



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİYALURONİDAZ ENZİM İNHİBİTÖRLERİ

Hilal DEMİRBAZ ÖZMEN

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman

Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

II. Danışman

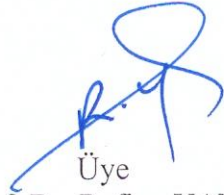
Yard. Doç. Dr. Sevim TUNALI

Şubat, 2015

İSTANBUL

Bu çalışma 13/02/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Üye

Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Kimya Bölümü
Biyokimya Anabilim Dalı



Üye

Prof. Dr. Nuriye AKEV
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Üye

Prof. Dr. Ayşen YARAT
Marmara Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Temel Tıp Bilimleri
Biyokimya Anabilim Dalı



Üye

Prof. Dr. Ayşe YUSUFUĞLU
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Kimya Bölümü
Organik Kimya Anabilim Dalı



Üye

Doç. Dr. Özlem SAÇAN
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Kimya Bölümü
Biyokimya Anabilim Dalı

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'nin 15549 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca engin bilgilerinden faydalandığım, her türlü desteği ile yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini kendime örnek aldığım çok değerli Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı danışman hocam Sayın Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ'a derin minnet ve saygılarımı arz ederim.

Çalışmalarım boyunca benden yardımlarını ve desteğini esirgemeyen hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Sevim TUNALI'ya teşekkür ederim. Ayrıca, Doç. Dr. Özlem SAÇAN'a, Arş. Görv. Dr. Bertan Boran BAYRAK'a, Arş. Görv. Dr. İsmet Burcu TÜRKYILMAZ'a, Arş. Görv. Onur ERTİK'e ve diğer çalışma arkadaşlarıma bana gösterdikleri ilgi ve anlayıştan dolayı teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bugünlere gelmemi sağlayan sevgili AİLEM'e, fedakarlıkları ve inancıyla hep yanımda olan sevgili eşim Azim ÖZMEN'e, ayrıca çalışma hayatının zorluklarına rağmen desteğini esirgemeyen Bilim İlaç yöneticilerimden Sayın Kadriye ÖZÇELİK'e ve ARDİ FARMA İlaç sahibi Sayın Yusuf Toktamış ÖĞÜN'e en içten duygularıyla sonsuz teşekkürler ederim.

Çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Şubat, 2015

Hilal DEMİRBAĞ ÖZMEN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	vi
ÖZET.....	vii
SUMMARY.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. ENZİMLER.....	3
2.1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri	3
2.2. ENZİMLERİN ADLANDIRILMASI	4
2.3. ENZİM İNHİBİSYONU.....	6
2.3.1. Geri Dönüşümlü (Reversible) Enzim İnhibisyonu.....	6
2.3.1.1. Yarışmalı (Kompetitif) Enzim İnhibisyonu.....	6
2.3.1.2. Yarışmasız (Nonkompetitif) Enzim İnhibisyonu	7
2.3.1.3. Yarıyarışmalı (Ankompetitif) Enzim İnhibisyonu	8
2.3.2. Geri Dönüşümsüz (İrreversibl) Enzim İnhibisyonu	9
2.4. HİDROLAZLAR.....	10
2.5. HİYALURONİK ASİD	11
2.6. HİYALURONİDAZLAR	17
2.6.1. ÖKARYOTİK HİYALURONİDAZLAR	19
2.6.1.1. Memeli HAaz'ları	19
2.6.1.2. Sığır Testis HAaz' ı (BTH).....	21
2.6.1.3. Arı Zehiri HAaz' ı (BVH).....	22
2.6.1.4. Diğer Zehir HAaz' ları	23
2.6.2. PROKARYOTİK HİYALURONİDAZLAR (HA Liyazlar)	24
2.7. HİYALURONİDAZ VE HİYALURONİK ASİDİN BİYOLOJİK FONKSİYONLARI	24

2.8. HİYALURONİDAZ ENZİM İNHİBİTÖRLERİ	27
2.8.1. Proteinler	29
2.8.2. Polimerler, Polisakkaritler, Sülfatlanmış Oligosakkaridler	29
2.8.3. Yağ Asidleri	31
2.8.4. Alkaloidler.....	32
2.8.5. Flavonoidler ve Terpenler	32
2.8.6. Antioksidanlar ve Polifenoller.....	33
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	36
3.1. DENEYLERDE KULLANILAN ALETLER.....	36
3.2. DENEYDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	36
3.3. ENZİM İNHİBİSYONUNDA KULLANILAN BİTKİ EKSTRELERİ	36
3.3.1. Sulu Ekstrelerin Hazırlanması.....	38
3.4. ENZİM İNHİBİSYONU DENEYİNİN YAPILIŞI.....	39
3.5. ENZİM İNHİBİSYONUNDA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. BİTKİ EKSTRELERİNİN HİYALURONİDAZ İNHİBİTÖRÜ ETKİSİ.....	41
4.2. KİMYASAL MADDELERİN HİYALURONİDAZ İNHİBİTÖR ETKİLERİ....	49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	55
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ	81

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Yarışmalı (Kompetitif) Enzim İnhibisyonunun Reaksiyon Şeması (Göktaş, 2012).....	7
Şekil 2.2: Kompetitif Enzim İnhibisyonu Substrat- V_{max} Grafiği (Göktaş, 2012).....	7
Şekil 2.3: Yarışmasız (Nonkompetitif) Enzim İnhibisyonunun Reaksiyon Şeması (Göktaş, 2012).....	8
Şekil 2.4: Nonkompetitif Enzim İnhibisyonu Substrat- V_{max} Grafiği (Göktaş, 2012).....	8
Şekil 2.5: Yarıyarışmalı (Ankompetitif) Enzim İnhibisyonunun Reaksiyon Şeması (Göktaş, 2012).....	9
Şekil 2.6: Ankompetitif Enzim İnhibisyonu Substrat- V_{max} Grafiği (Göktaş, 2012).....	9
Şekil 2.7: Hiyaluronik Asidin Kimyasal Yapısı (Nermeen ve diğ., 2010).....	12
Şekil 2.8: Hiyaluronik Asidin Üç Boyutlu Yapısı (Nermeen ve diğ., 2010).....	13
Şekil 2.9: CD44 Reseptörüne Ait Etki Mekanizması (Nermeen ve diğ., 2010).....	14
Şekil 2.10: Hyal-1 Enzimine Ait Sarmal Yapı (Nermeen ve diğ., 2010).....	19
Şekil 2.11: Hiyaluronik Asidin Derideki Yeri.....	25

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Bazı İnhibitörlerin Etki Ettiği Gruplar (Uğurlu, 2012).....	10
Tablo 2.2: Bazı Parçalayıcı Enzimler (Nermeen ve diğ., 2012).....	17
Tablo 2.3: Çeşitli Hiyaluronidaz Enzimlerinin Bazı Özellikleri (Nermeen ve diğ., 2010)	20
Tablo 2.4: Memeli Hiyaluronidazlarının Bazı Özellikleri (Nermeen ve diğ., 2010)	21
Tablo 2.5: Bazı Hiyaluronidaz Enzim İnhibitörleri (Nermeen ve diğ., 2010)	28
Tablo 3.1: Bitki Materyallerinin Latince Adları	37
Tablo 3.2: Enzim İnhibisyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler	40
Tablo 4.1: Çeşitli Bitkilerden Hazırlanan Sulu Ekstrelerinin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC ₅₀ Değerleri	41
Tablo 4.2: Amino Asid ve Peptidlerin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC ₅₀ Değerleri	49
Tablo 4.3: Çeşitli Asidlerin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC ₅₀ Değerleri	50
Tablo 4.4: Çeşitli Kimyasal Maddelerin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC ₅₀ Değerleri	52

SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

Da	: Dalton
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
µM	: Mikromolar
U	: Ünite

Kısaltmalar Açıklama

BTH	: Sığır hiyaluronidaz enzimi
BVH	: Arı zehiri hiyaluronidaz enzimi
E.C	: Enzim kod numarası
E.K	: Enzim Komitesi
EMT	: Epital Mezenkimal Geçiş
E.U	: Enzim ünitesi
GAG	: Glikozaminoglikan
GPI	: Glikozil fosfatidilinositol
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
HA	: Hiyaluronik asid, Hiyaluronan, Hiyaluronat
HAaz	: Hiyaluronidaz enzimi
HAS	: Hiyaluronan sentaz
IUB	: Uluslararası Biyokimya Birliği
MMP	: Matriks metaloproteinaz
NAC	: N-asetil sistein
PI3 kinaz	: Fosfatidilinozitol-3-kinaz
p-DAB	: Para dimetil amino benzaldehit
PSS	: Poli (stiren-4-sülfonat)
RTKs	: Aktifleşmiş tirozin kinazlar
Vit C	: Vitamin C, L-askorbik asid

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİYALURONİDAZ ENZİM İNHİBİTÖRLERİ

Hilal DEMİRBAY ÖZMEN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

II. Danışman : Yard. Doç. Sevim TUNALI

Bitkiler tarih boyunca; yiyecek, giyecek, baharat, parfüm ve ilaç olarak kullanılmıştır. Son yıllarda büyük ilgi gören bitkilerle tedavi yöntemi, yurdumuzda da yaygın bir şekilde kullanılmaya ve incelenmeye başlanmıştır. Bitkilerin bilinçli ve dikkatli kullanılması çok önemlidir. Bu bitkilerin sağlıklı ve verimli şekilde kullanılması için etkilerinin ve etki etme yollarının araştırılması gereklidir.

Ülkemizde, enzimler tıpta, sanayide ve diğer birçok alanda kullanılmaktadır. Çalışmamızda son yıllarda sağlık ve kozmetik alanında önemli bir yer edinen hiyaluronidaz enzim aktivitesi üzerine çeşitli bitkilerden hazırlanan sulu ekstraktların ve bazı kimyasal maddelerin inhibitör etkileri araştırıldı. Çalışmamızda kullandığımız sulu bitki ekstraktlarının ve kimyasal maddelerin tümünde hiyaluronidaz enzim etkisi saptandı. Elde edilen sonuçlardan bitki ve kimyasal maddelerin hiyaluronidaz üzerindeki % inhibisyon değerlerinin konsantrasyon artışı ile arttığı saptandı.

Yüksek oranda hiyaluronidaz inhibitör etkisi gösteren bitki ekstraktlarının ve kimyasal maddelerin, hiyaluronidaz inhibitörü olarak sağlık alanında ilaç tedavisine ilave olarak kullanımının uygun olabileceği sonucuna varıldı.

Ocak, 2015, 89 sayfa.

Anahtar kelimeler: Enzim inhibitörü, Hiyaluronidaz, Hiyaluronik asid, Bitki ekstresi

SUMMARY

GRADUATE THESIS

INHIBITORS OF HYALURONIDASE

Hilal DEMİRBAŞ ÖZMEN

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

Co-Supervisor : Yard. Doc. Dr. Sevim TUNALI

Throughout history, plants have been used as food, clothes, spice, perfume and medicine. In recent years, treatment methods with plants, which are very popular, have began to be used and researched widely in our country. Their effects and ways of effecting have to be researched scientifically in order to use efficiently these plants for a healthy life.

Enzymes are used in medicine, industry and in many areas in our country. In this study, the inhibitory effects of chemical compounds and cosmetic prepared from different plants were investigated on the activity of hyaluronidase which has an important value in health area. It was determined that all the plant extracts and chemical substances used in our study showed hyaluronidase inhibitory effect. The results showed that inhibition % values of plant extracts and chemical compounds on hyaluronidase were increased with increasing concentration.

It can be suggested that several plant spices and chemical compounds which are potential sources of hyaluronidase inhibitors may be appropriate to be used as an additional support to drug treatments in the field of health.

January 2015, 89 pages.

Keywords: Enzyme inhibition, Hyaluronidase, Hyaluronic acid, Plant extract

1. GİRİŞ

Bilindiği gibi, günümüzde hızla gelişen teknoloji günlük yaşantıda olduğu kadar bilim dünyasında da gelişimini sürdürmektedir. Günümüzde kullanım alanı giderek artan yüksek ürün kalitesi, üretimde düşük maliyet, az atık, fazla enerji tüketiminin engellenmesi, spesifiklik, kolay kontrol edilebilirlik ve reaksiyon hızının 10^{16} kata kadar artması gibi çeşitli nedenlerden dolayı ilk akla gelenlerden birisi de enzimlerdir.

Enzimler, canlı organizmasında kendisi parçalanmadan veya değişikliğe uğramadan reaksiyon hızlarını arttıran ve protein yapısında olan biyokatalizörlerdir. Organizmadaki biyokimyasal dönüşümlerin tümünün yürüyebilmesi enzimler sayesinde mümkün olmaktadır. Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en önemli farkı özgül (spesifik) olmalarıdır. Organizmadaki organik maddelerin yapımı, yıkımı, kas hareketleri ve solunum gibi fizyolojik olaylar enzimler yardımıyla yürüyebilmektedir (Lehninger, 1988).

Enzimler ve enzim inhibitörleri spesifik oluşları ve düşük konsantrasyonlarda dahi substrat reaksiyonlarını katalizlemelerinden dolayı gıda ve kimya endüstrisinde, tıpta, eczacılıkta, pestisitlerde, kozmetik ve tarım sanayinde kullanılmaktadır (Friedman, 1996).

Hiyaluronidazlar glukuronidazlar sınıfında olup, bağ dokusunda bulunan hiyaluronik asidi hidroliz etme özelliğine sahiptirler. İlk olarak Karl Meyer tarafından 1940 yılında memeli testisinden elde edilmiştir. Buna “spreading factor” de denilmektedir. Antiviral aşılarda ve toksinlerin deri altına enjekte edilmesiyle bu konuda araştırmalara devam edilmiştir (Meyer, 1971). İkinci bağımsız araştırma ise Meyer ve Palmer tarafından yapılmış ve hiyaluronik asidin izolasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir (Meyer ve Palmer, 1934; Chain ve Duthie, 1939).

Sonraki yıllarda hiyaluronidaz benzeri etki gösteren enzimlerin cilt, testis, böbrek, karaciğer, dalak, uterus, plasenta ve vücut sıvılarında (ter, kan, sperm); ayrıca yılan, akrep, kertenkele, eşek arısı, bal arısı, taş balığı gibi hayvan zehirlerinde, aynı zamanda

bazı bakteri, bakteriyofaj (bakterileri yok eden küçük cisimler) ve patojenik mantarlarda (*Candida*, *Streptomyces*), omurgasız hayvanlarda (kabuklu hayvanlar, sülük) vb. doku ve organizmalarda da var olduğu keşfedilmiştir (Frost ve diğ., 1996).

Yapılan değişik araştırmalar hiyaluronidaz enziminin cilt, kemik, diş, eklem, göz, damar ve kas gibi dokularda ayrıca dölllenme, yara iyileşmesi, inflamasyon, tümör hücrelerinin metastaz ve büyümesi gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlarda çok önemli roller üstlendiği bulunmuştur (Laurent, 1987).

Yıllardır süre gelen bitkiler ve bitkisel kaynaklardan elde edilmiş olan birçok kimyasal madde, halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Çeşitli bölgelerden elde edilmiş bu halk ilaçlarında yapılan araştırmalar günümüzdeki modern ilaç yapımı için temel oluşturmuştur. Bu düşünce ile halk arasında yaygın olarak tedavi amaçlı kullanılan ilaçların etkin ya da güvenilir olup olmadıklarının kanıtlanması gerekmektedir.

Yaptığımız çalışma ile çeşitli bitkilerden hazırladığımız ekstrelerin ve bazı kimyasal maddelerin hiyaluronidaz enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkileri incelendi.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ENZİMLER

Biyolojik olarak enzimlerin varlığı ilk olarak 1835 yılında İsveçli kimyacı Jöns Jacob Berzelius tarafından tanımlanmıştır. Berzelius, patatesten nişastanın yıkımını katalizleyen bir şey bulunduğunu fark etmiş ve tüm doğal ürünlerin bu tür bir kataliz reaksiyonu altında oluştuğunu ileri sürmüştür. Ancak uzun yıllar biyolojik katalizin kimyasal mekanizması bilinmemiş ve bir gizem olarak kalmıştır (Williams, 1904).

1850-1860 yılları arasındaki dönemde Louis Pasteur, fermantasyonun canlı hücre varlığında anaerobik olarak şekerin CO₂ ve etanole yıkılması olduğunu göstermiştir. Ferment denilen bu hücrelerin sadece canlı hücrelerde işlev gösterdiği düşünülmüştür. 1878 yılında ilk olarak Alman fizyolog Wilhelm Kühne Yunanca 'maya içinde' anlamına gelen 'enzim' terimini kullanmıştır.

İlk enzim ise saf halde Cornell Üniversitesi'nde, James B. Sumner tarafından verimli bir şekilde elde edilmiştir. Sumner, üreaz enzimini erkek tavşandan izole etmeyi başarmıştır. Bu çalışması Sumner'e 1947'de Nobel ödülünü kazandırmıştır (Pfeiffer, 1954).

2.1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler, doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenirler. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü düzenleyerek sadece belirli bir substrata veya aynı substrat grubu olan substrat serisine karşı etkindirler (Dikmen ve Özgünen, 2004). Bu yüksek seçicilik sayesinde en basit hücrede bile aynı anda pek çok sayıda biyokimyasal reaksiyon meydana gelmektedir. Enzimler, metabolizmada meydana gelen kimyasal reaksiyonlar esnasında hiçbir yan ürün oluşmaksızın %100 verimlilik sağlarlar (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Protein yapısında olan enzimlerin primer amino asit dizilimi genler tarafından belirlenmekte olup, bu özel diziliş enzimin kuarterner yapısı ve konformasyonunun oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Enzim proteininin yapısı yalnız enzimin

biyolojik aktivitesi için değil, aynı zamanda metabolik olayların kontrolünü sağlamak için de önemlidir.

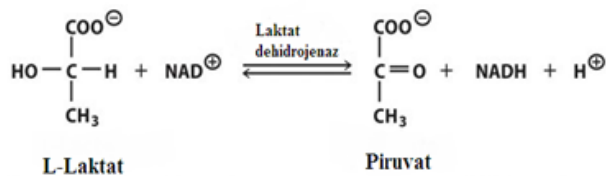
2.2. ENZİMLERİN ADLANDIRILMASI

Enzimler, önceleri katalitik etkilerini üzerinde gösterdikleri ve substrat adı verilen bileşiklerin isimlerinin sonuna, *-az* eki getirilerek isimlendirilmiştir. Örneğin, üreyi CO₂ ve NH₃'e parçalayan enzime üreaz, arginini ornitin ve üreye parçalayan enzime arginaz denilmiştir. Bu isimler en azından substratlar hakkında bilgi verirken, bu hususta hiçbir bilgi ifade etmeyen sadece deneysel/ampirik adlar da biyokimyacılar tarafından kullanılmıştır (tripsin, pepsin ve katalaz gibi) (Keha ve Küfrevioğlu, 2000).

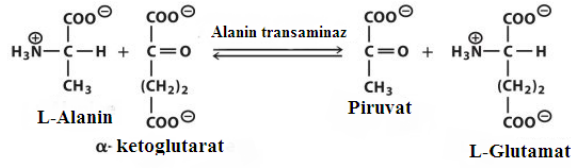
Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) Enzim Komitesinin (EC) önerdiği sistematik isimlendirme, katalizlenen reaksiyonun doğasını tanımlar ve özel bir sayısal kod ile gösterilir. Her enzim için özel sayısal kod 4 rakamdan oluşur ve her biri birbirinden nokta ile ayrılırken numaranın önüne E.C. kısaltması konulur (E.C. 2.6.1.2 gibi). İlk rakam her enzimin katalizlediği reaksiyon türüne göre belirlenmiş olan sınıfa aittir. Sonraki iki rakam enzimin ait olduğu alt sınıf ve alt-alt sınıfa aittir. Son rakam ise, enzimlerin ait olduğu alt-alt sınıfta verilen özgün bir seri numarasıdır.

Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komitesi enzimleri, kataliz ettikleri genel reaksiyon tipine göre sonuna 'az' eki getirerek altı ana sınıfa ayırmıştır (Can ve Akev, 2008; Tekman ve Öner, 1986). Bu altı ana gruplar örneklerle şunlardır;

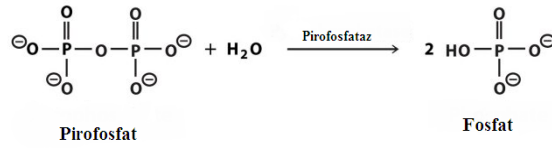
- 1- Oksidoredüktazlar:** İki substrat arasındaki redoks tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Solunum ve fermentasyon olaylarıyla ilgili enzimler de bu sınıfa aittirler.



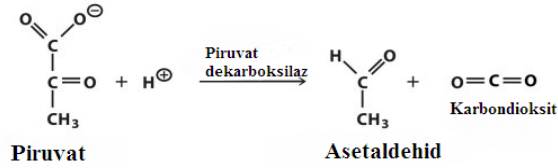
- 2- Transferazlar:** Fonksiyonel grupların bir molekülden diğerine transferini katalize eden enzim grubudur.



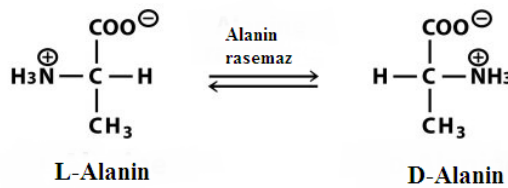
3- Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonlarını, suyun H^+ ve OH^- iyonları yardımıyla moleküllerin yıkılmasını katalizleyen enzimlerdir.



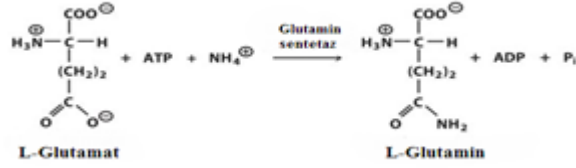
4- Liyazlar (Sentazlar): Bir organik moleküldeki grupların hidrolitik veya oksidatif olmayarak ayrılmasını kataliz eden enzimlerdir. C-C, C-O, C-N ve C-S bağlarını yükseltgenme ve hidroliz dışında bir mekanizma ile kıran enzimlerdir.



5- İzomerazlar: Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalize eden enzimlerdir. Substratın molekül içi değişikliklerini katalizleme özelliğine sahiptirler.



6- Ligazlar (Sentetazlar): ATP, ADP gibi yüksek enerjili fosfat bileşenlerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir.



2.3. ENZİM İNHİBİSYONU

Enzim-substrat kompleksini sağlayan bölge, enzimin kısıtlı bir bölgesini içermektedir. Çünkü enzimler büyük, buna karşılık substratlar küçük moleküllerdir. Enzimlerde substratın bağlandığı ve değişikliğe uğratıldığı ve başka bir bileşiğe dönüştürüldüğü bölgeye ‘aktif merkez’ denir. Bu aktif merkez de en az bir amino asit özel bir rol oynar.

Substratın enzimin aktif merkezine bağlanıp, enzim-substrat kompleksinin oluşumunu önleyen bileşenlere ‘enzim inhibitörleri’ bu olaya ise ‘enzim inhibisyonu’ denir.

Enzim inhibisyonu geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz olmak üzere iki şekilde meydana gelebilir.

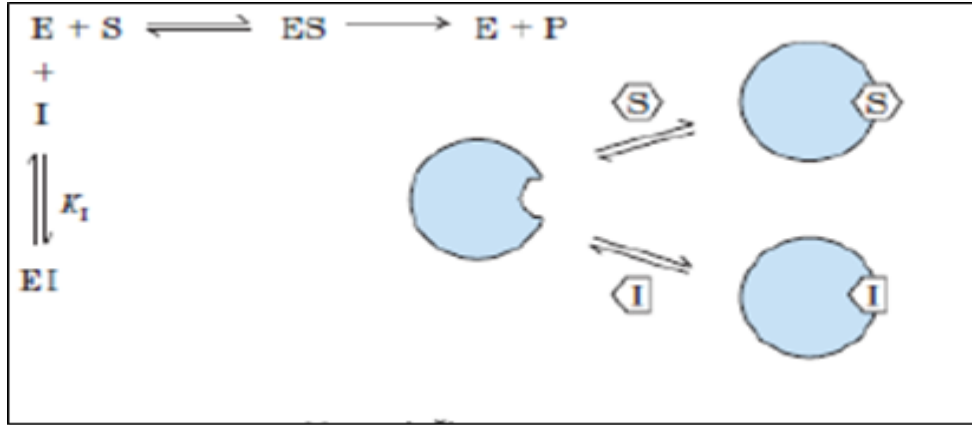
2.3.1. Geri Dönüşümlü (Reversible) Enzim İnhibisyonu

Dönüşümlü inhibitörler, enzime kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanır ve enzim molekülünden uzaklaştırılabilir. Dönüşümlü inhibisyon üç farklı şekilde meydana gelebilir.

