ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seçilmiş İnterlökin 1-Beta İnhibitörlerinin ADAMTS5 Üzerine Etkilerinin In Siliko Analizleri

Tuğrulhan ÖZDEN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Eylül, 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
ÇİZELGELER DİZİNİ IV
ŞEKİLLER DİZİNİ V
SİMGELER VE KISALTMALAR VII
1. GİRİŞ 1
1.1. Diz Eklem Anatomisi ve Fizyolojisi 1
1.2. Osteoartrit Fizyopatolojisi 3
1.3. Osteoartritte İmmün Yanıt 4
1.4. Osteoartritte Sitokinler ve Agrekanazlar 5
1.4.1. Sitokinler 5
1.4.2. Agrekan, Agrekanaz ve ADAMTS5 6
1.5. Osteoartritte Bitkisel Kaynaklı Kimyasal Moleküllerin Rolü 8
2. İNTERLÖKİN 1-BETA VE SEÇİLMİŞ İNHİBİTÖRLERİ 11
2.1. İnterlökin 1-Beta 11
2.2. Seçilmiş Bitkisel Kökenli İnhibitörler 13
2.2.1. Butein 13
2.2.2. Wogonin 14
2.2.3. Quercetin 15
2.2.4. Kurkumin 15
2.2.5. Epigallokateşin Gallat (EGCG) 16
2.2.6. Apigenin 17
2.2.7. Oleuropein 18
2.2.8. Hiperforin 19
2.2.9. Harpagosit 20
2.2.10. Gallik Asit 21
2.2.11. Resveratrol 21
3. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 23
4. MATERYAL VE METOT 25
4.1. Materyal 25
4.2. Metot 25
5. BULGULAR 29
5.1. Affinite ve Yerleştirme Değerleri 29
5.2. Bağlanma Şekilleri ve Bölgeleri 30

5.2.1. Pozitif Kontrol (Aldumastat) 30
5.2.2. Apigenin 31
5.2.3. Bütein 32
5.2.4. Kurkumin 33
5.2.5. Gallik Asit 34
5.2.6. Harpagosit 35
5.2.7. Oleuropein 36
5.2.8. Hiperforin 37
5.2.9. Quercetin 38
5.2.10. Wogonin 39
5.2.11. EGCG 40
5.2.12. Resveratrol 41
5.3. Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma, Ekskresyon, Toksikolojik (ADMET) Özellikleri 42
5.4. ADAMTS5 Üzerindeki Enerji Değişimlerinin Karşılaştırılması 43
6. TARTIŞMA 45
7. SONUÇ VE ÖNERİLER 47
KAYNAKLAR 49
ÖZGEÇMİŞ 57

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seçilmiş İnterlökin 1-Beta İnhibitörlerinin ADAMTS5 Üzerine Etkilerinin In Siliko Analizleri

Tuğrulhan ÖZDEN

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sinan KANDIR

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Osteoartrit (OA) inflamatuar sürecinde içinde yer aldığı dejeneratif eklem hasarıdır. OA tedavisinde inflamatuar yanıtı azaltmak ve durdurmak için birçok küçük moleküldan faydalanılmaya çalışılmaktadır. Sunulan çalışmada, seçilmiş IL-1β inhibitörlerinin ADAMTS5 üzerine etkilerinin in siliko analizlerinin yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, IL-1β inhibitör özelliği taşıyabilecek Apigenin, Bütein, Kurkumin, Gallik asit, Harpagosit, Oleuropein, Hiperforin, Quercetin, Wogonin, EGCG ve Resveratrol molekülleri ADAMTS5 inhibitörü olan Aldumastat ile affinite ve ADMET özellikleri yönünden karşılaştırılmıştır. Autodock Vina programı ile moleküler docking analizleri ve affinite değerleri hesaplanmış olup, seçilmiş moleküllerin ADAMTS5 ile 3B kompleks yapıları oluşturulmuştur. Moleküllerin ADAMTS5 bağlanma bölgeleri ve bağ türleri BIOVIA Discovery Studio yazılımı ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Docking sonrası Swis-Pdb Viewer yazılımı ile ADAMTS5 protein-ligand toplam enerji hesaplamaları yapılmıştır. Seçilmiş moleküllerin Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma, Ekskresyon, Toksikolojik (ADMET) özellikleri admetSAR yazılımı ile değerlendirilmiştir. EGCG, Apigenin, Oleuropein ve Wogonin'in ADAMTS5 'in aktif bölgesine negatif affiniteleri en yüksek olarak hesaplanmış ve bu moleküllerden ADMET özellikleri bakımından oral biyoyararlanımı ve bağırsak emilimi en yüksek hepatotoksik ve nefrotoksik özellikleri en düşük olarak Oleuropein ve Wogonin molekülleri bulunmuştur. Elde edilen bulguların in vitro ve in vivo çalışmalar için bir kılavuz niteliğinde olduğu ve in siliko analiz sonucunda ADAMTS5 inhibitörü potansiyeline sahip bu moleküllerin in vitro ve in vivo şartlar altında daha detaylı moleküler analizlerle incelenmesi gerektiği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Osteoartrit, ADAMTS5, IL-1, In siliko, Autodock

CUKUROVA UNIVERSITY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MSc THESIS

In Silico Analysis of The Effects Of Selected Interleukin 1-Beta Inhibitors on ADAMTS5

Tuğrulhan ÖZDEN

Advisor: Assistant professor Sinan KANDIR

Department of Biotechnology

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint damage involving the inflammatory process. Many small molecules are being used to reduce and stop the inflammatory response in the treatment of OA. In the presented study, it was aimed to perform in silico analyzes of the effects of selected IL-1β inhibitors on ADAMTS5. For this purpose, Apigenin, Butein, Curcumin, Gallic acid, Harpagocyte, Oleuropein, Hyperforin, Quercetin, Wogonin, EGCG and Resveratrol molecules, which may have IL-1β inhibitory properties, were compared with Aldumastat, an ADAMTS5 inhibitor, in terms of affinity and ADMET properties. Molecular docking analyzes and affinity values were calculated with the Autodock Vina program, and 3D complex structures of selected molecules were created with ADAMTS5. The ADAMTS5 binding sites and bond types of the molecules were comparatively examined with BIOVIA Discovery Studio software. After docking, ADAMTS5 protein-ligand total energy calculations were made with Swis-Pdb Viewer software. Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicological (ADMET) properties of selected molecules were evaluated with admetSAR software. The negative affinities of EGCG, Apigenin, Oleuropein and Wogonin to the active site of ADAMTS5 were calculated to be the highest, and among these molecules, Oleuropein and Wogonin were found to have the highest oral bioavailability and intestinal absorption in terms of ADMET properties, and the lowest hepatotoxic and nephrotoxic properties. We believe that the findings obtained are a guide for in vitro and in vivo studies, and as a result of in silico analysis, these molecules with ADAMTS5 inhibitor potential should be examined with more detailed molecular analyzes under in vitro and in vivo conditions.

Keywords: Osteoarthritis, ADAMTS5, IL-1, In silico, Autodock

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde ve lisansüstü eğitimimde, gelişmemde büyük emeği ve katkıları olan, bir danışmandan hep daha fazlası olan kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Sinan KANDIR'a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Lisans ve yüksek lisans eğitim hayatımın her anında yanımda bulunan, her şart ve koşulda benden desteklerini esirgemeyen, yaşamın tüm zorluklarını birlikte göğüslediğimiz sevgili Fatıma UZAN'a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Değerli katkıları ile çalışmamı zenginleştiren ve olgunlaştıran kıymetli jüri üyesi hocalarım Doç. Dr. Bilge Kaan TEKELİOĞLU ve Prof. Dr. Serdar KARAKURT'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Zengin fikirleriyle çalışmamda desteğini her daim yanımda hissettiğim Arş. Gör. Çağrı Avci'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez dönemim boyunca bize ev sahipliği yapan ve manevi olarak her daim destek veren değerli SABİDAM Personeli ve Ailesi'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Beni yetiştiren, eğiten, öğreten ve bugünlerime gelmeme vesile olan tüm Öğretmenlerime ve Hocalarıma da eğitim-öğretim hayatım boyunca kazandırdıkları her şey için ve beni gelecekte söz sahibi yapacak bilgilerle donattıkları için saygı ve hürmetlerimle teşekkürlerimi sunuyorum.

Ve Ailem, bana maddi manevi her türlü desteği esirgemeyen beni her koşulda destekleyen ve yanımda duran kıymetli Aileme saygı ve sevgilerimle teşekkürlerimi sunuyorum.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Molekül isimleri, elde edildiği veri bankaları ve tanımlama kodları. 25
Çizelge 5.1 Affinite ve yerleştirme değerleri. 29
Çizelge 5.2 Moleküllerin ADMET değerleri. 42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Diz eklemi anatomisinin şematik gösterimi 1
Şekil 1.2. Diz eklemini oluşturan yapılar. 2
Şekil 1.3. Osteoartritte ilgili sinyal yolakları ve görev alan moleküller (Chow Y ve ark., 2020)..... 6
Şekil 1.4. Agrekan yapısı ve ADAMTS kesim bölgeleri (Kandır, 2020a) 7
Şekil 1.5. ADAMTS5'in yapısı (Kandır, 2020a). 8
Şekil 1.6. ADAMTS5'in 3B yapısı 8
Şekil 2.1. IL-1β inhibitörleri. 13
Şekil 2.2. (A) *Butea monosperma* bitkisi (Garg,2007). (B) Butein 2 boyutlu molekül yapısı..... 14
Şekil 2.3. (A)*Scutellaria baicalensis* bitkisi (Doronenko, 2007). (B)Wogonin 2B molekül yapısı.14
Şekil 2.4. (A) *Allium cepa L.* bitkisi (Colin, 2013) (B) Quercetin 2 boyutlu molekül yapısı 15
Şekil 2.5. (A) *Curcuma longa* (SKsiddhartthan, 2007). (B) Kurkumin 2 boyutlu molekül yapısı . 16
Şekil 2.6. (A) *Camellia sinensis* bitkisi (Fagus,2010) (B) EGCG 2 boyutlu molekül yapısı..... 17
Şekil 2.7. (A) *Petroselinum crispum* bitkisi. (Anonim1) (B) Apigenin 2 boyutlu molekül yapısı. 18
Şekil 2.8. (A) *Olea europaea* bitkisi (Sputnik,2005). (B) Oleuropein 2 boyutlu molekül yapısı ... 19
Şekil 2.9. (A) *Hypericum* bitkisi (Anonim 2). (B) Hiperforin 2 boyutlu molekül yapısı..... 20
Şekil 2.10. (A) *Harpagophytum* bitkisi (Magnus, 2007) (B) Harpagosit 2 boyutlu molekül yapısı 20
Şekil 2.11. (A) *Hamamelis* bitkisi (Anonim 3). (B) Gallik asit 2 boyutlu molekül yapısı..... 21
Şekil 2.12. (A) *Vitis vinifera* bitkisi (Magnus 2008). (B) Resveratrol 2 boyutlu molekül yapısı 22
Şekil 4.1. Docking iş akış diyagramı. 27
Şekil 5.1. Seçilen inhibitörlerin pozitif kontrol ile karşılaştırmalı grafiği 30
Şekil 5.2. ADAMTS5 (gri) ile Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri. 30
Şekil 5.3. ADAMTS5(gri) ile Apigenin(sarı) ve Aldumastat'ın(kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri..... 31
Şekil 5.4. ADAMTS5(gri) Bütein (sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri..... 32
Şekil 5.5. ADAMTS5(gri) Kurkumin (sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri..... 33
Şekil 5.6. ADAMTS5(gri) Gallik asit (sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri..... 34
Şekil 5.7. ADAMTS5(gri) Harpagosit (sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri..... 35
Şekil 5.8. ADAMTS5(gri), Oleuropein (sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri..... 36

Şekil 5.9. ADAMTS5(gri), Hiperforin(sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri..... 37
Şekil 5.10. ADAMTS5(gri), Quercetin(sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri..... 38
Şekil 5.11. ADAMTS5 (gri), Wogonin (sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri..... 39
Şekil 5.12. ADAMTS5(gri), EGCG (sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri..... 40
Şekil 5.13. ADAMTS5(gri), Resveratrol (sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri. 41
Şekil 5.14. ADAMTS5 üzerindeki enerji değişim grafiği. 44

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA : Aminoasit
ADAMTS : Trombospondin Motifli Bir Disintegrin ve Metaloproteinaz
AIM2 : Melanom 2'de Bulunmayan Protein
AP1 : Aktivatör Protein 1
BDZ-S : Benzodiazepin-s
cDNA : Komplementer Deoksiriboz Nükleik Asit
COX-2 : Prostaglandin Endoperoksit Sentaz 2
CXCR5 : C-X-C Kemokin Reseptörü Tip 5
DAMP : Hasarla İlişkili Moleküler Model Moleküller
ECM : Ekstraselüler Matriks
EGCG : Epigallokateşin Gallat
IFP : Fasyal Plak
IGD : İmmünoglobulin D
IL : İnterlökin
IL-1α : İnterlökin 1 Alfa
IL-1Ra: İnterlökin1 Reseptör Antagonist
IL-1β : İnterlökin 1 Beta
IL-36Ra : İnterlökin 36 Reseptör Antagonist
IL-36α : İnterlökin 33 alfa
IL-36β : İnterlökin 36 Beta
IL-36γ : İnterlökin 36 Gama
LAG3 : Lenfosit Aktivasyon Geni 3
LPS : Lipopolisakkarit
MAPK : Mitojenle Aktive Protein Kinaz
MMP : Matriks Metalloproteinaz
NLRP3 : Protein 3 İçeren NLR Ailesi Pirin Alanı
NLS : Nükleer Yerleşim Dizisi
NO : Nitrik Oksit
OA : Osteoartrit
PAMP : Patojenle İlişkili Moleküler Patern
PGE2 : Prostaglandin E2
RANKL : Nükleer Faktör Kappa-B Ligandının Reseptör Aktivatörü
ROS : Reaktif Oksijen Türleri
SOD : Süperoksit Dismutaz
TLR : Toll benzeri reseptör

TNF-α : Tümör Nekroz Faktör Alfa

TNFR : Tümör Nekroz Faktör Reseptör

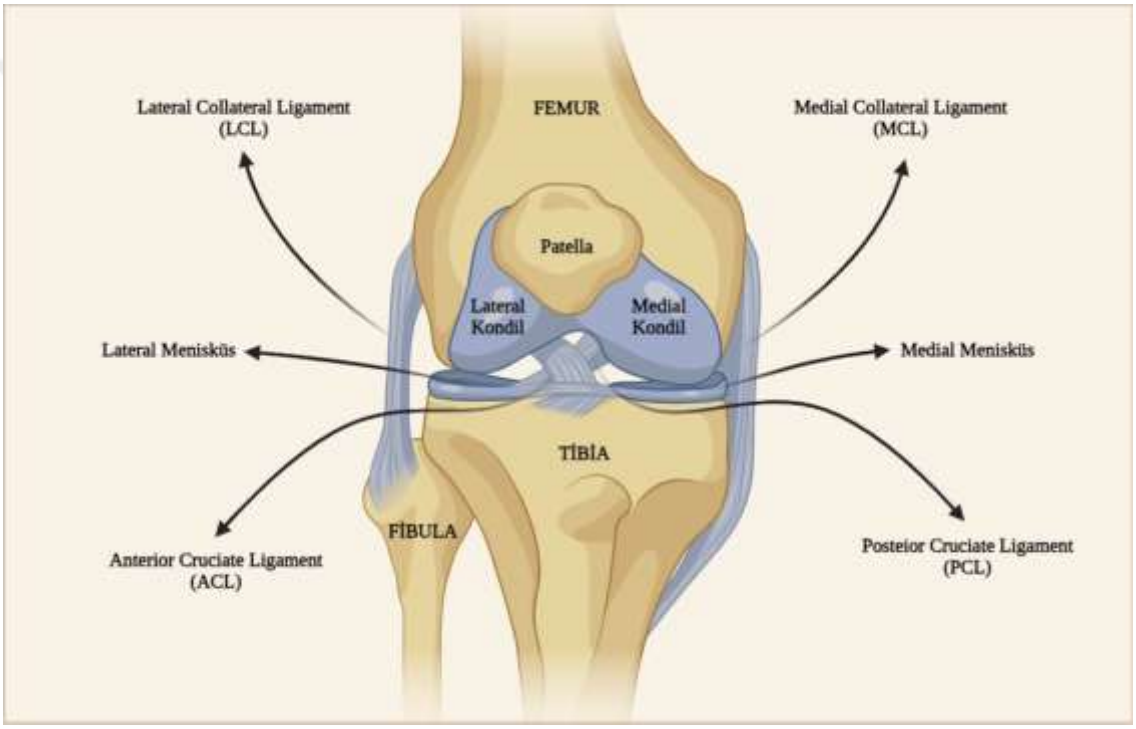
TRAF2 : Tümör nekroz faktör reseptörü ile ilişkili faktör 2

TS : Trombospondin

1. GİRİŞ

1.1. Diz Eklem Anatomisi ve Fizyolojisi

Günlük hayatımızda vücut ağırlığımızın büyük bir kısmını taşıyan ve hareketlerimiz için fleksiyon-ekstensiyon ile internal-eksternal rotasyona geniş ölçüde müsade eden kompleks bir fonksiyona sahip diz eklemi (Şekil 1.1) temel olarak medial tibiofemoral, lateral tibiofemoral, patellofemoral ve proksimal tibiofibular eklemleri içermektedir (Hirshmann ve Müller, 2015). Tibiofemoral eklem konveks eklem yüzeyinin iki kondilli olması (condylus medialis ve lateralis) nedeniyle bikondiler eklem grubuna girer. Asıl fonksiyonu fleksiyon-ekstansiyon olup aktif rotasyon hareketine de izin verir. Patellofemoral eklem ise eyer tip eklemdir (Rouviere ve ark., 2002).

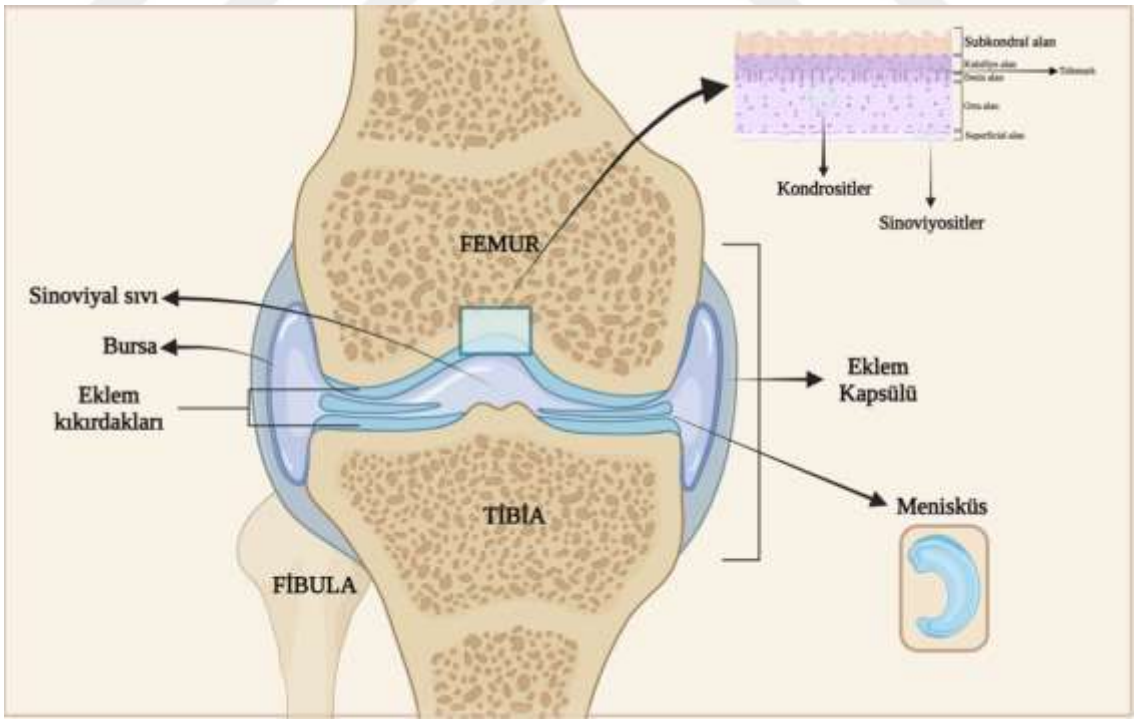


Şekil 1.1. Diz eklemi anatomisinin şematik gösterimi

Diz ekleminin konveks eklem yüzünü oluşturan femoral kondiller, hem sagittal hem de transvers yönde konvekstir. Distalden bakıldığında arka tarafta bir çukurla (fossa interkondilaris) ikiye ayrılmış olan iki kondil görülür. Bu kondiller ön tarafta birleşerek, patella ile eklem yapan facies patellaris'i oluşturur. Facies patellaris'te yukardan aşağıya doğru uzanan bir oluk eklem yüzeyini ikiye böler (Dursun, 2007, Yıldırım, 2003a; Yıldırım, 2003b). Yapısal olarak femurun kondilleri, tibianın kondil yüzeylerine terstir. Tibial platonun iç tarafı, dışa göre daha konkav, uzun ve dardır (Rouviere ve ark., 2002). Femur kondillerinin konvekslik derecelerinin, tibia kondillerinin konkavlık derecelerine uymaması nedeniyle, her iki kemiğin eklem yüzleri birbirine her yerde temas etmez.

Kalınlık merkezde 3-4 mm'dir, perifere gittikçe azalır. Lateral taraftaki eklem yüzü daha küçük olup, hemen hemen yuvarlaktır. Daha geniş olan medial taraftaki ise uzun ekseni sagittal yönde olmak üzere daha ovaldir.

Her iki eklem yüzü hafif çukur olup birbirine komşu olan kısımlarında biraz yükselerek tuberculum intercondylare mediale ve laterale'yi oluştururlar. Her bir diz ekleminde periferde kalan kama tarzında boşluklar, 'C' şeklinde fibrokartilaj yapıyla (menisküs) doldurulur. Menisküsler veya semilunar kıkırdaklar, menisküs mediale ve laterale olmak üzere iki tanedir. Menisküsler eklem kapsülünden kemiklerin eklem yapan yüzeyine uzanırlar (Arıncı, 2001). Her iki menisküsün uçları tibiada ekleme dahil olmayan interkondiler alana (intercondylaris anterior ve posterior) tutunur. Bunların periferik kısmı kalın olup içe doğru gittikçe incelerek serbestleşir ve konkav bir görünüm oluşur. Menisküsler eklem yüzeyleri arasında uyumu sağlamanın yanı sıra, şok emici olarak da görev yaparlar. Menisküslerin ana görevlerinin arasında ağırlık taşıma, eklem stabilizasyonu ve rotasyonu bulunmaktadır (Staeubli ve ark., 1999). Patella (diz kapağı kemiği), quadriseps femoris kasının kirişine yerleşmiştir. Patellanın arka yüzünün dörtte üçünü kaplayan bir alan, femurun facies patellaris'i ile temas ederek femoropatellar eklemi oluşturur. Eklem yüzeyi kalın bir hiyalin kıkırdak ile kaplıdır. Hyalin kıkırdak kenarlarda ince, kondillerin orta bölümünde daha kalındır. Sinoviyal kavite menisküslerin ince uç kenarlarının üzerinde, ayrıca onlarla kemiklerin eklem yüzleri arasında uzanır (Toprak ve ark., 1993).



Şekil 1.2. Diz eklemini oluşturan yapılar.

Diz eklemini oluşturan yapılar (Şekil 1.2), subkondral kemik, sinoviyal sıvıyı üreten sinoviyum ve fibröz kapsülün birlikte oluşturdukları eklem kapsülü, sinoviyal sıvının dolaştığı bursalar, ligamentler, menisküsler ve kıkırdaktır (Blackburn ve Craig, 1980, Abulhasan ve Grey, 2017). Avasküler, sinirsiz, saydam hialin kıkırdak (Latince "hyălĭnus," camdan yapılmış veya şeffaf anlamına gelir) doku matrisi, temel olarak suyun (%63-70) yanı sıra kollajenlerin (normal hialin kıkırdakta çoğunluğu tip II kollajen) varlığı ile karakterize edilir (Kandır, 2020a). Kollajen dışı proteinler ve proteoglikanlar (agrekanların çoğunluğunu içeren) bu dokunun önemli bileşenleridir, ancak en fazla bileşiği glikozaminoglikanlar (GAG) oluşturur.

Eklem kıkırdağı histolojik olarak, matriks düzeni ve hücre oryantasyonuna göre derin (radial), orta (transizyonel) ve yüzeyel (superfacial) alanlara ayrılmıştır. Kalsifiye kıkırdak, subkondral kemik ve eklem kıkırdağı arasında arayüz olarak görev yapar. Kalsifiye kıkırdakla eklem kıkırdağının ayrıldığı bölge tidemark olarak adlandırılır (Hall,2005, Sophia ve ark., 2009). Eklem kıkırdağı kan damarı, lenfatik, sinir içermez. Eklem kıkırdağının, sinoviyal eklemin hareketi için yüzey sağlamak, yükün eşit dağılımını ve sürtünmenin azalmasını sağlamak gibi fonksiyonları vardır. Sinoviyal membran (sinoviyum), sinoviyal sıvıyı üretir. Bu sıvı, lubrisin ve hyaluronik asitten oluşur, eklemi kayganlaştırır ve eklem kıkırdağını besler. Sinoviyum iki tip sinoviyal hücreden oluşur: Tip A (makrofaj benzeri) ve tip B (fibroblast benzeri). Sinoviyal fibroblastlar sinoviyal sıvı komponentlerini üretir (Seibel ve ark., 2006, Smith ve ark., 2018). Makrofaj benzeri olanlar çoğunlukla etkin değildir, fakat yangı sırasında aktive olurlar. Eklem kapsülü, fibröz kapsülle birlikte kapalı bir eklem boşluğu oluşturur ve eklemi dış etkilerden korur. Ligamentler, iki kemiği birbirine bağlar, harekete yardımcıdır ve eklem stabilizasyonunu sağlar. Subkondral kemik, eklem kıkırdağına destek sağlayan kemiktir, kalsifiye kıkırdak ve trabeküler kemik arasında yer alır. Büyüme plağı (epifiz plağı) ile trabeküler kemikten ayrılır. Subkondral kemik vasküler kanallar aracılığıyla beslenir. Eklem kıkırdağının beslenmesi, stres absorbsiyonu ve eklem yapısının korunması gibi görevleri vardır. Menisküsler, ekstraselüler matrikste (ESM) su, tip I kollagen ve PG'ler (baskın olarak agrekan) içeren fibrokıkırdaktır (Seibel ve ark., 2006, Sophia ve ark., 2009).

