

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**CYP1A1'İN DOĞAL POLİFENOLLER TARAFINDAN**  
**İNHİBİSYONUNUN İN VİTRO VE MOLEKÜLER**  
**MODELLEME ÇALIŞMALARI İLE İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DOĞUKAN MUTLU**

**DENİZLİ, ARALIK 2015**

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**CYP1A1'İN DOĞAL POLİFENOLLER TARAFINDAN  
İNHİBİSYONUNUN İN VİTRO VE MOLEKÜLER  
MODELLEME ÇALIŞMALARI İLE İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DOĞUKAN MUTLU**

**DENİZLİ, ARALIK 2015**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

DOĞUKAN MUTLU tarafından hazırlanan “CYPIA1’İN DOĞAL POLİFENOLLER TARAFINDAN İNHİBİSYONUNUN İN VİTRO VE MOLEKÜLER MODELLEME ÇALIŞMALARI İLE İNCELENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 02/12/2015 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Doç. Dr. Şevki ARSLAN  
Pamukkale Üniversitesi



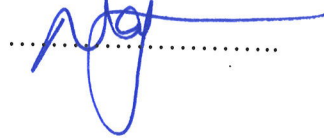
Yardımcı Danışman

Prof. Dr. Alaattin ŞEN  
Pamukkale Üniversitesi



Üye

Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN  
Pamukkale Üniversitesi



Üye

Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR  
Dokuz Eylül Üniversitesi



Üye

Doç. Dr. Yavuz DODURGA  
Pamukkale Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27.12.2015 tarih ve 48/15..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Orhan KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2014FBE043 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.**

**Doğukan MUTLU**



## ÖZET

**CYP1A1'İN DOĞAL POLİFENOLLER TARAFINDAN  
İNHİBİSYONUNUN İN VİTRO VE MOLEKÜLER MODELLEME  
ÇALIŞMALARI İLE İNCELENMESİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
DOĞUKAN MUTLU  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. ŞEVKİ ARSLAN)**

**DENİZLİ, ARALIK - 2015**

Polifenoller, meyve, sebze ve bitkisel kökenli içeceklerde bulunan sağlık üzerinde olumlu etkileri ve kanser önleyici özellikleri bilinen maddelerdir. Sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) ise bilinen bir ksenobiyotik metabolizması enzimidir ve prokarsinojenlerin metabolik aktivasyonundan sorumludur. Bu çalışmada, tıbbi bitkilerden izole edilen polifenollerin CYP1A1 inhibisyonu ve bu inhibisyonun mekanizmasının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, insan CYP1A1 ve NADPH sitokrom P450 redüktaz içeren bistonik plazmid bakterilerde eksprese edilmiş ve enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm fenolik bileşikler/flavonoidlerin CYP1A1 bağımlı EROD (7-etoksiresorufin O-deetilaz) aktivitesi üzerinde inhibe edici bir etki sergilediği gösterilmiştir. CYP1A1'in en kuvvetli inhibitörünün silikristin olduğu bulunmuştur. EROD aktivitesi ölçümlerine göre fenolik bileşik/flavonoidlerin inhibisyon etkileri sırasıyla silikristin > resveratrol isoscutellarein > > luteolin > oleuropein > eriositrin > silimarin şeklinde ve IC50 değerleri de aynı sırayla 15.83µM, 20.99µM, 21.76µM, 99.05µM, 148.99µM, 257.99µM ve 329.5µM olarak bulunmuştur. Silikristin, luteolin ve silimarinin EROD aktivitesini non-kompetatif şekilde resveratrol ve oleuropein'in ise karışık şekilde inhibe ettiği bulunmuştur. Öte yandan, eriositrin'in yarışmalı ve isoscutellarein'in EROD aktivitesini un-kompetatif biçimde inhibe ettiği bulunmuştur. Ayrıca moleküler modelleme çalışmaları ile *in vitro* test edilen yapıların etkileşimleri mekanistik olarak da incelenmiştir. Sonuç olarak bu çalışma, kullanılan polifenollerin CYP1A1 bağımlı EROD aktivitesinin etkin inhibitörleri olduğunu göstermektedir. İlaç metabolize eden enzimler kanserojenlerin metabolik aktivasyonu ya da inaktivasyonunda rol aldıklarından, bu enzimlerin polifenoller tarafından değiştirilmesi sağlık açısından önemlidir. Bu çalışma ile, kullanılan polifenollerin kanserojen aktivasyonunda rol aldığı bilinen CYP1A1 enzimini inhibe ederek kanserojen oluşumunu azaltıp malignant transformasyonu önleyebileceğini göstermektedir.

**ANAHTAR KELİMELER:** CYP1A1, inhibisyon mekanizması, polifenoller, flavonoidler, moleküler modelleme, biyoinformatik

## **ABSTRACT**

### **ASSESSMENT OF CYP1A1 INHIBITION BY NATURAL POLYPHENOLS APPLYING IN VITRO AND MOLECULAR DOCKING STUDIES**

**MSc THESIS**

**DOGUKAN MUTLU**

**PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE**

**BIOLOGY**

**(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. SEVKI ARSLAN)**

**DENİZLİ, DECEMBER 2015**

Polyphenols in fruits vegetables and plant based beverages are the well known chemicals that have positive effects on health and have cancer preventive properties. They show these effects by inhibiting the enzymes that are involved in carcinogen metabolism. Cytochrome P4501A1 (CYP1A1) is well known xenobiotic metabolizing enzyme and is responsible for metabolic activation of many procarcinogens. In this study, it is aimed to investigate the CYP1A1 inhibition and its mechanisms by polyphenols isolated in different medicinal plants. For this purpose, human CYP1A1 and NADPH cytochrome P450 reductase containing bistrionic plasmid was expressed in bacteria and used as the enzyme source. All phenolic compounds used in the study have been shown to exhibit an inhibitory effect on CYP1A1 dependent EROD (7-ethoxyresorufin O-deethylase) activity. It was found that silychristin is the most potent inhibitor of CYP1A1. The potency of the phenolic compounds/flavonoids to inhibit EROD activity follow the sequence of silychristin > isoscutellarein > resveratrol > luteolin > oleuropein > eriocitrin > silimarin with IC<sub>50</sub> values of 15.83μM, 20.99μM, 21.76μM, 99.05μM, 148.99μM, 257.99μM and 329.5μM respectively. Silychristin, luteolin and silimarin were found to inhibit EROD activity in a non-competitive manner. Resveratrol and oleuropein were found to inhibit EROD activity in a mixed type manner on the other hand, eriocitrin and isoscutellarein were found to inhibit EROD activity in a competitive and un-competitive manner respectively. Moreover, in-vitro tested chemicals were examined by molecular modelling studies as mechanistically. In conclusion, this study indicated that flavonoids used in this work were the strong inhibitors of CYP1A1 associated EROD activity. The modulation of drug-metabolizing enzymes by polyphenols is important in terms of human health, since these enzymes can play role in metabolic activation or inactivation of carcinogens. Polyphenols used in this study may be involved in the prevention of malignant transformation, by reducing the formation of carcinogens through inhibition of CYP1A1 which is known to be involved in carcinogen activation.

**KEYWORDS:** CYP1A1, mechanism of inhibition, polyphenols, flavonoids, molecular modeling, bioinformatics

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOL LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ.....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Fenolik Bileşikler.....	1
1.1.1 Flavonoidler.....	3
1.1.1.1 Flavonoidlerin Terapötik Etkileri.....	3
1.2 Faz I ve Faz II Ksenobiyotik Metabolizması Enzimleri.....	5
1.2.1 Faz I Ksenobiyotik Metabolizması Enzimleri.....	5
1.2.1.1 Sitokrom P450 Enzimleri.....	6
1.3 Flavonoidlerin Faz I ve Faz II Ksenobiyotik Metabolizması Enzimleri Üzerindeki Etkisi.....	15
1.3.1 Resveratrol.....	15
1.3.2 Silikristin.....	17
1.3.3 Luteolin.....	18
1.3.4 Isoscutellarein.....	19
1.3.5 Silimarin.....	19
1.3.6 Eriositrin.....	20
1.3.7 Oleuropein.....	21
1.4 Yapı Temelli İlaç Tasarımı.....	22
1.4.1 Protein Veritabanı.....	22
1.4.2 Moleküler Kenetlenme (Docking) Yöntemi.....	24
1.4.3 Kullanılan Docking Programları.....	25
1.4.3.1 AutoDock 4.2 ve AutoDock Tools.....	25
1.4.4 Kullanılan Yardımcı Programlar.....	26
1.4.4.1 Avogadro.....	26
1.4.4.2 Cygwin.....	27
1.4.4.3 Chimera.....	27
1.4.4.4 QuteMol.....	27
1.5 Çalışmanın Amacı.....	28
<b>2. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>30</b>
2.1 Malzemeler.....	30
2.1.1 Kullanılan Kimyasallar.....	30
2.1.2 Kullanılan Cihazlar.....	30
2.1.3 Kullanılan Polifenoller.....	31
2.2 Yöntemler.....	32
2.2.1 Kompetant Hücre Hazırlanması.....	32
2.2.2 CYP1A1 Bistonik Plazmid'in DH5 $\alpha$ Transformasyonu.....	32
2.2.3 Bakteriyel Membran Hazırlanması.....	33
2.2.4 NADPH Bağımlı Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	33



2.2.5	Protein Tayini .....	34
2.2.6	Western Blot Analizi .....	35
2.2.7	7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Aktivitesinin Belirlenmesi .....	36
2.2.7.1	EROD Aktivitesi ile Flavonoidlerin Etkilerinin Belirlenmesi	38
2.2.8	Docking Metodu .....	39
2.2.8.1	İnhibitör Yapılarının Oluşturulması .....	39
2.2.8.2	CYP1A1 Yapısının Hazırlanması .....	40
2.2.9	AutoDock ile Docking Hesaplamaları .....	42
<b>3.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>42</b>
3.1	7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Aktivitesinin Ölçülmesi ...	42
3.2	Protein İçeriği Analizi (Western Blot Analizi) .....	43
3.3	NADPH Bağımlı Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesinin Ölçülmesi	44
3.4	Flavonoidlerin CYP1A1 Bağımlı EROD Aktivitesi Üzerine Etkileri	44
3.4.1	Resveratrol'ün CYP1A1 Üzerinde Etkisi .....	45
3.4.2	Silikristin'in CYP1A1 Üzerinde Etkisi .....	48
3.4.3	Luteolin'in CYP1A1 Üzerinde Etkisi .....	51
3.4.4	Isoscutellarein'in CYP1A1 Üzerinde Etkisi .....	54
3.4.5	Silimarin'in CYP1A1 Üzerinde Etkisi .....	58
3.4.6	Eriositrin'in CYP1A1 Üzerinde Etkisi .....	61
3.4.7	Oleuropein'in CYP1A1 Üzerinde Etkisi .....	64
3.5	Docking Sonuçları .....	68
3.5.1	Resveratrol Yapısı İçin Docking Sonuçları .....	68
3.5.2	Silikristin Yapısı İçin Docking Sonuçları .....	71
3.5.3	Luteolin Yapısı İçin Docking Sonuçları .....	73
3.5.4	Isoscutellarein Yapısı İçin Docking Sonuçları .....	76
3.5.5	Silimarin Yapısı İçin Docking Sonuçları .....	78
3.5.6	Eriositrin Yapısı İçin Docking Sonuçları .....	80
3.5.7	Oleuropein Yapısı İçin Docking Sonuçları .....	83
3.6	Türev Ligand Denemeleri .....	85
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>87</b>
<b>5.</b>	<b>SONUÇ .....</b>	<b>99</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>101</b>
<b>7.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>119</b>

# ŞEKİL LİSTESİ

## Sayfa

Şekil 1.1: Diyetel polifenollerin sınıflandırılması (Xiuzhen ve diğ 2007).....	2
Şekil 1.2: Sitokrom P450'nin Absorbans Spektrumu .....	7
Şekil 1.3: ER zarında CYP2C5'in katlanmış yapısı ile proteinlerin ilişkisi .....	9
Şekil 1.4: P450 Sisteminin Katalitik Döngüsü (Meunier ve diğ 2004).....	11
Şekil 1.5: Sitokrom P450'lerin İsimlendirilmesi .....	12
Şekil 1.6: Trans-resveratrol yapısı .....	16
Şekil 1.7: Silikristin yapısı .....	17
Şekil 1.8: Luteolin yapısı .....	18
Şekil 1.9: Isoscutellarein yapısı .....	19
Şekil 1.10: Silimarin yapısı .....	20
Şekil 1.11: Eriositrin yapısı.....	20
Şekil 1.12: Oleuropein yapısı.....	21
Şekil 1.13: Protein veritabanının ekran görüntüsü.....	23
Şekil 1.14: Protein veritabanındaki dosya adlandırması .....	23
Şekil 1.15: AutoDock arayüzü ve AutoGrid işlemi .....	26
Şekil 2.2: Etoksiresorufin Odeethylase reaksiyonunu .....	36
Şekil 2.3: EROD ölçümü için reaksiyon karışımının bileşenleri .....	38
Şekil 2.4: İnhibitör moleküllerin QuteMol ile çizilmiş üç boyutlu yapıları (a) Resveratrol (b) Silikristin (c) Luteolin (d) Isoscutellarein (e) Silimarin (f) Eriositrin (g) Oleuropein.....	40
Şekil 3.1: Protein miktarının EROD aktivitesine etkisi .....	43
Şekil 3.2: P4501A immünokimyasal tespiti. 1) Ladder 2) Rat Mikrozom 3) 20ug CYP1A1 içeren bakteri lizati 4) 40ug CYP1A1 içeren bakteri lizati.....	43
Şekil 3.3: NADPH Bağımlı Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesi.....	44
Şekil 3.4: Resveratrol'ün EROD Aktivitesine Etkisi.....	45
Şekil 3.5: Resveratrol'ün EROD Aktivitesine Etkisi.....	45
Şekil 3.6: Michaelis-Menten grafiği ile Resveratrol'ün EROD Aktivitesi.....	46
Şekil 3.7: Lineweaver-Burk grafiği ile Resveratrol'ün EROD Aktivitesi.....	47
Şekil 3.8: Resveratrol'ün IC50 Değerinin Hesaplanması .....	47
Şekil 3.10: Silikristin'in EROD Aktivitesine Etkisi .....	48
Şekil 3.11: Michaelis-Menten grafiği ile Silikristin'in EROD Aktivitesi.....	49
Şekil 3.12: Lineweaver-Burk grafiği ile Silikristin'in EROD Aktivitesi.....	50
Şekil 3.13: Silikristin'in IC50 Değerinin Hesaplanması.....	50
Şekil 3.14: Luteolin'in EROD Aktivitesine Etkisi.....	51
Şekil 3.15: Luteolin'in EROD Aktivitesine Etkisi.....	52
Şekil 3.16: Michaelis-Menten grafiği ile Luteolin'in EROD Aktivitesi.....	53
Şekil 3.17: Lineweaver-Burk grafiği Luteolin'in EROD Aktivitesi.....	53
Şekil 3.18: Luteolin'in IC50 Değerinin Hesaplanması.....	54
Şekil 3.19: Isoscutellarein'in EROD Aktivitesine Etkisi.....	55
Şekil 3.20: Isoscutellarein'in EROD Aktivitesine Etkisi.....	55
Şekil 3.21: Michaelis-Menten grafiği ile Isoscutellarein'in EROD Aktivitesi.....	56
Şekil 3.22: Lineweaver-Burk grafiği ile Isoscutellarein'in EROD Aktivitesi.....	57
Şekil 3.23: Isoscutellarein'in IC50 Değerinin Hesaplanması .....	57

Şekil 3.24: Silimarin'in EROD Aktivitesine Etkisi .....	58
Şekil 3.25: Silimarin'in EROD Aktivitesine Etkisi .....	58
Şekil 3.26: Michaelis-Menten grafiği ile Silimarin'in EROD Aktivitesi .....	59
Şekil 3.27: Lineweaver-Burk grafiği ile Silimarin'in EROD Aktivitesi.....	60
Şekil 3.28: Silimarin'in IC50 Değerinin Hesaplanması.....	60
Şekil 3.29: Eriositrin'in EROD Aktivitesine Etkisi .....	61
Şekil 3.30: Eriositrin'in EROD Aktivitesine Etkisi .....	62
Şekil 3.31: Michaelis-Menten grafiği ile Eriositrin'in EROD Aktivitesi .....	63
Şekil 3.32: Lineweaver-Burk grafiği ile Eriositrin'in EROD Aktivitesi .....	63
Şekil 3.33: Eriositrin'in IC50 Değerinin Hesaplanması .....	64
Şekil 3.34: Oleuropein'in EROD Aktivitesine Etkisi .....	65
Şekil 3.35: Oleuropein'in EROD Aktivitesine Etkisi .....	65
Şekil 3.36: Michaelis-Menten grafiği ile Oleuropein'in EROD Aktivitesi .....	66
Şekil 3.37: Lineweaver-Burk grafiği ile Oleuropein'in EROD Aktivitesi .....	67
Şekil 3.38: Oleuropein'in IC50 Değerinin Hesaplanması.....	67
Şekil 3.39: CYP1A1 ile en iyi skorlu Resveratrol yapısının görünümü .....	69
Şekil 3.40: CYP1A1 ile Resveratrol arasındaki hidrojen bağları .....	70
Şekil 3.41: Resveratrol yapısının aktif bölge aminoasitleri ile etkileşimi .....	70
Şekil 3.42: CYP1A1 ile en iyi skorlu Silikristin yapısının görünümü.....	72
Şekil 3.43: CYP1A1 ile Silikristin arasındaki hidrojen bağları .....	72
Şekil 3.44: Silikristin yapısının aktif bölge aminoasitleri ile etkileşimi .....	73
Şekil 3.45: CYP1A1 ile en iyi skorlu Luteolin yapısının görünümü .....	74
Şekil 3.46: CYP1A1 ile Luteolin arasındaki hidrojen bağları .....	75
Şekil 3.47: Luteolin yapısının aktif bölge aminoasitleri ile etkileşimi .....	75
Şekil 3.48: CYP1A1 ile en iyi skorlu Isoscutellarein yapısının görünümü .....	77
Şekil 3.49: CYP1A1 ile Isoscutellarein arasındaki hidrojen bağları.....	77
Şekil 3.50: Isoscutellarein yapısının aktif bölge aminoasitleri ile etkileşimi....	78
Şekil 3.51: CYP1A1 ile en iyi skorlu Silimarin yapısının görünümü.....	79
Şekil 3.52: CYP1A1 ile Silimarin arasındaki hidrojen bağları .....	79
Şekil 3.53: Silimarin yapısının aktif bölge aminoasitleri ile etkileşimi .....	80
Şekil 3.54: CYP1A1 ile en iyi skorlu Eriositrin yapısının görünümü.....	81
Şekil 3.55: CYP1A1 ile Eriositrin arasındaki hidrojen bağları.....	82
Şekil 3.55: Eriositrin yapısının aktif bölge aminoasitleri ile etkileşimi.....	82
Şekil 3.56: CYP1A1 ile en iyi skorlu Oleuropein yapısının görünümü.....	84
Şekil 3.57: CYP1A1 ile Oleuropein arasındaki hidrojen bağları.....	84
Şekil 3.58: Oleuropein yapısının aktif bölge aminoasitleri ile etkileşimi.....	85
Şekil 3.59: Resveratrol Türevlerinin Yapıları.....	86

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

Tablo 2.2: Ayrıştırma ve yükleme jellerinin hazırlanması.....	35
Tablo 2.3: EROD aktivitesi ölçmek için reaksiyon karışımının bileşenleri.....	37
Tablo 2.4: Moleküllerin özellikleri .....	39
Tablo 3.1: Resveratrol Docking Sonuçları.....	69
Tablo 3.2: Silikristin Docking Sonuçları .....	71
Tablo 3.3: Luteolin Docking Sonuçları.....	74
Tablo 3.4: Isoscutellarein Docking Sonuçları.....	76
Tablo 3.5: Silimarin Docking Sonuçları .....	78
Tablo 3.6: Eriositrin Docking Sonuçları .....	81
Tablo 3.7: Oleuropein Docking Sonuçları .....	83
Tablo 3.8: Resveratrol Türevleri .....	86
Tablo 3.9: Resveratrol Türevleri ve Docking Sonuçları .....	87
Tablo 4.1: Flavonoidlerin inhibitör etkisi ve IC50 değerleri .....	97
Tablo 4.2: Flavonoidlerin RMSD değerleri .....	98

## SEMBOL LİSTESİ

- B(a)P** : Benzo(a)piren  
**BSA** : Sığır serum albümini  
**CYP** : Sitokrom P450  
**DMSO** : Dimetilsulfoksit  
**EDTA** : Etilendiamin tetraasetik asit  
**EROD** : Etoksiresorufin O-deetilaz  
**IC50** : %50 inhibisyon sağlayan konsantrasyon  
**Ki** : İnhibisyon sabiti  
**Km** : Michaelis-Menten sabiti  
**Km'** : En yüksek inhibitör konsantrasyonu için Michaelis-Menten sabiti  
**KPi** : Potasyum Fosfat  
**NADH** : Nicotinamideadenine dinükleotid indirgenmiş şekli  
**NADP<sup>+</sup>** : Nicotinamideadenine dinükleotit fosfat  
**NADPH** : Nicotinamideadenine dinükleotid fosfat, indirgenmiş form  
**PAGE** : Poliakrilamid jel elektroforezi  
**PDB** : Protein veritabanı dosyaları  
**RMSD** : Karekök sapması  
**TCDD** : 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin  
**TRIS** : (hidroksimetil) aminometan  
**Vmax** : Maksimum hız  
**IPTG** : İzopropil b-D-1-tiogalaktopiranosid  
**LB** : Luria-Broth  
**SDS** : Sodyum Dodesil Sülfat  
**APS** : Amonyum persülfat  
**TEMED** : Tetrametilendiamin  
**NBT** : Nitro Blue Tetrazolyum  
**GST** : Glutasyon S- transferaz  
**BCIP** : 5-bromo-4-kloro-indol-fosfat  
**ALP** : Alkalen Fosfataz  
**CYP450** : Sitokrom P450

## ÖNSÖZ

Bu çalışma, Sitokrom P450 1A1 geninin bitkilerden izole edilmiş doğal polifenoller tarafından inhibisyonunun *in vitro* ve moleküler modelleme çalışmaları ile incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, çok sayıda çevresel karsinojen ve toksik kimyasalın biyotransformasyonunda rol alan CYP1A1 geninin inhibisyonu ve karakterizasyon çalışmaları büyük önem taşımaktadır.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca, tezimin planlanması ve yürütülmesinde zamanını, bilgisini ve desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Doç. Dr. Şevki ARSLAN'a;

Çalışmalarım süresince beni yönlendiren ve tecrübeleriyle ufkumu genişleten sevgili hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN'e;

Değerli jüri üyelerim Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN, Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR ve Doç. Dr. Yavuz DODURGA'ya;

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde, projenin maddi desteğini sağlayan Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne;

Ve son olarak, tüm hayatım boyunca bana olan inançlarını asla kaybetmeyip maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, beni bu günlere getiren aileme; sevgili annem Şükriye MUTLU ve babam Hüseyin MUTLU'ya sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

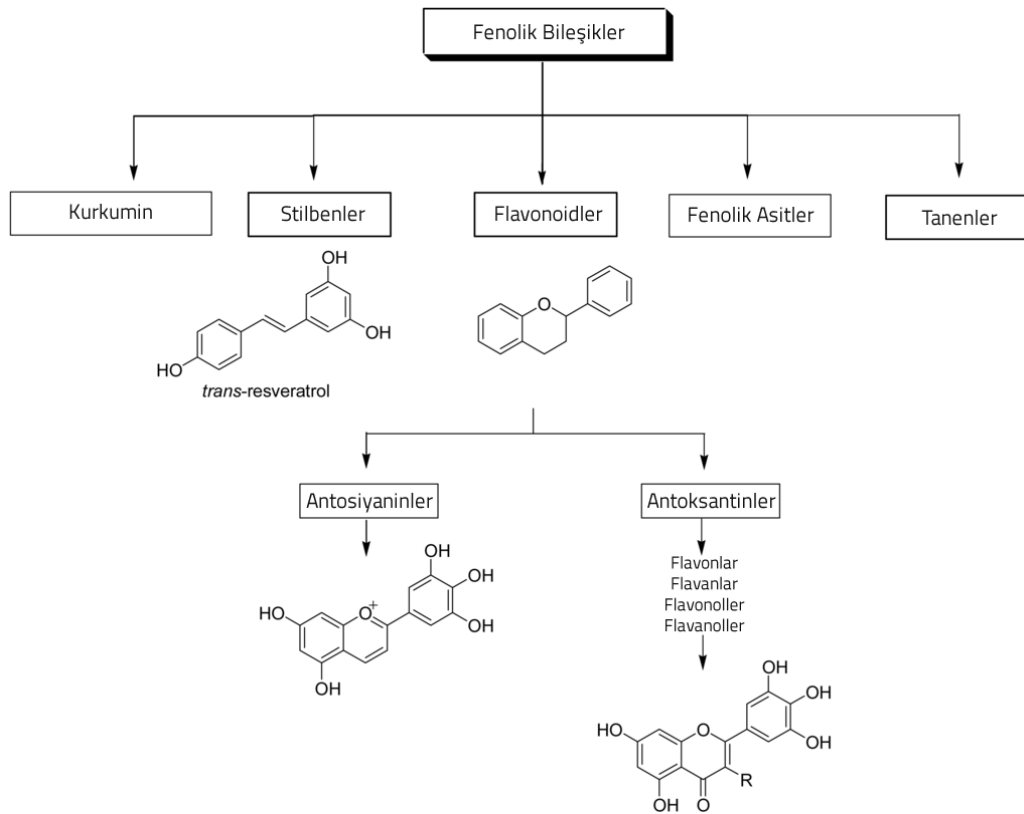
# 1. GİRİŞ

Teknolojinin ilerlemesi ve endüstrinin gelişmesi ile birlikte kaçınılmaz bir şekilde ve devamlı olarak yabancı kimyasallara maruz kalınmaktadır. P450 enzim sistemi sayesinde dışarıdan alınan ilaç, kimyasal madde, karsinojen vb. maddeler metabolize edilebilmektedir. Bu enzimler herhangi bir yabancı maddenin vücuda girmesi ile birlikte çalışmaktadır. Bunlar, toksik moleküllere fonksiyonel gruplar ekleyerek bu moleküllerin daha polar olmasını veya diğer detoksifikasyon ajanlarının etkisine duyarlı hala gelmesini sağlamaktadır. Öte yandan, terapötik maddeleri inaktive etme ya da yüksek aktiviteye sahip toksik bileşiklerin üretilmesi gibi olaylara da sebep olabilir ve eğer potansiyel bir karsinojeni aktive ederse, kanser ortaya çıkabilmektedir. Son resmi verilere göre Türkiye’de her yıl yaklaşık 97 bin erkek, 62 bin kadın ve toplamda 159 bin kişi kansere yakalanmaktadır (Sağlık Bakanlığı, 2012). Kanser, Amerika Birleşik Devletleri’nde ise tüm ölüm sebeplerinin yaklaşık %30’u olup, dünya genelinde ikinci ölüm nedenidir (American Cancer Society, 2012). Dünya Sağlık Örgütü raporlarına bakıldığında kanserden ölümlerin artacağı ve 2030 yılında yaklaşık 12 milyon insanın bu sebepten hayatını kaybedeceği ifade edilmiştir (Block ve diğ 1992, Galati ve O’Brien 2004, Taylor 2009). İyi bir diyetin kanser riskini azaltmada çok önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar taze sebze ve meyve tüketiminin kansere karşı koruyucu etki sağlayacağını göstermiştir. Meyve ve sebzeler, içerdikleri vitamin, mineral ve çok sayıdaki flavonoid sayesinde önleyici bir rol oynamaktadır. Çünkü sebze, meyve ve bitkisel kökenli içeceklerde çok sayıda fenolik bileşik/flavonoid bulunması araştırmacıları sağlık üzerindeki olumlu etkilerini araştırmak için bu bileşiklere yönelmiştir (Hertog ve diğ 1992, King ve Young 1999, Meulenberg 2009).

## 1.1 Fenolik Bileşikler

Bitkiler metabolizmalarında henüz rolleri tam olarak bilinmesede sekonder metabolit olarak çok sayıda fenolik madde oluşturmaktadır. Bu sebeple bitkisel kökenli gıdaların içeriğine bakıldığında çok sayıda ve farklı özelliklerde fenolik bileşiklere rastlanmaktadır. Fenolik maddeler bitkisel doğal bileşiklerin büyük bir

kısmını kapsamaktadır. Fenolik maddeler, yapısında en az bir aromatik halka ve çok sayıda hidroksil grubu bulunduran bileşiklerin tümüne denir. Fenolik ve polifenolik terimi kimyasal olarak kısaca, sahip olduğu aromatik halkada çeşitli fonksiyonel grupları (ester, metil esteri, glikozit vb.) ve hidroksil grubu bulunduran maddeler olarak tanımlanırlar. Fenolik bileşiklerin çoğu iki veya daha fazla hidroksil grubu bulundurur. Fenolik bileşikler, suda çözünebilirler ve genellikle hücrenin vakuollerinde yer alırlar. Bir milyonun üzerinde fenolik bileşik yapısı olduğu bilinmektedir (Rangel-Huerta ve diğ 2015). Bitkilerdeki fenolik bileşiklere ait ilk modern sınıflandırma; basit fenoller, fenolik asitleri, sinamik asitleri, kumarinleri, izokumarinleri, lignanları, ligninleri, flavanoidleri, tanninleri, benzofenonları, stilbenleri, ksantonları, kinonları ve betasiyaninleri içermektedir (Harborne 1964). Bitkisel fenolik bileşikler iki yolla oluşurlar (Day ve Harborne 1989). Fenolik bileşiklere bakterilerde, alglerde ve mantarlarda sık rastlanmaz. Gosipetin türeği olan klorflovanın *Aspergillus candidus* mantarı tarafından üretilmesine rağmen, aslında flavonoidler mantarlarda hemen hemen hiç bulunmazlar (Harborne 1964).



Şekil 1.1: Diyetel polifenollerin sınıflandırılması (Xiuzhen ve diğ 2007)



### 1.1.1 Flavonoidler

Flavonoidler C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> difenilpropan yapısındadır ve fenil grupları arasındaki üçlü karbon köprüsü, oksijenle halka oluşturmaktadır (flavan halkası). Flavonoidlerin arasındaki farklar; bağlanan hidroksil gruplarının sayısından, doymamışlık derecesinden ve üçlü karbon segmentinin oksidasyon düzeyinden kaynaklanmaktadır. Flavonoidler, fenolik bileşikler içinde en önemli grubu oluşturan flavan (2fenolbenzodihidropiran) türevleridir ve yapısal olarak altı gruba ayrılırlar. Bunlar; antosiyanidinler, flavonoller, flavonlar, flavanonlar, kateşinler (flavanoller) ve izoflavonoidler.

#### 1.1.1.1 Flavonoidlerin Terapötik Etkileri

Başlarda bitkilerdeki renk, tat ve fizyolojik etkileriyle dikkat çeken flavonoidler, son yıllarda özellikle sağlık üzerine olumlu etkilerinin ortaya çıkmasıyla önem kazanmıştır. Antioksidan ve serbest radikal yakalama özelliklerinin yanı sıra koroner kalp hastalıkları ve birçok kanser türünün engellenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. (Chen ve diğ 1996, Serafini ve diğ 2006)

Aglikon veya glikozitler halinde bulunan flavonoidler, bağırsağa girmeden önce şeker kısmından glikozitleri ayrılmakta, aglikonları ise hücre membranlarından serbestçe geçebilmektedir (De Pascual-Teresa ve diğ 2007, Viskupicova ve diğ 2008). Flavonoidlerin biyoyararlanımı konusunda çok az bilgi olmasına rağmen, son zamanlarda yapılan çalışmalar ile çözünebilir flavonoidlerin emiliminin daha kolay olacağı yönündedir. (Perez-Jimenez ve diğ 2009). Diyet olarak alınan flavonoidler ince barsak enzimleri tarafından metabolize olmuyor ve hidrolize uğrayamıyorsa kalın bağırsak florasında bozulmaktadır (Ortega ve diğ 2009). Flavonoid aglikonları, emilim sırasında ve sonrasında karaciğerde faz II enzimleri tarafından konjugasyon ürünleri olan glukuronize, metoksilli ve sülfatlı bileşiklere dönüştürülmektedir. Daha sonra bu konjugat metabolitleri dolaşımda albumine bağlanır, ancak hücre ve dokulara alımı henüz anlaşılabilir değildir. Emilen flavonoidler ve metabolitleri idrar ve safra yoluyla atılmaktadır ancak duodenum yoluyla geri emilebilir (Corcoran ve diğ 2012). Flavonoid metabolizmasının gerçekleştiği doku karaciğer gibi görünse de bağırsak mukozası ve böbrekler de konjugatif enzimler içermektedir (Hackett 1986).

Flavonoidlerin biyotransformasyonu, dehidroksilasyonu, redüksiyonu, C-halkası bölünmesi ve demetilasyonu gibi metabolik faaliyetler kalın bağırsaklar tarafından gerçekleştirilebilir. Oluşan bu metabolitler de hem bağırsakta hem de sistemde biyolojik açıdan yararlı bileşikler olarak rol oynayabilmektedir. Flavonoidlerin aktivitesi yapısına ve hedef dokuya bağlıdır (Corcoran ve diğ 2012). Flavonoidlerin metabolize edilmiş formlarının kanda bulunması, doğal bileşiklerinin bulunmasından farklıdır. Yaklaşık olarak 50 mg aglikon alımı ile kan plazma konsantrasyonunda 0-4 µM kadar flavonoid bulunabilmektedir (Gibellini ve diğ 2011). Avrupa ülkelerine bakıldığında flavonoidlerin toplam alımı günlük 0,2g ile 1g arasında değişkenlik göstermektedir (Zhang ve diğ 2004).

Gibellini ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda flavonoidlerin, *in vitro* ve *in vivo* olarak biyoaktiviteleri arasında önemli farklılıkların olduğu tespit edilmiştir (Gibellini ve diğ 2011). Dolayısıyla flavonoidlerin emilimi, metabolizması ve biyolojik aktivitelerinin araştırılması çok önemlidir (Viskupicova ve diğ 2008). Flavonoidlerin günlük ya da genel olarak tüketim miktarları da henüz netlik kazanmamıştır (Gibellini ve diğ 2011). Bunun sebebi, bitkilerde flavonoid oluşumunu etkileyen faktörlerin çokluğudur. Bunlar arasında ışık, genetik faktörler, çevresel koşullar, çimlenme, işlenme ve depolanma ve varyete yer almaktadır (Ross ve Kasum 2002). Emilim aynı zamanda flavonoidlerin dozu, alım şekli, beslenme, cinsiyet farklılıkları, bireylerin genetik özellikleri ve kolondaki mikrobiyal popülasyondan da etkilenmektedir (Viskupicova ve diğ 2008). Ayrıca flavonoid bileşiklerinin analiz edilebilmesi için yeterli metodun bulunmaması, standardizasyon eksikliği (Gibellini ve diğ 2011) ve gıdalarda bulunan flavonoid miktarına ilişkin verilerin yetersiz ya da çelişkili olması da bu durumu zorlaştırmaktadır (Çapanoğlu ve diğ 2010).

Öte yandan beslenme yoluyla alınan flavonoidlerin emiliminin birlikte tüketildiği diğer besin gruplarından etkilendiği de açıktır. Bunun sebebi, flavan çekirdeği üzerinde bulunan sakkaritlerin dışında diğer fonksiyonel gruplarında farklı oluşudur (Heim ve diğ 2002). Amerika Birleşik Devletleri'nde günlük flavonoid alımı mevsime bağlı olarak 1,0-1,1 g/gün şeklinde değişmektedir (Kuhnau 1976). Ancak bu çalışmada kullanılan metot günümüz koşullarına uygun değildir (Ross ve Kasum 2002).

Sampson ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ABD'deki günlük flavonoid alımı, kadınlar ve erkekler için sırasıyla 20 ve 22 mg/gün olarak belirlemişlerdir (Sampson ve diğ 2002). Hertog ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise Hollanda'daki flavonol ve flavon alımının 23 mg/gün olduğu belirtilmiştir. (Hertog ve diğ 1993) Danimarka için belirlenen flavanon alım miktarı 28 mg/gün olarak rapor edilmiştir (Leth ve Justesen 1998). Bir diğ er çalışmada, Finlandiya için belirlenen flavanon alım miktarının 36,6 mg/gün (28,3 mg/gün hesperetin ve 8,3 mg/gün naringenin) olduğu belirtilmiş, ancak büyük ölçüde turunçgillerde ve daha az miktarlarda aromatik bitkilerde bulunan flavanonların alım miktarının kişisel beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak önemli derecede farklılık gösterebileceği de vurgulanmıştır (De Pascual-Teresa ve diğ 2007). Bu maddelerin anti karsinojenik etki gösterdiklerini açıklayan mekanizmalardan birisi karsinojen metabolizmasında rol alan Faz I ve Faz II enzim sistemlerini modüle etmeleridir.

## **1.2 Faz I ve Faz II Ksenobiyotik Metabolizması Enzimleri**

Faz I ve Faz II ksenobiyotik metabolizması enzimleri, ksenobiyotiklerin ve ilaçların biyokimyasal açıdan metabolik değ iş ikliklerinden sorumlu baş lı ca enzimlerdir. Bu enzimler ksenobiyotik ve ilaçların kimyasal olarak değ iş ikliğ e uğ raması (biyotransformasyon) ve vücuttan uzaklaştırılması için beraber çalışmaktadır. Bu reaksiyonlar baş lı ca karaciğerde gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, akciğ er, böbrek, deri, mide, barsak yolları, adrenal testis, yumurtalık, plesenta ve beyin gibi memeli dokularında farklı miktarlarda bulunmakta ve farklı iş levler de göstermektedir (Shabibi ve diğ 2014, Olsen ve diğ 2015).

### **1.2.1 Faz I Ksenobiyotik Metabolizması Enzimleri**

Faz I reaksiyonları oksidasyon, redüksiyon veya hidroliz reaksiyonlarını içerir. Bu reaksiyonlar sonucunda ksenobiyotiklerin yapısına –OH, –NH<sub>2</sub>, –COOH, –SH gibi polar gruplar eklenmekte ve yapının biyoaktivasyonunda değ iş iklikler meydana gelmektedir. Genellikle Faz I reaksiyonları lipofilik karakterdeki ksenobiyotikleri hidrofilik bileş iklere dönüştürmektedir. Bu sistem, zehirli ve kanserojen maddelerin

detoksifikasyonu ve bunun sonucu olarak metabolitlerin elde edilmesi için çalışmaktadır (Nebert ve Gonzalez 1987, Schenkman 1999).

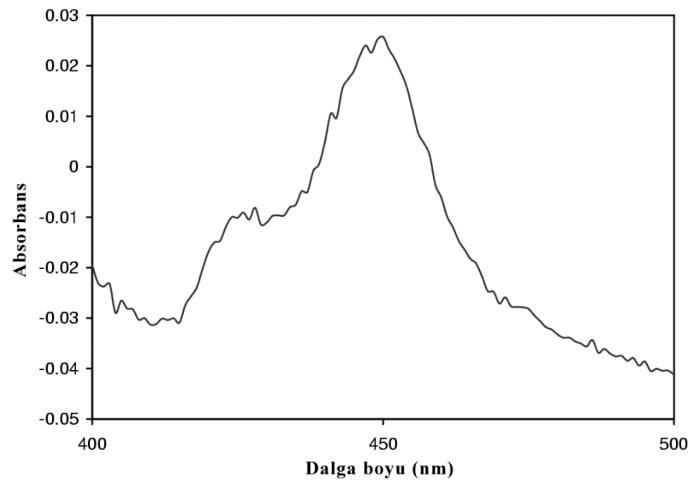
Faz I enzimleri amidazlar, esterazlar ve epoksit hidrolazlar gibi hidrolitik enzimleri; azoredüktaz, disülfid redüktazlar, NADPH-kinon oksidoredüktaz (NQO1), aldo-keto redüktazlar, nitroredüktazlar gibi indirgeyici enzimleri ve alkol ve aldehit dehidrojenaz, amin oksidaz, flavin içerikli monooksijenazlar (FMOs) ve Sitokrom P450 monooksijenazlar gibi oksidatif enzimleri içermektedir (Schenkman 1999). Bunlar arasında, Sitokrom P450 monooksijenazlar Faz I ksenobiyotik metabolizması enzimleri arasında en önemli olanıdır.

### **1.2.1.1 Sitokrom P450 Enzimleri**

Sitokrom P450 monooksijenazlar; eritrosit ve iskelet kası hücreleri dışında tüm memeli hücre tiplerinde ve prokaryotlarda bulunmaktadır. Ayrıca yağ asitleri, steroidler, prostaglandinler ve lökotrienler gibi doğal bileşiklerde olduğu gibi karsinojenler, mutajenler ve ilaçların oksidatif metabolizmasına da katılan bir hemoprotein ailesidir. Genellikle, çok bileşkenli elektron transport zincirlerinde terminal oksidaz olarak etki eder ve P450 içeren monooksijenaz sistemi olarak adlandırılırlar (Lu ve Levin 1974, Arınç ve Philpot 1976, Lieber ve diğ 1997). Bu enzimler, yüksek miktarlarda hepatositlerde bulunmaktadır ancak akciğer, barsak, böbrek ve beyin gibi ekstrahepatik dokularda düz endoplazmik retikulum içerisinde de büyük ölçüde yer almaktadırlar. Endojen olarak sentezlenen birçok bileşik, sitokrom P450 enzimlerinin substratı olarak görev yapmaktadır ve bu bileşikler ilaçlarla birlikte besinlerle, enjeksiyonla, solunum yoluyla veya deriden direkt absorpsiyonla vücuda giren endüstriyel maddelerdir (Benet ve diğ 1996). Sitokrom P450'ler endojen ve ekzojen bileşiklerin metabolizmasında önemli olan Faz I enzimlerinin bir ailesini teşkil ederler (Gonzales ve Yu, 2006). Bunlar bakterilerden memelilere kadar çalışılmış tüm türlerde bulunan, yapısal ve fonksiyonel olarak benzer hemoproteinler içeren bir gen süper ailesinin üyesidir (Nelson ve diğ 1996, Werck-Reichhart ve Feyereisen 2000).

Prokaryotik enzimler çözünebilir bir hemoprotein iken, yüksek organizmalarda membrana bağlıdır. Memelilerde, mitokondriyal iç membranda ve endoplazmik retikulum membranlarında yerleşmiştir (Werck-Reichhart ve Feyereisen 2000).

