

## Hyperoside'nin siklofosamid kaynaklı apoptoza karşı koruyucu etkilerinin *in silico* değerlendirilmesi

Bahri Gür<sup>1\*</sup>, Mustafa Cengiz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biyokimya Bölümü / Fen edebiyat Fakültesi, Iğdır Üniversitesi, Türkiye

<sup>2</sup>Metematik ve Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümü / Eğitim Fakültesi, Siirt Üniversite, Türkiye

\*bahri.gur@igdir.edu.tr

**Özet** – Hyperoside antiinflamatuvar, antibakteriyel, antiviral, nöroprotektif, antidepresan ve organ koruyucu etkilerinin yanısıra son zamanlarda akciğer, servikal, mide, kolon, pankreas, meme ve yumurtalık kanseri üzerine antitümör etkilerinin araştırılmaya başlandığı doğal bir flavonol glikozittir [1]. Çeşitli bitkilerden ekstrakte edildiği gibi kimyasal ve biyosentez yöntemlerle de elde edilmektedir. Siklofosamid (CP) immünoşpresan bir ilaçtır ve esasen kanser hücrelerinin DNA'sına zarar vererek antiproliferatif etki gösterirler [2]. Bu çalışmanın amacı CP kaynaklı ortaya çıkan hasarın Caspase-3, Bax ve Bcl-2 apoptoz belirteçleri üzerine oluşabilecek hasara karşı hyperoside katkısı ile koruyucu ve antiapoptotik etkilerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla yürütülen *in silico* çalışmalarda CP, hyperoside ve CP+hyperoside olmak üzere üç kombinasyonda sırasıyla Caspase-3, Bax ve Bcl-2 ile moleküler etkileşimlerini belirlemenin yanı sıra bu etkileşimlerin olası mekanizmalarına ek olarak CP, hyperoside ve CP+hyperoside tarafından proteinler arasında tercih edilen bağlanma bölgelerini ortaya çıkarılmıştır. Hiperosid ilavesiyle CP'nin Caspase-3, Bax ve Bcl-2'nin aktif bölge amino asit kalıntılarına bağlanmasında meydana gelen değişikliklerin yanı sıra hidrojen bağı oluşturma eğilimlerinde meydana gelen değişiklikler de *in silico* çalışmalarla açıklanmıştır. *In silico* sonuçlara göre hyperoside, CP kaynaklı ortaya çıkabilecek apoptoza karşı güçlü bir koruyucu aday olabileceği değerlendirilmiştir. Ayrıca sonuçlarımıza dayanarak, hyperoside'nin CP ve benzeri alkilleyici ajanların kullanımını gerektiren kanser hastaları üzerinde klinik uygulama öncesinde daha iyi değerlendirme imkânı sağlayacağı düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler** – Hyperoside, Negatif Bağlanma Enerjisi, Alkilleyici Ajanlar, Katalitik Aktivite, Flavonoidler

### I. GİRİŞ

Alkilleyici antineoplastik ilaç grupları, antioksidan-oksidan dengesine zarar verebilen güçlü ilaçlardır [3]. Siklofosamid (CP), tipik olarak kanser tedavisinde kemoterapötik bir ilaç olarak kullanılan alkilleyici nitrojen hardalın bir oksazafosforin türevidir [4]. CP'nin böbrek, karaciğer, akciğer ve testis gibi sağlıklı dokulara zarar verdiğini gösteren çalışmalar, bu ilacın kanser tedavisinde kullanımını sınırlandırmıştır [5, 6].

CP maruziyetinin oksidatif stres sonrası redoks dengesinin bozulmasına neden olarak biyokimyasal ve fizyolojik bozukluklara yol açtığı bildirilmiştir [7, 8]. CP, çeşitli neoplastik hastalıkların tedavisinde uygulanan ve genel olarak reçete edilen bir antikanser ilaçtır. CP'nin sitotoksik etkileri,

DNA ve proteini alkilleyen çapraz bağlanma üreten kimyasal olarak reaktif metabolitlerden kaynaklanmaktadır [9]. Reaktif oksijen türleri (ROS) akut ve kronik akciğer hasarının patogeneğinde önemli rollere sahiptir. Oksijen yaşam için hayati önem taşıdığından, hava yollarını ve alveolün yüzey alanını kaplayan hücreler her zaman oksijene ihtiyaç duyar. Pulmoner savunma hücreleri olarak bilinen nötrofiller, monositler ve makrofajlar moleküler oksijeni ROS'a dönüştürme eğilimindedir [10, 11]. Çalışmalar, CP'nin akrolein/ROS oluşumuna neden olması apoptozda artışa, lipid peroksidasyonunu artırması ve ilaç metabolize edilirken nötrofil biriktirmesinin yanı sıra sıçanların akciğerlerinde enflamatuvar reaksiyonlara neden olduğunu göstermiştir [4].

Hypericum türlerinin metanolik ekstralarında birçok biyoaktif bileşik olduğu bilinmektedir [12, 13]. Hypericaceae familyasının bir üyesi olan Hypericum, yatıştırıcı, antiseptik, anti-enflamatuar ve anthelmintik özellikleri nedeniyle geleneksel olarak tıbbi tedavilerde kullanılmaktadır [14]. Ayrıca Hypericum, antioksidan özelliklerinin yanı sıra klorojenik asit, hyperoside, quercitrin, quercetin ve rutin gibi özelliklere sahip flavonoid ve fenolik bileşiklere sahiptir [15, 16]. Ayrıca, Hypericum ekstraktının en yüksek orana sahip hiperosidin antiapoptotik, antioksidan özelliği, oksidatif stres aracılı birçok hastalığın ilerlemesini önlemeye veya azaltmaya yardımcı olur [12]. Ancak literatürde hyperoside'nin antiapoptotik etkinliğini gösteren *in silico* çalışmalara rastlanmamıştır. Bu tür bileşiklerin biyomoleküllerin aktivitesi üzerindeki etkisi, biyomoleküller ve ligand arasında meydana gelen hidrojen bağı ve diğer etkileşimler dikkate alınarak değerlendirilir.

