



**MARMARA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**İnsan Monoamin Oksidaz A ve B Enzimlerinin 3-  
Arilkumarin Türevleri ile İnhibisyonunun  
Araştırılması**

Elif Şahin

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

**DANIŞMAN**

Prof.Dr. Ayşe OGAN

**İKİNCİ-DANIŞMAN**

Doç.Dr. Özkan DANIŞ

**İSTANBUL, 2016**



**MARMARA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



İnsan Monoamin Oksidaz A ve B Enzimlerinin 3-  
Arilkumarin Türevleri ile İnhibisyonunun  
Araştırılması

---

Elif Şahin  
(520613004)

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
Kimya Anabilim Dalı  
Biyokimya Programı

**DANIŞMAN**  
Prof. Dr. Ayşe OGAN

**İKİNCİ-DANIŞMAN**  
Doç. Dr. Özkan DANIŞ

İSTANBUL, 2016

---

# MARMARA ÜNİVERSİTESİ

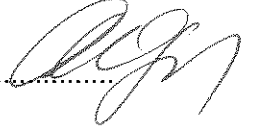
## FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans öğrencisi Elif Şahin'in "İnsan Monoamin Oksidaz A ve B Enzimlerinin 3-Arilkumarin Türevleri ile İnhibisyonunun Araştırılması" başlıklı tez çalışması, 04 Kasım 2016 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

### Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ayşe Ogan (Danışman)

Marmara Üniversitesi ..... (İMZA)



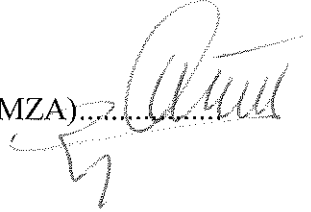
Prof. Dr. Safiye Erdem (Üye)

Marmara Üniversitesi ..... (İMZA)



Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL (Üye)

Yıldız Teknik Üniversitesi ..... (İMZA)



### ONAY

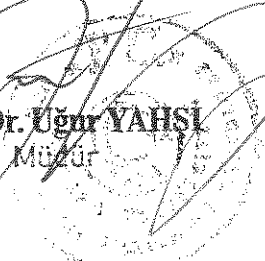
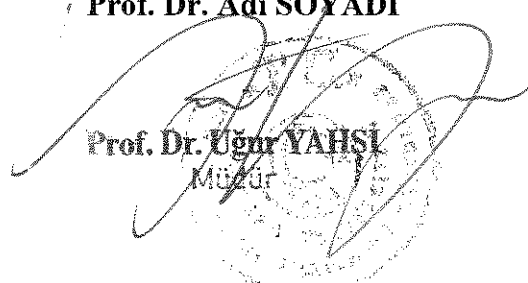
Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 05/12/2016 tarih ve 2016/27-02 sayılı kararı ile Elif Şahin'in Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Adı SOYADI

Prof. Dr. Uğur YAHSI

Müdür



# ÖNSÖZ

Lisans ve Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tez konumun seçilmesinde ve tüm tez süresince büyük desteğini gördüğüm tez danışmanım sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe OGAN'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tez konumun seçilmesinde ve tüm tez süresince büyük desteğini gördüğüm ikinci danışmanım Sayın Doç. Dr. Özkan DANIŞ'a, çalışmamızın bir bölümünün gerçekleşmesine katkıda bulunan FENA-110913-0376 no'lu projeyi desteklerinden dolayı Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı'na,

Tez çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında Doç. Dr. Serap DEMİR'e ve Yrd. Doç. Dr. Başak YÜCE DURSUN'a,

Hayatımın her anında, her ne olursa olsun desteklerini hep yanımda hissettiğim kıymetli aileme, teknik aksaklıkların giderilmesinde ve motivasyona ihtiyaç duyduğum zamanlarda desteğini yanımda hissettiğim sevgili Uğur ÇIKINTAŞ'a, tez yazımı döneminde izine ihtiyaç duyduğumda bana destek olan, şu an görevimi sürdürdüğüm Abdi İbrahim İlaç Sanayi AR-GE departmanındaki değerli yöneticim Samed ATAK'a ve ilk AR-GE departmanı deneyimini kazandığım Mustafa Nevzat İlaç firmasında stabilite yöneticiliği görevini sürdüren sevgili yöneticim Gülnur GENÇSOY'a, ilaç sektörüne girerken ve meslek hayatımın çeşitli dönemlerinde desteğini hep yanımda hissettiğim sevgili Eda HEPGÜLER'e, hayatımın bir bölümünde Alzheimer hastası olan ve ileride benim bu hastalığım tedavisi için çalışmam gerektiğini düşünen ve eğitim hayatım boyunca edindiğim bu misyon ile çalışmalarımı sürdürmemde müthiş katkısı olan merhum anneannem Zehra GÜLER'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Eylül 2016**

**Elif Şahin**

<b>İÇİNDEKİLER/</b>	<b>SAYFA</b>
<b>ÖNSÖZ</b>	<b>i</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>ii</b>
<b>ÖZET</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>SEMBOLLER</b>	<b>viii</b>
<b>KISALTMALAR</b>	<b>ix</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>xi</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>xiii</b>
<b>GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Monoamin Oksidaz Enzimi	6
1.3 Monoamin Oksidaz A ve B İzoenzimlerinin İşlevleri ve Karakteristik Özellikleri	7
1.4 Aromatik Kafes Yapısı	9
1.5 MAO Substratları ve Kataliz Tepkimesi	12
1.6 MAO'nun aminleri oksitlemesi konusunda önerilen mekanizmalar	15
1.6.1 Tek elektron transferi mekanizması	15
1.6.2 Polar Nükleofilik Mekanizma	17
1.6.3 Hidrür Mekanizma	17
1.7 MAO-A ve MAO-B inhibitörlerinin kullanıldığı hastalıklar	18
1.7.1 Depresyon	18
1.7.2 Alzheimer Hastalığı	19
1.7.3 Parkinson Hastalığı	20
1.8 Enzimler	21
1.8.1 Enzimler ve inhibisyonlarının tedavide önemleri	21
1.8.2 Enzimler ve Enzim Kinetiği	22
1.8.3 Enzim İnhibisyonu	24
1.8.3.1 Geri dönüşümlü İnhibisyon	25
1.8.3.2 Geri dönüşümsüz İnhibisyon	27
1.9 Kumarinler ve Enzim İnhibisyonunda Kullanımları	28

<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM</b>	
2.1. Araştırma Yöntemi	29
2.2. Araştırma Araçları	30
2.2.1. Araştırmada kullanılan cihazlar	30
2.2.2. Araştırmada kullanılan kimyasallar	30
2.3. Farmakolojik Denemeler – Genel metodlar	37
2.3.1. Stok Çalışma çözeltilerinin hazırlanması	38
2.3.2. Enzim aktivitesi Tayini	39
2.3.3. Kumarinle ile yapılan inhibisyon çalışmaları	40
2.3.4. İnhibisyon Mekanizması	41
2.3.5. Geri dönüşümlülük	42
2.3.6. Lipinski beş kuralı	42
<b>3. BULGULAR</b>	43
3.1.1. Enzim aktivitesinin tayin edilmesi	43
3.1.2. İnhibisyon çalışmaları	43
3.1.3 İnhibisyon Mekanizması	52
3.1.4 Geri dönüşümlülük	52
3.1.5 Lipinski beş kuralı	54
<b>4.TARTIŞMA-SONUÇ</b>	55
<b>KAYNAKLAR</b>	57
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## ÖZET

### **İnsan Monoamin Oksidaz A ve B Enzimlerinin 3-Arilkumarin Türevleri ile İnhibisyonunun Araştırılması**

Monoamin Oksidaz (EC-1.4.3.4, MAO), çeşitli hücrelerin mitokondri dış membranında bulunan, FAD-içeren bir flavoenzimdir. MAO, farklı üç boyutlu yapı, substrat ve inhibitör seçim özellikleri ile birbirinden ayrılan ve MAO-A ve MAO-B enzimi olarak isimlendirilen iki izoenzim halinde bulunur. Bu izoenzimler monoamin degradasyonunda ve dolayısıyla nörotransmitörlerin inaktivasyonunda önemli görev alırlar. Bu nedenle spesifik MAO enzim inhibitörleri, çeşitli nörodejeneratif ve nörolojik rahatsızlıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır.

Depresyon, günümüzde sıklıkla görülen bir psikiyatrik hastalıktır ve tedavisi için geliştirilen yeni ilaçlara rağmen halen önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Alzheimer Hastalığı, kavrama ve konuşma bozuklukları, hafıza kaybı ve birçok davranış anormallikleri ile karakterize edilen, kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. Alzheimer Hastalığı sanayileşmiş ülkelerde, özellikle yaşlılarda sık olarak görülür ve bu ülkelerde başlıca ölüm sebeplerinden biridir. Parkinson hastalığı kronik, ilerleyici, nörodejeneratif bir hareket bozukluğu hastalığıdır. Parkinson Hastalığını tamamen önleyici bir tedavi olmamasına rağmen çeşitli ilaç ya da cerrahi tedavi yöntemleriyle hastalık semptomlarında çeşitli düzeltilmeler sağlanabilmektedir. MAO-A inhibitörleri depresyon ve anksiyete gibi nörolojik rahatsızlıkların tedavisinde kullanım alanı bulurken, MAO-B inhibitörleri Parkinson ve Alzheimer Hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır.

Kumarinler doğal ve/veya sentetik kaynaklı olabilen ve antikanser, antimikrobiyel, antioksidant ve antikoagulan özellikler başta olmak üzere pek çok farmakolojik özelliklere sahip olan benzopirane halka sistemine sahip organik bileşiklerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli kumarin türevlerinin anti MAO etkileri gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyokimya ve Organik Kimya laboratuvarlarında sentezlenmiş ve yüksek antioksidan aktiviteye sahip

çeşitli 3-arilkumarin türevi bileşiklerin MAO-A ve MAO-B izoenzimleri üzerindeki inhibe edici özellikleri ilk kez *in vitro* olarak incelendi.

Bu çalışmamızda substrat olarak kullanılan p-tiraminin MAO izoenzimleri ile reaksiyonu sonunda açığa çıkan hidrojen peroksit, peroksidaz varlığında 10-asetil-3,7-dihidroksifenoksazin (Amplex Red reaktifi) ile spektroflorometrik olarak çoklu plaka okuyucuda tayin edildi. En yüksek aktivite gösteren kumarin türevi 3-(fenildiazenil)-4-hidroksikumarin olarak belirlendi (MAO-A IC<sub>50</sub>: 204.28 µM, MAO-B IC<sub>50</sub>: 0.13 µM, Seçicilik İndeksi: 1582.9). En yüksek aktivite gösteren bu kumarin türevi için farklı substrat konsantrasyonlarında kinetik çalışmalar gerçekleştirilerek inhibisyon mekanizması karışık inhibisyon ve K<sub>i</sub> değeri: 0.0315 µM olarak tayin edildi. Elde edilen bu sonuçlar 3-(fenildiazenil)-4-hidroksikumarin türevinin MAO-B izoenzimini düşük konsantrasyonlarda, seçimli ve geri dönüşümlü olarak inhibe ettiğini göstermektedir ve Parkinson ve Alzheimer hastalıklarının tedavisinde kullanılabilme üzere gerçekleştirilecek daha ileri *in vivo* çalışmalar için ümit vericidir.

## **ABSTRACT**

### **Investigation of the Inhibition of Human Monoamine Oxidase A and B by 3-Arylcoumarin derivatives**

Monoamine oxidase (EC-1.4.3.4, MAO) is a FAD-containing flavoenzyme located on the outer mitochondrial membrane in various cells. MAO exists in two isoenzymes, termed MAO-A and MAO-B which can be distinguished by differences in three-dimensional structure, substrate preference, and inhibitor specificity. These isoenzymes have important roles in degradation of mono amines and therefore inactivation of various neurotransmitters. In this respect, specific MAO inhibitors could be used in treatment of various neurodegenerative and neurological disorders.

Depression is the most common psychiatric disorder and despite the new drugs developed it still persists as a major health problem. Alzheimer's disease is a chronic, neurodegenerative disorder that is characterized by a loss of memory and cognition, decline in language and severe behavioral abnormalities. It is the most common form of dementia among the elderly especially in industrialized countries and one of the leading causes of death in developed countries. Parkinson's disease is a chronic, progressive neurodegenerative movement disorder. Although there is no cure for Parkinson's disease, drugs and surgery may provide symptomatic relief. MAO-A inhibitors are prescribed for the treatment of mental depression and anxiety, while, MAO-B inhibitors are used in symptomatic treatment of Parkinson's and Alzheimer's diseases.

Coumarins are natural and/or synthetic organic compounds with benzopyran ring system which has various pharmacological properties such as anticancer, antimicrobial, antioxidant and anticoagulant. In recent years, a number of coumarin derivatives had been shown to have anti MAO activities.

In this study, various 3-arylcoumarin derivatives that have been synthesized at Marmara University, Faculty of Arts and Sciences, Biochemistry and Organic Chemistry Laboratories were investigated first time for their ability to inhibit the catalytic activity of MAO-A and MAO-B *in vitro*.

For this purpose, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> which evolves from the reaction of our substrate p-tyramine and MAO isoenzymes has been spectrofluorometrically determined using Amplex Red Reagent. The most potent coumarin derivative has been determined as 3-(phenyldiazenyl)-4-hydroxycoumarin (MAO-A IC<sub>50</sub>: 204.28 μM, MAO-B IC<sub>50</sub>: 0.13 μM, Selectivity Index: 1582.9). For this the most potent coumarin derivative, inhibition mechanism has been identified as mixed inhibition with a K<sub>i</sub> value of 0.0315 μM (31.5 nM). From these results, it may be concluded that 3-(phenyldiazenyl)-4-hydroxycoumarin derivative selectively and reversibly inhibits MAO-B at low concentrations and it is promising in further *in vivo* studies for the treatment of Parkinson's and Alzheimer's diseases.

## SEMBOLLER

$\text{\AA}$	:Angström
$\beta$	:Beta
$\gamma$	:Gama
%	:Yüzde
$^{\circ}\text{C}$	:Santigrad derece
g	:Gram
m	:Metre
M	:Molar
mg	:Miligram
mL	:Mililitre
mM	:Milimolar
nm	:Nanometre
nM	:Nanomolar
$\mu\text{L}$	:Mikrolitre
$\mu\text{mol}$	:Mikromol
$\mu\text{M}$	:Mikromolar
U	:Ünite
dk	:Dakika
s	:Saniye

## KISALTMALAR

<b>AH</b>	: Alzheimer Hastalığı
<b>PH</b>	: Parkinson Hastalığı
<b>E</b>	: Enzim
<b>EC</b>	: Enzim Komisyonu
<b>EI</b>	: Enzim-İnhibitör kompleksi
<b>ES</b>	: Enzim-Substrat kompleksi
<b>ESI</b>	: Enzim-Substrat-İnhibitör kompleksi
<b>IC<sub>50</sub></b>	: Yüzde elli inhibisyon sağlayan inhibitör konsantrasyonu
<b>K<sub>i</sub></b>	: İnhibisyon sabiti
<b>K<sub>m</sub></b>	: Maksimum hızın yarısına erişildiği substrat konsantrasyonu
<b>MAO</b>	: Monoamin oksidaz
<b>MAO-A</b>	: Monoamin oksidaz A
<b>MAO-B</b>	: Monoamin oksidaz B
<b>NE</b>	: Norepinefrin
<b>S</b>	: Substrat
<b>SS</b>	: Standart Sapma
<b>V<sub>maks</sub></b>	: Maksimum hız

# ŞEKİL

	<b>SAYFA NO</b>
Şekil 1.1 İnsan MAO-A ve MAO-B enziminin aktif bölgesinde FAD'ın gösterimi	6
Şekil 1.2 MAO-A enziminin aktif bölge boşluklarındaki farklılıklar	8
Şekil 1.3 MAO-B enziminin aktif bölge boşluklarındaki farklılıklar	8
Şekil 1.4 İnsan MAO-A enziminin şematik olarak gösterimi	10
Şekil 1.5 İnsan MAO-B enziminin şematik olarak gösterimi	10
Şekil 1.6 MAO-A ve MAO-B izozimlerinin aktif bölge boşlukları ve aromatik kafes	11
Şekil 1.7 Serotonin, dopamin, norepinefrin ve epinefrin yapıları	12
Şekil 1.8 Monoaminlerin deaminasyon reaksiyonu	13
Şekil 1.9 MAO tarafından katalizlenen reaksiyonun basamakları	14
Şekil 1.10 MAO enziminin substrat oksidasyonu için ileri sürülen ilk kimyasal mekanizmasının gösterimi	14
Şekil 1.11 Tek elektron transferi mekanizmasının gösterimi	16
Şekil 1.12 Tek basamaklı radikal mekanizma	17
Şekil 1.13 Polar Nükleofilik mekanizma	18
Şekil 1.14 MAO enzimi için önerilen Hidrür transfer mekanizması	18
Şekil 1.15 Sağlıklı Birinin Beyni ile İlerlemiş Alzheimer Hastasının Beyin Yapılarının Karşılaştırmalı Gösterimi	20
Şekil 1.16 Substrat derişimine karşı başlangıç hızının değişimi	23
Şekil 1.17 Lineweaver–Burk Grafiği	24
Şekil 1.18 Yarışmalı inhibisyonda inhibitörün enzime bağlanması ve Lineweaver - Burk grafiği	25
Şekil 1.19 Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitörün enzime bağlanması ve Lineweaver - Burk grafiği	26
Şekil 1.20 Karışık inhibisyonda inhibitörün enzime bağlanması ve Lineweaver - Burk eğrisi	27
Şekil 1.21 Kumarinin genel yapısı	28

<b>Şekil 2.1</b> Tez Çalışmasında İzlenen Yöntemlerin şematize hali	29
<b>Şekil 2.2</b> Amplex® Red Monoamine Oxidase Assay Kitinin çalışma prensibi	37
<b>Şekil 2.3</b> Amplex® Red reaktifi için Floresans Eksitasyon- Floresans Emisyon Grafiği	38
<b>Şekil 3.1</b> Zamana bağlı olarak hMAO-A ve hMAO-B enzimleri için floresans değişimi	43
<b>Şekil 3.2</b> Kumarin türevlerinin inhibitör konsantrasyonu-% inhibisyon grafikleri	44
<b>Şekil 3.3</b> hMAO-A ve hMAO-B enzimlerine ait Michealis Menten grafikleri	52
<b>Şekil 3.4</b> 21 numaralı kumarin türevinin MAO-B'yi inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği	53
<b>Şekil 3.5</b> 21 numaralı kumarin türevine ait inkübasyon süresi – hMAO-B % inhibisyon grafiği	54
<b>Şekil 4.1</b> 3-aril kumarin bileşiklerinde ortak gözlenen yapılar	59

## TABLO LİSTESİ

	SAYFA NO
<b>Tablo 1</b> Çalışmada kullanılan Kumarin türevleri ve molekül ağırlıkları	31
<b>Tablo 2</b> Çalışmada kullanılan 21 adet kumarin türevinin, selejilin, rasajlin ve İproniazid'in molekül yapıları	32
<b>Tablo 3</b> Kumarin türevlerinin yapıları, IC50 değerleri ve seçicilik indeksleri	51
<b>Tablo 4</b> Çalışmamızda kullanılan kumarin bileşiklerine ait Lipinski tablosu	55



# 1. GİRİŞ

## 1.1. Giriş ve Amaç

Monoamin oksidaz (EC-1.4.3.4, MAO) flavin adenin dinükleotit (FAD) içeren ve mitokondri zarının dışında bulunan bir enzimdir ve biyolojik aminlerin oksidatif deaminasyonunu katalizler. MAO aktivitesinin aşırı artışı oksidatif stres ile ilişkilendirilen, doku ve nöronların dejenerasyonuna sebep olan hidrojen peroksit, amonyak gibi toksik metabolitlerin aşırı derecede oluşmasına da yol açar (Abdelhafez ve ark.,2013). MAO, serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT), norepinefrin (NE) ve dopamin (DA) gibi nörotransmitterlerin oksidasyonunda ve hücre içi konsantrasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynar. MAO enziminin nörotransmitterlerin metabolizmasında yer alması, MAO enzimini nörolojik bozuklukların tedavisinde farmakolojik müdahale için önemli bir hedef haline getirmiştir (van den Berg ve ark., 2007).

MAO enziminin, MAO-A ve MAO-B olmak üzere iki fonksiyonel izoenzimi bulunmaktadır. (Chaurasiya ve ark., 2012). MAO'nun fonksiyonel izoenzimleri olan MAO-A ve MAO-B aminoasit dizilimleri, dokulardaki dağılımları, immünolojik özellikleri, substrat tercihleri ve inhibitör seçiciliklerindeki farklılıklar ile birbirinden ayrılırlar (Abdelhafez ve ark., 2013).

MAO-A ve MAO-B'nin inhibisyonu bu aminlerin yıkımını engelleyerek antidepresan ve antiParkinson etki sağlar. MAO inhibitörlerinin tedavide kullanılabilmesi için MAO-A veya MAO-B izoenzimlerini seçimli olarak inhibe etmeleri gereklidir. Yaşa bağlı olarak gözlenen Alzheimer Hastalığı (AH) ve Parkinson Hastalığı (PH) gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için seçimli MAO-B inhibitörleri çok büyük bir potansiyele sahiptir (Chaurasiya ve ark., 2012).

Bu izozimlerden MAO-A seçici olarak serotonin, epinefrin ve norepinefrini oksitler ve selektif olarak klorgilin tarafından inhibe edilmektedir. MAO-B ise; seçici olarak benzilamin ve  $\beta$ -fenetilamini metabolize eder ve selektif olarak selejilin ve rasajilin tarafından inhibe edilir (Matos ve ark., 2012; Abdelhafez ve ark., 2013). Dopamin ve

tiramin ise her iki izoenzim için ortak substrattır. Fakat insan beyindeki dopamin tercihen MAO-B tarafından oksitlenir (Matos ve ark., 2012; Naoi ve ark., 2016).

Depresyon durumunda beyindeki noradrenalin ve serotonin, Parkinson hastalığında ise dopamin miktarı önemli ölçüde azalır (Lu ve ark., 2002). Son çalışmalarda agresif davranış örneklerinde MAO seviyesinde azalma tespit edilmiştir (De Colibus ve diğ., 2005; Nandigama ve diğ., 2001). MAO-A izoenziminin seçimli inhibisyonu depresyon tedavisinde önemli bir hedeftir. MAO inhibitörlerinin, dopaminerjik, serotonerjik ve noradrenerjik sinir uçlarındaki MAO enzimini inhibe ederek bu nörotransmitterlerin yıkımını azaltıkları ve böylelikle intranöronal düzeylerini artırarak depresyona yol açan nörotransmitter eksikliğinin önüne geçtikleri ileri sürülmüştür (Chaurasiya ve ark. 2012).

MAO-B inhibitörleri PH tedavisinde oldukça etkin olarak kullanım alanı bulurken, bazı klinik öncesi deneyler AH'nda MAO-B aktivitesinin bloklanması kavrayış becerilerini önemli ölçüde arttırdığını göstermektedir (Stahl ve ark. 2008). Bu nedenle günümüzde seçimli MAO-B inhibitörlerine verilen önem gittikçe artmaktadır (Shi ve ark., 2000). Alzheimer ve Parkinson Hastalığı'nın patogeneğinde rol oynayan dopamin, MAO-B enzimi tarafından metabolize edilen bir nörotransmitterdir. MAO-B'nin inhibe edilmesi ile AH'nın tedavisinde kullanılacak yaklaşımlardan biridir (Caı, 2014).

MAO inhibitörleri geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olmak üzere iki grupta incelenebilir. Geri dönüşümsüz inhibitörlere; hidrazin, siklopropilamin, proparjilamin ve allilamin türevleri örnek olarak verilebilir. Geri dönüşümlü olanlara ise; piperidilbenzofuranlar, morfolinobenzamitler ve oksazolidizonlar örnek olarak verilebilir (Cesura ve Pletscher, 1992).

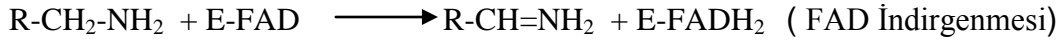
MAO inhibitörleri tüberküloz tedavisinde kullanılan hidrazin yapılı ve yapısal olarak izoniazide çok benzeyen iproniazidin antidepresan etkisi olduğu anlaşılması ile tesadüf sonucu keşfedilmiştir. Hidrazin temelli MAO inhibitörleri içeren ilaçlar 1950'lerin sonlarına doğru antidepresan olarak tedavi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Ancak takip eden yıllarda yapılan pek çok çalışmayla hidrazin temelli MAO inhibitörlerinin karaciğer toksisitesine yol açtığı bulunmuştur. Bunun yanı sıra tedavi amacıyla kullanılan seçimli olmayan, geri dönüşümsüz MAO inhibitörlerinin, tıpkı fazla miktarda eskitilmiş peynir tüketiminin neden olduğu tiramin zehirlenmesinde (peynir etkisi)

görülen ve ölümcül olabilen ani tansiyon yüksekliği ve beyin kanamasına sebep olduğu gözlenmiştir. Bu nedenlerden dolayı bu grup ilaçların klinik olarak kullanımları da kısıtlanmıştır (Coutts, R. T., Baker ve G. B., Danielson, 2000) ve yapılan araştırmalar farklı kimyasal yapılara sahip, seçimli ve geri dönüşümlü inhibitörlerin bulunması üzerine yoğunlaşmıştır (Chaurasiya ve ark., 2012).

MAO aktivitesinin aşırı artışının olumsuz etkilerinden birisi de hücredeki redoks dengesinin bozulmasıdır. Serbest radikaller, eşleşmemiş bir elektron içeren, yüksek seviyede reaktif atom ya da moleküllerdir. İnsan vücudunda doğal metabolik olaylar ile serbest radikaller oluşmaktadır (Sohol, RS., 1993). Vücutta süregelen bu işleyiş serbest radikaller lehine bozulduğu zaman birçok patolojik durum ortaya çıkmaktadır ve bu patolojik olaylar oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (Yen ve Wu 1999). Oksidatif stresin, enzim inaktivasyonu, lipid peroksidasyonu, kanser, immün sistem bozukluğu, DNA hasarı ve nörodejeneratif rahatsızlıklar gibi birçok rahatsızlıkta etkisi olduğu saptanmıştır (Halliwell, B., 1997). Serbest radikal yaratan kaynaklara radyasyon, virüs, ultraviyole ışınlar, hava kirliliği, sigara, stres, çeşitli zararlı kimyasallar ve pek çok farklı etken örnek olarak gösterilebilir. Antioksidanlar ise serbest radikalleri etkisiz hale getirerek vücudun etkilenmemesini ve redoks dengesinin yeniden kurulmasını sağlayan maddelerdir (Bolzan, D.A ve Bianchi, 1997).