1.2. Osteoartrit Fizyopatolojisi

OARSI (Uluslararası Osteoartrit Araştırmaları Derneği)'nin tanımına göre osteoartrit (OA), hareketli eklemlerde hücre stresi ve ESM yıkımı ile karakterize, mikro ve makro hasarların başlattığı doğal immünitenin proinflamatuar yolaklarını içeren yangısal yanıtıdır (Kraus ve ark., 2015). Yaş, cinsiyet, obezite, genetik faktörler, osteoporoz, akut travmalar, kronik ve immünolojik hastalıklar OA gelişiminde rol oynayan başlıca faktörlerdir (Cooper ve ark., 2000a; Cooper ve ark.,2000b; Sharma ve ark., 1995).

Osteoartrit etiyolojisi tam anlaşılamamakla birlikte, mekanik, biyokimyasal ve enzimatik faktörlerin birlikte OA'yı tetiklediği bilinmektedir. Hastalığa ve kısıtlılığa neden mekanizmaların anlaşılması öncelikli hedeftir, böylece hastalık modifiye eden tedavi seçenekleri keşfedilebilir. Tüm

faktörlerin ortak son yolağı, kondrositlerin matriks sentezi ve yıkımı arasındaki homeostatik dengenin bozulmasıdır (Klimiuk ve ark., 2004; Pelletier ve ark., 2001).

Eklem ortamındaki değişikliklere yanıt olarak, sinoviyumda ve kıkırdakta inflamasyon kaynaklı ve stres kaynaklı sinyal yolları aktive edilerek sitokinler, kemokinler, adipokinler, Toll benzeri reseptör (TLR) ligandları ve nitrik oksit (NO) gibi diğer yangısal mediatörler üretilir. Bu, perisellüler matristeki değişikliklere veya TLR ve RAGE (ileri glikasyon son ürün reseptörleri) ligandları olan hasarla ilişkili moleküler modellerin salınmasına yanıt olarak da ortaya çıkabilir. Sonuç olarak, kıkırdak parçalayıcı proteinazların ESM proteinleri veya ESM bozunma ürünleri tarafından yukarı regülasyonu, katabolik aktivasyonu, fenotipik kaymayı ve apoptozu daha da teşvik edebilir (Tecchio ve ark., 2014).

1.3. Osteoartritte İmmün Yanıt

Bağışıklık sistemi, osteoartrit gibi inflamatuar hastalıkların gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır. Bu hastalıkların patogenezinde, aktif nötrofiller ve makrofajlar gibi bağışıklık hücreleri, inflamasyonu hızlandıran ve dokuların tahrip edilmesine yol açan sitokinlerin üretimine katkı sağlarlar. Özellikle, IL-6, IL-1β ve TNF-α gibi proinflamatuar sitokinlerin artan üretimi, hastalığın ilerlemesi ve semptomların şiddetlenmesi ile ilişkilendirilir. Bu sitokinlerin yüksek düzeyde salınması, özellikle sinoviyum adı verilen eklem zarının alt tabakasında belirgin lökosit infiltrasyonunun ortaya çıkmasına neden olur. Bu infiltrasyon, makrofajlar, T-lenfositler, B-lenfositler ve nötrofiller gibi bağışıklık hücrelerinin bu bölgeye yoğunlaştığı bir gösterge olarak kabul edilir ve inflamasyonun varlığını işaret eder.

Diğer yandan, osteoartritli hastaların periferik kanlarında belirli T hücre tiplerinin artan seviyelerine rastlanır. Bu T hücreleri arasında PD1+CXCR5+CD4+T hücreleri, COS+CXCR5+CD4+T hücreleri ve IL 21CXCR5+CD4+T hücreleri bulunur. Bu CD4+ T hücreleri, osteoartritin erken evrelerinde inflamasyonun başlamasına katkıda bulunan yardımcı T hücreleri (Th hücreleri) olarak tanımlanır. Th hücrelerinin yüzeylerinde C-X-C kemokin reseptörü tip 5 (CXCR5), indüklenebilir kostimülatör (ICOS) ve programlanmış hücre ölümü 1 (PD-1) gibi moleküller bulunur ve bu moleküller, belirli immünolojik işlevlerin düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca, osteoartritte artan LAG-3+ hücrelerin düzenleyici T hücreleri (Treg hücreleri) olduğu gösterilmiştir. Treg hücreleri, birçok inflamatuar hastalıkta immün düzenleyici görevler üstlenirler ve antiinflamatuar sitokinlerin salınımını teşvik ederler. Ancak, yapılan çalışmalar, LAG-3 moleküllerinin Treg hücrelerinin işlevini baskılayabileceğini ve inflamasyonu artırabileceğini öne sürmektedir (Xia ve ark., 2017).

Bu iki hücre tipinin aktive olduğunda, çeşitli sitokinlerin üretimine katkı sağladığı bilinmektedir, özellikle IL-1β ve IL-6 gibi sitokinlerin seviyeleri artar. İnflamatuar Fasiyal Plak (IFP) olarak bilinen dokuda salgılanan immün hücreler ve inflamatuar mediatörler, osteoartritin patolojik sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. IL-1β, IFP tarafından artan proinflamatuar sitokin

sekresyonunu tetiklerken, aynı zamanda çevre dokuların, özellikle kıkırdak ve sinoviyumun, IFP'nin aktivitesini modüle ettiği gösterilmiştir (Clockaerts ve ark., 2012). Bu bulgular, bağışıklık sisteminin osteoartritin karmaşık patogenezinde merkezi bir rol oynadığını ve bu hastalığın gelişimini anlamak ve tedavi etmek için bağışıklık sisteminin etkileşimlerini daha iyi anlamamız gerektiğini vurgular.

1.4. Osteoartritte Sitokinler ve Agrekanazlar

1.4.1. Sitokinler

Bağışıklık hücreleri tarafından salgılanan sitokinler, osteoartrit de dahil olmak üzere herhangi bir inflamatuar yanıtın temel yapılarıdır. (Sokolove ve ark., 2013) IL-1β ve TNF-α gibi proinflamatuar sitokinler, erken osteoartritte salgılanan mediatörler arasındadır (Min ve ark2017). IL-1β ve TNF-α, inflamatuar yanıt oluşumunda bağımsız olarak veya diğer sitokinlerle iş birliği içinde görev alır (Xu ve ark 2015). Aktif kondrositler, sinoviyositler ve mononükleer hücreler tarafından üretilirler (Sellam ve ark 2010). TNF-α ve IL-1β, kondrosit ve sinoviyosit kültüründe inflamasyonu tetiklemek için kullanılmıştır (Jiang ve ark 2017). Stimülasyon yapılan hücrelerde IL-6, IL-8, IL-1β ve TNF-α'nında inflamasyonu aynı şekilde tetiklediği görülmüştür. Hayvanlarda yapılan osteoartrit çalışmalarında ise benzer şekilde sitokin profillerinde artış gözlemlenmiştir (Qu ve ark., 2018).

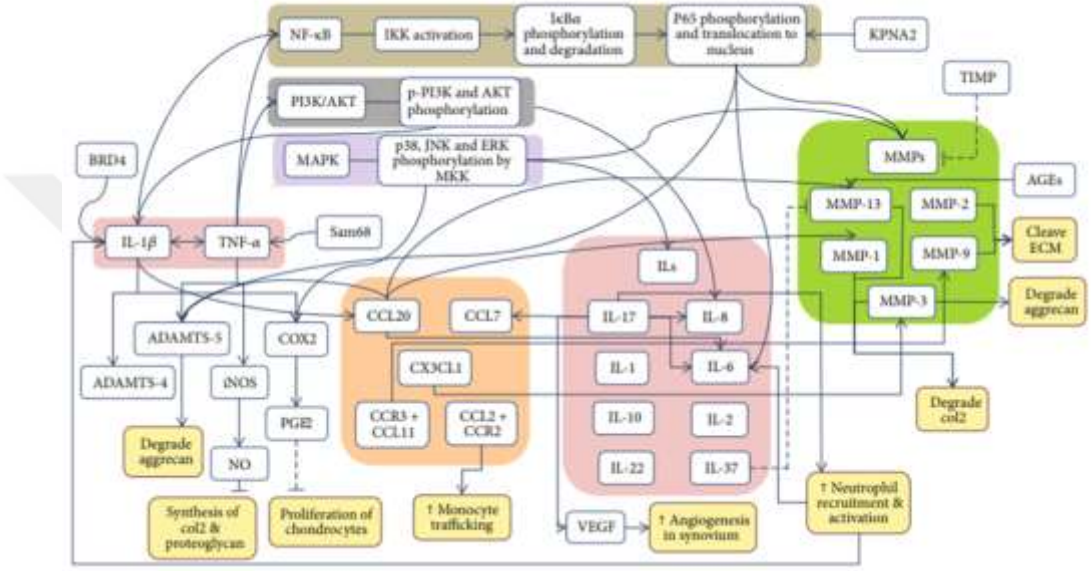
IL-1β, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz gibi bir dizi hücresel aktivitede yer alır. Eklemdeki kondrositlerin aktivitesini etkileyerek kolajen tip II ve agrekan dahil olmak üzere temel yapısal proteinlerin üretimine müdahale eder. Ayrıca, IL-1β, sırayla eklem kıkırdağını tahrip eden MMP-1 ve MMP-13 dahil olmak üzere kondrositler tarafından MMP sentezini etkiler (Zhang ve ark., 2016).

IL-1β 'nin nitrik oksit (NO) gibi reaktif oksijen türlerinin üretimini de indüklediği gösterilmiştir (Jayasuriya ve ark 2013). IL-1β 'nın osteoartrit patogenezinde önemli bir rol oynadığı kanıtlandığından, kondrositlerde bir in vitro osteoartrit modelini indüklemek için yaygın olarak kullanılır (Fernandes ve ark 2002). Kondrositlerde TNF-α ekspresyonunu ve TNF reseptörünün (TNFR) yüzey ekspresyonunu uyarır (Saperstein ve ark 2009). TNF-α'nın TNFR'ye bağlanması, sinyal iletimine neden olur ve TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2'yi (TRAF2) aktive eder. TRAF2, inflamatuar hastalıklarda yer alan aktive edilmiş B hücresi, nükleer faktör kappa-hafif zincir (NF-κB) sinyal yolunu aktive eder. Osteoartritli hastalar arasında yapılan bir çalışmada sinoviyum dokularının inflamasyon olmayan dokularla karşılaştırılmıştır. IL-1β, IL-6, IL-8, IL-18, IL-17, IL-22 ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta 1'in (TGFβ1) inflamasyonlu dokularda arttığı gözlemlenmiştir (Deligne ve ark 2015). IL-17, sinoviyal fibroblastlar ve kondrositler tarafından IL-6, IL-8 ve TNF-α salınımını indükleyerek inflamasyona ve kıkırdak yıkımına yol açar (Honorati ve ark., 2006). T helper 17 hücresi (Th17), mast hücresi ve miyeloid hücre tarafından salgılanır.

Bunun dışında IL-17, İnflamasyon bölgelerine alınan ilk hücre tipleri olan nötrofillerin toplanmasını ve aktivasyonunu teşvik eder (Rosales ve ark 2018). Aktif nötrofiller, osteoartritte

inflamatuar süreci düzenleyen çeşitli inflamatuar faktörleri sentezler. IL-17'nin, son dönem osteoartritli hastaların sinoviyal sıvısında mevcut olduğu gösterilmiştir (Snelling ve ark., 2017).

Artmış IL-17 ve IL-22 seviyeleri, osteoartritli hastaların temporomandibular ekleminin sinoviyal sıvısında da saptanır. Bu iki sitokinin artışı, osteoklastların farklılaşmasını ve eklemde kıkırdak altındaki bir kemik tabakası olan subkondral kemiğin rezorpsiyonunu indükleyen nükleer faktör kappa-B ligandının (RANKL) reseptör aktivatörünün yükselmesi ile doğru orantılı olduğu gözlemlenmiştir (Monasterio ve ark., 2018).



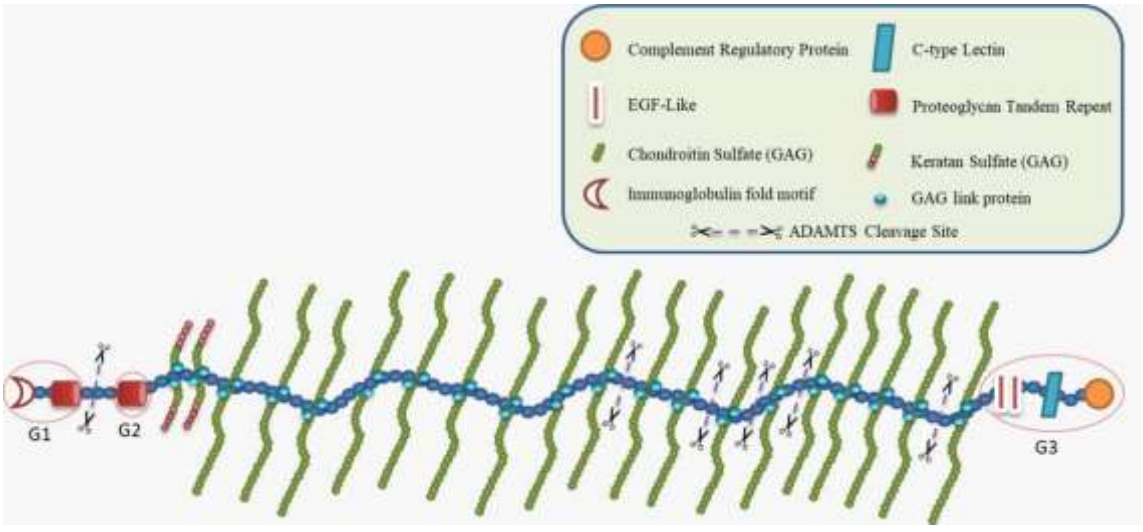
Şekil 1.3 Osteoartritte ilgili sinyal yolakları ve görev alan moleküller (Chow Y ve ark., 2020).

Sitokinler (pembe kutu), kemokinler (bej kutu), matriks metalloproteinazlar (yeşil kutu) ve osteoartritteki diğer proteinler arasındaki etkileşimler. Hücreler tarafından üretilen IL-1β ve TNF-α (pembe kutu); örneğin, aktive edilmiş kondrositler, sinoviyositler ve mononükleer hücreler, inflamatuar kaskadlardaki erken aracılar arasındadır. Kesintisiz çizgiler stimülasyonu gösterirken, noktalı çizgiler akış aşağı molekülün veya aktivitenin inhibisyonunu gösterir. Molekül etkileşimlerinin sonuçları sarı kutularda gösterilmiştir.

1.4.2. Agrekan, Agrekanaz ve ADAMTS5

Agrekanazlar, ADAMTS ailesinin üyeleri olup, trombospondin (TS) motifli disintegrin ve metalloproteazlardır ve kesin olarak düzenlenmiş modüler bir organizasyonla salgılanan çinko metalloproteinazdan oluşurlar. Agrekanazlar, kıkırdak yeniden şekillenmesinin erken dönemlerinde agrekan bölünmesinden sorumlu ana proteinazlardır. MMP 'ler, hastalığın gelişimi sırasında bu sürece katılmaya başlar ve kolajenin parçalanmasıyla devam eder. Bu nedenle agrekanaz aktivitesi, OA gibi yangısal eklem hastalıkları sırasında kıkırdak yıkımının bir özelliği olarak kabul edilir. Adamts ailesinin artritin gelişimini, anjiyogenezini, pıhtılaşmasını ve ilerlemesini etkilediği bilinen

birkaç üyesi vardır, ancak ADAMTS ailesinin 19 üyesinden aşağıdaki 5 üye yani ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, ADAMTS8 ve ADAMTS9 'un artritte kıkırdak proteoglikan agrekanını parçaladıkları, ancak yüksek enzim - substrat oranıyla çok zayıf aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir. Kıkırdakta agrekanaz-1 (ADAMTS4) ve agrekanaz-2 (ADAMTS5) olmak üzere iki farklı agrekanaz izole edilmiştir. Bu iki proteinaz, agrekan çekirdek proteinini IGD bölgesindeki agrekanaz-spesifik Glu373-Ala374 bağında ayırır ve bu nedenle bu proteinazlar, in vitro olarak en etkili agrekanazlar oldukları için artritik eklem hastalıklarının patolojisinde en çok ilgiyi görmüşlerdir. Bu agrekanaz aktivitesinin sıkı bir şekilde düzenlenmesi, agrekan anabolizma ve katabolizma oranı arasında hassas bir denge sağlamak için kritik öneme sahiptir. Agrekan, ADAMTS ailesinin üyeleri tarafından parçalanabilir, bunlar arasında ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, ADAMTS8 ve ADAMTS15 yer alır (Santamaria, 2020). Bu ADAMTS'ler arasında agrekan degradasyonu ile aktif olanlar arasında ADAMTS4 ve ADAMTS5 en etkilidir (Tortorella ve Malfait, 2008; Kandır, 2020b). Bu iki agrekanaz eklem ECM 'nin metabolizması, homeostazı ve patolojik değişiklikleri açısından kritik faktörler olarak kabul edilir. Yapı olarak, ADAMTS5, N ucundan C ucuna doğru bir sinyal peptit, bir prodomain, bir katalitik metalloproteinaz bölgesi, bir disintegrin benzeri bölge ve diğer C-terminal ancak bölgeler (merkezi thrombospondin tip 1 dizi tekrarı (merkezi TSR) motif, bir sistein-zengin bölge, bir aralık bölgesi ve ek bir TSR motif) şeklinde oluşur (Kelwick ve ark., 2015; Kandır, 2020a). ADAMTS5'in aktivasyonu için proprotein konvertazlar, özellikle furin ve furin benzeri enzimler tarafından prodomain ekstrasellüler eksizyonu gereklidir (Longpré ve ark., 2009). Katalitik metalloproteinaz bölgesi tek başına az proteolitik aktiviteye sahiptir ve C-terminal ancak bölgelerinin kombinasyonu proteolitik aktivitesini arttırır.

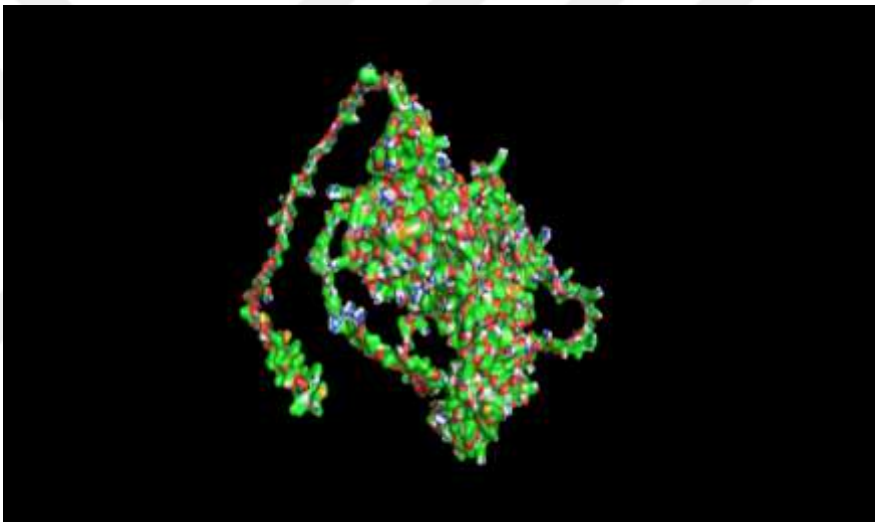


Şekil 1.4 Agrekan yapısı ve ADAMTS kesim bölgeleri (Kandır, 2020a)



Şekil 1.5 ADAMTS5'in yapısı (Kandır, 2020a).

ADAMTS5, sinyal peptit, prodomain, katalitik metalloproteinaz bölgesi, disintegrin-benzeri bölge ve diğer C-uçlu destek bölgelerden (orta TSR motif, sistein zengin bölgesi, aralık bölgesi ve ek TSR motif) oluşur. Agrekan ise globular bölgeler, interglobular bölge, keratan sülfat bağlantı bölgesi ve kondroitin sülfat bağlantı bölgelerinden oluşur. ADAMTS5, agrekanın glikozaminoglikan zincirlerini parçalayarak kıkırdağın yıkımına neden olur ve OA'de önemli bir faktördür. Bu nedenle, ADAMTS5'in yapısı ve işlevi hakkındaki bilgi, OA tedavisi için potansiyel hedeflerin belirlenmesinde önemlidir (Kandır, 2020b).


Şekil 1. 6 ADAMTS5'in 3B yapısı

Yeşil renkli bölgeler C atomlarını, beyaz renkli bölgeler H atomlarını, mavi bölgeler N atomlarını, kırmızı bölgeler O atomlarını ve turuncu bölgeler ise S atomlarını göstermektedir.

1.5. Osteoartritte Bitkisel Kaynaklı Kimyasal Moleküllerin Rolü

Polifenoller, meyveler, çiçekler, yapraklar ve kabuk dahil olmak üzere bitkilerin hemen hemen her parçası tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Pek çok yaygın meyve (üzüm, kiraz, elma, nar, portakal gibi), otlar ve baharatlar çok zengin polifenol kaynaklarıdır. Bu bileşikler, güçlü antiinflamatuar ve antioksidan özelliklere sahiptir (Manach ve ark., 2004; El Gharras, 2009).

Polifenollerin antioksidan özelliği, bir polifenolün ROS moleküllerini temizleme, prooksidan genlerin ekspresyonunu inhibe etme ve SOD 'lar, katalazlar gibi antioksidan genlerin ekspresyonunu arttırma yeteneğine bağlıdır (Akhtar ve ark 2012; Henrotin ve ark., 2018). Ayrıca, polifenollerin antiinflamatuar aktivitesi, MAPK, AP1 ve NFκB gibi proinflamatuar sinyal yollarını baskılama yeteneklerine bağlıdır. Çeşitli çalışmalar, esas olarak antioksidan ve antiinflamatuar

özelliklerine bağlı olan polifenolik bileşiklerin potansiyel OA baskılayıcı aktivitesini göstermiştir (Akhtar ve ark., 2012; Henrotin ve ark., 2018).

Nar özü, Butein, yeşil çay polifenolü, EGCG, Resveratrol, Wogonin, Quercetin, Harpagosit, Kurkumin, Morin ve diğerleri dahil olmak üzere birçok polifenolün antiinflamatuar ve antioksidan etkileri in vitro ve in vivo OA modellerinde test edilmiştir. *Scutellaria baicalensis* özütünün ve saflaştırılmış Wogonin'in IL-1β ile indüklenen IL-6, COX-2, iNOS ve metalloproteinaz ekspresyonunu baskıladığını ve PGE2 ve NO üretimini azalttığı sonucuna varılmıştır (Khan ve ark., 2017a; Khan ve ark., 2017b).

Gallik asit, Elajik asit ve Punikalagin polifenolleri bakımından zengin olan nar (Punicagranatum) meyve özü (PFE), birincil insan kondrositlerinde IL-1β ile indüklenen MMP-1, -3 ve -13 ekspresyonunu ve COX-2 ekspresyonunu inhibe ederek baskılamıştır (Shukla ve ark., 2008; Ahmed ve ark., 2005).

Soğan gibi birçok yaygın meyve ve sebzede bulunan bir flavonoid olan Quercetin, (3,3',4',5,7- pentahidroksi-flavon), güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir ve sıçan OA modelinde glutatyon ve glutatyon peroksidazın ekspresyonu artırarak ROS seviyelerini düşürdüğü gözlemlenmiştir (Qi ve ark., 2018).

Quercetin, açısından zengin olan *Ginkgo biloba* yaprağı ekstresi, antiinflamatuar aktiviteye sahiptir ve insan OA kondrositlerinde ve OA sıçan modelinde IL-1β ve LPS ile indüklenen iNOS, COX-2 ve NO ve PGE2 üretimini baskılamıştır (Chen ve ark., 2013).

Bir fenilpropanoid olan ve zerdeçalın ana bileşeni olan Kurkumin yaygın bir baharattır ve güçlü antiinflamatuar özelliklere sahip olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Kurkumin'in kondroprotektif etkisi, kondrositler, kıkırdak eksplantları ve çeşitli hayvan modelleri kullanılarak yapılan çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilmiştir (Park ve ark., 2015; Bannuru ve ark., 2018).

Zerdeçal ve tetrahidro-kurkumin 'in oral uygulaması, deneysel OA'nın bir sıçan ve fare modelinde IL-1β, IL-6 ve metalloproteinazların ekspresyonunu baskılayarak ağrı ve kıkırdak dejenerasyonunu hafifletmiştir (Zhang ve ark., 2016).

Kırmızı üzüm kabuğunda bulunan bir fitoaleksin olan resveratrolün (trans-3,4',5-trihidroksistilben), güçlü antioksidan ve antiinflamatuar aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Frischholz ve ark2020: Wang ve ark 2012). Resveratrol ayrıca deneysel OA'lı sıçanlarda IL-1β, TNF-α ve IL6 ekspresyon seviyelerini baskılamıştır (Wei ve ark., 2018).

2. İNTERLÖKİN 1-BETA VE SEÇİLMİŞ İNHİBİTÖRLERİ

2.1. İnterlökin 1-Beta

IL-1 ailesi, benzer veya farklı biyolojik etkileri olan 11 üyeden oluşmaktadır. IL-1α, IL-1β, IL-1Ra, IL-18, IL-33, IL-36α, IL-36β, IL-36γ, IL-36Ra IL-37 ve IL-38 tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bunlar arasında IL-1α, IL-1β, IL-18, IL-33 ve IL-36 reseptör agonistiktir ve IL-1Ra, IL-36Ra ve IL-38 reseptör antagonistiktir. IL-37 sadece antiinflamatuar bir sitokin. Her IL-1 ailesi üyesinin işlevi şu anda araştırılıyor olsa da IL-1 bu üyeler arasında en çok karakterize edilenidir (Priestle ve ark., 1989).

IL-1, IL-1α ve IL-1β gibi iki farklı formu vardır. Bunlar, iki farklı cDNA'dan ayrılmıştır ancak biyolojik fonksiyonları açısından birbirinden ayırt edilemezler. Amino asit dizileri açısından IL-1α ve IL-1β arasındaki benzerlik yüksek değildir (27%), ancak IL-1α ve IL-1β yapı olarak benzerdir ve aynı reseptör olan IL-1 tip 1 reseptör (IL-1R1) aracılığıyla aynı fonksiyonları gösterirler. Her iki bileşen de ortak bir β-barrel ve yanındaki döngülerle birlikte var. IL-1α ve IL-1β arasındaki fark, IL-1α ve IL-1β'nin N ucunda 14 amino asit uzantısıdır. Her öncülün moleküler ağırlığı yaklaşık 31 kDa'dır ve IL-1α ve IL-1β, özgül proteazlar tarafından olgun formlara dönüştürülür.

IL-1α 'nın N-terminal bölgesi bir nükleer yerleşim dizisi (NLS) içerir ve transkripsiyon aktivitesi gösterir (Werman ve ark., 2004).