Biyomoleküller için büyük öneme sahip olan -NH ve -OH grupları üzerinde oluşan hidrojen bağları, biyomolekülün şeklini ve işlevini önemli ölçüde etkiler. Ayrıca bu bağlar bir ligandın enzimin katalitik bağlanma cebinde stabilize edilmesi ve enzimatik kataliz için de gereklidir [17]. Biyomolekül-ligand etkileşimleri söz konusu olduğunda, hidrojen bağlarının sayısı ve uzunluğu ve ligandın biyomolekülün aktif bölge amino asit kalıntıları ile gerçekleştirdiği karbon-hidrojen, van der Waals, Donör-Donör ve Pi-Alkil etkileşimleri, biyomolekül-ligand etkileşimlerinden kaynaklanan Gibbs serbest enerji değeri değişimini ( $\Delta G$ ) azaltır. Bu azalma tipik olarak proteinin liganda olan afinitesinin bir göstergesi olarak kabul edilir [18-20]. Bu çalışmanın amacı CP kaynaklı ortaya çıkan apoptozun (Caspase-3, Bax ve Bcl-2) önlenmesinde hyperoside etkilerinin araştırılmasıdır.

## II. MATERYAL VE YÖNTEM

### A. CP, hyperoside, CPM+hyperoside'nin Caspase-3, Bax ve Bcl-2 makromolekülleri ile etkileşimlerinin moleküler modelleme çalışmaları

*In silico* çalışmalarda Discovery Studio 3.0 programı ve PyRx 0.8 programı kullanılarak CP, hyperoside ve CP+hyperoside'nin sırasıyla Caspase-3, Bax ve Bcl-2 ile etkileşimlerinin belirlenmesi, bu etkileşimlerin olası mekanizmalarının ve CP, hyperoside ve

CP+hyperoside kombinasyonlarının apoptoz belirteçleri ile meydana getirdiği komplekslerde tarafından proteinler arasında tercih edilen bağlanma bölgelerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. PDB kodları sırasıyla 1GFW (Caspase-3), 1F16 (Bax) ve 2O2F (Bcl-2) makromoleküllerinin kristal yapıları RSCB Protein Databank veri tabanından indirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan makromoleküllerin tüm aktif bölge amino asit kalıntıları (ASAR) Discovery Studio Visualizer programı ve önceki çalışmaların sonuçları kullanılarak belirlenmiştir [21-24].

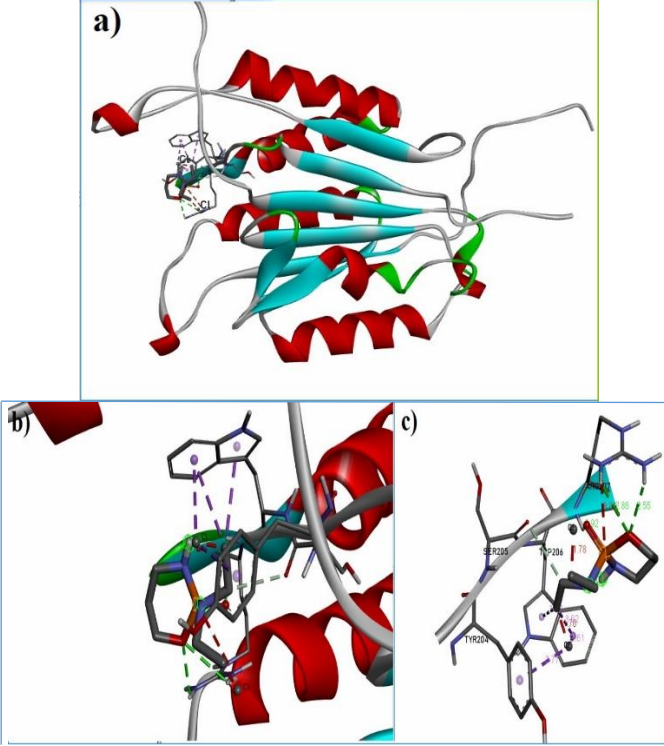
Caspase-3 için tanımlanan ASAR'lar sırasıyla Lys57, Ser58, Met61, His121, Gly122, Cys163, , Tyr204, Ser205, Glu206, Arg207, Phe256 amino asit residuelleridir. Bax için tanımlananlar ise Lys21, Gln28, Gln32, Glu131 ve Arg134 gibi yüklü ve hidrofilik kalıntılara ek olarak Met20, Ala24, Leu27, Ile31, Ile133, Met137 ve Leu141'dan oluşmaktadır. Bcl-2 için tanımlanan ASAR'lar ise Tyr199, Ala146, Val145, Gly142, Trp141, Leu134, Val130, Met112, Asp108, Tyr105, Asp100 ve Ala97 olarak belirlenmiştir. CP'nin ve hyperoside'nin moleküler modelleri SDF formatında sırasıyla Structure2D\_CID\_2907 ve Structure2D\_CID\_5281643 kodlarıyla PubChem veri tabanından indirilmiştir. CP ve hyperoside'nin Caspase-3, Bax ve Bcl-2'nin aktif bölgesine yerleştirilmesi PyRx programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir [20, 25, 26]. Enerji minimizasyonu ve diğer parametreler önceki çalışmalarımızda yapıldığı gibi ayarlandı [27, 28].

PyRx programı ile CP ve hyperoside moleküllerinin Caspase-3, Bax ve Bcl-2'nin hangi kalıntılara bağlanma eğiliminde olduğunu bulmak için dokuz farklı bağlanma modu seçildi ve bunun üzerine hem CP hem de hyperoside molekülleri ligand olarak kullanılmak üzere Discovery Studio 3.0 programına uyumlu olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra Caspase-3, Bax ve Bcl-2 makromoleküllerinin CP ve hyperoside molekülleri ile etkileşimleri 2D ve 3D etkileşim modları yardımıyla ortaya çıkarılmıştır. Negatif bağlanma enerjisi parametreleri ise en düşük Gibbs serbest enerji değişimi ( $\Delta G$ ) değerleri dikkate alınarak belirlenmiştir.