2.3.1.1. Yarışmalı (Kompetitif) Enzim İnhibisyonu

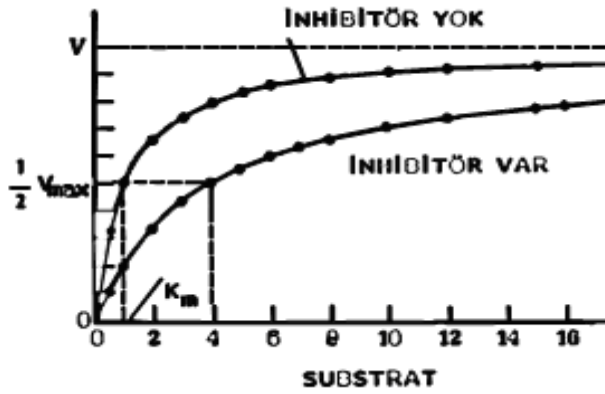
Bu tür inhibisyonda yarışmalı inhibitörün kimyasal yapısı ve şekli substratinkine çok benzer ve enzimin aktif merkezi ile geri dönüşümlü olarak birleşir. Buna örnek olarak süksinat dehidrojenazın katalizlediği reaksiyon verilebilir.

Bu enzim süksinatın yapısal analogları olan malonat, oksalat ve oksalasetat ile yarışmalı olarak inhibe olur. Şekil 2.1’de yarışmalı enzim inhibisyonunun şeması gösterilmektedir.



Şekil 2.1: Yarışmalı (kompetitif) Enzim İnhibisyonunun Reaksiyon Şeması (Göktaş, 2012).

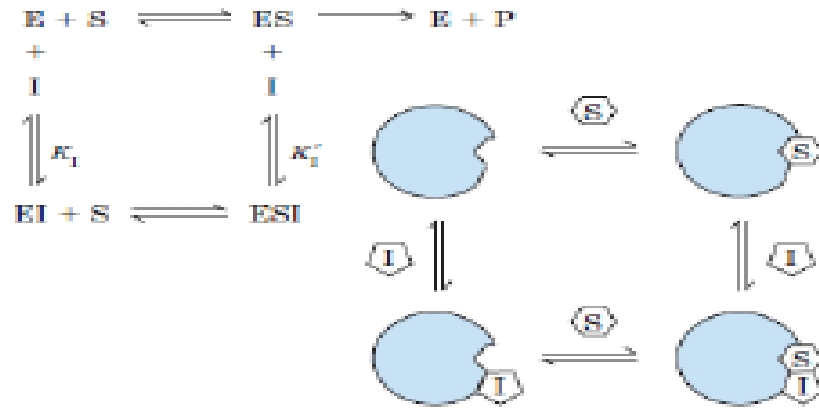
Kompetitif inhibisyonda enzimin inhibitör ile bağlanması reversibl olduğundan ortamda substrat konsantrasyonunun artmasıyla bu ilişki kopabilir. Kompetitif enzim inhibisyonunda inhibitör madde, enzimin substratına olan ilgisini azaltır; K_m değeri büyür, reaksiyon az çok normal bir V_{max} değeri gösterir (Bingöl, 1977). Şekil 2.2’de ise kompetitif enzim inhibisyonu Substrat- V_{max} grafiği gösterilmektedir.



Şekil 2.2: Kompetitif Enzim inhibisyonu Substrat- V_{max} Grafiği (Göktaş, 2012).

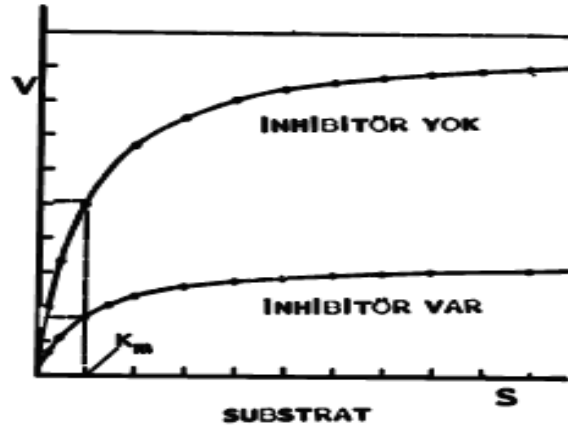
2.3.1.2. Yarışmasız (Nonkompetitif) Enzim İnhibisyonu

Nonkompetitif enzim inhibisyonunda, bir nonkompetitif inhibitör, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden ayrı bir yere reversibl olarak bağlanır. Enzime nonkompetitif inhibitörün bağlanması substrat bağlanmasına engel olmaz, substrat bağlanması da nonkompetitif inhibitörün bağlanmasını bloke etmez. Şekil 2.3’de yarışmasız enzim inhibisyonunun reaksiyon şeması gösterilmektedir.



Şekil 2.3: Yarışmasız (Nonkompetitif) Enzim İnhibisyonu (Göktaş, 2012).

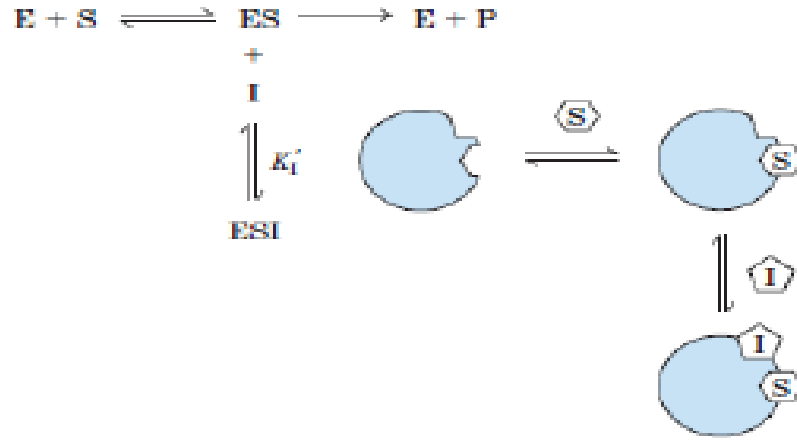
Enzime yarışmasız inhibitör ile substratın bağlanması sonucu oluşan ESI kompleksi ürün vermek üzere ES kompleksinden daha yavaş parçalandığı için tepkimenin hızı yavaşlamaktadır. Bu tür inhibisyon ile tepkimenin V_{\max} değeri azaldığı halde K_m değeri değişmez (Altınışik, 2011). Şekil 2.4.'de nonkompetitif enzim inhibisyonu V_{\max} -Substrat grafiği gösterilmektedir.



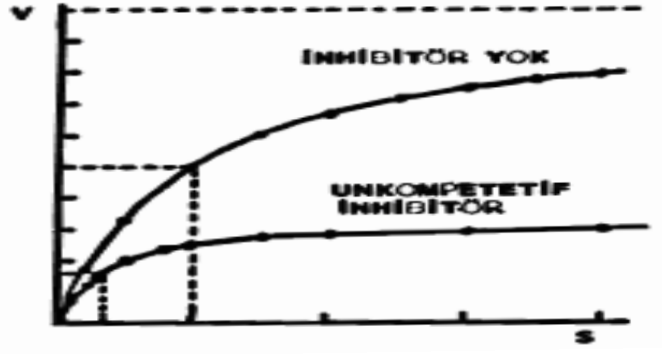
Şekil 2.4: Nonkompetitif Enzim İnhibisyonu Substrat- V_{\max} Grafiği (Göktaş, 2012).

2.3.1.3. Yarışmalı (Ankompetitif) Enzim İnhibisyonu

Ankompetitif inhibitör, nonkompetitif inhibitör gibi, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden ayrı bir yere reversibl olarak bağlanır; fakat nonkompetitif inhibitör serbest enzime veya ES kompleksine bağlanabildiği halde ankompetitif inhibitör, yalnızca ES kompleksi oluşuktan sonra enzimin substratın bağlı olduğu aktif yerden başka bir yerine reversibl bağlanarak enzimi inaktive eder (Altınışik, 2011). Şekil 2.5'de yarışmalı enzim inhibisyonunun reaksiyon şeması gösterilmektedir.



Şekil 2.5: Yarıyarışmalı (Ankometitif) Enzim İnhibisyonu (Göktaş, 2012).
Ankometitif inhibisyonu sonucu V_{max} değeri azalırken K_m değeri de küçülür (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Ankometitif Enzim İnhibisyonu Substrat - V_{max} Grafiği (Göktaş, 2012).

2.3.2. Geri Dönüşümsüz (İrreversibl) Enzim İnhibisyonu

İrreversibl enzim inhibisyonu, bir irreversibl inhibitörün, enzim üzerinde bulunan ve aktivite için esas olan bir fonksiyonel grubu yıkması veya onunla irreversibl olarak birleşmesi sonucu meydana gelir. Bir irreversibl inhibitör ve bir enzim arasında kovalent bağ oluşması yaygındır. Bazı inhibitörler geri dönüşümsüz olarak enzimleri inhibe edebilir. Bu inhibitörlerin etki ettiği gruplar Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Bazı İnhibitörlerin Etki Ettiği Gruplar (Uğurlu, 2012).

İnhibitör	İnhibitör ile kovalent bağ oluşturan gruplar
Siyanür	Fe, Cu, Zn ve diğer metaller
p-Merkuribenzoat	Sülhidril
Diizopropilflorofosfat	Serin hidroksili
İyodoasetamid	Sülhidril, imidazol, karboksil, tiyoeter

İyodoasetamid, aktif yerinde sistein kalıntısı içeren birçok enzim için bir irreversible inhibitördür; Diizopropilflorofosfat, aktif yerinde serin kalıntısı içeren tripsin ve kimotripsin gibi enzimler için bir irreversible inhibitördür (Tablo 2.1).

2.4. HİDROLAZLAR

Bir moleküle su girmesi sonucu molekülün parçalanması olayına ‘hidroliz’ denir. Bir maddenin suyun H^+ ve OH^- iyonlarını ayrı ayrı kendini meydana getiren yapı birimlerine ayrılmasıdır.

Biyolojik açıdan baktığımızda, organizmaya giren besin maddeleri büyük moleküldür. Organizmanın bu maddelerden yararlanabilmesi için bu besin maddelerinin kendilerini oluşturan yapı birimlerine ayrılması, daha küçük moleküller haline gelmesi gerekir. Besin maddeleri sindirim kanalında, özel enzimlerin yardımıyla, hidroliz olurlar ve kendilerini oluşturan yapı birimlerine ayrılırlar.

Karbohidratlar ----- > Monosakkaridler (eter, glikozid bağlarının hidrolizi)

Proteinler ----- > Amino asitler (peptid bağlarının hidrolizi)

Lipidler ----- > Gliserol + Yağ asitleri (ester bağlarının hidroliz)

Bu şekilde meydana gelen yapı birimleri bağırsaktan emilerek kana karışır ve organizma için yararlı olabilir. Hidroliz olmayan besin maddeleri ise dışkı ile atılır. Örneğin selülozu sindirebilen enzim insanda yoktur, organizma selülozdan yararlanamaz (Can ve Akev, 2008).

Hidrolazlar; 1) ester bağlarına, 2) glikozil bileşiklerine, 3) eter bağlarına, 4) peptit bağlarına, 5) diğer C-C bağlarına, 6) asid anhidrid bağlarına, 7) C-C bağlarına, 8) C-halojen bağlarına, 9) P-N bağlarına etki eden hidrolazlar olmak üzere alt sınıflara ayrılırlar.

2.5. HİYALURONİK ASİD

Hiyaluronik asid (HA) parlak ve transparan görüntüsünden dolayı Yunanca cam anlamına gelen “hyalos” kelimesinden türemiştir. HA hiyaluronan veya hiyaluronat olarak isimlendirilir. HA'nın molekül ağırlığı $2 \cdot 10^5 - 10 \cdot 10^7$ Da kadardır (Girish ve Kemparaju, 2005).

HA, ekstraselüler matriksin ana bileşeni olup, ilk kez Karl Meyer ve John Palmer tarafından 1934 yılında sığır gözünün camsı cisminin içinde bulunmuştur (Meyer ve Palmer, 1934). Bu maddenin bir amino şeker ve uronik asidden oluştuğu keşfedilmiş ve günümüzde kolaylık olsun diye bu maddeye HA (hyaloid+uronik asid) veya hiyaluronan adı verilmiştir (Weigel ve diğ., 1997; Tammi ve diğ., 2002).

Önceleri basit bir hücre dışı matris bileşeni olarak düşünülen HA'nın birçok hücre içi döngü yollarını etkilediği ve HA fragmentlerinin de birçok fizyolojik süreçte rol aldığı ortaya çıkmıştır. Bu durum HA'nın ileride çoğu hastalığın bilinmeyen patolojilerinin anlaşılmasında yardımcı olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, hiyaluronik asid molekülüne ilgi her geçen gün daha da artmaktadır (Voelcker ve diğ., 2008).

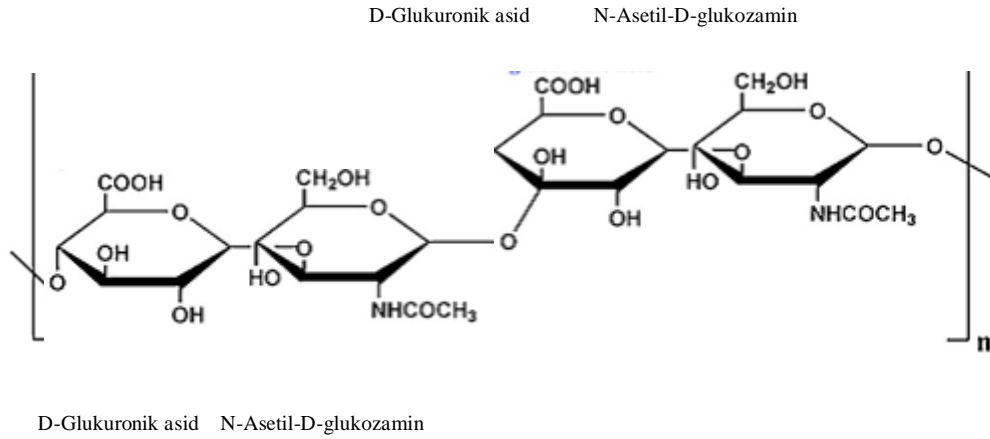
HA tüm yaşayan canlı organizmalarda doğal olarak bulunan bir heteropolisakariddir. HA eklemlerin sinoviyal sıvılarında, gözün vitröz cisimciğinde, kordon kanında, dermiste ve gevşek bağ dokuda bulunur. Sinir doku, bağ doku ve epitelyum dokularında da bulunur. Tükürükte de bulunmaktadır. Ancak tükürükte HA yüksek molekül formlarında bulunur (M.A. ≥ 200.000 kDa) (Pogrel ve diğ., 2003).

Ortalama 70 kg ağırlığında olan bir bireyin vücudunda 15 gram kadar HA bulunur. Epidermiste HA konsantrasyonu $15 \mu\text{g}/\text{gr}$, dermiste $740 \mu\text{g}/\text{gr}$ 'dir. Sağlıklı bir bireyde bu miktarın üçte biri her gün parçalanır ve yeniden sentezlenir (Stern, 2003).

HA çoğalan ve göç eden hücrelerde hücre matris ilişkisinde hayati bir rol oynar, eklemlerde kayganlığı sağlayan, darbelerin etkisini azaltan ve organizmaya bakterilere

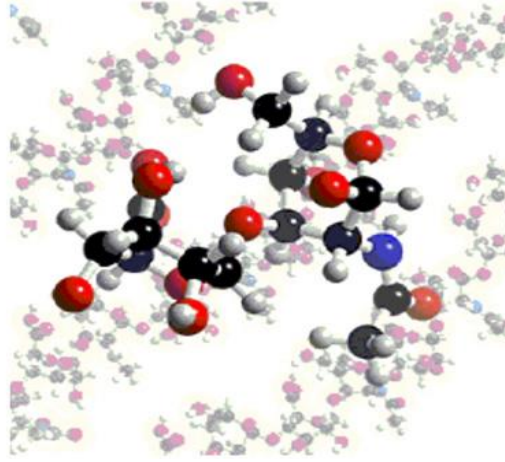
karşı koruyan bir yapıya sahiptir. HA, tüm eklem yapılarının ekstraselüler matriksinde en yüksek oranda bulunan bir glikozaminoglikan (GAG)'dır (Poza ve diğ., 1997).

Bu çok yönlü ve büyüleyici makromolekül, GAG ailesine ait olup non-sülfat, lineer, dalsız, yüksek molekül ağırlığına sahiptir. HA'nın kimyasal yapısı en basit şekliyle GAG'ların oluşturduğu dallanmış yapıdaki disakkaritlerin tekrar etmesiyle meydana gelen, $[(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-glukuronik asid (1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-N-asetilglukozamin}]_n$ yapıyı içerir (Kennedy ve diğ., 2000; Nandi ve diğ., 2000). Şekil 2.7'de HA'nın kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.7: Hiyaluronik Asidin Kimyasal Yapısı (Nermeen ve diğ., 2010).

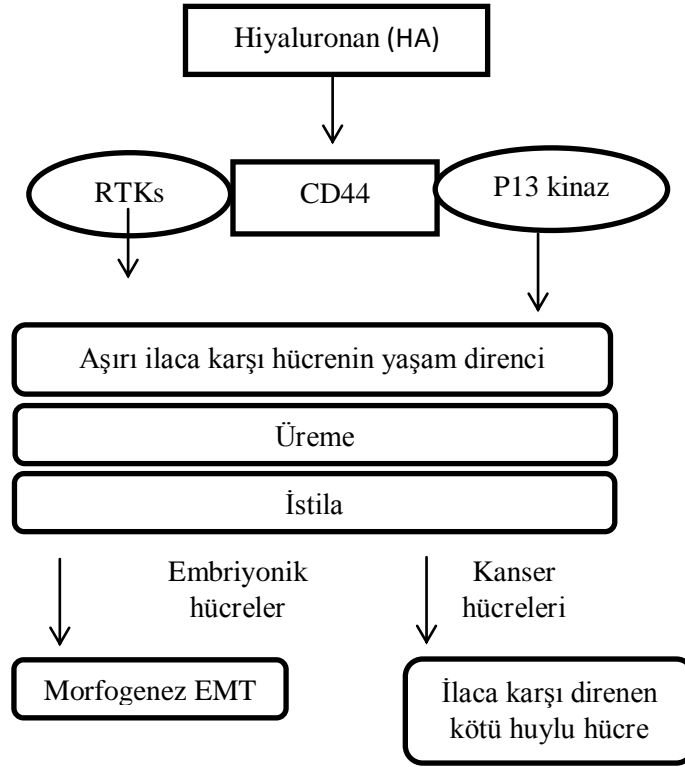
“n” değeri doku kaynağına bağlı olarak 2000-25000 değerlerine ulaşabilmektedir. Molekül ağırlığı 10^6 ila 10^7 Da arasında, uzunlukları ise 2-25 μm arasında değişmektedir. HA yüksek molekül ağırlığına sahip, yüksek derecede anyonik GAG'lardan; kondroitin-, dermatan- ve keratan sülfat, heparin ve heparan sülfat içermektedir (Scott ve diğ., 1991; Scott ve Heatley, 2002). Şekil 2.8.'de HA'nın üç boyutlu yapısı görülmektedir.



Şekil 2.8: Hiyaluronik Asidin Üç Boyutlu Yapısı (Nermeen ve diğ., 2010).

HA sentezi hiyaluronan sentaz (HAS) olarak adlandırılan HAS1, HAS2 ve HAS3 olmak üzere üç farklı hücre zarı enzimleri tarafından katalize edilir. HAS1 ve HAS2 enzimlerinin sentez ettiği hiyaluronan yüksek molekül ağırlığına sahip iken, HAS3 enziminin sentez ettiği HA düşük molekül ağırlığına sahiptir (Itano ve diğ., 1999). HAS ekspresyonu (yapı ve aktivitesi) ise hücre çeşidine bağlı olarak değişmektedir. Sikloheksimid, endoplazik stres, çift iplikli RNA gibi tüm protein sentezi inhibitörleri hiyaluronan üretimini artırır (Hascall ve diğ., 2004). HAS1 proteininin HA sentez etmesinin yanında D-glukuronik asid ve N-asetil-D-glukozamin kalıntılarıyla ilişkili farklı amino asid kalıntılarını da sentez edebilir. HAS1 ve HAS2 2×10^5 ile 2×10^6 Da moleküler ağırlığındaki daha büyük HA sentezini gerçekleştirirken; HAS3 1×10^6 ile 1×10^5 Da'luk daha küçük olanları sentez etmektedir (Pienimaki ve diğ., 2001).

Önceleri HA ekstraselüler matriksin pasif, yapısal bir bileşeni olarak düşünülmele birlikte, günümüzde hücre migrasyonu ve morfogenezisin de içinde bulunduğu bazı biyolojik olaylarda dinamik olarak yer aldığı bilinmektedir (Burd ve diğ., 1991; Wight ve diğ., 1992). HA aktif hücre büyüme bölgelerinde lokalize olan spesifik reseptörlere bağlanabilme özelliğine sahip olup en bilindikleri CD44, RHAMM ve lenfatik damar endotelial hiyaluronan reseptörü-1 (LYVE-1)'dir (Naor ve diğ., 2007; Bono ve diğ., 2004). Şekil 2.9'de CD44 reseptörünün etki mekanizmasının şeması görülmektedir.



Şekil 2.9: CD44 Reseptörüne Ait Etki Mekanizması (Nermeen ve diğ., 2010).

Şekilde 2.9’da gösterildiği üzere hiyalüronik asidin onkojenik işaretleme üzerindeki etkileri söz konusudur. Endojen HA - CD44 etkileşimi, CD44 reseptörünü, aktifleşmiş tirozin kinazlar (RTKs) reseptörünü, fosfatidilinozitol-3-kinazı (PI3 kinaz) hedef alan lenfosit ve hücre yaşamı, çoğalma ve yayılabilirlik ile ilgili birçok diğer işaretleme molekülleri içeren kurucu işaretleme komplekslerinin oluşumu için gereklidir (Toole, 2001).

Bu reseptörler içerisinde en çok CD44 önem arz etmektedir. HA’nın hücre proliferasyonuna katkısını hücre adezyon etkileşimlerine katılan CD44’e bağlanmasıyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Böylece HA anjiogenez, agregasyon, poliferasyon ve hücre göçünü stimüle eder (Deudon ve diğ., 1992; Evanko ve diğ., 1999).

RHAMM (Receptor for HA-Mediated Mobility) reseptörü büyüme faktörüne karşı hücrel yanıtı regüle eder ve özellikle hasarlı damar duvarında fibroblast ve düz kas hücrelerinin migrasyonunda görev alır (Chajara ve diğ., 2000; Toole, 2001).

LYVE-1 reseptörlerinin yapısı CD44 reseptörlerine % 57 benzemekte olup, N-terminal kısımlarında bir HA bağlama noktası bulunur. Bu benzerlik nedeniyle de bu iki reseptörün görevlerinin benzer olduğu düşünülmektedir (Banerji ve diğ., 1999).

HA'yı diğer GAG'lardan ayıran özelliklerinden biri, GAG'lar golgi cisimciğinde sentezlenirken, HA plazma membranında sentezlenmesidir. Ayrıca HA, nonsülfat yapıda olması ve proteinlere kovalent olarak bağlanma özelliği ile de farklılık göstermektedir (Kennedy ve diğ., 2000).

Tüm dokuların ekstraselüler matriksinde bulunan HA tüm türlerde aynı, basit kimyasal yapıya sahiptir. Böylece saflaştırılmış HA preparatının eksojen olarak uygulanması bu endojen materyalin lokal konsantrasyonunun yalnızca geçici olarak yükselmesine neden olmaktadır (Schlag ve Redl, 1994).