IL-1α, 271 amino asit (AA) öncül protein olarak üretilir. IL-1α geni için transkripsiyon sırasında, Sp1 (özellikle belirleyici protein 1) transkripsiyon faktörü, IL-1α promoter aktivitesini 5′-yukarı GC kutusu (-60 ila -45 bp) arasında aktive eder ve aynı zamanda IL-1α tarafından da aktive edilen NF-κB, kendi gen ekspresyonunu ve üretimini autokrin bir şekilde uyarır (Kimura ve ark., 1998).

IL-1α'nın öncüsü, hücre zarına bağlı bir şekilde bulunan ve kromatine bağlanan bir formda varlığını sürdürür. Stres cevapları sırasında, IL-1α Ca2 +-bağımlı proteaz olan kalpain veya sitotoksik T- lenfositler (CTL) / doğal öldürücü (natural killer-NK), granzyme-B, mast hücresi kimaz veya nötrofil elastaz gibi diğer proteazlar tarafından işlenir ve C-terminal 159 AA'ya kadar olgun IL-1α olarak işlenir.

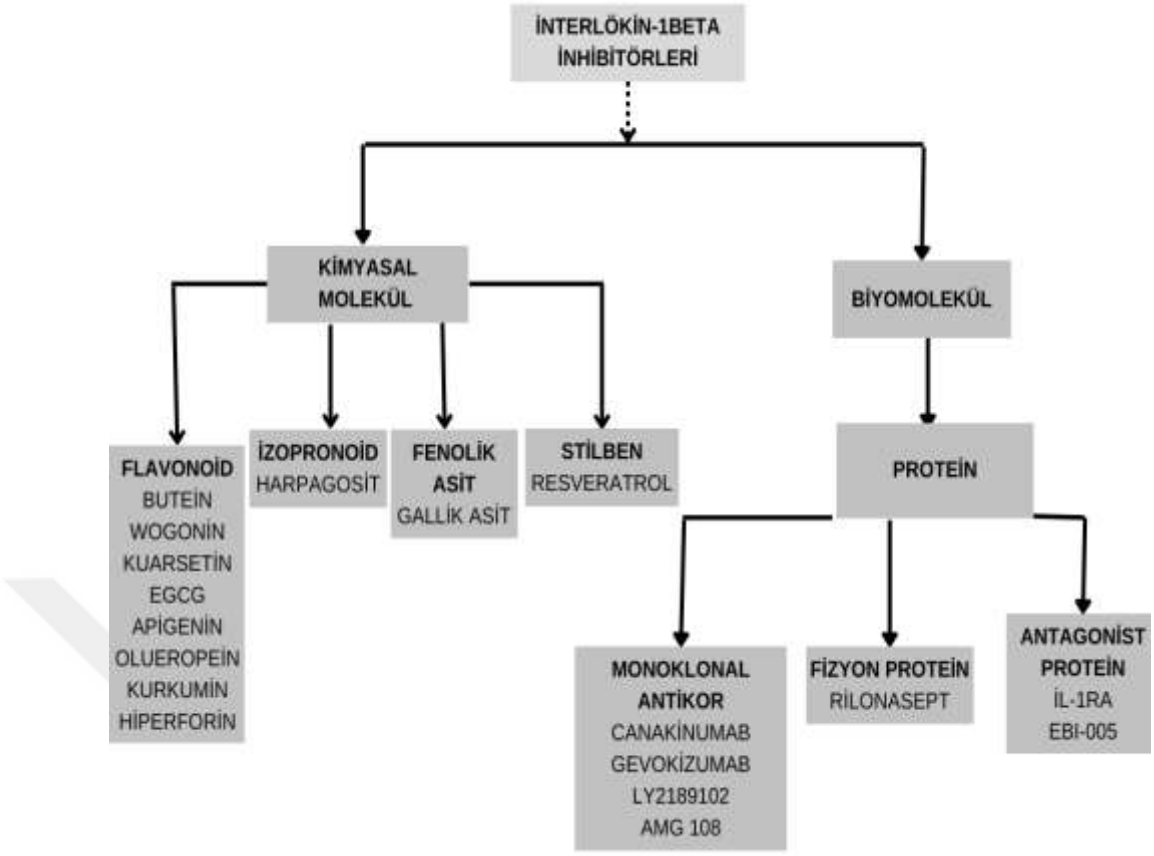
IL-1β, 269-AA öncü bir proteinden üretilir ve inflamazomlar tarafından aktive edilen kaspaz-1 (ayrıca IL-1β-dönüştürme enzimi (ICE) olarak bilinir) tarafından C-terminal 153 AA'ya kadar olgun IL-1β olarak işlenir. IL-1β öncüsü diğer serin proteazlar tarafından da işlenir. Kaspaz-1 eksikliği olan nötrofiller, LPS uyarısına cevap olarak elastaz tarafından işlenmiş olgun IL-1β 'yi salgılar. Elastaz, kimazlar, granzyme A, katepsin G ve proteinaz-3 gibi nötrofil proteazlar, IL-1β öncüsünü salgılanabilir, biyolojik olarak aktif bir forma parçalarlar. Bu alternatif olarak parçalanmış, işlevsel IL-1β formları, inflamatuar poliartritis ve gut tanısı konmuş bir hastanın sinoviyal sıvısında saptanmıştır (Irmler ve ark., 1995).

Sistemik inflamatuar cevap sendromu veya septik şok gibi durumlarda, böbrekler ve diğer dokularda büyük miktarlarda nötrofil inflamasyon görülebilir. Bu nedenle, yukarıda açıklanan çeşitli faktörler tarafından oluşan NLRP3 inflamazomuna bağlı inflamasyon, antiIL-1 tedavisinin hedefi olabilecektir.

Şu anda, NLRP3 yangısal aktivasyonunun başlatılması için iki aşamalı bir model önerilmektedir. İlk adım, NLRP3'ün transkripsiyonel ve posttranslasyonel hazırlanmasına aracılık eder (Adım 1) ve ikinci adım, İnflamasyonların aktivasyonudur. Adım 1, IL-1β genini kopyalamak için konsensus bağlanma bölgesine (-296 ila -286 bp) NF-κB bağlanmasıyla biyolojik olarak aktif olmayan bir IL-1β öncüsünün ilk sentezidir. Adım 2, inflamazom adı verilen sitozolik bir aktivasyon platformu tarafından aktive edilen kaspaz-1 tarafından olgun, biyolojik olarak aktif IL-1β'ye dönüştürülmesidir (Eder, 2009).

İnflamasyon, NLR'ler, AIM2, RIG-I veya pirin gibi PRR'lerden, bir adaptör protein ASC 'den ve kaspaz-1 'den oluşan büyük bir protein kompleksidir. Bunların arasında, NLRP3 inflamasyonu, çok çeşitli PAMP 'lar ve DAMP 'lar tarafından aktive edildiği bildirilen bir prototip inflamasyondur. IL-1α ve IL-1β, çok çeşitli dokularda ve çeşitli hücrelerde, özellikle timus, dalak, lenf düğümleri, peyer plakları ve kemik iliği dahil olmak üzere lenfoid organlardaki makrofajlarda eksprese edilir. IL-1α ve IL-1β akciğer, sindirim sistemi ve karaciğerdeki doku makrofajlarında da eksprese edilir. Ayrıca, uterusun hücresel subepitelyal endometriyal dokusunda, glomerüllerde, böbreğin dış kortikal bölgelerinde ve nötrofiller, keratinositler, epitelyal ve endotelyal hücreler, lenfositler, düz kas hücreleri ve fibroblastlarda da eksprese edilebilir (Dinarello, 1994).

Temel olarak IL-1β inhibitörleri Şekil 6.1 de verilmiştir. Analizleri yapılması amaçlanan seçilmiş inhibitörler kimyasal molekül sınıfında ki; Bütein, Wogonin, Quercetin, EGCG, Apigenin, oleuropein, Resveratrol, Gallik asit, Harpagosit, Hiperforin ve Kurkumin molekülleridir. Bu moleküller kimyasal sentez ile veya doğada birçok bitkiden ekstraksiyon yolu ile elde edilebilirler.

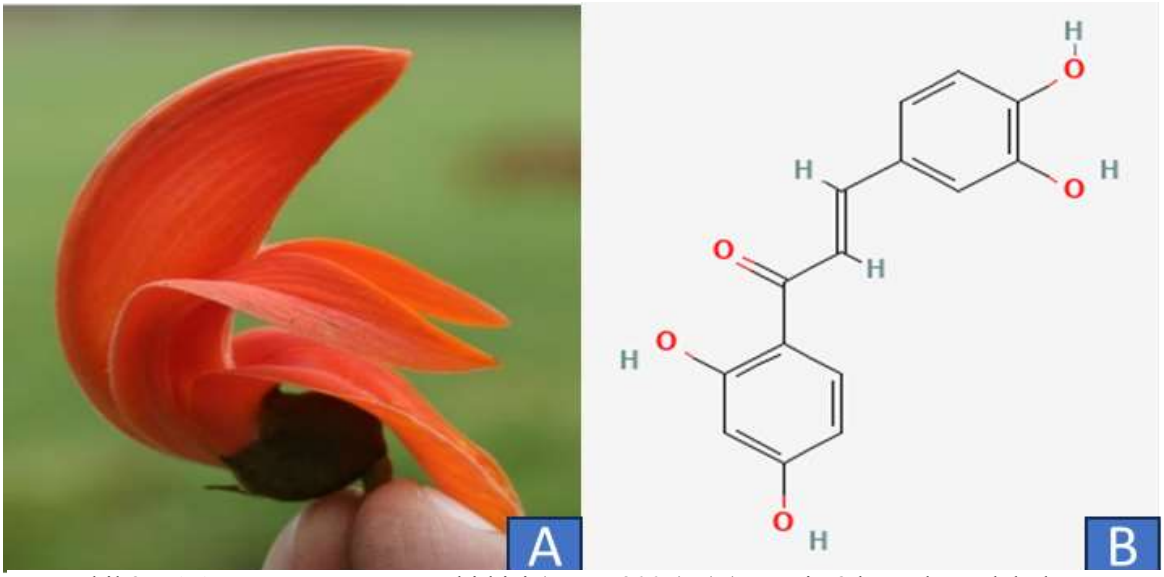


Şekil 2.1 IL-1β inhibitörleri.

2.2. Seçilmiş Bitkisel Kökenli İnhibitörler

2.2.1. Butein

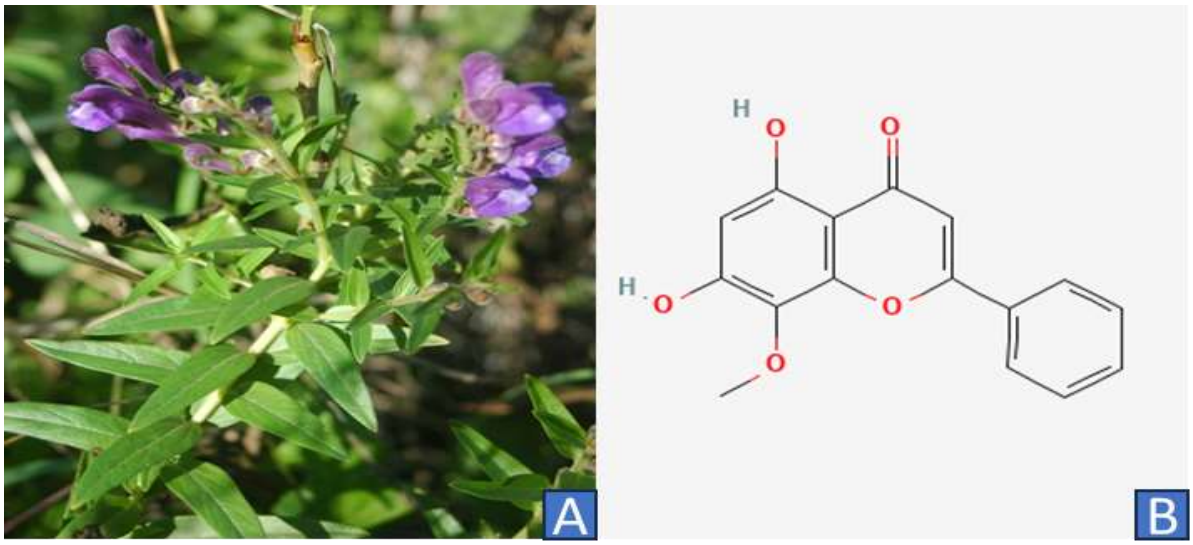
Butein, Çin, Hindistan, Japonya ve Kore dahil olmak üzere Asya ülkelerinin geleneksel tıbbi sistemlerinde oldukça araştırılmış ve kullanılmıştır. Örneğin, *B. monosperma, Bidens bipinnata, Dahlia variabilis, D. odorifera, Millettia nitida* ve *T. vernicifluum*'un bütein içeriği bakımından zengin ham ekstraktlarının, diyabet, diyare, dizanteri, tüberküloz ve hipertansiyon, bulaşıcı hastalıklar, yangısal hastalıklar, iskemi, sıtma, felç, romatoid artrit vb. hastalıkların tedavisinde bitkisel formülasyonlar olarak yaygın olarak kullanıldığı bulunmuştur (Semwal ve ark., 2015).



Şekil 2.2 (A) *Butea monosperma* bitkisi (Garg, 2007). (B) Butein 2 boyutlu molekül yapısı

2.2.2. Wogonin

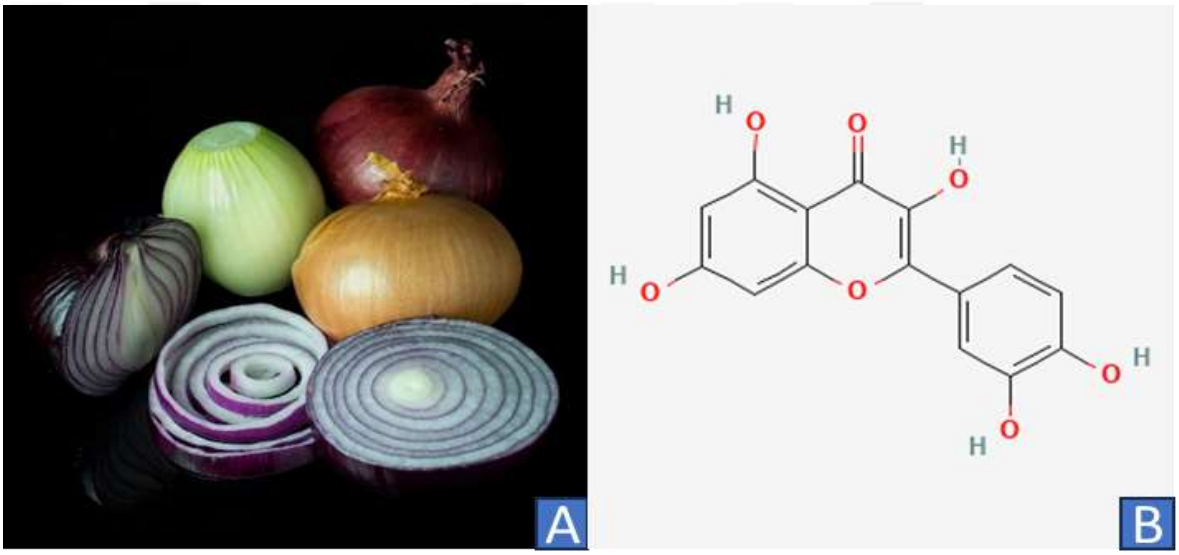
Scutellaria baicalensis georgi, geleneksel Çin tıbbındaki en önemli biridir. Antibakteriyel aktiviteye ve yatıştırıcı etkilere sahiptir ve ishal ve hepatit dahil olmak üzere bir dizi durumun tedavisinde uygulama alanı bulur. Bu bitkinin ana kimyasal bileşeni olan Wogonin, fenilbenzopiron çekirdeği içeren bir flavon türevidir. BDZ-S için nispeten yeni bir ligand sınıfı olan flavonoidler, insan diyetinin önemli bileşenleri olan çayın yanı sıra çok çeşitli meyvelerden, sebzelerden, yemişlerden ve çiçeklerden izole edilebilir (Crawley, J ve ark ,1982).



Şekil 2.3 (A)*Scutellaria baicalensis* bitkisi (Doronenko, 2007). (B)Wogonin 2B molekül yapısı.

2.2.3. Quercetin

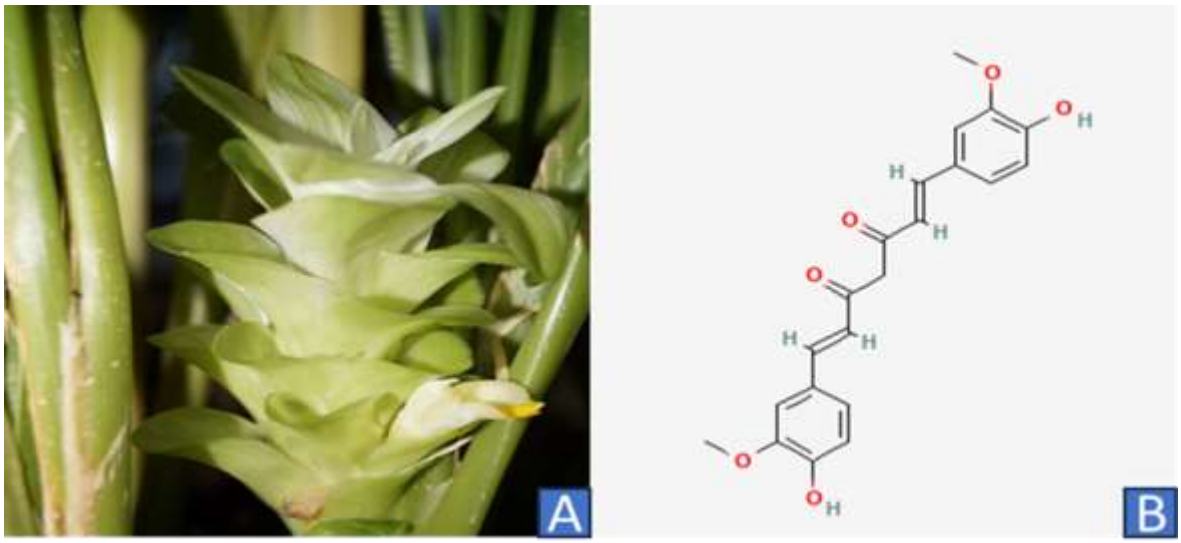
Quercetin bitkilerde, özellikle sebze ve meyvelerde yüksek miktarda bulunan flavonoiddir. Başta turpgiller, üzüm, elma, domates ve yaban mersini olmak üzere birçok besinde değişik miktarlarda bulunmaktadır. Yüksek miktarda quercetin içeren bitkilerin başında soğan gelmektedir. Diyetle alınan quercetinin yapısındaki glikozit bağları ve miktarları farklıdır, fenolik gruplara bağlı olan bir ya da daha fazla şeker grubu bulunabilir. Yapısındaki şeker gruplarının sayısı arttıkça quercetinin sudaki çözünürlüğü artmaktadır. Quercetinin yapısında üç önemli işlevli grup bulunur. Bu gruplar aynı zamanda antioksidan aktiviteden sorumludur. Quercetin kaynağı olan besinler toplumlar arasında farklılık gösterir. Örneğin, Hollanda ve Japonya'da başlıca quercetin kaynağı çay iken İtalya'da şarap, Amerika Birleşik Devletleri, Finlandiya ve Yunanistan'da ise soğan ve elmadır (Nijveldt J. ve ark., 2001).



Şekil 2.4 (A) *Allium cepa L.* bitkisi (Colin, 2013) (B) Quercetin 2 boyutlu molekül yapısı

2.2.4. Kurkumin

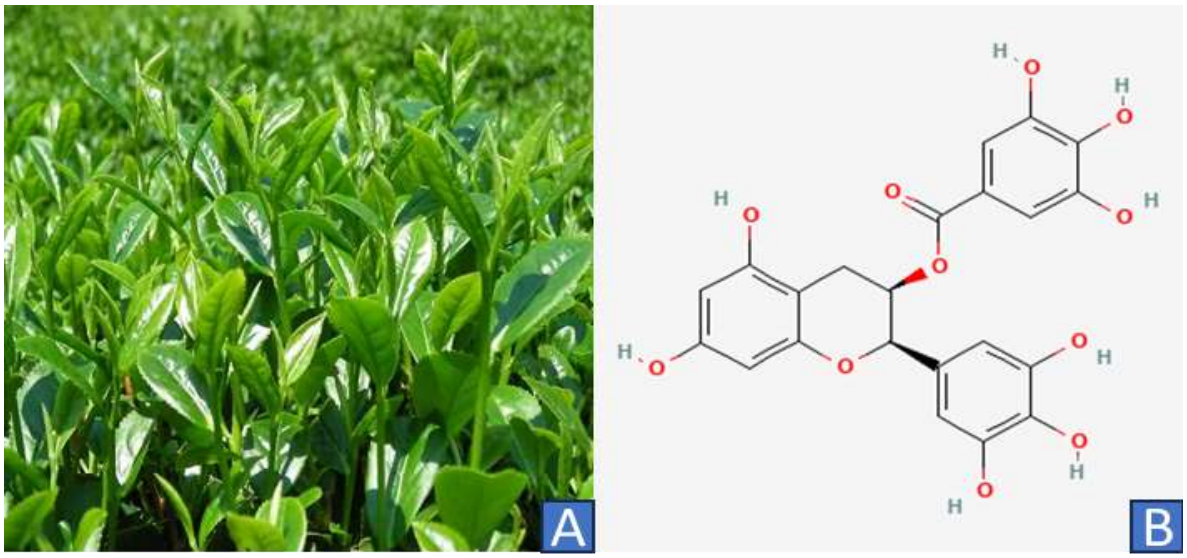
Asya ülkelerinde yaygın olarak kullanılan bir baharatın bileşiminde bulunan ve zerdeçal (*Curcuma longa*) bitkisinden izole edilen sarı renkli bir bileşiktir. Kurkuminin yapısında iki fenolik halka bulunur, bunlar orto konumlarında birer metoksi eter içerir ve para konumlarından bir alifatik doymamış hepten bağlayıcı ile birleştirilmiştir. Kurkumin hidrofobik karakterde ve tautomerik bir bileşiktir. Alkali ortamlarda elektron vericisi olarak işlev gören enol formu, nötral ve asidik çözeltilerde ise güçlü bir proton vericisi olan bis-keto formu baskındır. Geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan kurkuminin pek çok kullanım alanı vardır. Kurkumin üzerine son 30-40 yılda çok sayıda bilimsel çalışma yapılmış ve özellikle antiinflamatuar ve antikanser etkileri üzerinde durulmuştur. Günümüzde, kanser tedavi stratejilerinin hem ilaç direnci gelişmesi hem de sitotoksisite, genotoksisite vb. dezavantajlarının olmasına bağlı olarak, kurkumin kemoterapi alternatifi bir antikanser madde olarak ilgi çekmektedir (Mullaicharam ve ark., 2011).



Şekil 2.5 (A) *Curcuma longa* (SKsiddhartthan, 2007). (B) Kurkumin 2 boyutlu molekül yapısı

2.2.5. Epigallokateşin Gallat (EGCG)

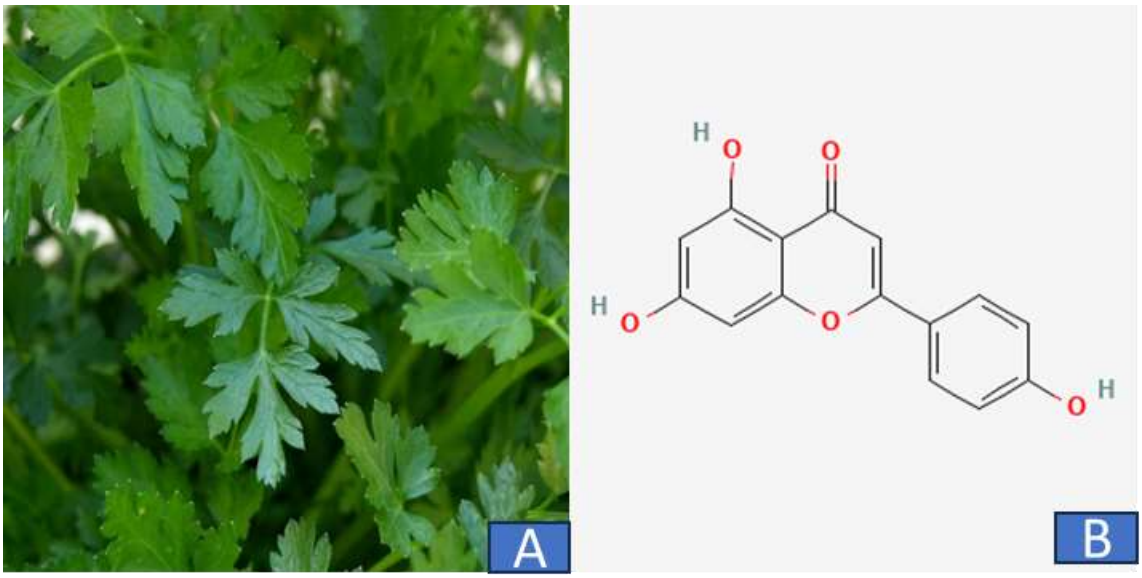
Yeşil çay kateşinleri olan EGC ve EGCG daha az miktarda olmakla birlikte siyah çayda da bulunurlar. Siyah çayın esas kateşinleri ise bu çaya rengini ve buruk aromasını veren polimerik yapıdaki teaflavinler (tF) ve tearubiginler (tr)'dir. Kateşinler A ve B halkalarındaki takılar nedeni ile güçlü antioksidan ve antikanser etkilere sahiptirler. tamoksifen kaynaklı oksidatif hasara karşı koruyucu etkileri, karaciğerde lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve süperoksit radikali ölçümleri ile birlikte enzimatik olan ve olmayan antioksidanların miktarları incelenerek ortaya konmuştur . Flavonoidlerin mitokondri ile etkileşiminin incelendiği bir çalışmada, kateşinlerin hücreleri quercetine benzer şekilde apoptoza götürdüğü, ancak quercetinden farklı olarak mitokondriyal ATP oluşumu üzerine etki yapmadığı gösterilmiştir. Yeşil çayın başlıca kateşini olan EGCG'nin moleküler etkileri üzerine çok sayıda çalışma yapılmış olup hem farklı kanser türlerinde hem de çeşitli in vitro ve in vivo modellerde antitümör etkileri gösterilmiş ve EGCG etkisiyle değişik apoptotik yolakların aktive olduğu bildirilmiştir (Ping Dou Q, 2009).