### III. BULGULAR

#### A. Caspase-3 için moleküler yerleştirme sonuçları

CP ile Caspase-3 arasında meydana gelen etkileşimlere bağlı olarak ortaya çıkan bağlanmalar Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. CP ile Caspase-3 etkileşimine bağlı moleküler docking sonuçları. CP'nin Caspase-3'e yerleştirilmesinin sonuçları: (a) CP Caspase-3'e yerleştirildikten sonra donör ve alıcı arasındaki etkileşimleri gösteren 3D görünüm (Çubuk yapı), (b) CP'nin Caspase-3 ile etkileşimini gösteren 3D yakınlaştırılmış görünüm, (c) CP'nin Caspase-3'ün amino asit kalıntılılarıyla etkileşimini gösteren 2D görünüm

Bir CP molekülünün Caspase-3'ün bağlanma bölgesine yerleştirilmesinin ardından, Şekil 1'de gösterildiği gibi bir CP/Caspase-3 kompleksi elde edilmiştir. Bağlanmanın gerçekleştiği bölgenin Caspase-3'ün aktif bölgesi olduğu anlaşılmıştır. Şekil 1.c, CP ile Caspase-3'ün Arg207'si arasındaki Conventional hidrojen bağı etkileşimlerinin modellenmesini gösteren bir 2D görünümünü göstermektedir, böylece bu amino asit kalıntısı ile toplam üç hidrojen bağı oluşturmaktadır. Ayrıca, CP ile Caspase-3'ün Ser205'i arasında bir karbon-hidrojen bağı bulunurken, CP Arg207 ile bir unfavorable pozitif-pozitif etkileşim kurmuştur. Ayrıca, Tyr204 ve Trp206 ile sırasıyla biri Tyr204 ve ikisi Trp206 ile olmak üzere toplam üç Pi-Sigma etkileşimi meydana gelmiştir.

Etkilerin yanı sıra, CP ve hyperoside'nin Caspase-3 aktiviteleri üzerindeki etkileri belirlenmiş birlikte değerlendirilmiş ve sonuçları Şekil 2'de verilmiştir.

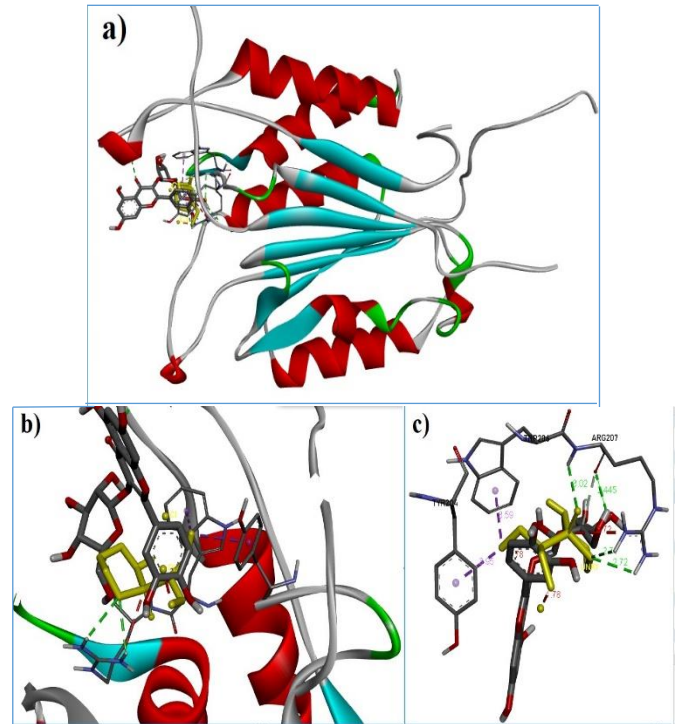
CP ve hyperoside'nin Caspase-3'e kenetlenmesinin özet sonuçları Tablo 1'te sunulmuştur.

Tablo 1. Siklofosamid ve hyperoside'nin Caspase-3'e kenetlenmesinin özet sonuçları

Caspase-3			
	Aktif bölge kalıntıları	H-bağ sayısı	$\Delta G$ (kcal/mol)
Siklofosamid	Tyr204, Trp206, Arg207*, Ser205	3 (2.92, 2.55, 2.86 Å)	-5.0
Siklofosamid & hyperoside	Tyr204, Trp206, Arg207*	3 (2.72, 2.71, 3.02 Å)	-4.8/-8.0

\* Conventional hidrojen bağı oluşturan bir amino asit kalıntısı

CP ve hyperoside'nin Caspase-3 aktivitesi üzerindeki etkileri birlikte uygulama sonucu moleküler yerleştirme sonuçları ile değerlendirilmiş ve Şekil 2'de sunulmuştur.



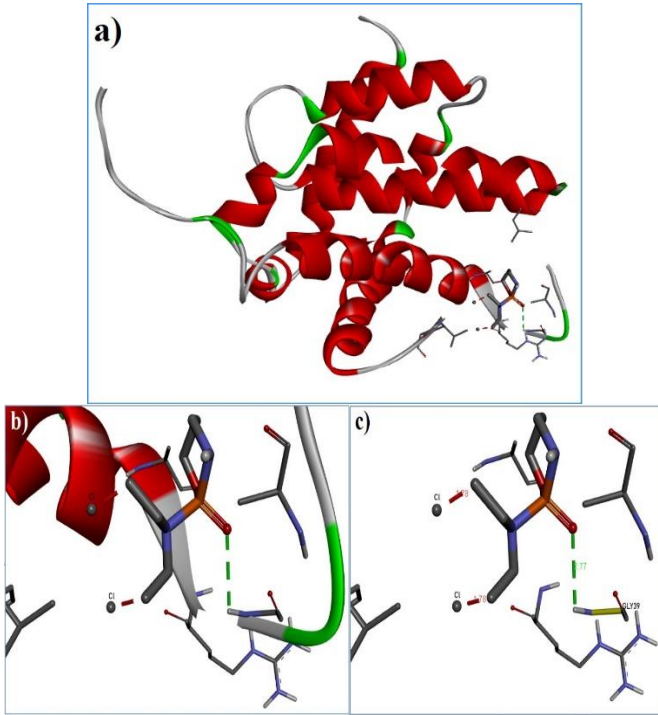
Şekil 2. CP+ hyperoside'nin Caspase-3'e kenetlenmesinin sonuçları. (a) CP+hyperoside Caspase-3'e kenetlendiğinde CP'nin (sarı çubuk yapısı) Caspase-3 ile etkileşimini gösteren 3B görünüm (b) hyperoside (Sarı çubuk yapısı) Caspase-3'e kenetlendiğinde CP'nin Caspase-3 ile etkileşimini gösteren 3B görünüm, (c) CP+ hyperoside'nin Caspase-3'ün amino asit kalıntılılarıyla etkileşimini gösteren 2B görünüm

CP ve hyperoside'nin birlikte uygulanması, CP için sistemin  $\Delta G$  değerinde 0,2 kcal/mol bir artış göstermiştir (-4,8 kcal/mol). Şekil 2.c, CP ile Caspase-3'ün Ser205'i arasında karbon-hidrojen bağı etkileşimi meydana gelmezken, CP ile

Caspase-3 arasında meydana gelen unfavorable bir pozitif-pozitif etkileşim ve unfavorable bir bump etkileşimi ile birlikte Conventional hidrojen bağlanmasını modellemek için 2D bir görünüm göstermektedir. CP ve Arg207 arasında oluşan üç hidrojen bağının ortalama uzunluğunun CP-hyperoside/Caspase-3 kompleksinde CP/Caspase-3'e kıyasla arttığı da ortaya çıkmıştır (Tablo 1). Ayrıca, CP- hyperoside/Caspase-3 kompleksinde hyperoside ve Arg207 arasında biri Conventional hidrojen bağı, diğeri karbon-hidrojen bağı olmak üzere iki etkileşim meydana gelmiştir. hyperoside ve Arg207 (2,445 Å) arasındaki Conventional hidrojen oluşumu CP-Arg207'ninkinden daha kısaydı (Şekil 2.c).