Endoplazmik retikulum, mitokondri ve çekirdek membranında yer alan serbest radikaller ile oluşan oksidatif stres, Parkinson hastalığında nörodejenerasyon oluşumu ve ilerleme sürecinde önemli görev almaktadır. Reaktif oksijen türleri olarak tanımlanan hidrojenperoksit, süperoksit ve hidroksil radikaller mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon ile moleküler oksijenin suya indirgenmesi sırasında oluşur. Ayrıca, *in vitro* veriler, glutamat stimülasyonu ile ilişkili nöronların oksijen radikalleri oluşumu ile etkileştiklerini göstermiştir. Bu radikaller, tekrar hem glutamat salınımına hem de geri alımın inhibisyonuna yol açarlar ve böylece bir kısır döngü gerçekleşir (Herdegen T. 1997). Bunlara ek olarak dopaminerjik nöronlarda MAO aracılığı ile dopaminin oksidatif deaminasyonu ve otooksidasyonu ile hidrojen peroksit ve diğer oksijen radikalleri oluşur. Güçlü antioksidanlar ve MAO inhibitörleri meydana gelen dopa toksisitesini ve serbest radikal üretimini inhibe ederler (Voigtlander von ve ark., 1998, Oertel W.H ve ark., 1999).

MAO-A ve MAO-B için oksitleme mekanizmasının genel olarak aşağıdaki basamaklardan oluştuğu düşünülmektedir. Reaksiyonu ilk olarak substrattan iki elektron ve bir protonun flavine aktarılması ile başlar ve flavinin indirgenmesini sağlar. Oluşan iminyum katyonu su ile hidroliz olur. İndirgenmiş FAD ise oksijen ile tekrar aktif hale döner.



Bu elektronların ve protonun aktarılması konusunda literatürde birçok mekanizma önerilmiş olmasına rağmen gerçek mekanizmanın hangisi olduğu hala yoğun tartışma konusudur (Akyüz ve Erdem, 2013; Erdem ve ark., 2012a ve Erdem ve ark., 2012b). (Cakir ve ark. 2016)

Geri dönüşümsüz MAO inhibitörlerinin çeşitli yan etkilere sahip olması araştırmacıları yeni, seçici ve geri dönüşümlü MAO inhibitörleri geliştirmeye yöneltmiştir. Geri dönüşümlü MAO inhibitörleri, enzime genellikle kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanır. Böylece oluşan enzim-inhibitör kompleksinin ayrılması daha hızlı gerçekleşir ve enzim inhibitörün özelliklerine bağlı olarak aktivitesini zamanla yeniden kazanır. Günümüzde seçici ve geri dönüşümlü olarak MAO-A'yı inhibe ettiği bilinen bileşikler moklobemid, simoksaton, brofaromin ve befloksaton; seçici ve geri dönüşümlü olarak MAO-B'yi inhibe ettiği bilinen bileşikler ise safinamid ve lazabemid'dir (Cesura ve Pletscher, 1992; Bolasco ve ark, 2010; Finberg, 2014).

Kumarinler bilindiği gibi pek çok farklı farmakolojik özellikler gösteren, benzopironlar olarak adlandırılan bir sınıfa ait genellikle antioksidan aktivite gösteren bileşiklerdir (Hoult ve Payá, 1996). Yapıları üzerinde gerçekleşebilen çeşitli süstitüsyonlar ile değişik yapılu türevleri oluşabilir ve bu türevler çok farklı biyolojik aktiviteye sahip olabilir. Bazı doğal ve sentetik kumarin türevlerinin monoamin oksidaz enzimini inhibe ettiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Matos et al ve Chimenti et al., 2009). Kumarin ana yapısının 3 veya 4 pozisyonlarındaki süstitüsyonların MAO-B inhibitör etkisini ve MAO-A/B seçiciliğini düzenlediği saptanmıştır. (Chimenti ve ark.,2009)

Kumarin türevlerinin nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde potansiyel bir ilaç olarak kullanımlarına ilişkin çalışmalar ve araştırmalar giderek önem kazanmaktadır (Peng ve ark., 2013). Bu konuda MAO enzimi ile yapılan çalışmalar da kumarin ve türevlerinin AH'nın tedavisinde kullanılabilir etkililiği olduğunu göstermektedir. (Matos ve ark., 2012; Patil ve ark., 2013).

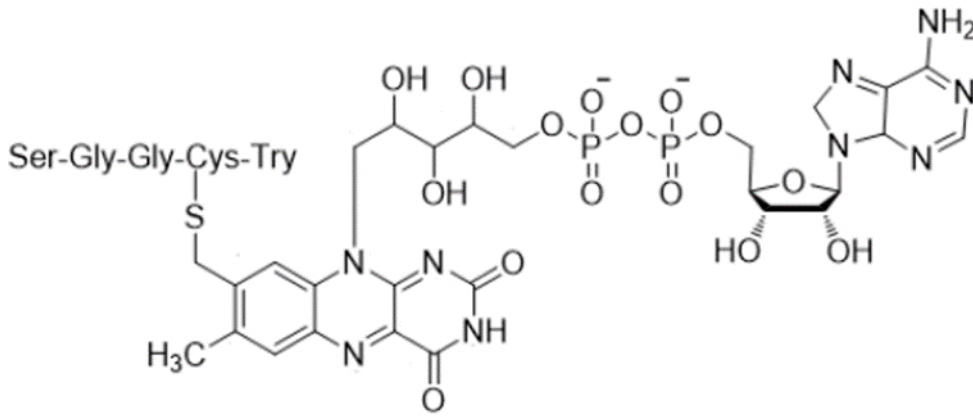
Kumarin halkasında gerçekleştirilen substitüsyonların MAO enzim inhibisyon aktivitesini ve izoenzim seçiciliğini önemli ölçüde arttırdığı bilinmektedir. Carotti ve ekibi önemli bir MAO inhibitör grubu olan 7-benziloksi kumarin türevlerinde para- ve substitüsyon olmayan yapıların orto- ve meta- substitüe türevlere göre çok daha yüksek bir aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir (Carotti ve ark., (2002).

Delogu ve grubu 3-heteroaril kumarin türevleri ile yaptıkları çalışmada bu bileşiklerin MAO-B'yi önemli ölçüde inhibe ettiklerini ve 3- pozisyonundaki aril grubunun yapısının bu aktiviteyi önemli ölçüde etkilediklerini bulmuştur (Delogu ve ark., 2011). Benzer şekilde Matos ve ekibi de 3-aril kumarin türevleri ile yaptıkları çalışmalarda farklı substitüsyonların bu kumarin türevlerinin inhibisyon özellikleri üzerine etkisini incelemiş ve yan grupların lipofilik özelliklerinin inhibisyon etkisine olumlu katkıda bulunduğunu gözlemlemiştir (Matos ve ark., 2012). Huang ve arkadaşları 7-aril kumarin türevleri ile yaptıkları çalışmada kumarin halkasında 7- pozisyonunda bulunan azot karbon çifte bağının kumarin türevlerinin MAO-B seçimli inhibisyon aktivitesini önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir (Ming ve ark., 2015).

Çalışmamızın amacı, PH, AH ve depresyon gibi nörodejeneratifve psikiyatrik rahatsızlıkların tedavisinde seçimli MAO-A veya MAO-B inhibitörü olarak kullanılabilir ve aynı zamanda MAO enziminin neden olduğu oksidatif stresi azaltabilecek yeni etken maddelerin bulunmasıdır. Bu amaçla, Biyokimya ve Organik Kimya Anabilim Daları tarafından sentezlenen ve antioksidan özellik gösterdiği belirlenmiş olan 21 adet 3-arilkumarin türevi bileşiklerin MAO-A ve MAO-B izoenzimleri üzerindeki inhibe edici özellikleri ilk kez *in vitro* olarak Amplex Red MAO Tayin Kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak incelenmiş ve yüksek etki gösteren bileşiklerin inhibisyon parametreleri ve mekanizmaları tayin edilmiştir.

## 1.2 Monoamin Oksidaz Enzimi

MAO, dış mitokondriyal membrana bağlı ve FAD taşıyan bir enzimdir. MAO enziminin MAO-A ve MAO-B olarak isimlendirilen iki formunun olduğu ve bunların aminoasit sıralamasının %70 benzerlik gösterdiği bulunmuştur. MAO-A 527, MAO-B ise 520 aminoasit kalıntısı içerir. Yapılan araştırmalarda MAO-A ve MAO-B izoenzimleri arasında yüksek oranda amino asit benzerliği saptanmıştır. İki izoenzimde de aktif bölge, prostetik grup olarak FAD'ın bağlı olduğu kısımdır (Lee ve ark., 2006). FAD'nin yapısı Şekil 1.1'de görülmektedir.



**Şekil 1.1** İnsan MAO-A ve MAO-B enziminin aktif bölgesinde FAD'ın gösterimi

MAO enzimi metabolik reaksiyonu substratın  $\alpha$ -CH bağının oksidatif kırılma yoluyla imin ara ürünü açığa çıkararak amin fonksiyonel grubunun oksidasyonunu içerir. MAO reaksiyonunu içeren metabolik yol, indirgenen flavin kofaktörünün moleküler oksijen tarafından tekrar oksitlenmesi ve hidrojen peroksit çıkışı ile tamamlanır. Bu enzimatik reaksiyon nörotransmitterlerin sinaptik konsantrasyonunu düşürür. MAO enzimi ile gerçekleşen reaksiyonlarda açığa çıkan hidrojen peroksit reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açarak mitokondriyal hasara ve nöronların ölümüne neden olabilir.

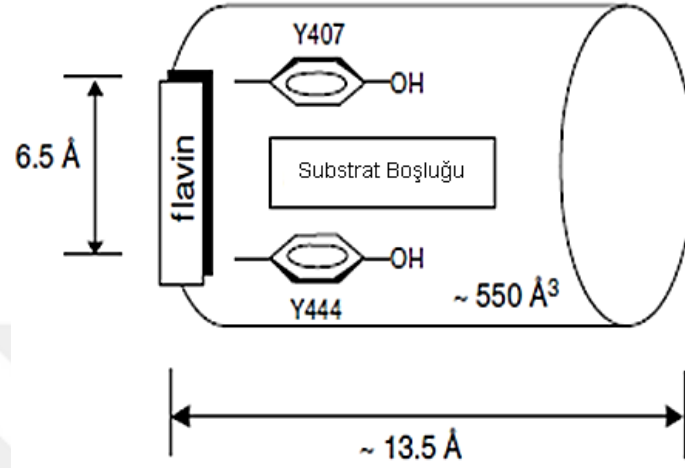
### 1.3 Monoamin Oksidaz A ve B İzoenzimlerinin İşlevleri ve Karakteristik Özellikleri

MAO-A ve MAO-B izozimleri kristal yapıları bakımından da farklılıklar gösterir. İnsan MAO-B'si ve sıçan MAO-B'si dimer olarak kristallenirken, insan MAO-A'sı monomer olarak kristallenir (Şekil 1.4). Kristal yapılarda görülen bu farklılık, sıçan MAO-A'sının 12 151 nolu pozisyonunda yer alan glutamik asitin yerine insan MAO-A'sında lizin amino asidinin bulunmasından kaynaklanır. İnsan MAO-B'si ve sıçan MAO-A'sının dimer ara yüzeyinde yer alan glutamik asitin yerine insan MAO-A'sında lizin amino asidinin bulunması insan MAO-A'sının monomer halinde kristallenmesiyle sonuçlanmıştır (Youdim ve ark., 2006).

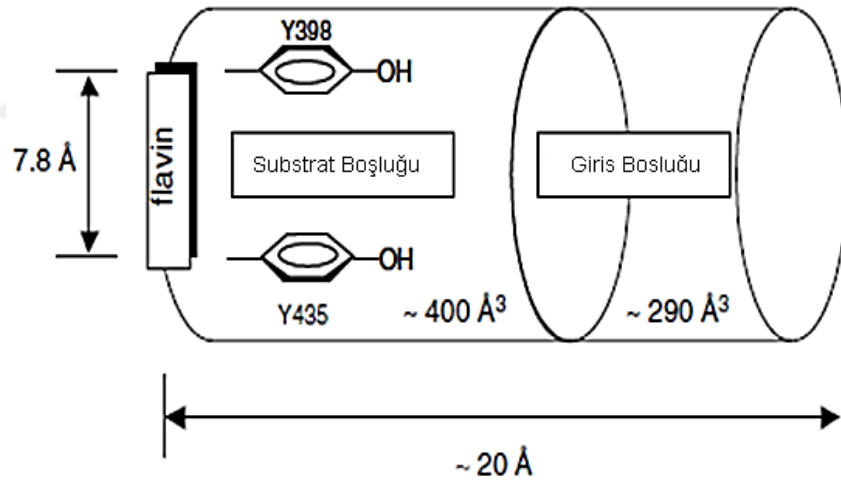
İnsan ve sıçan MAO-A'sının aktif bölge yapısı konformasyon ve hacim açısından farklılıklar gösterir. İnsan ve sıçan MAO-A'sı yaklaşık olarak % 92 oranında benzer amino asit dizilimine sahiptir (Edmonson ve ark., 2004; De Colibus ve ark., 2005). Oldukça hidrofobik tek bir substrat bağlanma bölgesi içeren MAO-A'nın aktif bölgesinin hacmi, sıçan MAO-A'sında 450 Å iken insan MAO-A'sında 550 Å'tür. 550 Å'lük hacme sahip olan insan MAO-A'sının aktif bölgesi kısa ve geniş bir substrat boşluğuna sahiptir. Yaklaşık olarak 700 Å'lük bir hacme sahip olan insan MAO B'sinin aktif bölgesi ise dar ve uzun bir substrat boşluğuna sahiptir (Youdim vd., 2006). Aktif bölge üzerinde yapılan çalışmalar substratın MAO-A'nın aktif bölgesinde MAO-B'nin aktif bölgesine kıyasla daha rahat dönebildiğini göstermiştir (Edmondson ve ark., 2007). Dolayısıyla da bu farklılığın MAO-A ve MAO-B'nin substrat ve inhibitör seçiminde etkili olduğu düşünülmektedir.

MAO, dış mitokondriyal membrana bağlı ve FAD taşıyan bir enzimdir. MAO enziminin MAO-A ve MAO-B olarak isimlendirilen iki formunun olduğu ve bunların aminoasit sıralamasının %70 benzerlik gösterdiği bulunmuştur. MAO-A 527, MAO-B ise 520 aminoasit kalıntısı içerir. Yapılan araştırmalarda MAO-A ve MAO-B izoenzimleri arasında yüksek oranda amino asit benzerliği saptanmıştır. İnsan MAO-A ve MAO-B'sinin aktif bölgesinde 20 adet amino asit bulunmaktadır. MAO-A'nın aktif bölgesinde yer alan amino asitler Tyr-69, Gln-74, Val-91, Val-93, Leu-97, Ile-180, Asn-181, Ile-207, Phe-208, Ser-209, Val-210, Glu-216, Cys-323, Ile-325, Ile-335, Leu-337, Met-350, Phe-352, Tyr-407, Tyr-444'tür. MAO-B'nin aktif bölgesinde yer alan amino asitler ise

Tyr-60, Gln-65, Val-82, Glu-84, Leu-88, Leu-171, Cys-172, Ile-198, Ile-199, Ser-200, Thr-201, Glu-207, Thr-314, Ile-316, Tyr-326, Leu-328, Met-341, Phe-343, Tyr-398 ve Tyr-435'tir. Her iki izoenzimde aktif bölgeyi oluşturan bu amino asitlerden sadece 7 tanesi farklılık göstermektedir (Edmonson ve ark., 2004).



Şekil 1.2 MAO-A enziminin aktif bölge boşluklarındaki farklılıklar (Türkkan, 2013)



Şekil 1.3 MAO-B enziminin aktif bölge boşluklarındaki farklılıklar (Türkkan, 2013)

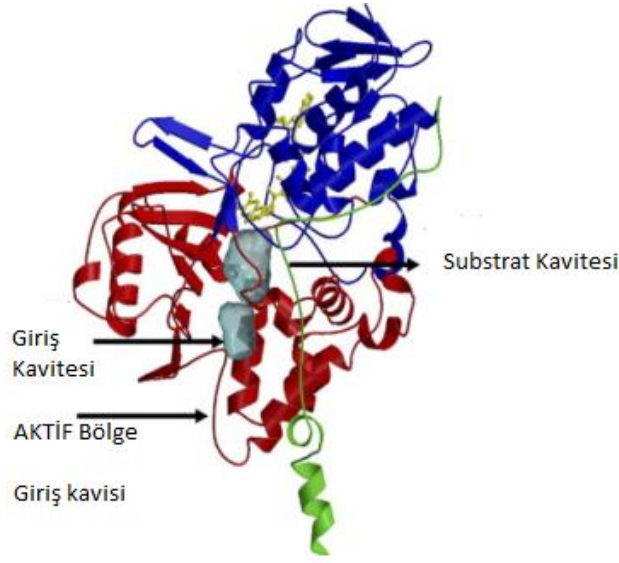
İnsan MAO-A'sının hidrofobik aktif bölgesi tek bir boşluktan oluşurken; insan MAO-B'sinin aktif bölgesi birbirine komşu yaklaşık 300 Å'luk bir giriş boşluğu ile yaklaşık 400 Å'luk substrat boşluğu olmak üzere iki ayrı boşluktan oluşmaktadır. Flavin koenziminin önünde yer alan substrat boşluğu (substrat bağlama bölgesi) MAO-A'da olduğu gibi giriş boşluğuna zıt yöndedir. Düz bir yapıya sahip olan substrat boşluğu bu bölgede yer alan Lizin 171 (Lys-171), Tirozin 188 (Tyr-188), Tirozin 326 (Tyr-326) ve Fenilalanin 343 (Phe-343) gibi aromatik ve alifatik amino asitlerden dolayı hidrofobik özelliktedir. Giriş

boşluğu da bu bölge de yer alan amino asitler nedeniyle hidrofobik özellik gösterir (Şekil 1.4). Substrat boşluğu ile giriş boşluğu arasında İsolösin 199 amino asidi (Ile-199) yer alır. Ile-199 bu iki boşluk arasında kapı görevi görür ve gelen substrat ya da inhibitöre göre bu kapı açılır ve kapanır. İnsan MAO-A'sında Ile-199'a karşılık gelen amino asit Phe-208 olup söz konusu amino asidin böyle bir işlevi yoktur. Bu nedenle kapı görevi gören Ile-199, MAO-B'nin inhibitör seçiciliğinde önemli bir yere sahiptir (Hubalek ve ark., 2005). MAO-A ve MAO-B izozimleri arasında görülen bir diğer önemli farklılık da MAO-B'nin aktif bölgesinde yer alan Tyr-326 amino asididir. MAO-B'deki aktif bölgenin ikiye ayrılmasından dolayı olarak sorumlu olan Tyr-326 amino asidi, MAO-A'da aynı pozisyona karşılık gelen Ile-335 amino asidine göre yapısı nedeniyle daha sınırlayıcı bir etki gösterir. Dolayısıyla da bütün bu faktörler göz önüne alındığında MAO-A da yer alan Phe-208/Ile-335 amino asit çifti ile MAO-B de yer alan Ile-199/Tyr-326 amino asit çiftinin bu iki izoenzimin inhibitör ve substrat seçimleri arasındaki farklılıkta temel belirleyici neden olduğu görülmektedir (Binda ve ark., 2003; Edmonson ve ark., 2009).

#### **1.4 Aromatik Kafes Yapısı**

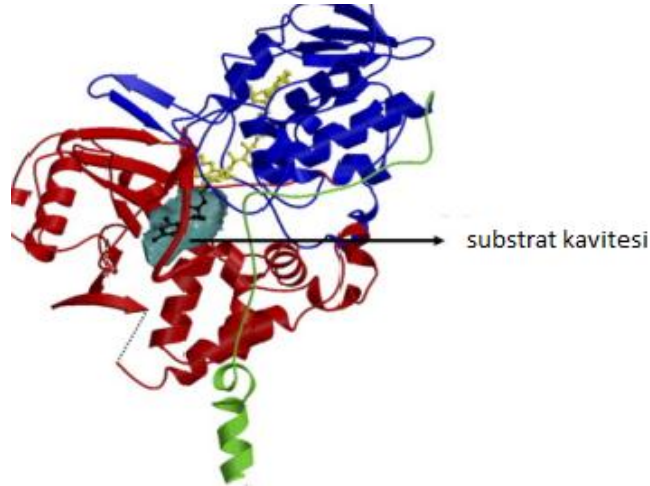
Binda ve arkadaşları insan MAO-B enziminin yapısını 2002 yılında aydınlatmışlardır (Binda ve ark., 2002). İnsan MAO enziminin kristal yapısının aydınlatılmış olması proteinler ve ligandlar arasındaki seçici etkileşmeyi açıklayabilmek açısından önemlidir. İnsan MAO-B enzimi dimer olarak kristallenmektedir. Dimerik formun tek bir monomerinin yapısı Şekil 1.5'de gösterilmektedir.

MAO-A enzimi insanda monomerik olarak kristallenirken, sıçanda ise hMAO-B enzimine benzer şekilde dimerik olarak kristallenmektedir. Her iki MAO-A enziminde de girişte bulunan protein boşluğuna ilave olarak oldukça hidrofobik olan tek bir substrat bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Substrat bağlanma kavitesi MAO-B'de olduğu gibi giriş boşluğuna zıt yöndedir (De Colibus ve ark., 2005).



**Şekil 1.4** İnsan MAO-A enziminin şematik olarak gösterimi (De Colibus ve ark., 2005)

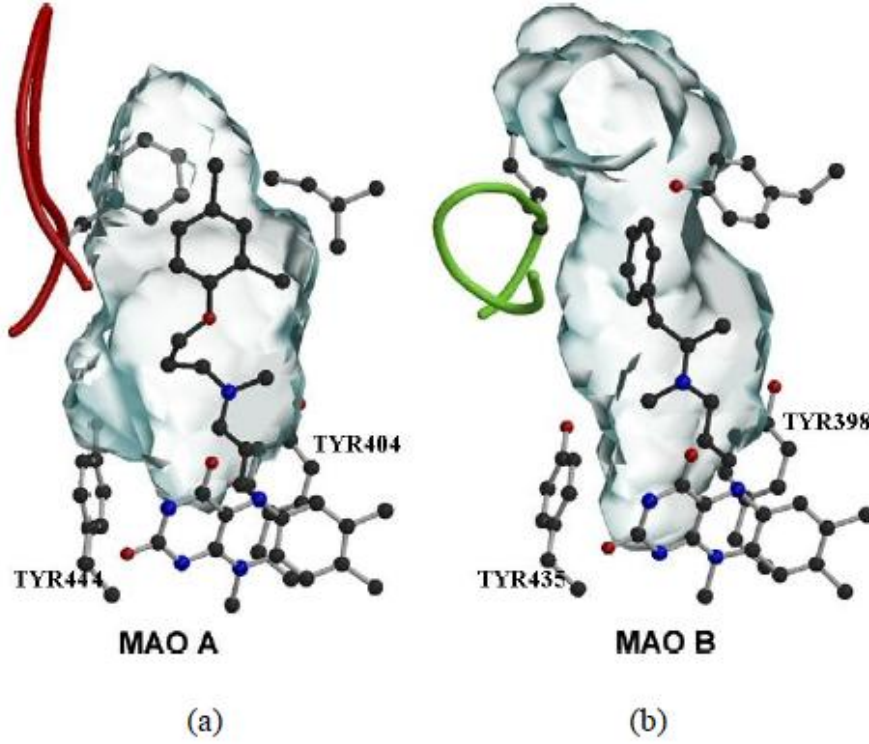
MAO-B enzimlerinin yapısındaki en önemli özellik birbirine komşu iki kavitenin var olmasıdır. En büyük kavite, flavin kofaktörünün önünde yer alan substrat bağlanma bölgesidir. İzolösün bu iki kavite arasında kapı görevi üstlenir ve MAO-B enziminin inhibitör seçiciliğinde önemlidir. Substrat kavitesinin sonunda sisteine kovalent bağlı FAD koenzimi bulunmaktadır. Flavine yakın, birbirine paralel tirozin 398 ve tirozin 435 amino asitlerini içeren kavitesi ise aromatik kısım olarak isimlendirilir ve substratın amin grubunun yönelmesinde önemlidir. (Holt ve ark., 1997).



**Şekil 1.5** İnsan MAO-B enziminin şematik olarak gösterimi (De Colibus ve ark., 2005)

Şekilde flavin bağlanma bölgesi mavi, substrat bağlanma bölgesi kırmızı, C-terminal membran bağlanma bölgesi yeşil, flavin ise sarı renk ile belirtilmiştir.

Şekilde; Flavin kısmı sarı, flavin bağlanma bölgesi mavi, substrat kısmı kırmızı, membran bağlanma bölgesi ise yeşil renkte gösterilmiştir.



Şekil 1.6. MAO-A ve MAO-B izozimlerinin aktif bölge boşlukları ve aromatik kafes (Edmondson ve ark., 2007)

MAO-A yuvarlak şekillidir ve substrat kavitesi, MAO-B'nin substrat kavitesine göre daha büyük hacimlidir ve substratların MAO-B'de rotasyon için daha az serbestliğe sahip olduğu bulunmuştur (De Colibus ve ark., 2005).

MAO' nun aktif bölgesinde yer alan ve enzime kovalent bağla bağlı olan FAD (Flavin Adenin Dinükleotid) oksidasyon reaksiyonunun gerçekleşmesini sağlayan koenzimdir (Şekil 1.7). Her iki izoenzimde FAD, 8- $\alpha$  pozisyonundan enzimin yan gruplarına bağlıdır. Bu yan gruplar MAO-A enziminde Cys-406, MAO-B enziminde ise Cys-397' dir (Edmonson ve ark., 2004).