Yapılan çalışmalarda tüm HA'nın yaklaşık olarak yarısının deride, $\frac{1}{4}$ 'lik kısmının da iskelet ve eklemlerde olduğu, geri kalanının ise kaslar ve iç organlara eşit miktarda dağılmış olarak bulunduğu gösterilmiştir. En yüksek HA konsantrasyonu göbek bağı, sinoviyal sıvı, deri ve vitreus cisimciği gibi bağ dokularında bulunmaktadır. Akciğer, böbrek, beyin ve kaslarda da kayda değer miktarda bulunurken karaciğerde az oranda bulunmaktadır; en düşük konsantrasyonu ise kan serumundadır (Fraser ve diğ., 1997). Serum HA seviyesinde patolojik artışlar olabilmektedir (Laurent, 1987). Siroz, romatoid artrit, skleroderma gibi enflamatuvar durumlarda, çeşitli kanser türlerinde HA sentezinin arttığı bilinmektedir (Watanabe ve diğ., 1997 ; Simpson ve diğ., 2001).

HA'nın klinik açıdan önemi ele alındığında, hücre dışı bileşeni olarak proteoglikanları stabilize ettiği gibi dokuların gelişmesi ve onarımına da yardımcı olur (Paulsson ve Heinegard, 1984; Toole ve diğ., 2008). Son çalışmalar HA'nın inflamasyonda da önemli rol oynadığını ortaya koymuştur. HA'nın bu inflamasyon aktivitesinin dokudan dokuya değişebilen, binler ile milyonlar arasındaki kDa'lara varan moleküler ağırlığıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (McKee ve diğ., 1996; Hill ve diğ., 2000; Maier, 2002).

Bunun aksine yüksek molekül ağırlığına sahip HA ürünlerinin ise antiinflamatuvar özelliği olduğu ve doku onarımını sağladığı da gösterilmiştir (Moreland, 2003; Noble ve Jiang, 2006). Endotel hücreleri ve kas hücreleri de HA sentez eder. Sentez edilen

HA'nın bu hücrelerin poliferasyonunu ve göçünü etkilediği düşünülmektedir. Ayrıca sentez edilen HA fragmentlerin, hücre içi döngüleri etkilerken aynı zamanda *in vivo* ortamda damarlaşmanın oluşmasını da tetiklediği varsayılmaktadır (Rooney ve diğ., 1995). HA'nın ateroskleroz da önemli olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Reissen ve diğ., 1996). Fakat hala HA'nın gerek vasküler hücreler gerekse diğer hücreleri etkileme mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır.

HA'nın yüksek viskoelastik özelliği bulunur. Bu özelliklerinden dolayı HA eklem ve göz hastalıklarında tedavi amaçlı kullanılır (King ve diğ., 1991). Örneğin; katarakt oluşumu göz lensinin saydamlığını kaybetmesi sonucu ortaya çıkan bir rahatsızlıktır ve körlüğe sebebiyet verebilir. Bu göz rahatsızlığı için belirli bir ilaç tedavisi olmadığından cerrahi tedavi uygulanır. Cerrahi müdahale esnasında oluşan yara büyük ise kendisini onarım kabiliyeti zayıf olan endotel hücreler yaranın onarımına yetişemeyecek ve yara içerisine su sızmasına neden olacaktır, bu da kornea ödemeine sebebiyet verebilir. HA gibi viskoelastik materyaller kullanılarak katarakt cerrahisinde bu problemin aşıldığına dair makaleler mevcuttur (Graue ve diğ., 1980; Balazs ve diğ., 1991; Adina, 2008; Balanzs, 2008).

Bu molekül çok hasarlı yaraların iyileştirilmesinde de kullanılmaktadır (Olczyk ve diğ., 2008). Son yıllarda yapılan çalışmalar, serum HA seviyelerinin alkolsüz karaciğer yağlanmasından meydana gelen fibrozis için % 86-100 duyarlılık ve % 88 özgüllük ile en iyi belirteçlerden birisi olabileceğini göstermektedir (Lydatakis ve diğ., 2006; Bolarin ve Azinge, 2007; Khan ve diğ., 2007; Schiavon ve diğ., 2008).

Eklem rahatsızlıklarında da HA molekülünün önemli bir yeri bulunur (Kato ve diğ., 2005; Chen ve diğ., 2008). Osteoartritin en başarılı uygulamalarından birisi HA'dır ve eklemlerde kıkırdağın dejenere olmasını önlenmesinin yanında kıkırdağı korumak için hücre dışı matriksten proteoglikanları salgıladığı gösterilmiştir (D'Souza ve Datta, 1986; Balanzs ve Denlinger, 1989; Fukuda ve diğ., 1996).

HA'nın sistematik skleroz ve kanser gibi birçok hastalıkta da önemli bir klinik belirteç (biyomarker) olabileceği düşünülmektedir (Freitas ve diğ., 1996; Yoshizaki ve diğ., 2008; Herman ve diğ., 2008). Özellikle kanserde HA'nın rolü çok karışıktır. Bu konuda birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen mekanizma tam açığa kavuşmuş değildir.

İnsanlarda bazı hücrelerde HA üretiminin arttırılması sonucu tümör hücrelerinin büyüdüğü gözlemlenmiştir (Kosaki ve diğ., 1999). Bir başka çalışmada ise HA reseptörü olan CD44'ü bloke eden antikorlar verildiğinde HA'nın CD44'e bağlanmasını önlediği ve sonuçta tümör gelişiminin azaldığı görülmüştür (Guo ve diğ., 1994). Bütün bu yapılan çalışmalar HA'nın tümör oluşmasında önemli role sahip olacağını gösterse bile düşük molekül ağırlıklı HA'nın anjiyogenezi (damarlaşma) arttırması sonucu yüksek molekül ağırlıklı HA'nın tam tersi şekilde anjiyogenezi inhibe etmesi ve ayrıca yüksek seviyede HA üretiminin tümör gelişimini stimüle ederken aşırı derecede fazla üretimi ise inhibe etmesi bu molekülün bu evrede çok karışık roller aldığına göstergesidir (Montesano ve diğ., 1996; Rahmanian ve diğ., 1997; Itano ve diğ., 2004).

Serum HA seviyesi ise yaşa bağlı olarak değişiklik gösterdiği saptanmış olup, orta yaşlı insanlar için 10-100 µg/L'dir (Engström-Laurent ve diğ., 1985). Özellikle yeni doğanlarda HA düzeyi 700 µg/L iken; daha sonraki yıllarda serumda ölçülen değeri hızlı bir şekilde düşmeye başlar (Lindqvist ve Laurent, 1992). Plazma HA seviyesinin ise serumdakinden % 5 daha fazla olduğu belirlenmiştir (Engström-Laurent ve diğ., 1985).

2.6. HİYALURONİDAZLAR

Hiyaluronidazlar (HAaz' lar) glukuronidazlar sınıfından olup özellikle HA'yı ve sınırlı olarak kondroitin ve kondroitin sülfatı parçalayabilme özelliğine sahip enzimlerdir. Tablo 2.2'de indirgeyici enzim örnekleri görülmektedir.

Tablo 2.2: Bazı Parçalayıcı Enzimler.

Enzim	E.C. No	Organizma	Reaksiyon	Kaynak
Kollajenaz	EC 3.4.24.3	<i>Clostridium perfringens</i>	Kollajeni parçalar.	Birkedal-Hansen, 1987
Hiyaluronidaz	EC 4.2.2.1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Bağ dokuyu parçalar.	Stern and Jedrzejas 2006
Streptokinaz	EC 3.4.99.0	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Dolaylı olarak plazmini aktif hale getirir, fibrin pıhtılarını parçalar.	McArthur ve diğ., 2008
Fosfolipaz	EC 3.1.4.3	<i>Clostridium perfringens</i>	Fosfolipitten baş grubunu ayırır.	Takahaski ve diğ., 1974

HAaz'ların yanı sıra endoglikozidazlar da β -N-asetil-D-glukozamin bağlarına sahip HA polimerini parçalayabilirler. Son yüzyılın yarısından beri bilinen HAaz'lar biyoteknolojik prosesler ve özellikle ilaç endüstrisinde önemli rol üstlenmektedirler (Nermeen ve diğ., 2010).

HAaz'ların ilk sınıflandırması 1971 yılında Meyer tarafından yapılmıştır. Bu sınıflandırma HAaz'ların substrat spesifitesi ve biyokimyasal analizleri ayrıca bu reaksiyonların ürünleri baz alınarak yapılmış olup üç ana sınıfa ayrılmıştır (Meyer, 1971).

Bu sınıflandırmaya göre;

HAaz'ların ilk grubu *4-glikanohidrolaz hiyaluronat* (EC 3.2.1.35) parçalayıcı, HA'yı β -1,4-glikozid bağlarından parçalar ve ana ürün olarak tetrasakkarid meydana getirir. HA substratı dışında kondroitin, kondroitin-4- ve kondroitin-6-sülfat substratlarına az miktarda da dermatan sülfata polimerizedir. Bu sınıftaki enzimlerin karakteristik özelliği ise, hem hidrolitik hem de transglikozidaz aktiviteyi ortaya çıkarmalarıdır (Takagaki ve diğ., 1994; Cramer ve diğ., 1994). En iyi bilinen enzimleri ise lizozomal, testis ve arı zehiri HAaz'lardır (Suzuki ve diğ., 2002).

İkinci tip enzimler ise, sülüklerin ve kancalıkurtların tükürük bezlerinden elde edilen enzimleri temsil eden HAaz'lardır. Bunlar *3-glikanohidrolazlar* (EC 3.2.1.36) olup HA'nın β -1,3-glikozid bağlarını parçalarlar ve oluşan şeker parçalarını glukuronik aside dönüştürürler. Bu enzimler son ürün olarak tetra- ve hekzasakkarid oluştururlar (Abramson, 1973; Kreil, 1995).

Son grup *mikrobiyal HAaz'lar* ya da *hiyaluronat (bakteriyel) liyazlardır* (E.C. 4.2.99.1). Bunlar HA'yı β -eliminasyon reaksiyonu ile parçalayıp doymamış 2-asetamino-2-deoksi-3-O-(β -D-gluko-4-ene-piranosiluronik asid)-D-glukoz'a ana ürüne dönüştürürler (Pritchard ve diğ., 2000). Hyaluronat liyazlar substrat özelliği farklı olan, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus* ya da *Streptomyces* gibi çeşitli mikroorganizmalardan izole edilmiştir (Hynes ve Walton, 2000).

HAaz' lar moleküler genetik baz alınarak sınıflandırıldığında, iki ana sınıfa ayrılırlar;

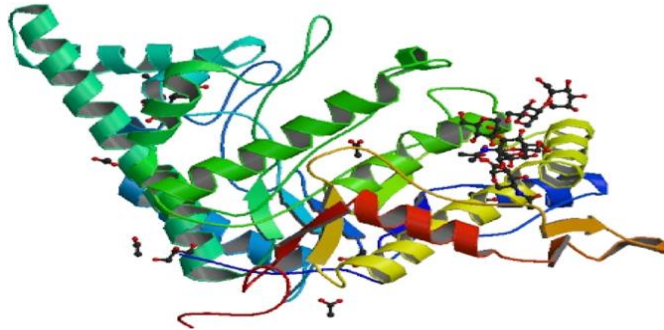
- a) Ökaryotik Hiyaluronidazlar.
- b) Prokaryotik Hiyaluronidazlar.

2.6.1. ÖKARYOTİK HİYALURONİDAZLAR

2.6.1.1. Memeli HAaz'ları

Son yıllarda edinilen bilgilere göre oluşturulmuş “insan genom projesi” kapsamında, insan genomunda altı tane HAaz tespit edilmiş olup bunların amino asid dizisinin % 33-42 arasında değişen benzerlikte bulunduğu belirlenmiştir. Bu genlerin üçü Hyal-1, Hyal-2 ve Hyal-3 (HYAL1, HYAL2 ve HYAL3) olarak isimlendirilmiş olup, kodları insan kromozomunda 3p21.3’de sıkıca kümelenmiş halde bulunmaktadır. HYAL4, HYALP1 (sözde gen) ve PH20 (SPAM1) genlerinden olan, Hyal-4 ve PH-20 7q31.3 genleri üzerinde kodlanmış halde bulunur. Bu enzimler arasında, Hyal-2, Hyal-4ve PH-20 glikozilfosfatidilinositol (GPI) bağlayıcı ile plazma membranında bulunmaktadır (Csoka ve diğ., 2001; Stern, 2003). HYALP1 protein transferi yapmadığından sözde gen olarak adlandırılmaktadır (Stern ve Jedrzejas, 2006).

Hyal-1 insan plazmasından ilk izole edilen enzimdir ve memeli idrarında da bulunan bir HAaz’dır. Ayrıca karaciğer, böbrek, dalak ve kalpte de yüksek miktarda bulunmaktadır. Asidik pH’larda aktif olup lizozomlarda yer alır (Frost ve diğ., 1997). Bununla beraber Hyal-2 proteini birçok dokuda bulunmasına karşın yetişkin beyinde bulunmaz (Lepperdinger ve diğ., 1998). Her iki protein de lizozomlarda lokalize olmasının yanı sıra Hyal-2 plazma membranında GPI bağlarıyla bir demire bağlı bulunabilmektedir. Şekil 2.11’de Hyal-1 enziminin sarmal yapısı görülmektedir.



Şekil 2.10: Hyal-1 Enzimine Ait Sarmal Yapı (Nermeen ve diğ., 2010).

Hyal-1 ve Hyal-2 sırasıyla intraselüler ve ekstraselüler matriksteki HA'nın katabilizmasından sorumludurlar (Csoka ve diğ., 1999; Stern ve Jedrzejcas, 2006). Bu enzimleri saflaştırmak son derece zordur. Yakın zamanda yapılan HAaz tespit prosedürü sonucu insan plazmasından kolaylaştırılmış saflaştırma yöntemiyle (yüzeysel gel testi) homojen olarak elde edilen Hyal-1 molekülünün ağırlığı 57 kDa'dır. Tablo 2.3'de çeşitli hiyaluronidaz enzimlerinin bazı özellikleri görülmektedir (Guntenhoner ve diğ., 1992).

Tablo 2.3:Çeşitli Hiyaluronidaz Enzimlerinin Bazı Özellikleri (Nermeen ve diğ., 2010).

Organizma	MW (kDa)	Uygun pH	Uygun Sıcaklık	Kaynak
Hiyaluronoglikozaminidaz (EC. 3.2.1.35)				
<i>Naja Naja</i>	54,70.41	5	37 °C	Girish and Kemparaju, 2005a
<i>Nephrops norvegicus</i>	320	7	37 °C	Li ve diğ., 2002
<i>Streptococcus agalactiae</i>	116	6.3	-	Ozegowski ve diğ., 1994
Hiyaluronoglikuronidaz (EC. 3.2.1.36)				
<i>Bos taurus</i>	-	6.7	37 °C	Asteriou ve diğ., 2001
Hiyaluronat Liyaz (EC. 4.2.2.1)				
<i>Streptococcus agalactiae</i>	92,111	5, 6.8, 5	37, 25 °C	Salmen ve diğ., 2005

Hyal-1'in en büyük ürünü tetrasakkaridlerden oluşmuş küçük oligosakkaridlerken, Hyal-2 yüksek molekül ağırlıklı HA'ları yaklaşık 20 kDa (yaklaşık 50 disakkarit ünitesi) büyüklüğündeki parçalara ayrıştırır (Lepperdinger ve diğ., 2001).

Hyal-3 hakkında çok az şey açığa kavuşmuş olup, HAaz makalelerinde kullanılabilir bir aktivitesi tanımlanamamıştır (Nagata ve diğ., 2004). Memeli testisinde ve kemik iliğinde yüksek miktarlarda bulunduğu bilinen, ancak denemeler için yeterli miktarda izolasyonu gerçekleştirilememiş olan bir enzimdir. (Csoka ve diğ., 2001). Hyal-3'ün katalitik özellikleri genel olarak bilinmemektedir (Stern ve Jedrzejcas, 2006).

Hyal-4, PH-20 ve Hyal-2 gibi muhtemelen GPI'ya bağlı olduğu düşünülen bir proteindir (Lin ve diğ., 1994). Bunun HA'ya karşı aktivite göstermeyen ilk memeli kondroitinazı olduğu öne sürülmüştür (Csoka ve diğ., 2001). Bu substrat spesifikliği Hyal-1 ve PH-20 enzimlerine göre belirgin bir zıtlık olup, Hyal-1 ve PH-20'nin her ikisinde hem HA'yı hem de kondroitin sülfatı düşük oranda parçalayabilirler. Bununla beraber deneysel kanıtlar hala eksik olup, sadece Hyal-4'ün özel fonksiyonu olarak diğer HAaz' ların içinde aktif bölgesine yakın ve kesinlikle korunan pozisyondaki C kalıntısı (C163)' nin varlığı bilinmektedir (Rigden ve Jedrzej, 2003).

PH-20 proteini [(sperm adhesion molecule 1; sperme bağlı molekül 1, SPAM 1)] hem çözünebilir izoformda hem de membrana bağlı halde çok fonksiyonlu olarak bulunmuştur (Cherr ve diğ., 2001). GPI-bağlanmış protein memeli spermi ve membrana bağlanmış halde iç akrozom lizozomları yüzeyinde yer alır. PH-20'nin en önemli rolü HA'ca zengin oosit'e (yumurta) spermin penetrasyonunu (nüfuz etme) kolaylaştırmaktadır. Kadın genital sistemi, göğüs, plasenta ve fetal (cenin) dokularında bulunmaktadır. Bütün bilinen memeli HAaz' ları asidik pH' da aktivite gösterirken PH-20 nötr pH'da aktivite göstermektedir. HYAL-P1 (sözde gen)' in ise tam olarak transkripsiyonu tanımlanamamıştır Tablo 2.4'de memeli hiyaluronidazlara ait bazı özellikler görülmektedir (Cherr ve diğ., 2001).

Tablo 2.4: Memeli Hiyaluronidazlarının Bazı Özellikleri (Nermeen ve diğ., 2010).

HAaz	Son ürün (sakkaridler)	Uygun pH
Hyal1	4-6	3-4
Hyal2	~100	4, 7.5
Hyal3	-	-
Hyal4	-	-
SPAM1 (PH-20)	4-6	4, 7.5
Phyal1	-	-

2.6.1.2. Sığır Testis HAaz' ı (BTH)

Sığır ve koyun testislerinde bulunan sığır testis HAaz' ı (BTH) çok uzun zamandır bilinmekle birlikte ortopedi, cerrahi, oftalmoloji, cildiye ya da dahiliye gibi çeşitli medikal alanlarda kullanımı yaygınlaşmıştır (Menzel ve Farr, 1998). Bulgulara göre membrana bağlı PH-20 enziminin parçası olan, boğa testisinden elde edilen HAaz en

yüksek çözünürlüğe sahip olan enzimdir (Meyer ve diğ., 1997). BTH endoglikanohyaluronidazdır (EC.3.2.1.35) ve HA'daki β -1,4-glikozik bağları parçalar. Ayrıca kondroitin, kondroitin-4- ve -6-sülfat ve az derecede de dermatan sülfatı parçalayabilme özelliğine sahiptir. İyon püskürtme kütle spektrometrisi kullanılarak, sırasıyla en büyük ve en küçük parçalanma ürünlerinin tetrasakkarid ve disakkarit olduğu saptanmıştır.

BTH'nin transglikozilaz aktivitesi pH değerine ve inkübasyon tamponunun tuz oranına bağlıdır. Saitoh ve arkadaşları, transglikozilasyon reaksiyonu için optimum pH değerinin pH 7'de olduğunu gösterirken, hidroliz de ise optimum pH değerinin 5'in altında olduğunu kanıtlamışlardır. BTH'nin transglikozilaz aktivitesinin yanı sıra hidrolaz aktivitesi de vardır (Saitoh ve diğ., 1995).

NaCl'ün varlığı transglikozilaz aktivitesinde olumsuz etki göstermektedir. 0.5 M NaCl üstündeki konsantrasyonla inhibisyonu neredeyse tamamlanmıştır (Saitoh ve diğ.,1995). HAaz aktivitesi değişik optimum pH'ları çeşitli literatürlerde raporlandırılmış olup, BTH'nin hazırlanması, substrat kaynağı, uygulamalı hiyaluronidaz denemesi ve inkübasyon şartlarına bağlıdır (Oettl ve diğ.,2003).

2.6.1.3. Arı Zehiri HAaz'ı (BVH)

Arı zehiri HAaz'ı (BVH), önemli allerjenlerden biri olup özellikle deride bulunan ekstraselüler matriksteki HA'yı parçalayıp zehirli bileşenlerinin vücuda nüfuzunu kolaylaştırmaktadır. BVH hiyaluronat 4-glikohidrolaz olup (EC. 3.2.1.35), memeli HAaz'ı ile diziliminde % 30 benzerlik göstermektedir. Hem memeli hem de BTH dizilimindeki ana benzerlik glikozil hidrolaz sınıfının 56. familyasına atanmasıyla gerçekleşmiştir (Henrissat ve Bairoch, 1996). Hem insan hem de BTH enzimleri, BVH ile karşılaştırıldığında hepsinin C-terminalinde 120-150 amino asidi bulunmaktadır. BTH gibi BVH'da HA ve kondroitin sülfatı parçalar. İlk başta rapor edilen maksimum aktif pH değeri 4.5 (Allalouf ve diğ., 1975) olan BVH'ın en yüksek aktivitesinin nötr pH'da olduğu görülmüştür.

BVH enziminin kristal yapısındaki kıvrımların tanımlanması çalışmalarında yapının büyük bir kısmının önemli ölçüde insan HAaz'ı ve insan PH-20 ile % 65 benzerlik gösterirken, sığır PH-20 enzimiyle 3 boyutlu yapısının amino asid dizilimi beklenenden

çok daha yüksek benzerlik göstermektedir. İnsan HAaz'larının bağlayıcı bölgesi tipik fiçı şeklindeki katalitik alanı C-terminal alana bağlayan ve substratın bağlanması için katalitik etkinin sağlanması için bir oyuk oluşturması yönünden diğerlerine benzemektedir. Tüm HAaz'larda bağlanma oyukta elektropozitif ve hidrofobik kalıntılarla gerçekleşirken, BVH enzimine substrat molekülleri elektronegatif ve hidrofobik yamalarla bağlanmayı tercih eder (Jedrzejewski ve Stern, 2005).

Hyal-1'in kristal yapısında birbirine yakın ilişkili etki alanı olan, N-terminal katalitik bölge ve daha küçük C-terminal bölge bulunur (Chao ve diğ., 2007).

Bu enzimler C1'de çift yer değiştirme özellikleriyle β (1→4) glikozid bağlarını parçanabilir hale gelirler. HA'nın karbonil grubu olan N-asetil-D-glikozamin ise tek nükleofil türüdür. Böylece substrat kendi kendini katalizleme reaksiyon mekanizmasına katılır. İlk olarak, glikozid bağını parçalayarak HA'nın bir parçası olan glutamik asid kalıntısını (Hyal-1 de Glu 131) bırakarak C4 oksijenine protonu transfer eder. Daha sonra ayrılan HA parçasının yerine bir su molekülü yerleşir. Hyal-1 de aktif bölge kalıntılarının eğilimi Glu131 ve Tyr202 su molekülünü polarize ederek C1 üzerinde nükleofilik girişimi öngörür böylece hidroliz tamamlanmış olur (Chao ve diğ., 2007).

İnsan HAaz'larının diziliminin henüz % 33-42'si açıklanmıştır. Aktif bölge kalıntılarında daha yüksek koruma belirlenmiş olup, enzimlerin pH'larında ve katalitik verimliliklerinde farklılıklar olduğu görülmüştür. Örnek olarak, sığır PH-20'nin (belirlenen dizilimlerinden % 61'i insaninkine eş değerdir) Hyal-2'ye göre asidik şartlarda 400 kat daha aktif olduğu kanıtlanmıştır (Vigrovich ve diğ., 2005).

2.6.1.4. Diğer Zehir HAaz'ları

Yılan zehirinde HA'yı, kondroitin-4- ve -6-sülfatı parçalayarak çeşitli oligosakkarid ve başlıca tetrasakkaridlere dönüştüren HAaz enzimini içerir. Akrep zehirinde yüksek miktarda HAaz enzimi bulunmaktadır (Tan ve Ponnudurai, 1992). Bu enzim aynı zamanda zehirli kahverengi keşiş örümceğinin zehirinde ve tarantula zehirinde de çok miktarda bulunmaktadır. Yabanarısından elde edilen zehirdeki HAaz enziminin yüksek aktiviteye sahip olduğu görülürken karınca zehirinde bulunan HAaz'ın düşük aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Girish ve diğ., 2002).