### B. Bax için in silico sonuçları

CP'nin Bax ile etkileşiminin sonuçları Şekil 3'da verilmiştir.

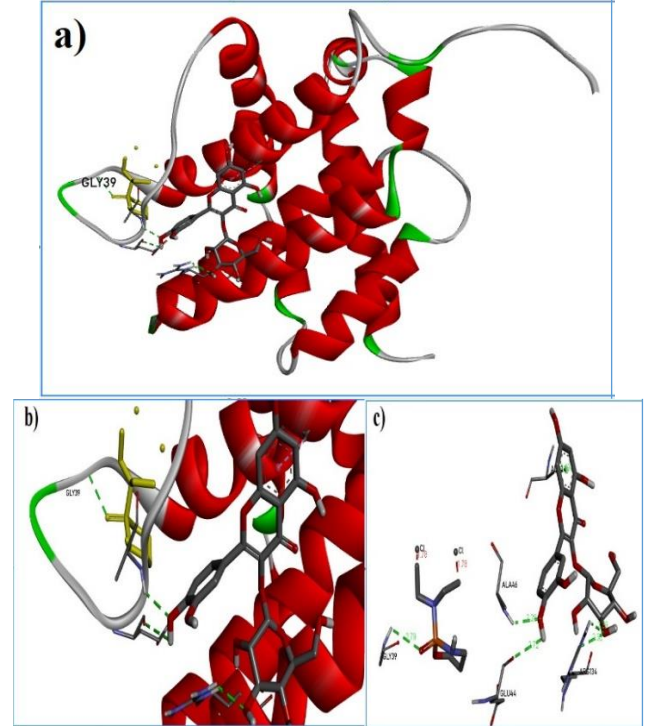


Şekil 3. CP'nin Bax'a kenetlenme sonuçları CP'nin Bax'a yerleştirilmesinin sonuçları: (a) CP Bax'a yerleştirildikten sonra donör ve alıcı arasındaki etkileşimleri gösteren 3D görünüm (Çubuk yapı), (b) CP ve Bax arasındaki etkileşimin 3D yakınlaştırılmış görünümü, (c) CP'nin Bax'ın amino asit kalıntıları ile etkileşimini gösteren 2D görünüm

Bir CP molekülünün Bax'ın bağlanma bölgesine kenetlenmesinin ardından, Şekil 3'da gösterildiği gibi bir CP/Bax kompleksi elde ettik. Bağlanmanın gerçekleştiği bölgenin Bax'ın aktif bölgesi olduğu belirlendi. Şekil 3.c, CP ile Bax'ın sadece bir amino asit kalıntısı, yani Gly39 arasında meydana gelen

Conventional hidrojen bağı etkileşimlerinin modellenmesinin 2D görünümünü göstermektedir.

Ayrıca, CP ve hyperoside'nin birlikte uygulamasına bağlı olarak Bax aktiviteleri üzerindeki etkileri moleküler docking çalışmaları yardımıyla analiz edilmiş ve sonuçları Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 4. CP+ hyperoside'nin Bax'a yerleştirilme sonuçları. (a) CP+ hyperoside Bax'a yerleştirildikten sonra CP (Sarı çubuk yapısı) ve Bax arasındaki etkileşimin 3D görünümü (b) hyperoside (Sarı çubuk yapısı) Bax'a yerleştirildikten sonra CP ve Caspase-3 arasında meydana gelen etkileşimi gösteren 3D yakınlaştırılmış görünüm, (c) CP+ hyperoside'nin Bax'ın amino asit kalıntıları ile 2D bağlanma modu görünümü

CP ve hyperoside'nin Bax'a kenetlenmesinin özet sonuçları Tablo 2'te sunulmuştur.

Tablo 2. Siklofosamid ve hyperoside'nin Bax'a kenetlenmesinin özet sonuçları

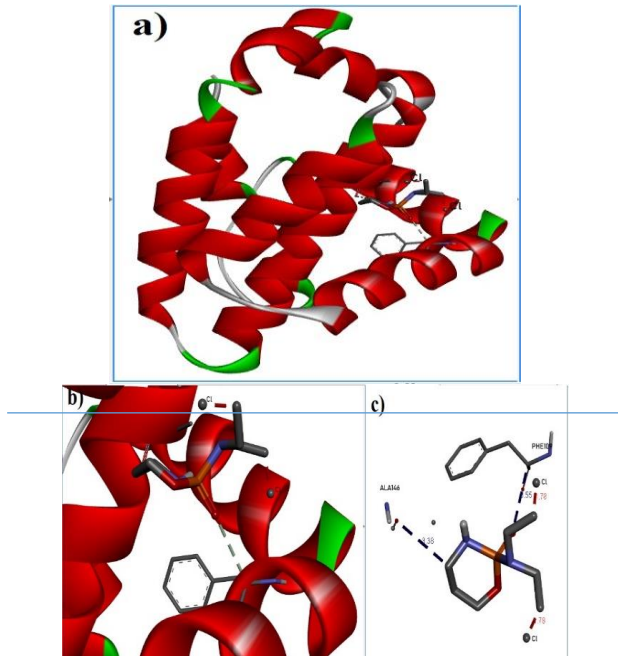
	Bax		
	Aktif bölge kalıntıları	H-bağ sayısı	$\Delta G$ (kcal/mol)
<b>Siklofosamid</b>	<b>Gly39*</b>	<b>Bir (2.77 Å)</b>	<b>-4.6</b>
<b>Siklofosamid &amp; hyperoside</b>	<b>Gly39*, Arg134, Glu44, Ala46,</b>	<b>Beş (2.28, 2.72, Üç (2.39, 2.32, 2.79 Å)</b>	<b>-4.6/-6.1</b>