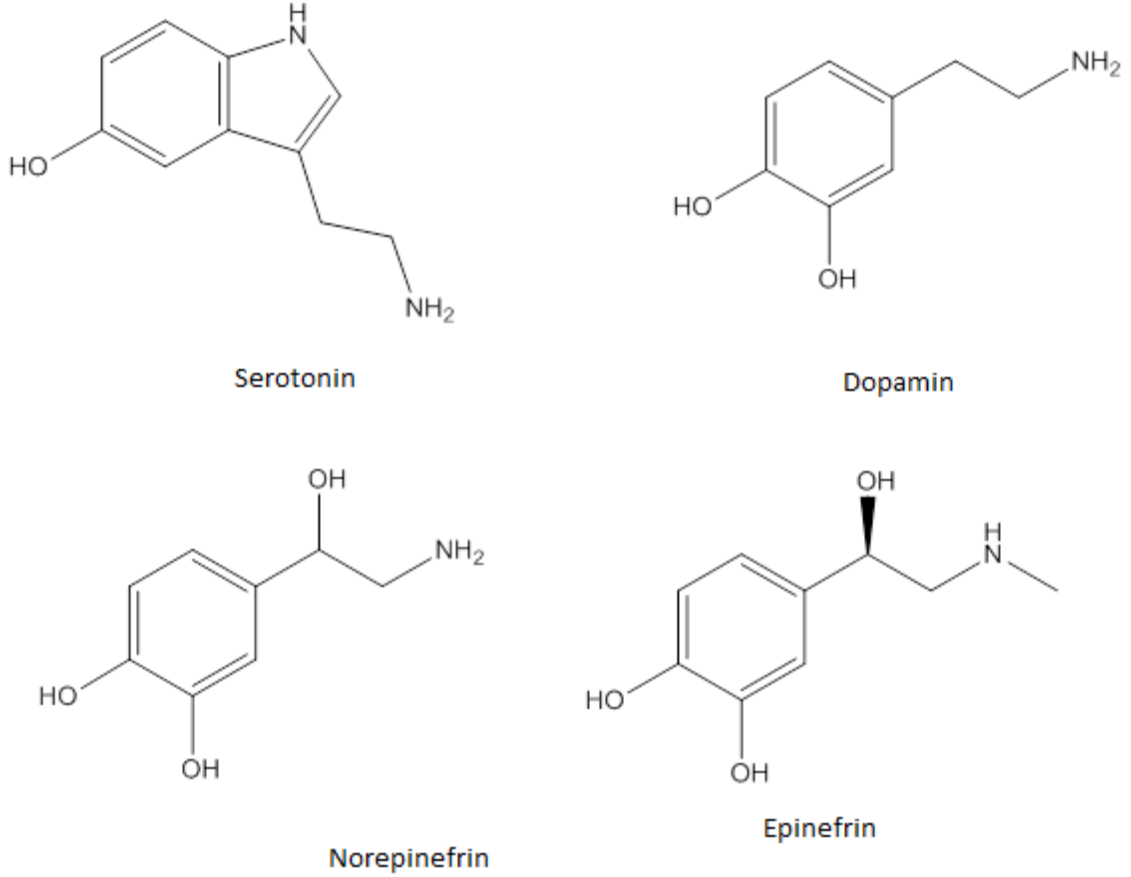
Her iki enzimde de substratın flavine yaklaştığı ön bölgede birbirine yaklaşık olarak paralel ve flavininin re yüzüne yaklaşık olarak dik pozisyonda bulunan iki tirozin halkası bulunmaktadır. Aralarında yaklaşık olarak 7.8Å mesafe bulunan iki tirozin

amino asidi tarafından oluşturulan bu yapı aromatik kafes olarak adlandırılır (Şekil 1.6). MAO-A da aromatik kafesi oluşturan amino asitler Tyr-407/Tyr-444, MAO-B de aromatik kafesi oluşturan amino asitler Tyr-398/Tyr435'dir (Youdim ve ark., 2006).

Aromatik kafes, MAO tarafından gerçekleştirilen oksidasyon reaksiyonlarında önemli bir rol oynar. Çünkü substrat ve inhibitörler flavin halkasına ulaşabilmek için bu iki fenolik tirozin halkasının arasından geçmek zorundadır (Edmonson ve ark., 2004). Aromatik kafes fonksiyonu belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda aromatik kafesin amin substratını polarize hale getirerek polar nükleofilik mekanizma için daha etkili bir nükleofile dönüştürdüğü ileri sürülmektedir. Ayrıca aromatik kafesin amin substratının, flavin halkasında reaksiyona gireceği pozisyona kadar reaksiyon yolunun belirlenmesinde de rol oynadığı literatürdeki çalışma sonuçları arasındadır (Edmonson ve ark., 2007; Erdem ve ark., 2001, 2006, 2011; Akyüz ve ark., 2007).

### **1.5 MAO Substratları ve Kataliz Tepkimesi**

MAO enzimi için yapılan çeşitli histokimyasal, immünokimyasal ve otoradyografik incelemelerde MAO-A ve MAO-B enziminin merkezi sinir sisteminin ve çevresindeki organların farklı hücrelerinde bulunduğu gözlenmiştir. MAO-A izoenzimi plasenta ve bağırsakta daha baskın iken, plateletlerde, lenfositlerde ve kromofin hücrelerinde MAO-B izoenziminin daha baskın olduğu bulunmuştur. MAO-A ve MAO-B enzimleri nöroaktif ve vazoaktif aminlerin oksidatif deaminasyonunu ve ksenobiyotiklerin deoksidasyonunu katalizler. Bunlar için asıl substratlar ise; klasik nörotransmitterler olan serotonin, dopamin, norepinefrin ve epinefrindir. Bu nörotransmitterlerin organik yapıları Şekil 1.7'de gösterilmiştir.



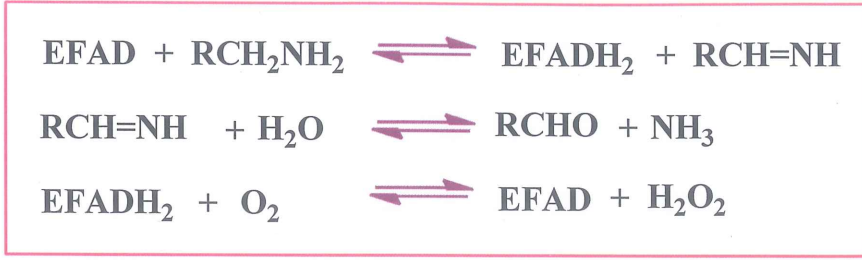
**Şekil 1.7** Serotonin, dopamin, norepinefrin ve epinefrin yapıları

Her iki MAO izoenziminin kofaktör kısmının benzerlik göstermesi nedeniyle pek çok substrat her iki MAO izoenzimi tarafından da metabolize edilebilir. Dolayısıyla substrat seçiciliğinden sorumlu olan yapısal farklılıkların proteinin diğer bölgelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Richards ve ark. 1992). MAO-A enziminin seçimli substratları serotonin ve norepinefrin, MAO-B enziminin seçimli substratları ise feniletülamın ve benzilamindir. Dopamin, tiramin ve triptamin her iki enzimin de eş değer substratları olarak görev görmektedir (Richards ve ark. 1992).

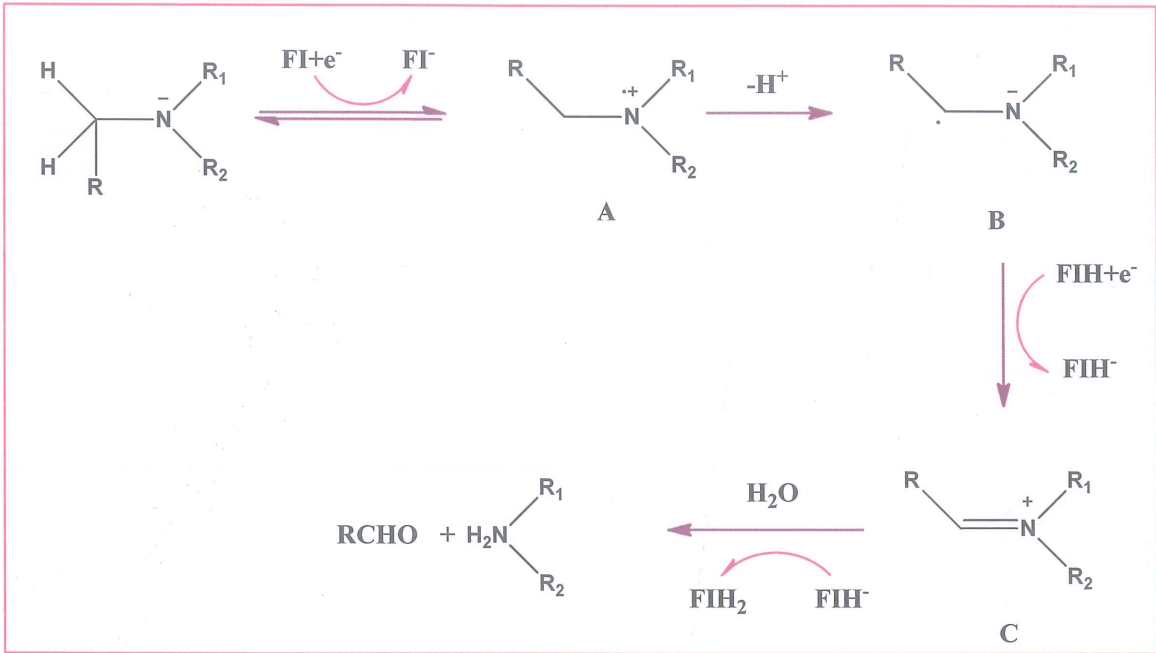
MAO, nörotransmitterlerin ve diğer monoaminlerin deaminasyonlarını aşağıda verilen genel reaksiyona göre katalizler.

**Şekil 1.8** Monoaminlerin deaminasyon reaksiyonu

MAO tarafından katalizlenen bu reaksiyon Şekil 1.9'da görüldüğü üzere üç basamaklıdır ve kimyasal mekanizması Şekil 1.10'da açıklanmıştır.



Şekil 1.9 MAO tarafından katalizlenen reaksiyonun basamakları



Şekil 1.10 MAO enziminin substrat oksidasyonu için ileri sürülen ilk kimyasal mekanizmasının gösterimi (Silverman ve ark. 1982).

Silverman ve arkadaşlarının ileri sürdüğü bu mekanizmada ilk olarak substratın amino grubundan, enzimin flavin grubuna bir elektron transferi ile amin radikal katyonu oluşur (A). Bu radikal bir protonunu kaybederek karbon radikalini oluşturur (B). Daha sonra ikinci elektron transferi ya da aktif bölge radikali ile birleşerek eliminasyon ile iminyum ürünü oluşur (C). Bu ürün kendiliğinden amonyak veya primer amin çıkışıyla, aldehide hidroliz olur. Bunu FAD'ın moleküler oksijen tarafından yeniden oksidasyonu izlemektedir (Silverman ve ark., 1991).

Yu ve arkadaşları benzilamin veya dopamini substrat olarak kullanarak yaptıkları çalışmalarda MAO-A ve MAO-B enzimlerinin aynı stereospesifiteyi gösterdiğini öne sürmüşlerdir (Yu ve ark., 1988).

### **1.6 MAO'nun aminleri oksitlemesi konusunda önerilen mekanizmalar**

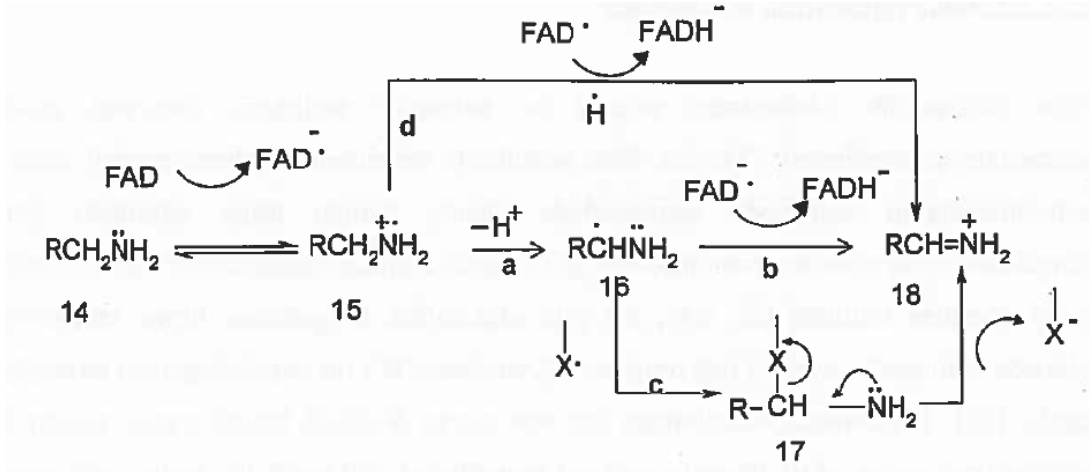
MAO'nun aminleri oksitlemesi konusunda pek çok mekanizma önerilmiştir. Bu mekanizmalardan en çok kabul gören mekanizmalar aşağıdaki gibidir;

- 1- Tek elektron transferi mekanizması (SET mekanizması)
- 2- Polar nükleofilik (katılma ayrılma) mekanizmaları
- 3- Hidrür transferi mekanizması

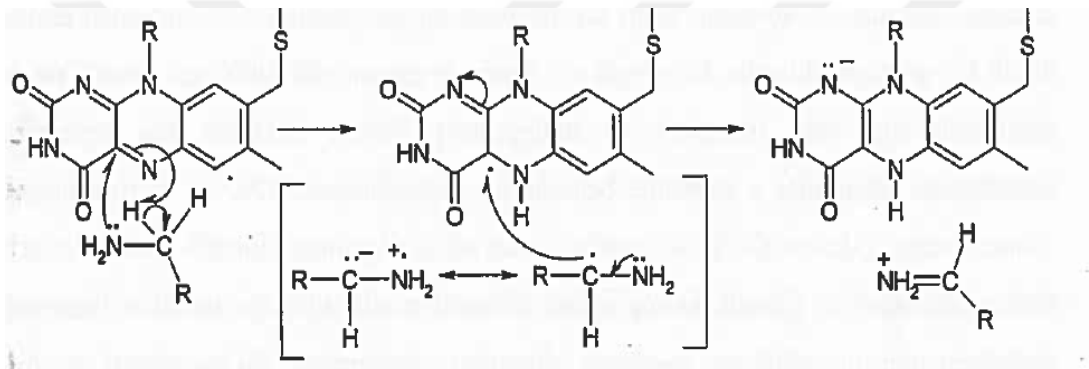
Enzim reaksiyonunun hangi mekanizma üzerinden gerçekleştiğini anlayabilmek adına yapılan çalışmalar sonucu destekleyici deliller bulunmasına karşı bu mekanizmalara karşı delillere de ulaşılmıştır. Önerilen bu mekanizmalar için günümüzde hala yeni hesapsal ve deneysel çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir (Akyüz ve Erdem, 2013), (Cakir ve ark.,2016)

#### **1.6.1 Tek elektron transferi mekanizması**

Silverman'ın desteklediği mekanizmaya göre aminoN'dan bir elektronun flavine aktarılmasıyla başlar ve ara ürün amin radikal katyonu oluşur. Bu durumda amin  $\alpha$  H'nin pK<sub>a</sub> değeri yaklaşık olarak 10 olur. Aktif bölge bazı tarafından kolayca proton alınır. Geride kalan yapı ise kendi içinde düzenlenerek karbon radikali oluşturur. Bu yapıdan ikinci bir elektron daha aktif bölge radikal uçlarından birine veya flavine aktarılması ile reaksiyon tamamlanır. Yapılan incelemelerde aktif bölgede baz tespit edilemediğinden dolayı mekanizma modifiye edilmiştir. Yeni mekanizmaya göre proton flavine aktarılır. Bu mekanizma tek elektron transferi ile başladığı için adı, tek elektron transfer mekanizması (SET) olarak belirtilmiştir (Silverman ve ark., 1992).



Şekil 1.11 Tek elektron transferi mekanizmasının gösterimi (Silverman ve ark., 1992).

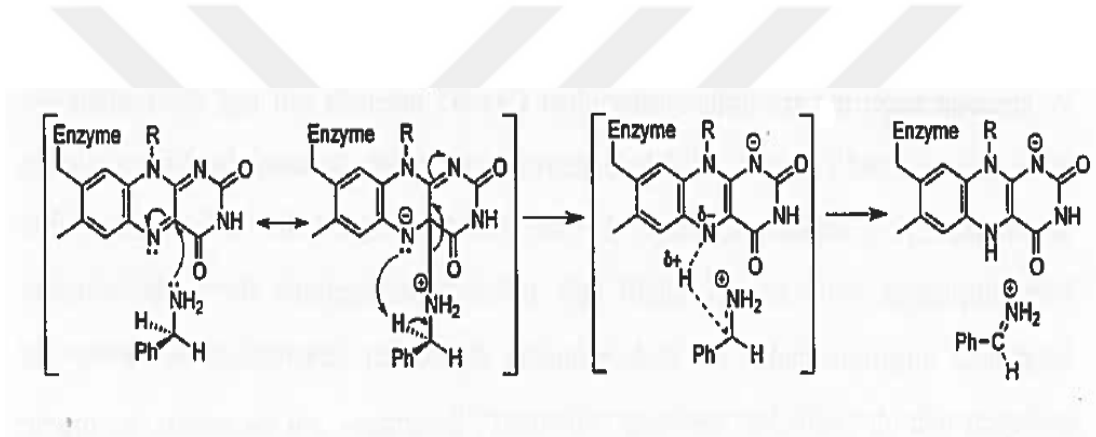


Şekil 1.12 Tek basamaklı radikal mekanizma (Lu ve ark. 2002).

Bu mekanizma halka açılması gibi deneysel ve model çalışmalarla MAO-B için incelenmiştir. Tek elektron transferinin gerçekleşmesinin termodinamik olarak zor olması karşıt delil olarak sunulmaktadır. Silverman'a göre gergin bağlanmalar, moleküllerin bükülmesi gibi durumlar elektron aktarımının indirgenme ve yükseltgenme potansiyelini düşürebilir. Birçok yayın yüksek enerjili reaksiyonların enzim aktif bölgesinde gerçekleşebileceğini göstermiştir (Rinne, 1978). Yapılan araştırmalara göre MAO enzimlerinde herhangi bir radikale rastlanmamıştır. Yapılan son çalışmalarla da tek basamaklı SET mekanizması için karşıt deliller olarak değerlendirilmektedir (Miller ve ark., 1999).

### 1.6.2 Polar Nükleofilik Mekanizma

Polar Nükleofilik Mekanizma; primer ve skonder aminlerin kimyasal model çalışmaları ile önerilmiştir. (Kim ve ark.,1995). Bu mekanizma önerildikten sonra MAO-B kristal yapısı X ışını ile aydınlatılmış ancak aktif bölge protonunu kapabilecek mükleofil bir aminoasit ucuna rastlanmadığı için mekanizma modifiye edilmiştir. Edmondson tarafından önerilen bu mekanizmaya göre; aminoN flavine nükleofilik saldırıda bulunur ve kovalent bağlı bir ara ürün oluşturur (Edmondson ve ark.,2007) Polar nükleofilik mekanizma için de bazı karşıt deliller öne sürülmüştür. Silverman polar mekanizmanın mikro reversibiliteye ters düştüğünü öne sürmüştür. Ayrıca sterik olarak ara ürün oluşturamayacak ikincil ve üçüncül aminlerde MAO için substrat olabilmektedir.

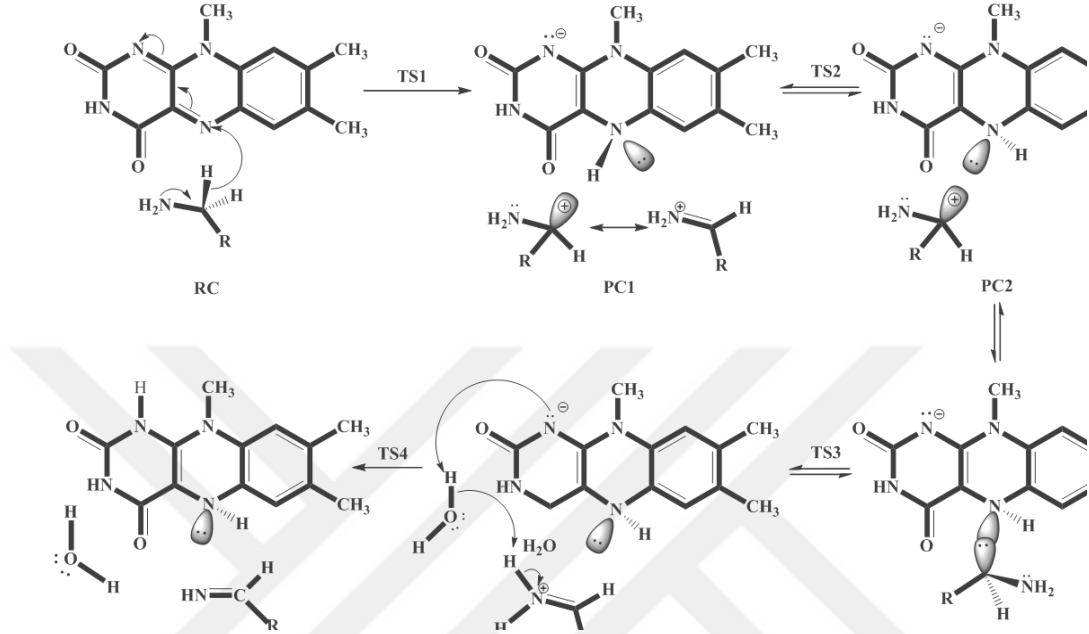


Şekil 1.13 Polar Nükleofilik mekanizma (Abad ve ark., 2013).

### 1.6.3 Hidrür Mekanizması

Hidrür Mekanizmasına göre amin α H'i hidrür olarak flavin'e aktarılır. Böylelikle tek adımda iki elektron ve bir proton flavine aktarılarak reaksiyon tamamlanır ancak genel olarak hidrür transferlerinin yüksek enerji gerektirmesi bu mekanizmanın pek olası olmadığını düşündürmüştür. Son yıllarda yapılan araştırmalarla bu flavoproteinlerden d-aminoasit oksidaz enziminin mekanizması hakkında ortak bir kanıya varılabilmektedir. Bu enzimin substratı olan d-amino asitleri direkt hidrür transferi yolu ile oksitlediği konusunda uzlaşmıştır. Bu önemli gelişme MAO mekanizması üzerine yapılan araştırmaları hareketlendirmiştir. MAO ile elde edilen mevcut sonuçlar da bu bakış açısı ile değerlendirilerek direkt hidrür mekanizmasının MAO için de geçerli olabileceğini öne sürmektedir (Fitzpatrick P.F, 2010). Çakır ve arkadaşları yaptıkları son hesapsal

modelleme çalışmalarında hidrür ve proton transferinin birlikte olabildiği hibrit bir mekanizma önermişlerdir (Cakir ve ark.,2016).



**Şekil 1.14** MAO enzimi için önerilen Hidrür transfer mekanizması (Cakir ve ark., 2016).

## 1.7 MAO-A ve MAO-B inhibitörlerinin kullanıldığı hastalıklar

### 1.7.1 Depresyon

Depresyon günümüzde oldukça sık rastlanan bir psikiyatrik hastalıktır. Tedavisi için geliştirilen yeni ilaçlara rağmen, depresyon hastanın yaşam standardını etkileyen ciddi bir sağlık sorunudur. Monoamin oksidaz inhibitörleri depresyon tedavisinde uzun süredir kullanım alanı bulmaktadır (Van Praag 1984, Kırılı 2000). Yapılan çalışmalar depresyon sendromlarının gelişmesinde serotonin başta olmak üzere nörotransmitterlerin önemli rol oynadıklarını göstermektedir (Ceylan ve Oral 2001). Serotonin bu zamana dek en fazla araştırma yapılmış ve üzerinde en fazla bilgi sahibi olunmuş nörotransmitterdir ve anksiyete, depresyon, obsesif kompulsif bozukluk ve şizofreni gibi psikiyatrik bozuklukların yanında hipertansiyon, vasküler bozukluklar, migren ve bulantı gibi bozuklukların oluşumunda da yer aldığı düşünülmektedir (Kırılı 2000).

Seçimli MAO-A inhibitörleri, depresyon tedavisinde kullanılmak üzere önem kazanmıştır (Olanow ve ark., 1993, Sandler ve ark., 1993).

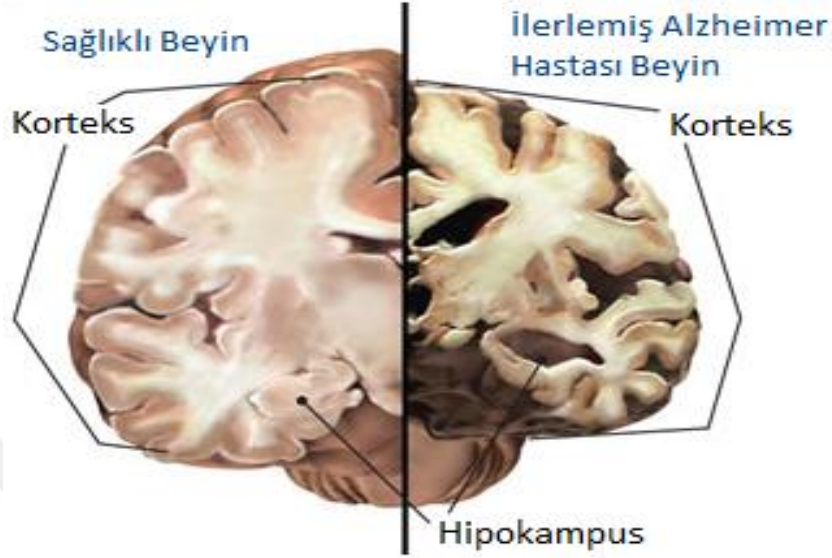
Depresyon ve davranış bozukluklarında genellikle MAO-A inhibitörleri kullanılır. MAO-A inhibitörleri, serotonin ve norepinefrin seviyesinin azalmasına karşı koymaktadır. Seçimli olmayan ve geri dönüşümsüz MAO inhibitörleri, tiramin içeren yiyeceklerle birlikte alındığında hipertansif etki gibi yan etkilere yol açmaktadırlar. Bu sebeplerden dolayı yeni, seçimli ve geri dönüşümlü bileşiklerin geliştirilmesi yönünde yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Seçimli ve geri dönüşümlü inhibitörlerin bulunmasından sonra bu ilaçların kullanımı önemli oranda artmıştır. Bu ilaçların tedaviye cevap vermeyen depresyonda, distimi, bulimia, yorgunluk ve aşırı uyku gibi atipik depresyonda da etkili oldukları saptanmıştır (Dostert ve ark. 1991).

### **1.7.2 Alzheimer Hastalığı**

AH, bilişsel yetenek kayıpları ve ağır davranış bozuklukları şeklinde tanımlanan ve en sonunda kişinin ölümüne yol açan ilerleyici nörodejeneratif bir beyin hastalığıdır (Xie ve diğ., 2013). AH, konuşma bozuklukları, hafıza kaybı, kavrayış bozukluğu ve birçok davranış anomallikleri olarak ortaya çıkmaktadır. Batılı ülkelerde 65 yaş üzeri insanlarda başlıca ölüm nedenleri arasında ise dördüncü sırada yer almaktadır (Pendlebury ve ark., 1994 ve Roberson ve Harrell, 1997).

AH, ilk kez 1906 yılında Alman psikiyatrist ve nöropatolog Alois Alzheimer tarafından 'Presenil Demans' vakası olarak yayınlanmıştır. Alois Alzheimer, 1901 yılında Frankfurt'ta çalıştığı sırada bir hastasını gözlemlemeye başlamıştır. Kısa süreli hafıza kaybını da kapsayan tuhaf davranış belirtilerine sahip olan hastasının ölümünden sonra Alois Alzheimer, bu hastanın kayıtlarını ve beyin dokularını Münih'te bulunan laboratuvarına getirmiştir. Alois Alzheimer, Kraepelin ve iki İtalyan doktor birlikte, boyama teknikleri kullanarak amiloid plakları ve nörofibriller yumakları tanımlamışlardır. 1910 yılında bir ders kitabında bu vakaile ilgili olarak "Alzheimer Hastalığı" teriminin kullanılmasıyla hastalığın adı "Alzheimer Hastalığı" olarak bilinmeye başlamıştır (Maurer, 2003).

Beynin ileri zihinsel fonksiyonlarla ilişkili bölgeleri, özellikle neokorteks ve hipokampus (Şekil 1.16) AH'nın karakteristik patolojisinden en fazla etkilenen bölgelerdir (Shinosaki ve ark. 2000).



**Şekil 1.15** Sağlıklı Birinin Beyni ile İlerlemiş Alzheimer Hastasının Beyin Yapılarının Karşılaştırmalı Gösterimi (Shinosaki ve ark. 2000).

