T.C.
ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOLESTERAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ ÜZERİNDE BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN ETKİLERİNİN *İN VİTRO* VE *İN SİLİCO* OLARAK İNCELENMESİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Gürbey BAŞ

ÇANKIRI
2020

Her hakkı saklıdır

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Kolesteraz enzimi aktivitesi üzerinde bazı fenolik bileşiklerin etkilerinin *in vitro* ve *in silico* olarak incelenmesi**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı'yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (……/……/20…..).

Gürbey BAŞ

ÖZET

Y. Lisans Tezi

KOLESTERAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ ÜZERİNDE BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN ETKİLERİNİN İN VİTRO VE İN SİLİCO OLARAK İNCELENMESİ

Gürbey BAŞ

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Şevki ADEM

Bu tez kapsamında pakreatik kolestreol esteraz enzim aktivitesi üzerinde bazı fenolik bileşiklerinin inhibisyon etkisi in vitro ve in siliko olarak test edilmiştir. Enzimin inhibisyonu diyetle alınan kolesterolü durduracağı için farmakolojik uygulamaları için önemlidir. İn vitro sonuçlardan elde edilen IC_{50} değerleri 10-46 μM aralığındadır.

Enzim-ligand etkileşimlerini moleküler seviyede belirlemek için Molegro Virtual Docker MVD 2019.7.0 programı kullanılarak doking çalışması yapıldı. Hidrojen bağlarının ve sterik etkileşmelerin Ligand-protein bağlanmasında etkili olduğu gözlemlendi. İn vitro ve in silico çalışmalar değerlendirildiğinde scutellarin ve enzim üzerinde en etkili moleküllerdir.

Eylül, 2020, 39 sayfa

Anahtar Kelimeler: Pankreatik Kolesterol esteraz, fenolik bileşik, inhibisyon, *in vitro, in silico*

SUMMARY

Master of Science Thesis

IN VITRO AND IN SILICO INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME PHENOLIC COMPOUNDS ON CHOLESTEROL ESTERASE ENZYME ACTIVITY

Gürbey BAŞ

Çankırı Karatekin University Graduate School of
Natural and Applied Sciences Department of
Chemistry

Supervisor: Doc. Dr. Şevki ADEM

In this thesis, the inhibition effect of some phenolic compounds on pakreatic choletreol esterase enzyme activity was tested in vitro and in silico. The inhibition of the enzyme is important for its pharmacological applications as it will stop cholesterol intake from the diet. IC50 values obtained from in vitro results are in the range of 10-46 μM.

To determine the enzyme-ligand interactions at the molecular level, the Dokle study was done using the Molegro Virtual Docker MVD 2019.7.0 program. Hydrogen bonds and steric interactions were observed to be effective in Ligand-protein binding. When in vitro and in silico studies are evaluated, scutellarin is the most effective molecule on the enzyme.

September, 2020, 39 pages

Keywords: Pancreatic Cholesterol esterase, phenolic compound, inhibition, *in vitro, in silico*

TEŞEKKÜR

Bu çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Şevki Adem'e değerli görüşleriyle desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Volkan Eyüpoğlu'na ayrıca her zaman yanımda olan ve her türlü desteğini veren sevgili eşim Gonca Baş'a ve aramıza yeni katılmış olan kızım Damla Tanem Baş'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Gürbey BAŞ

İÇİNDEKİLER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....i
ÖZET.....ii
SUMMARY iii
TEŞEKKÜR.....iv
İÇİNDEKİLER iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....iv
ÇİZELGELER DİZİNİ vi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....vii
1. GİRİŞ 1
1.1. Kolesterol Taşıyıcı Sistemler 2
1.2. Kolesterolün Zararları 4
1.3. Kolesterol Tedavisi.....6
1.4. Moleküler Doking Modelleme Çalışmaları.....8
2. KAYNAK ÖZETLERİ 9
3. Pankreatik kolesterol esterazın inhibitörleri.....11
4. Medikal bitkiler ve ekstratları.....11
5. Sekonder aktif moleküller.....13
6. MATERYAL VE METOD.....19
6.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar 19
6.1.1. Kullanılan kimyasallar 19
6.1.2. Kullanılan cihazlar 19
6.2. Deneysel Yöntem 19
7. BULGULAR.....22
8. TARTIŞMA VE SONUÇ 35
9. KAYNAKLAR 37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1 Siklopentano perhidro fenantrenin kimyasal yapısı.....1

Şekil 1.1. 2 Lipoprotein taşıma yollarına genel bakış.....2

Şekil 1.1. 3 Lipoproteinlerin taşınması (Koolman ve Röhm 2005).....3

Şekil 1.1. 4 Lipoprotein komplekslerinin yapıları (Koolman ve Röhm 2005).....4

Şekil tablosu öğesi bulunamadı.

Şekil 5. 1. Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....23

Şekil 5. 2 Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....24

Şekil 5. 3 Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....24

Şekil 5. 4 Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....25

Şekil 5. 5 Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....25

Şekil 5. 7 Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....26

Şekil 5. 8 Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....26

Şekil 5. 9 Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....27

Şekil 5. 10 Baicalinin Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi 27

Şekil 5. 11 Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....28

Şekil 5. 13 5-hidroksi flavone'ın enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi 30

Şekil 5. 14 Flavone'ın enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi 31

Şekil 5. 15 3-hidroksi flavone'un enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi.....31

Şekil 5. 16 5- hidroksi flavone enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi 32

Şekil 5. 17 Baicalin enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi 32

Şekil 5. 18 Formononetin enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi.....33

Şekil 5. 19 Luteolin enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi.....33

Şekil 5. 20 Sculletarin enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi 34

Şekil 5. 21 Silibinin enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi.....34

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 6.1. Pankreatik kolestrol esteraz Enzim Aktivitesi Hazırlanışı.....20

Çizelge 5.1. Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerinde fenolik bileşiklerin etkisinin radar grafikle gösterimi 22

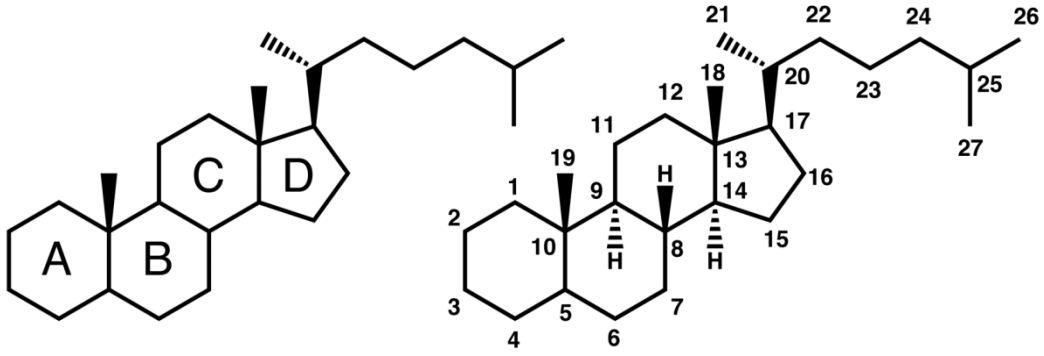
Çizelge 7.2. Molegro Virtual Docker Programdan Elde Edilen flavone-Enzim Etkileşimi Docking Genel Sonuçlari.....28

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
% :	Yüzde
°C :	Santigrat Derece
dk :	Dakika
g :	Gram
kg :	Kilogram
m2 :	Metrekare
mg :	Miligram
mL :	Mililitre
mM :	Milimolar
nm :	Nanometre
µg :	Mikrogram
ng :	Nanogram
µL :	Mikrolitre
µM :	Mikromolar
α :	Alfa
± :	Artı-Eksi
PL:	Pankreatik Lipaz

1. GİRİŞ

Kolesterol, steroid ve alkolden oluşan, vücuttaki çok önemli biyokimyasal olaylarda rolü olan bir moleküldür. Diyetle veya karaciğer ve ince bağırsaktan sentezlenerek elde edilir. Vücudumuzun kolesterol ihtiyacı 1.1-1.7 gram arasında değişir. Diyet ile alınan kolesterol arttığında karaciğer ve ince bağırsaktan üretilen kolesterol azalır, böylece denge korunmuş olur(Petursson ve ark. 2012).



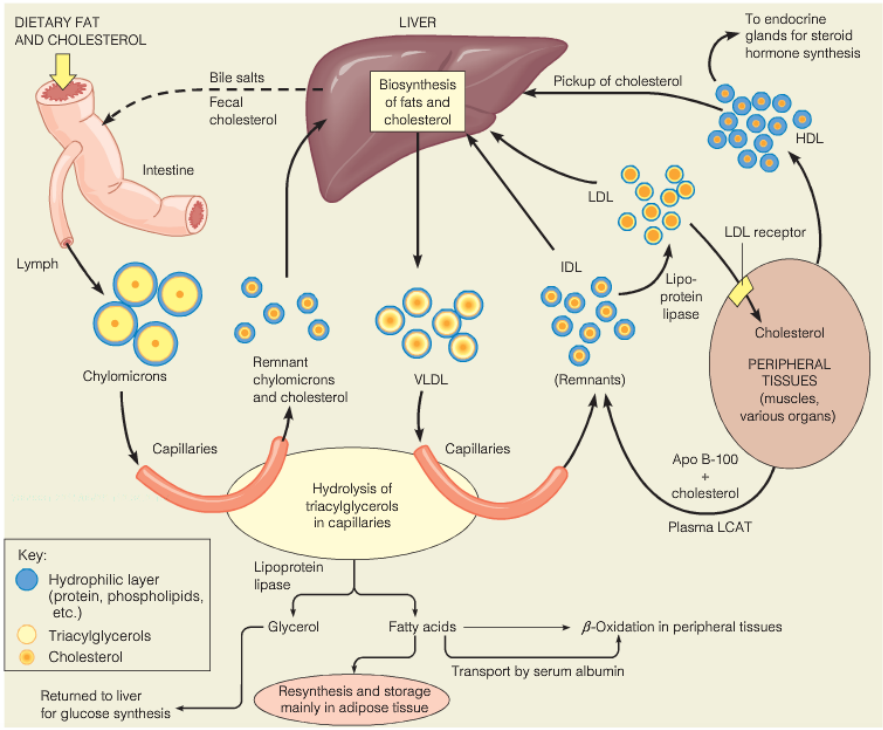
Şekil 1. 1 Siklopentano perhidro fenantrenin kimyasal yapısı

Temel olarak kolesterol siklopentano perhidro fenantrenin spesifik halkasına sahiptir. Kanda serbest veya ester halde bulunurlar. Hücre zarının yapısına katılırlar. Böbreküstü bezlerinde üretilen kortizol hormonu kolesterolden sentezlenir.

Östrojen, progesteron ve testosteron gibi cinsiyet hormonları da kolesterolden sentezlenir. Kolesterol D vitamininin ana maddesidir. Güneş ışınları ile vücuttaki kolesterolün birleşmesi ile D vitamini oluşur.

Kolesterol safra asitlerinin sentezi için de yapı maddesidir. Kolesterolün yetersiz olması durumunda sindirim sıkıntıları oluşur.

1.1. Kolesterol Taşıyıcı Sistemler



Şekil 1.1. 2 Lipoprotein taşıma yollarına genel bakış

Kolesterol; çok yüksek dansisiteli lipoprotein, düşük dansisiteli lipoprotein ve yüksek dansisiteli lipoproteinler tarafından taşınırlar. (Mergen ve ark. 2010)

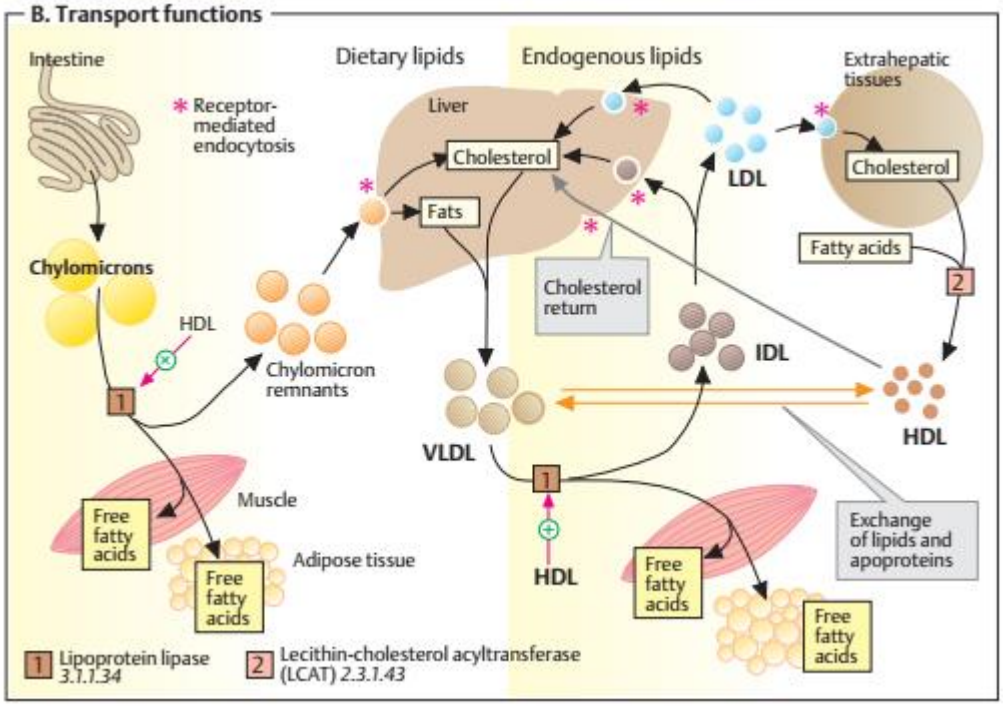
Şilomikronlar: Trigliseridleri taşıyan düşük yoğunluklu ve büyük moleküllerdir. Atherosklerozla alakaları yoktur. Bağırsak mukoza hücrelerinden sentezlenirler.(Gotto ve Pownall 1999, Engler 2004)

Çok yüksek dansisiteli lipoproteinler(VLDL): Vücutta kolesterol ve trigliseridleri taşırlar. Büyük miktarı karaciğerden üretilir. Trigliseridleri bıraktıktan sonra dolaşımda LDL olarak dolaşmaya devam ederler.(Gotto ve Pownall 1999, Engler 2004)

Düşük dansisiteli lipoproteinler(LDL): Kolesterolün ana taşıyıcılarıdırlar. Ateroskleroz ve serebrovasküler durumlarla alakalı temel proteinlerdir. Oksid-LDL en

atherojenik formdur. VLDL artıklarıdırlar.(Gotto ve Pownall 1999, Engler 2004)