\* Conventional hidrojen bağı oluşturan bir amino asit kalıntısı

Öte yandan, CP ve hyperoside'nin birlikte uygulanmasıyla ortaya çıktığı gibi, CP/Bax kompleksinin negatif bağlanma enerjisinde (-4,6 kcal/mol) başka bir değişiklik gözlenmemiştir (Tablo 2). Şekil 4.c'de olduğu gibi, Şekil 4.c de CP ile Bax'ın Gly39 amino asit kalıntısı arasındaki Conventional hidrojen bağı etkileşiminin modellenmesinin 2D görünümünü göstermektedir. Buna ek olarak, CP ve hyperoside'nin Bax'a eşzamanlı olarak yerleştirilmesi, CP-hyperoside/Bax kompleksinde Gly39 ve CP arasında oluşan hidrojen bağı uzunluğunun, CP/Bax kompleksinde Gly39 ve CP arasında oluşan hidrojen bağı uzunluğuna kıyasla 2,77Å'den 2,79Å'ye yükseldiğini ortaya koymuştur (Tablo 2). Benzer şekilde, CP/hyperoside-Bax kompleksinde Ala24 ile hyperoside arasında bir Pi-Alkil etkileşimi meydana gelirken, hyperoside ile Ala46, Glu44 ve Arg134 amino asit kalıntıları arasında dört Conventional hidrojen bağı etkileşimi meydana gelmiştir. Bununla birlikte, CP/hyperoside-Bax kompleksinin  $\Delta G$  değeri hyperoside için CP'ye göre daha düşük bulunmuştur (Tablo 2).

### C. Bcl-2 için *in silico* sonuçları

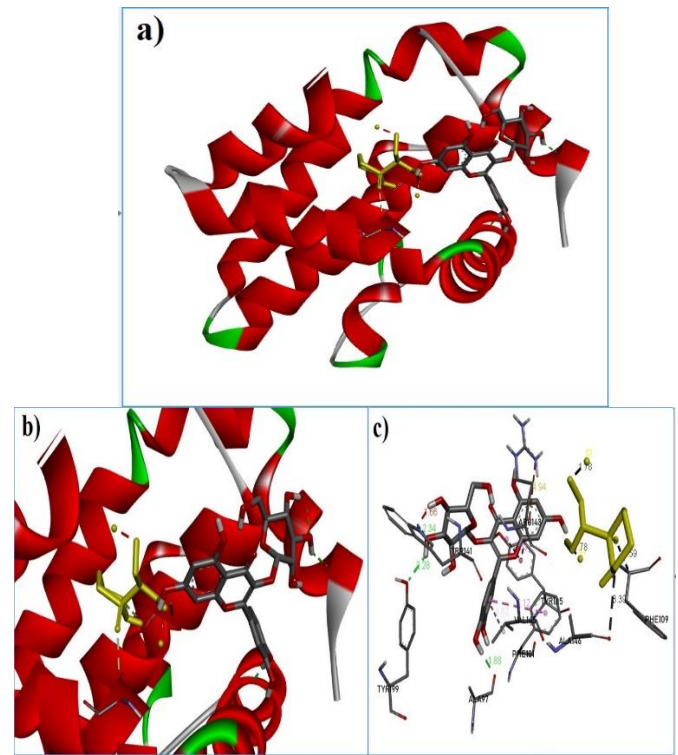
CP'nin Bcl-2 ile etkileşiminin sonuçları Şekil 5'de verilmiştir.



Şekil 5. CP'nin Bcl-2'ye kenetlenmesinin sonuçları. CP'nin Bcl-2'ye yerleştirilmesinin sonuçları: (a) CP Bcl-2'ye yerleştirildikten sonra donör ve alıcı arasındaki etkileşimleri gösteren 3D görünüm (Çubuk yapı), (b) CP ve Bcl-2 arasındaki etkileşimin 3D yakınlaştırılmış görünümü, (c) CP'nin Bcl-2'nin amino asit kalıntıları ile etkileşimini gösteren 2D görünüm

Bir CP molekülünün Bcl-2 bağlanma bölgesine yerleştirilmesinin ardından, Şekil 5'de gösterildiği gibi bir CP/Bcl-2 kompleksi elde ettik. Bağlanmanın gerçekleştiği bölgenin Bcl-2'nin aktif bölgesi olduğu ortaya çıktı. Şekil 5.c'deki 2D görünüme göre, CP ile Bcl-2'nin artık amino asitleri arasında Conventional hidrojen bağı etkileşimleri meydana gelmedi; ancak CP ile Bcl-2'nin amino asit kalıntıları (Phe109, Ala146) arasında karbon-hidrojen bağı etkileşimleri meydana geldi.

Moleküler kenetlenme çalışmaları sayesinde, CP ve hyperoside'nin birlikte uygulamasına bağlı olarak Bcl-2 aktiviteleri üzerindeki etkileri belirlenmiş ve ilgili sonuçlar Şekil 6'da sunulmuştur.



Şekil 6. CP+ hyperoside'nin Bcl-2'ye yerleştirilmesinin sonuçları: (a) CP+ hyperoside Bcl-2'ye yerleştirildikten sonra CP (Sarı çubuk yapısı) ve Bcl-2 arasındaki etkileşimin 3D görünümü (b) hyperoside (Çubuk yapısı) Bcl-2'ye yerleştirildikten sonra CP ve Bcl-2 arasındaki etkileşimin 3D yakınlaştırılmış görünümü, (c) CP+ hyperoside'nin (Sadece CP için sarı çubuk yapısı) Bcl-2'nin amino asit kalıntıları ile etkileşimini gösteren 2D görünüm

CP ve hyperoside'nin Bcl-2'ye kenetlenmesinin özet sonuçları Tablo 3'te sunulmuştur. CP ve hyperoside'nin birlikte uygulanması CP için negatif bağlanma enerjisinde (-5,0 kcal/mol) herhangi bir değişiklik göstermemiştir (Tablo 3). Şekil 6.c'de CP ile Bcl-2'nin Phe109, Ala146 amino asit kalıntıları arasında meydana gelen karbon-hidrojen bağı etkileşimlerinin modellenmesinin 2D görünümünü

göstermektedir. Öte yandan, CP ve hyperoside'nin Bcl-2'ye eşzamanlı olarak yerleştirilmesi, hyperoside ve Bcl-2 arasında üç yeni Conventional hidrojen bağı oluştuğunu ortaya koymuştur (Tablo 3).