Sitokrom P450 sistemi, katalitik fonksiyonları bilinmeden önce spektral özellikleri ile tanımlanan proteinlerden oluşmuştur. Bu gruptaki proteinlerin benzersiz bir absorbanans spektrumu vardır. Genellikle mikrozom olarak adlandırılan endoplazmik retikulum veziküllerinden hazırlanan süspansiyondan karbondioksit gazı geçirildikten sonra sodyum ditiyonat gibi indirgeyici bir ajan eklenince spesifik bir absorbanans spektrumu elde edilir. Bu işlem sırasında indirgenmiş hem proteinine CO bağlar ve 450 nm’de pik yapan absorbanans spektrumu elde edilir. Bu pigmentlere P450 adı, 450 nm’de absorbanans gösterdiği için verilmiştir (Şekil 1.1). Spesifik P450 formları, 446 ile 442 nm arasında maksimum absorbanans veren dalga boylarına sahiptir.



Şekil 1.2: Sitokrom P450'nin Absorbans Spektrumu

İnsanlarda ve diğer çoğu memelide P450'ler; steroid hormonların biyosentezi, antibiyotikler, karsinojenler, organik çözücüler, boyalar, pestisitler, alkoller, çevresel kimyasallar gibi ksenobiyotiklerin aktivasyonu ya da inaktivasyonu, doymuş yağ asitlerinin hücrel mesajcılara oksidasyonu, yağda çözünen vitaminlerin stereo ve bölge-özellikli metabolizması gibi reaksiyonların katalizlenmesinde önemli rol oynarlar (Arinc ve Philpot 1976, Porter ve Cooni 1991, Oleksiak ve diğ 2002).

Sitokrom P450 tarafından katalizlenen genel reaksiyon aşağıdaki gibidir.



Reaksiyonda substrat (R) alkan, aromatik halka ya da heterosiklik süstitüentler gibi oksijenasyon için olanak veren bir bölgeye sahiptir. Substrata, iki oksijen atomundan sadece biri katıldığı için bu reaksiyona monooksijenasyon

reaksiyonu ve bu enzimlere de sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri adı verilmektedir.

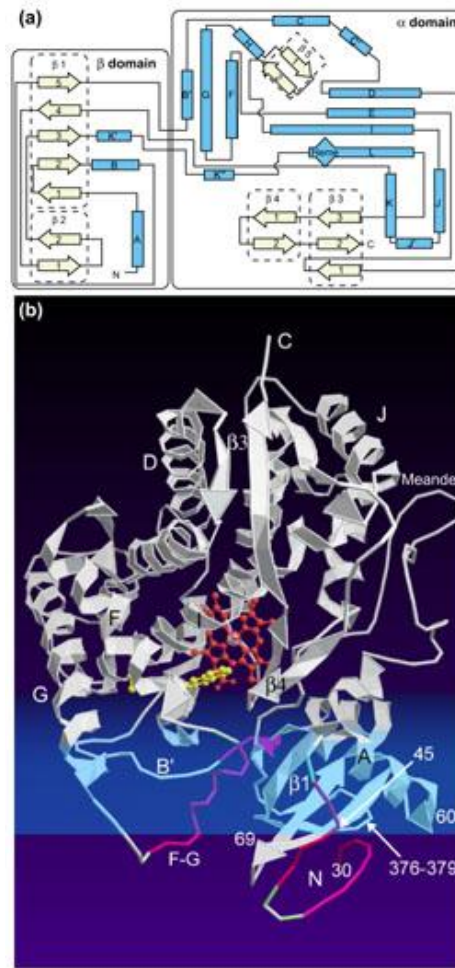
Spesifik detoksifikasyon reaksiyonları, çeşitli diyetel veya ksenobiyotik bileşenlerin varlığında, organizmanın yaşı ve cinsiyetine, genetik yapısına ve yaşam tarzındaki alışkanlıklarına bağlı olarak ya indüklenmekte ya da inhibe olabilmektedir. Hem endojen hem de ekzojen bileşikler tarafından çeşitli sitokrom P450'lerin indüklendiği 1960'lı yıllardan beri bilinmektedir. Bazı hastalık durumlarında detoksifikasyon aktiviteleri indüklenirken diğer bazı koşullarda bu aktiviteler inhibe olmaktadır. İnhibisyon iki veya daha fazla bileşenin aynı detoksifikasyon enzimi için yarışmasından olabilir. Bazı bileşenler sadece bir detoksifikasyon enzimini seçici olarak inhibe ederken bazıları tüm sitokrom P450 faz I enziminin aktivitesini inhibe etmek için sitokrom P450'nin reaktif bölgesi olan hem demirine direk olarak bağlanırlar. Bazı faz II enzimlerinin genel inhibisyon mekanizması ise gerekli kofaktörlerin eksikliğine dayanmaktadır (Liska 1998).

Sitokrom P450 proteinlerinin aktif bölgesi hidrofobik etkileşimlerle bağlanmış tek bir demir protoporfirin IX içerir ve oluşan hem proteininde hem bir oksijen molekülünün hem de substratların (RH) bağlanabileceği bölgeleri vardır. Hem grubu demir atomunun beşinci ligandı, sistein kalıntısından sağlanan tiyolat anyonudur ve P450'lerin olağandışı spektral ve katalitik özelliklere sahip olmasını sağlar. Altıncı ligand yer değiştirebilen su molekülü tarafından kullanılmaktadır. Substrat katalizinde demirin indirgenmesi reaksiyonunda oksijen altıncı konuma bağlanmaktadır (Porter ve Coon 1991).

Sitokrom P450 proteinleri arasındaki sekans benzerliği hayli düşüktür (%20'den daha az) ve yalnızca tamamen korunmuş 3 aminoasit içerirler. En yüksek yapısal korunmuş bölge, hem protein çevresinde, oksijen aktivasyonu ve elektron-proton transferlerinin genel bir mekanizmasını yansıtan merkez proteinindedir. Bu korunmuş merkez bölgesi 4 heliks demeti (D, E, I ve L), paket, J ve K heliksleri, 2 set  $\beta$  plaka ve bir oyuk yapısından oluşmuştur. Bu bölge; hem demire beşinci ligand şeklinde bağlanan ve mutlak korunan sistein kalıntısı yanı sıra L heliksinden hemen önce hem yapısının proksimal yüzeyinde yerleşmiş olan karakteristik P450 dizisini (Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cyc-X-Gly) kapsayan hem bağlanma boşluğunu 'loop'; K heliksi içerisinde yer alan ve merkez yapısını stabilize ettiği düşünülen, mutlak

korunmuş Glu-X-X-Arg motifini; hem proteinin distal bölgesinde proton transfer oluşunu oluşturan ve P450 imgesi olarak kabul edilen (Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser) L heliksinin merkez bölgesini içerir (Şekil 1.3) (WerckReichhart ve Feyereisen 2000).

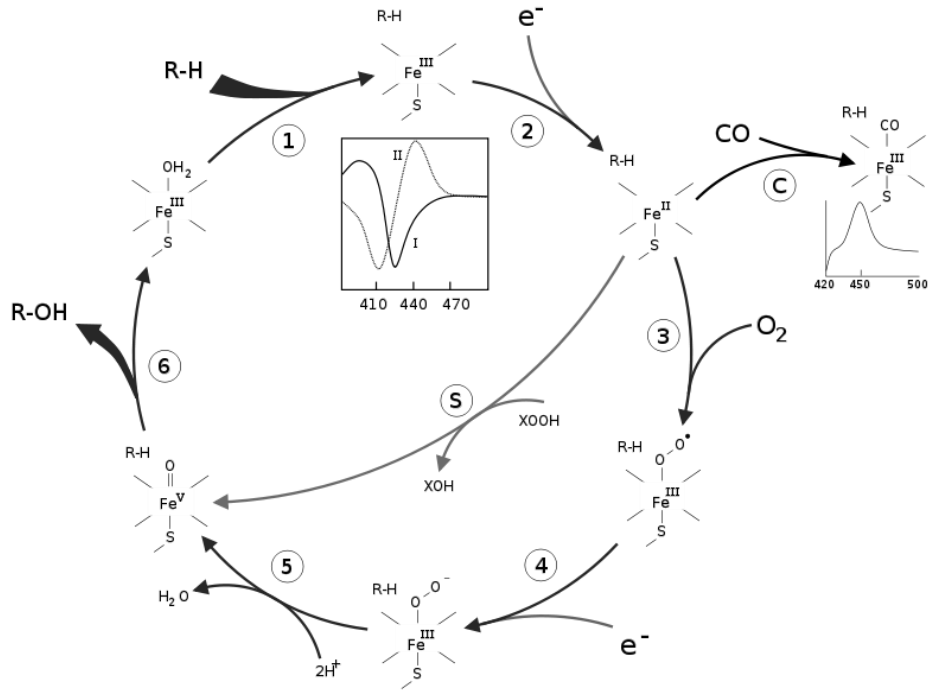
Şekil 1.3'te heliks yapıları (a) etiketi ile ve CYP2C5'in katlanmış yapısı ile proteinlerin ER (Endoplazmik retikulum) zarındaki etkileşimi (b) gösterilmektedir. Turuncu-sarı renklere sahip tabaka Hem grubunu işaret etmektedir (WerckReichhart ve Feyereisen 2000).



Şekil 1.3: ER zarında CYP2C5'in katlanmış yapısı ile proteinlerin ilişkisi

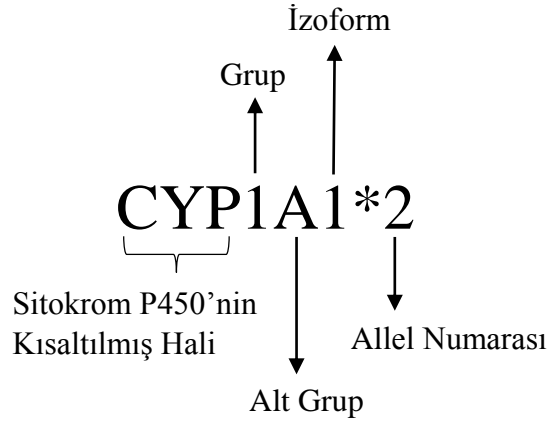
Genel olarak P450'ler reaksiyon döngüsüne girerler (Şekil 1.4). Bilinen tüm sitokrom P450'lerdeki hem demiri, porfirin halkasındaki 4 nitrojen atomuna ve 2 aksiyal liganda bağlıdır. Aksiyal ligandların birinde molekülün karboksil ucuna yakın yerleşmiş sistein kalıntısında bir sülfidril grubu bulunur. Çeşitli bileşiklerin oksidasyonu sırasında elektronlar NADPH'dan, NADPH Sitokrom P450 redüktaz tarafından sitokrom P450'ye transfer edilir. Hem demiri düşük ve yüksek spinli olmak üzere iki farklı spin durumunda bulunabilir. Düşük ve yüksek spinli durumlar demir atomunu çeviren elektronik alanlar olarak tanımlanabilir. Sitokrom P450 molekülü bir substrata bağlanınca bu elektronik alanlarda etkileşim meydana gelir ve hemdeki demir atomu düşük spinden yüksek spine geçer. Oksidasyon (monooksijenasyon) reaksiyon mekanizmasında, oksijenin hem demirine bağlanabilmesi için hemdeki demir ferik (Fe 3+) durumdan ferro (Fe 2+) duruma indirgenmelidir. Substrata bağlı, yüksek spin (-170mV), substrata bağlanmayan düşük spine (-270mV) göre daha fazla pozitif indirgenme potansiyeline sahip olduğu için Sitokrom P450, NADPH'dan elde edilen elektronlarla indirgenebilir durumdadır. İlk elektron transferiyle indirgenen sitokrom P450 daha sonra oksijenlenir ve NADPH'dan ikinci bir elektron oksijene bağlanarak, oksijen radikaline dönüştürülebilir. Bir iç oksidoredüksiyon neticesinde hidroksillenmiş substratın (ROH) ve suyun oluşumu gerçekleşir, serbest sitokrom P450 Fe +3 formunda rejenere olur. Monooksijenasyon reaksiyonunda toplam 2 elektron (e<sup>-</sup>) gereklidir. Elektronlar sitokrom P450 molekülüne tek tek transfer edilir (Schenkman, 1991). NADPH- sitokrom P450 redüktazdan sitokrom P450'ye elektron transferine lipitlerin yardımcı olduğu gösterilmiştir.





Şekil 1.4: P450 Sisteminin Katalitik Döngüsü (Meunier ve diğ 2004)

Günümüzde sitokrom P450'lerin omurgalı ve omurgasız hayvanlar, bitkiler ve bakterileride içeren ökaryot ve prokaryot organizmalarda bulunduğu gösterilmiştir. Sitokrom P450'lerin birçok reaksiyonu katalizlemelerinden dolayı enzimlerin isimlendirilmesinde sıradan metot yetersiz kalmış ve yapısal homolojiye dayanan sistematik bir adlandırma geliştirilmiştir (Şekil 1.5). Sitokrom P450 enzimleri baz dizilimi benzerliklerine, kontrol eden gen ailelerine ve substrat spesifikliğine göre sınıflandırılmaktadır. Bu adlandırma evrensel olarak kabul edilmiştir. (Nebert ve diğ 1987) Bu sistemde, CYP terimi sitokromun 'cytochrome' ilk iki harfini ve P450'nin ilk harfini temsil eder. Bu terim bir gen ya da sitokrom P450 gibi bir proteinin başlangıcının dizaynı için kullanılır. Aileyi belirlemek için rakamlar verilir ve bunu alt aileyi belirlemek için büyük harflerin kullanılması izler. Özgün P450'yi tanımlamak için rakamlar kullanılır. Günümüzde bilinen 18 memeli P450 gen ailesi 43 alt aileye bölünmüştür. Aynı ailenin üyeleri en az %40 homolog aminoasit dizisini paylaşır ve aynı alt ailenin üyeleri en az %55 homolog diziyi paylaşır. (Nelson ve diğ 1996)



Şekil 1.5: Sitokrom P450'lerin isimlendirilmesi

İnsanda bulunan 59 CYP450 izozimleri üç genel gruba ayrıştırılabilir. 1) Daha çok ksenobiyotik metabolizmasında yer alan CYP aileleri (CYP1-3), 2) Endojen metabolizmasında rol alan CYP aileleri (CYP5-51) ve 3) Yağ asitleri metabolizmasında ve kısmen ksenobiyotik metabolizmasında yer alan CYP4 ailesi. Bunlardan ilk grup günümüzde kullanılan ilaçların Faz I bağımlı metabolizmalarının yaklaşık % 70-80'ini gerçekleştiren sitokrom P450 enzimlerini içerir (Evans ve Relling 1999). Diyet, tür, genetik, yaş, fizyopatolojik şartlar ve çeşitli ajanlar sitokrom P450 enzimlerinin aktivite ve ekspresyon düzeylerini etkilerler. Sitokrom P450 ailesi 1A1, 1A2 ve 1B1 izoformlarını kapsar ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve heterosiklik aromatik aminler gibi prokarsinojenlerin aktivasyonunda ve biyotransformasyonunda önemli rol oynar (Sen ve diğ 2012). Akciğer kanseri (McLemore ve diğ 1990), kolorektal kanser (Sivaraman ve diğ 1994) ve meme kanseri (Jefcoate ve diğ 2000) gibi karsinojenik oluşumlarda CYP1 izoformlarının önemli rol oynadığı gösterilmiştir. CYP2E1 etanol ile indüklenebilen, küçük moleküler ağırlıklı bileşiklerin ve asetaminofen gibi yaygın olarak kullanılan ilaçların biyotransformasyonunda rol alan ve karsinojen (özellikle arilaminlerin) metabolizmasında hayli öneme sahip olan bir diğer CYP izoformudur. Ayrıca, aseton, asetat ve laurik asit, oleik asit gibi uzun zincirli yağ asitleri gibi endojen maddelerinde metabolizmasında önemli rol oynar (Lieber 1999). CYP1 izoformların aksine CYP2E1 transkripsiyonel kontrolün yanı sıra post-transkripsiyonel olarak da kontrol edilen ve bu anlamda CYP izoformları arasında farklılık gösteren bir izoformdur. Bu izoformun diyabet ve açlık gibi bazı patofizyolojik durumlarda indüklendiği bilinmektedir (Hong

ve diğ 1987, Arınç ve diğ 2005 ve 2007). CYP süper ailesinin insanda en fazla ifade edilen izoformu olan CYP3A4 bilinen terapötik ajanların %50'sinden fazlasının metabolizmasında yer alması nedeni ile de hayli önem arz eden bir diğ CYP izoformudur. CYP3A4 antibiyotikler (eritromisin), yatıştırıcılar (midazolam), bağışıklık sistemi ayarlayıcıları (siklosporin), anti-viral ilaçlar (ritonavir and saquinavir), antihistaminler (astemizole), kalsiyum kanal bloklayıcıları (nifedipine and verapamil), HMG KoA redüktaz inhibitörleri (lovastatin), uyarıcılar gibi birçok diğ ilacı metabolize eder (Martin ve Krum 2003, Arayne ve diğ 2005, van Herwaarden ve diğ 2005, Sica 2006, Sugimoto ve diğ 2006). Ayrıca bu izozim, testosteron, progesteron ve androstenedion gibi endojen maddelerin metabolizmasında önemli rol oynar (Yamazaki ve Shimada 1997, Wang ve diğ 2000).

#### **1.2.1.1.1 Sitokrom P4501A**

CYP1A alt ailesi şu ana kadar incelenen tüm memeli türlerinde bulunan iki genden oluşmaktadır. Bunlar; CYP1A1 ve CYP1A2'dir. Bu genler, daha önce sitokrom P448 olarak adlandırılmaktaydı. CYP1A1 ve CYP1A2, aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler ve diğ toksik kimyasallar gibi oksidasyon metabolizması ve dışarıdan alınan kimyasalların biyoaktivasyonunda rol almaktadır.

CYP1A1 ve CYP1A2'nin 3 metilkolantren (3-MC), benzo(a)piren (B(a)P), TCDD, dibenzofuranlar ve poliklorlu bifenillerin (PCBs) ortak indükleyicileri olduğu bilinmektedir. CYP1A1 ve CYP1A2 alt ailelerinin aminoasit sekansları %75 oranında benzerlik göstermektedir (Arinc ve diğ 1994). Dolayısıyla gen organizasyonu ve kimyasal özellikleri bakımından çok benzerdirler (Sogawa ve diğ 1985, Gonzalez 1990). Fakat kanserojen kimyasallar ve transkripsiyonel regülasyon mekanizmaları incelendiğinde katalitik özellikleri bakımından farklılık gösterirler. Örneğin; fare, sıçan ve tavşandan elde edilen sitokrom P4501A1'de yüksek benzo(a)piren (B(a)P) hidroksilaz aktivitesi gözlenirken CYP1A2'de bu aktivitenin sınırlı olduğu tespit edilmiştir (Yamazoe ve Kato 1992, Ioannides ve Parke 1993). Aynı zamanda CYP1A1'in ifadesi, kemirgenlerde polisiklik aromatik hidrokarbonların sebep olduğu kanser türleri ve diğ bozuklukların ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Nebert ve Jones 1989).

Memelilerde CYP1A1 ve CYP1A2 arasındaki bir diğer fark ise doku ekspresyonunda farklı görünmeleridir. CYP1A2 esas olarak karaciğerde ifade edilir. Öte yandan CYP1A1 esas olarak akciğer, lenfositler ve plasenta gibi karaciğer dışındaki dokularda ifade edilir (Arıncı 1993, Ding ve Kaminsky 2003, Shimada ve diğ 2003, Ionnides ve Lewis 2004, Bièche ve diğ 2007, Özkarslı ve diğ 2008).

Hayvanlarda, CYP1A1'in ifadesi karaciğer, böbrek, akciğer, deri ve ekstrahepatik dokularda indüklenebilirken CYP1A2'nin ifadesi ve indüklenebilmesi sadece karaciğer ile sınırlıdır. İnsanlarda ise sitokrom P4501A1 karaciğerde kayda değer oranda ifade edilmez ancak ekstrahepatik dokularda ve plesentada ifadesi indüklenebilir (Arinc ve Sen 1999).

#### **1.2.1.1.2 Sitokrom P4501A1'nin İndüksiyonunun Düzenlenmesi**

CYP450 sisteminin indüksiyonu, terapötik faktörlerin etkinliğini değiştirebilir. Bu enzimler hepatositlerde yüksek dozda bulunabilir ve lipofilik ilaçları hidrofilik bileşiklere dönüştürebilirler. Hidroksilasyon hızına bağlı olarak ilaçların inaktif hale gelmesi ve vücuttan atılma oranı artabilir. Ayrıca CYP450'lerin indüklenmesi ile toksik metabolitler ortaya çıkar ve bu metabolitler yüksek konsantrasyonlarda istenmeyen sonuçlara yol açabilir. Bazen de bu metabolitler az aktif olmasına rağmen biyotransformasyon sonrası daha aktif hale gelebilmektedir. Böyle durumlarda ise metabolitler daha toksik ve karsinogenik olabilmektedir (Spatzenegger ve Jaeger 1995, Renton 1986).

CYP1A, Sitokrom P450 aileleri arasında iyi karakterize edilmiş ve indüksiyonunun düzenlenmesi konusunda üzerinde çok çalışılmış bir gen ailesidir. Çünkü birçok kanser türünde etiyolojik açıdan değerlendirilmiş ve prokarsinogenlerin biyoaktivasyonunda etkili olduğu düşünülmüştür.

Uppstad ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, insan akciğer hücre hatlarında benzo(a)piren biyoaktivasyonunun CYP1A1 ve CYP1B1 gen ifadeleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmaya göre, benzo(a)piren, aril hidrokarbon reseptörünü (AHR) aktive ederek CYP1A1 genini indüklemektedir. Yani bir ligand ile aktive edilen transkripsiyon faktörü, CYP1A1 enzimini harekete geçirmektedir.

Yapılan alışmalar sonucunda, benzo(a)piren'in nihai bir kanserojen olduğu ve bunun biyoaktivasyonundaki en önemli enzimin CYP1A1 olduğu tespit edilmiştir (Uppstad ve diğ 2010).

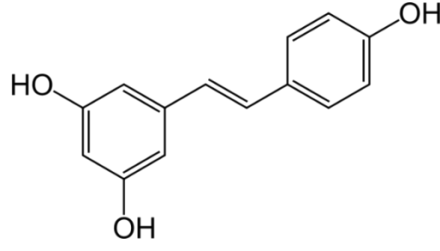
### **1.3 Flavonoidlerin Faz I ve Faz II Ksenobiyotik Metabolizması Enzimleri zerindeki Etkisi**

Daha önce belirtildiği gibi, flavonoidler bitkisel kökenli gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin alt sınıfıdır. Antioksidan zellikleri nedeniyle in vitro ve bazı hayvan çalışmalarında, tümör gelişiminin farklı evrelerinde engelleyici olarak kullanılmıştır. Ayrıca flavonoidler sebze ve meyvelerde çevresel stres faktörlerine karşı koruma sağlamaktadır.

Aşağıda, yaygın olarak kullanılan 7 farklı fenolik bileşiğin biyolojik zellikleri, Faz I ve Faz II Ksenobiyotik Metabolizması Enzimleri zerindeki etkileri ve yapılan deneysel çalışmalar detaylı olarak ele alınmıştır.

#### **1.3.1 Resveratrol**

Resveratrol, (trans-resveratrol, trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) başta üzüm olmak üzere pek çok farklı bitkide yer alan doğal bir fitoaleksindir. Fitoaleksinler, bitkilerde UV işını, hasar ve infeksiyonlara karşı gelişen ikincil yapılardır. Resveratrol, bitkilerde özellikle kırmızı zmde, yer fıstığında ve ananasta yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Resveratrol, siyah zmn soğuk hava koşulları, mantar enfeksiyonları gibi etkenlere bağlı olarak kendini korumak için ürettiği bir maddedir. Resveratrol'un cis- ve trans izomerik formları vardır, ancak cis-izomeri zmde tespit edilememiştir (Wood ve diğ 2010). Trans-resveratrol yapısı Şekil 1.6'da verilmiştir.



Şekil 1.6: Trans-resveratrol yapısı

Resveratrol'ün yararlı etkilerini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Resveratrol, koroner kalp hastalıklarına karşı koruyucu bir etkiye sahiptir. Yapılan başka bir araştırmaya göre de trombosit agregasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Resveratrol'ün yararlı etkileri, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve anti-koagülan özelliği ile sınırlı değildir. Resveratrol, aynı zamanda bir anti-kanser ajanıdır.

Farklı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara bakıldığında, resveratrolün, karsinogenezin önlenmesi ve geciktirilmesinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (Zulueta ve diğ 2015, Malhotra ve diğ 2015, Rotelli ve diğ 2015). Hücre kültürü yöntemiyle kinon redüktaz kaynaklı fare hepatoma hücreleri ve yine siklooksijenaz, hidroksiperoksidaz ve HL-60 kaynaklı insan promiyelositik lösemi hücrelerinin neden olduğu hücre farklılaşmalarını inhibe etmiştir. Ayrıca iki aşamalı fare deri kanseri modelinde anti-tümör özelliği olduğu gösterilmiştir.

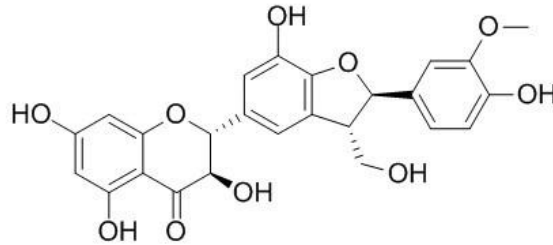
Resveratrol'ün sitokrom P4501A1 ifadesi üzerindeki etkileri daha önce yayınlanmıştı, ancak sonuçları tartışmalıydı. Çünkü, kültürlenmiş insan HepG2 hücrelerinde TCDD'den kaynaklanan P4501A1 mRNA transkripsiyonunun artışı inhibe etmiştir ancak insan HeLa hücrelerinde P4501A1 mRNA transkripsiyonunu uyarmıştır (Safe ve diğ 2001, 2002).

Mollerup S. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, insan bronş epitel hücreleri resveratrol varlığı ve yokluğunda benzo[a]piren ya da 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin ile tedavi edilmiştir. Bu da CYP1A1 ve CYP1B1'in resveratrol varlığında uyarılması ve inhibisyonunun doz ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Mollerup ve diğ 2001).

### 1.3.2 Silikristin

Silimarin, Deve dikenini'nden (*Silybum marianum*) elde edilen ve yıllardır araştırma konusu olmaya devam eden aktif bir bitki ekstresidir. Deve Dikeni ekstraktları %70–80 oranında silimarin içermektedir ve flavonoid yapısına sahiptir. Yapısı üç bileşenin karışımından oluşmaktadır: Silibinin, Silidianin ve Silikristin. Silikristin yapısı Şekil 1.7'de verilmiştir.

Bir flavonolignan olan Silimarin'in, antioksidan ve membran stabilize edici özelliği vardır. Çeşitli kimyasal ve doku yaralanmalarına karşı bitkinin organlarını korumaktadır ve potansiyel bir anti-hepatotoksik ajandır (Kazazis ve diğ 2014).

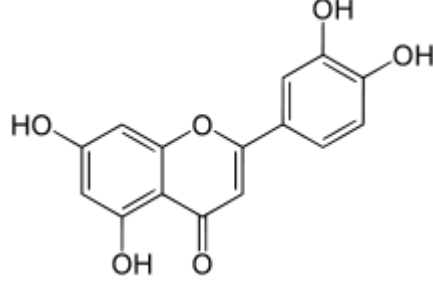


Şekil 1.7: Silikristin yapısı

Althagafy ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Hepatit C virüsü enfekte olmuş bir insan karaciğer kanseri hücresinde CYP2C9'un Silimarin flavonolignanları varlığında sitotoksikite ve inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Hepatit C virüsünün nispeten toksik olmayan ve zayıf inhibitörleri ile de karşılıklı test yapılan bu çalışmada Silimarin'in potansiyel bir inhibitör olduğu gösterilmiştir (Althagafy ve diğ 2013). Ayrıca, henüz Silikristin ile CYP1A1 üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

### 1.3.3 Luteolin

Luteolin, Süt sarmaşığı (*Cynanchum acutum*) bitkisinden izole edilmektedir. Sıklıkla yapraklarda olmak üzere kabuk, çiçek ve polende bulunan sarı, kristal görünüme sahip bir flavonoid türüdür. Luteolin yapısı Şekil 1.8’de verilmiştir.



Şekil 1.8: Luteolin yapısı

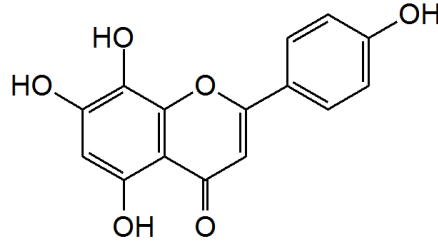
Luteolin’in gıdalardaki konsantrasyonu Kuarsetin veya Kaempferol gibi bazı flavonoidlere göre daha düşüktür, ancak Muhabbet Çiçeği (*Reseda luteola*) ve fıstık ağacının gövdesinde yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir.

Luteolin, günlük beslenmenin (1mg/gün’den daha az) bir parçası olup özellikle kanser araştırmalarında kullanılan popüler bir flavonoiddir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, luteolin alımı ve bazı kanser türlerine yakalanma riski arasında ters orantı olduğunu göstermektedir. Spesifik bir anti-enflamatuar ve anti-kanserojen etki göstermektedir (Ma ve diğ 2015, Cook ve diğ 2015, Lu ve diğ 2015).



### 1.3.4 Isoscutellarein

Isoscutellarein, *Sideritis libanotica* subsp. *linearis* bitkisinde bulunan bir flavonoid türüdür. Isoscutellarein yapısı Şekil 1.9’da verilmiştir.



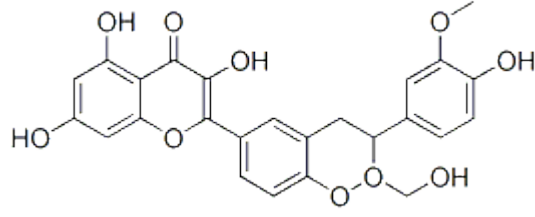
Şekil 1.9: Isoscutellarein yapısı

Nagai ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, influenza virüsü taşıyan farelerden oluşan bir deney grubuna isoscutellarein, intranazal ve oral olarak uygulandığında akciğerde virüsün çoğalmasını inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Nagai ve diğ 1992). Yine başka bir çalışmada iki farklı flavonoidin (apigenin ve isoscutellarein) antioksidan aktivitesi karşılaştırmalı olarak denenmiştir. Bu çalışmada Isoscutellarein’in antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Sadasivama ve Kumaresnb 2011).

### 1.3.5 Silimarin

Silimarin, daha önce belirtildiği gibi benzersiz bir flavonoid kompleksidir. Devedikeni sütünden elde edilen bu flavonoidin kullanım alanı oldukça geniştir. Öyle ki 17. yüzyılda yaşayan ünlü İngiliz bitki uzmanı Culpepper karaciğer ve dalak temizliği, sarılık ve safra taşı tedavisinde Devedikeni sütü kullanmıştır (Mayer ve diğ 2005). Silimarin yapısı Şekil 1.10’da verilmiştir.

Günümüzde ise özellikle Amerika Birleşik Devletleri’nde çiçek ve yaprakları salataya katılarak, tohumları ise kaynatılarak içecek olarak tüketilmektedir (Arthur 2000).

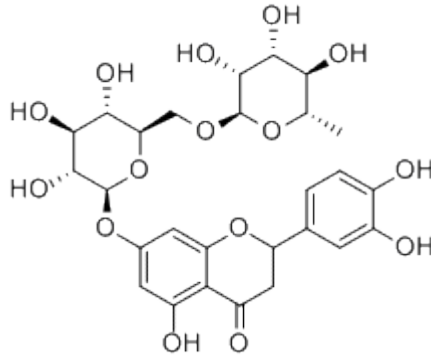


Şekil 1.10: Silimarín yapısı

Silimarín, özellikle bağırsaklarda bulunan serbest radikalleri yakalamaktadır. Mitokondri membran bütünlüğü ve spesifik olarak serbest oksijen radikallerini üreten enzimlerin inhibisyonunda büyük öneme sahiptir. Ayrıca, NF-κB yolaklarını inhibe ederek enflamatuvar yanıtların azaltılması, karaciğer toksisitesi ve çeşitli karaciğer hastalıklarında koruyucu etkilerin gelişmesinde etkilidir (Surai 2015).

### 1.3.6 Eriositrin

Eriositrin, Limon ve Misket Limonu meyve sularında bol miktarda bulunmaktadır ancak her iki meyveninde tohumunda bu maddeye rastlanmamıştır. Eriositrin yapısı Şekil 1.11’de verilmiştir.



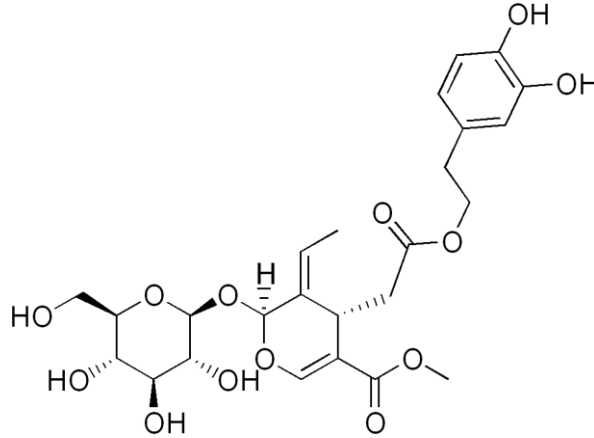
Şekil 1.11: Eriositrin yapısı

Eriositrin’in Limon’dan izole edilmesi ve antioksidatif aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada asit oto-oksidasyon sistemi üzerinde E vitamini ile birlikte denenmiş ve aynı antioksidatif etkiye sahip oldukları, sitrik asit ile birlikte kullanıldığında daha da etkili sonuçlar elde edildiği ifade edilmiştir (Yoshiaki ve diğ 1997).

### 1.3.7 Oleuropein

Oleuropein, 10-hidroksi-oleuropein, ligstroside ve 10-hidroksiligstroside gibi benzer bileşiklerle birlikte, zeytin ağacında bolca bulunan bir fitokimyasaldır. Bütün bu bileşikler elenolik asidin tirozol esterleridir (suyun ayrılmasıyla oluşan bileşikler). Oleuropein ve parçalanma ürünü olan hidroksitirozol çok etkili antioksidanlardır. Oleuropein yapısı Şekil 1.12’de verilmiştir.

Oleuropein sızma zeytinyağının acı ve keskin tadını veren maddedir. Bu acılık yapraklarda çok daha belirgindir. Oleuropein preparatlarının bağışıklık sistemini güçlendirici, kan basıncı ve kan şekerini düzenleyici farmakolojik etkileri tespit edilmiştir.



Şekil 1.12: Oleuropein yapısı

ABD’de yapılan bir hayvan çalışmada, oleuropeinin damarları genişlettiği ve bunun da kan basıncını düşürmeye yardımcı olduğu gösterilmiştir (Khayyal ve diğ 2002). Oleuropein’in antioksidan etki gösterdiği çok sayıda çalışma vardır (Somova ve diğ 2003, Carluccio ve diğ 2003, Turner ve diğ 2005, Al-Azzawie ve Alhamdani 2006, Jemai ve diğ 2008).

Oleuropein midede hızla parçalanarak (hidroliz) hidroksitirozol ve tirozol’e dönüşerek ince bağırsaklara geçer. Oleuropein bağırsaklardan emilerek kana geçemez. Hidrolize olmadan kalabilen oleuropein kalın barsaklarda bakteriler tarafından parçalanarak yine hidroksitirozol’e dönüştürülür. Fakat kalın bağırsaklarda her hangi bir emilim fonksiyonu yoktur.

İnsanlarda, kan hidroksitirozol seviyeleri ile ilgili ölçümlerde çıkan sonuçlara göre, hidroksitirozol, 32. dakikada kandaki en üst seviyesine ulaşır; buradaki yarı ömrü de yaklaşık olarak 3 saattir. Yani en önemli oleuropein ürünü olan hidroksitirozol yutulduktan yaklaşık ikibuçuk saat sonra kanda, vücuda alınabilen miktarının yarısına inmiştir (Corona ve diğ 2006).

## **1.4 Yapı Temelli İlaç Tasarımı**

Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı iki şekilde yapılabilmektedir. Bunlardan birincisi; Ligand Temelli İlaç Tasarımı'dır. Eğer ilacın vücut içerisinde etkileşime girdiği hedef protein yapısı bilinmiyorsa, SAR (Structure Activity Relationships) ve QSAR (Quantitative SARs) yöntemleri kullanılmaktadır. İkincisi ve bizim çalışmamızda da uyguladığımız gibi Yapı Temelli İlaç Tasarımı'nda ise hedef protein yapısı biliniyorsa moleküler dinamik, konformasyon analizi ve docking (kenetlenme) yöntemleri kullanılmaktadır (Klebe 2000, Mauser ve diğ 2008).

### **1.4.1 Protein Veritabanı**

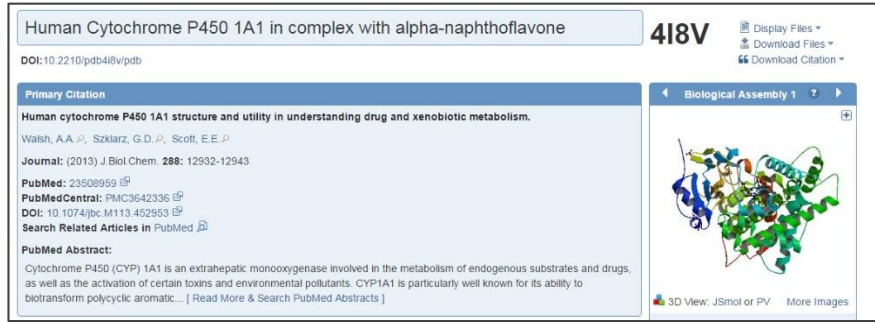
RCSB Protein Veritabanı (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Databank), biyolojik makro moleküllerin 3 boyutlu yapı bilgilerini işleyen ve dağıtan arşiv niteliğinde çok önemli bir kaynaktır (Berman ve diğ 2000). Arşivinde bulundurduğu 3 boyutlu yapılardan bazıları X-Ray, bir kısmı da NMR yöntemleriyle aydınlatılmıştır.

Protein veritabanında (Şekil 1.13) bulunan bir X-Ray yapısının çözünürlüğü (resolution) o yapı için ne kadar veri biriktirildiğinin bir göstergesidir. X-Ray çözünürlüğü Å (Angstrom) birimi ile ifade edilmekte ve sayı değeri ile gösterilmektedir. Sayı değeri düşük ise X-Ray çözünürlüğü yüksek olmaktadır (Lesk ve diğ 2001).



Şekil 1.13: Protein veritabanının ekran görüntüsü

Protein veritabanındaki yapılar belli bir dosya formatında depolanmaktadır (Şekil 1.12). Bu dosya formatı, kısaca PDB olarak adlandırılmaktadır. PDB dosyaları, makromoleküllerin atomik koordinatlarını, birincil ve ikincil yapı bilgilerini, kristalografik yapı faktörlerini ve NMR bilgilerini içermektedir. Protein veritabanında bulunan bu yapılar, gerek veritabanı içerisinde gerekse arama motorları aracılığıyla kolay erişilebilmesi için belli bir formatta adlandırılmaktadır. Şekil 1.14'te görüldüğü gibi alfa-Naphthoflavone bağlı CYP1A1 kompleksi 4I8V kodu ile adlandırılmıştır.



Şekil 1.14: Protein veritabanındaki dosya adlandırması

### 1.4.2 Moleküler Kenetlenme (Docking) Yöntemi

Kenetlenme işlemi, makromolekölün tahmin edilen aktif bölgesine ligand yapısının bağlanma konformasyonunu ve bağlanma sırasındaki yönelmenin tahminini içermektedir. Yani docking işlemi, makromoleköl ve ligand arasında bağlanma esnasındaki etkileşimleri ve hareketleri inceleyen bir programdır. Kenetlenme işlemi için üç boyutlu (3D) yapısı bilinen ligand ve proteinlere ihtiyaç duyulur (Xuan-Yu ve diğ 2011).

Kenetlenme çalışmasının, doğru yapısal modelleme ve aktivitenin doğru tahmini olmak üzere iki ana hedefi vardır. Günümüzde kenetlenme çalışmaları için birçok program mevcuttur. Bu programlar birbirlerinden farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar bir kenetlenme pozunu belirlemek için kullandıkları algoritma ve skorlama fonksiyonlarının farklılığından ileri gelmektedir. Bu programlardan bazıları, DOCK, AutoDock, Molegro Virtual Docker, Hex ve GRAMM'dır (Sousa ve diğ 2013).

Kenetlenme programlarında ligand ve hedef protein yapılarının esnekliği konusu gerçekleştirilmesi zor ve önemli konulardır. Kenetlenme terminolojisinde esneklik, ele alınan kimyasal yapının tüm konformasyonlarını içeren hesaplamalar yapmak demektir.

Günümüzde kullanılan kenetlenme programlarının çoğu ligand yapısını esnek olarak ele almaktadır. Protein yapısını ise esnek olmayan bir yapı olarak değerlendirmektedir. Bu farklılık proteinin tüm konformasyonlarının teker teker incelenmesinin ve bu konformasyonların her biri için kenetlenme hesaplamasının uzun ve zaman alıcı bir işlem olmasından kaynaklanmaktadır.

### 1.4.3 Kullanılan Docking Programları

CYP1A1 üzerinde yapılan bu çalışmada moleküler kenetlenme (docking) için AutoDock 4.2 ve AutoDock Tools programları kullanılmıştır.