Kertenkeledeki HAaz HA' yı parçalayıcı aktivite gösterirken, kondroitin-6-sülfat ve dermatan sülfata karşı hiç aktivite göstermemesine karşı kondroitin-4-sülfata karşı çok düşükte olsa etki eder (Tu ve Hendon, 1983). Taşbalığından elde edilen HAaz ise dermatan sülfat ve kondroitin sülfata karşı hiç etki etmezken, HA'yı tetra-, hekza-, okta- ve dekasakkaritlere indirger (Poh ve diğ., 1992).

2.6.2. PROKARYOTİK HİYALURONİDAZLAR (HA Liyazlar)

Streptococcus, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Streptomyces* ve *Clostridium* türündeki gram pozitif bakteriler de HA liyaz üretir ve hayvanlarda enfeksiyonlara neden olur (Gunther ve diğ., 1996). HA liyaz aynı zamanda gram negatif bakteriler tarafından da üretilir ancak patojenezis üzerindeki rolü daha azdır. Genellikle, gram negatif ve gram pozitif kaynaklı HA liyazlar faj kaynaklı HAaz'larla karşılaştırıldığında daha yüksek molekül ağırlığına sahiptir. Bu güne kadar iyi karakterize edilmiş HAaz'lar için bildirilmiş molekül ağırlığı 50 ila 160 arasında değişkenlik göstermiştir (Li ve diğ., 2000). Üstelik çeşitli çalışmaların gösterdiğine göre HAaz'ların ve kondroitinazların mantar patojenesinde özellikle *Candida* ve *Pracoccidiodes* türlerinde önemli rol oynadığı görülmüştür (Assis ve diğ., 2003). Bununla beraber, mantar türlerine ait HAaz'ların hiçbiri henüz karakterize edilmemiştir.

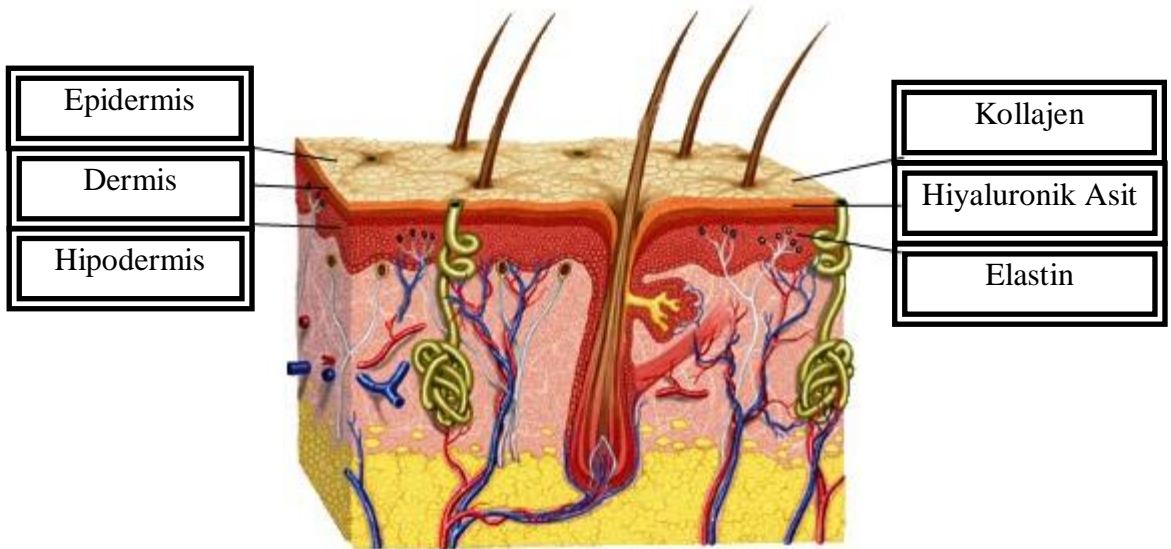
Bakteriyel hiyaluronidazlar arasında *Streptococcus pneumoniae* ve *Streptococcus agalactiae*'dan elde edilen HAaz' lar en iyi karakterize olanlardır. Her iki enzim de 2-asetamido-2-deoksi-3-O- (β -D-gluko-4-enepyranosyluronic asid)-D-glukozamin'in tuz içermeyen formu arasında ki β -1,4-glikosidik bağımlı parçalarlar (Prichard ve diğ., 2000).

2.7. HİYALURONİDAZ VE HİYALURONİK ASİDİN BİYOLOJİK FONKSİYONLARI

HAaz yıllardan beri tedavi amaçlı kullanılmakta olup, yapılan çalışmalar sonucunda çeşitli etkileri saptanmıştır. HAaz, HA mukopolisakkaritini ve bağ dokusunu depolimerize eder. Böylece HAaz ile dokuların geçirgenliği artarak, viskozite azalır ve enjekte edilen sıvılar için daha kolay geçirgenliğin sağlandığı dokular meydana gelir (yayılma etkisi).

Mezoterapi, intradermal olarak uygulanan minimal dozların sorunlu bölgeye enjekte edilmesi mantığına dayanan basit bir yöntemdir. Mezoterapinin kelime anlamı derinin orta tabakasının tevdisi anlamına gelmekte olup, HA ve HAaz bu amaçla kullanılır. Selülit tedavisinde depolimerize edici olarak HAaz kullanılır. Böylece sorunlu bölgelerdeki HA'nın parçalanması sağlanarak yeniden yapılanma meydana gelir.

HA deri dokusunda jel şeklinde olup kan dolaşımı sırasında yaşamsal maddelerin hücrelere transportunu sağlar, deriyi nemlendirir, mekanik ve kimyasal hasara karşı yastık görevi ile dokuları korur. Şekil 2.12'de hiyaluronik asidin derideki yeri gösterilmiştir.



Şekil 2.11: Hiyaluronik Asidin Derideki Yeri.

Çevresel faktörler ve yaşlanma sonucunda zamanla dokudaki HA parçalanır ve hasara uğrar. Son yıllarda HA'nın sentetik formları kozmetik dermatolojide kırışıklık tedavisinde kullanılmaktadır. HA yaşlı ve hasarlı deride kırışıklıklar boyunca nokta veya tünelizasyon tekniği kullanılarak uygulanır. Direkt dolgu maddesi olarak da kullanılmaktadır (Kutlubay ve diğ., 2010).

Mesane tümörü erkeklerde 4. sırada kadınlarda ise 8. sırada görülen tümördür. HA ve HAaz'ın mesane tümör belirleyicisi olarak kullanılması çalışmaları sürmektedir, ancak

henüz kullanımına başlanamamıştır. HA fizyolojik özellikleri yanı sıra, hücre yüzey reseptörlerine (CD44, hyaluronevün vs.) bağlanarak hücre adezyon, migrasyon ve poliferasyonunda rol alır. HA hidrate edilince genişler ve tümör hücresinin migrasyonu için boşluklar oluşmasını sağlar. HA ile zenginleşmiş tümör matrisi içindeki tümör hücresi hücre yüzey reseptörlerini kullanarak göç eder. Ayrıca tümör hücrelerini çevreleyerek immun sistemden izole eder ve kemorezistan hale gelmelerini sağlar (Kunudson, 1996). HA seviyesinin mesane tümörlü hastaların idrarında tümör derecesine bağlı olmaksızın 3-6 kat arttığı gösterilmiştir. Tümör dokusunda artan HA seviyesinin tümör metastaz eğilimini arttığı bilinmektedir (Lokeshwar ve diğ., 2000).

HA'nın HAaz tarafından parçalanması sonucu anjiogenik özelliğe sahip küçük fragmanları ortaya çıkarmaktadır. Mesane tümörlü hastaların idrarlarında hem HA hemde HA fragmanlarının varlığı HA ve HAaz'ın birlikte değerlendirilmesinin mesane tümör tanısında daha etkili olacağı yönünde ipuçları vermiştir. HAaz tümör dokusu tarafından salgılanır. Mesane tümörünün belirlenmesi için HA testi ve HAaz testi ayrı ayrı yapılabildiği gibi kombine teste de tabi tutulabilmektedir. Bu test sonuçlarına göre çeşitlilik gösteren mesane tümörlerinin var olup olmadığı belirlenir.

Hyal-1 ve Hyal-2 bazı durumlarda örneğin tütüne bağlı akciğer kanseri ya da üst solunum yolu kanseri tümör bağlayıcı genler olarak işlev görmektedirler (Frost ve diğ., 1996; Frost ve diğ., 1997; Duterme ve diğ., 2009). Hyal-1 enziminin yüksek düzeyde birçok hastalıkta özellikle prostat ve mesane kanserinde etkisinin olduğu dökümanite edilmiştir. Bu enzim anjiogenik HA parçalarının oluşumundan kendisi sorumludur. İdrarda bulunması nedeniyle ve mesane ile prostat kanserindeki seviyesinin değişimi nedeniyle Hyal-1 bu tür hastalıklarda belirleyici olarak kullanılmaktadır (Posey ve diğ., 2003; Lokeshwar ve diğ., 2005).

Arı zehiri yapısındaki birçok farmakolojik etkili unsurları ile doğal ilaç olarak görülmektedir. Yapısı 18 den fazla farmakolojik aktiviteye sahip bileşenden oluşmakta olup, bunlardan en önemlilerinden biri de HAaz'dır. Bu enzimin arı zehirinden izole edilmesi ve saflaştırılması oldukça zordur. Kuru arı zehirinin % 1-3'ünü oluşturmaktadır. Dokuların geçirgenliğini artırmak, hücrelere bağlanmış bağları çözme, HA polimerlerinin dokulara saldırılarını kontrol etmek gibi biyokimyasal etkilerinin yanında bağışıklık sistemini uyarıcı antijenik etki, anafilaksiyi engelleyici etkileri de

bilinmektedir. HAaz kaynaklı etki sayesinde, arı zehirinin eklem rahatsızlıklarında, özellikle romatizmal hastalıklarda, deri sertleşmesi, deri kanseri, egzama, doku sertleşmesi rahatsızlıklarında Avrupa'da kullanılmaktadır.

HAaz'ın terapötik açıdan absorpsiyon hızını arttırmada kullanılır ve subkutan (deri altı) yolu ya da intramüsküler enjeksiyonu yolu ile yapılan tedavilerde oluşan rahatsızlıkları, dokularda aşırı sıvı birikimini azaltmakta ve lokal anestezinin etkinliğini arttırmada bu enzim etkilidir. HAaz daha birçok alanda kullanıma sahip olup; ortopedi, cerrahi operasyon, oftalmoloji (göz hastalıkları), onkoloji, dermatoloji ve jinekoloji dalları gibi birçok alanda kullanıma sahiptir.

Döllenme, spermin yumurtanın en dıştaki katmanı ile (cumulus hücreleri) etkileşiminden başlar ve yumurta sitoplazmasında iki tane tek kromozomlu (haploid) yapısının füzyonu (kaynaşmak) ile sona eren bir süreçtir (Talbot ve diğ., 1999). Bu süreçte spermin, yumurta-cumulus kompleksine girmesi gerekmektedir. Bu ise spermdeki HAaz sayesinde, HA hidrolizi ile sağlanır (Kim ve diğ., 2008). Sperm HAaz'ları, SPAM1 (sperm bağlı molekül) ve PH-20 olup, HA'yı sindirerek cumulus hücrelerine nüfuz etmesine yardımcı olur. PH-20'nin döllenme boyunca, lipid bağlı GPI ile plazma membranına bağlı olarak spermin baş kısmında akrozom yüzeyinde bulunan bir formda bulunmaktadır.

2.8. HİYALURONİDAZ ENZİM İNHİBİTÖRLERİ

Hyaluronidaz enzimlerinin inhibitörleri, HA'nın anabolizması ve katabolizması arasındaki dengeyi sağlamasında rol alan, güçlü düzenleyici ajanlardır. Genelde belgelenmiş olan HAaz enzim inhibitörleri farklı kimyasal formlarda protein, GAG'lar, polisakkaridler, kuvvetli asitler, lanostanoidler, antibiyotikler, anti-nematodlar, sentetik organik bileşikler ve alkaloidler gibi bitkilerden türetilmiş biyoaktif bileşikler, antioksidanlar, polifenoller, flavonoidler, terpenoidler ve anti-inflamatuvar ilaçlardır. Bazı hyaluronidaz enzim inhibitörleri Tablo 2.5'de gösterildiği gibidir (Girish ve diğ., 2009).

Tablo 2.5: Bazı Hiyaluronidaz Enzim İnhibitörleri (Nermeen ve diğ., 2010).

Kimyasal Şekli	Bileşimin ismi	Etkilenen HAaz
Proteinler	Serum hiyaluronidaz inhibitörü	Testis, Hyal-1, BVH ve yılan zehiri
Glikozaminoglikanlar	Heparin	Hyal-1, serum, yılan zehiri
	Heparin sülfat	Yılan zehiri ve serum
	Dermatan sülfat	Yılan zehiri ve serum
	O-sülfatlanmış HA oligosakkaritler	Üre, mikrobial
Polisakkaritler / Oligosakkaritler	Pektin	Testis
	Dekstran sülfat	Testis, <i>Streptococcus dysgalactiae</i>
	Sodyum aljinat	Testis
Yağ Asidleri	Eikosatrienoik asid	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> HA liyaz
	Nervonik asid	
	Oleanoik asid	
Alkaloidler	Aristolöşik asid	Yılan zehiri
	Ajmalin	
	Reserpin	
Flavonoidler/ Terpenoidler	Flavon	Akrep ve yılan zehiri
	Kuarsetin	Testis ve yılan zehiri
	Apijenin	Testis, akrep, yılan ve BVH
	Kaempferol	Testis, akrep, yılan ve BVH
	Myrisetin	Testis, akrep, yılan ve BVH
	Rutin	Testis
	Fenorofen	Testis, Yılan zehiri
Antiinflamatuvar ilaçlar	D-izoaskorbik asid	<i>Streptomyces hyaluroyticus</i> HA liyaz, Testis
	Kateşin	Yılan zehiri
Antioksidanlar/ Polifenoller	Kurkumin	Yılan zehiri
	Tannik asid	Testis, Yılan zehiri
	Ellajik asid	Testis
	Gallik asid	Testis

2.8.1. Proteinler

İlk olarak 1946'da Dr. Haas tarafından insan serumunda dolaşan HAaz inhibitörünün varlığı rapor edilmiştir. Klinik araştırmalar sonucu HAaz inhibitörlerinin; kanser, akciğer ve dermatolojik bozukluklara sahip hastalarda artan oranlarda bulunduğu rapor edilmiş, bu çalışmalar temel alındığında, Mio ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada fare serumundan yüksek molekül kütlesine sahip (120 kDa) bir HAaz inhibitörü olan termolabil bir glikoprotein bileşik izole edilmiştir. Bu inhibitörün aktivitesi, proteaza duyarlılığı ve magnezyuma bağlı olup maksimum pH inhibisyonunu 6 ila 8 arasında göstermektedir. Bu HAaz inhibitörü sığır testisinden, yılan ve arı zehirinden elde edilip çeşitli ölçülerde inhibisyon sağlamışken, *Streptomyces* HA liyaza karşı duyarsız kalmıştır. Bu inhibitörün inter- α -inhibitör sınıfının bir üyesi olduğu tespit edilmiştir (Mio ve diğ., 2000).

Bir diğer çalışmada ise, *Withania somnifera* isimli bitkiden HAaz inhibitör etkisi olan bir glikoprotein (29 kDa) saflaştırılmıştır. Bu inhibitör Indiana kobrası ve Russel yılanı zehirlerindeki HAaz'ı doza bağlı olarak inhibe etmiştir (Machiah ve diğ., 2006).

2.8.2. Polimerler, Polisakkaritler, Sülfatlanmış Oligosakkaridler

Heparin negatif yüklü, asidik ve yüksek derecede sülfatlanmış bir GAG olup, glukoronat-2-sülfat ve N-sülfo-D-glukozamin-6-sülfat bileşiklerinin $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozid bağlarıyla bağlanması sonucu oluşmuş komponentlerin tekrarlanmasından meydana gelmiştir ve çok iyi bir HAaz inhibitörüdür (Wolf ve diğ., 1984). Heparinin katalitik kısımdan bağlayıcı olduğu düşünülmekte, non-kompetitif mekanizma ile enzimi inhibe etmektedir. Düşük konsantrasyonlardaki heparinin sığırdan elde edilen HAaz'a göre, zehirden elde edilmiş olan HAaz'ı daha çok inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca sülük ve *Streptomyces* HAaz'ları heparine karşı daha duyarlıdır. Ek olarak heparan sülfat ve dermatan sülfat insan serumu ve zehirden elde edilen HAaz'ları inhibe etmiştir (Salmen ve diğ., 2005).

GAG' larla yapılan testlere göre, heparin, heparan sülfat ve dermatan sülfatlar Naja naja zehirinden elde edilen HAaz'a göre daha iyi inhibisyon göstermiş, kondroitin sülfatla karşılaştırıldığında ise bunun orta derecede inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Naja

naja zehirinden elde edilen HAaz enzimin etkisine direnen GAG'lara ek olarak, bu enzimin inhibisyon etkisinin olduğu görülmüştür. Burada negatif yüklü GAG'lar ile pozitif yüklü bu zehirdeki enzim arasında elektrostatik etkileşimin olabileceği ve enzime HA substratının bağlanmasını önlediği ileri sürülmüştür (Girish ve Kemparaju, 2005a).

Heparin ve heparan sülfatın inhibitör etkisinin bu maddelerin yapısındaki oligosakkaritlerin yapısal olarak yüksek derece HA'ya benzediği için olduğu açıklanmıştır. Bu açıklamanın temelinde, Toida ve arkadaşları, hem O-sülfatlanmış GAG'lar hem de idrar HAaz'ı üzerindeki HA parçalarından inhibitör aktivitesini incelemiştir. Bütün O-sülfatlanmış olan GAG'ların doza bağlı olarak HAaz'ı inhibe ettiği, modifiye edilmemiş GAG'lar ile heparin hariç, çok güçlü bir inhibisyon göstermediği bulunmuştur. O-sülfatlanmış HA oligomerin miktarı arttırıldıkça inhibisyonun da arttığı belirlenmiştir. Tetra- ve dekasakkaridler gibi az sülfatlanmış oligosakkaridler daha az inhibisyon gösterirken, 16 ila 20 sakkarit birimi içeren oligomerlerin maksimum inhibisyon gösterdiği görülmüştür. HAaz'ın inhibisyonu heparin ile yarışmasız mekanizmayla gerçekleşirken, tamamiyle O-sülfatlanmış HA hem yarışmalı hem yarışmasız mekanizmayla inhibisyon göstermiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında inhibisyonun sadece elektrostatik etkileşime bağlı olmadığı, ancak O-sülfatlanmış oligosakkaridlerin zincir uzunluğuna da bağlı olduğu görülmüştür (Toida ve diğ., 1999).

Salmen ve arkadaşları tarafından yapılmış çalışmalar sonucu elde edilen bulgulara göre, sülfatlanmış oligosakkaritlerin BTH, BVH ve *Streptococcus agalactiae* HAaz'ları üzerinde bir numaralı inhibitör etki gösterdiği görülmüştür. Sülfatlanmış β -(1-4)-galakto-oligosakkaritlerin üç HAaz'ı da doza bağlı olarak inhibe ettiği görülmüştür. IC₅₀ değerleri sırasıyla sığır testisi ve arı zehiri için 35 ve 40 μ M olarak bulunmuştur. Bunun aksine, bakteriyal HAaz' da ise bu iki HAaz'a göre 9 kat daha az inhibitör etki gösterdiği görülmüştür. Sülfatlanmamış β -(1-4)-galakto oligosakkaritler her üç HAaz'da da aktivite göstermemiştir. Araştırmacıların açıklamasına göre, sülfatlanmış tri-, tetra- ve pentasakkaritler sığır testisi ve arı zehiri üzerinde inhibitör etkiye sahipken, sülfatlanmış oktasakkaritlerin bakteriyal HAaz'lar üzerinde inhibitör etki gösterdiği yönündedir. Ayrıca, sülfatlanmış antibiyotik neomisin türevleri ve bitki polisakkaritleri,

bunların doğal formları hariç, bakterial HAaz'lerden çok sığır testislerine ait HAaz'ları inhibe ettiği görülmüştür. Uzun süreli HAaz inhibitör etkisinde sülfatlanmış neomisin apijenine göre daha güçlüdür (Salmen ve diğ., 2005).

Raghavan ve arkadaşları, tarafından yapılan çalışmalarda sülfatlanmış neomisin ile aracılı GAG'ların, HAaz'lar tarafından parçalanmasının önlediği görülmüştür. Değişik HAaz'larda doğru inhibisyon özelliği, zincir uzunluğuna ve sülfatlanmaya bağlıdır. Uygulanmış olan inhibisyonda hidrofilik kısımlar HAaz'a ait lipofilik fonksiyon gruplarının bağlanma noktalarına benzeşmesi ve bağlanmasından dolayı aktivitesini bloke etmiş olabilir (Raghavan ve diğ., 2007).

Isoyama ve arkadaşları, 21 farklı inhibitörü Hyal-1, BTH, BVH ve *Streptomyces* HAaz'a karşı denemişlerdir. İnhibitör testi boyunca, polimer (stiren-4-sülfonat; PSS) her dört HAaz'ı da inhibe etmiştir. Hyal-1 ve BVH PSS 990,000'a karşı daha duyarlıyken diğer iki enzim daha az duyarlıdır. İnhibisyon denemesi sırasında farklı uzunluktaki PSS kullanılmış bunun her dört HAaz enzimi üzerinde hem inhibisyon yüzdesi hem de zincir uzunluğu ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bu farklı 21 HAaz inhibitör çalışması boyunca Hyal-1, BTH ve BVH'a karşı en etkili inhibisyonu gösteren PSS ve O-sülfatlanmış HA türevleri olurken, *Streptomyces* HAaz a karşı PSS 990,00 ve VERSA-TL 502 çok az inhibisyon özelliği göstermiştir. Hem PSS hem de O-sülfonatlı HA türevleri HAaz'lara karşı karışık inhibisyon (yarışmalı ve yarışmasız) mekanizmaları göstermiştir. Genel olarak bu çalışma HAaz inhibitörlerinin HAaz'ların asidik ya da bazik oluşuna göre seçicilik gösterdiğini göstermektedir (Isoyama ve diğ., 2006).

2.8.3. Yağ Asidleri

Suzuki ve arkadaşları, doymuş ve doymamış yağ asidlerinin HAaz ve kondroitinaz üzerindeki inhibisyonunu araştırmışlardır. Yağ asidleri ile yapılan çalışmada doymuş yağ asidlerinin koyun testisi, *Streptomyces hyalurolyticus* ve *Streptococcus dysgalactiae* HAaz üzerinde inhibisyon etkisinin olmadığı görülmüştür. Buna karşın, bir çift bağ içeren cis-doymamış yağ asidlerinin *S. dysgalactiae* ve dört farklı mikrobiyal kondroitinazi daha inhibe ettiği görülmüştür (Suzuki ve diğ., 2002).

Bununla beraber, eikosatrienoik asid ve nervonik asid gibi oleik asid izomerlerinin yarışmasız mekanizma sayesinde kondroitinaz ve HAaz'ları inhibe ettiği görülmüştür. Bu sonuçlar açıkça göstermektedir ki, cis-doymamış yağ asidlerinin çift bağ içermeleri inhibisyon için asıl gerekli olan özelliktir. Bununla beraber, yağ asidi molekülündeki çifte bağın pozisyonu ve cis-trans formları büyük ölçüde inhibisyonu etkilememekle beraber, yağ asidleri enzimlerin aktif bölgelerinden çok farklı bölgelerine bağlanmaktadır (Suzuki ve diğ., 2002).

2.8.4. Alkaloidler

Alkaloidler, doğal olarak ikincil metabolitlerden meydana gelen, temelde nitrojen atomları içeren ve hayvanlar, mantarlar, bakteriler ve bitkiler gibi çeşitli organizmalar tarafından üretilen bileşiklerdir. Bitkilerdeki, aristoloşik asid, ajmalin ve reserpin gibi alkaloidler Naja naja zehiri HAaz inhibitörü olarak bulunmuştur.