Tablo 3. Siklofosfamid ve hyperoside'nin Bcl-2'ye kenetlenmesinin özet sonuçları

Bcl-2			
Aktif bölge kalıntıları	H-bağ sayısı		$\Delta G$ (kcal/mol)
<b>Siklofosfamid</b> Ala146, Tyr105, Phe109,	Hidrojen bağı oluşmadı ancak iki karbon-hidrojen etkileşimi meydana geldi		<b>-5.0</b>
<b>Siklofosfamid &amp; hyperoside</b> Ala146, Phe109 Tyr199, Ala97, Trp141	CP için hiçbir hidrojen bağı oluşmazken, hyperoside için üç Conventional hidrojen bağı etkileşimi meydana gelmiştir		<b>-5.0/-7.3</b>

Ayrıca, Şekil 6.c CP-hyperoside/Bcl-2 kompleksindeki şu etkileşimleri göstermektedir: Arg134 ve hyperoside arasında bir Pi-Katyon etkileşimi, Tyr105 ve hyperoside arasında iki Pi-Pi Stacked etkileşim, Phe101 ve hyperoside arasında bir Pi-Pi T-shaped etkileşim, Val105 ve hyperoside arasında bir Pi-Alkil etkileşimi ve son olarak Trp141 ve hyperoside arasında bir Donör-Donör etkileşimi meydana gelmiştir. Bu arada, bu kompleksin hyperoside için negatif bağlanma enerjisi değişim değeri CP için hesaplanandan daha düşük olmuştur (Tablo 3).

#### IV. TARTIŞMA

Bu çalışma *in silico* çalışmalar sayesinde hyperoside'nin CP kaynaklı apoptoza karşı koruyucu etkilerinin değerlendirilmesini amaçlamaktadır. CP kaynaklı olarak doku hasarına yönelik literatür çalışmalarında yapısal bozukluklar, obstrüksiyon, kanama alanları gibi ciddi hasarlar raporlanmıştır. Suddek ve arkadaşları, CP verilen

sıçanların interalveolar septada hasar ve/veya ödem, konjesyon, makrofaj infiltrasyonu ve nötrofilik olduğunu göstermiştir [4]. Bir başka çalışmada CP verilen sıçanların akciğer dokularının histopatolojik incelemesinde alveolar hücre yaralanmaları, alveolar septa kalınlığı, eritrositler ve alveolar lümende polimorfonükleer hücreler rapor edilmiştir [29]. Önceki çalışmalarda da CP'nin karaciğer, böbrek, mesane ve testislerde apoptoza neden olduğu bildirilmiştir [5, 7, 12]. Ancak CP'nin neden olduğu apoptozis ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Hyperoside, yatıştırıcı, antiseptik, anti-helminetik ve anti-enflamatuar etkileri sayesinde kullanılan Hypericaceae familyasına aittir [12]. Ayrıca hyperoside, antioksidan ve anti-apoptotik özellikler gösteren fenolik ve flavonoid bileşikleriyle bilinmektedir [30]. Hyperoside'nin anti-oksidadif aktiviteleri, oksidadif stres kaynaklı birçok hastalığın yan etkilerini bastırmaya veya azaltmaya yardımcı olabilir [31]. Deneysel bir çalışmada, 100 mg/kg Hyperoside'nin CP kaynaklı testis hasarını ve apoptozu iyileştirmede önemli başarı sağladığı bildirilmiştir [12]. Ayrıca, Çetik ve arkadaşları CP ile ilişkili kardiyotoksisite, Bax ve Caspase-3 ekspresyonlarının CP+hyperoside grubunda azalırken, Bcl-2 ekspresyonlarını önemli ölçüde artırdığını, bunun da hücrelerde sadece CP toksisitesinin değil aynı zamanda apoptoz yoğunluğunun da azalmış olması gerektiğini düşündüğüne bildirmişlerdir [32]. Çalışmamız, hyperoside'nin CP kaynaklı apoptoza karşı koruyuculuğunun *in silico* olarak değerlendirilmesi açısından literatürde türünün ilk örneğidir.

CP'nin tek başına ve CP'nin hyperoside ile birlikte Caspase-3 ekspresyonu üzerindeki etkileri, moleküler yerleştirme sonuçları ile değerlendirilmiştir. Tablo 1'e bakıldığında, CP'nin Caspase-3'e bağlanması sayesinde Arg207 ile CP arasında üç konvansiyonel hidrojen bağı oluştuğu ve negatif bağlanma enerjisi ( $\Delta G$ ) değerinin -5.0 kcal/mol olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan, *in silico* çalışmalarımız CP ve hyperoside kombinasyonunun CP'nin Caspase-3'ün katalitik amino asit kalıntıları ile yaptığı etkileşimlerin sayısında da azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, hyperoside ilavesi, CP ile Arg207 arasında oluşan üç hidrojen bağının ortalama uzunluğunu arttırmanın yanı sıra CP/Caspase-3 kompleksinin oluşumu nedeniyle negatif bağlanma enerjisi değerini -4.8 kcal/mol'e yükseltmiştir.

Siklofosfamidin birlikte uygulanmasından sonra hesaplanan ve proteinin liganda afinitesinin bir göstergesi olan negatif bağlanma enerjisi değerinin CP'nin tek başına uygulanmasına kıyasla artmış olması, Caspase-3'ün CP'ye afinitesinin de azaldığı anlamına gelmektedir [18, 20, 26, 33]. Başka bir deyişle, bu sonuçlar Caspase-3 ekspresyonunun azaldığını düşündürmektedir.

