygenase inhibitors, *Basic and clinical pharmacology and toxicology*, 114 (1), 70–77.

Taavitsainen, P., 2001, *Cytochrome P450 Isoform-Specific In Vitro Methods To Predict Drug Metabolism and Interactions*, Oulu University Press, ISBN: 951-42-5900-9.

Thuresson, ED., Malkowski, MG., ve diğ., 2001, Mutational and X-ray crystallographic analysis of the interaction of dihomogamma-linolenic acid with prostaglandin endoperoxide H synthases, *The Journal of biological chemistry*, 276 (13), 10358–10365.

Thuresson, ED., Lakkides, KM., ve diğ., 2001, Prostaglandin endoperoxide H synthase-1: the functions of cyclooxygenase active site residues in the binding, positioning, and oxygenation of arachidonic acid, *The Journal of biological chemistry*, 276 (13), 10347–10357.

Thuresson, ED., Lakkides, KM., Smith, WL., 2000, Different catalytically competent arrangements of arachidonic acid within the cyclooxygenase active site of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 lead to the formation of different oxygenated products, *The Journal of biological chemistry*, 275 (12), 8501–8507.

Toyama, DO., ve diğ., 2009, Toxic Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin , 7-HOC) on the enzymatic , edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A2 (sPLA2) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom, *Toxicon*, 53 (4), 417–426.

Tsai, A., ve diğ., 1998, Structural characterization of arachidonyl radicals formed by prostaglandin H synthase-2 and prostaglandin H synthase-1 reconstituted with manganese protoporphyrin IX, *The Journal of biological chemistry*, 273 (7), 3888–3894.

Tsai, A., ve diğ., 1999, Rapid kinetics of tyrosyl radical formation and heme redox state changes in prostaglandin H synthase-1 and -2, *The Journal of biological chemistry*, 274 (31), 21695–21700.

Valentin, E., Lambeau, G., 2000, What can venom phospholipase A2 tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipase A2, *Biochimie*, 82, 815–831.

Valentin, E., Lambeau, G., 2000, Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins, *Biochimica et biophysica acta*, 1488 (1–2), 59–70.

Vasconcelos, JF., ve diğ., 2009, Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation, *European journal of pharmacology*, 609 (1–3), 126–131.

Walker, MC., ve diğ., 2001, A three-step kinetic mechanism for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by diarylheterocyclic inhibitors, *The Biochemical journal*, 357 (3), 709–718.

Wang, C., ve diğ., 2012, A natural coumarin derivative esculetin offers neuroprotection on cerebral ischemia/reperfusion injury in mice, *Journal of neurochemistry*, 121 (6), 1007–1013.

Wang, Y., ve diğ., 2015, Design, Synthesis, and In Vitro Evaluation of Novel 3, 7-Disubstituted Coumarin Derivatives as Potent Anticancer Agents, *Chemical biology and drug design*, 86 (4), 637–647.

Whittaker, J., ve diğ., 1998, The interaction of DNA-targeted platinum phenanthridinium complexes with DNA, *Nucleic acids research*, 26 (17), 3933–3939.

Wilkins, WP., Barbour, SE., 2008, Group VI phospholipases A2: homeostatic phospholipases with significant potential as targets for novel therapeutics, *Current drug targets*, 9 (8), 683–697.

Winget, JM., Pan, YH., Bahnson, BJ., 2006, The interfacial binding surface of phospholipase A2s, *Biochimica et biophysica acta*, 1761 (11), 1260–1269.

Yedgar, S., 2000, Inhibition of phospholipase A 2 as a therapeutic target, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488, 182–187.

Zhu, L., ve diğ., 2017, Constituents from *Apium graveolens* and their anti-inflammatory effects, *Journal of Asian Natural Products Research*, 6020, 1–8.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Oğuz KURT
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	12.01.1992
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	05393926096
E-Posta Adresi	oguz-kurt@hotmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Marmara Üniversitesi
Fakülte	Fen-Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji/Kimya (Çift Anadal Programı)
Mezuniyet Yılı	2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Doktora	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı AdıAnabilim Dalı Adı
Programı	Program AdıProgram Adı

Makale ve Bildiriler	