T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MORFOLİNO GRUBU TAŞIYAN BİLEŞİKLERİN ALFA-AMİLAZ, ALFA-GLUKOZİDAZ ve ÜREAZ ENZİMLERİYLE ETKİLEŞİMİNİN MOLEKÜLER DOKİNG, MM/GBSA ve MOLEKÜLER DİNAMİK ÇALIŞMASI

GÜLGÜN MANSUROĞLU

FİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
AĞUSTOS-2024

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MORFOLİNO GRUBU TAŞIYAN BİLEŞİKLERİN ALFA- AMİLAZ, ALFA-GLUKOZİDAZ ve ÜREAZ ENZİMLERİYLE ETKİLEŞİMİNİN MOLEKÜLER DOKİNG, MM/GBSA ve MOLEKÜLER DİNAMİK ÇALIŞMASI

GÜLGÜN MANSUROĞLU
ORCID:0000-0001-6448-0910

FİZİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Prof. Dr. BERNA ÇATIKKAŞ
ORCID: 0000-0002-0566-5015

HATAY
AĞUSTOS-2024

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MORFOLİNO GRUBU TAŞIYAN BİLEŞİKLERİN ALFA-AMİLAZ, ALFA-GLUKOZİDAZ ve ÜREAZ ENZİMLERİYLE ETKİLEŞİMİNİN MOLEKÜLER DOKİNG, MM/GBSA ve MOLEKÜLER DİNAMİK ÇALIŞMASI

GÜLGÜN MANSUROĞLU
FİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Berna ÇATIKKAŞ danışmanlığında hazırlanmış olan bu tez **11/09/2024** tarihinde aşağıda belirtilen jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Berna ÇATIKKAŞ
Başkan

Prof. Dr. Emine Elçin EMRE
Üye

Prof. Dr. Leyla AÇIK
Üye

Kod No:

Prof. Dr. Cengiz KARACA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 21YL.035

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

11/09/2024

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tez hazırlanırken dil bilgisi kurallarına ve etik davranış çerçevesinde akademik normlara dayanarak hazırlanmış, tez yazım kuralları dâhilinde bana ait olmayan bütün ifade ve bilgilerin kaynağına atıf yapılmıştır. Hazırlamış olduğum tez çalışmasında Yükseköğretim Kurulu tarafından herhangi bir değişiklik veya düzeltme yapılamayacağı için tez çalışmamın bilgisayar ekranındaki örneği ile bire bir aynı olması şahsımın sorumluluğundadır.

İmzası

GÜLGÜN MANSUROĞLU

ÖZET

MORFOLİNO GRUBU TAŞIYAN BİLEŞİKLERİN ALFA-AMİLAZ, ALFA-GLUKOZİDAZ ve ÜREAZ ENZİMLERİYLE ETKİLEŞİMİNİN MOLEKÜLER DOKİNG, MM/GBSA ve MOLEKÜLER DİNAMİK ÇALIŞMASI

Bu tez çalışmasında diyabet, ülser, gastrit hastalığını değerlendirmek için alfa-amilaz, alfa-glukozidaz ve üreaz enzimleri için Veri Bankasından (PDB numarası): 5E0F, 5NN5 ve 7ZCY hedef olarak seçilmiştir. Bu çalışmada ilaç adayı olarak, morfolino grubuna sahip, asetamit türevi 9 bileşik kullanılmıştır. Bileşiklerin önce konformasyon analizi yapıldıktan sonra optimize yapıları belirlenmiştir. Hedef enzimlerle ilaç adayı bileşiklerin ve referans bileşiklerin etkileşmeleri moleküler doking ve moleküler mekanik/genelleştirilmiş Born yüzey alanı (MM/GBSA) yöntemleri ile bağlanma enerjileri hesaplanmış ve analiz edilmiştir. MM/GBSA hesabı sonuçlarına göre en iyi sonuç veren bileşikler ve referans maddelerin hedef enzimlerle etkileşmeleri 100 ns moleküler dinamik simülasyonu ile incelenmiştir. Bileşiklerin ilaç özelliklerine sahip oldukları, absorpsiyon, dağılım, metabolizma, eliminasyon (ADME) hesaplamaları ile elde edilmiştir.

2024, 54 sayfa

Anahtar Kelimeler: Morfolino bileşikleri, alfa-amilaz, alfa-glukozidaz, üreaz enzimi moleküler doking

ABSTRACT

MOLECULAR DOKING, MM/GBSA and MOLECULAR DYNAMIC STUDY of the INTERACTION of COMPOUNDS CARRYING the MORPHOLINO GROUP with ALPHA-AMYLASE, ALPHA-GLUCOSIDASE and UREASE ENZYMES

In this thesis study, alpha-amylase, alpha-glucosidase and urease enzymes from the Protein Data Bank (PDB number): 5E0F, 5NN5 and 7ZCY were selected as targets to evaluate diabetes, ulcer and gastritis diseases. In this study, 9 acetamide-derived compounds with morpholino groups were used as drug candidates. After first performing conformational analysis of the compounds, their optimized structures were determined. Binding energies of drug candidate compounds and reference compounds with target enzymes were calculated and analyzed using molecular docking and molecular mechanics/generalized Born surface area (MM/GBSA) methods. According to the MM/GBSA calculation results, the interactions of the compounds and reference substances that gave the best results with the target enzymes were examined with a 100 ns molecular dynamics simulation. The drug properties of the compounds were determined by absorption, distribution, metabolism, elimination (ADME) calculations.

2024, 54 pages

Keywords: Morpholino compounds, alpha-amylase, alpha-glucosidase, urease enzyme molecular docking

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın hazırlanmasında her konuda yanımda olan, kıymetli bilgilerini tereddütsüz benimle paylaşan, zaman kavramı açısından saat ve gün farketmeksizin sorularıma sabırla cevap veren, beni yönlendiren ve bana ışık olan, akademik ünvanının gereğini layığıyla yerine getiren değerli Prof. Dr. Berna ÇATIKKAŞ'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde her türlü desteği sunan Tez İzleme Komitesi üyeleri Prof. Dr. Emine Elçin EMRE ve Prof. Dr. Leyla AÇIK'a, bu tez hazırlanırken bölümün olanaklarından faydalanmamı sağlayan HMKÜ Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölüm Başkanlığı'na, bunun yanında maddi desteği sağlayan HMKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje No:21 YL.035) teşekkürlerimi sunarım. YL eğitimimin her aşamasında katkı sağlayan HMKÜ FBE Enstitüsü Müdürlüğü çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi desteklerini hiç eksik etmeyen öğrenim hayatım boyunca her koşulda yanımda olan babam Ali LATİFECİ ve annem Münibe LATİFECİ'ye abim Mazhar LATİFECİ, Meşhur LATİFECİ ve biricik kız kardeşim Dilek LATİFECİ'ye çok teşekkür ederim. Proğramların yüklenmesinde ve teknik alanında destek olan Süleyman YILDIZ ve Özkan ATASOY'a teşekkür ederim. Bu tez çalışmasında fikir alış-verişinde bulunduğum Vedat TAŞKIRAN hocama teşekkür ederim. Beni her alanda destekleyen ve kendimi geliştirmek için bana fırsat tanıyan sabrı, güveni ve anlayışı için değerli eşim Cihan MANSUROĞLU'na bana annelik duygusunu tattıran çocuklarım Ceyhun ve Mehmet Uras MANSUROĞLU'na çok teşekkür ediyorum ve bu tez çalışmasını onlara ithaf ediyorum.

Cumhuriyetimizin 100.yılında çalıştığımız bu tezi CUMHURİYET'e ve tüm bilim kadınlarına atfederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ V
ŞEKİLLER DİZİNİ VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ VII
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 10
3. MATERYAL ve YÖNTEM 14
3.1. Materyal 14
3.2. Yöntem 14
3.2.1. Ligand Konformasyon ve Optimizasyon Hesabı 14
3.2.2. Ligand Hazırlama 15
3.2.3. Protein Hazırlama 15
3.2.4. Moleküler Doking 16
3.2.5. Bağlanma Enerjisi Hesaplamaları 18
3.2.6. Moleküler Dinamik Simülasyon 19
3.2.7. Farmakokinetik Analiz ve Adsorpsiyon-Dağılım-Metabolizma-Eliminasyon (ADME) Çalışması 20
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 22
4.1. Doking ve MM/GBSA Analizi 24
4.2. Moleküler Dinamik Simülasyon 35
4.3. Farmakokinetik Analiz ve ADME Çalışması 40
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 42
KAYNAKLAR 43
ÖZGEÇMİŞ 47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bileşiklerin isimleri 8
Çizelge 4.1. Hedef enzimler ve referans bileşikler. 22
Çizelge 4.2. Alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F) ve alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enzimleri ile bileşiklerin ve referansların doking skore (DS) ve bağlanma enerjileri (ΔG). 25
Çizelge 4.3. Üreaz enzimi (PDB ID: 7ZCY) ile bileşikler ve referansların doking skorları (DS) ve bağlanma enerjileri (ΔG). 27
Çizelge 4.4. Bileşikler ve referans bileşiklerin alfa-amilaz (PDB ID: 5EF0) enzimi ile etkileşmesi 33
Çizelge 4.5. Bileşikler ve referans bileşiklerin alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enzimi ile etkileşmesi 34
Çizelge 4.6. Bileşikler ve referans bileşiklerin üreaz (PDB ID: 7ZCY) enzimi ile etkileşmesi 35
Çizelge 4.7. Lipinski ile çalışılan tüm bileşiklerin ilaç benzerlik özellikleri 41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bileşiklerin iki boyutlu yapıları 8
Şekil 1.2. Referans bileşiklerin iki boyutlu yapıları 9
Şekil 4.1. Bileşiklerin üç boyutlu yapıları 23
Şekil 4.2 Referans bileşiklerin üç boyutlu yapıları 24
Şekil 4.3. Alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F) enziminin bağlanma bölgesindeki cep içinde 2 numaralı bileşik. 26
Şekil 4.4. Alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enziminin bağlanma bölgesindeki cep içinde 7 numaralı bileşik 27
Şekil 4.5. Üreaz (PDB ID: 7ZCY) enziminin bağlanma bölgesindeki cep içinde 4 numaralı bileşik 28
Şekil 4.6. Alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F) enzimi için 2 numaralı bileşik ve referans bileşiklerin (5J7 ve L-mimosin) kovalent olmayan etkileşimlerinin iki boyutlu ve üç boyutlu resimleri 29
Şekil 4.7. Alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enzimi için 7 numaralı bileşik ve referans bileşiklerin (NOJ ve kojik asit) kovalent olmayan etkileşimlerinin iki boyutlu ve üç boyutlu resimleri 30
Şekil 4.8. Üreaz (PDB ID: 7ZCY) enzimi için 4 numaralı bileşik ve referans bileşiğin (AHA) kovalent olmayan etkileşimlerinin iki boyutlu ve üç boyutlu resimleri 31
Şekil 4.9. Alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F) enzimi ile aktif bölgesine bağlanan 2 numaralı bileşik ve referans bileşiklerin (5J7 ve L-mimosin) 100ns süre için RMSD grafikleri 36
Şekil 4.10. Alfa- glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enzimi ile aktif bölgesine bağlanan 7 numaralı bileşik ve referans bileşiklerin (NOJ ve kojik asit) 100 ns süre için RMSD grafikleri 37
Şekil 4.11. Üreaz (PDB ID: 7ZCY) enzimi ile aktif bölgesine bağlanan 4 numaralı bileşik ve referans bileşiğin (AHA) 100 ns süre için RMSD grafikleri 38
Şekil 4.12. Alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F) enziminin 2 nolu ve referans bileşikleri ile etkileşimi 39
Şekil 4.13. Alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enziminin7 nolu ve referans bileşikleri ile etkileşimİ 39
Şekil 4.14. Üreaz (PDB ID: 7ZCY) enziminin 4 nolu ve referans bileşiği ile etkileşimi 40

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

$E_{Protein\text{-}Ligand\ Kompleks}$	: Minimize edilmiş bileşiğin enerjisi
$E_{Protein}$	: Ligand olmadan proteinin ortalama enerjisi
E_{ligand}	: Ligandın bileşikten çıkarıldıktan sonraki enerjisi
L	:Ligand

KISALTMALAR

DS	: Doking skor
ΔG	: Bağlanma enerjisi
HB	: Hidrojen bağı
YFT	: Yoğunluk fonksiyonel teoremi
B3LYP	: 3 parametreli Becke, Lee, Yang, Parr fonksiyoneli
ADME	: Adsorpsiyon-dağılım-metabolizma-eliminasyon
MM/GBSA	: Moleküler mekanik genelleştirilmiş Born ve yüzey alanı
PDB	: Protein veri bankası
VSGB	: Yüksek çözünürlüklü protein enerji modellemesi
IFD	: Induced fit doking
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
DM	: Şeker Hastalığı
AHA	: Asetohidroksamik asit

1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM), pankreastan salgılanan insülin hormonunun kan şekerinin düzenlenmesinde anormal durumlar sonucunda ortaya çıkan tamamen ya da kısmen fonksiyonel yetersizliğin olması ve böylece bunun eksikliği sonucu oluşan kronik bir rahatsızlık olarak tanımlanmıştır. Bu, hastalığın ortaya çıkış sebebine göre 3 sınıf altında incelenmiştir. Bunlar gestasyonel DM, Tip 1 DM ve Tip 2 DM' dir.

Gestasyonel DM (GDM) gebelik halinde ortaya çıkan glukoz miktarındaki düzensizliğin sonucunda oluşmaktadır. Yapılan çalışmalara göre gebelerin %7' sinde GDM ortaya çıkmaktadır. Hastalığın hamilelik sürecinde görüldüğü, bu gebe hastaların çoğunluğunda doğumdan sonra glukoz metabolizmasının düzensizliği ortadan kalkmaktadır. Yine aynı hastaların daha sonraki gebeliklerinde ve yaşamlarının ilerleyen safhalarında Tip 2 DM hastalığının görülme ihtimalinin oldukça yüksek olduğu ortaya çıkmıştır (Mann ve ark., 2014).

Tip 1 DM, pankreas hücrelerinin sayısının azalmasına veya bu hücrelerinin zedelenmesine ya da bazı hücrelerin fonksiyonel bozukluğuna dayalı olarak gelişen insülin eksikliği ile oluşan DM türüdür. Bu hastalık diyabet hastalarının %10-15'ini içine alır. Aynı şekilde bu hastalık yoğun olarak çocukluk ve gençlik yıllarında görülmektedir. Tip 1 DM de Pankreas'ın bazı hücrelerinin işlevsel olarak bozulmasından kaynaklı yetersiz insülin salgılanması gerçekleşir. Ayrıca hastalarda vücuttaki yağ depolarının azalmasına sebep verdiğinden metabolik bir reaksiyon olarak karşımıza çıkan ketozis ve daha ilerleyen zamanlarda ketoasidozis olarak adlandırılan rahatsızlık görülebilmektedir. Ketoasidoz rahatsızlığını önlemek ve yüksek kan şekerini dengelemek amacıyla dışarıdan insülin alınması gereklidir. Ketoasidoz hastaları vücudunda insülin üretemedikleri için insüline bağımlı yaşamak zorunda kalmaktadır. Tip-1 diyabetin tedavisi ise vücut dışından takviye olarak alınan insülin ve yapılan metabolik diyettir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde antidiyabetik ilaçların ne yazık ki Tip-1 diyabet hastalarında tedavi edici etkisi olmadığı ortaya çıkmıştır (Balcı, 2019).

Tip 2 DM diyabet türü diyabetik hastalıklar içerisinde en yaygın görülendir. Tip 2 DM pankreastan salgılanan β hücrelerinin işlevselliğinin azalması ile bu hücrelerin etrafındaki dokuların insüline karşı duyarsızlaşması sonucu meydana çıkan hiperglisemi, hiperinsülinemi, dislipidemi ve hipertansiyon ile seyreden bir hastalıktır. Bu hastalık yavaş seyretse de tedavisi oldukça uzun sürmektedir (Balcı, 2019). Hipergliseminin

görüldüğü hastalarda özellikle göz, böbrek ve sinir hücrelerinde fonksiyonel bozuklukların ortaya çıktığı görülmektedir. Bu hastalığı olan bireylerin β hücrelerinde insülin yeterince salgılanmakta ama hormonların hücresel alıcı olan reseptörlerinden yararlanılamaması nedeniyle insüline karşı bir direnç ortaya çıkmaktadır. Tip 2 DM özellikle insülin gerektiren ve takviye edicilerden karşılanması gereken diyabet olarak adlandırılmaktadır. Tip 2 DM' nin tedavisinde; hipoglisemikler, egzersiz, şeker sınırlandırıcı diyet, ve Alfa-amilaz, Alfa-glukozidaz inhibitörleri kullanılmaktadır (Salmanoğlu, 2020).

Diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıklar yakın zamanda dünya üzerindeki birçok ülkede yoğun olarak görülmektedir. Ancak bu hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların yeterince etkili ve güvenilir olmadığı düşünülmektedir. Güvenilir ilaç olabilmesi için ilaçların tedavi öncesi bir dizi testten geçmesi zorunludur (Balbaa et al., 2002). Metabolik hastalıkların başında gelen obezite ve diyabet gibi hastalıkların tedavi edilmesinde diyet kapsamında vücuda alınan karbonhidratların parçalanmasını engelleyici teknikler kullanılır (Umezawa ve ark., 2018).

Alfa-amilaz enzimi: nişasta ve glikojen gibi alfa bağlantılı büyük polisakkaritlerden alfa bağlarını bunlardan daha kısa zincirler oluşturan dekstrin ve maltoza hidrolize eden bir enzim olarak tanımlanmaktadır. Alfa-amilaz enzimi insanlar ve diğer memeli canlılarda bulunan amilazın ana formudur (Copeland, 2005). Alfa-amilaz enzimi gıdasal nişasta içeren tohumlarda da bulunmaktadır. Mantarlar tarafından da salgılanabilecek bir enzim olan alfa-amilaz; insanlarda, ağızda bulunan tükürük bezleri ve pankreasta aktif olarak salgılanan bir enzimdir. Amilaz enzimi sindirim sistemindeki kanalın iki farklı bölgesinde görev yapmaktadır. Hidrolaz enzim sınıfından olan α-amilaz ve α-glukozidaz enzimleri ise karbonhidrat metabolizmasını düzenleyen enzimlerdir. İnsülin ve glukagon hormonları karbonhidrat metabolizmasının dengesini pankreastan salgılanarak sağlamaktadır.

Biyolojik faaliyetlerin tümü için enerji zorunlu bir ihtiyaçtır. Bu enerji canlılar için en çok karbonhidratlı besinlerden sağlanmaktadır. Enerjinin açığa çıkması ve yaşamsal faaliyetlerin devamı için karbonhidratın parçalanması ve emilim düzeyine geçişi ancak enzimlerle sağlanmaktadır. Alfa-amilaz enzimleri aynı zamanda nişasta hidrolizinde, deterjan üretim sanayisinde, meyve suyu, bisküvi gibi gıda sanayisinde, eczacılıkta,

tekstil sanayisinde ve alkol üretiminde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Nigam ve ark., 1995).

Alfa-glukozidaz, karbonhidratların hidrolizinden görevli diğer bir hidrolazdır. Bu enzimler karbonhidratların glukozidik bağlarını hidroliz etmektedirler. Nişasta hidrolizinin son aşamasında glukozidazlar görev alır. Bunun yanında alfa-glukozidazlar, transglukozilasyon özelliğine sahiptirler. Sindirim sisteminde besinlerin içindeki karbonhidrat bileşikleri alfa-amilaz ve alfa-glukozidaz enzimleri sayesinde glukoza kadar parçalanır. Daha sonra bu maddeler ince bağırsaktan emilerek kana karışırlar. İnce bağırsakta alfa-glukozidaz enzimleri yüzeyde bulunur. Besinlerdeki karbonhidratların hidrolizinde bu sayılan enzimler oligo ve disakkaritleri daha küçük yapı olan monosakkaritlere parçalayabilirler. Monosakkaritlerde bağırsaklarda kolayca emilip kana geçecek kadar küçük hale gelmiş olur. Alfa-glukozidaz enzim inhibitörleri bu enzimleri yarışmalı olarak inhibe ederler (Salmanoğlu, 2020).

Alfa-glukozidazlar doğada yaygın olarak bulunan ve alfa-amilazla beraber çalışan önemli enzim gruplarındandır. Bu enzimlerin substrat istek yüzeyleri kaynağına göre sıcaklık, pH gibi faktörlerde değişiklik göstermektedir (Bourne ve ark., 2001).

Dolaşım sisteminde vücuttaki fazla şeker yağ hücrelerine dönüşerek depolanmaktadır. Bunun sonucunda karaciğer ve kaslarda depolanmasının yetersiz kalmasıyla kan damarlarında da depolanma olmaktadır. Damarlarda bu birikim sonucu plak oluşur, enfaktüs ve damar çeperi esnekliğini kaybeder. Oluşan bu durumda damarların işlevini kaybetmesi ve koroner damarların tıkanması sonucunda kalp krizi görülmektedir (Mir ve ark., 2015). Bunun yanında boşaltım sisteminde poliüri ve polidipsi gibi belirleyici semptomlar görülmektedir. Zamanla böbrek fonksiyonlarının bozulması yeni hastalıklara da sebep olacağı düşünülmektedir.

Vücutta karbohidrat metabolizmasının dengesinin bozulmasıyla Diabetes mellitus (şeker hastalığı) ortaya çıkmaktadır (Wirngo ve ark., 2016). Bu hastalık Diabetes mellitus tip I ve tip II olarak sınıflandırılmaktadır. Tip I Diabetes mellitus genetik geçişli konjenital bir hastalıktır. İnsülin hormonu replasmanı yapılarak tedavi edilmektedir. Protein sentezinde insülin dengesi önemli bir faktördür. Tip II Diabetes mellitus ise genellikle sonradan beslenme alışkanlıkları ve birçok sebep ile ortaya çıkan bir hastalıktır (Zengin, 2016).

Diyabetin tipi ne olursa olsun tedavinin amacı; normal kişilerin aldıkları karbonhidrat içindeki şeker miktarının kandaki şekere etkisini gösteren glisemi düzeyine yaklaşmak, oluşacak anormalliklerin önüne geçmek veya bunları geciktirmektir. Diyabette kan glukoz seviyesinin dengesini sağlamak için diyet, kan dolaşımı hızlandırıp insülin emilimini arttırmak için egzersiz, bunun yanında oral antidiyabetik ilaçlar tavsiye edilmektedir. Tip 1 DM hastaların tedavisi insülin takviye edilmesiyle olmaktadır. Tip 2 DM hiperglisemi ile karakterizedir. Bu hastalık insülin salgılanmasıyla, insülini engelleyecek faktörleri ortadan kaldırabilen birçok antidiyabetik ilaçlarla tedavi edilir. Bu oral antidiyabetik ilaçlar (ODİ) olarak, bağırsaklardaki sukroz ve nişasta sindirimini ve emilimini yavaşlatan, pankreası uyararak daha fazla insülini salgılayıp, buradaki α-glukozidaz enzimini tersinir olarak engelleyen, kan şekerini düşüren α-amilaz ve α-glukozidaz inhibitörleri kullanılmaktadırlar (Memişoğulları, 2005).

Diyabet tedavisinde amilaz ve glukozidaz enzimlerinin çeşitli inhibitörleri sentezlenmiştir. İnhibitör enzimler karbohidratları glukoz monomerine katalizlemektedir. Bu enzimler düşük kan şekerini yükselterek ya da yüksek kan şekerini düşürerek kan şekerini belirli bir değerde tutmak için çalışırlar. Bu enzimler hücre ile hücrelerarası sıvı glukoz monomerlerinin geçişini düzenlemektedir. Amilaz ve glukozidaz enzimlerinin inhibitörlerinden "akarboz" ve "vogliboz" formları en önemli ilaç etken maddeleridir (Zengin ve ark., 2014).

Günümüzde diyabet tedavisinde α-amilaz ve α-glukozidaz enzim inhibitörü olarak akarboz, miglitol ve vogliboz, grubunda yer alan ilaçlar kullanılmaktadır. Bunlardan yalnızca akarboz Türkiye'de bulunmaktadır. Bu ilaçların sindirim sistemi üzerine yan etkileri görülmektedir. Sindirilmeyen ve ince bağırsakta biriken karbonhidratlar kolonda bakteriler tarafından ayrıştırılır ve sindirilmemiş karbonhidratların yıkımı sonucunda gaz oluşumu, şişkinlik ve karın ağrısı görülmektedir (Mai, 2007).