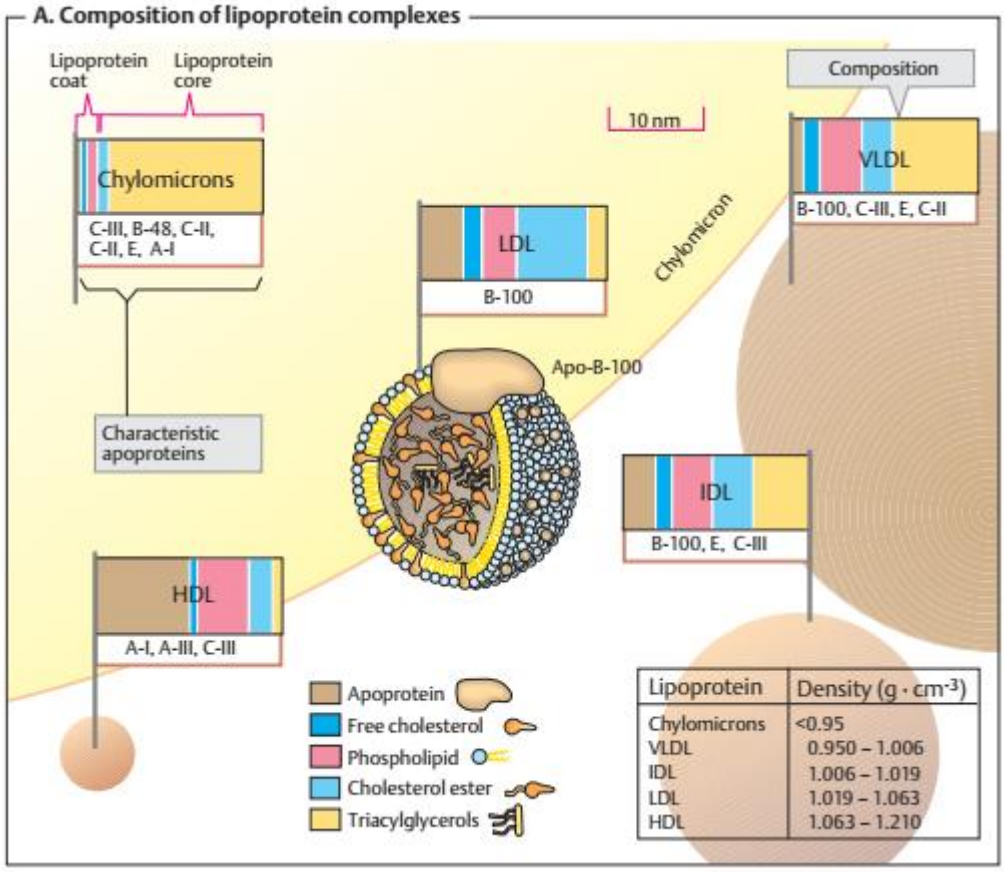
Yüksek dansisiteli lipoproteinler(HDL): En küçük yapıdaki moleküller olmakla beraber serum kolesterolünün %25 ini içerirler.



Şekil 1.1. 3 Lipoproteinlerin taşınması (Koolman ve Röhm 2005)

HDL miktarının düşük olması kardiyovasküler rahatsızlıkların en önemli belirtilerinden biridir.

Vücudu atherosklerozun gelişiminden korurlar. Bunu kolesterolün %20-30 unu karaciğere taşıyarak yaparlar.

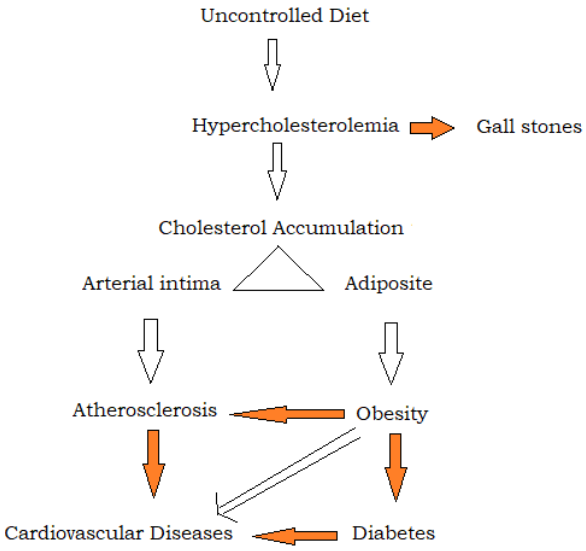


Şekil 1.1. 4 Lipoprotein komplekslerinin yapıları (Koolman ve Röhm 2005)

LDL oksidasyonunu azaltarak makrofajların damar çeperine yapışmasını engellerler.(Gotto ve Pownall 1999)

1.2. Kolesterolün Zararları

Genel kanının aksine damarlarımızda tıkanıklık yaratan kolesterol değildir. Kolesterol yağ özellikli bir madde olduğundan taşınması için lipoproteinlere ihtiyaç duyar. Kolesterol genel itibari ile dokulardan karaciğer LDL ile taşınır. Karaciğerden dokulara ise HDL ile taşınır. LDL de kendi içinde büyük ve küçük partiküllü olarak ikiye ayrılır. Büyük partiküllü LDL ye ile kolesterolün bağlanmasında bir sıkıntı yoktur yani atheroskleroz gelişmez.



Şekil 1.2.1 Hiperkolesteroleminin sebebi ve sonuçlarının şematik gösterimi

Ama büyük partiküllü LDL nin yapısının değişmesi ile küçük partiküllü hale gelmesi ve kolesterole bağlanması ile istenmeyen ve ateroskleroza neden olan oksid-LDL oluşur.

Kolesterolün zararları veya kolesterol kaynaklı sıkıntılar kolesterolün anlık yükselişlerinden meydana gelmez. Asıl sıkıntı yaratan durumlar kolesterolün yüksekliğinin uzun süreler devam etmesiyle oluşur.

Kolesterol yüksekliği sonucu tıkanma kalbi besleyen damarlarda ise göğüs ağrısı kalp krizi ve kalp yetmezliği gibi sorunlara neden olur. Bunların sonucu hasta koroner by pass ameliyatı (cerrahi olarak darlığın ortadan kaldırılması) veya anjiyoplasti (balonla daralmış koroner arterin genişletilmesi) veya stent (genişletilmiş arterin içine yerleştirilen bir tüp) konulması işlemine ihtiyaç duyabilir. Beyini besleyen boyun damarlarında kolesterol birikimi olması felçlere, konuşma bozukluklarına, dengesiz yürümeye, bilinç kaybına yol açar. Böbrek damarlarında kolesterol birikimi yüksek tansiyon ve böbrek yetmezliğine yol açabilir. Ana atardamarda (aort) kolesterol birikimi de tehlikelidir. Buradan kopan kolesterol birikintileri daha küçük damarları tıkayarak çok değişik sorunlara yol açabilirler: Bağırsağı besleyen damarları tıkayarak bağırsak ölümüne, göz damarlarını tıkayarak körlüğe, bacak damarlarını tıkayarak kangrene yol açabilirler.

1.3. Kolesterol Tedavisi

Diyet: Diyet tedavisi günümüzde hiperlipidemi tedavisinde halen birinci basamak tedavi seçeneğidir. Kardiyovaskuler hastalık riskini azaltmaya yönelik sağlıklı beslenme önerileri arasında; fazla kalori ve tuz tüketiminin önlenmesi, hayvansal yağların azaltılması ve yerine bitkisel yağların daha fazla kullanılması, taze meyve-sebze ve liften zengin yiyecek tüketiminin arttırılması, kırmızı et yerine daha çok tavuk ve balık tüketilmesi, yer almaktadır.

Lipit düşürücü ilaçlar: Safra asidi bağlayıcı reçineler(kolestiramin, kolestipol): ince bağırsakta safra asitlerini bağlayarak, geri emilimi azaltır, safra asitlerinin enterohepatik dolaşımını keser. Genelde lipid düşürücü tedaviye ek olarak kullanılır. En sık görülen yan etkileri konstipasyondur.

S**tatinler**: Statinler, vücudun kolesterol yapmak için kullandığı bir enzimin (HMG-CoA reductase) üretimini bloke ederek çalışırlar. Böylece kolesterolün karaciğerde sentezi (imalatı) azalır. Statinler, yüksek kolesterolü olan hastaların kanlarındaki yağ seviyesini düşürmekte etkilidirler ve bu şekilde koroner, serebrovasküler (beyin damarları) ve periferik vasküler (bacak damarları) hastalıkların engellenmesine yardımcı olurlar.

Kandaki yağ seviyelerini düşürmede tüm kolesterol düşürücü ilaçlar bir dereceye kadar etkili oldukları halde statinler, LDL kolesterol (kötü huylu kolesterol) seviyelerini ve trigliserid seviyelerini düşürmede özellikle etkilidir. Statinler, çeşitlerine ve dozajlarına bağlı olarak LDL seviyelerini %30-60 arasında düşürmektedirler. Statinler HDL kolesterol (iyi huylu kolesterol) seviyesini de bir miktar yükseltir.

Son çalışmalar statinlerin hafif anti-enflamatuar (enflamasyon=iltihap) özellikleri olduğu ve vücutta enflamasyonun bir işareti olan C-reaktif proteinin (CRP) kandaki seviyesini düşürdüğünü göstermiştir. C-reaktif proteinin, damar duvarlarının enflamasyonu sonucu olarak ortaya çıkan ve kalp krizi ve inmeyi önceden tahmin etmek için kullanılan iyi bir belirteç olduğu bilinmektedir.

Kolesterol absorpsiyon inhibitörleri (**ezetimib**): Niemann-Pick C1-benzeri protein 1 (NPC1L1) aracılığıyla intestinal epitelyum hücrelerinde kolesterol ve sterol alımını selektif olarak inhibe eder. Maksimal tolere edilebilen statin dozunun üzerindeki LDL kolesterol seviyelerinde ek ilaç olarak kullanılır. LDL kolesterolü ek olarak %18 oranında düşürür.

Fibrik asit türevleri (fibratlar):Diyet ve yaşam tarzı değişiklikleri etkili olmadığında hipertrigliseridemi tedavisinde kullanılır. Karaciğerde VLDL sentezini ve hücreden VLDL salımını azaltarak plazma VLDL düzeyini düşürürler. Temel olarak 2 ana gruba ayrılırlar; 1.kuşak fibratlar (gemfibrozil, klofibrat) ve 2. kuşak fibratlar (fenofibrat, bezofibrat, siprofibrat). Ayrıca yüksek plazma trigliserid ve düşük HDL'si olan kişilerde kardiyovasküler riski azaltmak için kullanılır. Fibratlar, statinlerin glukuronidizasyonunu inhibe ederek eliminasyonunu azaltmaktadır. En sık görülen yan etkileri; daire, karın ağrısı, bulantı, kusma ve karında şişkinlik hissidir.

Balık yağı: Omega-3 yağ asidi karaciğerden; diaçilgliserol açiltransferaz, yağ asidi sentetaz ve asil-coA karboksilaz enzimleri aktivitesini baskılayarak lipit sentezini azaltmaktadır (Chan ve ark. 2002). PPAR aktivitesini artırarak karaciğerde lipitlerin beta oksidasyonunu artırır (Chan ve ark. 2002). VLDL sekresyonunu azaltır ve şilomikron katabolizmasını artırır, sonucunda TG ve kolesterol seviyesini düşürür(Chan ve ark. 2002, Park ve Harris 2003). Ek olarak omega-3 yağ asidinin daha atherojenik olan dens-küçük LDL yapısını büyüttüğü ve LDL düzeylerini etkilemeden atherojenik etkisini azalttığı, AS patogenezinde rol alan platelet derive büyüme faktör gibi sitokinlerin düzeylerini azalttığı tespit edilmiştir (Suzukawa ve ark. 1995, Park ve Harris 2003).

Fitosteroller: Bitki ve ağaçlardan elde edilen fitosterol türevidir. Bağırsakta miçel oluşumuna etki göstererek intestinal kolesterol emilimini önlemektedir.

Diğer ilaçlar: Probukol, antioksidan olarak kullanılır ve plazma lipoprotein düzeyleri üzerine orta derede etkileri vardır.

1.4. Moleküler Doking Modelleme Çalışmaları

Terapötik bileşiklerin akılcı tasarımları bilgisayarlardaki teknolojik gelişmeler sayesinde çok daha pratik ve rahat bir şekilde hızlı sonuçlar almaya başlanmıştır. Docking, iki molekülün birbirlerine kararlı bir şekilde bağlanması esnasında moleküllerden birinin bilgisayar ortamında yönlendirmesinin tahmin edilmesidir. (Lengauer ve Rarey 1996)

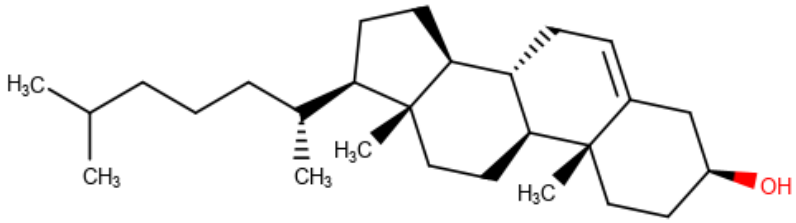
Docking çalışmalarında hedef yapı proteinlerdir. Bunlar reseptör, enzim, iyon kanalı veya yapısal protein olabilir. X-ışınları kristallografisi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) teknikleri protein yapısının belirlenmesinde en fazla kullanılan tekniklerdir.
İlk önce kristal şeklindeki protein üzerine gönderilen X-ışınları sayesinde proteinin yapısı ortaya çıkar. İkinci olarak su ortamında çözünen protein yapısını belirlemek için NMR kullanılır. Bu yöntemde kompleks çözümlere gerek olduğundan X-ışınları kristallografisi yöntemi daha çok kullanılır. Bu yöntemlerle proteinin üç boyutlu yapısı aydınlatılarak proteinin kimyasal etkileşimlerini anlamamızı sağlar.

Docking sürecinde sürekli hareket halindeki protein ve ligandın endüşük potansiyel enerjili konumları belirlenerek doğada olduğu gibi optimizasyon işlemi uygulanır.