CP'nin tek başına ve hyperoside ile birlikte uygulanmasının Bax ekspresyonu üzerindeki etkileri moleküler yerleştirme sonuçlarımız göz önünde bulundurularak değerlendirildiğinde, CP'nin tek başına Bax ile sadece bir hidrojen bağı oluştururken, hyperoside ile beş hidrojen bağı oluşturduğu belirlenmiştir (Tablo 2). Ayrıca CP-hyperoside/Bax kompleksi oluşturulduğunda CP ile Gly39 arasında oluşan hidrojen bağı uzunluğunun CP/Bax kompleksine kıyasla arttığı tespit edilmiş, bu da Bax'ın CP'ye olan afinitesinin azalmış olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, CP-hyperoside/Bax kompleksinde hyperoside ve Bax arasında dört yeni hidrojen bağının oluşması, Bax'ın CP'ye kıyasla hyperoside'ye daha yüksek bir afiniteye sahip olduğunu göstermiştir. Hesaplanan negatif bağlanma enerjisi değişim değerleri, Tablo 2'de sunulduğu gibi, bu sonuçları doğrular görünmektedir. CP- hyperoside/Bax kompleksinin oluşumunda,  $\Delta G$  değeri hyperoside'nin Bax'a kenetlenmesi için -6,1 kcal/mol olarak hesaplanırken, CP'nin Bax'a moleküler yerleştirme sonucu için  $\Delta G$  değeri -4,6 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, CP'nin hyperoside ile birlikte uygulanmasının Bax'ın CP'ye olan afinitesinde bir azalmaya neden olacağı ve dolayısıyla Bax ekspresyonlarının azalmasına yol açacağı şeklinde yorumlanabilir.

Hyperoside'nin Bcl-2 ekspresyonları üzerindeki etkilerini araştırmak üzere yürütülen *in silico* çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, Bcl-2'nin CP'ye olan afinitesinin hyperoside ilavesiyle önemli ölçüde azaldığı anlaşılmaktadır. Ayrıca, CP/Bcl-2 ve CP- hyperoside/Bcl-2 komplekslerinin hiçbirinde Bcl-2'nin CP ile Conventional hidrojen bağları oluşturmadığı gözlenmiştir. Öte yandan, hyperoside'nin eklenmesinin ardından hyperoside ve Bcl-2'nin katalitik amino asit kalıntıları arasında üç yeni Conventional hidrojen bağı etkileşimi oluştuğu da gözlemlenmiştir. CP- hyperoside/Bcl-2 kompleksinde hyperoside'nin Bcl-2'ye bağlanması nedeniyle elde edilen Gibbs serbest enerji değişim değeri ( $\Delta G$ ) CP/Bcl-2 kompleksine göre oldukça

düşük olduğu görülmüştür (-7,3 kcal/mol). Bu çok düşük bağlanma enerjisi değeri ve CP-hyperoside/Bcl-2 kompleksi için elde edilen yeni hidrojen bağı oluşumları, Bcl-2'nin hyperoside'ye olan afinitesinin CP'ye olan afinitesine kıyasla çok yüksek olması gerektiğini göstermektedir (Tablo 3). Bu sonuçlar hyperoside ve CP'nin *in vivo* olarak birlikte uygulandığında, bu uygulamanın Bcl-2 ekspresyonları üzerinde olumlu bir etkiye neden olabileceği anlamında yorumlanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışma Bcl-2 ekspresyonlarında CP ile ilişkili artışın hyperoside ilavesiyle önlenebileceğini düşündürmüştür. Hyperoside'nin deneysel olarak üretilen çeşitli doku toksisitelerine karşı koruma sağlamak için anti-enflamatuar ve anti-apoptotik yollarla çalıştığı literatürde gösterilmiştir [12, 32]. *In silico* sonuçlarımız ve literatür çalışmaları dikkate alınarak hyperoside'nin apoptozu önleyebileceği değerlendirilmiştir [34].

## V. SONUÇLAR

*In silico* sonuçlarımıza dayanarak, hyperoside'nin CP'nin neden olduğu apoptozu karşı koruyucu etkilerinin ortadan kaldırılması için potansiyel bir aday olabileceğini düşünüyoruz. Bu çalışma sonuçlarımıza dayanarak, hyperoside'nin CP ve benzeri alkilleyici ajanların kullanımını gerektiren kanser hastaları üzerinde klinik uygulama öncesinde daha iyi değerlendirme imkânı sağlayacağı düşünülmüştür.

## KAYNAKLAR

- [1] Q. Wang, H.C. Wei, S.J. Zhou, Y. Li, T.T. Zheng, C.Z. Zhou, X.H. Wan, Hyperoside: A review on its sources, biological activities, and molecular mechanisms, *Phytotherapy Research* 36(7) (2022) 2779-2802.
- [2] X.-y. Quan, H.-t. Chen, S.-q. Liang, C. Yang, C.-w. Yao, Y.-z. Xu, H.-f. Liu, N. An, Revisited cyclophosphamide in the treatment of lupus nephritis, *BioMed Research International* 2022 (2022).
- [3] S.A. Saghir, S.A. Alharbi, M.A. Al-Garadi, N. Al-Gabri, H.Y. Rady, N.K. Olama, M.A. Abdulghani, A.M. Al Hroob, A.A. Almaman, M. Bin-Jumah, Curcumin prevents cyclophosphamide-induced lung injury in rats by suppressing oxidative stress and apoptosis, *Processes* 8(2) (2020) 127.
- [4] O.A. Abd El-Ghafar, E.H. Hassanein, A.M. Sayed, E.K. Rashwan, A.G.S. Shalkami, A.M. Mahmoud, Acetovanillone prevents cyclophosphamide-induced acute lung injury by modulating PI3K/Akt/mTOR and Nrf2 signaling in rats, *Phytotherapy Research* 35(8) (2021) 4499-4510.
- [5] M. Cengiz, S.C. Yildiz, C. Demir, İ.K. Şahin, Ö. Teksoy, A. Ayhanci, Hepato-protective and anti-apoptotic role of boric acid against liver injury induced by cyclophosphamide, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 53 (2019) 1-7.