Ajmalin ve reserpin' nin kısmi inhibitör etkisinin yanı sıra aristoloşik asid non-kompetitif mekanizmayla aktiviteyi tamamen inhibe eder. HAaz ile aristoloşik asidin etkileşimi spektrofotometrik analizle doğrulanmış olup, bu analizde HAaz'ın bilinen floresans yoğunluğu aristolosik asid ile bastırılmıştır. Bu bastırma işlemi doza bağlı olarak belirlenmiştir. Bu spektrofotometrik analizden; aristolosik asidin, enzimin katalitik kısmına bağlanmadığı, ancak HAaz'daki tirozin ve triptofan artıkları ile etkileştiği sonucuna varılmıştır.

Aristolosik asid, HA'yı parçalayıcı HAaz'ın inhibisyonunu ciltte ve kas dokularının bölümlerinde desteklerken, *in vivo* olarak HA'nın parçalanması toksinlerin kolaylıkla difüzyonuna katkı sağlar. Bundan dolayı gelişmiş toksisite görülür. Enteresan olan ise, Naja naja zehiri enjekte edilen deney farelerinin yaşam sürelerinin aristoloşik asid ile arttığının görülmesidir (Girish ve Kemparaju, 2006).

2.8.5. Flavonoidler ve Terpenler

Flavonoidler, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin çeşitli substitüentlerle oluşturduğu üçlü sarmal yapıdan oluşmuş doğal yapılardır. Bunlar genellikle substitüentlerine bağlı olarak üç gruba ayrılırlar. Birinci grup flavanolları, ikinci grup antosiyaninleri, üçüncü grup ise flavonlar, flavanonlar ve kalgonlardır. Flavonoidler antiinflamatuvar,

antioksidan, antialerjik, hepatoprotektif (karaciğer koruyucu), antitrombotik, antiviral ve antikarsinojenik özellikleri uzun zamandır bilinen bileşiklerdir (Hollman ve Arts, 2008).

1990 yılında, Kuppusamy ve arkadaşları 31 çeşit flavonoidlerin sığır testis HAaz'ı üzerindeki etkilerini tekrar ele almışlar ve incelenmiş olan flavonoidler arasında sadece taninin yoğun olarak enzim aktivitesini 50 μ M konsantrasyonda inhibe ettiğini, diğer yedi bileşiğin (kamferol, silibin, apigenin, luteolin, morin, myricetin ve kuarsetin) 250 μ M konsantrasyonda yaklaşık olarak % 29 ile % 76 arasında inhibisyon etkisi gösterdiğini saptamışlardır (Kuppusamy ve diğ., 1990).

1991'de Kuppusamy ve arkadaşları tarafından silibin ve 12 flavon türevlerinin Meleyan korna zehiri, iki çingiraklı yılan, bal arısı ve akrep zehirinden elde edilen HAaz'lar üzerindeki inhibitör etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmalarda apijen, kamferol, luteolin, myrisetin, floretin, kalgon ve kuarsetinin kısmen % 89 oranında 250 μ M konsantrasyonda inhibitör etki gösterdiği görülmüştür. Bunun yanı sıra silibin arı ve akrep zehirindeki HAaz'ı tamamen inhibe ettiği görülmüştür (Kuppusamy ve Das, 1991). Elde edilen bu sonuçlara göre, flavonlar, flavonoller ve kalkonların genel olarak zehir HAaz'larını inhibe edebilme özelliğine sahip olduğu ileri sürülmüştür (Kuppusamy ve Das, 1993).

Li ve arkadaşları, tannik asid, kamferol, kuarsetin ve apigenin *Sinomolgus* türü maymunların sperm motilitesindeki HAaz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerini araştırmıştır. Her dört flavonoidin de doza bağlı olarak HAaz aktivitesini inhibe ettiği, ancak doza bağlı olarak kuarsetin ve kamferolün, tannik asid ve apigenine göre maksimum inhibisyon gösterdiği saptanmıştır. Hamster kumulus hücreleri içerisine maymun spermi nüfuz edildiğinde kuarsetin, arginin ve kamferolün hiyaluronidaz aktivitesini anlamlı bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Maymun sperm mobilitesi ve dölleme spermin over hücrelerine girmesi sırasındaki HAaz inhibisyonunun araştırılmasında flavonoidlerin uygun bir araç olduğu sonucuna varılmıştır (Li ve diğ., 1997).

2.8.6. Antioksidanlar ve Polifenoller

Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasardan hücreleri koruyucu fitokimyasallar (bitki kökenli kimyasallar) antioksidanlardır. Diyet antioksidanları, polifenollerini içeren

ve arterioskleroz (damar sertliği), koroner kalp hastalığı ve kanser gibi oksidatif stres ile meydana gelen çeşitli hastalıkların neden olduğu patojenezler üzerinde koruyucu rol oynadığından antioksidanların önemi artmıştır. Antioksidanların biyolojik faaliyetleri geniş bir spektrum göstermekte olup, antikarsinojenik, antiinflamatuvar ve antiviral olaylarda rol oynamaktadırlar. Bunlara ek olarak, antioksidanlar lipid peroksidasyonu ve trombosit agregasyonunu da inhibe etmektedir (Duthie ve diğ., 2000).

Vitamin C (Vit C, L-askorbik asid) en iyi bilinen antioksidanlardan olup, kollajenin korunmasında, peptit hormonların aktivasyonunda ve hücre büyüme ve bölünmesinin düzenlenmesinde etkilidir. Vit C birçok enzimatik reaksiyonda elektron donör gibi reaksiyona girer ve çeşitli hastalıklarda savunma mekanizmasını güçlendirerek hastalığın önlenmesine yardımcı olur. Vit C ve türevlerinin de antitümör ve antiviral etkilere sahip olduğu açıklanmıştır.

Abell ve arkadaşları, çeşitli askorbik asit türevlerinin α -amilaz enzimini inhibe ettiğini göstermiştir (Abell ve diğ., 1998). Okorukwu ve Vercruysse, BTH ve *S. hyalurolyticus* HAaz'larının Vit C'nin yapısal analogları tarafından inhibe edildiğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada, L-askorbik asid ve D-izoaskorbik asid her iki enzimi de inhibe etmiş ancak güçlü inhibisyonunu HA liyaz üzerinde yaptığı gözlenmiştir (Okorukwu ve Vercruysse, 2003). Vit C'nin Naja naja zehiri ve koyun testisi HAaz'larını 500 mM üzerindeki konsantrasyonlarında inhibe etmediği de öne sürülmektedir (Girish ve Kemparaju, 2005).

Yakın zamanda Vit C'nin memeli HAaz'ından çok bakterial enzimlerine karşı daha güçlü olduğu açıklanmıştır. *Streptococcus pneumoniae* (SpnHL) ve *S. dysgalactine* (SagHL)'den elde edilen HA liyazı IC₅₀ değerinde sırasıyla 6mM ve 32 mM konsantrasyonda inhibe etmiştir.

SpnHL ve Vit C'nin kristal kompleksine uygulanan X-ışını analizinde Vit C'nin bağlanma şekli üzerinde çalışılmıştır. SpnHL'nin bağlanma kısmında N-terminal α -domain ve C-terminal β -domain içerdiği ve 10 kalıntı bağlayıcıyla bağlandığı görülmüştür (Li ve diğ., 2001).

Bağlı haldeki Vit C enzimde 25 noktada etkileşime ve 7 kalıntıya sahiptir. Bu kalıntılar substrat bağlayıcı ve hidrolizi içerir. Amino asidlerden Arg-243, Asn-290, Trp-292,

Tyr-408, Arg-462, Arg-466, Asn-580, Vit C ile reaksiyona girdiği bulunmuştur. Bunlardan, Trp-292 Vit C ile en fazla etkileşime giren olup, hidrofilik etkileşimlere ayrıca da substrat zinciri üzerindeki bağlanma b6lgelerinin spesifikliğinden sorumludurlar. Bu nedenle Vit C, HA'nın bağlanma b6lgeleri için yarışır. Arg-243, Arg-462 ve Arg-466 formları çeşitli tuz k6pr6lerini, Tyr-408, Asn-290 ve Asn-580 formları Vit C ile hidrojen bağlarını oluşturur. Kristal yapısından anlaşılan şudur ki, katalitik yarıklar içindeki hidrofobik kalıntıların varlığı nedeniyle, lipofilik zincirler içeren Vit C'nin, doğal Vit C'ye g6re daha g6l6 inhibisyon etkisine sahip olabilir (Li ve diğ., 2001).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. DENEYLERDE KULLANILAN ALETLER

Buzdolabı	: Arçelik
Destile Su	: Brand MonoDest3000
Derin Dondurucu	: Beko
Etüv	: Nüve FN5000
Isıtıcı	: Electromantle
pH Metre	: Beckman
Spektrofotometre	: Shimadzu UV-mini 1240
Terazi	: Gec Avery
Terazi	: Mettler 110 Hassas Terazi
Sonikatör	: Bandelin Sonorex

3.2. DENEYDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Bu çalışmada asetik asid (Merck,100063), hidroklorik asid (Merck,100314), hiyaluronidaz (Sigma,H3506), hiyaluronik asid sodyum tuzu (Sigma,H5347), kalsiyum klorür anhidrit (Fluka,21085), p-dimetilaminobenzaldehit (p-DAB) (Merck,3057), potasyum tetraborat (Sigma,P5754), sodyum asetat (Merck,6265), sodyum hidroksit (Fluka,71691) ve enzim inhibisyon deneyinde ki kimyasal maddeler kullanılmıştır.

3.3. ENZİM İNHİBİSYONUNDA KULLANILAN BİTKİ EKSTRELERİ

Enzim inhibisyonunun araştırılmasında ananas, avokado, beyaz dut, çilek, domates, elma, fesleğen, gül, havuç, ıhlamur, ıspanak, kabak, karanfil, kayısı, kiraz sapı, kudret narı, kuşburnu, lavanta, limon, mandalina, maydanoz, muz, nar, nane, papatya, portakal,

soğan, üzüm ve yaban mersininden elde edilen ekstratlar kullanıldı. Bitki materyallerinin Latince adları Tablo 3.1’ de verildiği gibidir.

Tablo 3.1: Bitki Materyallerinin Latince Adları.

Bitki Materyalinin Türkçe Adı	Bitki Materyalinin Latince Adı	Bitkinin Kullanılan Kısımları
Ananas	<i>Ananas comosus</i>	Meyva
Avokado	<i>Persea gratissima</i>	Meyva
Beyaz dut	<i>Morus alba</i>	Meyva
Çilek	<i>Fragaria vesca</i>	Meyva
Domates	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Sebze
Elma	<i>Malus domestica</i>	Meyva
Fesleğen	<i>Ocimum basilicum L.</i>	Yaprak
Gül	<i>Rosa domescana</i>	Çiçek
Havuç	<i>Daucus carota</i>	Sebze
Ihlamur	<i>Tilia argentea Desf.</i>	Yaprak
Ispanak	<i>Spinacia oleracea</i>	Yaprak
Kabak	<i>Cucurbita pepo</i>	Sebze
Karanfil	<i>Eugenia caryophyllata Thunb.</i>	Tohum
Kayısı	<i>Prunus armeniaca</i>	Meyva
Kiraz sapı	<i>Prunus avium</i>	Meyva

Tablo 3.1 (Devam): Bitki Materyallerinin Latince Adları.

Kudret narı	<i>Momordica charantia</i>	Meyva
Kuşburnu	<i>Fruktus cynosbati</i>	Tohum
Lavanta	<i>Lavandula angustifolia</i>	Yaprak
Limon	<i>Citrus limon</i>	Sebze
Mandalina	<i>Citrus reticulata</i>	Meyva
Maydanoz	<i>Petroselinum crispum</i> (Miller) A.W. Hill	Yaprak
Muz	<i>Musa cavendish</i>	Meyva
Nane	<i>Mentha piperita L.</i>	Yaprak
Nar	<i>Punica granatum</i>	Meyva
Papatya	<i>Matricariae floş</i>	Yaprak
Portakal	<i>Citrus sinensis</i>	Meyva
Soğan	<i>Allium cepa L.</i>	Sebze
Üzüm	<i>Vinis vinifera L.</i>	Meyva
Yaban Mersini	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Meyva

3.3.1. Sulu Ekstrelerin Hazırlanması

20 g bitki materyali cam balona konularak üzerine 200 mL destile su ilave edildi. Karışım geri soğutucu altında 8 saat reflüks edildi. Elde edilen karışım soğuduktan sonra süzgeç kâğıdından geçirilerek süzüldü. Süzüntü önceden tartılmış cam balona alındı. Balon rotaevaporatöre yerleştirilerek karışımın suyu düşük basınç altında

uzaklaştırıldı. Geriye kalan ekstre önceden darası alınmış kroze ye konularak 1 hafta boyunca 37°C' deki etüvde, içindeki su tamamen uzaklaşmıca ya kadar bekletildi. Elde edilen ekstre tartıldıktan sonra Eppendorf tüplerine alınarak -20°C' de muhafaza edildi.

3.4. ENZİM İNHİBİSYONU DENEYİNİN YAPILIŞI

0.1M pH 4.0 asetat tamponunda çözülmüş, hiyaluronidaz enzim çözeltisinin 50 µL'si (1000 U/mL) deney tüpüne alındı. Yine pH 4.0 asetat tamponunda çözülmüş farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraları ya da kimyasallara ait çözeltilerin 100 µL'si enzim üzerine eklendi. 37°C' de 20 dakika inkübe edildi. 1.25 mM CaCl₂ çözeltisinin 100 µL'si enzim aktivasyonu için üzerlerine ilave edildikten sonra yine 37°C' de 20 dakika inkübe edildi. pH 4.0 asetat tamponunda çözülmüş 0.8 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmış olan hiyaluronik asid sodyum tuzu çözeltisinin 0.25 mL'si üzerlerine ilave edildikten sonra 37°C' de 40 dakika bekletildi. 100 µL 0.4 N sodyum hidroksit daha sonra 100 µL 0.4 M potasyum borat çözeltileri sırasıyla ilave edildikten sonra 3 dakika kaynar su banyosunda deney tüpleri tutuldu. Akan suyun altında soğutulan deney tüplerine 3 mL p-DAB çözeltisi (1g p-DAB 1.25 mL 10N HCl ile çözülüp 8.75 mL asetik asid ile seyreltilir. Bu çözeltinin 1 mL' si asetik asid ile 10 mL' ye seyreltilir). Son kez 37°C' de 20 dakika inkübe edildikten sonra 585 nm' de absorbanları okundu. Kör olarak ilk adımda 150 µL pH 4.0 asetat tamponu numuneler ile aynı koşullara maruz bırakılmıştır. Kontrol çözeltisi için ise ilk adımda 50 µL enzim üzerine 100 µL pH 4.0 asetat tamponu ilave edilerek numuneler ile aynı koşullara maruz bırakılmıştır (Lee ve diğ., 2001).

Yapılan çalışmada farklı konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerin hiyaluronidaz enzimi üzerine inhibisyon değerleri aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

$$\% \text{inhibisyon} = [(\Delta A_{585 \text{ kontrol}} - \Delta A_{585 \text{ örnek}}) / \Delta A_{585 \text{ kontrol}}] \times 100$$

$\Delta A_{585 \text{ kontrol}}$: Kontrol çözeltisinin absorban değeri

$\Delta A_{585 \text{ örnek}}$: Numune çözeltisinin absorban değeri

Hiyaluronidaz enziminin IC₅₀ değeri (enzimin % 50 inhibisyon etkisi göstermesi için gerekli madde miktarı) absise madde miktarı, ordinata % enzim inhibisyon verilerinin

uygulaması ile çizilen eğrinin lineer kesiminden elde edilen regresyon denkleminde hesaplandı.

3.5. ENZİM İNHİBİSYONUNDA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Çalışmamızda HAaz inhibitör etkilerinin tayininde Tablo 3.2’de belirtilen organik ve anorganik maddeler kullanılmıştır.

Tablo 3.2: Enzim İnhibisyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler.

L(+)-Askorbik asid (Vitamin C) (Merck,702)
Azeleik asid (Merck, 820116)
Benzoik asid (Fluka, G145)
N-N dimetil 1,4-fenilen diamonyum klorür (Fluka 07770)
Gallik asid (Fluka, 48630)
Glikolik asid (Fluka, 50590)
L-Glutatyon (indirgenmiş) (Fluka, 49750)
2-Hidroksi dodekanoik asid (Fluka, 55240)
Kafein (Fluka, 60018)
β -karoten (provitamin A) (Fluka, 45300)
Kateşin (Sigma, 124K1484)
Kojik asid (Fluka, 60890)
Kuarsetin dihidrat (Fluka, 83370)
Metionin (Hoffman-La Roche, 24228)
Rezorsinol (Merck, 107593)
Rutin hidrat (Sigma, R5143)
L(+)-Sistein (Merck, 2838)
DL- α -Tokoferol asetat (E Vitamini) (Merck, 8283)
Valproik asid (Merck, 814439)
Vanilik asid (Aldrich S, 41232-497)

4. BULGULAR

Bu çalışmada, halk arasında çeşitli amaçlar için kullanılan bitkilerin, organik ve anorganik maddelerin HAaz üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi.

Enzim kaynağı olarak saf HAaz kullanıldı.

4.1. BİTKİ EKSTRELERİNİN HİYALURONİDAZ İNHİBİTÖRÜ ETKİSİ

Tablo 4.1’de çeşitli bitkilerin sulu ekstralarının hiyaluronidaz üzerindeki IC₅₀ değerleri gösterilmektedir.

Tablo 4.1: Çeşitli Bitkilerden Hazırlanan Sulu Ekstrelerinin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC₅₀ Değerleri.

Bitki Ekstrelerinin Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon	IC ₅₀ Değeri (µg/mL)*
Ananas	6000	58.65±2.89	4403.87±28.80
	4000	48.65±4.73	
	3000	42.45±0.07	
	2000	34.25±1.20	
	1000	22.45±1.06	
Avokado	5000	66.20±3.67	1223.73±20.40
	2500	54.20±0.35	
	1000	40.90±1.83	
	500	28.80±5.09	

Tablo 4.1 (Devam): Çeşitli Bitkilerden Hazırlanan Sulu Ekstrelerinin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC₅₀ Değerleri.

Beyaz dut	2000	91.70±2.96	386.30±59.77
	1000	83.30±3.18	
	500	60.70±3.74	
	300	39.30±6.08	
	100	9.30±4.52	
Çilek	5000	61.55±4.31	2904.94±444.52
	4000	54.20±0.14	
	3000	51.65±1.20	
	2000	35.45±7.56	
	1000	12.85±4.17	
Domates	6000	90.70±3.46	2432.94±444.52
	4000	82.10±1.06	
	3000	73.50±2.82	
	2000	41.80±7.63	
	1000	33.10±0.35	
Elma	20	62.20±2.05	13.70±1.39
	10	43.20±0.56	
	5	30.50±7.00	
	1	28.60±4.59	

Tablo 4.1 (Devam): Çeşitli Bitkilerden Hazırlanan Sulu Ekstrelerinin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC₅₀ Değerleri.

Fesleğen	3000	86.30±4.66	454.05±17.47
	1500	78.10±3.25	
	500	55.10±2.12	
Gül	1000	62.75±4.87	826.24±8.20
	800	48.40±3.11	
	600	33.20±0.84	
	400	22.50±3.67	
	200	11.20±0.98	
Havuç	5000	73.85±4.87	4083.79±204.38
	4000	49.10±2.54	
	3000	40.10±6.64	
	2000	26.40±5.79	
	1000	3.45±1.90	
İhlamur	2500	93.20±0.56	521.11±50.46
	2000	85.90±4.17	
	1500	73.10±1.06	
	1000	66.10±0.28	
	500	48.20±4.66	

Tablo 4.1 (Devam): Çeşitli Bitkilerden Hazırlanan Sulu Ekstrelerinin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC₅₀ Değerleri.

Kabak	1000	52.60±3.25	952.39±58.89
	800	36.85±0.21	
	600	34.25±1.34	
	400	27.85±5.44	
	200	11.35±0.07	
Karanfil	750	96.40±0.56	236.47±17.07
	500	83.60±1.83	
	250	51.60±1.97	
Kayısı	1	77.25±4.03	0.108±0.02
	0.5	60.95±5.30	
	0.1	47.15±9.68	
	0.01	27.85±0.21	
	0.001	15.35±0.07	
Kiraz sapı	1000	94.40±6.50	10.25±0.29
	500	86.90±8.90	
	100	74.50±5.23	
	10	48.80±1.41	
	1	3.15±0.07	

Tablo 4.1 (Devam): Çeşitli Bitkilerden Hazırlanan Sulu Ekstrelerinin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC₅₀ Değerleri.

Kudret narı	1000	97.70±2.26	293.17±34.66
	800	91.90±4.03	
	600	66.60±0.56	
	400	59.00±3.25	
	200	14.20±5.16	
Kuşburnu	1000	52.10±1.55	994.05±23.85
	800	32.60±0.21	
	600	22.40±2.62	
	400	9.25±2.05	
	200	6.50±3.11	
Lavanta	2000	95.35±1.48	425.14±205.93
	1500	92.70±0.42	
	1000	86.50±0.42	
	750	69.55±6.15	
Limon	6000	62.50±2.75	3480±111.26
	4000	58.55±0.91	
	2000	28.75±0.91	
	1000	19.95±2.05	

Tablo 4.1 (Devam): Çeşitli Bitkilerden Hazırlanan Sulu Ekstrelerinin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC₅₀ Değerleri.

Mandalina	1500	95.40±1.83	825.08±3.85
	1250	86.10±4.73	
	1000	78.40±10.25	
	750	40.40±10.25	
	500	30.30±0.14	
Maydanoz	6000	59.10±0.35	3644.05±428.94
	4000	54.95±0.63	
	3000	41.45±4.87	
	2000	33.45±2.19	
	1000	26.00±3.95	
Muz	20	79.20±5.51	0.96±0.02
	10	67.10±2.05	
	5	60.10±2.47	
	1	51.80±2.54	
Nar	2	62.10±0.35	1.69±0.41
	1	46.20±0.10	
	0.75	38.60±5.44	
	0.5	13.00±1.13	

Tablo 4.1 (Devam): Çeşitli Bitkilerden Hazırlanan Sulu Ekstrelerinin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC₅₀ Değerleri.

Nane	1500	85.30±4.03	612.35±76.81
	1000	66.60±4.87	
	750	52.90±5.16	
	500	41.20±0.28	
	250	20.00±0.28	
Papatya	2000	92.40±3.39	835.84±22.73
	1500	75.40±1.27	
	1000	62.25±4.17	
	750	46.45±2.61	
	500	19.00±4.52	
Portakal	8000	66.10±4.24	6375.13±634.58
	4000	25.80±9.26	
	2000	12.03±0.77	
	1000	8.40±2.61	
Soğan	6000	98.50±1.20	2613.65±3.34
	4000	73.20±7.49	
	3000	51.20±3.74	
	2000	43.80±1.97	
	1000	27.50±5.44	

Tablo 4.1 (Devam): Çeşitli Bitkilerden Hazırlanan Sulu Ekstrelerinin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC₅₀ Değerleri.

Üzüm	50	43.85±2.33	57.09±3.04
	40	35.35±0.49	
	30	20.45±0.07	
	20	7.05±0.63	
Yaban Mersini	100	88.80±7.91	42.80±4.19
	50	62.10±1.69	
	25	38.00±7.99	

* Ortalama ± SD

Tablo 4.1'e göre;

Sulu ekstrelerin hiyaluronidaz enzimi üzerine % inhibisyon değerleri konsantrasyon artışı ile artmıştır. Bitki ekstreleri içinde IC₅₀ değerinin en düşük olması nedeniyle en yüksek hiyaluronidaz inhibisyonunu kayısının (0.108±0.02 µg/mL) gösterdiği görülmüştür. Kayıyı takiben muz (0.96±0.02 µg/mL), kiraz sapı (10.25±0.29 µg/mL), elma (13,70±1.39 µg/mL), yaban mersini (42.80±4.19 µg/mL) sulu ekstrelerinin inhibitör etkileri tespit edilmiştir.

En düşük IC₅₀ değerleri gözetilerek, bitkiler arasındaki en güçlü hiyaluronidaz inhibitörü olabilme sıralaması şu şekildedir: Kayısı, muz, nar, kiraz sapı, elma, yaban mersini, üzüm, karanfil, kudret narı, beyaz dut. Bu sıralamadaki bitkiler çalışmamızda en yüksek inhibitör değerlerini elde ettiğimiz ilk on bitkidir.