Bu amaçla ticari olarak satılan, internet ve açık kaynaklar üzerinden ulaşılabilecek bazı docking programları mevcuttur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Hücre membranının önemli bir bileşeni, bazı steroid hormonların, safra asidi ve tuzlarının sentezinde kullanılan kolesterol, hayvansal kaynaklı steroid bir alkoldür (Şekil 1). Bu nedenle tüm hücrelere sürekli olarak sağlanması kritik öneme sahiptir. Bu molekülün eksikliği ve fazlalığı çeşitli patolojilere sebep olmaktadır (Singh ve ark. 2017). Kolesterol oldukça hidrofobiktir ve esterleştiğinde bu özellik iyice artar. Kolesterol, kolesterol esterleri ve triaçilgliseroller hidrofobik olduklarından kanda lipoproteinler (Şilomikronlar, VLDL, HDL) tarafından taşınırlar (Champe ve ark. 2005).

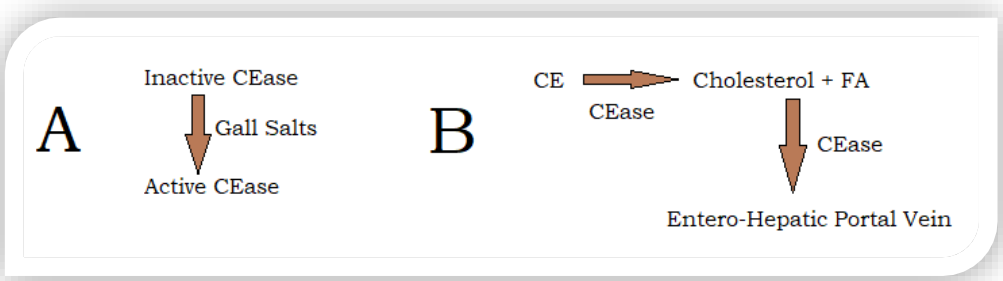


Şekil 2.1 Kolesterolün moleküler yapısı

Kan kolesterol seviyesinin düzenlenmesinde HMG-CoA Redüktaz, CEase (pankreatik, hepatik), ACAT ve LCAT enzimleri görev almaktadır (Singh2017). Kanda yüksek kolesterol miktarı olarak tanımlanan hiperkolesterolemi, ateroskleroz için majör risk faktörlerinden biridir (Şekil 2). Bu yüzden son on yılda kolesterolün bağırsaklardan emiliminin inhibe edilmesi hiperkolesterolemi ile seyreden kardiyovasküler hastalıklarda dikkat çeken bir strateji olmuştur. Kolesterolün bağırsaklardan emiliminin engellemesinin bilinen en iyi yolu ise CEase'nin inhibe edilmesidir. CEase inhibisyonu kolesterolün emiliminin azalmasına yol açabilir (Varghese ve ark. 2017) ve hiperkolesteroleminin önlenmesi için bu yol kullanılabilir.

Cholesterol esterase (EC: 3.1.1.13) (CEase)'ın diğer isimleri; cholesteril ester hydrolase, pancreatic lisophospholipase'dır (Asmaa ve Ream 2016). Pankreatik Kolesterol Esteraz özellikle pankreasdan salgılanır (John ve ark. 2011), (John ve ark. 2014), (Varghese ve

ark. 2017). Serin hidrolazlar grubundan olan CEase, pankreasın asiner hücrelerinden inaktif olarak salgılanır, şaperonlar eşliğinde hidrolitik parçalanmadan korunur ve safra tuzları ile zimojen formu terk ederek lipit sindiriminde görev alır ((John ve ark. 2014), (Asmaa ve Ream 2016), (Varghese ve ark. 2017). Enzimin aktif bölgesi nükleofilik, katalitik bir triad (ser-194, his-435, asp-320), oxianyon bir triada (gly-107, ala-108, ala-195) sahiptir (Varghese ve ark. 2017).



Şekil 2.2 [A] CEase aktivasyonu [B] CEase işlevi. CEase (cholesterol esterase), CE (cholesterol ester), FA (fatty acid).

Lipit sindiriminde rol oynayan önemli enzimlerden biri olan CEase diyetle alınan kolesterol esterlerinin emilebilmeleri için hidroliz eden enzimdir (Şekil 3) ve kolesterol sindirim ve emiliminde kilit moleküldür (Varghese ve ark. 2017). Kolesterolün emilim ve taşınmasında Pankreatik Kolesterol Esterazın diyet kolesterol esterlerinin biyo-yararlanımında kombine üç işlevi vardır (Singh ve ark. 2017); kolesterol esterlerini kolesterol ve yağ asitlerine hidroliz eder, kolesterolün karma misellere katılmasına katkı sağlar ve serbest kolesterolün enterositlere taşınmasına yardımcı olur (John ve ark. 2014).

Diyetle alınan kolesterolün emiliminin azaltılması önemlidir. Pankreatik kolesterol esteraz enziminin inhibisyonu ile total kolesterol alımının %10-15'lik kısmı engellenebilir. Bu engellemenin doğal ya da düşük yan etkili moleküllerle gerçekleştirilmesi dünyada yüksek kolesterol seviyeleri için bir önlem olabilir. Diyabet hastası ve obezlerde yüksek kolesterol seviyelerinin düşürülmesi ile kalp-damar hastalıkları riski azaltılabilir (Im ve ark. 2018). Diyetle aşırı kolesterol alımı durumunda HMG-CoA inhibe olup (Rodwell ve ark. 2015) Pankreatik kolesterol esteraz aktivitesi

artması beklenebileceğinden Pankreatik kolesterol esteraz inhibisyonu iyi bir antilipidemik hedef olarak görülebilir.

Günümüzde kan kolesterol regülasyonunun Pankreatik Kolesterol Esteraz inhibisyonu üzerinden gerçekleştirilebileceği tartışılmaktadır. Bu amaçla birçok medikal bitkiler, bu bitkilerden elde edilen sekonder moleküller ve ileri modifiye edilmiş moleküllerin Pankreatik Kolesterol Esteraz üzerinde inhibitör etkileri denenmektedir. Medikal bitkilerin en önemli yanları düşük yan etki olmalarıdır (Asmaa ve Ream 2016).

3. Pankreatik kolesterol esterazın inhibitörleri

3.1. Medikal bitkiler ve ekstratları

Cordyceps sinensis ekstrakları ile Kolesterol Esteraz enzim inhibisyonunu ölçmeye çalışan Kim ve arkadaşları (Kim 2010) *in vitro* olarak enzim aktivitesindeki değişimi belirlemek için yaptıkları testler sonuçlarında 12,5 μg/mL'lik bir IC_{50} değer ile kolesterol esterazın güçlü bir şekilde inhibe edildiğini ve bunun hiperkolesterolemi kontrolü için potansiyel bir madde olarak yararlılığını ortaya koyduğunu bildirmişlerdir.

İn vitro yapılan bir çalışmada Ngamukote ve arkadaşları üzüm çekirdeğinde bulunan üç büyük polifenolik bileşiğin kolesterol düşürücü aktivitesini araştırmış, elde ettikleri sonuçlar gallik asit, kateşin ve epikateşin doğal moleküllerinin konsatrasyonlarına bağlı olarak pankreatik kolesterol esterazı önemli ölçüde inhibe ettiğini, ayrıca bu moleküllerin kolesterol misellerinin oluşumunu sırasıyla % 27.26 ± 2.17,% 11.88 ± 0.75 ve 19.49 ± 3.71% azalttığını göstermişlerdir(Ngamukote ve ark. 2011). Bu bulgularla belirli bir üzüm çekirdeğinde bulunan üç büyük polifenolik bileşiğin pankreatik kolesterol esterazı ve safra asitlerinin bağlanmasını inhibe ederek ve kolesterol emilimine neden olabilen misellerde kolesterolün çözünürlüğünü azaltarak kolesterol düşürücü aktiviteye sahip olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Camellia sinensis yapraklarının metanol ekstresinin *in vitro* kolesterol esteraz inhibitör ve antioksidan aktivitesini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada standart olan Orlistatın IC_{50} değeri 24.15 ± 0.59 μg /ml iken ekstraktın IC_{50} değeri 82.46 ± 0.74 μg /ml ile enzimi inhibe etme kabiliyetinin olduğunu (Kumar ve ark. 2011) ayrıca ekstratın

kolesterol sentezi ile ilgili hastalıklar üzerinde yararlı bir etkiye sahip olabilecek ve potansiyel antioksidan ve serbest radikal süpürücü aktiviteler gösterdiği de bildirilmiştir(Kumar ve ark. 2011). Adisakwattana ve arkadaşlarının 2012'de yağ sindirimini ve emilimini engellemek için daha etkili yeteneği olan yenilebilir bitkilerin hiperlipideminin olası tedavisini araştırmış, Senna yaprağı ektresi ve Aspir bitkisinin CEase üzerinde sırasıyla 2,54 mg/ml ve 1,70 mg/ml IC_{50} değerleri ile inhibitör etki gösterdiğini bildirilmişlerdir.

Catechin polimerlerinin Pankreatik Kolesterol Esterazı konsantrasyona bağlı olarak önemli ölçüde inhibe ettiği ve ayrıca kolesterol misellerinin oluşumunu engellediği rapor edilmiştir. Catechin polimerler, Pankreatik Kolesterol Esteraza karşı Catechin monomerlerine göre doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde daha anlamlı bir inhibitör etki gösterdiği ($p<0.05$) ve Catechin polimerlerinin hiperlipidemi ve hiperkolesteroleminin hafifletilmesi için kullanılabileceği de ifade edilmiştir (Jeon ve Imm 2014).

Ekstratı içeriğinde %8,32 phenolikler, % 10,02 saponinler ve % 1,23 flavonoidleri bulunduran Acı Kavun Suyu ekstratının Pankreatik Kolesterol Esterazı IC_{50}: 0,73 mg/ml konsantrasyon değeri ile inhibe ettiği bildirilmişler ancak Acı Kavun Suyu Ekstratı sadece Pankreatik Kolesterol Esterazı inhibe etmediği bununla birlikte Pankreatik Lipaz, Alfa-Glukozidaz ve Alfa-Amilaz üzerine inhibitör etki gösterdiği vurgulanmıştır. (Su ve ark. 2016)

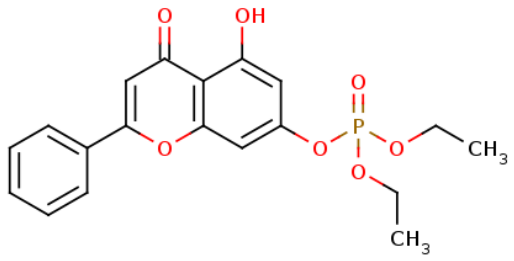
Asmaa ve arkadaşları Suriye'de yetişen bazı medikal bir bitkilerin (Ecballium elaterium, Pinus brutia, Plantago lanceolata, Schinus molle, ve Hedera helix) CEase üzerinde in vitro inhibitör etkileri araştırmış; Ecballium elaterium, Pinus brutia ve Hedera helix extraklarının pankreatik kolesterol esteraz üzerinde %18 ile 22 aralığında inhibitör etki gösterdiği bildirilmiş ancak in vivo çalışmalara da ihtiyaç olduğu belirtilmiştir.(Asmaa ve Ream 2016)

Phellinus Pini (Ph.Pini) bitkisinin metanol ekstraktının Pankreatik Kolesterol Esteraz enzim aktivitesi üzerinde Simvastatin ile kıyaslandığı bir çalışmada orta düzeyde inhibitör etki gösterdiği, %5'lik Ph.Pini ekstraktının önemli ölçüde TC, TG ve LDL seviyelerini baskıladığı ayrıca kan glukoz seviyelerinde bir azalmaya sebep olduğu

belirtilmiş, toz haline getirilmiş Ph.Pini meyvesinin doğal bir antihiperkolesterolemik ajan olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (Im ve ark. 2018).

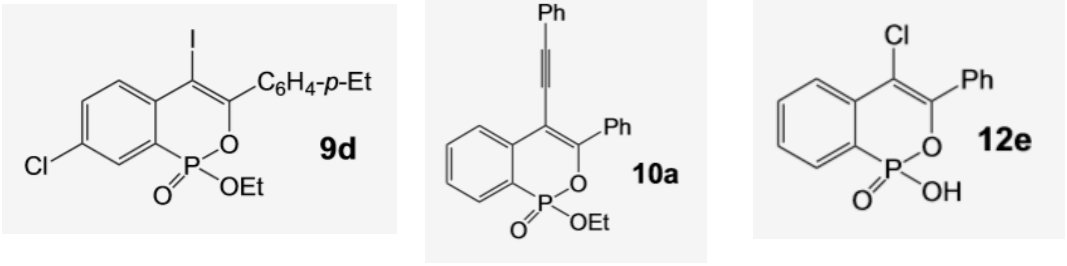
3.2. Sekonder aktif moleküller

Fosforillenmiş flavonoidlerin flavonoidlere göre CEase üzerine nanomolar seviyede etkili ve seçici geri dönüşümsüz ve yarışmalı inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca yine aynı araştırmacı 2014 yılında 29 molekül için CEase (kolesterol esteraz) ve AChE (asetilkolinesteraz) enzim IC_{50} inhibitör değerleri araştırmış ve çalışma sonucuna göre Kolesterol esteraz enzim aktivitesini 0,72 nM IC_{50} değeri ile fosforile flavonoid molekülü olan 5-hydroxy-4-oxo-2-phenyl-4H-1-benzopyran-7-yl phosphoric acid diethyl ester (Şekil 4) tarafından en güçlü inhibitör olarak davrandığını rapor etmişlerdir.



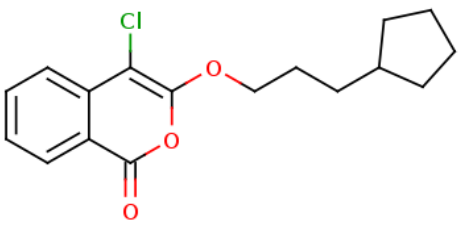
Şekil 3.2.1: 5-hydroxy-4-oxo-2-phenyl-4H-1-benzopyran-7-yl phosphoric acid diethyl ester

Li ve arkadaşları 2010'da 45 adet phosphaisocoumarin molekül sentezini yaparak domuz pankreatik kolesteraz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada 3-aryl and 4-halogen, 4-phenylethynyl or 4-benzoylmethyl değişken gruplarının varlığında etkili inhibisyon gözlendiği, bu grup türev bileşiklerden özellikle şekil 5'deki 7-chloro-1-ethoxy-3-(4-ethylphenyl)-4-iodo-1H-2,1-benzoxaphosphinine 1-oxide (9d) (Şekil 5); 1-ethoxy-3-phenyl-4-(phenylethynyl)-1H-2,1-benzoxaphosphinine 1-oxide (10a) (Şekil 5); 4-chloro-3-phenyl-1H-2,1-benzoxaphosphinin-1-ol 1-oxide (12e) (Şekil 5) moleküllerin sırasıyla IC_{50} 4,8 µM, 2,3 µM, 1,9 µM güçlü inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir.