Şekil 2.6 (A) *Camellia sinensis* bitkisi (Fagus,2010) (B) EGCG 2 boyutlu molekül yapısı

2.2.6. Apigenin

Kimyasal olarak 4', 5, 7,-trihidroksiflavon olarak bilinen apigenin, moleküler formülü C15H10O5 ve moleküler ağırlığı 270.24 olan, doğal olarak oluşan birçok glikozitin aglikonu olan flavon sınıfına ait doğal bir üründür. Flavonların yanı sıra bazı sentetik türevlerinin, antioksidan, antiinflamatuar, antitümör, ant-genotoksik, antialerjik, nöroprotektif, kardiyoprotektif ve antimikrobiyal dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteler sergiledikleri gösterilmiştir. Apigenin, yünü boyamak için kullanılan sarı kristalli bir katıdır. Apigenin birçok bitkide sekonder metabolit olarak sentezlenir. Maydanoz, kereviz, soğan, portakal, papatya, mısır, pirinç, çay, buğday filizi, bazı çimenler vb. gibi çeşitli bitkilerin apigenin ve türevlerini sentezlediği bilinmektedir. Tüm flavonoidler temel olarak bitkilerde şikimik asit yolu adı verilen tek bir temel yoldan sentezlenirler. (Yan, J ve ark., 2014).

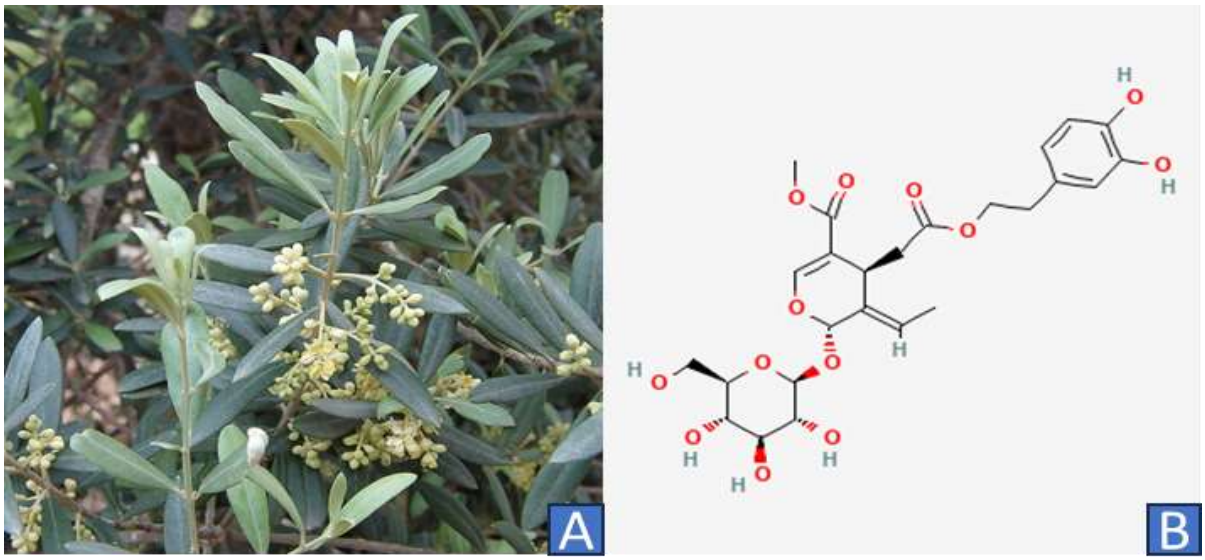


Şekil 2.7 (A) *Petroselinum crispum* bitkisi. (Anonim1) (B) Apigenin 2 boyutlu molekül yapısı.

2.2.7. Oleuropein

Oleuropein, bir oleosidik iskelet ve bir karbonhidrat grubu içeren bir hidroksitirosol esteridir. Oleosidik iskelet, Oleaceae familyasının secoiridoid glikozitlerinin ortak bir özelliğidir.

O. europaea L.'deki oleuropein biyosentezi karmaşıktır ve henüz iyi anlaşılmamıştır. Botanik olarak Olea europaea olarak bilinen zeytin ağacı, Oleaceae familyasına ait olup, dünyanın sıcak ılıman bölgelerinde yetişir ve yetiştiriciliğinin Doğu Akdeniz'de veya bugün Türkiye, Suriye, Lübnan, Ürdün, Filistin ve Filistin'i içine alan bölgede başladığına inanılır. Tarihsel kanıtlara göre zeytin ve zeytinyağı gibi hasat ürünlerinin tüketimi MÖ 7000-5000'den beri gerçekleşmektedir. Zeytin yaprağı ürünleri, eski zamanlardan beri tıbbi özellikleri nedeniyle üretilmekte ve kullanılmaktadır. Oleuropein zeytin yağında, meyvesinde ve yaprağında bol miktarda bulunur. Son yıllarda, bu ürünler sağlıklı beslenmenin önemli bileşenleri olarak kabul edilmiştir (Wichers ve ark., 2000).



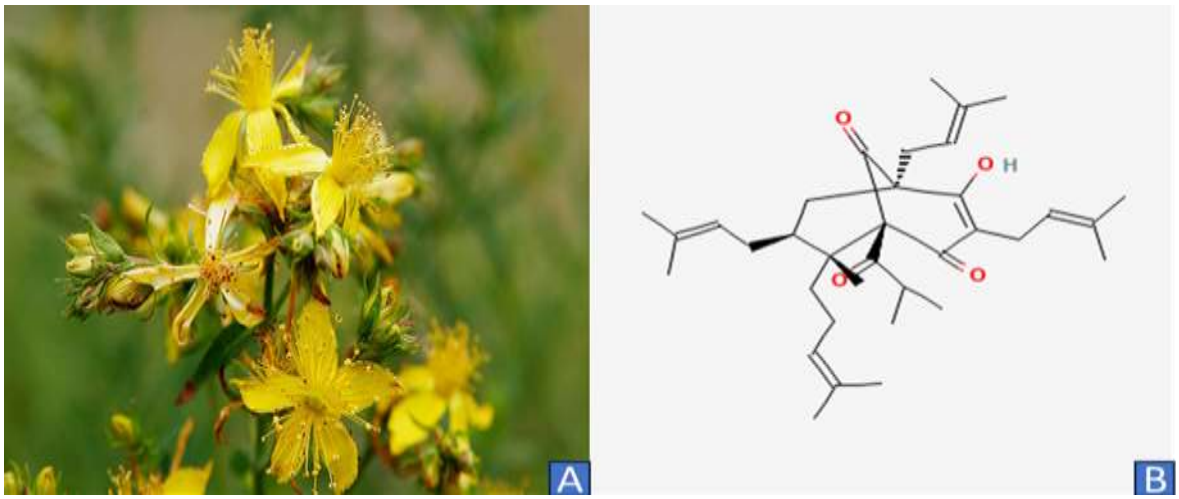
Şekil 2.8 (A) *Olea europaea* bitkisi (Sputnik,2005). (B) Oleuropein 2 boyutlu molekül yapısı

2.2.8. Hiperforin

Hiperforin, floroglüsinol iskelesine entegre edilmiş bir lipofilik izopren zincirine sahip, prenillenmiş yapısıyla karakterize edilen bir floroglüsinol türevidir. Bu bileşik, St. John's wort'un yapraklarında ve çiçeklerinde belirgin bir şekilde bulunur; kuru kütlesinin yaklaşık %4'ünü oluşturur ve en bol biyoaktif bileşenlerden biridir. Hiperforinin bozunmaya karşı dikkate değer bir duyarlılık sergilediğini ve bunun kullanımını zorlu bir çaba haline getirdiğini belirtmek önemlidir. Özellikle hiperforinin kararsızlığı, atmosferik oksijenin varlığında, oksidatif bozulmaya yatkın olduğundan belirgin hale gelir. Ayrıca çeşitli organik çözücülere maruz kaldığında bozunmaya karşı hassastır. Bununla birlikte, hiperforinin disikloheksilamonyum tuzunun, doğal muadili ile karşılaştırıldığında daha fazla stabilite, kristallik ve uzun süreli depolama için daha fazla uygunluk sunduğu gözlemlenmiştir.

Yaygın dağılımı Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika'daki bölgeleri kapsamaktadır. Ait olduğu *Hypericum* cinsi, dünya çapında 350-400 farklı türden oluşan geniş bir diziyi kapsamakta olup, bu türlerin 70'i Türkiye coğrafi sınırları içerisinde belgelenmiştir. Bu bitkiler dünya çapındaki ılıman ve tropik bölgelerde oldukça üretkendir; yol kenarları, çimenli nehir kıyıları, ihmal edilmiş tarlalar ve yağışlı kışlar ve kuru yazlarla karakterize edilen bölgeler gibi ortamlarda yaşama eğilimi gösterirler. PH'ı hafif asidik ila nötr olan topraklarda gelişen bu bitki türü, 50-60 cm'ye kadar bir boya ulaşabilir ve yapraklarında, kendine özgü görünümüne katkıda bulunan, kolaylıkla gözlemlenebilir yağ bezleri bulunur. (Medina MA ve ark., 2006).

Yüzyıllar boyunca, St. John bitkisinin geleneksel tıpta tarihi bir rolü olmuştur; enfeksiyonlar, solunum sistemi bozuklukları, peptik ülserler ve cilt rahatsızlıkları gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanıldığı belgelenmiştir. Dikkat çekici bir şekilde, hiperforinin antidepresan özellikleri başlangıçta bu bitkinin farmakolojik profilinin bir parçası olarak açıklığa kavuşturulmuştur. (Di CG ve ark., 2001).



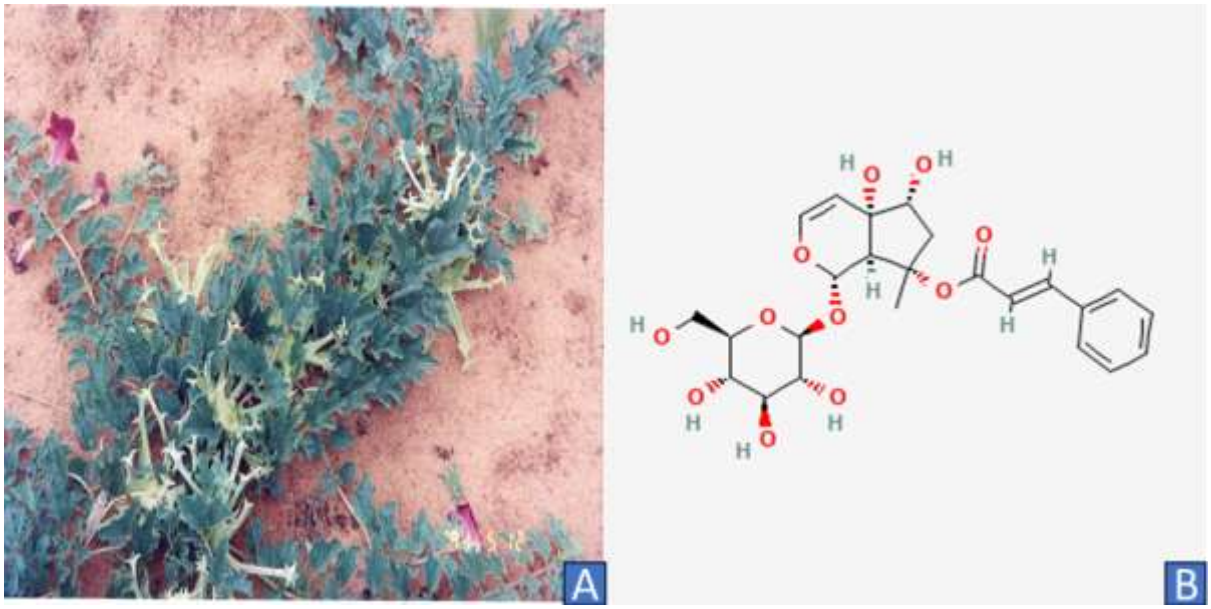
Şekil 2.9 (A) *Hypericum* bitkisi (Anonim 2). (B) Hiperforin 2 boyutlu molekül yapısı

2.2.9. Harpagosit

Harpagosit, oldukça çekici farmasötik özelliklere sahip bir iridoid glikozittir. *Harpagophytum procumbens* 'teki iridoid havuzunun ana bileşenidir ve farmasötik ürünlerin ve botanik takviyelerin standardizasyonu için kullanılır. Bileşik ayrıca diğer bazı bitki türlerinden ve in vitro bitki sistemlerinden izole edilmiştir.

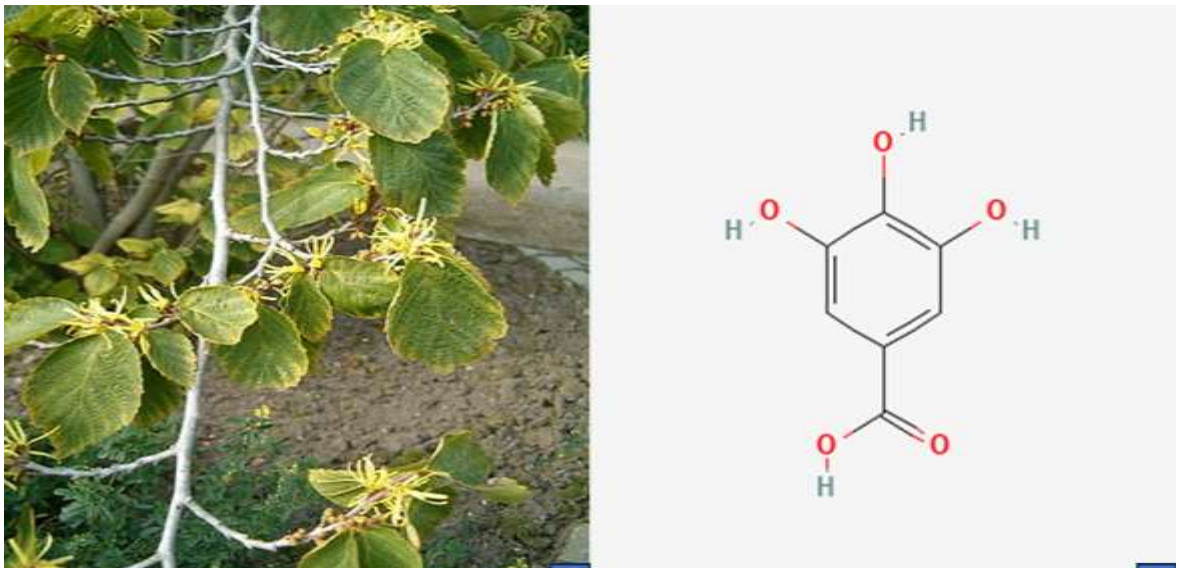
Harpagophytum bitkileri yüzyıllardır Güney Afrika'nın Khoisan halkı tarafından ateş, gastrointestinal problemler, diyabet, hipertansiyon ve kan hastalıkları gibi çeşitli sağlık bozukluklarını tedavi etmek için kullanılmaktadır.

Geçen yüzyılın ortalarında, birkaç sistematik araştırma, bitkinin yumrularından elde edilen özlerin dejeneratif romatoid artrit, osteoartrit, tendinit, böbrek ve kalp hastalıklarının tedavisinde etkili olduğunu ortaya koymuştur. H. procumbens şu anda Avrupa Farmakopesi'sinde romatizma ve artritik rahatsızlıkların tedavisi için listelenmiştir (Stewart ark., 2005).



Şekil 2.10 (A) *Harpagophytum* bitkisi (Magnus, 2007) (B) Harpagosit 2 boyutlu molekül yapısı

2.2.10. Gallik Asit

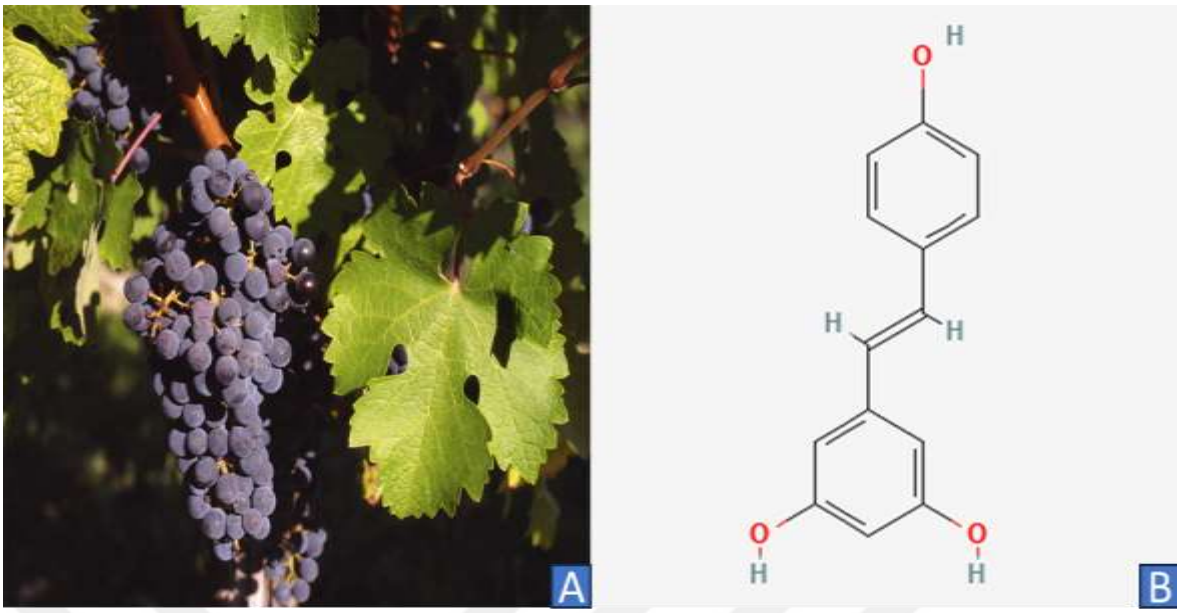


Şekil 2.11. (A) *Hamamelis* bitkisi (Anonim 3). (B) Gallik asit 2 boyutlu molekül yapısı

Gallik asit hidroliz olabilen tanenlerden (gallotanen) elde edilen, tıp ve eczacılıktan boya, kimya ve besin endüstrilerine kadar çok geniş bir alanda çeşitli amaçlarda kullanılan bir organik asittir. Gallik asit, antimantar, antioksidan ve antiviral etkilere sahiptir. Normal hücrelere zarar vermeden, kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterir. Hamamelis (Cadı fındığı), Hamamelidaceae familyasından Hamamelis cinsini oluşturan ikisi Kuzey Amerika biri Japonya ve bir türü de Çin'de bulunan bitkilerin ortak adıdır. Diğer bir ismi sihirli ceviz olan bitki, genellikle cilt bakımında ve cilt hastalıklarında tedavi amaçlı kullanılır (Wianowska ve ark., 2023).

2.2.11. Resveratrol

Resveratrol, bir metilen köprüsü ile birleştirilmiş 2 aromatik halkadan oluşan bir bileşik grubu olan stilben ailesinin bir üyesidir. Bitkiler aleminde 30'dan fazla stilben ve stilben glikozit tanımlanmıştır. Resveratrolün (3,5,4'-trihidrostilben) diyet tüketimiyle ilişkili potansiyel sağlık yararlarına olan ilgi son on yılda önemli ölçüde artmıştır. Resveratrol, mantar enfeksiyonlarının ilerlemesini önleyen bir fitoaleksin polimer ailesi olan viniferinlerin ana molekülüdür. Monomerik resveratrol ve/veya resveratrol içeren gıdaların artan tüketimi, daha iyi sağlıkla ilişkilendirilebilir. Resveratrol, bitkilerde özellikle kırmızı üzümde, yer fıstığında ve ananasta yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır (Berman ve ark., 2007).



Şekil 2. 12 (A) *Vitis vinifera* bitkisi (Magnus 2008). (B) Resveratrol 2 boyutlu molekül yapısı

3. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Frischholz ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan çalışma da resveratrolün 3 boyutlu eklem kondrosit yapılarında ECM birikimi üzerindeki etkisini araştırmıştır. Çalışma, kırmızı üzümlerde ve kırmızı şarapta bulunan doğal olarak oluşan bir bileşik olan resveratrolün, proinflamatuar bir sitokin olan IL-1β 'nın ECM birikimi üzerindeki olumsuz etkilerine karşı koyabildiğini bulmuştur. Elde edilen bulgulara göre, resveratrolün, osteoartrit gibi durumlarda kıkırdak degradasyonunun tedavisi için terapötik bir ajan olarak potansiyele sahip olabileceği öngörülmektedir.

Khan ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan çalışmada, bitkilerden elde edilen küçük bir molekül olan Wogonin'in insan osteoartrit kondrositleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışma, Wogonin'in ROS/ERK/Nrf2 sinyal yollarını aktive ederek güçlü antiinflamatuar ve kondroprotektif etkiler sergilediği bulunmuştur. Ayrıca, Wogonin'in inflamsyonu önleyerek ve kıkırdağı koruyarak osteoartrit tedavisi için terapötik bir ajan olma potansiyeline sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Khan ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan çalışmada Scutellaria baicalensis kök ekstresinin Wogonin açısından zengin bir fraksiyonunun insan osteoartrit kondrositleri üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Çalışmada, kullanılan ekstraktın, proinflamatuar sitokin interlökin-1beta (IL-1beta) tarafından indüklenen Aktivatör Protein 1 (AP-1) adı verilen bir transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu baskılayarak kondroprotektif etkiler uyguladığını bulmuştur. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, bu ekstraktın, inflamasyonu önleyerek ve kıkırdağı koruyarak osteoartrit tedavisi için terapötik bir ajan olma potansiyeline sahip olabileceği öngörülmektedir.

Park ve arkadaşlarının (2016) yapmış olduğu çalışmada, kurkumin ve tetrahidro-kurkumin'in östrojen eksikliği olan sıçanlarda osteoartrit semptomları ve proinflamatuar sitokinler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışma da hem kurkumin hem de tetrahidro-kurkumin'in osteoartrit semptomlarının gelişimini önlediğini ve proinflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu azalttığını bulmuştur. Bu bileşiklerin osteoartrit tedavisi için terapötik ajanlar olarak potansiyele sahip olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca yapılan bu çalışma, kurkumin ve tetrahidro-kurkumin'in östrojen eksikliği olan sıçanlarda osteoartrit tedavisi için terapötik ajanlar olarak potansiyele sahip olabileceğini öne süren ilk çalışma olmuştur.

Qiu ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan çalışmada, osteoartritli sıçanlarda Quercetin'in mitokondriyal disfonksiyon ve biyogenez üzerindeki etkisini araştırmıştır. Yapılan bu çalışma da, birçok meyve ve sebzede bulunan bir flavonoid olan Quercetin'in, osteoartritli sıçanlarda AMPK/SIRT1 sinyal yolunu yukarı regüle ederek mitokondriyal disfonksiyonu azaltabildiğini ve biyogenezi destekleyebildiğini bulunmuştur. Sonuçlara göre, Quercetin'in, osteoartrit gelişiminde önemli bir rol oynayan hücrelerin güç merkezleri olan mitokondri fonksiyonunu iyileştirerek osteoartrit tedavisi için terapötik bir ajan olarak potansiyele sahip olabileceğinin önemini vurgulamaktadır.

Shukla ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan araştırmada, narın biyoyararlı bileşenlerinin/ metabolitlerinin insan kondrositlerinde COX2 aktivitesi ve IL-1 beta kaynaklı PGE2 üretimi üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Yapılan bu araştırmada, narın bu bileşenlerinin/ metabolitlerinin insan kondrositlerinde tercihen COX-2 aktivitesini ve IL-1beta kaynaklı PGE2 üretimini inhibe ettiğini bulmuştur. Bu sonuca göre narın İnflamasyonu inhibe ederek ve kıkırdağı koruyarak osteoartrit tedavisi için terapötik bir ajan olma potansiyeline sahip olabileceği öngörülmektedir.

Zhang ve arkadaşlarının (2016) yapmış olduğu çalışmada, travma sonrası osteoartrit fare modelinde Kurkuminin osteoartrit ilerlemesi ve ağrı semptomları üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Yapılan bu çalışmada, Kurkuminin osteoartritin ilerlemesini yavaşlattığını ve ağrı semptomlarını hafiflettiğini bildirmişlerdir. Bu sonuca göre Kurkuminin osteoartrit tedavisi için terapötik bir ajan olma potansiyeline sahip olabileceğini düşündürmüştür. Çalışma ayrıca, Kurkuminin travma sonrası osteoartrit tedavisinde özellikle yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Ahmed ve arkadaşlarının (2005) yapmış olduğu çalışmada, *Punica granatum* ekstraktının insan kondrositlerinde matriks metalloproteinazların ekspresyonu ve MAP kinazları ve NF-κB 'nin aktivasyonu üzerindeki etkilerini araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada, Punica granatum ekstraktının, IL-1 beta'ya yanıt olarak insan kondrositlerinde matriks metaloproteinazların ekspresyonunu ve MAP kinazları ve NF-κB 'nin aktivasyonunu inhibe ettiğini bulmuştur. Bu sonuca göre *Punica granatum* ekstraktının içerisinde bulunan aktif fitokimyasal bileşiklerin osteoartrit tedavisi için inflamasyonu engelleyerek ve kıkırdağı koruyarak terapötik bir ajan olma potansiyeline sahip olabileceğini vurgulamaktadır.

Bu bağlamda, ADAMTS5, agrekan ve kollajen tip II gibi kıkırdağın önemli bileşenlerini parçalayarak osteoartritin gelişmesinde ve ilerlemesinde kilit rol oynayan bir enzimdir. OA 'lı bireylerin eklemlerinde yüksek ADAMTS5 seviyeleri bulunduğu literatür veri ile sabittir ve ADAMTS5'in hedeflenmesi OA tedavisi için potansiyel bir terapötik strateji olarak önerilmektedir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, ADAMTS5 inhibisyonunun kıkırdak yıkımını yavaşlatabileceğini ve eklem fonksiyonlarını iyileştirebileceğini göstermektedir. Sunulan çalışmada seçilmiş IL-1β inhibitörlerinin aynı zamanda tedavi amacı ile ADAMTS5 inhibitörü olarak görev alıp alamayacağının in siliko analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE METOT

4.1. Materyal

Docking öncesi hazırlık, docking ve analiz aşamalarında Cpu (Amd Ryzen 5600), Ram 16gb, Gpu (GeForce RTX 3060 Twin Edge 12 GB GDDR6 192 Bit) donanım özelliklerine sahip bilgisayar kullanılmıştır. Ve yine materyal olarak, Çizelge 4.1 de isimleri, elde edildiği veri bankaları ve ID / CID'ı verilen moleküllerin 3B yapılarının pdb dosya formatları kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Molekül isimleri, elde edildiği veri bankaları ve tanımlama kodları.