4.2. KİMYASAL MADDELERİN HİYALURONİDAZ İNHİBİTÖR ETKİLERİ

Askorbik asid, azeleik asid, benzoik asid, N-N dimetil-1,4-fenil diamonyum diklorür, gallik asid, glikolik asid, L-gutasyon (indirgenmiş), 2-hidroksidodekanoik asid, kafein, β -karoten, kateşin, kojik asid, kuarsetin, metionin, rezorsinol, rutin, L(+)-sistein, tokoferol, valproik asid, vanilik asid kimyasal maddeleri HAaz inhibitörü etkileri Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.2: Amino Asid ve Peptidlerin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC₅₀ Değerleri.

Kimyasal Maddelerin Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon	IC₅₀ Değeri (µg/mL)*
Glutasyon	4000	75.20±1.13	582.16±102.04
	2000	65.70±1.27	
	1000	55.20±6.92	
	500	49.10±0.14	
	250	35.56±0.14	
Metionin	4000	44.40±0.28	4504.59±28.69
	3000	34.70±0.14	
	2000	23.20±0.28	
	1000	15.80±0.14	
Sistein	4000	73.50±29.55	2907.92±71.72
	3000	67.80±28.21	
	2000	34.40±0.84	

* Ortalama ± SD

Tablo 4.3: Çeşitli Asidlerin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC₅₀ Değerleri.

Kimyasal Maddelerin Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon	IC₅₀ Değeri (µg/mL)*
Azeleik asid	2000	93.30±0.28	892.79±164.92
	1000	57.50±15.48	
	500	31.70±176	
	250	18.90±0.14	
	100	9.40±0.14	
Benzoik asid	3000	95.20±0.56	1461.85±155.66
	2000	56.10±5.79	
	1000	41.50±3.88	
	500	21.60±0.28	
	100	1.40±0.28	
Askorbik Asid (Vitamin C)	100	33.20±1.90	183.15±16.18
	50	26.60±3.74	
	10	14.70±0.14	
	1	8.00±2.47	
Gallik asid	3	41.50±8.48	4.09±1.20
	1	26.70±3.81	
	0.1	14.70±0.57	

Tablo 4.3 (Devam): Çeşitli Asidlerin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC₅₀ Değerleri.

Glikolik asid	4000	60.80±4.73	2818.35±161.28
	3000	53.30±2.47	
	2000	41.90±1.06	
	1000	35.60±4.73	
Kojik asid	150	96.30±5.30	89.50±9.21
	100	54.60±0.77	
	50	22.90±0.14	
	25	6.80±7.14	
Valproik asid	1000	97.90±0.64	9.51±0.38
	500	80.60±0.14	
	100	68.80±1.83	
	10	52.60±2.12	
	1	11.50±2.75	
Vanilik asid	3000	50.50±0.70	2970.58±41.59
	2000	32.05±0.07	
	1000	21.65±0.92	

* Ortalama ± SD

Tablo 4.4: Çeşitli Kimyasal Maddelerin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC₅₀ Değerleri.

Kimyasal Maddelerin Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon	IC₅₀ Değeri (µg/mL)*
N-N Dimetil-1,4-fenil diamonyum diklorür	10	81.50±0.70	6.08±0.12
	5	43.00±1.41	
	1	6.05±0.07	
2-Hidroksidodekanoik asid	1500	98.00±0.77	269.41±3.28
	1000	86.50±1.13	
	500	79.00±2.05	
	250	46.80±0.07	
	100	7.50±3.53	
Kafein	4000	37.00±5.23	5125.53±638.08
	3000	20.10±2.82	
	2000	10.60±0.28	
	1000	3.70±0.98	
β-Karoten	1	64.00±3.95	0.102±0.02
	0.1	50.30±2.09	
	0.01	23.30±4.80	
	0.001	5.80±4.10	

Tablo 4.4 (Devam): Çeşitli Kimyasal Maddelerin Hiyaluronidaz Üzerindeki % İnhibisyon ve IC₅₀ Değerleri.

Kateşin	2000	57.70±3.88	1407.77±170.66
	1000	47.00±0.70	
	500	36.00±0.77	
Kuarsetin	3	46.80±5.30	4.03±1.69
	1	41.20±0.77	
	0.5	34.20±0.14	
	0.1	12.60±7.14	
Rezorsinol	10	52.60±0.14	9.50±0.02
	1	44.40±0.14	
	0.1	25.40±0.14	
Rutin	1	77.70±24.46	0.019±0.007
	0.1	70.80±33.09	
	0.01	26.50±9.75	
	0.001	13.20±1.97	
α-Tokoferol	4000	48.70±1.62	4226.32±116.28
	3000	18.80±2.19	
	2000	8.50±0.28	
	1000	0.50±0.14	

- Ortalama ± SD

Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4'e göre;

Amino asid ve peptidlerin arasında en yüksek hiyaluronidaz enzim inhibitör aktivitesini glutatyon ($582.16 \pm 102.04 \mu\text{g/mL}$) göstermiştir. Glutatyondan sonra sırasıyla sistein ve metionin göstermiştir (Tablo 4.2).

Çeşitli asidlerin hiyaluronidaz enzimi üzerindeki inhibisyon değerleri gallik asid, valproik asid, kojik asid, askorbik asit, azeleik asid, benzoik asid, glikolik asid, vanilik asid şeklinde azalmaktadır. Asidler içerisinde en yüksek inhibisyon değerini gallik asid göstermiştir ($4.09 \pm 1.20 \mu\text{g/mL}$) (Tablo 4.3).

Çalışılan kimyasal maddeler içerisinde IC_{50} değeri en düşük olması nedeniyle en yüksek hiyaluronidaz inhibisyonunu rutin'in ($0.019 \pm 0.007 \mu\text{g/mL}$) gösterdiği görülmüştür. Rutin'i takiben β -karoten, kuarsetin ve N-N dimetil 1,4-fenilen diamonyum klorür, 2-hidroksi dodekanoik asit, kateşin, α -tokoferol ve kafein hiyaluronidaz üzerinde inhibitör etki göstermiştir (Tablo 4.4).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tıbbi bitkilerin çoğu ülkemizde halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır. Gıda maddesi olarak kullanılan bazı bitkilerin de çeşitli hastalıklara karşı iyi geldiği bilinmektedir. Bazı hastalıkların önemszenmesinde toplumların gıda alışkanlıklarının önemli bir rolü olduğu gözlenmiştir. Bu konuda yapılan bilimsel çalışmalar gıda olarak kullanılan bazı ürünlerin sağlık üzerine yararlı etkilerinin olduğunu doğrulamıştır (Calay, 2010). Bunun sonucunda gıda maddesi olarak kullanılan bazı ürünlerin bir kısmı tıbbi amaçlarla pazarlanmaya başlanmıştır. Küreselleşen dünyada insanların ve toplumların uzayan yaşam süresinin yanı sıra nitelikli yaşam sürme ihtiyacı da ön plana çıkmıştır. Dünyada kaliteli yaşam sürmek isteyen kişiler, kimyasal ve sentetik ürünlerin yan etkilerinden kaçınmak için doğal yaşam tarzına ve doğal ürünler kullanmaya başlamıştır (Carlesen ve diğ., 2010).

GAG grubunda yer alan yüksek molekül ağırlıklı heteropolisakkarit yapıda bir molekül olan HA eklemlerin sinoviyal sıvılarında, gözün cam cisminde, kordon kanında, dermiste, sinir dokuda, gevşek bağ dokuda ve tükrükte bulunur. HA'nın patojenik, fizyolojik proseslerde embriyon gelişiminde, adezyonda, hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşmasında, inflamasyonda, yara iyileşmesinde, anjiyogenesiste ve tümör oluşumunda rolü olduğu bilinmektedir (Escalante ve diğ., 2000). HA eklemlerde önemli görevler üstlenmiştir. Yağlanma, su dengesi, matriks düzenlenmesi bu görevlerin başlıcalarıdır. HA inflamatuvar medyatörlerin salınımını ve etkilerini azaltarak lökosit proliferasyonu, kemotaksisi, migrasyonu ve fagositozu önler. Eklem sıvısında yeterli konsantrasyonda HA bulunması inflamatuvar prosesin oluşmasını engelleyerek kıkırdak dokunun korunmasını sağlar ve osteoartrit sürecini yavaşlatır.

Hyaluronidaz, bağ dokusunun ekstrasellüler matriksinde HA polisakkaritlerinin depolimerize olmasını sağlayan ve testis, dalak, göz, deri, karaciğer ve plasenta gibi organlarda ve gözyaşı, kan, sperm gibi vücut sıvılarında bulunan bir enzimdir (Chain ve Duthie, 1939). Bu enzim alerjik reaksiyonlar (Kakegawa ve diğ., 1985), kanser metaztazı, (Stern, 2008) ve inflamasyon ile ilgilidir (Leibovitch ve diğ., 2006).

Eski yıllarda, insan ve hayvan testikuler ekstraktlarında viral ajanların yayılmasını arttırıcı ajanlar bulunduğu tespit edilmiştir (Duran-Reynolds, 1928). Sığır testis hiyaluronidazının suni tohumlamada önemli derecede etkili olduğu da bildirilmiştir (Kaya, 2013).

Tümör hücrelerinde hiyaluronidaz enzim aktivitelerinin fazla miktarda bulunduğu gözlenmiştir. Nekrotik hücre tümörlerinde (Balazs ve Vonueuler, 1951; Cobbin ve Dicker, 1962) metastatik meme ve prostat kanserinde (Lokeshwar ve diğ., 2001; Wikstrom ve diğ., 2000) hiyaluronidaz aktivitesinin normal hücrelere göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

Ayrıca çeşitli çalışmalarda hiyaluronidaz enziminin endometriyum, ovaryum, meme kanserlerinin ilerlemesini sağladığı ve tümör hücrelerinde in vivo anjiogenezi desteklediği bildirilmektedir (Liu ve diğ., 1996; Tamakoshi ve diğ., 1997; Bertrand ve diğ., 1997; Novak ve diğ., 1999; Madan ve diğ., 1999;). Kanserli hastaların serumlarında (Fischer-Szfarz, 1968; Kolarova, 1975), karaciğer hastalıklarında (Snively ve Glick, 1950) ve bazı dermatolojik bozukluklarda (Grais ve Glick., 1948) hiyaluronidaz inhibitör aktivitesinin arttığı da görülmüştür.

Hiyaluronidaz enzim aktivitesinin artması ile bazı patolojik bozukluklar oluştuğu için bu enzim aktivitesinin azaltılması ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Sentetik olarak kullanılan ilaçların yan etkilerinin fazla olması nedeni ile doğal olan maddelere karşı olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır.

Bazı doğal ve sentetik bileşiklerin antihiyaluronidaz aktivitesine sahip olduğu çeşitli çalışmalarda ileri sürülmüştür (Jeong ve diğ., 1990; Gore ve diğ., 1996; Fong ve diğ., 1999).

Apigenin (Jeong ve diğ., 1999; Trochon ve diğ., 2000), indometazin (Szary ve diğ., 1975), aljinik asidin (Asada ve diğ., 1997), pektinin (Sawabe ve diğ., 1992), GAG' ların (Toida ve diğ., 1999) flavonoidlerin (Kuppusamy ve diğ., 1990), kurkumin, kumarin (Tonnesen, 1989), saponin (Facino ve diğ., 1995) ve antioksidanların (Girish ve diğ., 2005) HA'yı inhibe ettiği belirtilmiştir.

Daphne oleoides subsp. kurdica bitkisinin yara iyileştirici bir etki gösterdiği ve bu bitki ekstrelerinin antihiyaluronidaz aktivitesine sahip olduğu Süntar ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (Süntar ve diğ., 2012). *Clitoria ternatea* yaprak ekstraktının hiyaluronidaz ve elastaz inhibisyon etkisi gösterdiği Maity ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (Maity ve diğ., 2012).

Bitkilerle ilgili yapılan çalışmalarda *Tagetes erecta* linn çiçeklerinde (Maity ve diğ., 2011), *Triphala guggulu* (Sumantran ve diğ., 2007), *Ficus microcarpa* L. fil. bark (Ao ve diğ., 2010), *Cimicifuga* rizomlarında (Iwanaga ve diğ., 2010), *Meehania fargesii*'den izole edilen flavon glikozidleri ve siklik spermidin alkaloidlerinin (Murata ve diğ., 2010) hiyaluronidaz inhibitör aktivitesi gösterdiği bulunmuştur.

Sawabe deri ile ilişkili enzimler üzerine bazı bitkilerin tirozinaz, hiyaluronidaz ve elastaz inhibitör etkilerini incelemiş, çalışılan bitkilerin ancak bir kısmında antihiyaluronidaz aktivitesi saptanmıştır (Sawabe ve diğ., 1998).

Sarımsağın yaprak ve filizlerinde flavanol glikozidlerin ve aglikonların hiyaluronidaz aktivitesi saptanmış ve sarımsakta bulunan bu maddelerin farklı hiyaluronidaz inhibitör aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Kim ve diğ., 2005).

Üzüm ve turunçgillerde bol miktarda bulunan naringen' in hiyaluronidaz inhibitör aktivitesine sahip olduğu Moon ve arkadaşları tarafından saptanmıştır (Moon ve diğ., 2009).

Cucumis sativus meyvasının antioksidan, antihiyaluronidaz ve antielastaz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Elastaz ve hiyaluronidaz enzimlerinin *C. sativus* tarafından inhibe edilmesi ile bu bitkinin deri hastalıkları ve kozmetikte büyük bir öneme olduğu görülmüştür (Nema ve diğ., 2010).

Areca catechu bitkisinden elde edilen fenolik bileşiklerin antielastaz ve antihiyaluronidaz enzim aktivitesine sahip olduğu ve bitkiden saflaştırılan fenolik bileşiklerin yaşlanmaya karşı bağ doku proteinlerini koruduğu Lee ve arkadaşları tarafından öne sürülmüştür (Lee ve diğ., 2001).

Böğürtlenden (*Rubus fruticosus B.*) elde edilen bazı polifenol bileşiklerinin hiyaluronidaz inhibitör aktivitesi gösterdiği Marquina ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (Marquina ve diğ., 2002).

Ülkemizde en fazla yetişen bitkilerden biri olan kayısı, karoten bakımından oldukça zengin olan bir meyvedir. Halk arasında cilt güzelliği için kullanılır. Kayısı yağı cilt kuruluğu, saç dökülmesi, akne ve birçok deri ile ilgili hastalıklarda etkili bir üründür. Kayısının antielastaz aktivitesine sahip olduğu Gökteş (2012) tarafından saptanmıştır. Çalışmamızda kayısı yüksek bir oranda hiyaluronidaz enzimini inhibe etmiştir. Kayısının yapısında bulunan karotenoidler nedeni ile bu aktiviteye sahip olduğu öne sürülebilir.

Üzümsü meyvelerde bulunan antosiyanin, kuersetin, miristein ve ellaiik asid gibi fenolik bileşikler antikanserijen, antibakteriyel, antiviral ve antioksidan aktiviteye sahiptir. Genel olarak dut, çilek, böğürtlen, ahududu ve yaban mersini gibi meyvelerin antioksidan aktiviteleri çok yüksektir. Ülkemizde Akdeniz kıyılarında bol miktarda yetişen bir meyve olan muz, antioksidan özelliğe sahiptir. Muzun sıçanlarda UVB ile oluşturulan deri hasarını önlediği (Viyoch ve diğ., 2012) ileri sürülmüştür. Ayrıca muzun diyabetik sıçanlarda gastrointestinal sistemde meydana gelen hasarları önlediği Adewoye ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (Adewoye ve diğ., 2011). Yaban mersini Türkiye’de Karadeniz Bölgesinde oldukça fazla miktarda yetiştirilen, antioksidan özelliğe sahip bir bitkidir. Kan şekerini düzenler, idrar yollarını temizler, beyin sağlığını korur, antikanserijen ve doğal bir antidepresandır. Ayrıca, ağız içi yaralarını iyileştirir, ülser ve mide kramplarını önler, damar sertliğini giderir (Burdulis ve diğ., 2009; Yamaura ve diğ., 2012; Luo ve diğ., 2014).

Morus alba yani beyaz dut türünün yapraklarının anti-inflamavuar ve antitümör özellikleri Kumar ve Chauhan (2008) tarafından kanıtlanmıştır. Ayrıca Tetsuhiro ve diğ. (2007) tarafından yapılan çalışmada, dut yaprağının cilt hastalıklarının yanı sıra, gastrointestinal hastalıklarda, hipertansiyonda ve idrar salınımını kolaylaştırmada kullanıldığı açıklanmıştır. Çalışmamızda beyaz dutun hiyaluronidaz enzimini yüksek oranda inhibe ettiği bulunmuştur. Bu etkinin dutun içerdiği flavonoidlerden kaynakladığı öne sürülebilir.

Rutin P vitamini olup, suda çözünen bir vitamindir. Deneysel olarak oluşturulan hipertansiyonu azaltarak vasküler lezyonları önlediği Orbison ve Peters (1953) tarafından ileri sürülmüştür. Ayrıca yapılan diğer bir çalışmada, UV ışınlarıyla oluşturulan deri hasarı yapısında *Calendula officinalis* bitkisinde bulunan rutin koruyucu özelliğinden bahsedilmiştir (Fonseca ve diğ., 2010). Ayrıca rutin hiperkolesterolemik sıçanlarda oluşan toksisiteyi önlediği (Al-rejaie ve diğ., 2013), Alzheimer hastalığında oksidatif stresi azalttığı (Javed ve diğ., 2012), Parkinson hastalığında oksidatif strese karşı nöronları koruduğu (Khan ve diğ., 2012) ve diyabetik sıçan dokularında oluşan hasarı önlediği (Kamalakkannan ve Prince, 2006) de bildirilmiştir.

Aslam ve diğ. (2006) yaptıkları bir çalışmada narın antioksidan, antiinflamatuvar ve anti-kanserojen özelliklerinden dolayı cilt onarımını sağladığı bulunmuştur. Bu çalışma ile paralel olarak bizim yaptığımız çalışmada da nar IC_{50} 1.69 ± 0.41 $\mu\text{g/mL}$ değeriyle hiyaluronidaz enzimini inhibe etmiştir. Narın yapısında gallik asid, kojik asid, kuarsetin ve rutin gibi çeşitli bileşikler bulunmaktadır (Aviram ve diğ., 2000). Narın içinde bulunan bu bileşiklerden dolayı narın hiyaluronidaz enzimini inhibe ettiği düşünülebilir.

Bazı çalışmalarda tannik asit, kuarsetin, kaemfenol, apigenin gibi flavonoidlerin maymun sperminden ekstrakte edilen hiyaluronidaz enzimin kuvvetli bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (Li ve diğ., 1997). Salisilat ve indometazin (Szary ve diğ., 1975) gibi bazı antiinflamatuvar drogların hiyaluronidaz inhibitör aktivitesi gösterdiği (Mio ve Stern, 2002) belirtilmiştir. Heparin ve seksiterpen laktonların da hiyaluronidaz inhibitör aktivitesi gösterdiği literatürde belirtilmiştir (Machiah ve diğ., 2006). Bitkilerde bulunan gallik asid, tannik asid gibi flavonoidlerin antihyaluronidaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır (Srivastav ve diğ., 2010). Çalışmamızda gallik asidin asitler içinde en yüksek antihyaluronidaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Yapılan çeşitli çalışmalarda gallik asidin birçok türevinin analjezik, antialerjik, antikanserojen, antielastaz, antikollajenaz, antibakteriyel, antihepatotektik ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Göktaş, 2012). Ayrıca gallik asid ve esterleri gıda sanayinde katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. Çalışmamızda gallik asidin asitler içinde en yüksek antihyaluronidaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Gallik asidin

hiyaluronidaz enzimini yüksek oranda inhibe etmesinin nedeni yapısında bulunan hidroksi grupları nedeni ile olabilir.

Çeşitli hastalıklarda HAaz inhibitör aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Kortizon (Koda ve diğ., 1976) ve benzoilfenil benzoatların hiyaluronidaz enzimini inhibe ettiği Khanum ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (Khanum ve diğ., 2005).

Beta karoten A vitaminin ön maddesi olup antioksidan özelliğe sahip bir maddedir. A vitamininin deri ile ilgili hasarları önlediği literatürlerde belirtilmiştir (Kligman, 1986; Kligman ve Leyden, 1993; Fisher ve diğ., 1997; Varani ve diğ., 2000). Diabetik sıçanlarda hiyaluronidaz ve deri MMP-2 aktivitesinin arttığı (Takahashi ve Takasu, 2011) saptanmıştır. A vitamininin MMP aktivitesini inhibe ettiği de Takahashi ve Takasu tarafından belirtilmiştir (Takahashi ve Takasu, 2011). Çalışmamızda β -karotenin IC_{50} değerinin düşük değerde olduğu bulunmuştur. IC_{50} değerinin düşük olması bu maddenin enzimi yüksek oranda inhibe ettiğini göstermektedir. Ayrıca yapılan bir başka tez çalışmasında beta karotenin elastaz enzimini yüksek bir oranda inhibe ettiği gösterilmiştir (Göktaş, 2012). β -karotenin antioksidan özelliği yanında elastaz, hiyaluronidaz enzimlerini inhibe etmesi bu maddenin deri hastalıklarında, damar hastalıklarında, yaşlanmanın önlenmesinde, kanser ve inflamasyonun önlenmesinde etkili olabileceğini göstermektedir.

Antioksidanlar UV ışınlarını, DNA hasarını ve hücrede oluşan hasarları önler. Oral olarak alınan antioksidanların deride oluşan hasarları önlediği belirtilmektedir (Amer ve Maged, 2009). Vitamin E, vitamin C ve glutatyonun deride oluşan hasarları önlediği saptanmıştır (Amer ve Maged, 2009). Vitamin C ve türevlerinin antitumoral, antiviral ve antihiyaluronidaz aktivitelere sahip olduğu literatürlerde belirtilmiştir (Raic-Malic ve diğ., 2000, Botzki ve diğ., 2004).

Glutatyon (gama-glutamilsistein glisin), organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptiddir (Meister ve Anderson, 1983; Meister, 1983). Glutatyonun DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitesinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücre fonksiyonları dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rolü vardır (Meister ve Anderson, 1983; Meister 1983; Deneke ve Fanburg, 1989).

Amino asidler insan organizmasında sağlıklı ciltler ve iyi bir yaşam için gereklidir (Chiu ve Kimball, 2003). Cilt bakım ürünlerine bazı amino asidlerin katılması ile kırışıklıkların önlendiği bilinmektedir. Metionin yapısında metil grubu ve sülfidril grubu bulunan bir esansiyel amino asiddir. Metionin deri ile ilgili hastalıkların tedavisinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca Anabilim Dalımızda yapılan bir tez çalışmasında metioninin elastaz enzimi inhibe ettiği bulunmuştur (Göktaş, 2012). Metionin'in karaciğer hasarını (Caballero ve diğ., 2015), ve kırılğan saçların dökülmesinin önlendiği (Yun ve diğ., 2011) belirtilmektedir. Metioninin cisplatin ile oluşturulan nörotoksiteye karşı koruyucu bir rolü olduğu, Hidduja ve arkadaşları tarafından saptanmıştır (Hinduja ve diğ., 2014). Yapısında kükürt bulunan amino asidlerin diyabet ve diyabet ile ilgili komplikasyonları önlediği Manna ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada öne sürülmüştür (Manna ve diğ., 2013). Çalışmamızda metionin hiyaluronidaz enziminin sistein ile birlikte yüksek bir oranda inhibe etmiştir. Bunun nedeni her iki amino asidin yapısında da -SH gruplarının varlığı olabilir.

Sistein ve GSH'in enzimi yüksek oranda inhibe etmesinin sebebinin sistein ve GSH'da serbest -SH gruplarının bulunmasıdır. Glutasyon ve N-asetil sisteindeki -SH grupları antioksidan özelliğe sahiptir. Pei ve arkadaşları GSH ve NAC' nin MMP aktivitesi üzerinde inhibitör özellik gösterdiğini (Pei ve diğ., 2006) ileri sürmüştür.