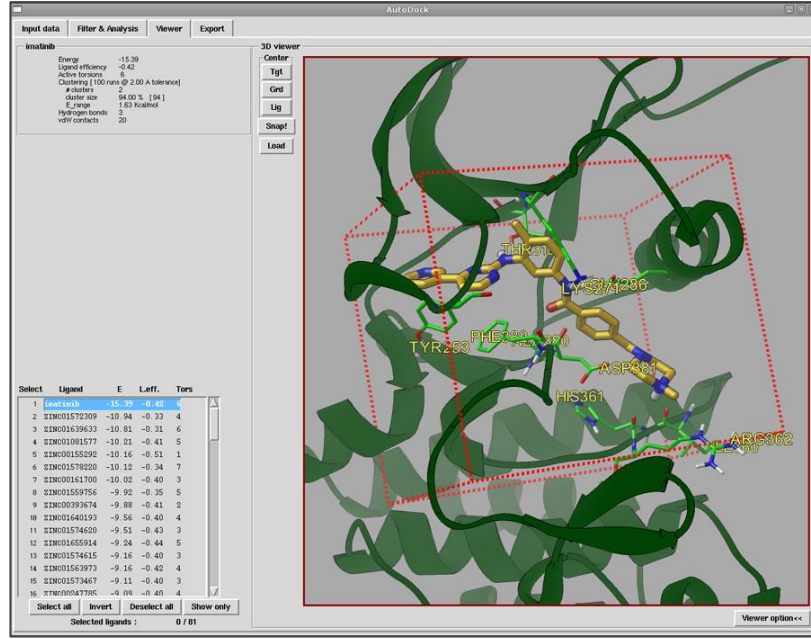
#### 1.4.3.1 AutoDock 4.2 ve AutoDock Tools

AutoDock programı, 1998 yılında Morris ve ekibi tarafından geliştirilmiş bir kenetlenme programıdır (Morris ve diğ 1998). Atom temelli bir kenetlenme metodudur. AutoDock, algoritma olarak genetik bir algoritma kullanmaktadır. Genetik algoritmalar ile molekülün enerji ve geometri bilgileri kullanılarak oluşturulacak bir sonraki konformasyon belirlenmektedir.

AutoDock ile kenetlenme işlemi yapılabilmesi için önce AutoGrid hesaplaması yapmak gerekmektedir. AutoGrid ile hedef molekül üç boyutlu (3D) bir küp içerisine (grid) yerleştirilmektedir. Daha sonra hedef moleküldeki tüm atom tipleri için afinite haritaları oluşturulmaktadır. Bu harita bilgileriyle AutoDock programı artık hedef proteini tanıyacaktır.

AutoDock programı makromolekül ve ligand arasındaki bağlanma enerjisini hesaplamada serbest enerji kuvvet alanı ( $K_i$ ) değerini kullanır. Bu kuvvet alanı  $K_i$  değerleri bilinen çok sayıda protein-ligand kompleksi ile parametrize edilmiştir. Tahmini enerji değerlerini hesaplayabilmek için hedef yapıların atomik afinite potansiyellerinin bir ön hesaplaması olan AutoGrid işlemi yapılmaktadır (Şekil 1.15). Bu hesaplamada, yapı üç boyutlu (3D) bir küp içerisine (grid) yerleştirilir ve hedef moleküldeki her atom için bir afinite değeri hesaplanır.

AutoDock, daha rahat kullanılması için grafiksel açıdan kullanıcı dostu bir arayüze sahiptir. Bu sayede özellikle grid box işlemi yapılırken kullanıcının daha rahat bir şekilde hesaplanacak alanı belirlemesine yardımcı olur.



Şekil 1.15: AutoDock arayüzü ve AutoGrid işlemi

## 1.4.4 Kullanılan Yardımcı Programlar

### 1.4.4.1 Avogadro

Avogadro, hesaplamalı kimya, moleküler modelleme, biyoinformatik, malzeme bilimi ve ilgili alanlar için tasarlanmış gelişmiş bir moleküler editör programıdır. Güçlü bir eklenti eklenti mimarisi sunan bu program sayesinde yüksek kalitede moleküler düzenleme yapılabilmekte ve tüm işletim sistemlerinde kullanılabilir. Bu çalışmada Avogadro, protein veritabanlarında bulunmayan moleküllerin çizimi ve docking için hazır hale getirilmesi amacıyla kullanılmıştır (Avogadro[online] 2015).



#### **1.4.4.2 Cygwin**

Cygwin, Microsoft Windows dağıtımları üzerinde çalışan bir UNIX simülatörüdür ve asıl amacı UNIX, Linux, BSD veya benzeri POSIX tabanlı sistemlerde yer alan yazılımların Windows işletim sisteminde çalışmasını sağlamaktır (Cygwin[online] 2015). Bash ise işletim sistemi için bir kabuk ya da başka bir deyişle komut dili yorumlayıcısıdır (Delorie ve Noer 1998).

Autodock ve yardımcı programları, Cygwin yazılım tabanı kullanılarak Linux dışındaki işletim sistemlerinde çalıştırılabilmektedir. Cygwin komut sistemi ve güncelleme paketleri, sitesinden alınmıştır.

#### **1.4.4.3 Chimera**

Chimera, “UCSF Computer Graphics Laboratory” tarafından geliştirilen bir interaktif görüntüleme ve moleküler yapıları modelleme programıdır. Bu program Ulusal Sağlık Örgütü (National Institutes of Health) tarafından finanse edilmektedir. Chimera ve altyapısı hükümet, kar amacı gütmeyen kuruluşlar ve kişisel kullanıcılar tarafından ücretsiz olarak kullanılabilir. Bu çalışmada Chimera; veritabanından indirilen ligand ve proteinlerin yapılarını düzenlemek amacıyla kullanılmıştır (Chimera[online] 2015).

#### **1.4.4.4 QuteMol**

QuteMol açık kaynak kodlu (open source) ve interaktif bir yüksek kaliteli moleküler görüntüleme sistemidir. QuteMol diğer moleküler görüntüleme sistemlerine göre daha yenilikçi görsel efektler sunmaktadır. Büyük moleküllerin veya karmaşık proteinlerin 3 boyutlu (3D) şekil ve yapısını daha kolay anlamak için geliştirilmiştir (QuteMol[online] 2015).

## 1.5 Çalışmanın Amacı

Günümüzde pek çok kanser hastası kimyasal ve ışınsal tedavi gibi konvansiyonel tedavilerin yanı sıra alternatif tedavileri de sıklıkla kullanmaktadırlar. Zaten birçok bitkinin insan sağlığı üzerine olan teröpatik etkisi şüphesiz asırlardır bilinmektedir ve son birkaç yüz yılda alternatif tedavi olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda teknoloji bakımından ileri seviyedeki toplumların bitkilere ve onlardan elde edilen özütlere olan ilgisi de, kuşkusuz diyetle alınan sebze ve meyvelerin içerdiği polifenoller hakkında yapılan bilimsel çalışmalar sayesinde artmıştır. Avrupa'da ve Amerika Birleşik Devletleri'nde olduğu gibi ülkemizde de lokman hekimcilik, son yıllarda bilimsel çalışmaların alternatif tıp üzerine yoğunlaşması ile hız kazanmaktadır. Hatta Avrupa'nın birçok yerinde bu bitkisel kimyasallar ana kaynağından saflaştırılarak ya da çeşitli preparatlar halinde veya diyetset katkı maddeleri olarak pazarlanmaktadır ve pek çok hastalığın alternatif tıpla tedavisinde kullanılmaktadırlar.

Alternatif tıpta kullanılan bitkiler sebze ve meyvelerde olduğu gibi çok sayıda aktif polifenol içermektedir ve bu bitkilerin sahip oldukları antikarsinojenik aktiviteleri bu maddelere bağlanmaktadır. Bu maddler antikarsinojenik etkilerini ilaçlar, karsinojenler gibi birçok değişik ksenobiyotiğin metabolizmasında rol alan enzimlerin eksoresyonlarını değiştirerek göstermektedir. Bu enzimlerden en önemlileri sitokrom P450 bağımlı ilaçları metabolize eden enzimlerdir. Sitokrom P450 (CYP) enzim sistemi, memelilerde, hem hastalık hem de sağlık durumunda önemli roller üstlenmektedir. Farklı sitokrom P450 enzimleri, steroid hormonların oluşması, terapötik ilaçların etki süresi ve şiddetinin düzenlenmesi, yağda çözünen vitaminlerin biyosentezi ve katabolizmasında rol oynaması, lipofilik özelliğe sahip ve vücutta birikmeye meyilli kimyasal maddelerin suda çözünür bileşikler haline getirilerek vücuttan atılması dışında hücre ve genetik materyallerde hasara sebep olan toksik metabolitleri de oluşturmakta dolayısıyla tümör oluşumundan da sorumludur.

Sitokrom P450'ler PAH'lar dahil çok sayıda çevresel kimyasal maddeyi toksik ve karsinojenik metabolitlere dönüştürür. Bu enzim sisteminin en önemli bileşeni olan CYP çok sayıda izozimi olup her biri farklı gen tarafından ifade edilmektedir (Nelson ve diğ 1996). CYP1 ailesinden CYP1A1 PAH'ları mutajenik ve karsinojenik etkili

metabolitlerine dönüştürür. Örneğin PAH'lardan biri olan benzo(a)pireni (BaP) güçlü karsinojenik metaboliti olan benzopiren 7,8-dihidrodiol-9.10-epoksite (BPDE) dönüştürmede CYP1A1 önemli görev üstlenir.

Bu bilgilerin ışığında çalışmanın amacı; literatürde *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, antiproliferatif, antitümör ve antioksidan etkinliği gösterdiği söylenen, fakat henüz moleküler etki mekanizmaları net olmayan fenolik bileşikler tarafından EROD aktivitesi ölçümleri ile CYP1A1 inhibisyon mekanizmasının araştırılmasıdır. Ayrıca bu maddelerin teorik olarak CYP1A1 nasıl bağlandıkları hakkında bilgiler docking çalışmaları ile ortaya konulacaktır. Bunun için, insan CYP1A1 ve NADPH sitokrom P450 redüktaz içeren bistonik plazmid bakterilerde ekspres edilmiş ve enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Çalışmada, resveratrol, silikristin, luteolin, isoscutellarein, silimarin, eriositrin ve oleuropein'in farklı konsantrasyonlarda aktiviteye etkisinin moleküler modelleme çalışmaları ile de desteklenerek araştırılması amaçlanmıştır. Meyve ve sebzelerin flavonoid bakımından zengin oldukları ve özellikle kansere yakalanma riskine karşı faydalı olabileceği söylenen flavonoidlerin, bu açıdan beslenmeye katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, flavonoidlerin ortaya konulmuş olumlu etkilerini desteklerse, kanser hastalarında diğer tedavilerin yanında destek tedavi olarak önemi vurgulanacaktır. Araştırma sonucunda elde edilecek verilerin doz belirleme, yeni bileşiklerin sentezi ve gelecekte yapılacak çalışmalara yön vermesi ve ışık tutması beklenmektedir.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1 Malzemeler

#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Sodyum Klorür (NaCl) (Merck, 1.06400), Maya Ekstresi, Tripton, Agar (Merck, 101,614), Ampisilin, (Bio Basic, DB0028), Kalsiyum Klorür CaCl<sub>2</sub>, S.O.C. Medium (Invitrogen, 15544-034), Gliserol (Sigma, G2289), Tris Asetat Tamponu (pH:7,6): 10 mM Tris-HCl, 0.2 M Sükröz, 0.5 mM EDTA, Lizozim (50mg/ml), Potasyum Fosfat Tamponu (pH:7,4): 0.1 M Potasyum Fosfat, 6mM Magnezyum Asetat, %20 Gliserol, 10mM 2-merkaptoetanol, Proteaz İnhibitör Tableti, 5-Aminolevulinik asit, Resorufin etil ester, BSA (Albumin from Bovine Serum) (Fluka, 62971), NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), DMSO (Dimetil sülfoksit), IPTG (İzopropil b-D-1-tiogalaktopiranosid), *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , İnsan CYP1A1 ve NADPH sitokrom P450 redüktaz genlerini içeren bistonik plazmid, CYP1A1 Antibody, Resorufin, Trans-resveratrol (Sigma, R5010).

#### 2.1.2 Kullanılan Cihazlar

Etüv (BINDER BD 115), Santrifüj (Sigma 3K30), (Sigma 1-14), Otoklav (NUVE OT 4060), (HICLAVE HVE-50), Agaroz Jel Elektroferez Aparatı (Thermo EC320), Poli Akrilamid Jel Elektroferez Aparatı (Owl P9DS), (Hooper miniVE SE 300-10A-1.0), UV Jel Görüntüleme Kabini (DNR LB 0605), pH Metre (Mettler Toledo MP 220), Vorteks (DragonLab MX-F), Su banyosu (Memmert WB-14), Isı bloğu (Biosan Dry Bloc Heating Thermostat TDB-100), Spektrofotometre (UV-1700 Shimadzu), (Analytik Jena Specord 200 UV-1601), (Thermo 1510), Terazi (Precisa XB 220A), (Mettler Toledo AB 265S), (Mettler Toledo PB 602-L), Çalkalamalı İnkübatör (Zticheng ZHWY-200B Incubator Shaker), Sonikatör (Bandelin Sonoplus), Manyetik Karıştırıcı (Velp AREX Heating Magnetic Stirrer).

### 2.1.3 Kullanılan Polifenoller

Araştırmalarda kullanılan polifenoller, ankırı Karatekin Üniversitesi Kimya Bölümü tarafından izole edilmiş ve saflaştırılmıştır.

Isoscutellarein, *S. libanotica* subsp. *linearis* bitkisinin toprak üstü kısmının metanol ekstraktından izole edilmiştir (Demirtas ve diğ 2011).

Silikristin ve Silimarin, *S. marianum* (Meryem ana dikeni) tohumlarından izole edilmiştir. Tohumların yağı hekzan ile ekstrakte edildikten sonra kalan tohum posası aseton ile tekrar ekstrakte edilmiştir. Elde edilen bu ekstrakt silika jel kolon ile ayrılmış ve her iki molekül de NMR ve MS ile aydınlatılmıştır (Bu çalışmanın sonuçları yayınlanmamıştır).

Oleuropein, zeytin ağacı yaprakları suda kaynatılarak elde edilmiştir. Bu sulu ekstrakt etil asetat ile sıvı-sıvı partisyonuna tabi tutulmuş ve etil asetat fazı yoğunlaştırdıktan sonra oleuropein maddesi metanol:formik asit (19:1) içerisinde kristallendirilerek saflaştırılmıştır (Bu çalışmanın sonuçları yayınlanmamıştır).

Eriositrin, *Mentha dumetorum* bitkisinin yapraklarından izole edilmiştir. Bitki yaprakları suda kaynatıldıktan sonra sulu ekstrakt etil asetat ile partisyona tabi tutulmuş ve bu faz kolon kromatografisi ile ayrılarak saflaştırılmıştır (Akşit ve diğ 2014).

Luteolin, *Cynanchum acutum* (Süt sarmaşığı) bitkisinin metanol ekstraktına uygulanan silika jel kolondan ile ayrılarak elde edilmiştir (Bu çalışmanın sonuçları yayınlanmamıştır).

Resveratrol (%99 saflıkta), ticari olarak Sigma firmasından temin edilmiştir.

## 2.2 Yöntemler

### 2.2.1 Kompetant Hücre Hazırlanması

Stoktan alınan ve 37°C'de gece boyunca büyütülmüş kültürden tek koloni seçildi. 1 L'lik erlenmayer şişesinin içerisine 100 ml LB besiyeri aktarıldı. 37°C'de 3 saat çalkalayıcı inkübatörde hücreler büyütüldü. Kültürün büyümesi her 20 dakikada bir 600 nm'de absorbansı ölçülerek kontrol edildi. OD<sub>600</sub> değeri 0,6'dan 1'e ulaşıncaya kadar inkübe edildi ve hücrelerin logaritmik büyüme fazına ulaşılması sağlandı. Hücreler, steril ve soğuk propilen tüplere aktarıldı ve 10 dakika boyunca buzda bekletildi. 4000 rpm'de 10 dakika boyunca 4°C sıcaklıkta santrifüjlendi ve süpernatant kısmı döküldü. Her pelet, buz üzerinde 2 ml 0.1 M CaCl<sub>2</sub> içinde çözüldü ve tek tüpte toplandı. Santrifüj işlemi tekrarlandıktan sonra buz üzerinde 10 ml'lik her kültür için 1.2 ml 0.1 M CaCl<sub>2</sub> + %15 gliserol içerisinde çözüldü. Elde edilen bakteri süspansiyonu 100 µl'lik alikotlar halinde ependorf tüplere bölündü ve -80 °C'lik dondurucuda saklandı.

### 2.2.2 CYP1A1 Bistronik Plazmid'in DH5α Transformasyonu

İnsan CYP1A1 ve NADPH sitokrom P450 redüktaz genlerini içeren bistronik plazmid Prof. Dr. F. Peter Guengerich tarafından sağlanmıştır (Parikh ve diğ 1997). Transformasyon işleminde kullanılacak olan Agar petri kapları bir gün önceden hazırlanarak kontaminasyon olup olmadığı test edildi. Bu amaçla; 20 petri kabı 5'erli olacak şekilde 4 grup folyolandı ve otoklav'a atıldı. Son hacmi 500ml olacak şekilde 5 g Tripton, 5 g NaCl, 2,5 g Maya ekstraktı ve 7,5 g Agar tartıldı ve dH<sub>2</sub>O içerisinde çözümlenerek LB (Luria-Broth) besiyeri hazırlandı. Daha sonra üzerine agar eklendi ve manyetik karıştırıcıda çözüldü. (50-60°C'de ısıtılarak.) LB sterilizasyon için otoklav'a atıldı. Sterilizasyon bittikten sonra LB'nin yaklaşık 30 °C'ye kadar soğumasını beklendi. 500 ml hazırlanan LB'nin üzerine 500 µl ampisillin eklendi ve iyice karışması sağlandı. Daha sonra taban yüzeyini kaplayacak şekilde petrilere döküldü ve gün boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Bu işlemin ardından petrilere +4 °C sıcaklıktaki dolaba kaldırıldı.

Transformasyon işlemi için plazmidi almaya hazır olan ve laboratuvarımızda hazırlanmış *E. coli* suşu olan DH5- $\alpha$  kullanılmıştır. Bunun için, 50  $\mu$ l DH5- $\alpha$  buz üzerine alındı ve çözünmesi sağlandı. Üzerine 5  $\mu$ l ve 1/300x seyreltilmiş CYP1A1 eklendi ve buz üzerinde 30 dakika kadar beklendi. Bu sırada 42 °C'de SOC medium ısıtılmaya başlandı. Daha sonra 45 saniye süreyle 42 °C'de ısı şoku yapıldı ardından tekrar buz üzerine alındı. Buz üzerinde 3 dakika beklendi. 42 °C'de ısıttığımız SOC medium'dan 250  $\mu$ l üzerine eklendi ve 45 dakika 37 °C'de çalkalamalı inkübasyona bırakıldı. Bu işlemden sonra hazırladığımız ampisilinli petri kaplarına yayma işlemi yapıldı. Son olarak 37 °C'de gece boyunca etüvde inkübasyona bırakıldı.

### **2.2.3 Bakteriyel Membran Hazırlanması**

Gece boyunca (overnight) bıraktığımız LB'den 1/2 oranında olacak şekilde (2ml'lik ependorfa) 1 ml LB ve 1 ml gliserol hazırlandı ve -80°C'deki dondurucuya kaldırıldı (stok amacıyla). Falcon tüpleri ile gece boyu bekletilen LB bitene kadar santrifüj işlemi tekrarlayıp (6000 rpm, 5 dakika) işlem sonunda kalan peleti tartıldı. Kuru ağırlığı 0.07'ye bölerek çıkan değer kadar üzerine A tamponu ilave edildi ve homojen olarak karışması sağlandı. Daha sonra bu değerın 2 katı kadar dH<sub>2</sub>O ve 0.1 mg/ml oranında lizozim eklendi. 30 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi ve ardından 40.000g'de 15 dakika santrifüj edildi. Bu işlemin ardından pelet dışında kalan kısım dökülerek B tamponu ve üzerine de proteaz inhibitörü tablet (1/4 büyüklüğünde) ilave edilerek homojen olarak karışması sağlandı. Daha sonra sonikasyon işlemi (15 dakika boyunca 1 dk işlem 30 sn bekleyerek) yapıldı ve son olarak 10.000g'de 20 dakika santrifüjden sonra süpernatant kısmı ependorflara bölünerek -80°C'deki dondurucuya kaldırıldı.

### **2.2.4 NADPH Bağımlı Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

NADPH bağımlı sitokrom P450 redüktaz aktivitesi, Masters ve arkadaşlarının metoduna göre spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Masters ve diğ 1976). Sitokrom c aktivitesinin belirlenmesi için, reaksiyon karışımının bileşenleri: 1 ml lik hacme

sahip bir kuartz küvet içerisinde 0.7 ml sitokrom c (1.1 mg/ml), değişik konsantrasyonlarda protein lizati ve 0.025 ml NADPH (3.3 mg/ml)'tan oluşmaktadır.

Deney, oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, NADPH ilavesi olmadan başlatılmış ve spektrofotometre 550 nm'de 1 dakika boyunca takip edilmiş ve böylelikle sitokrom c'nin otooksidasyon hızı belirlenmiştir. Son olarak, reaksiyon karışımına eklenen NADPH'ın neden olduğu absorbans 1 dakika boyunca takip edilmiştir. Enzim aktivitesi ekstinksiyon katsayısı olarak  $19.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  kullanılarak hesaplanmıştır.

### 2.2.5 Protein Tayini

Protein konsantrasyonu Lowry metodu ile belirlenmiştir (Lowry ve diğ 1951) Standart olarak BSA kullanılmıştır. Bu tayin için enzim kaynağı 50 defa seyreltilmiştir. Orijinal seyreltmeye ilave olarak, test tüpleri içinde 0.05 ml, 0.1 ml ve 0.2 ml alikotlar halinde seyreltme yapılmıştır. Bunların miktarları daha sonra damıtılmış su ile 0.2 ml nihai hacme tamamlanmıştır. Daha sonra 1 ml alkalın bakır reaktifi (%2'lik bakır sülfat, %2'lik sodyum potasyum tartrat ve 0.1 N NaOH ihtiva eden %20'lik sodyum karbonat sırasıyla 1:1:100 oranında) ile karıştırılmıştır. Bütün tüpler vorteks yardımıyla karıştırılmış ve alkalın ortamda bakır reaksiyonu gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 10 dakika beklenmiştir.

Bu esnada 2 N Folin Fenol Reaktifi (1 ml Folin ve 1ml dH<sub>2</sub>O 1:1 oranında) hazırlanmış ve her bir tüpe ilave edilmiştir. Vorteks yardımıyla karıştırılan tüpler oda sıcaklığında 30 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Oluşan renk yoğunluğu spektrofotometre aracılığıyla 660 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kristal sığır serum albümini kullanılarak hazırlanan standartlar (0.02, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mg/ml) için de aynı adımlar uygulanmıştır. Okunan değerler ile bir standart eğrisi oluşturularak eğim elde edilmiş ve protein konsantrasyonu aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Protein Konsantrasyonu} = \frac{\text{OD}_{660}}{\text{Eğim}} \times \frac{\text{Tüp İçi Seyreltme Faktörü}}{\text{Orijinal Seyreltme Faktörü}}$$



### 2.2.6 Western Blot Analizi

Elektroforez, iki fazlı akrilamid jel üzerinde gerçekleştirildi. Bu amaçla %8,5' luk ayrıştırma jeli ve %4'lük yükleme jeli, Tablo 2.2'de belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 2.2: Ayrıştırma ve yükleme jellerinin hazırlanması

Jel içeriği		Ayrıştırma jeli (%8,5)	Yükleme jeli (%4)
Akrilamid/ Bisakrilamid		2,85 ml	0,75 ml
Distile su		4,5 ml	2,5 ml
Tris-HCl Tamponu	pH 8.8	2,5 ml	
	pH 6.8		1,25 ml
% 10 SDS		0,15 ml	0,1 ml
APS		0.05 ml	0,025 ml
TEMED		0,0065 ml	0,005 ml

Cam plakalar, jelin döküleceği standlara yerleştirilip plakalar arasına önce ayrıştırma jeli arkasından yükleme jeli döküldü ve oda sıcaklığında sırasıyla 50 ve 20 dakika süreyle donmaya bırakıldı. Sonrasında ilk kuyucuğa molekül ağırlıkları bilinen proteinlerden oluşan markır, diğerlerine de protein miktarları Lowry yöntemiyle önceden tayin edilen numuneler jele yüklenerek elektroforez başlatıldı. 1X elektroforez tamponu varlığında, numunelerin ayrıştırma jeline kadar aynı anda toplanabilmesi için akım önce 10 mA'e, daha sonra asıl ayrıştırmanın olması için 15 mA'e ayarlanarak elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

Elektroforez sonunda cam plakaların arasından alınan jel, 1X transfer tamponu içerisinde nitroselüloz membran ile sandviçlendi. Bu amaçla kullanılacak olan nitroselüloz membran, süngerler ve filtre kağıtları soğuk 1x transfer tamponu ile önceden doyuruldu. Sandviç için, katottan anota doğru sırasıyla sünger, filtre kağıdı, jel, nitroselüloz membran, filtre kağıdı ve sünger sandviç aparatı içerisinde üstü üste yerleştirildi ve aparat sıkıca kapatıldı. Hazırlanan sandviçin anot kutbunun anotta, katot kutbunun da katotta olmasına dikkat edilerek Hoefer MiniVE transfer tankına yerleştirildi. Transfer işlemi 1X tamponu içerisinde +4°C'de 45 V ve 350 mA'de 90 dakika süresince gerçekleşti.

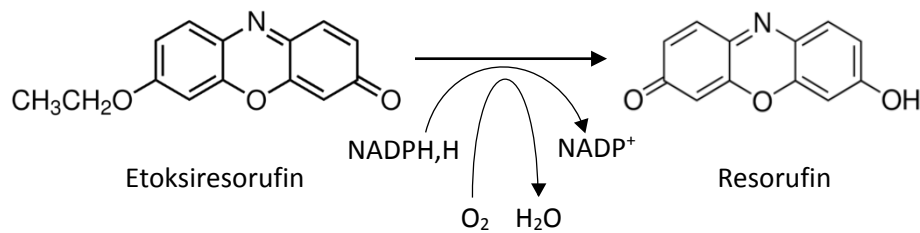
Transfer sonucunda sandviç aparatının içinden alınan membran, önce non-spesifik bağlanmaların engellenmesi amacıyla %5'lik bloklama solüsyonu ile oda

sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Daha sonrasında membran balık CYP1A1 primer antikoruna alınarak +4°C’de gece boyu bekletildi. Sonrasında işaretleyici enzim-alkali fosfataz (örneğin; anti-rabbit IgG- ALP konjugatı) ile bağlı olan ikincil antikorlarla 1 saat inkübe edildi.

Görüntüleme için membran, antikor bağlanan proteinlerin tespiti için Ey ve Ashman (1986) tarafından tanımlanan Alkalen Fosfataz (ALP) substrat çözeltisi (1,5 M Tris-HCl (pH 8.8), 1 M NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM ZnCl<sub>2</sub>, Dietanolamin, NBT (Nitroblue tetrazolium), PMS ve BCIP (5-bromo-4-kloro-indol-fosfat) ile inkübe edilmiştir. Görüntü elde edildikten sonra blot kurutularak folyoda saklanmıştır.

### 2.2.7 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Aktivitesinin Belirlenmesi

7-etoksiresorufin-O-deethylase (EROD) aktivitesi, sitokrom P4501A (CYP1A) izoenzimlerinin poliaromatik hidrokarbonlar tarafından indüklenmesi konusunda yaygın olarak kullanılmaktadır. EROD en hassas biyokimyasal belirteçlerden biridir ve aktivite düzeyindeki artış çevre kirliliği ve polisiklik hidrokarbonlara maruz kalındığını işaret etmektedir. Moleküler oksijen ve NADPH varlığında monooksijenazlar tarafından Etoksiresorufin Odeethylase reaksiyonunun katalizlenmesi Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.2: Etoksiresorufin Odeethylase reaksiyonunu

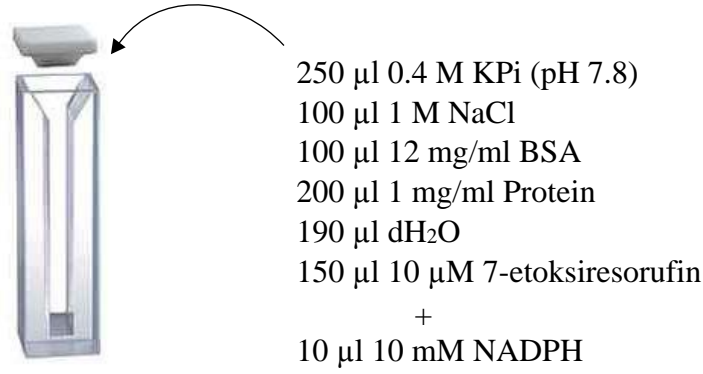
EROD aktivitesinin belirlenmesi için, reaksiyon karışımının bileşenleri Tablo 2.3’de verilmiştir. Şekil 2.3’de de gösterildiği gibi, tipik bir reaksiyon karışımı, 1 ml lik hacme sahip bir kuartz küvet içerisinde 0.2 M NaCl, 1.2 mg BSA, 1.5 mM 7-

etoksiresorufin, 1 mg/ml protein, 0.5 mM NADPH ve 0.1 M potasyum fosfat tamponundan (pH 7.8) oluşmaktadır.

Deney, oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, NADPH ilavesiyle başlatılmış ve spektrofotometre 535 nm (uyarma) ve 585 nm (emisyon) arasında 2 dakika boyunca takip edilmiştir (Hitachi, F-2000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japonya) Son olarak, miktarı bilinen resorufin standart olarak reaksiyon karışımına eklenmiş ve floresanstaki artış kaydedilmiştir. Enzim aktivitesi, resorufinin neden olduğu floresan artışı kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 2.3: EROD aktivitesi ölçmek için reaksiyon karışımının bileşenleri

<b>Bileşenler</b>	<b>Stok Solüsyonlar</b>	<b>Hacim (ml)</b>	<b>Son Konsantrasyon</b>
Potasyum Fosfat Tamponu (pH 7.8)	0.4 M	0.25	0.4 M
Sodyum Klorür	1 M	0.1	1 M
BSA	12 mg/ml	0.1	1.2 mg/ml
Etoksiresorufin	10 µM	0.15	1.5 µM
NADPH	10 mM	0.01	1 µM
Enzim Kaynağı	Protein konsantrasyonuna bağlı olarak değişmekte	0.2	100 µg
Distile Su		0.19	



Şekil 2.3: EROD ölçümü için reaksiyon karışımının bileşenleri

### 2.2.7.1 EROD Aktivitesi ile Flavonoidlerin Etkilerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılan bütün fenolik bileşikler (resveratrol, silikristin, luteolin, silimarin, isoscutellarein, oleuropein, eriositrin) %25'lik (h/h) DMSO içinde çözülmüştür.

Flavonoidlerin stok çözeltileri, DMSO içinde hazırlanmıştır ve flavonoid tarafından önlenme riskine karşı DMSO-kontrol ölçümleri ile karşılaştırılmıştır. Flavonoidlerin etkisi Tablo 2.3'de gösterilen reaksiyon karışımına çeşitli konsantrasyonlarda eklenerek incelenmiştir. Flavonoid ilave edildikten sonra, reaksiyon karışımı karıştırılmış ve oda sıcaklığında (25°C) 5 dakika inkübe edilmiştir. Son olarak reaksiyon, NADPH ilavesiyle başlatılmış ve spektrofotometre 535 nm (uyarma) ve 585 nm (emisyon) arasında 2 dakika boyunca takip edilmiştir.

IC<sub>50</sub> değerleri, GraphPad Prism 5.0 ve ICEstimator uygulaması yardımıyla (%50 inhibisyon sağlayan konsantrasyon), logaritmik inhibitör (flavonoid) konsantrasyonlarına karşı lineer regresyon (kontrol yüzdesi) ile belirlenmiştir (ICEstimator[online] 2015, GraphPad Prism 2015). IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandıktan sonra, üç farklı flavonoid konsantrasyonu seçilerek inhibisyon mekanizması çalışılmıştır. Bu çalışmanın detayları "BULGULAR" kısmında ele alınacaktır.

## 2.2.8 Docking Metodu

Docking metodu, AutoDock programı kullanılarak yapılmıştır. Bu program ile protein veri bankasında bulunan ve Avogadro aracılığı ile çizilen tüm polifenol yapıları test edilmiştir.

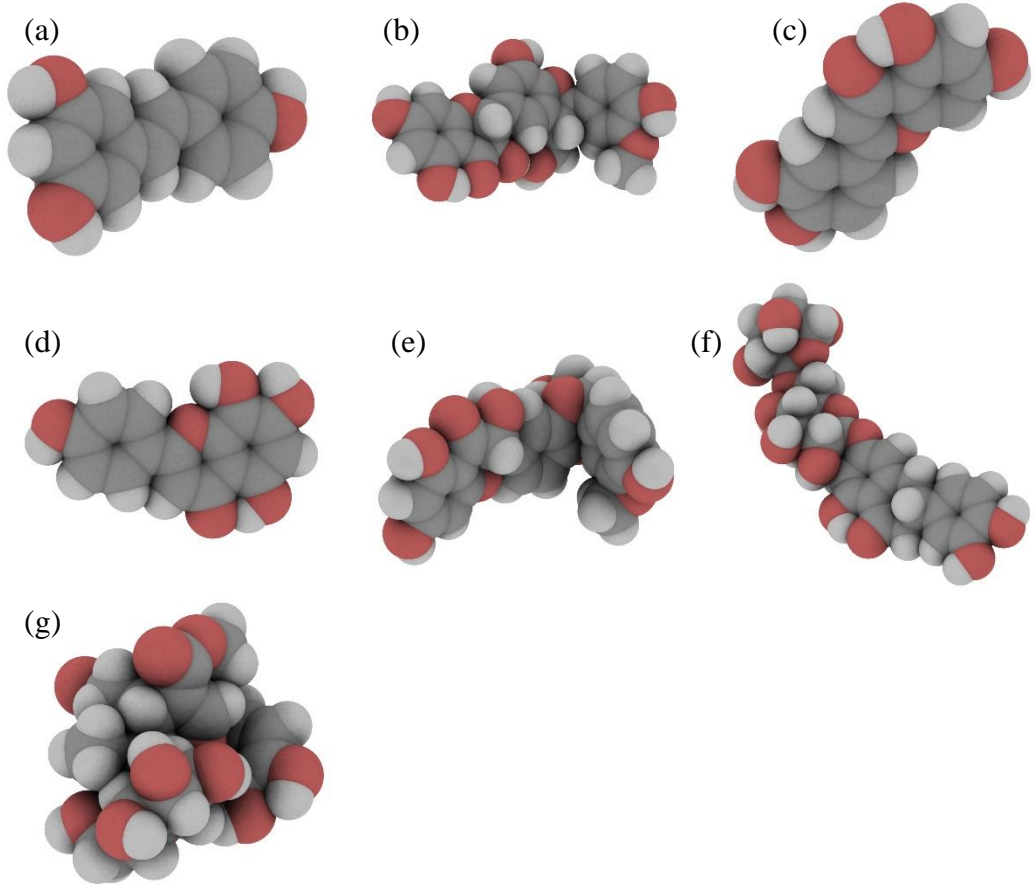
### 2.2.8.1 İnhibitör Yapılarının Oluşturulması

İnhibitör yapıların bir kısmı, protein veri bankası üzerinden hazır olarak indirilmiş bir kısmı da Avogadro programı kullanılarak çizilmiştir. Bu inhibitör yapılarını belirlerken; öncelikle bu yapıların çözünürlüklerinin yüksek olması, beslenme yoluyla alınması ve literatür araştırması yapıldığında potansiyel ilaç yapıları elde etmek için kullanılabilir yapılar olması etkili olmuştur. Bu moleküller Tablo 2.4'te verilmiştir.

Tablo 2.4: Moleküllerin özellikleri

Molekül Adı	Formülü	Moleküler Ağırlığı
Resveratrol	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	228.24328 g/mol
Silikristin	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	482.43618 g/mol
Luteolin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286.24 g/mol
Isoscutellarein	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286.23 g/mol
Silimarin	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	482.44 g/mol
Eriositrin	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	596.53398 g/mol
Oleuropein	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>13</sub>	540.51 g/mol

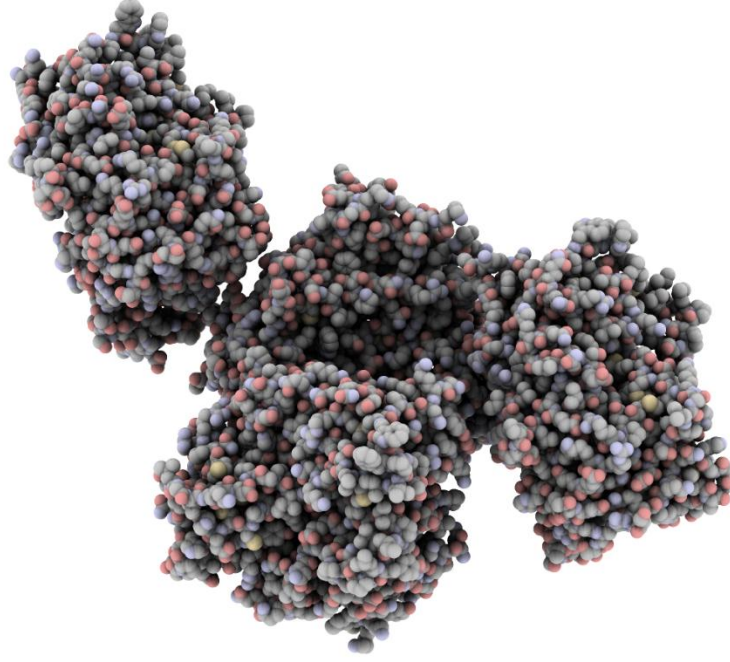
Ayrıca moleküllerin yapıları, RCSB Protein veri tabanı ve PubChem kimya veritabanı üzerinde incelenmiş ve QuteMol programı aracılığı ile üç boyutlu (3D) olarak modellenmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: İnhibitör moleküllerin QuteMol ile çizilmiş üç boyutlu yapıları (a) Resveratrol (b) Silikistin (c) Luteolin (d) Isoscutellarein (e) Silimarin (f) Eriositrin (g) Oleuropein

### 2.2.8.2 CYP1A1 Yapısının Hazırlanması

Daha önce bahsedildiği gibi protein veri bankasında 4I8V kodu ile paylaşılan alfa-Naphthoflavone bağlı CYP1A1 kompleksi pdb formatında indirilmiştir. Chimera programı yardımıyla Şekil 2.5'te gösterildiği gibi CYP1A1, alfa-Naphthoflavone yapısından ayrılmış ve üç boyutlu (3D) olarak modellenmiştir. Daha sonra docking işleminde kullanılmak üzere tekrar “.pdb” formatında kaydedilmiştir.



Şekil 2.5: CYP1A1'in QuteMol ile çizilmiş üç boyutlu yapısı

Daha sonra, CYP1A1 makromolekülünden pdb2pqr sağlayıcısı (Baker ve diğ 2007) kullanılarak su molekülleri uzaklaştırılmış ve dosyalar “.pqr” formatına dönüştürülmüştür. Bu işlem hedef molekül için girilen pH değerine göre uygun torsiyon açıları ve protonlanma basamaklarının ayarlanması için yapılmaktadır. Daha sonra, yapı AutoDock araçları ile tekrar “.pdb” formatına dönüştürülmüş ve kenetlenmeye uygun hale getirilmiştir.

### **2.2.9 AutoDock ile Docking Hesaplamaları**

Autodock ile docking yapmak için önceden .pdbqt formatı ile kaydedilen ligandlar (inhibitörler) ve CYP1A1 (makromolekül) yapısı Autodock arayüzü olan Autodock Tools programı ile açılmaktadır. Grid parametre bilgilerini içeren dosya da yüklenerek docking için kullanılacak grid hesaplaması yapılır. Bu hesaplama sonucunda elde edilen veriler docking hesaplamasının temelini oluşturmaktadır.

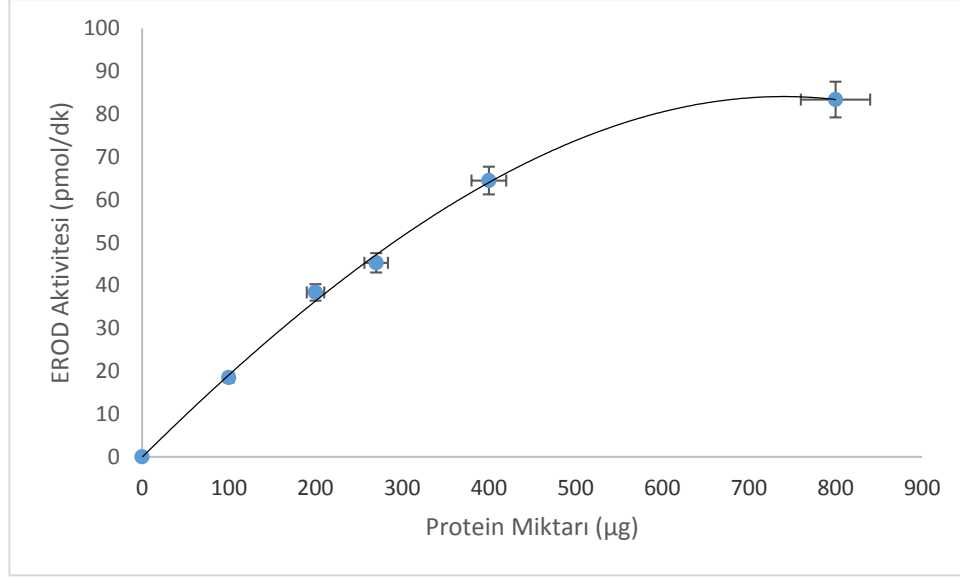
Docking işlemi için Autodock programında genetik algoritma seçilmiştir. Genetik algoritma, docking aşamasında makromolekül ve ligand yapısının doğal ortamını taklit edilmesini sağlayan ve bu ortamın içerisinde yapıları gerçek ortamında da birbirleriyle oluşturacakları etkileşimleri belirleyen algoritmadır. Tüm parametreler girildikten sonra AutoDock docking hesaplamasına başlanmıştır. Bu docking parametreleri makromolekül ve tüm ligandlar için sabit tutulmuştur.

## **3. BULGULAR**

### **3.1 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Aktivitesinin Ölçülmesi**

EROD aktivitesi ile flavonoidlerin etkilerini araştırmaya başlamadan önce, enzimin stabilitesini incelemek ve uygun konsantrasyonu bulmak için çok sayıda ön çalışma yapılmıştır. Bu ön çalışmalar kinetik ölçümlerin temelini oluşturmaktadır. Stabilite çalışmalarında, seyrelttiğimiz enzim kaynağının CYP1A1 ilişkili EROD aktivitesi, belirli zaman aralıkları ile belirlendi ve protein konsantrasyonun 100µg olduğu çalışmalar daha uygun bulunmuştur (Şekil 3.1).