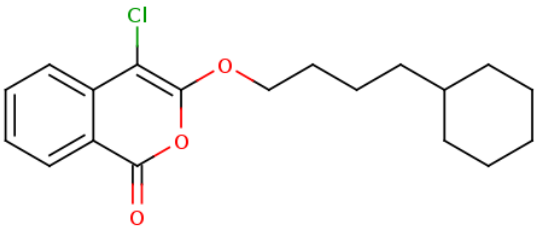


Şekil 3.2.2: 9d (7-chloro-1-ethoxy-3-(4-ethylphenyl)-4-iodo-1H-2,1-benzoxaphosphinine-1-oxide), 10a (1-ethoxy-3-phenyl-4-(phenylethynyl)-1H-2,1-benzoxaphosphinine-1-oxide) ve 12e (4-chloro-3-phenyl-1H-2,1-benzoxaphosphinin-1-ol 1-oxide) moleküllerinin yapısı.

Deck ve arkadaşları CEase'nin güçlü inhibitörleri olan 3-alkoxychloroisocoumarins geliştirmişlerdir.(Deck ve Willinger 2008) Bu inhibitörler, bir 3-alkoksi ikame edicisine katılan doymuş bir sikloalkan halkasına sahip olacak şekilde tasarlamışlardır. Tasarlanan bileşiklerin CEase aktif bölgesine yerleştirerek inhibisyon potansiyelini belirlemek için moleküler modelleme çalışmalarında subtitient grubu oluşturacak halkanın boyutunun yanı sıra halkayı tutan zincirin uzunluğu, moleküllerin kolesterol esteraz enzimine bağlanmada önemli katkılar sağladığı bulunmuştur. Üzerinde çalıştıkları moleküller içerisinde 4-Chloro-3-(4-cyclohexylbutoxy) isocoumarin and 4-chloro-3-(3-cyclopentylpropoxy)isocoumarin (Şekil 6) sırasıyla 11nM and 19nM gibi çok düşük IC_{50} değerlerine sahip olan isocoumarin temelli yeni bileşikler sentezlemişlerdir (Heynekamp ve ark. 2008).



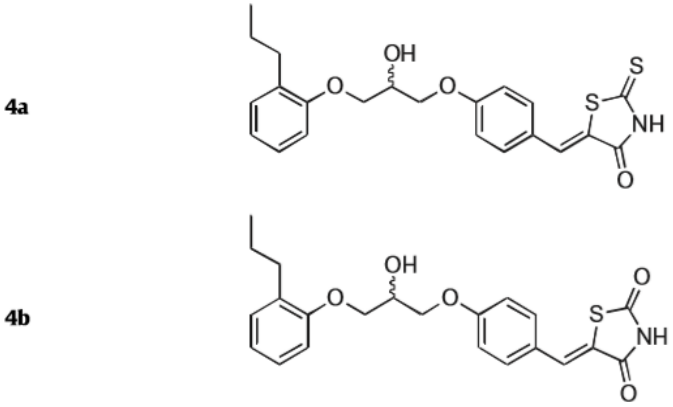
4-chloro-3-(3-cyclopentylpropoxy)isocoumarin



4-chloro-3-(4-cyclohexylbutoxy)isocoumarin

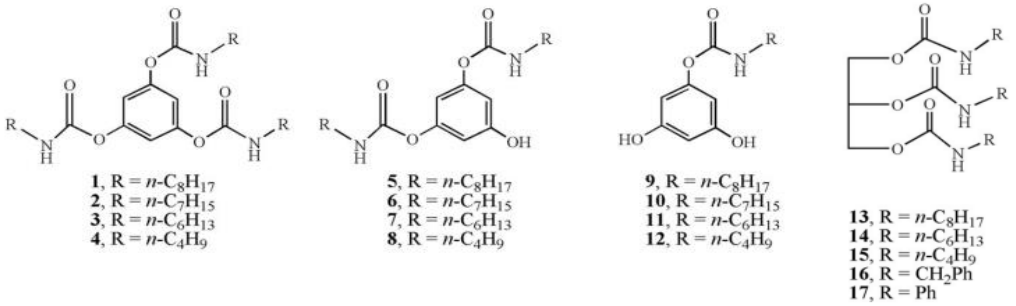
Şekil 3.2.3: 3-alkoxychloroisocoumarinlerin moleküler yapısı.

Heng ve arkadaşları CEase inhibitörleri belirlemeye yönelik yaptıkları bir çalışmada 5-benzylidenerholine (4a) molekülünün (Şekil 7) enzimi 1,76 μM IC_{50} konsantarsyonuyla inhibe ettiğini, aynı çalışmada 5-benzyldene-2,4-thiazolidinedione (4b) molekülünün (Şekil 7) enzimi 5,89 μM IC_{50} konsantrsyonu ile inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.(Heng ve ark. 2011)



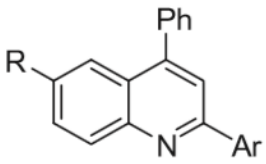
Şekil 3.2.4: 4a (5-benzylidenerholine) ve 4b (5-benzyldene-2,4-thiazolidinedione) molekülünün açık yapısı.

Kolesterol esterazın iki seri (oniki molekül) 1,3,5-Tri-N-Alkylcarbamyl-Phloroglucinols (1–12) ve (beş molekül) 1,3,5-Tri-N-Substituted Carbamylglycerols (13-17) Pseudo-Substratı sentezlenerek inhibisyon aktivitelerine bakılan çalışmada (Lin2012) 17 molekülün CEase'nin etkili inhibitörü oldukları, inhibitörlerin enzimine nükleofilik saldırıı yoluyla enzimin karbamil karbonuna bağlandıkları bildirilmiştir. İlk dört molekülün (1-4) son beş moleküle göre (Şekil 8) inhibisyon oranları 220-760 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir.



Şekil 3.2.5: 1,3,5-Tri-N-Alkylcarbamyl-Phloroglucinols (1–12) ve (beş molekül) 1,3,5-Tri-N-Substituted Carbamylglycerols (13-17).

CEase inhibisyonu için yapılan bir çalışmada oniki adet quinolin grubu molekülün IC_{50} değerlerine bakılmış, moleküller içerisinde CI bağlı (2-(1H-Indol-3-yl)-6-nitro-4-phenylquinoline) için IC_{50} değeri 1.33 ± 0.11 μM bulunmuş, R değişkenine NO_2 takıldığında CEaz emzim inhibisyon IC_{50} konsantrasyonunun 1,98 μM değerinde olduğunu tespit edilmiştir.

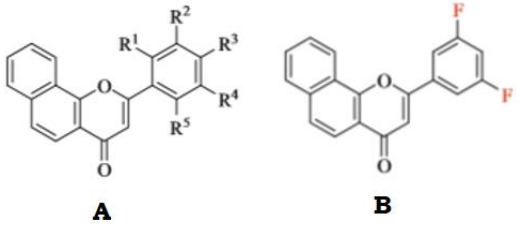


Şekil 3.2.6: 2-(1H-Indol-3-yl)-6-nitro-4-phenylquinoline (R: NO_2 Ar: Indol-3-yl).

Yapılan bir çalışmada Silico tarama yöntemi ile yirmisekiz kimyasal molekül arasında, üç molekülden epikateşin, eukonon ve 1,3,5,6-tetrahidroksi-ksanonun'nın Pankreatik Kolesterol Esteraz ile bağlanma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. (Varghese ve ark. 2017) Lider molekülleri olarak adlandırılan bu moleküller daha az sterik engelleme ve daha az hacimli olmaları, enzimin aktif bölgesine kolaylıkla yerleşebilmelerine olanak tanıdığı, CEase aktivitesini sınırlandırdığı yani iyi CEase inhibisyonu gerçekleştirdiği ve bütün bu olumlu özellikler dikkate alındığında antilipidemik ilaç adayı olabilecekleri ifade edilmiştir. Yani hiperkolesterolemi için ilaç etken maddesi olarak kullanılabilirler. Genel olarak, biyoaktivite skoru, bir molekülün bir ilaç olarak

aktivitesi ile doğru orantılıdır. Seçilen lider moleküllerin biyoaktivite skoru, epikateşin bileşiği ve eukonon ve 1,3,5,6-tetrahidroksi-ksanon için orta düzeyde biyolojik aktivite açısından çok iyi bir biyolojik aktivite göstermektedir. Docking Energy Score enzimle iyi etkileşme olarak ≤ -5 kcal/mol kabul edilen sınıra göre epicatechin (-5,63 kcal/mol), euxanthone (-5,68 kcal/mol), 1,3,5,6-tetrahydroxy xanthone (-5 kcal/mol) olarak belirlenmiş, tanımlanan bu polifenolik moleküller CEaz aktivitesini sınırlandırmak için hayati bir rol üstlendikleri, potansiyel ilaç adayları olarak görülebilecekleri bildirilmiştir.

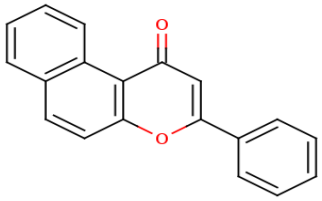
Singh ve arkadaşları 2017'de yaptıkları bir çalışmada Kolesterol Estaraz inhibitör aktivitesi ölçüm çalışmalarında kullandıkları Benzoflavon (Şekil 10-A) türevi 40 molekülden R1'den R5' kadar farklı kombinasyonlarla) karakterize ederek her molekül için IC_{50} değerleri elde etmişlerdir. Bu moleküller içerisinde A-12 (R1: H, R2: F, R3: H, R4: F, R5: H) molekülü (Şekil 10-B) 0,78 nM IC_{50} değeri göstererek CEase inhibitörü seçilmiştir.(Singh ve ark. 2017)



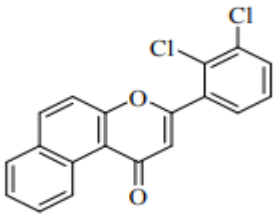
Şekil 3.2.7: A: Benzoflavone, B: Bileşik A-12.

Singh ve arkadaşları potansiyel Kolesterol Esteraz (CEase) inhibitörleri geliştirmek için 7,8-benzoflavonlardaki flavon iskeletine bağlı benzen halkasının pozisyonu değiştirilerek 5,6-benzoflavon (Şekil 11) türevleri bir dizisi molekül tasarlayıp sentezlemişlerdir. Sentezlenen tüm bileşikler, bir spektrofotometrik kolesterol esterazına (CEase) karşı inhibitör potansiyelleri kontrol edilmiş, 40 bileşik arasından 7 türev bileşiğin kolesterol esteraza karşı inhibitör aktivite gösterdikleri bildirilmiştir. Bu yedi bileşik arasından Bileşik B-16 (Şekil 11), kolesterol esteraz karşı 0.73 nM'lik bir IC_{50} değeri ile en umut verici karışık tip inhibitör aktiviteyi gösterdiği, dahası, B-16'nın enzimin aktif bölgesinin amino asit kalıntıları ile olan anahtar bağlanma etkileşimlerini belirlemek için, moleküler protein-ligand yerleştirme çalışmaları da

gerçekleştirilmişlerdir. B-16, CEase'ın katalitik yapısını tamamen bloke eder ve ester hidroliz mekanizmasına katılmasını önler.(Singh ve ark. 2018)



5,6-benzoflavone



B-16

Şekil 3.2.8: 5,6-benzoflavone ve bileşik B-16'nın moleküler yapıları

4. MATERYAL VE METOD

4.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan çeşitli kimyasallar ve cihazlar Bölüm 4.1.1 ve 4.1.2 verilmiştir.

4.1.1. Kullanılan kimyasallar

Deneysel çalışmalarda,

- Pankreatik Kolesterol esteraz (Sigma 26745-10MG-F, lyophilized, powder, white, ~35 U/mg)
- Enzim substratı olarak Para-nitro fenil bütürat
- Tampon hazırlamada, Merck marka disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ve sodyum fosfat (Na_2HPO_4) kullanılmıştır.
- Tarokolik asit sodyum tuzu

4.1.2. Kullanılan cihazlar

- Çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında, Cole Parmer Benchtop pH/mV/^oC metre ve elektrot,
- Deneysel çalışmalarda multiplate okuyucu kullanılmıştır. Cihazdaki datalar GEN5 programı ile değerlendirilmiştir.

4.2. Deneysel Yöntem

Pankreatik kolestrol esteraz enzim aktivitesi aşağıda belirtilen yönteme göre belirlenmiştir (Pietsch ve Gütschow 2002). Enzim aktivitesi 408 nm de absorbans ölçümü ile yapıldı. Absorbans ölçümleri mikroplate okuyucuda 96 lık platelerde yapılmıştır. Kullanılan çözeltiler ve miktarları **Çizelge 6.1.**'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Pankreatik kolestrol esteraz Enzim Aktivitesi Hazırlanışı

Kolesterol esteraz	
Madde	Pipetleme miktarı
100 mM fosfat tampon (pH=7) 100 mM NaCl	80 mikro litre
Tarokolik asit sodyum tuzu 12 mM	100
Para-nitro fenil bütürat (20 mM in buffer)	20 mikro litre
Enzim	10
Saf su	60 mikro litre saf su

İnhibisyon çalışmaları için moleküller 1 mg/ml olacak şekilde DMSO da çözüldü. Daha sonra 100 mikro litre stokdan alınıp üzerine 900 mikro litre saf su eklendi. Reaksiyon ortamına eklenen inhibitör hacmi kadar saf su hacminden azaltıldı. İnhibitörün katılmadığı reaksiyon kontrol olarak kabul edildi. Maddelerin inhibisyon etkileri kontrolle yüzdelik olarak kıyaslanarak belirlendi. %aktivite-[Konsantrasyon] grafiklerinin eğrilerinden IC_{50} değerleri hesaplandı.

Docking Çalışmaları

Docking çalışmalrı için Molegro Virtual Docker MVD 2019.7.0 kullanıldı. Enzimin üç boyutlu yapısı http://www.rcsb.org/pdb sitesinden 1F6W (**Method:** X-RAY DIFFRACTION, **Resolution:** 2.3 Å, **R-Value Work:** 0.181) kodu ile verilen kristal yapı kullanıldı. Referans ligand olarak di(hydroxyethyl)ether (PEG) kullanılmıştır (Terzyan ve ark. 2000).

Moleküllerin sdf formatları https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov web sayfasından indirildi. Programa uyum sağlamaması durumunda moleküllerin yapıları ChemDraw Professional 16.0 da çizildi ve Chem3D 16.0. de sdf formatına çevrildi. Bu programda uymaması durumunda Gaussian programı kullanılarak moleküllerin SDF formatları hazırlandı.