- [6] M.S. Badawi, The protective effect of  $\beta$ -cryptoxanthin against cyclophosphamide-induced lung injury in adult male albino rats, *Bulletin of the National Research Centre* 46(1) (2022) 1-9.
- [7] M. Cengiz, V. Sahinturk, S.C. Yildiz, İ.K. Şahin, N. Bilici, S.O. Yaman, Y. Altuner, S. Appak-Baskoy, A.J.J.o.T.E.i.M. Ayhanci, *Biology*, Cyclophosphamide induced oxidative stress, lipid per oxidation, apoptosis and histopathological changes in rats: Protective role of boron, 62 (2020) 126574.
- [8] U.B. Das, M. Mallick, J.M. Debnath, D.J.A.j.o.a. Ghosh, Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats, 4(3) (2002) 201-208.
- [9] E. Habibi, M. Shokrzadeh, A. Ahmadi, A. Chabra, F. Naghshvar, H. Haghi-Aminjan, F. Salehi, Pulmonoprotective action of *Zataria multiflora* ethanolic extract on cyclophosphamide-induced oxidative lung toxicity in mice, *Chinese journal of integrative medicine* 26(10) (2020) 754-761.
- [10] D.H. El-Kashef, Role of venlafaxine in prevention of cyclophosphamide-induced lung toxicity and airway hyperactivity in rats, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 58 (2018) 70-76.
- [11] T. Naraoka, T. Sumi, Y. Keira, H. Nakata, H. Chiba, Epirubicin and Cyclophosphamide-induced Acute Fibrinous and Organizing Pneumonia, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 204(8) (2021) e92-e93.
- [12] S. Can, S. Çetik Yıldız, C. Keskin, V. Şahintürk, M. Cengiz, S. Appak Başköy, A. Ayhanci, G. Akıncı, Investigation into the protective effects of *Hypericum Triquetrifolium* Turra seed against cyclophosphamide-induced testicular injury in Sprague Dawley rats, *Drug and Chemical Toxicology* 45(4) (2022) 1679-1686.
- [13] L. Chen, Y. Liu, Z. Tang, X. Shi, Z. Song, F. Cao, P. Wei, M. Li, X. Li, D. Jiang, Improvements in estrogen deficiency-induced hypercholesterolemia by *Hypericum perforatum* L. extract are associated with gut microbiota and related metabolites in ovariectomized (OVX) rats, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 135 (2021) 111131.
- [14] F. Ibaokurgil, B.A. Yildirim, S. Yildirim, Effects of *Hypericum scabrum* L. essential oil on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats, *Cutaneous and Ocular Toxicology* (2022) 1-8.
- [15] Z. Toker, Variation of total hypericin, phenolic and flavonoid compounds in *Hypericum triquetrifolium* during its phenological cycle, *Pharmaceutical Biology* 47(4) (2009) 285-288.
- [16] E.F. Manzullo, C.P. Escalante, Research into fatigue, *Hematology/Oncology Clinics* 16(3) (2002) 619-628.
- [17] J. Kostal, Computational Chemistry in Predictive Toxicology: status quo et quo vadis?, *Advances in molecular toxicology*, Elsevier 2016, pp. 139-186.
- [18] S. Canofeni, S. Di Sario, J. Mela, R. Pilloton, Comparison of immobilisation procedures for development of an electrochemical PPO-based biosensor for on line monitoring of a depuration process, *Analytical letters* 27(9) (1994) 1659-1669.
- [19] S. Shityakov, C. Förster, In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter, *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry* 2014 (2014) 23-36.
- [20] B. Gür, Determination of the pH-dependent immobilization efficacy of  $\alpha$ -glycosidase and its catalytic performance on SnO<sub>2</sub>:Sb/ITO thin films, *Biochemical Engineering Journal* 163 (2020) 107758.
- [21] S. Cheemanapalli, A. C.M, S.B. Pakala, S.K. Chitta, Design and screening of syringic acid analogues as BAX activators-An in silico approach to discover "BH3 mimetics", *Computational Biology and Chemistry* 74 (2018) 49-62.
- [22] R. Sinha, A.S. Vidyarthi, A molecular docking study of anticancer drug paclitaxel and its analogues, (2011).
- [23] S. Siddiqui, S. Upadhyay, I. Ahmad, A. Hussain, M. Ahamed, Cytotoxicity of *Moringa oleifera* fruits on human liver cancer and molecular docking analysis of bioactive constituents against caspase-3 enzyme, *Journal of Food Biochemistry* 45(5) (2021).
- [24] E.D. Kaya, A. Türkhan, F. Gür, B. Gür, A novel method for explaining the product inhibition mechanisms via molecular docking: inhibition studies for tyrosinase from *Agaricus bisporus*, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* (2021) 1-14.
- [25] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *Journal of computational chemistry* 31(2) (2010) 455-461.
- [26] F. Gür, M. Cengiz, H.M. Kutlu, B.P. Cengiz, A. Ayhanci, Molecular docking analyses of Escin as regards cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: In vivo and in Silico studies, *Toxicology and Applied Pharmacology* 411 (2021) 115386.
- [27] F. Gür, M. Cengiz, B. Gür, Alternations in nuclear factor kappa beta activity (NF- $\kappa$ B) in the rat brain due to long-term use of atomoxetine for treating ADHD: In vivo and in silico studies, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 534 (2021) 927-932.
- [28] F. Gür, B. Gür, B. Erkeyman, Z. Halıcı, A. Karakoç, Investigation of serum and brain superoxide dismutase levels depending on atomoxetine used in attention-deficit/hyperactivity disorder treatment: A combination of in vivo and molecular docking studies, *Bioorganic Chemistry* 105 (2020) 104435.
- [29] E. Şengül, V. Gelen, S. Gedikli, S. Özkanlar, C. Gür, F. Çelebi, A. Çınar, The protective effect of quercetin on cyclophosphamide-Induced lung toxicity in rats, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 92 (2017) 303-307.
- [30] N. Faraji, A. Ganji, N. Heshami, I. Salehi, A. Haddadian, S. Shojaie, A. Komaki, Hypolipidemic effects of *Hypericum Scabrum* extract on the serum lipid profile and obesity in high-fat diet fed rats, *Human Antibodies* 29(1) (2021) 55-61.
- [31] N.Z. Timraz, H.M. El-Bassossy, S.R. Ibrahim, A.M. El-Halawany, O.S. Aljohani, H.M. Abdallah, Vasodilating effect of *Hypericum revolutum* (Vahl)(Clusiaceae) methanol extract in rats, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 20(5) (2021) 1003-1007.
- [32] S. Cetik Yildiz, C. Keskin, V. Şahintürk, A. Ayhanci, Cardioprotective effects of *Hypericum triquetrifolium* Turra. against cyclophosphamide related cardiotoxicity in rats, *Journal of Research in Pharmacy* 22(3) (2018).
- [33] S.B. Kassa, P. Taslimi, Ş. Özel, B. Gür, İ. Gülçin, Y. Onganer, Effects of some phenolic compounds on the inhibition of  $\alpha$ -glycosidase enzyme-immobilized on Pluronic®F127 micelles: An in vitro and in silico study,



Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 632 (2022) 127839.

[34] S.C. Yildiz, C. Keskin, V. Sahintürk, A. Ayhanci, A histopathological, immunohistochemical and biochemical investigation on the in vitro antioxidant, myeloprotective, hematoprotective and hepatoprotective effects of *Hypericum triquetrifolium* seed extract against cyclophosphamide-induced toxicity, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 62 (2019).