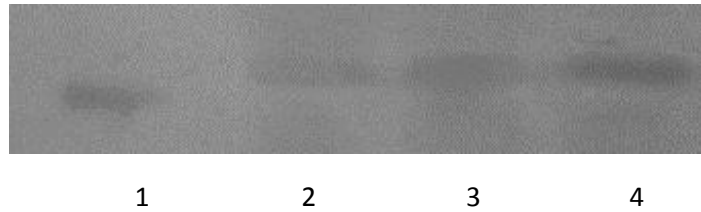


Şekil 3.1: Protein miktarının EROD aktivitesine etkisi

Her deneyin sonunda, kontrol aktivitesi yeniden ölçülmüş ve başlangıçtaki kontrol aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. Bu arada, seyreltilmiş enzimin stabilitesi de sürekli kontrol edilmiştir.

### 3.2 Protein İçeriği Analizi (Western Blot Analizi)

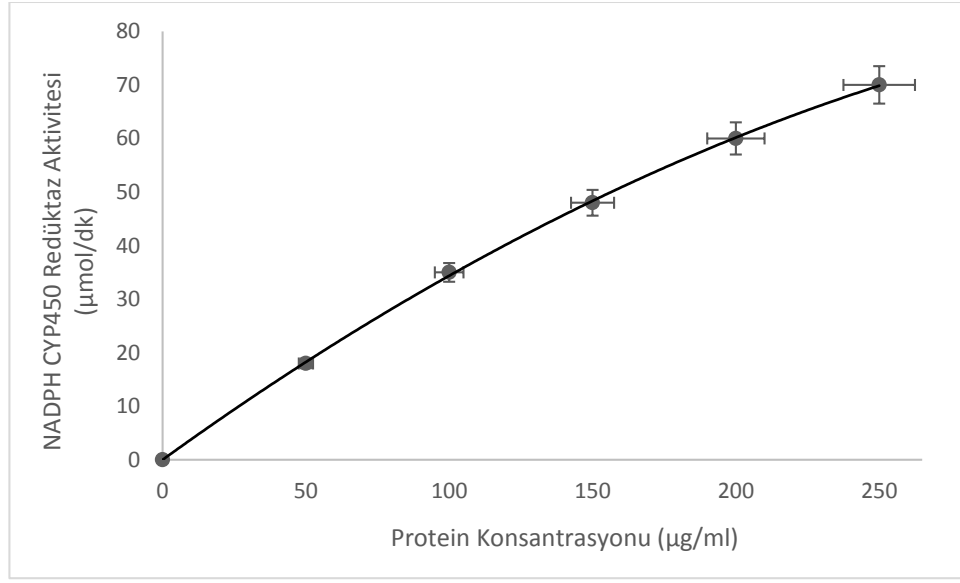
*E. coli* üzerinde üretilmiş sitokrom P4501A1'e karşı üretilmiş poliklonal birinci antikor ve anti-rabbit IgG-ALP konjuge sekonder antikor kullanılarak CYP1A1 proteininin eksprese edilip edilmediği belirlenmiştir. Western blot analizi Şekil 3.2'de verilmiştir. Görüldüğü üzere 56.000 kDa'da bir protein bandı vardır. Bu bistonik proteinin eksprese edildiğini göstermektedir.



Şekil 3.2: P4501A immünokimyasal tespiti. 1) Ladder 2) Rat Mikrozom 3) 20ug CYP1A1 içeren bakteri lizatı 4) 40ug CYP1A1 içeren bakteri lizatı

### 3.3 NADPH Bağımlı Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesinin Ölçülmesi

EROD aktivitesi üzerinde çalışmaya başlamadan önce, insan CYP1A1 ve NADPH sitokrom P450 redüktaz içeren bistonik plazmidin eksprese olup olmadığını anlamak ve stabilitesini kontrol etmek için redüktaz aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Bu ön çalışmalar neticesinde, Şekil 3.3'te gösterildiği gibi NADPH bağımlı sitokrom P450 redüktaz aktivitesi 100 µg enzim konsantrasyonuna kadar lineer bir artış göstermektedir.



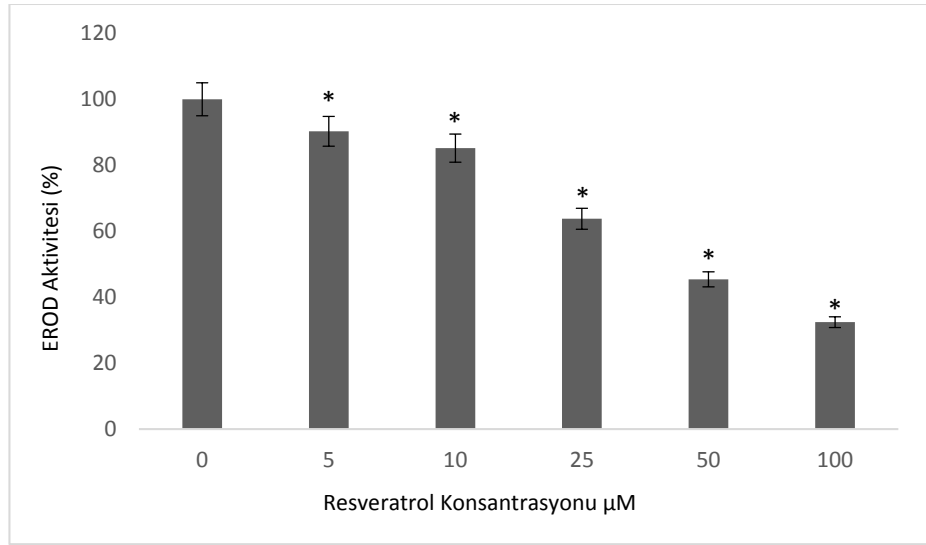
Şekil 3.3: NADPH Bağımlı Sitokrom P450 Redüktaz Aktivitesi

### 3.4 Flavonoidlerin CYP1A1 Bağımlı EROD Aktivitesi Üzerine Etkileri

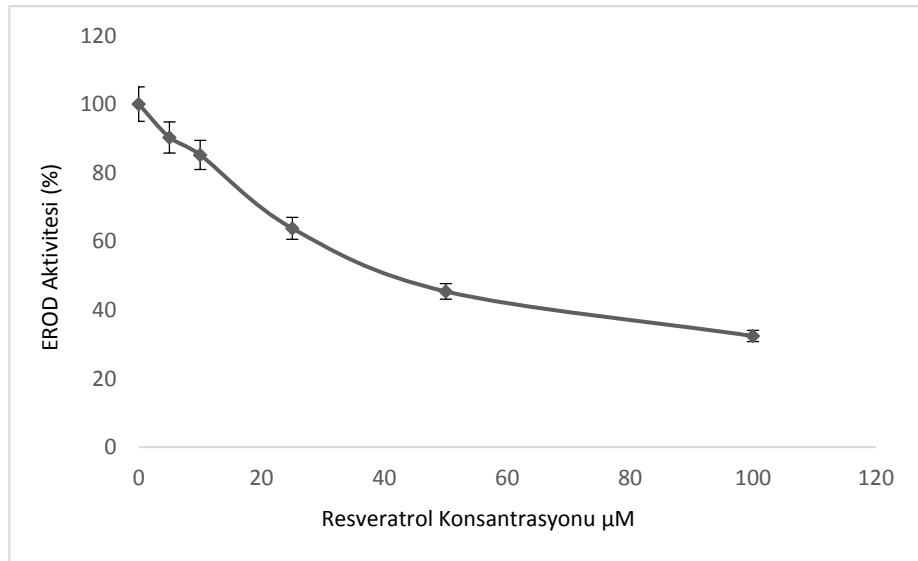
Bu çalışmada, CYP1A1 bağımlı EROD aktivitesi üzerine resveratrol, silikristin, luteolin, isoscutellarein, silimarin, eriositrin ve oleuropein'in etkileri araştırılmıştır. IC50 değerleri lineer regresyona (% kontrol) karşı logaritmik regresyon (flavonoid) konsantrasyonları kullanılarak belirlenmiştir ve bu hesaplamalar için web tabanlı bir uygulama olan ICEstimator 1.2 kullanılmıştır. Km, Vmax ve Ki değerleri ise GraphPad Prism 5.0 ile hesaplanmış ve web tabanlı diğer uygulamalar ile doğrulanmıştır.

### 3.4.1 Resveratrol'ün CYP1A1 Üzerinde Etkisi

Resveratrol'ün farklı konsantrasyonlarının varlığında, EROD aktivitesi metotlarda tarif edildiği gibi tespit edilmiştir. 7-etoksiresorufin konsantrasyonu  $1.5\mu\text{M}$ 'da tutularak resveratrol konsantrasyonu  $5 - 100\mu\text{M}$  arasında değiştirilmiştir. Şekil 3.4 ve Şekil 3.5 EROD aktivitesi üzerine resveratrol'ün etkisini göstermektedir. resveratrol, doza bağlı olarak EROD aktivitesini inhibe etmiştir. Ayrıca, resveratrol  $100\mu\text{M}$  konsantrasyonu EROD aktivitesinin %68 inhibisyonuna neden olmuştur.



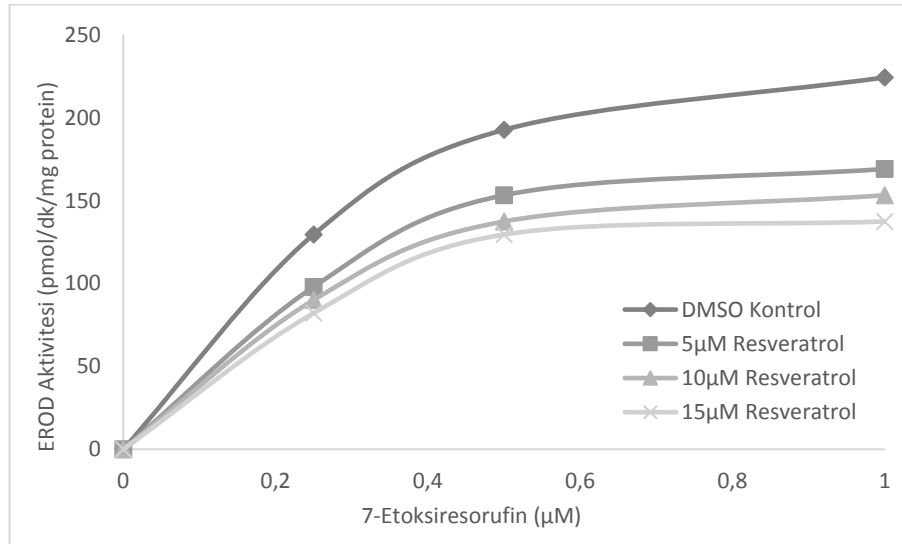
Şekil 3.4: Resveratrol'ün EROD Aktivitesine Etkisi



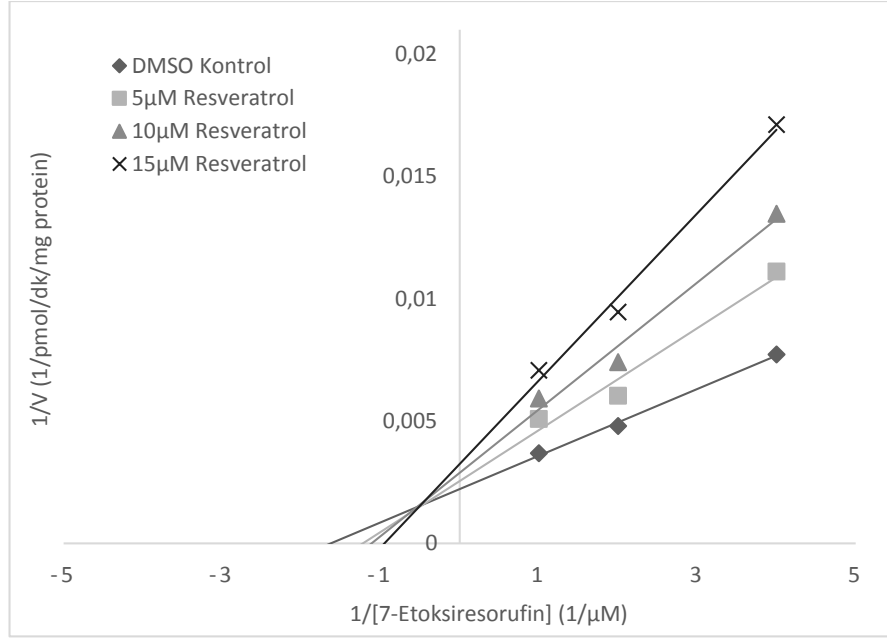
Şekil 3.5: Resveratrol'ün EROD Aktivitesine Etkisi

EROD aktivitesi ölçülürken resveratrol'ün inhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde, reaksiyon karışımında resveratrol (5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 15 $\mu$ M) ve 7-etoksiresorufin (0.25 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M, 1 $\mu$ M) için üç farklı konsantrasyon seçildi ve deneyler bu doğrultuda gerçekleştirildi.

Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'da gösterildiği gibi resveratrol'ün üç farklı konsantrasyonu, yine üç farklı 7-etoksiresorufin konsantrasyonuna karşı ölçülmüştür. Artan resveratrol konsantrasyonu ile birlikte Km değeri artarken Vmax değeri azalmıştır. Resveratrol'ün yüksek konsantrasyonu (15 $\mu$ M) varlığında Vmax değeri 393.5 $\mu$ M (DMSO Kontrol)'dan 234.2 $\mu$ M'a kadar düşüş göstermiştir. Km değeri ise anlamlı bir şekilde 0.520 $\mu$ M (DMSO Kontrol)'dan 0,680 $\mu$ M'a kadar yükselmiştir. Bu da; bu inhibisyon şeklinin karışık inhibisyon olduğunu göstermektedir. Üç farklı 7-etoksiresorufin (0.25 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M, 1 $\mu$ M) konsantrasyonuna karşı resveratrol (1/v) aktivitesi incelendiğinde ise Ki (inhibisyon sabiti) değeri 12.2 $\mu$ M olarak hesaplanmıştır.

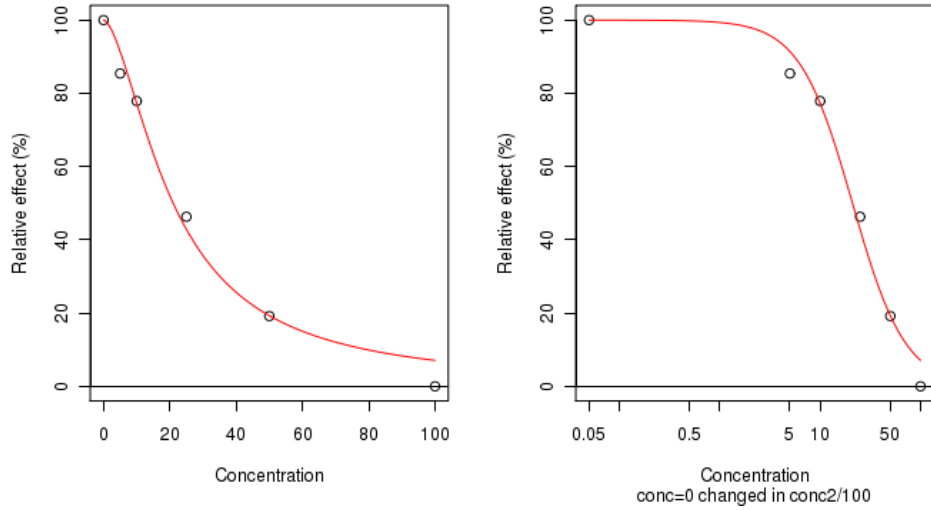


Şekil 3.6: Michaelis-Menten grafiği ile Resveratrol'ün EROD Aktivitesi



Şekil 3.7: Lineweaver-Burk grafiği ile Resveratrol'ün EROD Aktivitesi

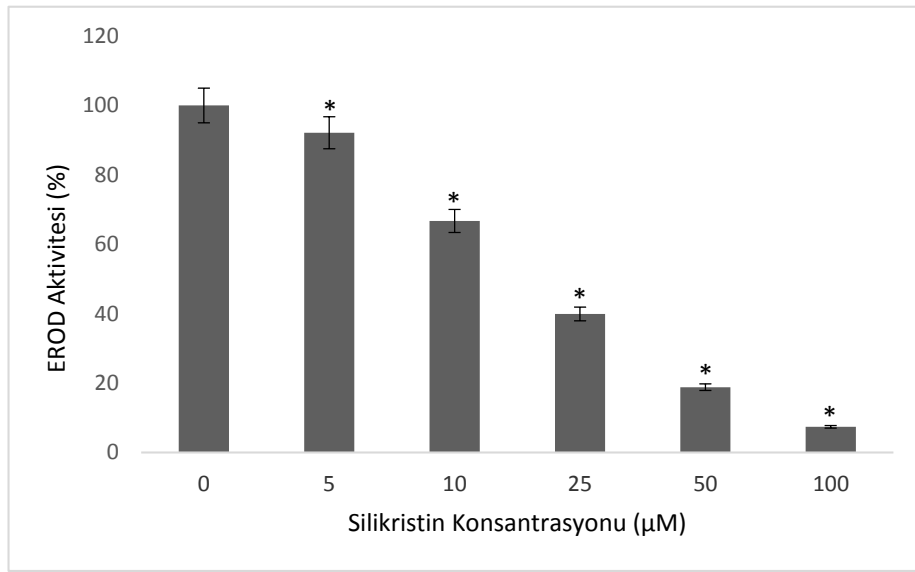
Şekil 3.8'de gösterilen IC50 değeri, logaritmik resveratrol konsantrasyonuna karşı EROD aktivitesi yüzde grafiğinin çizilmesiyle saptanmıştır ve IC50 değeri 20.99μM olarak hesaplanmıştır.



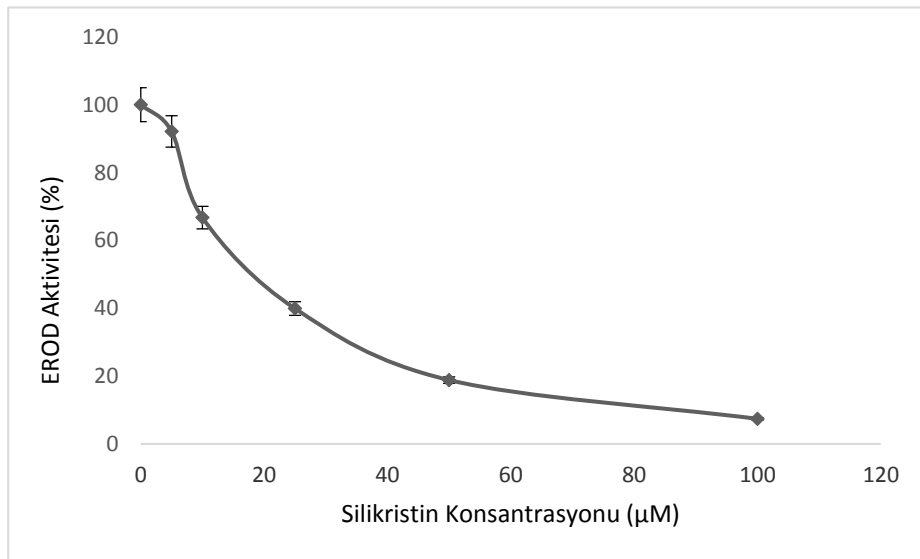
Şekil 3.8: Resveratrol'ün IC50 Değerinin Hesaplanması

### 3.4.2 Silikristin'in CYP1A1 Üzerinde Etkisi

Silikristin'in farklı konsantrasyonlarının varlığında, EROD aktivitesi metotlarda tarif edildiği gibi tespit edilmiştir. 7-etoksiresorufin konsantrasyonu 1.5  $\mu\text{M}$ 'da tutularak silikristin konsantrasyonu 5 – 100 $\mu\text{M}$  arasında değiştirilmiştir. Şekil 3.9 ve Şekil 3.10 EROD aktivitesi üzerine silikristin'in etkisini göstermektedir. Silikristin, doza bağlı olarak EROD aktivitesini inhibe etmiştir. Ayrıca, silikristin 100 $\mu\text{M}$  konsantrasyonu EROD aktivitesinin %93 inhibisyonuna neden olmuştur.



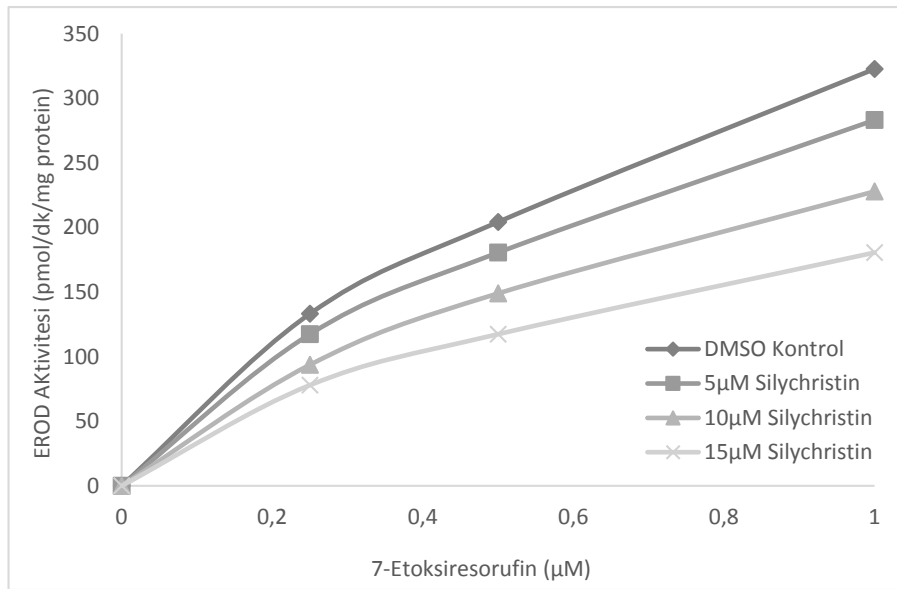
Şekil 3.9: Silikristin'in EROD Aktivitesine Etkisi



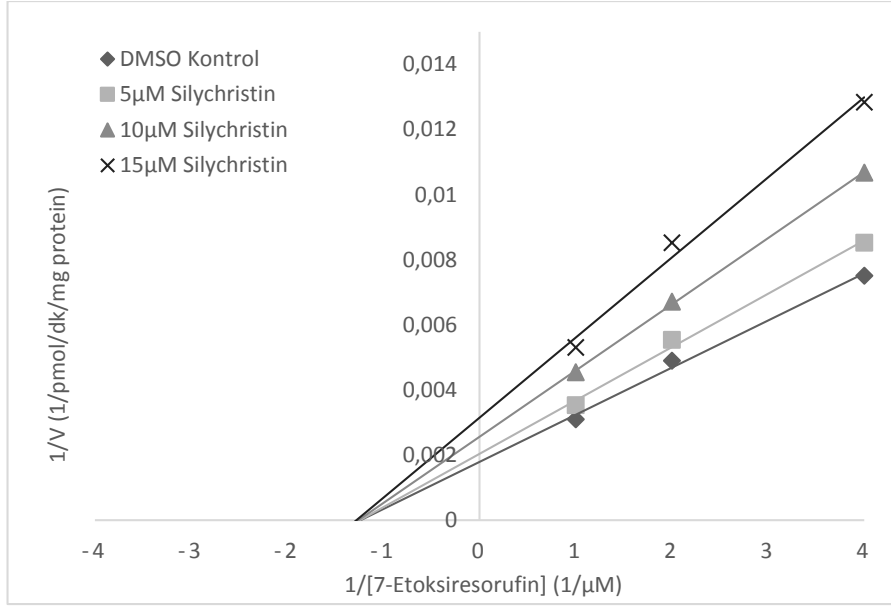
Şekil 3.10: Silikristin'in EROD Aktivitesine Etkisi

EROD aktivitesi ölçülürken silikristin'in inhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde, reaksiyon karışımında silikristin (5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 15 $\mu$ M) ve 7-etoksiresorufin (0.25 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M, 1 $\mu$ M) için üç farklı konsantrasyon seçildi ve deneyler bu doğrultuda gerçekleştirildi.

Şekil 3.11 ve Şekil 3.12'de gösterildiği gibi silikristin'in üç farklı konsantrasyonu, yine üç farklı 7-etoksiresorufin konsantrasyonuna karşı ölçülmüştür. Artan silikristin konsantrasyonu ile birlikte  $K_m$  değeri ( $K_m$ :1.055,  $K_m'$ :1.092 $\mu$ M) değişmezken  $V_{max}$  değeri azalmıştır. Silikristin'in yüksek konsantrasyonu (15 $\mu$ M) varlığında  $K_m$  değişmeden  $V_{max}$  değeri anlamlı bir şekilde 658.4 $\mu$ M (DMSO Kontrol)'dan 391 $\mu$ M'a kadar düşmüştür. Bu da; bu inhibisyon şeklinin bir karışık inhibisyon tipi olan non-kompetatif inhibisyon olduğunu göstermektedir. Üç farklı 7-etoksiresorufin (0.25 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M, 1 $\mu$ M) konsantrasyonuna karşı silikristin (1/v) aktivitesi incelendiğinde ise  $K_i$  (inhibisyon sabiti) değeri 15.45 $\mu$ M olarak hesaplanmıştır.

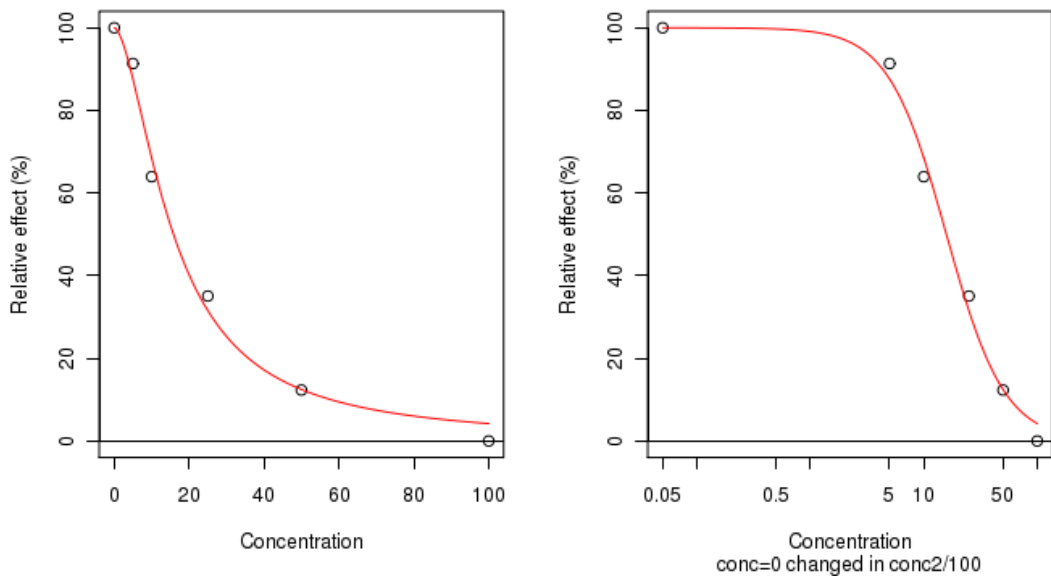


Şekil 3.11: Michaelis-Menten grafiği ile Silikristin'in EROD Aktivitesi



Şekil 3.12: Lineweaver-Burk grafiği ile Silikristin'in EROD Aktivitesi

Şekil 3.13'de gösterilen IC<sub>50</sub> değeri, logaritmik resveratrol konsantrasyonuna karşı EROD aktivitesi yüzde grafiğinin çizilmesiyle saptanmıştır ve IC<sub>50</sub> değeri 15.83μM olarak hesaplanmıştır.

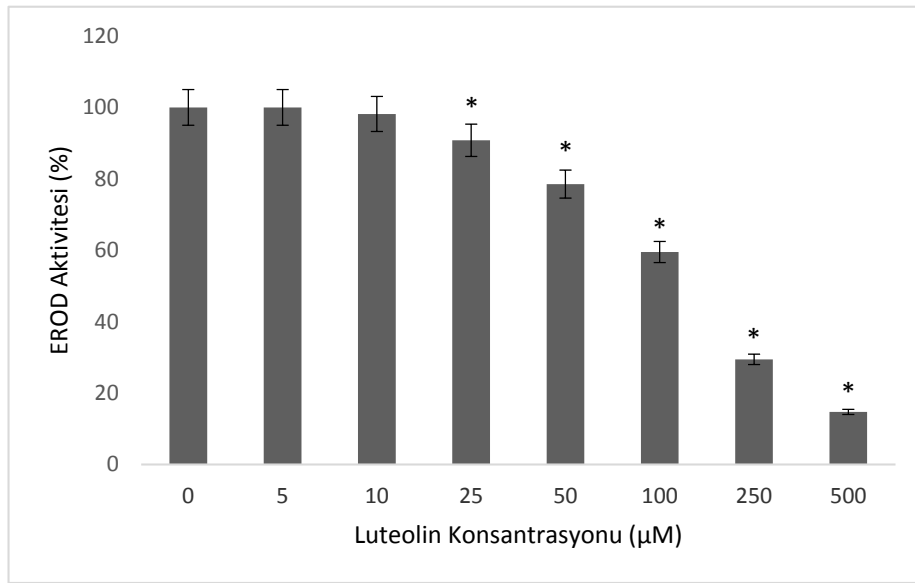


Şekil 3.13: Silikristin'in IC<sub>50</sub> Değerinin Hesaplanması

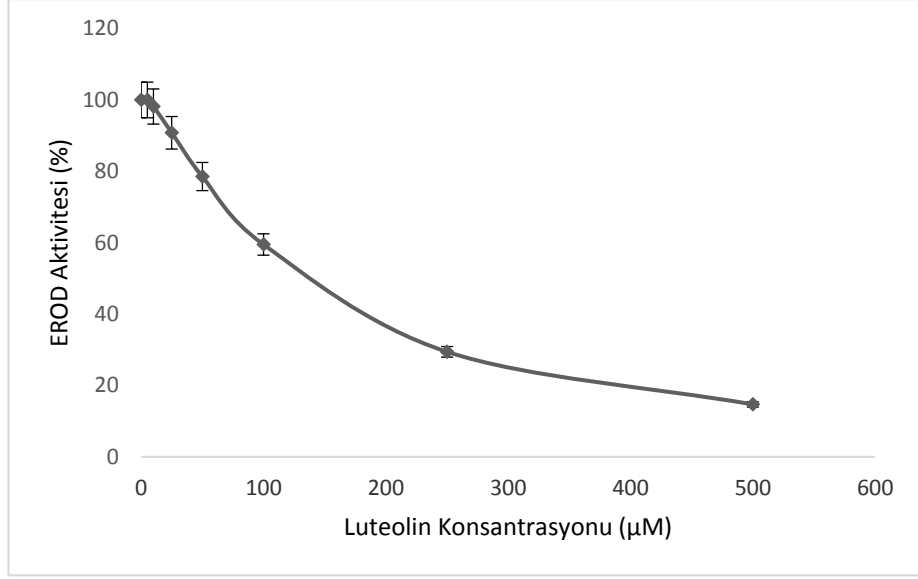


### 3.4.3 Luteolin'in CYP1A1 Üzerinde Etkisi

Luteolin'in farklı konsantrasyonlarının varlığında, EROD aktivitesi metotlarda tarif edildiği gibi tespit edilmiştir. 7-etoksiresorufin konsantrasyonu 1.5  $\mu\text{M}$ 'da tutularak luteolin konsantrasyonu 5 – 500 $\mu\text{M}$  arasında değiştirilmiştir. Şekil 3.14 ve Şekil 3.15 EROD aktivitesi üzerine luteolin'in etkisini göstermektedir. Luteolin, doza bağlı olarak EROD aktivitesini inhibe etmiştir. Ayrıca, Luteolin'in 500 $\mu\text{M}$  konsantrasyonu EROD aktivitesinin %86 inhibisyonuna neden olmuştur.



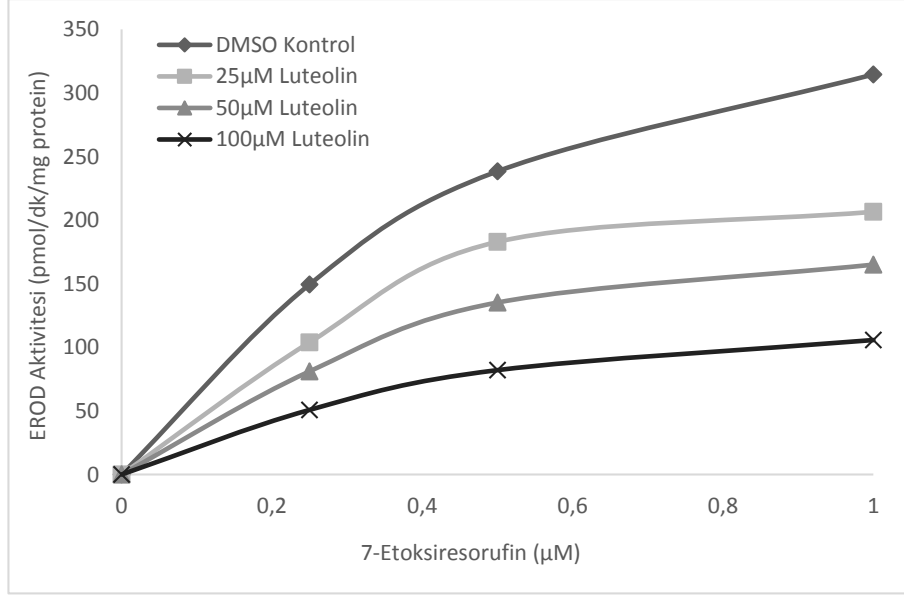
Şekil 3.14: Luteolin'in EROD Aktivitesine Etkisi



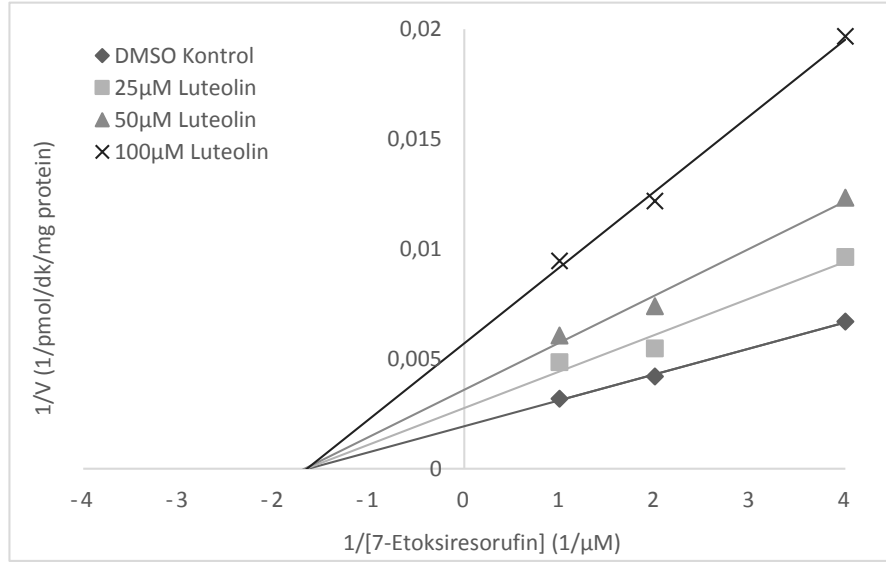
Şekil 3.15: Luteolin'in EROD Aktivitesine Etkisi

EROD aktivitesi ölçülürken luteolin'in inhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde, reaksiyon karışımında luteolin (25µM, 50µM, 100µM) ve 7-etoksiresorufin (0.25µM, 0.5µM, 1µM) için üç farklı konsantrasyon seçildi ve deneyler bu doğrultuda gerçekleştirildi.

Şekil 3.16 ve Şekil 3.17'da gösterildiği gibi luteolin'in üç farklı konsantrasyonu, yine üç farklı 7-etoksiresorufin konsantrasyonuna karşı ölçülmüştür. Artan luteolin konsantrasyonu ile birlikte  $K_m$  değeri ( $K_m$ :0.450,  $K_m'$ :0.524µM) değişmezken  $V_{max}$  değeri azalmıştır. Luteolin'in yüksek konsantrasyonu (100µM) varlığında  $K_m$  değişmeden  $V_{max}$  değeri anlamlı bir şekilde 436.5µM (DMSO Kontrol)'dan 162.8µM'a kadar düşmüştür. Bu da; bu inhibisyon şeklinin bir karışık inhibisyon tipi olan non-kompetatif inhibisyon olduğunu göstermektedir. Üç farklı 7-etoksiresorufin (0.25µM, 0.5µM, 1µM) konsantrasyonuna karşı luteolin (1/v) aktivitesi incelendiğinde ise  $K_i$  (inhibisyon sabiti) değeri 86.73µM olarak hesaplanmıştır.

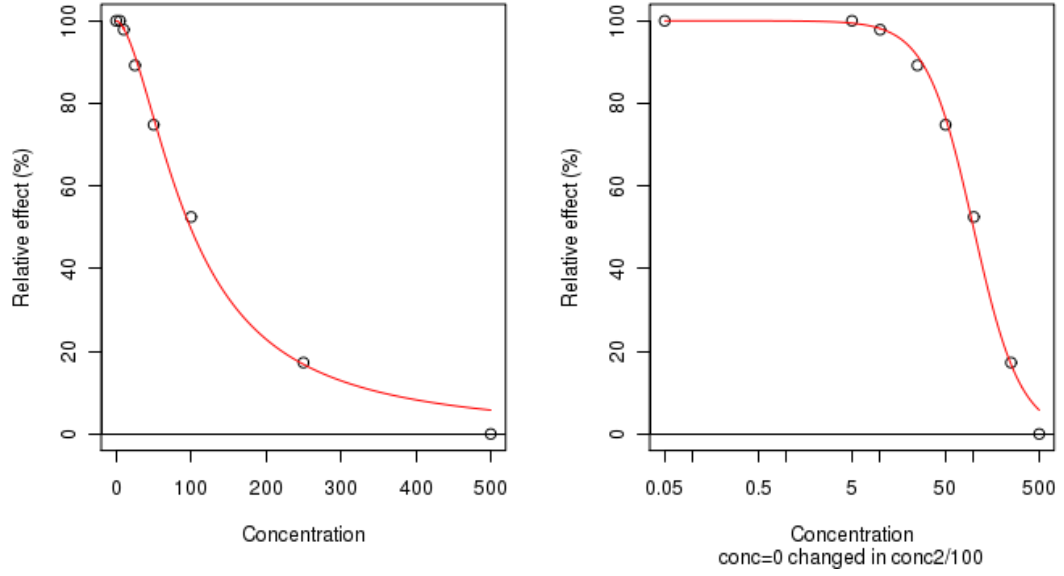


Şekil 3.16: Michaelis-Menten grafiği ile Luteolin'in EROD Aktivitesi



Şekil 3.17: Lineweaver-Burk grafiği Luteolin'in EROD Aktivitesi

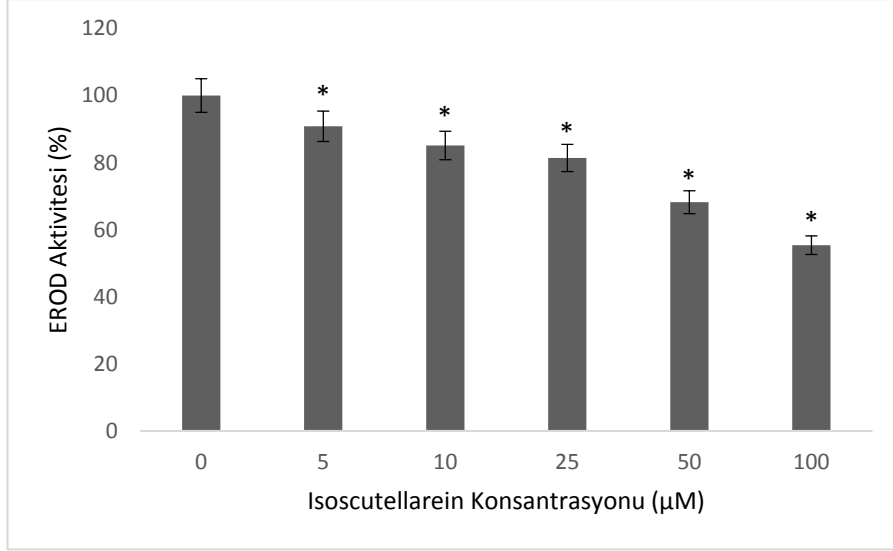
Şekil 3.18'de gösterilen IC50 değeri, logaritmik resveratrol konsantrasyonuna karşı EROD aktivitesi yüzde grafiğinin çizilmesiyle saptanmıştır ve IC50 değeri 99.05µM olarak hesaplanmıştır.



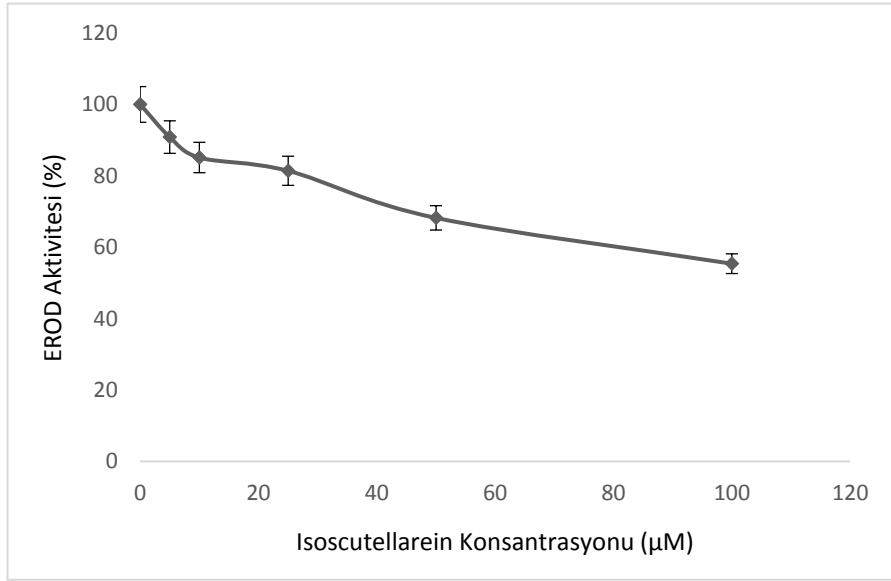
Şekil 3.18: Luteolin'in IC50 Değerinin Hesaplanması

#### 3.4.4 Isoscutellarein'in CYP1A1 Üzerinde Etkisi

Isoscutellarein'in farklı konsantrasyonlarının varlığında, EROD aktivitesi Metotlarda tarif edildiği gibi tespit edilmiştir. 7-etoksiresorufin konsantrasyonu 1.5µM'da tutularak isoscutellarein konsantrasyonu 5 – 100µM arasında değiştirilmiştir. Şekil 3.19 ve Şekil 3.20 EROD aktivitesi üzerine isoscutellarein'in etkisini göstermektedir. Isoscutellarein, doza bağlı olarak EROD aktivitesini inhibe etmiştir. Ayrıca, isoscutellarein 100µM konsantrasyonu EROD aktivitesinin %45 inhibisyonuna neden olmuştur.