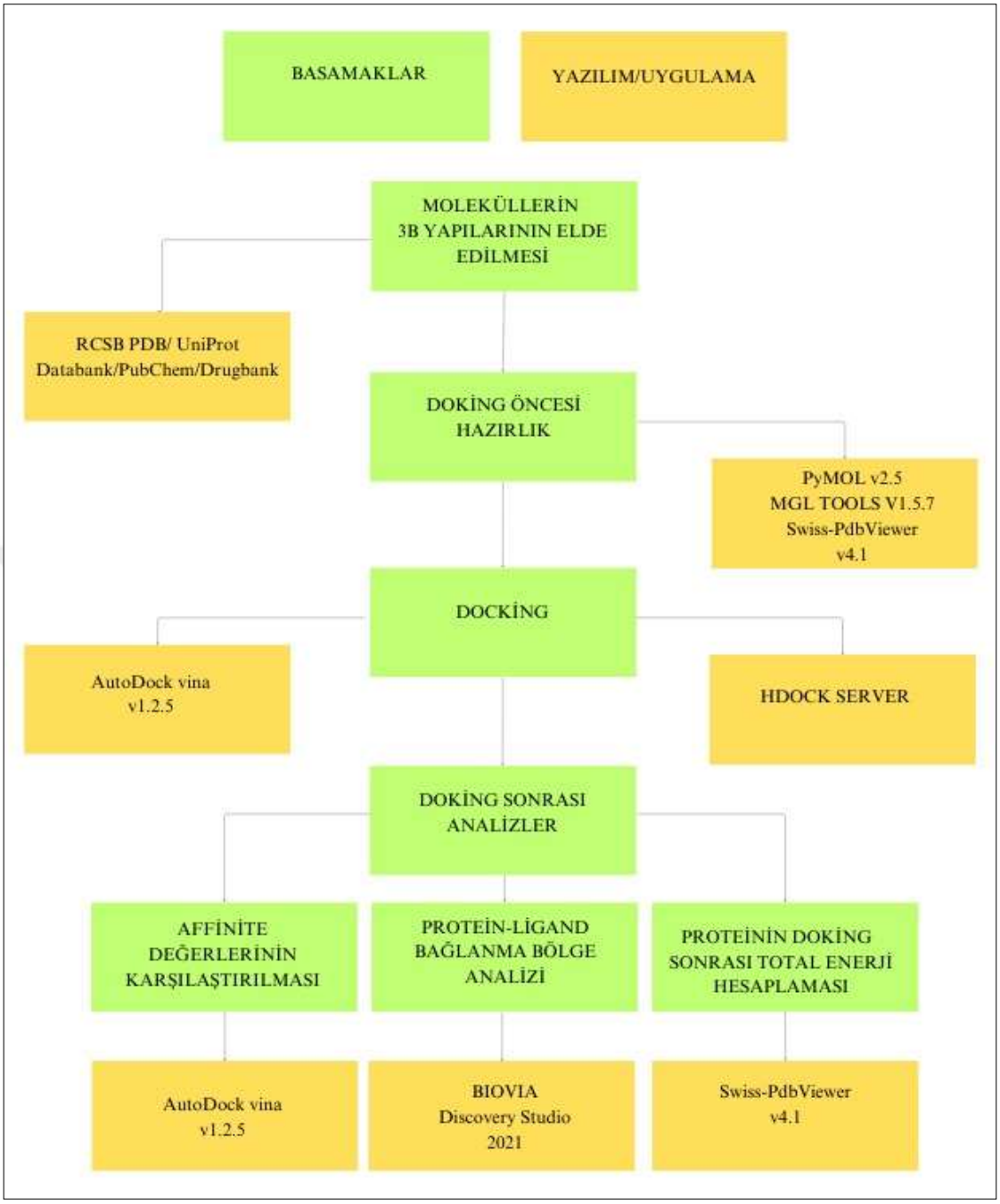
MOLEKÜL	VERİ BANKASI	ID/CID
ADAMTS5	UniProt	Q6TY16
EGCG	PubChem	65064
APİGENİN	PubChem	5280443
OLEUROPEİN	PubChem	5281544
HARPOGOSİT	PubChem	5281542
HİPERFORİN	PubChem	441298
GALLİK ASİT	PubChem	370
RESVERATROL	PubChem	445154
ALDUMASTAT	PubChem	121448788
WOGONİN	PubChem	5281703
BÜTEİN	PubChem	5281222

4.2. Metot

Moleküllerin 3B yapıları pdb dosya formatında Çizelge 4.1 de verilen veri bankalarından elde edildi. Elde edilen ADAMTS5 proteini öncelikle Pymol v2.5 yazılımı kullanılarak görüntülendi. Bu aşamada proteinde kayıp atom varlığı, üzerinde başka ligand ve iyon bağlı olup olmadığı kontrol edildi. Proteine ait pdb dosyası MGL TOOLS içerisinde bulunan AUTODOCK TOOLS v1.5.7 yazılımına aktarıldı. Burada proteinden su molekülleri uzaklaştırıldı ve polar bağlar eklendi. Proteinin son hali pdb dosya formatında kaydedildi. Kaydedilen pdb dosyası Swiss-Pdb Viewer v4.1 aktarıldı. Burada, proteinin enerji minimizasyonu yapıldı. Proteine ait pdb dosyası daha sonra AUTODOCK TOOLS v1.5.7 yazılımında görüntülenerek docking işlemi için bir gridbox oluşturuldu. Gridbox X, Y, Z değerleri; X center = 2.534, Y center = -21.112 , Z center = -11.434, X size = 110, Y size = 100, Z size = 126 olarak ayarlandı. AUTODOCK TOOLS v1.5.7 yazılımı kullanılarak proteine ve ligandlara ait pdb dosyaları pdbqt dosya formatında kaydedildi.

Autodock Vina V1.2.5 yazılımı kullanılarak protein ile her bir ligand için tek tek docking yapıldı. Ligandlara ait affinite sonuçları txt dosya formatında kaydedildi. Yazılım çıktısı olarak her bir liganda ait out.pdbqt dosyası ile proteine ait out.pdbqt dosyası PyMOL v2.5 yazılımında açılarak 1.konformasyon kompleks halleri pdb dosya formatında kaydedildi. Doğrulama için ise HDOCK SERVER (http://hdock.phys.hust.edu.cn/) kullanıldı. Her bir ligand ADAMTS5 ile docking yapıldı

ve affinite değerleri kaydedildi. PyMOL v2.5 yazılımı ile kaydedilen kompleks pdb dosyaları BIOVİA Discovery Studio (2021) yazılımı kullanılarak protein ile ligand arasındaki bağ türleri, proteine ait bağlanma bölgeleri çıkartıldı. 2D diyagram halinde png formatında kaydedildi. Her bir protein-ligand kompleksinin Swis-Pdb Viewer V4.1 yazılımı kullanılarak docking sonrası total enerjileri hesaplandı ve kaydedildi. İnhibitör olarak seçilen tüm moleküllerin admetSAR V2.0 (http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar2) sunucusu kullanılarak, absorbsiyon, dağılım, metebolizma ve toksikolojik özellikleri belirlendi.



Şekil 4.1 Docking iş akış diyagramı.

Her bir yeşil kutu docking öncesinde, docking sırasında ve docking sonrasındaki basamakları, sarı kutular ise docking öncesi ve sonrası analizler için kullanılan yazılımları ve uygulamaları göstermektedir.

5. BULGULAR

5.1. Affinite ve Yerleştirme Değerleri

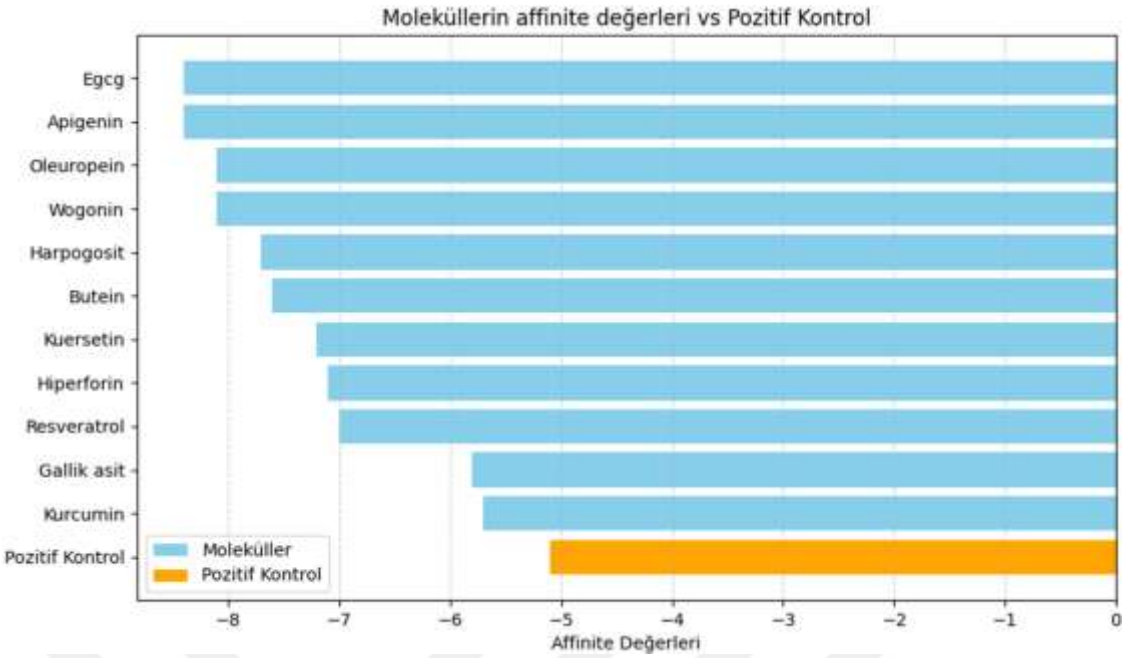
AutoDock Vina da afinite değeri, bir ligand (küçük molekül) ile bir reseptör (hedef protein veya makromolekül) arasındaki öngörülen bağlanma enerjisini temsil eder. Bu değer tipik olarak kcal/mol cinsinden ifade edilir ve ligand ile reseptör arasındaki etkileşimin gücünün bir ölçüsü olarak değerlendirilir. Daha düşük bir afinite değeri, daha uygun bir bağlanmayı gösterir ve ligand ile reseptör arasında daha güçlü bir etkileşim olduğunu gösterir.

HDOCK sunucusu, bir protein (reseptör) ile bir ligand (küçük molekül) arasındaki bağlanma modunu ve afiniteyi tahmin etmek için kullanılan moleküler bir yerleştirme platformudur. HDOCK da "yerleştirme değeri" tipik olarak belirli bir protein-ligand kompleksi için tahmin edilen bağlanma enerjisini veya puanı ifade eder. Bu puan Autodock Vina ‘da ki gibi daha düşük bir yerleştirme puanı daha uygun bir bağlanmayı gösterir ve ligand ile reseptör arasında daha güçlü bir etkileşim olduğunu gösterir.

Çizelge 5. 1 Affinite ve yerleştirme değerleri.

ETKEN MADDE	AUTODOCK VİNA (Kcal/mol)	HDOCK (yerleştirme değeri)
EGCG	-8.4	-241.72
Apigenin	-8.4	-240.36
Oleuropein	-8.1	-209.70
Wogonin	-8.1	-208.43
Harpogoside	-7.7	-168.26
Bütein	-7.6	-164.08
Quercetin	-7.2	-162.10
Hiperforin	-7.1	-160.80
Resveratrol	-7.0	-156.90
Gallik asit	-5.8	-147.78
Kurkumin	-5.7	-143.77
Pozitif Kontrol	-5.1	-127.43

Yukarıdaki Çizelge 5.1 de verilen docking sonrası affinite değerleri verilmiştir. Affinite değerleri göz önüne alındığında Apigenin ve EGCG ve Oleuropein molekülünün pozitif kontrol olarak kullanılan Aldumastat molekülüne göre kıyasla düşük serbest bağlanma enerji seviyesi ile bağlanma olasılığı en yüksek üç molekül olduğu anlaşılmıştır. Yine docking yapılan diğer moleküllerinde pozitif kontrolden daha uygun ve olumlu bir bağ yaptığı, ADAMTS5 ile daha uyumlu bir etkileşim gösterdiği görülmektedir.

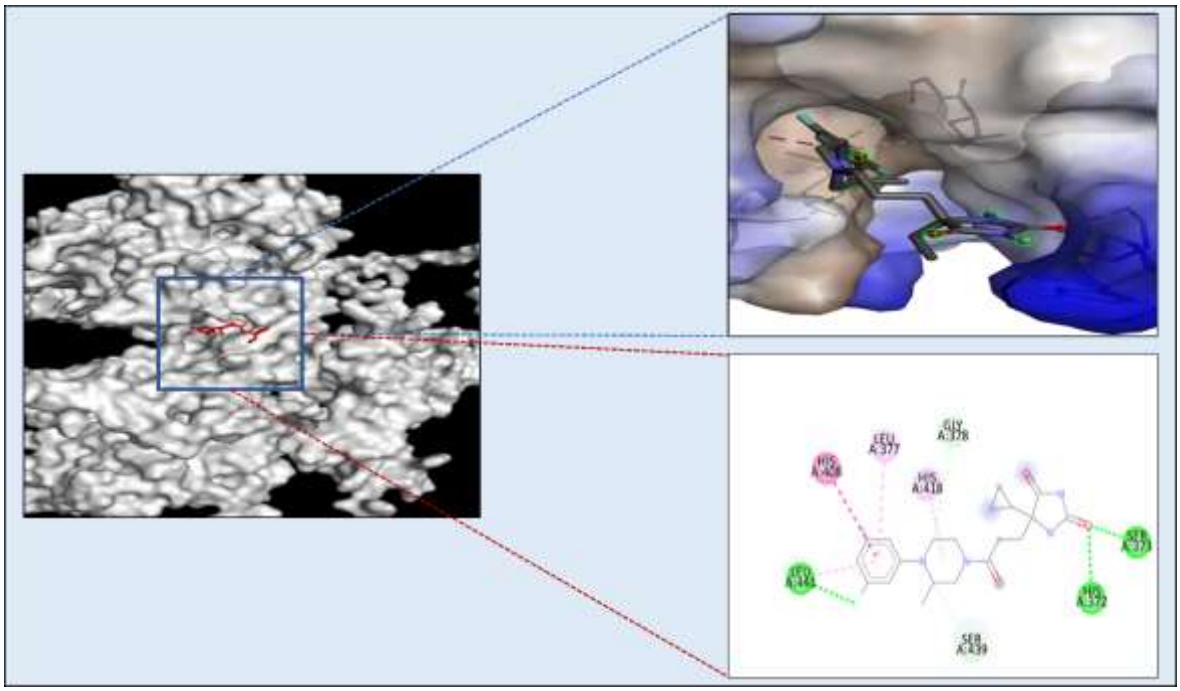


Şekil 5.1 Seçilen inhibitörlerin pozitif kontrol ile karşılaştırmalı grafiği

5.2. Bağlanma Şekilleri ve Bölgeleri

5.2.1. Pozitif Kontrol (Aldumastat)

Şekil 5.2 ’de pozitif kontrol olarak seçilen molekül olan Aldumastat ve ADAMTS5’in docking sonrası kompleks yapısı sunulmuştur.



Şekil 5.2 ADAMTS5 (gri) ile Aldumastat’ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri.

Elde edilen bağ türleri bölgelerine göre; Aldumastat ve Histidin A: 408 (HIS A: 408) arasında gözlenen pi-pi t-şekilli bağ, olumlu bir aromatik istifleme etkileşiminin göstergesidir. Bu etkileşim, moleküller arasında spesifik bir yönelimi teşvik ederek bağlanma afinitesini arttırır.

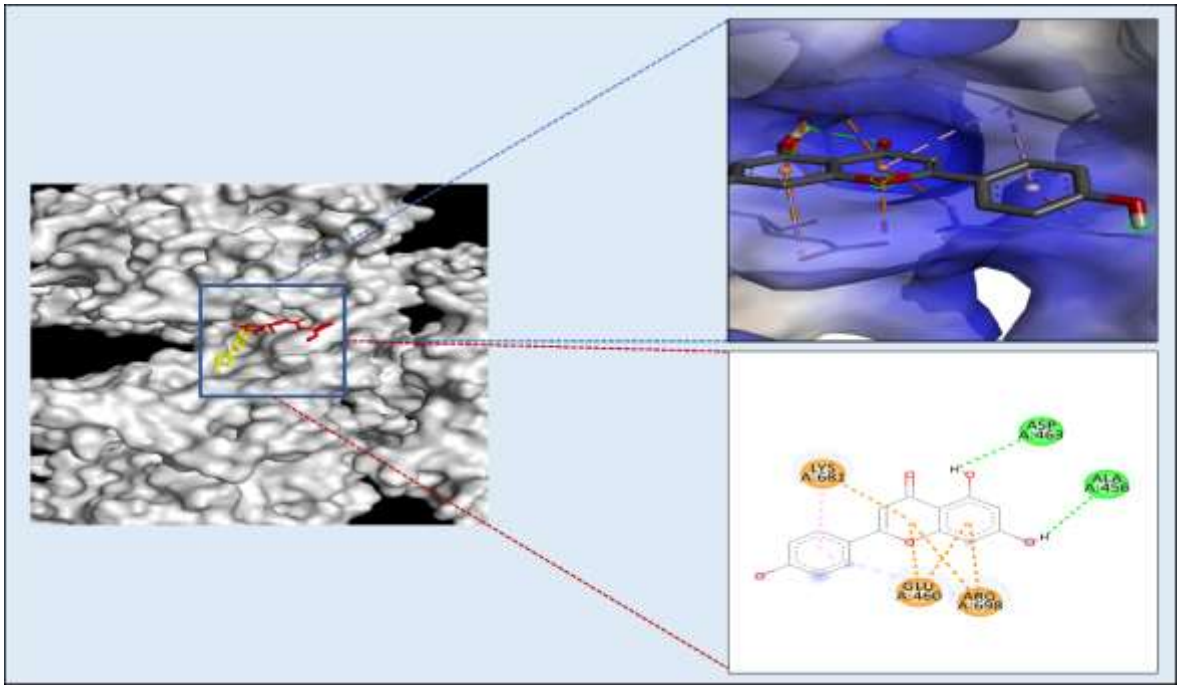
Aldumastat ile Lösin A: 441 (LEU A:441), Histidin A: 372 (HIS A:372) ve Serin A: 373 (SER A:373) arasında oluşan geleneksel hidrojen bağları, kompleksin stabilizasyonunda çok önemli bir rol oynar. Hidrojen bağları, moleküler etkileşimleri güçlendirme kapasiteleriyle bilinir ve bağlanma bölgesinin yapısal bütünlüğünün korunmasında etkilidir.

Aldumastat ve Histidin A: 418 (HIS A:418) ve Lösin A: 377 (LEU A:377) içeren pi-alkil etkileşimi genel bağlanma gücüne katkıda bulunur. Bu tür etkileşimler, ligandın pi-elektron bulutunu ve proteindeki alkil gruplarını dahil ederek bağlanma arayüzünü güçlendirme yetenekleriyle tanınır.

Son olarak Glisin A: 378 (GLY A:378) ve Serin A: 439 (SER A:439) arasında kurulan karbon hidrojen bağı, komplekse başka bir stabilite katmanı ekler. Karbon hidrojen bağlarının ek bir etkileşim enerjisi kaynağı sağladığı ve proteinin konformasyonel dinamiklerini etkileyebildiği bilinmektedir.

5.2.2. Apigenin

Şekil 5.3 de gösterilen yapıda pozitif kontrol olarak seçilen Aldumastat ile Apigenin molekülünün ADAMTS5 ile bağlanma şeklinin karşılaştırmalı 3B yapısı gösterilmiştir. Kısmi olarak aynı bölgelerden bağlantı yaptığı gözlemlenmiştir.

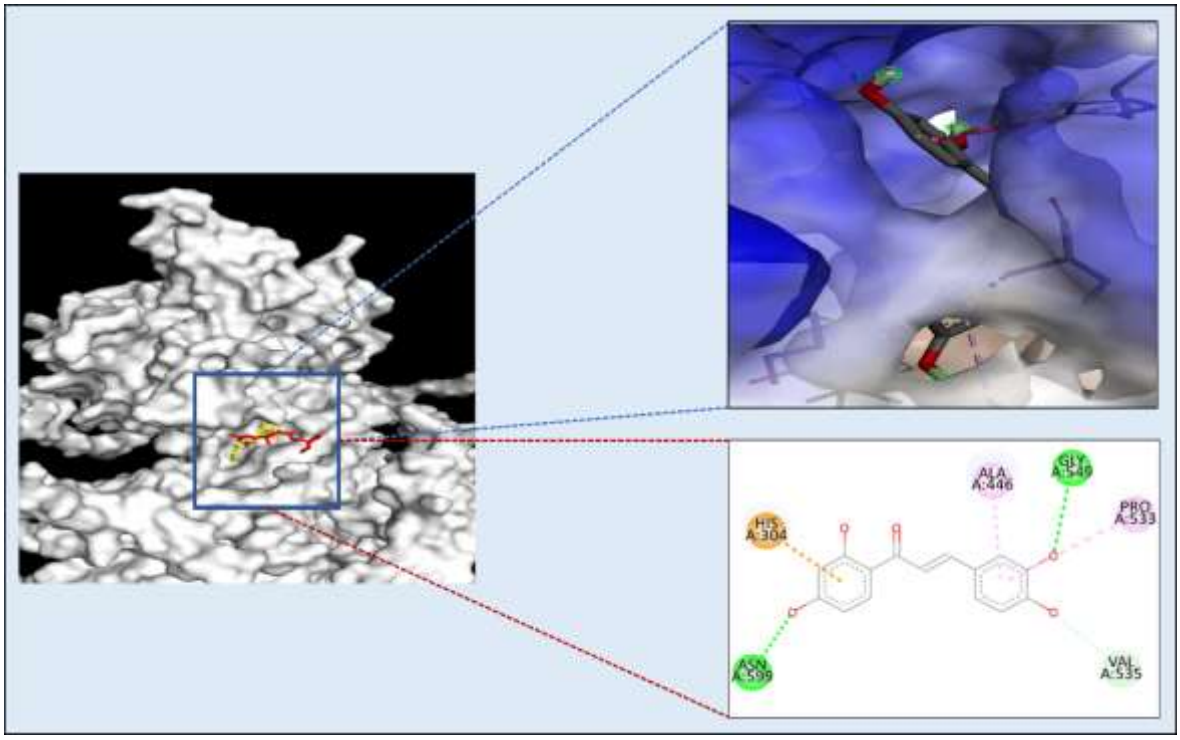


Şekil 5.3 ADAMTS5(gri) ile Apigenin(sarı) ve Aldumastat'ın(kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri.

Elde edilen bağ türleri bölgelerine göre; Apigenin ile hedef protein ADAMTS5 arasındaki bağlanma etkileşimleri araştırıldı. Sunulan analiz verileri dikkate değer bağlanma bölgelerini ve ilgili etkileşimleri ortaya çıkardı. Spesifik olarak LYS A: 681, GLU A: 460 ve ARG A: 698 ile Apigenin arasında güçlü iyonik bağların oluşumunu yansıtan bir pi-katyon etkileşimi gözlemlendi. Ek olarak Apigenin ile ASP A: 463 ve ALA: 456 arasında geleneksel bir hidrojen bağı tanımlandı, bu da bağlanma arayüzünde stabilize edici kuvvetlerin varlığının bir göstergesidir.

5.2.3. Bütein

Şekil 5.4'de pozitif kontrol olarak seçilen ADAMTS5 inhibitörü ile Bütein molekülünün bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. Pozitif kontrol ve Bütein molekülü ADAMTS5'e bağlanma bölgesi olarak çok yakın ve benzer olduğu gözlemlenmiştir.



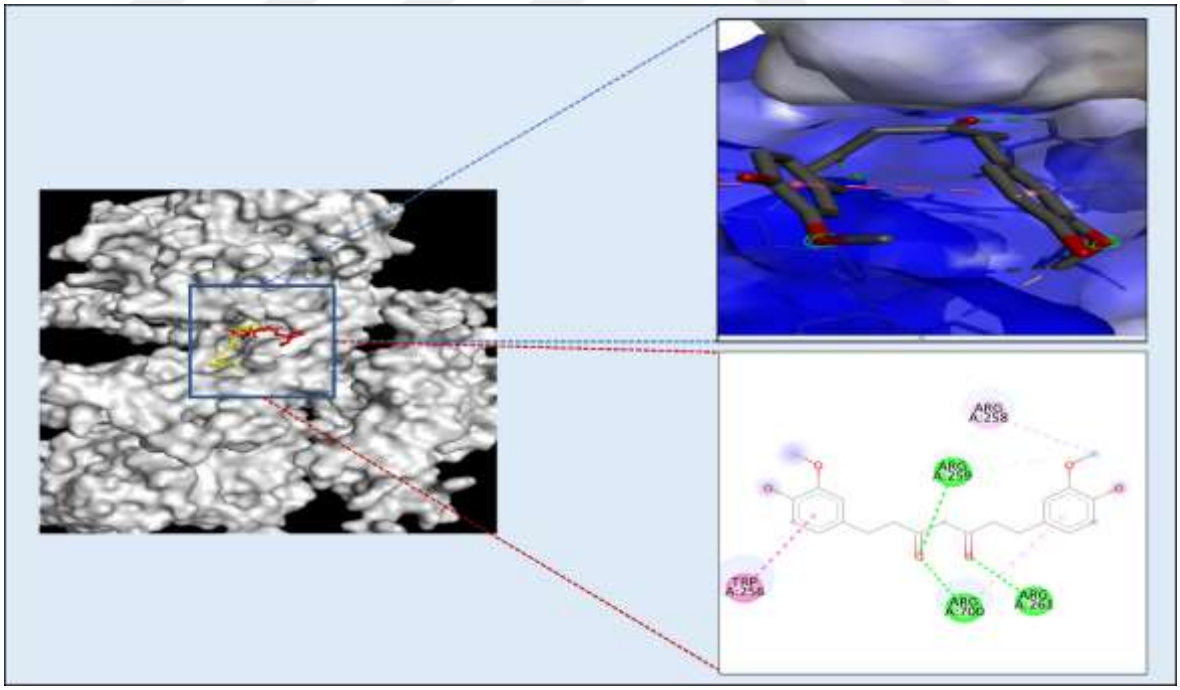
Şekil 5.4 ADAMTS5(gri) Bütein (sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri.