Demans, günlük yaşamsal aktivitelerin sürdürülmesini engelleyen ilerleyici bir beyin hastalığı olup, bellek kaybı, günlük yaşamın gereksinimlerini yerine getirmede zorlanma, toplumsal davranışların düzenlenmesinde ve duygusal tepkilerin kontrolünde bozulma gibi belirtilerle görülür. Özellikle yaşlı popülasyonda görülen demans, geri dönüşümsüz ve ilerleyici bir durumdur (Adams ve ark., 1984, Bachman ve ark., 1992). AH, demansın en sık görülen sebebidir. Tüm demans vakalarının yaklaşık %60-80'inden sorumludur (Williams ve ark., 2010).

### **1.7.3 Parkinson Hastalığı**

PH, kronik, ilerleyici, nörodejeneratif bir hareket bozukluğu hastalığıdır. Hastalığı tamamen önleyici bir tedavi olmamasına rağmen çeşitli ilaç ya da cerrahi tedavi yöntemleriyle hastalık semptomlarında çeşitli düzeltilmeler sağlanmaktadır. Levodopa PH'nın semptomatik tedavisinde kullanılan en güvenilir ve etkili ilaçtır (Mouradian MM ve ark. 1989, Tolosa E. ark., 1994).

MAO-B inhibitörlerinin PH tedavisinde etkin olduğu MAO-B enzimi inhibisyonunun kavrayış becerilerini önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir. Günümüzde kullanılan etkin

Parkinson ilaçları olan selejilin ve rasajilin MAO-B enzimini geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektedir. Bu şekilde inhibe edildiğinde, MAO-B proteininin *de novo* sentezi birkaç haftayı bulmaktadır. Bu sebeple inhibitör seviyesi azaldığında enzim aktivitesinin hızla tekrar yerine gelmesini sağlayacak yeni geri dönüşümlü inhibitörlerin bulunması büyük önem kazanmaktadır. Bu inhibitörler hem seçimli olarak MAO-B'yi inhibe etmeli, hem de inhibisyon geri dönüşümlü olmalıdır. Bu özelliklere sahip MAO inhibitörlerinin geliştirilmesi ile nörotransmitörlerin biyolojik yarı ömrü uzatılabilir (Legoabe ve ark, 2012).

Dopamin, nigrostriatal dopaminerjik sistemde MAO-B tarafından deamine edilmektedir. MAO-B inhibitörleri tarafından sağlanan dopamin seviye artışı nörotransmitterlerdeki nigrostriatal bozukluğunu kompanse etmektedir. MAO-B inhibitörü olan selejilin nörokoruyucu etki sağlamaktadır. MAO-A'nın geri dönüşümlü inhibitörü olan moklobemidin antiparkinson etkisi olduğu saptanmıştır (Legoabe ve diğ.,2012).

Selejilinin PH'nın erken döneminde nöron koruyucu olarak kullanımı MAO inhibisyonu yoluyla dopamin metabolizması sonucu oluşan oksidatif stresin yol açtığı hasarı önleyebildiği ileri sürülmüştür. Selejilin ve rasajilin ayrıca MAO ile düzenlenen reaksiyonlarda açığa çıkan yan ürünlerden bir tanesi olan ve reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olan hidrojen peroksidin miktarını azaltarak da mitokondriyal hasarı ve nöronların ölümünün engellenmesine yardımcı olur (Parkinson Study Group 1989, 1993).

## **1.8 Enzimler**

Enzimler, canlı organizmadaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve yan ürün oluşmasına fırsat vermeden yüzde yüzlük bir ürün verimi sağlayan genellikle protein yapıları biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilmektedir. İnhibitörler genellikle küçük molekül kütlelerine sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzimatik inhibisyon, geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olmak üzere başlıca iki şekilde sınıflandırılmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

### **1.8.1 Enzimler ve inhibisyonlarının tedavide önemleri**

Enzimler bilindiği gibi Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç olmak üzere bütün enzimler protein yapısında olan bileşiklerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010). İlaç olarak enzim inhibitörlerinin kullanımı ilaç sanyainde önemli bir yer tutmaktadır. Çalışmamızda incelediğimiz kumarinlerin inhibisyon özelliklerini göstermeden önce enzim kinetiğini ve inhibisyon mekanizmalarını aşağıdaki gibi özetleyebiliriz.

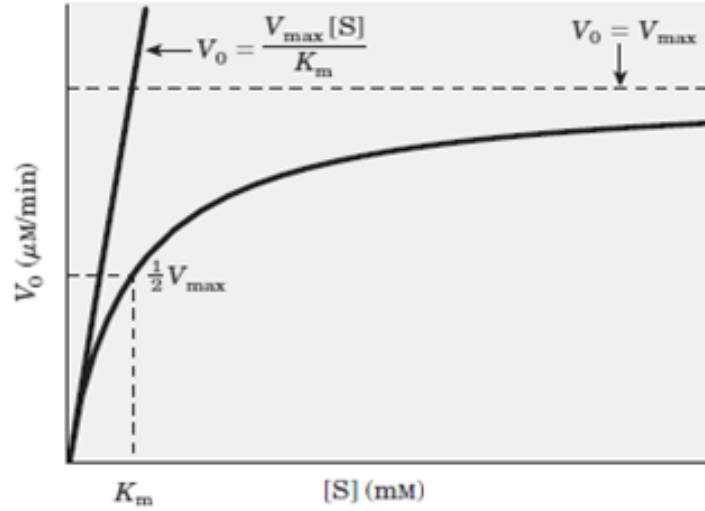
### **1.8.2 Enzimler ve Enzim Kinetiği**

Enzim konsantrasyonu ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda çok küçük bir substrat konsantrasyonunda enzim moleküllerinin çoğu serbest haldedir ve enzim-substrat kompleksi oluşumu düşüktür. Böyle bir durumda reaksiyon hızı düşüktür. Substrat konsantrasyonu arttırıldığında, reaksiyon ortamındaki enzim moleküllerinin tamamının substrat ile bağlanarak ES kompleksi oluşturması ile maksimum hıza ( $V_{maks}$ ) ulaşılır.

Maksimum hıza ulaşıldıktan sonra enzimli reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonu artışından etkilenmez. Enzimli reaksiyon maksimum hız değerine reaksiyon ortamındaki enzimin tamamını doyuran herhangi bir substrat konsantrasyonunda ulaşabileceğinden bu parametrenin deneysel olarak ölçülmesi güçtür. Ancak enzim moleküllerinin yarısının substrat ile doyduğu  $1/2 V_{maks}$  değerindeki substrat konsantrasyonu deneysel olarak belirlenebilir. Bu değer “Michaelis-Menten sabiti” olarak adlandırılır ve  $K_m$  sembolü ile gösterilir.

$K_m$  değeri, enzimin konsantrasyonundan bağımsızdır ve enzim ile verilen substratın karşılıklı etkileşimlerini gösterir. (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

Enzim ile katalizlenmiş reaksiyonların katalitik özellikleri kararlı hal modelleri ile incelenebilir.



**Şekil 1.6** Substrat derişimine karşı başlangıç hızının değişimi (Nelson ve ark., 2005).

$$v = \frac{V_{maks} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (1.1)$$

Michaelis-Menten eşitliği; başlangıç substrat derişimi [S], ilk hızı  $V_0$  ve maksimum ilk hızı  $V_{maks}$  arasındaki ilişkinin ortaya konulduğu bir ifadedir. Denklem 1.1’de gösterilmiştir.

Arasındaki ilişki Michaelis-Menten ( $K_m$ ) sabiti ile belirtilmiştir (Nelson ve ark., 2005).

$V_0$ ’ in,  $V_{maks}$ ’in tam olarak yarısına eşit olduğu durumda Denklem 1.2 ile aşağıda verilen eşitlik ortaya çıkmaktadır.

$$\frac{V_{maks}}{2} = \frac{V_{maks} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (1.2)$$

Denklem sadeleştirildiğinde ise;

$$K_m = [S] \quad (1.3)$$

Denklem 1.3 olmaktadır. Bu durumda  $K_m$  ilk hızın ( $V_0$ ), maksimum ilk hızın ( $V_{maks}$ ) yarısına eşit olduğu durumdaki substrat derişimidir (Nelson ve ark., 2005).

Michaelis-Menten eşitliğindeki [S]’ye karşı  $V_0$  grafiğinin tersi olan dőz çizgi olarak çizilen  $1/[S]$ ’ ye karşı  $1/V_0$  grafiği, Lineweaver-Burk eşitliği olarak ifade edilir (Nelson ve diğ. 2005). Aşağıdaki Denklem 1.4’te gösterilmiştir.

$$v = \frac{V_{maks} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (1.4)$$

Denklem 1.5'te verilen Michaelis-Menten eşitliği ters çevrildiği zaman;

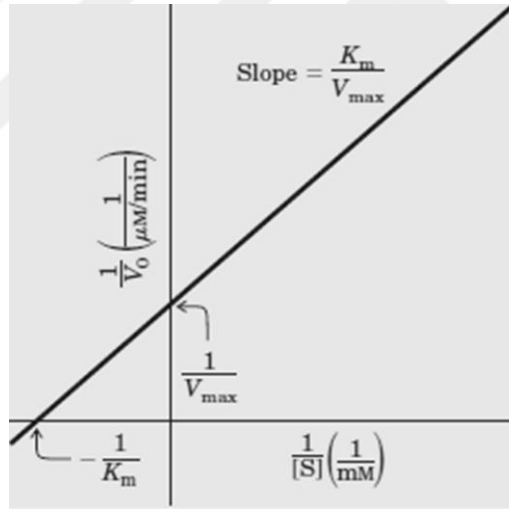
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{maks} \times [S]} \quad (1.5)$$

Bu eşitliğe dönüşür. Eşitlik daha açık olarak ifade edilirse;

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{maks} \times [S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (1.6)$$

Denklem 1.6'daki gibi ifade edilir (Nelson ve ark., 2005).

$\frac{1}{v}$ , a karşı  $\frac{1}{[S]}$  grafiği ise Lineweaver–Burk grafiğini göstermektedir.



Şekil 1.17 Lineweaver–Burk Grafiği (Nelson ve ark., 2005)

Eğim,  $K_m/V_{maks}$ 'ı ifade ederken eğimin  $1/V$ 'ı kestiği nokta  $1/V_{maks}$ 'ı ifade etmektedir.  $1/[S]$  ekseninin kesim noktası ise  $-(1/K_m)$ 'dir (Nelson ve ark., 2005).

### 1.8.3 Enzim İnhibisyonu

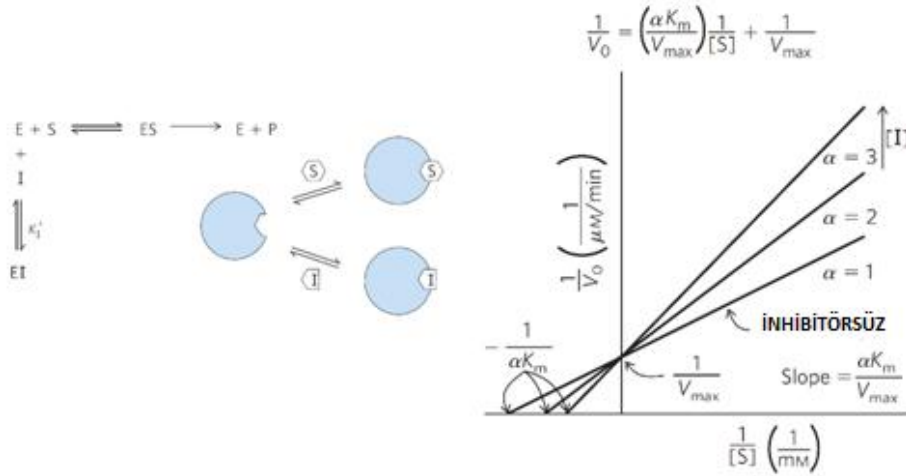
Enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna neden olan bileşiklere

de inhibitör denir. İnhibitörler genellikle küçük moleköl kütlesine sahip bileşikler veya iyonlardır.

Enzimatik inhibisyon, geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olmak üzere başlıca iki şekilde sınıflandırılmaktadır (Nelson ve ark., 2005).

### 1.8.3.1 Geri dönüşümlü İnhibisyon

Geri dönüşümlü inhibisyon; yarışmalı (kompetitif), yarı yarışmalı (unkompetitif) ve karışık inhibisyon olmak üzere üç grupta incelenir. Geri dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi, bir denge tepkimesi şeklindedir. Geri dönüşümlü inhibisyonda enzim inhibisyonu inhibitör ortamdan uzaklaştırılmadığı sürece inhibisyon devam eder. Yarışmalı inhibitör, yapı itibarıyla substrata çok benzer ve enzimin aktif bölgesi için substrat ile yarışmaktadır. İnhibitör, enzimin aktif bölgesini işgal ederken, substratın enzime bağlanmasını engeller. Substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibitör etkisi ortadan kaldırılabılır.  $V_{max}$  değeri değişmezken,  $K_m$  değeri artar. (Horton ve ark. 2006)



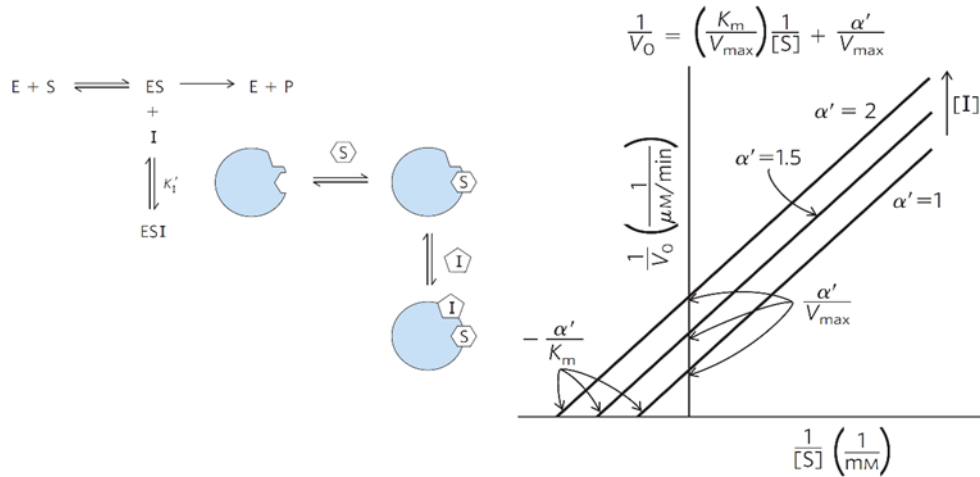
**Şekil 1.18** Yarışmalı inhibisyonda inhibitörün enzime bağlanması ve Lineweaver - Burk grafiği (Nelson, D. L., Cox, 2013)

İnhibitörsüz ve iki farklı konsantrasyonda inhibitör içeren enzim reaksiyonuna ait Lineweaver-Burk eğrileri Şekil 1.19'da verilmiştir. Grafikten de anlaşılacağı üzere, İnhibitör konsantrasyonunun artırılmasıyla aynı  $V_{maks}$  değerine sahip ancak farklı  $K_m$  değerlerine sahip olan eğriler elde edilmiştir. Yarışmalı inhibisyonda yeterli substrat

konsantrasyonu olduğunda substrat inhibitörün önüne geçeceğinden  $V_{maks}$  değeri değişmeyecektir (Nelson ve ark., 2005).

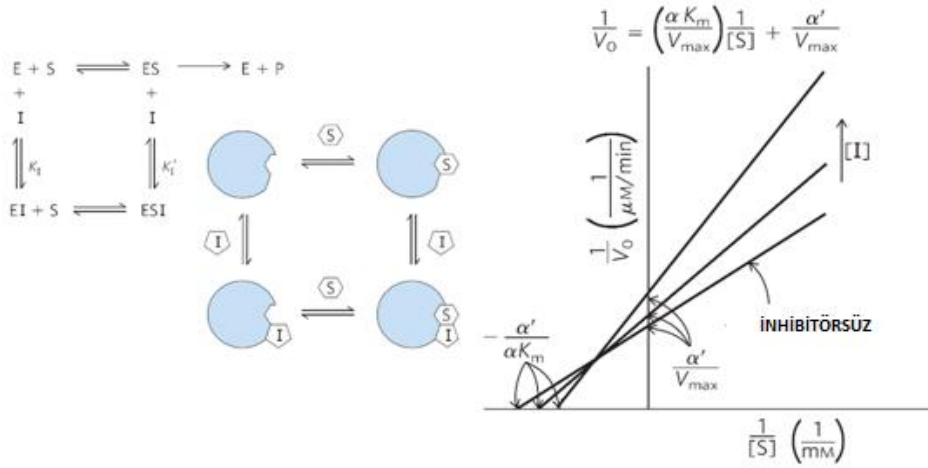
Diğer bir dönüşümlü inhibisyon tipi yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonudur. Bu inhibisyon tipinde inhibitör, yarışmalı bir inhibitörden farklı olarak sadece enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanır, serbest enzime (E) bağlanamaz.

Bu inhibisyon daha çok birden fazla substratlı enzimler için geçerlidir. Bu tip inhibisyonda inhibitör enzim substrat kompleksine bağlanıp aktif olmayan enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksi oluşturduğundan inhibitörün varlığında  $V_{maks}$  azalır. ESI kompleksinin oluşumu ile substrat (S) kompleksi ortamdaki sürekli çekileceğinden enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşumu reaksiyon dengesini daha fazla sağa kaydırır ve böylece  $K_m$  değeri küçülür (Horton ve ark., 2006).



**Şekil 1.19** Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitörün enzime bağlanması ve Lineweaver - Burk grafiği (Horton ve ark., 2006).

Karışık inhibisyonda; inhibitör enzime ya da enzim substrat kompleksine bağlanmaktadır. Aktif olmayan EI ve ESI kompleksi oluşturabilir. Substrat ve inhibitör enzime aynı anda bağlanabilir. Karışık inhibitörün etkisi, enzimin katalitik aktivitesini düşürerek gözlenmektedir. Bu tip inhibisyonda, inhibitör ile substrat arasında yarışma yoktur. Substrat konsantrasyonu artırılmasıyla inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Enzimin  $K_m$  değeri sabit kalırken  $V_{maks}$  değeri azalmaktadır (Horton ve ark., 2000).



**Şekil 1.20** Karışık inhibisyonda inhibitörün enzime bağlanması ve Lineweaver - Burk eğrisi (Nelson ve D. L., Cox, 2013)

Bir başka geri dönüşümlü inhibisyon tipi ise; yarışmasız inhibisyonudur. İnhibitör, enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanır fakat serbest enzime bağlanamaz. Birden fazla substratlı enzimler için geçerliliği yüksektir. Bu inhibisyon tipinde aktif olmayan enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksi oluşur. İnhibitör ile  $V_{maks}$  azalır. ESI kompleksinin oluşumu ile ES kompleksi ortamdan sürekli çekilir, ES kompleksinin oluşumu reaksiyon dengesini sağa kaydırır ve böylece  $K_m$  değeri azalmaktadır.

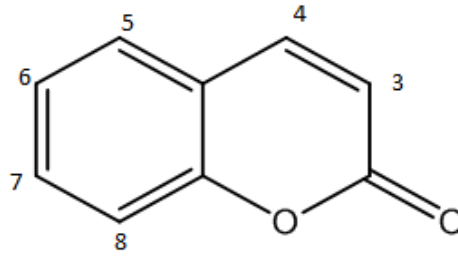
### 1.8.3.2 Geri dönüşümsüz İnhibisyon

Geri dönüşümsüz inhibisyonda ise; inhibitör enzimin işlevsel kısmını kovalent bağ yaparak bozar ya da enzim ile birleşerek kararlı bir yapı oluşturur. Bu grup inhibitörlerin “intihar inaktivatörler” olarak bilinen türleri bulunmaktadır. Bu inhibitörler enzime spesifiktir ve enzimin aktif bölgesine bağlanana kadar reaktif değillerdir. Enzimatik reaksiyonlarda belirli bir aralıktaki substrat konsantrasyonunun değişimine karşı ürün oluşum hızı eğrisi çizilmektedir (Nelson ve diğ. 2005).

### 1.9 Kumarinler ve Enzim İnhibisyonunda Kullanımları

Kumarinler ile ilgili çalışmalar iki yüzyıldan fazla yıl önce başlamıştır ve kelime olarak kumarin, adını bileşiğin ilk olarak izole edildiği *Coumarouna odorata Aube* ağacından almaktadır (Borges ve diğ. 2005).

Kumarinler 19. yüzyılda tonka fasulyelerinden izole edilmiştir ve bu tarihten beri yemeklerde tat veren ajanlar olarak ve parfümeride kullanılmaktadır (Kulkarni ve diğ. 2006).Kumarin (2H-Chromen-2-one), doğal olarak birçok bitkide bulunan ve benzopironlar grubundan, kristal yapılı, renksiz bir kimyasal bileşiktir. Serbest olarak ya da glukoz ile beraber bulunabilmektedir (Venugopala ve diğ. 2013).



**Şekil 1.21** Kumarinin genel yapısı

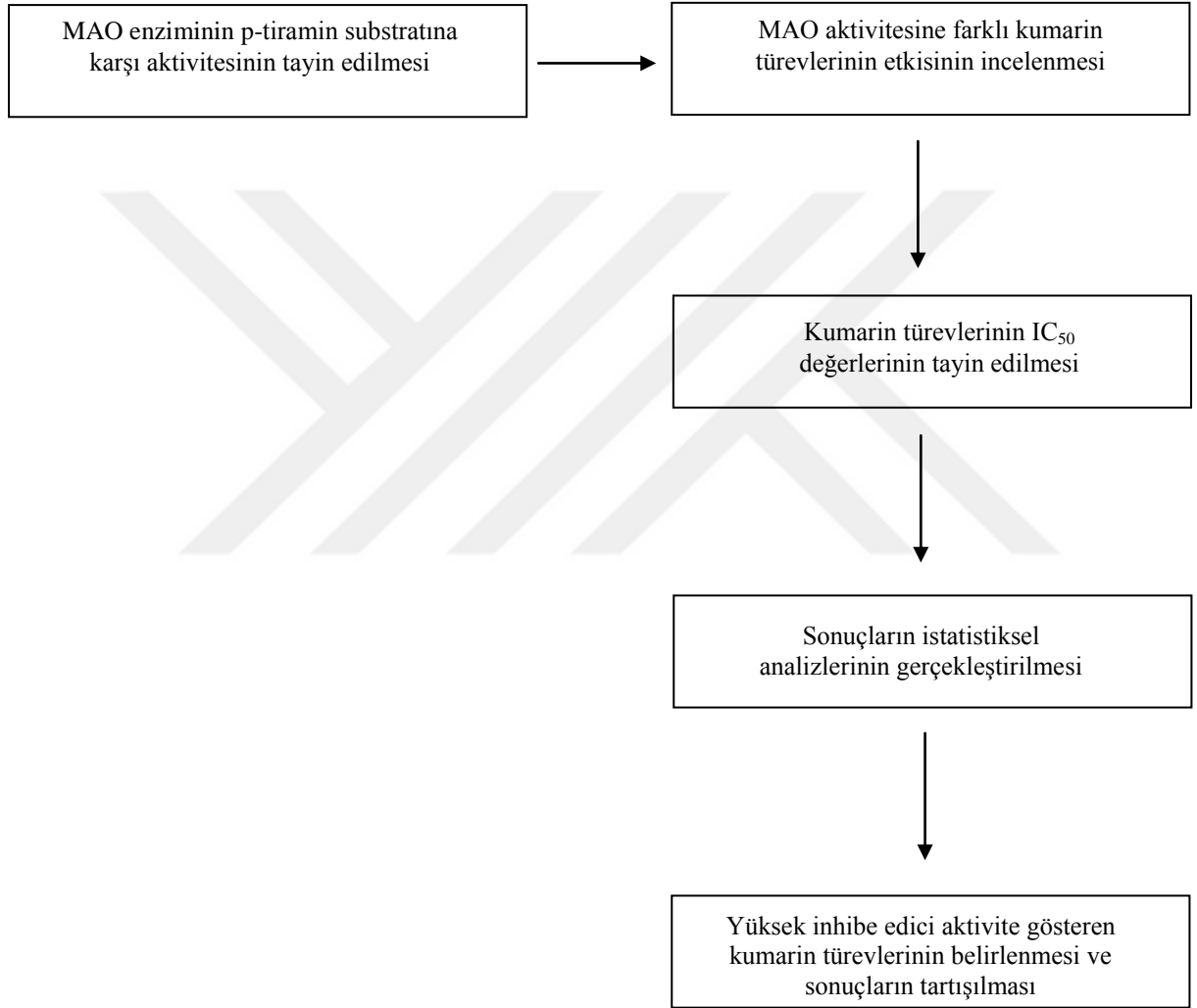
Kumarinler; antikanser, antimikrobiyal, analjezik, lipid düşürücü, karaciğer koruyucu, antioksidan, antidepresan, antiinflamatuvar, antiviral, antidiyabetik, antialerjik, antitümör, antikoagülan ve antifungal gibi geniş biyolojik aktivite ve etki alanına sahiptir (Borges ve ark., 2005, Yüce, B 2006, Lee ve ark. 2006, Anand ve ark., 2012). Kumarinler MAO enzimi de dahil olmak üzere pek çok enzim için inhibitör tasarımında önemli bir bileşik sınıfıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı doğal ve sentetik kumarin türevlerinin monoamin oksidaz enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Hossain et al., 1996; Jo et al., 2002; Matos et al., 2009 ve Chimenti et al., 2009).

En azından 4 pozisyonunda tek bir metil grubu daha da aktif bileşiklerin oluşumunu sağlamış, 3 ve 4 pozisyonlarına birlikte metil grubu gelmesi ile MAO B'nin daha fazla inhibe olmasına neden olmuştur (Gnerre et al., 2000). Ayrıca AH tedavisi için de tasarlanmış kumarinler mevcuttur (Shen ve ark., 2005). Kumarin türevleri ayrıca nöronların oksidatif strese ve serbest radikallere karşı korunmasını da sağlamaktadır (Anand ve ark., 2012).

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Araştırma Yöntemi

Araştırma Şekil 2.1’de gösterilen aşamalardan oluşmaktadır.