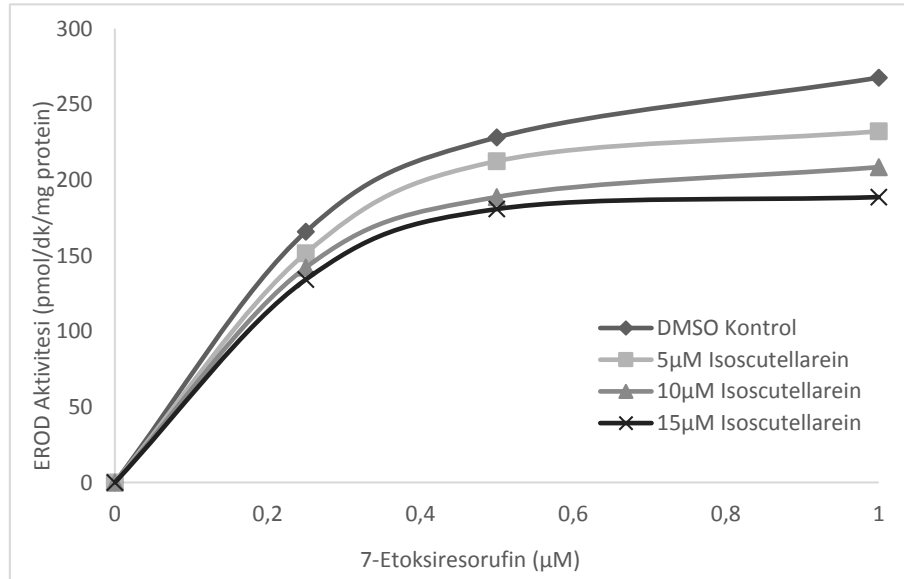
Şekil 3.19: Isoscuteallarein'in EROD Aktivitesine Etkisi



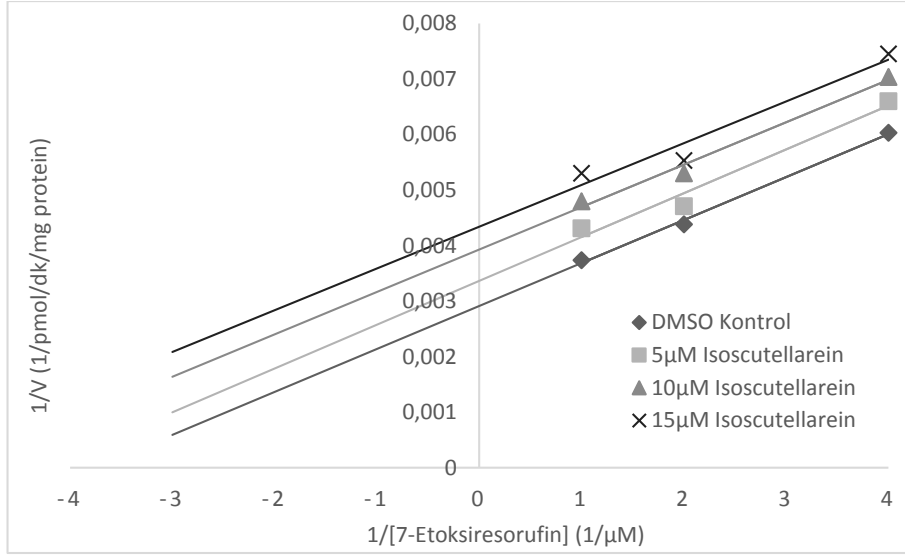
Şekil 3.20: Isoscuteallarein'in EROD Aktivitesine Etkisi

EROD aktivitesi ölçülürken isoscuteallarein'in inhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde, reaksiyon karışımında isoscuteallarein (5µM, 10µM, 15µM) ve 7-etoksiresorufin (0.25µM, 0.5µM, 1µM) için üç farklı konsantrasyon seçildi ve deneyler bu doğrultuda gerçekleştirildi.

Şekil 3.21 ve Şekil 3.22’de gösterildiği gibi isoscutellarein’in üç farklı konsantrasyonu, yine üç farklı 7-etoksiresorufin konsantrasyonuna karşı ölçülmüştür. Artan isoscutellarein konsantrasyonu ile birlikte  $K_m$  ve  $V_{max}$  değeri azalmıştır. Isoscutellarein’in yüksek konsantrasyonu ( $15\mu M$ ) varlığında  $V_{max}$  değeri  $337\mu M$  (DMSO Kontrol)’dan  $228\mu M$ ’a kadar düşüş göstermiştir.  $K_m$  değeri ise  $0.25\mu M$  (DMSO Kontrol)’dan  $0.15\mu M$ ’a kadar düşmüştür. Bu da; bu inhibisyon şeklinin yarışmasız (un-kompetatif) inhibisyon olduğunu göstermektedir. Üç farklı 7-etoksiresorufin ( $0.25\mu M$ ,  $0.5\mu M$ ,  $1\mu M$ ) konsantrasyonuna karşı isoscutellarein ( $1/v$ ) aktivitesi incelendiğinde ise  $K_i$  (inhibisyon sabiti) değeri  $26.77\mu M$  olarak hesaplanmıştır.

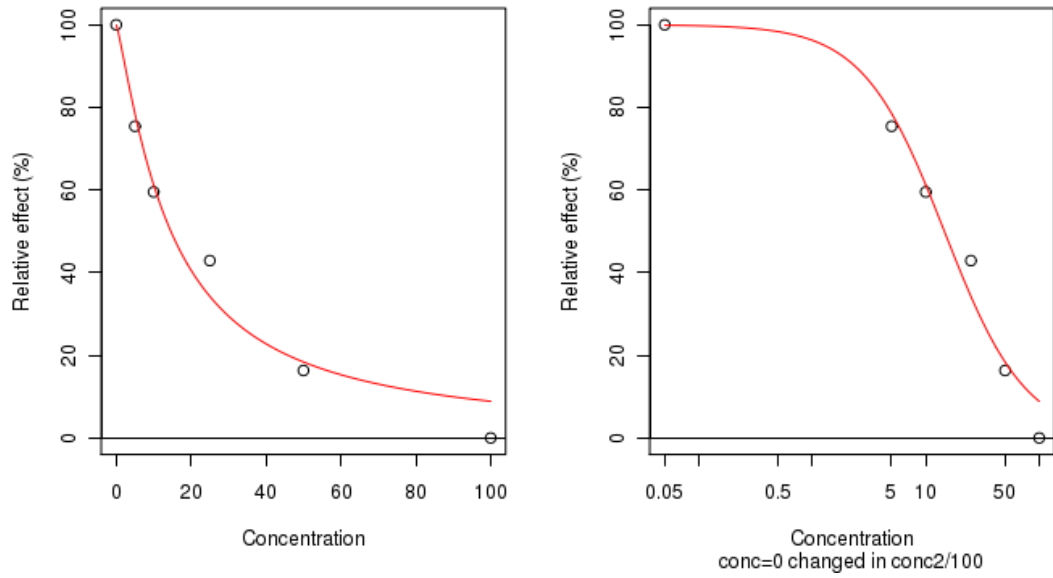


Şekil 3.21: Michaelis-Menten grafiği ile Isoscutellarein'in EROD Aktivitesi



Şekil 3.22: Lineweaver-Burk grafiği ile Isoscutellarein'in EROD Aktivitesi

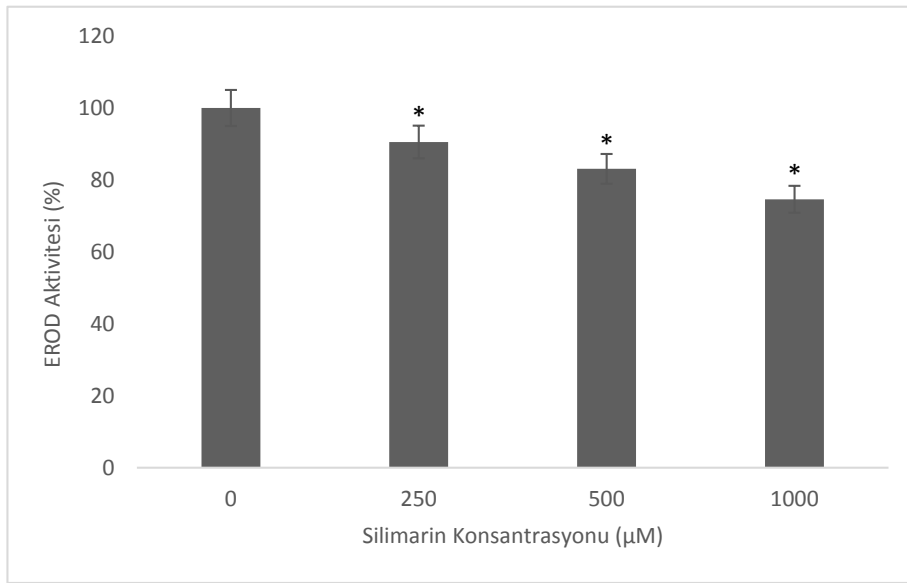
Şekil 3.23'de gösterilen IC<sub>50</sub> değeri, logaritmik resveratrol konsantrasyonuna karşı EROD aktivitesi yüzde grafiğinin çizilmesiyle saptanmıştır ve IC<sub>50</sub> değeri 21.76μM olarak hesaplanmıştır.



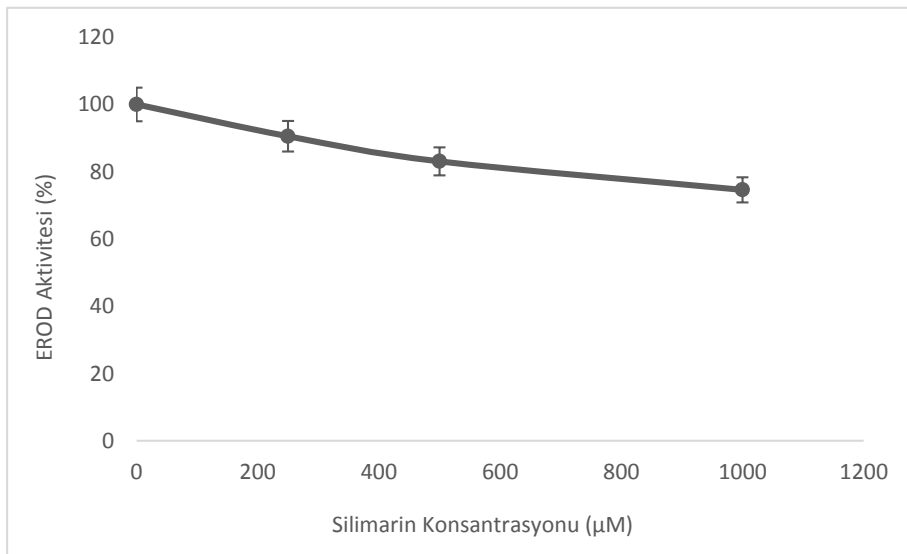
Şekil 3.23: Isoscutellarein'in IC<sub>50</sub> Değerinin Hesaplanması

### 3.4.5 Silimarin'in CYP1A1 Üzerinde Etkisi

Silimarin'in farklı konsantrasyonlarının varlığında, EROD aktivitesi metotlarda tarif edildiği gibi tespit edilmiştir. 7-etoksiresorufin konsantrasyonu  $1.5\mu\text{M}$ 'da tutularak silimarin konsantrasyonu  $250 - 1000\mu\text{M}$  arasında değiştirilmiştir. Şekil 3.24 ve Şekil 3.25 EROD aktivitesi üzerine silimarin'in etkisini göstermektedir. Silimarin, doza bağlı olarak EROD aktivitesini inhibe etmiştir. Ayrıca, silimarin'in  $100\mu\text{M}$  konsantrasyonu EROD aktivitesinin %26 inhibisyonuna neden olmuştur.



Şekil 3.24: Silimarin'in EROD Aktivitesine Etkisi

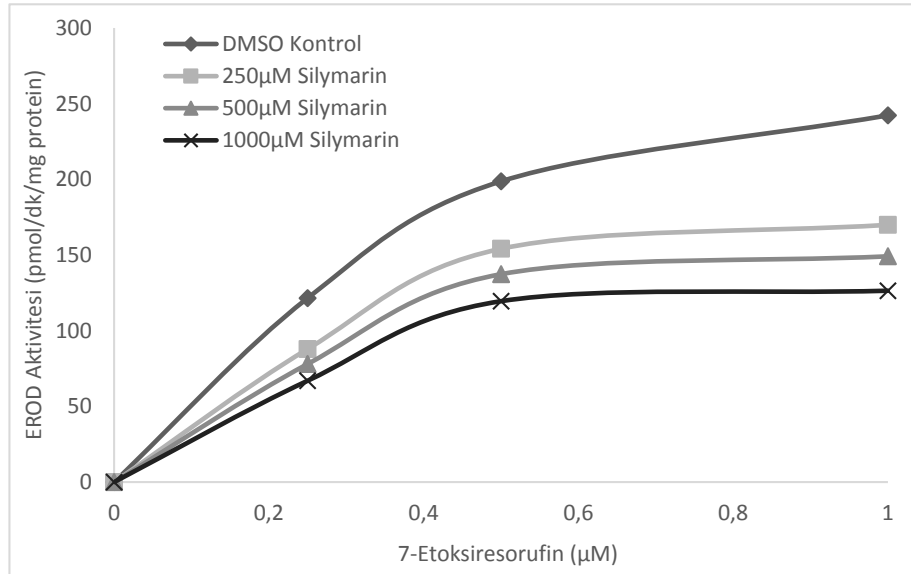


Şekil 3.25: Silimarin'in EROD Aktivitesine Etkisi

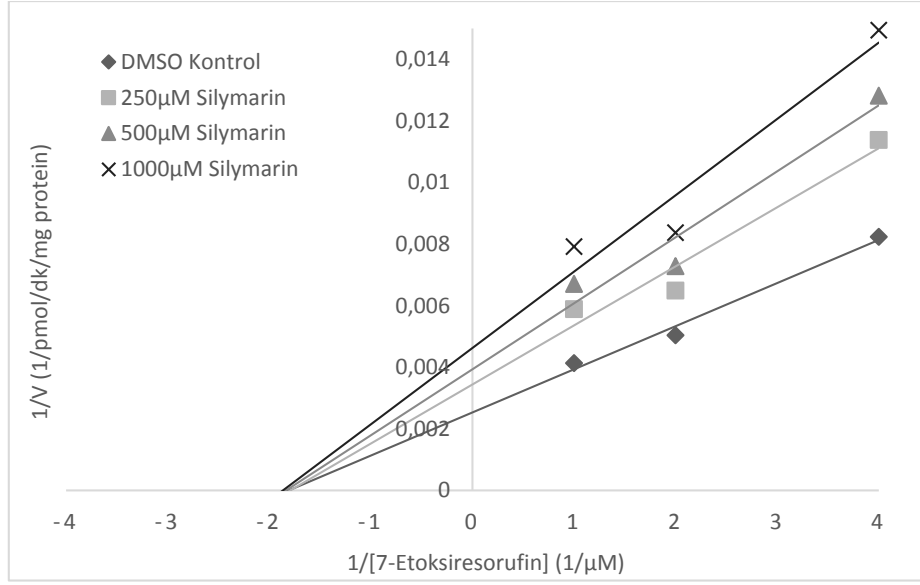


EROD aktivitesi ölçülürken silimarin'in inhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde, reaksiyon karışımında silimarin (250 $\mu$ M, 500 $\mu$ M, 1000 $\mu$ M) ve 7-etoksiresorufin (0.25 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M, 1 $\mu$ M) için üç farklı konsantrasyon seçildi ve deneyler bu doğrultuda gerçekleştirildi.

Şekil 3.26 ve Şekil 3.27'de gösterildiği gibi silimarin'in üç farklı konsantrasyonu, yine üç farklı 7-etoksiresorufin konsantrasyonuna karşı ölçülmüştür. Artan silimarin konsantrasyonu ile birlikte  $K_m$  değeri ( $K_m$ :0.41,  $K_m'$ :0.36 $\mu$ M) değişmezken  $V_{max}$  değeri azalmıştır. Silimarin'in yüksek konsantrasyonu (1000 $\mu$ M) varlığında  $K_m$  değişmeden  $V_{max}$  değeri anlamlı bir şekilde 340 $\mu$ M (DMSO Kontrol)'dan 182 $\mu$ M'a kadar düşmüştür. Bu da; bu inhibisyon şeklinin bir karışık inhibisyon tipi olan non-kompetatif inhibisyon olduğunu göstermektedir. Üç farklı 7-etoksiresorufin (0.25 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M, 1 $\mu$ M) konsantrasyonuna karşı silimarin (1/v) aktivitesi incelendiğinde ise  $K_i$  (inhibisyon sabiti) değeri 1.14mM olarak hesaplanmıştır.

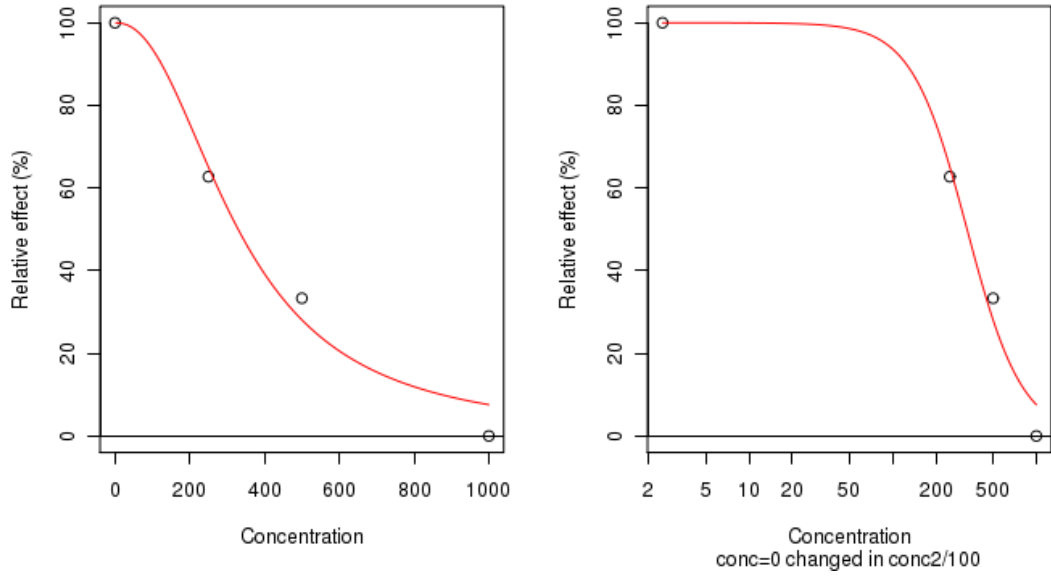


Şekil 3.26: Michaelis-Menten grafiği ile Silimarin'in EROD Aktivitesi



Şekil 3.27: Lineweaver-Burk grafiği ile Silimarin'in EROD Aktivitesi

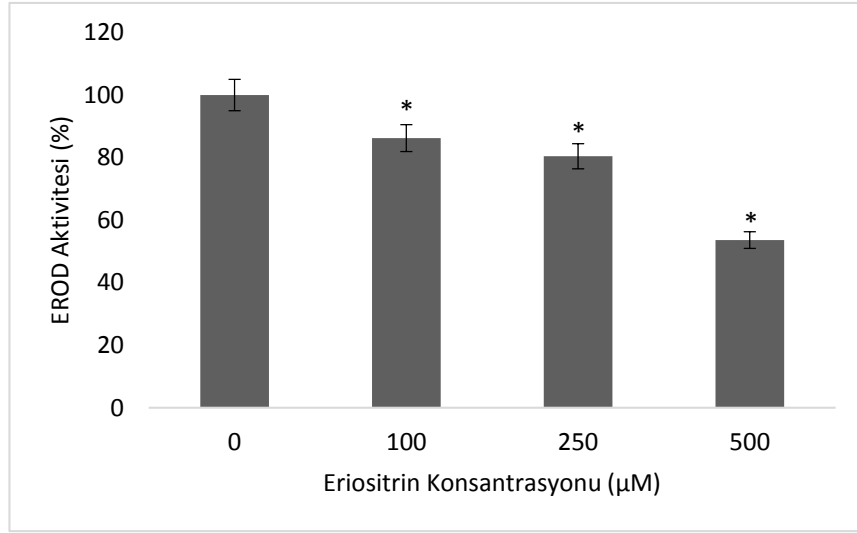
Şekil 3.28'de gösterilen IC<sub>50</sub> değeri, logaritmik resveratrol konsantrasyonuna karşı EROD aktivitesi yüzde grafiğinin çizilmesiyle saptanmıştır ve IC<sub>50</sub> değeri 329.5μM olarak hesaplanmıştır.



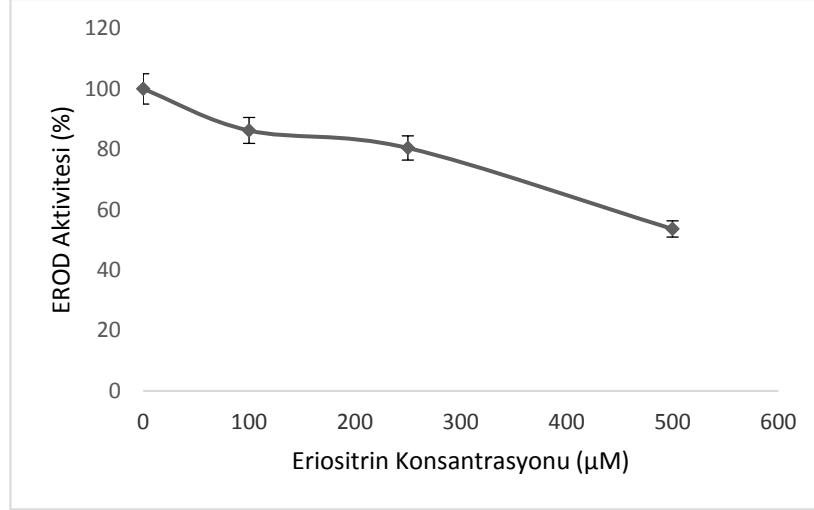
Şekil 3.28: Silimarin'in IC<sub>50</sub> Değerinin Hesaplanması

### 3.4.6 Eriositrin'in CYP1A1 Üzerinde Etkisi

Eriositrin'in farklı konsantrasyonlarının varlığında, EROD aktivitesi metotlarda tarif edildiği gibi tespit edilmiştir. 7-etoksiresorufin konsantrasyonu  $1.5\mu\text{M}$ 'da tutularak eriositrin'in konsantrasyonu  $100 - 500\mu\text{M}$  arasında değiştirilmiştir. Şekil 3.29 ve Şekil 3.30 EROD aktivitesi üzerine eriositrin'in etkisini göstermektedir. Eriositrin, doza bağlı olarak EROD aktivitesini inhibe etmiştir. Ayrıca, eriositrin'in  $500\mu\text{M}$  konsantrasyonu EROD aktivitesinin %47 inhibisyonuna neden olmuştur.



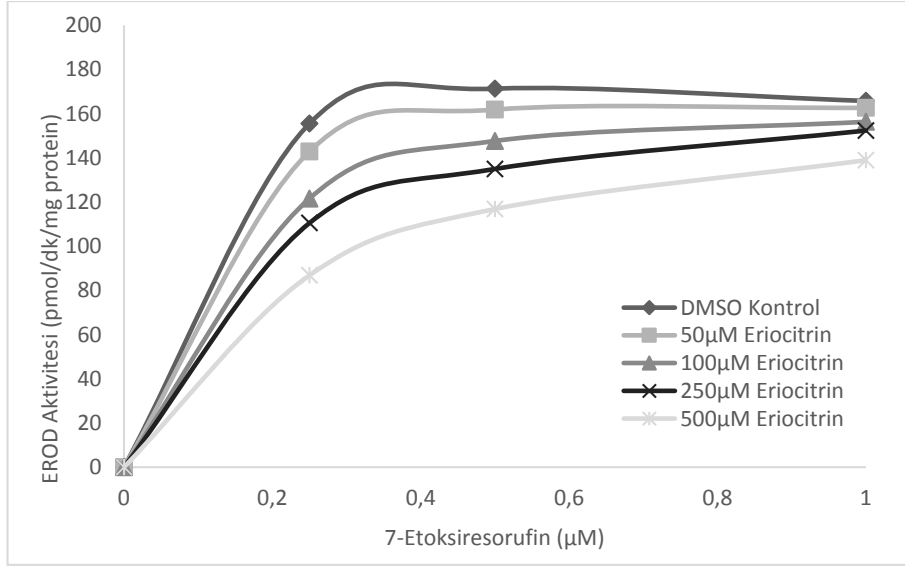
Şekil 3.29: Eriositrin'in EROD Aktivitesine Etkisi



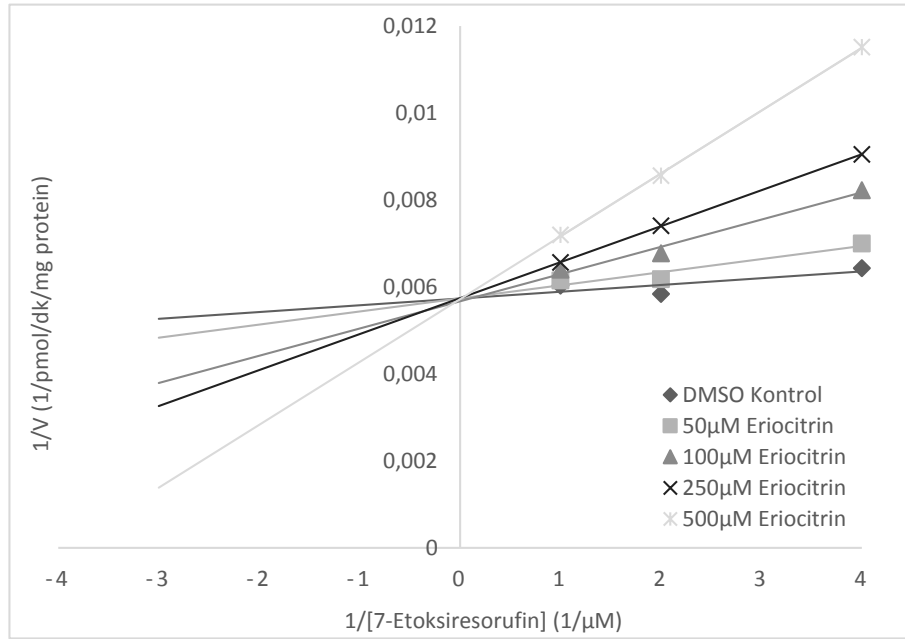
Şekil 3.30: Eriostatin'in EROD Aktivitesine Etkisi

EROD aktivitesi ölçülürken eriositrin'in inhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde, reaksiyon karışımında eriositrin (50µM, 100µM, 250µM, 500µM) ve 7-etoksiresorufin (0.25µM, 0.5µM, 1µM) için üç farklı konsantrasyon seçildi ve deneyler bu doğrultuda gerçekleştirildi.

Şekil 3.31 ve Şekil 3.32'de gösterildiği gibi eriositrin'in üç farklı konsantrasyonu, yine üç farklı 7-etoksiresorufin konsantrasyonuna karşı ölçülmüştür. Artan eriositrin konsantrasyonu ile birlikte Vmax değeri artarken Km değeri (Km:177, Km':178µM) değişmemiştir. Eriostatin'in yüksek konsantrasyonu (500µM) varlığında Km değişmeden Vmax değeri anlamlı bir şekilde 0.039µM (DMSO Kontrol)'dan 0.272µM'a kadar yükselmiştir. Bu da; bu inhibisyon şeklinin yarışmalı (kompetatif) inhibisyon olduğunu göstermektedir. Üç farklı 7-etoksiresorufin (0.25µM, 0.5µM, 1µM) konsantrasyonuna karşı eriositrin (1/v) aktivitesi incelendiğinde ise Ki (inhibisyon sabiti) değeri 71.83µM olarak hesaplanmıştır.

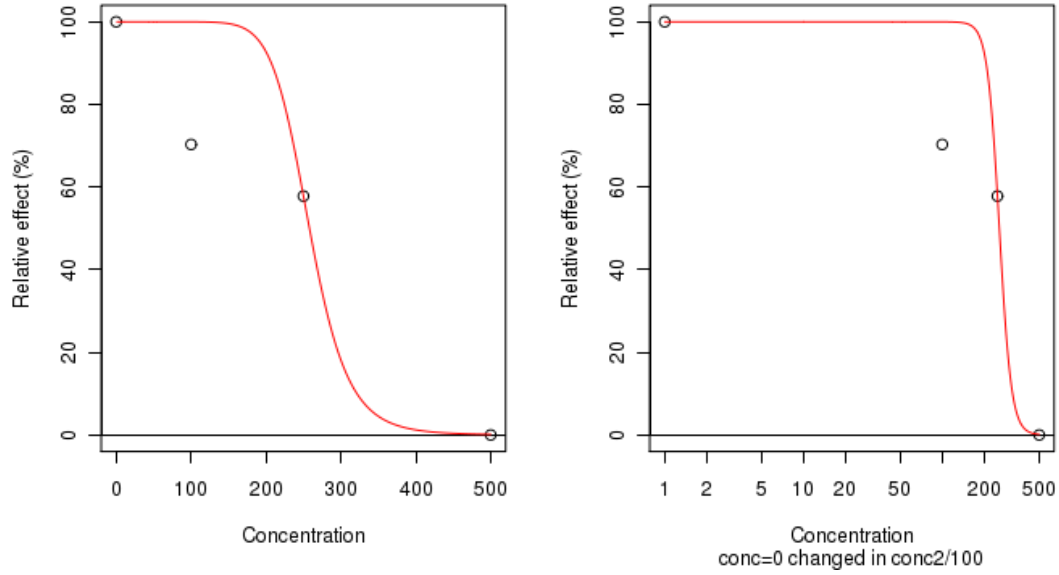


Şekil 3.31: Michaelis-Menten grafiği ile Eriocitrin'in EROD Aktivitesi



Şekil 3.32: Lineweaver-Burk grafiği ile Eriocitrin'in EROD Aktivitesi

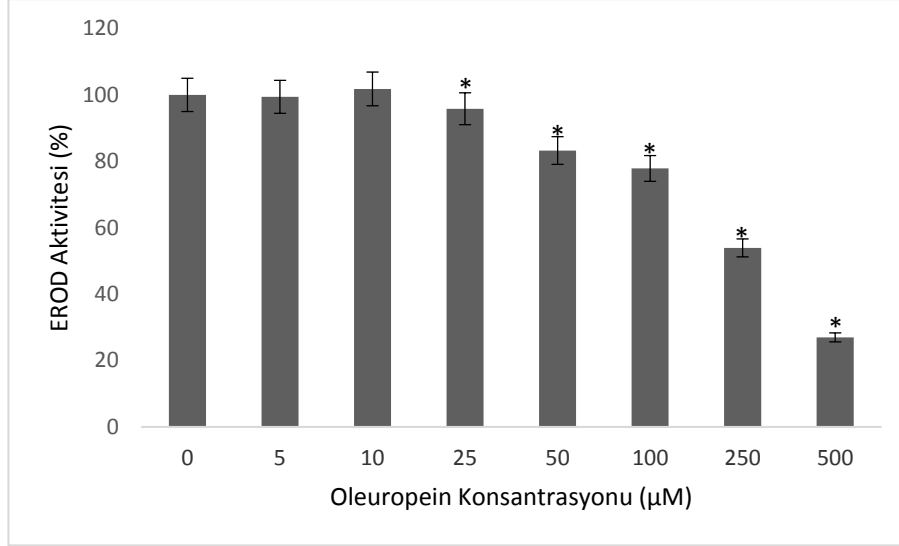
Şekil 3.33'de gösterilen IC50 değeri, logaritmik resveratrol konsantrasyonuna karşı EROD aktivitesi yüzde grafiğinin çizilmesiyle saptanmıştır ve IC50 değeri 257.99µM olarak hesaplanmıştır.



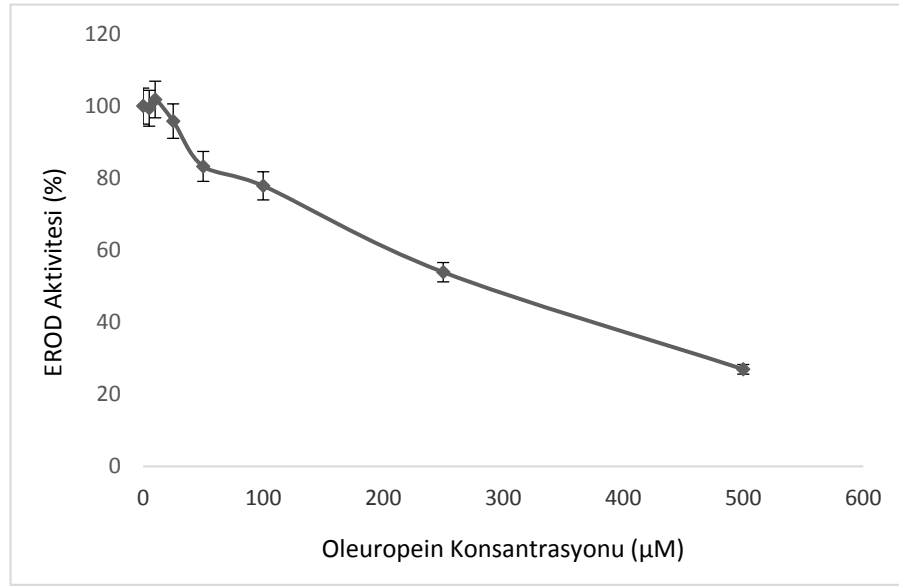
Şekil 3.33: Erositrin'in IC50 Değerinin Hesaplanması

### 3.4.7 Oleuropein'in CYP1A1 Üzerinde Etkisi

Oleuropein'in farklı konsantrasyonlarının varlığında, EROD aktivitesi metotlarda tarif edildiği gibi tespit edilmiştir. 7-etoksiresorufin konsantrasyonu 1.5µM'da tutularak oleuropein konsantrasyonu 5 – 500µM arasında değiştirilmiştir. Şekil 3.34 ve Şekil 3.35 EROD aktivitesi üzerine oleuropein'in etkisini göstermektedir. Oleuropein, doza bağlı olarak EROD aktivitesini inhibe etmiştir. Ayrıca, oleuropein'in 500µM konsantrasyonu EROD aktivitesinin %74 inhibisyonuna neden olmuştur.



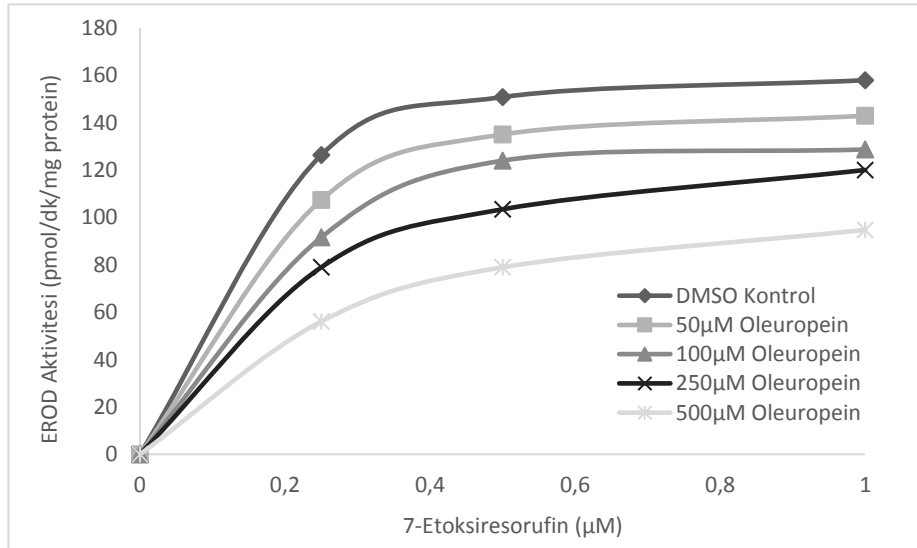
Şekil 3.34: Oleuropein'in EROD Aktivitesine Etkisi



Şekil 3.35: Oleuropein'in EROD Aktivitesine Etkisi

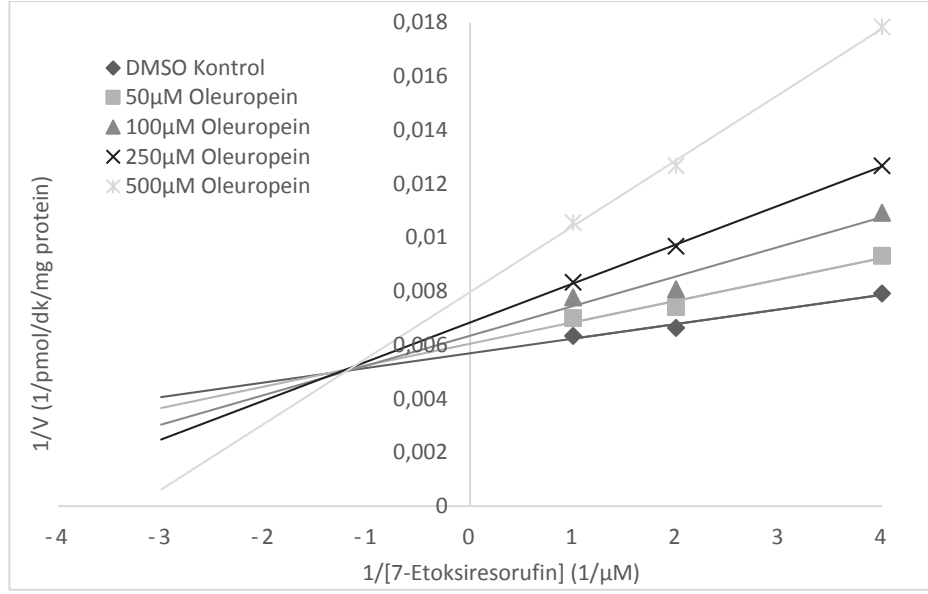
EROD aktivitesi ölçülürken oleuropein'in inhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde, reaksiyon karışımında oleuropein (50µM, 100µM, 250µM, 500µM) ve 7-etoksiresorufin (0.25µM, 0.5µM, 1µM) için üç farklı konsantrasyon seçildi ve deneyler bu doğrultuda gerçekleştirildi.

Şekil 3.36 ve Şekil 3.37’de gösterildiği gibi oleuropein’in üç farklı konsantrasyonu, yine üç farklı 7-etoksiresorufin konsantrasyonuna karşı ölçülmüştür. Artan oleuropein konsantrasyonu ile birlikte  $K_m$  değeri artarken  $V_{max}$  değeri azalmıştır. Oleuropein’in yüksek konsantrasyonu ( $500\mu M$ ) varlığında  $V_{max}$  değeri  $174.34\mu M$  (DMSO Kontrol)’dan  $125\mu M$ ’a kadar düşüş göstermiştir.  $K_m$  değeri ise anlamlı bir şekilde  $0.091\mu M$  (DMSO Kontrol)’dan  $0.309\mu M$ ’a kadar yükselmiştir. Bu da; bu inhibisyon şeklinin karışık inhibisyon olduğunu göstermektedir. Üç farklı 7-etoksiresorufin ( $0.25\mu M$ ,  $0.5\mu M$ ,  $1\mu M$ ) konsantrasyonuna karşı oleuropein ( $1/v$ ) aktivitesi incelendiğinde ise  $K_i$  (inhibisyon sabiti) değeri  $147.54\mu M$  olarak hesaplanmıştır.



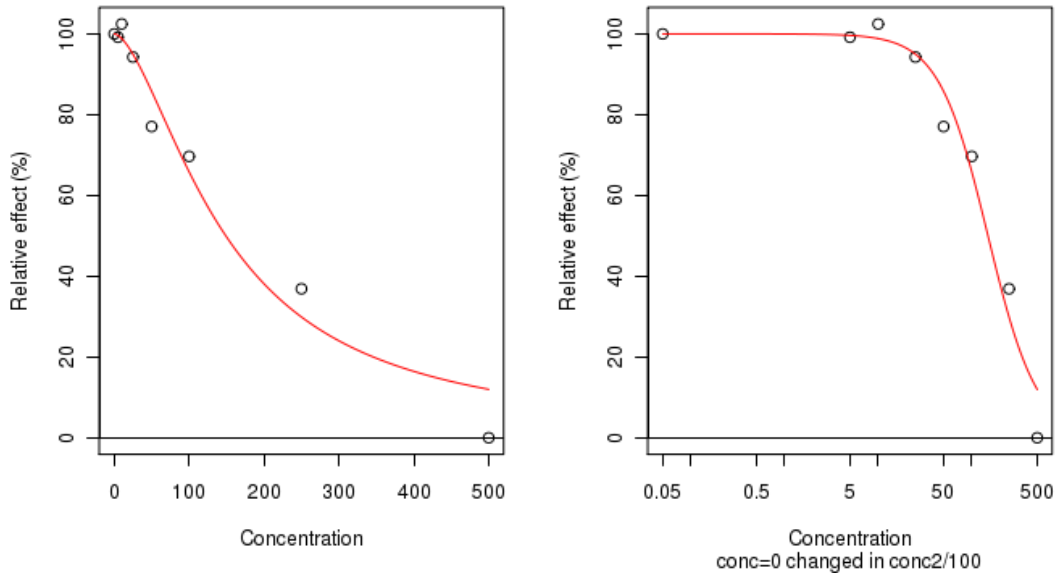
Şekil 3.36: Michaelis-Menten grafiği ile Oleuropein'in EROD Aktivitesi





Şekil 3.37: Lineweaver-Burk grafiği ile Oleuropein'in EROD Aktivitesi

Şekil 3.38'de gösterilen IC50 değeri, logaritmik resveratrol konsantrasyonuna karşı EROD aktivitesi yüzde grafiğinin çizilmesiyle saptanmıştır ve IC50 değeri 148.99μM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.38: Oleuropein'in IC50 Değerinin Hesaplanması

### 3.5 Docking Sonuçları

Bu çalışmada, resveratrol, silikristin, luteolin, isoscutellarein, silimarin, eriositrin ve oleuropein *in vitro* çalışmalarda olduğu gibi CYP1A1 makromolekülü ile moleküler docking (kenetlenme) yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bu yöntem için Autodock 4.2 ve AutoDock Tools araçlarından faydalanılmıştır.