AutoDock Vina kullanılarak yürütülen bu moleküler yerleştirme çalışmasında, küçük molekül ligandı Bütein ve ADAMTS5 proteini arasında spesifik etkileşimler belirlendi. Bu etkileşimler çeşitli bağ türlerini içermektedir ve ilişkilerinin moleküler temelinin anlaşılmasında çok önemli olduğu söylenebilir. ADAMTS5 bağlamında Butein'in biyolojik aktivitesini potansiyel olarak etkiler. Butein, ADAMTS5 içerisinde Asparagin 599 ve Glisin 549 ile geleneksel hidrojen bağları oluşturur. Hidrojen bağları, buteinin fonksiyonel gruplarından bir hidrojen atomunun, amino asit yan zincirleri içindeki elektronegatif atomlarla (tipik olarak oksijen veya nitrojen) uygun bir elektrostatik etkileşim oluşturduğu kovalent olmayan etkileşimlerdir. Bu bağlar kompleksin

stabilitesini arttırabilir ve ligand bağlanması ve tanınmasında önemli bir rol oynayabilir. Butein ve Histidin 304 arasında bir pi-katyon etkileşimi gözlenir. Bu etkileşim, tipik olarak aromatik sistemlerle ilişkili olan buteinin pi elektron bulutunun, Histidin 304'ün imidazol halkasındaki pozitif yüklü nitrojen atomu ile etkileşiminden kaynaklanır, genel bağlanma afinitesini etkiler ve ADAMTS5'in bağlanma cebi içindeki ligandın yönelimini ve özgüllüğünü etkileyebilir. Butein, Alanin 446 ve Prolin 533 ile karbon-hidrojen (C-H) bağları kurar. Bu C-H bağları, kovalent bağlardan nispeten daha zayıftır ancak yine de ligand-protein etkileşimine katkıda bulunabilir. Bu tür etkileşimler, kompleksin bağlanma afinitesini ve stabilitesini modüle etmede önemlidir ve muhtemelen proteinin konformasyonunu ve fonksiyonel özelliklerini etkiler. Son olarak, ADAMTS5 'te Butein ve Valin 535 arasında bir pi-alkil etkileşimi kaydedilmiştir. Bu etkileşim, Butein'in aromatik halkasının pi elektronları ile Valin 535'in alkil grubu arasındaki etkileşimden kaynaklanır. Pi-alkil etkileşimleri, ligandın bağlanma bölgesi içindeki konumunu etkileyebilir ve genel bağlanma enerjisine katkıda bulunabilir.

5.2.4. Kurkumin

Şekil 5.5 'de pozitif kontrol olarak seçilen ADAMTS5 inhibitörünü ve Kurkumin molekülünün bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. Pozitif kontrol ve Kurkumin molekülü ADAMTS5'e bağlanma bölgesi olarak çok yakın ve benzer olduğu gözlemlenmiştir.



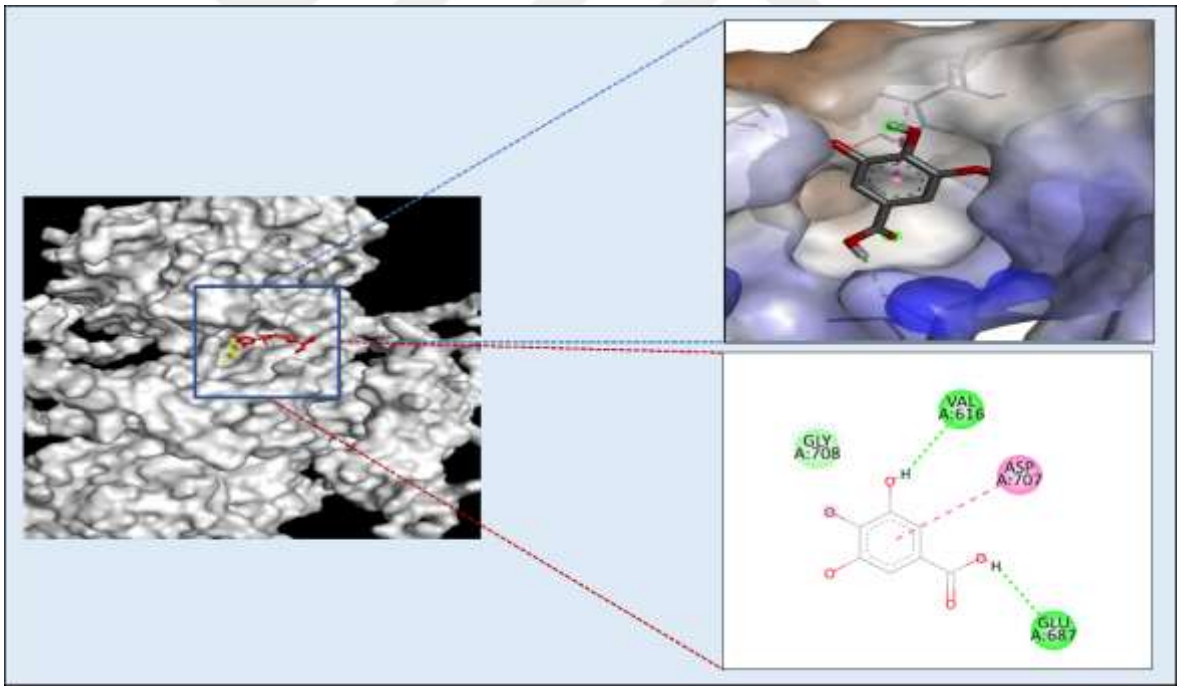
Şekil 5.5 ADAMTS5(gri) Kurkumin (sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri.

Autodock Vina kullanılarak yapılan moleküler yerleştirme çalışmasında Kurkumin'in ADAMTS5 proteinindeki birkaç önemli amino asitle etkileşime girdiği bulundu. Bu etkileşimler

Kurkumin ve ADAMTS5 arasındaki bağlanma mekanizması hakkında değerli bilgiler sağlar. Özellikle Kurkumin, ARG 259, ARG 270 ve ARG 261 ile geleneksel hidrojen bağları oluşturmaktadır; bu durum Kurkumin molekülü ile arjinin kalıntıları arasındaki hidrojen atomlarını içeren güçlü, spesifik etkileşimleri gösterir. Ek olarak, Kurkumin ve TRP 256 arasında bir pi-pi istifleme etkileşimi gözlemlendi; bu durum da Kurkumin ve triptofanın aromatik halkalarının paralel bir şekilde uygun şekilde hizalandığını ortaya koydu. Ayrıca Kurkumin, sırasıyla ARG 258 ve ARG 700 ile alkil ve pi-alkil etkileşimleri sergiledi; bu, arjinin kalıntılarındaki alkil gruplarını içeren spesifik olmayan ancak stabilize edici temasları ima eder. Bu çeşitli etkileşimler toplu olarak, Kurkumin'in ADAMTS5 proteini içindeki genel bağlanma afinitesine ve stabilitesine katkıda bulunur ve potansiyel olarak terapötik etkisini etkiler.

5.2.5. Gallik Asit

Şekil 5.6'da Gallik asit ve pozitif kontrolün ADAMTS5'e bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. Gallik asit ADAMTS5 'e pozitif kontrolün bağlanma yaptığı bölgeye kısmen yakın bir bağlanma göstermiştir.



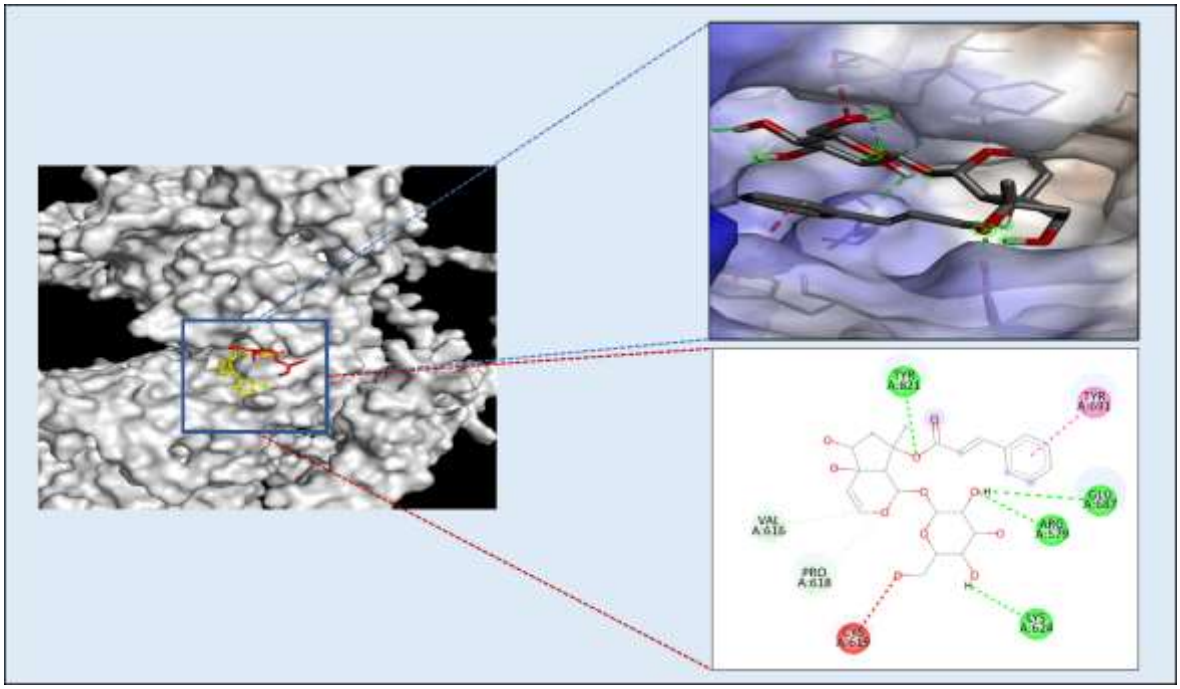
Şekil 5.6 ADAMTS5(gri) Gallik asit (sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri.

Gallik asit molekülü ile ADAMTS5 proteini arasındaki moleküler kenetlenme bağlamında, bu etkileşimin stabilize edilmesinde birkaç anahtar amino asit rol oynar. 616. pozisyondaki valin (VAL) ve 687. pozisyondaki Glutamik Asit (GLU), gallik asit molekülü ile geleneksel hidrojen bağları oluşturur; bu, hidrojen atomlarının önemli bir rol oynadığı güçlü, spesifik etkileşimleri belirtir. 708 pozisyonundaki glisin (GLY), polar olmayan grupların yakınlığı nedeniyle nispeten daha

zayıf ancak yine de önemli olan van der Waals kuvvetleri aracılığıyla etkileşime katkıda bulunur. Ek olarak, 707 pozisyonundaki Aspartik Asit (ASP), pi elektronlarını ve aromatik halkaları içeren spesifik bir kovalent olmayan bağ olan amid-pi yığılmış bir etkileşime girer. Bu farklı bağlanma türleri, gallik asit-ADAMTS5 etkileşiminin çok yönlü doğasını aydınlatarak, bu amino asitlerin kompleksin stabilitesini ve bağlanma afinitesini yönetmedeki önemini vurgularyarak, biyolojik süreçler ve ilaç keşif çabaları için potansiyel çıkarımlarla birlikte ortaya çıkar.

5.2.6. Harpagosit

Şekil 5.7'de pozitif kontrol olarak seçilen ADAMTS5 inhibitörünü ve harpagosit molekülünün bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. Pozitif kontrol ve harpagosit molekülü ADAMTS5'e bağlanma bölgesi olarak kısmen yakın ve benzer olduğu gözlemlenmiştir.



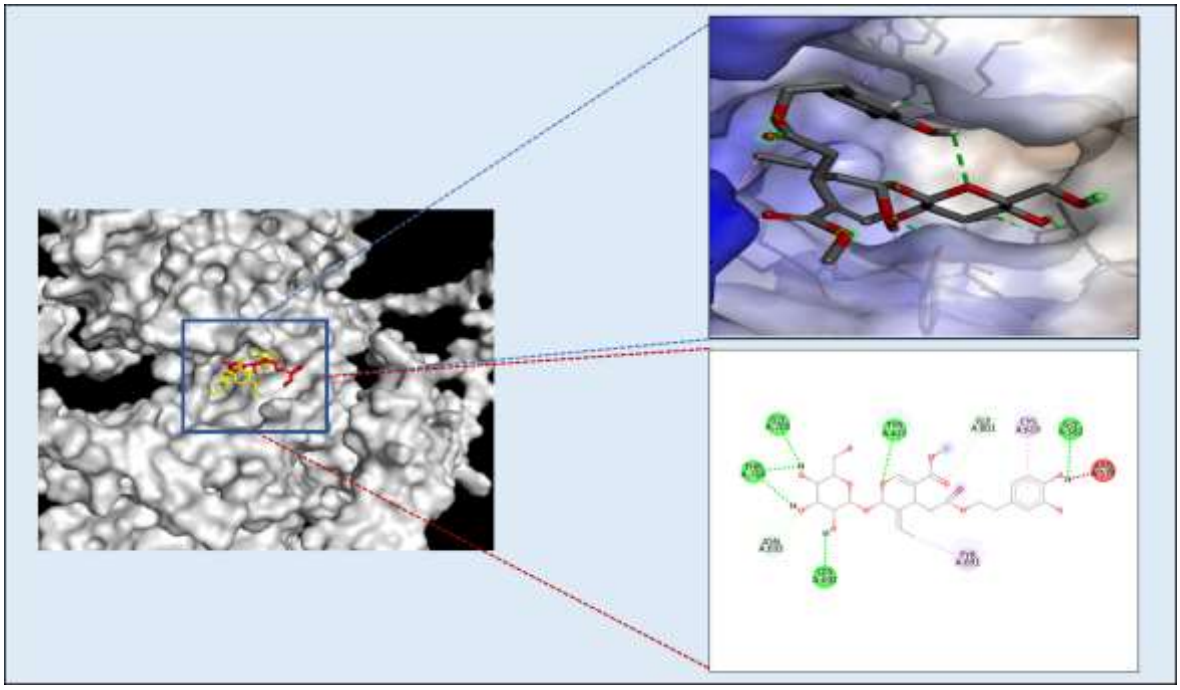
Şekil 5. 7 ADAMTS5(gri) Harpagosit (sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri.

AutoDock Vina kullanılarak yapılan moleküler yerleştirme simülasyonu bağlamında, harpagosit molekülü ile ADAMTS5 proteini arasındaki etkileşim incelendi. Özellikle Harpagosit molekülü, ADAMTS5 içindeki spesifik amino asitlerle farklı türde etkileşimler kurar. Bu etkileşimler arasında TYR 821, GLU 687, ARG 579, LYS 624 ile geleneksel hidrojen bağları ve VAL 616 ve PRO 618 ile ilginç bir karbon-hidrojen bağı yer alır. Ayrıca, CYS 619 ile potansiyel sterikliği gösteren (iki molekül arasında çatışma veya itme) olumsuz bir alıcı-alıcı etkileşimi gözlemlendi. Son olarak, TYR 691 ile tirozinin aromatik halkalarını ve Harpagosit molekülünü içeren bir pi-pi istifleme etkileşimi kaydedilmiştir. Bu moleküler etkileşimlere ilişkin bu tür ayrıntılı bilgiler, Harpagosit molekülünün ADAMTS5 proteini ile etkileşiminin potansiyel bağlanma

mekanizmalarını ve biyolojik sonuçlarını açıklamada etkili olup, moleküler biyoloji alanında daha fazla araştırma ve anlayış için bir temel sağlamaktadır.

5.2.7. Oleuropein

Şekil 5.8'de pozitif kontrol olarak seçilen ADAMTS5 inhibitörünü ve Oleuropein molekülünün bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. Pozitif kontrol ve Oleuropein molekülü ADAMTS5 'e bağlanma bölgesi olarak çok yakın ve benzer ve fazla çakışma olduğu gözlemlenmiştir.

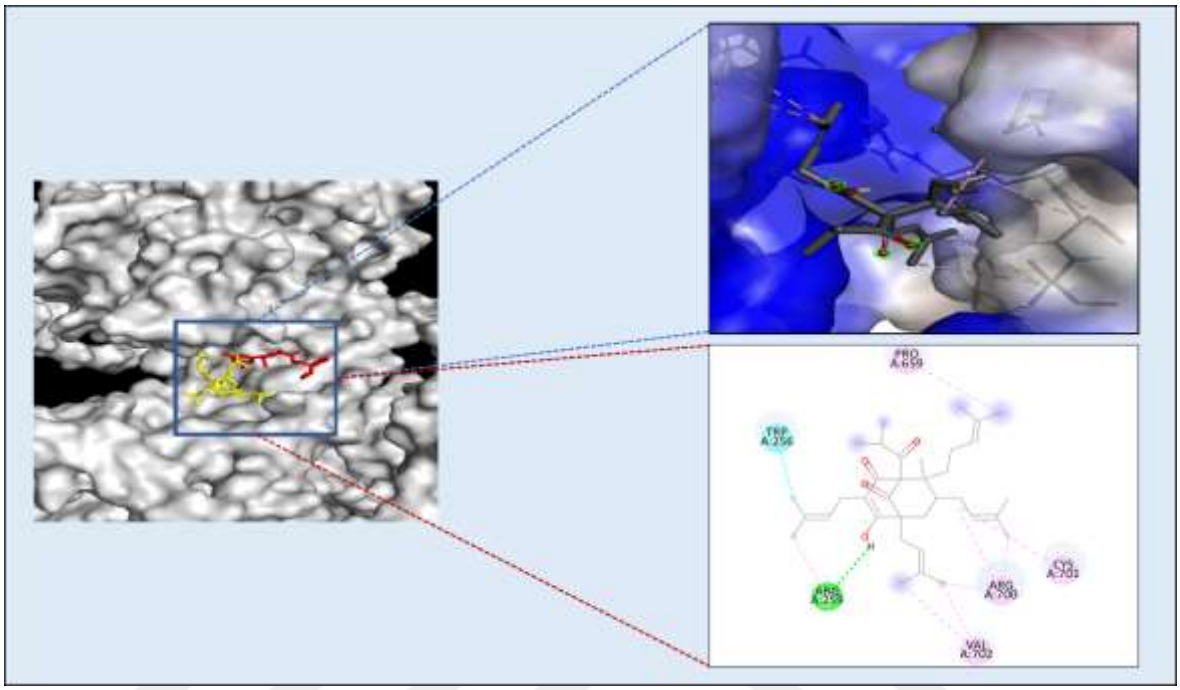


Şekil 5.8 ADAMTS5(gri), Oleuropein (sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri.

Oleuropein'in ADAMTS5 proteini ile moleküler kenetlenme simülasyonunda birçok kritik etkileşim tespit edilmiştir. Ligand ile SER 692, THR 704, GLY 705, TYR 821 ve GLY 582 amino asitleri arasında geleneksel hidrojen bağları oluşturulur; bu, oleuropeindeki hidrojen atomları ile bu amino asitlerdeki elektronegatif atomlar arasındaki güçlü çekimleri gösterir. ASN 693 ve GLY 801 ile karbon hidrojen bağları kurulur; bu, ligandın karbon atomları ile bu amino asitlerin yan zincirlerindeki hidrojen atomları arasındaki hidrofobik etkileşimleri gösterir. ARG 579 ile, ligand ile bu arjinin kalıntısı arasında sterik engel veya çatışma olduğunu düşündüren, olumsuz bir donör etkileşimi gözlenir. Ek olarak, CYS 619 ve TYR 691 ile pi-alkil etkileşimleri meydana gelir; bu da ligandın aromatik halkası ile bu amino asitlerin hidrofobik kısımları arasında olumlu etkileşimler olduğunu gösterir. Bu çeşitli etkileşimler, Oleuropein-ADAMTS5 protein kompleksinin stabilitesi ve özgüllüğünde önemli bir rol oynamakta ve biyolojik sistemlerde ligand bağlanmasının moleküler mekanizmalarına dair değerli bilgiler sunmaktadır.

5.2.8. Hiperforin

Şekil 5.9'da pozitif kontrol olarak seçilen ADAMTS5 inhibitörünü ve Hiperforin molekülünün bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. Pozitif kontrol ve hiperforin molekülü ADAMTS5'e bağlanma bölgesi olarak kısmen yakın ve benzer olduğu gözlemlenmiştir.

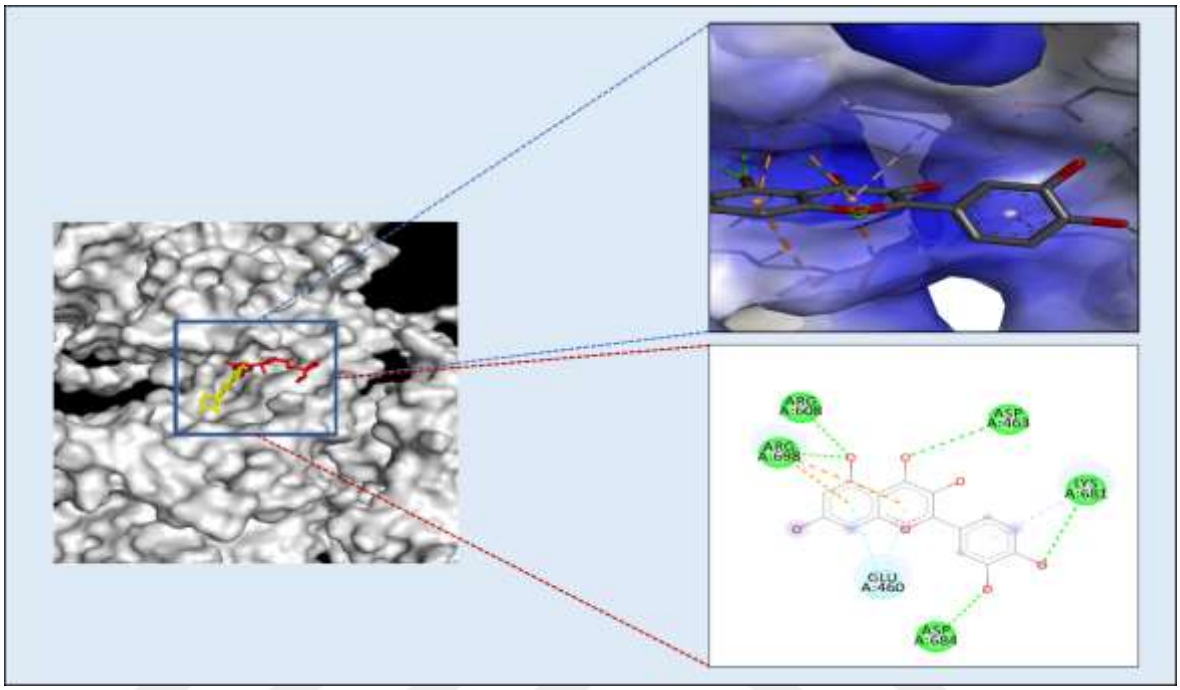


Şekil 5.9 ADAMTS5(gri), Hiperforin(sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri.

Autodock Vina kullanılarak Hiperforin molekülü ile ADAMTS5 proteini arasında gerçekleştirilen moleküler kenetlenme simülasyonunda birçok dikkate değer etkileşim gözlemlendi. İlk olarak arjinin (ARG) 259, hiperforin ile güçlü bir geleneksel hidrojen bağı sergiledi; bu, güçlü bir elektrostatik etkileşime işaret ederken aynı zamanda hidrofobik yan zinciri nedeniyle bir alkil etkileşimine de girmektedir. Ek olarak triptofan (TRP) 256, Hiperforin ile bir pi-alkil etkileşimi gösterdi; bu, stabilizasyon için çok önemli olabilecek bir aromatik istifleme kuvvetine işaret ediyor. Ayrıca valin (VAL) 702, arjinin (ARG) 700, sistein (CYS) 701 ve prolin (PRO) 659 amino asitlerinin tümü hiperforin ile alkil etkileşimlerine katılmıştır; bu da ağırlıklı olarak hidrofobik yan zincirleri aracılığıyla polar olmayan etkileşimler olduğunu düşündürmektedir. Bu çeşitli etkileşimler toplu olarak hiperforin-ADAMTS5 kompleksinin stabilitesine ve bağlanma afinitesine katkıda bulunarak ligand-protein etkileşiminde rol oynayan moleküler kuvvetleri aydınlatır.

5.2.9. Quercetin

Şekil 5.10'da pozitif kontrol olarak seçilen ADAMTS5 inhibitörünü ve Quercetin molekülünün bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. Pozitif kontrol ve Quercetin molekülü ADAMTS5'e bağlanma bölgesi olarak kısmen yakın ve benzer olduğu gözlemlenmiştir.

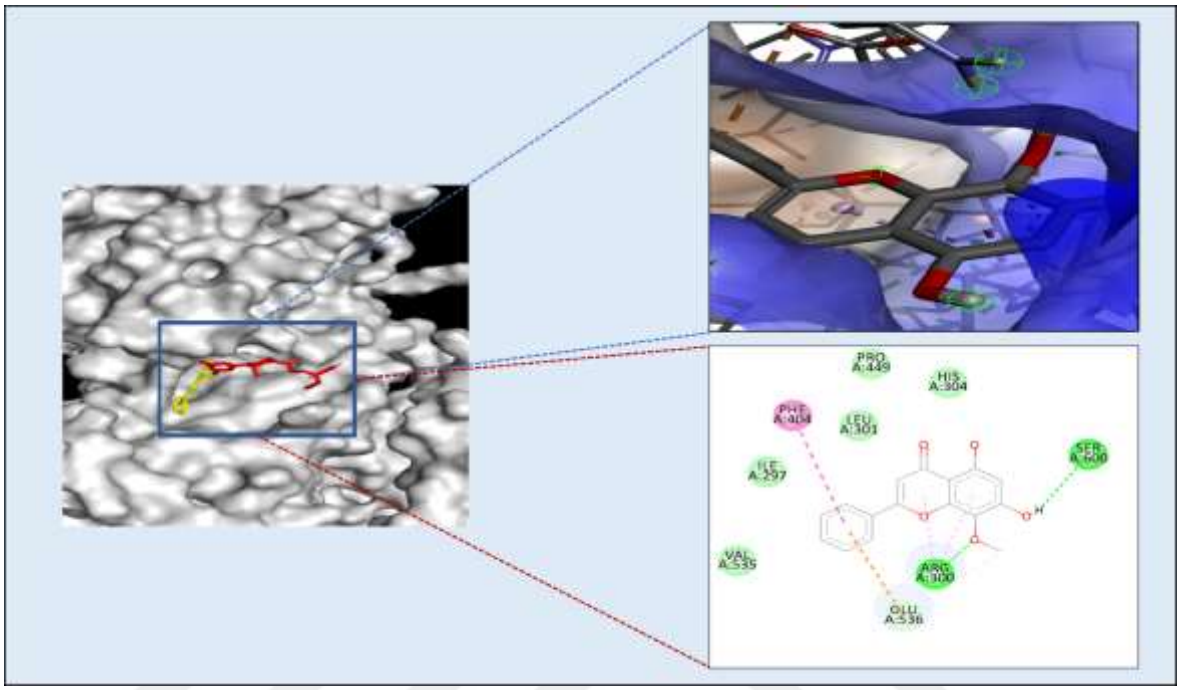


Şekil 5.10 ADAMTS5(gri), Quercetin(sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri.