Çalışmamızda kullandığımız bitki ekstraları ve kimyasal maddelerin tümünün hiyaluronidaz enzimini inhibe ettiği görülmüştür. Yüksek oranda hiyaluronidaz inhibitör etkisi gösteren bitki ekstraları ve kimyasal maddelerin hiyaluronidaz inhibitörü olarak deri, kanser ve romatizma hastalıklarında ilaç tedavisine ilave kullanımının uygun olabileceği öne sürülebilir. Ancak bu bitki ekstraları ve kimyasal maddelerin hiyaluronidaz enzim inhibisyonlarının *in vivo* deneylerle de kanıtlanması için ileri düzeyde çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abell, A.D., Ratcliffe, M.J., Gerrard, J., 1998, Ascorbic acid-based inhibitors of alpha-amylases, *Bioorganic medicinal chemistry letters*, 8, 1703-1706.
- Abramson, C., 1973, Staphylococcal hyaluronate lyase, *Contributions to microbiology and immunology*, 1, 376-389.
- Adewoye, E.O., Ige, A.O., Latona, C.T., 2011, Effect of methanolic extract of *Musa sapientum* leaves on gastrointestinal transit time in normal and alloxan induced diabetic rats: possible mechanism of action, *Nigerian journal of physiological*, 23, 83-88.
- Adina, B., 2008, The influence of viscoelastic substances on the corneal endothelium during cataract surgery by phacoemulsification, *Oftalmologia*, 52, 84-89.
- Allalouf, D., Ber, A., Ishay, J., 1975, Properties of testicular hyaluronidase of the honey bee and oriental hornet: Comparison with insect venom and mammalian hyaluronidases, *Comparative biochemistry physiology*, 50, 331-337.
- Al-Rejaie, S.S., Aleisa, A.M., Sayed-Ahmed, M.M., Al-Shabanah, O.A., Abuohashish, H.M., Ahmed, M.M., Al-Hosaini, K.A., Hafez, M.M., 2013, Protective effect of rutin on the antioxidant genes expression in hypercholesterolemic male Wistar rat, *BMC complementary and alternative medicine*, 13, 1-9.
- Altınışık, M., 2011, *Dokular* [online], <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-23.pdf> [Ziyaret Tarihi: 20.07.2012].
- Amer, M. and Maged, M., 2009, Cosmeceuticals versus pharmaceuticals, *Clinics in dermatology*, 27, 428-430.
- Ao, C., Higa T., Ming, H., Ding, Y., Tawata, S., 2010, Isolation and identification of antioxidant and hyaluronidase inhibitory compounds from *Ficus microcarpa* L. fil. Bark, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 25, 406-413.
- Asada, M., Sugie, M., Inoue, M., Nakagomi, K., Hongo, S., Murata, K., Irie, S., Takeuchi, T., Tomizuka, N., Oka, S., 1997, Inhibitory effect of alginic acids on hyaluronidase and on histamine release from mast cells, *Bioscience biotechnology biochemistry*, 61, 1030-1032.
- Aslam, M.N., Lansky, E.P., Varani, J., 2006, Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells, *Journal of ethnopharmacology*, 103, 311-318.

- Assis, C.M., Granda, R.F., Gambale, W., Shimizu, M.T., Paula, R., 2003, Biosynthesis of chondroitinase and hyaluronidase by different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Journal of medical microbiology*, 52, 479-481.
- Asteriou, T., Deschrevel, B., Delpech, B., Bertrand, P., Bultelle, F., Meria, C., 2001, An improved assay for the N-acetyl-D-glucosamine reducing ends of polysaccharides in the presence of proteins, *Analytical biochemistry*, 293, 53-59.
- Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., Fuhrman, B., 2000, Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient mice, *American journal of clinical nutrition*, 71, 1062-1076.
- Balazs, E.A., 2008, Hyaluronan as an ophthalmic viscoelastic device, *Current pharmaceutical biotechnology*, 9, 236-238.
- Balazs, E.A., Bland, P.A., Denlinger, J.L., 1991, Matrix engineering, *Blood coagulation & fibrinolysis*, 2, 173-178.
- Balazs, E.A., Denlinger, J.L., 1989, Clinical uses of hyaluronan, *Ciba found symposium*, 143, 265-75; *Discussion* 275-280, 281-285.
- Balazs, E.A., Euler, J.V., 1952, The hyaluronidase content of necrotic tumor and testis tissue, *Cancer research*, 12, 326-329.
- Balazs, E.A., Vonueuler, J.V., 1951, The hyaluronidase content of necrotic tumor and testis tissue, *Journal of cancer research*, 4, 326-329.
- Banerji, S., Ni, J., Wang S.X., Clasper, S., Su, J., Tammi, R., Jones, M., Jackson, D.G., 1999, LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan, *The journal of cell biology*, 144, 789-801.
- Bertrand, P., Girard, N., Duval, C.C., D'Anjou, J., Cahuziyi, C., Menard, J.F., Delpech, B., 1997, Increased hyaluronidase levels in breast tumor metastases, *International journal of cancer*, 73, 327-331.
- Bingöl, G., 1977, *Vitaminler ve Enzimler*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ders Kitap Serisi No: 46, Ankara.
- Bolarin, D.M. and Azinge, E.C., 2007, Biochemical markers, extracellular components in liver fibrosis and cirrhosis, *Nigerian quarterly journal of hospital medicine*, 17, 42-52.
- Bono, P., Wasenius V.M, Heikkila P., Lundin, J., Jackson, D.G., Joensuu, H., 2004, High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer, *Clinical cancer research*, 10, 7144-7149.

- Botzki, A., Rigden, D.J., Braun, S., Nukui, M., Salmen, S., Hoechstetter, J., Bernhardt, G., Dove, S., Jedrzejak, M.J., Buschauer, A., 2004, L-Ascorbic acid 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor. X-ray structure and molecular modeling of enzyme-inhibitor complexes, *Journal of biological chemistry*, 279, 45990-45997.
- Burd, D., Greco, R.M., Regauer, S., Longaker, M.T., Siebert, J.W., Garg, H.G., 1991, Hyaluronan and wound healing: A new perspective, *British journal of plastic surgery*, 44, 579-584.
- Burdulis, D., Sarkinas, A., Jasutiene, I., Stackevicene, E., Nikolajevs, L., Janulis, V., 2009, Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium Myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium Corymbosum* L.) fruits, *Acta poloniae pharmaceutica*, 66, 399-408.
- Caballero, V.L., Mendieta, J.R., Lombardo, D., Saceda, M., Ferragut, J.A., Conde, R., Giudici, A.M., 2015, Liver damage and caspase-dependent apoptosis is related to protein malnutrition in mice: Effect of methionine, *Acta histochemica*, 117, 126-135.
- Calay, Ö., 2010, *Tirozinaz enziminin bazı tıbbi bitkiler tarafından inhibisyonu*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Can, A., Akev, N., 2008, *Eczacılık fakültesi öğrencileri için biokimya dersleri*, İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi-İstanbul, 51-57.
- Carlsen, M.H., Halvorsen, B.L., Holte, K., Bohn, S.K., Drangland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willet, W.C., Philips, K.M., Jacobs, D.R., Blomhoff, R., 2010, The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide, *Nutrition journal*, 9, 1-11.
- Chain, E. and Duthie, E.S., 1939, Mucolytic enzyme in testis extracts, *Nature*, 144, 977-978.
- Chiu, A. and Kimball, A.B., 2003, Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage, *British journal of dermatology*, 149, 681-691.
- Chajara, A., Raoudi, M., Delpech, B., Leroy, M., 2000, Increased hyaluronan and hyaluronidase production and hyaluronan degradation in injured aorta of insulin resistant rats, *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology*, 20, 1480-1487.
- Chao, K.L., Muthukumar, L., Herzberg, O., 2007, Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis, *Biochemistry*, 46, 6911-6920.

- Chen, H.C., Shah, S., Stabler, T.V., Li, Y.J., Kraus, V.B., 2008, Biomarkers associated with clinical phenotypes of hand osteoarthritis in a large multigenerational family: The CARRIAGE family study, *Osteoarthritis cartilage*, 16, 1054-1059.
- Cherr, G.N., Yudin, A.I., Overstreet, J.W., 2001, The dual functions of GPI-anchored PH-20: Hyaluronidase and intracellular signaling, *Matrix biology*, 20, 515-525.
- Cobbin, L.B. and Dicker, S.E., 1962, Some characteristics of plasma and urine 'hyaluronidase', *Journal of physiology (London)*, 163, 168-174.
- Cramer, J.A., Bailey, L.C., Bailey, C.A., Miller, R.T., 1994, Kinetic and mechanistic studies with bovine testicular hyaluronidase, *Biochimica et biophysica acta*, 1200, 315-321.
- Csoka, A.B., Frost, G.I., Stern, R., 2001, The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes, *Matrix biology*, 20, 499-508.
- Csoka, A.B., Scherer, S.W., Stern, R., 1999, Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31, *Genomics*, 48, 63-70.
- Deneke, S.M. and Fanburg, B.L., 1989, Regulation of cellular glutathione, *The american journal of physiology*, 257, L163-L173.
- Deudon, E., Berrou, E., Breton, M., Picard, J., 1992, Growth-related production of proteoglycans and hyaluronic acid in synchronous arterial smooth muscle cells, *Journal of biological chemistry*, 24, 465-470.
- Dikmen, N. ve Özgünen, T., 2004, *Harper biyokimya*, Nobel Tıp Kitabevleri, s928.
- D'souza, M., Datta, K., 1986, Studies on the affinity of hyaluronic acid binding protein to glycosaminoglycans, *Biochemistry international*, 13, 89-100.
- Duran-Reynolds, F., 1928, Exaltation de l'activite du virus vaccinal par les extraits de certains organes, *Société biologie*, 99, 6-7.
- Dutorme, C., Merterns-Strijhagen, J., Tammi, M., Lamion, B., 2009, Two novel functions of hyaluronidase-2 (Hyal 2) are formation of the glycocalyx and control of CD44-ERM interactions, *Journal of biological chemistry*, 284, 33495-33508.
- Duthie, G.G., Duthie, S.J., Kyle, J.A.M., 2000, Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants, *Nutrition research reviews*, 23, 79-106.
- Engström-Laurent, A., Laurent, U.B., Lilja, K., Laurent, T.C., 1985, Concentration of sodium hyaluronate in serum, *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 45, 497-504.

- Escalante, T., Franceschi, A., Rucavado, A., Gutierrez, J.M., 2000, Effectiveness of batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*, *Biochemistry pharmacology*, 60, 269-274.
- Evanko, S.P., Angello, J.C., Weight, T.N., 1999, Formation of hyaluronan-and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells, *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*, 19, 1004-1013.
- Facino, R.M., Carini, M., Stefani, R., Aldini, G., Saibene, L., 1995, Anti-elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and sapogenins from *hedera-helix*, *aesculus-hippocastanum*, and *ruscus-aculeatus*-factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency, *Archiv der pharmazie*, 328, 720-724.
- Fisher, G.J., Wang, Z.Q., Data, S.C., Varani, J., Kang, S., Voorhees, J.J., 1997, Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light, *The new england journal of medicine*, 337, 1419-1428.
- Fischer-Szfarz, B., 1968, Demonstration of a new hyaluronidase inhibitor in serum of cancer patients, *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 128, 300-302.
- Fong, T.A.T., Shawver, L.K., Sun, L., Tang, C., App, H., Powell, T.J., Kim, Y.H., Schreck, R., Risau, W., Ullrich, A., Hirth, K.P., McMahon, G., 1999, SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types, *Cancer research*, 59, 99-106.
- Fonseca, Y.M., Catini, C.D., Vicentini, F.T., Nomizo, A., Gerlach, R.F., Fonseca, M.J., 2010, Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion, *Journal of ethnopharmacology*, 127, 596-601.
- Fraser, J.R.E., Laurent, T.C., Laurent, U.B.G., 1997, Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover, *Journal of internal medicine*, 242, 27-33.
- Freitas, J.P., Filipe, P., Emerit, I., 1996, Hyaluronic acid in progressive systemic sclerosis, *Dermatology*, 192, 46-49.
- Friedman, M., 1996, Food browning and its prevention: an overview, *Journal of agricultural and food chemistry*, 44, 631-653.
- Frost, G.I., Csoka, T., Stern, R., 1996, The hyaluronidases: A chemical, biological and clinical overview, *Trends in glycoscience and glycotechnology*, 8, 419-434.

- Frost, G.I., Csoka, A.B., Wong, T., Stern, R., 1997, Purification, cloning and expression of human plasma hyaluronidase, *Biochemical biophysical research communications*, 236, 10-15.
- Fukuda, K., Dan, H., Takayama, M., 1996, Hyaluronic acid increases proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage in the presence of interleukin-1, *Journal of pharmacology experimental therapeutics*, 277, 1672-1675.
- Girish, K.S., Jagadeesha, D.K., Rajeev, K.B., Kemparaju, K., 2002, Snake venom hyaluronidase: An evidence for isoforms and extracellular matrix degradation, *Molecular cell biochemistry*, 240, 105-110.
- Girish, K.S. and Kemparaju, K., 2005, Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides, *Biochemistry (Moscow)*, 70, 948-952.
- Girish, K.S. and Kemparaju, K., 2005a, A low molecular weight isoform of hyaluronidase: purification from Indian cobra (*Naja naja*) venom and partial characterization, *Biochemistry (Moscow)*, 70, 708-712.
- Girish, K.S. and Kemparaju, K., 2006, Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase: role in the management of poisonous bite, *Life science*, 78, 1433-1440.
- Girish, K.S., Kemparaju, K., Nagaraju, S., Vishwanath, B.S., 2009, Hyaluronidase inhibitors: A biological and therapeutic perspective, *Current medicinal chemistry*, 16, 2261-2288.
- Gore, M., A'Hern, R., Stankiewicz, M., Slevin, M., 1996, Tumour marker levels during marimastat therapy, *Lancet*, 348, 263-264.
- Göktaş, H., 2012, *Elastaz enzim inhibitörleri*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Grais, M.L. and Glick, D., 1948, Mucolytic enzyme systems. II. Inhibition of hyaluronidase by serum in skin diseases, *Journal of investigative dermatology*, 11, 259-273.
- Graue, E.L., Polack, F.M., Balazs, E.A., 1980, The protective effect of Na-hyaluronate to corneal endothelium, *Experimental eye research*, 31, 119-127.
- Guntenhoner, M.W., Pogrel, M.A., Stern, R., 1992, A substrate-gel assay for hyaluronidases activity, *Matrix biology*, 12, 388-396.
- Gunther, E., Ozegowski, J.H., Köhler, W., 1996, Occurrence of extracellular hyaluronic acid and hyaluronatylase in streptococci of groups A, B, C and G, *Zentralblatt für bakteriologie*, 285, 64-73.

- Guo, Y., Ma, J., Wang, J., Che, X., Narula, J., Bigby, M., Wu, M., Sy, M.S., 1994, Inhibition of human melanoma growth and metastasis in vivo by anti-CD44 monoclonal antibody, *Cancer research*, 54, 1561-1565.
- Gürdöl, F. ve Ademoğlu, E., 2006, *Enzimler*, Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 173.
- Haas, E., 1946, On the mechanism of invasion; antinvasin I, an enzyme in plasma, *Journal of biological chemistry*, 163, 63-88.
- Hascall, V.C., Marjors, A.K., De La Motte, C.A., Evanko, S.P., Wang, A., Drazba, J.A., Strong, S.A., Wight, T.N., 2004, Intracellular hyaluronan: A new frontier for inflammation?, *Biochimica biophysica acta*, 1673, 3-12.
- Henrissat, B. and Bairoch, A., 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, *Journal of biological chemistry*, 316, 695-696.
- Herman, M.P., Svatek, R.S., Lotan, Y., 2008, Urine-based biomarkers for the early detection and surveillance of non-muscle invasive bladder cancer, *Minerva urologicae nefrologica*, 60, 217-235.
- Hill, A.T., Bayley, D.L., Campbell, E.J., 2000, Airways inflammation in chronic bronchitis: The effects of smoking and alpha 1- antitrypsin deficiency, *European respiratory journal*, 15, 886-890.
- Hinduja, S., Kraus, K.S., Manohar, S., Salvi, R.J., 2014, D-Methionine protects against cisplatin-induced neurotoxicity in the hippocampus of the adult rat, *Neurotoxicity research*, DOI: 10.1007/s12640-014-9503-y.
- Hollman, P.C.H. and Arts, I.C.W., 2008, Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the science of food and agriculture*, 80, 1081-1093.
- Hynes, W.L. and Walton, S.L., 2000, Hyaluronidases of gram-positive bacteria, *FEMS microbiology letter*, 183, 201-207.
- Isoyama, T., Thwaites, D., Selzer, M.G., Carey, R.I., Barbucci, R., Lokeshwar, V.B., 2006, Differential selectivity of hyaluronidase inhibitors toward acidic and basic hyaluronidases, *Glycobiology*, 16, 11-21.
- Itano, N., Sawai, T., Atsumi, F., 2004, Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation, *Journal of biological chemistry*, 279, 18679-18687.
- Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hamaguchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki, Y., Miyauchi, S., Spicer, A.P., McDonald, J.A., Kimata, K., 1999, Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties, *Journal of biological chemistry*, 274, 2085-2092.

- Iwanaga, A., Kusano, G., Warashina, T., Miyase, T., 2010, Hyaluronidase inhibitors from “Cimicifugae Rhizoma” (a mixture of the Rhizomes of Cimicifuga dahurica and C. heracleifolia), *Journal of natural products*, 73, 573-578.
- Javed, H., Khan, M.M., Ahmad, A., Vaibhav, K., Ahmad, M.E., Khan, A., Ashafaq, M., Islam, F., Siddiqui, M.S., Safhi, M.M., Islam, F., 2012, Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type, *Neuroscience*, 210, 340-352.
- Jedrzejas, M.J. and Stern, R., 2005, Structures of vertebrate hyaluronidases and their unique enzymatic mechanism of hydrolysis, *Proteins*, 61, 227-238.
- Jeong, S.J., Higuchi, R., Ono, M., Kuwano, M., Kim, Y.C., Miyamoto, T., 1990, Cis-Hinokiresinol, a norlignan from Anemarrhena asphodeloides, *Journal nature(London)*, 348, 555-557.
- Jeong, S.J., Ahn, N.H., Kim, Y.C., Inagaki, M., Miyamoto, T., Higuchi, R., 1999, Norlignans with hyaluronidase inhibitory activity from Anemarrhena asphodeloides, *Planta medica*, 65, 367- 368.
- Kamalakkannan, N. and Prince, P.S.M., 2006, Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues, *Molecular and cellular biochemistry*, 293, 211-219.
- Kakegawa, H., Matsumoto, H., Satoh, T., 1985, Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase, *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 33, 642-646.
- Kato, S., Yamada, H., Terada, N., Masuda, K., Lenz, M.E., Morita, M., Yoshihara, Y., Henmi, O., 2005, Joint biomarkers in idiopathic femoral head osteonecrosis: Comparison with hip osteoarthritis, *Journal of rheumatology*, 32, 1518-1523.
- Kaya, M.O., 2013, *Yeni bir metodla hyaluronidaz enziminin saflaştırılması ve bazı bileşiklerin bu enzim üzerine etkilerinin araştırılması*, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu İ., 2000, *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, Erzurum.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu İ., 2004, *Biyokimya*. 2.Baskı, Bakanlar Matbaacılık, Erzurum.
- Kennedy, C.I., Diegelmann, R.F., Haynes, J.H., Yager, D.R., 2000, Proinflammatory cytokines differentially regulate hyaluronan synthase isoforms in fetal and adult fibroblasts, *Journal pediatric surgery*, 35, 874-879.
- Khan, J.A., Khan, F.A., Dilawar, M., Liaz, A., Khan, N.A., Mehmood, T., 2007, Serum hyaluronic acid as a marker of hepatic fibrosis, *Journal of college of physicians and surgeons pakistan*, 17, 323-326.

- Khan, M.M., Raza, S.S., Javed, H., Ahmad, A., Khan, A., Islam, F., Safhi, M.M., Islam, F., 2012, Rutin protects dopaminergic neurons from oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease, *Neurotoxicity research*, 22, 1-15.
- Khanum, S.A., Murari, S.K., Vishwanth, B.S., Shashikrnth, S., 2005, Synthesis of benzyl phenyl benzoates as effective inhibitions for phospholipase A2 and hyaluronidase enzymes, *Bioorganic and medicine chemistry letter*, 15, 4100-4104.
- Kim, E., Yamashita, M., Kimura, M., Honda, A., Kashiwabara, S., Baba, T., 2008, Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida, *International journal of developmental biology*, 52, 677-682.
- Kim, M., Kim, Y.C., Chung, S.K., 2005, Identification and in vitro biological activities of flavonols in garlic leaf and shoot: inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals, *Journal of the science of food and agriculture*, 85, 633-640.
- King, S.R., Hickerson, W.L., Proctor, K.G., 1991, Beneficial actions of exogeneous hyaluronic acid on wound healing, *Surgery*, 109, 76-84.
- Kligman, A.M., Leyden, J.J., 1993, Treatment of photoaged skin with topical tretinoin, *Skin pharmacology*, 6, 78-82.
- Kligman, L.H., 1986, Effects of all-trans-retinoic acid on the dermis of hairless mice, *Journal of the american academy of dermatology*, 15, 779-785.
- Koda, A., Nagai, H., Watanabe, S., Yanagihara, Y., Sakamoto, K., 1976, Inhibition of hypersensitivity reactions by a new drug, N(3',4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (N-5'), *Journal of allergy and clinical immunology*, 57, 396-407.
- Kolarova, M., 1975, Host-tumor relationship XXXIII. Inhibitor of hyaluronidase in blood serum of cancer patients, *Neoplasma*, 22, 435-439.
- Kosaki, R., Watanabe, K., Yamaguchi, Y., 1999, Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity, *Cancer research*, 9, 1141-1145.
- Kreil, G., 1995, Hyaluronidases a group of neglected enzymes, *Protein science*, 4, 1666-1669.
- Kumar, R.V. and Chauhan, S., 2008, Mulberry: Life enhancer, *Journal of medicinal plants research*, 2, 271-278.
- Kunudson, W., 1996, Tumor associated hyaluronan: providing an extracellular matrix that facilitates invasion, *American journal of pathology*, 148, 1721-1726.
- Kuppusamy, U.R., Khoo, H.E., Das, N.P., 1990, Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase, *Biochemical pharmacology*, 40, 397-401.

- Kuppusamy, U.R. and Das, N.P., 1991, Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidases, *Experientia*, 47, 1196-2000.
- Kuppusamy, U.R. and Das, N.P., 1993, Protective effects of tannic acid and related natural compounds on *Crotalus adamanteus* subcutaneous poisoning in mice, *Pharmacology toxicology*, 72, 290-295.
- Kuppusamy, U.R., Khoo, H.E., Das, N.P., 1990, Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase, *Experientia*, 47, 1196-2000.
- Kutlubay, Z., Engin B., Serdaroğlu, S., Tüzün, Y., 2010, Mezoterapide Kullanılan İlaçlar, *Dermatoloji akademî dergisi*, 1, 85-89.
- Laurent, T.C., 1987, Biochemistry of hyaluronan, *Acta otolaryngol (Stockh) (Suppl)*, 442, 7-24.
- Lee, K.K., Chot, J.J, Park, E.J., Choit, J.D., 2001, Anti-elastase and anti-hyaluronidase of phenolic substance from *Areca catechu* as a new anti-ageing agent, *International journal of cosmetic science*, 23, 341-346.
- Lehninger, A.L., 1988, *Biochemistry*, New York, Worth Publishers, Incorporated.
- Leibovitch, I., Tamblyn, D., Casson, R., Selva, D., 2006, Allergic reaction to hyaluronidase: a rare cause of orbital inflammation after cataract surgery, *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, 244, 944-949.
- Lepperdinger, G., Mullegger, J., Kreil, G., 2001, Hyal-2 less active, but more versatile?, *Matrix biology*, 20, 509-514.
- Lepperdinger, G., Strobl, B., Kreil, G., 1998, HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity, *Journal of biological chemistry*, 273, 22466-22470.
- Li, M.W., Yudin, A.I., VendeVoort, C.A., Sabeur, K., Primakoff, P., Overstreet J.W., 1997, Inhibition of monkey sperm hyaluronidase activity and heterologous cumulus penetration by flavonoids, *Biology of reproduction*, 56, 1383-1389.
- Li, M.W., Yudin, A.I., Robertson, K.R., Cherr, G.N., Overstreet, J.W., 2002, Importance of glycosylation and disulfide bonds in hyaluronidase activity of macaque sperm surface PH-20, *Journal of andrology*, 23, 211-219.
- Li, S. and Jedrzejewski, M.J., 2001, Hyaluronan binding and degradation by *Streptococcus agalactiae* hyaluronate lyase, *Journal of biological chemistry*, 276, 41407-41416.
- Li, S., Kelly, S.J., Lamani, E., Ferraroni, M., Jedrzejewski, M.J., 2000, Structural basis of hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase, *EMBO journal*, 19, 1228-1240.