Docking sonuçlarında gösterilen RMSD (root means square deviation) değerleri, ligand yapımızın belirlenen konformasyonunun karekök sapması olarak tanımlanmaktadır. Yani ligandın etkileşime girdiği bağlanma bölgesinden sapması anlamına gelmektedir ve bağlanma sonuçları için kullanılan en önemli parametredir. RMSD değerleri dışında dikkat edilmesi gereken parametre ise bağlanma enerjisidir. Bu sıralama ile değerlendirmemizin nedeni ligandın aktif bölge dışında başka bir bölgeye bağlanarak düşük bağlanma enerjisi verebileceği, bu yüzden de önce aktif bölgeye olan yakınlığı, sonra da aktif bölgede yaptığı bağlanmanın enerjisine bakılmasıdır. Sonuçlara bakılarak en iyi bağlanma derecesinin (RMSD değerinin en düşük olduğu nokta) 2 Å'den küçük olması hedef yapıya doğru bağlandığını ve AutoDock programının bir güvenilirlik göstergesi olduğunu göstermektedir (Katchalski-Katzir ve diğ 1992, Jianwen 2009, Haiou ve diğ 2014).

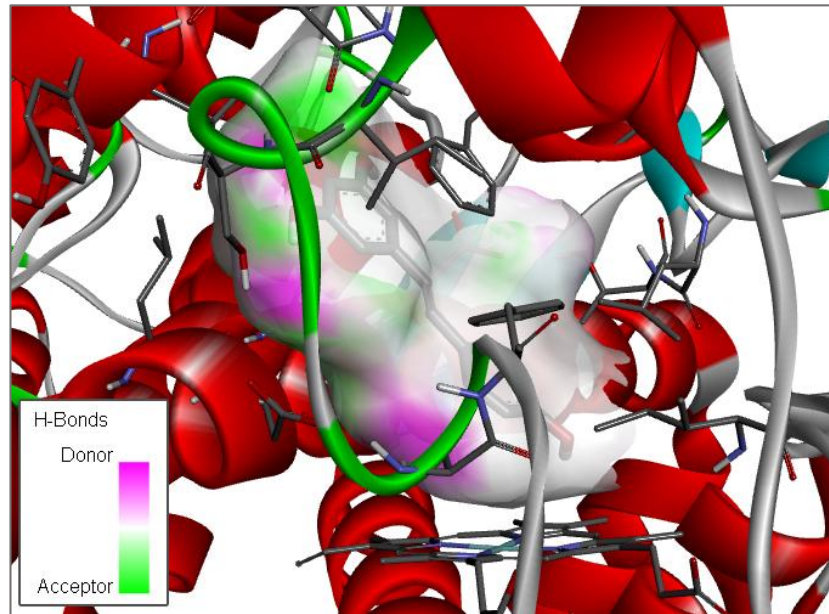
#### 3.5.1 Resveratrol Yapısı İçin Docking Sonuçları

Docking programı ile resveratrol için elde edilen 9 ayrı sonuç bulunmaktadır. Tablo 3.1'de resveratrol yapısı için yapılan docking sonuçlarına bakıldığında en düşük olan RMSD değeri 2 numaralı konformasyona ait olan 0.093 Å'dür.

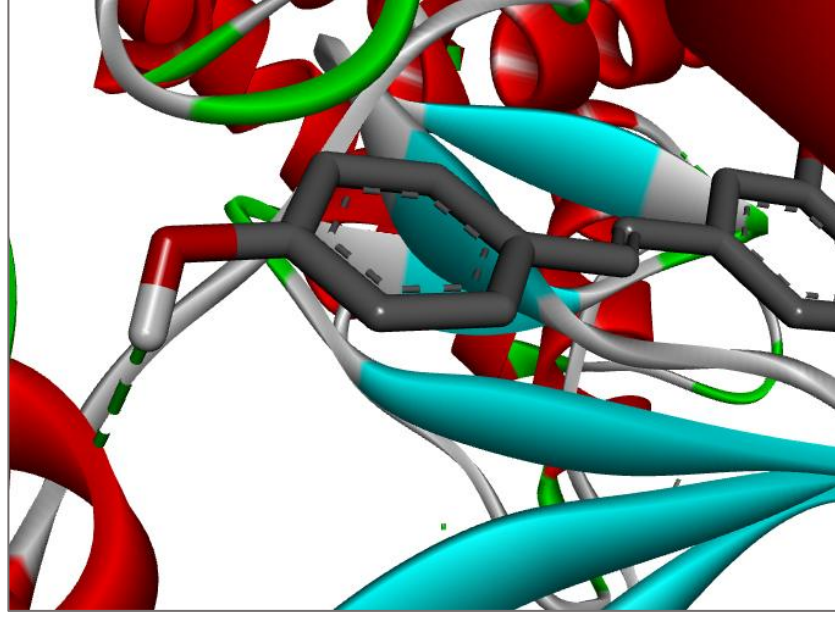
Tablo 3.1: Resveratrol Docking Sonuçları

No	Ligand	Bağlanma Afinitesi	rmsd/ub	rmsd/lb
1	CYP1A1_resveratrol	-6.7	0.0	0.0
2	CYP1A1_resveratrol	-6.7	2.012	0.093
3	CYP1A1_resveratrol	-6.5	7.253	1.159
4	CYP1A1_resveratrol	-6.5	7.381	1.178
5	CYP1A1_resveratrol	-6.4	17.58	15.021
6	CYP1A1_resveratrol	-6.3	21.312	18.544
7	CYP1A1_resveratrol	-6.3	21.24	18.516
8	CYP1A1_resveratrol	-6.2	14.548	12.88
9	CYP1A1_resveratrol	-6.0	17.921	14.813

Tabloda verilen değerler ışığında Şekil 3.39’da en iyi skorlu resveratrol yapısı ile CYP1A1 makromolekülünün aktif bölgede bağlandığı pozisyon ve Şekil 3.40’da aralarındaki hidrojen bağları gösterilmektedir.

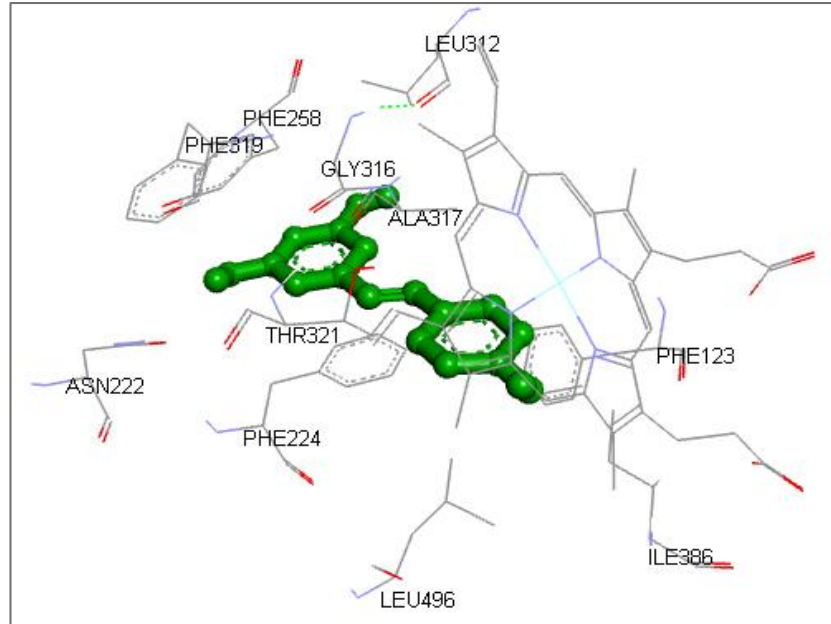


Şekil 3.39: CYP1A1 ile en iyi skorlu Resveratrol yapısının görünümü



Şekil 3.40: CYP1A1 ile Resveratrol arasındaki hidrojen bağları

Şekil 3.41’de resveratrol ligandının CYP1A1 aktif bölgesinde bulunan aminoasitlerle olan etkileşimi gösterilmektedir. Resveratrol, CYP1A1’in aktif bağlanma bölgesinde ASN222, GLY316, LEU312, ALA317, ASP313, ASP320 ve CYS457 amino asitleri ile etkileşim içerisindedir.



Şekil 3.41: Resveratrol yapısının aktif bölge aminoasitleri ile etkileşimi

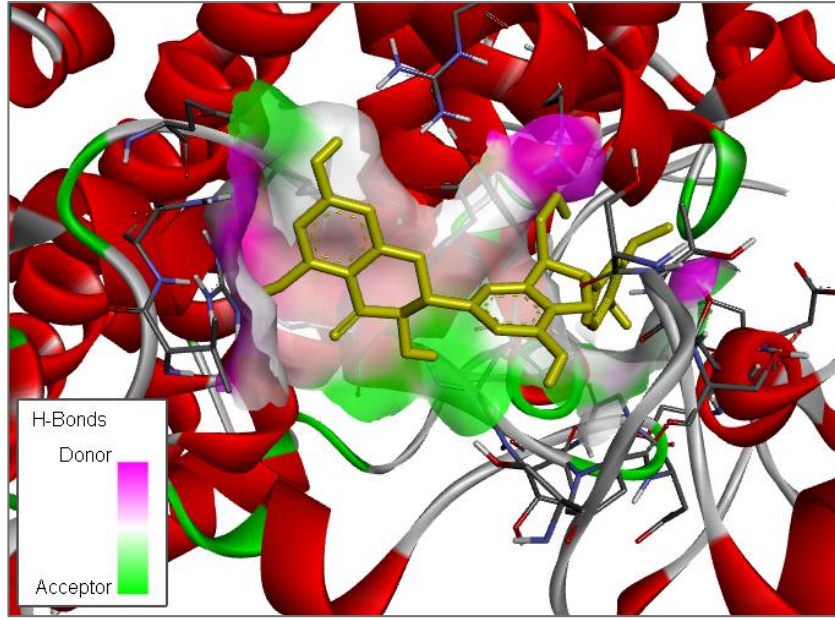
### 3.5.2 Silikristin Yapısı İçin Docking Sonuçları

Docking programı ile Silikristin için elde edilen 9 ayrı sonuç bulunmaktadır. Tablo 3.2’de silikristin yapısı için yapılan docking sonuçlarına bakıldığında en düşük olan RMSD değeri 4 numaralı konformasyona ait olan 1.73 Å’dür.

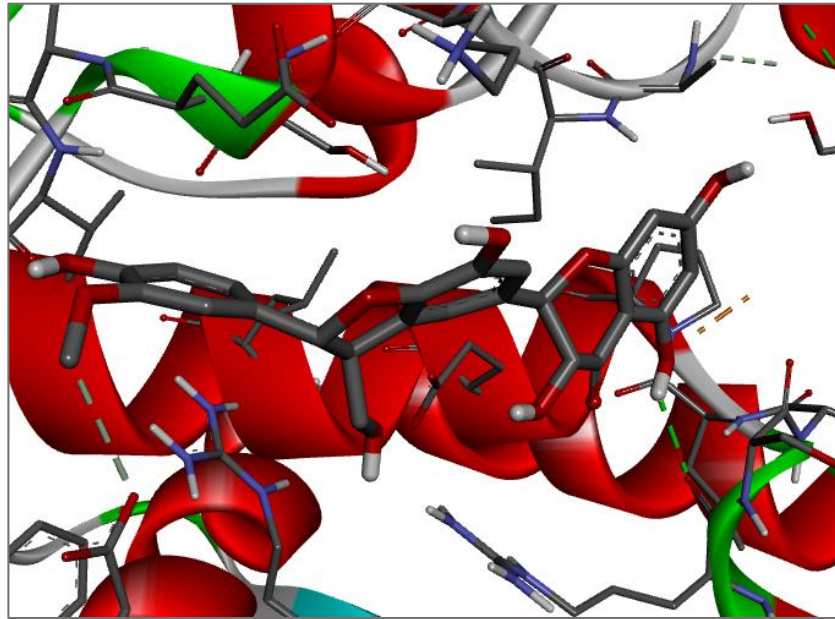
Tablo 3.2: Silikristin Docking Sonuçları

No	Ligand	Bağlanma Afinitesi	rmsd/ub	rmsd/lb
1	CYP1A1_Silikristin	-8.5	0.0	0.0
2	CYP1A1_Silikristin	-8.5	8.144	4.257
3	CYP1A1_Silikristin	-8.5	7.864	4.251
4	CYP1A1_Silikristin	-8.5	9.634	1.73
5	CYP1A1_Silikristin	-8.3	10.796	3.428
6	CYP1A1_Silikristin	-8.1	11.616	3.935
7	CYP1A1_Silikristin	-8.0	10.835	3.275
8	CYP1A1_Silikristin	-7.8	11.402	3.346
9	CYP1A1_Silikristin	-7.7	7.039	3.773

Tabloda verilen değerler ışığında Şekil 3.42’de en iyi skorlu Silikristin yapısı ile CYP1A1 makromolekülünün aktif bölgede bağlandığı pozisyon ve Şekil 3.43’de aralarındaki hidrojen bağları gösterilmektedir.

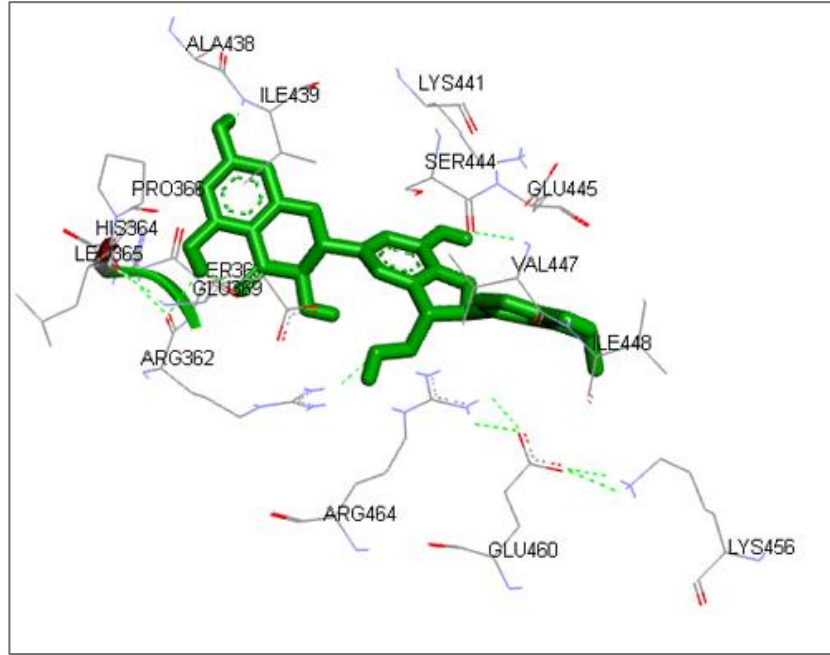


Şekil 3.42: CYP1A1 ile en iyi skorlu Silikristin yapısının görünümü



Şekil 3.43: CYP1A1 ile Silikristin arasındaki hidrojen bağları

Şekil 3.44’de Silikristin ligandının CYP1A1 aktif bölgesinde bulunan aminoasitlerle olan etkileşimi gösterilmektedir. Silikristin, CYP1A1’in aktif bağlanma bölgesinde ARG362, LEU365, MET368, GLU369, ILE439, VAL447, SER444, LYS456, GLU460 ve ARG464 amino asitleri ile etkileşim içerisindedir.



Şekil 3.44: Silikristin yapısının aktif bölge aminoasitleri ile etkileşimi

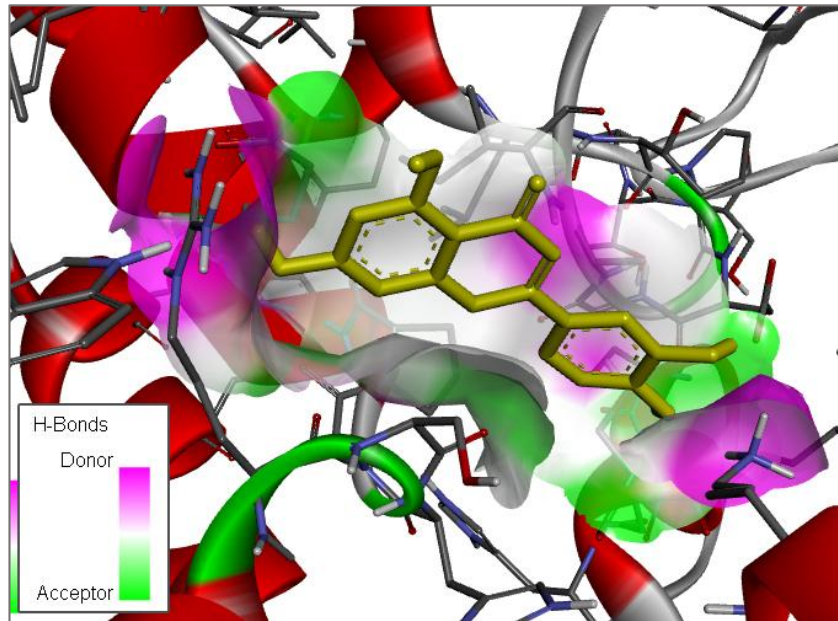
### 3.5.3 Luteolin Yapısı İçin Docking Sonuçları

Docking programı ile luteolin için elde edilen 9 ayrı sonuç bulunmaktadır. Tablo 3.3’de luteolin yapısı için yapılan docking sonuçlarına bakıldığında en düşük olan RMSD değeri 3 numaralı konformasyona ait olan 1.165 Å’dür.

Tablo 3.3: Luteolin Docking Sonuçları

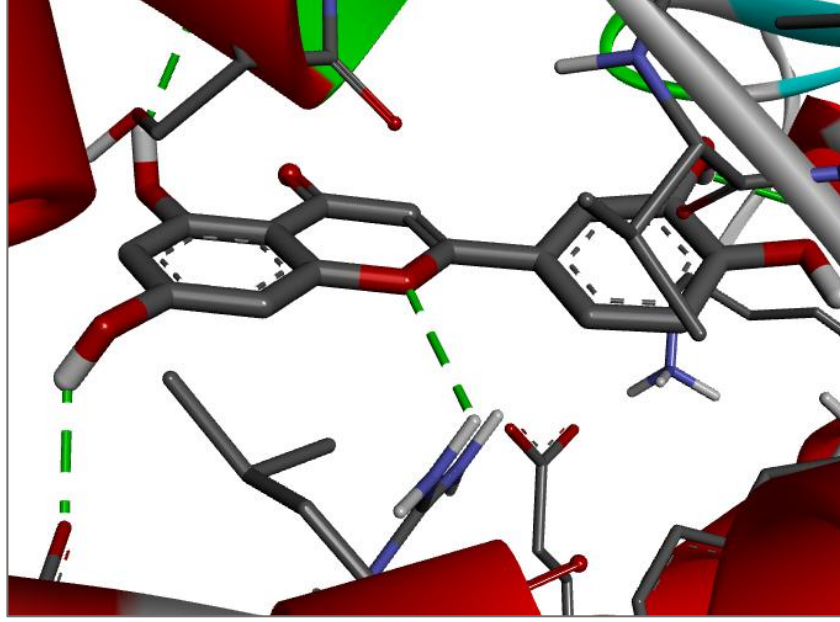
No	Ligand	Bağlanma Afinitesi	rmsd/ub	rmsd/lb
1	CYP1A1_luteolin	-7.7	0.0	0.0
2	CYP1A1_luteolin	-7.2	6.882	1.59
3	CYP1A1_luteolin	-7.1	2.568	1.165
4	CYP1A1_luteolin	-7.0	7.578	3.864
5	CYP1A1_luteolin	-7.0	14.672	13.332
6	CYP1A1_luteolin	-7.0	6.467	4.281
7	CYP1A1_luteolin	-6.9	7.538	3.324
8	CYP1A1_luteolin	-6.8	17.551	14.861
9	CYP1A1_luteolin	-6.7	8.982	5.382

Tabloda verilen değerler ışığında Şekil 3.45’de en iyi skorlu luteolin yapısı ile CYP1A1 makromolekülünün aktif bölgede bağlandığı pozisyon ve Şekil 3.46’da aralarındaki hidrojen bağları gösterilmektedir.



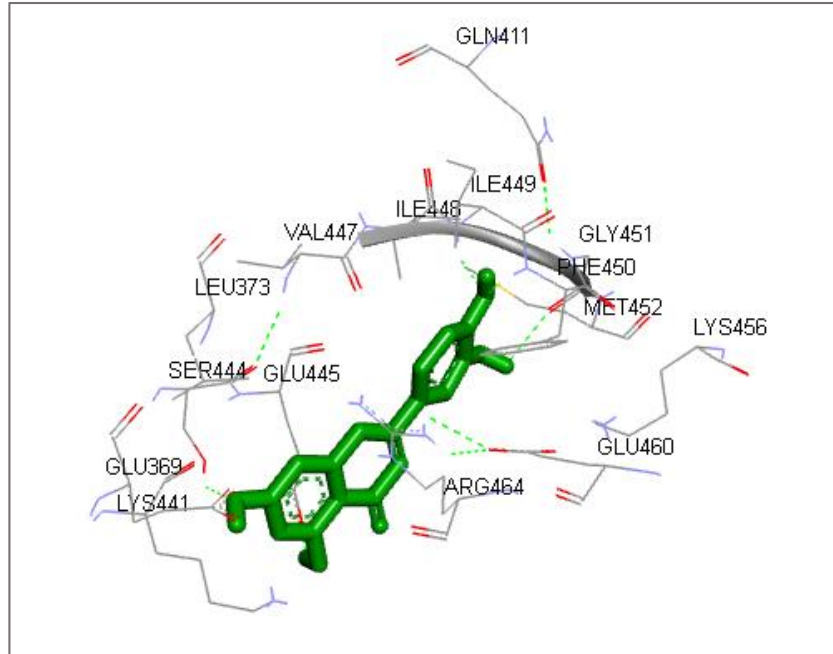
Şekil 3.45: CYP1A1 ile en iyi skorlu Luteolin yapısının görünümü





Şekil 3.46: CYP1A1 ile Luteolin arasındaki hidrojen bağları

Şekil 3.47’de luteolin ligandının CYP1A1 aktif bölgesinde bulunan aminoasitlerle olan etkileşimi gösterilmektedir. Luteolin, CYP1A1’in aktif bağlanma bölgesinde SER444, VAL447, ILE449, PHE450, GLY451, GLN411, ARG464, GLU460, GLU445 ve GLU369 amino asitleri ile etkileşim içerisindedir.



Şekil 3.47: Luteolin yapısının aktif bölge aminoasitleri ile etkileşimi

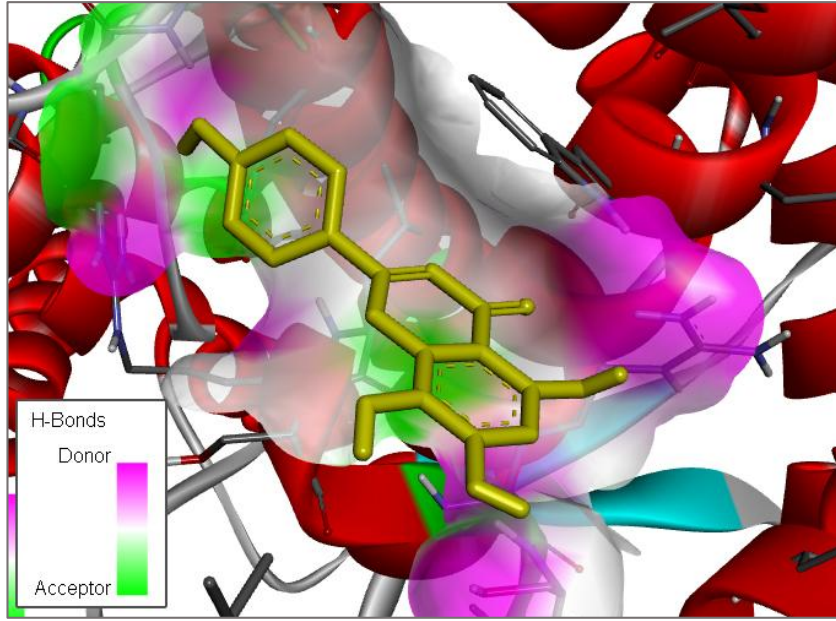
### 3.5.4 Isoscutellarein Yapısı İçin Docking Sonuçları

Docking programı ile isoscutellarein için elde edilen 9 ayrı sonuç bulunmaktadır. Bu konformasyonlar içerisinde en düşük RMSD değeri o yapıya ait en iyi bağlanma konformasyonunu işaret etmektedir. Tablo 3.4'te isoscutellarein yapısı için yapılan docking sonuçlarına bakıldığında en düşük olan RMSD değeri 4 numaralı konformasyona ait olan 1.031 Å'dür.

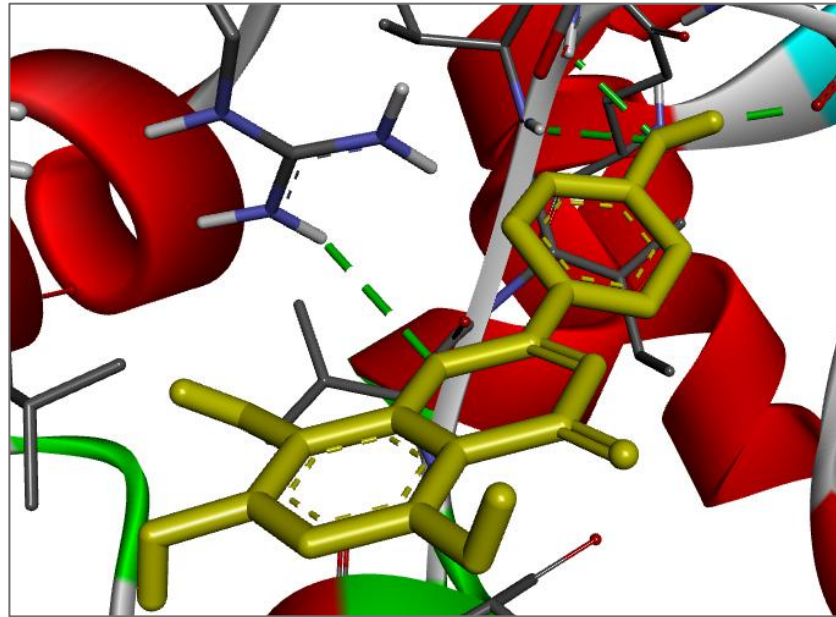
Tablo 3.4: Isoscutellarein Docking Sonuçları

No	Ligand	Bağlanma Afinitesi	rmsd/ub	rmsd/lb
1	CYP1A1_isoscutellarein	-7.3	0.0	0.0
2	CYP1A1_isoscutellarein	-7.2	6.558	1.634
3	CYP1A1_isoscutellarein	-7.1	14.558	13.148
4	CYP1A1_isoscutellarein	-6.8	2.855	1.031
5	CYP1A1_isoscutellarein	-6.7	13.087	7.82
6	CYP1A1_isoscutellarein	-6.6	6.9	2.844
7	CYP1A1_isoscutellarein	-6.6	9.553	6.159
8	CYP1A1_isoscutellarein	-6.5	16.427	13.328
9	CYP1A1_isoscutellarein	-6.5	17.494	14.961

Tabloda verilen değerler ışığında Şekil 3.48'de en iyi skorlu isoscutellarein yapısı ile CYP1A1 makromolekülünün aktif bölgede bağlandığı pozisyon ve Şekil 3.49'da aralarındaki hidrojen bağları gösterilmektedir.

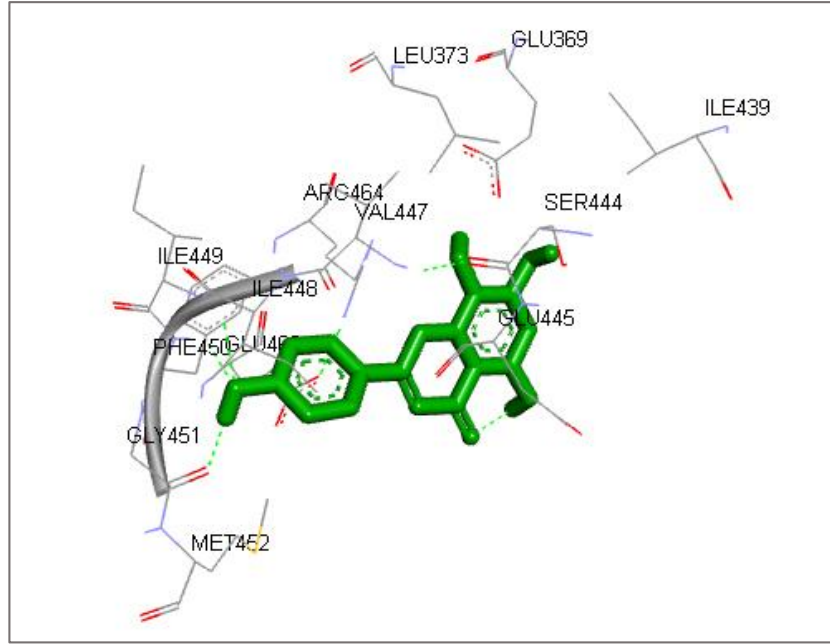


Şekil 3.48: CYP1A1 ile en iyi skorlu Isoscutellarein yapısının görünümü



Şekil 3.49: CYP1A1 ile Isoscutellarein arasındaki hidrojen bağları

Şekil 3.50’de isoscutellarein ligandının CYP1A1 aktif bölgesinde bulunan aminoasitlerle olan etkileşimi gösterilmektedir. Isoscutellarein, CYP1A1’in aktif bağlanma bölgesinde SER444, VAL447, ILE449, PHE450, GLY451, GLN411, ARG464, GLU460 ve GLU451 amino asitleri ile etkileşim içerisindedir.



Şekil 3.50: Isoscutellarein yapısının aktif bölge aminoasitleri ile etkileşimi

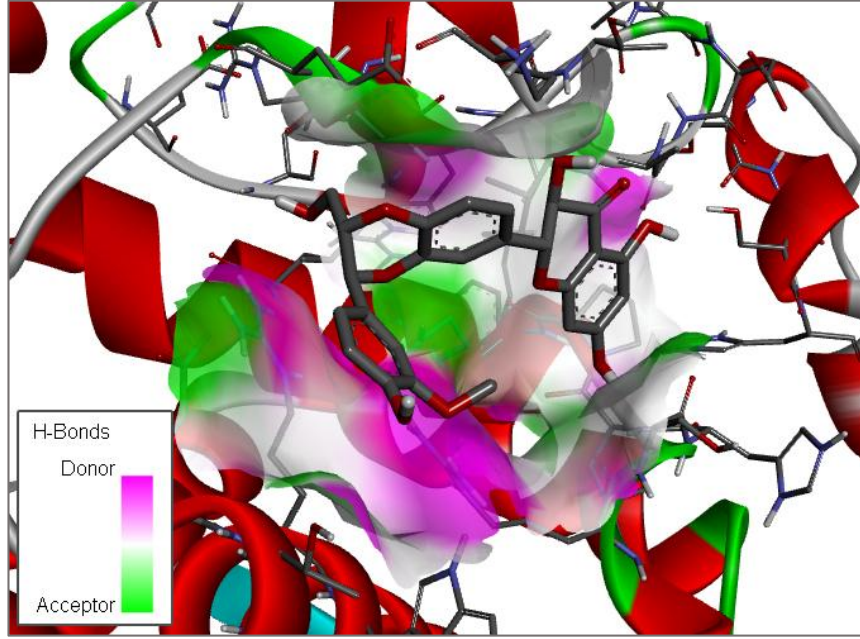
### 3.5.5 Silimarin Yapısı İçin Docking Sonuçları

Docking programı ile Silimarin için elde edilen 9 ayrı sonuç bulunmaktadır. Tablo 3.5'te Silimarin yapısı için yapılan docking sonuçlarına bakıldığında en düşük olan RMSD değeri 5 numaralı konformasyona ait olan 1.16 Å'dür.

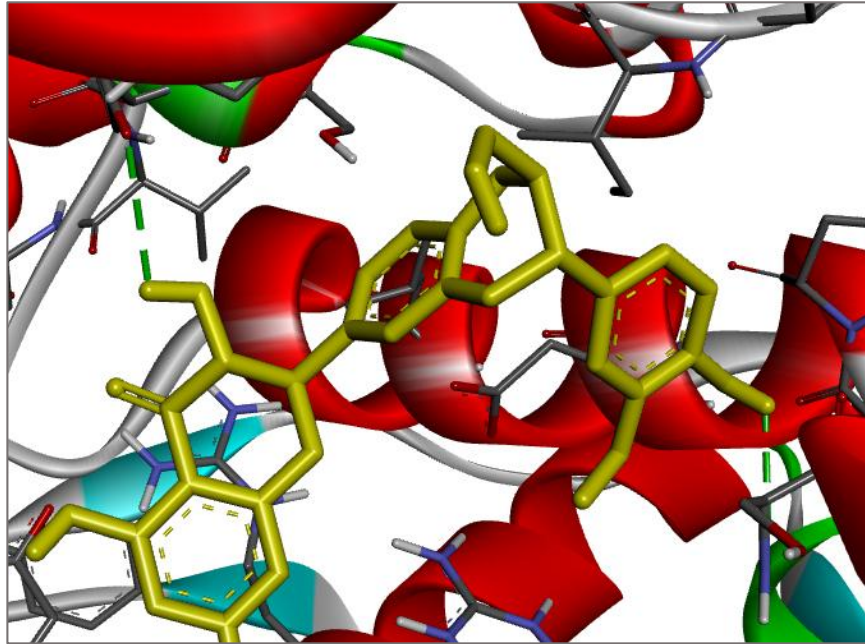
Tablo 3.5: Silimarin Docking Sonuçları

No	Ligand	Bağlanma Afinitesi	rmsd/ub	rmsd/lb
1	CYP1A1_Silimarin	-8.2	0.0	0.0
2	CYP1A1_Silimarin	-8.1	8.048	4.669
3	CYP1A1_Silimarin	-7.8	8.735	2.517
4	CYP1A1_Silimarin	-7.7	8.005	4.651
5	CYP1A1_Silimarin	-7.6	2.408	1.16
6	CYP1A1_Silimarin	-7.5	4.502	2.006
7	CYP1A1_Silimarin	-7.5	9.404	7.115
8	CYP1A1_Silimarin	-7.4	11.072	5.455
9	CYP1A1_Silimarin	-7.4	8.771	1.949

Tabloda verilen değerler ışığında Şekil 3.51’de en iyi skorlu Silimarin yapısı ile CYP1A1 makromolekülünün aktif bölgede bağlandığı pozisyon ve Şekil 3.52’de aralarındaki hidrojen bağları gösterilmektedir.

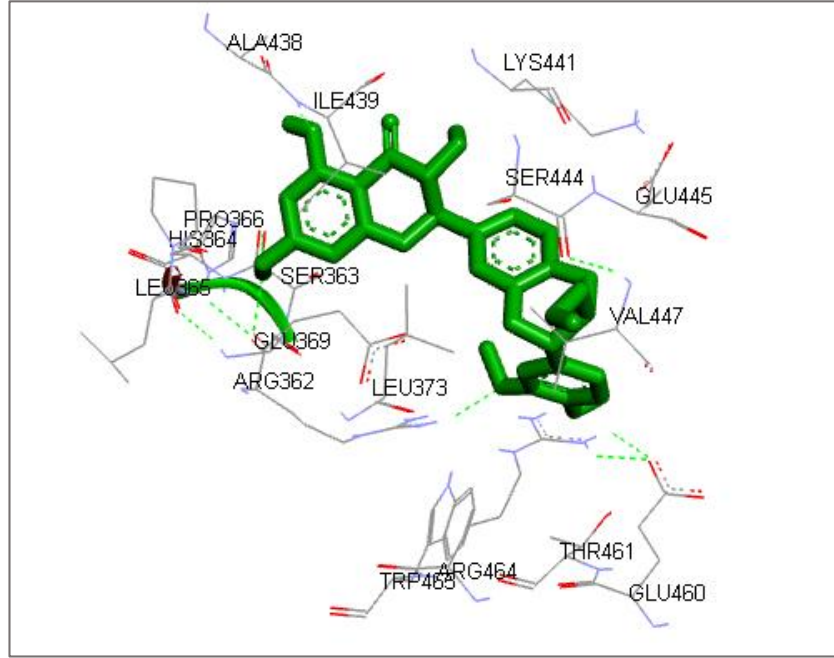


Şekil 3.51: CYP1A1 ile en iyi skorlu Silimarin yapısının görünümü



Şekil 3.52: CYP1A1 ile Silimarin arasındaki hidrojen bağları

Şekil 3.53’de Silimarin ligandının CYP1A1 aktif bölgesinde bulunan aminoasitlerle olan etkileşimi gösterilmektedir. Silimarin, CYP1A1’in aktif bağlanma bölgesinde ARG362, HIS364, ASP361, ILE439, LEU365, ARG464, MET368, GLU369, VAL447, GLU460 ve SER363 amino asitleri ile etkileşim içerisindedir.



Şekil 3.53: Silimarin yapısının aktif bölge aminoasitleri ile etkileşimi

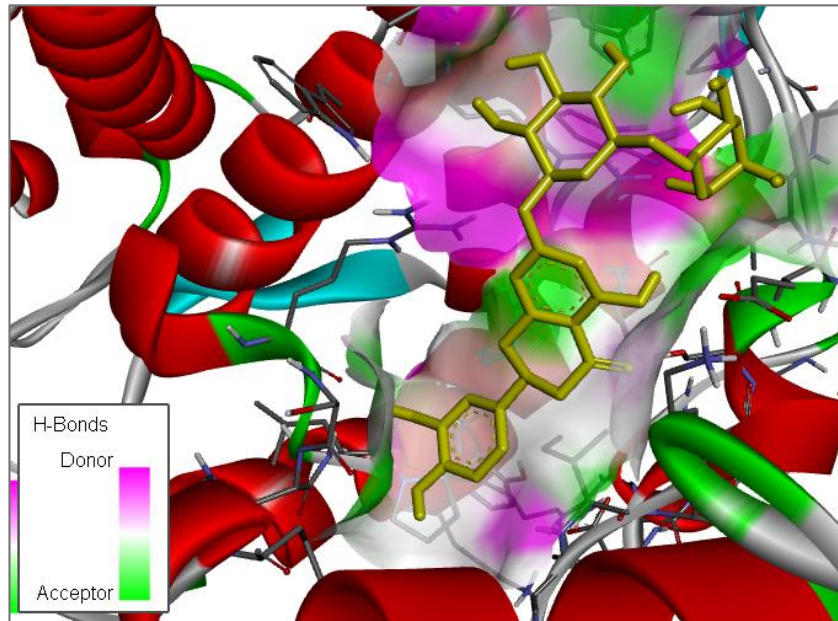
### 3.5.6 Eriositrin Yapısı İçin Docking Sonuçları

Docking programı ile Eriositrin için elde edilen 9 ayrı sonuç bulunmaktadır. Tablo 3.6’da Eriositrin yapısı için yapılan docking sonuçlarına bakıldığında en düşük olan RMSD değeri 5 numaralı konformasyona ait olan 1.962 Å’dür.

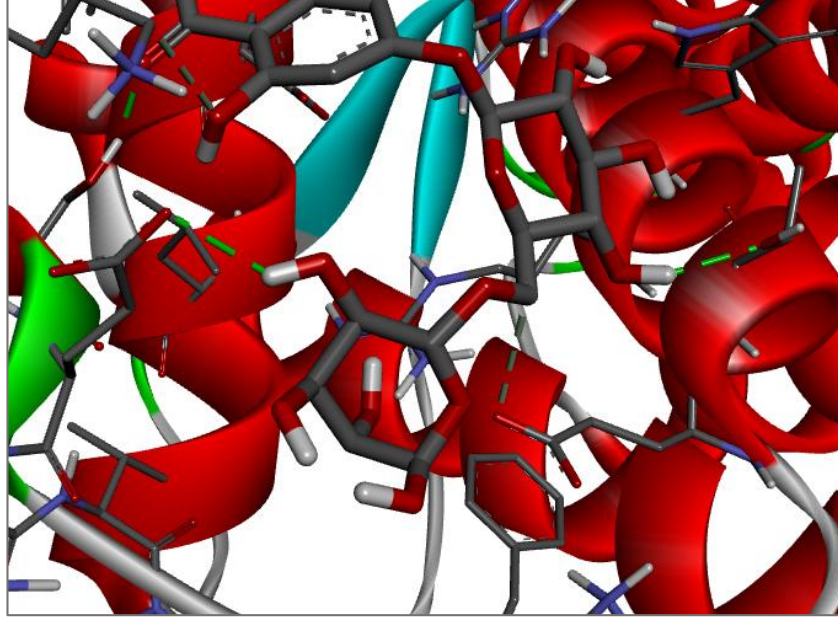
Tablo 3.6: Eriositrin Docking Sonuçları

No	Ligand	Bağlanma Afinitesi	rmsd/ub	rmsd/lb
1	CYP1A1_Eriositrin	-8.8	0.0	0.0
2	CYP1A1_Eriositrin	-8.7	12.735	9.634
3	CYP1A1_Eriositrin	-8.6	10.824	3.824
4	CYP1A1_Eriositrin	-8.6	12.11	6.285
5	CYP1A1_Eriositrin	-8.5	2.231	1.962
6	CYP1A1_Eriositrin	-8.4	9.347	5.0
7	CYP1A1_Eriositrin	-8.4	13.377	5.071
8	CYP1A1_Eriositrin	-8.4	14.29	6.051
9	CYP1A1_Eriositrin	-8.3	13.175	5.509

Tabloda verilen değerler ışığında Şekil 3.54’de en iyi skorlu Eriositrin yapısı ile CYP1A1 makromolekülünün aktif bölgede bağlandığı pozisyon ve Şekil 3.55’de aralarındaki hidrojen bağları gösterilmektedir.