Şekil 2.1 Tez Çalışmasında İzlenen Yöntemlerin şematize hali

## 2.2 Araştıma araçları

### 2.2.1 Araştırmada kullanılan cihazlar

**Hassas Terazi:** Sartorius Analytic, A200S  $\pm$  0,0001 (Almanya)

**Spektroflorometre:** FLX800™, Bio-Tek® Instruments, Inc., Winooski, VT, USA;

**Orbital Karıştırıcı:** IKA-Werke, OS 10 B (Almanya)

**- 86 °C Derin Dondurucu:** ThermoElectronCorp., Forma ULT (A.B.D.)

**Buzdolabı:** Regal (Türkiye)

**Destile Su Cihazı:** Millipore, Rios-DI UV (A.B.D.)

**Etüv:** Genlab, Midi/2/AL (0-100) (İngiltere)

**Manyetik Karıştırıcı:** Chiltren, Isıtıcılı HS 31 (İngiltere)

**Otomatik Pipetler:** Gilson, Pipetman (Fransa)

**pH Metre:** ToledoMettler (İsviçre)

**Vorteks Karıştırıcı:** Fisons, Whirlimixer (İngiltere)

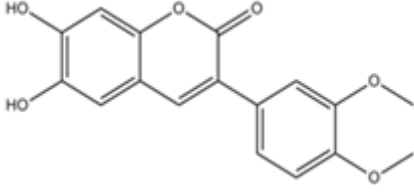
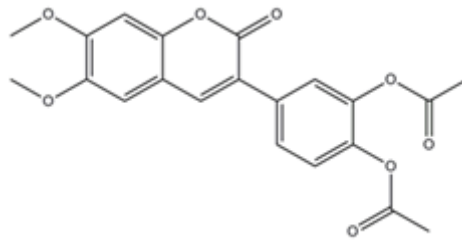
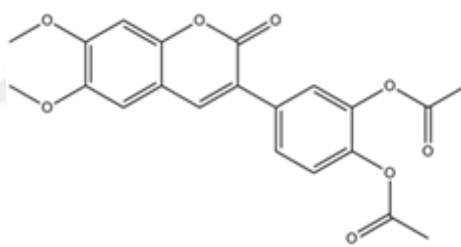
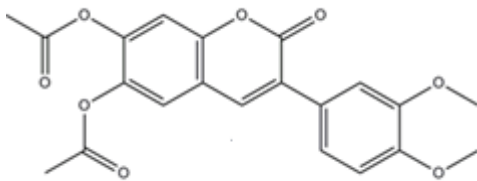
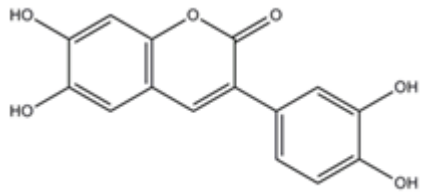
### 2.2.2 Araştırmada kullanılan kimyasallar

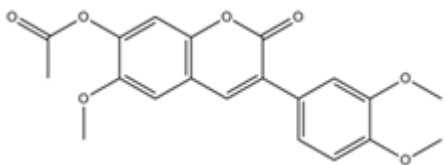
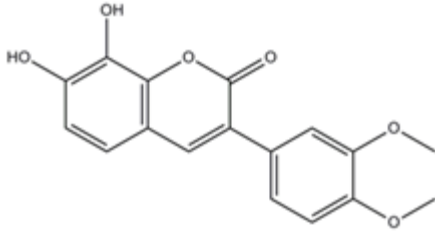
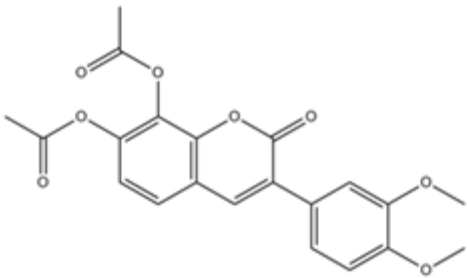
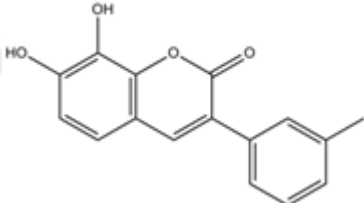
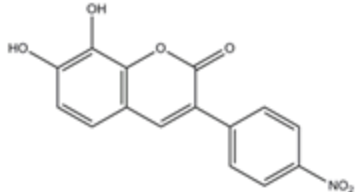
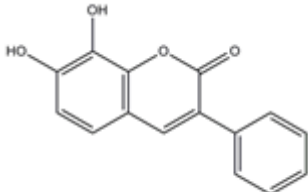
İnsan rekombinant MAO-A (hMAO-A) ve MAO-B (hMAO-B) enzimleri, dimetilsülfoksit (DMSO), selejilin, iproniazit ve rasajilin Sigma Aldrich firmasından, Amplex Red MAO Tayin Kiti Invitrogen firmasından temin edildi. Çalışmamızda kullandığımız tüm kimyasallar analitik saflıktadır ve Merck firmasından temin edilmiştir. Biyokimya ve Organik Kimya Anabilim Daları tarafından sentezlenen 21 adet kumarin türevi kullanılmıştır. Aşağıdaki tabloda kullanılan kumarin türevlerinin isimleri ve moleköl ağırlıkları gösterilmiştir.

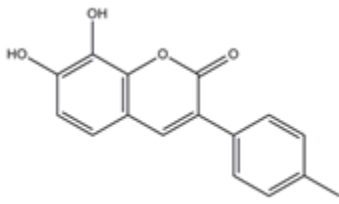
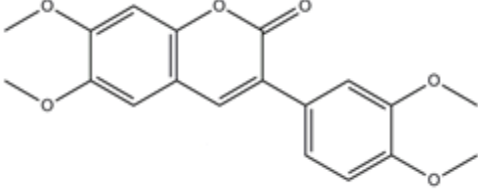
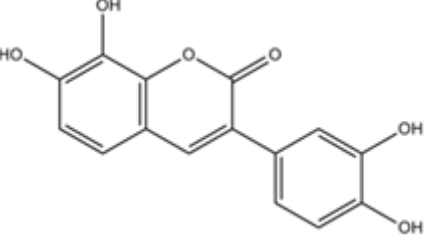
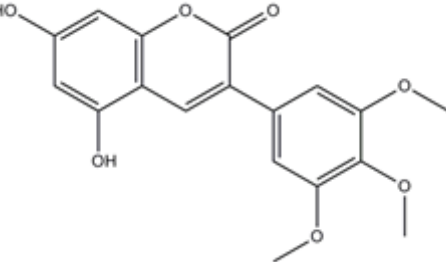
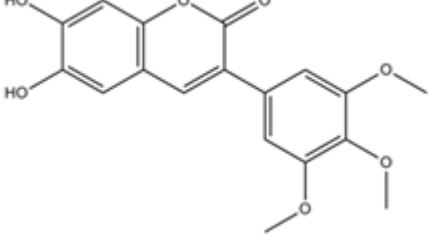
**Tablo 1** Çalışmada kullanılan kumarin türevlerinin isimleri ve molekül ağırlıkları

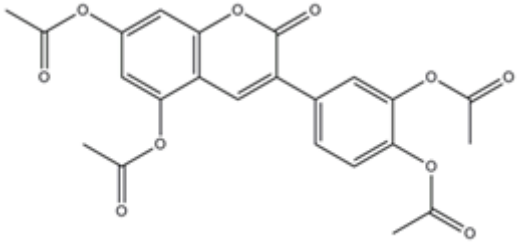
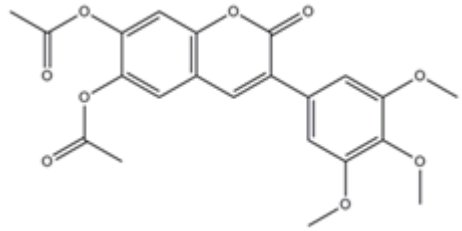
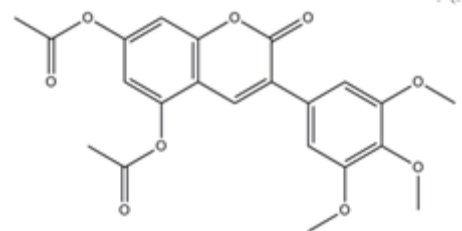
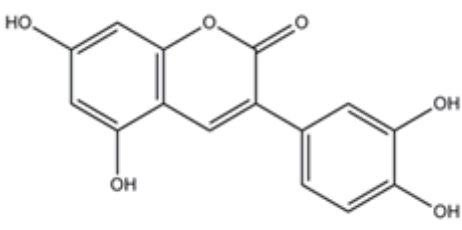
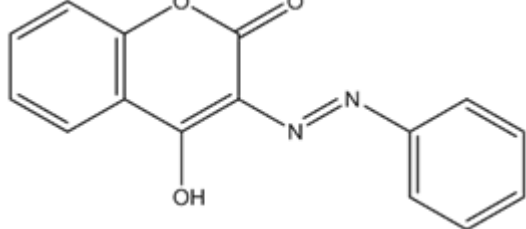
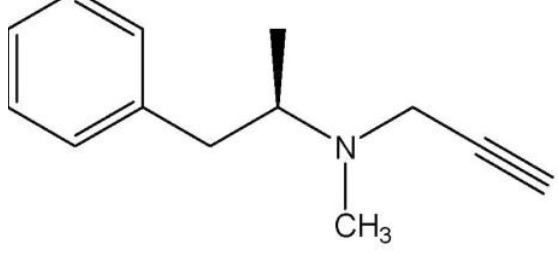
Kumarinler	İsimleri	Molekül Ağırlıkları (g/mol)
1	3-(3,4-dimetoksifenil) 6,7 dihidroksi kumarin	314,293
2	3-(3,4-diasetoksifenil)-6,7-dimetoksi kumarin	398,367
3	3-(3,4-diasetoksifenil)-6,7-dimetoksi kumarin	314,293
4	3-(3,4-dimetoksifenil)-6,7-asetoksikumarin	398,367
5	3-(3,4-dihidroksifenil)-6,7-dihidroksi kumarin	286,239
6	3-(3,4-dimetoksifenil)-6-metoksi-7asetoksi kumarin	370,357
7	3-(3,4-dimetoksifenil)-7,8-dihidroksi kumarin	314,293
8	3-(3,4-dimetoksifenil)-7,8-diasetoksi kumarin	398,367
9	3-(3-metilfenil)-7,8-dihidroksi kumarin	268,268
10	3-(4-nitrofenil)-7,8-dihidroksi kumarin	299,238
11	3-fenil-7,8-dihidroksi kumarin	254,241
12	3-(4-metilfenil)-7,8-dihidroksi kumarin	268,268
13	3-(3,4-dimetoksifenil)-6,7-dimetoksi kumarin	344,36
14	3-(3,4-dihidroksifenil)-7,8-dihidroksi kumarin	286,239
15	3-(3,4,5-trimetoksifenil)-5,7-dihidroksi kumarin	344,319
16	3-(3,4,5-trimetoksifenil)-6,7-dihidroksi kumarin	344,319
17	3-(3,4-diasetoksifenil)-5,7-diasetoksi kumarin	454,387
18	3-(3,4,5-trimetoksifenil)-6,7-diasetoksi kumarin	428,393
19	3-(3,4,5-trimetoksifenil)-5,7-diasetoksi kumarin	428,363
20	3-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi kumarin	286,239
21	3-(fenildiazetil)-4-hidroksi kumarin	266,256

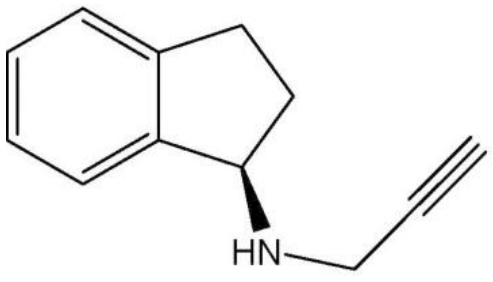
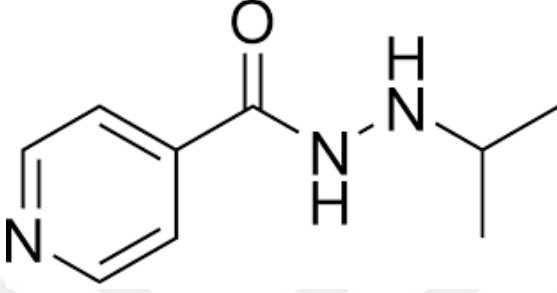
**Tablo 2** Çalışmada kullanılan 21 adet kumarin türevinin, selejilin, rasajilin ve iproniazid'in molekül yapıları

Kumarinler	İsimleri
1	
2	
3	
4	
5	

6	
7	
8	
9	
10	
11	

12	
13	
14	
15	
16	

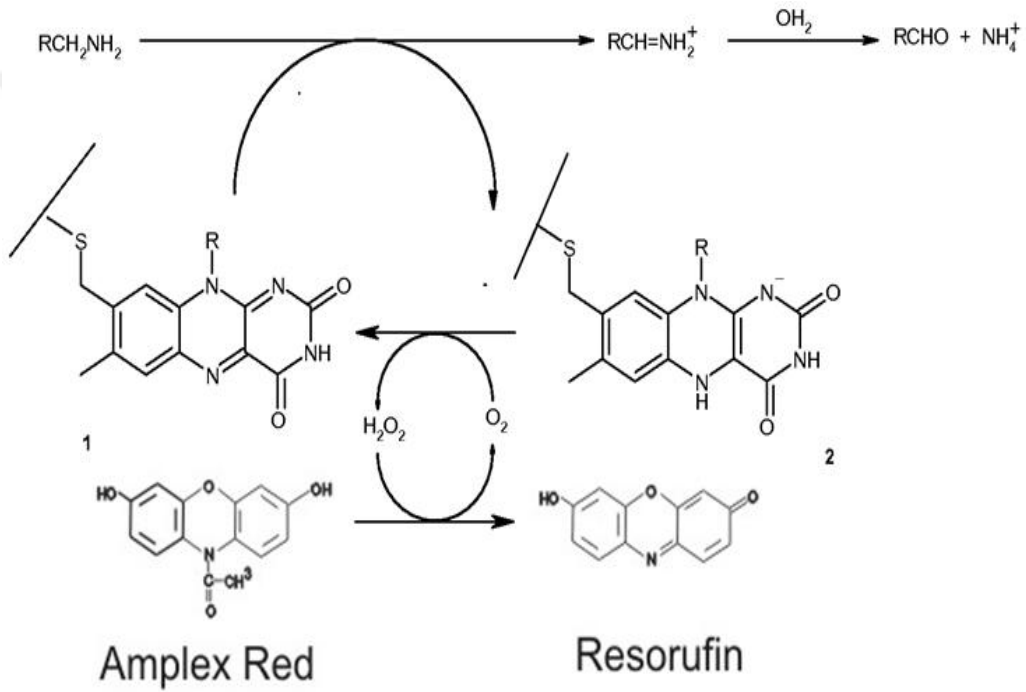
17	 <p>Chemical structure of a flavone derivative. The flavone core is substituted with four acetoxy groups (-O-C(=O)-CH<sub>3</sub>): two on the A-ring (at positions 2 and 6) and two on the C-ring (at positions 7 and 8).</p>
18	 <p>Chemical structure of a flavone derivative. The flavone core is substituted with two acetoxy groups (-O-C(=O)-CH<sub>3</sub>) on the A-ring (at positions 2 and 6) and three methoxy groups (-O-CH<sub>3</sub>) on the C-ring (at positions 7, 8, and 9).</p>
19	 <p>Chemical structure of a flavone derivative. The flavone core is substituted with two acetoxy groups (-O-C(=O)-CH<sub>3</sub>) on the A-ring (at positions 2 and 6) and three methoxy groups (-O-CH<sub>3</sub>) on the C-ring (at positions 7, 8, and 9).</p>
20	 <p>Chemical structure of a flavone derivative. The flavone core is substituted with four hydroxyl groups (-OH): two on the A-ring (at positions 5 and 7) and two on the C-ring (at positions 3 and 4).</p>
21	 <p>Chemical structure of a flavone derivative. The flavone core is substituted with a hydroxyl group (-OH) at position 5 and a benzylidene group (-CH=N-Ph) at position 3.</p>
Selejilin	 <p>Chemical structure of Selejilin. It is a tertiary amine with a phenyl group, a methyl group (-CH<sub>3</sub>), and a propargyl group (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH) attached to the nitrogen atom.</p>

Rasajilin	 <chem>C#CCN[C@@H]1Cc2ccccc12</chem>
Iproniazit	 <chem>CC(C)N(N)C(=O)c1ccncc1</chem>

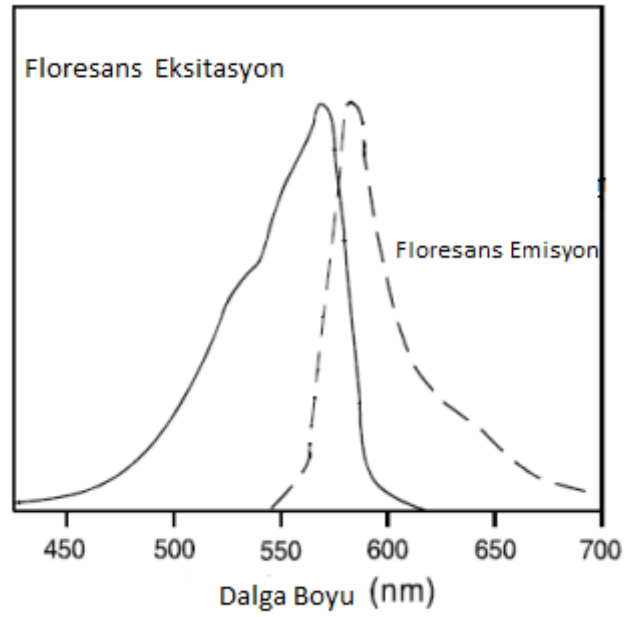
### 2.3 Farmakolojik Denemeler – Genel metodlar

MAO-A ve MAO-B enzim aktivitesi tayini Amplex® Red Monoamin Oksidaz deney kiti kullanım kılavuzuna uygun olarak belirlendi. Kitin genel çalışma prensibi Şekil 2.2’ de verilmiştir.

Amplex® Redreaktifi hidrojen peroksit ile 1:1 stokiometri ile reaksiyona girerek yüksek derecede floresans resorufin oluşturur ve böylece çok düşük konsantrasyonlarda (alt limit 100 pikomolar) hidrojen peroksidin tayin edilmesine olanak sağlar.



Şekil 2.2 Amplex® Red Monoamine Oksidase Assay Kitinin çalışma prensibi



**Şekil 2.3** Amplex® Red reaktifi için Floresans Eksitasyon- Floresans Emisyon Grafiği

### 2.3.1 Stok Çalışma Çözeltilerin Hazırlanışı

20mM Amplex® Red stok çözeltisi: 1mg Amplex® Red reaktifi 200 µL DMSO içinde çözülerek hazırlandı. Hazırlanan stok çözelti -20 °C sıcaklıkta, ışıktan korunarak muhafaza edildi.

1X tampon Çözelti (0.25 M, pH:7.4 Sodyum fosfat tamponu): 5 mL 5X stok tampon çözeltisi destile su ile 25 mL'ye seyreltildi. Hazırlanan çözeltiler günlük olarak kullanıldı.

200 U/mL'lik horseradish peroksidaz (HRP) stok çözeltisi: Kit kullanım kılavuzuna uygun olarak 1X tampon çözelti kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan çözelti 200 µL'lik hacimlere ayrılarak -20 °C sıcaklıkta saklandı.

100 mM substrat (p-tiramin) çözeltisi: Kit kullanım kılavuzuna uygun olarak 1.2 mL destile su kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan çözelti 200 µL'lik hacimlerde -20 °C sıcaklıkta saklandı.

0.5 mM MAO inhibitörlerini (selejinin, iproniazit ve rasajilin) içeren stok çözeltisi: İnhibitörler 1 mL destile su içinde çözülerek kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan çözelti 200 µL'lik hacimlerde -20 °C sıcaklıkta saklandı.

hMAO-A: Enzimli reaksiyonda floresans şiddeti 10000 birim olacak şekilde ana stoktan (0.5 mL: 100 mM pH 7.4 potasyum fosfat tamponu, 0.25 M Sukroz, 0.1 M EDTA, %5 Gliserol. 5 mg protein/mL; 140 ünite/mg protein) 1:20 seyreltme ile hazırlandı (son konsantrasyon: 1.1 µg protein/200 µL).

hMAO-B: Enzimli reaksiyonda floresans şiddeti 10000 birim olacak şekilde ana stoktan (0.5 mL: 100 mM pH 7.4 potasyum fosfat tamponu, 0.25 M Sukroz, 0.1 M EDTA, %5 Gliserol. 5 mg protein/mL; 47 ünite/mg protein) 1:3 seyreltme ile hazırlandı (son konsantrasyon: 7.5 µg protein/200 µL).

Substrat çalışma çözeltisi: Yukarıda hazırlanışı verilmiş olan stok çözeltiler kullanılarak her çalışma günü taze olarak hazırlandı (200 µL Amplex Red stok çözeltisi, 100 µL horseradish peroksidaz stok çözeltisi, 200 µL substrat (p-tiramin) çözeltisi ve 9.5 mL 1X reaksiyon tamponu).

Stok inhibitör çözeltileri: Denemelerde kullanılan kumarin türevleri 10µg/µL konsantrasyonunda DMSO içinde hazırlandı. Daha sonra kullanılan kumarin türevlerinin molekül ağırlıkları ile orantılı olarak reaksiyon ortamında kumarin örnek hacmi 2 µL ve kumarin konsantrasyonu 0.05 ve 2 µM olacak şekilde DMSO ile seyreltmeler yapıldı.

### **2.3.2 Enzim Aktivitesinin Tayini**

Çalışma süresince substrat ve 1X reaksiyon tamponu karanlıkta ve oda sıcaklığında, enzimler buz üstünde saklandı. -20 °C sıcaklıkta muhaza edilen 10 mM'lik stok çözeltisi hazırlamak için 3-arilkumarin türevleri DMSO'da çözüldü. DMSO konsantrasyonu her bir kuyucukta %1'den yüksek olmayacak şekilde deneylerde kullanıldı.

2 µL destile su, 4.5µL hMAO-A veya hMAO-B ve 93.5 µL 1X reaksiyon tamponu, siyah düz tabanlı spektrofotometrik 96 kuyulu plakalara konuldu. 15 dakika 37°C'de karıştırılarak inkübe edildi. Sürenin sonunda 100 mikrolitre substrat çözeltisi eklenerek reaksiyona başlandı. 37 °C'de çoklu ölçümlü mikropate floresans okuyucuda (FLX800™, Bio-Tek® Instruments, Inc., Winooski, VT, USA; 545 nm eksitasyon ve 590 nm emisyon) 15 dakika boyunca her 30 saniyede bir ölçüm alınarak enzimatik reaksiyonun ilerlemesi takip edildi. Enzim aktivitesi 15 dakika sonundaki gözlenen floresans şiddetinden başlangıç anındaki floresans şiddeti çıkarılarak hesaplandı.

hMAO-A ve hMAO-B izoenzimleri ile gerçekleştirilen reaksiyonların aynı anda paralel yürütmesi sağlandı.

Kumarin türevlerinin çözücüsü olan DMSO'nun etkisini gözlemlemek amacıyla aynı deneme 2 µL destile su yerine 2 µL DMSO kullanılarak tekrarlandı.

### 2.3.3 Kumarinler ile yapılan inhibisyon çalışmaları

İnhibisyon denemesi MAO enzim aktivitesi Invitrogen Amplex Red MAO tayin kiti kullanım kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirildi.

2 µL, DMSO içerisinde çözünerek hazırlanmış kumarin türevleri (%20-%80 yüzde inhibisyon elde edilecek şekilde farklı konsantrasyonlarda), 4.5 µL hMAO-A veya hMAO-B ve 93.5 µL 1X reaksiyon tamponu, siyah düz tabanlı spektrofotometrik 96 kuyulu mikro plakalara konuldu. 15 dakika 37°C'de karıştırılarak inkübe edildi. Sürenin sonunda 100 µL substrat çalışma çözeltisi eklenerek reaksiyon başlatıldı. 37 °C'de çoklu ölçümlü mikro plaka floresans okuyucuda (FLX800™, Bio-Tek® Instruments, Inc., Winooski, VT, USA; 545 nm eksitasyon ve 590 nm emisyon) 15 dakika boyunca her 30 saniyede bir ölçüm alınarak enzimatik reaksiyonun ilerlemesi takip edildi.

2 µL, DMSO içerisinde çözünerek hazırlanmış çeşitli bilinen MAO inhibitörleri (selejilin, iproniazit ve rasajilin) yukarıda anlatıldığı şekilde tayin edildi.

Kumarin kontrol çözeltisi; 2 µL DMSO içinde çözülmüş kumarin türevleri, 4.5 µL 100 mM pH 7.4 potasyum fosfat tamponu ve 93.5µL 1X reaksiyon tamponu, siyah düz tabanlı spektrofotometrik 96 kuyulu mikro plakalara konuldu. 15 dakika 37°C'de karıştırılarak inkübe edildi. Sürenin sonunda 100 µL substrat çalışma çözeltisi eklenerek reaksiyon başlatıldı. 37 °C'de çoklu ölçümlü mikro plaka floresans okuyucuda (FLX800™, Bio-Tek® Instruments, Inc., Winooski, VT, USA; 545 nm eksitasyon ve 590 nm emisyon) 15 dakika boyunca her 30 saniyede bir ölçüm alındı. Floresans verdiği tespit edilen kumarin türevlerinin aynı konsantrasyondaki floresans şiddetleri enzimli reaksiyondan elde edilen floresans şiddetinden çıkarılarak hesaplama yapıldı ( $F_{inh}$ ).

Yüzde inhibisyon değerleri aşağıda verilen denklemle hesaplandı. Denklem 1.7;

$$\% \text{inhibisyon} = \frac{F_{enz} - F_{inh}}{F_{enz}} \times 100 \quad (1.7)$$

$F_{enz}$ : İnhibitörsüz enzim aktivitesi;  $F_{inh}$ : İnhibitör varlığında enzim aktivitesi

%50 enzim inhibisyonuna karşılık gelen kumarin türevi konsantrasyonları ( $IC_{50}$ ) GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA) kullanılarak inhibitör konsantrasyonuna karşılık gelen % inhibisyon grafiklerinin lineer regresyon analizi ile hesaplandı.

Tüm denemeler üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. Verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism 5.0 yazılımı ile gerçekleştirildi. Kumarin türevlerinin  $IC_{50}$  değerleri arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığının belirlenmesi için one way ANOVA testi uygulandı. Varyans analizi iki ya da daha fazla gruba ait ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili hipotezleri test etmek için Anova testi kullanılmaktadır. Eğer ikiden fazla grubun ortalamaları karşılaştırılacak ise F Testi diğer bir isimle Varyans Analizi (ANOVA, Analysis Of Variance) uygulanır. Denemelerimizde ikiden fazla grubu karşılaştırdığımız için ANOVA testini uyguladık.

### **2.3.4 İnhibisyon Mekanizması**

En yüksek inhibisyon aktivitesi gösteren kumarin türevinin inhibisyon mekanizmasının belirlenmesi amacıyla 8 farklı substrat konsantrasyonunda (1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.15, 0.1, 0.075 ve 0.05 mM) MAO-A ve MAO-B izoenzimleri için enzim aktiviteleri tayin edildi. Bu amaçla 2  $\mu$ L DMSO, 4.5  $\mu$ L hMAO-A veya hMAO-B ve 93.5  $\mu$ L 1X reaksiyon tamponu, siyah düz tabanlı spektrofotometrik 96 kuyulu plakalara konuldu. 15 dakika  $37^{\circ}C$ 'de karıştırılarak inkübe edildi. Sürenin sonunda 8 farklı konsantrasyonda p-tiramin içeren 100 mikrolitre substrat çözeltisi eklenerek reaksiyona başlandı.  $37^{\circ}C$ 'de çoklu ölçümlü mikropate floresans okuyucuda (FLX800™, Bio-Tek® Instruments, Inc., Winooski, VT, USA; 545 nm eksitasyon ve 590 nm emisyon) 15 dakika boyunca her 30 saniyede bir ölçüm alınarak enzimatik reaksiyonun ilerlemesi takip edildi.

Çizilen Michealis-Menten grafiklerinden GraphPad Prism 5.0 yazılımı ile MAO-A ve MAO-B enzimleri için  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri hesaplandı.

En yüksek etki gösterdiği belirlenen kumarin türevinin inhibisyon mekanizmasının aydınlatılması için 3 farklı inhibitör konsantrasyonunda (0.05, 1 ve 2  $\mu$ M) ve 8 farklı substrat konsantrasyonunda yukarıda anlatıldığı şekilde enzim aktivitesi tayin edildi. Bu amaçla 2  $\mu$ L DMSO içinde çözülmüş kumarin türevi (0.05, 1 ve 2  $\mu$ M), 4.5 $\mu$ L hMAO-A veya hMAO-B ve 93.5  $\mu$ L 1X reaksiyon tamponu, siyah düz tabanlı spektrofotometrik 96 kuyulu plakalara konuldu. 15 dakika  $37^{\circ}C$ 'de karıştırılarak inkübe edildi. Sürenin sonunda 8 farklı konsantrasyonda p-tiramin içeren 100 mikrolitre

substrat çözeltisi eklenerek reaksiyona başlandı. 37 °C'de çoklu ölçümlü mikropate fluoresans okuyucuda (FLX800™, Bio-Tek® Instruments, Inc., Winooski, VT, USA; 545 nm eksitasyon ve 590 nm emisyon) 15 dakika boyunca her 30 saniyede bir ölçüm alınarak enzimatik reaksiyonun ilerlemesi takip edildi. Lineweaver Burk grafiği çizilerek inhibisyon mekanizması belirlendi. Belirlenen inhibisyon mekanizması kullanılarak GraphPad Prism 5.0 yazılımı ile  $K_i$  değeri belirlendi.

### **2.3.5 Geri dönüşümlülük**

En yüksek aktiviteyi gösteren kumarin türevi ile gerçekleştirilen inhibisyonun geri dönüşümlü olup olmadığının belirlenmesi amacıyla 3-(fenildiazenil)-4-hidroksikumarin bileşiği  $IC_{50}$  değeri olan 0.13  $\mu$ M konsantrasyonda 4 farklı örnek hazırlandı ve substrat eklenerek, farklı zamanlarda (15, 30, 45 ve 60 dakika) inkübe edildi ve enzimatik aktivite Bölüm 2.3.3'de anlatıldığı şekilde tayin edildi (Hammuda 2016).

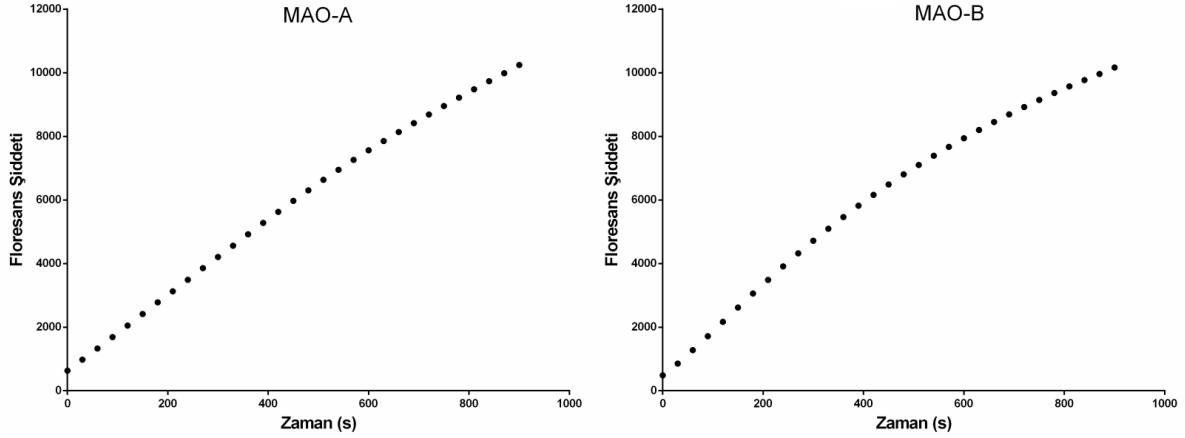
### **2.3.6 Lipinski beş kuralı**

Çalışmamızda kullanılan kumarin türevlerinin ilaç olarak kullanılabilirliğini ölçmek amacıyla, Lipinski'nin beş kuralına uygunlukları "Molinspiration Hesaplama Yazılımı" ile araştırılmıştır ([www.molinspiration.com](http://www.molinspiration.com)). Lipinski'nin beş kuralı, farmakolojik aktiviteye sahip bir bileşiğin insanlarda oral olarak aktif bir ilaç olarak kullanılabilirliğini test etmek için uygulanan bir yöntemdir. Bu kurala göre, oral olarak aktif bir ilacın hidrojen bağı donörlerinin toplam sayısı 5'ten fazla, hidrojen bağı akseptörlerinin sayısı 10'dan fazla olmamalıdır. Molekül ağırlığı 500 Da'dan küçük olmalı ve log P (oktanol- su ayrılım katsayısı) değeri, 5'ten büyük olmamalıdır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1.1 Enzim aktivitesinin tayin edilmesi

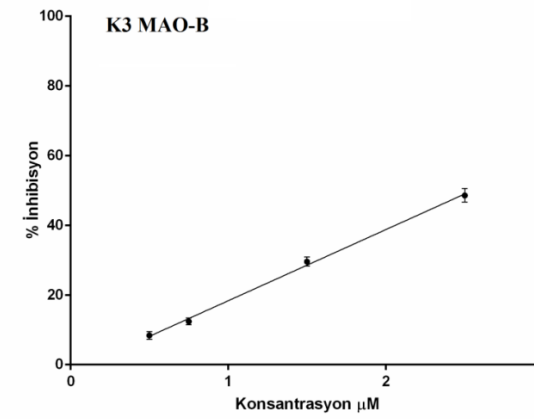
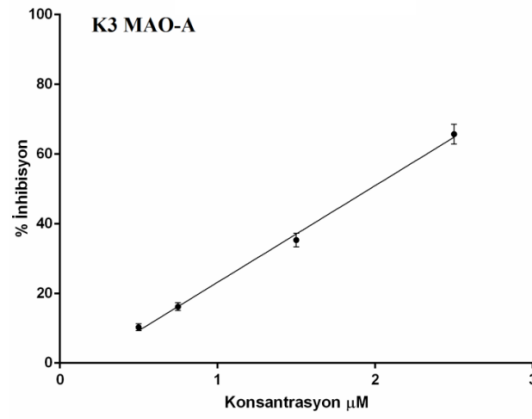
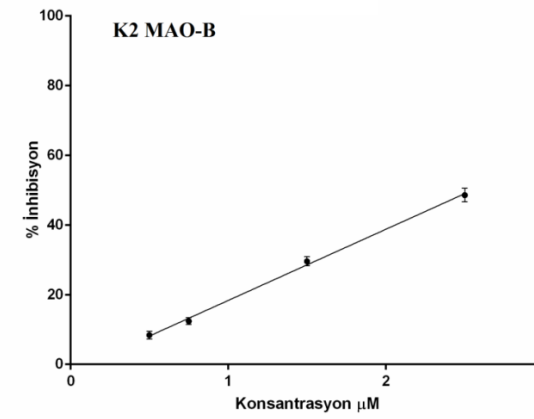
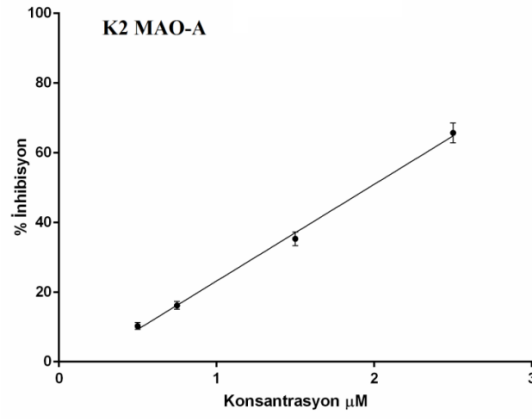
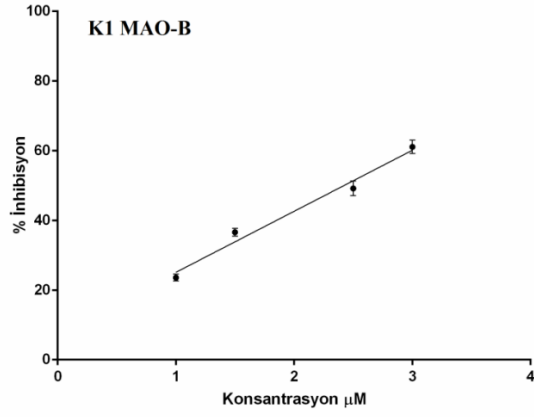
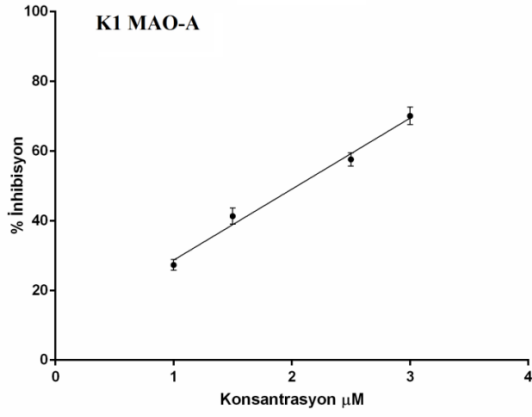
MAO-A ve MAO-B enzim aktivitesi tayini Bölüm 2.3.2'ye göre yapıldı. MAO-A ve MAO-B enzim reaksiyonu sonucu floresans şiddetlerindeki değişim sırasıyla 9609 ve 9677 olarak ölçüldü ve Şekil 3.1'de verildi.



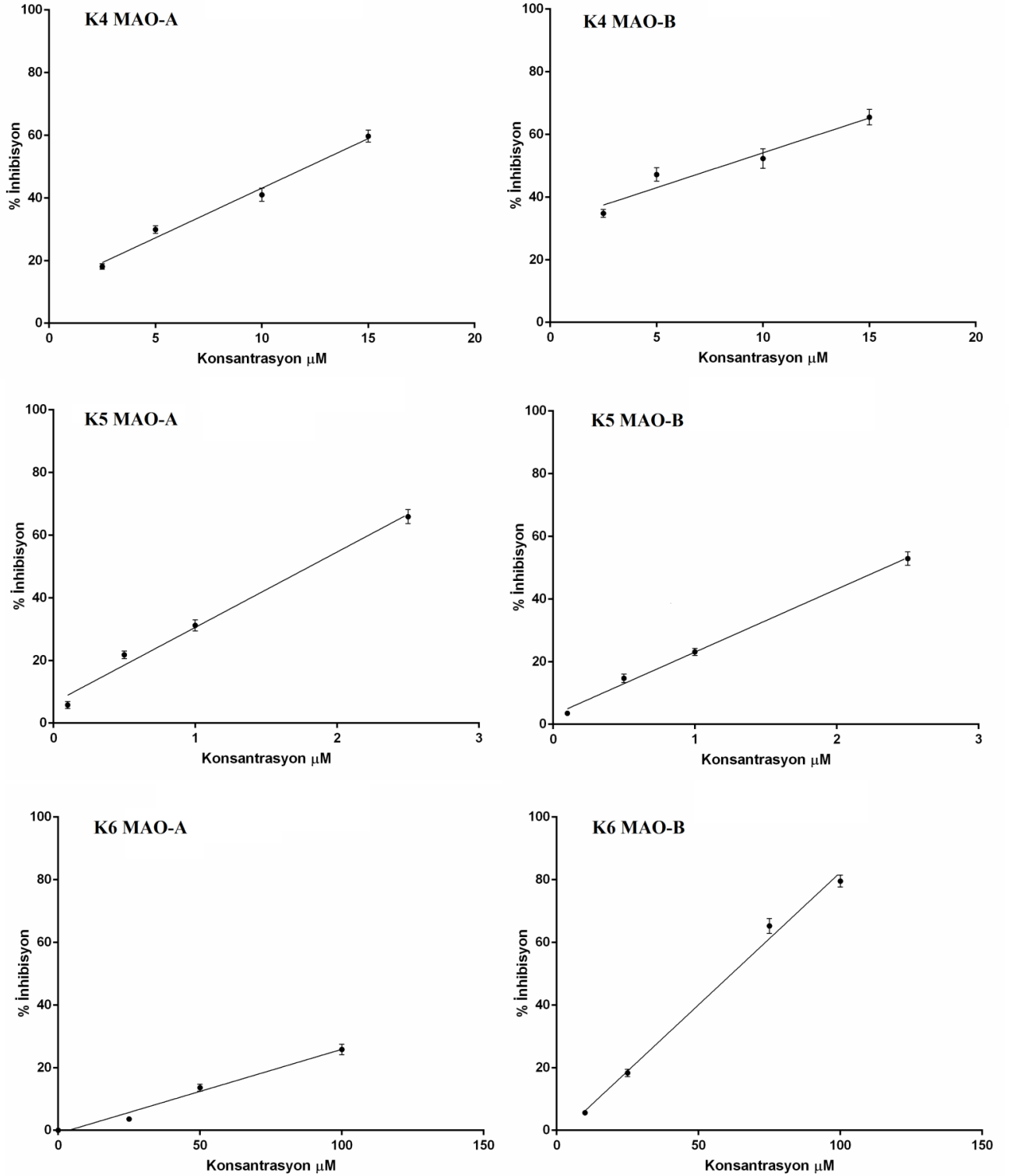
Şekil 3.1 Zamana bağlı olarak hMAO-A ve hMAO-B enzimleri için floresans değişimi

#### 3.1.2 İnhibisyon çalışmaları

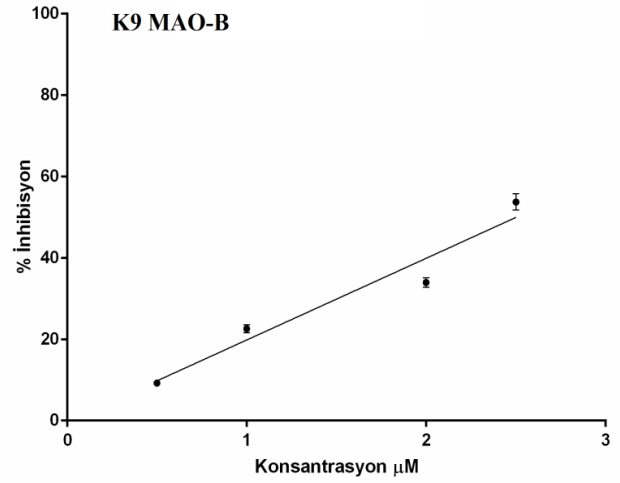
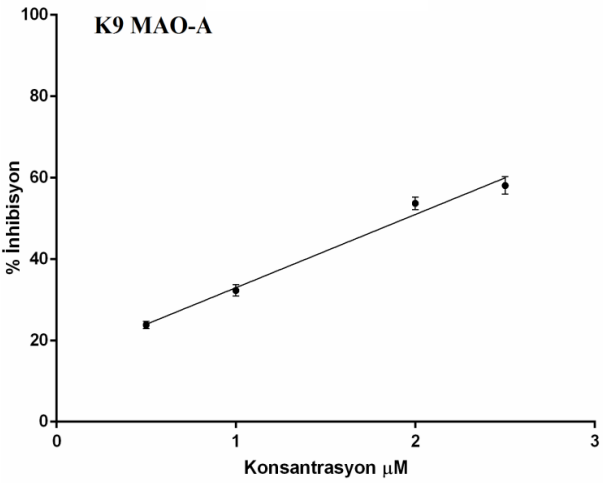
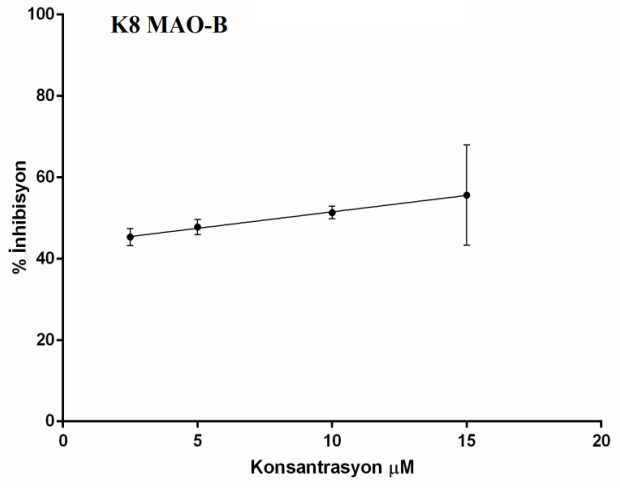
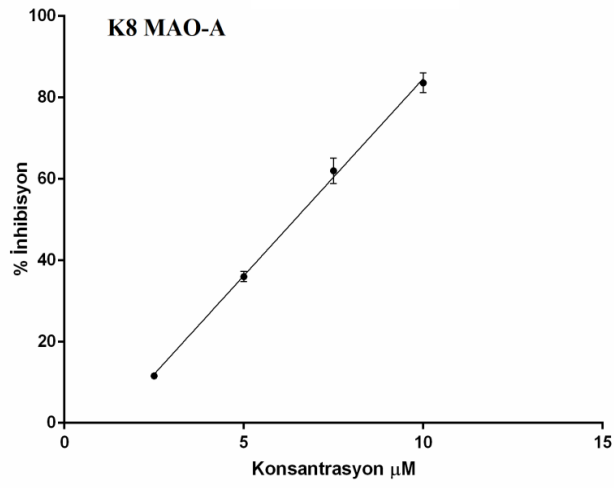
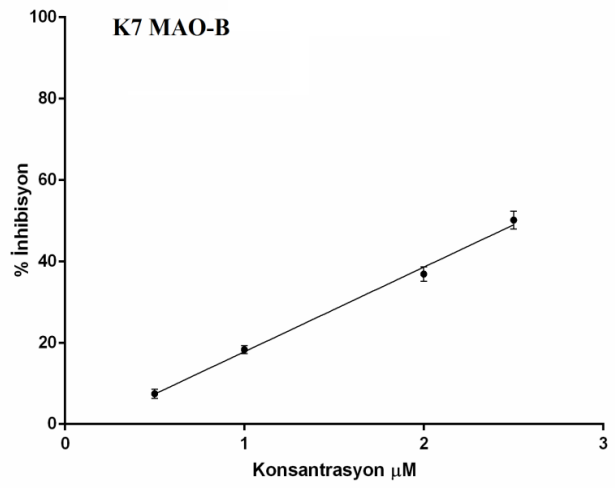
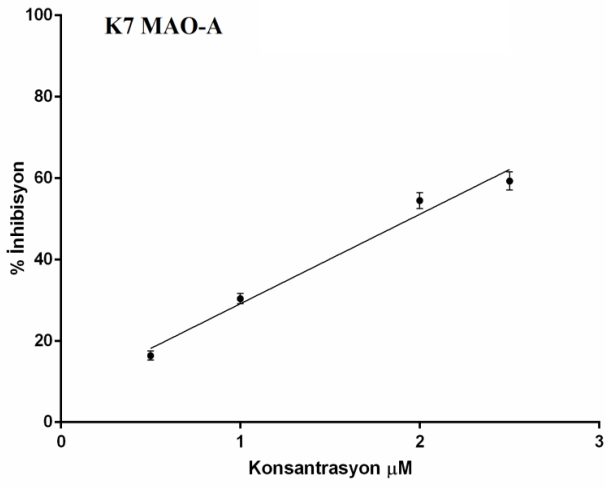
21 adet Kumarin türevleri (K1-K21) ile inhibisyon çalışmaları Bölüm 2.3.3'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi ve her bir kumarin bileşiği için elde edilen % inhibisyon değerlerine karşılık gelen inhibitör konsantrasyonlarının grafikleri Şekil 3.2'de verildi.



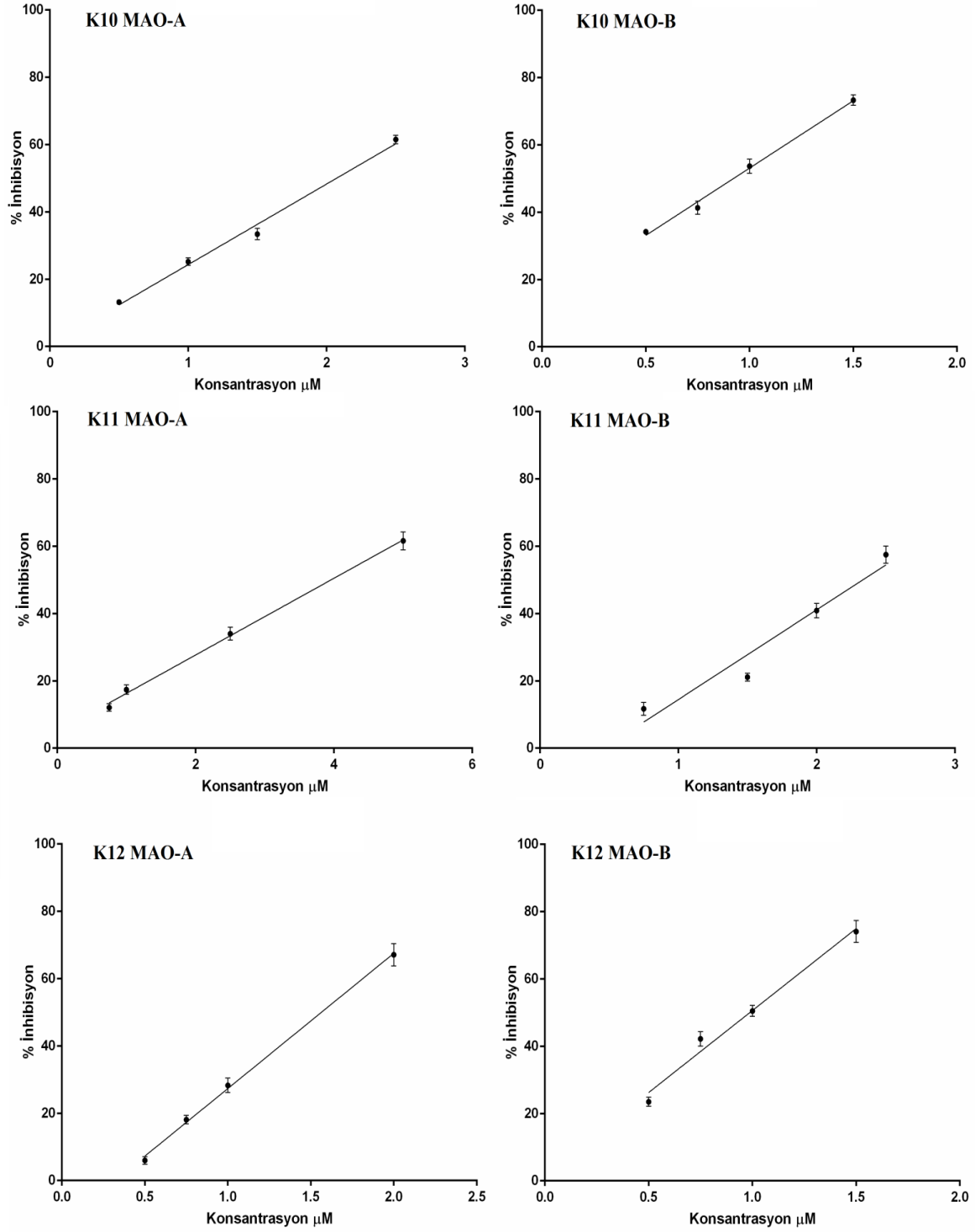
**Şekil 3.2** Kumarin türevlerinin % inhibisyon grafikleri- inhibitör konsantrasyonu



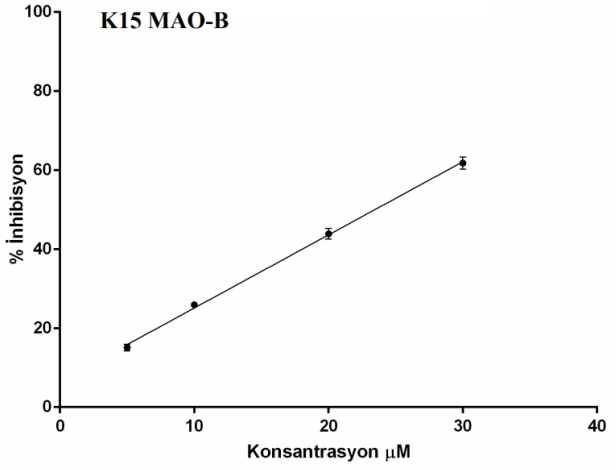
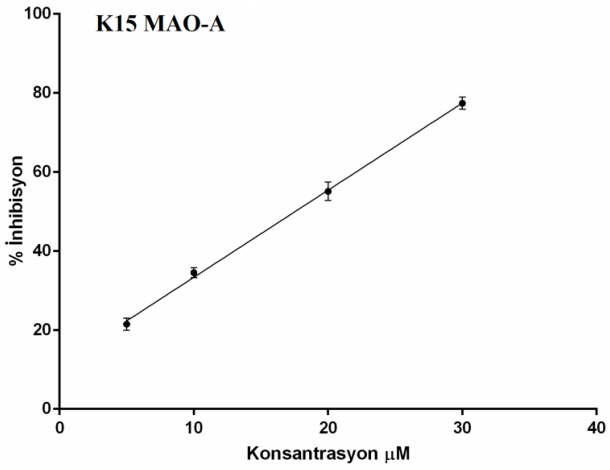
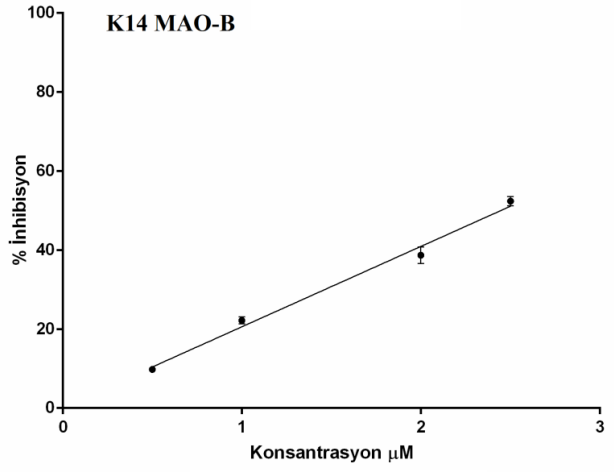
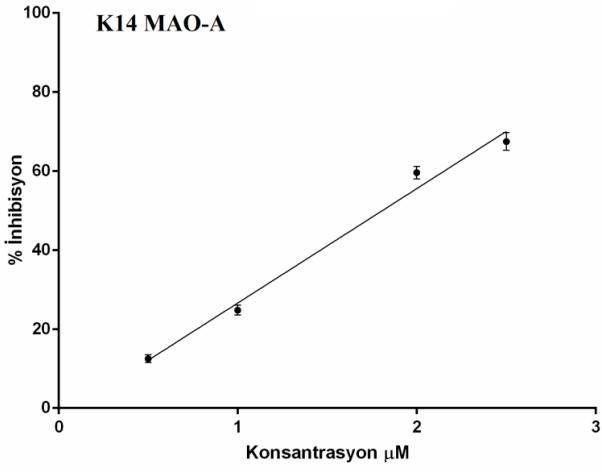
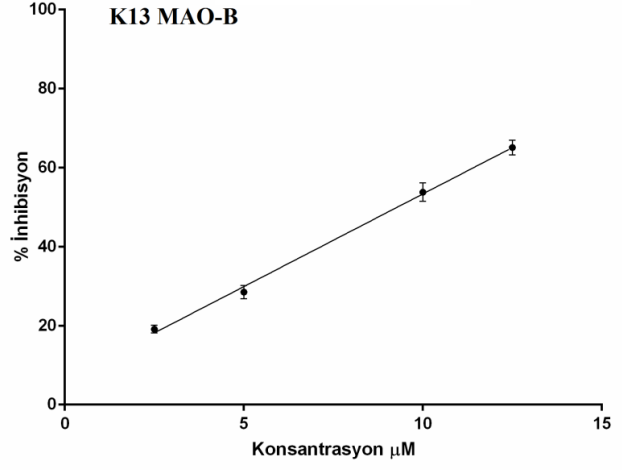
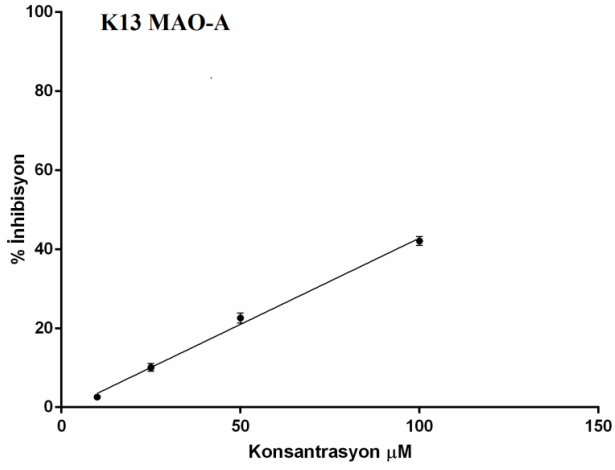
**Şekil 3.2** Kumarin türevlerinin % inhibisyon grafikleri- inhibitör konsantrasyonu (devam)