Quercetin'in ADAMTS5 proteinine ait farklı amino asitlerin farklı türde etkileşimlere dahil olduğu tanımlandı. Özellikle ASP 684, ARG 698, ARG 608, ASP 463 ve LYS 681 ile geleneksel hidrojen bağları gözlendi; burada bu amino asitler, ADAMTS5 protein dizisi içindeki spesifik pozisyonları temsil etmektedir. Bu hidrojen bağları, Quercetin ile protein arasındaki nispeten zayıf ama önemli etkileşimleri ifade eder. Ek olarak, GLU 460 ile bir pi-anyon etkileşimi kaydedildi; bu, quercetinin aromatik halkasının pi elektronları ile GLU 460 üzerindeki negatif yüklü bir grup arasındaki etkileşimi gösterir. Ayrıca, ARG 698 ile, GLU 460'ın pi elektronlarını içeren bir pi-katyon etkileşimi meydana geldi. Son olarak, LYS 681 ile bir pi-alkil etkileşimi kuruldu; bu, LYS 681'in alkil grubunun Quercetin'in aromatik halkası ile etkileşime girdiğini ortaya koymaktadır. Bu farklı etkileşimler, Quercetin'in ADAMTS5'e bağlanmasının ardındaki moleküler mekanizmalara ışık tutarak, potansiyel terapötik uygulamalar ve protein-ligand etkileşimleri alanında daha ileri araştırmalar için değerli bilgiler sunmaktadır.

5.2.10. Wogonin

Şekil 5.11'de pozitif kontrol olarak seçilen ADAMTS5 inhibitörünü ve Wogonin molekülünün bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. Pozitif kontrol ve Wogonin molekülü ADAMTS5'e bağlanma bölgesi olarak kısmen yakın ve benzer olduğu gözlemlenmiştir.

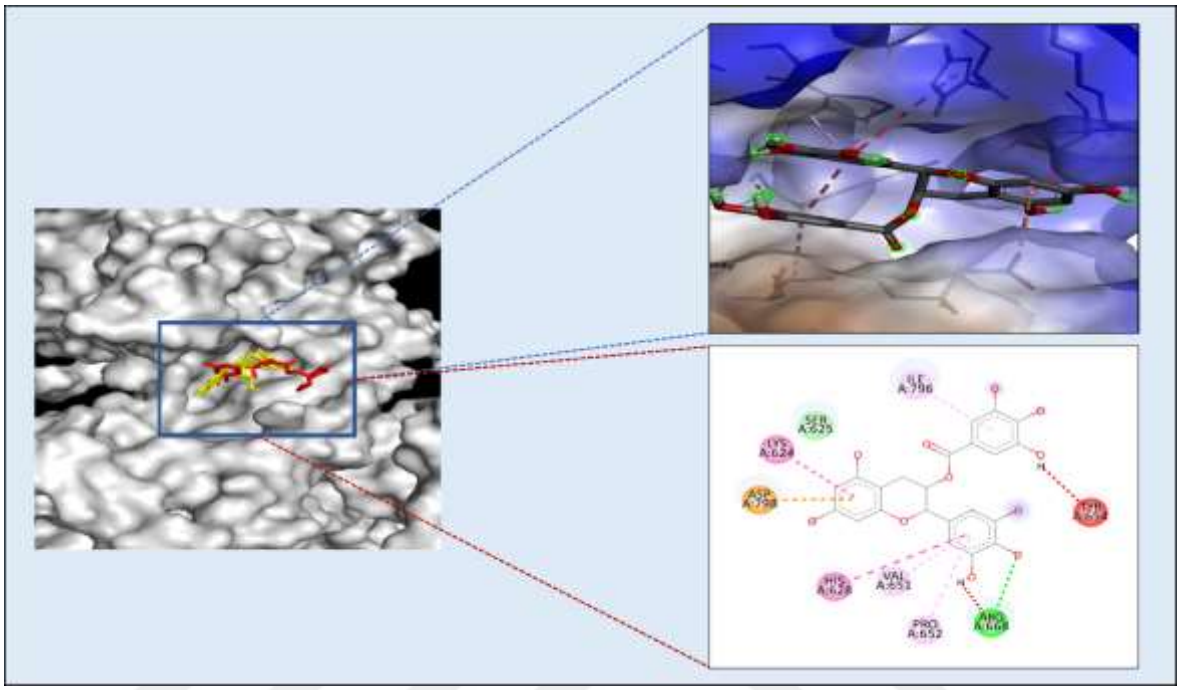


Şekil 5.11 ADAMTS5 (gri), Wogonin (sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri.

Wogonin molekülünün ADAMTS5 proteini ile Autodock Vina kullanılarak yapılan moleküler kenetlenme çalışmasında birçok kritik etkileşim tespit edildi. Özellikle, ARG 300 ve SER 600 ile geleneksel hidrojen bağları oluşturuldu; burada pozitif yüklü arjinin amino grubu ve serin hidroksil grubu, Wogonin ile hidrojen bağları kurdu. GLU 536 ile bir pi-anyon etkileşimi gözlemlendi; bu, Wogonin'in elektron açısından zengin kısmı ile negatif yüklü glutamik asit arasındaki çekici kuvveti gösterir. Ek olarak, Wogonin'in aromatik kısmının arjininin alkil grubu ile etkileşime girdiği ARG 300 ile bir pi-alkil etkileşimi ve aynı ARG 300 ile bir karbon-hidrojen bağı kaydedildi. Ayrıca PHE 404 ile fenilalaninin aromatik halkasına karşı Wogonin aromatik halkasının istiflenmesini içeren pi-pi T şeklinde bir etkileşim meydana geldi. Son olarak, VAL 535, ILE 297, LEU 301, PRO 449 ve HIS 304'ü içeren van der waals etkileşimleri, Wogonin'in ADAMTS5'e bağlanmasını yöneten ve potansiyel olarak biyolojik aktivitesini etkileyen moleküler etkileşimleri toplu olarak şekillendirerek genel bağlanma stabilitesine katkıda bulundu.

5.2.11. EGCG

Şekil 5.12'de pozitif kontrol olarak seçilen ADAMTS5 inhibitörünü ve EGCG molekülünün bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. Pozitif kontrol ve EGCG molekülü ADAMTS5'e bağlanma bölgesi olarak çok yakın ve benzer ortak bölgelerden çakışık olduğu gözlemlenmiştir.

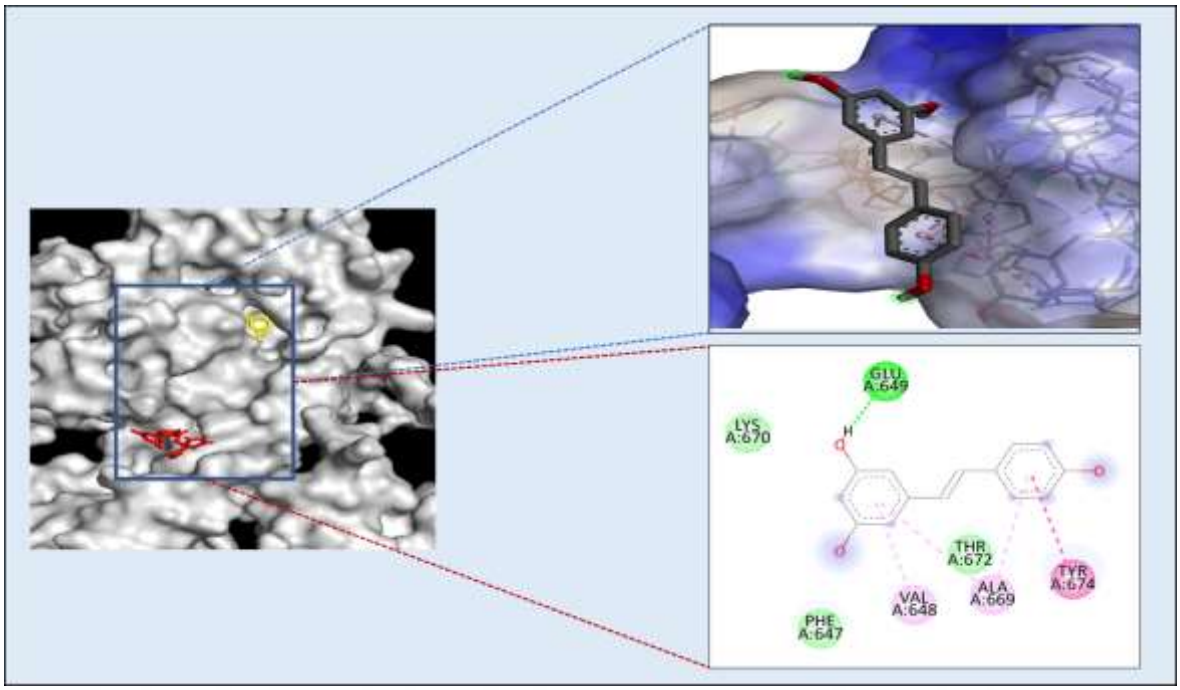


Şekil 5.12 ADAMTS5(gri), EGCG (sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri.

EGCG molekülü ile ADAMTS5 proteini arasında Autodock Vina kullanılarak yapılan moleküler kenetlenme simülasyonu sırasında birçok önemli etkileşim gözlemlendi. Özellikle, EGCG ve ARG 668 (668 pozisyonundaki arjinin) arasında güçlü bir etkileşime işaret eden geleneksel bir hidrojen bağı oluşturuldu. Ayrıca, ASP 798 (798 pozisyonundaki aspartik asit) ile bir pi-anyon etkileşimi meydana geldi; burada EGCG'nin pi elektronları, amino asidin negatif yüklü kısmı ile etkileşime girdi. Van der waals kuvvetleri de SER 625 (625 pozisyonundaki serin) ile etkileşime girmiştir ve bu da zayıf ama kayda değer bir etkileşimi temsil etmektedir. Ek olarak, EGCG ile LYS 624 (624. pozisyonda lizin) ve HIS 628 (628. pozisyonda histidin) arasında pi-pi T şeklinde bir etkileşim gözlendi; bu, önemli stabilizasyon kuvvetlerini gösterir. Bununla birlikte, TYR 654 (654. pozisyonda tirozin) ve ARG 668 ile olumsuz donör etkileşimleri tespit edildi; bu, güçlü bağlanma için optimal olmayan geometriye işaret etmektedir. Son olarak EGCG, VAL 651 (651. pozisyonda valin), PRO 652 (652. pozisyonda prolin) ve ILE 796 (796. pozisyonda izolösin) ile pi-alkil etkileşimlerini sergiledi. Bu çeşitli etkileşimler, EGCG ile adamt-5 proteinindeki spesifik amino asitler arasındaki karmaşık etkileşime ışık tutarak, bunların bağlanma afinitesini ve biyolojik süreçler ve terapötik uygulamalar için potansiyel etkilerini anlamamıza katkıda bulunur.

5.2.12. Resveratrol

Şekil 5.13'de pozitif kontrol olarak seçilen ADAMTS5 inhibitörünü ve resveratrol molekülünün bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. Pozitif kontrol ve Resveratrol molekülü ADAMTS5'e bağlanma bölgesi olarak birbirine uzak ve farklı bölgelerden bağlandığı gözlemlenmiştir.



Şekil 5.13 ADAMTS5(gri), Resveratrol (sarı) ve Aldumastat'ın (kırmızı) docking sonrası kompleks yapısı ve yakınlaştırılmış pozu ile bağ türleri ve bağlanma bölgeleri.

Resveratrolün ADAMTS5 ile moleküler kenetlenme simülasyonunda birçok önemli etkileşim gözlemlendi. Özellikle Resveratrol, 649. pozisyonda Glutamat (GLU) ile geleneksel bir hidrojen bağı oluşturdu; bu, hidrojen atomları ve oksijen atomlarını içeren spesifik bir etkileşimi akla getirmektedir. Ek olarak pi-alkil etkileşimleri, 648. pozisyonda Valin (VAL) ve 669. pozisyonda Alanin (ALA) ile tanımlandı; bu, ligand-protein kompleksinin hidrofobik etkileşimler yoluyla stabilizasyonunun göstergesidir. Tirozin (TYR) ile 674 pozisyonunda bir pi-pi yığılmış etkileşimi tespit edildi; bu, bu bağlanma olayında aromatik halka yığınının rolünü vurguladı. Ayrıca, 670. pozisyonda Lizin (LYS), 647. pozisyonda Fenilalanin (PHE) ve 672. pozisyonda Treonin (THR) ile van der Waals etkileşimleri gözlendi; bu, zayıf çekim kuvvetleri nedeniyle protein-ligand kompleksinin genel stabilitesini gösterir. Bu çeşitli etkileşimler göz önüne alındığında Resveratrol'ün protein ile çok yönlü bir bağlanma profiline sahip olduğu söylenebilir. Bu etkileşimler toplu olarak Resveratrol'ün, protein yapısındaki spesifik amino asitlere bağlanması yoluyla ADAMTS5 fonksiyonunu nasıl etkileyebileceğine dair bir tahminde bulunulmasına olanak sağlar.

5.3. Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma, Ekskresyon, Toksikolojik (ADMET) Özellikleri

AdmetSAR2.0 sunucusu kullanarak Aldumast'ta dahil docking'i yapılan 12 molekülün **A**bsorbsiyon, **D**ağılım, **M**etabolizma, **E**kskresyon, **T**oksikolojik (ADMET) özelliklerinden, İnsan Bağırsak Emilimi (İBE), Kan-Beyin Bariyeri (KBB), İnsan Oral Biyoyararlanımı (İOB), Hepatotoksisite (HPT), Nefrotoksisite (NFT), Akut Oral Toksisite güven aralığı (AOT(c)), Akut Oral Toksisite (günlük), Suda Çözünme Katsayısı (SÇK) araştırılmış ve elde edilen veriler Tablo 5.2 'de sunulmuştur.

Çizelge 5.2 Moleküllerin ADMET değerleri.

	İBE	KBB	İOB	HPT	NFT	AOT (c)	AOT (günlük) log(1/(mol/kg))	SÇK logS
Aldumastat	+	-	+	+	-	III 0.5853	2.117	-3.889
Apigenin	+	-	-	+	-	III 0.7012	1.484	-2.777
Bütein	+	-	-	-	-	III 0.7755	1.765	-2.272
Kurkumin	+	-	+	-	-	III 0.6349	2.147	-3.364
Gallik asit	+	-	+	+	-	III 0.6904	2.317	-1.097
Harpagosit	+	-	-	-	-	III 0.5445	1.777	-2.582
Oleuropein	+	-	+	-	-	III 0.6219	2.603	-2.454
Hiperforin	+	+	-	+	+	III 0.4938	2.146	-3.84
Quercetin	+	-	-	+	-	II 0.7348	2.526	-2.999
Wogonin	+	-	+	-	-	III 0.7362	1.348	-3.222
EGCG	+	-	-	+	-	IV 0.3764	1.614	-3.314
Resveratrol	+	-	-	-	+	III 0.6825	2.377	-2.778

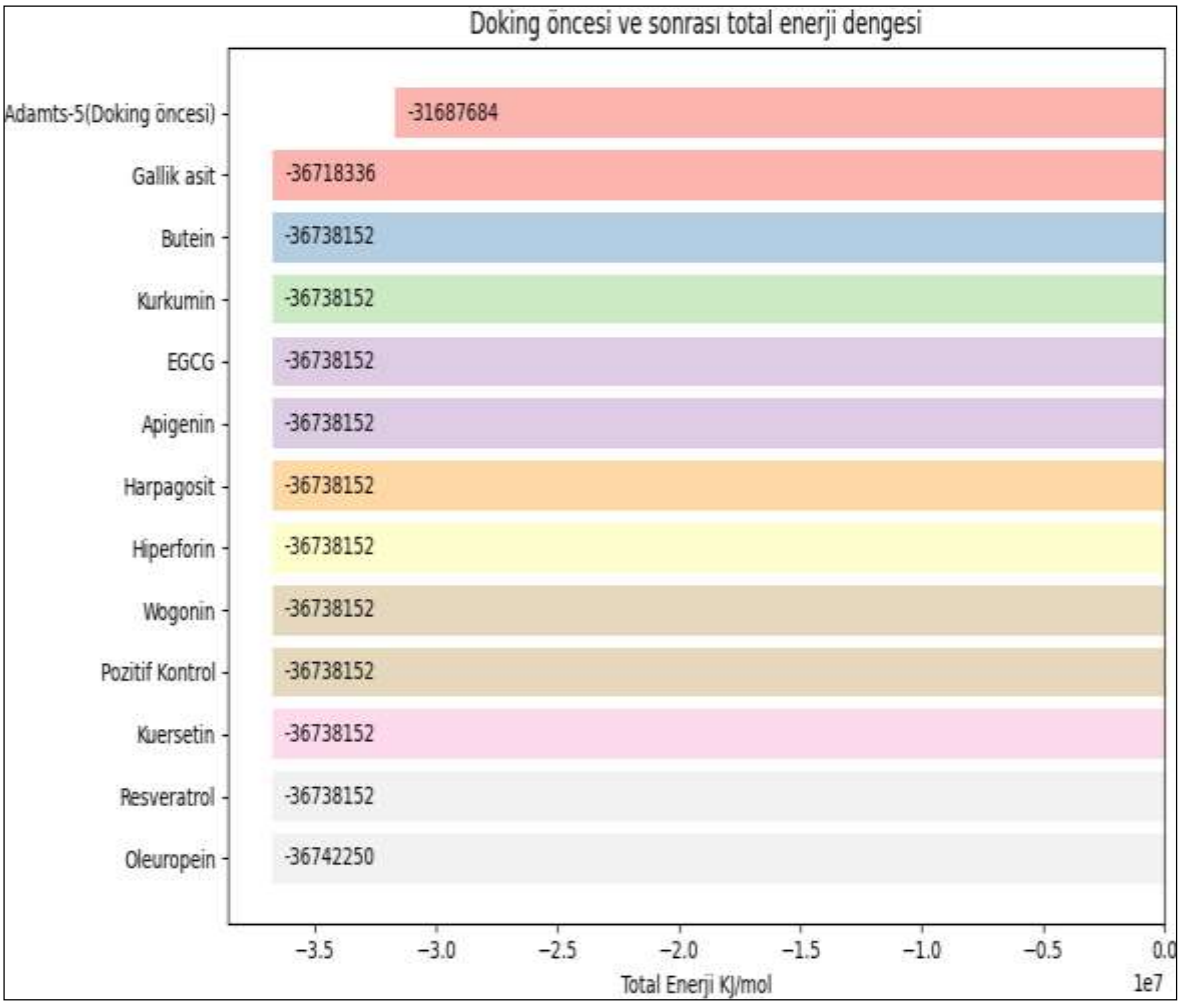
Bu özellikler farmasötik araştırma ve ilaç geliştirme alanında önemli unsurlardır. İBE, bir ilacın sindirim sisteminden kan dolaşımına ne kadar verimli bir şekilde emilebileceği konusunda bizi bilgilendirir; bu, ilacın oral uygulamasında ve genel etkinliğinde kritik bir faktördür. KBB, bir ilacın beyne erişip erişemeyeceğini belirleyen karmaşık bir koruyucu görevi görür ve dolayısıyla nörolojik durumların tedavisinde önemli bir rol oynar. İOB, oral olarak uygulanan bir ilacın aktif formunda kan dolaşımına ulaşan fraksiyonunu ölçerek ilaç dağıtım yöntemlerine ilişkin kararları şekillendirir.

HPT ve NFT değerlendirilmesi, ilaç metabolizması ve eliminasyonundaki rolleri göz önüne alındığında hayati organlar olan karaciğer ve böbreklerin güvenliğini sağlamak için gereklidir. Hem tek yüksek dozlar hem de günlük maruz kalmalar için AOT değerlendirmeleri, acil güvenlik hususları açısından çok önemlidir. Ek olarak, SÇK ilaç formülasyonunu yönlendirir ve ilacın vücutta ne kadar iyi emilip dağıtıldığını etkiler. Birlikte bu özellikler, bir ilacın vücutla olan etkileşimlerini, zarar verme potansiyelini ve güvenli ve etkili terapötik kullanıma uygunluğunu anlamak için kapsamlı bir çerçeve oluşturur.

Tablo 5.2'de sunulan değerlere göre, oral biyoyarlanımı olan 5 molekül tespit edilmiştir. Bu moleküller, Aldumastat, Kurkumin, Gallik asit, Oleuropein ve Wogonindir. Diğer bir yandan bu moleküller arasında hepatotoksisite ve nefrotoksisitesi negatif olan 3 molekül Kurkumin, Oleuropein ve Wogonin'dir. Affinite değerleri göz önüne alındığında en yüksek moleküller arasında olan EGCG ve Apigenin molekülünün oral biyoyararlanımı negatiftir. Bu da bu moleküllerin oral yolla uygulanmasının terapötik etkisinin zayıf olacağını işaret etmektedir. Aynı zamanda 2 molekülünde HPT pozitif olarak belirlenmiştir. Öte yandan KBB 'den sadece Hiperforin 'in geçebildiği tespit edilmiştir.

5.4. ADAMTS5 Üzerindeki Enerji Değişimlerinin Karşılaştırılması

Docking öncesi ADAMTS5 'in sahip olduğu enerji ile seçili moleküllerin docking sonrası molekül+ADAMTS5 kompleks yapısının toplam enerjileri Resim 5.14 'de sunulmuştur. ADAMTS5 proteininin enerji minimizasyonu öncesindeki başlangıç toplam enerjisinin (-31.687,684) olduğu hesaplanmıştır. Enerji minimizasyon takiben, bu moleküllerin ADAMTS5 ile kompleks halleri için toplam enerji değerleri oldukça tutarlı bulunmuştur; (-36.718,336) gibi biraz daha düşük bir enerji değerine sahip olan Gallik asit dışında diğer 10 molekülün ve pozitif kontrol Aldumastat'ın enerji değeri (-36.738,152) civarında hesaplanmıştır. Oleuropeinin enerji değeri ise (-36.742,250) olarak hesaplanmıştır. Bu da Oleuropein 'in diğer moleküller arasında ADAMTS5 en kararlı bağlanmasını ve ADAMTS5'in enerjisi üzerindeki etkisinin daha fazla olduğunu bu etkinin ADAMTS5 proteinini daha kararlı ve stabil hale getirerek inhibe edebileceğini göstermektedir. Ayrıca bu durum, enerji minimizasyon sürecinin, test edilen tüm moleküller için stabil ve uygun kompleks oluşumlarla sonuçlandığını ve bunların ADAMTS5 proteini ile etkileşim potansiyellerine işaret ettiğini göstermektedir. Elde edilen enerji değerleri olumlu bağlanmayı gösterse de moleküler kenetlenme tahminlerinin gerçek bağlanma affinitelerini doğrulamak için in vitro ve in vivo şartlar altında deneysel doğrulama gerektirdiğini unutmamak önemlidir. Genel olarak, bu çalışma bu bileşiklerin ADAMTS5 ile etkileşime girmedeki terapötik potansiyeline işaret etmektedir. Ancak, bağlanma mekanizmalarının ve biyolojik etkilerinin kapsamlı bir şekilde anlaşılması için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.



Şekil 5.14 ADAMTS5 üzerindeki enerji değişim grafiği.

6. TARTIŞMA

OA, dejeneratif eklem hastalığıdır ve gelişmiş ülkelerde yaş ortalamasının yükselmesiyle birlikte sıklığı artmaktadır. Oluşum mekanizmaları halen tam olarak anlaşılamamış ve hastalığı duraklatacak ya da ilerlemesini önleyecek terapötik bir ilaç geliştirilememiştir. Bu mekanizmaları anlamak ve terapötik ilaç çalışmaları yapmak amacıyla hayvan deneyi modelleri geliştirilmiştir. En sık kullanılan modeller arasında fare, sıçan ve Gine domuzu gibi hayvanların cerrahi veya kimyasal OA modelleri yer almaktadır. Bu modellerde kıkırdak lezyonunun evresini belirlemek ve standardize etmek için çeşitli skorlama yöntemleri geliştirilmiştir (Tıraş, 2021).

Sunulan çalışmada, ADAMTS5 inhibitörü olarak pozitif kontrol Aldumastat ile seçili IL-1β inhibitörlerinin ADAMTS5'e bağlanma bölgeleri, bağlanma affinite değerleri ile bağlanma sonrası 3B kompleks yapıları incelenmiş ve birbirleri arasında karşılaştırma yapılmıştır. Aynı zamanda, ileride yapılması planlanan in vitro ve in vivo çalışmalar için potansiyel inhibitör olarak seçilen moleküllerin ADMET özellikleri de belirlenmiştir.

Chen ve ark (2014) tarafından yapılan çalışmada tavşanlarda osteoartrit (OA) cerrahi yolla indüklenmiş ve kıkırdak dejenerasyonunu iyileştirmek için hyaluronik asit hidrojeli içinde verilen ADAMTS5 inhibitörü yüklenerek tedavi potansiyeli incelenmiştir. Sonuçlar, hidrojelde ADAMTS5 inhibitörüyle yapılan tedavinin, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kıkırdak dejenerasyonunu önemli ölçüde azaltabildiğini göstermişlerdir. Ek olarak, yapılan tedavi ile eklem fonksiyonlarında iyileşme ve inflamasyon belirteçlerinde azalma gösterildiğini bildirmişlerdir (Chen ve ark., 2014). Kandır ve ark (2020) atlarda yapmış oldukları çalışmalarında ADAMTS5'in posttravmatik OA'da önemli bir belirteç olabileceğini vurgulamışlardır.