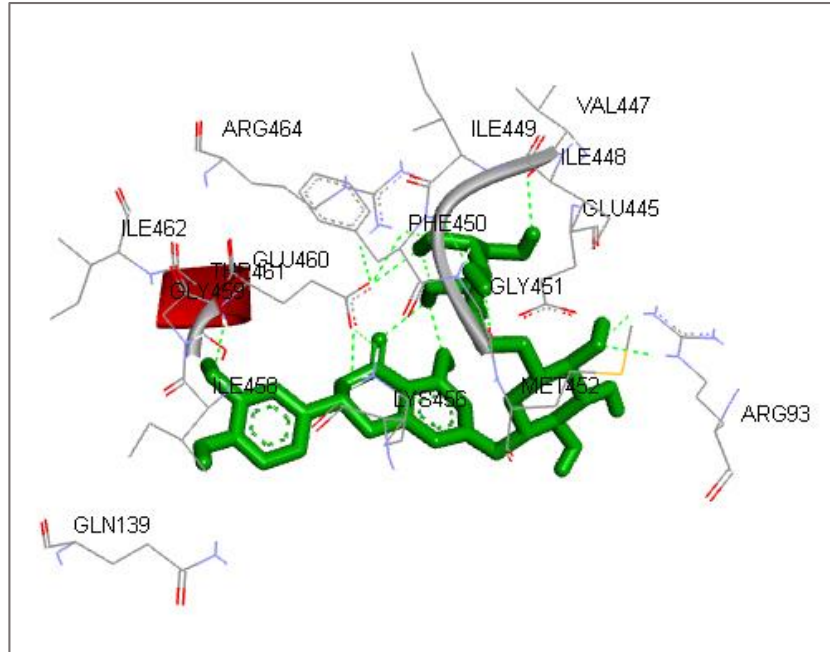


Şekil 3.54: CYP1A1 ile en iyi skorlu Eriositrin yapısının görünümü



Şekil 3.55: CYP1A1 ile Eriostein arasındaki hidrojen bağları

Şekil 3.55’de Eriostein ligandının CYP1A1 aktif bölgesinde bulunan aminoasitlerle olan etkileşimi gösterilmektedir. Eriostein, CYP1A1’in aktif bağlanma bölgesinde ARG93, VAL447, PHE450, GLY451, GLN411, LYS456, GLU460 ve ARG464 amino asitleri ile etkileşim içerisindedir.



Şekil 3.55: Eriostein yapısının aktif bölge aminoasitleri ile etkileşimi



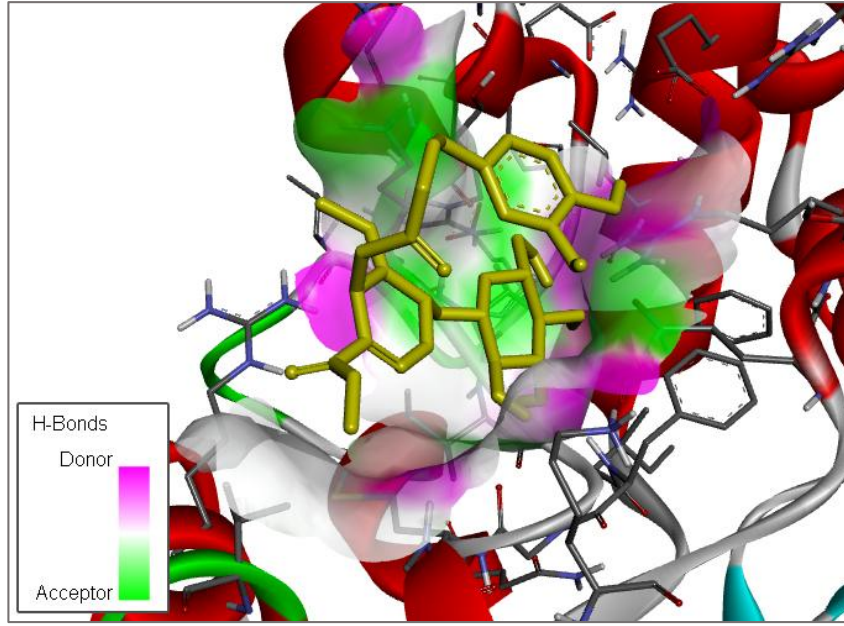
### 3.5.7 Oleuropein Yapısı İçin Docking Sonuçları

Docking programı ile oleuropein için elde edilen 9 ayrı sonuç bulunmaktadır. Tablo 3.7’de oleuropein yapısı için yapılan docking sonuçlarına bakıldığında en düşük olan RMSD değeri 4 numaralı konformasyona ait olan 1.66 Å’dür.

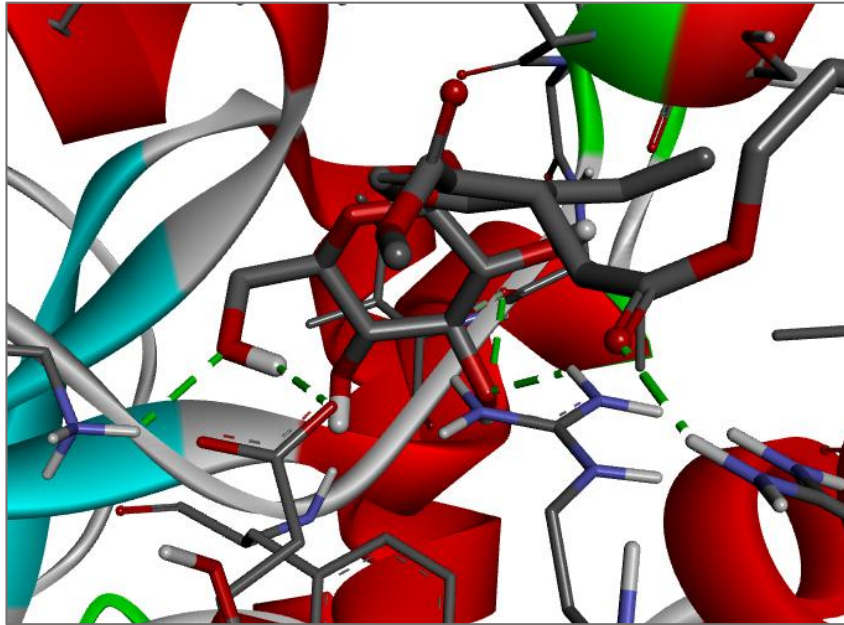
Tablo 3.7: Oleuropein Docking Sonuçları

No	Ligand	Bağlanma Afinitesi	rmsd/ub	rmsd/lb
1	CYP1A1_oleuropein	-7.7	0.0	0.0
2	CYP1A1_oleuropein	-7.5	10.854	1.965
3	CYP1A1_oleuropein	-7.5	8.225	4.386
4	CYP1A1_oleuropein	-7.5	11.163	1.66
5	CYP1A1_oleuropein	-7.4	10.538	5.471
6	CYP1A1_oleuropein	-7.3	10.031	2.117
7	CYP1A1_oleuropein	-7.3	7.736	5.031
8	CYP1A1_oleuropein	-7.3	10.703	1.746
9	CYP1A1_oleuropein	-7.2	11.209	2.018

Tabloda verilen değerler ışığında Şekil 3.56’de en iyi skorlu oleuropein yapısı ile CYP1A1 makromolekülünün aktif bölgede bağlandığı pozisyon ve Şekil 3.57’de aralarındaki hidrojen bağları gösterilmektedir.

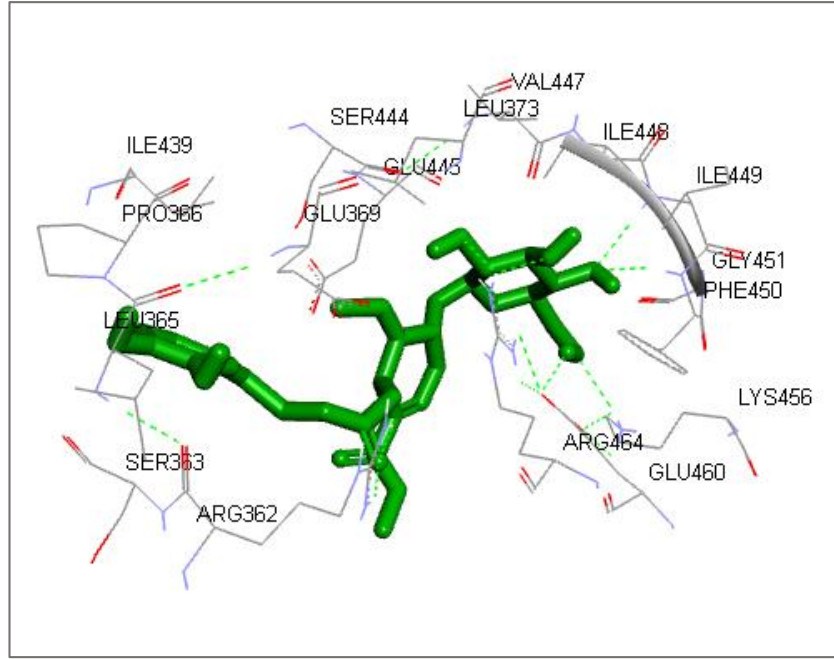


Şekil 3.56: CYP1A1 ile en iyi skorlu Oleuropein yapısının görünümü



Şekil 3.57: CYP1A1 ile Oleuropein arasındaki hidrojen bağları

Şekil 3.58’de oleuropein ligandının CYP1A1 aktif bölgesinde bulunan aminoasitlerle olan etkileşimi gösterilmektedir. Oleuropein, CYP1A1’in aktif bağlanma bölgesinde ARG93, VAL447, PHE450, GLY451, GLN411, LYS456, GLU460 ve ARG464 amino asitleri ile etkileşim içerisindedir.



Şekil 3.58: Oleuropein yapısının aktif bölge aminoasitleri ile etkileşimi

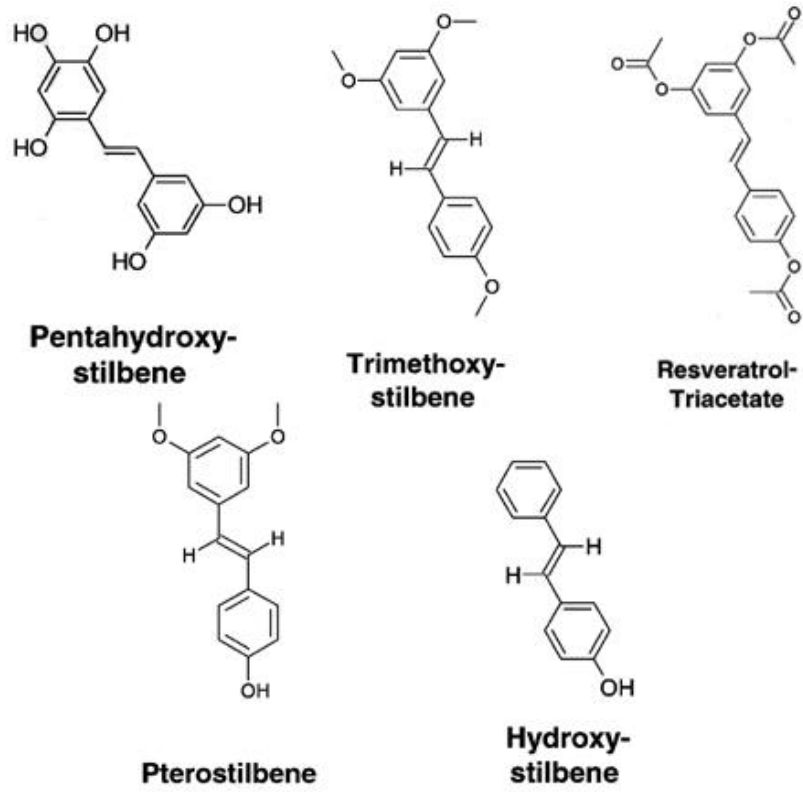
### 3.6 Türev Ligand Denemeleri

Resveratrol, değişik yiyecek ve içeceklerden doğal olarak elde edilen bir stilben türevidir. Kemopreventif ve anti tümör faaliyetleri de dahil olmak üzere çok sayıda yararlı özelliği olduğu bilinen resveratrol, son on yıl içerisinde giderek artan bir biçimde ilgi görmektedir. Doğada birçok gıdada bulunan ve yapısal olarak da benzer olan birçok resveratrol türevi vardır. Buna ek olarak, resveratrol analoglarının bir dizi resveratrol spesifik özelliğın aktivitesini artırmak ve/veya geliştirmek için fonksiyonel gruplar ilave edilerek sentezlendiği çalışmalar da bulunmaktadır. Bu resveratrol türevlerinin geliştirilmesi kanserin önlenmesi ve tedavisi için umut vaad etmektedir (Fulda 2010).

Bu bağlamda, mevcut ligandlar ile docking çalışmaları bittikten sonra bazı resveratrol türevleri ve CYP1A1 makromolekülü ile denemeler yapılmıştır. Bu çalışma için metilli, hidroksile ve asetillendirilmiş resveratrol türevlerinden örnekler seçilmiştir (Tablo 3.8). Seçilen türev bileşiklerin yapıları Şekil 3.59'da verilmiştir.

Tablo 3.8: Resveratrol Türevleri

<b>Metillenmiş Resveratrol Türevleri</b>
Pterostilben, 3,4',5-Trimetoksi-trans-stilben
<b>Hidroksillenmiş Resveratrol Türevleri</b>
Hidroksistilben, Pentahidroksistilben
<b>Asetillendirilmiş Resveratrol Türevleri</b>
Resveratrol triasetat



Şekil 3.59: Resveratrol Türevlerinin Yapıları

Docking sonuçlarına bakıldığında (Tablo 3.9) seçilen resveratrol türevleri ile CYP1A1 makromolekülü arasında en yüksek skorlu bağlanma afinitelerinin trans-resveratrol'e göre daha düşük olduğu görülmektedir.

Tablo 3.9: Resveratrol Türevleri ve Docking Sonuçları

<b>Ligand</b>	<b>Bağlanma Afinitesi</b>	<b>rmsd/ub</b>	<b>rmsd/lb</b>
CYP1A1_triasetat	-6.8	9.244	4.88
CYP1A1_trimetoksi-trans-stilben	-6.9	7.093	3.704
CYP1A1_pterostilben	-6.1	17.81	15.299
CYP1A1_pentahidroksistolben	-5.6	11.163	7.626
CYP1A1_hidroksistolben	-5.6	7.093	3.704

#### 4. TARTIŞMA

Dünyamızdaki canlılar ve özellikle insanlar, endüstriyel faaliyetler sonucunda oluşan ve sürekli artan miktarlarda çeşitli toksik bileşikler, kimyasallar gibi yabancı maddelere maruz kalmaktadır. Bunlar arasında polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), aromatik aminler, nitrozaminler ve metaller en önemlileridir. İnsan vücudu bu tip kimyasal maddelere karşı çok çeşitli savunma mekanizmaları geliştirilmesine rağmen gerek bu kimyasallara karşı giderek artan maruziyet gerekse savunma mekanizmalarının toksik olmayan kimyasalları aktive etmesi sonucunda birçok kanser durumunun görülmesi kaçınılmaz olmaktadır. Günümüzde kanser gelişiminin sentetik ve doğal antioksidan, antimitojen ve antikarsinojen maddeler kullanılarak önlenmesi (chemoprevention) kanser kontrol yöntemi olarak giderek artan biçimde önem kazanmaktadır. Bu maddeler ilaç halinde sentetik olarak ya da diyet içerisinde tabii orijinli bileşikler halinde bulunurlar (Morse ve Stoner 1993). Sentetik antioksidanlar bu yüzyılın başından beri kullanılmasına rağmen son yıllarda yapılan çalışmalar bazı toksik etkileri olduğunu göstermiştir. Bu yüzden doğal antioksidan, antimitojen ve antikarsinojenlerin önemi son yıllarda artmaya başlamıştır (Osowa ve diğ 1992). Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar bu maddeleri içeren sebze ve meyve tüketiminin insanları kansere karşı koruduğunu göstermektedir. (Nestle 1992, Giuliano ve Gapstur 1998, Nestle 1998.) Ayrıca, dünyada ve Türkiye’de pek çok kanser hastası kemoterapi, radyoterapi gibi konvansiyonel tedavilerin yanı sıra bu maddeleri içeren bitkisel preparatları tamamlayıcı ve alternatif tedavi olarak sıklıkla kullanmaktadır. Bunun sonucunda, günümüzde bu ürünlere gösterilen ilgi her geçen

gün artmakta, hem halk sağlığı açısından önem oluşturmakta ve hem de çok büyük bir ekonomik değer olarak ortaya çıkmaktadır. Bu rnlerin, ABD'de 5 milyar dolar, dünya genelinde ise 50 milyar dolarlık yıllık ticaret hacmine eriştiği belirtilmektedir (Gruenwald 2000).

Sebze, meyve, kuruyemiş gibi alınan besinlerin yanı sıra geleneksel tedavi amaçlı kullanılan ısırgan otu, zerdeçal ve yeşil çay gibi birçok bitkinin içinde polifenol olarak bilinen doğal bileşiklerin bulunmaktadır. Bu bileşikler fotosentetik stres, reaktif oksijen türleri, yaralar ve otobur canlılara karşı korunmada bitkilerin kendisi tarafından ürettiği sekonder metabolitlerdir. Bu polifenoller kimyasal yapılarına göre çeşitli sınıflara ayrılmışlardır. Flavonoidler, fenolik bileşiklerin en büyük sınıfını oluşturmaktadır ve yaklaşık olarak 5000 bileşik tanımlanmıştır. Genellikle kimyasal yapılarına göre flavonlar; flavanonlar, flavanoller, izoflavonlar ve antosiyaninlerden ayrılmaktadır. Yapısal olarak ana bileşiği flavon (2-fenilbenzopiren) ile ilişkilidir. Flavonoidler, sağlığı destekleyen, hastalık önleyici diyet takviyesi ve kanser önleyici aktiviteye sahip maddeler olarak tanımlanmıştır. Ek olarak, flavanoidlerin son derece güvenli ve düşük toksisiteye sahip olmaları, onları kanser önleyici ajanlar olmak için mükemmel birer aday yapmaktadır (Wang ve diğ 2009, Celik ve diğ 2013).

Antiproliferatif ve antioksidan olan, apoptozu indüklemesi yönüyle dikkat çeken hesperetin, ülkemizde çok tüketilen narenciye türlerinde bulunan ve flavonoid grubu bileşiklerinden olan bir flavanondur (Choi 2007, Lee ve diğ 2011, Sghaiera ve diğ 2011). Hücre aktivasyonunda narenciye flavonoidlerinin birçok farmakolojik özellikleri tirozin kinaz gibi enzimleri inhibe etmesiyle ilişkilendirilebilir. Anti-karsinogenik etkilerini; apoptoz, seçici sitotoksisite ve antiproliferatif eylemler aracılığıyla sergilemektedir (Manthey 2001). Yapılan çalışmalarda kolon (Li ve diğ 2011, Nalini ve diğ 2012), meme (Choi 2007, Yang ve diğ 2011, Nalini ve diğ 2012), gastrointestinal karsinoid (Zarebczan ve diğ 2011) hücre döngüsünü durdurarak hücreleri inhibe ettiği gösterilmiştir (Michaud-Levesque ve diğ 2012). Özellikle serbest radikal yakalama özelliğiyle dikkat çeken kuersetin ise flavonoidlerin flavanoller grubundandır (Chen ve diğ 2008). Tümör hücrelerine proapoptotik etki gösterdiği de rapor edilmiştir. Bunun yanında kuersetinin, hücre farklılaşması, apoptoz, hücre adezyon ve etkileşimi ve hücre döngüsüyle ilişkili birçok gen ve protein ekspresyonunda da etkisi görülmektedir (Staedler ve diğ 2011).

Bu bileşiklerin kimyasal karsinojenisdeki rollerini açıklayan en olası mekanizmalardan biri de, bu maddelerin toksik kimyasalların metabolizmasında rol oynayan Faz I ve Faz II enzimlerinin modülasyonuna sebep olarak biyoaktif madde oluşumunu düşürmesi ya da detoksifikasyon hızının artmasına neden olmalarıdır. Birçok karsinojenin DNA gibi makro moleküllere kovalent olarak bağlanabilen reaktif elektrofilik metabolitlere veya inaktif metabolitlere dönüşümleri Sitokrom P450 (CYP) (özellikle CYP1A, CYP1B, CYP2E ve CYP3A) enzimlerince katalizlenmektedir. Bu enzim sistemi, memelilerde, hem hastalık hem de sağlık durumunda önemli roller üstlenmektedir. Farklı Sitokrom P450 enzimleri, steroid hormonların oluşması, terapötik ilaçların etki süresi ve şiddetinin düzenlenmesi, yağda çözünen vitaminlerin biyosentezi ve katabolizmasında rol oynaması, lipofilik özelliğe sahip ve vücutta birikmeye meyilli kimyasal maddelerin suda çözünür bileşikler haline getirilerek vücuttan atılması dışında hücre ve genetik materyallerde hasara sebep olan toksik metabolitleri de oluşturmakta dolayısıyla tümör oluşumundan da sorumludur (Sen ve diğ 2001, Sen ve diğ 2006, Arslan ve diğ 2011). Özellikle de CYP1 ailesi toksik kimyasallar, karsinojenler ve aromatik hidrokarbonların metabolik aktivasyonundaki rolleri ile tanınmaktadır. İnsan CYP1 ailesi 3 üyeden oluşmaktadır. Bunlar; CYP1A1, CYP1A2 ve CYP1B1'dir. Bu enzimler, kimyasal karsinogenezdeki rolleri nedeniyle çok çalışılmıştır. Bu sitokrom enzimleri prokarsinojenlerin aktivasyonunu katalize etmektedir. CYP1A1 de bir aril hidrokarbon hidroksilaz (AHH) olarak bilinir ve polisiklik aromatik hidrokarbonların bir dizi oksidasyonunu katalizler. CYP1A1 insan karaciğerinde eser miktarda olmakla beraber esas olarak ekstrahepatik dokularda ifade edilmektedir ve çok sayıda farklı reaksiyon CYP1A1 tarafından katalizlenir (Wei ve diğ 1996).

Bütün P450 izoformlarının içinde CYP1A; (CYP1A1 ve CYP1A2) karsinojenlerin, mutajenlerin ve çevresel kirleticilerin metabolizmasında rol oynadığından öncelikli bir yer tutmaktadır. Bu iki üye ilaçlar, beslenme, çevresel karsinojenler, yağ asitleri ve steroidler gibi birçok endojen bileşiğin metabolizması da dahil olmak üzere eksojen substratların metabolizmasında kritik bir rol oynamaktadır. Genellikle P450 metabolizması sonucu bu substratlar inaktive edilir. Ancak, bazı durumlarda aynı metabolizma sonucunda bir reaktifin aktive edilmesi ile kansere de

yol açabilmektedir. Çünkü karsinogenler ve anti-kanser ilaçlarının hem biyoaktivasyonu hem de inaktivasyonunda rol oynamaktadır. Bu sebeple de kanser hastalıklarının etiolojisinde önemli bir yere sahiptir (Oyama ve diğ 2004, Rooseboom ve diğ 2004).

Doğal ya da sentetik küçük moleküller ile bu enzimlerin hedeflenmesi kanserin önlenmesi ve tedavisinde potansiyel faydalar sağlayacaktır. Şimdiye kadar, CYP enzimlerinin hedeflendiği en başarılı örneklerden biri hormona bağlı göğüs kanseri tedavisinde aromataz inhibitörlerinin (CYP19) kullanılmasıdır. Östrojen'in meme kanseri gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Östrojen üzerine bağlanabilen bir reseptör, östrojen bağımlı meme tümör hücrelerinin proliferasyonundan sorumlu hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etmektedir. Yumurtalıklar, kadınlarda menapoz öncesinde östrojenin dolaşımdaki başlıca kaynağıdır. Ancak, meme kanseri hastalarının çoğu menapoz sonrası kadınlardır ve bu hastaların %75'inde östrojen bağımlı tümör hücreleri vardır (Labrie 1991). Menapozdan sonra yumurtalıklar östrojen üretmeyi durdurmaktadır ve serbest östrojen konsantrasyonu biyolojik etki seviyesinin çok altında olmasına rağmen östrojen bağımlı meme kanserlerinin büyük bölümü bu dönemde ortaya çıkmaktadır. Steroid sülfataz (STS) aracılığıyla konjugatın ayrılması sonrası östrojen tekrar biyolojik olarak hazır hale gelmektedir (Woo ve diğ 1996). Bu gibi durumlarda, meme östrojen konsantrasyonunun menapoz öncesi kadınlardaki doku düzeyi ile neredeyse eşdeğer olduğu saptanmıştır. Bu nedenle; aromataz inhibitörlerinin geliştirilmesi, meme kanseri tedavisinde yeni bir strateji temsil etmektedir. İlk başarılı aromataz inhibitörü, 4 hidroxyandrostenedione (4-OHA, Formestan), 1977 yılında Harry, Angela Brodie ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir ve bu bileşik ile yapılan klinik çalışmalar neticesinde periferik dokularda östrojen sentezi inhibe edilmiştir (Brodie ve diğ 1977). Bu aromataz inhibitörlerinin, özellikle CYP enzimleri hedeflenerek tasarlanmış olması ve kanser tedavisinde başarılı olduğu açıkça görülmektedir.

Son yıllardaki araştırmalarda, kanserin önlenmesi ve tedavisi için kullanılan resveratrol, doğal olarak üzüm, şarap, yer fıstığı ve yabanmersininde bulunan polifenolik yapıda bir bileşiktir. 19. yüzyılın sonlarına doğru keşfedilen resveratrol'un, Çin ve Japonya'da cilt enfeksiyonları, mantar hastalıkları, kalp ve karaciğer rahatsızlıkları için kullanıldığı bilinmekteydi. Yararlarının pek çok bulguyla



desteklenmesi, şarapta resveratrol varlığı ile ilgili çalışmaların da yapılmasına neden olmuştur. Farklı bölgelerden ve değişik türden şaraplar üzerinde yapılan testler sonucunda belirlenen resveratrol miktarları araştırmacılar tarafından değerlendirilmiştir. Ayrıca şaraptaki resveratrolün etkinliğinin izole edilmiş resveratrol ile benzer olduğu saptanmıştır (Siemann ve Creasy 1992). Ancak, şarap sadece resveratrol değil, aynı zamanda önemli ölçüde alkol de içermektedir. Alkol ise sürekli olarak kullanıldığında kardiyomiyopati denilen, kalp kasını harap eden ve aritmiden (kalp atışları ritminde düzensizlik) kalp yetmezliğine kadar çeşitli önemli sorunlara yol açmaktadır (Sato ve diğ 2002). Son zamanlarda yapılan bilimsel çalışmalar ile resveratrolün trombosit (platelet) toplanmasını engelleyici, sıvı peroksidasyon değişimini yardımcı, lipoprotein metabolizmasını ayarladığı, damar genişletici ve iltihap dağıtıcı gibi birçok aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Corre ve diğ 2005). Ferrero ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, sıçan kalbinde oluşturulan iskemi perfüzyon hasarında resveratrolün lipid peroksidasyonunun yıkım ürünü olan malonaldehit düzeyini azalttığı rapor edilmiştir (Ferrero ve diğ 1998). Yine benzer bir çalışmada, resveratrolün bakır ile uyarılan lipid peroksidasyonunu azaltıcı etkisinin quercetin, catechin ve epicatecin gibi bazı fenollerle karşılaştırıldığında  $10^{-5}$  M derişimde resveratrolün daha etken olduğunu göstermiştir (Fulgenzi ve diğ 2001). Bilindiği gibi serbest radikaller DNA hasarına neden olmaktadır. Bu konu ile ilgili Mark ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada resveratrolün potent hidroksil radikal süpürücü özelliği ile DNA kırılmalarını azalttığı ortaya konmuştur (Mark ve diğ 2000). Ayrıca, hepatit hücrelerinde yapılan bazı araştırmalarda, aromatik hidrokarbonların kanserojen aktivitesine neden olan CYP450'lerin aktivasyonunu, resveratrolün belirgin biçimde inhibe ederek meme kanserini önlediği ve bağırsaktaki ilaç emilimini engelleyen etkisini yok ettiği gösterilmiştir (Juan ve diğ 1999, Chun 1999). Antikanserojen tedavinin ana hedeflerinden bir tanesi de tirozin kinaz ailesi enzimlerin inhibisyonudur. Palmieri ve arkadaşları, resveratrolün bu yolağı inhibe ettiği insan plasental ve prostatik adenoma hücrelerinde gösterilmiştir (Atten ve diğ 2001).

Bu tez çalışmasında, insan CYP1A1 ve NADPH sitokrom P450 redüktaz içeren bionik plazmid bakterilerde eksprese edilmiş ve enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Çalışmada, resveratrolün farklı konsantrasyonlarda CYP1A1 bağımlı EROD aktivitesine olan etkileri araştırılmıştır. 7-etoksiresorufin konsantrasyonu

1.5µM’da sabit tutularak resveratrol konsantrasyonu 5 – 100µM arasında değiştirilmiş ve doza bağlı olarak EROD aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Logaritmik inhibitör konsantrasyonuna karşı EROD aktivitesi yüzde grafiğinin çizilmesiyle resveratrolün IC50 değeri 20.99µM olarak saptanmıştır. İnhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde ise, resveratrol (5µM, 10µM, 15µM) ve 7-etoksiresorufin (0.25µM, 0.5µM, 1µM) için üç farklı konsantrasyon seçilmiş ve deneyler bu doğrultuda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde resveratrolün karışık tipte bir inhibisyon sergilediği görülmüştür. Benzer şekilde, Chun ve arkadaşları tarafından insan karaciğer mikrozomları ve *E. coli* hücre zarında eksprese edilmiş insan CYP1A1 ve NADPH sitokrom P450 redüktaz içeren bistonik plazmid üzerinde resveratrolün antikarsinojenik aktivite mekanizmasının araştırıldığı bir çalışmada, mikrozom hücreleri üzerindeki EROD aktivitesi üzerinde düşük bir inhibisyon (IC50:1.1mM) gözlenmiştir. İlginç bir şekilde, resveratrolün doza bağlı şekilde EROD aktivitesini (IC50:23µM) ve MROD (metoksiresorufin O-demetilasyon) aktivitesini (IC50:11µM) güçlü bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir. İnsan CYP1A2 üzerinde de çalışılan resveratrolün EROD (IC50: 1.2mM) ve MROD (IC50: 580µM) aktiviteleri üzerinde etkili olmadığı saptanmıştır. Bu bağlamda, resveratrolün CYP1A2’ye göre CYP1A1 üzerinde yaklaşık 50 kat daha seçici olduğu bulunmuştur. İnsan CYP1A1 ve NADPH sitokrom P450 redüktaz bistonik ekspresyon sisteminde ise resveratrolün CYP1A1’i 9 ve 89µM K(i) değerleri ile karışık tipte bir inhibisyon sergilediği görülmüştür (Chun ve diğ 1999). Bizim çalışmamızda da aynı yöntem uygulanmış ve sonuçlar tutarlılık göstermiştir. Yine başka bir çalışmada, Arınç ve arkadaşları tarafından balık CYP1A1 ve GST aktivitelerinin polifenoller tarafından inhibisyon mekanizması araştırılmıştır. Kullanılan polifenoller ile birlikte inhibisyon derecesindeki farklılıklara rağmen, kullanılan tüm polifenollerin hem CYP1A1 bağımlı EROD aktivitesi hem de GST enzim aktiviteleri üzerindeki rolü inhibe edici olarak bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan resveratrol’ün IC50 değerinin 3.59µM olduğu ve EROD aktivitesini yarışmacı şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir (Arınç ve diğ 2015). IC50 değeri ve inhibisyon tipinin bizim çalışmamızdan farklılık göstermesi kullanılan enzim kaynağının farklı oluşuna bağlanabilir. Son olarak, bu çalışmalar elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. Bu sonuçlar, resveratrolün CYP1A1’in seçici bir inhibitörü olduğunu ve insanlar için kanser önleyici bir madde olarak kullanılmasının kabul edilebilir olduğunu göstermektedir.

Karaciğer hastalıklarını tedavi etmek için yüzlerce yıldır kullanılan Deve dikenini (*S. marianum*) ekstreleri önemli oranda flavolignan içermektedir. Bunların başında silikristin, silibinin ve silidianin yer almaktadır. İnsan karaciğer mikrozomları kullanılarak CYP2D6, CYP2E1 ve CYP3A4 üzerinde yapılan araştırmalarda doza bağımlı inhibisyonları gözlenmiş ve bu inhibisyonların yarışmalı ve karışık tipte olduğu rapor edilmiştir (Zuber ve diğ 2002). Bizim çalışmamızda da aynı bitkiden saflaştırılan silikristin'in farklı konsantrasyonlarda CYP1A1 bağımlı EROD aktivitesine olan etkileri araştırılmıştır. 7-etoksiresorufin konsantrasyonu 1.5µM'da sabit tutularak silikristin konsantrasyonu 5 – 100µM arasında değiştirilmiş ve doza bağlı olarak EROD aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Logaritmik inhibitör konsantrasyonuna karşı EROD aktivitesi yüzde grafiğinin çizilmesiyle silikristin'in IC50 değeri 15.83µM olarak saptanmıştır. İnhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde ise, silikristin (50µM, 100µM, 150µM) ve 7-etoksiresorufin (0.25µM, 0.5µM, 1µM) için üç farklı konsantrasyon seçilmiş ve deneyler bu doğrultuda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde silikristin'in non-kompetatif tipte bir inhibisyon sergilediği görülmüştür. Ayrıca silikristin, insan CYP1A1 ve NADPH sitokrom P450 redüktaz bistonik ekspresyon sisteminde ilk defa çalışılmıştır.

Bakteriyel membranlar kullanılarak insan NADPH-sitokrom P450 redüktaz ile ifade edilen CYP1A1 ve flavonoidlerin hidroksil gruplarının bunun üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir araştırmada; chrysin, apigenin ve luteolin flavonoidleri ile CYP1A1 bağımlı 7-etoksiresorufin omikron-deetilasyon aktivitesinin inhibisyonu çalışılmıştır. Bu çalışmada CYP1A1 bağımlı EROD aktivitesinin en güçlü inhibitörlerinden birinin luteolin maddesi olduğu tespit edilmiştir (Kim ve diğ 2005). Anti-anjiyogenik faaliyetlerin araştırıldığı başka bir çalışmada ise luteolinin, lektin ve luteol maddelerine göre anjiyogenezi daha iyi inhibe ettiği (Ambasta ve diğ 2015), benzer bir diğer çalışmada da progestin bağımlı anjiyogenezi inhibe ettiği ve insan göğüs kanseri hücreleri üzerinde büyümeyi engelleyici yönde rol oynadığı saptanmıştır (Cook ve diğ 2015). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da, luteolin'in farklı konsantrasyonlarda CYP1A1 bağımlı EROD aktivitesine olan etkileri araştırılmıştır. 7-etoksiresorufin konsantrasyonu 1.5µM'da sabit tutularak luteolin konsantrasyonu 5 – 500µM arasında değiştirilmiş ve doza bağlı olarak EROD aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Logaritmik inhibitör konsantrasyonuna karşı EROD aktivitesi yüzde grafiğinin çizilmesiyle luteolinin IC50 değeri 99.05µM olarak

saptanmıştır. İnhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde ise, luteolin (25µM, 50µM, 100µM) ve 7-etoksiresorufin (0.25µM, 0.5µM, 1µM) için üç farklı konsantrasyon seçilmiş ve deneyler bu doğrultuda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde luteolinin non-kompetatif tipte bir inhibisyon sergilediği görülmüştür. Ayrıca, bu sonuçlar, resveratrolde olduğu gibi luteolinin de CYP1A1'in seçici bir inhibitörü olduğunu ve insanlar için kanser önleyici bir madde olarak kullanılmasının kabul edilebilir olduğunu göstermektedir.

Kim ve arkadaşlarının, farklı kanser hücre hatları üzerinde bazı narenciye türlerinden elde edilen yaprak ekstraktları ile yaptığı bir araştırmada, isoscutellareinin potansiyel olarak bazı kanserlerin tedavisi için faydalı bir ajan olabileceği rapor edilmiştir (Kim ve diğ 2010). Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi ile elde edilen ve tanımlanan farklı flavonoidlerin araştırıldığı bir çalışmada *in vitro* olarak yapılan antioksidan aktivite tayinlerinde isoscutellarein maddesinin etkili olduğu ve insan prostat kanseri hücreleri üzerinde de reaktif oksijen türlerinin seviyelerini azalttığı tespit edilmiştir (Kirmizibekmez ve diğ 2012). Öte yandan, lipozomlar içerisine flavonoidler yerleştirilecek insan kanser hücre hatlarında fizikokimyasal özelliklerin araştırılması ve biyolojik aktivitelerin belirlenmesi hedeflenen bir çalışmada ise isoscutellarein maddesinin serbest formu ile karşılaştırıldığında kapsüllenmiş formunun kanser hücre aktiviteleri üzerindeki inhibisyonunun geliştirildiği rapor edilmiştir (Goniotaki ve diğ 2004). Bizim çalışmamızda ise isoscutellarein'in farklı konsantrasyonlarda CYP1A1 bağımlı EROD aktivitesine olan etkileri araştırılmıştır. 7-etoksiresorufin konsantrasyonu 1.5µM'da sabit tutularak luteolin konsantrasyonu 5 – 100µM arasında değiştirilmiş ve doza bağlı olarak EROD aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Logaritmik inhibitör konsantrasyonuna karşı EROD aktivitesi yüzde grafiğinin çizilmesiyle isoscutellarein'in IC50 değeri 21.76µM olarak saptanmıştır. İnhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde ise, isoscutellarein (5µM, 10µM, 15µM) ve 7-etoksiresorufin (0.25µM, 0.5µM, 1µM) için üç farklı konsantrasyon seçilmiş ve deneyler bu doğrultuda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde isoscutellarein'in bir karışık inhibisyon tipi olan un-kompetatif inhibisyon sergilediği görülmüştür. Ayrıca isoscutellarein, insan CYP1A1 ve NADPH sitokrom P450 redüktaz bistronik ekspresyon sisteminde ilk defa çalışılmıştır.

Kiruthiga ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada; wistar albino sıçanlar kullanılarak ksenobiyotik metabolizması tarafından düzenlenen benzo(a)piren (B(a)P) kaynaklı toksisite testlerinde Silimarinin tarafından kimyasal olarak önleyici bir etki sergilediği gösterilmiştir. Test sonuçlarına göre, Silimarin'in faz I ve faz II enzimlerini indükleyerek B(a)P kaynaklı hasarlara karşı önemli derecede koruyucu olduğu ortaya konulmuş ve histopatolojik analizler yapılarak teyit edilmiştir. Genel olarak, CYP1A1 inhibisyonunun ve faz II enzimlerinin modülasyonunun B(a)P'e karşı Silimarin ile sağlanabileceği ifade edilmiştir (Kiruthiga ve diğ 2015). Yine farklı bir çalışmada Silimarin'in aktif bir bileşeni olan silibinin kullanılarak pankreas kanser hücre hatlarında (Panc1 ve Capan2) gelişimin mekanizması ve inhibisyonu incelenmiştir. Sonuç olarak; silibinin'in pankreas kanserine karşı tedavi edici potansiyeli olduğu saptanmıştır (Feng ve diğ 2015). Kansere karşı potansiyel kemopreventif ajanları ve mekanizmalarının araştırıldığı bir çalışmada, Hepalclc7 sıçan hepatom hücreleri üzerinde CYP1A aktivitesinin modülasyonu (inhibisyon, indüksiyon) için bir dizi referans bileşikle birlikte test edilen silimarinin kimyasal yoldan önleyici (Gerhäuser ve diğ 2003) ve yine başka bir çalışmada, insan hepatoselüler karsinoma hücre hattı HepG2 telomeraz aktivitesi üzerinde antiproliferatif etkileri olduğu saptanmıştır (Yurtcu ve diğ 2015). Bizim çalışmamızda ise silimarin'in farklı konsantrasyonlarda CYP1A1 bağımlı EROD aktivitesine olan etkileri araştırılmıştır. 7-etoksiresorufin konsantrasyonu 1.5µM'da sabit tutularak silimarin konsantrasyonu 250 – 1000µM arasında değiştirilmiş ve doza bağlı olarak EROD aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Logaritmik inhibitör konsantrasyonuna karşı EROD aktivitesi yüzde grafiğinin çizilmesiyle silimarin'in IC50 değeri 329.5µM olarak saptanmıştır. İnhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde ise, silimarin (250µM, 500µM, 1000µM) ve 7-etoksiresorufin (0.25µM, 0.5µM, 1µM) için üç farklı konsantrasyon seçilmiş ve deneyler bu doğrultuda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde isoscutellarein'in un-kompetatif tipte bir inhibisyon sergilediği görülmüştür. Ayrıca isoscutellarein, insan CYP1A1 ve NADPH sitokrom P450 redüktaz bistronik ekspresyon sisteminde ilk defa çalışılmıştır.

Oral karsinogenezde fenolik bileşiklerin kemopreventif potansiyelinin araştırıldığı bir çalışmada ise potasyum apigenin, rosmarinik asit, katekinler, cocoa ve eriositrin kullanılarak tedavi edilen tüm gruplarda kontrol grubuna göre tümör

yayılması ve farklılaşması oranının anlamlı bir şekilde azaldığı saptanmıştır. Özellikle potasyum apigenin, rosmarinik asit ve eriositrin ile tedavi edilen hayvanlarda tümöre daha az rastlanmıştır (Baldasquin-Caceres ve diğ 2014). Diyabetik sıçanlarda oksidatif stres üzerine flavonoidlerin koruyucu etkilerini araştıran Miyake ve arkadaşları, limon suyundan elde edilen hesperedin ve eriositrin'in oksidatif stresi baskıladığını ve bu maddelerin in vivo antioksidan olarak rol oynadıklarını rapor etmişlerdir (Miyake ve diğ 1998). Bizim çalışmamızda ise eriositrin'in farklı konsantrasyonlarda CYP1A1 bağımlı EROD aktivitesine olan etkileri araştırılmıştır. 7-etoksiresorufin konsantrasyonu 1.5µM'da sabit tutularak eriositrin konsantrasyonu 100 – 500µM arasında değiştirilmiş ve doza bağlı olarak EROD aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Logaritmik inhibitör konsantrasyonuna karşı EROD aktivitesi yüzde grafiğinin çizilmesiyle eriositrin'in IC50 değeri 257.99µM olarak saptanmıştır. İnhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde ise, eriositrin (50µM, 100µM, 250µM, 500µM) ve 7-etoksiresorufin (0.25µM, 0.5µM, 1µM) için üç farklı konsantrasyon seçilmiş ve deneyler bu doğrultuda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde eriositrin'in yarışmalı (kompetatif) inhibisyon sergilediği görülmüştür. Ayrıca eriositrin, insan CYP1A1 ve NADPH sitokrom P450 redüktaz bistonik ekspresyon sisteminde ilk defa çalışılmıştır.