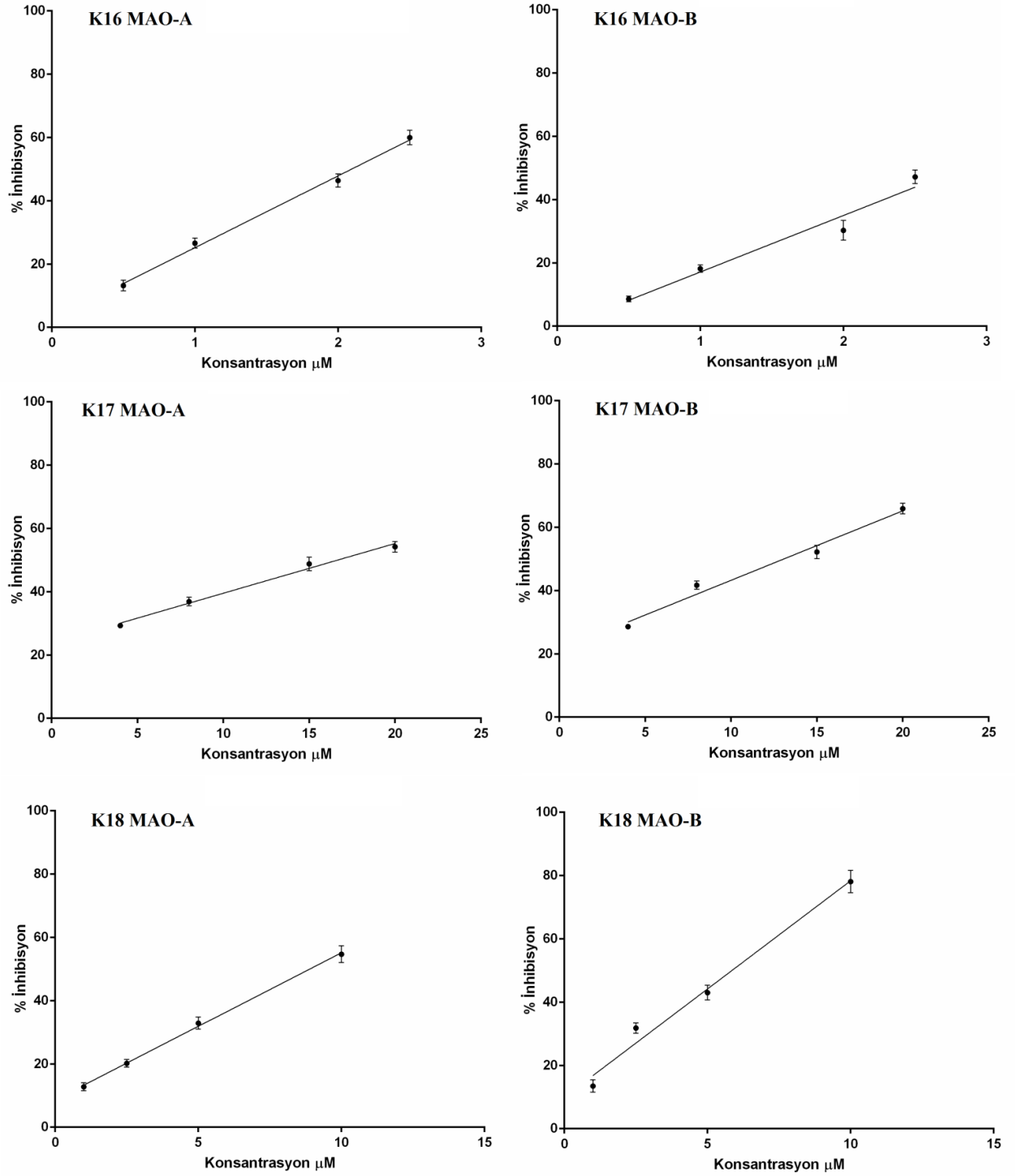
**Şekil 3.2** Kumarin türevlerinin % inhibisyon grafikleri- inhibitör konsantrasyonu (devam)



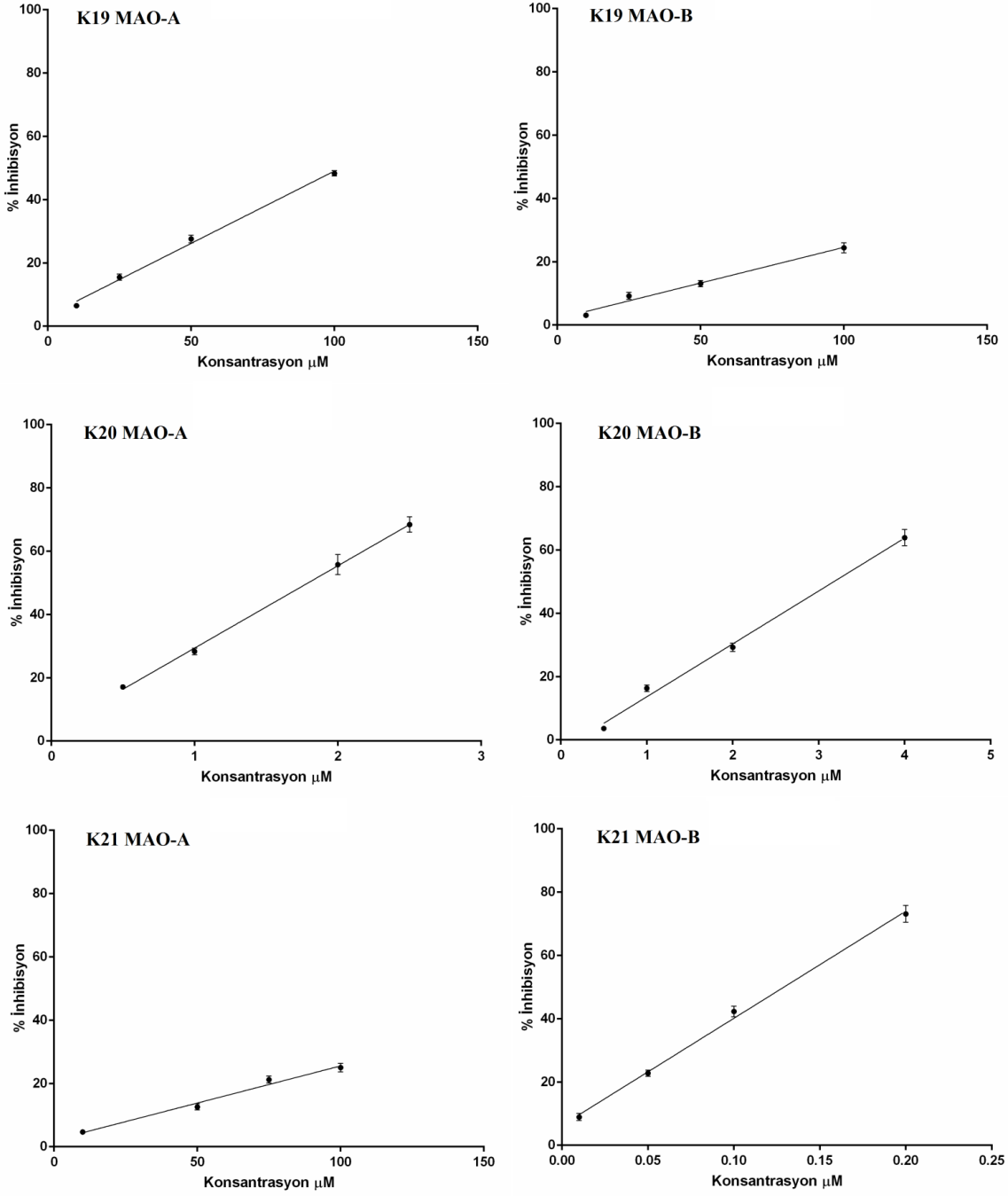
**Şekil 3.2** Kumarin türevlerinin % inhibisyon grafikleri- inhibitör konsantrasyonu (Devam)



**Şekil 3.2** Kumarin türevlerinin % inhibisyon grafikleri- inhibitör konsantrasyonu (Devam)

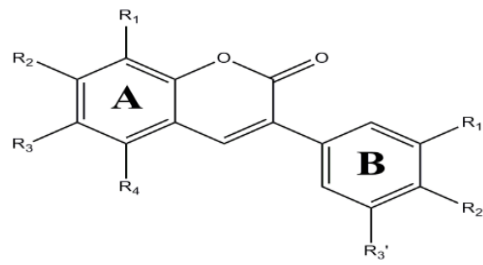


**Şekil 3.2** Kumarin türevlerinin % inhibisyon grafikleri- inhibitör konsantrasyonu (Devam)



**Şekil 3.2** Kumarin türevlerinin % inhibisyon grafikleri- inhibitör konsantrasyonu (Devam)

Tablo 3’de, Şekil 3.2’ de verilmiş olan grafiklerin lineer regresyonu ile hesaplanan,  $IC_{50}$  değerleri ve seçicilik indeksleri (SI) gösterilmiştir.



**Tablo 3** Kumarin türevlerinin yapıları, IC<sub>50</sub> değerleri ve seçicilik indeksleri (SI)

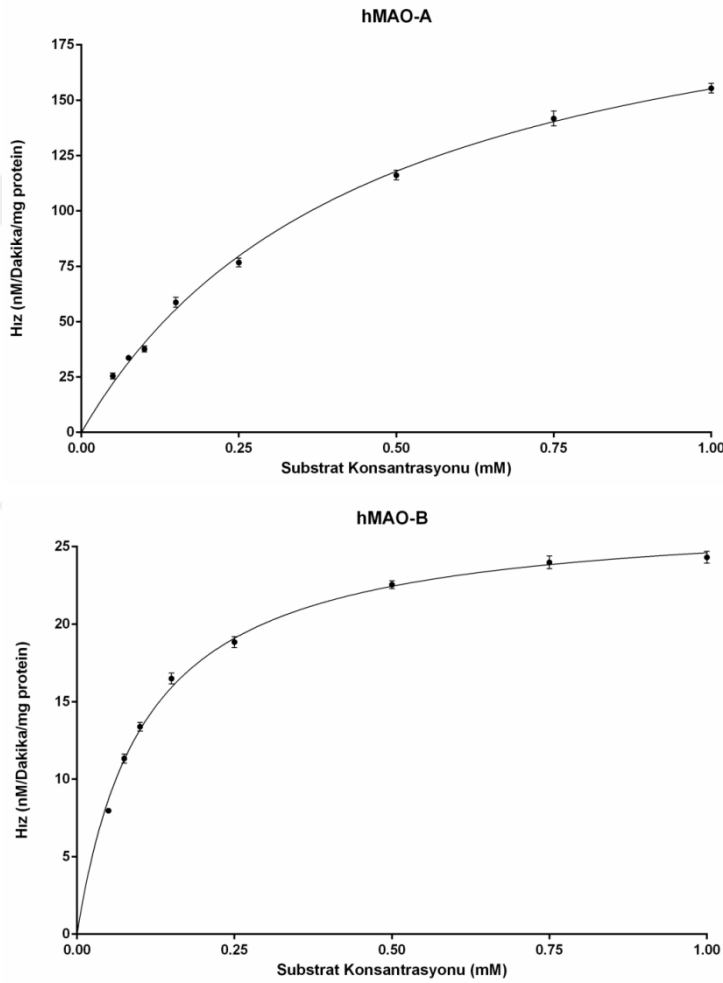
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub> '	R <sub>2</sub> '	R <sub>3</sub> '	MAO-A IC <sub>50</sub> (µM)	MAO-B IC <sub>50</sub> (µM)	SI (IC <sub>50</sub> <sub>MAO-A</sub> / IC <sub>50</sub> <sub>MAO-B</sub> )
1	-H	-OH	-OH	-H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	-H	2.04±0.16	2.43±0.06	0.84
2	-H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	-H	-OAc	-OAc	-H	14.03±1.13	10.14±1.72	1.38
3	-H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	-H	-OH	-OH	-H	1.97±0.22	2.56±0.11	0.77
4	-H	-OAc	-OAc	-H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	-H	12.17±1.38	8.24±1.32	1.48
5	-H	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	1.79±0.09	2.34±0.15	0.76
6	-H	-OAc	OCH <sub>3</sub>	-H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	-H	182.12±2.36	61.29±1.89	2.97
7	-OH	-OH	-H	-H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	-H	1.94±0.17	2.54±0.12	0.76
8	-OAc	-OAc	-H	-H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	-H	6.43±0.62	8.14±1.16	0.79
9	-OH	-OH	-H	-H	CH <sub>3</sub>	-H	-H	1.95±0.04	2.50±0.18	0.78
10	-OH	-OH	-H	-H	-H	NO <sub>2</sub>	-H	2.07±0.08	0.91±0.04	2.27
11	-OH	-OH	-H	-H	-H	-H	-H	3.95±0.21	2.33±0.12	1.7
12	-OH	-OH	-H	-H	-H	CH <sub>3</sub>	-H	1.56±0.06	0.99±0.07	1.58
13	-H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	-H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	-H	115.59±2.01	9.28±1.16	12.46
14	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H	1.80±0.16	2.45±0.19	0.73
15	-H	-OH	-H	-OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	17.5±1.12	23.36±2.15	0.75
16	-H	-OH	-OH	-H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	2.09±0.04	2.84±0.13	0.74
17	-H	-OAc	-H	-OAc	-OAc	-OAc	-H	16.84±1.29	13.00±2.11	1.3
18	-H	-OAc	-OAc	-H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	8.92±0.84	5.83±0.56	1.53
19	-H	-OAc	-H	-OAc	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	102.65±2.89	213.2±3.31	0.48
20	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-H	1.77±0.05	3.14±0.33	0.56
21								204.09±2.68	0.13±0.02	1607
	Selejilin							62.82±2.08	0.02±0.01	3141
	İproniazit							5.97±0.56	7.48±0.75	0.8
	Rasajilin							14.2±1.13	0.07±0.01	202.9

-Her IC<sub>50</sub> değeri üç farklı denemenin ortalaması ± standart sapması olarak verilmiştir (n=3)

-MAO-A IC<sub>50</sub> değerlerine karşılık gelen MAO-B IC<sub>50</sub> değerleri için P <0.01, (ANOVA/Dunnett testi)

### 3.1.3 İnhibisyon Mekanizması

Çalışmamızda kullanılan MAO-A ve MAO-B enzimlerine ait kinetik parametreler Bölüm 2.3.4’de anlatıldığı şekilde p-tiramin substratı kullanılarak tayin edildi.  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri Şekil 3.3’de verilen Michealis Menten grafiklerinden GraphPad Prism programı yardımıyla hMAO-A;  $K_m$  0.4617±0.002 mM,  $V_{maks}$  226.8±3.685 nM/Dakika/mg protein, hMAO-B;  $K_m$  0,106±0.003 mM,  $V_{maks}$  27.22±0.199 nM/Dakika/mg protein olarak hesaplandı.

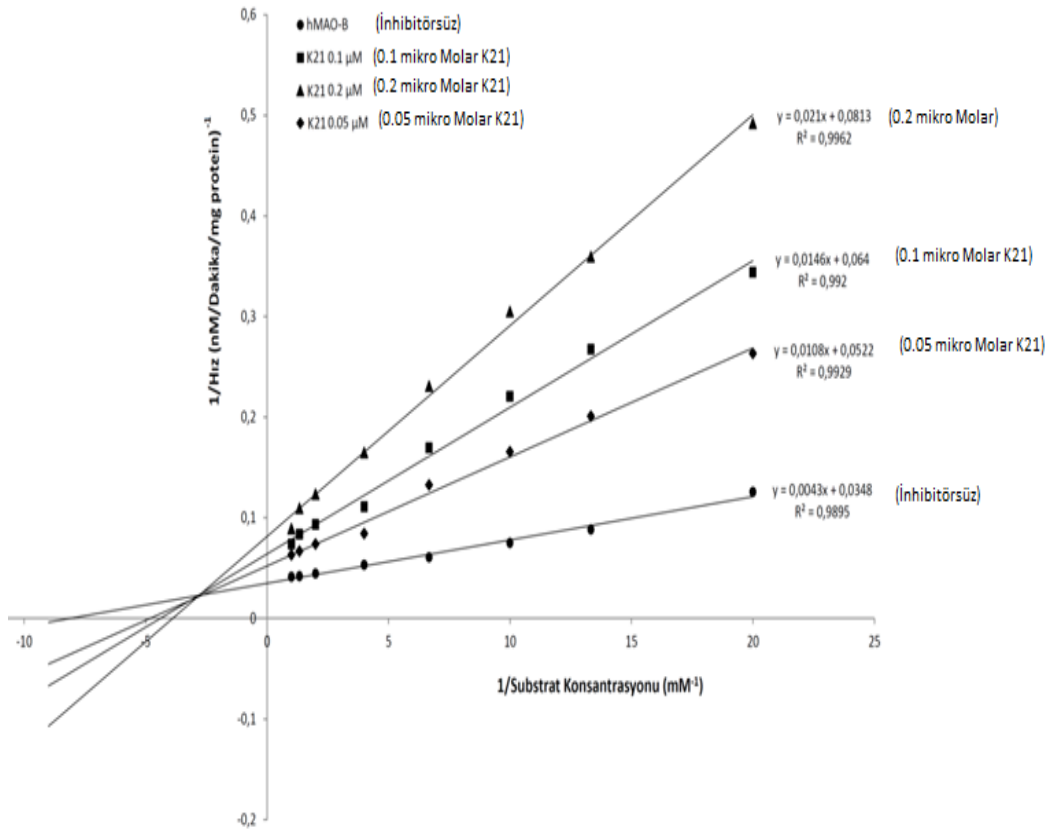


Şekil 3.3 hMAO-A ve hMAO-B enzimlerine ait Michealis Menten grafikleri

Yapılan çalışmalarda en yüksek inhibisyon aktivisine sahip olduğu belirlenen 21 numaralı kumarin türevinin inhibisyon mekanizması Bölüm 2.3.4’de anlatıldığı şekilde araştırıldı ve elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 3.4’de verildi.

İnhibisyon grafiğın yardımıyla inhibisyon tipi belirlendi. Elde edilen grafiğe göre inhibisyon tipi “**karışık inhibisyon**” olarak belirlendi. Bilindiği gibi karışık inhibisyonda; inhibitör enzime ya da enzim substrat kompleksine bağlanmaktadır. Aktif olmayan EI ve ESI kompleksleri oluşturabilir, substrat ve inhibitör enzime aynı anda bağlanabilir. Karışık inhibitörün etkisi, enzimin katalitik aktivitesini düşürerek gözlenmektedir. Bu tip inhibisyonda, inhibitör ile substrat arasında yarışma yoktur. Substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla inhibisyon ortadan kaldırılamaz, enzimin  $K_m$  değeri sabit kalırken  $V_{maks}$  değeri azalmaktadır (Horton ve ark., 2000).

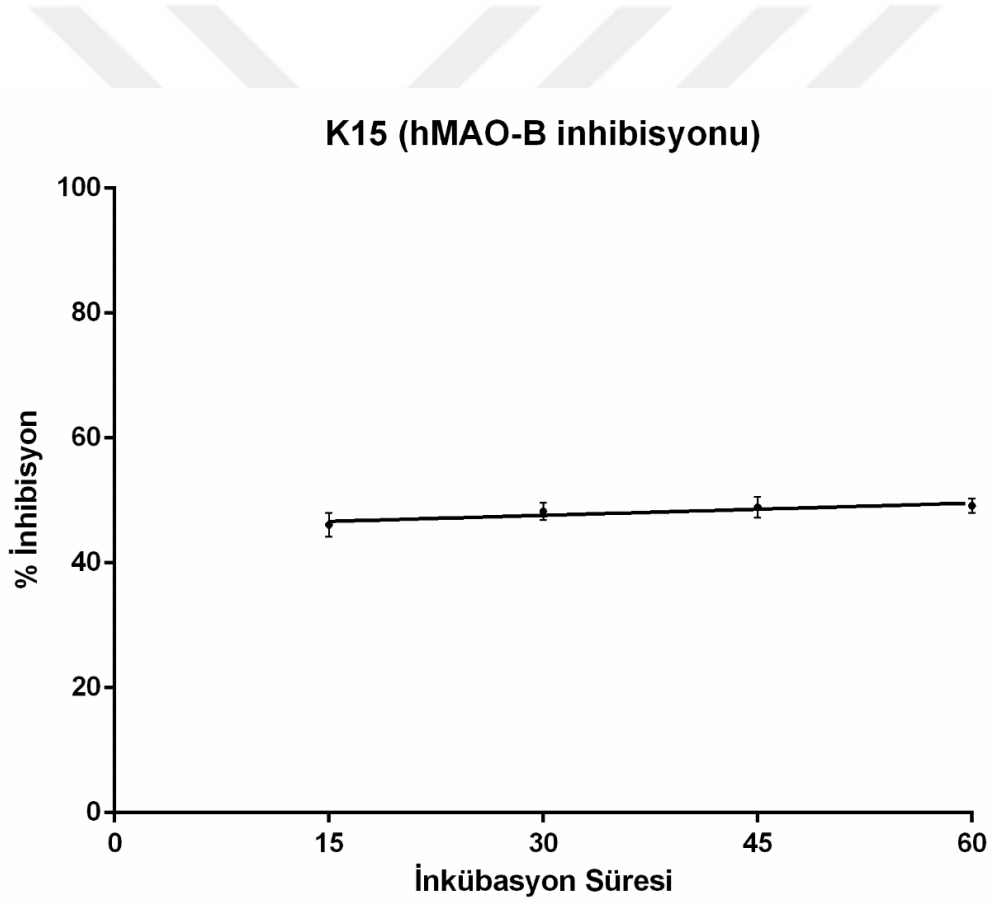
Belirlenen inhibisyon tipi göz önüne alınarak ve GraphPad Prism programı kullanılarak 21 numaralı kumarin türevinin  $K_i$  değeri  $0,0315 \pm 0,004 \mu M$  olarak hesaplandı.



**Şekil 3.4** 21 numaralı kumarin türevinin MAO-B’yi inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği

### 3.1.4 Geri dönüşümlülük

En yüksek aktivite gösteren 21 numaralı kumarin türevi ile gerçekleşen inhibisyon geri dönüşümlü olup, elde edilen sonuçlar Şekil 3.5’de verildi. En yüksek aktiviteyi gösteren kumarin türevi ile gerçekleştirilen inhibisyonun geri dönüşümlü olup olmadığının belirlenmesi amacıyla 3-(fenildiazenil)-4-hidroksikumarin bileşiği IC50 değeri olan 0.13  $\mu$ M konsantrasyonda 4 farklı örnek hazırlandı ve substrat eklenerek, farklı zamanlarda (15, 30, 45 ve 60 dakika) inkübe edildi ve enzimatik aktivite Bölüm 2.3.3’de anlatıldığı şekilde tayin edildi (Hammuda 2016). 21 numaralı kumarin türevinin inhibisyonu inkübasyon zamanına bağlı olmadığı bulundu. Bu sonuç bağlanmanın geri dönüşümlü olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 3.5 21 numaralı kumarin türevine ait inkübasyon süresi – hMAO-B % inhibisyon grafiği

### 3.1.5 Lipinski beş kuralı

Kumarin türevlerinin drog olarak kullanılabilirliğini ölçmek için Lipinski'nin beş kuralı uygulandı. Kullanılan kumarin türevlerinin tamamının hidrojen bağı donörleri sayısının (0-4), hidrojen bağı akseptörleri sayısının (4-10), molekül ağırlıklarının (254-454 Da) ve logP değerlerinin (1,382-3,843) olduğu tespit edildi. Bölüm 2.3.6'da belirtilen Lipinski'nin beş kuralında verilen değerler ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 4** Çalışmamızda kullanılan kumarin bileşiklerine ait Lipinski tablosu

Bileşik	Log <i>P</i> *	Moleküler	TPSA**	<i>n</i> -OH akseptör***	<i>n</i> -OHNH donör****	Hacim
1	2,391	314,293	89,135	6	2	267,122
2	1,997	398,367	101,289	8	0	340,145
3	2,391	314,293	89,135	6	2	267,122
4	1,997	398,367	101,289	8	0	340,145
5	1,776	286,239	111,123	6	4	232,066
6	2,501	370,357	84,218	7	0	321,162
7	2,62	314,293	89,135	6	2	267,122
8	2,194	398,367	101,289	8	0	340,145
9	3,398	268,268	70,667	4	2	232,592
10	2,932	299,238	116,491	7	2	239,365
11	2,974	254,241	70,667	4	2	216,031
12	3,422	268,268	70,667	4	2	232,592
13	2,61	344,36	63,24	6	0	308,39
14	2,005	286,239	111,123	6	4	232,066
15	2,574	344,319	98,369	7	2	292,668
16	2,376	344,319	98,369	7	2	292,668
17	1,382	454,387	135,431	10	0	378,112
18	1,981	428,393	110,523	9	0	365,691
19	2,376	428,363	110,523	9	0	365,691
20	1,974	286,239	111,123	6	4	232,066
21	3,843	266,256	75,167	5	1	227,117

\*logP—oktanol/su dağılım katsayısı

\*\*TPSA—topolojik polar yüzey alanı

\*\*\*n-OH—hidrojen akseptörleri sayısı

\*\*\*\*n-OHNH—hidrojen bağı donörleri sayısı

## 4. TARTIŞMA

Çalışmamızda Bölümümüz Biyokimya ve Organik Kimya Laboratuvarlarında sentezlenmiş ve yüksek antioksidan özellik gösterdiği bulunmuş olan (Danış ve ark. 2016). 21 adet kumarin türevinin ilk kez olarak insan MAO-A ve MAO-B enzimi aktivitesi üzerine olan etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir. 3-aril kumarin türevlerinin, genel olarak düşük mikromolar seviyede MAO-A'yı inhibe ettiği saptanmıştır. 6, 13, 19 ve 21 numaralı türevler hariç  $IC_{50}$  değerleri 1.56 ve 17.5  $\mu M$  arasında değişmektedir. 6, 15 ve 19 numaralı türevler hariç MAO-B enzimini inhibe ettikleri ve bu bileşiklere ait  $IC_{50}$  değerinin 0.13 - 13  $\mu M$  olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, sadece 13 ve 21 numaralı kumarin türevlerinin MAO-A/B seçicilik etkisine sahip oldukları görülmektedir. 13 numaralı kumarin türevi her ne kadar MAO-B enzimini kısmen seçici olarak inhibe ediyor olsa da (SI = 12.46), MAO-B inhibisyon konsantrasyonu göreceli olarak düşüktür ( $IC_{50} = 9.28 \mu M$ ). Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda 21 numaralı kumarin türevinin (3-fenildiazenil-4-hidroksi kumarin) MAO-B enzimini çok düşük konsantrasyonlarda (MAO-B  $IC_{50} = 0,13 \mu M$ ), seçimli (SI = 1607) ve geri dönüşümlü olarak inhibe ettiği ortaya çıkmaktadır. En yüksek aktivite gösteren bu kumarin türevi için inhibisyon mekanizması karışık inhibisyon ve  $K_i$  değeri 0.0315  $\mu M$  (31.5 nM) olarak tayin edildi. 21 numaralı kumarin türevi yaygın olarak kullanılan seçimli MAO-B inhibitörleri selejilin ve rasajiline yakın bir  $IC_{50}$  değerine (sırasıyla  $IC_{50} = 0,02$  ve 0,07  $\mu M$ ) ve diğer inhibitörlerle karşılaştırılabilecek bir seçimlilik değerine sahiptir (selejilin SI: 3141, rasajilin SI:202.9). Geri dönüşümlü MAO inhibitörleri, enzime genellikle kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanmaktadır. Böylece oluşan enzim-inhibitör kompleksinin ayrılması daha hızlı gerçekleşir ve enzim inhibitörün özelliklerine bağlı olarak aktivitesini zamanla yeniden kazanır.