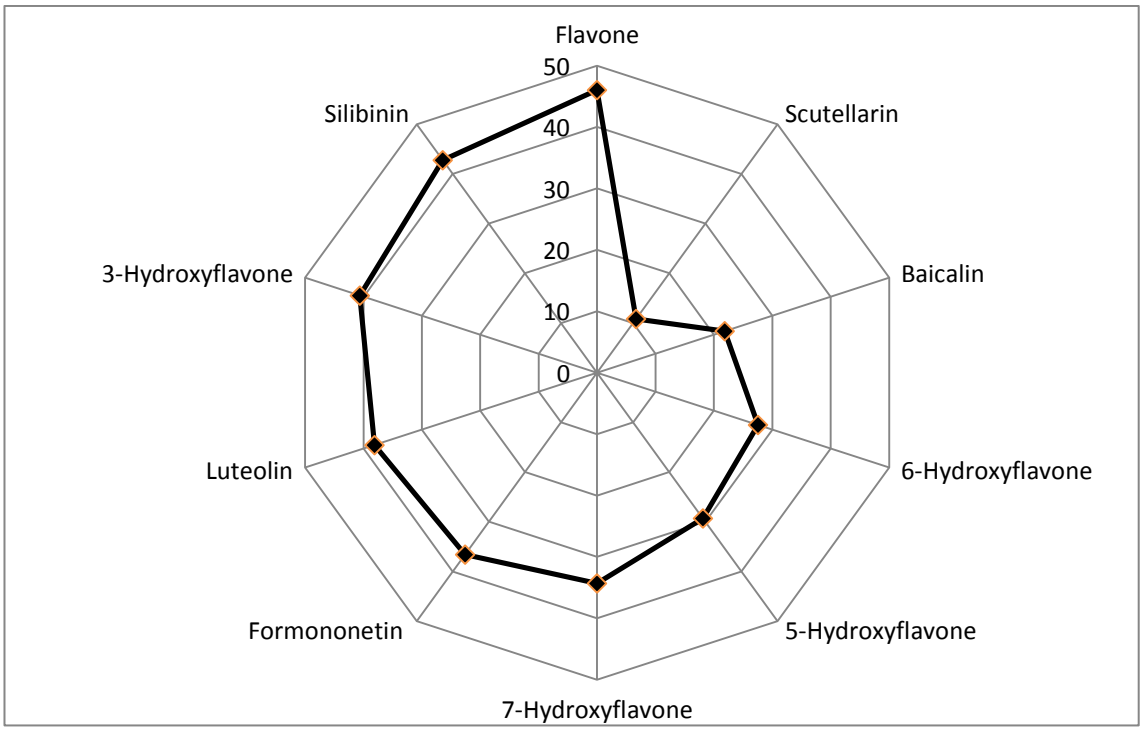
Molegro Virtual Docker MVD 2019.7.0 programında doking çalışmalarında programın kullanılışı

1) File menüsünden Import Molecule kullanılarak protein (enzim) programa alındı.
2) Protein üzerinde çalışma yapılacak şekilde ayarlamalar yapıldı.
3) Enzim üzerindeki oyuklar (Cavit) belirlendi.
4) Docking sekmesindeki Docking Wizard kullanılarak doking yapılacak molekül programa aktarıldı.
5) Docking ayarları yapıldıktan sonra program çalıştırıldı.
6) Docking sonuçları "Import Docking Result" seçeneğinden çalışmada kullanılan Docking programa sırasıyla çekildi.
7) Sekilen moleküldeki en uygun model seçilerek "Convert Pose to Ligand" seçeneğiyle liganda çevrildi.
8) View menüsünden Hidrojen bağ etkileşimlerini göster seçeneğiyle hidrojen bağlarını gösterilmesi sağlandı. Burada hidrojen bağının bağlanma şekli enerjisi ve uzunluğu gösterilmektedir.
9) Ligand map seçeneğinde hangi amino asitle hidrojen bağı yaptığı göstermektedir. Ayrıca buradaki sterik etkileşimleri hangi amino asitle yapmış olduğu da görülebilmektedir. Bu sterik etkileşimlerin enerji ve uzunluklarını da hesaplanmaktadır.
10) Docking görselleri Ekran Alıntı Aracı kullanılarak alındı.

5. BULGULAR

Yapılan tez çalışmasında 14 adet flovon yapıdaki bileşiğin pankreatik koletreol esteraz enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi incelenmiştir. Moleküllerin 12'si enzim üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1.-4.2'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerinde fenolik bileşiklerin etkisinin radar grafikle gösterimi

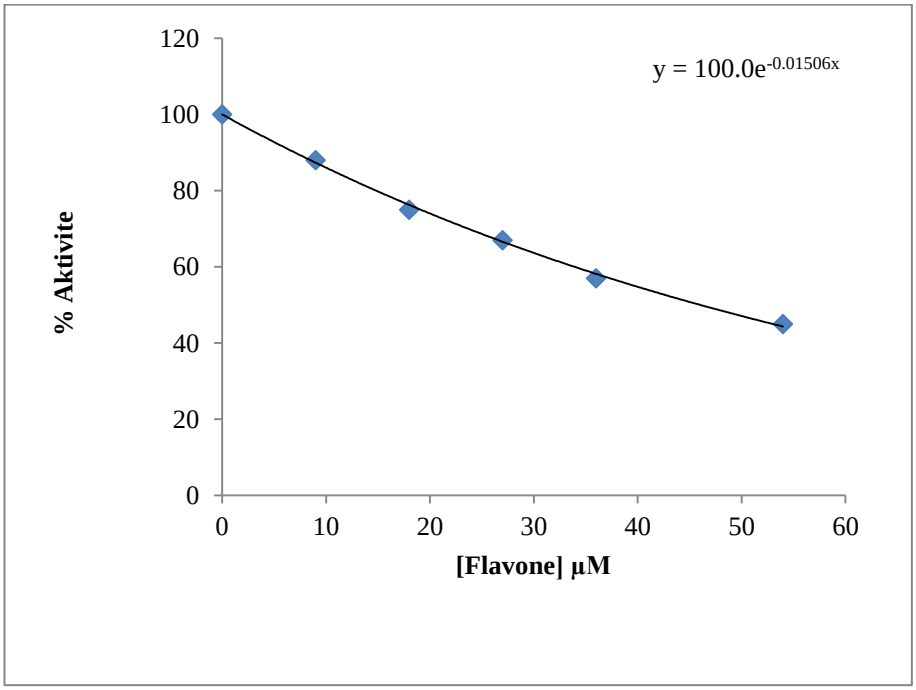


Çizelge 5.2. incelendiğinde; Fenolik bileşkler değerleri 10 ile 45 µm aralıkta IC_{50} değerleri ile inhibisyon etkisi göstermiştir. Scutellarin 10 µm IC_{50} değeri ile en yüksek inhibisyon etkisi gösteren bileşiktir. Baicalin, 6-Hydroxyflavone, ve 5-Hydroxyflavone 20-30 µM arası IC_{50} değerlerine sahiptir. Hidroksi falvonları bir flavon 46 µM IC_{50} değeri ile pankreatik kolesterpl esteraz enzimine karşı en düşük inhibisyon etkisine sahip moleküldür.

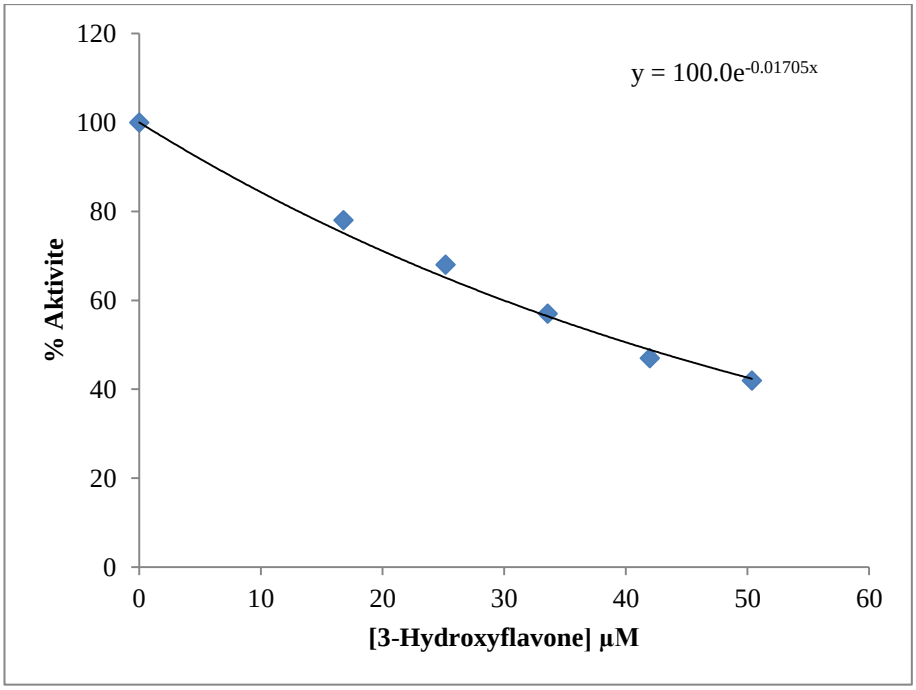
Çizelge 5.2. Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerinde fenolik bileşiklerin etkisinin radar grafikle gösterimi

Bileşik	IC50 değeri µM
Scutellarin	11
Baicalin	22
6-Hydroxyflavone	28
5-Hydroxyflavone	29
7-Hydroxyflavone	34
Formononetin	37
Luteolin	38
3-Hydroxyflavone	41
Silibinin	43
Flavone	46

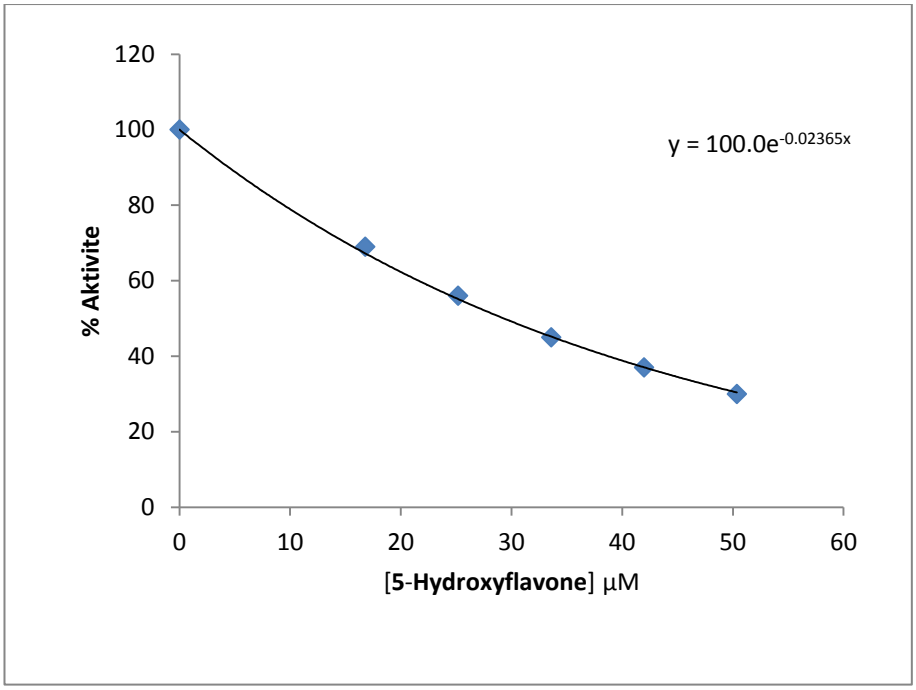
İnhibisyon çalışmaları sonucu elde edilen %aktivite–[konsantrasyon] grafikleri şekil 4.1- 4.9 arasında verilmiştir. Bu grafik eğrilerinden elde edilen IC_{50} değerleri yukarıda çizelgelerde verilmiştir.



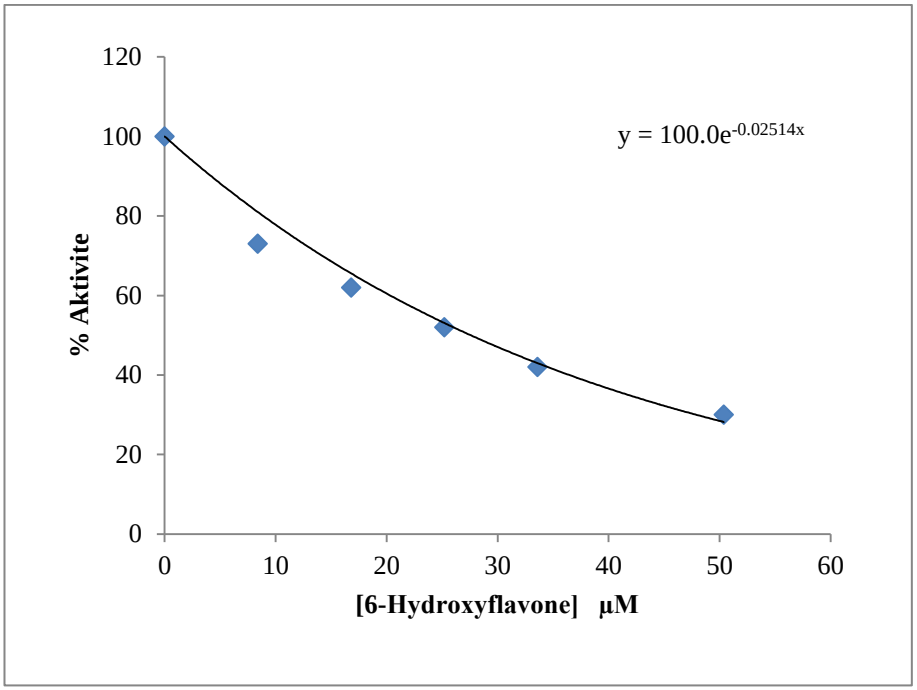
Şekil 5. 1. Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