Brebion ve ark (2021) Aldumastat'ın, ADAMTS5 aktivitesindeki etkili inhibisyonunu tanımlamak in siliko analiz gerçekleştirmiş ve farmakolojik özelliklerini in vitro değerlendirerek, diğer ADAMTS enzimlerine karşı etkinliğini ve seçiciliğini ve ayrıca kıkırdak yıkımını ve inflamasyon önleme potansiyelini test etmişlerdir. Ayrıca, bileşiğin sıçanlarda oral biyoyararlanımını da değerlendirirmişlerdir. Elde ettikleri bulgulara göre, Aldumastat'ın (GLPG1972/S201086) güçlü ve seçici bir ADAMTS5 inhibitörü olduğunu, kıkırdak yıkımını önleyebildiğini, inflamasyon belirteçlerini azaltabildiğini ve farelerde iyi oral biyoyararlanıma sahip olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, Aldumastat'ın OA tedavisi için umut verici bir ilaç adayı olma potansiyeline sahip olduğunu ve ADAMTS5 'in inhibisyonunun bu hastalık için terapötik bir hedef olabileceğini öne sürmüşlerdir (Brebion ve ark.,2021). Clement ve ark (2022), ADAMTS5 enziminin küçük moleküllü bir inhibitörü olan Aldumastat'ın OA üzerindeki etkilerini hem in vitro hem de in vivo olarak değerlendirmişlerdir. Elde ettikleri bulgulara göre, Aldumastat'ın güçlü ve seçici bir ADAMTS5 inhibitörü olduğunu ve OA sıçan modelinde kıkırdak yıkımını önleyebildiğini, inflamasyon belirteçlerini azaltabildiğini ve eklem fonksiyonunu iyileştirebildiğini göstermişler ve Aldumastat'ın OA tedavisi için umut verici bir ilaç adayı olduğunu ve ADAMTS5'in inhibisyonunun bu hastalık

için terapötik bir hedef olabileceğini öne sürmüşlerdir (Clement ve ark., 2022). Schnitzer ve ark (2023) insanlarda OA tedavisi için Aldumast'ın ADAMTS5 inhibititörü olarak değerlendirildiği faz 2 randomize olarak 932 kişi ile klinik çalışmalarında plaseboya göre, farklı dozlarda oral yolla uygulanan Aldumastat'ın hasta gruplarında kıkırdak kaybında herhangi bir etki göstermediğini bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmada elde ettiğimiz verilere göre de Aldumastat'ın affinite değeri (-5.1) düşük bulunmuştur. Bu durumun, ADAMTS5'e bağlanma olasılığının karşılaştırılan diğer moleküllere kıyasla zayıf olduğu göstermektedir. Dolasıyla, literatür veri de in vitro ve in vivo koşullarda Aldumastat her ne kadar umut vadedici olarak nitelendirilse de yapılan klinik çalışmanın verilerimizle uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

Scalfo ve ark (2014) inek kıkırdağından elde edilen kondrosit kültüründe Oleuropein, Quercetin ve Curcumin'in OA biyobelirteçleri üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, ADAMTS5 gen ekspresyonunun azaldığını bildirmişlerdir. Takuma ve ark (2018) spontanöz OA STR/ort farelere 8 hafta boyunca 100 mg/kg dozunda zeytin yaprağı ekstraktı uyguladıkları çalışmalarında, OA bağlı dejenerasyonun zayıfladığını ve OA semptomlarını iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Horcajada ve ark (2022) yapmış oldukları çok merkezli klinik çalışmada OA hastası yaşlılarda Oleuropein bazlı gıda takviyesinin çok şiddetli ağrıya sahip olanlar dışında OA 'e bağlı diz eklemi ağrısını azalttığına yönelik veriler elde ettiklerini ileri sürmüşlerdir. Sunulan çalışmada, Oleuropein'in ADAMTS5'e bağlanma olasılığı (-8.1) yüksek bulunmuştur. Bu durum, Oleuropein 'in ADAMTS5 inhibitör potansiyelinin yüksek olabileceğini göstermektedir. Nitekim, elde edilen bulgular ADAMTS5 inhibisyonu ile OA dejenerasyonunun azaldığına dair in vitro ve in vivo bulgular ile uyum içerisindedir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Artan obezite ve metabolik hastalıklara da bağlı olarak gelişebilen OA ve çeşitleri günümüzde halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmakta ve yaş ile birlikte kıkırdak dejenerasyonuna bağlı olarak prevalansı artış göstermektedir. Güncel tedavi yöntemleri kıkırdak dejenerasyonunu yavaşlatmak, eklem sıvısını artırmak ve eklem bütünlüğünü korumak üzerine uygulanmakta ve hastanın yaşam kalitesini artıracak önlemlerle prognozun yavaşlatılması hedeflenmektedir. Yeni ilaç ve molekül arayışları, oluşmuş kıkırdak degredasyonunu yavaşlatmak veya geri dönüştürebilmeye dayalıdır. Buna ilaveten, inflamatuar süreci hedef alarak inflamatuar sitokin ekspresyonlarını baskılamak önem arz etmektedir. Bu amaçla, özellikle IL-1β inhibitörlerinden faydalanılmakta, kıkırdak degredasyonunda bir makas protein görevi üstlenen ve IL-1β ile aktive olan ADAMTS5 'in etkinliğini inhibe etmek ön plana çıkmaktadır. Bu bilgiler ışığında sunulan çalışmada potansiyeli yüksek olarak görülen ve literatürde güncel araştırma konularında doğrudan veya dolaylı yolaklarla IL-1β inhibisyonunda yer alan bitkisel kökenli etken maddeler ADAMTS5 inhibisyonu kanıtlandığından pozitif kontol olarak tercih edilmiş Aldumastat ile in siliko yöntemlerle karşılaştırmalı olarak ADAMTS5 inhibisyonu özelinde incelenmiş ve değerlendirmiştir.

Elde edilen bulgulara göre, hem ADAMTS5 'in aktif bölgesine affinite yönünden bağlanma olasılığı en yüksek 4 molekül EGCG, Apigenin, Oleuropein ve Wogonin olarak tespit edilmiş ve bu moleküller arasından hem oral biyoyararlanımı ve bağırsak emilimi en yüksek hem de hepatotoksik ve nefrotoksik özellikleri en düşük olarak Oleuropein ve Wogonin ön plana çıkmıştır.

Elde edilen bulguların in siliko analiz sonucu olduğu ve in vitro ile in vivo şartlar altında daha detaylı analizlere ihtiyaç duyulduğu unutulmamalıdır. Bu bağlamda, ADAMTS5 inhibitörü potansiyeline sahip bu moleküllerin in vitro ve in vivo şartlar altında daha detaylı moleküler analizlerle incelenmesi gerektiği kanaatindeyiz.

Yapılan in siliko çalışmalar in vitro ve in vivo çalışmalar için bir kılavuz niteliğinde olup, ileriki çalışmalara öncülük etmektedir.

KAYNAKLAR

Abulhasan JF, Grey MJ. (2017). Anatomy and Physiology of Knee Stability. Journal of Functional Morphology and Kinesiology.; 2(4):34. Doi.org/10.3390 jfmk2040034

Ahmed, S., Wang, N., Hafeez, B. B., Cheruvu, V. K., & Haqqi, T. M. (2005). Punica granatum L. extract inhibits IL-1beta-induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappaB in human chondrocytes in vitro. The Journal of nutrition, 135(9), 2096–2102. Doi.org/10.1093/jn/135.9.2096

Akhtar, N., & Haqqi, T. M. (2012). Current nutraceuticals in the management of osteoarthritis: a review. Therapeutic advances in musculoskeletal disease, *4*(3), 181–207. Doi.org/10.1177/1759720X11436238

Anonim1: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Parsley_bush.jpg [son erişim tarihi:11.09.2023].

Anonim2: https://commons.m.wikimedia.org/wiki/File:Saint_John%27s_wort_flowers.jpg#mw-jump-to-license [Son erişim tarihi: 11.09.2023]

Anonim3:https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hamamelis_virginiana_FlowersLeaves_BotGardBln0906.JPG#mw-jump-to-license[Son erişim tarihi: 11.09.2023].

Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 3 ed: Güneş Kitabevi; 2001.

Bannuru, R. R., Osani, M. C., Al-Eid, F., & Wang, C. (2018). Efficacy of curcumin and Boswellia for knee osteoarthritis: Systematic review and meta-analysis. Seminars in arthritis and rheumatism, 48(3), 416–429. Doi.org/10.1016/j.semarthrit.2018.03.001

Berman, A. Y., Motechin, R. A., Wiesenfeld, M. Y., & Holz, M. K. (2017). The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. NPJ precision oncology, 1, 35. Doi.org/10.1038/s41698-017-0038-6

Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. (2000). Protein Veri Bankası. Nükleik Asitler Res, 28, 235-242.

Blackburn, T A, and E Craig. "Knee anatomy: a brief review." Physical therapy vol. 60,12 (1980): 1556-60. Doi:10.1093/ptj/60.12.1556

Brebion, F., Gosmini, R., Deprez, P., Varin, M., Peixoto, C., Alvey, L., & Amantini, D. (2021). Discovery of GLPG1972/S201086, a potent, selective, and orally bioavailable ADAMTS5 inhibitor for the treatment of osteoarthritis. Journal of Medicinal Chemistry, 64(6), 2937-2952.

Chen Y.J, Tsai K.S., Chiu C.Y., Yang T.H., Lin T.H., Fu W.M., Chen C.F., Yang R.S., Liu S.H. (2013). EGb761 inhibits inflammatory responses in human chondrocytes and shows chondroprotection in osteoarthritic rat knee. J. Orthop. Res., 31(7), 1032–1038.

Chen, P., Zhu, S., Wang, Y., Mu, Q., Wu, Y., Xia, Q., & Ouyang, H. (2014). The amelioration of cartilage degeneration by ADAMTS5 inhibitor delivered in a hyaluronic acid hydrogel. Biomaterials, *35*(9), 2827-2836.

Chow, Y. Y., & Chin, K. Y. (2020). The role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of inflammation*, *2020*.

Clement-Lacroix, P., Little, C. B., Smith, M. M., Cottereaux, C., Merciris, D., Meurisse, S.,& Amantini, D. (2022) Pharmacological characterization of GLPG1972/S201086, a potent and selective small-molecule inhibitor of ADAMTS5. Osteoarthritis and Cartilage, *30*(2), 291-301.)

Clockaerts, S., Bastiaansen-Jenniskens, Y. M., Feijt, C., De Clerck, L., Verhaar, J. A., Zuurmond, A. M., Stojanovic-Susulic, V., Somville, J., Kloppenburg, M., & van Osch, G. J. (2012). Cytokine production by infrapatellar fat pad can be stimulated by interleukin 1β and inhibited by peroxisome proliferator activated receptor α agonist. Annals of the rheumatic diseases, 71(6), 1012–1018. Doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200688

Colin. (2013). Alliumcepa L. [Fotoğraf]. Vikipedi. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mixed_onions.jpg [Son erişim tarihi: 11.09.2023].

Cooper C, Snow S, McAlindon TE et al. (2000). Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. Arthritis and Rheumatism, 43(5): 995–1000.

Crawley, J. N., & Davis, L. G. (1982). Baseline exploratory activity predicts anxiolytic responsiveness to diazepam in five mouse strains. *Brain research bulletin*, *8*(6), 609-612.

Deligne C, S. Casulli, A. Pigenet et al. (2015). Differential expression of interleukin-17 and interleukin-22 in inflamed and non-inflamed synovium from osteoarthritis patients. *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 23, no. 11, pp. 1843–1852.

Dhak (Butea monosperma) in Kolkata, West Bengal, India. [Fotoğraf].Vikipedi. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dhak_(Butea_monosperma)_flowers_in_Kolkata_I_IMG_4225.jpg [Son erişim tarihi:11.09.2023].

Di CG, Borrelli F, Ernst E, Izzo AA. (2001). St John's wort: Prozac from the plant kingdom. Trends Pharmacol Sci, 22(6), 292-7.

Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. FASEB J. 1994;8:1314–25.

Doronenko. (2007). Scutellaria baicalensis [Fotoğraf]. Vikipedi.

Dou QP. (2009). Molecular mechanisms of green tea polyphenols. nutr Cancer, 61, 827–35.

Dursun N. (2007). Veteriner Anatomi I, Ankara, Medisan Yayınevi, p. 294.

Eder C. Mechanisms of interleukin-1β release. Immunobiology. 2009;214:543–53.

El Gharras, H. (2009), Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. International Journal of Food Science & Technology, 44: 2512-2518. Doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x

Fagus. (2010). Camellia sinensis [Fotoğraf]. Vikipedi. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:%C3%87ay-3.JPG [Son erişim tarihi:11.09.2023].

Fernandes J.C, Martel-Pelletier J, Pelletier J.P. (2002). The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. Biorheology, 39(1-2), 237–246.Garg, J. (2007).

Frischholz S, Berberich O, Bock T, Meffert R.H., Blunk T. (2020). Resveratrol counteracts IL-1beta-mediated impairment of extracellular matrix deposition in 3D articular chondrocyte constructs. J. Tissue Eng. Regen. Med.

Fox, A.J. Sophia, Bedi, A., & Rodeo, S.A. (2009). The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. Sports Health, *1*(6), 461-468. PubMed PMID: 23015907. PMCID: PMC3445147. [Epub: November 1, 2009].

Guex, N. ve Peitsch, MC (1997) SWISS-MODEL ve Swiss-PdbViewer: Karşılaştırmalı protein modelleme için bir ortam.Elektroforez 18 , 2714-2723.

Hall, B. K. (2005). Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology. Elsevier Academic. Amsterdam/London.

Henrotin Y, Mobasheri A. (2018). Natural products for promoting joint health and managing osteoarthritis. Curr. Rheumatol. Rep., 20(11), 72

Hirschmann, M.T., & Müller, W. (2015). Complex function of the knee joint: The current understanding of the knee. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, *23*, 2780–2788. DOI: 10.1007/s00167-015-3619-3

Honorati M.C, Neri S, Cattini L, Facchini A. (2006). Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts. Osteoarthritis and Cartilage, 14(4), 345–352.

Horcajada, M. N., Beaumont, M., Sauvageot, N., Poquet, L., Saboundjian, M., Costes, B., Verdonk, P., Brands, G., Brasseur, J., Urbin-Choffray, D., Vandenberghe, M., Brabants, K., De Vlam, K., Fache, W., Jandrain, B., Grek, V., Malaise, M., & Henrotin, Y. (2022). An oleuropein-based dietary supplement may improve joint functional capacity in older people with high knee joint pain: findings from a multicentre-RCT and post hoc analysis. Therapeutic advances in musculoskeletal disease, 14, 1759720X211070205. Doi.org/10.1177/1759720X211070205

Ioan-Facsinay A, Kloppenburg M. (2013). An emerging player in knee osteoarthritis: the infrapatellar fat pad. Arthritis Research & Therapy, 15(6), 225.

Irmler M, Hertig S, MacDonald HR, Sadoul R, Becherer JD, Proudfoot A, Solari R, Tschopp J. (1995). Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. J Exp Med, 181, 1917–22.

J. Eberhardt, D. Santos-Martins, A. F. Tillack, and S. Forli. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. Journal of Chemical Information and Modeling.

Jayasuriya C.T, Chen Q. (2013). Role of inflammation in osteoarthritis. Rheumatology. Current Research, 3(2).

Jiang Y, Zhu L, Zhang T, et al. (2017). BRD4 has dual effects on the HMGB1 and NF-κB signaling pathways and is a potential therapeutic target for osteoarthritis. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, 1863(12), 3001–3015.

Kandir S, Tekin G, Er C, Karakurt S, (2017). Effects of Exercise on ADAMTS4 andADAMTS5 Levels in Sport Horses. Acta Physiol, 221, 194-.

Kandır S, Er C, Karakurt S. (2020). Pre- and post-exercise ADAMTS4 and ADAMTS5 Levels in Concur Horses . Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 13 (2), 99-103. doi:10.47027/duvetfd.738477

Kandir, S. (2020). ADAMTS Proteases: Potential Biomarkers and Novel Therapeutic Targets for Cartilage Health. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.93046

Khan N.M, Haseeb A, Ansari M.Y, Devarapalli P, Haynie S, Haqqi T.M. (2017). Wogonin, a plant-derived small molecule, exerts potent antiinflammatory and chondroprotective effects through the activation of ROS/ERK/Nrf2 signaling pathways in human osteoarthritis chondrocytes. Free Radic. Biol. Med., 106, 288–301.

Khan N.M, Haseeb A, Ansari M.Y, Haqqi T.M. (2017). A wogonin-rich fraction of Scutellaria baicalensis root extract exerts chondroprotective effects by suppressing IL-1beta-induced activation of AP-1 in human OA chondrocytes. Sci. Rep., 7, 43789.

Kimura H, Inukai Y, Takii T, Furutani Y, Shibata Y, Hayashi H, Sakurada S, Okamoto T, Inoue J, Oomoto Y, Onozaki K. (1998). Molecular analysis of constitutive IL-1alpha gene expression in human melanoma cells: autocrine stimulation through NF-κB activation by endogenous IL-1α. Cytokine, 10, 872–9.

Klimiuk PA, Sierakowski S, Domyslawska I, Chwiecko J. (2004). Effect of repeated infliximab therapy on serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol, 31(2), 238-42.

Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. (2015). Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. Osteoarthritis Cartilage, 23(8), 1233-41.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2007). Clustal W ve Clustal X sürüm 2.0. Biyoenformatik, 23, 2947-8.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. The American Journal of Clinical Nutrition, *79*(5), 727–747. doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727

Magnus M. (2007). Harpagophytum [Fotoğraf]. Vikipedi. https://commons.m.wikimedia.org/wiki/File:Harpagophytum_5.jpg#mw-jump-to-license [Son erişim tarihi:11.09.2023].

Magnus M. (2007). Vitis vinifera [Fotoğraf]. Vikipedi. https://commons.m.wikimedia.org/wiki/File:Red_Mountain_Cabernet_Sauvignon_grapes_fromHedge_Vineyards.jpg#mw-jump-to-license[Son erişim tarihi:11.09.2023].

Marti-Renom MA, Stuart A, Fiser A, Sanchez R, Melo F, Sali A. (2000). Genlerin ve genomların karşılaştırmalı protein yapısı modellemesi. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 29, 291-325.

Medina MA, Martinez-Poveda B, Amores-Sanchez MI, Quesada AR. (2006). Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? Life Sci, 79(2), 105-11.

Min S, Wang C, Lu W, et al. (2017). Serum levels of the bone turnover markers dickkopf-1, osteoprotegerin, and TNF-α in knee osteoarthritis patients. Clinical Rheumatology, 36(10), 2351-2358.

Monasterio G, Castillo F, Rojas L, et al. (2018). Th1/Th17/Th22 immune response and their association with joint pain, imageneological bone loss, RANKL expression and osteoclast activity in temporomandibular joint osteoarthritis: a preliminary report. Journal of Oral Rehabilitation, 45(8), 589-597.

Mullaicharam Ar, Maheswaran A. (2012). Pharmacological effects of curcumin. Int J nutr Pharmacol neurol Dis, 2, 92-9.

Nijveldt rJ, van nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van norren K, van leeuwen PA. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin nutr, 74, 418–25.

Park S, Lee LR, Seo JH, Kang S. (2016). Curcumin and tetrahydrocurcumin both prevent osteoarthritis symptoms and decrease the expressions of pro-inflammatory cytokines in estrogen-deficient rats. Genes Nutr, 11(2).

Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. (2001). Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. Arthritis Rheum, 44(6), 1237-47.

Priestle JP, Schär HP, Grütter MG. (1989). Crystallographic refinement of interleukin 1β at 2.0 A resolution. Proc Natl Acad Sci U S A, 86, 9667–71.

Qiu, L., Luo, Y., & Chen, X. (2018). Quercetin attenuates mitochondrial dysfunction and biogenesis via upregulated AMPK/SIRT1 signaling pathway in OA rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *103*, 1585–1591.

Qu R, Chen X, Wang W et al. (2018). Ghrelin protects against osteoarthritis through interplay with Akt and NF-κB signaling pathways. FASEB Journal, 32(2), 1044–1058.

Remmert M, Biegert A, Hauser A, Soing J. (2011). HHblits: HMM-HMM hizalamasına göre arama yapan yıldırım hızında yinelemeli protein dizisi. Nat Yöntemleri, 9, 173-175.

Rosales C. (2018). Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? Frontiers in Physiology, 9, 113–113.

Rouviere H, Delmas A. (2002). Anatomie humaine Membres Tome 3. Descriptive, topographique et fonctionnelle. 15 ed.

Saperstein S, Chen L, Oakes D, Pryhuber G, Finkelstein J. (2009). IL-1beta augments TNF-alpha-mediated inflammatory responses from lung epithelial cells. Journal of Interferon & Cytokine Research, 29(5), 273–284.

Scalfo FM, Escande S, Schulsse S, Offord EA, Henrotin Y, Horcajada MN. (2014) Oleuropein, quercetin and curcumin prevent cartilage breakdown in bovine chondrocytes. Osteoarthritis and Cartilage. 22, 169. Doi:10.1016/j.joca.2014.02.315

Schnitzer, T., Pueyo, M., Deckx, H., van der Aar, E., Bernard, K., Hatch, S., van der Stoep, M., Grankov, S., Phung, D., Imbert, O., Chimits, D., Muller, K., Hochberg, M. C., Bliddal, H., Wirth, W., Eckstein, F., & Conaghan, P. G. (2023). Evaluation of S201086/GLPG1972, an ADAMTS5 inhibitor, for the treatment of knee osteoarthritis in ROCCELLA: a phase 2 randomized clinical trial. Osteoarthritis and cartilage, *31*(7), 985–994. Doi.org/10.1016/j.joca.2023.04.001.

Seibel, M. J., Robins, S. P., & Bilezikian, J. P. (2006). Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism (2nd ed.). Academic Press. United States of America.

Sellam J, Berenbaum F. (2010). The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. Nature Reviews Rheumatology, 6(11), 625–635.

Semwal RB, Semwal DK, Combrinck S, Viljoen A. (2015). Butein: From ancient traditional remedy to modern nutraceutical. Phytochemistry Letters, 11, 188-201.

Shan Y, Qi C, Liu Y, Gao H, Zhao D, Jiang Y. (2017). Increased frequency of peripheral blood follicular helper T cells and elevated serum IL-21 levels in patients with knee osteoarthritis. Molecular Medicine Reports, 15(3), 1095–1102.

Sharma L. (1995). Local factors in osteoarthritis. Current Opinion in Rheumatology, 13, 441–446.

Shukla M, Gupta K, Rasheed Z, Khan KA, Haqqi TM. (2008). Bioavailable constituents/metabolites of pomegranate (Punica granatum L) preferentially inhibit COX2 activity ex vivo and IL-1beta-induced PGE2 production in human chondrocytes in vitro. J. Inflamm., 5, 9.

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, Thompson JD, Higgins DG. (2011). Clustal Omega kullanılarak yüksek kaliteli protein çoklu dizi hizalamalarının hızlı, ölçeklenebilir üretimi. Mol Syst Biol, 7, 539.

SKsiddhartthan. (2007). Curcuma longa [Fotoğraf]. Vikipedi. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Turmeric_inflorescence.jpg [Son erişim tarihi: 11.09.2023].

Smith, D. W., Gardiner, B. S., Zhang, L., & Grodzinsky, A. J. (2018). Articular Cartilage Dynamics. Springer. doi.org/10.1007/978-981-13-1474-2.

Snelling SJB, Bas S, Puskas GJ et al. (2017). Presence of IL-17 in synovial fluid identifies a potential inflammatory osteoarthritic phenotype. PloS One, 12(4), e0175109.

Sokolove J and Lepus CM. (2013). Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease, 5(2), 77–94.

Sputnik (2005) Olea europaea [Fotoğraf]. Vikipedi. https://tr.m.wikipedia.org/wiki/Dosya:Olive_blossoms.jpg [Son erişim tarihi: 11.09.2023].

Staeubli, H. U., et al. (1999). Anterior cruciate ligament and intercondylar notch in the coronal oblique plane: Anatomy complemented by magnetic resonance imaging in cruciate ligament-intact knees. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, *15*(4), 349-359. DOI: 10.1016/s0749-8063(99)70051-4

Stewart, K. M., & Cole, D. (2005). The commercial harvest of devil's claw (Harpagophytum spp.) in southern Africa: The devil's in the details. Journal of ethnopharmacology, 100(3), 225-236.

Takuma, M., Haruka, K., Mutsuto, W., Toshiki, M., Kenshiro, M., Akane, T., Hiroshi, M., & Yoshihiro, N. (2018). Olive leaf extract prevents cartilage degeneration in osteoarthritis of STR/ort mice. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 82(7), 1101–1106. Doi.org/10.1080/09168451.2018.1451741

Tecchio C, Micheletti A, and Cassatella MA. (2014). Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. Frontiers in Immunology, 5, 508.

Tıraş, N., 2021. Travmatik Osteoartrit Oluşturulmuş Ratlarda Bitkisel Karışım Ürününün NLRP3 İnflamazom Yanıtı Üzerine Etkisi. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, 72 sf.

Toprak M, Akkın SM. (1993). Genel Anatomi Terminolojisi ve Kullanım Özellikleri: İstanbul Üniversitesi.

Trott O, Olson AJ. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. Journal of Computational Chemistry, 31, 455-461.

Wang J, Gao JS, Chen JW, Li F, Tian J. (2012). Effect of resveratrol on cartilage protection and apoptosis inhibition in experimental osteoarthritis of rabbit. Rheumatol. Int., 32(6), 1541–1548.

Wei Y, Jia J, Jin X, Tong W, Tian H. (2018). Resveratrol ameliorates inflammatory damage and protects against osteoarthritis in a rat model of osteoarthritis. Mol. Med. Rep., 17(1), 1493–1498.

Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee JK, Werman B, Krelin Y, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN. (2004). The precursor form of IL-1α is an intracrine proinflammatory activator of transcription. Proc Natl Acad Sci U S A., 101, 2434–9.

Wianowska D, Olszowy-Tomczyk M. A Concise Profile of Gallic Acid—From Its Natural Sources through Biological Properties and Chemical Methods of Determination. Molecules. 2023; 28(3):1186. Doi.org/10.3390/molecules28031186.

Wichers, H. J., Soler-rivas, C., & Espı, J. C. (2000). Oleuropein and related compounds. J. Sci. Food Agric, 80, 1013-1023.

WR Pearson ve DJ Lipman. (1988). Biyolojik dizi karşılaştırması için geliştirilmiş araçlar. Proc Natl Acad Sci ABD, 85, 2444-2448.

Xia J, Ni Z, Wang J, Zhu S, Ye H. (2017). Overexpression of lymphocyte activation gene-3 inhibits regulatory T cell responses in osteoarthritis. DNA and Cell Biology, 36(10), 862–869.

Xu S, Sun C, Zhang S et al. (2015). Sam68 promotes NF-κB activation and apoptosis signaling in articular chondrocytes during osteoarthritis. Inflammation Research, 64(11), 895–902.

Yan, J.; Yu, L.; Xu, S.; Gu, W.; Zhu, W. (2014). Apigenin Accumulation and Expression Analysis of Apigenin Biosynthesis Relative Genes in Celery. Scientia Horticulturae, 165, 218–224.

Yıldırım M. (2003). İnsan Anatomisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

Yıldırım M. (2003). Lokomotor Sistem Anatomisi: Nobel Tıp Kitabevleri.

Zhang G, Sun Y, Wang Y, Liu R, Bao Y, and Li Q. (2016). miR-502-5p inhibits IL-1β-induced chondrocyte injury by targeting TRAF2. Cellular Immunology, 302, 50–57.

Zhang Z, Leong DJ, Xu L, He Z, Wang A, Navati M, Kim SJ, Hirsh DM, Friedman JM, Sun HB. (2016). Curcumin slows osteoarthritis progression and relieves osteoarthritis-associated pain symptoms in a post-traumatic osteoarthritis mouse model. Arthritis Res. Ther., 18(1), 128.

ÖZGEÇMİŞ

Tuğrulhan ÖZDEN. İlk, ortaöğretim ve lise öğretimini aynı şehirde tamamladı. Lisans eğitimini 2015-2019 yılları arasında Gümüşhane Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik alanında tamamladı. 2019 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır.