

**ANTİTROMBOSİT İLAÇ HEDEFLERİ İÇİN BAZI
FİTOKİMYASALLARIN *İN SİLİCO* TARAMASI**

***İN SİLİCO* SCREENING OF SOME PHYTOCHEMICALS
FOR ANTIPLATELET DRUG TARGETS**

SHABNAM POURHANAFİ

PROF. DR. VİLDAN ADAR GÜRSOY
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA tezi olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

ANTİTROMBOSİT İLAÇ HEDEFLERİ İÇİN BAZI FİTOKİMYASALLARIN *İN SİLİCO* TARAMASI

Shabnam POURHANAFİ

Doktora, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Vildan Adar GÜRSOY

OCAK 2023, 179 sayfa

Kardiyovasküler hastalıklar (CVDs), dünya çapındaki ölümlerin ve hastalıkların en önemlilerinden biridir. Her yıl ortalama 17,9 milyon insan bu hastalıklar yüzünden hayatını kaybetmektedir. Bu rakamın 2030'a kadar 23,6 milyondan fazla olacağı tahmin edilmektedir. CVDs tedavisi ve önlenmesi için uzun süredir kullanılan birçok antitrombosit ilaç bulunmaktadır. Ancak bu ilaçlarda terapötik direnç, gastrointestinal kanama ve mide ülserleri gibi ciddi yan etkileri vardır. Bu nedenle daha güvenli ve daha etkili antitrombosit ilaç araştırmaları devam etmektedir.

Literatürde, geleneksel tıpta CVDs tedavisinde kullanıldığı bilinen **sedef otu** (*Ruta graveolens*), sarı kantaron (*Hypericum Perforatum*), **manolya** (*Magnolia Obovata*) , **vb.** bitkilerden ve doğal ürünlerden türetilmiş 50 fitokimyasalın (diktamin, rutin, magnolol, vs) insan ve hayvan deneylerinin olmasına rağmen, trombosit reseptörlerine bağlanma enerjileri ve özelliklerini içeren teorik bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez kapsamında bu fitokimyasalların trombosit işlevi üzerindeki engelleyici potansiyeli ve antitrombosit özellikleri moleküler modelleme yöntemleri kullanılarak 5 antitrombosit hedef için (**COX-1**, **P2Y12**, **GP-VI**, **PDE-3**, ve **PAR-1**) incelenecek ve etkileşim modları açıklanacak ve hesapsal biyolojik aktivite değerleri hesaplanarak, potansiyel ilaç adayı olma özellikleri konusunda bir değerlendirme yapılacaktır.

Çalışmamızın ilk aşamasında, Autodock Vina yönteminin doğruluğu kanıtlanmak için trombositlere ait üç-boyutlu yapı koordinatlarını içeren 3N8X, 4NTJ, 1SO2, 2GI7 ve 3VW7 kodlu yapılar kullanılarak validasyon çalışması yapılmıştır. Yapılan validasyon çalışmasında tüm RMSD değeri **2 Å** altında bulunup, Auto Dock Vina programının uygunluğu belirlenmiştir.

Daha sonra, antitrombosit özelliği bilinen ve CVDs tedavisinde kullanılan 14 bitkinin içerdiği 50 fitokimyasalın bilinen beş önemli antitrombosit hedefin aktif bölgesi ile nasıl etkileştiklerine Autodock Vina programı ile bakılmıştır ve her hedefe karşı en düşük enerjiye sahip en iyi kenetlenmiş bileşik seçilip ayrıntılı olarak analiz edilmiştir.

Üçüncü aşamada her hedefe karşı en iyi bağlanma enerjisine sahip bileşikler (COX-1'e karşı **graveolinin**, P2Y12 ve PDE-3'e karşı **sanguinarin**, kolajen'e karşı **rutin** ve PAR-1'e karşı **bisdemetoksikurkumin**) moleküler dinamik simülasyon çalışmalarına tabii tutulmuştur.

Dördüncü aşamada simüle edilen ligandlar ve proteinler arasındaki bağlanma stabilitesi moleküler mekanikler Poisson–Boltzmann yüzey alanı (MM-PBSA) bağlanma analizi ile doğrulanmıştır. MM-PBSA analiz sonuçları, kenetlenmiş tüm komplekslerde bağlanmanın ana katkı maddelerinin van der Waals etkileşimleri olduğunu göstermiştir. Polar solvasyon enerjisi, pozitif değeri nedeniyle bağlanma enerjisine katkıda bulunmazken, bileşenlerin geri kalanı yani van der Waals enerjisi, polar olmayan solvasyon enerjisi ve elektrostatik etkileşim enerjisi negatif değerleri ile etkileşim enerjisine ve sistemin kararlılığına önemli katkı sağlamışlardır. Bağlanma enerjisi ayrışma analizi, her kompleks için kalıntı katkısı başına ortaya çıkmıştır.

Çalışmanın son aşamasında bileşiklerin etkililiği ve biyoyararlanımı kontrol edilmiştir. Ligandların ilaç benzerliği, absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım

ve toksisite (ADMET) özelliklerini değerlendirmek için swissADME ve ADMETlab sunucuları kullanılmıştır

Bu çalışmadan elde edilen veriler yeni antitrombosit ilaç tasarım çalışmalarına katkıda bulunacaktır.

Anahtar kelimeler: ADMET, Antitrombosit ilaçlar, MM-PBSA, Moleküler doking, Moleküler dinamik simülasyon, ve Fitokimyasal.

ABSTRACT

***IN SILICO* SCREENING OF SOME PHYTOCHEMICALS FOR ANTIPLATELET DRUG TARGETS**

Shabnam POURHANAFI

PhD Degree, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Vildan ADAR GÜRSOY

JANUARY 2023, 179 pages

Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of death globally, with an estimated 17.9 million deaths each year, a number that is predicted to increase more than 23.6 million by 2030. There are many antiplatelet drugs which are being used for a long time to treat and prevent of CVDs. All of these drugs are accompanied by a diversity of adverse effects such as drug resistance, high bleeding risk and gastrointestinal toxicity. Thus researchers are seek for new antiplatelet agents with fewer or no side effects and better efficacy.

Ruta graveolens, Hypericum Perforatum, Magnolia Obovata, etc., which are known to be used in the treatment of CVDs in traditional medicine. Although there are human and animal experiments of some phytochemicals (dictamin, rutin, magnolol, etc.) of these plants, there is no theoretical study including their binding energies and properties to platelet receptors.

In this thesis, the inhibitory potential and antiplatelet properties of these phytochemicals on platelet function will be examined against 5 antiplatelet targets (COX-1, P2Y12, GP-VI, PDE-3, and PAR-1) using molecular modeling methods. Their interaction modes will be explained, and an evaluation will be made about potential drug candidates by calculating computational biological activity values.

Firstly to confirm the accuracy of docking simulation process, a redocking approach was performed using the coded structures 3N8X, 4NTJ, 1SO2, and 3VW7. All RMSD values were less than **2 Å** and this confirmed the reliability of molecular docking parameters and algorithms.

In the second part Compounds were docked to each of five antiplatelet targets, to calculate their binding affinity.

In the third step, Top five compounds with good binding energies viz., **graveolinine** against cox-1, **sanguinarine** against P2Y12 and PDE3, **rutin** against collagen and **bisdemethoxycurcumin** against PAR-1 were considered for molecular dynamic simulations. The simulated complexes confirmed the binding stability between the ligands and the proteins.

In the fourth step, Binding stability between simulated ligands and proteins was confirmed by molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area (MM-PBSA) binding analysis. The MM-PBSA analysis results indicated that in all docked complexes the major contributors of binding were van der Waals interactions. The polar solvation energy did not contribute to their binding energy due to its positive value, while the rest of the components viz van der Waals energy, non-polar solvation energy and electrostatic interaction energy with negative value made a significant contribution in interaction energy and stability of system. The binding energy decomposition analysis revealed per residue contribution for each complexes.

In the last part of the study, In order to check efficacy and bioavailability of compounds, swissADME and ADMETlab servers were used to evaluate the drug-likeness, absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) properties of them.

As a result The data obtained from this study will contribute to new antiplatelet drug design studies.

Keywords: ADMET, Antiplatelet drugs, MM-PBSA, Molecular docking, Molecular dynamics simulation, and Phytochemicals.

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca tezimin her aşamasında ilgi ve teővikleri ile beni destekleyen ve bilgi, birikim ve tecrübeleriyle yönlendiren ve ufkumu genişleten değerli tez danıőmanım Sayın Prof. Dr. Vildan. Adar. Gürsoy'a sonsuz teőekkürlerimi sunmaktan onur duyarım.

Ayrıca Hacettepe Üniversitesi Bilgisayar Destekli İlaç Tasarım Araştırma Grubunaki arkadaşlarım'a,

Her zaman bana sabırla yardımcı olup ve bütün yüreği ile yanımda olan sevgili eőim Shayan Barandeh'ye,

En önemlisi ise yaőamımın her evresinde olduğu gibi doktora çalıőmalarım süresince hep yanımda olan ve bana inanan en kıymetlilerim canım annem, babam ve kardeőlerim Farhad, Farid, ve özellikle motivasyon kaynağım olan biricik kızkardeőim Sogand pourhanifi' ye sonsuz teőekkürlerimi borç bilirim.

SHABNAM POURHANAFİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER	x
ÇİZELGELER	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar (CVDs)	3
2.2. Trombositler	5
2.3. Koagülasyon Sistemi Aktivasyonu	8
2.4. Antitrombosit İlaçlar	11
2.5. Antitrombosit etki gösteren Bitkiler ve Doğal Bileşikler	21
2.6. Bilgisayar-Destekli İlaç Tasarımı	30
2.7. Moleküler Kenetlenme (docking)	31
2.8. MD Simülasyonları	33
2.9. İlaç Benzerlik ve ADMET Tahminleri	37
3. MATERYAL VE METOTLAR	39
3.1.1. ZINC15 veritabanı	39
3.1.2. UCSF Chimera	40
3.1.3. AutoDock Vina	40
3.1.4. Gaussian09	41
3.1.5. MGL Tools	42
3.1.6. Ligplot.....	42
3.1.7. Ambertool	43
3.1.8. GROMACS	43
3.1.9. G_mmpbsa.....	43

3.1.10. SWISS-MODEL.....	44
3.2. ÇALIŞMA AŞAMALARI.....	46
3.2.1. Doking Yöntemi Validasyonu	48
3.2.2. Doking Hesaplamaları	48
3.2.3. MD Simülasyonlarının Yapılması	52
3.2.4. MM-PBSA Yöntemi Hesaplamaları	54
3.2.5. Moleküllerin İlaç Benzerlik ve ADMET Çalışmalar	55
4. SONUÇLAR	56
4.1. Fitokimyasalların Geometri Optimizasyonu.....	56
4.2. Validasyon Sonuçları	56
4.3. Fitokimyasallar ile Yapılan Doking Sonuçları.....	59
4.3.1. COX-1-Graveolinin Doking Sonuçları	60
4.3.2. P2Y12-Sanguinarin Doking Sonuçları	72
4.3.3. PDE-3-Sanguinarin Doking Sonuçları	84
4.3.4. GP-VI-Rutin Doking Sonuçları	96
4.3.5. PAR-1-BDMC Doking Sonuçları	108
4.4. Dinamik Simülasyon Hesaplamaları.....	120
4.4.1. COX-1-Graveolinin Kompleksinin MD Simülasyon Analizi.....	121
4.4.2. P2Y12-Sanguinarin MD Simülasyon Analizi.....	124
4.4.3. PDE-Sanguinarin MD Simülasyon Analizi	128
4.4.4. GP-VI-rutin MD Simülasyon Analizi	131
4.4.5. PAR-1-BDMC MD Simülasyon Analizi	135
4.5. MM-PBSA Bağlanma Serbest Enerjisi	138
4.6. İlaç Benzerliği Ve ADMET Özelliklerinin İncelenmesi	148
5.YORUMLAR	153
6.KAYNAKLAR	158
EKLER	171
ÖZGEÇMİŞ.....	171

ŞEKİLLER

Şekil 2. 1. WHO Verilerine Göre Küresel Ölüm Nedenleri 2000, 2010, ve 2019 .4	4
Şekil 2. 2.TÜİK Verilerine Göre Ölüm Nedenlerinin Oranı, 2018, 2019.5	5
Şekil 2. 3. Aktive Olmamış Ve Aktive Trombosit A) Aktif Olmamış, B) Aktive6	6
Şekil 2. 4 Trombositlerin Adezyon, Aktivasyon Ve Agregasyon Adımları8	8
Şekil 2. 5. Koagülasyon Kaskatının Şematik Gösterimi11	11
Şekil 2. 6. Günümüzde Kullanılan Antitrombosit İlaçlar12	12
Şekil 2. 7. Aspirinin Salisilik Asitten Yapılması13	13
Şekil 2. 8. Tiyenopiridin İlaçlarının Aktif Metabolitlerine Dönüşüm Yolları16	16
Şekil 2. 9. Vorapaksar İlacının Kimyasal Yapısı20	20
Şekil 2. 10. Berberis24	24
Şekil 2. 11. Kan Kökü25	25
Şekil 2. 12. Kınakına27	27
Şekil 2. 13. Bayka Kafatası28	28
Şekil 2. 14. Murraya29	29
Şekil 2. 15. Proteine Kenetlenen Küçük Molekül Gösterimi31	31
Şekil 2. 16. MD Simülasyon Hesaplama Şeması33	33
Şekil 3. 1. ZINC15 Veri Tabanı Anasayfası Görüntüsü39	39
Şekil 3. 2. Gaussian 5.0 View ile Kuersetin Molekülün Görünümü41	41
Şekil 3. 3. Graveolinin Ligandının Aminoasitlerle İki Boyutlu Etkileşimi42	42
Şekil 3. 4. ADMETlab Programı İle Değerlendirilebilecek ADMET Özellikleri45	45
Şekil 3. 5. Çalışma Aşamalarının Şematik Gösterimi47	47
Şekil 3. 6. Grid kutusunun gösterimi51	51
Şekil 3. 7. COX-1 için Örnek Konfigürasyon Dosyası51	51
Şekil 3. 8.Docking Hesaplaması Başlangıç Görüntüsü52	52
Şekil 3. 9. MM-PBSA Simülasyonları İçin Hazırlanan Scriptler55	55
Şekil 4. 1. Validasyon İşleminin Çıktı Dosyası56	56
Şekil 4. 2. COX-1'in Validasyon Sonuçları. (Altın Rengi Kristal Ligandın Orijinal Yapısı, Mavi Renk En İyi Değere Sahip Olan Ligand).57	57
Şekil 4. 3. P2Y12'in Validasyon Sonuçları. (Altın Rengi Kristal Ligandın Orijinal Yapısı, Mavi Renk En İyi Değere Sahip Olan Ligand).58	58

Şekil 4. 4. PDE-3'in Validasyon Sonuçları. (Altın Rengi Kristal Ligandın Orijinal Yapısı, Mavi Renk En İyi Değere Sahip Olan Ligand).	58
Şekil 4. 5. PAR-1'in Validasyon Sonuçları. (Altın Rengi Kristal Ligandın Orijinal Yapısı, Mavi Renk En İyi Değere Sahip Olan Ligand).	59
Şekil 4. 6. Graveolinin Log Dosyası	61
Şekil 4. 7. COX-1-graveolinin kompleksinin Doking Görüntüsü	62
Şekil 4. 8. Graveolinin Ligandının Aktif Bölge Etkileşimleri	62
Şekil 4. 9. Aspirin Ve Graveolinin'in Bağlanma Bölgelerinin Karşılaştırılması	63
Şekil 4. 10. Sanguinarin'in Log Dosyası	72
Şekil 4. 11. P2Y12-Sanguinarin kompleksinin Doking Görüntüsü	73
Şekil 4. 12. Sanguinarin ligandının Aktif Bölge Etkileşimleri	74
Şekil 4. 13. Klopidoğrel Ve Sanguinarin'in Bağlanma Bölgelerinin Karşılaştırılması	74
Şekil 4. 14. Sanguinarin Log Dosyası	84
Şekil 4. 15. PDE3-Sanguinarin Kompleksinin Doking Görüntüsü	85
Şekil 4. 16. Sanguinarin Ligandının Aktif Bölge Etkileşimleri	86
Şekil 4. 17. Silostazol Ve Sanguinarin'in Bağlanma Bölgelerinin Karşılaştırılması	86
Şekil 4. 18. Rutin'in Log Dosyası	96
Şekil 4. 19. GP-VI-rutin Kompleksinin Doking Görüntüsü	97
Şekil 4. 20. Rutin Ligandının Aktif Bölge Etkileşimleri	97
Şekil 4. 21. Hinokitol Ve Rutin'in Bağlanma Bölgelerinin Karşılaştırılması	98
Şekil 4. 22. BDMC Log Dosyası.....	108
Şekil 4. 23. PAR-1-BDMC Kompleksinin Doking Görüntüsü.....	109
Şekil 4. 24. BDMC Ligandının Aktif Bölge Etkileşimleri	109
Şekil 4. 25. Vorapaksar Ve BDMC'in Bağlanma Bölgelerinin Karşılaştırılması	110
Şekil 4. 26. COX-1-Graveolinin' İn RMSD Grafiği	121
Şekil 4. 27. Graveolinin'in COX-1'e Simülasyondan Önce Ve Sonra Bağlanma Konumu.....	122
Şekil 4. 28. Graveolin'in COX-1 İle Bağlanma Bölgesinin 2D ve 3D Görüntüsü	122

Şekil 4. 29. Aktif Bölgedeki Aminoasitl Ve Ligand Arasındaki Mesafe Değişikliği	123
Şekil 4. 30 Graveolinin Ligandının COX-1 İle RMSF Diyagramı	124
Şekil 4. 31. P2Y12-Sanguinarin'in RMSD Grafiği	125
Şekil 4. 32. Sanguinarin'in P2Y12'ye Simülasyondan Önce Ve Sonra Bağlanma Konumu.....	125
Şekil 4. 33. Sanguinarin P2Y12 İle Bağlanma Bölgesinin 2D Ve 3D Görüntüsü	126
Şekil 4. 34. Aktif Bölgedeki Aminoasit Ve Ligand Arasındaki Mesafe Değişikliği	127
Şekil 4. 35. Sanguinarin Ligandının P2Y12 İle RMSF Diyagramı	127
Şekil 4. 36. PDE-3-Sanguinarin'in RMSD Grafiği	128
Şekil 4. 37. Sanguinarin'in PDE-3'e Simülasyondan Önce Ve Sonra Bağlanma Konumu.....	129
Şekil 4. 38. Sanguinarin Ligandının PDE-3 Proteini İle Bağlanma Bölgesi 2D Ve 3D Görüntüsü.....	130
Şekil 4. 39. Aktif Bölgedeki Aminoasit Ve Ligand Arasındaki Mesafe Değişikliği	130
Şekil 4. 40. Sanguinarin Ligandının PDE-3 İle RMSF Diyagramı.....	131
Şekil 4. 41. Rutin-GP-VI'in Zamana Karşı RMSD Grafiği	132
Şekil 4. 42. Rutin 'in GP-VI'e Simülasyondan Önce ve Sonra Bağlanma Konumu.....	133
Şekil 4. 43. Rutin Ligandının GP-VI ile Bağlanma Bölgesi 2D Ve 3D Görüntüsü	133
Şekil 4. 44. Aktif Bölgedeki Aminoasit Ve Ligand Arasındaki Mesafe Değişikliği	134
Şekil 4. 45. GP-VI-rutin'in RMSF Diyagramı	134
Şekil 4. 46. PAR-1-BDMC'in RMSD Grafiği	135
Şekil 4. 47. BDMC'in PAR-1 Simülasyondan Önce Ve Sonra Bağlanma Konumu	136
Şekil 4. 48. BDMC Ligandının PAR-1 İle Bağlanma Bölgesi 2D Ve 3D Görüntüsü.....	136
Şekil 4. 49. Aktif Bölgedeki Aminoasit ve Ligand Arasındaki Mesafe Değişikliği	137

Şekil 4. 50. PAR-1-BDMC'in RMSF Diyagramı	138
Şekil 4. 51. COX-1-Graveolinin Kompleksindeki Önemli Aminoasitler Ve Bağlanma Enerjileri	140
Şekil 4. 52. Önemli Aminoasitlerin Ligand Molekülü ile Yerleşimi	141
Şekil 4. 53. P2Y12-Sanguinarin Kompleksindeki Önemli Aminoasitler Ve Bağlanma Enerjileri	141
Şekil 4. 54. Önemli Aminoasitlerin Ligand Molekülü ile Yerleşimi	142
Şekil 4. 55. PDE-3-sanguinarin Kompleksindeki Önemli Aminoasitler Ve Bağlanma Enerjileri	143
Şekil 4. 56. Önemli Aminoasitlerin Ligand Molekülü ile Yerleşimi	144
Şekil 4. 57. GP-VI-rutin Kompleksindeki Önemli Aminoasitler Ve Bağlanma Enerjileri	145
Şekil 4. 58. PAR-1-BDMC Kompleksindeki Önemli Aminoasitler Ve Bağlanma	146
Şekil 4. 59. Önemli Aminoasitlerin Ligand Molekülü ile Yerleşimi	147

ÇİZELGELER

Çizelge 2. 1. Pıhtılaşma Faktörleri ve Eş anlamları	9
Çizelge 2. 2. P2Y12 Antagonistleri ve Özellikleri	15
Çizelge 2. 3. GP1ıb/ıııa Antagonistleri ve Özellikleri	18
Çizelge 2. 4. PDE-3 İnhibitörleri ve Özellikleri	19
Çizelge 2. 5. Çalışmada Kullanılan Doğal Bileşiklerin Literatür taraması	22
Çizelge 2. 6. MD Simülasyonunda Kullanılan Popüler Kümeler	35
Çizelge 3. 1. Seçilen Antitrombosit İlaç hedefleri için Kullanılan PDB Kodları ...	49
Çizelge 4. 1. En iyi bağlanma değerine sahip bileşikler	60
Çizelge 4. 2. Fitokimyasalların Seri Halinde 3N8X İle Doking Sonuçları	61
Çizelge 4. 3. Fitokimyasalların Seri Halinde 4NTJ İle Doking Sonuçları	75
Çizelge 4. 4. Fitokimyasalların Seri Halinde 1SO2 İle Doking Sonuçları	87
Çizelge 4. 5. Fitokimyasalların Seri Halinde 2Gİ7 İle Doking Sonuçları	99
Çizelge 4. 6. Fitokimyasalların Seri Halinde 3VW7 İle Doking Sonuçları	111
Çizelge 4. 7. Sistemlerin Serbest Enerji Değerleri	138
Çizelge 4. 8. COX-1-Graveolinin Kompleksindeki Aminoasitlerin Enerji Katkıları	140
Çizelge 4. 9. P2Y12-Sanguinarin Kompleksindeki Aminoasitlerin Enerji Katkıları	142
Çizelge 4. 10. PDE-3-sanguinarin Kompleksindeki Aminoasitlerin Enerji Katkıları	144
Çizelge 4. 11. GP-VI-rutin Kompleksindeki Aminoasitlerin Enerji Katkıları	145
Çizelge 4. 12. PAR-1-BDMC Kompleksindeki Aminoasitlerin Enerji Katkıları	147
Çizelge 4. 13. Moleküllerin Farmakokinetik Özelliklerinin Analizi	149
Çizelge 4. 14. Bileşiklerin ADMET Özelliklerinin İnceleme Sonuçları	152

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ΔG_B	Bağlanma Enerjisi
μM	Mikromolar
Å	Angstrom
cal	Kalori
IC_{50}	Enzim katalizli bir reaksiyonun hızını yarıya indirmek için gerekli olan inhibitör konsantrasyonu
kcal	Kilokalori
K_i	İnhibasyon Sabiti
mol	Molekül

Kısaltmalar

AA	Araşidonik Asit
ADT	AutoDock Tools
ADP	Adenozin difosfat
BDMC	Bisdemetoksi kurkumin
CADD	Bilgisayar destekli ilaç tasarımı
COX	Sikloksijenaz
CAMP	Siklik adenozin monofosfat
CGMP	Siklik guanozin monofosfat
CVDs	Kardiovasküler hastalıklar
DMC	Demetoksi Kurkumin
Doking	Moleküler kenetleme
GP	Glikoprotein
MD	Moleküler Dinamik
NVT	Sabit hacim
NPT	Sabit basınç

PAR-1	Proteaz ile aktive edilen reseptör
PDE	Fosfodiesteraz
TXA2	Tromboksan A2
VWF	Von willebrand faktör
WHO	Dünya sağlık örgütü
PDB	Protein Veri Bankası

1. GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar (CVDs), dünyadaki mortalite ve morbidite nedenlerinin başında gelmektedir. Etkin tedavilerin olmasına rağmen pıhtı kaynaklı bu hastalıklar halen en ciddi ve en yaygın sağlık sorunudur. Tromboembolik olaylar esasen trombosit kaynaklı bir süreçtir. Trombositler, tromboz, koroner arter hastalığı, kalp krizi ve felç gibi arteriyel iskemik olayların gelişiminde önemli rol oynar. Bu yüzden trombosit fonksiyonlarını etkileyen farmakolojik tedaviler CVDs önlenmesi ve tedavisinin ayrılmaz bir parçasıdır. Günümüzde **antitrombosit** sınıfında yer alan ve kolajen, epinefrin, adenozin difosfat (ADP) ve trombin gibi önemli agonistlerin oluşumunu inhibe ederek trombosit agregasyonunu durduran birçok ilaç vardır. Ancak bu ilaçlarda direnç, gastrointestinal kanama ve mide ülserleri gibi yan etkiler olduğu ve kesin tedavi vaad etmedikleri için daha güvenli ve daha etkili antitrombosit ilaç araştırmaları devam etmektedir.

Bu bağlamda, tıbbi bitkiler ve doğal ürünler biyoaktif bileşenlerce zengin ve mükemmel farmakolojik etkilere sahip olduklarından, yeni antitrombosit ilaçların geliştirilmesi üzerine çalışan küresel ilaç firmaları için son derece önemli bir kaynak oluşturmaktadır.

Bu araştırmada **ilk kez** bilgisayar simülasyonları kullanılarak antitrombosit özelliği olduğuna dair deneysel çalışmalar bulunan **14 doğal bileşiğin** (sarı kantaron, manolya, Sedef otu, üzerlik, kan kökü, kınakına, berberis, zerdeçal, Baykal kafatası, biberiye, domates, murraya, propolis ve stefania) içindeki **50 fitokimyasalın** trombosit reseptörlerine karşı inhibe etme özellikleri araştırılarak CVDs tedavisinde ve istenmeyen yan etkilerini minimum düzeye indirebilecek yeni öncü bileşikler belirlenmiştir.

Amacımız fitokimyasalların bağlanma etkileşimlerini inceleyip en iyi bağlanmayı gösteren ve antitrombosit etki gösteren yeni potansiyel ilaç öncü bileşiklerinin mantıksal tasarlanmasında yol gösterici olmaktır.

Bu tez çalışması 5 aşamadan oluşmaktadır;

İlk aşamada, çalışmada kullanılan fitokimyasalların geometri optimizasyonu yapılarak moleküler kenetleme (docking) çalışmalarında kullanmak üzere kararlı konformasyonları

belirlenmiştir.

İkinci aşamada kullanılan AutoDock Vina programının validasyon testi **3N8X**, **4NTJ**, **1SO2**, ve **3VW7** kodlu enzimler için yapılmış ve RMSD değeri dikkate alınarak docking programın uygunluğuna bakılmıştır.

Üçüncü aşamada, tezde kullanılan 50 fitokimyasalın seçilen beş trombosit reseptörünün aktif bölgesi ile nasıl etkileştiği bilinmemesi üzere moleküler kenetlenme programı kullanılarak bu reseptörlerin aktif bölgesi ile nasıl etkileştiklerine bakılmıştır. Bağlanma enerjileri ve bağlanma modları detaylı olarak incelenmiştir.

Tezin dördüncü aşamasında en iyi skora sahip beş bileşik için **Moleküler dinamik (MD) simülasyon** gerçekleştirilmiştir. Simüle edilmiş kompleksler, ligandlar ve proteinler arasındaki bağlanma stabilitesi incelenmiş ve Molecular Mechanics/Poisson Boltzmann Surface Area yöntemi ile bağlanma enerjileri rafine edilmiştir.

Son olarak bileşiklerin ilaç benzerliği ve absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite (**ADMET**) özellikleri de tahmin edilmiştir.

Bu çalışmada, 14 doğal bileşik içerisinde bulunan 50 fitokimyasalın hesapsal aktivitesi ilk kez çalışılmıştır. Bu yönü ile CVDs üzerine alanında 5 hedef yapı ile yapılmış ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

Ayrıca hesaplama sonuçları CVDs tedavisinde kullanılabilecek yeni antitrombosit ilaçların keşfi konusunda yapılacak araştırmalara önemli katkıda bulunabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar (CVDs)

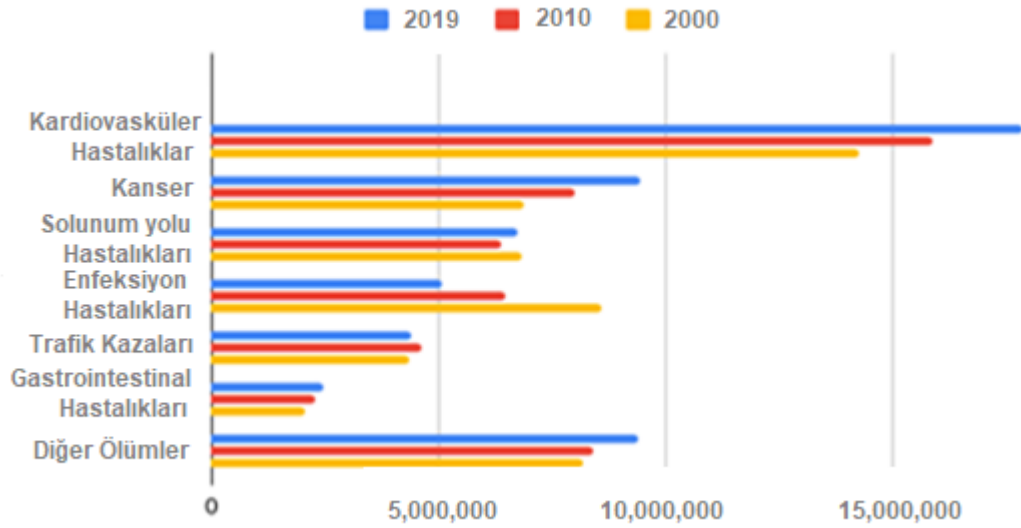
Kardiyovasküler sistem, metabolik işlevlerin, vücut ısısının ve pH'ın düzenlenmesi, homeostazın ve savunma mekanizmasının işleyişinin sağlanması için kalbi ve diğer sistemleri birbirine bağlayan kan damarlarını ve kalbi içerir [1].

Organ sistemlerini ve işlevleri kontrol eden karmaşık bir organ olan beyin merkezi kontrolü, vücudun çevredeki değişikliklere hızlı ve koordineli bir şekilde yanıt vermesini sağlar. Beynin normal faaliyeti kan dolaşımına bağlıdır. Kalpten beyne kan taşıyan iki büyük damar boynun her iki yanında uzanır. Kan damarları beyin damarlarına bölünmüştür. Beynin tüm bölgelerine oksijen ve besin taşırlar. Ayrıca, beynin olağan aktivitesi için iyi bir kan temini çok önemlidir. Bir dizi kan damarları ve kalp rahatsızlıkları ile beyindeki damar hastalıkları kalp damar hastalıkları olarak adlandırılır [2,3].

Kalp ve damar hastalıkları olarak da bilinen CVDs, insan vücudunun dolaşım sisteminin temel bileşenlerini olumsuz etkileyen tüm hastalıklara verilen genel bir isimdir. Koroner arter hastalıkları, periferik damar hastalıkları, romatizmal kalp hastalıkları, inme, kalp yetmezliği, hipertansif kalp hastalıkları, kalp kapak hastalığı, tromboembolik hastalıklar ve venöz tromboz gibi kalp ve kan damarlarında meydana gelen tüm hastalıkları bu gruba girer [4].

CVDs için birçok risk faktörü vardır. Bu risk faktörleri “davranışsal risk faktörleri, metabolik risk faktörleri ve diğer risk faktörleri” olarak 3 gruba ayrılır. Davranışsal risk faktörleri, kötü beslenme ve hareketsizlik olarak belirtilmiştir. Yaşam tarzını ilgilendiren bu davranışsal risk faktörleri bu hastalıklarının %80'inden sorumludur. Metabolik risk faktörleri ise hipertansiyon, yüksek kan şekeri seviyeleri, yüksek kan lipidleri ve kolesterol, aşırı kilo ve obezite olarak belirtilmiştir. CVDs için diğer ana risk faktörleri; düşük ekonomik durum, düşük eğitim seviyesi, yaş, cinsiyet, genetik eğilim ve stres, depresyon ve aşırı homosistein seviyeleri gibi psikolojik faktörlerdir [5].

CVDs, dünya çapında vefat etme sebepleri içinde birinci sırada bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün raporuna göre bu hastalıklar her sene yaklaşık olarak 17 milyon insanın vefat etmesine neden olur. Bu rakam bütün vefat edenlerin ortalama 3' te 1'ini oluşturur [6]. CVDs sürekliliği, gelişmiş devletlerde düşmesine rağmen gelişmekte olan devletlerde ise yükselmektedir. 2000 yılında CVDs nedeniyle hayatını kaybedenlerin sayısı 14,2 milyon iken bu sayı 2010 yılında 15,9 milyona, 2019 yılında ise 17,9 milyona yükselmiştir. Benzer seyir devam ettiği taktirde, bu sayının 2030 yılına kadar artış göstererek, 23,6 milyonu aşması bekleniyor (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1. WHO Verilerine Göre Küresel Ölüm Nedenleri 2000, 2010, ve 2019 [7]

CVDs dünyada olduğu gibi türkiyede de en çok ölüme ve sakatlığa neden olan hastalıkların başında gelmektedir. Her yıl 150.000 – 200.000 insan bu hastalıklardan hayatını kaybediyor [8]. Türkiye İstatistik Kurumunun verilerine göre CVDs 2018 senesinde ölümlerin yüzde 38,4'sını oluşturarak birinci sırada yer almaktadır. Vefat etme sebepleri 2019 yılında da yer değiştirmedir. Yüzde 36,8 oranıyla CVDs bağlı ölümler birinci sırada yer aldı [9, 10] (Şekil.2. 2.).



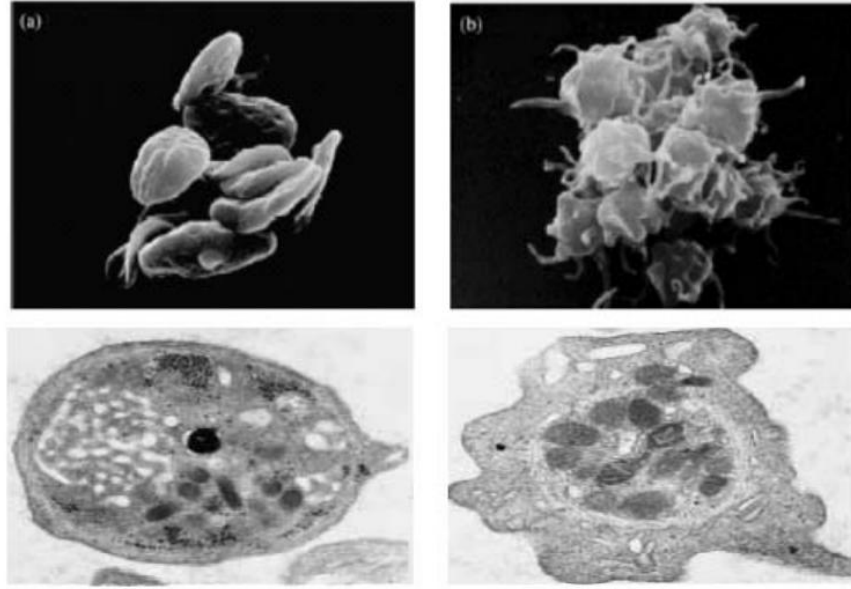
Şekil 2. 2.TÜİK Verilerine Göre Ölüm Nedenlerinin Oranı, 2018, 2019.

2.2. Trombositler

2.2.1. Trombositlerin yapı ve Fonksiyonları

Trombositler, ortalama 2-3 mm çapında ve 0,5 mm kalınlığında özel çekirdeksiz, yuvarlak veya oval kan hücreleridir. Trombositler, poliploid hematopoietik hücreler olan **megakaryositlerden** oluşmaktadır. Önemli hematolojik öncüler olan megakaryositlerin her biri binlerce trombositin salınmasına sebep olurlar. Trombositlerin ortalama ömürleri 10 gün ile sınırlıdır ve kandaki normal konsantrasyonları mm^3 te 150.000 ile 300.000 arasındadır. Ana işlevleri, damar sistemi taramak ve yaralanma veya lezyon bölgesine bağlanarak endotel hasarına yanıt vermektir. Bu nedenle, pıhtılaşma sürecinin önemli bir bileşenidir [11].

İnaktif trombositler diğer trombositlerle veya kan damarı duvarları ile etkileşime girmezler. Vasküler yaralanma sonrasında hücreler ve ligandları arasında önemli etkileşimler gerçekleşir ve trombositler hasarlı yüzeye hızla yapışarak pıhtılaşma basamaklarını başlatırlar (Şekil 2. 3). Trombositlerin endotelin yüzeyel lezyonlarına yapışması, örneğin aterosklerotik plakların yırtılmasından sonra, **kalp krizi** ve **felce** yol açan en yaygın mekanizmalar olan patolojik pıhtı ve damar tıkanıklığına da neden olabilir [12].



Şekil 2. 3. (A) Aktive Olmamış Trombosit.(B) Aktive Olmuş trombosit [13]

Bu karışık biyokimyasal ve hücre sel süreci trombositlerin **adezyon**, **aktivasyon**, ve **agregasyon** ile etkileşimleri olmak üzere 3 kategori altında inceleyebiliriz [14] (Şekil.2.4.).

2.2.1.1. Adezyon

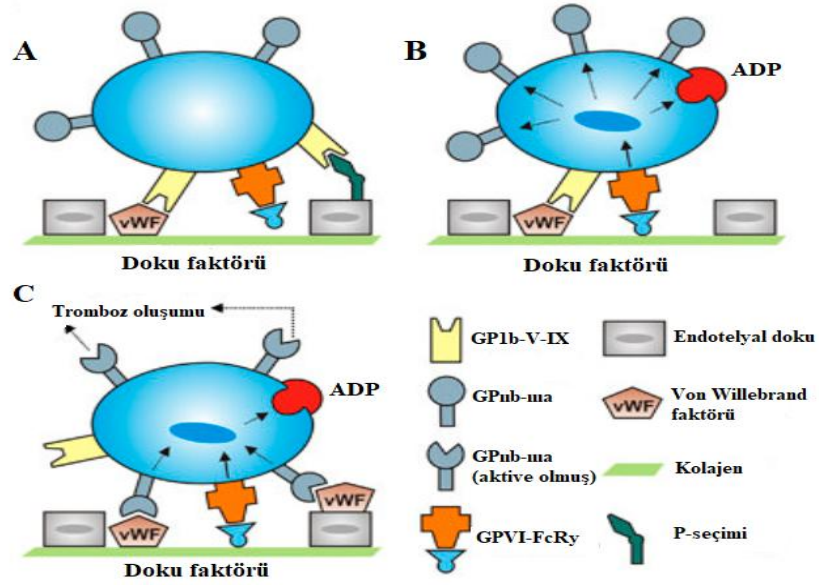
Normal fizyolojik dönemde trombositler birbirleri veya endotel hücreleri ile etkileşime girmeden dolaşırlar. Bununla birlikte, bir damar hasarı bölgesi oluştuğunda, geçen trombositler saniyeler içinde endotelyuma yapışır. Bu etkileşim, kolajen, von Willebrand Faktör (vWF), fibronektin, laminin ve trombospondin dâhil olmak üzere subendotelyal matriks proteinleri aracılığı ile gerçekleşir. Trombosit bu bileşenlerle etkileşime girerek, kan akışı tarafından oluşturulan yüksek kaydırıcı kuvvetlerin üstesinden gelmek ve hedef bölgeye bağlanmasına yardımcı olan bir dizi yüzey membran reseptörüne sahiptir. Kolajen, subendotelyal matriksin en trombojenik bileşenidir, ancak trombositin glikoprotein (GP) reseptörü ile etkileşimini stabilize etmek için vWF'de ihtiyaç duyar. VWF, endotel duvarındaki subendotelyal kolajene yapışan yapışkan uzatmalar ile trombositlerin form değiştirmesine neden olur [15].

2.2.1.2. Aktivasyon

Trombositler subendotelyal kolajene yapıştıktan sonra aktive olurlar. Kolajen ve vWF'nin trombosit reseptörlerine bağlanması, trombosit içinde kalsiyumun aracılık ettiği hücre içi sinyalleri tetikler. Buda ADP ve serotonin içeren depolama veziküllerinin degranülasyonuna, tromboksan A2 (TxA2) sentezine ve GP IIb/IIIa reseptörünün yüzey popülasyonunda bir artışa neden olur. Aynı zamanda, dolaşımdaki TxA2 ve ADP, trombin ve epinefrin gibi diğer çözümlü agonistler ile uyum içinde, yapışık trombositlere bağlanır ve sinerjik olarak aktivasyonlarını indükler. Böylece trombosit aktivasyonu birkaç ikincil geri besleme yolu ile güçlendirilir [16, 17].

2.2.1.3. Agregasyon

Agregasyon süreci, çeşitli yapışma proteinlerini bağlayan trombosit yüzeyindeki GP IIb/III reseptörleri ile düzenlenir. Bu reseptörler, dinlenme durumunda ligandları için düşük afiniteye sahiptir, ancak trombosit aktivasyonu sırasında yukarı regüle edilir ve işlevsel hale gelir [18]. GP IIb/IIIa reseptörleri tarafından bağlanan en önemli adezyon moleküllerinden biri fibrinojendir. Trombosit aktivasyonu bu reseptörlerin yüzey yoğunluğunu arttırdığından, daha fazla fibrinojen bağlanabilir ve bu da trombin aracılı fibrine dönüşüm için daha yüksek konsantrasyonları erişilebilir hale getirir. Aynı zamanda, yapışık trombositlerin yüzeyindeki GP IIb/IIIa reseptörleri, vWF, ve fibronektin gibi diğer çözümlü yapışma proteinlerini hareketsiz hale getirir. Toplamda, bu süreçler yaralanma bölgesine daha fazla trombosit çeker ve fibrinojenin bağlanması, bu yeni gelenlerle fibrin çapraz bağlanmasını teşvik eder fibrin daha sonra yapıyı güçlendirerek trombosit agregasyonunun, tromboz oluşumunun ve büyümesinin devam etmesine izin verir [19].



Şekil 2. 4. Trombositlerin adezyon, aktivasyon ve agregasyon Adımları. (A) Trombositlerin (GP)Ib-V-IX ve vWF gibi subendotelyal yapılara yapışması ve adezyonun gerçekleşmesi. (B) Trombozun stabilize olması, ADP, txA2 gibi agonistlerinin salınması ve aktivasyonun başlaması (C) Aktivasyon sonunda GPIIb/IIIa ve vWF aracılığı ile trombosit agregasyon oluşumu ve trombüs büyümesi.

2.3. Koagülasyon Sistemi Aktivasyonu

Günümüzde kullanılan koagülasyon mekanizmasının temeli, 19. yüzyılın başlarında Schmidt ve Morawitz'in ortaya çıkardığı koagülasyon şemasına dayanmaktadır. Kanda pıhtılaşmasını etkileyen 50'den fazla madde bulunmaktadır. Pıhtılaşmayı hızlandıranlar prokoagülan ve onu inhibe edenler ise antikoagülan maddeler olarak adlandırılır [20]. Pıhtı mekanizmasının gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini bu iki grup arasındaki denge belirler. Normal koşullar altında antikoagülan maddeler baskınken, damar hasarlandığında prokoagülanlar baskınlaşır ve pıhtı oluşumu gerçekleşir.

Pıhtılaşmada reaksiyonlarında yer alan faktörlere kan-pıhtılaşma faktörleri adı verilir. Bu faktörler karaciğer parankim hücrelerinde üretilir ve çoğu inaktif formdadır. Aktivasyon gerçekleştikten sonra bu faktörler enzimatik etkileri ile

mekanizmada rol alırlar. Kanın pıhtılaşma faktörleri Çizelge 2. 1. de görülmektedir. Numaralandırma bulunuş sıralarına göre verilmiştir.

Çizelge 2. 1.Pıhtılaşma Faktörleri ve Eşanlamları

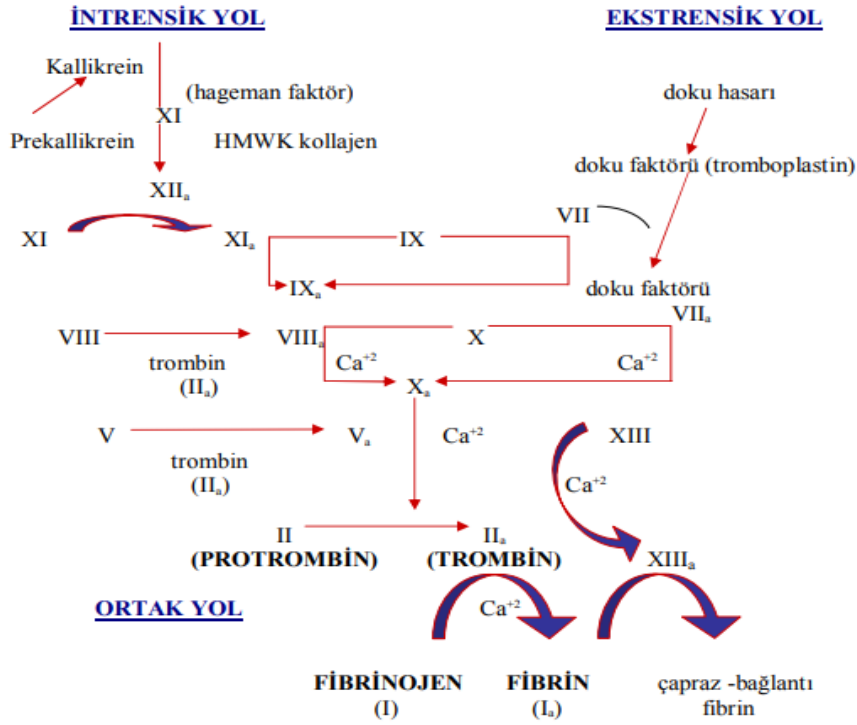
Fibrinojen	FAKTÖR I
Protrombin	FAKTÖR II
Doku faktörü, doku tromboplastin	FAKTÖR III
Kalsiyum	FAKTÖR IV
Proakselerin labil faktör	FAKTÖR VI
protrombin konversiyon. Akseleratörü, Prokonvertin, stabil faktör	FAKTÖR VII
Antihemofilik faktör. antihemofilik globulin,	FAKTÖR VIII
Plazma tromboplastin komponent, christmas faktör, antihemofilik faktör b	FAKTÖR IX
Stuart faktör, stuart-prower faktör	FAKTÖR X
Plazma tromboplastin, antihemofilik faktör c	FAKTÖR XI
Hageman faktör	FAKTÖR XII
Fibrin stabil edici faktör	FAKTÖR XIII
Prekallikrein	FLETCHER
Fletcher yüksek molekül ağırlıklı kininojen	FİTZGERALD

Hemostaz, önemli bir aktivasyon olmadıkça etkilenmezken koagülasyon çok düşük seviyelerde bile gerçekleşir. Koagülasyon sisteminin aktivasyonu **ekstrinsik** ve **intrinsik** olmak üzere iki yol ile gerçekleşir (Şekil.2. 5).

Koagülasyonun daha uzun yolu olan intrinsik yol direkt olarak kanın travmaya uğramasıyla aktive olur. Bu aktivasyondan sonra trombositler ve faktör XII'a değişime uğrar. Faktör XII Endotel kolajenine maruz kaldıktan sonra Faktör XIIA'ya dönüşür. Faktör XIIA, faktör XI'i enzimatik olarak faktör XIA'ya aktive etmek için bir katalizör görevi görür. Faktör XIA daha sonra faktör IX'u faktör IXA'ya, aktive etmeye devam eder. Buda faktör X'in faktör Xa'ya dönüş ile

sonuçlanır. Bu aşama ekstrinsik yolun son aşaması ile aynıdır. Aktif Faktör X, trombosit ve faktör V'nin birleşmesi ile protrombini trombine dönüştürür [23]. Bu adımlar kalsiyuma gereksinim duyar ve fosfolipid bağımlıdır. Bu olaylar ayrıca bir dizi zincirleme reaksiyonla gerçekleşir ve Her faktör etkinleştirildiğinde, sonraki birçok faktör etkinleşir.

Ortak yol aktivasyonu faktör Xa'ya aktive olan faktör X'te başlar. Aktifleştirilmiş faktör Xa, protrombinaz kompleksini oluşturmak için fosfolipid yüzeylerdeki kofaktör, aktive faktör V ve kalsiyum ile birleşir. Bu kompleks sonunda aktivasyon peptidi olan Protrombini parçalayarak Protrombinin trombine dönüştürülmesine yardımcı olur. trombin tekrar tekrar pıhtılaşma faktörlerini aktive ederek ve trombositlerin agregasyonunu ve aktivasyonunu uyararak koagülasyon zincirinin yayılmasına sebep olur. Her seferinde aktive olan ve çoğalan pıhtılaşma faktörleri protrombini trombine dönüştürür. Trombin, pıhtılaşma olayının en önemli adımı olan fibrinojenin fibrine dönüşümünü sağlar. Ayrıca intrinsik yoldaki diğer faktörlerin yanı sıra kofaktör V, VIII ve faktör XIII'ü aktive eder. Fibrin alt birimleri, fibrin ipliklerini oluşturmak için bir araya gelir ve faktör XIII, fibrin liflerini birbirine bağlar. Bu da, pıhtının stabilize edilmesine yardımcı olur.

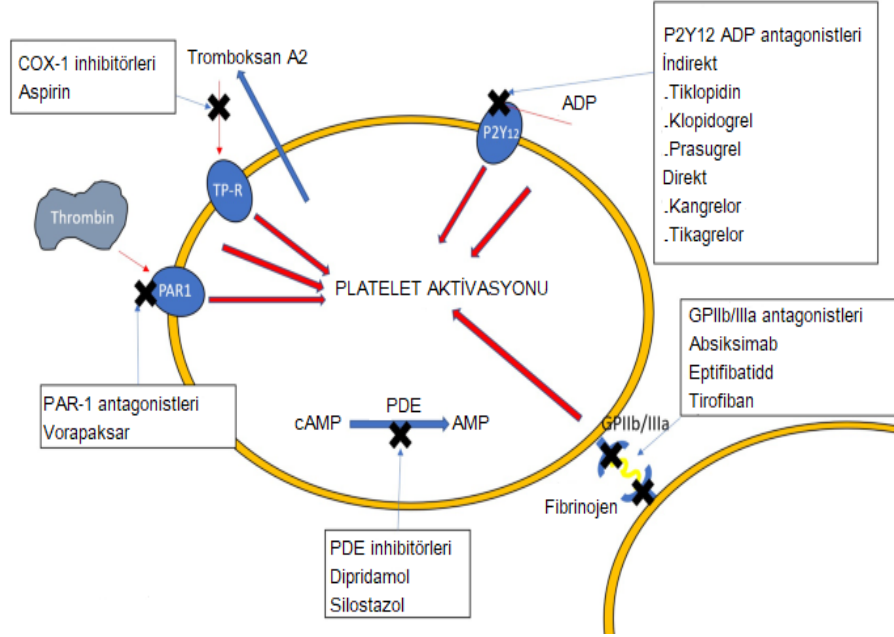


Şekil 2. 5. Koagülasyon Kaskadının Şematik Gösterimi [24]

2.4. Antitrombosit İlaçlar

Arteriyel trombozda trombositlerin merkezi rol oynaması nedeniyle, CVDs bağlı pıhtının önlenmesi ve tedavisinde antitrombosit ilaçların önemi yadsınamaz. Antitrombosit ajanlar trombositlerin aktivasyonunu engelleyen, onların birbiri ile ve damar endoteline yapışıp ve kümelenmesini önleyen ilaçlardır. Trombositlerin fonksiyonlarına müdahale ederek tromboz riskini azaltan antitrombosit tedavi CVDs tedavisinde temel taşı meydana getirir. Trombositler çeşitli uyarıcılara yanıt veren ve trombosit aktivasyonundan sorumlu olan bir dizi önemli plazma membran reseptörüne sahiptir. Trombosit yüzeyindeki önemli reseptörler birkaç gruba ayrılabilir; thromboksan gibi **prostaglandin** reseptörleri, ADP ve trombin gibi **transmembran** reseptörleri, GP-VI gibi **immünooglobulin** reseptörleri, αIIbβ3 gibi integrin reseptörleri [25, 26]. CVDs'leri tedavi etmek ve önlemek için uzun süredir kullanılan antitrombosit ilaçlar da esas olarak bu reseptörleri inhibe ederek işlev görür (Şekil.2. 6). Farklı mekanizmalara sahip olan antitrombosit ilaç grupları tek başına veya birlikte

kullanılabilmektedir [27]. Yıllar içerisinde, toplumda yaşam süresinin uzaması ve CVDs görülen artış nedeniyle bu ilaçların olan talebi de tetiklemiş ve artmasına sebep olmuştur. Günümüzde kullanılan Antitrombosit ilaçların ana grupları aşağıda tartışılmaktadır.



Şekil 2. 6. Günümüzde Kullanılan Antitrombosit İlaçlar

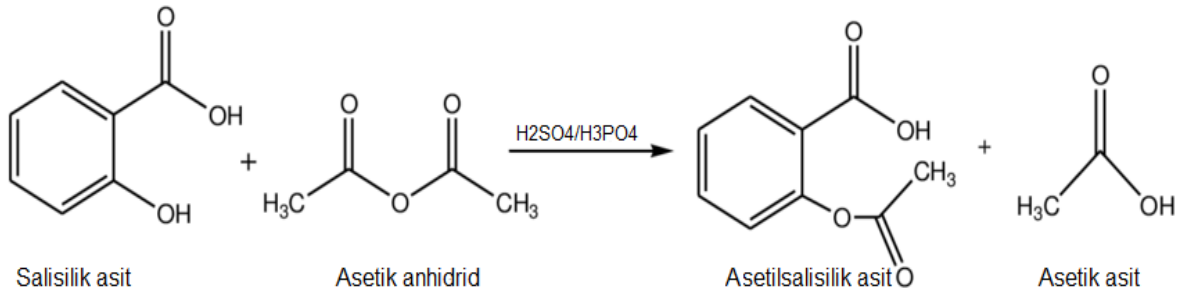
2.4.1. COX-1 İnhibitörleri

Trombosit aktivasyonunun sonuçlarından biri güçlü bir damar daraltıcı ve aktivatör olan TxA2 oluşumudur. TxA2 önemli bir trombosit agonistidir ve aktive trombositler tarafından üretilen ve salınan tromboksan reseptörleri aracılığıyla hareket eder. TxA2'nin üretimi, araşidonik asit (AA) ile başlayan sıralı bir süreç yoluyla gerçekleşir. AA, vücut hücrelerinin fosfolipid zarında bulunan çoklu doymamış bir yağ asididir.

iltihap ortamında, fosfolipaz A2 hücre zarından AA ayırır ve bir yoldan sikloksijenaz (COX) enziminin etkisiyle prostaglandin H2'ye dönüştürülür [28]. TxA2, Serbest bırakıldıktan sonra, trombosit şekli değişikliğine, fosfolipaz A2 aktivasyonuna, yoğun granüllerin ve alfa granüllerinin trombosit degranülasyonu, ve trombosit agregasyonuna neden olur. Böylece trombosit

TxA2 sentezi, çeşitli trombotik kardiyovasküler hastalıklarda belirgin şekilde artar. COX-1'den türetilmiş TxA2'nin geri dönüşümsüz inhibisyonu şu anda birincil ve ikincil damar pıhtı olayların önlenmesi için önemli bir antitrombosit tedavi olarak kullanılmaktadır.

COX-1 inhibitörü olan **aspirin** ondokuzuncu yüzyılın sonlarında salisilik asit maddesinden sentezlenen en eski ve en çok kullanılan antitrombosit ilaçtır. Salisilik asit, söğüt gibi bazı ağaçların kabuğunda bulunur ve 2000 yılı aşkın süredir tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Salisilik asit tahriş edici özelliği nedeniyle uzun zaman kullanılmıyordu. 19. yüzyılın sonlarında Bayer şirketi tarafından asetillenmiş ve dolayısıyla daha az toksik olan asetilsalisilik asit formuna dönüştürüldü ve aspirin ticari ismi ile üretilmiştir (Şekil.2. 7.).



Şekil 2. 7. Aspirinin Salisilik Asitten Yapılması

Aspirin, antitrombosit etkisini COX enzimini geri dönüşümsüz olarak asetilleyerek gösterir. TxA2 üretimini bloke eder ve trombosit aktivitesini ve agregasyonunu azaltarak trombus oluşumunu inhibe eder [29-31].

2.4.2. P2Y12 Reseptör Antagonistleri

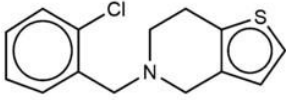
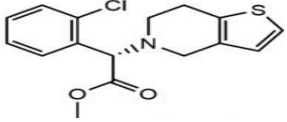
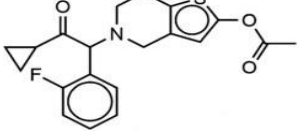
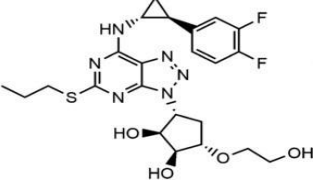
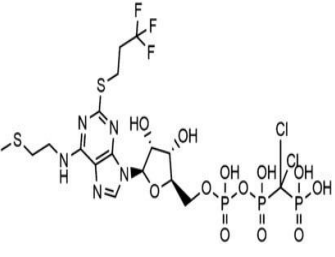
ADP, trombosit fonksiyonlarında önemli rol oynayan bir agonisttir. Trombosit yoğun granüllerden ve ayrıca yaralanma bölgesindeki hasarlı hücrelerden salınan bu agonist, etkisini P2Y1 ve P2Y12 olarak adlandırılan iki **pürinerjik reseptör** ile gösterir. Bu reseptörler farklı G proteinlere bağlı G protein bağımlı reseptörlerdir.

P2Y1, fosfolipaz C ve fosfatidilinositol sinyal yolunun uyarılması yoluyla ADP ile indüklenen trombosit agregasyonunu başlatan Gq-bağılı bir reseptördür [32].

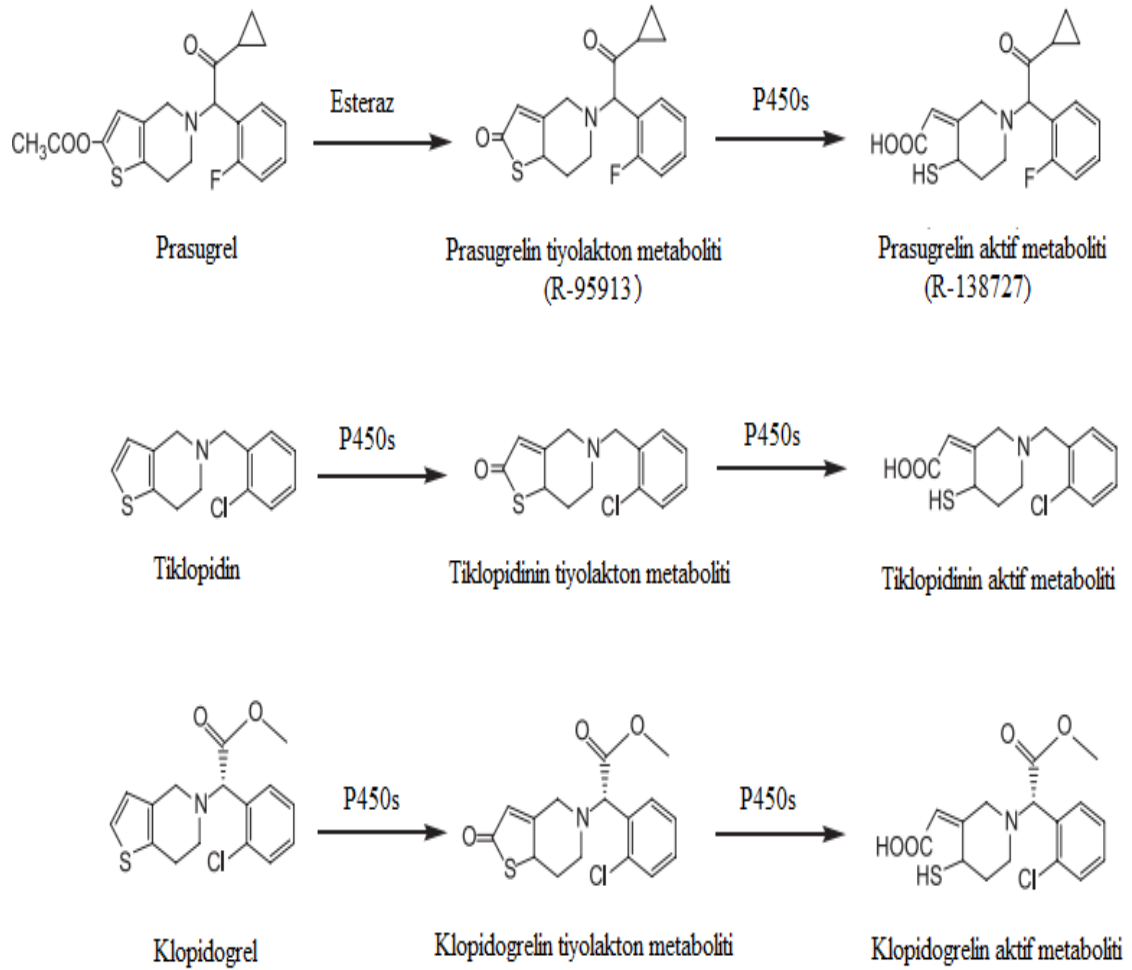
P2Y12 ise trombosit aktivasyonuna aracılık eden bir yedi transmembran alan reseptörüdür. Bu reseptör adenilat siklazi önleyerek hücre içi siklik adenosin monofosfat (cAMP) seviyelerini azaltır. Ayrıca fosfatidilinositiyol 3-kinazı inhibe eder ve Akt kinaz aktivasyonunu indükler. Hücre içi cAMP seviyelerindeki azalma, vazodilatör ile uyarılan fosfoprotein fosforilasyon hızını azaltır, böylece GPIIb/IIIa reseptörünün aktivasyonunu ve trombosit agregasyonunu indükler. P2Y12, ADP ile indüklenen trombosit agregasyonunun amplifikasyonunda ve stabilizasyonunda merkezi bir rol oynar. Güçlü agonistler tarafından indüklenen trombosit salınımında da rol oynar. P2Y12 reseptörünün trombosit aktivasyonu ve stabil trombüs oluşumundaki önemli rolü, onu arteriyel trombozun yönetimi ve önlenmesinde önemli bir hedef haline getirmiştir [33].

P2Y12 antagonistleri indirekt (tienopiridinler) ve direkt ilaçlar olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Çizelge.2. 2).

Çizelge 2. 2. P2Y12 Antagonistleri ve özellikleri

İlaç	Moleküler Yapı	Etki Mekanizması	Kullanım Şekli	FDA Onay
Tiklopidin		Tersinmez (tienopiridin)	Oral	1999
Klopidogrel		Tersinmez (tienopiridin)	Oral	1997
Prasugrel		Tersinmez (tienopiridin)	Oral	2009
Tikagrelor		Tersinir (nontienopiridin)	Oral	2011
Kangrelor		Tersinir (nontienopiridin)	Damar içi	2015

Tienopiridinler (tiklopidin, klopidogrel ve prasugrel) antitrombosit etkilerini aktif metabolitlere geliştiren, oral olarak uygulanan inaktif ön ilaçlardır. Hepatik CYP450 sistemi yardımıyla bir disülfid bağı oluşturup P2Y12'ye kovalent olarak bağlanırlar ve böylece P2Y12 reseptörünü geri dönüşümsüz olarak inhibe ederler. Bu ilaçların trombositler üzerindeki inhibitör etkisi, dolaşımdaki bir trombositin ömrü boyunca, yani ortalama 8 ila 12 gün sürer (Şekil.2. 8).



Şekil 2. 8. Tienopiridin ilaçlarının Aktif Metabolitlerine Dönüşüm Yolları [34]

Kangrelor ve tikagrelor iki direkt etkili P2Y12 antagonistdir. Tikagrelor Siklopentil-triazolopirimidin sınıfına ait yeni bu grubun ilk üyesidir. Bu ilaç P2Y12 reseptörünün konformasyonunu değiştirir ve ona geri dönüşümlü olarak bağlanır ve inhibe eder. Tikagrelor metabolik aktivasyon gerektirmediğinden, klopidoğrel veya prasugrelden daha hızlı etki başlangıcına sahiptir ve yüksek düzeyde trombosit inhibisyonu gösterir.

Kangrelor, bir adenosin trifosfat analogu ve tek intravenöz P2Y12 inhibitörüdür. 3 ila 6 dakikalık bir yarılanma ömrü nedeniyle hızlı bir etki başlangıcı ve çok hızlı bir etki dengesi olması nedeni ile derin ve geri dönüşümlü trombosit inhibisyonu gerektiren hastaların tedavisinde kullanılır [35].

2.4.3. GPIIb/IIIa Reseptör Antagonistleri

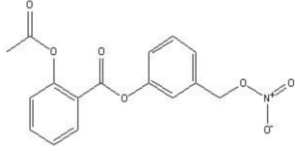
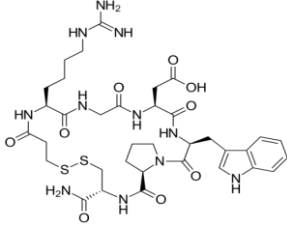
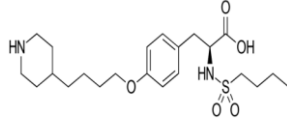
GPIIb/IIIa trombosit yüzeyindeki en bol bulunan integrin ve en önemli proteindir. Dinlenme halinde olan trombositlerinde, GPIIb/IIIa, aktif olmayan bir konformasyonda bulunurken aktivasyonu sırasında, konformasyonel değişikliklere uğrar ve fibrinojen ve diğer ligandlar için birkaç bağlanma yeri açığa çıkar. Fibrinojen bağlanması, trombositleri çapraz bağlayarak trombosit agregasyonuna aracılık eder ve trombositler arasında köprüler oluşturarak sonuçta trombüs oluşumuna yol açar. GP IIb/IIIa reseptörü trombositlere özgü olduğundan ve tüm agonistler tarafından agregasyon için son ortak yol olduğundan, bu reseptörü antagonize etmek trombosit agregasyonunu ve dolayısıyla pıhtı oluşumunu önlemede etkin bir hedef haline getirir [36].

Absiksimab, eptifibatid ve tirofiban klinik kullanım için onaylanmış üç GP IIb/IIIa antagonistdir (Çizelge.2. 3). Bu ilaçlar damardan enjekte edilir ve fibrinojen ile GP IIb/IIIa reseptörü arasındaki teması bloke eder [37].

Absiksimab, çeşitli hücre tiplerinin yüzeyinde diğer integrinlerle çapraz reaksiyona girerek geri dönüşümsüz olarak etki eder.

Eptifibatid ve tirofiban absiksimabın aksine spesifik olarak GPIIb/IIIa reseptörleri üzerinde geri dönüşümlü inhibisyon sağlayan küçük moleküler ağırlıklı ilaçlardır ve GPIIb/IIIa reseptörlerine düşük afiniteleri nedeniyle immün yanıtı indükleyemezler [38].

Çizelge 2. 3. GPIIb/IIIa Antagonistleri ve özellikleri

İlaç	Moleküler Yapı	Etki Türü	Kullanım Şekli	FDA Onay
Absiksimab		Kimerik insan-fare monoklonal antikorunun Fab fragmanı (tersinmez)	Damar içi	1994
Eptifibatid		Sentetik siklik heptapeptid (tersinir)	Damar içi	1998
Tirofiban		Sentetik nonapeptid (tersinir)	Damar içi	1999

2.4.4. Fosfodiesteraz İnhibitörleri

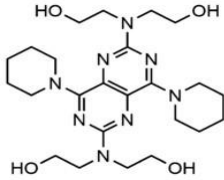
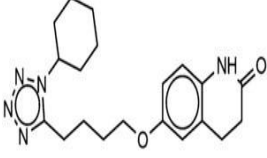
CAMP ve siklik guanozin monofosfat (cGMP), sitoskeletal yeniden düzenleme, fibrinojen reseptör aktivasyonu, ve degranülasyon olmak üzere temel trombosit fonksiyonları üzerinde etki eden uyarıcı ikinci habercilerdir [39]. Fosfodiesteraz (PDE) enzimleri bu siklik nükleotidlerin hidrolizini katalize edip hücre içi seviyelerini sınırlayarak bu süreçte önemli rol oynar. Bu nedenle, PDE'lerin inhibisyonu, trombositler üzerinde güçlü bir inhibitör etki sağlayabilir. Klinik uygulamada bu sınıfta şu anda trombosit agregasyonunu inhibe eden iki PDE inhibitörü kullanılmaktadır: Dipiridamol ve silostazol. (Çizelge.2. 4.).

Dipiridamol, çeşitli etki mekanizmaları ile damar genişletici ve antitrombosit özelliklere sahip bir pirimidopirimidindir. CAMP seviyelerini siklik nükleotid

fosfodiesteraz tarafından parçalanmasını engelleyerek ve adenozin alımını bloke ederek arttırır ve sinyal iletimi inhibe eder [40]. Dipiridamolun ayrıca aspirin ile birlikte geçici felç geçiren hastalarda kullanılması önerilir.

Silostazol, dipiridamol gibi damar genişletici ve antitrombist etkiye sahip oral olarak alınan, seçici PDE-3 enzim inhibitörüdür ve etkisini bu enzimin aktivitesini inhibe ederek ve cAMP degradasyonunu baskılayarak gösterir [41].

Çizelge 2. 4. PDE-3 İnhibitörleri ve Özellikleri

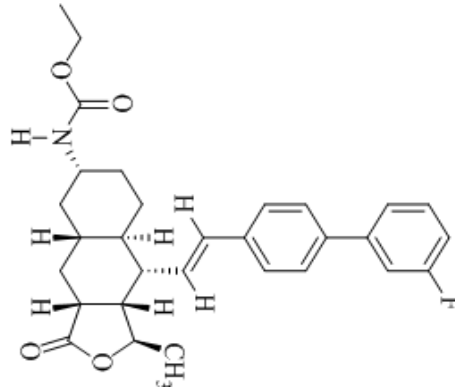
İlaç	Moleküler Yapı	Etki Türü	Kullanım Şekli	FDA Onay
Dipridmol		Sentetik pirimidinin türevi (tersinir)	Oral	1999
Silostazol		kinolinon türevi (tersinir)	Oral	1999

2.4.5. Trombin Reseptör Antagonistleri

Trombin bir **serin proteaz** ve bilinen en güçlü trombosit agonistidir. Trombositlerin şekil değişikliğine, yoğun ve α granüllerden agregasyonuna ve sekresyonuna neden olur. Trombin, birincil agregasyonuna neden olmakla kalmaz, aynı zamanda depolama granüllerinden salınan ADP tarafından ikincil agregasyonu da indükler. Trombin kaynaklı trombosit aktivasyonuna, protein kinaz C aktivasyonuna ve hücre içi kalsiyumda artışa yol açan G-protein aracılı Fosfolipaz C aktivasyonu eşlik eder. Trombin ayrıca GP IIb-IIIa'yı aktive ederek fibrinojen ve vWF'nin bağlanmasına neden olur [42]. Trombin sinyalleşmesine,

proteaz ile aktive edilen reseptörler (PAR) veya trombin reseptörleri olarak bilinen yüzey G protein bağımlı reseptörleri aracılık eder.

PAR'ın bilinen dört farklı tipi vardır: PAR-1, PAR-3 ve PAR-4. İnsanlarda trombin aracılı trombosit aktivasyonunun PAR-1 ve PAR-4 reseptörleri yoluyla gerçekleştiği gösterilmiştir. **PAR-1**, insan trombositleri üzerinde ana trombin reseptörü olarak görev yapar ve düşük trombin konsantrasyonları ile trombosit aktivasyonuna aracılık eder. [43]. PAR-1, trombin kendi reseptörüne bağlandığında ve arginin41-serin42 peptit bağını keserek reseptörü aktive edebilen bağı bir peptit ligandı verdiğinde bağımsız olarak aktive olur. Bu yüzden bu reseptörün blokajı hemostatik fonksiyonlar üzerinde etki etmeden tromboza katkıda bulunur ve trombinin trombositler üzerindeki etkilerini engeller. Himbasinin sentetik bir türevi olan **vorapaksar** ilacı, şu anda klinik kullanım için onaylanmış tek PAR-1 antagonistdir (Şekil.2. 9.).



Şekil 2. 9. Vorapaksar İlacının Kimyasal Yapısı

Vorapaksar fibrinojen bölünmesine müdahale etmeden trombine bağı trombosit agregasyonunu önleyen, oral olarak aktif, yüksek afiniteli, oldukça seçici ve rekabetçi bir ilaçtır ve genelde miyokard enfarktüsü veya periferik arter hastalığı geçiren hastalarda tekrarlayan iskemik olayların tekrarlanmasını önlemek için kullanılır [44].

2.5. Antitrombosit etki gösteren Bitkiler ve Doğal Bileşikler

Bitkisel tıp eski çağlardan beri çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılmış ve modern eczacılığın önemli bir parçası olarak kalmıştır [45]. Antitrombosit ilaçlar CVDs tedavisi ve önlenmesinde her ne kadar dönüm noktası olsa da, terapötik direnç, baş ağrısı, kanama, ve gastrointestinal rahatsızlıklar gibi çeşitli yan etkileri olduğundan daha güvenli ve daha etkili antitrombosit ilaç araştırmaları devam etmektedir [46]. Tıbbi bitkiler ve doğal ürünler biyolojik aktivitelerinden dolayı bu noktada daha pozitif yaklaşım sergilemiş ve yeni antitrombosit ajanların geliştirilmesi için iyi alternatif kaynaklar olarak kullanılabilirler. Bitkilerin içeriğinde bulunan fitokimyasallar ile yapılan çalışmalar CVDs tedavisinde umut verici sonuçlar ortaya koymuştur. Çalışmamızda bu konu üzerinde çalışılan 14 önemli bitki ele alınmıştır. Manolya, Sedef otu, berberis, sarı kantaron, kan kökü, zerdeçal, kınakına, propolis, domates, çin takkesi, üzerlik, muarraya, biberiye ve Stephania bitkileri dünya genelinde CVDs tedavisinde etkili olduğu bilinen bitkilerdir [Çizelge.2. 5].

2.5.1. Manolya (*Magnolia Obovata*)

Bitki Magnoliaceae ailesine ait, Rusya bölgesine özgü olmakla birlikte, bugün Japonya'da da yetişebilmektedir [47]. Manolya'dan elde edilen ekstraktlarının tavşanlar üzerinde yapılan testleri trombositler ile etkileştiği gözlemlenmiştir [48]. Yapılan bir diğer çalışma sonucunda, **magnolol**, **honokiol**, **obovatol**, ve **siringin**'in faydalı antitrombosit etkilerinin olduğu öner sürülmüştür [49].

2012 yılında yapılan bir çalışmada da magnolol fitokimyasalının COX-1 ve kalsium mobilizasyonunun baskılanması ile antitrombosit aktivite österdiği bulunmuştur. Ayrıca manolya bitkisindeki obovatol bileşiğinin in vitro olarak tavşanlarda kolajen ve AA tarafından indüklenen trombosit agregasyonunu sırasıyla 2.4 ± 0.8 ve 4.8 ± 0.9 uM IC50 değerleri ile inhibe ettiği gözlemlenmiştir [50, 51].

Çizelge 2. 5. Çalışmada Kullanılan Doğal Bileşiklerin Literatür Taraması

Bitki/ Doğal bileşik	Türkçe	Önemli Fitokimyasal	Etki mekanizması /Test türü
Magnolia Obovata	Manolya	Siringin, Honokiol, Obovatol, Magnolol	COX-1, kolajen ve AA tarafından indüklenen trombosit agregasyon inhibisyonu (in vitro)
Ruta Graveolens	Sedefotü	Graveolinin, Diktamin, Çalepensin, Kausindin, Skimmianin	AAve kolajen tarafından indüklenen trombosit agregasyon inhibisyonu (in vitro)
Berberis Vulgaris	Berberis	Berberin	ADP, kolajen, AA, ve kalsiyum tarafından indüklenen trombosit agregasyon inhibisyonu (in vivo)
Hypericum Perforatum	Sarı kantaron	Kuersetin, Kuersitrin, astilbin, İsokuersitrin, Rutin, kateşin, Mirisetin, mikuelin, Epikateşin, Kaempferol, Luteolin, Hiperozid,	COX-1 enzim tarafından indüklenen trombosit agregasyon inhibisyonu (in vitro/in vivo)
Sanguinaria Canadensis	Kankökü	Sanguinarin	kalsiyum mobilizasyonunda azalma ve COX-1tarafından indüklenen trombosit agregasyon inhibisyonu (in vitro)
Curcuma Longa	Zerdeçal	Kurkumin, Demetoksikurkumin, BDMC, Arturmeron	AA, kolajen, kolajen (GP-VI) ve ADP tarafından uyarılan trombosit agregasyon inhibisyonu (in vitro)
Solanum Lycopersium	Domates	Likopen, Guanosin, Adenozin, Kafeik asit, P-kumarik asit	ADP, kolajen, COX-1 tarafından indüklenen trombosit agregasyon inhibisyonu (in vivo/ in vitro)
Cinchona Officinalis	Kınakına	Cinçoin	Epinefrin, ADP, ve kolajen tarafından indüklenen trombosit agregasyon inhibisyonu (in vitro / in vivo)
Propolis	Propolis	Apigenin, Krisin , Galangin	kolajen, ADP ve trombin tarafından indüklenen trombosit agregasyon inhibisyonu (in vitro)

Scutellaria Baicalensis	Çin takkesi	Baisalin, Wogonosid	Trombin ve kolajen tarafından indüklenen trombosit agregasyon inhibisyonu (in vivo)
Preganum Harmala	Üzerlik	Harman, Harmin, Harmol, Harmalin, Harmalol	GP-VI (kolajen) tarafından indüklenen trombosit agregasyon inhibisyonu (in vitro)
Rosmarinus Officinalis	Biberiye	Karnosic asid, Karnosol, Rosmarinikacid.	AA, kolajen, trombin tarafından indüklenen trombosit agregasyon inhibisyonu (in vitro)
Stephania Venosa	Stefania	Dikentrin	AA ve kolajen tarafından indüklenen trombosit agregasyon inhibisyonu (in vitro)
Murraya Koenigii	Murraya	Girinimbin	AA ve kolajen tarafından indüklenen trombosit agregasyon inhibisyonu (in vitro)

2.5.2.Sedef otu (*Ruta graveolens*)

Sedef otu bitkisi Sedefotugiller familyasına ait çok yıllık çalı görünümlü bir bitki türüdür. Akdeniz bölgesinde çeşitli hastalıkların tedavisinde yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır [52]. Literatürde bu bitkinin antitrombosit etkisinin olduğu ve CVDs tedavisinde kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Sedefotunun antitrombosit etkinin esas olarak içinde bulunan alkaloidler tarafından uygulandığı düşünülmektedir. **Diktamin, çalepensin, klasindin, graveolinin ve skimiyanin** bitkiden elde edilen beş önemli alkaloiddir. Bu alkaloidlerin AA ve kolajen tarafından indüklenen trombosit agregasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği gözlemlenmiştir [53].

2.5.3.Berberis (*Berberis vulgaris*)

Berberis, neredeyse tüm geleneksel tıp sistemlerinde yüzyıllardır kullanılan bir bitkidir. Özellikle İran, Hindistan ve Çin tıbbında en az 3.000 yıl öncesine dayanan bir kullanım geçmişine sahip bu bitki günümüzde Kuzeybatı Afrika,

Asya ve Avrupa'da yetiştirilmektedir (Şekil.2.10.). Bitkinin antimikrobiyal, antikolinergik, anti inflamatuvar, ve antitrombosit biyoaktiviteleri çeşitli prelinik ve klinik raporlardan anlaşılmaktadır [54]. **Berberin**, Berberis in biyolojik olarak en aktif alkaloidi olarak bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, berberin bileşiğinin in vivo olarak tavşanlarda ADP, kolajen ve AA ve kalsiyum tarafından indüklenen trombosit agregasyonu önemli derecede inhibe ettiği gözlemlenmiştir [55].



Şekil 2. 10. Berberis

2.5.4.Sarı kantaron (St John's wort or Hypericum perforatum)

Sarı kantaron (St. John's Wort) Çin'den gelen ve dünyanın tüm ılıman bölgelerinde yaygın olarak yetişen çok yıllık bir bitkidir [56]. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda, kantaron bitkisinin özellikle COX-1 enzimine karşı trombosit agregasyonu önemli derecede inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Bu tıbbi bitkinin özütleri flavonoidler de dâhil olmak çok sayıda bileşen içermektedir. Bitkide bulunan ve izole edilen flavonoidler: **hiperozid, kuersetin, kuersitrin, izokuersitrin, rutin, mirisetin, astilbin, kaemferol, luteolin, mikuelianin, kateşin, epikateşin, ve klorogenik asit**'dir [57, 58].

2.5.5.Kan kökü (*Sanguinaria canadensis*)

Kan kökü (*Sanguinaria canadensis*) orta ve doğu Amerika Birleşik Devletleri'ne özgü ve etnobotanik kullanım geçmişi olan otsu bir bitkidir (Şekil.2.11). Kırmızı lateksi nedeniyle kan kökü olarak da bilinen bu önemli bitki geleneksel tıpın çeşitli alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Sanguinarin, Kan kökü'nün biyolojik olarak en aktif bileşeni olarak bilinmektedir. **Benzofenantridin** alkaloidi olan sanguinarin ile ilgili çoğu rapor, hipotansif, antitrombosit ve pozitif inotropik etkiler dâhil olmak üzere CVDs özellikleri ile ilgilidir [59]. Yapılan çalışmalarda, sanguinarin bileşiğinin in vitro olarak tavşanlarda cAMP üretimi, kalsium mobilizasyonunu ve TxA2 üretiminin inhib ettiği ayrıca COX-1 enziminide baskılayarak trombosit agregasyonu önemli derecede azalttığı gözlemlenmiştir [60].



Şekil 2. 11. Kan Kökü

2.5.6.Zerdeçal (*Curcuma longa*)

Halk arasında zerdeçal olarak bilinen *Curcuma longa* Asyanın tropikal bölgelerinde yetişen ve dünya çapında yaygın olarak kullanılan bir baharattır. Zingiberaceae familyasına önemli üyesi olan zerdeçal bilimsel olarak en çok araştırılan bitki türlerinden biridir [61].

Kurkuminoidler, kurkumin ve onun analoglarından **demetoksikurkumin** (DMC) ve **bisdemetoksikurkumin** (BDMC) oluşan zerdeçalın biyolojik olarak en aktif bileşikleridir.

Yapılan çalışmalarda kurkuminoidlerin in vitro olarak farelerde önemli derecede antitrombosit etki gösterdikleri bulunmuştur. Bu bileşenlerin AA, kolajen, GP-VI ve ADP tarafından uyarılan trombosit agregasyonunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Zerdeçaldan elde edilen **ar-turmeron** bileşiğinin de antitrombosit etkisi tavşan deneyleri ile saptanmıştır [62, 63].

2.5.7.Domates (Solanum lycopersium)

Solanaceae familyasının en önemli türü olan domates, fenolik asitler, flavonoidler, karotenoidler, vitaminler ve glikoalkaloidler dâhil olmak üzere çok zengin bir besin bileşikler kaynağıdır. Bu biyoaktif bileşenler, antioksidan, anti-mutajenik, anti-proliferatif, anti-inflamatuar ve anti-aterojenik aktivitelere sahiptir [73]. Bitkinin çoğunluğunu teşkil eden altı büyük bileşen şunlardır: Likopen, guanozin, adenozin, resveratrol, kafeik asit, p-kumarik asit.

Domates ve ürünlerinden izole edilen ekstraktlar trombosit agregasyonunda azalma yaptığı in vitro ve in vivo çalışmalar ile gösterilmiştir. Bitkiden izole edilen en önemli fenolik bileşik olan likopen bileşiğinin cAMP'ı arttığı ve TxA2 oluşumunu ve kalsium mobilizasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir [74].

Ayrıca bitkide bulunan guanozin bileşiğinin ADP, kolajen tarafından indüklenen trombosit agregasyonunda azalma yaptığı gösterilmiştir [75].

2.5.8.Kınakına (Cinchona officinalis)

Kınakına, peru kabuğu olarak da bilinen kökboyasığıllar familyasına ait bir bitki türüdür. 30'dan fazla alkaloid kaynağı olan bu bitki çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir (Şekil.2.12). Yüzyıllar boyunca sıtma tedavisinin temel dayanağı olarak kullanılmıştır ve antimalaryal ve antiaritmik ilaç olarak tıpta hala önemli bir rol oynamaktadır [64].

Bitkinin kabuğundan elde edilen **cinçoin** bileşiğinin epinefrin, ADP, kolajen ve kalsiyum tarafından indüklenen trombosit agregasyonu üzerinde inhibitör etkisi gösterdiği görülmüştür [65].



Şekil 2. 12. Kınakına

2.5.9. Propolis

Propolis veya "arı tutkalı" bal arılarının bitki tomurcuklarından ve diğer botanik kaynaklarından topladığı mumsu bir maddedir. Antik çağlardan beri halk tıbbında enfeksiyonları iyileştirmek için kullanılmaktadır. İçinde flavonoidler, kumarinler, aminoasitler, terpenler, ve steroidler gibi 150'den fazla bileşen tanımlanmış olan propolis için antioksidan, antimikrobiyal, ve antiinflamatuvar, antitrombosit, ve antitümör özellikler dâhil olmak üzere birçok farmasötik aktivite rapor edilmiştir [66, 67]. Antitrombosit etki olarak propolisten elde edilen sulu ekstraktlarının insanlar üzerinde kolajen, ADP ve trombinin neden olduğu trombosit agregasyonunda azalma yaptığı gözlemlenmiştir [68].

Ayrıca bitkiden izole edilen **krisin** bileşiğinin de antitrombosit özellikleri gözlemlenmiştir [69].

2.5.10.Çin takkesi (Scutellaria baicalensis Georgi)

Baykal kafatası Lamiaceae ailesine ait bir bitki türüdür. Doğu Asya, Rusya ve Avrupada yaygın olarak yetiştirilen bir bitkidir. Baisalin ve wogonosid bitkide

bulunan ve izole edilen en önemli biyoaktif bileşenlerdir [70]. Baisalin madesinin CVDs tedavisine etkisi fare deneyleri ile ispatlanmış ve konsantrasyona bağlı bir şekilde trombin ve kolajen tarafından indüklenen trombosit agregasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir [71].

2014 yılında yayınlanan bir makalede ise çin takkesindeki **wogonosid** bileşiğinin antitrombosit özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Wogonosid trombin kaynaklı trombosit agregasyonunu önemli derecede azalattığı ortaya atılmıştır [72].



Şekil 2. 13. Bayka Kafatası

2.5.11.Üzerlik (*Peganum harmala*)

Üzerlik Nitrariaceae ailesine ait çok yıllık bir bitki türüdür. Orta Doğu ve Kuzey Afrika'da yetiştirilen bir bitkidir. **Harman, harmin, harmol, harmalin, harmalol** gibi beta-karbolin alkaloidleri bu bitkinin çoğunluğunu teşkil eden en önemli bileşenlerdir [76]. Üzerlik bitkisinin antitrombosit etkisi 2009 yılında in vitro bir çalışma ile incelenmiş olup araştırma sonucu bu beş alkaloidin kolajen reseptör inhibitörü olarak davrandığı ve trombosit agregasyonunda azalma yaptığı görülmüştür. Harman ve harmin, sırasıyla 113.7 ve 132.9 μM IC50 değerleri ile en fazla inhibisyon gösteren bileşenler olarak bulunmuştur [77].

2.5.12.Biberiye (*Rosmarinus officinalis*)

Biberiye bir milyon yıldan fazla bir süredir baharat ve doğal ilaç olarak kullanılan, Lamiaceae familyasına ait bir bitkidir. Dünyanın birçok yerinde

yetiştirilir. Biberiye bitkisinde bulunan **Karnosolun** antitrombosit etkisi 2006 yılında tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada denenmiştir. Karnosol konsantrasyonuna bağlı olarak AA ve kolajen tarafından indüklenen trombosit agregasyonunu sırasıyla $5,5 \pm 0,3$ ve $42,5 \pm 0,9$ μM IC50 değerleriyle inhibe ettiği bulunmuştur [78]. Biberiye bitkisindeki **karnosik asit** de konsantrasyona bağlı bir şekilde kolajen, AA, ve trombin tarafından indüklenen yıkanmış tavşan trombosit agregasyonunu sırasıyla 39 ± 0.3 , 34 ± 1.8 , ve 48 ± 2.9 μM IC50 değerleri ile önemli ölçüde inhibe ettiği öne sürülmüştür [79].

2.5.13.Stefania (Stephania venosa)

Stefania bitkisi Menispermaceae familyasına ait çok yıllık bir bitkidir. Tavşanlar üzerinde yapılan çalışma sonucunda stefaniadaki “**dikentrin**” kimyasalının antitrombosit özelliğine sahip olduğu bulunmuştur. Aporfin türevi bir alkaloid olan dikentrin AA ve kolajen tarafından indüklenen trombosit agregasyonu azalttığı bulunmuştur [82].

2.5.14.Murraya (Murraya Euchrestifolia)

Rutaceae familyasına ait murraya bitkisi içerdiği **girinimbin** alkaloidi sayesinde uzun yıllardır geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Şekil 2.14.). Bir karbazol alkaloidi olan girinimbin antibakteriyel, antitrombosit, anti-inflamatuar, antioksidan ve antitümör aktiviteler dâhil çeşitli biyolojik etkilere sahiptir [80]



Şekil 2. 14. Murraya

2.6. Bilgisayar-Destekli İlaç Tasarımı

Yeni bir ilaç geliştirmek ve piyasaya sürmek genel itibari ile yıllar süren ve milyarlar dolarlık maliyet gerektiren oldukça yorucu ve pahalı bir süreçtir. Bu bağlamda Bilgisayar destekli ilaç tasarımı (CADD) yöntemleri bu kısıtlamalarını aşmak ve süreci kolaylaştırmak için iyi bir alternatif olarak uygun görülmüş ve son yıllarda ilaç tasarımı alanında oldukça popüler hale gelmiştir. CADD yöntemleri çeşitli teorik ve hesaplamalı yaklaşımlar aracılığıyla ilaç hedeflerinin belirlenmesi, moleküllerin bu hedeflere bağlanması, bağlanma afinitelerine göre sıralanmasını amaçlamaktadır [83]. CADD de iki temel yaklaşım söz konusudur: ligand tabanlı ve yapı tabanlı ilaç tasarımı. Her iki yöntem için birçok program bulunmaktadır.

2.6.1.Ligand Tabanlı İlaç Tasarımı

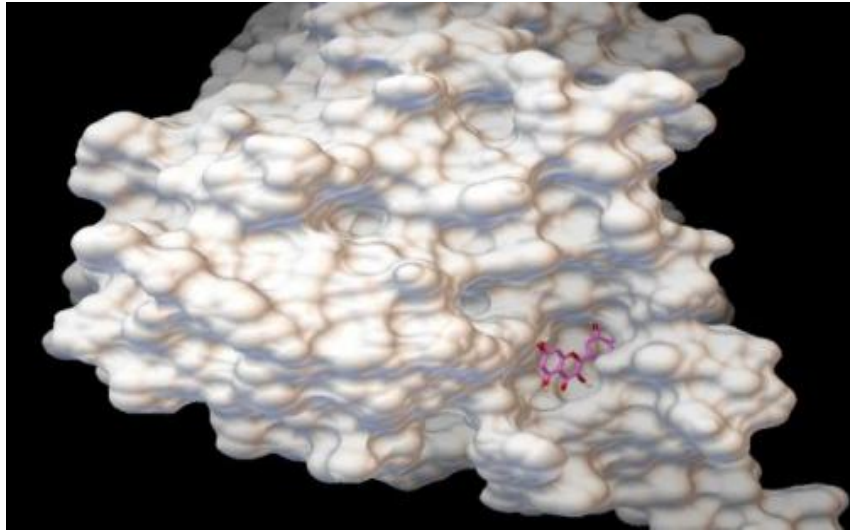
Ligand tabanlı ilaç tasarımı biyolojik hedefle bağlandığı bilinen biyoaktif molekülün biliniyor olmasına dayanır. Bu yöntem ligandın hedefe bağlanma süreci ve ilgili biyolojik fonksiyonları için önemli olan bağlanma bölgesi ve diğer benzer özellikler konusunda güçlü tahminler sunabilir. Kantitatif yapı-aktiflik ilişkileri, farmakofor analizi ve yapısal benzerlik taramaları en sık tercih edilen model yaklaşımlarıdır [84].

2.6.2.Yapı Tabanlı İlaç Tasarımı

Yapı tabanlı ilaç tasarımı ilaç hedefinin yapısal bilgisinin olduğu durumlarda kullanılır. Reseptör olarak da bilinen bu makromoleküler hedeflerin moleküler yapısı, X-ışını kristalografisi veya Nükleer Manyetik Rezonansa benzer deneysel tekniklerle elde edilmektedir [85]. Bu metodla ligand-reseptör etkileşimleri incelenerek, ligandların hedefe bağlanma süreci, ilgili biyolojik fonksiyonları için önemli olan bağlanma bölgeleri ve ligandların hedef moleküllere olan ilgisi öngörülür. Bu yöntemler için geliştirilmiş ücretli ve ücretsiz çok sayıda yazılım mevcuttur. Doking ve MD simülasyon en sık kullanılan yapı temelli ilaç tasarım yöntemleri arasındadır.

2.7. Moleküler Kenetlenme (doking)

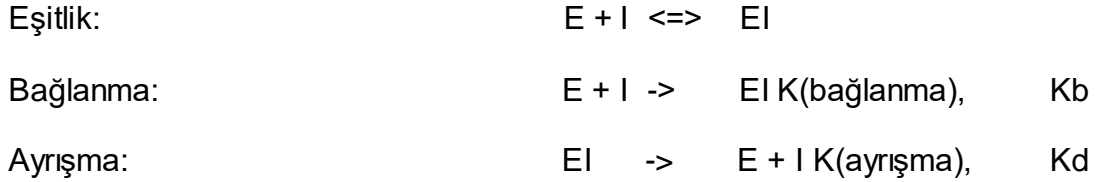
Doking ligand gibi küçük bir molekül ile protein, DNA ve RNA gibi makromoleküller arasındaki etkileşimleri ve hareketleri son derece yüksek bir oranla öngören programdır. Yapı temelli ilaç tasarımı yöntemlerinin en sık kullanılan programlardan biridir. Doking işlemi için ligand ve protein arasındaki bağlanmayı modellemek için, bilinen üç boyutlu yapıları üst üste bindirilir ve hedef molekülün anahtar bölgeleri ile ligand arasındaki uyum sağladıktan sonra analiz edilir (Şekil.2.15).



Şekil 2. 15. Proteine Kenetlenen Küçük Molekül Gösterimi

Son yıllarda, hem akademik hem de ticari kullanım için 60'tan fazla farklı doking programı geliştirilmiştir. Günümüzdeki kenetlenme programları kullandıkları algoritma fonksiyonlarında ve kenetleme pozu belirlemede farklılık göstermektedirler. Bu programlarda genel olarak ligand yapısı esnek tutulurken protein yapısı esnek olmayan bir yapı şeklinde değerlendirilmektedir [86]. Dokingde esneklik önemli bir terim olup, incelemeye alınan kimyasal yapılarının konformasyonlarını içeren hesaplamalar gerçekleştirilmektedir. Doking simülasyonunu gerçekleştirebilmek için kullanılan programlardan bazıları; AutoDock, DOCK, FlexX, FRED, Glide, GOLD, ICM, Yucca, MCDock, AADS ve Hammerhead dir.

Deneysel değerlerle karşılaştırmak ve aktivasyon tahmini için kenetleme programları ΔGB (bağlanma enerjisi) değerini tanımlamaktadır. Bu bağlanma enerjisinden referans alınarak aşağıda belirtilen denklemler ile K_i sabitine ulaşılmaktadır. Bağlanma ve inhibisyon ters yönlerde meydana geldiğinden denklemdaki negatif işareti kaldırılır:



$$K(\text{bağlanma}) = \frac{1}{K(\text{ayrışma})}$$

Böylece;

$$\ln K(\text{bağlanma}) = -\ln K(\text{ayrışma})$$

$$\ln K_b = -\ln K_d$$

$$K_i = \text{Enzim ve inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti} = K_d$$

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Sonuç olarak;

$$\ln K_b = -\ln K_i$$

$$\Delta G(\text{bağlanma}) = -RT \ln K_b$$

$$\Delta G(\text{inhibasyon}) = RT \ln K_i$$

Bağlanma ve inhibisyon zıt yönlerde meydana gelmektedir. Bu yüzden denklemdaki negatif işareti kaldırılır:

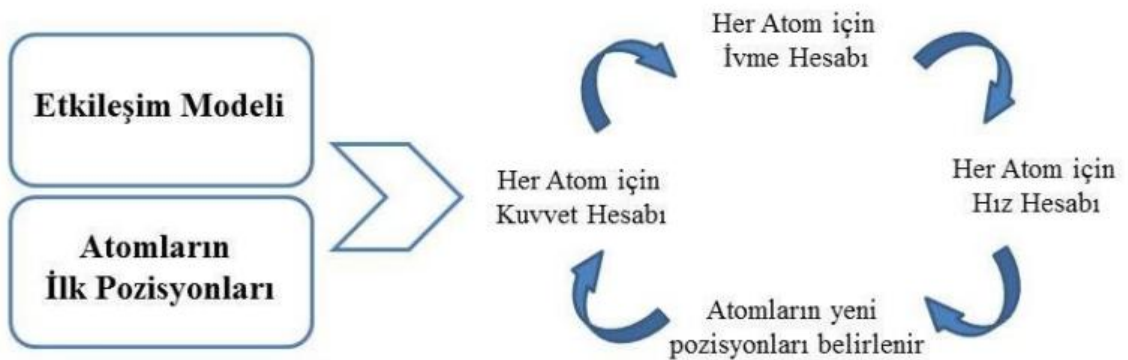
$\Delta GB = RT \ln K_i$ olur.

$$\Delta GB / (RT) = \ln K_i$$

$K_i = \exp(\Delta GB / (RT))$ formülünden K_i değeri elde edilir.

2.8. MD Simülasyonları

MD, Atom ve moleküllerin bilgisayar ortamında benzetim için yaygın olarak bilinen önemli bir programdır. Bu tekniğin temeli Newton' un ikinci hareket yasasına dayanmaktadır [88]. MD bilinen fizik kanunları ile belli bir zaman içerisinde atom ve moleküllerin etkileşmelerine izin veren bir bilgisayar benzetim tekniği olup son yıllarda biyomoleküler sistemlerin benzetimlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Aynı zamanda fizik, kimya ve matematik gibi bilim dallarına ait teori ve kanunların kullanılması ile meydana getirilen algoritmaları da içermesi bakımından disiplinler arası bir metod olarak oldukça büyük önem taşımaktadır. Dinamik simülasyon bir sistemde bulunan moleküllerin tüm etkileşimlerini göz önünde bulundurarak o molekülün içindeki atomların Newton hareket denklemini hesaplar istatistiksel bir topluluk oluşturur [89]. MD'nin moleküler yapı, moleküler hareket ve fonksiyonlar arasındaki ilişkiler ile moleküler sistemlerin zamana bağlı davranışlarını incelemek için kullanılması büyük avantaj sağlar (Şekil.2.16.).



Şekil 2. 16. MD Simülasyon Hesaplama Şeması

Newton mekaniğini kullandığı bu benzetim tekniği, atomik ölçekteki moleküler hareketlerin kavranılabilir olmasına, doğadaki kuvvetlerin animasyonunun yapılabilmesine, uygun algoritma ve parametrelerin seçimi ile yeteri kadar uzun zaman adımlarında kümülatif olarak meydana gelen hataların en aza indirilmesine katkıda bulunmaktadır.

MD yöntemlerinin bulabildiği sonuçlar açısından bu kadar çeşitli olması, kullanım amaçlarının ve alanlarının da çok çeşitli olmasını sağlar. Aşağıda sıralananlar belli bir sıraya konmamış kısa başlıklardır ancak MD bu başlıkların çok dışında da birçok kullanım alanına sahiptir.

- Temel çalışmalarda, difüzyonu, moleküler kaosu, denge durumundaki özellikleri incelemek veya etkileşme potansiyeli modellerini test etmek için kullanılabilir.
- Faz geçişlerini incelemek için kullanılabilir.
- Dielektrik özellikleri ya da spektroskopik özellikleri incelemek için kullanılabilir. Likit kristalleri ya da iyonik sıvıları incelemek için kullanılabilir.
- Polimer zincirlerini incelemek, oluşturdukları yapıları ve ortam şartlarındaki değişikliklere nasıl tepki gösterdiklerini incelemek için kullanılabilir.
- Polimer zincirlerinin incelendiği gibi Moleküler Biyoloji alanında da protein zincirlerini incelemek için kullanılabilir [90].
- Yüksek enerjili parçacıkların sabit hedeflere gönderildiklerinde gözlemlenen çarpışmaları, benzetim yöntemiyle incelemek için kullanılabilir.

2.8.1. MD Simülasyonda Kullanılan Termodinamik Topluluklar

İstatistiksel mekanikte kanonik bir topluluk, sabit sıcaklıklarda bir ısı banyosuyla termal dengede olan mekanik bir sistemin, olası durumlarını temsil eden istatistiksel topluluktur. Sistem ısı banyosuyla enerji alışverişinde bulunabilir, böylece sistemin durumları toplam enerjide farklılık gösterir [91]. MD simülasyonlarda yaygın olarak kullanılan kümeler Çizelge.2.6 da verilmektedir.

- Kanonik topluluk (NVT): Kanonik topluluk ısı banyosuyla etkileşen sistemin olası durumlarını belirtir. Durumların olasılık dağılımının belirlenmesinde,

kanonik topluluğun termodinamik değişkeni mutlak sıcaklıktır (T). Topluluk tipik olarak ayrıca sistemdeki parçacık sayısı (N) ve sistem hacmi (V) gibi mekanik değişkenlere bağlıdır ve bunlardan her biri sistemin iç durumlarının doğasını etkiler. Bahsedilen bu üç parametrelili topluluk, genellikle NVT topluluk olarak adlandırılır. Bu toplulukta, parçacık sayısı, sistem hacmi ve sıcaklık sabitken, sistemin toplam enerjisinin değişimi izinlidir.

Çizelge 2. 6. MD Simülasyonda Kullanılan Popüler Kümeler

Tpoluluk	Tanım
NVT	Kanonik ve sabit sayıda atom (N), hacim (V) ve sıcaklık (T) içeren ve bütün sistemler için kullanılabilen bir topluluktur.
NVE	Mikrokanonik ve sabit sayıda atom (N), hacim (V) ve enerji (E) içeren İzole sistemlere denk gelen bir topluluktur.
NPH	İzobarik-izoentalpik ve sabit sayıda atom (N), basınç (P) ve entalpi (H) içeren bir topluluktur.
NPT	İzobarik-izotermal ve sabit sayıda atom (N), basınç (P) ve sıcaklık (T) içeren ve bütün sistemler için kullanılabilen bir topluluktur.
μVT	Büyük kanonik ve sabit bir kimyasal potansiyel sistem (μ), hacim (V) ve sıcaklık (T) içeren bir topluluktur.

- İzotermal-izobarik (Gibbs) topluluk (NPT): NPT topluluk sıcaklık (T), basınç (P) ve parçacık sayısının (N) sabit olduğu istatistiksel mekanik bir topluluktur. Burada sistemin anlık hacminin değişimi izinliyen, basınç ortalama olarak sabittir.
- Mikrokanonik Topluluk (NVE): Mikrokanonik ya da NVE toplulukta sistem, parçacık sayısı (N), hacim (V) ve enerjideki (E) değişimlere karşı izole edilmiştir. Bu durum ısı değişimi olmayan adyabatik bir sürece karşılık gelir. Deneylerle

kıyaslama yapılabilmesi açısından MD simülasyonlarda NVT ve NPT topluluk daha kullanışlıdır [92]. Simülasyonda başlangıçta sistem sıcaklığını elde etmek için, her bir parçacığa Maxwell-Boltzman dağılımına uyacak şekilde ilk hız değerleri rasgele atanır ve simülasyon süresince sıcaklık istenilen şekilde kontrol edilir.

Bu tez çalışmasında MD simülasyonu, NVT (sabit hacim) ve NPT (sabit basınç) toplulukları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Günümüzdeki modern donanım ve yazılım kodları aracılığı ile MD simülasyonlarını nanosaniye, mikrosaniye zaman çerçevesinden birkaç milisaniyeye kadar çalıştırmak mümkündür. Bu, büyük biyomoleküller dâhil konformasyonel alanın detaylı incelenmesini sağlamaktadır. Örneğin hedef bir proteine bağlanan ligandın izleyeceği yolun tamamını kapsayabilir. Sonrasında bu uzun yörüngeler, ilaç tasarımında kritik olan termodinamik ve kinetik veriler ile protein-ligand bağlanmasının serbest enerji profilini bulmak için serbest enerji yöntemleri ile bağdaştırılmaktadır.

Günümüzde MD simülasyon gerçekleştirebilmek en çok kullanılan programlar NAMD, AMBER, GROMACS, ve CHARMM dir [93].

2.8.2. MM-PBSA ve Serbest Enerji:

MD simülasyonları, moleküllerin etkileşimlerinden oluşan bağlanma serbest enerjisinin hesaplanmasına olanak vermekte ve bu enerjinin tahmine edilmesi için bazı hesaplama yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler şu şekildedir: termodinamik entegrasyon (Thermodynamic Integration – TI), serbest enerji pertürbasyonu (Free Energy Perturbation – FEP), doğrusal etkileşim enerjisi (Linear Interaction Energy – LIE) ve moleküler mekanik Poisson-Boltzmann yüzey alanı (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area – MM-PBSA). TI ve FEB yöntemleri diğer yöntemlere göre daha özenli tahminleme yapmasına rağmen maliyeti en yüksek yöntemlerdir. Hesaplama maliyeti orta derecede olan LIE yöntemi, tahminleme için deneysel verileri bilinen yapıların bağlanma afiniteleriyle ilgili bilgilere gereksinim duymaktadır.

MM-PBSA yöntemi ise diğerlerine oranla daha düşük hesaplama maliyetine sahiptir. Bağlanma serbest enerjisinin hesaplanmasında MD simülasyonları boyunca elde edilen ve moleküllere ait olan anlık görüntüleri kullanılmaktadır.

MM-PBSA yönteminin AMBER paketinde uygulanmasından dolayı yüksek verimli bağlanma serbest enerjisi hesaplamaları sınırlı kalmaktadır. G_mmpbsa metodu, GROMACS MD simülasyon paketinde MM-PBSA yöntemi ile bağlanma serbest enerjisinin tahminlenmesi için geliştirilmiş açık kaynaklı bir yazılımdır. Yörünge dosyalarının işlenmesi, belirli enerji terimlerinin hesaplanması, her bir aminoasitle ligand etkileşimlerinin ölçülmesi, polar ve polar olmayan çözünme enerjilerinin hesaplanması gibi işlemleri gerçekleştirebilmektedir. Ayrıca harici bir yazılım diline veya komut dizisine (script) ihtiyaç duymadan, GROMACS paketine benzer bir kullanımla serbest enerji hesaplaması yapılabilmektedir. Elde edilen veriler ise python programlama dili ve komut dizileriyle kolaylıkla işlenebilmektedir.

2.9. İlaç Benzerlik ve ADMET Tahminleri

İlaç tasarımı ve geliştirme süreci çok fazla zaman, enerji ve maliyet kaybına yol açan bir süreçtir. Milyonlarca ilaç adayı onaylanma aşamasında başarısız oluyor. Bu başarısızlıklarının önemli derecede farmakokinetik ve toksisite özellikleri ile ilişkilendirebilir. Bu nedenle ilaçların ADMET yani emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite değerlerini incelemek ilaç tasarım sürecinde kritik bir öneme sahiptir ve rutin olarak erken aşamalarında gerçekleştirilmektedir.

ADMET ilgili ilaç molekülünün canlı bir sistem üzerindeki potansiyel etkisini tanımlayan farmakokinetik özelliklerle ilişkilidir [94]. İlaç molekülünün vücuda uygun şekilde alınması, doku ve organlara dağıtılması, aktivitesini hemen ortadan kaldırmayacak şekilde metabolize edilmesi, iyi elimine edilmesi ve toksik olmadığını teyit etmektir. ADMET yapılması çoklu fizyolojik mekanizmalardan kaynaklandığı için modellenmesi ve tahmin edilmesi zor bir işlemdir. Ancak son zamanlarda bu biyolojik karmaşıklığı tahmin etmek amacıyla *in silico* modellemeler kullanılarak çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu modeller genel olarak 5 kural olarak belirtilen özelliklerin, kantitatif yapı ilişkileri

ve nicel yapı-özellik ilişkisi ve benzerlik aramaları, moleküler modelleme ve fizyolojik temelli farmakokinetik modelleme gibi kantitatif yöntemlerle tahmin edilmesi yaklaşımlarına dayanmaktadır.

Bir molekülün bir ilaç olarak etkili olabilmesi için yeterli konsantrasyonda vücuttaki hedefine ulaşmalı ve beklenen biyolojik reaksiyonların gerçekleşmesi için yeterince uzun bir biyoaktif formda kalmalıdır. İlaç keşfi ve tasarım sürecinde, bileşiklerin ADMET açısından taranması veya fiziksel numunelere erişimin kısıtlı olduğu durumlarda ADMET parametrelerini önceden öngörmek artan bir şekilde kabul görmektedir.

ADMET çalışmaları için yaygın olarak kullanılan birçok program ve web sunucuları bulunmaktadır. Örneğin; *ADMETlab*, *admetSAR*, *SwissADME*, *FAF-Drugs4*, *ProTox-II*, and *pkCSM* [95].

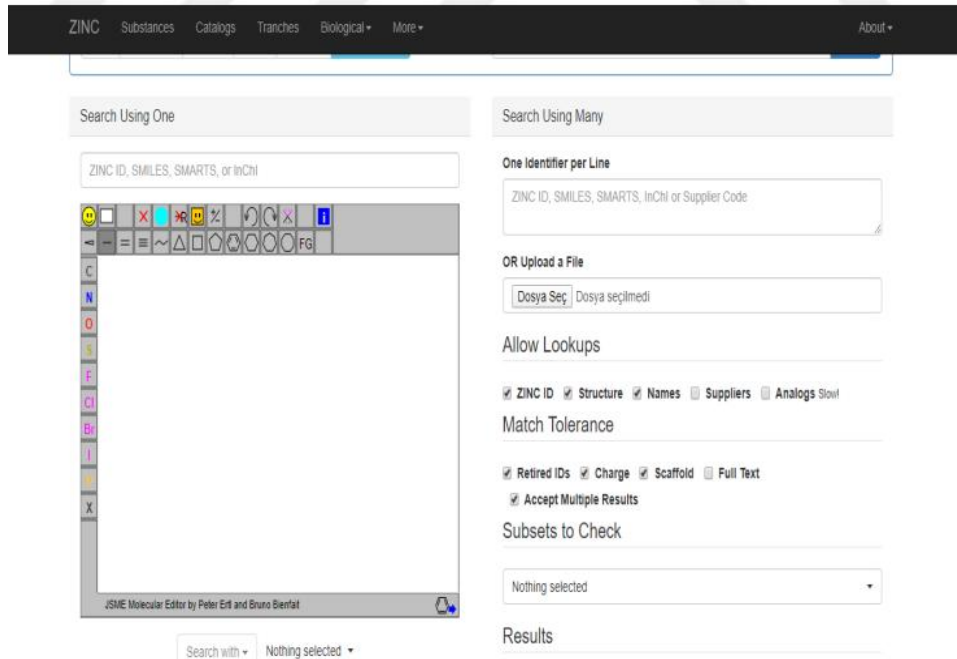
3. MATERYAL VE METOTLAR

3.1. KULLANILAN YAZILIMLAR

3.1.1. ZINC15 veritabanı

ZINC15 (<http://zinc15.docking.org/>) sanal tarama için hazırlanmış milyonlarca kimyasal bileşik içeren açık erişimli bir veri tabanıdır (Şekil 3. 1.). Çoğu doking programıyla da uyumlu 3D moleküller sağlayabilmektedir. Irwin ve Shoichet laboratuvarları tarafından geliştirilen bu veritabanı uzman bilgisi ve geniş altyapı gerektirmeyen kullanımı kolay bir programdır. Sadece bileşiğin molekül ağırlık, yük, hidrojen verici ve alıcı grupların sayısı gibi özellikler dikkate alınmalıdır.

ZINC aynı zamanda yeni ligand keşfi ve mevcut bir liganda benzer karakterde ligand aramada da kullanılmaktadır. Buradan moleküller farklı yollar ile taranabilmektedir. Örneğin molekülün 2 boyutlu yapısı çizilip, dosya olarak yüklenebilir veya SMILES, mol2, 3D, ve SDF gibi çeşitli yaygın dosya formatlarında kodlanarak da indirilebilir. Ayrıca referans molekülün mevcut olduğu durumlarda molekülü sunucuya yükleyerek benzer karakterdeki yapılar tespit edilebilir [96, 97].



Şekil 3. 1. ZINC15 Veri Tabanı Anasayfası Görüntüsü

3.1.2. UCSF Chimera

UCSF Chimera programı "Resource for Biocomputing and Informatics" labratuarı tarafından geliştirilmiş bir moleküler görüntüleme ve modelleme yazılımıdır. Akademik ve ticari olmayan kullanımlar için ücretsiz olarak sunulmaktadır. Bu program yoğunluk haritaları, supramoleküler düzenekler, moleküler dinamik yörüngeler dâhil moleküler yapıların ve ilgili verilerin 3 boyutlu görselleştirmesini sunmaktadır [98].

3.1.3. AutoDock Vina

Moleküler doking, kullanılan çoklu çekirdek kapasite seçeneği sunabilen performans ile geliştirilmiş ve yüksek doğruluğa sahip olduğundan, ilaç keşfi ve sanal taramada önemli yazılımlardan biridir [99].

AutoDock Vina, AutoDock ile aynı laboratuvar tarafından geliştirilen açık kaynaklı moleküler doking programlarından biridir ve tartışmasız en yaygın kullanılan ve başarılı programların arasındadır. Bu başarının nedenleri Autodock Vina'nın AutoDock'a göre daha fazla kullanım kolaylığı sağlaması, bağlama modu tahminlerinin doğruluğunu önemli ölçüde artması ve daha hızlı olmasından kaynaklanmaktadır. Vina ile doking yapılması için ligand ve birlikte doking yapılacak hedef molekül bilgilerini içeren bir konfigürasyon dosyası gerekmektedir. Program girdi ve çıktılarında interaktif olarak oluşturulabilen PDBQT formatını kullanır. Bu format MGLTOOLS aracılığıyla okunabilmektedir [100].

Autodock Vina kullanımında uygulama detayları, belirsiz arama parametrelerinin ayarlanması, veya kümeleme sonuçlarının bilmesine ihtiyaç duyulmaz. Bu yönleriyle kullanıcılarına kolaylık sağlamaktadır. Root Mean Square Deviation (RMSD) 2 Å'den küçük olanlar doking işleminde anlamlı sonuçlardır. AutoDock Vina ile doking hesaplamalarında sırasıyla;

- AutoDockTools (ADT) programı ile koordinat dosyaları hazırlanır.
- AutoGrid kullanılarak küçük molekülün afinitesi ve inhibisyon aktivitesi belirlenmesi için ön hesaplama gerçekleştirilir.
- AutoDock ile doking işlemi yapılır.

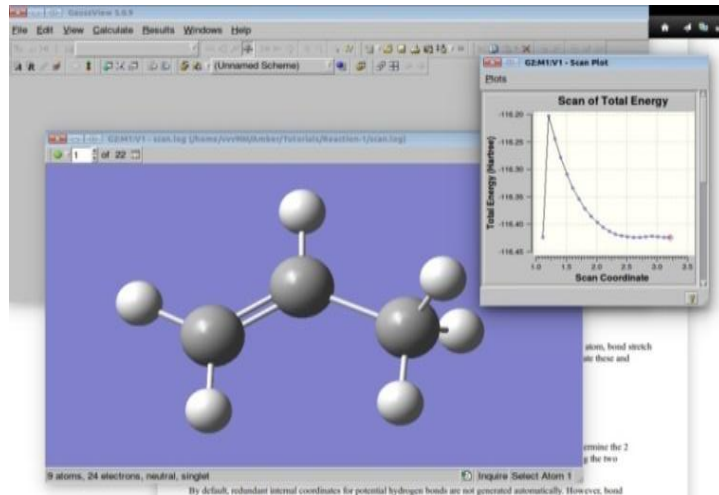
- ADT kullanılarak sonuçların analizleri gerçekleştirilir.

<https://github.com/ccsb-scripps/AutoDock-Vina> adresinden siteye ulaşılabilmektedir.

3.1.4. Gaussian09

Gaussian yazılımı geniş bir yelpaze oluşturan moleküler sistemleri modellemek için tasarlanmış ve moleküler yapılar, spektroskopik veriler için kullanılan kuantum mekaniğine dayalı bir programdır. Ayrıca deneysel olarak incelenmesi imkansız veya zor olan bileşiklerin kesin veya potansiyel reaksiyonlar üzerinde işlemlerini yapmak için de kullanılmaktadır. Gaussian 1970 yılından beri sürekli olarak güncellenmektedir. Gaussian09 çok çeşitli bilgisayar sistemleri için lisanslanmış Gaussian programlar serisinin en son sürümüdür. Gelişmiş yöntemler ve algoritmalar içerdiğinden dolayı çok fazla Kullanım Kolaylığı sağlamaktadır [101]. Gaussian 5.0 View kullanıcı arayüzü ile molekül çizimleri yapılabilmektedir (Şekil 3.2.).

Tezdeki 50 fitokimyasalın optimize edilerek doking işlemine hazırlanması aşamasında kullanılmıştır.



Şekil 3. 2. Gaussian 5.0 View ile Kuersetin Molekülün Görünümü

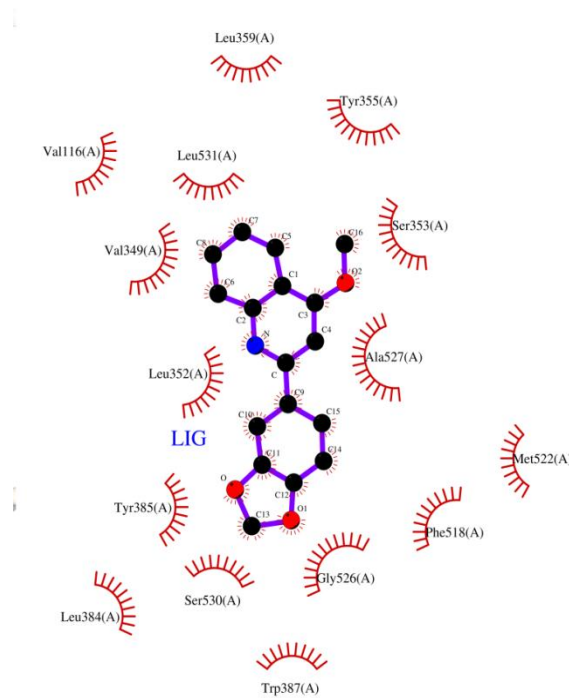
3.1.5. MGL Tools

Proteinlerin ve küçük moleküllerin Autodock ve Autodock Vina gibi docking programları tarafından kullanılabilir formatların oluşturulması ve bazı hesaplamaların gerçekleştirilmesi için kullanılan bir yazılımdır [102]. Protein yapıların ve küçük moleküllerin docking işlemine hazırlanılmasında bu yazılımdan yararlanılmıştır.

3.1.6. Ligplot

Ligplot programı, standart Protein Veri Bankası dosya girişinden protein-ligand komplekslerinin şematik diyagramlarını oluşturan bir programdır. Ligplot ile çizilen dosyalar hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler dâhil olmak üzere moleküller arası etkileşimlerin ve güçlerinin basit ve bilgilendirici bir temsili veren renkli veya siyah beyaz PostScript verilerdir. Ayrıca proteinler ve nükleik asitlerdeki diğer etkileşim türlerini göstermek için de kullanılabilir [103].

Çalışmamızda protein ve liganlar arasındaki etkileşimlerin analizi için bu yazılım kullanılmıştır (Şekil.3.3.).



Şekil 3. 3. Graveolinin Ligandının Aminoasitlerle İki Boyutlu Etkileşimi

3.1.7. Ambertool

AmberTools, kimyasal sistemlerle ilgili hesaplamalı çalışmalarda özellikle biyomoleküler simülasyon ve analiz için tasarlanmış çok sayıda paketten oluşan programlardır. Bu programlardır birlikte veya ayrı ayrı çalışacak şekilde tasarlanmış ücretsiz program pakeleridir [104]. Çalışmamızda MD simülasyonlarını çalıştırmak ve molekülleri hazırlamak için kullanılmıştır.

3.1.8. GROMACS

“Groningen Machine for Chemical Simulations”ın baş harflerinden oluşan GROMACS programı 1980'lerde Hollanda'nın Groningen Üniversitesinde geliştirilmiş açık kaynak kodlu bir moleküler dinamik simülasyon aracıdır. Birçok kuvvet alanı parametrelerini destekleyen GROMACS diğer simülasyon programından da 2-10 kat daha hızlı çalışmaktadır [105]. GROMACS, Newton denklem teorilerini kullanarak protein, lipid ve nükleik asit simülasyonları için tasarlanmış çok yönlü, iyi optimize edilmiş bir paket programdır. Ayrıca polimerler gibi biyolojik olmayan sistemlerin hesaplamasında son derece hızlıdır. GROMOS, OPLS, AMBER ve ENCAD gibi farklı kuvvet alanlarıyla uyumlu olan GROMACS birçok alt programlardan meydana gelmektedir. <http://www.GROMACS.org> adresinden edinilebilir. GROMACS programı, komut satırı arabirimi ile çalıştırılır ve dosyaları girdi ve çıktı olarak kullanılmaktadır. Hesaplamalar, ilerleme ve tahmini bitiş zamanı geribildirim, yörünge görüntüleyici ve analizi için detaylı bir görüş vermektedir [106].

3.1.9. G_mmpbsa

G_mmpbsa moleküllerin serbest bağlanma enerjilerinin GROMACS yazılımı kullanılarak tahminlenmesine yardımcı olan bir yazılımdır. Bu yazılım Moleküler Mekanik Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı metodunu kullanarak serbest bağlanma enerjisini tahminlemektedir [107]. Trajectory dosyalarının işlenmesi, belirli enerji terimlerinin hesaplanması, her bir aminoasitle ligand etkileşimlerinin ölçülmesi, polar ve polar olmayan çözünme enerjilerinin hesaplanması gibi işlemleri gerçekleştirebilmektedir. Ayrıca harici bir yazılım diline veya ihtiyaç

duymadan, GROMACS paketine benzer bir kullanımla serbest enerji hesaplaması yapılabilmektedir. Seçilen doğal ürünlerin ilgili proteine olan serbest bağlanma enerjisinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

3.1.10. SWISS-MODEL

1993 yılında başlayan otomatik modelleme alanının öncü sunucusu olan ve üç boyutlu protein yapılarının otomatik karşılaştırmalı modellemesi için kullanılan ücretsiz web tabanlı modelleme programıdır [108]. İsviçre Biyoenformatik Enstitüsü tarafından taranmıştır. <https://swissmodel.expasy.org/> adresinden siteye ulaşılabilmektedir. Ayrıca kişisel bilgisayarlara kurularak da çalıştırılabilen DeepView programı vasıtasıyla kullanılabilir.

3. 1.11. Swiss ADME

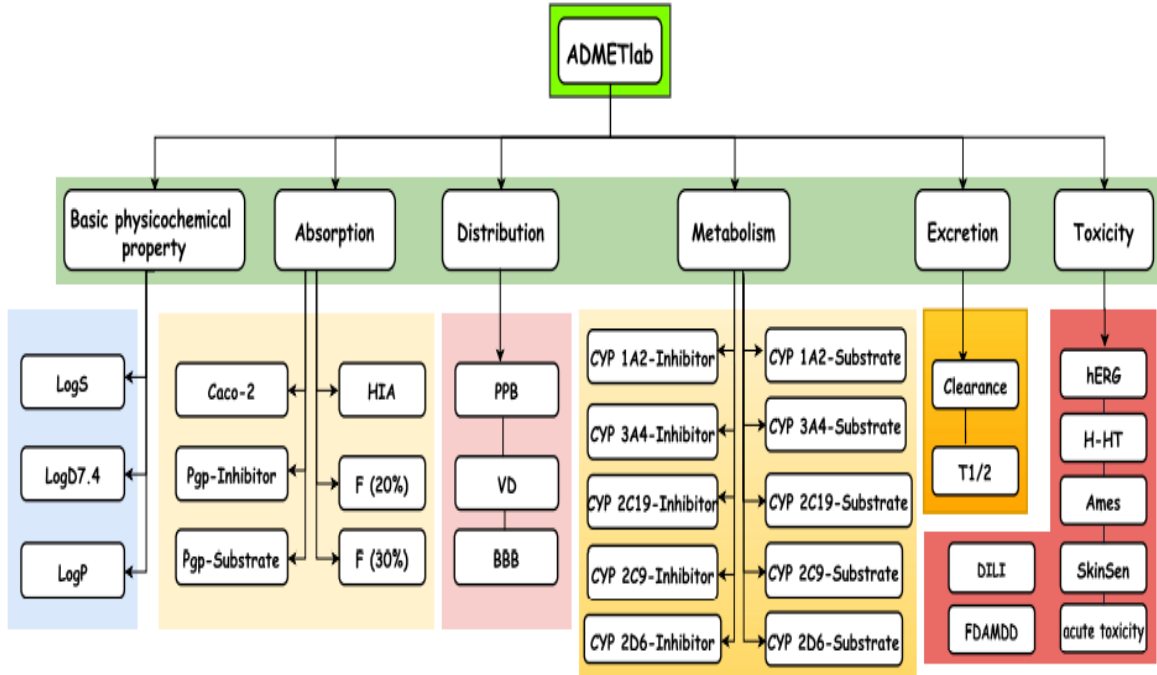
İlaç tasarım süreçlerinde çoğu ilaç adayı çeşitli nedenlerden dolayı pazarlanan ilaçlar haline gelemeyiz. Bu başarısızlığın temel nedenlerinden biri zayıf fizikokimyasal ve farmakokinetik özelliklerdir. Swiss ADME programı bu özellikleri hesaplamak ve ilaç benzerliklerini tahmin etmek için bir dizi parametreye ve tahmine dayalı modele erişim sağlayan ücretsiz bir araçtır. Bu program fizikokimyasal özelliklerin hesaplanmasının yanında ilaç keşfi için kritik önemi bulunan özellikleri belirleyebilmektedir.

Kullanıcılar analiz için tek seferde bir molekül çizebilmekte ve ardından ADMET'in bir SMILES dönüşümü yaparak tahmini yapılabilmektedir. Buna ek olarak, kullanıcının SMILES bilgisi varsa, moleküllerin SMILES'ini kullanarak da tahmin yapılabilmektedir. Bu çalışmadaki bileşiklerin ilaç benzerliği Lipinski kuralına göre değerlendirilmiştir [109].

3. 1. 11. ADMETlab

Araştırmacılar tarafından ADMET değerlendirmesini kolaylaştırmak amacıyla, mevcut ADMET ve temel fizikokimyasal parametreler ile ilgili son verileri mümkün olduğunca entegre eden kapsamlı bir şekilde toplanmış bir veri tabanıdır (Şekil.3.4.).

Bu modüller, ücretsiz olarak erişilebilen bir web arayüzünde bulunmaktadır (<https://admetmesh.scbdd.com/service/evaluation/index>). Kullanıcılar isterlerse molekül çizimi yapabilirler ya da SMILES bilgilerine sahiplerse moleküllerin SMILES'ini kullanarak da tahmin yapılabilmektedir [110].

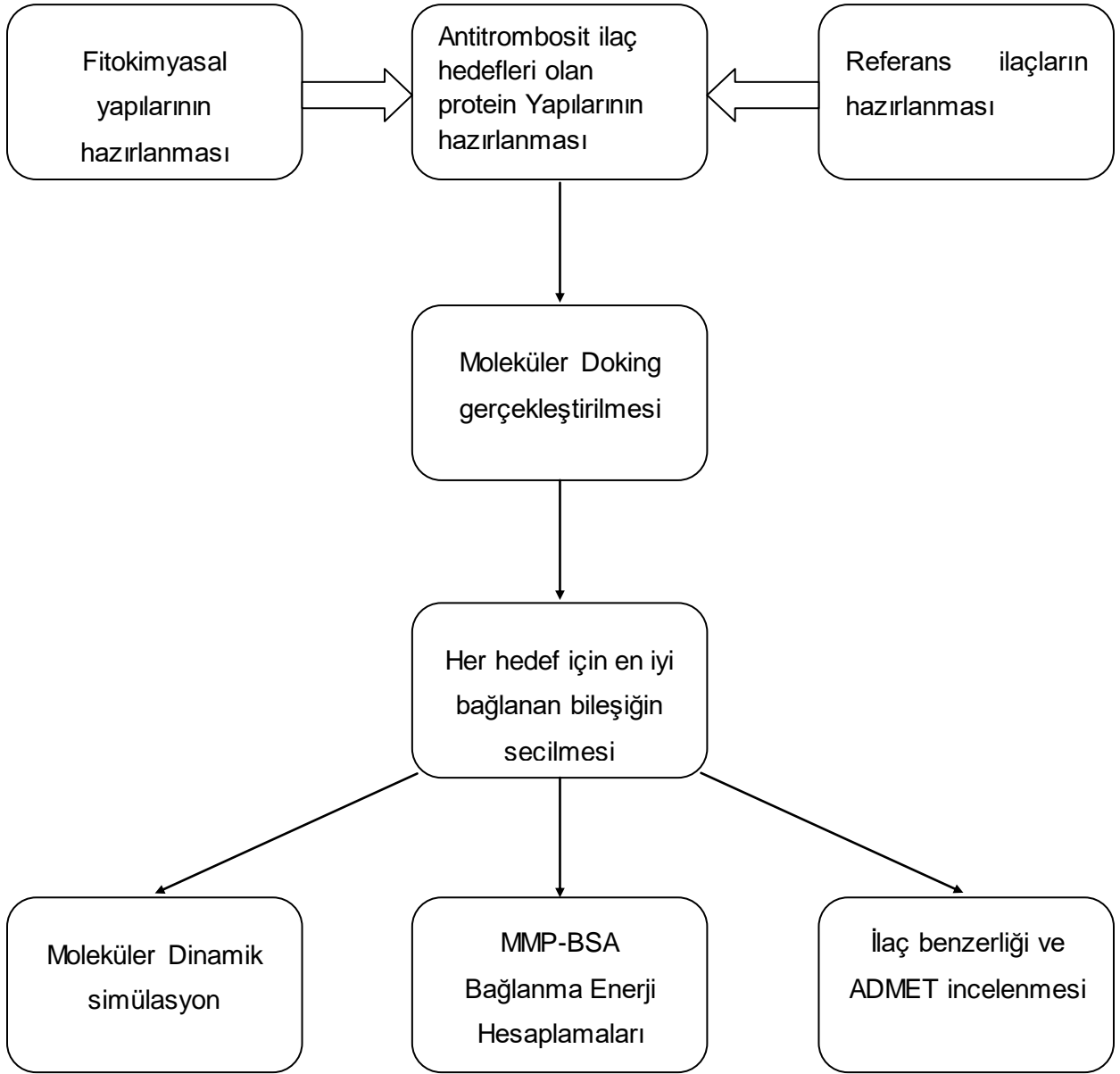


Şekil 3. 4. ADMETlab Programı İle Değerlendirilebilecek ADMET Özellikleri

3.2. ÇALIŞMA AŞAMALARI

Tez kapsamında yapılan çalışma altı aşamadan oluşmaktadır

1. Çalışmada kullanılan fitokimyasalların geometri optimizasyonu yapılarak doking çalışmalarında kullanılmak için kararlı konformasyonları belirlenmiştir.
2. Moleküler doking için kullanılan AutoDock Vina programının uygunluğuna bakmak için önce validasyon testi 3N8X, 4NTJ, 1SO2, ve 3VW7 kodlu enzimler için yapılmış ve RMSD değeri dikkate alınmıştır.
3. Literatürde bu 50 fitokimyasalın seçilen beş reseptörün aktif bölgesi ile nasıl etkileştiği bilinmemesi üzere moleküler doking programı kullanılarak bu reseptörlerin aktif bölgesi ile nasıl etkileşime girdikleri incelenmiştir. Ayrıca bağlanma enerjileri ve bağlanma modları da kapsamlı olarak incelenmiştir.
4. En iyi skora sahip beş bileşik için MD simülasyon gerçekleştirildi ve simüle edilmiş kompleksler, ligandlar ve proteinler arasındaki bağlanma stabilitesi ve etkileşim güçleri RMSD, RMSF, ve mesafe analizi parametreleri ile onaylandı ve
5. Molecular Mechanics/Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) yöntemi ile bağlanma enerjileri rafine edildi.
6. Çalışmamızda bileşiklerin ilaç benzerliği ve *in silico* ADMET özellikleri ADMETlab programı kullanılarak tahmin edilmiştir.



Şekil 3. 5. Çalışma Aşamalarının Şematik Gösterimi

3.2.1. Doking Yöntemi Validasyonu

Autodock Vina programının doğrulanması için tüm protein yapılarındaki ligandlar enzimlerine yerleştirilerek konformasyonların orijinal X-ray yapısındaki konformasyonlardan sapma dereceleri incelenmiştir. RMSD olarak adlandırılan bu değer incelenen programların farklılıkları, protein ve ligand molekülün yapısı gibi çeşitli parametrelere bağlıdır.

Validasyon için seçilecek protein yapıları için Protein databankası incelenip her biri için sonuçlar elde edilmiştir. **3N8X**, **4NTJ**, **1SO2**, **2GI7** ve **3VW7** kodlu yapılar R değerlerinin düşük olması nedeniyle doking hesaplamaları için seçilmiştir [111-115]. Bu yapılar UCSF Chimera Programı ile açılarak içlerindeki kristal sular silinip, ligandları yapıdan ayrılmıştır. Polar hidrojenler ADT ara yüzü kullanılarak eklenmiştir. Sonrasında pdbqt formatında kaydedilip doking işlemi için hazırlanmıştır. Sonuç analizi RMSD değeri karşılaştırılarak yapılmıştır. değeri düşük olması, seçilen yöntemin iyi olduğu anlamına gelmektedir.

Doking metodunun doğruluğunun belirlenmesi amacıyla hesapsal ve deneysel ligand konformerleri arasındaki RMSD değeri karşılaştırılır. RMSD değerlerinde 2 Å sınır değer olarak kabul edilmektedir.

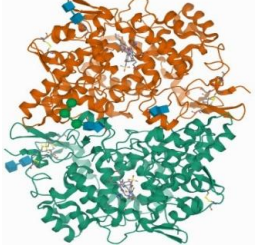
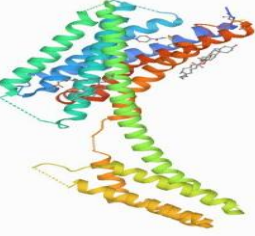
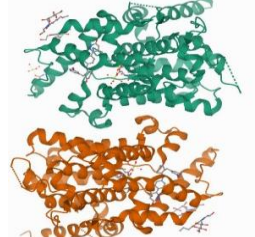
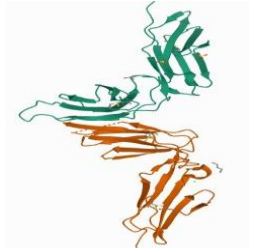
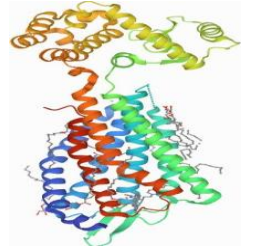
3.2.2. Doking Hesaplamaları

Tüm hesaplamalar, Lenovo 320S Intel ® Core™ i5-8250U CPU @ 1.60GHz 1.80 GHz Windows 10 Pro 64 Bit dizüstü bilgisayar da yapılmıştır. Doking için Autodok Vina programı kullanılmıştır.

3.2.2.1. Protein Dosyalarının Hazırlanması

Trombositler üzerinde etkisi olan beş enzimin X-ışını kristal yapıları COX-1(PDB kodu:3N8X), P2Y12(PDB kodu:4NTJ), PDE-3(PDB kodu:1SO2), GP-VI (PDB kodu:2GI7) ve PAR-1(PDB kodu:3VW7) protein databankası sitesinden (www.rcsb.org) PDB formatında indirilmiştir (Çizelge 3. 1.) .

Çizelge 3. 1. Antitrombosit Hedefler Ve Kullanılan PDB Kodları

Hedef	PDB kod	Çözünürlük (Å)	Organizma	Yıl	3B yapısı
COX-1	3N8X	2.7	Ovis aries (evcil koyun)	2010	
P2Y12	4NTJ	2.6	Koli basili, İnsan	2014	
PDE-3	1SO2	2.4	İnsan	2004	
GP-VI	2G17	2.3	Salmonella bakterisi	2006	
PAR-1	3VW7	2.2	Enterobacte ria phage T4. (T4 bakteriyo fajı). İnsan	2012	

Tüm enzimlerde bağlı bulunan ligandları yapıdan çıkarılıp optimize edildikten sonra. PDB uzantısı ile kaydedilip Doking hesaplamalarının yapılması için hazırlanmıştır. Daha sonra PDB uzantısında hazırlanan yapılarda ADT programı ile tüm kristal sular silinip polar hidrojenler yapıya eklenmiştir. En son döne bilen bağlar tanımlandıktan sonra aktif bölge koordinatları belirlenmiş ve dosyalar PDBQT halinde kaydedilmiştir.

3.2.2.2. Ligand Dosyalarının Hazırlanması

Tezde kullanılan 50 fitokimyasal ve referans bileşikleri olarak alınan beş antitrombosit ilaç PUBCHEM veritabanından sdf formatı ile indirilmiştir (EK.1). Daha sonra Gaussian09 yazılımı kullanılarak .gjf dosyasına çevrilip optimize edilmiştir. DFT/B3LYP/6-31G (d,p) seti ile yapılan optimizasyon işleminde temel amac minimum enerjiye sahip en kararlı ve en uygun konformasyonu bulmaktır.

Ligand dosyası hazırlanması işleminde optimizasyonu yapılan fitokimyasallar NewZmat yoluyla. pdb formatına çevrilip torsiyon kökü ve torsiyon sayısı belirlenmiştir. Daha sonra ADT ile açılarak doking çalışması için hazır hale getirilmiş ve PDBQT formatında kaydedilmiştir.

3.2.2.3. AutoDock Vina ile Doking Hesaplamaları

AutoDock Vina programı ile doking işleminin yapılabilmesi için protein ve ligandın ismi, bu ikilinin bağlanma bölgelerini içine alacak alanın boyutlarını ve kartezyen koordinatlarını içeren konfigürasyon dosyası gereklidir.

Enzimlerin aktif bölgeleri birbirlerinden farklı olduğundan bağlanan atomların boyutları ve koordinatları da farklılık göstermektedir. konfigürasyon dosyası, Grid haritası ile belirlenen kartezyen koordinatları doking için hazırlanan ve .txt formatı içinde "conf" adında, doking işlemine girecek ligandın dosya adı ve formatının yazıldığı, grid harita kartezyen koordinatlarının ve grid kutusunun boyut değerlerinin bulunduğu dosyadır (Şekil.3.6).

Autodock Vina hesaplamaları için tek girdi dosyası Konfigürasyon dosyasıdır. Her enzimin aktif bölgesi kendine özgüdür. Bu yüzden kullanılan her beş enzimde bağlanmanın gerçekleşeceği atomun koordinatları ve küpün boyutları

farklılık göstermektedir. Bu dosyanın COX-1 için hazırlanan örneği Şekil 3. 7.'de görülmektedir.



Şekil 3. 6. Grid Kutusunun Gösterimi

```
conf - Not Defteri
Dosya Düzen Biçim Görünüm Yardım
receptor=3N8Xop.pdbqt
ligand=dsang.pdbqt

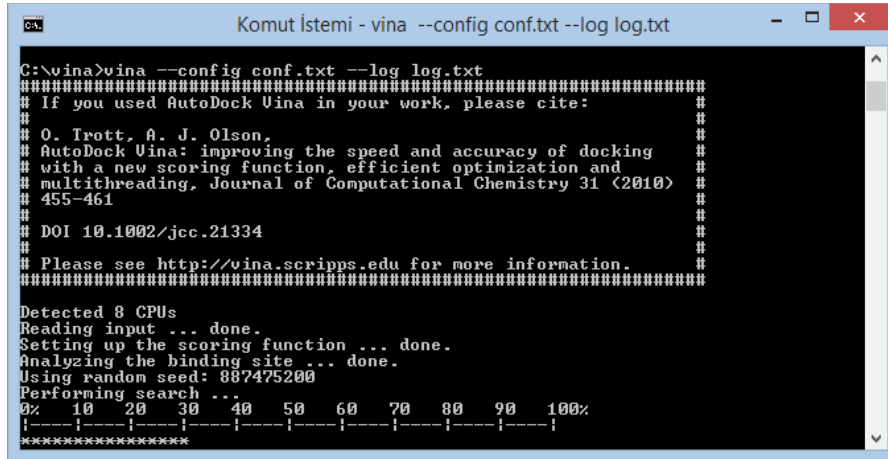
out= out.pdbqt

center_x=-34.11
center_y=-54.89
center_z= 23.79

size_x=30
size_y= 30
size_z=30
```

Şekil 3. 7. COX-1 için Örnek Konfigürasyon Dosyası

Docking işlemi başlamadan önce Autodock Vina'nın çalışmasını sağlayan vina.exe dosyası komut sistemi üzerinden çağrılır. Bu komut The Scripps Research Institute tarafından hazırlanmıştır. İlk olarak docking aşamasında kullanılacak olan conf.txt dosyasının bulunduğu klasör çağrılır. Program çalışmaya başladıktan sonra log dosyası kaydedilir. Moleküler Docking hesaplamalarının başlangıç görüntüsü Şekil 3. 8.'de bulunmaktadır.



```

C:\vina>vina --config conf.txt --log log.txt
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:
#
# O. Trott, A. J. Olson,
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking
# with a new scoring function, efficient optimization and
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)
# 455-461
#
# DOI 10.1002/jcc.21334
#
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.
#####
Detected 8 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: 887475200
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
*****

```

Şekil 3. 8.Docking Hesaplaması Başlangıç Görüntüsü

3.2.3. MD Simülasyonlarının Yapılması

Autodock Vina programından elde edilen her hedef için en iyi ligand MD simülasyonuna tabi tutulmuştur. MD simülasyonları, Linux işletim sisteminde GROMACS 2021.2 paketi kullanılarak yürütülmüştür.

Ligandları simülasyona hazırlanmak için yük dağılımları yapıp daha sonra mol2 formatında kaydedilmiştir. Elde edilen molekülün AMBER99SB alan kuvveti ile uyumlu topoloji, parametre dosyaları acpype yazılımı ile oluşturulmuş ve GROMACS yazılımı ile uyumlu hale getirilmiştir. Genel AMBER kuvvet alanı proteinlerin topoloji parametrelerini oluşturmak için kullanılmıştır [116, 117].

Simülasyonlara başlamadan önce ilk olarak yapılar kübik bir simülasyon kutusunun merkezine yerleştirilmiştir. Yapılardaki proteinler için histidinlerin doğru hidrojen durumu ve enzimler için de gerektiğinde disülfid bağları

tanımlanmıştır. Kuvvet alanına uygun su modelleri kullanılarak sistemlere su molekülleri eklenmiştir. Su kutusunun boyutu 10 Å³ olarak tutulmuştur. Sistemler için yeterli karşı iyonlar eklenerek nötralize edildikten sonra dik iniş algoritması kullanılarak iki aşamalı enerji minimizasyonları uygulanmıştır. Bu işlem Steepest Descent metodu ile 5000 zaman adımı ile gerçekleştirilmiştir. Her yapının Minimizasyonu yapıldıktan sonra dengeleme simülasyonuna tabi tutulmuştur.

Equilibration veya dengeye getirme işlemi için NVT ve NPT toplulukları kullanılmıştır. Sıcaklık v-rescale termostadı ile 310 K' de sabit tutulmuştur ve termostat için çiftlenim sabiti 0.1 ps olarak seçilmiştir. Basınç ise Parrinello–Rahman barostadı ile 1 bar da sabit tutulmuştur ve barostat için çiftlenim sabiti 1 ps olarak seçilmiştir. Tüm kuvvet alanları için 100 nanosaniye (ns) zamanı uzunluğunda üç adet birbirinden bağımsız ürün simülasyon hesaplamaları yapılmıştır. Böylece tüm sistemlerin analizi için birbirinden bağımsız yörünge dosyaları elde edilmiştir.

Çalışmadaki tüm simülasyonlar 100 ns üretim çalışması uygulanmış ve sonuçlar her 4 ps'de bir bir frame alınacak şekilde kaydedilmiştir. Tüm hesaplamalar Intel Core i7 işlemcili ve 4 GB RAM'li bir Dell PC'de çalışan Red Hat 10. 2 Linux platformunda GROMACS programının 2021.2 versiyonu ile yapılmıştır.

3.2.3.1. Veri Analizleri

Kaydedilen verilerin analizi GROMACS paketi içeriğindeki araçlar ile gerçekleştirilmiştir. Simülasyonların tamamlanmasının ardından, Sistemlerin kararlılığı ve esnekliği, stabilitesi, etkileşim gücünü, yapısal ve dinamik özellikleri kontrol etmek amacıyla konformasyonel kararlılığın önemli göstergeleri olan Karekök ortalama sapma (RMSD) ve kök ortalama kare dalgalanma (RMSF) parametreleri kullanılarak incelenmiştir. Bu dosyaların analizlerinden ilgilenilen yapının özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır.

RMSD değerleri GROMACS'ta gmx_rms komutu kullanılarak GROMOS program yardımcı programı ile hesaplanmıştır. RMSD çok zincirli yapıların kararlılık çalışmaları için sıklıkla kullanılan başlıca analiz araçlarından ve

Protein zincirlerindeki atomlarının simülasyon boyunca başlangıçtaki konformasyonel yapılarındaki konumlarından ne kadar saptığını göstermektedir. Bu analiz simülasyonun dengeye ulaşp ulaşmadığını gösterir. 1-3 Å RMSD değeri mükemmel olarak kabul edilir.

RMSD yapıların konformasyonel kararlılığına sıcaklığın etkisi hakkında da önemli bilgiler sağlayabilmektedir.

RMSD değerine ek olarak, aminoasitlerin hakkındada bilgi edinebilmek ve protein bölgelerinin mobilitesini incelemek amacıyla her bir aminoasit için RMSF değerleri de hesaplanmıştır. RMSF değerleri GROMACS'ta `gmx_rmsf` komutu kullanılarak GROMOS yardımcı programı ile hesaplanmıştır. Bu bölümde, aminoasitlerin esnekliğini incelemek için, simülasyonun son 20 ns'si (RMSD diyagramının kararlı kısmı) kullanılmış ve hesaplama için aminoasitlerin alfa-karbonları temel alınmıştır. Daha düşük RMSF değerine sahip kalıntılar daha küçük konformasyonel değişiklik olduğunu ve daha fazla kararlılığa sahip olduğunu göstermektedir. İdeal ve kabul edilebilir RMSF değeri 0.3 nm 'nin altındadır.

3.2.4. MM-PBSA Yöntemi Hesaplamaları

Moleküler mekanik Poisson-Boltzmann yüzey alanı (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area – MM-PBSA) moleküllerin etkileşimlerinden oluşan bağlanma serbest enerjisinin hesaplanmasına ve bu enerjinin tahmin edilmesi için en önemli hesaplama yöntemlerinden biridir.

Çalışmadaki sistemlerin serbest enerji değerleri MM-PBSA yaklaşımına dayalı `g_mmpbsa` yazılımı kullanılarak hesaplanmış ve yapılarındaki aminoasitlerin bağlanma enerjilerine olan katkıları incelenmiştir. Örnek kodları Şekil 3. 9'da verilmiştir. Her kompleks için MD simülasyonunun son 30 ns'sinden eşit aralıklarla çıkarılan koordinatların 300 anlık görüntüsü alınmıştır.

```

gmx pdb2gmx -ff amber99sb -f receptor.pdb -o complex.pdb -water
tip3p

grep -h ATOM complex.pdb LIG_NEW.pdb >| complex2.pdb

cat topol.top | sed '/forcefield\.itp\|/a\#include "LIG_GMX.itp"'
>| complex.top

echo "LIG 1" >> complex.top

gmx editconf -f complex2.pdb -o newbox.gro -bt dodecahedron -d 1.0

gmx solvate -cp newbox.gro -cs spc216.gro -p complex.top -o
solv.gro

gmx grompp -f ../ions.mdp -c solv.gro -p complex.top -o ions.tpr

gmx genion -s ions.tpr -o solv_ions.gro -p complex.top -pname NA -
nname CL -neutral -conc 0.15 <<ROD
<<ROD
<<ROD

gmx grompp -f ../em.mdp -c solv_ions.gro -p complex.top -o em.tpr

```

Şekil 3. 9. MM-PBSA Simülasyonları İçin Hazırlanan Scriptler

3.2.5. Moleküllerin İlaç Benzerlik ve ADMET Çalışmalar

Moleküllerin farmakokinetik, fizikokimyasal özellikleri gibi ADMET profillerinin belirlenmesi için kullanılan önemli parametreleri, SwissADME, ADMETlab 2.0 web sunucuları kullanılarak yapılmıştır. Ligandların ilaç benzerlik özellikleri konusunda bir değerlendirilme yapılmıştır.

SwissADME ve ADMETlab 2.0 web siteleri üzerinden SMILES bilgisi kullanılarak tahmin gerçekleştirilmiştir.

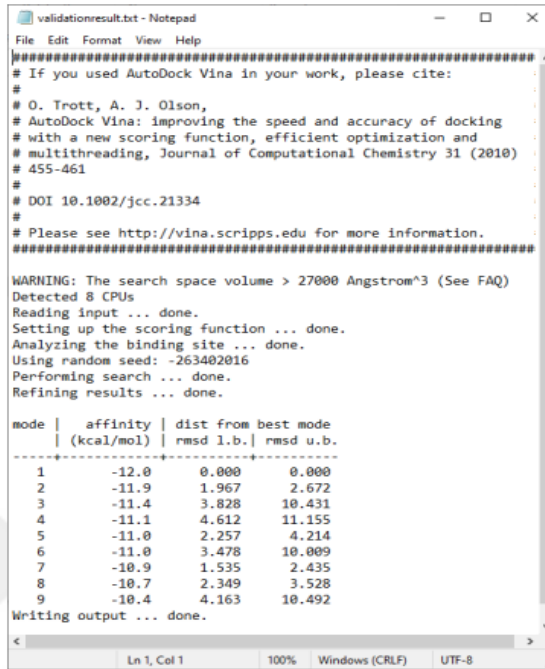
4. SONUÇLAR

4.1. Fitokimyasalların Geometri Optimizasyonu

Doğal bileşiklerdeki 50 fitokimyasalın geometri optimizasyonu DFT/B3LYP/6-31G(d,p)temel seti ile yapılmıştır. Tüm hesaplamalar, Lenovo 320S Intel ® Core™ i5-8250U CPU @ 1.60GHz 1.80 GHz Windows 10 Pro 64 Bit dizüstü bilgisayar da yapılmıştır.

4.2. Validasyon Sonuçları

Autodock Vina programının validasyonu için, X-ray yapısında proteinlerin içinde bulunan ligandlar yapıdan çıkarılarak Autodock Vina programı yardımıyla aynı yapıya tekrar yerleştirilip, elde edilen konformasyonların referans yapıdaki konformasyondan sapması incelenmiştir. Yapılan validasyon işlemi sonrasında elde edilen örnek çıktı dosyası Şekil.4. 1. de verilmiştir.



```
validationresult.txt - Notepad
File Edit Format View Help
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:
#
# O. Trott, A. J. Olson,
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking
# with a new scoring function, efficient optimization and
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)
# 455-461
#
# DOI 10.1002/jcc.21334
#
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.
#####
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 8 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -263402016
Performing search ... done.
Refining results ... done.

mode | affinity | dist from best mode
      | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----+-----+-----+-----
1     | -12.0     | 0.000     | 0.000
2     | -11.9     | 1.967     | 2.672
3     | -11.4     | 3.828     | 10.431
4     | -11.1     | 4.612     | 11.155
5     | -11.0     | 2.257     | 4.214
6     | -11.0     | 3.478     | 10.009
7     | -10.9     | 1.535     | 2.435
8     | -10.7     | 2.349     | 3.528
9     | -10.4     | 4.163     | 10.492

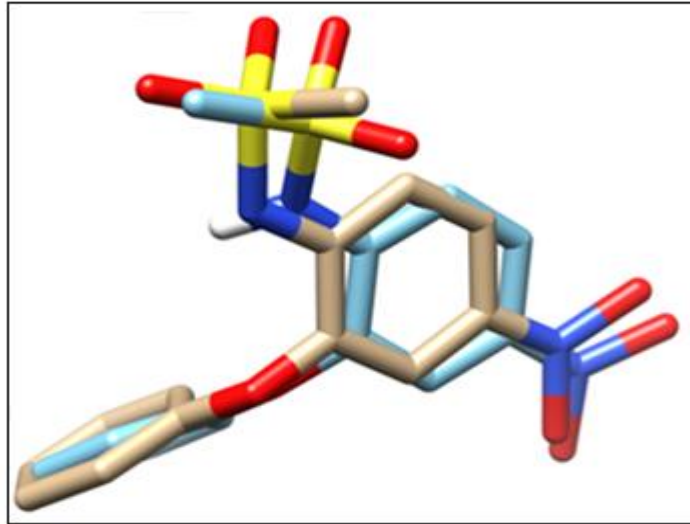
Writing output ... done.
Ln 1, Col 1    100% Windows (CRLF) UTF-8
```

Şekil 4. 1. Validasyon İşleminin Çıktı Dosyası

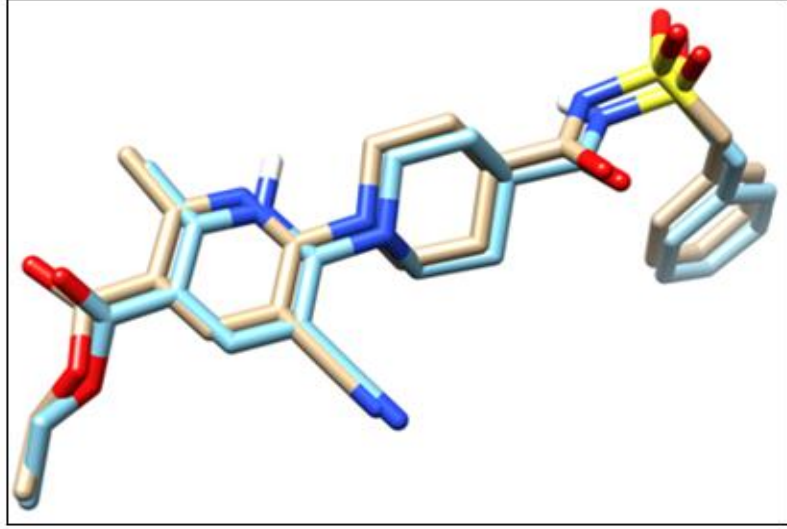
Tüm konformasyonlarda oluşabilecek elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları program sayesinde gözlemlenmiş ve en anlamlı sonucu veren konformasyon seçilmiştir. Yapının orjinal yapıdan sapmasının değerlendirilmesi PyMol Molecular Graphics programı ile incelenmiştir. Validasyonu için, Ligandı olmayan GP-VI proteini hariç, diğer 4 proteinin kristal yapılarındaki ligandlar yapıdan çıkarılarak Autodock Vina programı yardımıyla aynı yapıya yeniden yerleştirilmesi ile elde edilen konformasyonların referans yapıdaki konformasyondan sapması incelenmiştir.

Hesaplama sonucunda, ligandların doking pozisyonları ile kristal yapı pozisyonları üst üste çakıştırılarak, RMSD < 2 Å şartını sağladığı bulunmuştur. RMSD değerleri; COX-1 (PDB:3N8X), P2Y12 (PDB:4NTJ), PDE3 (PDB:1SO2) ve PAR-1 (PDB: 3VW7) enzimleri için sırasıyla 1.103, 0.583, 0.529 ve 0.279 Å bulunmuştur. Her dört pdb kodunun en iyi konformasyonu ve referans olarak alınan ligandın üst üste çakışmış şekilleri ise Şekil (4. 2- 4. 5) de görülmektedir.

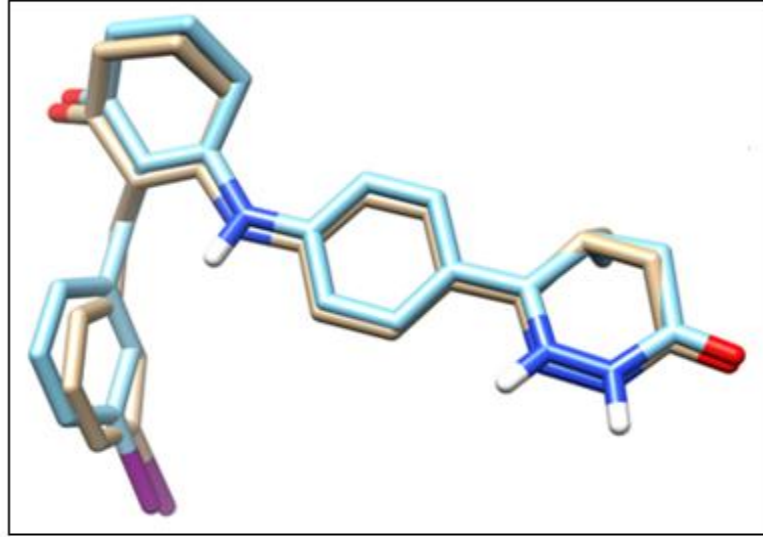
Sonuç olarak Autodock Vina ile oluşturulan log dosyaları ve ADT aracılığı ile oluşturulmuş olan sanal grafiklerin incelenmesi ile validasyon testinin güvenilirliği test edilmiştir. Görsel veriler incelendiğinde aktif bölgeye yerleşen en iyi konformasyonun birinci konformasyon olduğu bulunmuştur.



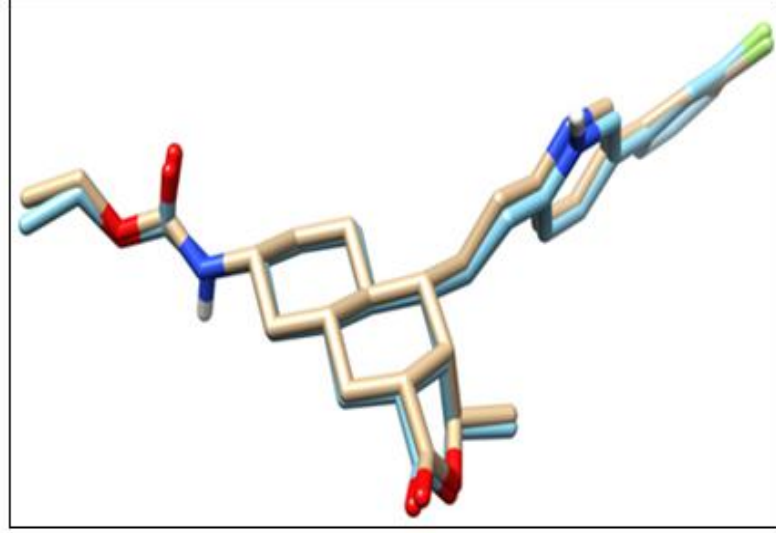
Şekil 4. 2. COX-1'in Validasyon Sonuçları. (Altın Rengi Kristal Ligandın Orjinal Yapısı, Mavi Renk En İyi Değere Sahip Olan Ligand).



Şekil 4. 3. P2Y12'in Validasyon Sonuçları. (Altın Rengi Kristal Ligandın Orijinal Yapısı, Mavi Renk En İyi Değere Sahip Olan Ligand).



Şekil 4. 4. PDE-3'in Validasyon Sonuçları. (Altın Rengi Kristal Ligandın Orijinal Yapısı, Mavi Renk En İyi Değere Sahip Olan Ligand).



Şekil 4. 5. PAR-1'in Validasyon Sonuçları. (Altın Rengi Kristal Ligandın Orijinal Yapısı, Mavi Renk En İyi Değere Sahip Olan Ligand).

4.3. Fitokimyasallar ile Yapılan Doking Sonuçları

Doking hesaplamaları antitrombosit etki gösteren 14 farklı bitkiden elde edilen toplam 50 doğal bileşik ile antitrombosit ilaç hedefleri olan COX-1, P2Y12, PDE-3, GP-VI ve PAR-1 proteinleri arasında yapılmıştır. Bütün çalışmalar Lenovo 320S intel^(R) Core^(TM) i5-8250U CPU @ 1.60GHz 1.80 GHz Windows 10 Pro 64 Bit dizüstü bilgisayar da yapılmıştır. Hesaplamalar her hedef için üçer kez tekrar edilerek yapılmıştır. Sonraki aşamada her hedef için en yüksek afiniteye (en düşük serbest bağlanma enerjisi; ΔG (kcal/mol)) sahip bileşik seçilmiş ve detaylı olarak incelenmiştir.

Çizelge 4. 1. En İyi Bağlanma Değerine Sahip Bileşikler

Hedef Protein	Fitokimyasal	Bitki	Bağlanma Enerji (kcal/mol)	Referans ilaç	Ki değeri (µM)
COX-1	Graveolinin	Sedefotu	-8.6	Aspirin (-6.9)	0.53
P2Y12	Sanguinarin	Kankökü	-10.9	Klopidogrel (-7.6)	0.01
PDE-3	Sanguinarin	Kankökü	-11.9	Silostazol (-9.3)	0.001
GP-VI	Rutin	Sarkantaron	-7.4	Hionokitiol (-5.8)	3.76
PAR-1	BDMC	Zerdeçal	-10.6	Vorapaksar (-9.9)	0.001

4.3.1. COX-1-Graveolinin Doking Sonuçları

AutoDock Vina programı kullanılarak COX-1 enziminin tezdeki 50 fitokimyasal ile doking hesaplaması yapılmıştır. Mümkün olabilecek konformasyonlar belirlenip, log dosyası oluşturulmuştur

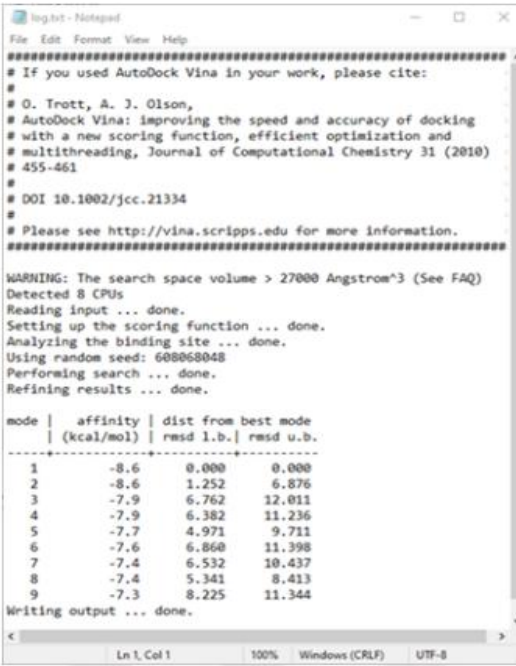
AutoDock Vina kullanıcı ara yüzü yardımıyla en iyi konformasyonu belirlenmiştir. Bağlanma enerjileri ve görsel değerlendirmeler dikkate alınmıştır. İlk konformasyonun aktif bölgeye tam olarak yerleştiği ve bağlanma değerinin diğerlerine göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Fitokimyasalların COX-1 enzim ile doking çalışmasının sonucu çizelge 4.1 de verilmiştir.

Doking işlemi sonucunda **graveolinin** (2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-4-methoxyquinoline) COX-1 enzimine en yüksek afinite ile bağlanan bileşik olduğu bulunmuştur (Şekil 4. 6.). Graveolinin ΔG_B bağlanma enerjisi -8.6 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

Bu enerjiden Ki değeri hesaplanabilir. Hesaplama için kullanılan formül;

$$\Delta G_B = R.T.\ln K_i \quad (R= 1.986 \text{ cal/mol.K; } T= 300 \text{ K})$$

Buradan; Ki değeri 0.53 μM olarak bulunmuştur.



```
log.txt - Notepad
File Edit Format View Help
=====
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:
#
# G. Trott, A. J. Olson,
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking
# with a new scoring function, efficient optimization and
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)
# 455-461
#
# DOI 10.1002/jcc.21334
#
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.
=====
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 8 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: 608068048
Performing search ... done.
Refining results ... done.

mode | affinity | dist from best mode
      | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----|-----|-----|-----
1     | -8.6      | 0.000     | 0.000
2     | -8.6      | 1.252     | 6.876
3     | -7.9      | 6.762     | 12.011
4     | -7.9      | 6.382     | 11.236
5     | -7.7      | 4.971     | 9.711
6     | -7.6      | 6.860     | 11.398
7     | -7.4      | 6.532     | 10.437
8     | -7.4      | 5.341     | 8.413
9     | -7.3      | 8.225     | 11.344

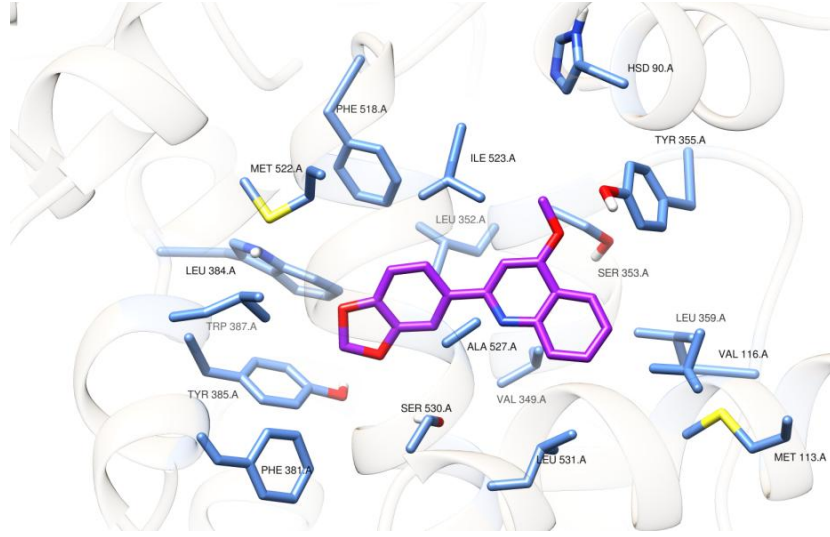
Writing output ... done.
Ln 1, Col 1      100% Windows (CRLF) UTF-8
```

Şekil 4. 6. Graveolinin Log Dosyası

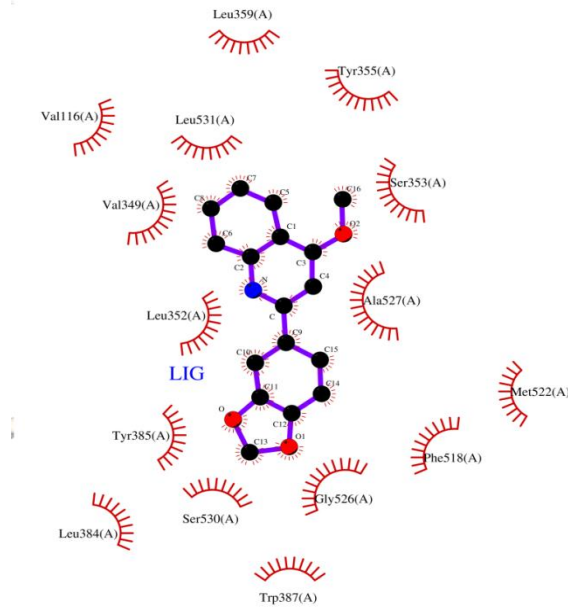
Konformasyonların bağlanma enerjileri ve görsel değerlendirmeleri dikkate alınarak bağlanma ve graveolinin ligandı çevreleyen aminoasitlerle olan etkileşimi şekil 4. 7 ve 4.8 'de verilmiştir.

Konformasyon incelendiğinde enzimin aktif bölgesine yüksek afinite ile bağlanmış olan ligand Leu359, Tyr355, Val16, Leu531, Val349, Ser353, Leu352, Ala527, Tyr385, Met522, Phe518, Leu384, Ser530, Gly526, ve Typ387 aminoasitleri ile etkileşimler yapmışlardır. Konformasyonun, aktif bölgeye tam olarak yerleştiği görülmektedir. Aktif bölgeye yerleşen aminoasitlerin hidrojen bağı yapmadığı ancak Van der Waals etkileşimlerinde buldukları ADT

kullanıcı ara yüzü yardımıyla gözlenmiştir. FDA onaylı ilaç olan ve çalışmamızda referans ilaç olarak kullanılan aspirinin COX-1 e karşı ΔG_B bağlanma enerjisi ise -6.9 kcal/mol yani graveolinin den daha düşük olarak bulunmuştur (Şekil 4.9)

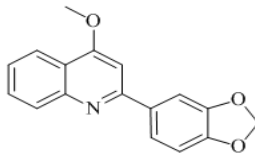
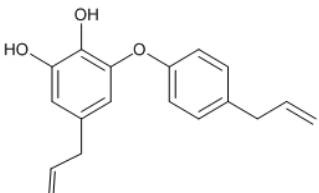
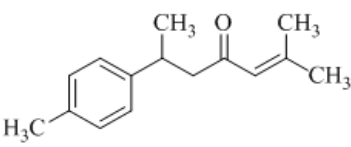
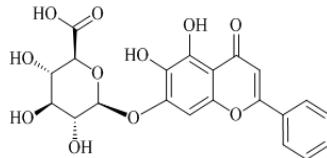
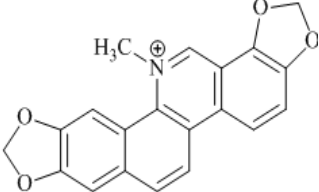


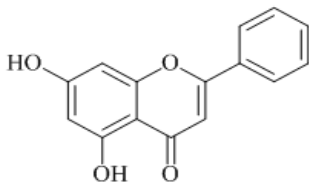
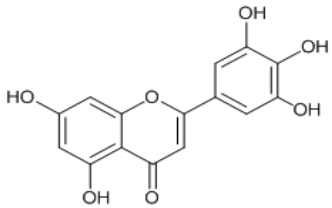
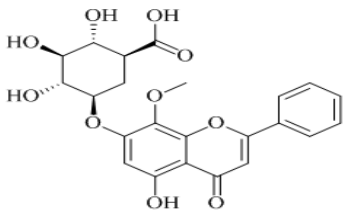
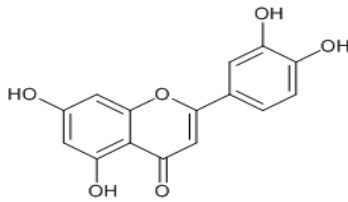
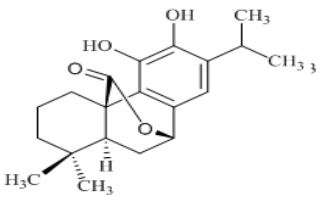
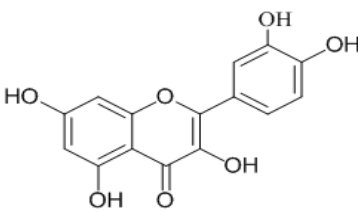
Şekil 4. 7. COX-1-graveolinin kompleksinin Doking Görüntüsü

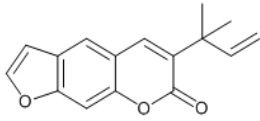
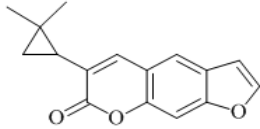
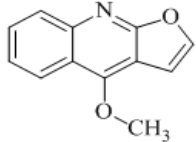
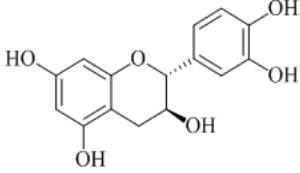
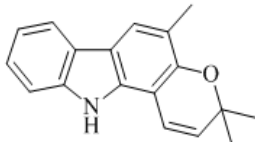
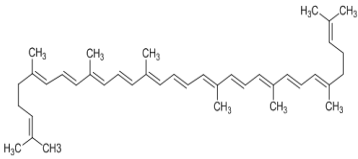


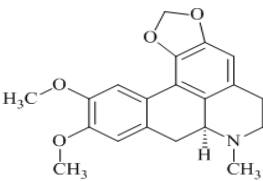
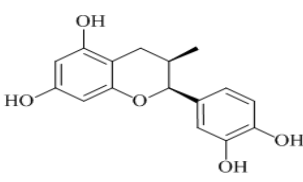
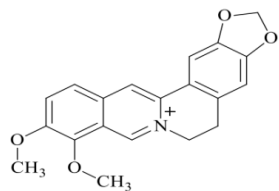
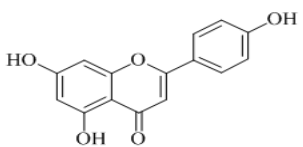
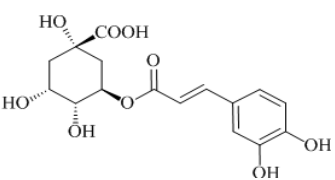
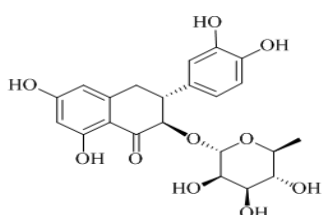
Şekil 4. 8. Graveolinin Ligandının Aktif Bölge Etkileşimleri

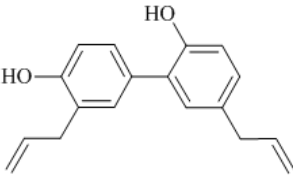
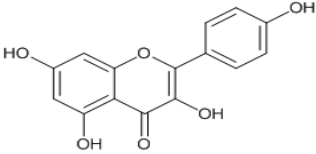
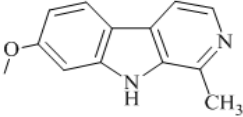
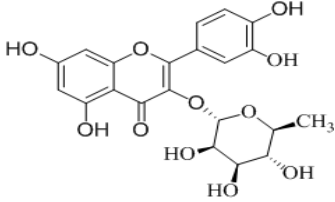
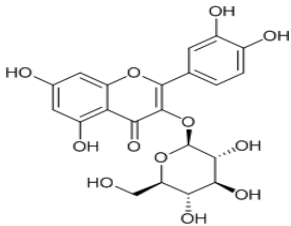
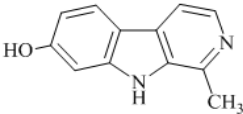
Çizelge 4. 2. Fitokimyasalların Seri Halinde 3N8X İle Doking Sonuçları

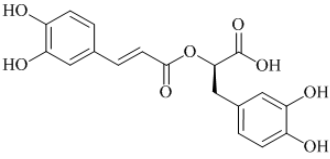
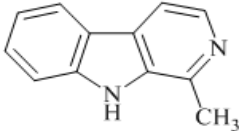
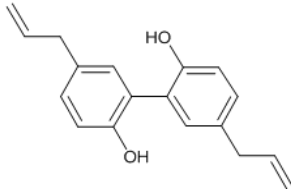
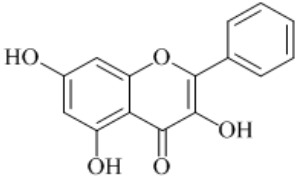
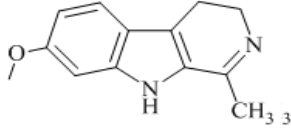
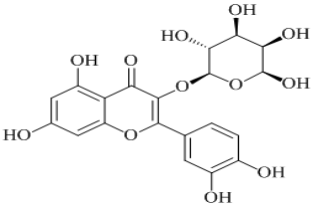
Teorik sıra	Fitokimyasal	Molekül yapısı	Bağlanma enerjisi	Ki (hesaplanan) (μM)
1	Graveolinin		-8.6	0.53
2	Obovatol		-8.5	0.59
3	Ar-turmeron		-8.4	0.75
4	Baisalin		-8.3	0.89
5	Sanguinarin		-8.3	0.89

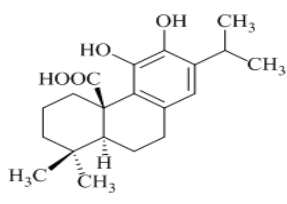
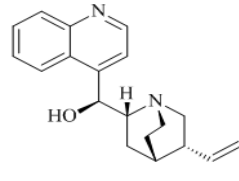
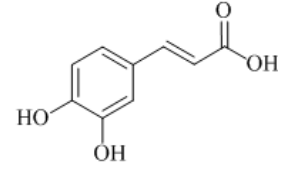
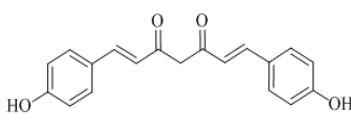
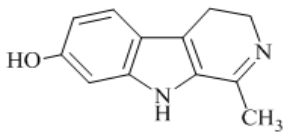
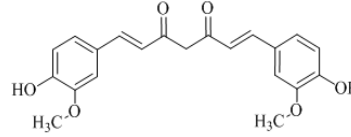
6	Krisin		-8.3	0.89
7	Mirisetin		-8.1	1.24
8	Wogonosid		-8.1	1.24
9	Luteolin		-8.1	1.24
10	Karnosol		-8.1	1.24
11	Kuercetin		-8.1	1.24

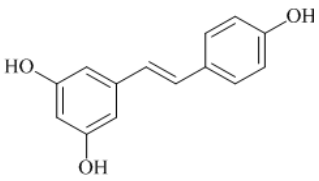
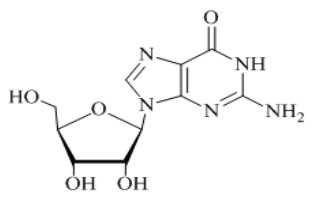
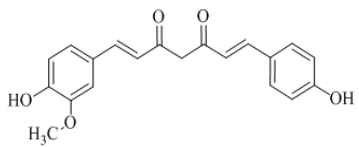
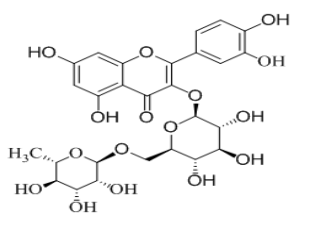
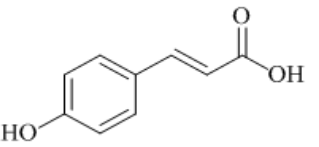
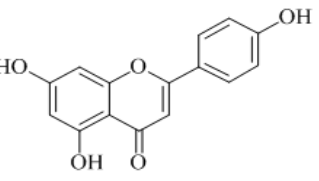
12	Çalepensin		-8.1	1.24
13	Klasindin		-8.0	1.36
14	Diktamin		-7.8	1.69
15	Kateşin		-7.8	1.69
16	Girinimbin		-7.7	1.96
17	Likopen		-7.7	1.96

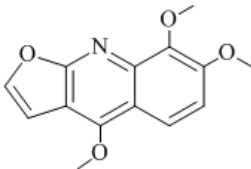
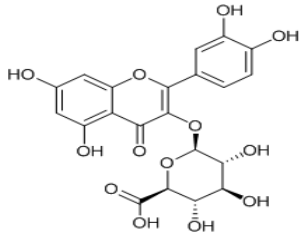
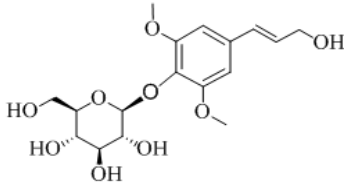
18	Dikentrin		-7.7	1.96
19	Epikateşin		-7.7	1.96
20	Berberin		-7.6	2.68
21	Apigenin		-7.6	2.68
22	Klorogenik Asit		-7.6	2.68
23	Astilbin		-7.5	3.18

24	Honokiol		-7.5	3.18
25	Kaempferol		-7.5	3.18
26	Harmin		-7.5	3.42
27	Kuersitrin		-7.4	3.76
28	İzokuersitrin		-7.4	3.76
29	Harmol		-7.3	4.14

30	Rosmarinik Asit		-7.3	4.14
31	Harman		-7.3	4.14
32	Magnolol		-7.3	4.14
33	Galangin		-7.2	5.67
34	Harmalin		-7.1	6.24
35	Hiperozid		-7.1	6.24

36	Karnosik Asit		-7.0	7.78
37	Cinçonin		-6.9	9.35
38	Kafeik Asit		-6.8	10.35
39	BDMC		-6.8	10.35
40	Harmalol		-6.8	10.35
41	Kurkumin		-6.8	10.35

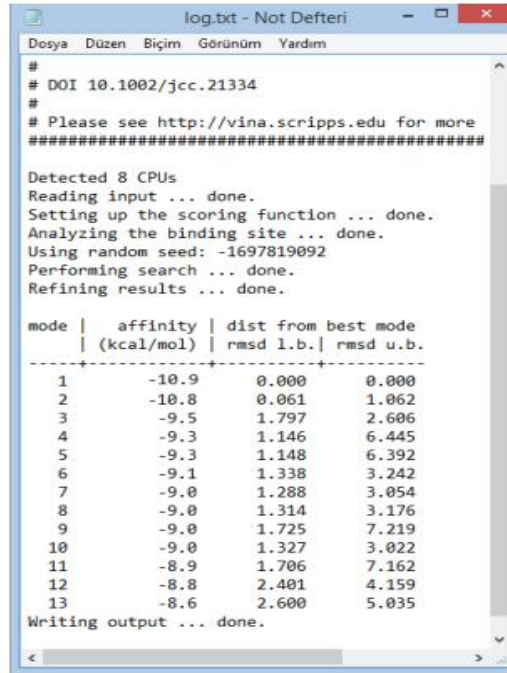
42	Resveratrol		-6.7	14.91
43	Guanozin		-6.7	14.91
44	DMC		-6.6	17.85
45	Rutin		-6.6	17.85
46	P-Koumaric Asit		-6.5	18.76
47	Adenozin		-6.3	20.34

48	Skimmianin		-6.3	20.34
49	Mikuelianin		-5.8	68.92
50	Siringin		-5.7	92.91

4.3.2. P2Y12-Sanguinarin Doking Sonuçları

AutoDock Vina programı kullanılarak P2Y12 reseptörünün tezdeki 50 fitokimyasal ile doking hesaplaması yapılmıştır. Doking işlemi tamamlandıktan sonra program tarafından bir log dosyası oluşturulmuş ve olası konformasyonlar belirlenip, bağlanma enerjileri ve görsel değerlendirmeler dikkate alınmıştır (Şekil 4.10.).

AutoDock Vina kullanıcı ara yüzü aracılığı ile en iyi konformasyonu belirlenmiştir. İlk konformasyonun aktif bölgeye tam olarak yerleştiği ve bağlanma değerinin diğerlerine göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür.



```
#
# DOI 10.1002/jcc.21334
# Please see http://vina.scripps.edu for more
#####

Detected 8 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -1697819092
Performing search ... done.
Refining results ... done.

mode | affinity | dist from best mode
      | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----+-----+-----+-----
  1   |   -10.9 |    0.000 |    0.000
  2   |   -10.8 |    0.061 |    1.062
  3   |    -9.5 |    1.797 |    2.606
  4   |    -9.3 |    1.146 |    6.445
  5   |    -9.3 |    1.148 |    6.392
  6   |    -9.1 |    1.338 |    3.242
  7   |    -9.0 |    1.288 |    3.054
  8   |    -9.0 |    1.314 |    3.176
  9   |    -9.0 |    1.725 |    7.219
 10   |    -9.0 |    1.327 |    3.022
 11   |    -8.9 |    1.706 |    7.162
 12   |    -8.8 |    2.401 |    4.159
 13   |    -8.6 |    2.600 |    5.035

Writing output ... done.
```

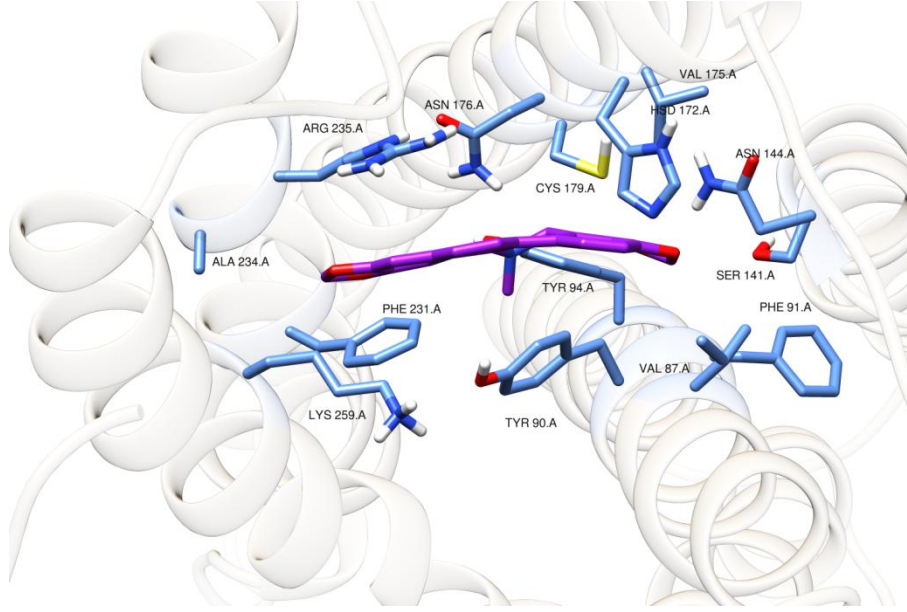
Şekil 4. 9. Sanguinarin'in Log Dosyası

Fitokimyasalların P2Y12 enzim ile doking çalışmasının sonucu çizelge 4. 3 de verilmiştir. Doking işlemi sonucunda sanguinarin (13-metil[1,3] benzodioksolo[5,6-c]-1,3-dioksolo[4,5-i]fenantridinyum), P2Y12 enzimine en yüksek afinite ile bağlanan bileşik olduğu bulunmuştur. Sanguinarin ΔG_B bağlanma enerjisi -10.9 kcal/mol olarak hesaplanmış ve bu bağlanmanın aktif bölgedeki 2 boyutlu ve 3 boyutlu görüntüsü Şekil 4.11'de verilmiştir.

Bu enerjiden Ki değeri aşağıdaki formülden hesaplanabilir;

$$\Delta GB = R.T.\ln Ki \quad (R= 1.986 \text{ cal/mol. K; } T= 300 \text{ K})$$

Buradan; Autodock Vina hesaplamalarına göre Ki değeri 0.01 μM olarak bulunmuştur.



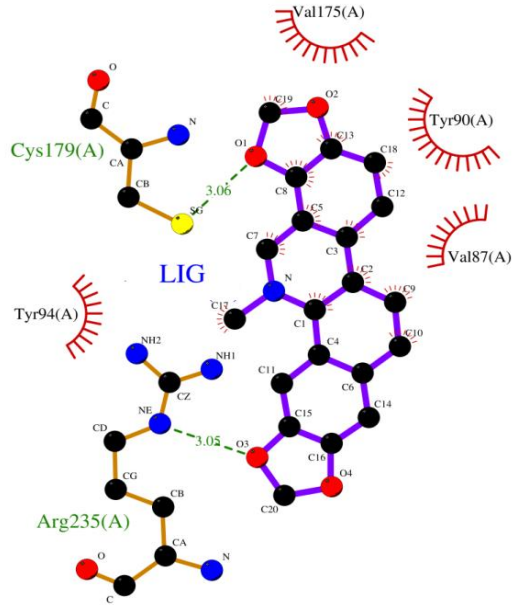
Şekil 4. 10. P2Y12-Sanguinarin Kompleksinin Doking Görüntüsü

Konformasyonun enerji değerleri ve görsel değerlendirmeler dikkate alınarak sanguinarin çevreleyen aminoasitlerle etkileşimi Şekil 4.12 'de verilmiştir.

Konformasyon incelendiğinde Enzimin aktif bölgesine yüksek afinite ile bağlanmış olan ligand Arg235, Cys179, Val175, Tyr90, Val87 ve Tyr94 aminoasitleri ile etkileşimler yapmışlardır. Konformasyonun, aktif bölgeye tam olarak yerleştiği görülmektedir. Aktif bölgeye yerleşen aminoasitlerin hem Hidrojen bağı yaptığı hemde Van der Waals etkileşimlerinde buldukları ADT kullanıcı ara yüzü yardımıyla gözlenmiştir.

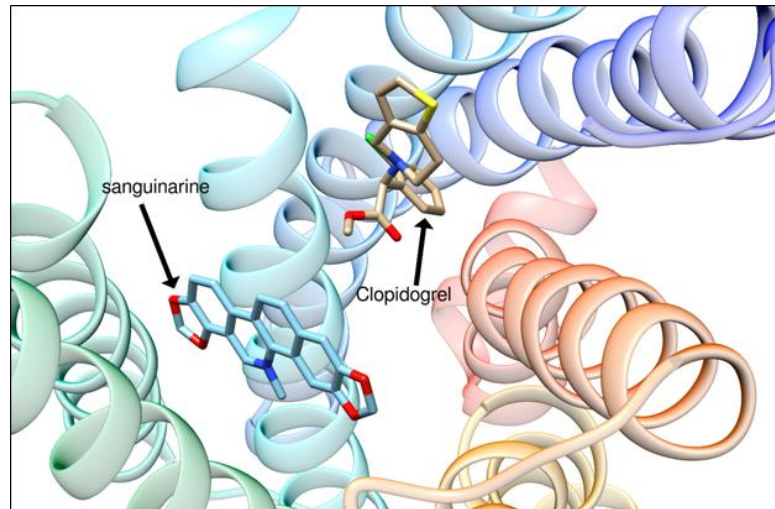
Arg235, Cys179 kalıntıları Hidrojen bağı yaparak ligandın konformasyonuna katkı sağladığı görülmektedir. Ligand, Arg235 aminoasiti ile 3.05 Å uzunluğunda

Hidrojen bağı ve Cys179 aminoasiti ile 3.06 Å uzunluğunda bir Hidrojen bağı yapmıştır.



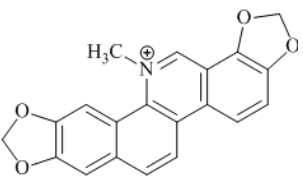
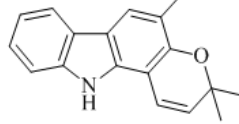
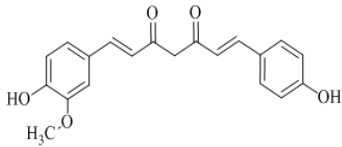
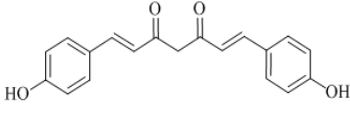
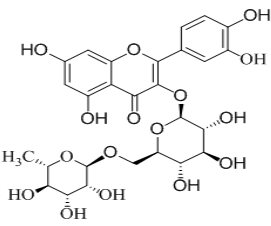
Şekil 4. 11. Sanguinarin ligandının Aktif Bölge Etkileşimleri

FDA onaylı ilaç olan ve çalışmamızda referans ilaç olarak kullanılan klopidogrel P2Y12 ye karşı ΔG_B bağlanma enerjisi ise -7.6 kcal/mol yani sanguinarin'den daha düşük olarak bulunmuştur. Sanguinarin klopidogrel ile aynı bağlanma bölgesine yerleştiği Şekil 4.13.'de görülmektedir.

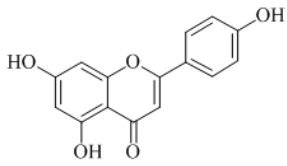
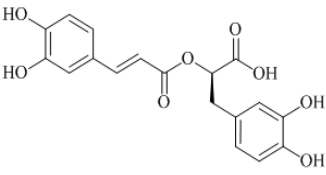
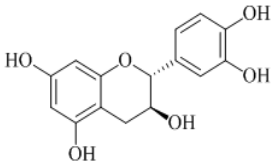
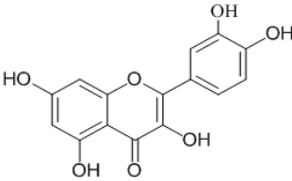
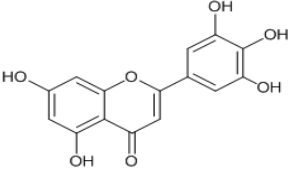
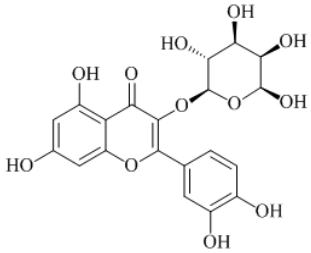


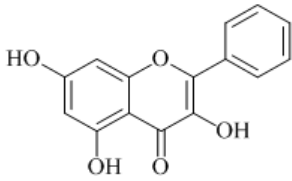
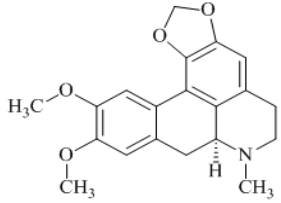
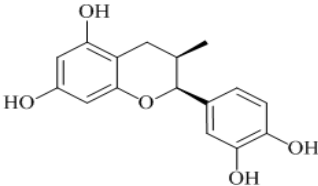
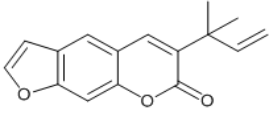
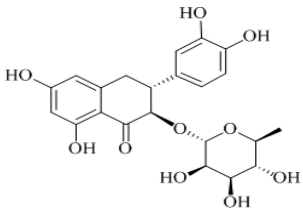
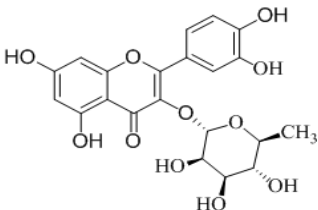
Şekil 4. 12. Klopidogrel Ve Sanguinarin'in Bağlanma Bölgelerinin Karşılaştırılması

Çizelge 4. 3. Fitokimyasalların Seri Halinde 4NTJ İle Doking Sonuçları

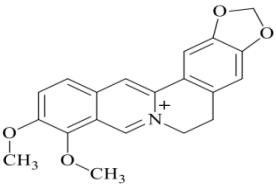
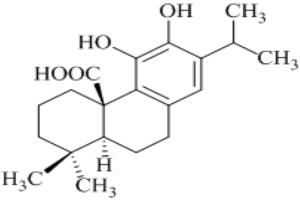
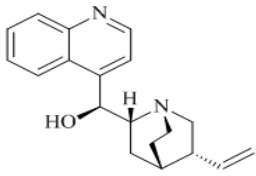
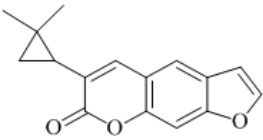
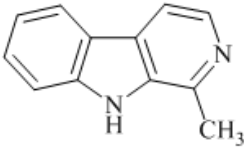
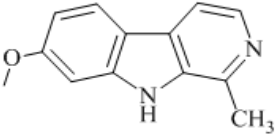
Teorik sıra	Fitokimyasal	Molekül yapısı	Bağlanma enerjisi (kcal/mol)	Ki (hesaplanan) (µM)
1	Sanguinarin		-10.9	0.01
2	Girinimbin		-9.7	0.08
3	DMC		-9.6	0.09
4	BDMC		-9.5	0.11
5	Rutin		-9.5	0.11

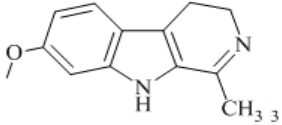
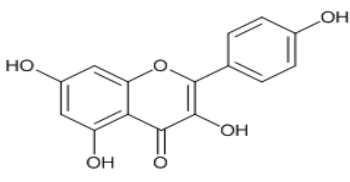
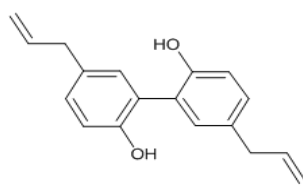
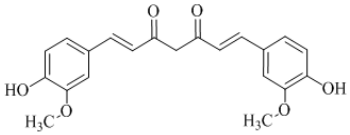
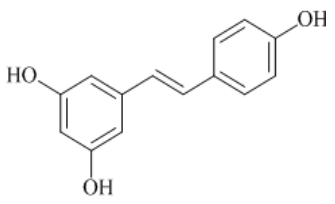
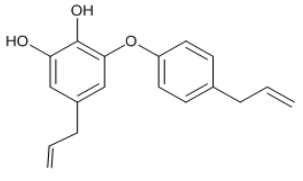
6	Baisalin		-9.3	0.15
7	Krisin		-9.3	0.15
8	Graveolinin		-9.2	0.18
9	Mikuelianin		-9.1	0.21
10	Luteolin		-9.1	0.21
11	Wogonosid		-9.0	0.25

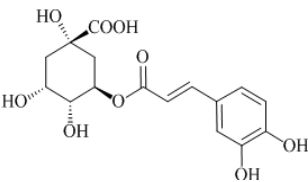
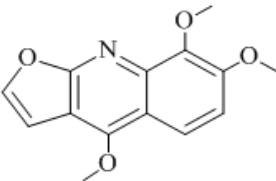
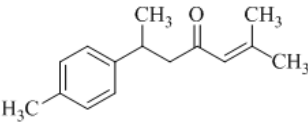
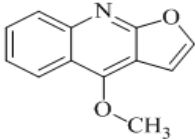
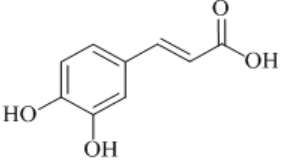
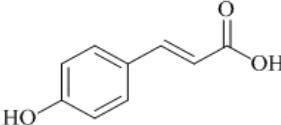
12	Apigenin		-8.8	0.35
13	Rosmarinik Asit		-8.7	0.42
14	Kateşin		-8.7	0.42
15	Kuersetin		-8.6	0.53
16	Mirisetin		-8.6	0.53
17	Hiperozid		-8.5	0.59

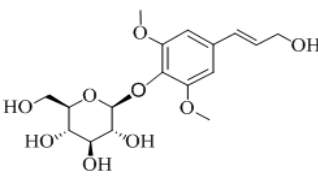
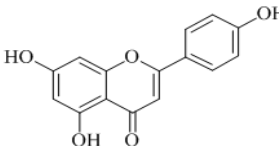
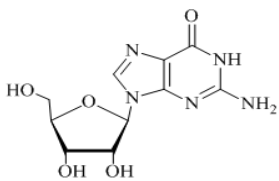
18	Galangin		-8.5	0.59
19	Dikentrin		-8.5	0.59
20	Epikateşin		-8.4	0.75
21	Çalepensin		-8.4	0.75
22	Astilbin		-8.4	0.75
23	Kuersitrin		-8.4	0.75

24	İzokuersitrin		-8.2	0.97
25	Likopen		-8.1	1.24
26	Honokiol		-8.1	1.24
27	Karnosol		-8.1	1.24
28	Harmol		-8.0	1.36
29	Harmalol		-8.0	1.36

30	Berberin		-8.0	1.36
31	Karnosik Asit		-8.0	1.36
32	Cinçonin		-8.0	1.36
33	Klasindin		-7.9	1.62
34	Harman		-7.9	1.62
35	Harmin		-7.9	1.62

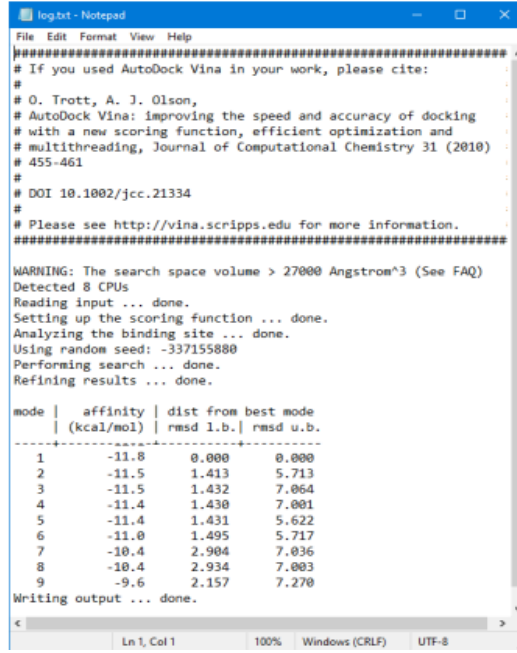
36	Harmalin		-7.9	1.62
37	Kaempferol		-7.9	1.62
38	Magnolol		-7.9	1.62
39	Kurkumin		-7.8	1.69
40	Resveratrol		-7.8	1.69
41	Obovatol		-7.7	2.12

42	Klorgenik asit		-7.6	2.62
43	Skimanin		-7.6	2.62
44	Ar-turmeron		-7.5	3.18
45	Diktamin		-7.5	3.18
46	Kafeik asit		-7.1	6.24
47	P-Kumarik Asit		-7.1	6.24

48	Siringin		-7.1	6.24
49	Adenozin		-6.8	10.35
50	Guanozin		-6.6	17.85

4.3.3. PDE-3-Sanguinarin Doking Sonuçları

AutoDock Vina programı kullanılarak PDE-3 enziminin tezdeki 50 fitokimyasal ile doking hesaplaması yapılmıştır. Mümkün olabilecek konformasyonlar belirlenip ve log dosyası oluşturulmuştur. Bağlanma enerjileri ve görsel değerlendirmeler dikkate alınıp AutoDock Vina kullanıcı ara yüzü aracılığı ile en iyi konformasyon belirlenmiştir (Şekil 4.14).



```
log.txt - Notepad
File Edit Format View Help
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:
#
# O. Trott, A. J. Olson,
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking
# with a new scoring function, efficient optimization and
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)
# 455-461
#
# DOI 10.1002/jcc.21334
#
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.
#####
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 8 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -337155880
Performing search ... done.
Refining results ... done.

mode |  affinity |  dist from best mode
      |  (kcal/mol) |  rmsd l.b. |  rmsd u.b.
-----|-----|-----|-----
1      |    -11.8   |    0.000   |    0.000
2      |    -11.5   |    1.413   |    5.713
3      |    -11.5   |    1.432   |    7.064
4      |    -11.4   |    1.430   |    7.001
5      |    -11.4   |    1.431   |    5.622
6      |    -11.0   |    1.495   |    5.717
7      |    -10.4   |    2.904   |    7.036
8      |    -10.4   |    2.934   |    7.003
9      |     -9.6   |    2.157   |    7.270

Writing output ... done.
Ln 1, Col 1    100%  Windows (CRLF)  UTF-8
```

Şekil 4. 13. Sanguinarin Log Dosyası

İlk konformasyonun aktif bölgeye tam olarak yerleştiği ve bağlanma enerjisinin diğerlerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

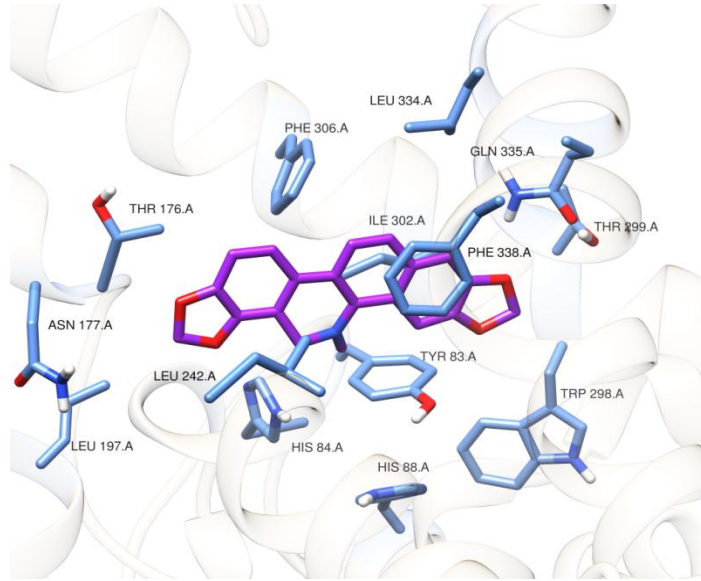
Fitokimyasalların PDE-3 enzim ile doking çalışmasının sonucu çizelge 4. 4' de verilmiştir. Doking işlemi sonucunda sanguinarin (13-metil[1,3] benzodioksolo[5,6-c]-1,3-dioksolo[4,5-i]fenantridinyum), PDE-3 enzimine en yüksek afinite ile bağlanan bileşik olduğu bulunmuştur. Sanguinarin ΔG_B bağlanma enerjisi -11.8 kcal/mol olarak hesaplanmış ve bu bağlanmanın aktif bölgedeki 2 boyutlu ve 3 boyutlu görüntüsü Şekil 4.15'de verilmiştir.

Bu enerjiden Ki değeri hesaplanabilir.

Hesaplama için kullanılan formül;

$$\Delta GB = R.T.\ln Ki \quad (R= 1.986 \text{ cal/mol.K; } T= 300 \text{ K})$$

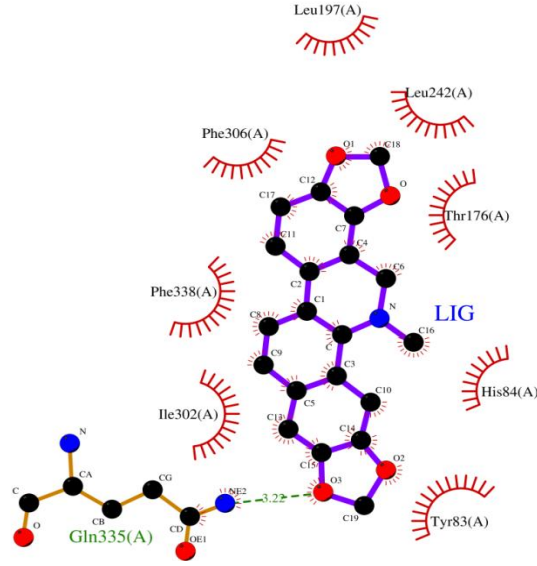
Buradan; Vina hesaplamalarına göre Ki değeri 0.001 μM bulunmuştur.



Şekil 4. 14. PDE3-Sanguinarin Kompleksinin Doking Görüntüsü

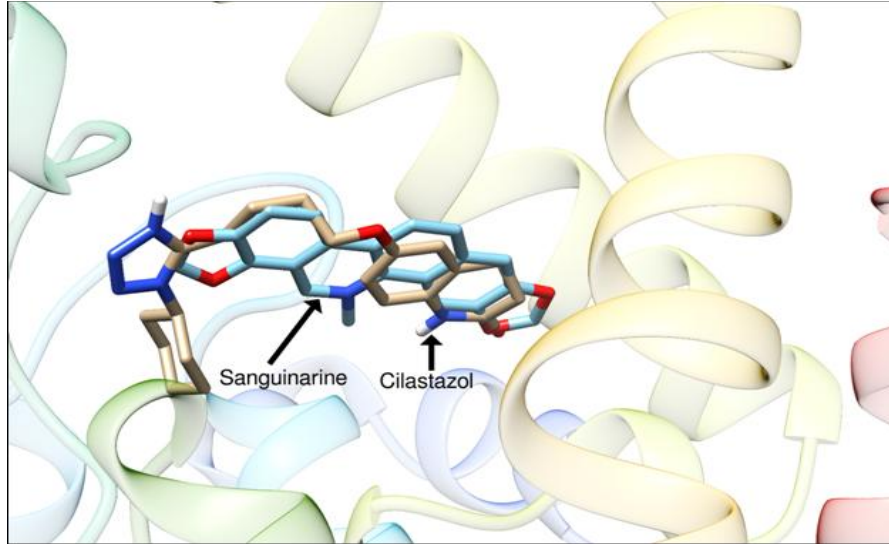
Konformasyonların bağlanma enerjileri ve görsel değerlendirmeleri dikkate alınarak sanguinarin çevreleyen aminoasitlerle etkileşimi de incelenmiştir, Sonuçlar Şekil 4.16'da gösterilen iki boyutta analiz edilmiştir.

Konformasyon incelendiğinde Enzimin aktif bölgesine yüksek afinite ile bağlanmış olan ligand Gln335, Leu197, Phe306, Leu242, Phe338, Thr176, Tyr83, His84, ve Ile302 aminoasitleri ile etkileşimler yapmışlardır. Konformasyonun, aktif bölgeye tam olarak yerleştiği görülmektedir. Aktif bölgeye yerleşen aminoasitlerin hem Hidrojen bağı yaptığı hemde Van der Waals etkileşimlerinde buldukları ADT kullanıcı ara yüzü yardımıyla gözlenmiştir. Gln335 Hidrojen bağı yaparak ligandın konformasyonuna katkı sağladığı görülmektedir. Ligand, Gln335 aminoasiti ile 3.22 Å uzunluğunda Hidrojen bağı yapmıştır.



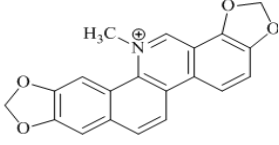
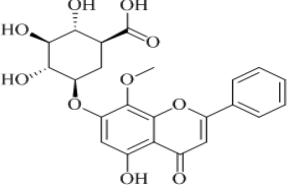
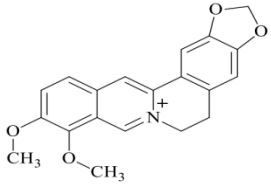
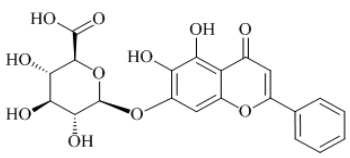
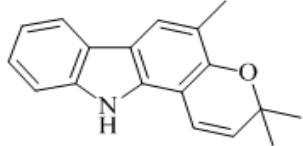
Şekil 4. 15. Sanguinarin Ligandının Aktif Bölge Etkileşimleri

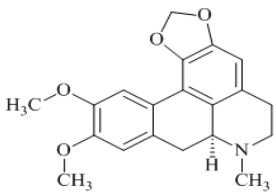
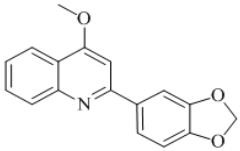
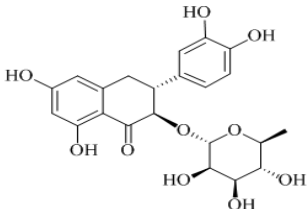
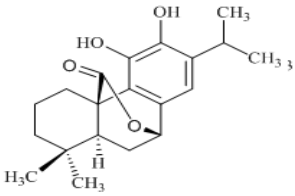
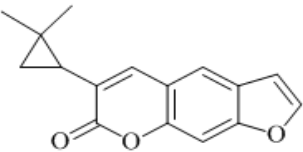
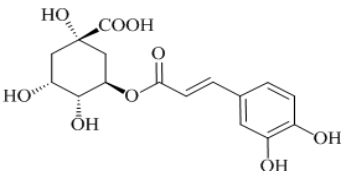
FDA onaylı ilaç olan ve çalışmamızda referans ilaç olarak kullanılan silostazol PDE-3 e karşı ΔG_B bağlanma enerjisi ise -9.3 kcal/mol yani sanguinarin' den daha düşük olarak bulunmuştur. Sanguinarin silostazol ile aynı bağlanma bölgesine yerleştiği Şekil 4.17.'de görülmektedir.

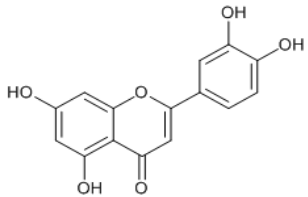
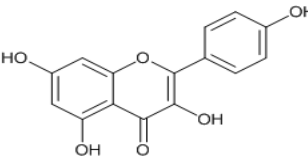
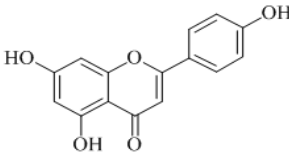
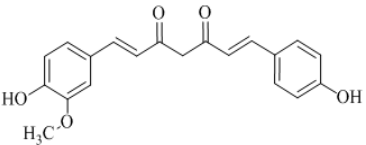
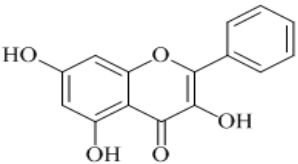
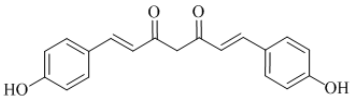


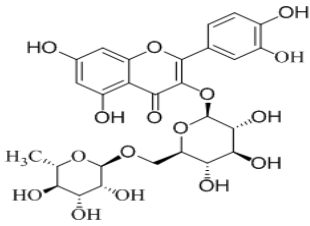
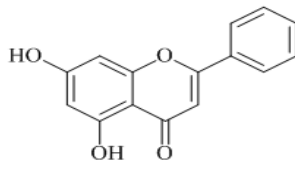
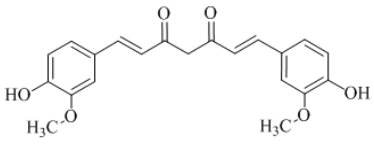
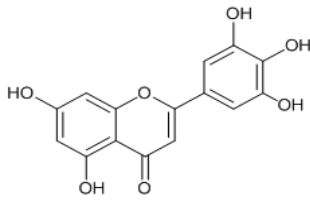
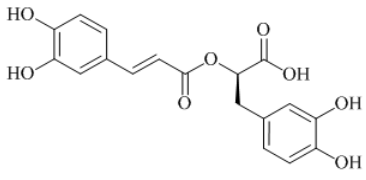
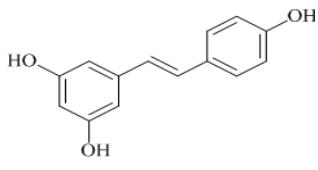
Şekil 4. 16. Silostazol Ve Sanguinarin'in Bağlanma Bölgelerinin Karşılaştırılması

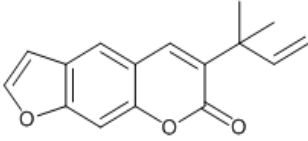
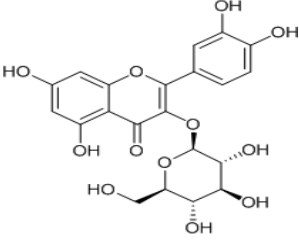
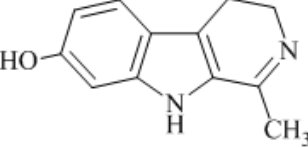
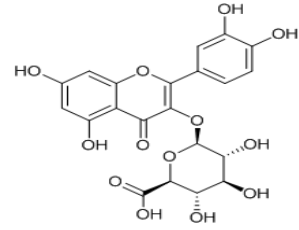
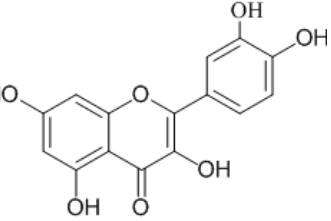
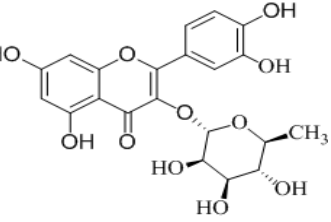
Çizelge 4. 4. Fitokimyasalların Seri Halinde 1SO2 İle Doking Sonuçları

Teorik sıra	Fitokimyasal	Molekül yapısı	Bağlanma enerjisi	Ki (hesaplanan) (µM)
1	Sanguinarin		-11.8	0.001
2	Wogonosid		-10.8	0.01
3	Berberin		-10.6	0.01
4	Baisalin		-10.5	0.02
5	Girinimbın		-10.4	0.02

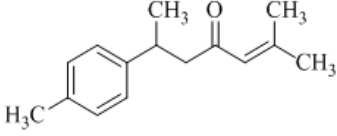
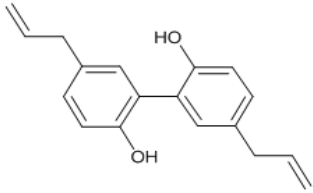
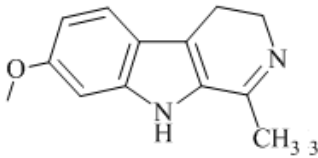
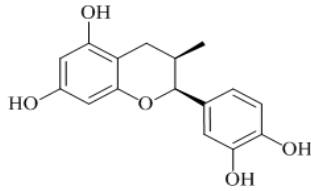
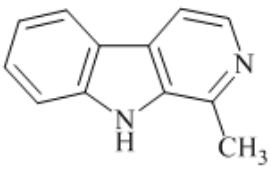
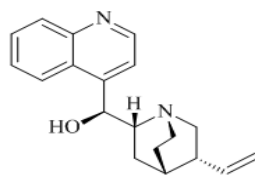
6	Dikentrin		-9.9	0.07
7	Graveolinin		-9.7	0.08
8	Astilbin		-9.7	0.08
9	Karnosol		-9.6	0.09
10	Klasindin		-9.6	0.09
11	Klorogenik Asit		-9.3	0.15

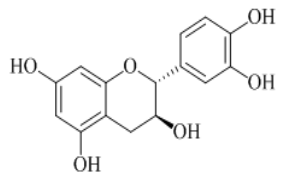
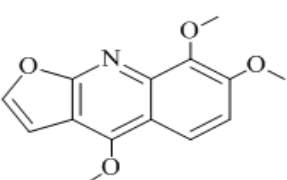
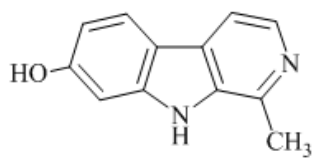
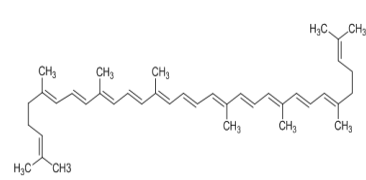
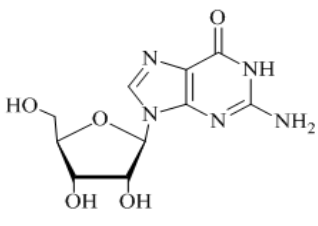
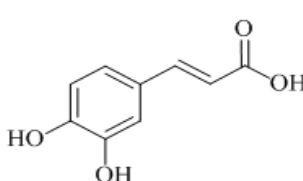
12	Luteolin		-9.2	0.18
13	Kaempferol		-9.2	0.18
14	Apigenin		-9.1	0.21
15	DMC		-9.1	0.21
16	Galangin		-9.1	0.21
17	BDMC		-9.0	0.25

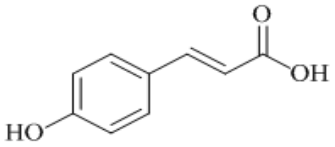
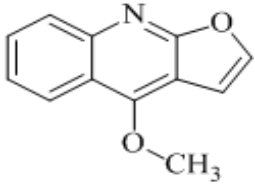
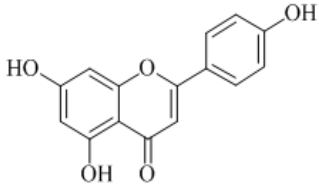
18	Rutin		-9.0	0.25
19	Krisin		-9.0	0.25
20	Kurkumin		-8.9	0.29
21	Mirisetin		-8.9	0.29
22	Rosmarinik Asit		-8.9	0.29
23	Resveratrol		-8.8	0.35

24	Çalepensin		-8.8	0.35
25	İsokuersitrin		-8.7	0.42
26	Harmalol		-8.7	0.42
27	Mikuelianin		-8.7	0.42
28	Kuersetin		-8.7	0.42
29	Kuersitrin		-8.6	0.53

30	Karnosik Asit		-8.5	0.59
31	Siringin		-8.4	0.74
32	Hyperosid		-8.4	0.74
33	Obovatol		-8.4	0.74
34	Harmin		-8.3	0.89
35	Honokiol		-8.1	1.24

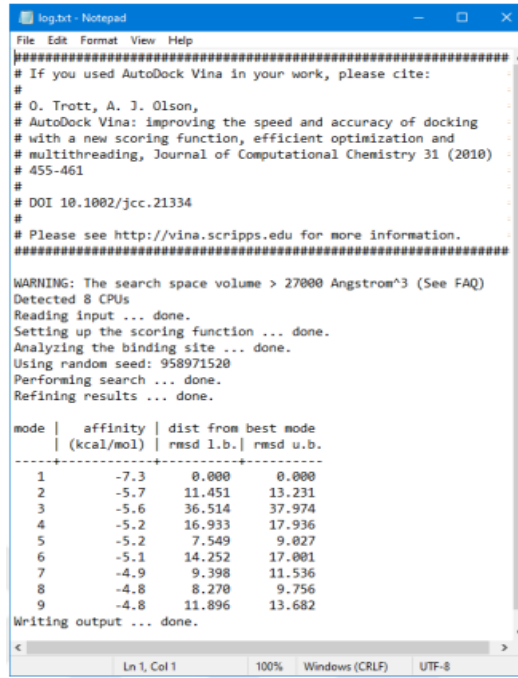
36	Ar-turmeron		-8.1	1.24
37	Magnolol		-8.1	1.24
38	Harmalin		-8.0	1.36
39	Epikateşin		-8.0	1.36
40	Harman		-8.0	1.36
41	Cinçonin		-8.0	1.36

42	Kateşin		-7.9	1.62
43	Skimmianin		-7.8	1.69
44	Harmol		-7.8	1.69
45	Likopen		-7.8	1.69
46	Guanosin		-7.3	4.14
47	Kafeik Asit		-7.1	6.24

48	P-Kumarik Asit		-7.1	6.24
49	Diktamin		-7.1	6.24
50	Adenozin		-6.8	10.35

4.3.4. GP-VI-Rutin Doking Sonuçları

AutoDock Vina programı kullanılarak GP-VI enziminin tezdeki 50 fitokimyasal ile doking hesaplaması yapılmıştır. Mümkün olabilecek konformasyonlar belirlenip ve log dosyası oluşturulmuştur. Bağlanma enerjileri ve görsel değerlendirmeler dikkate alınıp AutoDock Vina kullanıcı ara yüzü ile en iyi konformasyon belirlenmiştir (Şekil.4.18).



```
log.txt - Notepad
File Edit Format View Help
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:
#
# O. Trott, A. J. Olson,
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking
# with a new scoring function, efficient optimization and
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)
# 455-461
#
# DOI 10.1002/jcc.21334
#
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.
#####
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 8 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: 958971520
Performing search ... done.
Refining results ... done.

mode | affinity | dist from best mode
      | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----|-----|-----|-----
  1   |   -7.3   |    0.000   |    0.000
  2   |   -5.7   |   11.451   |   13.231
  3   |   -5.6   |   36.514   |   37.974
  4   |   -5.2   |   16.933   |   17.936
  5   |   -5.2   |    7.549   |    9.027
  6   |   -5.1   |   14.252   |   17.001
  7   |   -4.9   |    9.398   |   11.536
  8   |   -4.8   |    8.270   |    9.756
  9   |   -4.8   |   11.896   |   13.682

Writing output ... done.
Ln 1, Col 1      100% Windows (CRLF) UTF-8
```

Şekil 4. 17.Rutin'in Log Dosyası

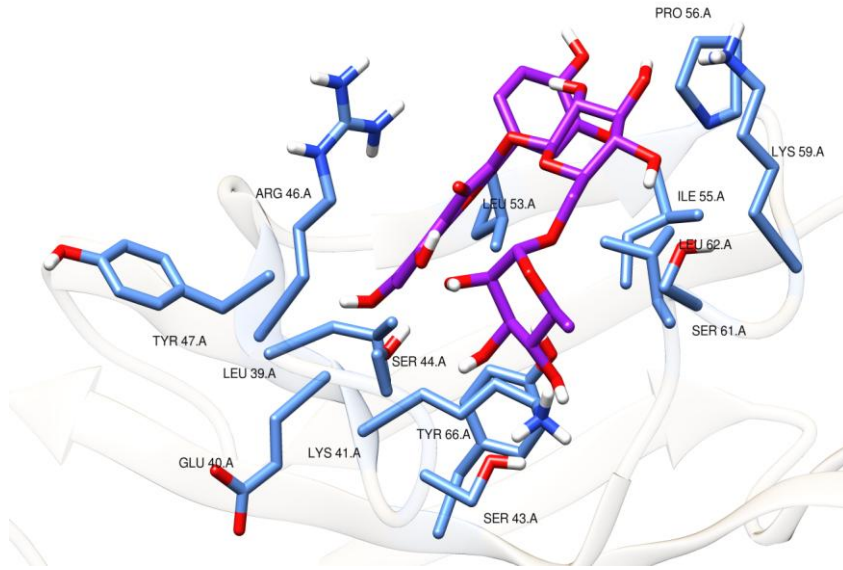
Fitokimyasalların GP-VI enzim ile doking çalışmasının sonucu çizelge 4. 5 de verilmiştir. Doking işlemi sonucunda Rutin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rhamnoglucoside) GP-VI enzime en yüksek afinite ile bağlanan bileşik olduğu bulunmuştur. Rutin ΔG_B bağlanma enerjisi -7.3 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. bu bağlanmanın aktif bölgedeki görüntüsü Şekil 4.19' da verilmiştir.

Bu enerjiden K_i değeri aşağıdaki formülden hesaplanabilir;

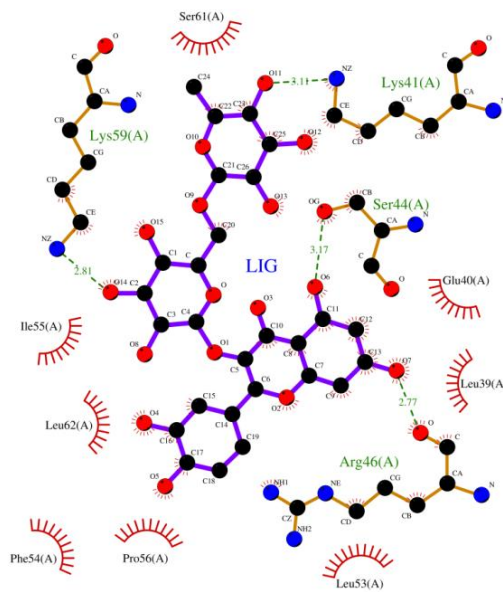
$$\Delta G_B = R.T.\ln K_i \quad (R= 1.986 \text{ cal/mol. K; } T= 300 \text{ K})$$

Buradan; Autodock Vina hesaplamalarına göre K_i 3.76 μM olarak bulunmuştur. konformasyonda enerji değerleri ve görsel değerlendirmeleri dikkate alınarak sanguinarin çevreleyen aminoasitlerle etkileşim sonuçları Şekil 4.20'de

gösterilen iki boyutta analiz edilmiştir. Konformasyon incelendiğinde Enzimin aktif bölgesine yüksek afinite ile bağlanmış olan ligand Lys41, Arg46, Lys59, Ser61, Ser44, Ile55, Glu40, Leu102, Leu309, Phe54, Pro56, ve Leu53 aminoasitleri ile etkileşimler yapmışlardır. Konformasyonun, aktif bölgeye tam olarak yerleştiği görülmektedir. Aktif bölgeye yerleşen aminoasitlerin hem Hidrojen bağı yaptığı hemde Van der Waals etkileşimlerinde buldukları ADT kullanıcı ara yüzü yardımıyla gözlenmiştir.



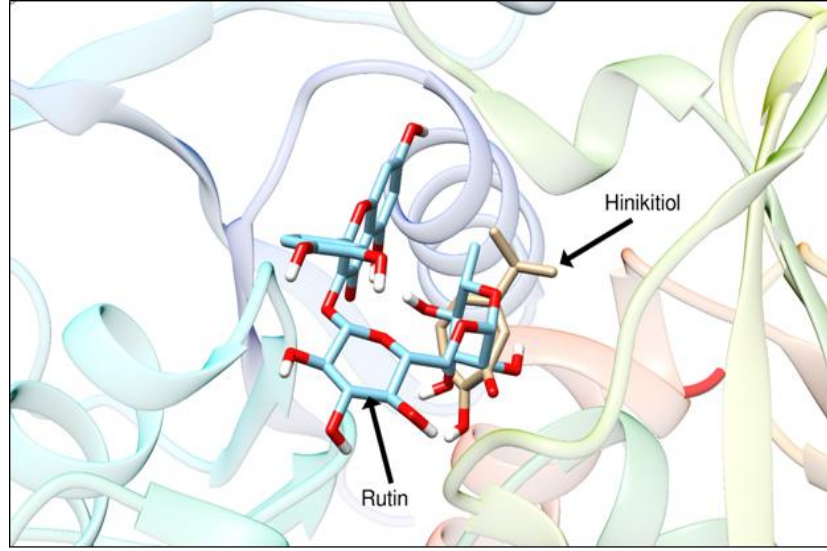
Şekil 4. 18. GP-VI-rutin Kompleksinin Doking Görüntüsü



Şekil 4. 19. Rutin Ligandının Aktif Bölge Etkileşimleri

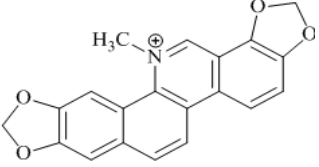
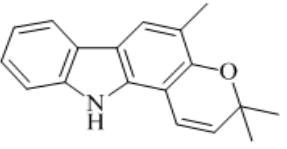
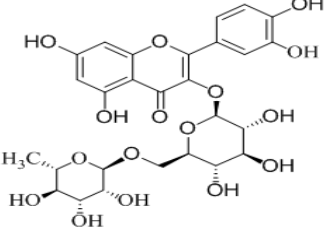
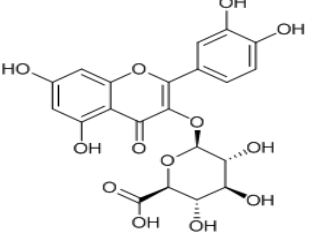
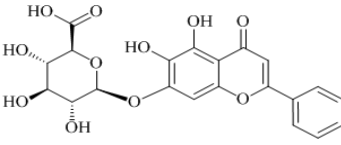
Lys41, Lys59, Ser44, Arg46 aminoasitleri Hidrojen bağı yaparak rutin'in aktif bölgedeki konformasyonuna katkı sağladığı görölmektedir. Bu aminoasitler Hidrojen bağ yaparak ligandın konformasyonuna katkı sağladığı görölmektedir. Ligand, Lys41, Lys59, Ser44, Arg46 aminoasitleri ile sırasıyla 3.11, 2.81, 3.17, ve 2.77 Å uzunluğunda Hidrojen bağı yapmıştır.

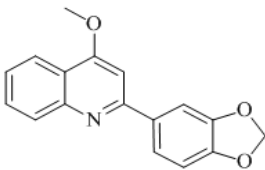
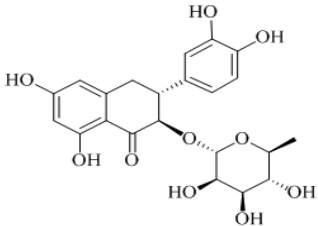
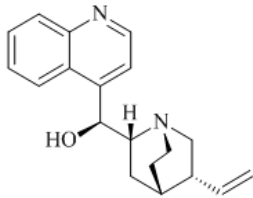
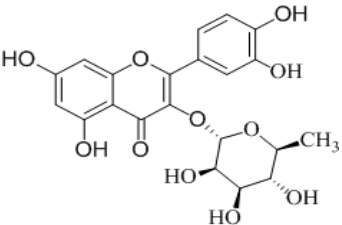
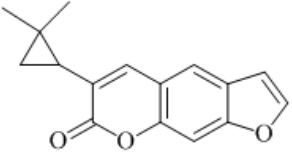
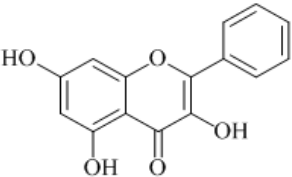
Çalışmamızda referans ilaç olarak kullanılan hinokitiol GP-VI'e karşı ΔG_B bağlanma enerjisi ise -5.8 kcal/mol yani rutin' den daha düşük olarak bulunmuştur. Hinokitiol rutin ile aynı bağlanma bölgesine yerleştiği Şekil 4.21.'de görölmektedir.

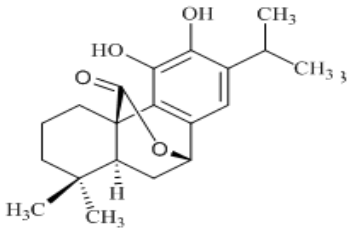
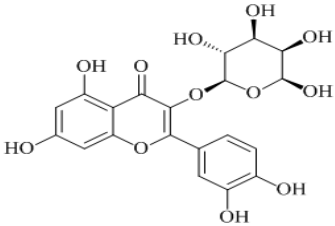
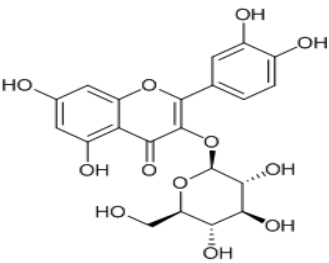
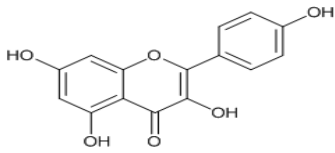
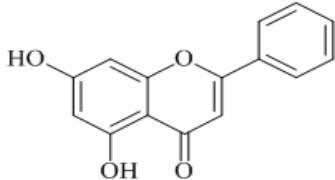
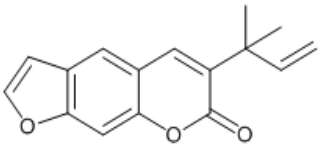


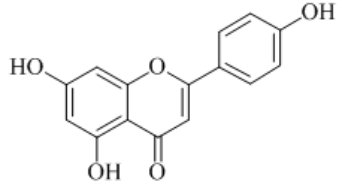
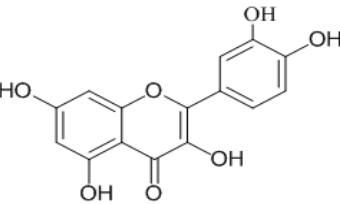
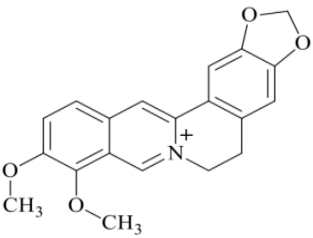
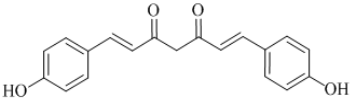
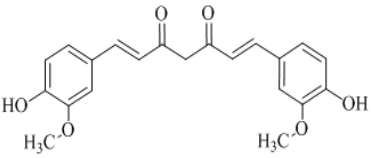
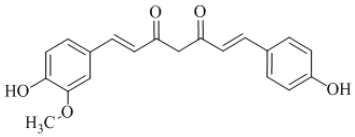
Şekil 4. 20. Hinokitiol Ve Rutin'in Bağlanma Bölgelerinin Karşılaştırılması

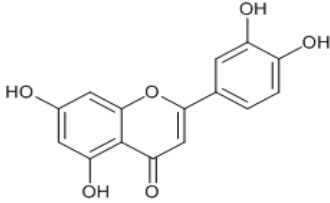
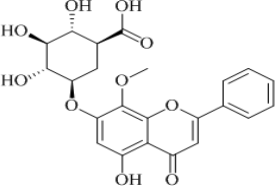
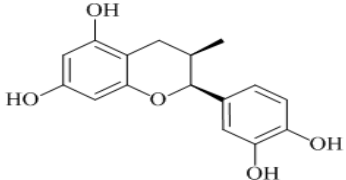
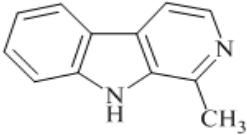
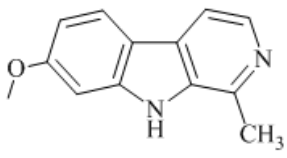
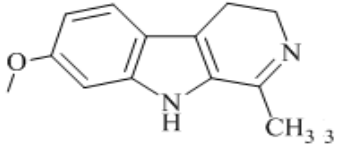
Çizelge 4. 5. Fitokimyasalların Seri Halinde 2GI7 İle Doking Sonuçları

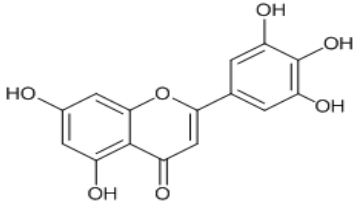
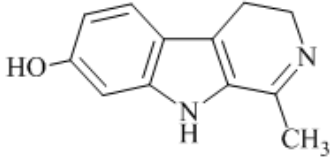
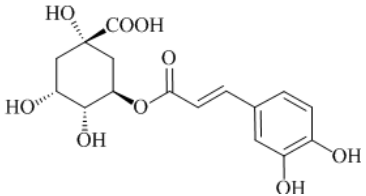
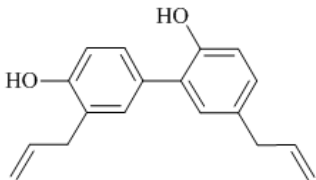
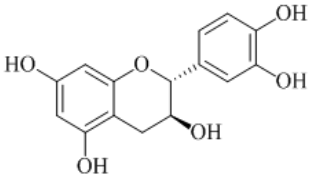
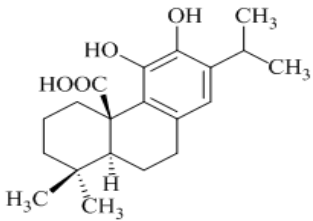
Teoril sıra	Fitokimyasal	Molekül yapısı	Bağlanma enerjisi	Ki (hesaplanan) (µM)
1	Sanguinarin		-7.4	3.76
2	Girinimbin		-7.4	3.76
3	Rutin		-7.3	4.14
4	Mikuelianin		-7.2	5.67
5	Baisalin		-7.2	5.67

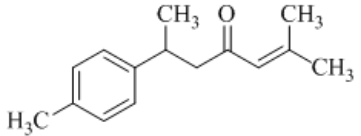
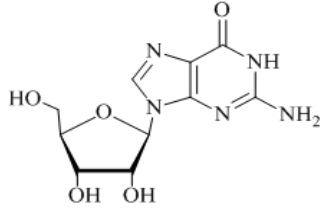
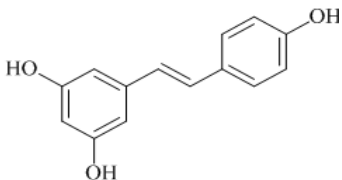
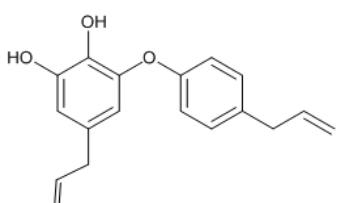
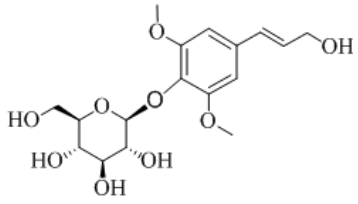
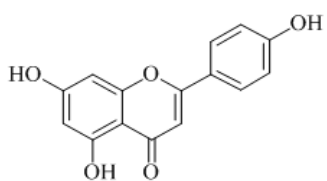
6	Graveolinin		-6.9	9.35
7	Astilbin		-6.9	9.35
8	Cinçonin		-6.9	9.35
9	Kuersetin		-6.8	10.35
10	Klasindin		-6.7	14.91
11	Galangin		-6.7	14.91

12	Karnosol		-6.7	14.91
13	Hiperozid		-6.6	17.81
14	İsokuersitrin		-6.6	17.81
15	Kaempferol		-6.6	17.81
16	Krisin		-6.6	17.81
17	Çalepensin		-6.6	17.81

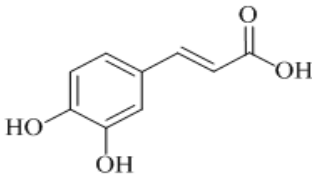
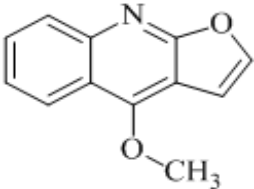
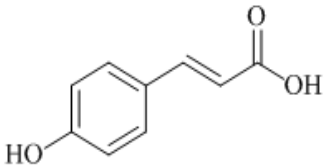
18	Apigenin		-6.6	17.81
19	Kuersetin		-6.6	17.81
20	Berberin		-6.5	18.76
21	BDMC		-6.5	18.76
22	Kurkumin		-6.5	18.76
23	DMC		-6.5	18.76

24	Luteolin		-6.5	18.76
25	Wogonosid		-6.5	18.76
26	Epikateşin		-6.5	18.76
27	Harman		-6.4	20.34
28	Harmin		-6.4	20.34
29	Harmalin		-6.4	20.34

30	Mirisetin		-6.4	20.34
31	Harmalol		-6.4	20.34
32	Klorogenik Asit		-6.4	20.34
33	Honokiol		-6.4	20.34
34	Kateşin		-6.3	28.56
35	Karnosik Asit		-6.3	28.56

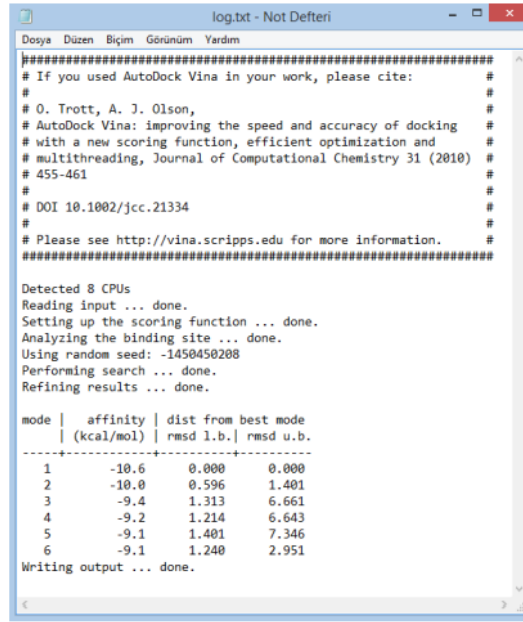
36	Ar-turmeron		-6.1	33.74
37	Guanozin		-6.1	33.74
38	Resveratrol		-6.1	33.74
39	Obovatol		-6.1	33.74
40	Siringin		-6.1	33.74
41	Adenozin		-6.1	33.74

42	Dikentrin		-6.0	56.45
43	Harmol		-6.0	56.45
44	Likopen		-6.0	56.45
45	Rosmarinik Asit		-6.0	56.45
46	Skimmianin		-6.0	56.45
47	Magnolol		-5.9	64.876

48	Kafeik Asit		-5.8	68.92
49	Diktamin		-5.8	68.92
50	P-Kumarik Asit		-5.3	78.43

4.3.5. PAR-1-BDMC Doking Sonuçları

AutoDock Vina programı kullanılarak PAR-1 reseptörünün tezdeki 50 fitokimyasal ile doking hesaplaması yapılmıştır. Mümkün olabilecek konformasyonlar belirlenip ve log dosyası oluşturulmuştur. Enerji ve görsel değerlendirmeler dikkate alınmış ve program yardımı ile en iyi konformasyon belirlenmiştir (Şekil.4.22).



```
log.txt - Not Defteri
Dosya Düzen Biçim Görünüm Yardım
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:
#
# O. Trott, A. J. Olson,
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking
# with a new scoring function, efficient optimization and
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)
# 455-461
#
# DOI 10.1002/jcc.21334
#
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.
#####
Detected 8 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -1450450208
Performing search ... done.
Refining results ... done.

mode | affinity | dist from best mode
      | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----|-----|-----|-----
1     | -10.6     | 0.000     | 0.000
2     | -10.0     | 0.596     | 1.401
3     | -9.4      | 1.313     | 6.661
4     | -9.2      | 1.214     | 6.643
5     | -9.1      | 1.401     | 7.346
6     | -9.1      | 1.240     | 2.951
Writing output ... done.
```

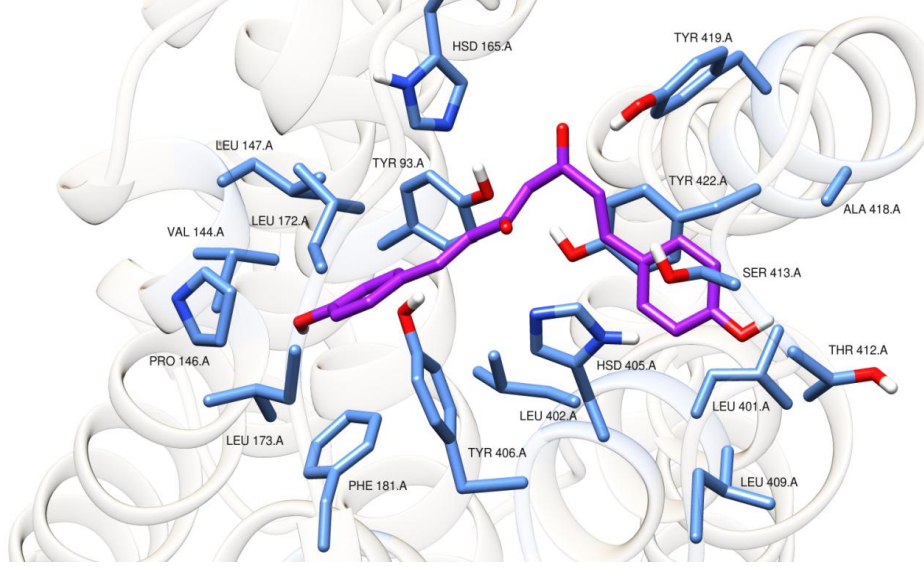
Şekil 4. 21. BDMC Log Dosyası

Fitokimyasalların PAR-1 ile doking çalışmasının sonucu çizelge 4. 6' da verilmiştir. Doking işlemi sonucunda BDMC ((1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxyphenyl) hepta-1,6-diene-3,5-dione) PAR-1 enzimine en yüksek afinite ile bağlanan bileşik olduğu bulunmuştur. Rutin ΔG_B bağlanma enerjisi -10.6 kcal/mol olarak hesaplanmış ve bu bağlanmanın aktif bölgedeki 2 boyutlu ve 3 boyutlu görüntüsü Şekil 4.23'de verilmiştir.

Bu enerjiden K_i değeri aşağıdaki formülden elde edilebilir;

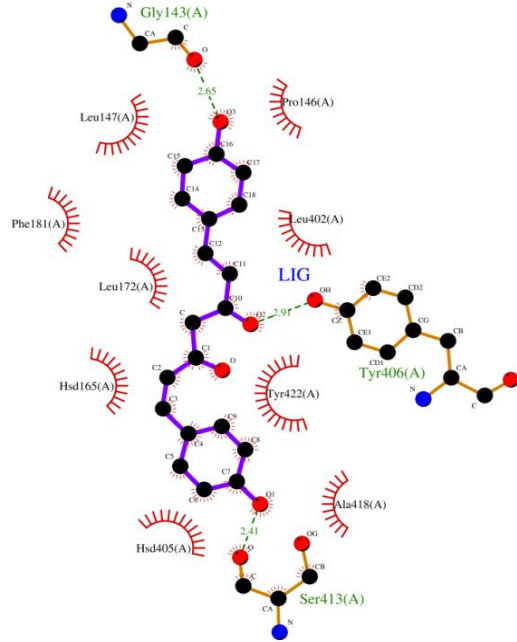
$$\Delta G_B = R.T.\ln K_i \quad (R= 1.986 \text{ cal/mol.K; } T= 300 \text{ K})$$

Buradan; Autodock Vina hesaplamalarına göre K_i 0.01 μ M olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 22. PAR-1-BDMC Kompleksinin Doking Görüntüsü

Konformasyonların bağlanma enerjileri dikkate alınarak BDMC'ni çevreleyen aminoasitlerle etkileşim sonuçları Şekil 4.24 'de gösterilen iki boyutta analiz edilmiştir.

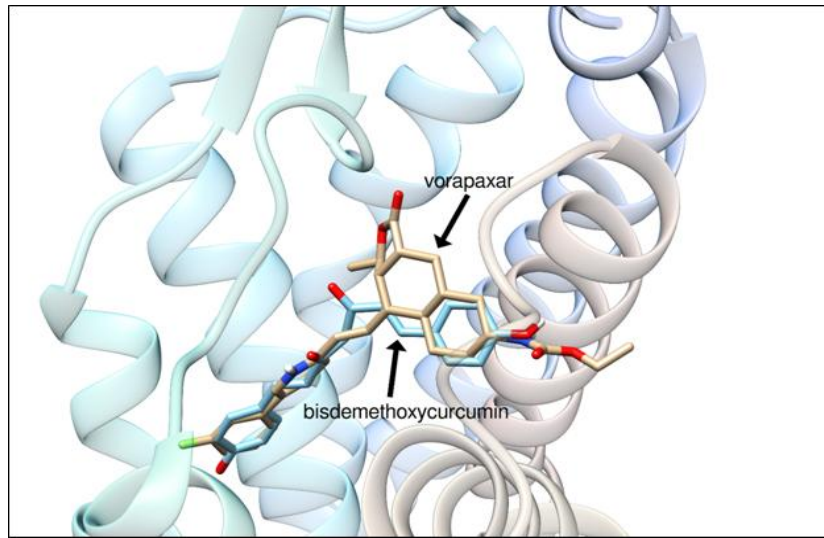


Şekil 4. 23. BDMC Ligandının Aktif Bölge Etkileşimleri

Konformasyon incelendiğinde enzimin aktif bölgesine yüksek afinite ile bağlanmış olan ligand Ser413, Leu147, Pro146, Phe181, Leu172, Gly143, Tyr406, Leu402, Hsd165, Tyr422, Hsd405, ve Ala418 aminoasitleri ile etkileşimler yapmışlardır. Konformasyonun, aktif bölgeye tam olarak yerleştiği görülmektedir. Aktif bölgeye yerleşen aminoasitlerin hem hidrojen bağı yapıldığı hem Van der Waals etkileşimlerinde buldukları ADT kullanıcı ara yüzü yardımıyla gözlenmiştir.

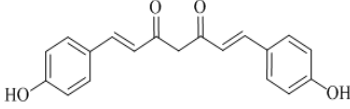
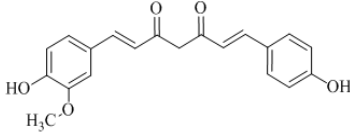
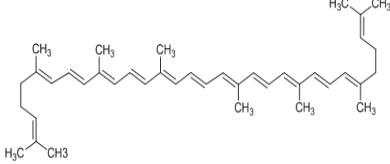
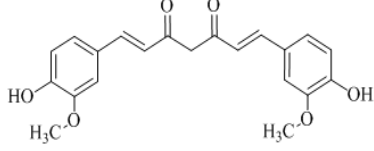
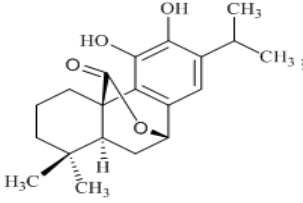
Gly143, Tyr406, Ser413 aminoasitleri Hidrojen bağı yaparak BDMC'in aktif bölgedeki konformasyonuna katkı sağladığı görülmektedir. Bu aminoasitler Hidrojen bağı yaparak ligandın konformasyonuna katkı sağladığı görülmektedir. Ligand, Gly143, Tyr406, Ser413 aminoasitleri ile sırasıyla 2.65, 2.91, ve 2.41 Å uzunluğunda Hidrojen bağı yapmıştır.

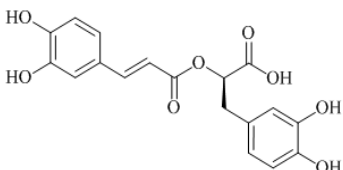
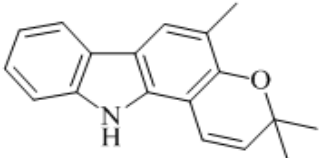
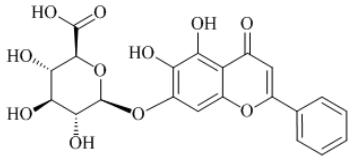
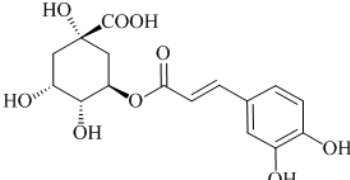
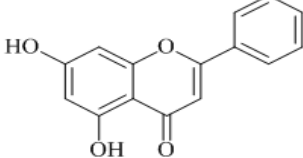
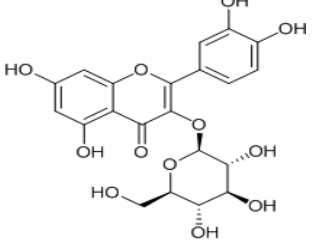
FDA onaylı ilaç olan ve çalışmamızda referans ilaç olarak kullanılan vorapaksar PAR-1' e karşı ΔG_B bağlanma enerjisi ise -15.9 kcal/mol yani BDMC den daha yüksek olarak bulunmuştur. BDMC vorapaksar ile aynı bağlanma bölgesine yerleştiği Şekil 4. 25.'de görülmektedir.

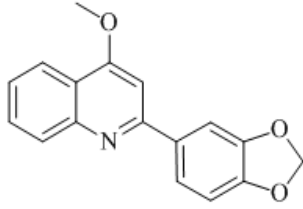
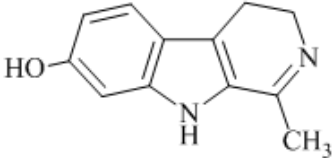
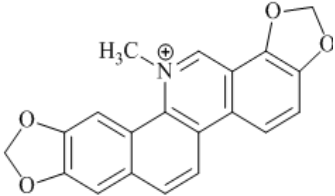
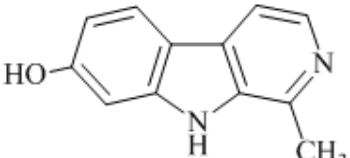
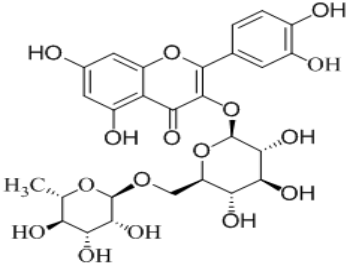
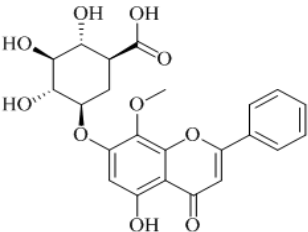


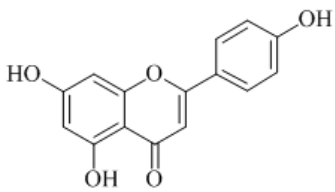
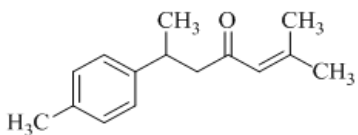
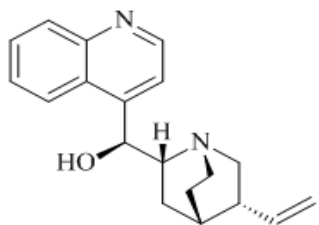
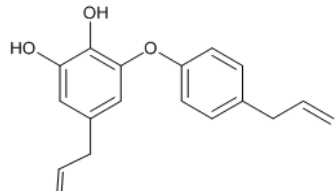
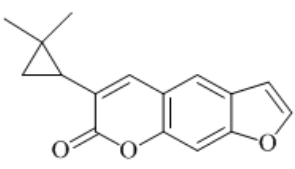
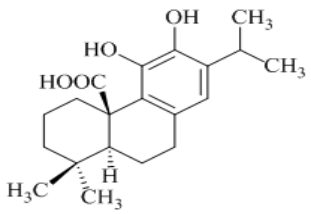
Şekil 4. 24. Vorapaksar Ve BDMC'in Bağlanma Bölgelerinin Karşılaştırılması

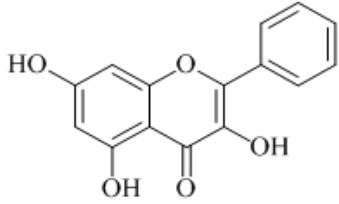
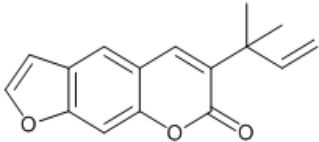
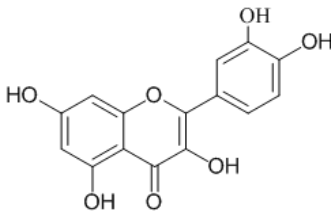
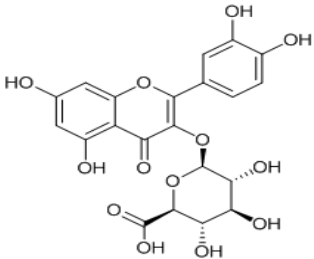
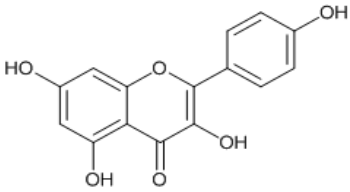
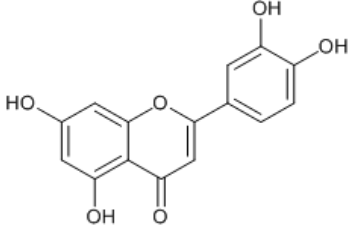
Çizelge 4. 6. Fitokimyasalların Seri Halinde 3VW7 İle Doking Sonuçları

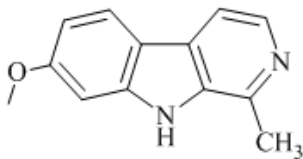
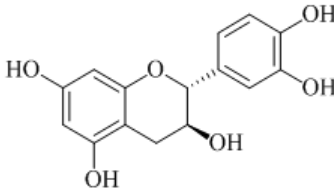
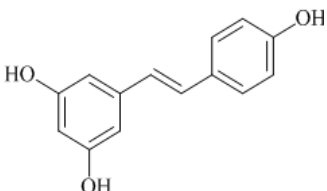
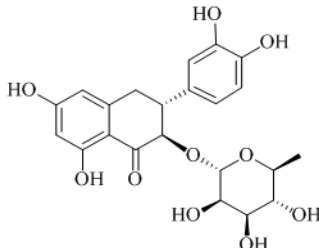
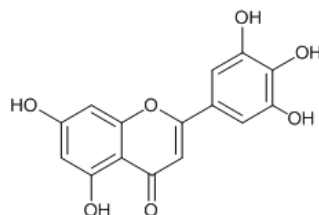
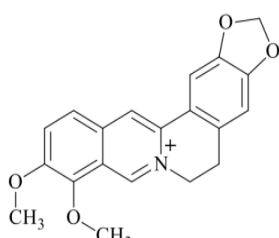
Teorik sıra	Fitokimyasal	Molekül yapısı	Bağlanma enerjisi	Ki (hesaplanan) (µM)
1	BDMC		-10.6	0.01
2	DMC		-10.5	0.02
3	Likopen		-10.4	0.02
4	Kurkumin		-10.3	0.03
5	Karnosol		-10.0	0.06

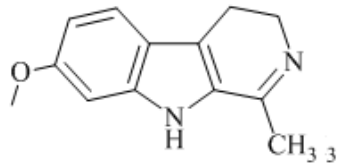
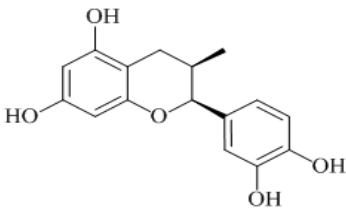
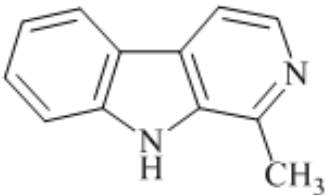
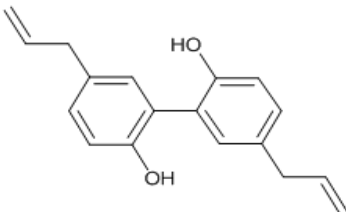
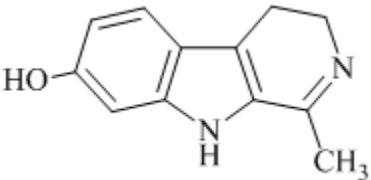
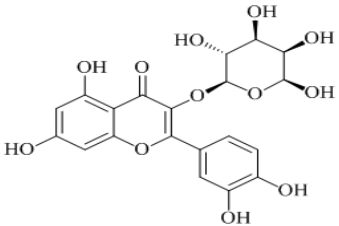
6	Rosmarinik Asit		-10.0	0.06
7	Girinimbin		-9.7	0.08
8	Baisalin		-9.7	0.08
9	Klorogenik Asit		-9.5	0.11
10	Krisin		-9.3	0.15
11	İzokuersitrin		-9.3	0.15

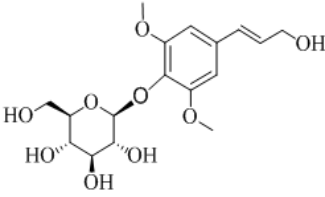
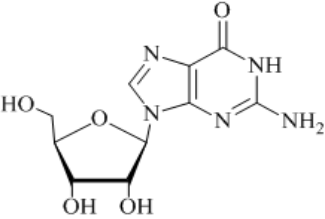
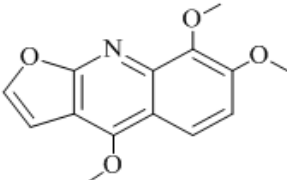
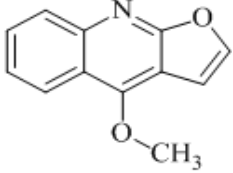
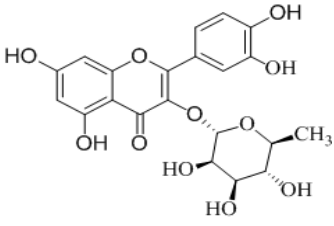
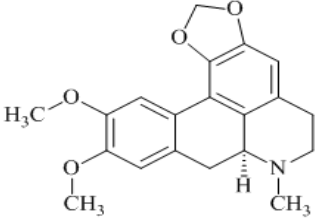
12	Graveolinin		-9.2	0.18
13	Honokiol		-9.0	0.25
14	Sanguinarin		-9.0	0.25
15	Harmol		-9.0	0.25
16	Rutin		-8.9	0.29
17	Wogonosid		-8.9	0.29

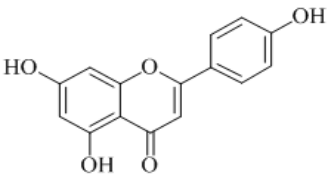
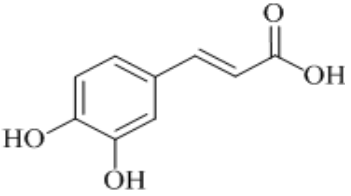
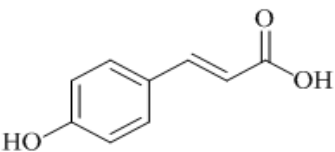
18	Apigenin		-8.9	0.29
19	Ar-turmeron		-8.9	0.29
20	Cinçonin		-8.9	0.29
21	Obovatol		-8.9	0.29
22	Klasindin		-8.9	0.29
23	Karnosik Asit		-8.9	0.29

24	Galangin		-8.9	0.29
25	Çalepensin		-8.8	0.35
26	Kuersetin		-8.8	0.35
27	Mikuelianin		-8.7	0.42
28	Kaempferol		-8.7	0.42
29	Luteolin		-8.7	0.42

30	Harmin		-8.6	0.53
31	Kateşin		-8.6	0.53
32	Resveratrol		-8.5	0.59
33	Astilbin		-8.4	0.75
34	Mirisetin		-8.4	0.75
35	Berberin		-8.3	0.89

36	Harmalin		-8.3	0.89
37	Epikateşin		-8.3	0.89
38	Harman		-8.3	0.89
39	Magnolol		-8.3	0.89
40	Harmalol		-8.1	1.24
41	Hyperosid		-7.9	1.62

42	Siringin		-7.9	1.62
43	Guanosin		-7.7	1.62
44	Skimmianin		-7.5	3.18
45	Diktamin		-7.5	3.18
46	Kuersitrin		-7.4	3.76
47	Dikentrin		-7.2	5.67

48	Adenozin		-7.2	5.67
49	Kafeik Asit		-7.1	6.24
50	P-Kumarik Asit		-7.1	6.24

4.4. Dinamik Simülasyon Hesaplamaları

Docking hesaplamaları hedef protein yapısının esnekliği tam olarak dikkate alınmayarak bazı aktif olabilecek bileşiklerde eksik sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Bu sebeple docking işlemlerinin ardından MD çalışmaları ile hedef protein yapısı için birden fazla konformasyon oluşturulabilmekte ve ligand ile hedef protein yapısı arasındaki bağlanma daha doğru tahmin edilebilmektedir. Ayrıca bağlanma enerji hesaplamalarıyla birleştirilmiş MD simülasyonları, sanal tarama ve özgün öncü moleküllerin keşfi çalışmalarının geliştirilmesinde iyi bir yöntem olduğu ortaya çıkmaktadır.

Docking simülasyonları sonucu her hedef için en güçlü bağlanma afinitesine sahip olan bileşik seçilip ve daha detaylı inceleme için MD simülasyonuna yönelendirilmiştir. Bu şekilde seçilen 5 hit molekülün inhibe edici potansiyelleri sadece docking metotlarıyla değil ayrıca daha detaylı bir şekilde MD simülasyonlarıyla da öngörüldü. Amacımız sistemlerin kararlılığını kontrol etmek, ligandların enzim dinamikleri üzerindeki etkilerini ve bağlanma bölgesindeki kalıntıları ile olan etkileşimlerini belirlenen zaman içerisinde incelemektir.

Çalışmamızda yapılan tüm simülasyonlar bir Linux işletim sisteminde ve GROMACS moleküler modelleme paketinin 2021.2 versiyonu ile gerçekleştirilmiştir.

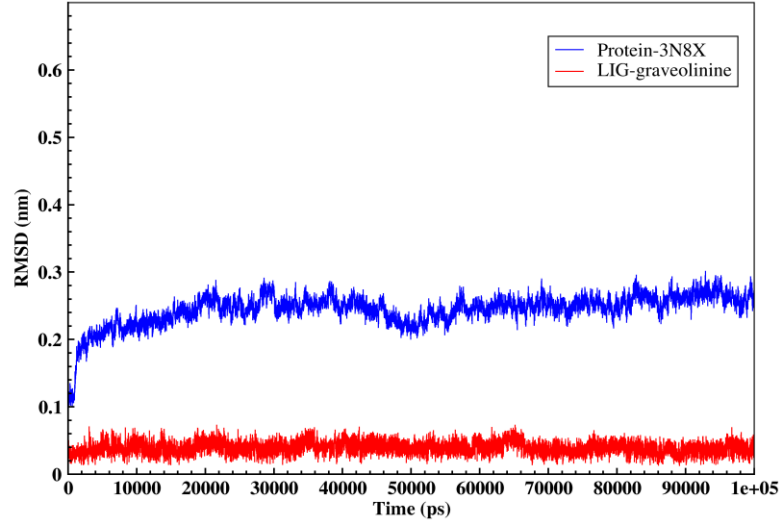
Tüm hesaplamaları 100 ns'lik sürelerde gerçekleştirilmiştir ve her 4 ps'de bir bir frame alınmıştır. Her bir hedef için simülasyonlar 100 ns'lik üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

MD Simülasyonların tamamlanmasının ardından, Komplekslerin stabilitesi, etkileşim güçleri ve yapısal ve dinamik özellikleri kontrol etmek amacıyla konformasyonel kararlılığın önemli göstergeleri olan RMSD, RMSF, mesafe analizi, ve MM-PBSA parametreleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar grafikler eşliğinde aşağıda tartışılmıştır.

4.4.1. COX-1-Graveolinin Kompleksinin MD Simülasyon Analizi

Simülasyon sonuçlarından elde edilen veriler ile COX-1 enziminin graveolinin ile yaptığı kompleks de başlangıç konumlarından itibaren dengeye ulaşınca kadar zamanla nasıl değiştiği ve ne kadar uzaklaştığı hesaplanmıştır. RMSD-Zaman grafiği şekil 4.26'da verilmiştir. Bu diyagram incelendiğinde proteinin genel olarak kararlı bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. RMSD ilk 2 ns de küçük bir sapma ile 0.25 nm'ye ulaşmış ve simülasyonun geri kalan kısmında bu değer civarında stabil kaldığı ortaya çıkmıştır.

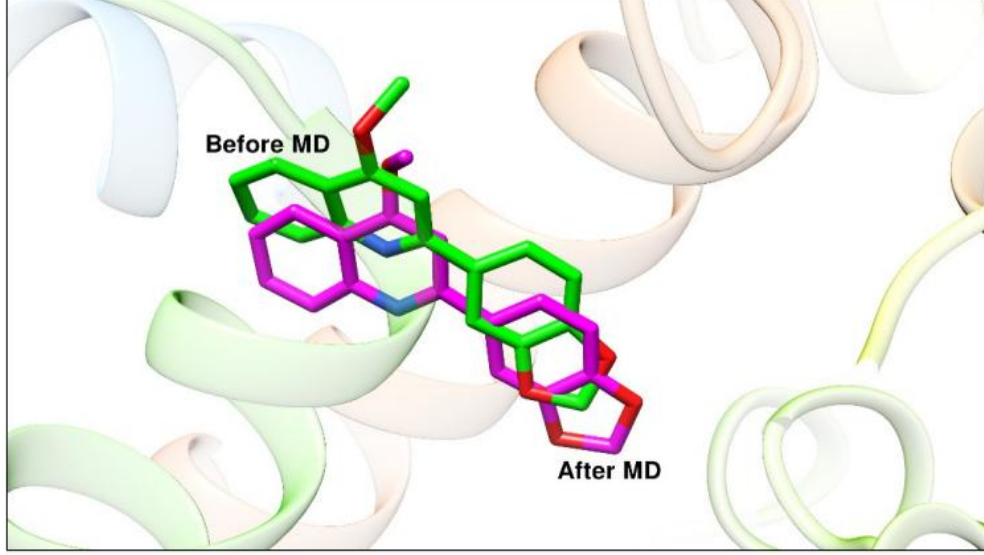
Ligandın RMSD diyagramında ise bağlanma bölgesi içindeki herhangi bir sapma fark edilmemiş ve simülasyon boyunca stabil olduğu gözlenmiştir.



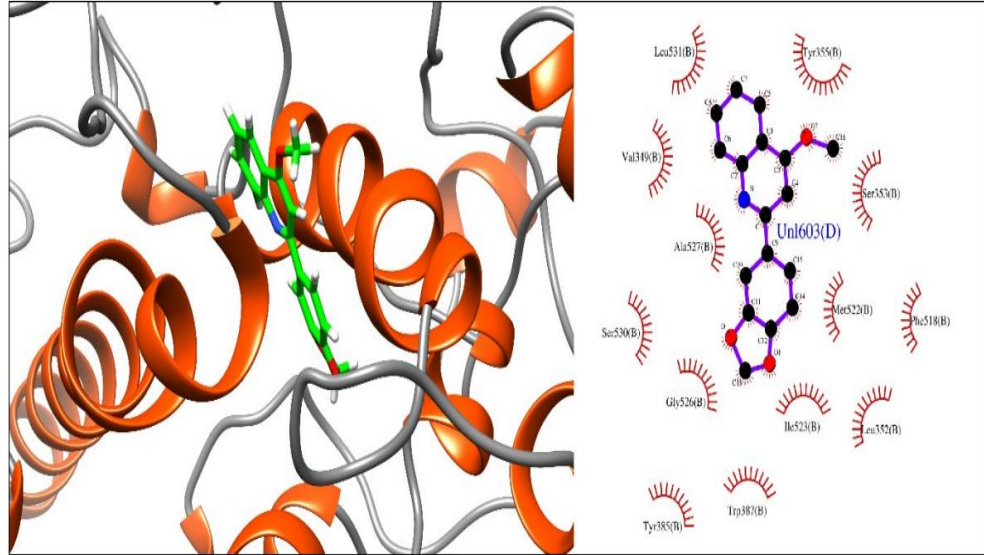
Şekil 4. 25. COX-1-Graveolinin'in RMSD Grafiği

Graveolinin ligandının MD simülasyondan önce ve sonra COX-1 proteinine nasıl bağlandığı Şekil 4.27'de gösterilmiştir. Buna göre, proteinin bağlanma bölgesindeki graveolinin ligandının konumu, simülasyon öncesi konumundan bir değişiklik göstermemektedir. Buda ligand molekülünün bağlantı noktasında kararlı olduğunu belirtmektedir. Şekil 4.28' de graveolinin ligandının proteine bağlanması ve çevresindeki aminoasitler iki ve üç boyutlu olarak gösterilmiştir. Konformasyon incelendiğinde aktif bölgede yüksek afinite ile bağlanmış olan ligandlar Ala527, Val349, Ser353 Tyr355, Gly526, Leu359, Trp387 Tyr385,

Leu531, Met522 aminoasitleri ile yüksek etkileşimler yapmışlardır. Buda yapılan doking hesaplamaların sonuçları destekler niteliktedir.



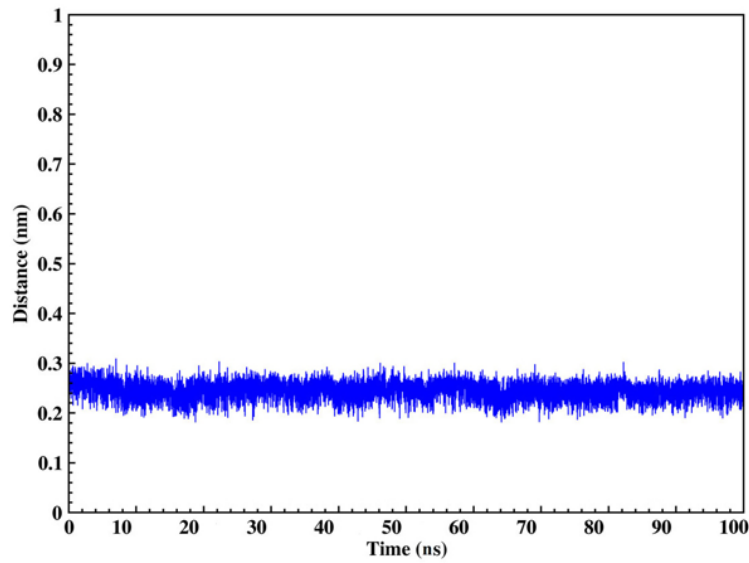
Şekil 4. 26. Graveolin'in COX-1'e Simülasyondan Önce ve Sonra Bağlanma Konumu



Şekil 4. 27. Graveolin'in COX-1 İle Bağlanma Bölgesinin 2D ve 3D Görüntüsü

Sistemin kararlılığını kontrol etmek için proteinde etkileşime giren aminoasitler ile ligand arasındaki mesafe de incelenmiştir (Şekil. 4.29). COX-1-graveolinin kompleksinde, Ala527, aday aminoasit olarak seçilip, ligand molekülünden minimum mesafesindeki değişiklikler değerlendirilmiştir.

Aminoasit ile ligand arasındaki mesafe, simülasyon süreci boyunca yaklaşık 0.25 nm değeri civarında stabil kaldığı ve bir dalgalanma gözlenmemiştir. Sonuç olarak bu kompleksde ligand molekülünün bağlanma bölgesinde kararlı kaldığı bulunmuştur.



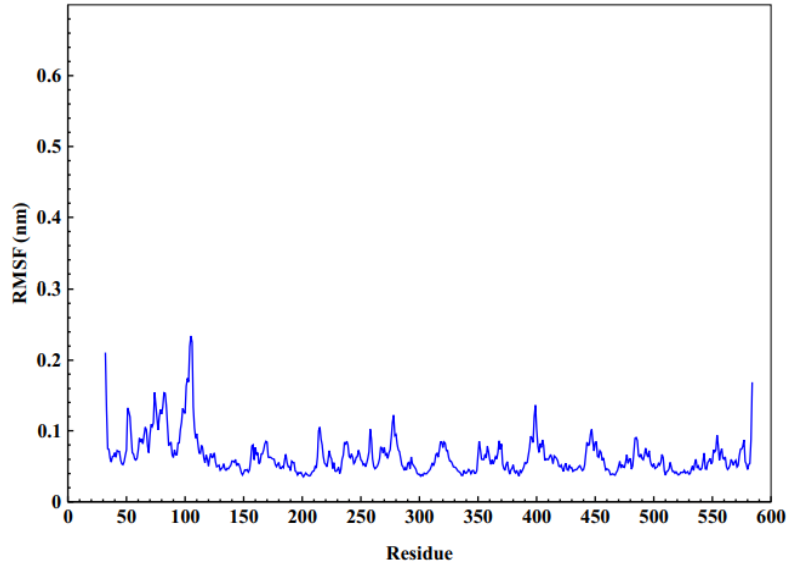
Şekil 4. 28. Aktif Bölgedeki Aminoasit ve Ligand Arasındaki Mesafe Değişikliği

COX-1-graveolinin kompleksinde aminoasitlerin hakkında bilgi edinebilmek ve protein bölgelerinin mobilitesini incelemek amacıyla her bir aminoasit için RMSF değerleri de hesaplanmıştır (Şekil 4.30). Aminoasitlerin esnekliğini incelemek için, simülasyonun son 20 ns'si (RMSD diyagramının kararlı kısmı) kullanılmış ve hesaplama için aminoasitlerin alfa-karbonları temel alınmıştır.

COX-1 proteininin RMSF diyagramı incelendiğinde aminoasitler simülasyon boyunca çok az dalgalanma ve esneklik gösterdiği ve stabil olma eğiliminde olduğu ortaya çıkmaktadır. Çoğu aminoasidin esneklik miktarı 0.1 nm altında olduğu görülmüştür. Bu aminoasitler küçük konformasyonel değişiklik

göstermekle daha fazla kararlılığa sahip olmaktadır. En yüksek dalgalanma Trp100 and Asp109 aminoasitlerde ve yaklaşık 0.24 nm olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, COX-1-graveolinin kompleksi MD simülasyon boyunca kararlı olduğu ve ligand molekülünün bağlanma bölgesinde stabil kaldığını göstermektedir.



Şekil 4. 29 Graveolinin Ligandının COX-1 İle RMSF Diyagramı

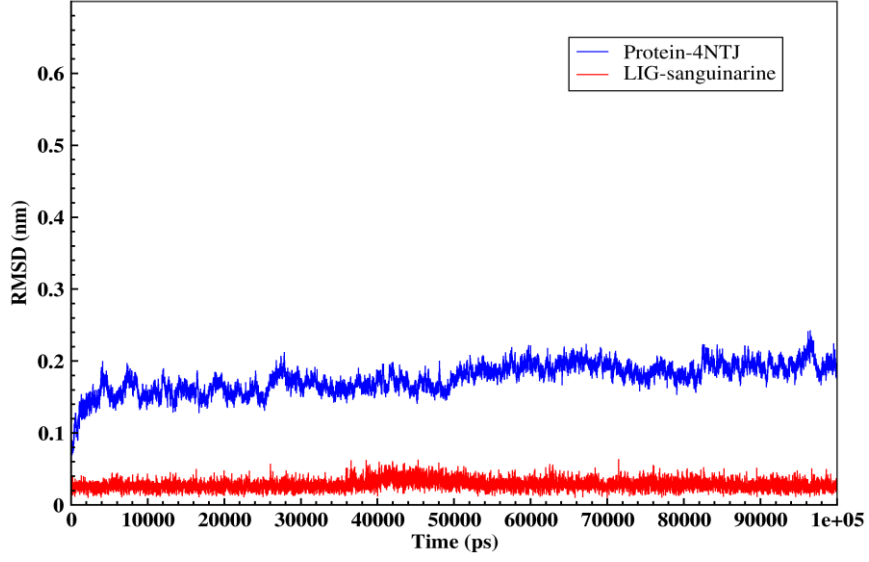
4.4.2. P2Y12-Sanguinarin MD Simülasyon Analizi

Simülasyon sonuçlarından elde edilen veriler ile P2Y12 in sanguinarin ile yaptığı kompleks de başlangıç konumlarından itibaren dengeye ulaşınca kadar zamanla nasıl değiştiği ve ne kadar uzaklaştığı hesaplanmıştır. RMSD-Zaman grafiği şekil 4.31'de verilmiştir. Bu diyagram incelendiğinde proteinin genel olarak kararlı bir yapıya sahip olduğu görülmektedir.

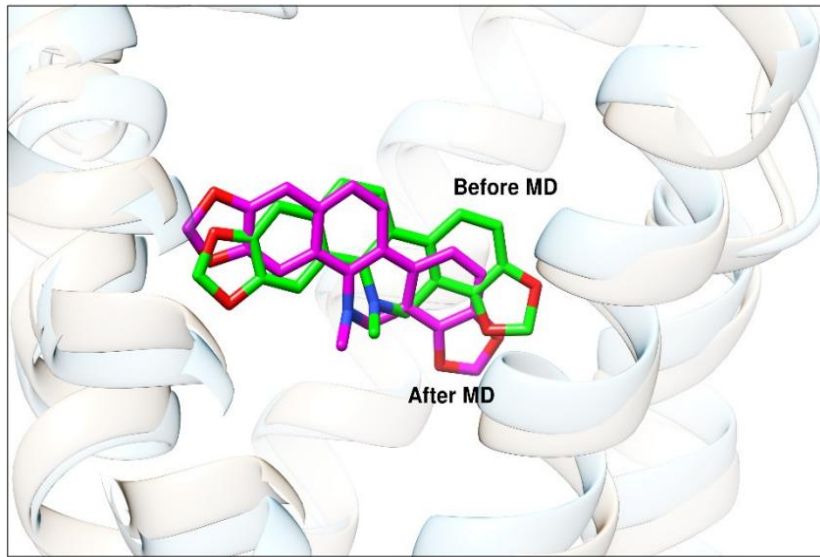
Proteinin RMSD değerinde 48 ns'ye kadar arada bir kademeli olarak küçük dalgalanmalar olmaktadır. Bu zamandan sonra 1.8 nm değerinde dengeye ulaştığı ve kararlı hale geçtiği gözlenmektedir.

Ligandın RMSD diyagramında ise bağlanma bölgesi içindeki herhangi bir sapma fark edilmemiş ve simülasyon boyunca stabil olduğu gözlenmiştir.

Sanguinarin ligandının MD simülasyonundan önce ve sonra P2Y12 proteinine nasıl bağlandığı Şekil.4.32'de gösterilmiştir. Buna göre, proteinin bağlanma bölgesindeki sanguinarin ligandının konumu, simülasyon öncesi konumundan bir değişiklik göstermemektedir. Buda ligand molekülünün bağlantı noktasında kararlı olduğunu belirtmektedir.

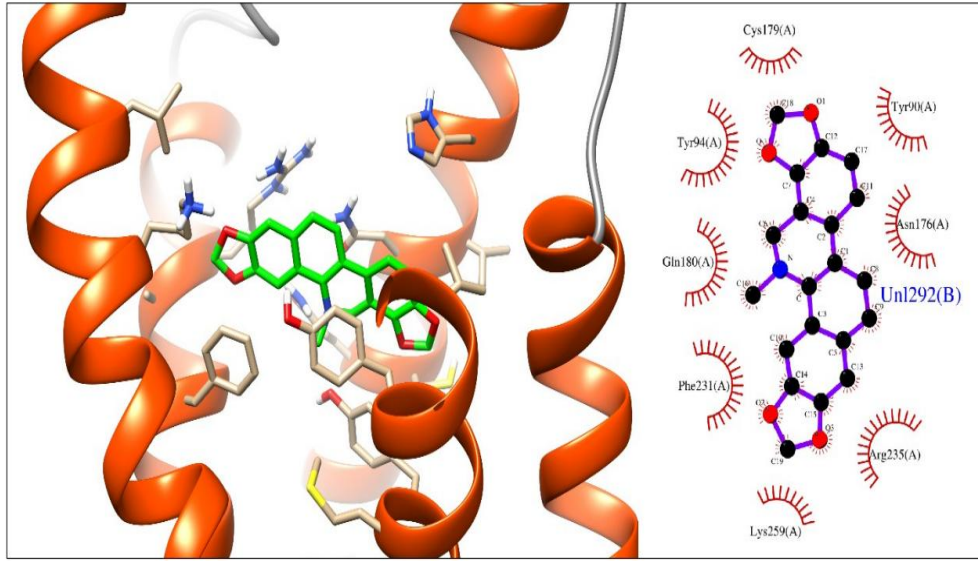


Şekil 4. 30. P2Y12-Sanguinarin'in RMSD Grafiği



Şekil 4. 31. Sanguinarin'in P2Y12'ye Simülasyondan Önce Ve Sonra Bağlanma Konumu

Şekil 4.33' de ise sanguinarin ligandının proteine bağlanması ve çevresindeki aminoasitler iki ve üç boyutlu olarak gösterilmiştir. Konformasyon incelendiğinde aktif bölgede yüksek afinite ile bağlanmış olan ligandlar Val175, Cys179, Tyr90, Arg347, Arg235, Phe231,ve Lys259 aminoasitleri ile yüksek etkileşimler yapmışlardır. Buda yapılan doking hesaplamalarındaki sonuçları destekler niteliktedir.

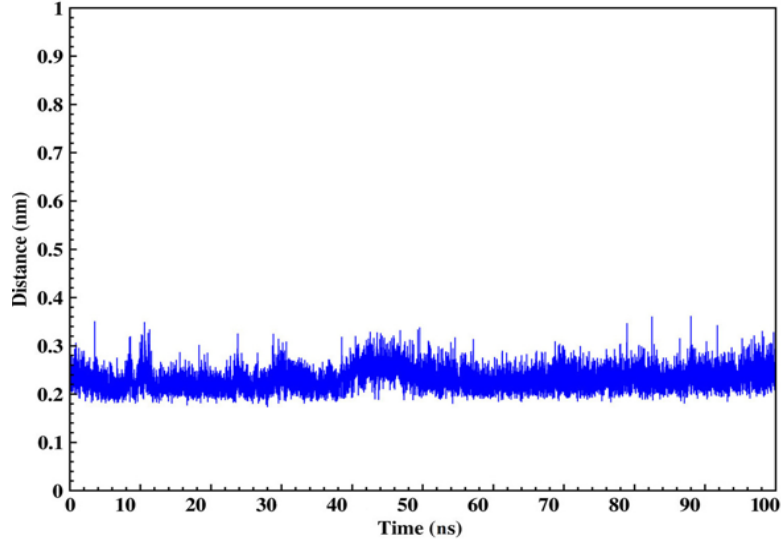


Şekil 4. 32. Sanguinarin P2Y12 İle Bağlanma Bölgesinin 2D Ve 3D Görüntüsü

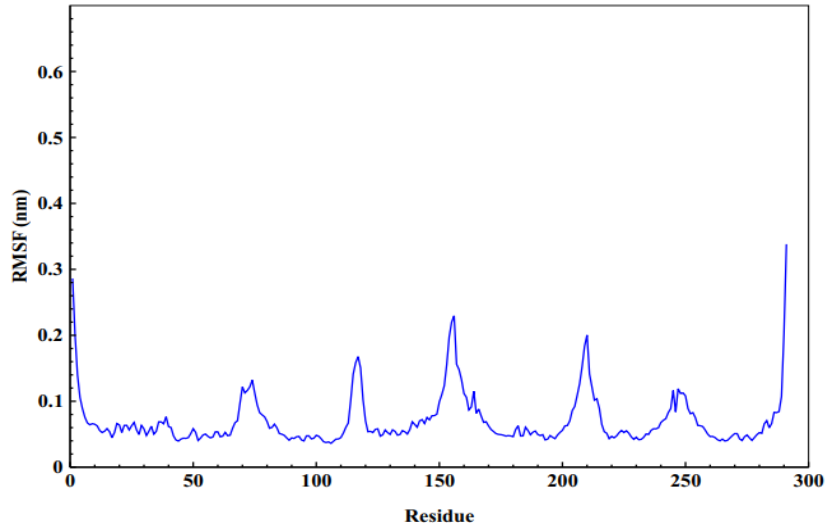
Sistemin kararlılığını kontrol etmek için proteinde etkileşime giren aminoasitler ile ligand arasındaki mesafe de incelenmiştir. 4NTJ-sanguinarine kompleksinde, Tyr90 aday aminoasit olarak seçilmiş, ligand molekülünden minimum mesafesindeki değişiklikler değerlendirilmiştir (şekil.4.34).

Aminoasit ile ligand arasındaki mesafe, simülasyon süreci boyunca 0,2- 0,3 nm değerleri arasında küçük sapmalar ile stabil kaldığı ve büyük bir dalgalanma olmadığı gözlemlenmiştir. Bu diyagramdan 4NTJ-sanguinarine kompleksinde ligand molekülünün bağlanma bölgesinde kararlı kaldığını sonucuna varılmıştır. Bu kompleksdeki aminoasitlerin hakkındada bilgi edinebilmek ve protein bölgelerinin mobilitesini incelemek amacıyla her bir aminoasit için RMSF değerleri de hesaplanmıştır (Şekil 4.35). Aminoasitlerin esnekliğini incelemek

için, simülasyonun son 20 ns'si (RMSD diyagramının kararlı kısmı) kullanılmış ve hesaplama için aminoasitlerin alfa-karbonları temel alınmıştır.



Şekil 4. 33. Aktif Bölgedeki Aminoasit Ve Ligand Arasındaki Mesafe Değişikliği



Şekil 4. 34. Sanguinarin Ligandının P2Y12 İle RMSF Diyagramı

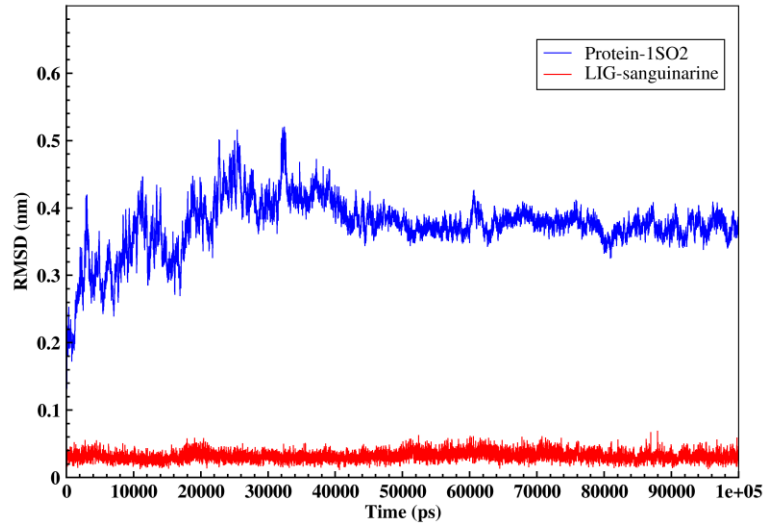
4NTJ proteininin RMSF diyagramı incelendiğinde aminoasitler simülasyon boyunca çok az dalgalanma ve esneklik gösterdiği ve stabil olma eğiliminde olduğu ortaya çıkmaktadır. Çoğu aminoasidin esneklik miktarı 0.06 nm altında olduğu ve sadece Arg113, Pro120, Gln151, Cys160, Thr208, Lys212, Trp100,

ve Asp109 aminoasitleri daha fazla esnekliğe sahip olduğu görülmüştür. En yüksek RMSF değeri 0.24 nm olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, P2Y12-sanguinarin kompleksi MD simülasyonu boyunca kararlı olduğu ve ligand molekülünün bağlanma bölgesinde stabil kaldığını göstermektedir.

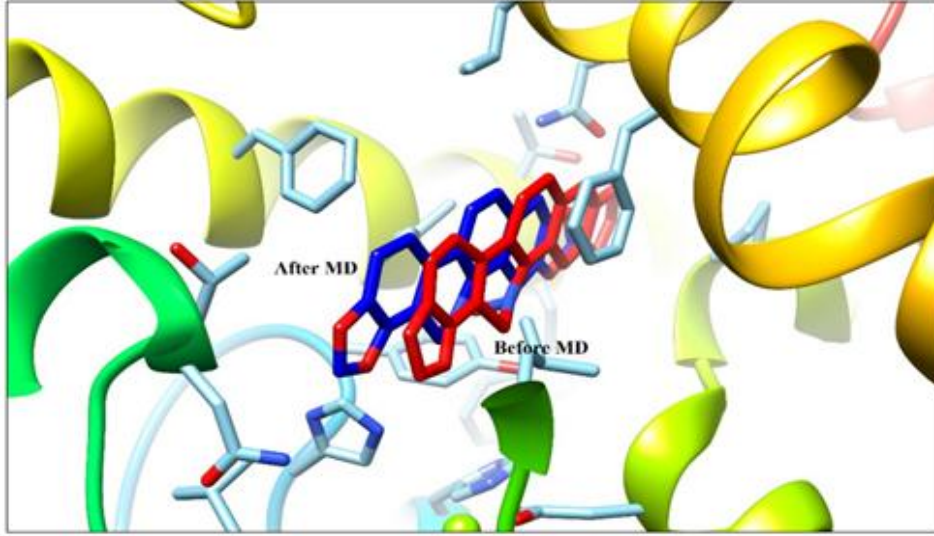
4.4.3. PDE-Sanguinarin MD Simülasyon Analizi

Simülasyon sonuçlarından elde edilen veriler ile PDE-3'un sanguinarin ile yaptığı kompleksde başlangıç konumlarından itibaren dengeye ulaşmaya kadar zamanla nasıl değiştiği ve ne kadar uzaklaştığı hesaplanmıştır. RMSD-Zaman grafiği Şekil 4.36'da verilmiştir. Bu diyagram incelendiğinde proteinin genel olarak kararlı bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Protein RMSD diyagramının simülasyon başlangıcında değişik dalgalanmalar gerçekleşmektedir. Ancak 30 ns den sonra dengeye ulaştığı ve kararlı hale geçtiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 35. PDE-3-Sanguinarin'in RMSD Grafiği

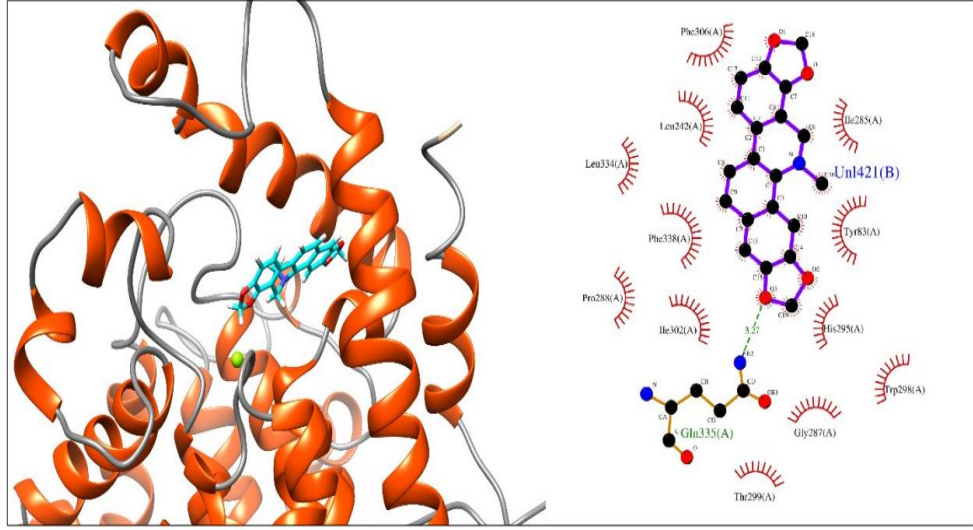
Ligandın RMSD diyagramında ise bağlanma bölgesi içindeki herhangi bir sapma fark edilmemiş ve simülasyon boyunca stabil olduğu gözlenmiştir. Sanguinarin ligandının MD simülasyonundan önce ve sonra PDE-3 proteinine nasıl bağlandığı Şekil.4.37’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 36. Sanguinarin'in PDE-3'e Simülasyondan Önce ve Sonra Bağlanma Konumu

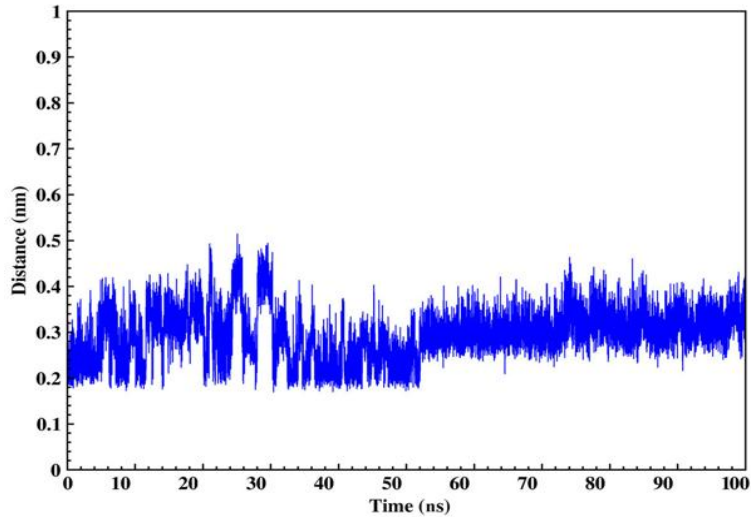
Buna göre, proteinin bağlanma bölgesindeki sanguinarin ligandının konumu, simülasyon öncesi konumundan bir değişiklik göstermemektedir. Buda ligand molekülünün bağlantı noktasında kararlı olduğunu belirtmektedir.

Şekil 4.38' de sanguinarin ligandının PDE-3 proteinine bağlanması ve çevresindeki aminoasitler 2D ve 3D olarak gösterilmiştir. Konformasyon incelendiğinde aktif bölgede yüksek afinite ile bağlanmış olan ligandlar Phe338, Ile302, Leu242, Phe306, Pro288, Tyr83, His84, ve Gln335 aminoasitleri ile etkileşimler yapmışlardır. Buda yapılan doking hesaplamalardaki sonuçları destekler niteliktedir.



Şekil 4. 37. Sanguinarin Ligandının PDE-3 Proteini İle Bağlanma Bölgesi 2D ve 3D Görüntüsü

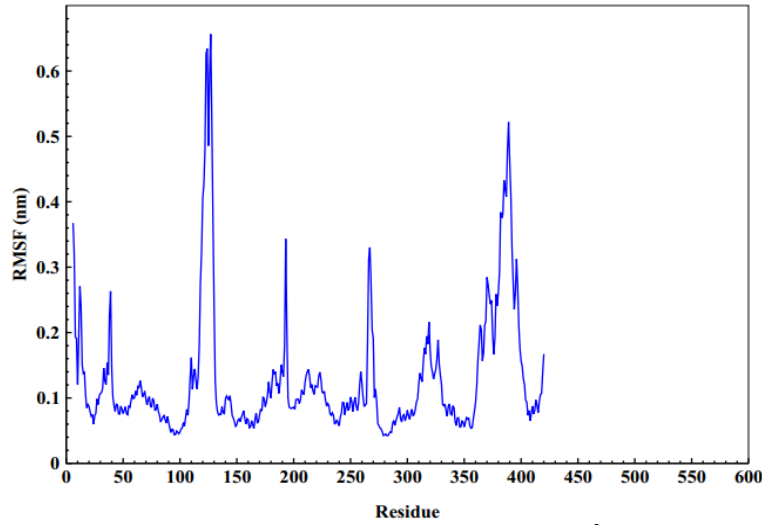
Sistemin kararlılığını kontrol etmek için proteinde etkileşime giren aminoasitler ile ligand arasındaki mesafe de incelenmiştir (Şekil 4.39). PDE-3-sanguinarin kompleksinde, simülasyon sırasında ligand ile Hidrojen bağı yapan Gln335 aminoasidi aktif bölge için ana aminoasit olarak seçilmiştir. Bu aminoasit ile ligand arasındaki mesafede 52 ns'ye kadar bazı dalgalanmalar olduğu gözlenmiştir. 52 ns den sonra küçük bir yükseliş ile 0.3 nm değerinde stabil kalmıştır. Sonuç olarak bu kompleksde ligand molekülünün bağlanma bölgesinde kararlı kaldığı bulunmuştur.



Şekil 4. 38. Aktif Bölgedeki Aminoasit Ve Ligand Arasındaki Mesafe Değişikliği

PDE-3-sanguinarin kompleksinde aminoasitler hakkındada bilgi edinebilmek ve protein bölgelerinin mobilitesini incelemek amacıyla her bir aminoasit için RMSF değerleri de hesaplanmıştır (şekil.4.40). Aminoasitlerin esnekliğini incelemek için, simülasyonun son 20 ns'si (RMSD diyagramının kararlı kısmı) kullanılmış ve hesaplama için aminoasitlerin alfa-karbonları temel alınmıştır.

PDE-3 proteininin RMSF diyagramı incelendiğinde aminoasitler simülasyon boyunca çok az dalgalanma ve esneklik gösterdiği ve stabil olma eğiliminde olduğu, yalnızca loop bölgesinde olan Thr120, Arg130, Leu355 ve Ser400 aminoasitlerinde 0.3 ün üzerinde yüksek dalgalanmalar görülmüştür. En yüksek RMSF değer 0.6 nm üzerinde bulunmuştur. Sonuç olarak, PDE-3-sanguinarin kompleksi MD simülasyon boyunca kararlı olduğu ve ligand molekülünün bağlanma bölgesinde stabil kaldığını göstermektedir.

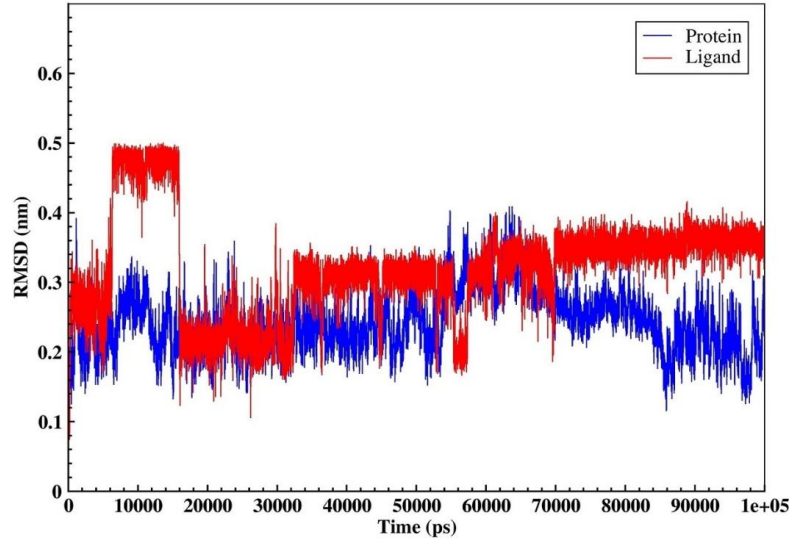


Şekil 4. 39. Sanguinarin Ligandının PDE-3 İle RMSF Diyagramı

4.4.4. GP-VI-rutin MD Simülasyon Analizi

Simülasyon sonuçlarından elde edilen veriler ile GP-VI in sanguinarin ile yaptığı kompleksde başlangıç konumlarından itibaren dengeye ulaşmaya kadar zamanla nasıl değiştiği ve ne kadar uzaklaştığı hesaplanmıştır. RMSD-Zaman grafiği Şekil 4.41'de verilmiştir. Bu diyagram incelendiğinde proteinin nisbeten kararlı bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Protein RMSD diyagramında uzun

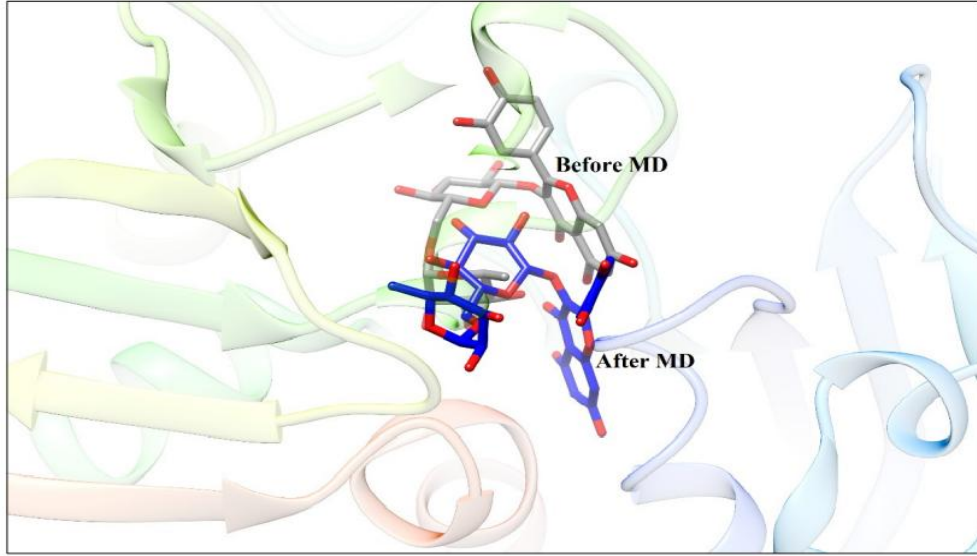
bir süre değişik dalgalanmalar gerçekleşmiş daha sonra kararlı bir yapıya ulaşmıştır. En yüksek değer ise 0.34 nm ve 30 ns civarında gözlemlenmektedir. Ligandın RMSD diyagramında ise 70 ns'ye kadar RMSD değerlerinde bazı dalgalanmalar gözlemlenmiş daha sonra kararlı hale gelmiştir.



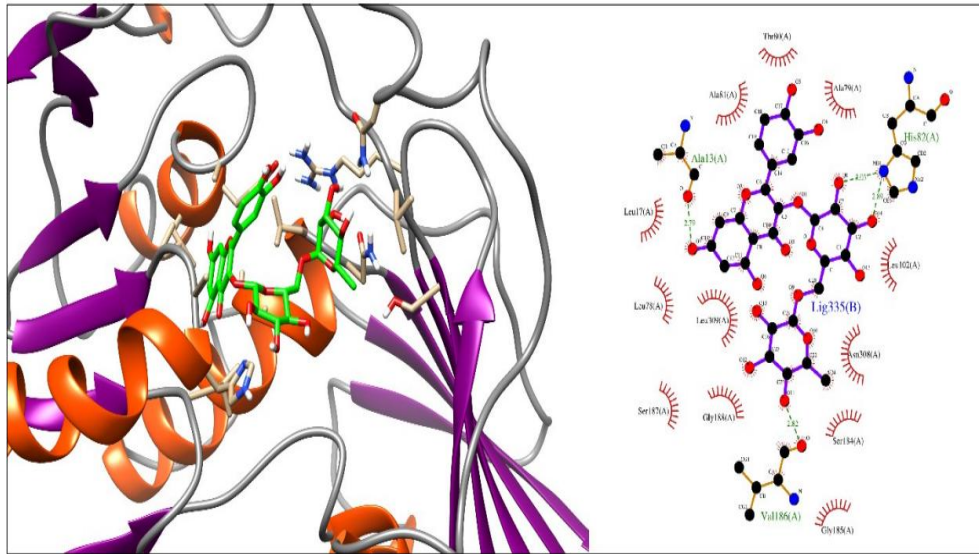
Şekil 4. 40. Rutin-GP-VI'in Zamana Karşı RMSD Grafiği

Rutin ligandının MD simülasyonundan önce ve sonra GP-VI proteinine nasıl bağlandığı Şekil.4.42'de gösterilmiştir. Buna göre, proteinin bağlanma bölgesindeki rutin ligandının konumu, simülasyon öncesi konumundan önemli bir değişiklik göstermemektedir. Buda ligand molekülünün bağlantı noktasında kararlı olduğunu belirtmektedir.

Şekil 4.43' de ise rutin ligandının proteine bağlanması ve çevresindeki aminoasitler iki ve üç boyutlu olarak gösterilmiştir. Konformasyon incelendiğinde aktif bölgede yüksek afinite ile bağlanmış olan ligandlar Leu309, Leu102, Ser184, Glu16, Ala81, ve Ala313 aminoasitleri ile etkileşimler yapmışlardır. Buda yapılan doking hesaplamalarındaki sonuçları destekler niteliktedir.



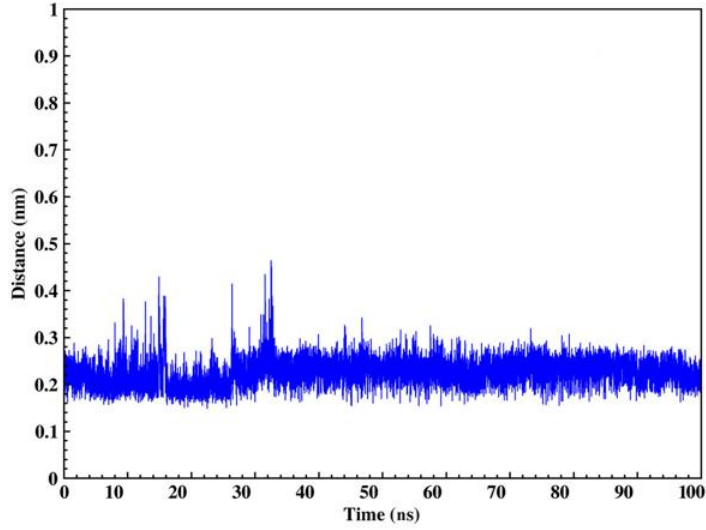
Şekil 4. 41. Rutin 'in GP-VI'e Simülasyondan Önce ve Sonra Bağlanma Konumu



Şekil 4. 42. Rutin Ligandının GP-VI ile Bağlanma Bölgesi 2D ve 3D Görüntüsü

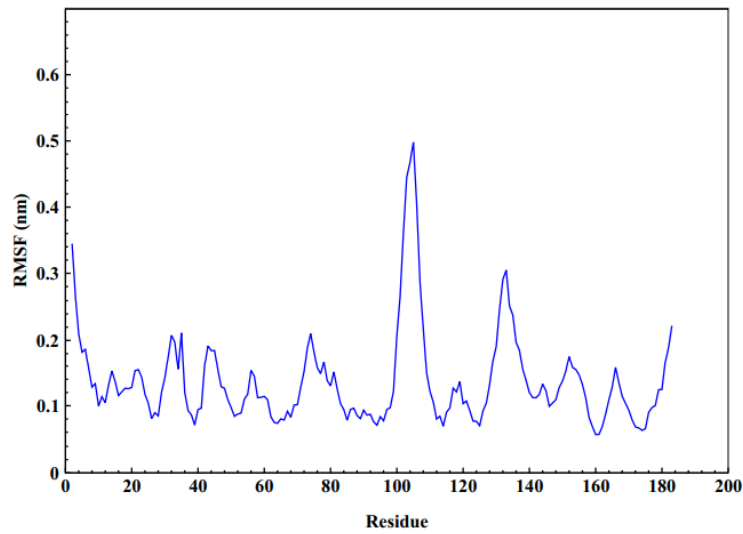
Sistemin kararlılığını kontrol etmek için proteinde etkileşime giren aminoasitlere ligand arasındaki mesafe de incelenmiştir (Şekil.2.44). 2G17-rutin kompleksinde simülasyon sırasında ligand ile Hidrojen bağı yapan Gln50, Arg46 ve Gln48 aminoasitleri aktif bölge için ana aminoasitler olarak seçilmiştir. Bu kalıntılar ile ligand arasındaki mesafe, simülasyon süreci boyunca 0.25 nm değeri civarında

stabil kaldığı ve sadece 32- 80 ns arasında hafif dalgalanmalar gözlenmemiştir. Sonuç olarak bu bu kompleksde ligand molekülünün bağlanma bölgesinde kararlı kaldığını bulunmuştur.



Şekil 4. 43. Aktif Bölgedeki Aminoasit ve Ligand Arasındaki Mesafe Değişikliği

Rutin-GP-VI kompleksinde aminoasitlerin hakkındada bilgi edinebilmek ve protein bölgelerinin mobilitesini incelemek amacıyla her bir aminoasit için RMSF değerleri de hesaplanmıştır (şekil 4.45).

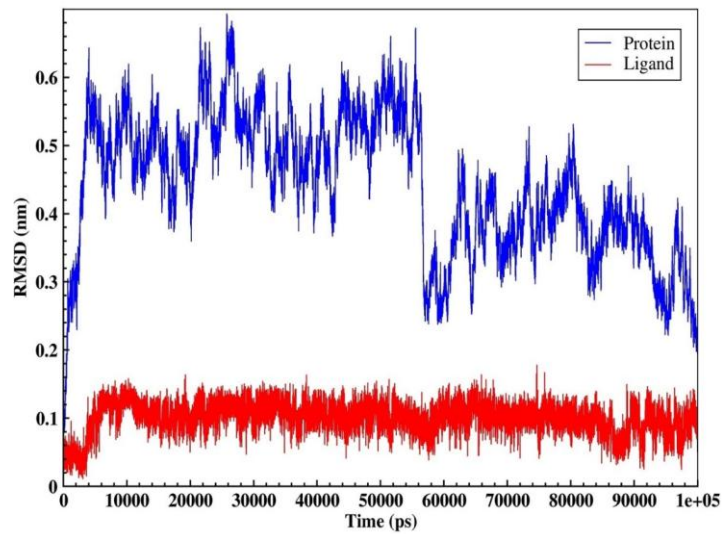


Şekil 4. 44. GP-VI-rutin'in RMSF Diyagramı

Aminoasitlerin esnekliğini incelemek için, simülasyonun son 20 ns'si (RMSD diyagramının kararlı kısmı) kullanılmış ve hesaplama için aminoasitlerin alfa-karbonları temel alınmıştır. GP-VI proteininin RMSF diyagramı incelendiğinde aminoasitlerin çok düşük esnekliğe sahip olup stabil olma eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek dalgalanma loop bölgesinde olan Pro100 ve Val110 numaralı aminoasitlerinde ve yaklaşık 0.48 nm olarak bulunmuştur. Daha fazla esnekliğe sahip bu kalıntılar, diğer aminoasitlerden daha az kararlılığa sahiptirler. Sonuç olarak, GP-VI-rutin kompleksi MD simülasyon boyunca kararlı olduğu ve ligand molekülünün bağlanma bölgesinde stabil kaldığını göstermektedir.

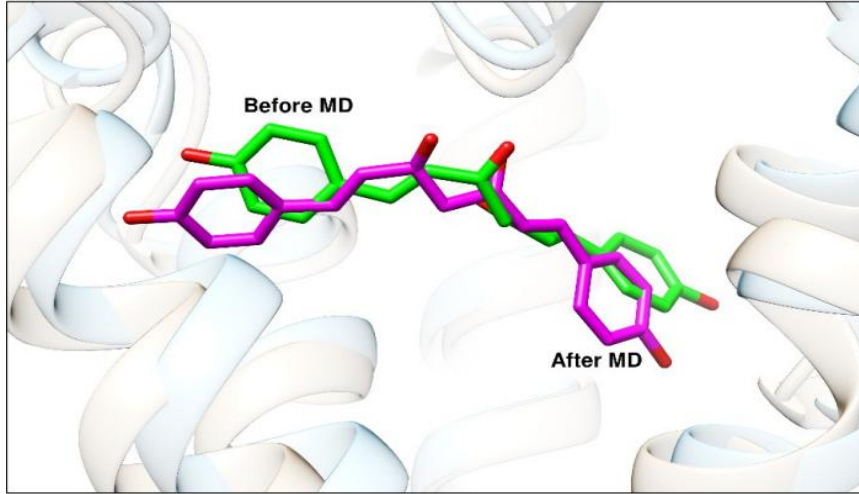
4.4.5. PAR-1-BDMC MD Simülasyon Analizi

Simülasyon sonuçlarından elde edilen veriler ile PAR-1 in BDMC ile yaptığı kompleksde başlangıç konumlarından itibaren dengeye ulaşmaya kadar zamanla nasıl değiştiği ve ne kadar uzaklaştığı hesaplanmıştır. RMSD-Zaman grafiği şekil 4.46'da verilmiştir. Bu diyagram incelendiğinde proteinin nisbeten kararlı bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Protein RMSD diyagramında uzun bir büyük dalgalanmalar gerçekleşmiş daha sonra simülasyonun sonunda 0.2 nm e ulaştığı ve kararlı bir yapıya ulaşmıştır. Ligandın RMSD diyagramında ise ilk 3 ns de bir artış gösterdikten sonra stabil olduğu ve kararlı hale gelmiştir.

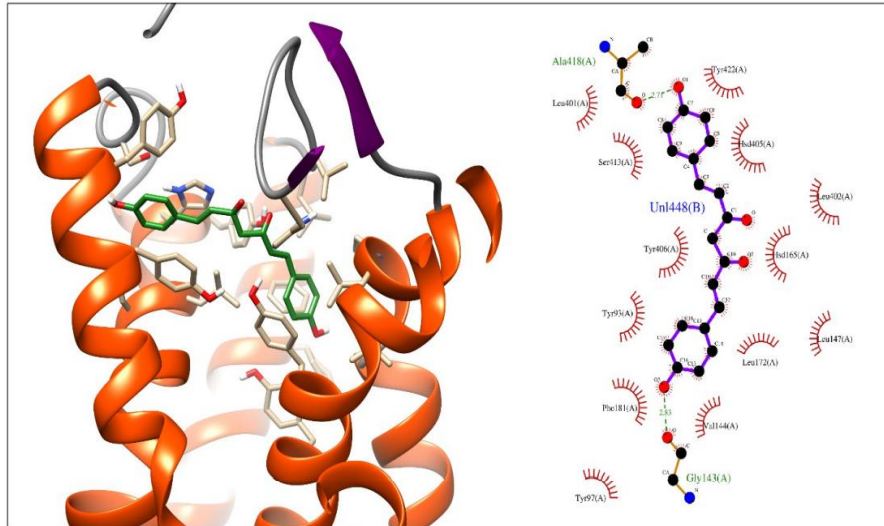


Şekil 4. 45. PAR-1-BDMC'in RMSD Grafiği

BDMC ligandının MD simülasyonundan önce ve sonra PAR-1 proteinine nasıl bağlandığı Şekil 4.47’te gösterilmiştir. Buna göre, proteinin bağlanma bölgesindeki BDMC ligandının konumu, simülasyon öncesi konumundan önemli bir değişiklik göstermemektedir. Buda ligand molekülünün bağlantı noktasında kararlı olduğunu belirtmektedir. Şekil 4.48’ de ise BDMC ligandının proteine bağlanması ve çevresindeki aminoasitler iki ve üç boyutlu olarak gösterilmiştir.



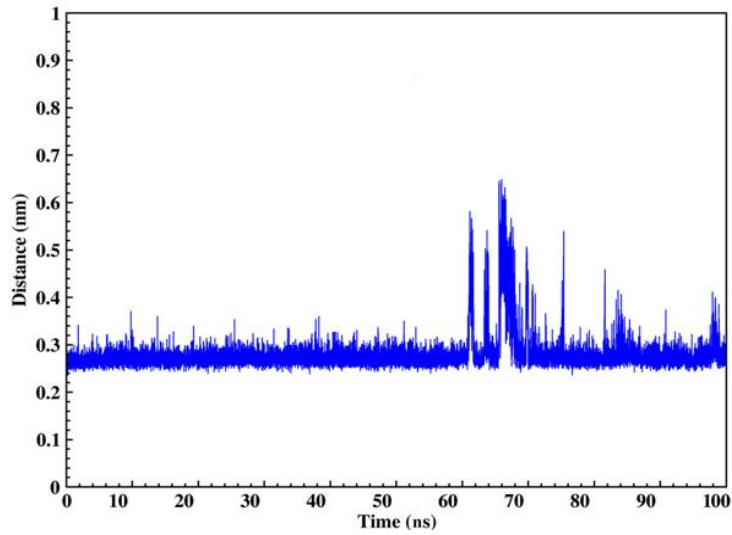
Şekil 4. 46. BDMC’in PAR-1 Simülasyondan Önce Ve Sonra Bağlanma Konumu



Şekil 4. 47. BDMC Ligandının PAR-1 İle Bağlanma Bölgesi 2D ve 3D Görüntüsü

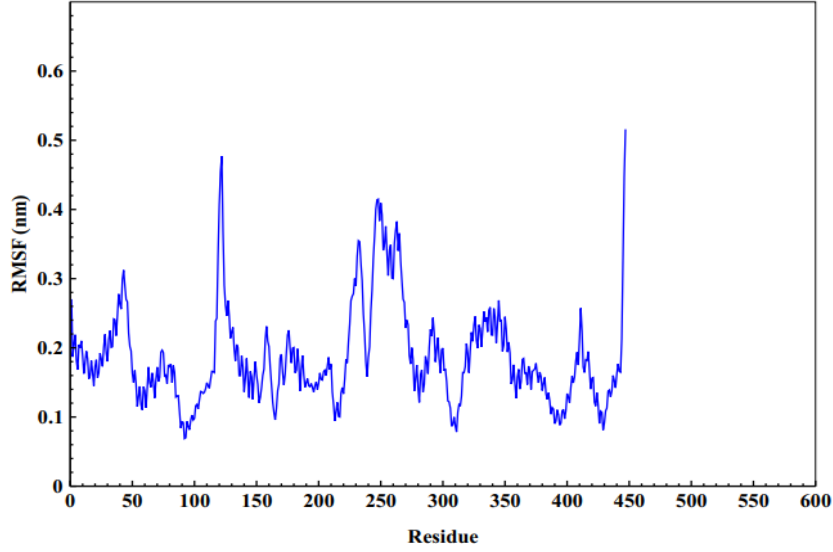
Konformasyon incelendiğinde aktif bölgede yüksek afinite ile bağlanmış olan ligand Ala418, Ser413, Leu402, Leu147, Gly143, Hsd165, Phe181, Leu172, Hsd405, aminoasitleri ile etkileşimler yapmıştır. Buda yapılan doking hesaplamalardaki sonuçları destekler niteliktedir.

Sistemin kararlılığını kontrol etmek için proteinde etkileşime giren aminoasitler ile ligand arasındaki mesafe de incelenmiştir (Şekil 4.49). PAR-1-BDMC kompleksinde, simülasyon sırasında ligand ile Hidrojen bağı yapan Gly143 aminoasiti aktif bölge için ana aminoasit olarak seçilmiştir. Bu aminoasit ile ligand arasındaki mesafe, 60 ns'ye kadar çok yüksek stabilite göstermiştir. 60 ve 70 ns arasında bazı dalgalanmalardan sonra tekrar stabil hale geçmiştir. 0.3 değeri civarında küçük sapmalar ile sabit kalmıştır. Sonuç olarak bu kompleksde ligand molekülünün bağlanma bölgesinde kararlı kaldığı bulunmuştur.



Şekil 4. 48. Aktif Bölgedeki Aminoasit ve Ligand Arasındaki Mesafe Değişikliği

PAR-1-BDMC kompleksinde aminoasitlerin hakkındada bilgi edinebilmek ve protein bölgelerinin mobilitesini incelemek amacıyla her bir aminoasit için RMSF değerleri hesaplanmıştır (Şekil.4.50)



Şekil 4. 49. PAR-1-BDMC'in RMSF Diyagramı

4.5. MM-PBSA Bağlanma Serbest Enerjisi

Sistemlerin serbest enerji değerleri MM-PBSA yaklaşımına dayalı g_mmpbsa yazılımı kullanılarak hesaplanmış ve yapılarındaki aminoasitlerin bağlanma enerjilerine olan katkıları incelenmiştir. Her kompleks için MD simülasyonunun son 30 ns' den eşit aralıklarla çıkarılan koordinatların 300 anlık görüntüsü alınmıştır. Hesaplamalar sonucunda elde edilen enerji değerleri Çizelge 4. 7' de verilmiştir.

Çizelge 4. 7. Sistemlerin Serbest Enerji Değerleri

Complex name	ΔG_{vdw}	ΔG_{elec}	$\Delta G_{solv-polar}$	$\Delta G_{solv-nonpol}$	ΔG_{tot}
COX-1- graveolinin	-179.980	-17.650	95.719	-16.772	-118.683
P2Y12-sanguinarin	-182.250	-17.647	119.443	-16.533	-96.988
PDE3- sanguinarin	-187.996	-17.288	96.369	-16.709	-125.624
GP-VI- rutin	-171.385	-13.831	82.636	-16.099	-118.678
PAR1- BDMC	-182.721	-19.674	139.273	-19.389	-82.511

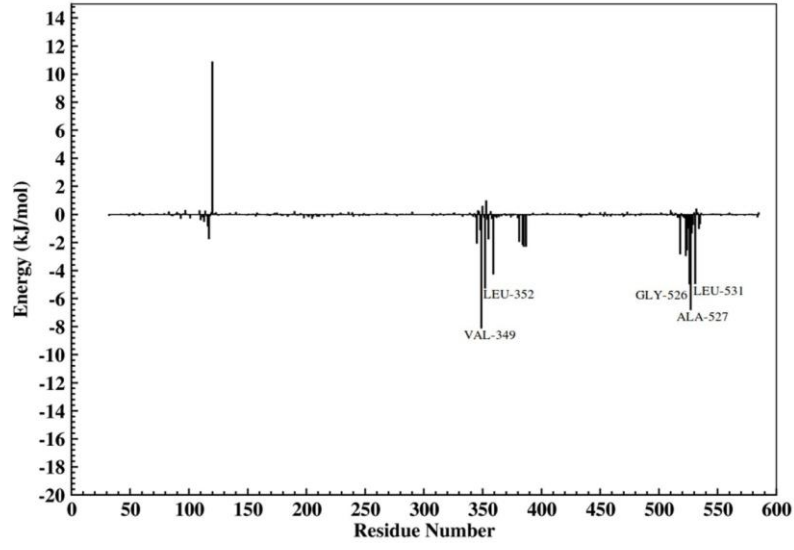
Negatif değerler bağlanma enerjisine olumlu pozitif değerler ise olumsuz enerji katkılarına karşılık gelmektedir. ΔG_{tot} ile gösterilen toplam bağlanma enerjileri tüm kompleksler için iyi değerlere sahip olduğunu görülmüştür. Tüm hesaplamalar için ΔE_{vdw} ile gösterilen van der Waals etkileşimleri oldukça baskın olup ve ligandın proteine bağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır.

ΔG_{elec} ile gösterilen elektrostatik enerjileri sistemlerde olumlu enerji katkısında bulunduğu ve kararlılıklarına önemli katkı sağladıkları gözlemlenmektedir.

$\Delta G_{solv-nonpol}$ ile gösterilen polar olmayan solvasyon enerji MD enerji tipleri kadar olmasa da enerji etkileşimlerine olumlu katkılar sağladı gözlemlenmiştir. Ancak $\Delta G_{solv-polar}$ ile gösterilen polar solvasyon enerjisi pozitif değerinden dolayı bağlanma enerjisine olumlu katkıda bulunmadığı görülmüştür.

Bağlanmada yer alan önemli aminoasitleri belirlemek ve her bir aminoasidin etkileşim modu hakkında daha fazla ayrıntı sağlamak için bağlanma enerjisinin dekompozisyonu yapılmıştır. Her kompleks için elde edilen sonuçlar ve bahsı geçen aminoasitler AutoDock Vina programından elde edilen sonuçların örtüştüğü görülmektedir. Bahsedilen tüm aminoasitler, AutoDock Vina sonuçlarından elde edilen her proteinin ilgili ligand ile etkileşimlerinde de yer aldığı görülmektedir.

COX-1-graveolinin kompleksinde Val349, Ala527, Leu352, Gly526, Leu531, Leu359, Ile523, Phe518, Glu524, ve Tyr385 bağlanma enerjisine katkıda bulunan aminoasitler olarak gözlenmiştir (şekil.4.51.) Katkıda bulunan önemli aminoasitler ve her birinin bağlanma enerjileri çizelge 4.8 de verilmiştir. Buna göre Val349, Ala527, Leu352, Gly526, ve Leu531, en yüksek katkı yapan aminoasitler olduğu belirlenmiştir.

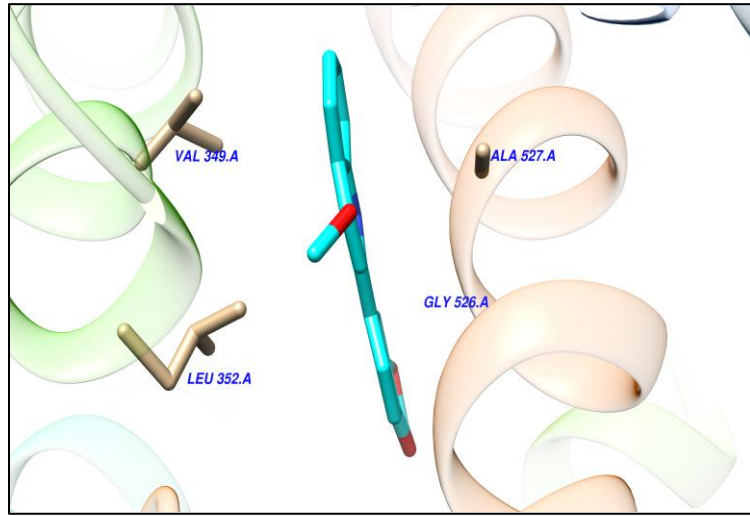


Şekil 4. 50. COX-1-Graveolinin Kompleksindeki Önemli Aminoasitler Ve Bağlanma Enerjileri

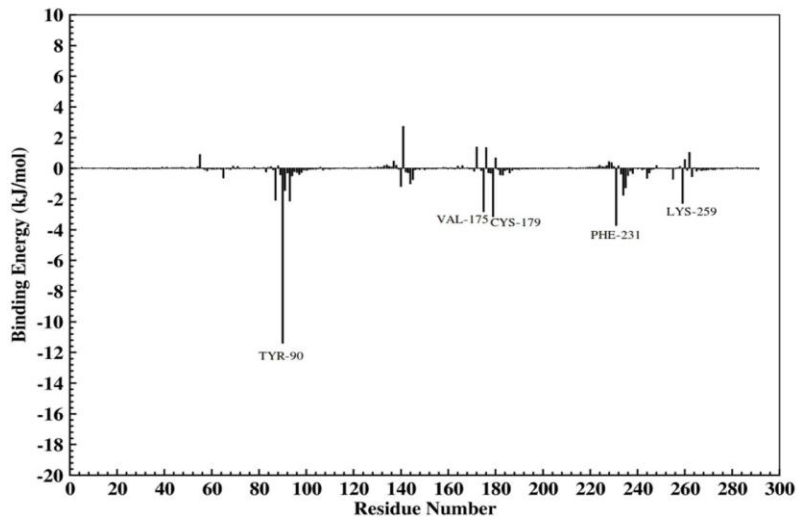
Çizelge 4. 8. COX-1-Graveolinin Kompleksindeki Aminoasitlerin Enerji Katkıları

COX-1- Graveolinin	
Aminoasit	Bağlanma enerjisi (kJ/mol)
VAL-349	-8.0935
ALA-527	-6.7794
LEU-352	-5.2438
GLY-526	-4.9548
LEU-531	-4.9282
LEU-359	-4.2482
ILE-523	-2.9424
PHE-518	-2.8041
GLU-524	-2.5349
TYR-385	-2.2716

Ayrıca Bağlanma kuvveti en yüksek olan aminoasitlerin ligand molekülü ile yerleşimi de Şekil.4.52'de verilmiştir. Bu aminoasitler daha önce Autodock Vina sonuçlarından elde edilen protein-ligand etkileşimlerinde de dâhil olan kalıntılar olarak bulunmuştur. Bu kalıntılar 310-310 ve 480-510 aralıklarda olduğu görülmektedir. P2Y12-sanguinarine kompleksinde Tyr90, Phe231, Cys179, Val175, Lys259, Met93, Val87, Ala234, Phe91, ve Arg235 bağlanma enerjisine katkıda bulunan aminoasitler olarak gözlenmiştir (Şekil 4.53).



Şekil 4. 51. Önemli Aminoasitlerin Ligand Molekülü ile Yerleşimi

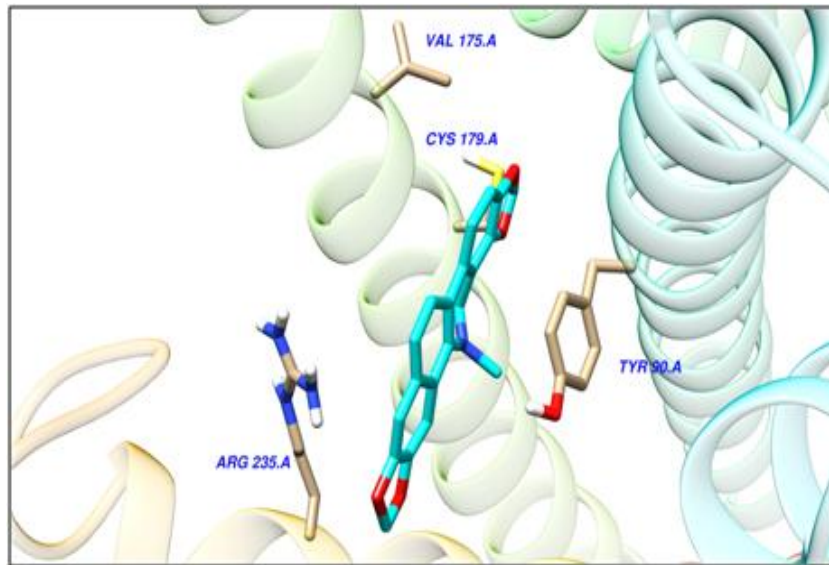


Şekil 4. 52. P2Y12-Sanguinarin Kompleksindeki Önemli Aminoasitler Ve Bağlanma Enerjileri

Çizelge 4. 9. P2Y12-Sanguinarin Kompleksindeki Aminoasitlerin Enerji Katkıları

P2Y12-sanguinarin	
Aminoasit	Bağlanma enerjisi (kJ/mol)
TYR-90	-11.3917
PHE-231	-3.7153
CYS-179	-3.1435
VAL-175	-2.8099
LYS-259	-2.2736
MET-93	-2.1238
VAL-87	-2.0716
ALA-234	-1.7448
PHE-91	-1.4248
ARG-235	-1.2587

Bağlanma kuvveti en yüksek olan aminoasitlerin ligand molekülü ile yerleşimi de Şekil.4.54'de verilmiştir. Bu aminoasitler daha önce Autodock Vina sonuçlarından elde edilen protein-ligand etkileşimlerinde de dâhil olan kalıntılar olarak bulunmuştur. Bu kalıntıların önemli kısmı 84-94 ve 172-180 ve 256-264 aralıklardaki olduğu görülmektedir.

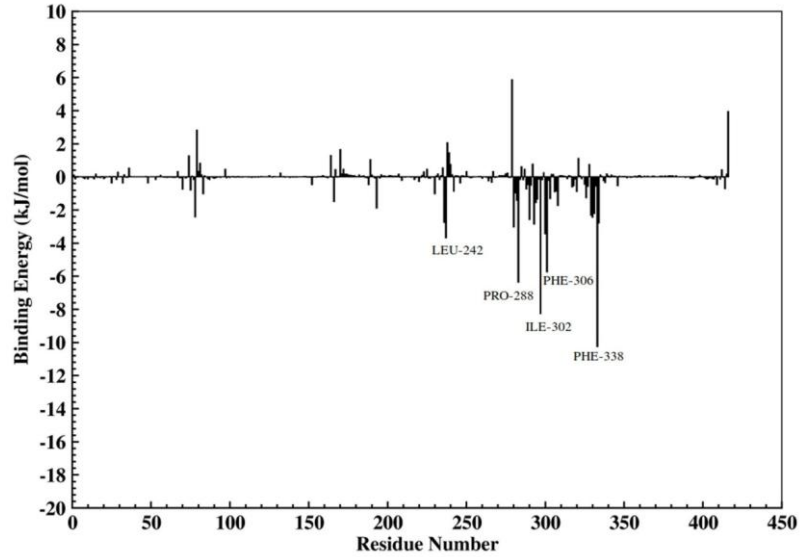


Şekil 4. 53. Önemli Aminoasitlerin Ligand Molekülü ile Yerleşimi

PDE-3-Sanguinarine kompleksinde, Phe338, Ile302, Pro288, Phe 306, Leu-242, Glu305, Ile285, Trp298, Ile339, and Asp241 bağlanma enerjisine katkıda bulunan aminoasitler olarak gözlenmiştir (Şekil.4.55.).

Katkıda bulunan önemli aminoasitler aminoasitler ve her birinin bağlanma enerjileri çizelge 4.10' da verilmiştir. Buna göre Phe338, Ile302, Pro288, Phe 306 ve Leu-242 en yüksek katkı yapan aminoasitler olduğu belirlenmiştir.

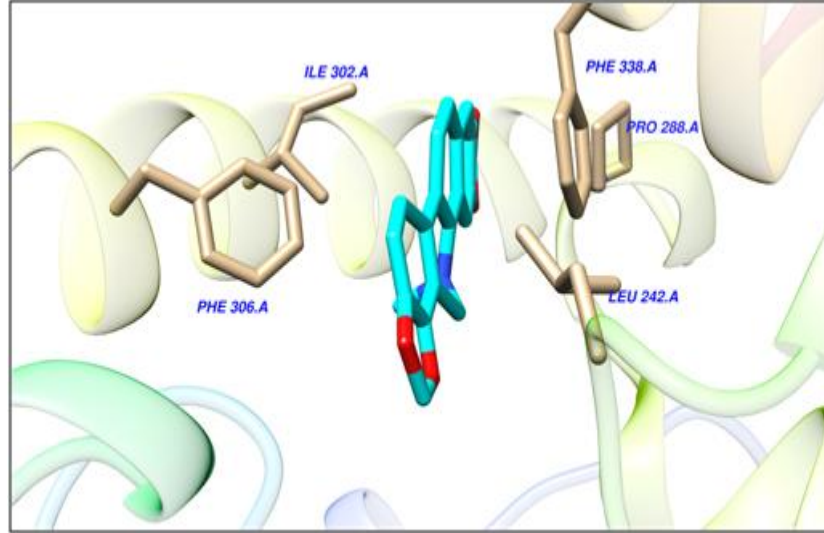
Bağlanma kuvveti en yüksek olan aminoasitlerin ligand molekülü ile yerleşimi de Şekil.4.56'da verilmiştir. Bu aminoasitler daha önce Autodock Vina sonuçlarından elde edilen protein-ligand etkileşimlerinde de dâhil olan kalıntılar olarak bulunmuştur. Bu kalıntılar 280-340 aralıklardaki olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 54. PDE-3-sanguinarin Kompleksindeki Önemli Aminoasitler Ve Bağlanma Enerjileri

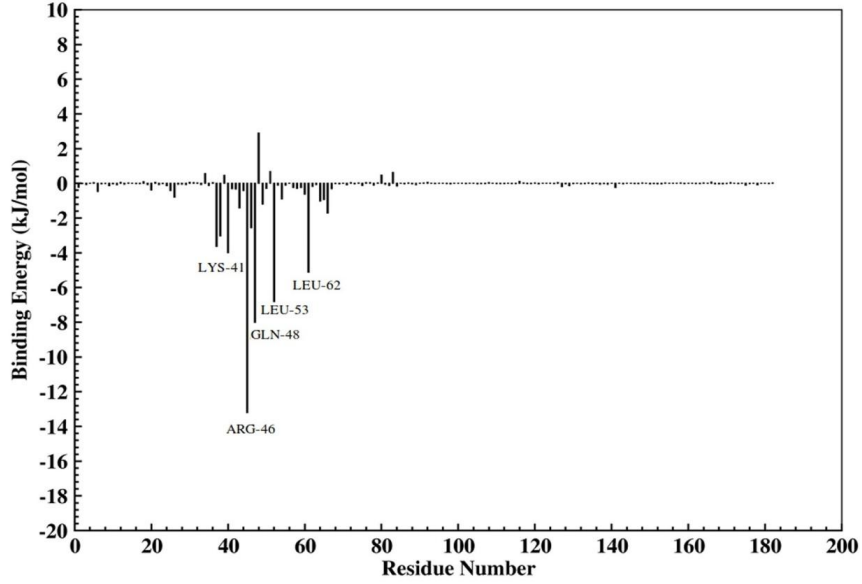
Çizelge 4. 10. PDE-3-sanguinarin Kompleksindeki Aminoasitlerin Enerji Katkıları

PDE-3- sanguinarin	
Aminoasit	Bağlanma enerjisi(kJ/mol)
PHE-338	-10.2395
ILE-302	-8.2556
PRO-288	-6.3642
PHE-306	-5.7386
LEU-242	-3.6833
GLU-305	-3.4303
ILE-285	-3.0178
TRP-298	-2.8446
ILE-339	-2.779
ASP-241	-2.7428



Şekil 4. 55. Önemli Aminoasitlerin Ligand Molekülü ile Yerleşimi

GP-VI-Rutin kompleksinde, Arg46, Gln48, Leu53, Leu62, Lys41, Arg38, Leu39, Tyr47, Arg67, ve Ser44 bağlanma enerjisine katkıda bulunan aminoasitler olarak gözlenmiştir (Şekil 4.57).



Şekil 4. 56. GP-VI-rutin Kompleksindeki Önemli Aminoasitler Ve Bağlanma Enerjileri

Çizelge 4. 11. GP-VI-rutin Kompleksindeki Aminoasitlerin Enerji Katkıları

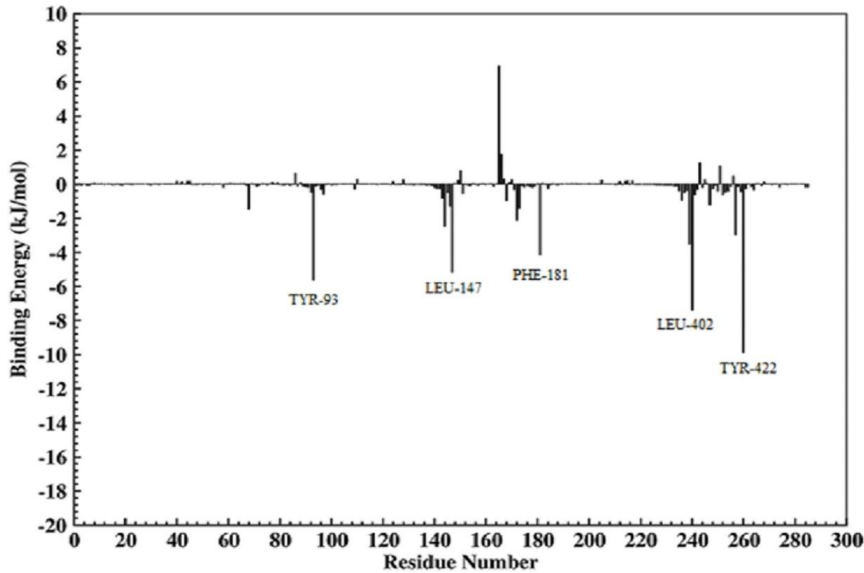
GP-VI- Rutin	
Aminoasit	Bağlanma enerjisi(kJ/mol)
ARG-46	-13.2085
GLN-48	-7.9916
LEU-53	-6.8019
LEU-62	-5.1123
LYS-41	-3.9909
ARG-38	-3.6318
LEU-39	-3.0219
TYR-47	-2.5618
ARG-67	-1.7058
SER-44	-1.4114

Buna göre Arg46, Gln48, Leu53, Leu62 ve Lys41 en yüksek katkı yapan aminoasitler olduğu belirlenmiştir. Bu aminoasitler daha önce Autodock Vina sonuçlarından elde edilen protein-ligand etkileşimlerinde de dâhil olan kalıntılar olarak bulunmuştur. Bu kalıntılar 32-68 aralıklardaki olduğu görülmektedir.

PAR-1-BDMC kompleksinde, Tyr422, Leu402, Tyr93, Leu147, Phe181, Leu401, Tyr419, Val44, Leu172, ve Lys68 bağlanma enerjisine katkıda bulunan aminoasitler olarak gözlenmiştir (Şekil 4.58).

Katkıda bulunan önemli aminoasitler aminoasitler ve her birinin bağlanma enerjileri Çizelge 4.12 de verilmiştir. Buna göre Tyr422, Leu402, Tyr93, Leu147, ve Phe181 en yüksek katkı yapan aminoasitler olduğu belirlenmiştir.

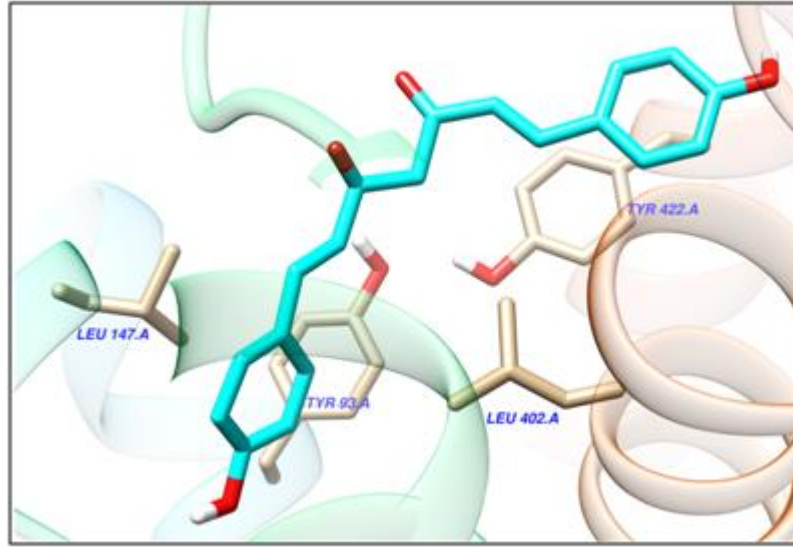
Bağlanma kuvveti en yüksek olan aminoasitlerin ligand molekülü ile yerleşimi de Şekil.4.59'da verilmiştir. Bu aminoasitler daha önce Autodock Vina sonuçlarından elde edilen protein-ligand etkileşimlerinde de dâhil olan kalıntılar olarak bulunmuştur. Bu kalıntıların 240-262 aralıklardaki olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 57. PAR-1-BDMC Kompleksindeki Önemli Aminoasitler Ve Bağlanma Enerjiler

Çizelge 4. 12. PAR-1-BDMC Kompleksindeki Aminoasitlerin Enerji Katkıları

PAR1- BDMC	
Aminoasit	Bağlanma enerjisi (kj/mol)
TYR-422	-9.8645
LEU-402	-7.3627
TYR-93	-5.6104
LEU-147	-5.1726
PHE-181	-4.1441
LEU-401	-3.4958
TYR-419	-2.9495
VAL-144	-2.4502
LEU-172	-2.1035
LYS-68	-1.4523



Şekil 4. 58. Önemli Aminoasitlerin Ligand Molekülü ile Yerleşimi

4.5. İlaç Benzerliği ve ADMET Özelliklerinin İncelenmesi

Güvenli ve etkili ilaç tasarımının gerçekleşmesinde, dokuların ilaca maruz kalması ile ilgili birçok farmakolojik özellik ilaç benzerliği ve ADMET hesaplamaları ile elde edilebilmektedir. Çalışmamızın son aşamasında ligandların farmakolojik özellikleri ve ADMET profilleri hesaplanmıştır. Bu özellikler sayesinde ilacın vücut içerisinde nasıl ve ne kadar absorbe edileceği, kan beyin bariyerindeki geçirgenliği, farmakolojik fiziksel özellikleri, ve oral absorpsiyonu gibi sonuçlar elde edilmiştir.

Bir molekülün oral ilaç adayı olabilmesi için lipinski beşer kuralına göre moleküler ağırlığı 500' den küçük, hidrojen bağ alıcı sayısı 10'dan küçük ve hidrojen bağ verici sayısı ise 5'ten küçük olması gerekmektedir. Ayrıca lipofilisitenin saptanması amacıyla kullanılan LogP, 5'ten küçük, TPSA değeri 60-70; suda çözünürlüğün göstergesi olarak kullanılan LogS -1 ile -5 arasında olması beklenmektedir.

Bileşiklerin SwissAME web sitesi üzerinden elde edilen farmakokinetik bulguları çizelge 4.13'de gösterilmektedir.

Lipofiliklik bir ilacın emiliminde önemli moleküler özelliklerden biridir. Lipofilisitenin logaritması (log P) değeri gravolinin, sanguinarin, rutin, ve BDMC için sırasıyla 3.38, 2.88, 1.51, ve 2.83 olarak bulunmuştur. Her dört bileşiğin LogP değeri 5'ten küçük olduğu için hedeflerine yüksek aktivite gösterebilen bileşikler olarak varsayılmaktadırlar. Suda çözünürlüğün logaritması (log S) değeri gravolinine, sanguinarine, rutin, ve BDMC için sırasıyla -4.45, -5.24, -3.3, ve -3.8 olarak bulunmuştur yani bu moleküller suda çözünmektedir.

Gravolinin, sanguinarin ve BDMC bileşiklerinde hiçbir sapma gözlenmediği için lipinski'nin beşer kuralına uymaktadırlar.

Rutin bileşiğinde 500'den fazla molekül ağırlığı, 5'ten fazla hidrojen bağı donörü, ve 10'dan fazla hidrojen bağı alıcısının olduğu nedeni ile Lipinski kuralına uymamaktadır. Rutin ayrıca Ghose, Veber, ve Egan kurallarına uymayan ve sırasıyla 4, 1, ve 2 sapmaya sahip tek ilaçtır. Bu yüzden de diğer bileşiklere göre daha az ilaç olma potansiyeline sahiptir.

Çizelge 4. 13. Moleküllerin Farmakokinetik Özelliklerinin Analizi

İlaç benzerlik özellikleri	Graveolinin	Sanguinarin	Rutin	BDMC
Moleküler ağırlık (g/mol)	279.29	332.33	610.52	308.33
Log P	3.38	2.88	1.51	2.83
Log S	-4.45	-5.24	-3.3	-3.8
Hidrojen bağ alıcısı	4	4	16	5
Hidrojen bağ vericisi	0	0	10	2
Molar Kırılabilirlik	79.73	94.68	141.38	89.82
Lipinski sapma	0	0	3	0
Ghose sapma	0	0	4	0
Veber sapma	0	0	1	0
Egan sapma	0	0	2	0
Biyoayarlılık skoru	0.55	0.55	0.17	0.55
TPSA (Å²)	40.58	40.8	269.43	74.6
Dönebilen bağ sayısı	0	6	6	2

Bileşiklerin ADMETlab web sitesi üzerinden elde edilen ADMET sonuçları çizelge 4.14 'de gösterilmektedir.

Graveolinin bileşiği için ADMET özellikleri açısından değerlendirilme yapıldığında İnsan kolorektal adenokarsinom hücre hattı (Caco-2) geçirgenlik kabiliyeti gösterdiği ve P-glikoprotein (P-gp) substratı olmadığı nitelendirilmiştir.

Bu ligand gastrointestinal absorpsiyon (HIA) açısından yüksek özellik göstermiştir. Ayrıca plazma proteinlerine bağlanma (PBB) kabiliyeti 84.149 % olup (kan-beyin bariyeri) BBB geçebilmektedir.

Sitokrom P450 (CYP) ilaçların eliminasyonunda önemli rol oynayan enzimlerdir ve inhibisyonları ilaçların vücuttan geç atılmasına neden olmaktadır. Genel olarak ilacın yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) üç saatten kısa olması gerekmektedir. Graveolin ligandı CYP izoformlarının hepsinde inhibisyon sağladığı ve 1.754 saatlik bir yarılanma ömrü ile vücuttan atıldığı görülmektedir. Bu ligand ilaca bağlı karaciğer hasarı (DILI) göstermektedir. Human-ether-a-gogo related gene (HERG) kanalını inhibe ettiği ve insan hepatoksisite (H-HT) özelliği olmadığı nitelendirilmiştir.

Sanguinarinmolekülü Caco-2 geçirgenliği olup P-gp substratı özelliğini göstermemektedir. Bu ligand yüksek HIA kabiliyeti göstermiştir. PBB özelliği 75.758 % olarak bulunmuştur. Ayrıca BBB geçtiği için de oral antitrombosit ilaçlar için iyi bir aday olabilmektedir. Sanguinarin, CYP450 2C9 hariç, CYP izoformlarının hepsinin inhibisyonunu sağladığı ve 2.166 saatlik bir yarılanma ömrü ile vücuttan atıldığı görülmektedir. HERG kanalını inhibe ettiği ve H-HT özelliğinin olmadığı nitelendirilmiştir. Bu ligand DILI özelliği göstermektedir.

Rutin bileşiğinin Caco-2 geçirgenlik özelliğinin olmadığı ve P-gp substratı kabiliyeti gösterdiği nitelendirilmiştir. Bu ligand HIA açısından düşük özellik göstermiştir. Ayrıca PBB kabiliyeti 76.002 % olup BBB geçememektedir. Bunun için rutin bileşiğine daha detaylı analize ihtiyaç duyulur. Başka bir deyişle BBB geçmeden beyin etkilenmesi, bize bu ligandın vücuda alındıktan sonra oluşan metabolitlerinin BBB geçerek beyin fonksiyonlarını etkileyebileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan, kullanılan tahmin yönteminin hata payı da göz önüne alınmalı ve bu sonuçlar başka bulgularla desteklenmeden kesin doğru olarak değerlendirilmemelidir. Rutin, CYP izoformlarının hiçbirini için inhibisyon sağlamadığı ve 2.128 saatlik bir yarılanma ömrü ile vücuttan atıldığı görülmektedir. Bu ligand DILI özelliği gösterip HERG kanalını inhibe ettiği görülmektedir. H-HT özelliği bulunmamıştır.

BDMC bileşiği için ADMET özellikleri açısından değerlendirilme yapıldığında Caco-2 geçirgenlik kabiliyeti gösterdiği ve P-gp substratı olmadığı

nitelendirilmiştir. Bu ligand HIA açısından yüksek özellik göstermiştir. Ayrıca PBB kabiliyeti 87.603 % olup BBB geçmektedir. BDMC, CYP450 2C9 ve CYP450 2C19 hariç CYP izoformlarının hepsi için inhibisyon sağladığı ve 1.186 saatlik bir yarılanma ömrü ile vücuttan atıldığı görülmektedir. Bu ligand DILI özelliği gösterip HERG kanalını inhibe ettiği görülmektedir. H-HT özelliği bulunmamıştır.

Çizelge 4. 14. Bileşiklerin Admet Özelliklerinin İnceleme Sonuçları

Sınıf	Özellik	Graveolinin	Sanguinarin	Rutin	BDMC
Absorbsiyon	Caco-2 geçirgenlik	Caco-2+	Caco-2+	Caco-2-	Caco-2+
	Pgp-inhibitor	Non- inhibitor	Non- inhibitor	Non- inhibitor	Non- inhibitor
	G- absorbsiyon (HIA)	HIA+	HIA+	HIA+	HIA+
Dağılım	PPB	84.149 %	75.758 %	76.002 %	87.603 %
	BBB	BBB+	BBB+	BBB-	BBB+
Metabolizma	CYP450 1A2 inhibitorü	İnhibitor	İnhibitor	Non-inhibitor	İnhibitor
	CYP450 3A4 inhibitorü	İnhibitor	İnhibitor	Non-inhibitor	İnhibitor
	CYP450 3A4 substratı	Substrat	Substrat	Non-substrat	Substrat
	CYP450 2C9 inhibitorü	İnhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor
	CYP450 2C9 substratı	Substrat	Non-substrat	Non-substrat	Non-substrat
	CYP450 2C19 inhibitorü	İnhibitor	İnhibitor	Non-inhibitor	Non-inhibitor
	CYP450 2D6 inhibitorü	İnhibitor	İnhibitor	Non- inhibitor	İnhibitor
	CYP450 2D6 substratı	Substrat	Substrat	Non-substrat	Substrat
Atılım	T1/2 (h)	1.754	2.166	2.128	1.846
Toksosite	hERG inhibitorü	İnhibitor	İnhibitor	İnhibitor	Non-inhibitor
	Ames Toksisitesi	Ames+	Ames+	Ames+	Ames-
	DILI	DILI+	DILI+	DILI+	DILI+
	İnsan Hepatoksosite (H-HT)	H-HT-	H-HT-	H-HT-	H-HT-

5. YORUMLAR

Tez kapsamında yürütülen çalışmalar beş adımdan oluşmaktadır

İlk adımda AutoDock Vina programının validasyon testi hedef proteinler için seçilen 3N8X, 4NTJ, 1SO2, ve 3VW7 kodları ile yapılmış ve RMSD değeri dikkate alınarak programın uygunluğuna bakılmıştır. Görsel değerlendirmeler sonucunda, programın doking çalışması için doğru sonuç verdiği kanıtlanmıştır.

İkinci adımda CVDs hakkında genel bilgi edinilmiş, literatür araştırması yapılmıştır. Devamında 14 bitkide bulunan 50 fitokimyasal için validasyon çalışmasında kullanılan grid değerleri ile seçilen beş antitrombosit hedefine karşı doking yapılmıştır. Bu fitokimyasalların ilgili reseptörlerin aktif bölgesi ile nasıl etkileştiklerine bakılmıştır. Bağlanma enerjileri ve bağlanma modları detaylı olarak incelenmiştir.

Üçüncü adımda en iyi skorlama değerine sahip beş bileşik için MD simülasyon gerçekleştirildi ve simüle edilmiş kompleksler, ligandlar ve proteinler arasındaki bağlanma stabilitesini onayladı. Bu şekilde bulunan en iyi (hit) moleküllerin seçicilik potansiyelleri sadece doking metotlarıyla değil ayrıca daha detaylı bir şekilde MD simülasyonlarıyla da incelenmiştir.

Dördüncü adımda MM/PBSA yöntemi ile bağlanma enerjileri incelendi.

Beşinci adımda çalışmamızda bileşiklerin ilaç benzerliği ve *in silico* ADMET özellikleri ADMETlab programı kullanılarak tahmin edilmiştir.

Bu çalışmada, 14 bitki içerisinde bulunan 50 fitokimyasalın hesapsal aktivitesi beş antitrombosit hedef yapı ile ilk kez çalışılmıştır. Bu yönü ile CVDs üzerine alanında yapılmış ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

Çalışmamızın adımları detaylı bir şekilde analiz edilip özetlenecek olursak

A. Validasyon çalışmasında;

Auto Dock Vina programının doğruluğu, hesapsal olarak bulunan aktif bölge aminoasitleri ile X-Ray yapısında bulunan aktif bölge aminoasitlerinin uyuşması ile kanıtlanmıştır. RMSD değerleri; COX-1(PDB:3N8X), P2Y12(PDB:4NTJ), PDE3(PDB:1SO2) ve PAR-1(PDB: 3VW7) enzimleri için sırasıyla 1.103, 0.583, 0.529 ve 0.279 Å bulunmuştur.

B. Doking Çalışmasında;

Hesaplama sonuçlarına her hedef için en iyi bağlanma özelliği gösteren fitokimyasallara sahip fitokimyasallar; graveolinin, sanguinarin, rutin, ve BDMC bileşikler olarak bulunmuştur.

COX-1 enzimine en iyi bağlanma özelliği gösteren bileşiğin sedefotu bitkisinde bulunan ve kinolin türevi olan **graveolinin** bileşiği olduğu (Ki= 0.49 µM) görülmüştür.

P2Y12 reseptörüne en iyi bağlanma özelliği gösteren bileşiğin kan kökü bitkisinde bulunan ve alkaloid türevi olan **sanguinarin** bileşiği olduğu (Ki= 0.01 µM) görülmüştür.

PDE-3 enzimine en iyi bağlanma özelliği gösteren bileşiğin kan kökü bitkisinde bulunan ve alkaloid türevi olan **sanguinarin** bileşiği olduğu (Ki= 0.001 µM) görülmüştür.

GP-VI reseptörüne en iyi bağlanma özelliği gösteren bileşiğin sarı kantaron bitkisinde bulunan ve flavonol türevi olan **rutin** bileşiği olduğu (Ki= 4.45 µM) görülmüştür.

PAR-1 enzimine en iyi bağlanma özelliği gösteren bileşiğin zerdeçal bitkisinde bulunan ve flavonol türevi olan rutin bileşiği olduğu (Ki= 0.001 µM) görülmüştür.

C. Dinamik simülasyon çalışmasında

Doking simülasyonları sonucu her hedefe karşı en iyi bağlanma enerjisine sahip bileşikler (COX-1'e karşı **graveolinin**, P2Y12 ve PDE-3'e karşı **sanguinarin**,

kolajen'e karşı **rutin** ve PAR-1'e karşı **bisdemetoksikurkumin**) daha detaylı analiz için dinamik simülasyon çalışmalarına tabii tutulmuştur.

Her bir hedef için simülasyonlar 100 ns'lik üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Simülasyonların tamamlanmasının ardından, Komplekslerin stabilitesi, etkileşim gücünü, yapısal ve dinamik özellikleri kontrol etmek amacıyla konformasyonel kararlılığın önemli göstergeleri olan RMSD, RMSF, ve mesafe analizi parametreleri kullanılarak incelenmiştir.

Sonuç olarak, tüm komplekslerde dinamik simülasyon boyunca kararlı olduğu ve ligand moleküllerinin bağlanma bölgesinde stabil kaldığını göstermektedir.

D. MM-PBSA Bağlanma serbest enerjisi

Systemlerin kararlılığını kontrol etmek için serbest enerji değerleri MM-PBSA yaklaşımına dayalı hesaplanmış ve yapılarındaki aminoasitlerin bağlanma enerjilerine olan katkıları incelenmiştir.

Ayrıca bağlanmada yer alan önemli aminoasitleri belirlemek ve her bir aminoasidin etkileşim modu hakkında daha fazla ayrıntı sağlamak için bağlanma enerjisinin dekompozisyonu yapılmıştır

E. Fitokimyasalların ADMET Özelliklerin Hesaplanmasında

Çalışmamızın son aşamasında ligandların farmakolojik özellikleri ve ADMET profilleri hesaplanmıştır.

Bileşiklerin farmakokinetik özellikleri SwissAME web sitesi üzerinden elde edilmiştir. Gravalinin, sanguinarin ve BDMC bileşiklerinde hiçbir sapma gözlenme Lipinski'nin beşer kuralına uymaktadırlar. Rutin bileşiğinde 500'den fazla molekül ağırlığı, 5'ten fazla hidrojen bağı donörü, ve 10'dan fazla hidrojen bağı alıcısının olması nedeni ile lipinski kuralından sapma gösterip oral ilaç adayı olamdığı belirlenmiştir.

Bileşiklerin ADMET özellikleri ise ADMETlab web sitesi üzerinden incelenmiştir.

Graveolinin bileşigi için ADMET özellikleri açısından değerlendirilme yapıldığında Caco-2 geçirgenlik kabiliyeti gösterdiği ve P-gp substratı olamığı nitelendirilmiştir. Bu ligand HIA açısından yüksek özellik göstermiştir. Ayrıca PBB kabiliyeti 84.149 % olup BBB geçebilmektedir. Graveolin, CYP izoformlarının hepsinin inhibisyonunu da sağladığı ve 1.754 saatlik bir yarılanma ömrü ile vücuttan atıldığı görülmektedir. Bu ligand DILI özelliği de göstermiştir. HERG kanalını inhibe ettiği ve H-HT özelliği olmadığı nitelendirilmiştir.

Sanguinarin molekülü Caco-2 geçirgenliği olup P-gp substratı özelliğini göstermemektedir. Bu ligand yüksek HIA kabiliyeti göstermiştir. Ayrıca PBB özelliği 75.758 % olup BBB geçebilmektedir. Sanguinarin, CYP450 2C9 hariç, CYP izoformlarının hepsinin inhibisyonunu sağladığı ve 2.166 saatlik bir yarılanma ömrü ile vücuttan atıldığı görülmektedir. HERG kanalını inhibe ettiği ve H-HT özelliğinin olmadığı nitelendirilmiştir. Bu ligand DILI özelliği görülmektedir.

Rutin bileşiginin Caco-2 geçirgenlik özelliğinin olmadığı ve P-gp substratı kabiliyeti gösterdiği nitelendirilmiştir. Bu ligand HIA açısından düşük özellik göstermiştir. Ayrıca PBB kabiliyeti 76.002 % olup BBB geçememektedir. Bunun için rutin bileşigine daha detaylı analize ihtiyaç duyulur başka bir deyişle BBB geçmeden beyin etkilenmesi, bize bu ligandın vücuda alındıktan sonra oluşan metabolitlerinin BBB geçerek beyin fonksiyonlarını etkileyebileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan, kullanılan tahmin yönteminin hata payı da göz önüne alınmalı ve bu sonuçlar başka bulgularla desteklenmeden kesin doğru olarak değerlendirilmemelidir. Rutin, CYP izoformlarının hiçbirini için inhibisyon sağlamadığı ve 2.128 saatlik bir yarılanma ömrü ile vücuttan atıldığı görülmektedir. Bu ligand DILI özelliği gösterip HERG kanalını inhibe ettiği görülmektedir. H-HT özelliği bulunmamıştır.

BDMC bileşigi için ADMET özellikleri açısından değerlendirilme yapıldığında Caco-2 geçirgenlik kabiliyeti gösterdiği ve P-gp substratı olmadığı nitelendirilmiştir. Bu ligand HIA açısından yüksek özellik göstermiştir. Ayrıca PBB kabiliyeti 87.603 % olup BBB geçmektedir. BDMC, CYP450 2C9 ve CYP450 2C19 hariç CYP izoformlarının hepsi için inhibisyon sağladığı ve 1.186 saatlik bir yarılanma ömrü ile vücuttan atıldığı görülmektedir. Bu ligand DILI

özelliği gösterip HERG kanalını inhibe ettiği görölmektedir. H-HT özelliği bulunmamıştır.

Tez kapsamında moleküler doking ve dinamik simölasyon yöntemleri ile beş antitrombosit hedef için 50 fitokimyasalın bağlanma modları ve bağlanma enerjileri incelenmiş, daha sonra graveolinin, sanguinarin, rutin, ve BDMC antitrombosit ilaç hedefleri olan COX-1, P2Y12, PDE-3, ve PAR-1 enzimlerin aktif bölgesinde kuvvetli bağlanma etkileşimleri yaptıkları görölmüştür.

Bu fitokimyasalların potansiyel iyi birer trombosit inhibitörü oldukları in siliko olarak tahmin edilmiştir ve hesaplama sonuçları CVDs tedavi ve önlenmesi için ilaç geliştirme süreçlerine önemli katkıda bulunabilir. İncelenen bu bileşiklerin in vivo ve in vitro çalışmalarının ileriki zamanda yapılması planlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. González-Alonso, J. Human thermoregulation and the cardiovascular system. *Exp Physiol.* 97(340–346), **2012**.
2. Chen Z., Venkat P. Brain–Heart Interaction Cardiac Complications After Stroke. *Circ Res.* 121(451-468), **2017**.
3. Samuels MA. The brain-heart connection. *Circulation.* 2007;116:77–84.
4. Ruan Y., Guo Y., Zheng Y., Huang Z., Sun S., Kowal P., Shi Y., Wu F. Cardiovascular disease (CVD) and associated risk factors among older adults in six low-and middle-income countries: Results from SAGE Wave 1. *BMC Public Health.* 18(1–13), **2018**.
5. World Health Organization. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. **2011**.
6. Benjamin, E.J., Virani, S.S., Callaway, C.W., Chamberlain, A.M., Chang, A.R., Cheng, S., Chiuve, S.E., Cushman, M., Delling, F.N., Doe, R.De., Ferranti, S.D., Ferguson, J.F., Fornage, M., Gillespie, G., Isasi, C.R., Jiménez, M.C., Jordan, L.C., Judd, S.E., Lackland, D., Lichtman, J.H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C.T., Lutsey, P.L., Mackey, J.S., Matchar, D.B., Matsushita, K., Mussolino, M.E., Nasir, K., O'Flaherty, M., Palaniappan, L. P., Pandey, A., Pandey, D. K., Reeves, M. J., Ritchey, M. D., Rodriguez, C. J., Roth, G. A., Rosamond, W. D., Sampson, U. A., Satou, G. M., Shah, S. H., Spartano, N. L., Tirschwell, D. L., Tsao, C. W., Voeks, J. H., Willey, J. Z., Wilkins, J. T., Wu, J. Y., Alger, H. M., Wong, S.S., Muntner, P. Heart disease and stroke statistics. 2018 update: a report from the American Heart Association., 137 (12), E67–E492, **2018**.
7. World Health Organization (WHO). Fact sheet: Cardiovascular diseases (CVDs). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>, March **2013**.
8. Demirsoy, N. Epidemiology of cardiovascular diseases/Kardiyovaskuler hastaliklarin epidemiyolojisi. Turkish Journal of Physical Medicine and Rehabilitation. 4-10, **2010**.

9. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). Ölüm edeni istatistikleri. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-Nedeni-Istatistikleri>. 30626, **2018**.
10. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). Ölüm Nedeni İstatistikleri. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri>. 33710, **2019**.
11. Ueno, M., Kodali, M., Tello-Montoliu, A., Angiolillo, D.J. Role of platelets and antiplatelet therapy in cardiovascular disease. *J Atheroscler Thromb.* 18(6), 431-442, **2011**.
12. Nieswandt, B., Pleines, I., Bender, M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost.* 9(92–104), **2011**.
13. Willoughby, S., Holmes, A., Loscalzo, J. Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs.* 1(4), 273–288, **2002**.
14. Kraft P., De Meyer S.F., Kleinschnitz C. Next-generation antithrombotics in ischemic stroke: Preclinical perspective on “bleeding-free antithrombosis”. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32(10),1831–1840, **2012**.
15. Massberg, S., Brand, K., Gruner, S., Page, S., Muller, E., Muller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., Konrad, I., Nieswandt, B., Gawaz, M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med,* 196: 887–96, **2002**.
16. Hou, Y., Carrim, N., Wang, Y., Gallant, RC., Marshall, A., Ni, H. Platelets in hemostasis and thrombosis: novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis *J. Biomed. Res.* 29 (437-444), **2015**.
17. Jennings, L.K. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thrombosis and Haemostasis.* 102 (2): 248–257, **2009**.
18. Jackson, S.P., Nesbitt, W.S., Westein, E. Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 7. 17–20, **2009**.
19. Antoniak, S. The coagulation system in host defense. *Res Pract Thromb Haemost.* 2(3):549-557, **2018**.

20. Johnson, B.S., Mardirossian, G. Pharmacology and Therapeutics for Dentistry (4th ed.). *Mosby, St Louis*, (420- 436), **1998**.
21. Smith, S.A., Travers, R.J., Morrissey, J.H. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 50:326-336, **2015**.
22. Stroo, I., Ding, C., Novak, A., Yang, J., Roelofs, J.J., Meijers, J.C.M., Revenko, A.S., van 't Veer, C., Zeerleder, S., Crosby, J.R., van der Poll, T. Inhibition of the extrinsic or intrinsic coagulation pathway during pneumonia-derived sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 315: 799-809, **2018**.
23. Adams, R.L., Bird, R.J. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology (Carlton)*.14:462–70, **2009**.
24. G. Duygu, Minör Oral Cerrahi İşlemlerde Antitrombosit İlaçların Kanama Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi, Master Tezi, Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2007**.
25. Abdullah, N.M., Kachman, M., Walker, A., Hawley, A.E., Wroblewski, S.K., Myers, D.D., Strahler, J.R., Andrews, P.C., Michailidis, G.C., Ramacciotti, E., Henke, P.K., Wakefield, T.W. Microparticle surface protein are associated with experimental venous thrombosis: a preliminary study. *Clin Appl Thromb Hemost*. 15:201–208, **2009**.
26. Andrews, R.K., Gardiner, E.E. Basic mechanisms of platelet receptor shedding. *Platelets*. 28(4):319-324, 2017.
27. Majithia, A., Bhatt, D.L. Novel Antiplatelet Therapies for Atherothrombotic Diseases, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 39(4), 546- 557, **2019**.
28. Pulcinelli, FM., Rioldino, S., Celestini, A., Pignatelli, P., Trifiro, E., Di Renzo, L., Violi, F. Persistent production of platelet thromboxane A2 in patients chronically treated with aspirin. *J Thromb Haemost*. 3:2784–2789, **2005**.
29. Patrono, C., Garcia Rodriguez, L.A., Landolfi, R., Baigent, C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N. Engl. J. Med*. 353(22), 2373-2383, **2005**.

30. Vanwormer, J.J., Greenlee, R.T., McBride, P.E., Peppard, P.E., Malecki, K.C., Che, J., Nieto F.J. Aspirin for primary prevention of CVD: are the right people using it?. *J Fam Pract.* 61(9), 525-533, **2012**.
31. Ames, P.R., Batuca, J.R., Muncy, I.J., De La Torre, I.G., Pascoe-Gonzales, S., Guyer, K., Matsuura, E., Lopez, L.R. Aspirin insensitive thromboxane generation is associated with oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res.* 130:350–354, **2012**.
32. Cattaneo, M. The platelet P2Y receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood.* 117(7), 2102-2112, **2011**.
33. Cattaneo, M., Lecchi, A. Inhibition of the platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate potentiates the antiplatelet effect of prostacyclin. *J Thromb Haemost.* 5(3), 577–582, **2007**.
34. Baqi, Y., Müller, C.E. Antithrombotic P2Y12 receptor antagonists: Recent developments in drug discovery. *Drug Discov.Today.* 24(1), 325-333, **2019**.
35. Schulze, A., Hartung, P., Schaefer, M., Hill, K. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel activation by the thienopyridine-type drugs ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel. *Cell Calcium.* 55(4), 200-207, **2014**.
36. Furman, M.I., Frelinger, A.L.III., Michelson, A.D. GPIIb/IIIa inhibitor-induced dethrombosis. *J Thromb Thrombolysis.* 18(1):11–17, **2004**.
37. Armstrong, P.C., Peter, K. GPIIb/IIIa inhibitors: From bench to bedside and back to bench again. *Thromb Haemost.* 107(5), 808-814, **2012**.
38. Gurm, H.S., Tamhane, U., Meier, P., Grossman, P.M., Chetcuti, S., Bates, E.R. A comparison of abciximab and small-molecule glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a meta-analysis of contemporary randomized controlled trials. *Circ Cardiovasc Interv.* 2(3):230–236, **2009**.
39. Soderling, S.H., Beavo, J.A. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol.* 12(2), 174-179, **2000**.
40. Rondina, M.T., Weyrich, A.S. Targeting phosphodiesterases in antiplatelet therapy. *Handb Exp Pharmacol.* 210, 225-238, **2012**.

41. Sacco, R.L., Diener, H.C., Yusuf, S., Cotton, D., Ounpuu, S., Lawton, W.A., Palesch, Y., Martin, R.H., Albers, G.W., Bath, P., Bornstein, N., Chan, B.P., Chen, S.T., Cunha, L., Dahlöf, B., De Keyser, J., Donnan, G.A., Estol, C., Gorelick, P., Gu, V., Hermansson, K., Hilbrich, L., Kaste, M., Lu, C., Machnig, T., Pais, P., Roberts, R., Skvortsova, V., Teal, P., Toni, D., Vandermaelen, C., Voigt, T., Weber, M., Yoon, B.W. PROFESS Study Group. Aspirin and extended-release dipyridamole versus clopidogrel for recurrent stroke. *N Engl J Med.* 18;359(12):1238-51, **2008**.
42. Cho, J.R., Rollini, F., Franchi, F., Ferrante, E., Angiolillo, D.J. Unmet needs in the management of acute myocardial infarction: role of novel protease-activated receptor-1 antagonist vorapaxar. *Vasc Health Risk Manag.* 10, 177-188, **2014**.
43. Capodanno, D., Bhatt, D.L., Goto, S., Donoghue, M.L., Moliterno, D.J., Tamburino, C., Angiolillo, D.J. Safety and efficacy of proteaseactivated receptor-1 antagonists in patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Thromb Haemost.* 10(10), 2006-2015, **2012**.
44. Franchi, F.; Rollini, F.; Park, Y.; Angiolillo, D.J. Platelet thrombin receptor antagonism with vorapaxar: pharmacology and clinical trial development. *Future Cardiol.* 11(5), 547–564, **2015**.
45. Dar, R.A., Shahnawaz, M., Rasool, S., Qazi, P.H. Natural Product Medicines: A Literature Update . *J Phytopharmacology.* 6 (6), 340-342, **2017**.
46. Hall, R., Mazer, D. Antiplatelet drugs: A review of their pharmacology and management in the perioperative period. *Anesth Analg.* 112(2), 292-318, **2011**.
47. Niu, L., Hou, Y., Jiang, M., Bai, G. The rich pharmacological activities of *Magnolia officinalis* and secondary effects based on significant intestinal contributions. *J Ethnopharmacol.* 2281:114524, **2021**.
48. Fujita, M., Itokawa, H., Sashida Y. Studies on the components of *Magnolia obovata* Thunb. I. On the components of the essential oil of the bark. *Yakugaku Zasshi*, 93: 415–421, **1973**.

49. Lee, Y.J., Lee, Y.M., Lee, C.K., Jung, J.K., Han, S.B., Hong, J.T. Therapeutic applications of compounds in the Magnolia family. *Pharmacol Ther.* 130:157–76, **2011**.
50. Pyo, M.K., Lee, Y., Sook, H., Choi, Y. Anti-Platelet Effect of the Constituents Isolated from the Barks and Fruits of Magnolia obovata. *Arch Pharm Res.* 25(3), 325-328, **2002**.
51. Park, E.S., Lim, Y., Lee, S.H., Kwon, B.M., Yoo, H.S., Hong, J.T., Yun, Y.P. Antiplatelet activity of obovatol, a biphenolic component of Magnolia Obovata, in rat arterial thrombosis and rabbit platelet aggregation. *J Atheroscler Thromb.* 18(8):659-69, **2011**.
52. De Feo, V., De Simone, F., Senatore, F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry.* 61:573–578. **2002**.
53. Wu, T.S., Shi, L.S., Wang, J.J., Lou, S.C., Chang, H.C., Chen, Y.P., Kuo, Y.H., Chang, Y.L., Tenge, C.M. Cytotoxic and antiplatelet aggregation principles of *Ruta graveolens*. *J. Chin. Chem. Soc.* 50, 171–178, **2003**.
54. Huang CG, Chu ZL, Yang ZM. The progress in pharmacological researches on berberine. *Commun Inform Pharm.* 9(4):10 – 2, **1991**.
55. Huang, C.G., Chu, Z. L., Wei, S.J., Jiang, H., Jiao, B. H. Effect of berberine on arachidonic acid metabolism in rabbit platelets and endothelial cells, *Thromb Res.*, 106(4-5), 223-227, **2002**.
56. Uebelhack, R., Franke, L. In vitro effects of St. John's wort extract and hyperforin on 5 HT uptake and efflux in human blood platelets. *Pharmacopsychiatry.* 34, 146-7, **2001**.
57. Chung, M.I., Weng, J.R., Wang, J.P., Teng, C.M., Lin, C.N. Antiplatelet and anti-inflammatory constituents and new oxygenated xanthenes from *Hypericum geminiflorum*. *Planta Med.* 68(1), 25-29, **2002**.
58. Butterweck, V., Schmidt, M. St. John's wort: Role of active compounds for its mechanism of action and efficacy. *Wien Med Wochenschrift.* 157 (13-14), 356-361, **2007**.
59. Croaker A., King G.J., Pyne J.H., Anoopkumar-Dukie S., Liu L. *Sanguinaria canadensis*: Traditional medicine, phytochemical composition, biological activities and current uses. *Int. J. Mol. Sci.* 17:1414, **2016**.

60. Jeng, J.H., Wu, H.L., Lin, B.R., Lan, W.H., Chang, H. H., Ho, Y.S., Lee, P.H., Wang, Y.J., Wang, J.S., Chen, Y.J., Chang, M.C. Antiplatelet effect of sanguinarine is correlated to calcium mobilization, thromboxane and camp production. *Atherosclerosis.*, 191(2), 250–258, **2007**.
61. Sharifi-Rad, J., Rayess, Y. E., Rizk, A. A., Sadaka, C., Zgheib, R., Zam, W., Sestito, S., Rapposelli, S., Neffe-Skocińska, K., Zielińska, D., Salehi, B., Setzer, W. N., Dosoky, N. S., Taheri, Y., El Beyrouthy, M., Martorell, M., Ostrander, E. A., Suleria, H., Cho, W. C., Maroyi, A., Martins, N. Turmeric and Its Major Compound Curcumin on Health: Bioactive Effects and Safety Profiles for Food, Pharmaceutical, Biotechnological and Medicinal Applications. *Frontiers in pharmacology*, 11, 01021, 2020.
62. Maheswarajah, N., Rao , L. J., Naidu, K.A. Anti-platelet activity of water dispersible curcuminoids in rat platelets. *Phytother Res.* 29(3), 450-458, **2015**.
63. Prakash, P., Misra, A., Surin, W.R., Jain, M., Bhatta, R.S., Pal, R., Raj, K., Barthwal, M.K., Dikshit, M. Anti-platelet effects of Curcuma oil in experimental models of myocardial ischemiareperfusion and thrombosis. *Thrombosis Res.* 127(2), 111-118, **2011**.
64. Shah, B.H.; Nawaz, Z.; Virani, S.S.; Ali, I.Q.; Saeed , S.A.; Gilani, A. H. The inhibitory effect of cinchonine on human platelet aggregation due to blockade of calcium influx. *Biochem Pharmacol.* 56(8), 955-960, **1998**.
65. Jung, S.A., Choi, M., Kim, S., Yu, R., Park, T. Cinchonine Prevents High-Fat-Diet-Induced Obesity through Downregulation of Adipogenesis and Adipose Inflammation. *PPAR Res.* 2012, 541204, **2012**.
66. Szliszka, E., Sokół-Łętowska, A., Kucharska, A.Z., Jaworska, D., Czuba, Z.P., Król, W. Ethanolic Extract of Polish Propolis: Chemical Composition and TRAIL-R2 Death Receptor Targeting Apoptotic Activity against Prostate Cancer Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013:757628, **2013**.
67. Gonçalves, C.C., Hernandez, L., Bersani-Amado, C.A., Franco, S.L., Silva, J.F., Natali, M.R. "Use of propolis hydroalcoholic extract to treat colitis experimentally induced in rats by 2, 4, 6- trinitrobenzenesulfonic acid. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2013. 1-13, **2013**.

68. Zhang, Y.X., Yang, T.T., Xia, L., Zhang, W.F., Wang, J.F., Wu, Y.P. Inhibitory Effect of Propolis on Platelet Aggregation In Vitro. *J Healthc Eng.* 2017, 3050895, **2017**.
69. Liu, G., Xie, W., He, A.D., Da, X.W., Liang, M.L., Yao, G.Q., Xiang, J.Z., Gao, C.J., Ming, Z.Y. Antiplatelet activity of chrysin via inhibiting platelet $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -mediated signaling pathway. *Mol Nutr Food Res.* 60(90), 1984-1993, **2016**.
70. Zhang, Y., Zhang, H., Chu, X., Wang, X., Qiu, M., Xu, Z., Zhao, A., Jia, W. Protective effect of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi on cerebral ischemia injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 355-360, **2006**.
71. Lee, W.; Ku, A.K.; Bae, J.S. Antiplatelet, anticoagulant, and profibrinolytic activities of baicalin. *Arch. Pharm. Res.* 38(5), 893-903, **2015**.
72. Ku, S.K., Bae, J.S. Antithrombotic activities of wogonin and wogonoside via inhibiting platelet aggregation. *Fitoterapia.* 2014(98), 27-35, **2014**.
73. Tan, H., Thomas-ahner, J.M., Grainger, E.M., Wan, L., Francis, D.M., Schwartz, S.J., Clinton, S.K. Tomato-based food products for prostate cancer prevention: what have we learned?. *Cancer Metastasis Rev.* 29(3):553–568, **2010**.
74. Fuentes, E., Carle, R., Astudillo, L., Guzmán, L., Gutiérrez, M., Carrasco, G., Palomo, I. Antioxidant and Antiplatelet Activities in Extracts from Green and Fully Ripe Tomato Fruits (*Solanum lycopersicum*) and Pomace from Industrial Tomato Processing. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2013, 1-9, 2013.
75. Fuentes, E., Forero-Doria, O., Carrasco, G., Marican, A., Santos, L.S., Alarcon, M., Palomo I. Effect of tomato industrial processing on phenolic profile and antiplatelet activity. *Molecules.* 18(9), 11526-11536, 2013.
76. Moloudizargari, M., Mikaili, P., Aghajanshakeri, S., Asghari, M. H., & Shayegh, J. Pharmacological and therapeutic effects of *Peganum harmala* and its main alkaloids. *Pharmacognosy reviews*, 7(14), 199–212, 2013.
77. Im, J.H., Jin, Y.R., Lee, J.J., Yu, J.Y., Han, X.H., Im, S.H., Hong, J.T., Yoo, H.S., Pyo M.Y., Yun, Y.P. Antiplatelet activity of beta-carboline alkaloids from *Peganum harmala*: A possible mechanism through

- inhibiting PLC γ 2 phosphorylation. *Vascul Pharmacol*, 50, 147–152, 2009.
78. Lee, J.J., Jin, Y.R., Lim, Y., Hong, J.T., Kim, T.J., Chung, J.H., Yun, Y.P. Antiplatelet activity of carnosol is mediated by the inhibition of Txa2 receptor and cytosolic calcium mobilization. *Vascul. Pharmacol.* 45(3), 148-153, 2006.
79. Miraj, S. An evidence-based review on herbal remedies of *Rosmarinus officinalis*. *Der Pharmacia Lettre.* 8 (19), 426-436, 2016.
80. Wu, T.S., Wang, M.L., Wu, P.L. Seasonal variations of carbazole alkaloids in *Murraya euchrestifolia*. *Phytochemistry*, 43, 785–789, 1996.
81. Ko, F.N., Lee, Y.S., Wu, T.S., Teng, C.M. Inhibition of cyclooxygenase activity and increase in platelet cyclic AMP by girinimbine, isolated from *Murraya euchrestifolia*. *Biochemical Pharmacology.* 48(2) , 353-360, 1994.
82. Yu, S.M., Chen, C.C., Ko, F.N., Huang, Y.L., Huang, T.F., Teng, C.M. Dicentrine, a novel antiplatelet agent inhibiting thromboxane formation and increasing the cyclic AMP level of rabbit platelets. *Biochemical Pharmacology.* 43(2), 323-329, 1992.
83. OuYang, Ss., Lu, Jy., Kong, Xq. Liang, Z.J., Luo, C., Jiang, H. Computational drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 33, 1131–1140, 2012.
84. Cavasotto, C.N., Phatak, S.S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discov. Today.* 14(13-14), 676-683, 2009.
85. Krieger, E., Nabuurs, S.B., Vriend, G. Homology modeling. *Methods Biochem. Anal.* 44, 509-523, 2003.
86. Rudnitskaya, A., Török, B., Török, M. Molecular docking of enzyme inhibitors: A computational tool for structure-based drug design. *Biochem Mol Biol Educ.* 38(4): 261-265, 2010.
87. <http://autodock.scripps.edu/faqs-help/faq/how-autodock-4-converts-bindingenergy-kcal-mol-into-ki> (2015).
88. Șterbuleac, D. [Molecular dynamics: a powerful tool for studying the medicinal chemistry of ion channel modulators](#). *RSC Med Chem.* 12(9):1503-1518, 2021.

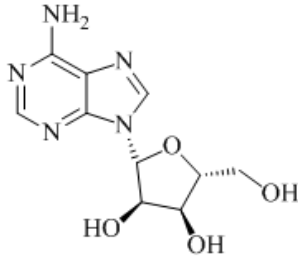
89. Ferenkel, D., Smith B., Ratner, M.A. Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications. *Phys. Today*. 50, 66, 1997.
90. Gunsteren, W. F. and Berendsen, H. J. C., Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications and perspectives in chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29, 992- 1023, 1990.
91. Guvench, O., MacKerell, A.D.Jr. Comparison of Protein Force Fields for Molecular Dynamics Simulations. *Methods in Molecular Biology*, 443(1), 63-88, 2008.
92. Dodson, G.G., Lane, D.P., Verma, C.S. Molecular simulations of protein dynamics: New windows on mechanisms in biology. *EMBO Rep.* 9(2), 144–150, 2008.
93. Hamelberg, D., Mongan, J., McCammon, J.A. Accelerated molecular dynamics: a promising and efficient simulation method for biomolecules. *J Chem Phys.* 120(24):11919-29, 2004.
94. Dong, J., Wang, N.N., Liu, K.Y., Zhu, M.F., Yun, Y.H., Zeng, W.B., Chen, A.F., Cao, D.S. ChemBCPP: a freely available web server for calculating commonly used physicochemical properties. *Chemometr Intell Lab Syst* 171:65–73, 2017.
95. Xiong, G., Wu, Z., Yi, J., Fu, L., Yang, Z., Hsieh, C., Yin, M., Zeng, X., Wu, C., Lu, A., Chen, X., Hou, T., & Cao, D. (2021). ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic acids research*, 49(W1), W5–W14, 2021.
96. Sterling, T., Irwin, J.J., ZINC 15 - Ligand Discovery for Everyone, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55, 2324-2337, 2015.
97. Irwin, J.J., Shoichet, B.K. ZINC--A free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling.* 45 (1), 177-182, 2005.
98. Yang, Z., Lasker, K., Schneidman-Duhovny, D., Webb, B., Huang, C.C., Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Meng E.C., Sali, A., Ferrin, T.E., UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: An integrated modeling system, *Journal of Structural Biology* 179 (3), 269–278, 2012.
99. Trott, O., & Olson, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization,

- and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455–461, 2010.
100. Bursulaya, B. D., Totrov, M., Abagyan, R., Brooks, C. L. Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking. *Journal of computer-aided molecular design*, 17(11), 755–763, 2003.
 101. Erickson, C.B., Ankenman, B.E., Sanchez, S.M. Data from fitting Gaussian process models to various data sets using eight Gaussian process software packages. *Data Brief*. 18:684-687, 2017.
 102. Morris, G. M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791, 2009.
 103. Laskowski, R.A., Swindells, M.B. LigPlot+: Multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery. *J. Chem. Inf. Model.* 51, 2778–2786, 2011.
 104. Salomon-Ferrer R., Case, D.A., Walker, R.C. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci.* 3: 198–210, 2013.
 105. Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25, 2015.
 106. Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M.R., Smith, J.C, Kasson, P.M. van der Spoel D, Hess B, Lindahl E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics.* 29(7):845-54, 2013.
 107. Kumari, R., Kumar, R. Open Source Drug Discovery Consortium, Lynn A. g_mmpbsa--a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J Chem Inf Model.* 54(7):1951-62, 2014.
 108. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic acids research*, 31(13), 3381–3385, 2003.

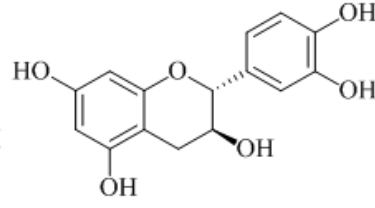
109. Dong, J., Wang, N.N., Yao, Z.J., Zhang, L., Cheng, Y., Ouyang, D., Lu, A.P. Cao, D.S. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. *J Cheminform.* 10, 29, 2018.
110. Daina, A., Michielin, O. & Zoete, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep.* 7, 42717, 2017.
111. Sidhu, R. S.; Lee, J.Y.; Yuan, C.; Smith, W. Comparison of cyclooxygenase-1 crystal structures: Cross-talk between monomers comprising cyclooxygenase-1 homodimers. *Biochemistry.* 49(33), 7069-7079, 2010.
112. Zhang, K.; Zhang, J.; Gao, Z.G.; Zhang, D.; Zhu, L.; Han, G.W.; Moss, S.M.; Paoletta, S.; Kiselev, E.; Lu, W.; Fenalti, G.; Zhang, W.; Müller, C.E.; Yang, H.; Jiang, H.; Cherezov, V.; Katritch, V.; Jacobson, K.A.; Stevens, R.C.; Wu, B.; Zhao, Q. Structure of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature.* 509(7498), 115-118, 2014.
113. Scapin, G.; Patel, S.B.; Chung, C.; Varnerin, J.P.; Edmondson, S.D.; Mastracchio, A.; Parmee, E.R.; Singh, S.B.; Becker, J.W.; Van der Ploeg, L.H., Tota, M.R. Crystal structure of human phosphodiesterase 3B: atomic basis for substrate and inhibitor specificity. *Biochemistry,* 43(20), 6091-6100, 2004.
114. Horii, K.; Kahn, M.L.; Herr, A.B. Structural basis for platelet collagen responses by the immune-type receptor glycoprotein VI. *Blood.* 108(3), 936-942, 2006.
115. Zhang, C.; Srinivasan, Y.; Arlow, D.H.; Fung, J.J.; Palmer, D.; Zheng, Y.; Green, H.F.; Pandey, A.; Dror, R.O.; Shaw, D.E.; Weis, W.I.; Coughlin, S.R.; Kobilka, B.K. High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature.* 492(7429), 387-392, 2012.
116. Wang, J., Wang, W., Kollman, P.A., Case, D.A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J Mol Graph Model.* 25(2):247-60, 2006.

117. Sprenger, K.G., Jaeger, V.W., Pfaendtner, J. The general AMBER force field (GAFF) can accurately predict thermodynamic and transport properties of many ionic liquids. *J Phys Chem B*. 119(18):5882-95, 2015.

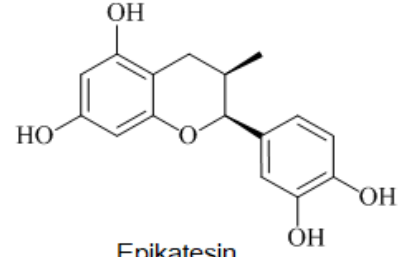
7.EKLER



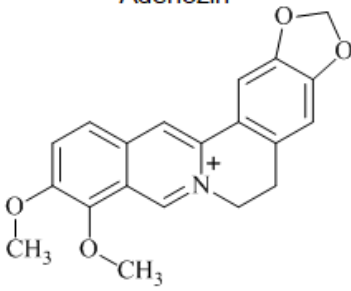
Adenozin



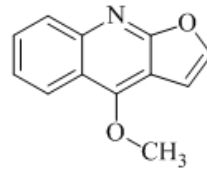
Kateşin



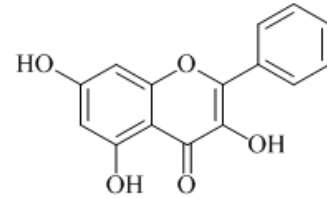
Epikateşin



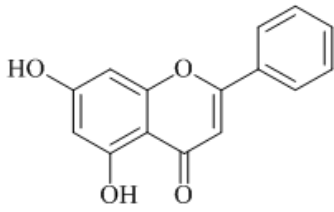
Berberin



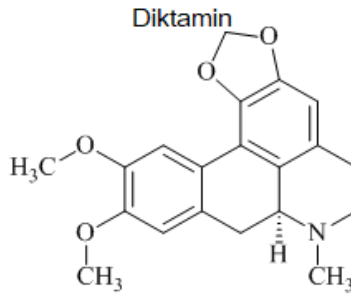
Diktamin



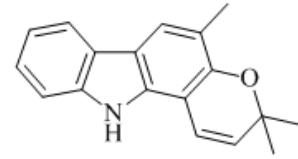
Galangin



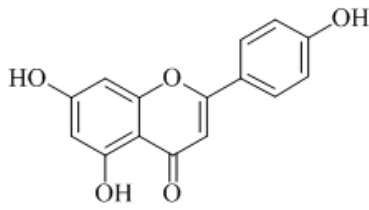
Krisin



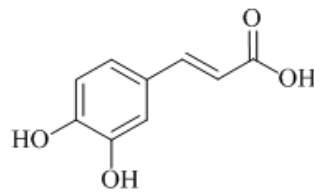
Dikentrin



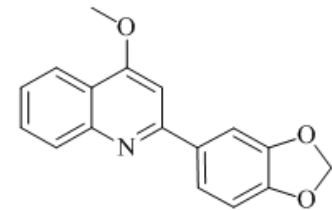
Girinimbin



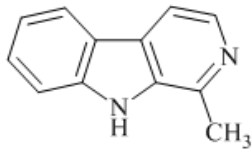
Apigenin



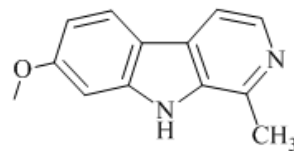
Kafeik asit



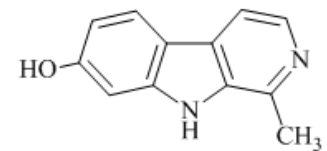
Graveolinin



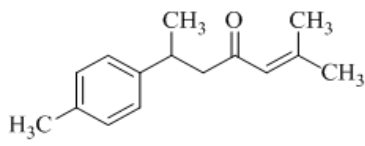
Harman



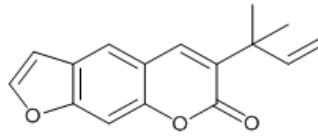
Harmin



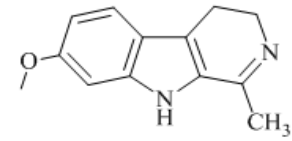
Harmol



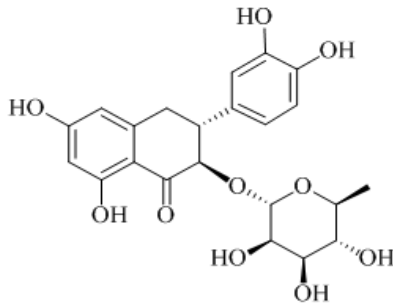
Ar-turmeron



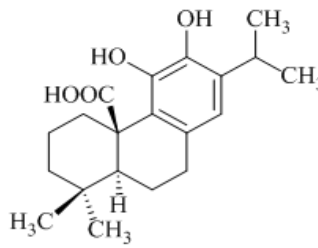
Çalepsin



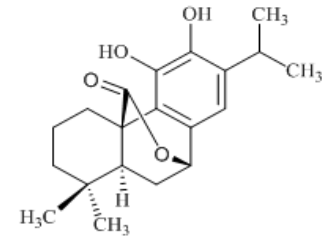
Harmalin



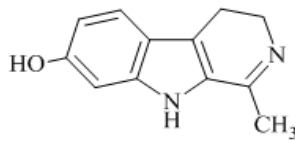
Astilbin



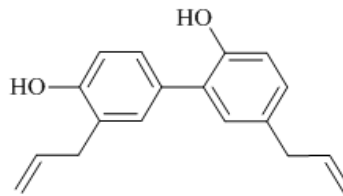
Karnosik asit



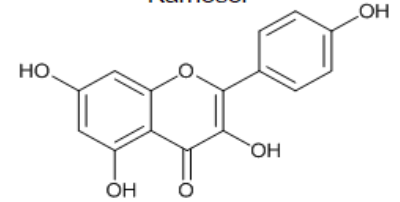
Karnosol



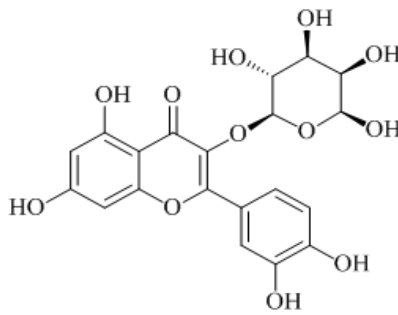
Harmalol



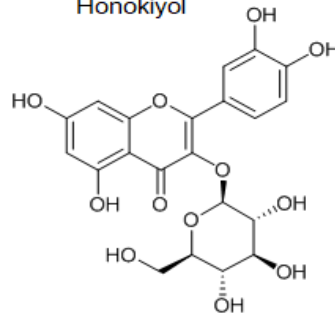
Honokiyol



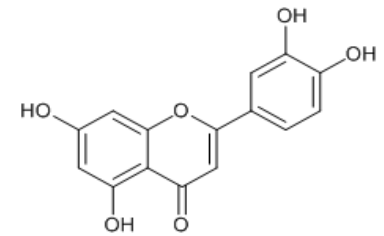
Kaemferol



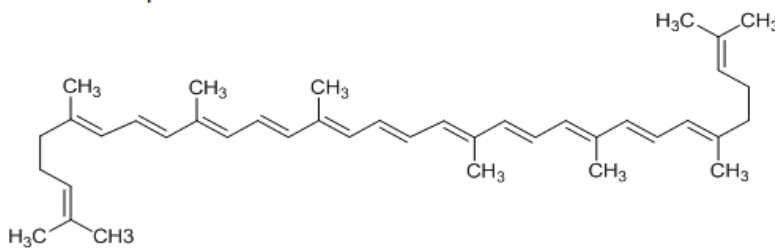
Hiperzoid



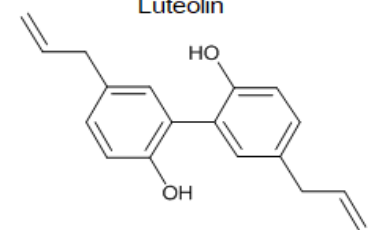
İzokuersetin



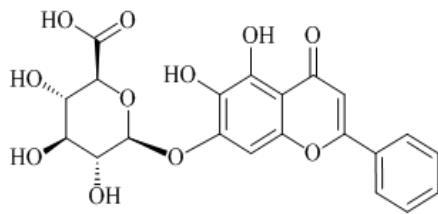
Luteolin



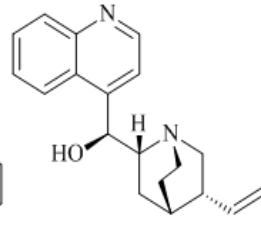
Likopen



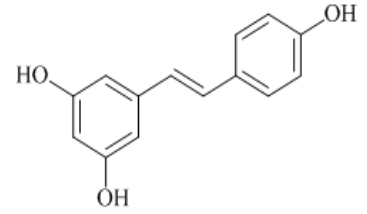
Magnolol



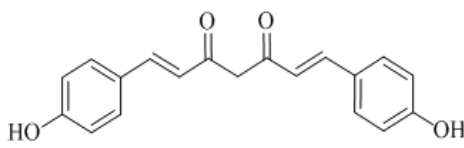
Baisalin



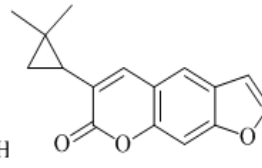
Cinçoyon



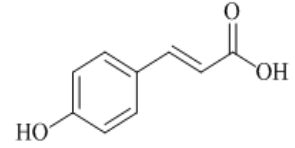
Resveratrol



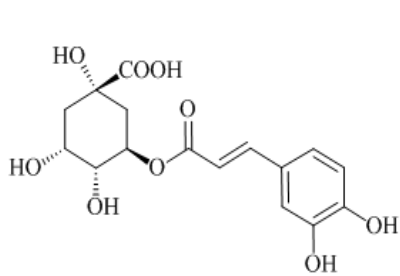
BDMC



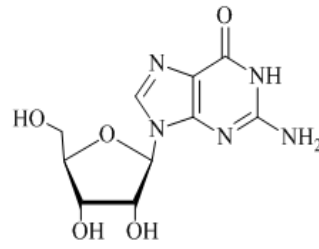
Klavsidin



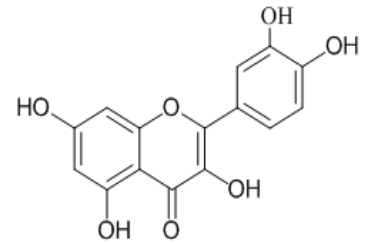
P-kumarik asit



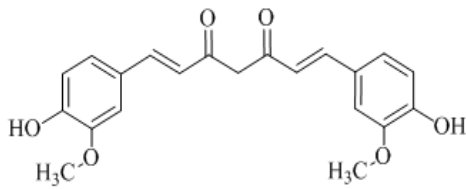
Klorjenik asit



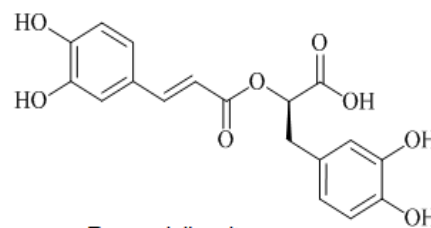
Guanozin



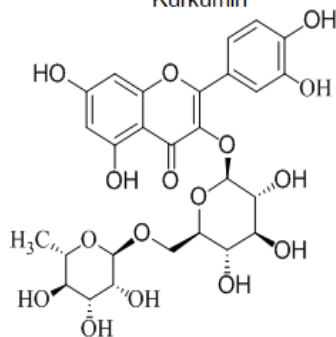
Kuersetin



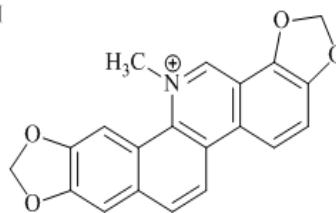
Kurkumin



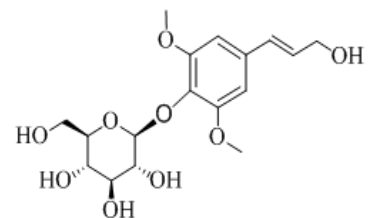
Rosmarinik asit



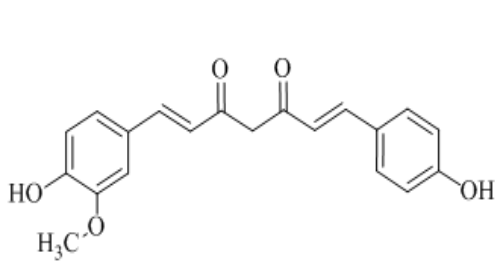
Rutin



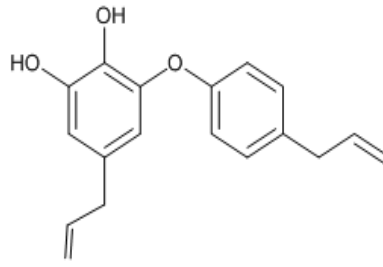
Sanguinarin



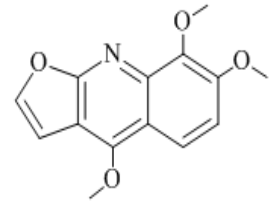
Siringin



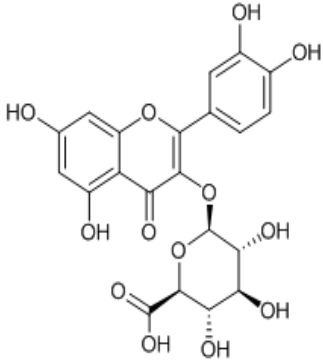
DMC



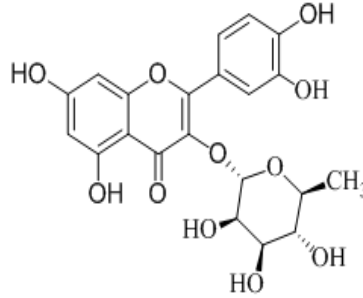
Obovatol



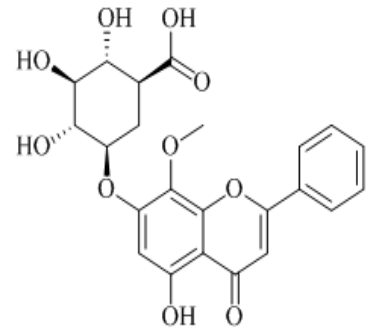
Skimiyanin



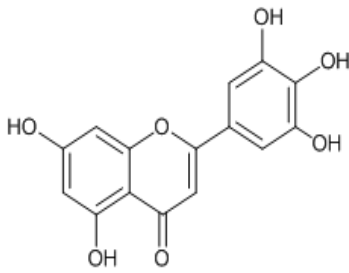
Mikuelin



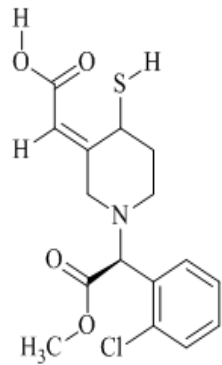
Kuersitrin



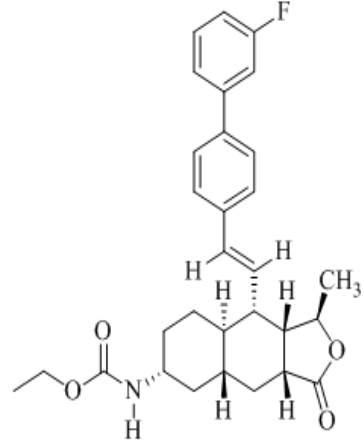
Wogonosid



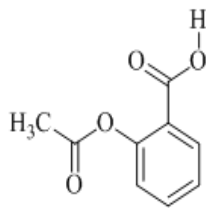
Mirisetin



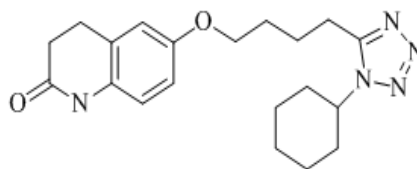
Klopidoğrel



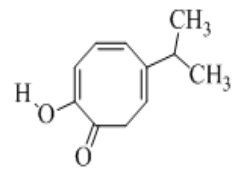
Vorapaksar



Aspirin



Silostazol



Hinokitiyol

EK.1. tezde kullanılan 50 fitokimyasalın kimyasal yapıları

EK 2: Doking Parametre Dosyalar

1. COX-1 Validasyon Dosyası:

receptor=3N8X.pdbqt

ligand=nitro.pdbqt

size_x=22.587

size_y=36.307

size_z=23.005

center_x=-30.969,

center_y=-40.981

center_z= 48.039

out=validation.complex.pdbqt

2. P2Y12 Validasyon Dosyası :

receptor=4NTJ.pdbqt

ligand=Etil.pdbqt

size_x=51.341

size_y=63.493

size_z=59.571

center_x=12.774

center_y=94.320

center_z= 57.350

out=validationcomplex.pdbqt

3. PDE-3 Validasyon Dosyası:

receptor=1SO2.pdbqt

ligand=Benzil.pdbqt

size_x=80.13

size_y=59.21

size_z=53.20

center_x= 40.96

center_y=44.11

center_z= 17.79

out=validationcomplex.pdbqt

4. PAR-1 Validasyon Dosyası :

receptor=3VW7.pdbqt

ligand=Piridine.pdbqt

size_x=25.699

size_y=33.845

size_z=60.617

center_x=-2.013

center_y= -12.655

center_z= 43.353

out=validationcomplex.pdbqt

EK.3. Fitokimyasallar ve Sanal Ligand Taraması Çoklu Doking Parametrelerin Dosyası:

1. receptor=3N8X.pdbqt

size_x=22.587

size_y=36.307

size_z=23.005

center_x=-30.969,

center_y=-40.981

center_z= 48.039

2. receptor=4NTJ.pdbqt

size_x=51.341

size_y=63.493

size_z=59.571

center_x=12.774

center_y=94.320

center_z= 57.350

3. receptor=1S02.pdbqt

size_x=80.13

size_y=59.21

size_z=53.20

center_x= 40.96

center_y=44.11

center_z= 17.79

4. receptor= GP-VI

size_x=53.85

size_y=67.42

size_z=62.64

center_x=115.30

center_y= 50.82

center_z= 20.40

receptor=3VW7.pdbqt

size_x=25.699

size_y=33.845

size_z=60.617

center_x=-2.013

center_y= -12.655

center_z= 43.353

EK.4. Çoklu Doking Başlatmak için Komut Dosyası:

```
#!/bin/bash for f in ligand_*.pdbqt; do
```

```
b=`basename $f .pdbqt`
```

```
echo Processing ligand $b
```

```
mkdir -p $b
```

```
vina --config conf.txt --ligand $f --out ${b}/out.pdbqt --log ${b}/log.txt done
```