Akdeniz diyetinin önemli bir parçası olan zeytinyağı, yüksek diyetel yağ içeriğine rağmen koroner arter hastalıkları ve kansere karşı olumlu etkileri ve uzun ömür ile ilişkili olmuştur. Bu konuda yapılan araştırmalar zeytinyağının kardio koruyucu etkileri, trombosit agregasyonunun ve düşük yoğunluklu lipid oksidasyonunu önlenmesi gibi terapötik etkilerini gözler önüne sermiştir (Misra ve diğ 2010). Bunun dışında, *in vitro* çalışmalar ile zeytinyağından bulunan oleuropein'in insan karaciğer mikrozomlarında androstenedion 6-hidroksilaz (CYP3A4) aktivitesini inaktive ettiği gösterilmiştir (Stupans ve diğ 2000, 2001). Bizim çalışmamızda ise oleuropein'in farklı konsantrasyonlarda CYP1A1 bağımlı EROD aktivitesine olan etkileri araştırılmıştır. 7-etoksiresorufin konsantrasyonu 1.5µM'da sabit tutularak oleuropein konsantrasyonu 5 – 500µM arasında değiştirilmiş ve doza bağlı olarak EROD aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Logaritmik inhibitör konsantrasyonuna karşı EROD aktivitesi yüzde grafiğinin çizilmesiyle oleuropein'in IC50 değeri 148.99µM olarak saptanmıştır. İnhibisyon mekanizmasının belirlenmesinde ise, oleuropein (50µM, 100µM, 250µM, 500µM) ve 7-etoksiresorufin (0.25µM, 0.5µM, 1µM) için üç

farklı konsantrasyon seçilmiş ve deneyler bu doğrultuda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde oleuropein'in karışık (mixed type) tipte bir inhibisyon sergilediği görülmüştür. Ayrıca oleuropein, insan CYP1A1 ve NADPH sitokrom P450 redüktaz bistonik ekspresyon sisteminde ilk defa çalışılmıştır.

Bu bilgiler ışığında, öncelikle, daha önce anti-enflamatuar ve anti-kanserojen özellikleri tespit edilmiş ve CYP1A1 ilişkili enzim aktivitesi (EROD) çalışılmış olan resveratrol referans olarak kabul edilmiş ve testlere bu madde ile çalışılarak başlanmıştır. Luteolin, isoscutellarein, eriositrin, silikristin, silimarin ve oleuropein ise insanların diyetinde yaygın olarak kullanılan flavonoidler oldukları için seçilmiştir. Kullanılan bu fenolik bileşiklerin CYP1A1 bağımlı EROD aktivitesi üzerinde önleyici bir etki sergilediği gösterilmiştir.

CYP1A1'in tüm fenolik bileşiklere olan afinitesi aynı derecede değildi. Test edilen flavonoidlerden Silikristin diğerlerine nazaran düşük konsantrasyonlarda daha yüksek inhibisyon göstermiş ve bu nedenle diğerlerine göre daha güçlü bir inhibitör olduğu saptanmıştır. Test edilen fenolik bileşiklerin inhibisyon gücü sırasıyla silikristin > luteolin > oleuropein > resveratrol > eriositrin > isoscutellarein > silimarin şeklindedir. Tablo 4.1'de CYP1A1 bağımlı EROD aktivitesine flavonoidlerin inhibitör etkisi ve IC50 değerleri gösterilmektedir.

Tablo 4.1: Flavonoidlerin inhibitör etkisi ve IC50 değerleri

<b>Flavonoid</b>	<b>IC50</b>	<b>% İnhibisyon</b>
Silikristin	15.83	%93
Luteolin	99.05	%86
Oleuropein	148.99	%74
Resveratrol	20.99	%70
Eriositrin	257.99	%65
Isoscutellarein	21.76	%78
Silimarin	329.5	%26

Tablo 4.2’de ise CYP1A1 makromolekülü ile docking yapılan flavonoid yapıları ve elde edilen RMSD sonuçları görülmektedir.

Tablo 4.2: Flavonoidlerin RMSD değerleri

<b>Flavonoid</b>	<b>RMSD</b>
Resveratrol	0.093 Å
Isoscutellarein	1.031 Å
Silimarin	1.16 Å
Luteolin	1.165 Å
Oleuropein	1.66 Å
Silikristin	1.73 Å
Eriositrin	1.962 Å

Elde edilen docking sonuçları bağlanma afinitesine göre sıralandığında resveratrol-CYP1A1 kompleksi için elde edilen RMSD değeri (0.093 Å) bu yapının hedef moleküle yüksek bağlanma özelliğini ve referans olarak seçilmesinin uygun olduğunu göstermiştir. Yapılan diğer *in vitro* çalışmalarda, Resveratrol’un seçici bir biçimde CYP1A1’i inhibe ettiği çok iyi bilinmektedir. Elde edilen RMSD değerlerine bakıldığında çalışılan fenolik maddelerden Resveratrol’un en iyi bağlanma değerine sahip olduğu açıkça görülmektedir. Bu sonuçlar literatür sonuçlarını desteklemektedir. Ayrıca, fenolik bileşiklerin docking detaylarına bakıldığında CYP1A1’in aktif bölgesinde çoğunlukla VAL447, AGR464, GLU368 ve SER444 aminoasitleri ile etkileşime girmiş oldukları saptanmıştır. Dolayısıyla bu aminoasitlerin CYP1A1’in fenolik bileşikler tarafından inhibisyonu için önemli olduğunu göstermiştir. Tüm bunlara ek olarak, RMSD ve *in vitro* çalışmalarımıza bakıldığında silikristin, silimarin ve isoscutellarein’in de potansiyel olarak güçlü bir CYP1A1 inhibitörü olduğu sonucuna varılmıştır.

Öte yandan, kanser gibi hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için resveratrol bileşiğinin yararlı özelliklerini geliştirmek aynı zamanda türevleri kullanılarak yapılacak olan rasyonel ilaç tasarımları insan sağlığı için büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda türev ligand denemeleri için seçmiş olduğumuz analogların/geliştirilen bir dizi bileşiğin sadece biyoinformatik gözlemlere dayanarak resveratrol kadar



seçiciliği olmadığı saptanmıştır. Bileşiklere –OH, –NO<sub>2</sub> ve benzeri gruplar eklenerek indirgenmesi teorik olarak mantıklı dursada konformasyonel değişikliklere de sebep olacağından bağlanma afinitesini etkilemektedir. Bu da ligandın makromolekülün aktif bölgesine bağlanmasını engellemekte ya da güçleştirmektedir.

## 5. SONUÇ

Günümüzde insan kanserlerinin yaklaşık %80'ine günlük yaşam içerisinde maruz kalınan kimyasalların sebep olduğu bilinmektedir. Bazen bu kimyasalların biyoaktivasyonu sonucunda daha da toksik maddeler ortaya çıkmaktadır. CYP1 ailesi, özellikle de CYP1A1'in, toksisite, kansere yol açan kanserojen polisiklik hidrokarbonların (PAH) ve diğer prokarsinojenlerin metabolik aktivasyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Bu sebeple; CYP1 enzimleri kanserin önlenmesi ve tedavisi için büyük bir öneme sahiptir. Öte yandan; flavonoidler kanserin önlenmesi için araştırmacılara umut vadetmektedir. Öyle ki; sahip oldukları biyolojik özellikleri sayesinde kanserin önlenmesinde etkili oldukları gösterilmiştir. Bu çalışmada, fenolik bileşiklerin CYP1A1 bağımlı EROD aktivitesi üzerindeki olası etkileri araştırılmıştır. Kullanılan bileşiklerin CYP1A1 bağımlı EROD aktivitesi üzerinde önleyici bir etki sergilediği de gösterilmiştir. Test edilen polifenollerden, CYP1A1 bağımlı EROD aktivitesinin en güçlü inhibitörünün 15.83µM IC<sub>50</sub> değeri ile silikristin olduğu bulunmuştur. Silikristin, luteolin ve silimarin EROD aktivitesini non-kompetatif şekilde inhibe etmiştir. Ayrıca isoscutellarein'in EROD aktivitesini bir karışık inhibisyon tipi olan un-kompetatif bir biçimde inhibe ettiği gösterilmiştir. EROD aktivitesinin en zayıf inhibitörünün ise 0.25mM IC<sub>50</sub> değeri ile eriositrin olduğu tespit edilmiştir. Eriositrin, EROD aktivitesini yarışmalı (kompetatif) bir şekilde inhibe etmektedir. Test edilen diğer flavonoidlerin ise EROD aktivitesini karışık (mixed type) şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, polifenollerin karsinojenlerin aktivasyon ve detoksifikasyonuna katıldığını, özellikle de CYP1A1 ilişkili EROD aktivitesini inhibe ettiğini göstermektedir. Literatürdeki çalışmaların sonuçları ile birlikte polifenollerin kimyasal olarak önleyici bir potansiyel ajan olduğu kabul edilebilir. Şimdiye kadar, CYP1A ilişkili enzim aktivitesi (EROD) hakkında resveratrol ve luteolinin inhibe edici etkileri çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Ancak bu konuda, isoscutellarein, eriositrin, silikristin, silimarin ve oleuropein'in

etkisi hakkında bildirilen hiçbir çalışma yoktur. Yapılan testler ile bu polifenollerin potansiyelleri hakkında bilgi edinilmiş ve bu maddelerin kemopreventif rolü ile ilgili çalışmalar da desteklenmiştir.

Sonuç olarak, ilaç metabolize eden enzimler kanserojenleri etkin veya etkisiz hale getirdiğinden, bu enzimlerin flavonoidler tarafından modülasyonu sağlık açısından önemlidir. Ksenobiyotik metabolize eden CYP1 ailesinin kanserojenlerin aktivasyonundaki ve kemoteröpatiklerin etkisizleştirilmesindeki potansiyel rolü bu enzimlerin inhibe edilmesinin potansiyel teröpatik fayda sağlayacağını ileri sürmektedir. Bu çalışmanın sonuçları, flavonoidlerin kanserojen aktivasyonuna katıldığı bilinen CYP1A1 gibi enzimleri inhibe ederek kanserojen oluşumunu azaltıp malignant transformasyonu önlemeye katılabileceğini göstermiş ve bu potansiyel inhibitör bileşiklerin gelecekte yapılacak araştırmalarda oral olarak alınabilen, yan etkisi düşük ve yüksek afiniteye sahip bir ilaç tasarımı için umut olacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

Akşit H., Çelik S. M., Şen Ö., Erenler R., Demirtaş I., Telci I., Elmastaş M., "Complete isolation and characterization of polar portion of *Mentha dumetorum* water extract", *Records of Natural Products*, (8,3) 277-280, (2014).

Al-Azzawie H. F., Alhamdani M. S., "Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits." *Life Sci.*, 78(12):1371-7, (2006).

Althagafy H. S., Graf T. N., Sy-Cordero A. A., Gufford B. T., Paine M. F., Wagoner J., Polyak S. J., Croatt M. P., Oberlies N. H., "Semisynthesis, cytotoxicity, antiviral activity, and drug interaction liability of 7-O-methylated analogues of flavonolignans from milk thistle.", *Bioorg Med. Chem.*, 21(13):3919-26, (2013).

Ambasta R. K., Jha S. K., Kumar D., Sharma R., Jha N. K., Kumar P., "Comparative study of anti-angiogenic activities of luteolin, lectin and lupeol biomolecules.", *J Transl Med.*, 13(1):307, (2015).

Arayne M. S., Sultana N., Bibi Z., "Grape Fruit Juice- Drug Interactions." *Pak J. Pharm Sci.*, 45-57, (2005).

Arınc E. and Philpot R. M., "Preparation and properties of partially purified pulmonary cytochrome P-450 from rabbits.", *J. Biol. Chem.*, 25: 3213–3220, (1976).

Arınc E., "Extrahepatic microsomal forms: Lung microsomal cytochrome P450 isozymes. In Handbook of experimental pharmacology, cytochrome P450.", *Springer*, 373–386,1, (1993).

Arınc E., Arslan Ş., Bozcaarmutlu A. and Adalı O., "Effects of diabetes on rabbit kidney and lung CYP2E1 and CYP2B4 expression and drug metabolism and potentiation of carcinogenic activity of N-nitrosodimethylamine in kidney and lung", *Food Chem Toxicology*, 45: 107-118, (2007).

Arınç E., Arslan, Ş. and Adalı O., "Differential effects of diabetes on CYP2E1 and CYP2B4 proteins and associated drug metabolizing enzyme activities in rabbit liver.", *Arch of Toxicology*, 79: 427-433, (2005).

Arınç E., Yılmaz D., Bozcaarmutlu A., "Mechanism of inhibition of CYP1A1 and glutathione S-transferase activities in fish liver by quercetin, resveratrol, naringenin, hesperidin, and rutin.", *Nutr. Cancer.*, 67(1):137-44, (2015).

Arinc E. and Sen A., "Hepatic Cytochrome P4501A1 and 7-ethoxyresorufin O-deethylase induction in mullet and common sole as an indicator of toxic organic pollution in İzmir Bay, Turkey.", *Mar. Environ. Res.*, 48, 147-160, (1999).

Arslan S., Ozgun O., Sen, A., "Modulatory effects of Cyclamen trochopteranthum on drug and carcinogen metabolism in HeLa cells.", *FEBS Journal*, 278(S1): 194-195, (2011).

Atten M. J., Godoy-Romero E., Attar B. M., Milson T., Zopel M., Holian O., "Resveratrol regulates cellular PKC alpha and delta to inhibit growth and induce apoptosis in gastric cancer cells.", *Investigational New Drugs*, 23:111, (2001).

Avogadro[online], [http://avogadro.cc/wiki/Main\\_Page](http://avogadro.cc/wiki/Main_Page), (2015).

Baker N. A., Dolinsky T. J., Czodrowski P., Li H., Nielsen E. J., Jensen J. H., Klebe G., "PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations.", *Nucleic Acids Research*, 35 (Web Server issue), 522–525, (2007).

Baldasquin-Caceres B., Gomez-Garcia F. J., López-Jornet P., Castillo-Sanchez J., Vicente-Ortega V., "Chemopreventive potential of phenolic compounds in oral carcinogenesis.", *Arch Oral Biol.*, 59(10):1101-7, (2014).

Benet, L. Z., Kroetz D. L. (eds.), Sheiner L. B., "Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution, metabolism, and elimination.",

*Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 3-27, (1996).

Berman M., Westbrook J. , Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Wissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E, "The Protein Databank", *Nucleic Acid Research*, 235-242, (2000).

Bièche I., Narjoz C., Asselah T., Vacher S., Marcellin P., Lidereau R., Beaune P., de Waziers I., "Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues.", *Pharmacogenet. Genom.*, 17: 731-742, (2007).

Block G., Patterson B., Subar S., "Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence.", *A. Nutr. Cancer*, 17: 1-29, (1992).

Brodie A. M., Schwarzel W. C., Shaikh A. A., Brodie H. J., "The effect of an aromatase inhibitor, 4-hydroxy-4-androstene-3,17-dione, on estrogen-dependent processes in reproduction and breast cancer.", *Endocrinology*, 100(6): 1684-1695, (1977).

Carluccio M. A., Siculella L., Ancora M. A. et al., "Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals.", *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.*,23(4):622-9, (2003).

Celik G., Akca H., Sen A., "Investigation of aromatase inhibitor activities in several dietary vegetables on human non-small cell lung cancer cell lines.", *Turkish Journal Biochemistry*, 38 (2) ; 207–217, (2013).

Chen Y., Li X., Xing N., Cao X., "Quercetin inhibits choroidal and retinal angiogenesis in vitro.", *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 246:373-378, (2008).

Chen Z. Y., Chan P. T., Ho K. Y., Fung K. P., Wang J., "Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups." *Chem Phys Lipids*, 79: 157–163, (1996)

Chimera[online], <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera>, (2015).

Choi E. J., "Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21.", *Nutrition and Cancer*, 59: (1) 115-119, (2007).

Chun Y. J., Kim M. Y., Guengerich F. P., "Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor.", *Biochem Biophys Res Commun.*, 262(1):20-4, (1999).

Cook M. T., Liang Y., Besch-Williford C., Goyette S., Mafuvadze B., Hyder S. M., "Luteolin inhibits progesterin-dependent angiogenesis, stem cell-like characteristics, and growth of human breast cancer xenografts.", *Springerplus*, 4:444, (2015).

Corcoran M. P., McKay D. L., Blumberg J. B., "Flavonoid basics: chemistry, sources, mechanisms of action, and safety." *Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics*, 31: 176–189, (2012).

Corona G., Tzounis X., Assunta Dessì M., Deiana M., Debnam E. S., Visioli F., Spencer J. P., "The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation.", *Free Radic Res.*, 40(6):647-58, (2006).

Corre L. L., Chalabi N., Delort L., Bignon Y. J. and Bernard-Gallon, "Resveratrol and breast cancer chemoprevention: Molecular mechanisms.", *Mol.Nutr. Food Res.(Review)*, 49; 462 – 471, (2005).

Cygwin[online], <https://www.cygwin.com>, (2015).

Çapanoğlu G. E., Toydemir O. G., Boyacoğlu D., "Flavonoidlerin biyoyararlılığını etkileyen faktörler." *Review GIDA*, 35 (5): 387-394, (2010).

Day and Harborne J. B. (eds.), *Methods in Plant Biochemistry*, 389-420, (1989).

De Pascual-Teresa S., Sanchez-Moreno C., Granado F., Olmedilla B., De Ancos B., Cano M. P., "Short and mid-term bioavailability of flavanones from oranges in humans.", *Curr Top Nutraceut R*, 5: 129-134, (2007).

Delorie D. J. and Noer G., "Cygwin API Reference", *Copyright Red Hat Inc.*, (1998).

Demirtas I., Ayhan B., Sahin A., Aksit H., Elmastas M., Telci I., "Antioxidant activity and chemical composition of *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* (Bentham) Borm. (Lamiaceae)", *Natural Product Research*, (25,16) 1512-1523, (2011).

Ding X. and Kaminsky L. S., "Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts.", *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43: 149-173, (2003).

Evans W. E. and Relling M. V., "Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics." *Science*, 286(5439):487-91, (1999).

Feng W., Cai D., Zhang B., Lou G., Zou X., "Combination of HDAC inhibitor TSA and silibinin induces cell cycle arrest and apoptosis by targeting survivin and cyclinB1/Cdk1 in pancreatic cancer cells.", *Biomed Pharmacother.*, 74:257-64, (2015).

Ferrero M. E., Berletti A., Fulgenzi A., Pellegatta F., Corsi M., Bonfrate M., Ferrara F., Caterina R., Giovannini L., Berletti A., "Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium.", *Am.J.Clin.Nutr.*, 68:1208-12, (1998).

Fulda S., "Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer.", *Drug Discov. Today*, 15(17-18):757-65, (2010).

Fulgenzi A., Bertelli A. E., Magni E., Ferrero E., Ferrero M. E., "In vivo inhibition of TNF $\alpha$ -induced vascular permeability by resveratrol." *Transp. Proceedings.*, 33: 2;341-2343, (2001).

Galati G. and O'Brien P. J., "Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties.", *Free Radical Bio. Med.*, 37(3): 287-303, (2004).

Gerhäuser C. et al, "Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents.", *Mutat Res.*, 523-524:163-72, (2003).

Gibellini L., Pinti M., Nasi M., Montagna J. P., Biasi S. D., Roat E., Bertocelli L., Cooper E. L., Cossarizza A., "Quercetin and cancer chemoprevention.", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (2011).

Goniotaki M., Hatziantoniou S., Dimas K., Wagner M., Demetzos C., "Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines.", *J Pharm Pharmacol.*, 56(10):1217-24, (2004).

Gonzalez F. J. and Yu Ai-Ming., "Cytochrome P450 and xenobiotic receptor humanized mice.", *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 46: 41–64, (2006).

Gonzalez F. J., "Molecular genetics of the P450 superfamily.", *Pharmacol. Ther.*, 45: 1-38, (1990).

GraphPad Prism 5.0, <http://www.graphpad.com>, (2015).

Hackett A. M., "The metabolism of flavonoid compounds in mammals. In: Plant flavonoids in biology and medicine. biochemical pharmacological and structure activity relationships." *New York: Liss*, 177–194, (1986).

Haiou L., Liyao L., Rong C., Lijun Q., Xiaoyan X., Qiang L., "PaFlexPepDock: Parallel Ab-Initio Docking of Peptides onto Their Receptors with Full Flexibility Based on Rosetta", *PLoS One*, 9(5), (2014).

Harborne J. B., "Phenolic glycosides and their natural distribution.", *Biochemistry of Phenolic Compounds*, 129, (1964).



Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J., "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships." *J Nutritional Biochem*, 13: 572-584, (2002).

Hertog M. G. L., Feskens E. J. M., Hollman P. C. H., Kafan M. B., Kromhout D., "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study.", *Lancet*, 342:1007-1010, (1993).

Hertog M. G. L., Hollman P. C. H. and Katan M. B., "Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands." *J. Agric. Food. Chem.*, 40: 2379-2383, (1992).

Hong J.Y., Pan J., Gonzales F. J., Gelboin H. V., Yang C. S., "The induction of a specific form of cytochrome P-450 (P-450j) by fasting." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142, 1077-1083, (1987).

ICEstimator[online], <http://www.antimalarial-icestimator.net>, (2015).

Ioannides C., Lewis D. F., "Cytochrome P450 in the bioactivation of chemicals.", *Curr. Top Med. Chem.*, 4: 1767-1788, (2004).

Jefcoate C. R., Liehr J. G., Santen R. J., Sutter T. R., Yager J. D., Yue W., Santner S. J., Tekmal R., Demers L., Pauley R., Naftolin F., Mor G., Berstein L., "Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens.", *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 95-112, (2000).

Jemai H., Bouaziz M., Fki I., El Feki A., Sayadi S., "Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves.", *Chem. Biol. Interact.*, 25;176(2-3):88-98, (2008).

Jianwen F., "Accurate Docking is Achieved by Decoupling Systematic Sampling from Scoring", *All Theses and Dissertations (ETDs)*, 108, (2009).

Juan M., Raventos M. L., Bronat C., Planas M. J., "Determination of trans resveratrol in plasma by HPLC.", *Anal Chem.*, 71:747-750, (1999).

Katchalski-Katzir E., Shariv I., Eisenstein M., Asher A. F., Aflalo C., Vakser I. A., "Molecular surface recognition: Determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques.", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, (89) 2195-2199, (1992).

Kazazis C. E., Evangelopoulos A. A., Kollas A., Vallianou N. G., "The therapeutic potential of milk thistle in diabetes.", *Rev Diabet Stud.*, 11(2):167-74, (2014).

Khayyal M. T., el-Ghazaly M. A., Abdallah D. M., Nassar N. N., Okpanyi S. N., Kreuter M. H., "Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats.", *Arzneimittelforschung*, 52(11):797-802, (2002).

Kim H. J., Lee S. B., Park S. K., Kim H. M., Park Y. I., Dong M. S., "Effects of hydroxyl group numbers on the B-ring of 5,7-dihydroxyflavones on the differential inhibition of human CYP1A and CYP1B1 enzymes.", *Arch Pharm Res.*, (10):1114-21, (2005).

Kim H., Moon J. Y., Mosaddik A., Cho S. K., "Induction of apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells by polymethoxylated flavone-rich *Citrus grandis* Osbeck (*Dangyuja*) leaf extract.", *Food Chem Toxicol.*, 48(8-9):2435-42, (2010).

King A., Young G., "Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals.", *J. Am. Diet Assoc.*, 99(2): 213-218, (1999).

Kirmizibekmez H., Ariburnu E., Masullo M., Festa M., Capasso A., Yesilada E., Piacente S., "Iridoid, phenylethanoid and flavonoid glycosides from *Sideritis trojana*.", *Fitoterapia*, 83(1):130-6, (2012).

Kiruthiga P. V., Karthikeyan K., Archunan G., Pandian S. K., Devi K. P., "Silimarin prevents benzo(a)pyrene-induced toxicity in Wistar rats by modulating xenobiotic-metabolizing enzymes.", *Toxicol Ind Health.*, 31(6):523-41, (2015).

Klebe G., "Recent developments in structure-based drug design.", *Journal of Molecular Medicine*, 78 (5): 269–81, (2000).

Kuhnau J., "The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition." *World Rev Nutr Diet*, 24: 117–191, (1976).

Labrie F. (ed.), "Intracrinology.", *Mol. Cell Endocrinol.*, 78(3), C113-C118, (1991).

Lee K. S., Kim E. Y., Cho S. G., Han Y. J., Yang Y. C., Lee S. S., Ko M. S., Riu K. J., Lee H. T., Park S. P., "3,4-Dihydroxyflavone acts as an antioxidant and antiapoptotic agent to support bovine embryo development in vitro.", *J Reprod Dev.*, 57: 127-134 (2011).

Lesk M. A., "Introduction to Protein Architecture", *Oxford University Press*, 27, 39, 304, (2001).

Leth T., Justesen U., "Analysis of flavonoids in fruits, vegetables and beverages by HPCL-UV and LC-MS and estimation of the total daily flavonoid intake in Denmark. In: Polyphenols in Food.", *Official Publications Eur. Commun.*, 39–40, (1998).

Li F., Ye L., Lin S., Leung L. K. (eds.), "Dietary flavones and flavonones display differential effects on aromatase (CYP19) transcription in the breast cancer cells MCF-7.", *Molecular and Cellular Endocrinology*, 344: 51–58, (2011).

Lieber C. S., "Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): The first 30 years (1968 –1998)—a review." *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 23, 991–1007, (1999).

Lieber C.S., "Cytochrome P-450E1: Its physiological and Pathological Role." *Biol. Rev.*, 77(2): 517-544, (1997).

Liska D. J., "The detoxification enzyme systems.", *Aitern. Med. Rey.*, 3(3): 18,198, (1998).

Lu A., Levin W., "The resolution and reconstitution of the liver microsomal hydroxylation system.", *Biochem. Biophys. Acta.*, 344: 205-240, (1974).

Lu J. et al, "Luteolin exerts a marked antitumor effect in cMet-overexpressing patient-derived tumor xenograft models of gastric cancer.", *J. Transl Med.*, 13:42, (2015).

Ma L., Peng H., Li K., Zhao R., Li L., Yu Y., Wang X., Han Z., "Luteolin exerts an anticancer effect on NCI-H460 human non-small cell lung cancer cells through the induction of Sirt1-mediated apoptosis.", *Mol. Med. Rep.*, 12(3):4196-202, (2015).

Malhotra A., Bath S., Elbarbry F., "An Organ System Approach to Explore the Antioxidative, Anti-Inflammatory, and Cytoprotective Actions of Resveratrol.", *Oxid Med Cell Longev.*, 2015:803971, (2015).

Manthey J. A., Guthrie N., Grohmann K., "Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation current medicinal chemistry.", *Curr Med Chem.*, 8: 135-153, (2001).

Mark E. J., Wiencke J. K., Thurston S. W., Kelsey K. T., Varkonyi A., Wain J. C., Christiani D. C., "Early age at smoking initiation and tobacco carcinogen DNA damage in the lung.", *J. Natl. Cancer Inst.*, 91: 614–620, (2000).

Martin J. and Krum H., "Cytochrome P450 Drug Interactions Within The HMG-KoA Reductase Inhibitor Class: Are They Clinically Relevant.", *Drug Safety.*, 13-21(9), (2003).

Masters B. S. S., Yasukochi Y., "Some properties of a detergent-solubilized NADPH–cytochrome c (cytochrome P-450) reductase purified by biospecific affinity chromatography.", *J. Biol. Chem.*, 251:5337–5344, (1976).

Mauser H., Guba W. (eds.), "Recent developments in de novo design and scaffold hopping.", *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 11 (3): 365–74, (2008).

Mayer K. E., Myers R. P. and Lee S. S., "Silimarin treatment of viral hepatitis: a systematic review.", *Journal of Viral Hepatitis*, 12, 559–567, (2005).

McLemore T. L., Adelberg S., Liu M.C., McMahon N. A., Yu S. J., Hubbard W. C., Czerwinski M., Wood T. G., Storeng R., Lubet R. A. et al., "Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas." *J. Natl. Cancer Inst.*, 82:1333-1339, (1990).

Meulenberg E. P., "Phenolics: occurrence and immunochemical detection in environment and food." *Molecules*, 14(1): 439-473, (2009).

Meunier B., de Visser S. P., Shaik S., "Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes.", *Chem. Rev.*, 104 (9), (2004).

Michaud-Levesque J., Bousquet-Gagnon N., Béliveau R., "Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration.", *Experimental Cell Research*, 318: 925–935, (2012).

Misra A., Singhal N., Khurana L., "Obesity, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes in developing countries: role of dietary fats and oils.", *J. Am. Coll. Nutr.*, 29,289S–301S, (2010).

Miyake Y., Yamamoto K., Tsujihara N., Osawa T., "Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats.", *Lipids*, 33(7):689-95, (1998).

Mollerup S., Ovrebo S., Haugen A., "Lung carcinogenesis: resveratrol modulates the expression of genes involved in the metabolism of PAH in human bronchial epithelial cells.", *Int. J. Cancer*, 92: 18-25, (2001).

Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K., Olson A. J., "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function.", *J. Comp. Chem.*, 1639-1662, (1998).

Nagai T., Miyaichi Y., Tomimori T., Suzuki Y., Yamada H., "In vivo anti-influenza virus activity of plant flavonoids possessing inhibitory activity for influenza virus sialidase.", *Antiviral Res.*, 19(3):207-17, (1992).

Nalini N., Aranganathan S., Kabalimurthy J. (eds.), "Chemopreventive efficacy of hesperetin (citrus flavonone) against 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis.", *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(5): 397-408, (2012).

Nebert D. W. and Gonzalez F. J., "P-450 Genes: Structure, Evolution and Regulation.", *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 945-993, (1987).

Nebert D. W., Gonzalez F. J., "P450 genes and evolutionary genetics.", *Hosp Pract*, 22(3): 63-74, (1987).

Nelson D. R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J. J., Feyereisen R., Waxman D. J., Waterman M. R., Gotoh O., Coon M. J., Estabrook R. W., Gunsalus I. C. and Nebert D. W., "P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, and Nomenclature.", *Pharmacogenetics*, 6: 1-42, (1996).

Oleksiak M. F., Wu S., Parker Qu W., Cox R., Zeldin D. C. and Stegeman J. J., "Identification and regulation of a new vertebrate cytochrome P450 subfamily, the CYP2Ps, and functional characterization of CYP2P3, a conserved arachidonic acid epoxygenase/19hydroxylase.", *Arch. Biochem. Biophys.*, 411(2): 223-234, (2002).

Olsen L., Oostenbrink C., Jørgensen F. S., "Prediction of cytochrome P450 mediated metabolism.", *Adv Drug Deliv Rev.*, 86:61-71, (2015).

Ortega N., Reguant J., Romero M. P., Macia A., Motilva M. J., "Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an in vitro digestion model.", *J Agric Food Chem.*, 57: 5743–5749, (2009).

Oyama T., Kagawa N., Kunugita N., Kitagawa K., Ogawa M., Yamaguchi T., Suzuki R., Kinaga T., Yashima Y., Ozaki S., Isse T., Kim Y. D., Kim H.,

Kawamoto T., "Expression of cytochrome P450 in tumor tissues and its association with cancer development." *Front Biosci.*, 9: 1967-1976, (2004).

Özkarlı M., Sevim H., Sen A., "In vivo effects of *Urtica urens* (dwarf nettle) on the expression of CYP1A in control and 3-methylcholanthrene-exposed rats.", *Xenobiotica*. 38: 48-61, (2008).

Parikh A., Gillam E. M., Guengerich F. P., "Drug metabolism by *Escherichia coli* expressing human cytochromes P450.", *Nat Biotechnol.*, 15(8):784-8, (1997).

Perez-Jimenez J., Serrano J., Taberner M., Arranz S., Diaz-Rubio M. E., Garcia-Diz L. et al., "Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: Plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans.", *Plant Foods Hum Nutr.*, 64: 102-7, (2009).

Peter F. Surai, "Silimarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives.", *Antioxidants*, 4(1), 204-247, (2015).

Porter T. D., and Coon M. J., "Cytochrome P450, Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms." *J. Biol. Chem.*, 266(21):13469-13472, (1991).

Presser A. (ed.), "Silimarin: A Potent Antioxidant", *Pharmacist's Guide to Medicinal Herbs. Smart Publications*, 259-260, (2000).

QuteMol[online], <http://qutemol.sourceforge.net>, (2015).

Rangel-Huerta O. D., Pastor-Villaescusa B., Aguilera C. M., Gil A., "A Systematic Review of the Efficacy of Bioactive Compounds in Cardiovascular Disease: Phenolic Compounds.", *Nutrients*, 7(7):5177-216, (2015).

Renton K. W., "Factors affecting drug biotransformation.", *Clin Biochem.*, 19(2):72-5, (1986).

Rooseboom M., Commandeur J. N., Vermeulen N. P., "Enzyme-Catalyzed Activation of Anticancer Prodrugs.", *Pharmacol. Rev.*, 56: 53-102, (2004).

Ross J. A., Kasum C. M., "Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety.", *Annu Rev Nutrition*, 22:19–34, (2002).

Rotelli M. T. et al, "IN-VITRO evidence for the protective properties of the main components of the Mediterranean diet against colorectal cancer: A systematic review.", *Surg Oncol.*, 24(3):145-52, (2015)

Sadasivama K., and Kumaresanb R. (eds.), "A comparative DFT study on the antioxidant activity of apigenin and scutellarein flavonoid compounds.", *Molecular Physics: An International Journal at the Interface Between Chemistry and Physics*, 839-852, (2011).

Safe S. H., "Problems for risk assessment of endocrine-active estrogenic compounds.", *Environ Health Perspect.*, 110 Suppl 6:925-9, (2002).

Safe S. H., "Toxicology of environmental estrogens.", *Reprod Fertil Dev.*, 13(4):307-15, (2001).

Sampson L., Rimm E., Hollman P. C., De Vries J. H., Katan M. B., "Flavonol and flavone intakes in US health professionals.", *J Am Dietetic Ass*, 102:1414-1420, (2002).

Sato M., Maulik N., Das D. K., "Cardioprotection with alcohol: role of both alcohol and polyphenolic antioxidants." *Ann N Y Acad Sci*, 957:122-135, (2002).

Schenkman J. B., "The fate of xenobiotics in the body. In Molecular and Applied Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes.", *Life Sciences*, 1-20, (1999).

Schenkman, J. B., "Cytochrome P450-Dependent Monooxygenase: An Overview, in molecular aspects of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds", *Plenum Press*, 1-10, (1991).

Sen A., Agus H. H, Bayav M., and Sevim H., "In vivo assessment of *Urtica urens* supplementation on rat xenobiotic metabolizing enzymes.", *FEBS Journal*, 273: 300-300, (2006).



Sen A., Hu C. H., Urbach E., Wang-Buhler J. L., Yang Y. H., Arinc E., Buhler D. R., "Cloning, sequencing and characterization of CYP1A1 cDNA from leaping mullet (*Liza saliens*) liver and implications for the potential functions of its conserved amino acids.", *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 15, 243-255, (2001).

Sen A., Ozgun O., Arinc E., Arslan S., "Diverse action of acrylamide on cytochrome P450 and glutathione S-transferase isozyme activities, mRNA levels and protein levels in human hepatocarcinoma cells.", *Cell Biol. Toxicol.*, 28:175-186, (2012).

Sen A., Tin Y., Arslan S., "In Vitro Effects of Metallic Environmental Pollutants on Hepatic Cystolic GST Activities of Leaping Mullet (*Liza saliens*).", *Drug Metabolism Reviews* (Ed. Jack A. Hinson), 129, (2001).

Serafini M., Villano D., Spera G., Pellegrini N., "Redox molecules and cancer prevention: the importance of understanding the role of the antioxidant network.", *Nutr Cancer*, 56 (2): 232-240, (2006).

Sghaiera M. B., Skandrani I., Nasra N., Francac M. G. D., Chekir-Ghediraa L., Ghediraa K., "Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure–activity relationship study.", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32: 336–348, (2011).

Shahabi P., Siest G., Meyer U. A., Visvikis-Siest S., "Human cytochrome P450 epoxygenases: variability in expression and role in inflammation-related disorders.", *Pharmacol Ther.*, 144(2):134-61, (2014).

Shimada T., Sugie A., Shindo M., Nakajima T., Azuma E., Hashimoto M., Inoue K., "Tissue-specific induction of cytochromes P4501A1 and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in engineered C57BL/6J mice of arylhydrocarbon receptor gene.", *Toxicol. Appl. Pharmacology*, 187: 1-10, (2003).

Sica, D. A., "Interaction of grapefruit juice and calcium channel blockers.", *Am. J. Hypertens.*, 19, 768-773, (2006).

Siemann E. H. and Creasy L. L., "Concentration of the phtoalexin trans-resveratrol in wine.", *Am. J. Enol. Vitic.*, 43(1); 49-52, (1992).

Sivaraman L., Leatham M.P., Yee J., Wilkens L.R., Lau A. F., Le Marchand L., "CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer." *Cancer Res.*, 54:3692-3695, (1994).

Somova L. I., Shode F. O., Ramnanan P., Nadar A., "Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves.", *J Ethnopharmacol.*, 84(2-3):299-305 (2003).

Spatzenegger M. and Jaeger W., "Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism.", *Drug Metab Rev.*, 27(3):397-417, (1995).

Staedler D., Idrizi E., Kenzaoui B. H., Juillerat-Jeanneret L., "Drug combinations with quercetin: doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells.", *Cancer Chemother Pharmacol*, 68:1161–11, (2011).

Stupans I., Murray M., Kirlich A., Tuck K. L., Hayball P. J., " Inactivation of cytochrome P450 by the food-derived complex phenol oleuropein.", *Food Chem Toxicol.*, 39(11):1119-24, (2001).

Stupans I., Stretch G., Hayball P., "Olive oil phenols inhibit human hepatic microsomal activity.", *J Nutr.*, 130(9):2367-70, (2000).

Sugimoto K., Araki N., Ohmori M., Harada K., Cui Y., Tsuruoka S., Kawaguchi A., Fujimura A., "Interaction between grapefruit juice and hypnotic drugs: comparison of triazolam and quazepam.", *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 62, 209-215, (2006).

Taylor C. K., Levy R. M., Elliott J. C., Burnett B. P., "The effect of genistein aglycone on cancer and cancer risk: a review of in vitro, preclinical, and clinical studies.", *Nutr. Rev.*, 67(7): 398-415, (2009).

Turner R., Etienne N., Alonso M. G. et al., "Antioxidant and anti-atherogenic activities of olive oil phenolics.", *Int J Vitam Nutr Res.*, 75(1):61-70, (2005).

- Uppstad H., Øvrebø S., Haugen A., Mollerup S., "Importance of CYP1A1 and CYP1B1 in bioactivation of benzo[a]pyrene in human lung cell lines.", *Toxicol Lett.*, 1;192(2):221-8, (2010).
- van Herwaarden, A. E., Smit, J.W., Sparidans, R. W., Wagenaar E., van der Kruijssen, C. M., Schellens, J. H., Beijnen, J. H., Schinkel, A. H., "Midazolam and cyclosporin a metabolism in transgenic mice with liver-specific expression of human CYP3A4.", *Drug Metab. Dispos.*, 33, 892-895, (2005).
- Viskupicova J., Ondrejovic M., Sturdik E., "Bioavailability and metabolism of flavonoids.", *J Food Nutr Res.*, 47(4): 151–162, (2008).
- Wang L., Lee I. M., Zhang S. M., Blumberg J. B., Buring J. E., and Sesso H. D., "Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women.", *Am J Clin Nutr.*, 89(3): 905–912, (2009).
- Wang, H., Napoli, K. L., Strobel, H. W., "Cytochrome P450 3A9 catalyzes the metabolism of progesterone and other steroid hormones.", *Mol. Cell. Biochem.* 213, 127-135, (2000).
- Wei Q., Gu J., Cheng L., Bondy M. L., Jiang H., Hong W. K., Spitz M. R., "Benzo[a]pyrene diol epoxide-induced chromosomal aberrations and risk of lung cancer.", *Cancer Res.*, 56: 3975-3979, (1996).
- Werck-Reichhart D., Feyereisen R., "Cytochromes P450: a success story.", *Genome Biol.*, 1(6), (2000).
- Woo L.W., Purohit A., Reed M. J., and Potter B. V., "Active site directed inhibition of estrone sulfatase by nonsteroidal coumarin sulfamates." *J. Med. Chem.*, 39, 1349-1351, (1996).
- Wood L. G., Wark P. A., Garg M. L., "Antioxidant and anti-inflammatory effects of resveratrol in airway disease.", *Antioxid Redox Signal.*, 13(10):1535-48, (2015).

Xiuzhen H., Tao S. and Hongxiang L., "Dietary Polyphenols and Their Biological Significance", *Int. J. Mol. Sci.*, 8(9), 950-988, (2007).

Yamazaki H., Shimada T., "Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes.", *Arch. Biochem. Biophys.*, 346, 161-169, (1997).

Yoshiaki, M., Kanefumi, Y., Toshihiko, O., "Isolation of Eriodictyol 7-rutinoside) from Lemon Fruit (*Citrus limon* BURM. f.) and Its Antioxidative Activity.", *Food Science and Technology International*, Tokyo Vol. 3, 84-89, (1997).

Yurtcu E., Darcansoy I. O., Iffet S. F., "Effects of Silimarin and Silimarin-doxorubicin applications on telomerase activity of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2.", *Journal of B.U.O.N.*, 20(2):555-61, (2015).

Zarebczan B., Pinchot S. N., Kunnimalaiyaan M., Chen H., "Hesperetin, a potential therapy for carcinoid cancer.", *The American Journal of Surgery*, 201: 329–333, (2011).

Zhang S., Yang X., Morris M. E., "Combined effects of multiple flavonoids on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport.", *Pharmaceutical Research*, 21(7): 1263-1273, (2004).

Zuber R., Modrianský M., Dvorák Z., Rohovský P., Ulrichová J., Simánek V., Anzenbacher P., "Effect of silybin and its congeners on human liver microsomal cytochrome P450 activities.", *Phytother Res.*, 16(7):632-8, (2002).

Zulueta A., Caretti A., Signorelli P., Ghidoni R., "Resveratrol: A potential challenger against gastric cancer.", *World J Gastroenterol.*, 21(37):10636-43, (2015).

## 7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Doğukan MUTLU

Doğum Yeri ve Tarihi : Kartal, İSTANBUL / 10.09.1989

Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversitesi

Elektronik posta : dogukanmutlu@gmail.com

İletişim Adresi : Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat  
Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyokimya  
Laboratuvarı 20070 Pamukkale/Denizli

### **Konferans listesi** :

- Dogukan Mutlu, Huseyin Aksit, Ibrahim Demirtas, Sevki Arslan,“ In vitro assessment of human CYP1A1 inhibition potential of Resveratrol and Silychristin”, 9th Congress of the Turkish Toxicology Society, İzmir (2015).