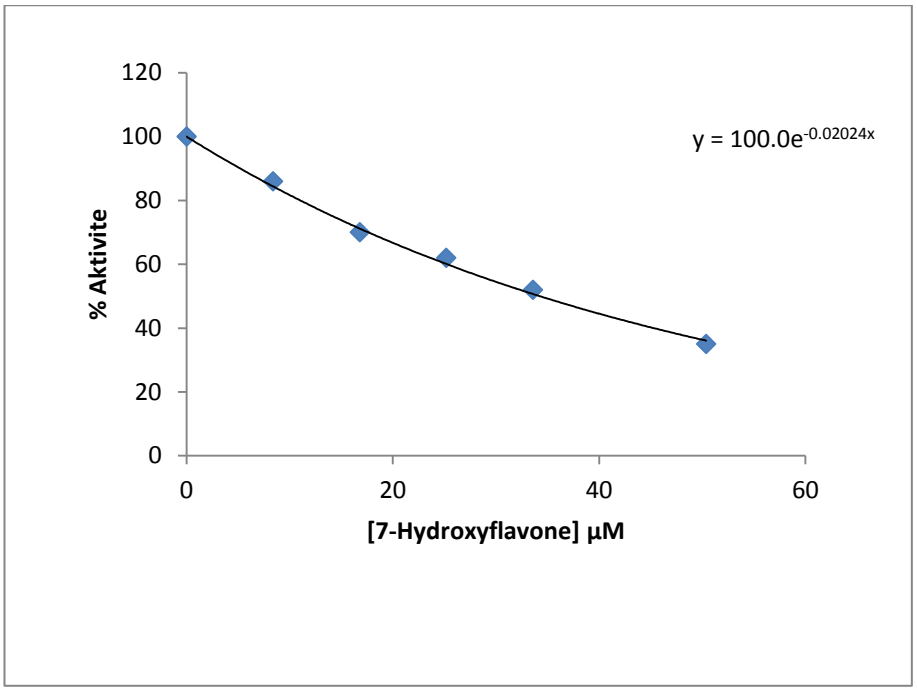
Şekil 5. 2 Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



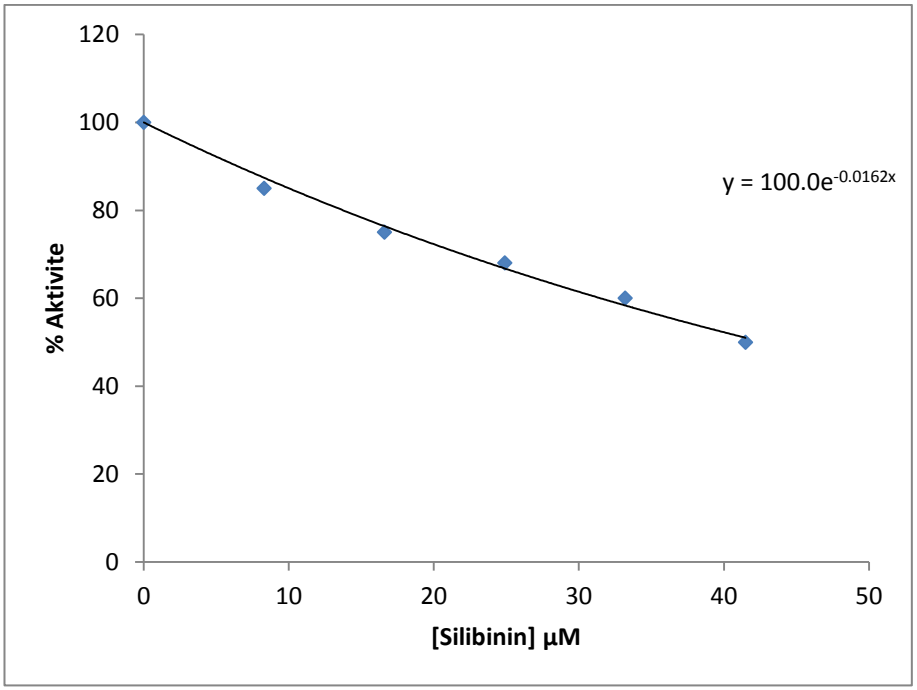
Şekil 5. 3 Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



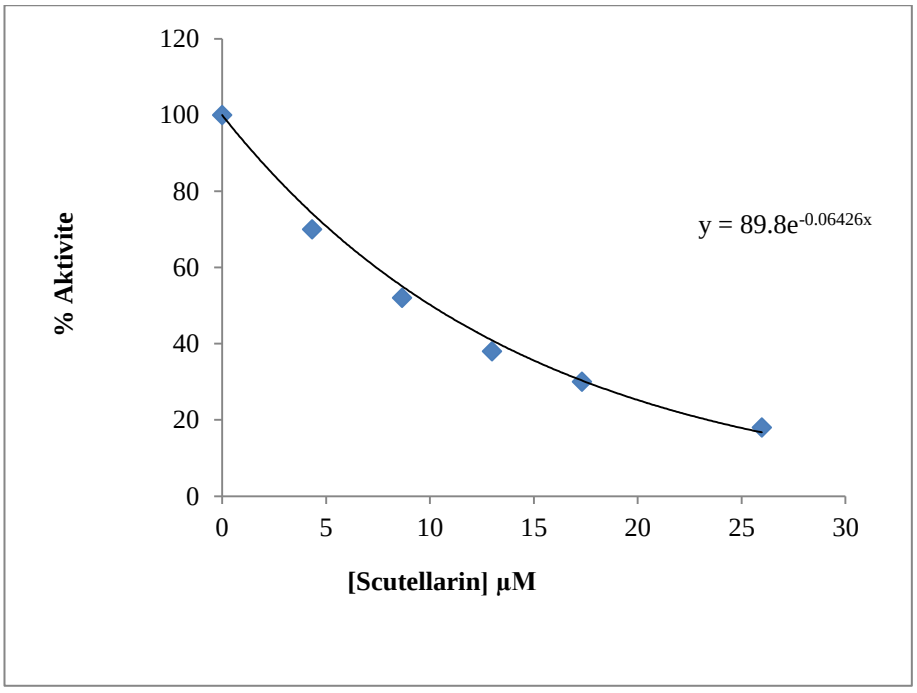
Şekil 5. 4 Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



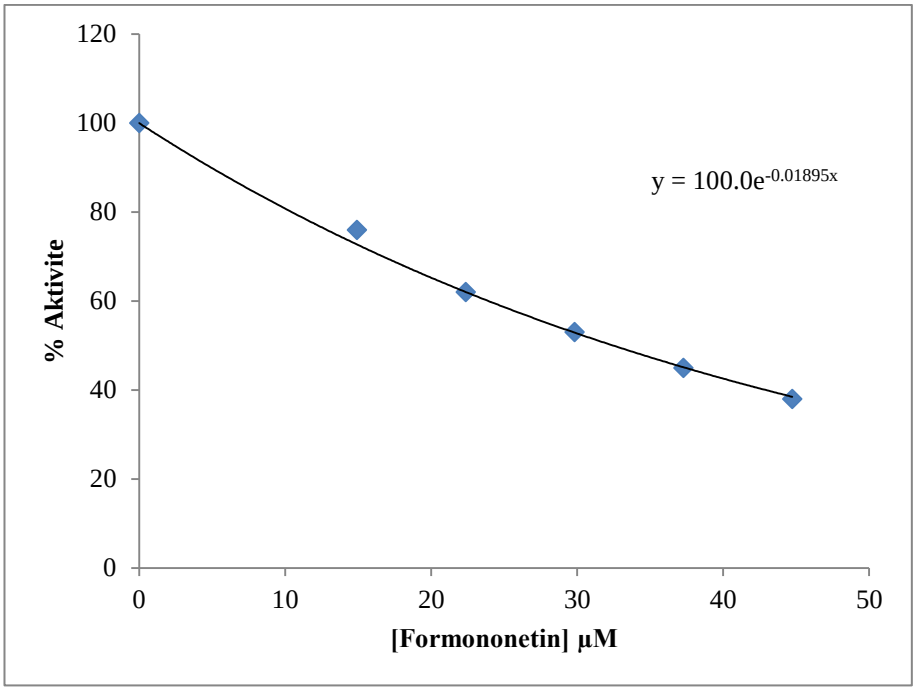
Şekil 5. 5 Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



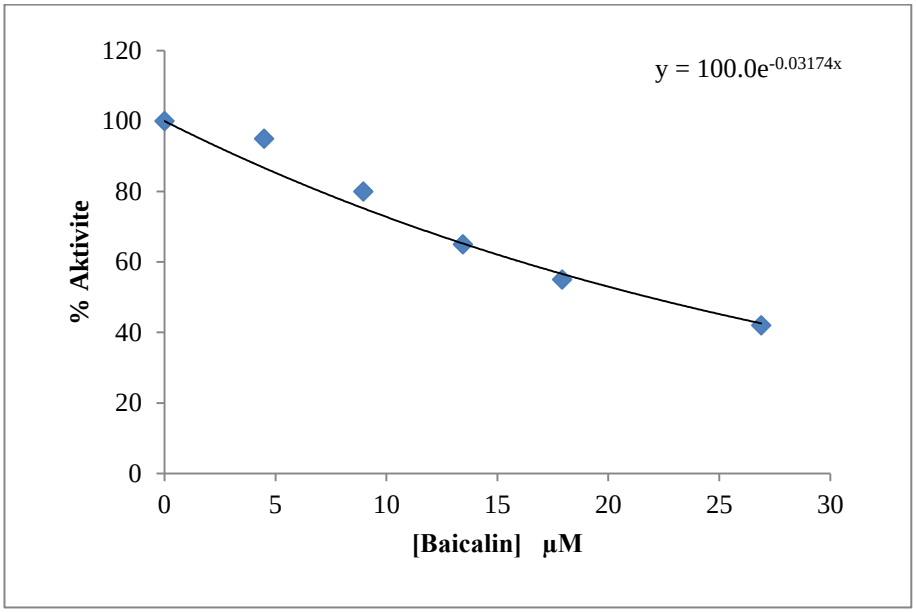
Şekil 5. 6 Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



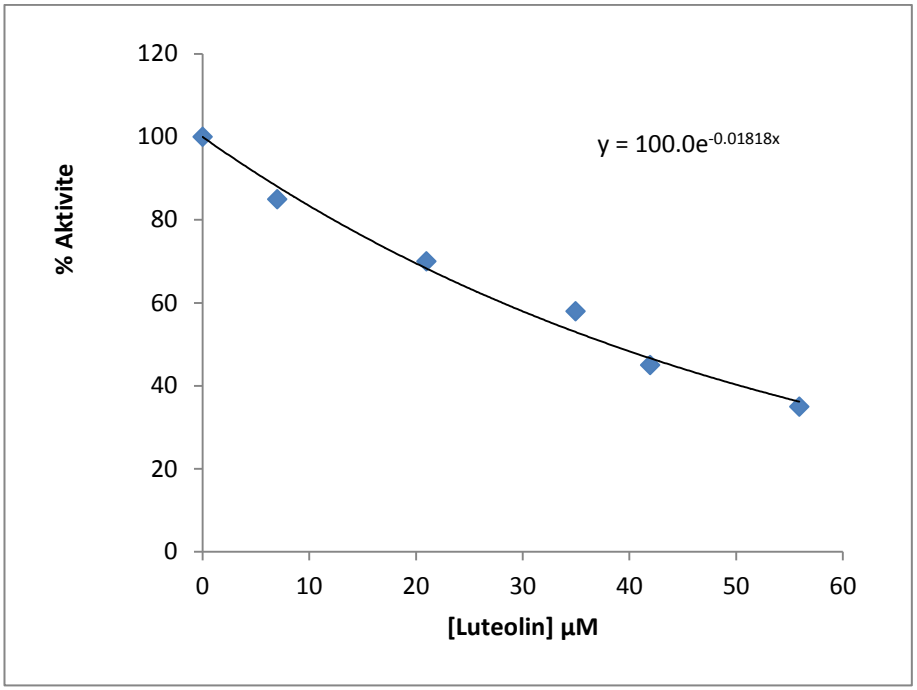
Şekil 5. 7 Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



Şekil 5. 8 Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



Şekil 5. 9 Baicalinin Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



Şekil 5. 10 Pankreatik Kolseterol Esteraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Docking sonuçlarına göre moleküller ve enzimin aktif bölgesi arasında etkileşimde sterik etkileşmişlerin ve hidrojen bağlarının önemli rol oynadığı gözlemlenmiştir. *İn vitro* ve *in silico* sonuçlar beraber değerlendirildiğinde scutelların enzim üzerinde en iyi inhibisyon etkisne sahip bileşik olduğu görülmektedir.

Çizelge 5.2. Molegro Virtual Docker Programdan Elde Edilen flavone-Enzim Etkileşimi Docking Genel Sonuçlari

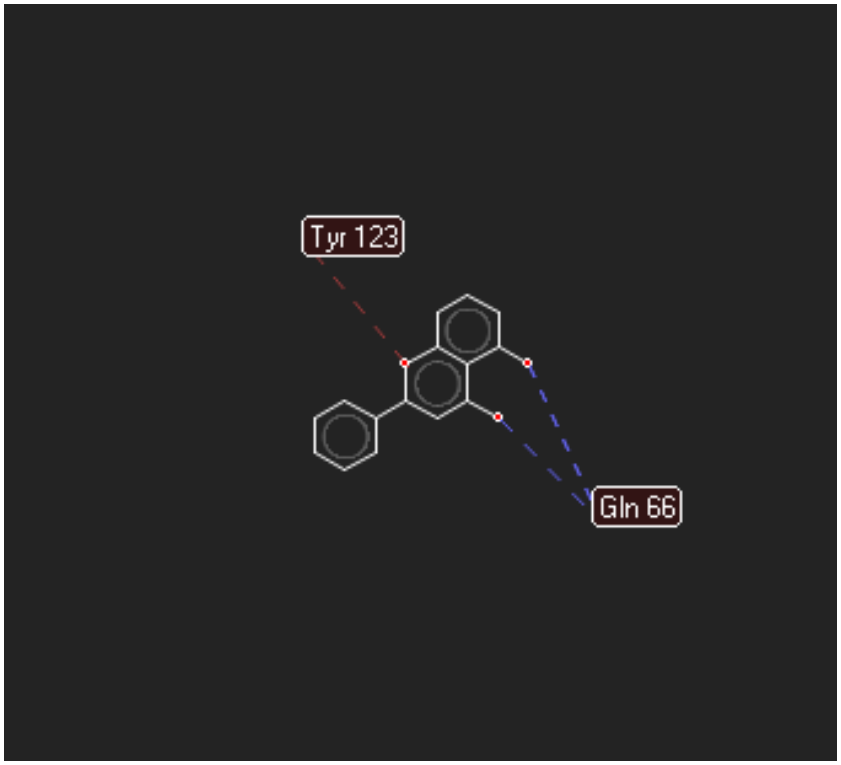
Name	MolDock Score	Interaction	Internal	HBond
Scutelların	-159.296	-192.074	32.7779	-17.1857
Baicalın	-127.307	-162.549	35.2416	-18.5475
Silibinin	-125.432	-164.876	39.444	-18.1867