Rasajilin ve selejilin (L-deprenil) bilindiği gibi anti-Parkinson etkiye sahip seçici ve geri dönüşümsüz MAO-B inhibitörleridir. MAO enzimini seçici olarak inhibe etme yeteneğine sahip olmalarına rağmen bu ilaçların serotonin sendromu, baş dönmesi, bulanık görme, sersemlik gibi santral sinir sistemi yan etkilerinin olması, enzimin aktif bölgesine kovalent olarak bağlanarak geri dönüşümsüz inhibisyon yapması, yüksek dozlarda ve tekrar eden uygulamalarda selektivite kayıpları gibi nedenler tedavideki kullanımlarında önemli kısıtlamalara neden olmuştur (Cesura ve Pletscher, 1992;

Finberg, 2014). Bu saydığımız sebeplerden dolayı yeni inhibitörlerin bulunması arayışı başlamıştır.

Günümüzde seçici ve geri dönüşümlü olarak MAO-A'yı inhibe ettiği bilinen bileşiklere; moklobemid, simoksaton, brofaromin ve befloksaton; seçici ve geri dönüşümlü olarak MAO-B'yi inhibe ettiği bilinen bileşikler ise safinamid ve lazabemid örnek olarak verilebilir (Cesura ve Pletscher, 1992; Bolasco ve ark., 2010; Finberg, 2014). Fakat bu bileşikler geri dönüşümlü inhibisyon yapmalarına rağmen selejilin ve rasajilin'nin etkisine sahip değildir.

Kumarin türevlerinin potansiyel yeni MAO-A ve MAO-B inhibitörü olabileceği düşüncesi ile seçici, bu bileşiklerden yan etkileri azaltılmış, tedavi edici nitelikte yeni öncü bileşikler tasarlanmaktadır (Cesura ve Pletscher, 1992; Finberg, 2014). Literatürlerde yaptığımız incelemelerde sentezlenen yeni kumarin türevlerinin MAO-A ve MAO-B'nin inhibisyonlarına olan etkisini inceleyen çalışmalara ve bizim çalışmamızın sonuçlarına yakın çalışmalara da rastlanmıştır. Bu çalışmalarda da seçimli MAO inhibitörlerine değinilmektedir. İncelenen çalışmalardan ilk olarak, Secci ve arkadaşlarının (Secci ve ark.,2011) yaptığı çalışmalardan bahsedebiliriz. Yapılan çalışmada, sentezlenen kumarin bileşiklerinin 3 pozisyonuna eklenen metil ve fenil grupları ya da hidrojen atomu süstitüsyonları araştırılmıştır. 3-karboksilik asidin anti MAO ajanları, 2a ve 2b olarak isimlendirilmiş kumarin türevlerinin MAO-B izoformlarına kıyasla daha seçici olduğu bulunmuştur. 3 pozisyonuna eklenen karboksilik asit, ester, açıl klorür gruplarının MAO inhibitör aktivitesi ve A/B seçiciliği üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada 3-karboksilik asitin anti MAO ajanları, kumarin türevlerinin MAO-B izoformlarına kıyasla daha seçici olduğu bulunmuştur. 3-aril kumarinler her izoformlarında (3a-e olarak isimlendirilmiş kumarin bileşiğinde) özellikle de 3d olarak isimlendirilen kumarin bileşiğinde çok güçlü anti MAO-B aktivitesini gösterir, bu bileşik için çok düşük bir seçicilik indeksi değerinden söz edebiliriz. Yapılan çalışmada MAO-A ve B için de aynı anda seçicilik gösteren bir kumarin bileşiği karşımıza çıkmamaktadır.

Diğer bir çalışma ise; Abdelhafez ve arkadaşlarının 2013 yılında yayımlanan çalışmasıdır (Abdelhafez ve ark.,2013). Bu çalışmaya göre, sentezlenen yeni kumarin türevlerinin in vitro ve in vivo olarak MAO inhibisyonu etkisi araştırılmıştır. MAO-A

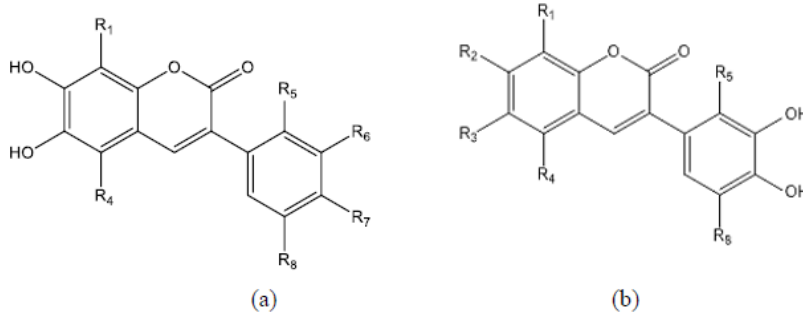
ve B enzimlerinin in vitro aktiviteleri kynuramin substrat olarak kullanarak florometrik bir metot yardımı ile belirlenmiştir. Çalışmada iki MAO izoformu kullanılmıştır. Çalışmada sentezlenen yeni kumarin türevlerinin (1a,b, 2a,b, 3a,b, 4a,b, 5a,b, 6a,b, 7a,b, 8a,b, 9a,b ve 10a,b) in vitro ve in vivo olarak MAO inhibisyonu etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre sentezlenen kumarin türevlerinin En fazla in vitro ve in vivo aktivite gösteren kumarin bileşikleri sırayla, 2-(3,4-dimethylcoumarin-7-yloxy) acetohydrazide (3b olarak isimlendirilen kumarin bileşiği)  $K_i$  değerleri ; (MAO-A için; 5.01 pM ve MAO-B için 0.484  $\mu$ M) ve in vivo olarak  $ED_{50} = 0.009143 \mu$ M ) bulunmuştur. 2-(3,4-dimethylcoumarin-7-yloxy)-N-(2,5dioxopyrrolidin-1-yl) asetamid (7b olarak isimlendirilmiş kumarin bileşiği) in vitro  $K_i$  değerleri ile (MAO-A için ve MAO-B için 6.34 pM 0.575  $\mu$ M) ve in vivo  $ED_{50} = 0.00915 \mu$ M gibi oldukça düşük sayılabilecek değerler bulunmuştur.

Yapılan diğer bir çalışmada, Huang ve arkadaşları 7-aril kumarin türevleri ile yaptıkları çalışmalarda kumarin halkasında 7- pozisyonunda bulunan azot karbon çifte bağının kumarin türevlerinin MAO-B seçimli inhibisyon aktivitesini önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir (Ming ve ark., 2015).

Matos ve çalışma grubu; (Matos ve ark., 2011), 6-metil-3-fenil kumarin türevli bileşik serilerinden olan bileşik 3 ve 6'yı MAO-A ve MAO-B inhibitörleri olarak sentezlemişler ve metoksi 3-fenil ve para-hidroksi analogları ile karşılaştırmışlardır. Para metoksi süstituenti olan bileşik 3, bileşik 6'ya hidriodik asit eklenmesi ile hidrolize olmuştur. Oluşan bu hibrit bileşikler MAO-B izoenzimleri için yüksek seçicilik göstermektedir. Bu tür hibrit bileşikler düşük nanomolar aralıkta  $IC_{50}$  değerlerine sahiptir ve yüksek MAO-B seçiciliği/aktivitesi göstermektedir. Bileşik 6 için MAO B aktivitesinin  $IC_{50}$  değeri bileşik 3'e göre on kat kadar büyüktür. Meta pozisyonunda metoksi grubu içeren bileşik 4 olarak adlandırılan kumarin bileşiğinin yapılan çalışmalarda referans bileşik R-(-)-deprenil'e göre yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur. Metoksi grubu içeren bileşiğin MAO-B etkisi diğer türevlere göre çok yüksek olduğu görülmüştür. Aynı pozisyonda ise hidroksi grubu olduğunda bu etkinin düştüğü bulunmuştur (Matos ve ark., 2009). Matos ve grubu yaptıkları çalışmalarda, yapıdaki küçük değişimlerin molekülün afinitesinde büyük değişimlere neden olabileceği sonucuna varmışlardır. Bu sonuç da MAO aktivitesi ve seçiciliğini anlamamıza yardımcı olmaktadır. Çalışmalar neticesinde ortaya çıkan ilginç

sonuçlardan biri de meta metoksi pozisyonunda bulunan bileşiklerin MAO inhibiyon aktivitesini göstermeleridir. Metoksi sübstitientinin fenil halkasında 3 pozisyonundaki yerinin değişimi, sentezlenen kumarinin farmakolojik açıdan ciddi bir potansiyele sahip olduğunu ortaya çıkarmaktadır.

Orto pozisyonunda yapıda hidroksil grubu olması laboratuvarımızda sentezlenen kumarin türevleri ile benzerlik göstermektedir. Yapılan doking çalışmalarında 3-aril kumarin bileşiklerinde ortak gözlenen yapılar gösterilmiştir Şekil 4.1 de, 3-aril kumarin bileşiklerinde ortak gözlenen yapılar belirtilmiştir. Üstelik bu bileşik MAO-B izoenzimleri için seçicidir. Hibrit bileşikler MAO-B izoenzimleri için yüksek seçicilik göstermektedir. Bu tür hibrit bileşikler düşük nanomolar aralıkta dahi yüksek aktivite göstermektedir. 3 fenil halkasına meta metoksi grubu bağlandığında da orto ve para pozisyonuna göre yüksek aktivite gösterdiği birçok kez çalışmalarda gösterilmiştir. (Erzincan, 2016).



**Şekil 4.1** 3-aril kumarin bileşiklerinde ortak gözlenen yapılar

## SONUÇ

Sentezlemiş olduğumuz 21 numaralı kumarin türevi yaygın olarak kullanılan seçimli MAO-B inhibitörleri selejilin ve rasajiline yakın bir IC50 değerine sahiptir. MAO-B enzimine karşı yüksek inhibisyon aktivitesine ve seçimliğine sahip bu kumarin türevinin Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıkların tedavisinde MAO-B enziminin inhibisyonu için kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla daha ileri in vivo çalışmaların ve toksisite denemelerinin gerçekleştirilmesi gereklidir.



## KAYNAKLAR

- Abad, E. Zenn R.K ve Kastner J., (2013) Reaction mechanism of Monoamine oxidase from QM/MM calculations. *J.Phys. Chem. B*, (117)46 14238-14246
- Abdelhafez, O.M.; Amin, K.M.; Ali, H.I.; Abdalla, M.M. ve Batran, R.Z.: (2013) Monoamine oxidase A and B inhibiting effect and molecular modeling of some synthesized coumarin derivatives. *Neurochem. Int.*, 2013, 62, 198-209.
- Adams (1984) , *Journal of oral rehabilitation* volume 11, 1984, 233–235.
- Akyüz, M.A. ve Erdem, S.S. (2013) Computational modeling of the direct hydride transfer mechanism for the MAO catalyzed oxidation of phenethylamine and benzylamine: ONIOM (QM/QM) calculations. *J. Neurol. Transm.*, 120,937-945
- Anand, P. Singh, B. ve Singh, N., (2012). "A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease", *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20: 1175-1180
- Angelo Carotti, Antonio Carrieri,<sup>a</sup> Stefano Chimichi,<sup>b</sup> Marco Boccalini,<sup>b</sup> Barbara Cosimelli,<sup>c</sup> Carmela Gnerre,<sup>d</sup> Andrea Carotti,<sup>a</sup> Pierre-Alain Carrupt<sup>d</sup>, Bernard Testad (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12 3551–3555)
- Bachman, MD, P. A. Wolf, MD, R. Linn, PhD, J. E. Knoefel, MD, J. CobbS, MPH, A. Belanger, BS, R. B. D'Agostino, PhD and L. R. White, MD (1992) Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham Study *Neurology* January 1992 vol. 42 no. 1 115
- Binda, C., Newton-Vinson, P., Hubálek, F., Edmondson, D. E., Mattevi, A. (2002). Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nat. Struct. Biol.* 9, 22-26
- Bolzan, D.A and Bianchi, N.O. (1997). Bianchi, Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking, *Clin. Biochem.* 30:6449-454

- Borges, F. Roleira, F. Milhazes, N. Santana, L. ve Uriarte, E.,(2005). Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity, *Current medicinal chemistry*, 12: 887-916.
- Cai, Z. (2014). Monoamine oxidase inhibitors: Promising therapeutic agents for Alzheimer's disease (Review). *Molecular Medicine Reports*, 9, 1533-1541.
- Cakir K., Erdem S. Ve Atalay V. (2016) ONIOM calculations on serotonin degradation by monoamine oxidase B: insight into the oxidation mechanism and covalent reversible inhibition, *Org. Biomol. Chem.*, 2016,14, 9239.
- Cesura, M.A., Pletscher, A. (1992) The New Generation of Monoamine Oxidase Inhibitors. *Progress in Drug Research*, 38, 171-297.
- Ceylan ME, Oral ET. (2001) Araştırma ve Klinik Uygulamada Biyolojik Psikiyatri Duygudurum Bozuklukları, 4.Cilt, İstanbul, syf 73-99.
- Chaurasiya, N.D.; Ganesan, S.; Nanayakkara, N.P.D, Dias, L.R.S (2012); Walker, L.A. ve Tekwani, B.L.: Inhibition of human monoamine oxidase A and B by 5-phenoxy 8-aminoquinoline analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, 22, 1701-1704.
- Coutts, R. T., Baker, G. B., Danielson (2000) Neurochemical and metabolic aspects of antidepressants: an overview *Journal Psychiatry Neuroscience*. 2000 Nov; 25(5): 481–496.
- Daniş Özkan, Serap Demir, Cihan Gündüz, Alparslan Mustafa Muhlis, Altun Selçuk, Yüce-Dursun (2016). Synthesis of selected 3- and 4-arylcoumarin derivatives and evaluation as potent antioxidants. *Research on Chemical Intermediates* 42 (6), 6061–6077)
- Dawey W, Tivey DJ. (1958), *J.Chem. Soc.*, (1320).
- De Colibus, L., Li, M., Binda, C., Lustig, A., Edmondson, D. E., Mattevi, A. (2005) Three dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): Relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 12684-12689
- Delogu ve diğ., 2011 Function and Expression, *Molecular Biological Studies of Monoamine Oxidase: Structure and Function*. *Biochem. Soc.Trans.* 19, 199-201

- Dostert, P., Strolin Benedetti, M. (1991) Structure-modulated recognition of substrates and inhibitors by monoamine oxidases A and B. *Biochem. Soc. Trans.* 19, 207-211
- Edmondson, D. E., Binda, C., Mattevi, A. (2004) The FAD Binding Site of Human Monoamine Oxidase A and B. *NeuroToxicology*, 25, 63–72
- Edmondson, D. E., Binda, C., Mattevi, A. (2007) Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases A and B. *Archives of Biochemistry*, 464,269-276.
- Erzincan, (2016) Çift etkiye sahip potansiyel antioksidan ve anti-parkinson ilaç aktif maddelerin in-siliko tasarımı Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- Fitzpatrick P.F. (2010) Oxidation of amines of flavoproteins *archives of Biochemistry and Biophysics* 493, 13-25
- Gnerre S1, Maccallum I, Przybylski D, Ribeiro FJ, Burton JN, Walker BJ, Sharpe T, Hall G, Shea TP, Sykes S, Berlin AM, Aird D, Costello M, Daza R, Williams L, Nicol R, Gnirke A, Nusbaum C, Lander ES, Jaffe DB. (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Halliwell, B. (1997) Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutr. Rev.* 55(1):S44–S52
- Herdegen T., (1997) Neurobiologisches Grundlagen der Funktion und degenerativen Störungen des Nervensystems. In: herdegen T. Et al. *Klinische Neurobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, heilderberg, 1-38
- Holt, A., Sharman, D.F., Baker, G.B., Pelcic, M.M. (1997) Continuous spectrophotometric assay for monoamine oxidase and related enzymes in tissue homogenates. *Anal Biochem*, 244, 384-392
- Horton, H.R. ve Moran, L.A., (2000) *Principles of biochemistry*.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ. (2010) *Biyokimya*. 7. Baskı, Bizim Büro Basımevi Yayın-Dağıtım, Ankara, Türkiye, 89-115.
- Kırılı S (2000) *Depresyonun Biyolojik Oluşumu ve Farmakolojik Tedavisi*, Roche, Bursa

- Kulkarni, M.V. Kulkarni, G.M. Lin, C.-H. ve Sun, C.-M., (2006) Recent advances in coumarins and 1-azacoumarins as versatile biodynamic agents, *Current medicinal chemistry*, 13: 2795-2818.
- Lee, S. Sivakumar, K. Shin, W.-S. Xie, F. ve Wang, Q., (2006) Synthesis and anti-angiogenesis activity of coumarin derivatives, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 16: 4596-4599.
- Legoabe, L.J.; Petzer, A.; Petzer, J.P. (2012) Selected chromone derivatives as inhibitors of monoamine oxidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 5480-5848.
- Lu, X.; Rodriguez, M.; Ji, H. ve Silvermann, R.B. (2002) *Flavins and Flavoproteins 2002*, eds. S. Chapman, R. Perham and N. Scrutton, Rudolf Weber Agency for Scientific Publications, Berlin, , p.817.
- Matos, M. J., Viña, D., Vazquez-Rodriguez, S., Uriarte, E., Santana, L. (2012) Focusing on New Monoamine Oxidase Inhibitors: Differently Substituted Coumarins As An Interesting Scaffold. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12, 2210-2239.
- Matos, M. J., Viña, D., Vazquez-Rodriguez, S., Uriarte, E., Santana, L. (2012) Focusing on New Monoamine Oxidase Inhibitors: Differently Substituted Coumarins As An Interesting Scaffold. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12, 2210-2239.
- Maurer, K., Maurer, U., (2003) *Alzheimer: The Life of a Physician and Career of a Disease*. New York: Columbia University Press, New York, USA.
- Mehra H.S. J. (1968) *Indian Chem Soc.*, 45, (178) Mitochondrial Monoamine Oxidase Catalyzed Amine Oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 7126-7128
- Ming Huang, Sai-Sai Xie, Neng Jiang, Jin-Shuai Lan, Ling-Yi Kong, Xiao-Bing Wang (2015) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25 508–513
- Molinspiration Cheminformatics (Bratislava-Slovak Republic, 1986), <http://www.molinspiration.com> Accessed 13 Nov 2015
- Mouradian MM, Juncos JL, Fabbrini G, Chase TN (1989) Motor fluctuations in Parkinson's disease. *Ann Neurol.*;25: 633-634.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. and Lehninger, A. (2013) *L. Lehninger principles of biochemistry* - W.H. Freeman and Company - New York

- Olanow, C. W (1993) MAO-B Inhibitors in Parkinson's Disease. *Adv. Neurol.* 60 (Parkinson's Disease), 666-671
- Parkinson Study Group (1989) Effect of deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *N Engl J Med.*; 321:1364-1371.
- Parkinson Study Group (1993) Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *N Engl J Med.*; 328:179-183.
- Pendlebury W.W., Solomon P.R. (1994) Alzheimer's Disease: Therapeutic Strategies for the 1990s. *Neurobiology of Aging*, 15(2), 287-289
- Peng, X.M., Damu, G. L.V., Zhou, C.H. (2013) Current Developments of Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry, *Current Pharmaceutical Design*, 19, 3884-3930.
- Powell, J. F. (1991) Amines Oxidases: Structure, Abdelhafez, O.M.; Amin, K.M.; Ali, H.I.; Abdalla, M.M. ve Batran, R.Z (2013) Monoamine oxidase A and B inhibiting effect and molecular modeling of some synthesized coumarin derivatives. *Neurochem. Int.*, 2013, 62, 198-209
- Richards, J. G., Saura, J., Ulrich, J., Da Prada, M. (1992) Molecular Neuroanatomy of Monoamine Oxidases. *Psychopharmacology* 106, 21-23.
- Sandler, M., Glover, V., Clow, A., Jarman, J. (1991) Monoamine Oxidase-B, monoamine oxidase-B inhibitors and Parkinson's disease. A role for superoxide dismutase. *Adv. Neurol.* 60 (Parkinson's Disease), 238-241
- Shen, Q., Peng, Q., Shao, J., Liu, X., Huang, Z., Pu, X., Ma, L., Li, Y.M., Chan, A.S.C., Gu, L. (2005) Synthesis and Biological Evaluation of Functionalized Coumarins as Acetylcholinesterase Inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 1307-1315.
- Shinosaki, K., Nishikawa, T., Takeda, M. (2000) Neurobiological Basis of Behavioral and Psychological Symptoms in Dementia of The Alzheimer Type. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 54(6), 611-620
- Silverman, R. B. (1991) The use of mechanism-based inactivators to probe the mechanism of monoamine oxidase. *Biochem. Soc. Trans.* 19, 201-206

- Silverman, R. B., Hoffman, S. J., Catus III, W. B. Silverman, R. B., Hoffman, S. J., Catus III, W. B. (1982) A Mechanism for Mitochondrial Monoamine Oxidase Catalyzed Amine Oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 7126-7128
- Sohol, RS. (1993). The free radical hypothesis of aging. An appraisal of the current status. *Aging* ; 5:3-17
- Stahl, S.M. ve Felker, A. (2008): Monoamine Oxidase Inhibitors: A Modern guide to an unrequited class of antidepressants.. *CNS Spectr.*, 13, 855-870.
- Tolosa E., Valldoriola F., Marti MJ. (1994) New and emerging strategies for improving levodopa treatment *Neurology*; 35-44.
- Türkkan, S., (2013) Monoamin Oksidaz (MAO) İnhibitör Etkili Yeni Pirazolin Türevleri ile Moleküler Doking. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye
- Van den Berg, D.; Zoellner, K.R.; Ogunrombi, M.O.; Malan, S. F.; Terre'Blanche, G.; Castagnoli, N.; Bergh, J.J. ve Petzer, J.P. (2007) Inhibition of monoamine oxidase B by selected benzimidazole and caffeine analogues. *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, 15, 3692-3702
- Van Praag HM (1984) Studies in the mechanism of action of serotonin precursors in depression. *Psychopharmacol Bull*, 20:599-602.
- Venugopala, K.N. Rashmi, V. ve Odhav, B., (2013). "Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity", *BioMed research international*, 2013.
- Voigtlander von., P.F., Fici G.J., Althaus J.S. (1999) Pharmacological approaches to counter the toxicity of dopa. *Aminoacids* 14, 189-196 Oertel W.H., Kupsch A.: Pathogenese der Parkinson- Krankheit. In: Huffmann G.Klinische Neurologie, Bd. II. Einhorn- Presse Verlag, Reinbek, 487-497
- Wang, J. Araki, T. Ogawa, T. Matsuoka, M. ve Fukuda, H., (1999). A method of graphically analyzing substrate-inhibition kinetics, *Biotechnology and bioengineering*, 62: 402-411.
- Williams L, Maccallum I, Przybylski D, Ribeiro FJ, Burton JN, Walker BJ, Sharpe T, Hall G, Shea TP, Sykes S, Berlin AM, Aird D, Costello M, Daza R, , Nicol R, Gnirke A, Nusbaum C, Lander ES, Jaffe DB. (2011) *National Academy of Science U S A.*

- Xie, S.S., Wang, X.B., Li, J.Y., Yang, L., Kong, L.Y. (2013) Design, Synthesis and Evaluation of Novel Tacrine-Coumarin Hybrids as Multifunctional Cholinesterase Inhibitors Against Alzheimer's Disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 64, 540-53.
- Yen, G. C. and J. Y. Wu, (1999). Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chem.*, 65, 375-379.
- Yu, P. H., Davis, B. A. (1988) Stereospecific Deamination of Benzylamine Catalyzed by Different Amine Oxidases. *Int. J. Biochem.* 20, 1197-1201.
- Yüce,B., (2006). Hesperidin, Rutin ve 7,8-Dihidroksi-3-(4-Metilfenil) Kumarin Bileşiklerinin Lipit Düşürücü ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması, Marmara Üniversitesi

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** :Elif Şahin  
**Doğum Yeri/ Tarihi** :Adapazarı /22.08.1989  
**Yabancı Dili** :İngilizce  
**E-Posta** :sahin.elif.77@gmail.com

### Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite/Lise	Mezuniyet Yılı
Lise	Fen - Matematik	Hacı Zehra Akkoç Lisesi (Y.D.A)	2007
Üniversite	Kimya	Marmara Üniversitesi	2013