- Li, S., Taylor, K.B., Kelly, S.J., Jedrzejewski, M.J., 2001, Vitamin C inhibits the enzymatic activity of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase, *Journal of biological chemistry*, 276, 15125-15130.
- Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W.F., Myles, D.G., Primakoff, P., 1994, A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg, *Journal of cell biology*, 125, 1157-1163.
- Lindqvist, U. and Laurent, T.C., 1992, Serum hyaluronan and aminoterminal propeptide of type III procollagen: Variation with age, *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 52, 613-621.
- Liu, D., Pearlman, E., Diaconu, E., Guo, K., Mori, H., Haqqi, T., Markowitz, T.S., Wilson, S., Sy, M.S., 1996, Expression of hyaluronidase by tumor cells induces angiogenesis in vivo, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states*, 93, 7832-7837.
- Lokeshwar, V.B., Cerwinka, W.H., Lokeshwar, B.L., 2005, HYAL1 hyaluronidase: A molecular determinant of bladder tumor growth and invasion, *Cancer research*, 65, 2243-2250.
- Lokeshwar, V.B., Obek, C., Pharm, H.T., Wei, D., Young, M.J., Duncan, R.C., Soloway, M.S., Block, N.L., 2000, Markers for bladder cancer detection and evaluation of grade, *Journal of urology*, 163, 348-356.
- Lokeshwar, V.B., Rubinowicz, D., Schroeder, G.L., Forgacs, E., Minna, J.D., Block, N.L., Nadji, M., Lokeshwar, B.L., 2001, Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells, *Journal of biological chemistry*, 276, 11922-11932.
- Luo, H., Lv, X.D., Wang, G.E., Li, Y.F., Kurihara, H., He, R.R., 2014, Anti-inflammatory effects of anthocyanins-rich extract from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) on croton oil-induced ear edema and *Propionibacterium acnes* plus LPS-induced liver damage in mice, *International journal of food sciences and nutrition*, 65, 594-601.
- Lydatakis, H., Hager, I.P, Kostadelou, E., Mpousmpoulas, S., Pappas, S., Diamantis, I., 2006, Non-invasive markers to predict the liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease, *Liver international*, 26, 864-871.
- Madan, A.K., Pang, Y., Wilkiemeyer, M.B., Yu, D., Beech, D.J., 1999, Increased hyaluronidase expression in more aggressive prostate adenocarcinoma, *Oncology reports*, 6, 1431-1433.
- Machiah, D.K., Gowda, T.V., Grish, K.S., 2006, A glycoprotein from a folk medical plant, *Withania somnifera*, inhibits hyaluronidase activity of snake venoms, *Comparative biochemistry physiology*, (Part C), 143, 158-161.

- Maier, L.A., 2002, Clinical approach to chronic beryllium disease and other nonpneumoconiotic interstitial lung disease, *Journal of thoracic imaging*, 17, 273-284.
- Maity, N., Nema, K.N, Abedy, M.K., Sarkar, B.K., Mukherjee, P.K., 2011, Exploring *Tagetes erecta* Linn flower for the elastase, hyaluronidase and MMP-1 inhibitory activity, *Journal of ethnopharmacology*, 137, 1300-1305.
- Maity, N., Nema, K.N., Sarkar, B.K., Mukherjee, P.K., 2012, Standardized *Clitoria ternatea* leaf extract as hyaluronidase, elastase and metalloproteinase-1 inhibitor, *Indian journal of pharmacology*, 44, 584-587.
- Manna, P., Das, J., Sil, P.C., 2013, Role of sulfur containing amino acids as an adjuvant therapy in the prevention of diabetes and its associated complications, *Current diabetes review*, 9, 237-248.
- Marquina, M.A., Corao, G.M., Araujo, L., Buitrago, D., Sosa, M., 2002, Hyaluronidase inhibitory activity from the polyphenols in the fruit of blackberry, (*Rubus fruticosus B.*), *Fitoterapia*, 73, 727-729.
- McArthur, J.D., McKay, F.C., Ramachandran, V., Shyam, P., Cork, A.J., Sanderson-Smith, M.L., Cole, J.N., Ringdahl, U., Sjobring, U., Ranson, M., Walker, M.J., 2008, Allelic variants of streptokinase from *Streptococcus pyogenes* display functional differences in plasminogen activation, *FASEB journal*, 22, 3146-3153.
- McKee, C.M., Penno, M.B, Cowman, M., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Bao, C., Noble, P.W., 1996, Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44, *Journal of clinical investigation*, 98, 2403-2413.
- Meister, A. and Anderson, M.E., 1983, Glutathione, *Annual review of biochemistry*, 52, 711-760.
- Meister, A., 1983, Selective modification of glutathione metabolism, *Science*, 220, 472-477.
- Menzel, E.J. and Farr, C., 1998, Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: Biochemistry, biological activities and therapeutic uses, *Cancer letters*, 131, 3-11.
- Meyer, M.F, Kreil, N.G., Aschauer, H., 1997, The soluble hyaluronidase from bull testes is a fragment of the membrane-bound PH-20 enzyme, *FEBS letters*, 413, 385-388.
- Meyer, K. and Palmer, J.W., 1934, The polysaccharide of the vitreous humor, *Journal of biological chemistry*, 107, 629-634.
- Meyer, K., 1971, *Hyaluronidase*. The Enzymes; 3rd ed.; Academic press: New York; pp: 307-320.

- Mio, K., Carrette, O., Maibach, H.I., Stern, R., 2000, Evidence that the serum inhibitor of hyaluronidase may be a member of the interalpha-inhibitor family, *Journal of biological chemistry*, 275, 32413-32421.
- Mio, K. and Stern, R., 2002, Inhibitors of the hyaluronidase, *Matrix biology*, 21, 31-37.
- Montesano, R., Kumar, S., Orci, L., Pepper, M.S., 1996, Synergistic effect of hyaluronan oligosaccharides and vascular endothelial growth factor on angiogenesis in vitro, *Laboratory investigation*, 75, 249-262.
- Moon, S.H., Kim, K.T., Lee, N.K., Han, Y.S, Nah, S.Y., Cho, S.G., Park, Y.S., Paik, H.D., 2009, Inhibitory effects of naringenin and its novel derivatives on hyaluronidase, *Food science and biotechnology*, 18, 267-270.
- Moreland, L.W., 2003, Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: Mechanisms of action, *Arthritis research & therapy*, 5, 54-67.
- Murata, T., Miyase, T., Yoshizaki, F., 2010, Cyclic spermidine alkaloids and flavone glycosides from *Meehania fargesii*, *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 58, 696-702.
- Nagata, H., Kojima, R., Sakurai, K., Sakai, S., Kodera, Y., Nishimura, H., Inada, Y., Matsushima, A., 2004, Molecular-weight-based hyaluronidase assay using fluorescent hyaluronic acid as a substrate, *Analytical biochemistry*, 330, 356-358.
- Nandi, A., Estess, P., Siegeman, M.H., 2000, Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial is mediated through the functionally active form of CD44, *Journal of biological chemistry*, 275, 14939-14948.
- Naor, D., Nedvetzki, S., Walmsley, M., Yayon, A., Turtey, E.A., Golan, I., 2007, CD44 involvement in autoimmune inflammations: The lesson to be learned from CD 44-targeting by antibody or from knockout mice, *Annals new york academy sciences*, 1110, 233-247.
- Nema, N.K., Maity, N., Sarkar, B., Mukherjee, P.K., 2010, *Cucumis sativus* fruit-potential antioxidant, anti-hyaluronidase, and anti-elastase agent, *Archives of dermatological research*, 303, 247-252.
- Nermeen, S., Safory, E., Fazary, A., Lee, C.K., 2010, Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives, *Carbohydrate polymers*, 81, 165-181.
- Noble, P.W. and Jiang, D., 2006, Matrix regulation of lung injury, inflammation, and repair: The role of innate immunity, *Proceedings of the american thoracic society*, 3, 401-404.

- Novak, U., Stylli, S.S., Kaye, A.H., Lepperdinger, G., 1999, Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells, *Cancer research*, 59, 6246-6250.
- Oettl, M., Hoehstetter, J., Asen, I., Bernhardt, G., Buschauer, A., 2003, Comparative characterization of bovine testicular hyaluronidase and a hyaluronate lyase from *Streptococcus agalactiae* in pharmaceutical preparations, *European journal of pharmaceutical science*, 18, 267-277.
- Okorukwu, O.N., Vercruyse, K.P., 2003, Effects of ascorbic acid and analogs on the activity of testicular hyaluronidase and hyaluronan lyase, *Journal of biological chemistry*, 276, 15125-15130.
- Olczyk, P., Komosinska-Vassev, K., Winsz-Szczotka, K., Kuznik-Trocha, K., Olczyk, K., 2008, Hyaluronan: Structure, metabolism, functions, and role in wound healing, *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej* (Online), 62, 651-659.
- Orbison, J.L., Peters, E., 1953, Failure of rutin and catechin to affect vascular lesions of experimental hypertension or hypersensitivity, *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 83, 173-175.
- Ozegowski, J. H., Gunther, E., Reichardt, W., 1994, Purification and characterization of hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae*, *Zentralblatt für bakteriologie*, 208, 497-506.
- Paulsson, M. and Heinegard, D., 1984, Noncollagenous cartilage proteins current status of an emerging research field, *College relationship research*, 4, 219-229.
- Pei, P., Horan, M.P., Hille, R., Hemann, C.F., Schwendeman, S.P., Mallery, S.R., 2006, Reduced nonprotein thiols inhibit activation and function of MMP-9: implications for chemoprevention, *Free radical biology & medicine*, 41, 1315-1324.
- Pfeiffer, J., 1954, *Enzymes, the physics and chemistry of life*, pp: 171-173.
- Pienimaki, J.P., Rilla, K., Fulop, C., Sironen, R.K., Karvinen, S., Pasonen, S., Lammi, M.J., Tammi, R., Hascall, V.C., Tammi, M.I., 2001, Epidermal growth factor activates hyaluronan synthase 2 in epidermal keratinocytes and increases pericellular and intracellular hyaluronan, *Journal of biological chemistry*, 276, 20428-20435.
- Poh, C.H., Yuen, R., Chung, M.C., Khoo, H.E., 1992, Purification and partial characterization of hyaluronidase from stonefish (*Synanceja horrida*) venom, *Comparative biochemistry and physiology*, 101, 159-163.
- Pogrel, M.A., Low, M.A., Stern, R., 2003, Hyaluronan (hyaluronic acid) and its regulation in human saliva by hyaluronidase and its inhibitors, *Journal of oral science*, 45, 85-91.

- Posey, J.T., Soloway, M.S., Ekici, S., Sofer, M., Civantos, F., Duncan, R.C., Lokeshwar, V.B., 2003, Evaluation of the prognostic potential of hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) for prostate cancer, *Cancer research*, 63, 2638-2644.
- Pozo, M.A., Balazs, E.A., Belmonte, C., 1997, Reduction of sensory responses to passive movements of inflamed knee joints by hylan, a hyaluronan derivative, *Experimental brain research*, 116, 3-9.
- Pritchard, D.G., Trent, J.O., Li, X., Zhang, P., Egan, M.L., Baker, J.R., 2000, Characterization of the active site of group B streptococcal hyaluronan lyase, *Proteins*, 40, 126-134.
- Rahmanian, M., Pertoft, H., Kanda, S., Christofferson, R., Claesson- Welsh, L., Heldin, R., 1997, Hyaluronan oligosaccharides induce tube formation of a brain endothelial cell line in vitro, *Experimental cell research*, 237, 223-230.
- Raic-Malic, S., Svedruzic, D., Gazivoda, T., Marunovic, A., Hergolg-Brundic, A., 2000, Synthesis and antitumor activities of novel pyrimidine derivatives of 2,3-O,O-dibenzyl-6-deoxy-L-ascorbic acid and 4,5-didehydro-5,6- dideoxy-L-ascorbic acid, *Journal of medicinal chemistry*, 43, 4806-4811.
- Raghavan, D., Simionescu, D.T., Vyavahare, N.R., 2007, Neomycin prevents enzyme-mediated glycosaminoglycan degradation in bioprosthetic heart valves, *Biomaterials*, 28, 2861-2868.
- Reissen, R., Wight, T.N., Pastore, C., Henley, C.B.A., Jeffrey, M., Isner, M.D., 1996, Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries, *Circulation*, 93, 1141-1147.
- Rigden, D.J., Jedrzejewski, M.J., 2003, Structures of Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase in complex with chondroitin and chondroitin sulfate disaccharides. Insights into specificity and mechanism of action, *Journal of biological chemistry*, 278, 50596-50606.
- Rooney, P., Kumar, S., Ponting, J., Wang, M., 1995, The role of hyaluronan in tumour neovascularization (review), *International journal of cancer*, 60, 632-636.
- Saitoh, H., Takagaki, K., Majima, M., Nakamura, T., Matsuki, A., Kasai, M., Narita, H., Endo, M., 1995, Enzymic reconstruction of glycosaminoglycan oligosaccharide chains using the transglycosylation reaction of bovine testicular hyaluronidase, *Journal of biological chemistry*, 270, 3741-3747.
- Salmen, S., Hoehstetter, J., Kasbauer, C., Paper, D.H., Bernhardt, G., Buschauer, A., 2005, Sulphated oligosaccharides as inhibitors of hyaluronidases from bovine testis, bee venom and *Streptococcus agalactiae*, *Journal of medicinal plants*, 71, 727-732.

- Sawabe, Y., Nakagomi, K., Iwagami, S., Suzuki, S., Nakazawa, H., 1992, Inhibitory effects of pectic substances on activated hyaluronidase and histamine-release from mast-cells, *Biochimica et biophysica acta*, 1137, 274-278.
- Sawabe, Y., Yamasaki, K., Iwagami, S., Kajimura, K., Nakagomi, K., 1998, Inhibitory effects of natural medicines on the enzymes related to the skin, *Yakugaku zasshi*, 118, 423-429.
- Schlag, G. and Redl, H., 1994, *Wound healing*, Berlin, Springer-Verlag, 136-143.
- Schiavon, L.L., Narciso-Schiavon, J.L., Carvalho, F.R.J., Sampaio, J.P., Medina-Pestana, J.O., Lanzoni, V.P., Silva, A.E., Ferraz, M.L., 2008, Serum levels of YKL-40 and hyaluronic acid as noninvasive markers of liver fibrosis in haemodialysis patients with chronic hepatitis C virus infection, *Journal of viral hepatitis*, 15, 666-674.
- Scott, J.E., Cummins, C., Brass, A., Chen, Y., 1991, Secondary structure of hyaluronate in solution, A ¹H-n.m.r. investigation at 300 and 500 MHz in [2H₆]dimethyl sulphoxide solution, *Biochemical journal*, 220, 197-205.
- Scott, J.E. and Heatley, F., 2002, Biological properties of hyaluronan in aqueous solution are controlled and sequestered by reversible tertiary structures, defined by NMR spectroscopy, *Biomacromolecules*, 3, 547-553.
- Simpson, M.A., Reiland, J., Burger, S.R., Furch, L.T., Spicer, A.P., Oegema, T.R., McCarthy, J.B., 2001, Hyaluronan synthase elevation in metastatic prostate carcinoma cells correlates with hyaluronan surface retention, a prerequisite for rapid adhesion to bone marrow endothelial cells, *Journal of biological chemistry*, 276, 17949-17957.
- Snively, G.G. and Glick, D., 1950, Mucolytic enzyme systems. X. Serum hyaluronidase inhibitor in liver disease, *Journal of clinical investigation*, 29, 1087-1090.
- Srivastav, A., Chandra, A., Singh, M., Jamal, F., Rastogi, P., Rajendran, S.M., Bansode, F.W., Lakshmi, V., 2010, Inhibition of hyaluronidase activity of human and rat spermatozoa *in vitro* and antispermatogenic activity in rats *in vivo* by Terminalia chebula, a flavonoid rich plant, *Reproductive toxicology*, 29, 214-224.
- Stern, R., 2003, Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet?, *Glycobiology*, 13, 105R-115R.
- Stern, R., 2008, Hyaluronidase in cancer biology, *Seminars in cancer biology*, 18, 275-280.
- Stern, R. and Jedrzejewski, M.J., 2006, Hyaluronidases: Their genomic structures, and mechanism of action, *Chemical reviews*, 106, 818-839.
- Sumantran, V.N., Kulkarni, A.A., Harsulkar, A., Welw, A., Koppikar, S.J., Chandwaskar, R., Gaire, V., Dalvi, M., Wagh, U.V., 2007, Hyaluronidase and

- collagenase inhibitory activities of the herbal formulation *Triphala guggulu*, *Journal of biosciences*, 32, 755-761.
- Suzuki, K., Terasaki, Y., Uyeda, M., 2002, Inhibition of hyaluronidases and chondroitinases by fatty acids, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 17, 183-186.
- Süntar, İ., Akkol, E.K., Keles, H., Yeşilada, E., Sarker, S.D., Arroo, R., Baykal, T., 2012, Efficacy of *Daphne oleoides* subsp. *Kurdica* used for wound healing: Identification of active compounds through bioassay guided isolation technique, *Journal of ethnopharmacology*, 141, 1058-1070.
- Szary, S.H., Kowalczyk-Bronisz S.H., Gioldanowski, J., 1975, Indomethacin as inhibitor of hyaluronidase, *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis (Warszawa)*, 23, 131-134.
- Takagaki, K., Nakamura, T., Izumi, J., Saitoh, H., Endo, M., 1994, Characterization of hydrolysis and transglycosylation by testicular hyaluronidase using ion- spray mass spectrometry, *Biochemistry*, 33, 6503-6507.
- Takahashi, N. and Takasu, S., 2011, A close relationship between type 1 diabetes and vitamin A-deficiency and matrix metalloproteinase and hyaluronidase activities in skin tissues, *Experimental dermatology*, 20, 899-904.
- Talbot, P., Geiske, C., Knoll, M., 1999, Oocyte pick up by the mammalian oviduct, *Molecular biology of the cell*, 10, 5-8.
- Tamakoshi, K., Kikkawa, F., Maeda, O., Sukanuma, N., Yamagata, S., Yamagata, T., Tomoda, Y., 1997, Hyaluronidase activity in gynaecological cancer tissues with different metastatic forms, *British journal of cancer*, 75, 1807-1811.
- Tammi, M.I., Day, A.J., Turley, E.A., 2002, Hyaluronan and homeostasis: A balancing act, *Journal of biological chemistry*, 277, 4581-4584.
- Tan, N.H. and Ponnudurai, G., 1992, Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms, *Comparative biochemistry and physiology*, 103, 299-302.
- Tekman, Ş. ve Öner, N., 1986, *Genel biyokimya*, Üçüncü baskı, Fatih Yayınevi-İstanbul, 351-367.
- Tetsuhiro, N., Keita, T., Yasuaki, G., Saori, G., Naoki, T., Kaeko, K., Masatoshi, I., Saburo, H., Akinori, A., Takeshi, K., Hazhiro, S., 2007, Mulberry leaf extract prevents amyloid beta-peptide fibril formation and neurotoxicity, *Neurology report*, 18, 813-816.
- Toida, T., Ogita, Y., Suzuki, A., Toyoda, H., Imanari, T., 1999, Inhibition of hyaluronidase by full O-sulfonated glycosaminoglycans, *Archives of biochemistry and biophysics*, 370, 233-241.

- Tonnesen, H.H., 1989, Studies on curcumin and curcuminoids. XIV. Effect of curcumin on hyaluronic acid degradation in vitro, *International journal of pharmacology*, 50, 91-95.
- Toole, B.P., 2001, Hyaluronan in morphogenesis, *Seminars in cell & developmental biology*, 12, 79-87.
- Toole, B.P., Ghatak, S., Misra, S., 2008, Hyaluronan oligosaccharides as a potential anticancertherapeutic, *Current pharmaceutical biotechnology*, 9, 249-252.
- Trochon, V., Blot, E., Cymbalista, F., Engelmann, C., Tang, R.P., Thomaidis, A., Vasse, M., Soria, J., Lu, H., Soria, C., 2000, Apigenin inhibits endothelial-cell proliferation in G(2)/M phase whereas it stimulates smooth-muscle cells by inhibiting p21 and p27 expression, *International journal of cancer*, 85, 691-696.
- Tu, A.T. and Hendon, R.R., 1983, Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading facto, *Comparative biochemistry and physiology*, 76, 377-383.
- Uğurlu, E., 2012, *Karbonik anhidrazın inhibisyonu*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Varani, J., Warner, R.L., Gharaee-Kermani, M., Phan, S.H., Kang, S., Chung, J.H., 2000, Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin, *Journal of investigative dermatology*, 114, 480-486.
- Vigrovich, V., Miller, A.D., Strong, R.K., 2005, Expression and characterization of a soluble, active form of the jaagsiekte sheep retrovirus receptor, Hyal2, *Journal of virology*, 79, 79-86.
- Viyoch, J., Mahingsa, K., İngkaninan, K., 2012, Effects of Thai musa species on prevention of UVB-induced skin damage in mice, *Food and chemical toxicology*, 50, 4292-4301.
- Voelcker, V., Gebhardt, C., Averbeck, M., Saalbach, A., Wolf, V., Weih, F., Sleeman, J., Andereqq, U., Simon, J., 2008, Hyaluronan fragments induce cytokine and metalloprotease upregulation in human melanoma cells in part by signalling via TLR4, *Experimental dermatology*, 17, 100-107.
- Watanabe, H., Cheung, S.C., Itano, N., Kimata, K., Yamada, Y., 1997, Identification of hyaluronan-binding domains of aggrecan, *Journal of biological chemistry*, 272, 28057-28065.
- Weigel, P.H., Hascall, V.C, Tammi, M., 1997, Hyaluronan synthases, *Journal of biological chemistry*, 272, 13997-14000.

- Wight, T.N., Kinsella, M.G., Qwarnström, E.E., 1992, The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation, *Current opinion cell biology*, 4, 793-801.
- Wikstrom, P., Bergh, A., Damber, J.E., 2000, Transforming growth factor-beta I and prostate cancer, *Scandinavian journal of urology and nephrology*, 34, 85-94.
- Willams, H.S., 1904, *Modern development of the chemical and biological sciences A History of science*, in five volumes, Harper and Brothers, New York.
- Wolf, R.A., Glogar, D., Chaung, L.Y., Garrett, P.R., Ertl, G., Tumas, J., Braunwald, E., Kloner, R.A., Feldstein, M.L., Muller, J.E., 1984, Heparin inhibits bovine testicular hyaluronidase activity in myocardium of dogs with coronary artery occlusion, *American journal of cardiology*, 53, 941-944.
- Yamaura, K., Shimada, M., Nakayama, N., Ueno, K., 2012, Protective effects of natsumikan (*Citrus natsudaikai*) extract on acetaminophen-induced lethal hepatotoxicity in mice, *Pharmacognosy research*, 4, 234-236.
- Yoshizaki, A., Iwata, Y., Komura, K., Hara, T., Ogawa, F., Muroi, E., Takenaka, M., 2008, Clinical significance of serum hyaluronan levels in systemic sclerosis: Association with disease severity, *Journal of rheumatology*, 35, 1825-1829.
- Yun, K., Ryu, C.S., Oh, J.M., Kim, C.H., Lee, K.S., Lee, H.S., Kim, B.H., Kim, S.K., 2011, Plasma homocystein level and hepatic sulphur amino acid metabolism in mice fed a high-fat diet, *European journal of nutrition*, 11, 294-300.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Hilal Demirbay Özmen
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	25.04.1985, Bakırköy
Telefon	0555 586 84 45
E-mail	hdemirbay34@hotmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/Kimya Anabilim Dalı/Biyokimya Programı	2015
Lisans	İ.Ü. Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü	2008
Lise	Osman Ülkümen Süper Lisesi	2002