Luteolın	-124.638	-145.485	20.8474	-17.5153
Formononetın	-107.193	-121.772	14.5789	-5.42908
6-hidroksi flavone	-91.1829	-105.011	13.8277	-6.7666
3-hidroksi flavone	-83.7476	-102.125	18.3774	-4.99191
5-hidroksi flavone	-83.4681	-103.528	20.0604	-6.51479
Flavone	-82.5873	-98.2138	15.6265	-2.8086

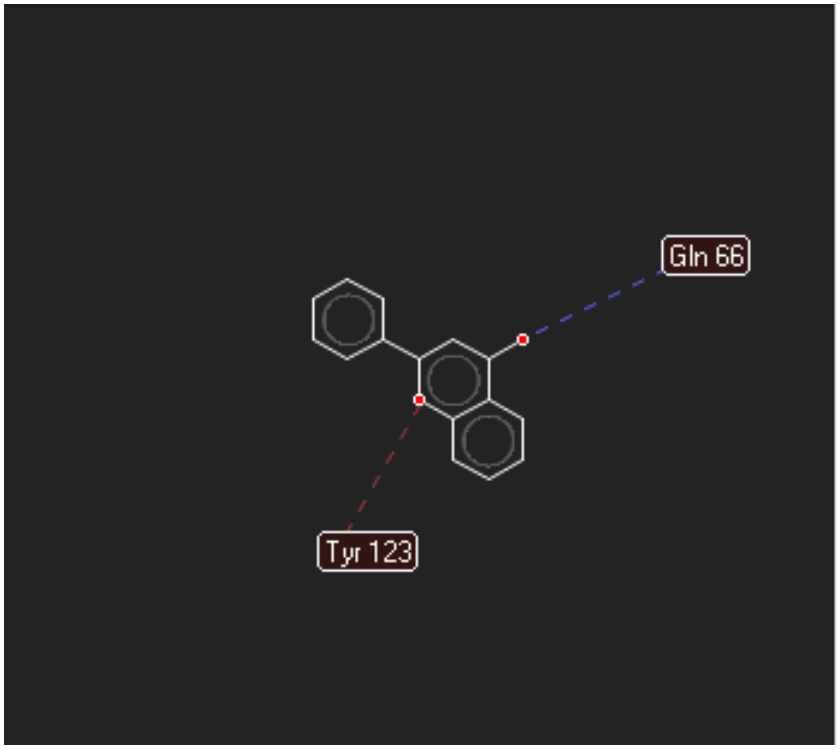
Çizelge 4.4: Enzim ve moleküller arasında oluşan hidrojen bağı etkileşimleri

Ligand	Hidrojen Bağ sayısı	Enerji	Uzunluk	Etkileştiği Amino asit
Flavone	1	-2.43	3.10	Gln 66
3-Hidroksi flavone	1	-1.88	2.60	Asn 142
	2	-2.38	3.10	Gln 66
5- Hidroksi flavone	1	-1.20	3.19	Gln 66
	2	-1.78	3.24	Gln 66
6- Hidroksi flavone	1	-2.10	3.18	Gln 66
	2	-2.21	3.15	Gln 66
	3	-2.33	3.12	Tyr 105
Baicalin	1	-2.50	2.88	Tyr 125
	2	-1.93	3.09	Tyr 125
	3	-2.02	3.01	Tyr 125
	4	-2.50	0	HOH 713
	5	0.05	0	HOH713
	6	-2.28	3.10	Gln 66
	7	-2.50	2.72	Gln 66

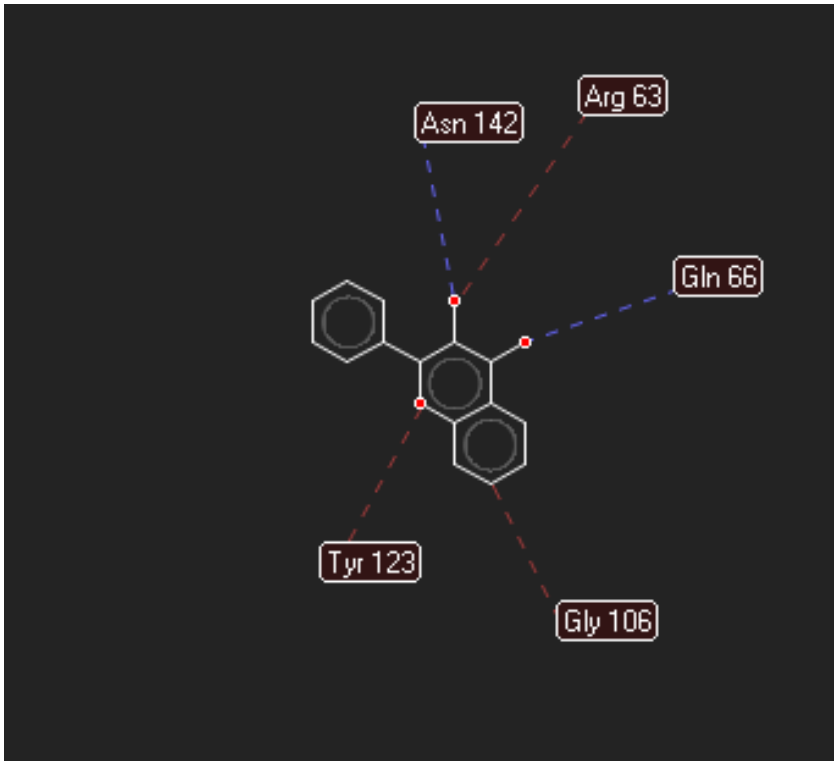
Formononetın	1	-0.89	3.40	Gly 106
	2	-1.22	3.10	Asn 84
Luteolin	1	-2.23	3.15	Tyr125
	2	-2.50	2.60	Gly 106
	3	-2.50	2.92	Gln 66
	4	-2.50	2.92	Gln 66
	5	-2.50	0	HOH 713
	6	-1.25	0	HOH 745
	7	-2.47	3.11	Thr 140
	8	-2.50	3.10	Thr 140
	9	-0.72	2.87	Phe 141
Silibinin	1	-2.50	2.60	Ile 69
	2	-2.50	0	HOH 767
	3	-2.31	0	HOH 767
	4	-1.59	3.10	Asn 142
	5	-1.52	3.10	Tyr 125
	6	-2.27	3.08	Tyr 123
	7	-2.50	2.80	Gly 106
	8	-2.50	2.63	Gly 106



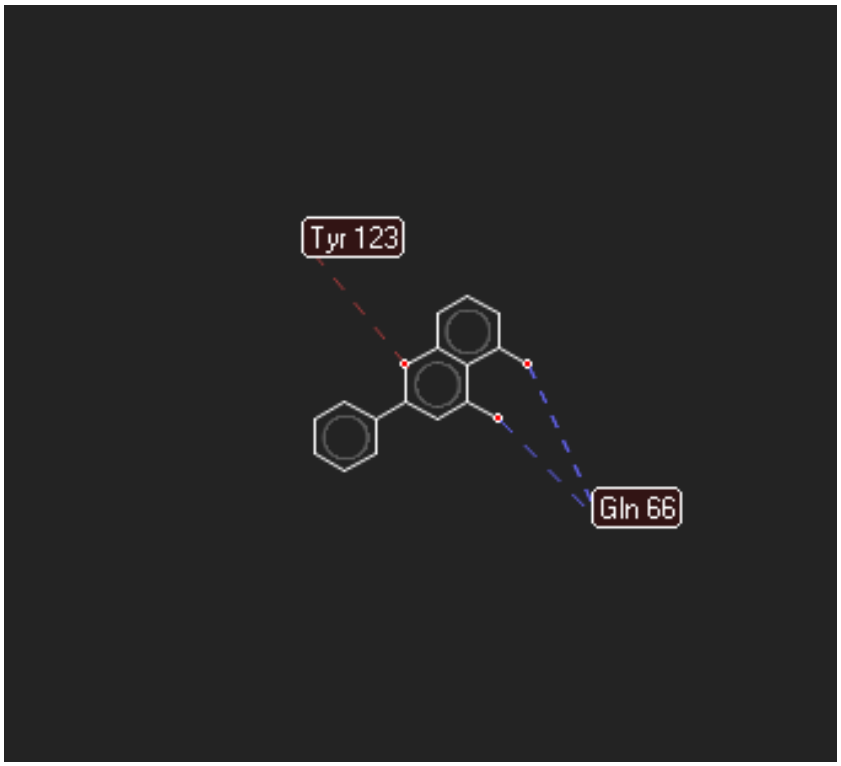
Şekil 5. 11 5-hidroksi flavone'ın enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi



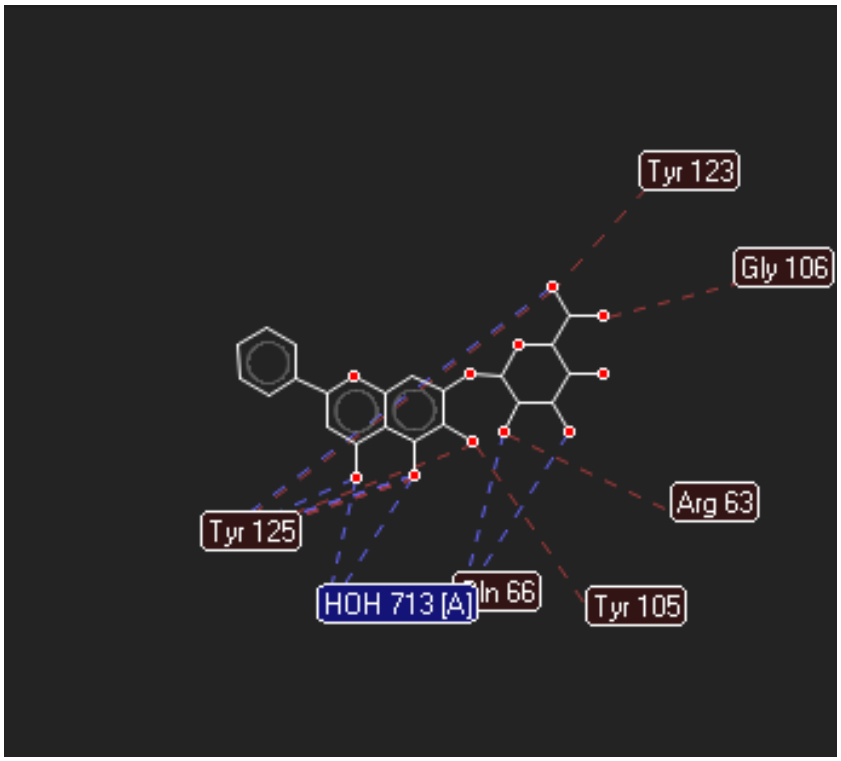
Şekil 5. 12 Flavone'ın enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi



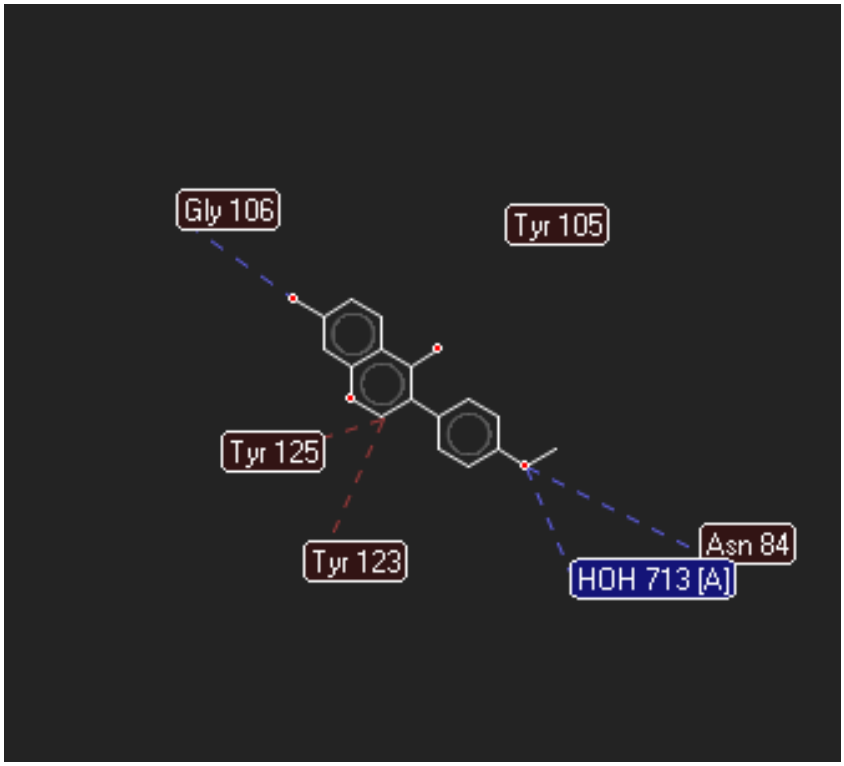
Şekil 5. 13 3-hidroksi flavone'un enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi



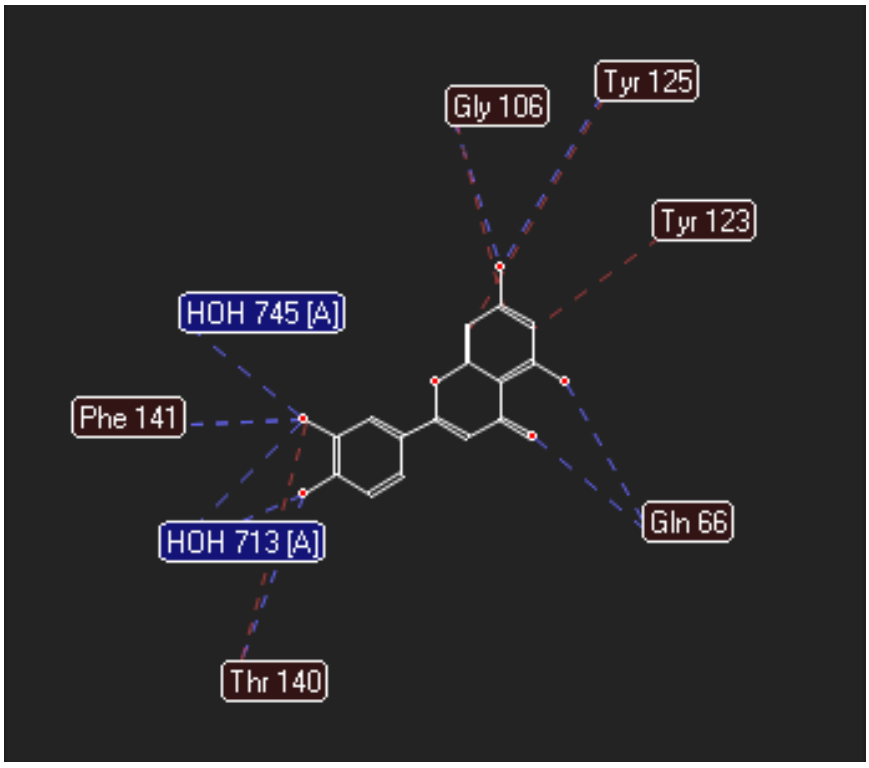
Şekil 5. 14 5- hidroksi flavone enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi



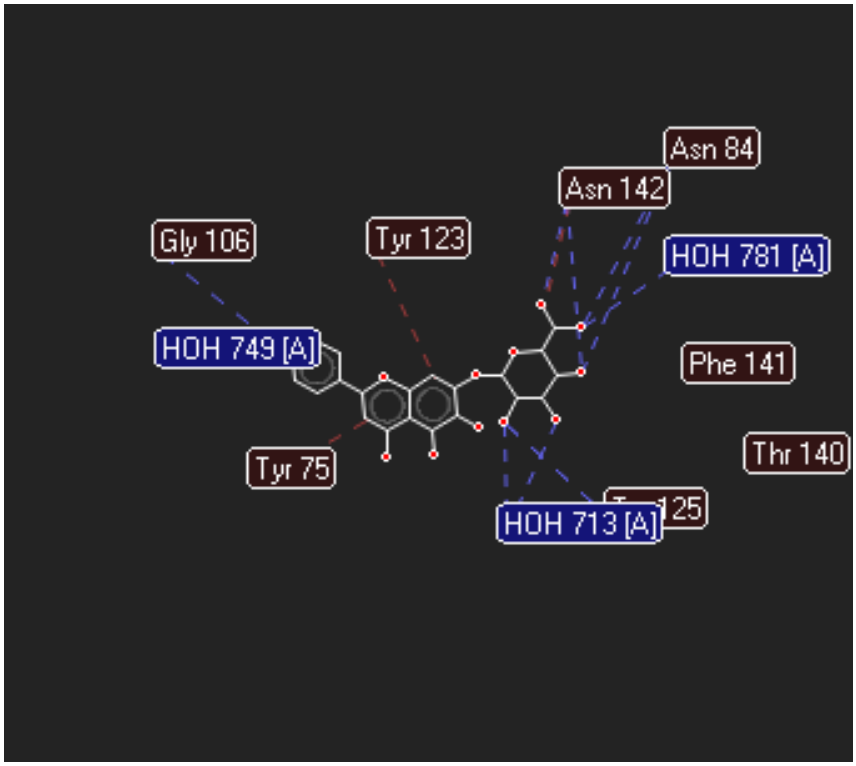
Şekil 5. 15 Baicalin enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi



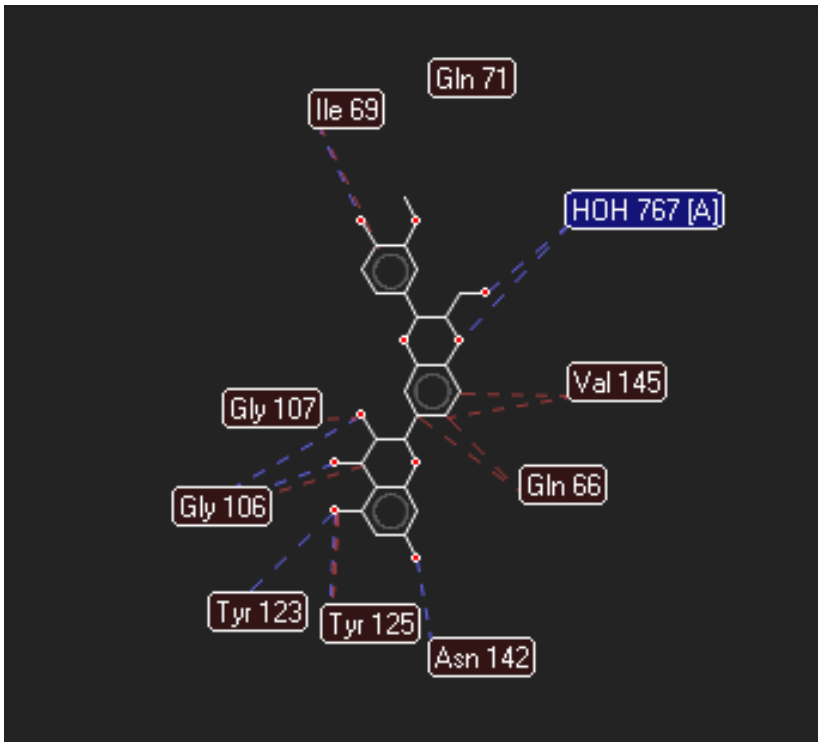
Şekil 5. 16 Formononetin enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi



Şekil 5. 17 Luteolin enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi



Şekil 5. 18 Sculletarin enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi



Şekil 5. 19 Silibinin enzimle etkileşiminin iki boyutlu gösterimi

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hücre membranının önemli bir bileşeni, bazı steroid hormonların, safra asidi ve tuzlarının sentezinde kullanılan kolesterol, hayvansal kaynaklı steroid bir alkoldür (Şekil 1). Bu nedenle tüm hücrelere sürekli olarak sağlanması kritik öneme sahiptir. Bu molekülün eksikliği ve fazlalığı çeşitli patolojilere sebep olmaktadır (Singh ve ark. 2017). Kolesterol oldukça hidrofobiktir ve esterleştiğinde bu özellik iyice artar. Kolesterol, kolesterol esterleri ve triaçilgliseroller hidrofobik olduklarından kanda lipoproteinler (Şilomikronlar, VLDL, HDL) tarafından taşınırlar(Champe ve ark. 2005).

Biz bu tez kapsamında 14 flavon yapıda bileşiğin PKE enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisini test ettik. Moleküllerden 14 tanesi enzim üzerinde inhibisyon etkisi gösterdi. Scularetin enzim üzerinde en yüksek inhibisyon etkisi gösteren bileşik olmuştur. Onu, Baicalin, 6-Hydroxyflavone ve 5-Hydroxyflavone takip etmiştir.

Sculletarin ile 5 hidroksi flavone karşılaştırıldığında, sculletarinin enzim üzerinde daha yüksek bir inhibisyon etkisi görülmektedir. Sebebi incelendiğinde şekillerde de görüldüğü gibi Sculletarindeki daha yüksek steric etkileşim ve daha çok görülen hidrojen bağları sayesinde inhibisyon etkisi daha yüksektir.

Flavon, 3-oh flavon, 5-oh flavon, 6-oh flavon ve 7-oh flavon karşılaştırıldığında ise inhibisyon etki sıralaması yüksekten düşüğe 6-oh flavon, 5-oh flavon,7-oh flavon,3-oh flavon, flavon şeklindedir. Buradaki çıkarılan sonuç OH grubunun hidrojen bağları sayesinde enzim üzerinde inhibisyon etkisinin artması ayrıca OH grubu bulanan bileşikler içinde de bağlandığı pozisyona göre inhibisyonun arttığı yönündedir

Bileşiklerin enzim aktivitesini nasıl etkilediğini anlamak için docking çalışmaları yapılmıştır. Hidrojen bağlarının ve steric etkileşimlerin ligandların enzime bağlanmasında önemli olduğu görülmüştür. İn silico ve in vitro sonuçlar arsında korelasyon görülmektedir.

Tez sonuçları, flavonoidlerin önmli bir sınıfı olan flavonların enzim aktivitesini önemli ölçüde etkilediği gözlemlenmiştir. Diğer fenolik yapıdaki bileşiklerde test edilerek daha aktif moleküller tespit edilebilir. Ya da bu moleküllerden yola çıkarak daha aktif moleküller sentezlenebilir.

7. KAYNAKLAR

Asmaa, B. H. ve N. Ream (2016). "In vitro screening of the pancreatic cholesterol esterase inhibitory activity of some medicinal plants grown in Syria." Int J Pharmacogn Phytochem Res **8**(8): 1432-1436.

Champe, P. C., R. A. Harvey ve D. R. Ferrier (2005). Biochemistry, Lippincott Williams & Wilkins.

Chan, D. C., G. F. Watts, P. H. R. Barrett, L. J. Beilin, T. G. Redgrave ve T. A. Mori (2002). "Regulatory effects of HMG CoA reductase inhibitor and fish oils on apolipoprotein B-100 kinetics in insulin-resistant obese male subjects with dyslipidemia." Diabetes **51**(8): 2377-2386.

Deck, C. ve R. m. Willinger (2008). "Improved head injury criteria based on head FE model." International Journal of Crashworthiness **13**(6): 667-678.

Engler, M. B. (2004). "Familial hypercholesterolemia: genetic predisposition to atherosclerosis." Medsurg Nursing **13**(4): 253.

Gotto, A. ve H. Pownall (1999). "Manual of Lipid Disorders: Reducing the Risk of Coronary Heart Disease. Williams & Wilkins." Baltimore.[Google Scholar].

Heng, S., W. Tieu, S. Hautmann, K. Kuan, D. S. Pedersen, M. Pietsch, M. Gütschow ve A. D. Abell (2011). "New cholesterol esterase inhibitors based on rhodanine and thiazolidinedione scaffolds." Bioorganic & medicinal chemistry **19**(24): 7453-7463.

Heynekamp, J. J., L. A. Hunsaker, T. A. Vander Jagt, R. E. Royer, L. M. Deck ve D. L. Vander Jagt (2008). "Isocoumarin-based inhibitors of pancreatic cholesterol esterase." Bioorganic & medicinal chemistry **16**(9): 5285-5294.

Im, K. H., J. Choi, S.-A. Baek ve T. S. Lee (2018). "Hyperlipidemic inhibitory effects of Phellinus pini in rats fed with a high fat and cholesterol diet." Mycobiology **46**(2): 159-167.

Jeon, S.-Y. ve J.-Y. Imm (2014). "Lipase inhibition and cholesterol-lowering activities of laccase-catalyzed catechin polymers." Food Science and Biotechnology **23**(5): 1703-1707.

John, S., S. Thangapandian, P. Lazar, M. Son, C. Park ve K. W. Lee (2014). "New insights in the activation of human cholesterol esterase to design potent anti-cholesterol drugs." Molecular diversity **18**(1): 119-131.

John, S., S. Thangapandian, S. Sakkiah ve K. W. Lee (2011). "Discovery of potential pancreatic cholesterol esterase inhibitors using pharmacophore modelling, virtual screening, and optimization studies." Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry **26**(4): 535-545.

Kim, S. D. (2010). "Isolation, structure and cholesterol esterase inhibitory activity of a polysaccharide, PS-A, from Cordyceps sinensis." Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry **53**(6): 784-789.

Koolman, J. ve K.-H. Röhm (2005). Color atlas of biochemistry, Thieme Stuttgart.

Kumar, A. P., A. Sivashanmugam, M. Umamaheswari, V. Subhadradevi ve P. Jagannath (2011). "Cholesterol esterase enzyme inhibitory and antioxidant activities of leaves of Camellia sinensis (L.) Kuntze. using in vitro models." International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research **2**(10): 2675.

Lengauer, T. ve M. Rarey (1996). "Computational methods for biomolecular docking."

Current opinion in structural biology **6**(3): 402-406.

Mergen, B. E., H. Mergen, K. Öngel, T. Tavlı ve V. Tavlı (2010). "Lipoprotein metabolizması hastalıkları ve tedavisine yaklaşım." Türkiye Aile Hekimliği Dergisi **14**(1): 38-45.

Ngamukote, S., K. Mäkynen, T. Thilawech ve S. Adisakwattana (2011). "Cholesterol-lowering activity of the major polyphenols in grape seed." Molecules **16**(6): 5054-5061.

Park, Y. ve W. S. Harris (2003). "Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance." Journal of lipid research **44**(3): 455-463.

Petursson, H., J. A. Sigurdsson, C. Bengtsson, T. I. Nilsen ve L. Getz (2012). "Is the use of cholesterol in mortality risk algorithms in clinical guidelines valid? Ten years prospective data from the Norwegian HUNT 2 study." Journal of evaluation in clinical practice **18**(1): 159-168.

Pietsch, M. ve M. Gütschow (2002). "Alternate substrate inhibition of cholesterol esterase by thieno [2, 3-d][1, 3] oxazin-4-ones." Journal of Biological Chemistry.

Rodwell, V. W., D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly ve P. A. Weil (2015). Harper's illustrated biochemistry, McGraw-Hill Education.

Singh, H., J. V. Singh, M. K. Gupta, P. Singh, S. Sharma, K. Nepali ve P. M. S. Bedi (2017). "Benzoflavones as cholesterol esterase inhibitors: Synthesis, biological evaluation and docking studies." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **27**(4): 850-854.

Singh, J. V., A. Kaur, K. Bhagat, M. K. Gupta, M. Singh, H. Singh ve P. M. S. Bedi (2018). "5, 6-Benzoflavones as cholesterol esterase inhibitors: synthesis, biological evaluation and docking studies." MedChemComm **9**(3): 490-502.

Su, J., H. Wang, C. Ma, C. Liu, C. Gao, R. Nie ve M. R. Tanver Rahman (2016). "Hypocholesterolaemic mechanism of bitter melon aqueous extracts via inhibition of pancreatic cholesterol esterase and reduction of cholesterol micellar solubility." International journal of food sciences and nutrition **67**(1): 20-28.

Suzukawa, M., M. Abbey, P. Howe ve P. J. Nestel (1995). "Effects of fish oil fatty acids on low density lipoprotein size, oxidizability, and uptake by macrophages." Journal of lipid research **36**(3): 473-484.

Terzyan, S., C. S. Wang, D. Downs, B. Hunter ve X. C. Zhang (2000). "Crystal structure of the catalytic domain of human bile salt activated lipase." Protein Science **9**(9): 1783-1790.

Varghese, G. K., R. Abraham, N. N. Chandran ve S. Habtemariam (2017). "Identification of lead molecules in Garcinia mangostana L. against pancreatic cholesterol esterase activity: an in silico approach." Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences: 1-10.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gürbey BAŞ

Doğum Yeri : Çankırı

Doğum Tarihi : 1988

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Adres : AHR mah / ÇANKIRI

Tel : 05057427504

E-posta : grbey_eczanesi@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Çankırı Fen Lisesi

Lisans : Ankara Üniversites Eczacılık Fakültesi 2006-2012

Yüksek Lisans: Çankırı Karatekin Üniversitesi Kimya A.B.D.-2020

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

GÜRBEY ECZANESİ sahibi ve mesul müdürü 2012-