Üreaz enziminin laitnce adı üre amidohidrolez olup, Uluslararası Biokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUB) tarafından EC 3.5.1.5 kod numarası ile belirlenmiştir. Üreaz, bakteri, mantar, alg ve bitkiler de üretilen bir tür hidroliz enzimidir (Mobley & Hausinger, 1989). Hidrolazlar sınıfında yer alan üreaz enzimi, üreyi amonyak ve karbondiokside dönüştürür (Follmer ve ark., 2004). James B. Summer 1926 yılında, Jackbean (Canavalia ensiformis) üreazını bir enzim şeklinde saflaştırıp kristalize etmiştir. Bu çalışmayla 1946 yılında Sumner Nobel Kimya ödülünü almıştır. Bu çalışmayla enzim

hakkında daha çok bilgi edinilmiş ve ileriki çalışmalar için adımlar atılmıştır. Daha sonraki yıllarda bu enzimin üç boyutlu halinin analizi, X ışınları kristallografisi ile bulunmuştur. 1967 yılında bilgisayar teknolojisinin gelişmesiyle bu yapı aydınlatılmıştır (Kara, 2006).

Ürenin amonyak ve karbondioksite hidrolizlenmesinde üreaz enzimi katalizör görevi görür. Bu olay katalizör olmadan gerçekleştiğinde üre parçalanması yavaş gerçekleşir. Bu olay sonucunda amonyak ve siyanürik asit oluşur. Katalizör kullanılarak gerçekleşen reaksiyonda ise oluşan ürünler amonyak ve karbonik asittir. Bunun sonucunda karbonik asit kendiliğinden parçalanarak karbondioksit ve amonyağa dönüşür (Krajewska ve ark., 2001). Üreaz enzimi biyoteknolojik çalışmalarda kan ve üre tayininde biyosensör olarak da kullanılmaktadır. Üreaz gıda endüstrisinde üreyi meyve suyundan ve alkollü yiyecek ve içeceklerden uzaklaştırması yapay böbrekte ürenin kandan uzaklaştırılması gibi çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanım açısından önemli bir yere sahiptir (Dindar, 2011).

Bu çalışmada kullanılan diğer bir enzim olan üreaz, insan ve diğer canlıların metabolizmasını etkileyen, vücutlarında bulunan ve hastalığa sebep olabilen patojenlerin tedavisinde kullanılabilecek ilaçların geliştirilebilmesi için inhibitör çalışmalarında oldukça önemlidir (Dinç, 2009). Üreaz enzimi tarafından ürenin parçalanmasıyla açığa çıkan amonyak mide asidini nötral pH'ya yaklaştırarak Helicobacter pylori'nin kolonizasyonuna yardımcı olur (Dunn ve ark., 1990). Üreaz insan ve hayvanlarda ise idrar ve gastro intestinal yolların enfeksiyonlarında, idrar yolu iltihap ve taşlarının oluşumuna neden olan enfeksiyonlarda viral faktör olarak kendini göstermektedir (Burne ve ark., 2000).

Mide ve onikiparmak bağırsağında mide asidi ve sindirim sıvıları tarafından yaşanan doku kaybına ülser denir. Üreaz üreyi karbondioksit ve amonyağa parçalayarak asit özelliği olan mide tabakasında pH değerini yükselterek ortamı bazikleştirir. Böylece mide mukozasındaki tabakayı ve ülsere neden olan *Helicobacter pylori* bakterisini, bu yapıdan korumuş olur. Fakat bazı durumlarda bu bazik ortam normal değer etkisini ortadan kaldırarak, görevli hücrelerin gastrin salınımını tetikler. Bu şekilde asit miktarının artmasıyla gastrit oluşumuna neden olur ve doku hasarına yol açar (Ari, 2006). *Helicobacter pylori* mide asidine dayanıklı diğer organizmaların yaşayamadığı

ortamlarda bile yaşayabilen bir bakteridir. *Helicobacter pylori'* nin hastalık oluşturması üreaz inhibisyonu yoluyla kontrol edilebilir (Kara, 2006).

İlaçların araştırılıp insan kullanımına sunulması bu ürünlerin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarının doğrulanması karmaşık, uzun ve maliyeti oldukça fazladır. Bu Farmasötik ürünleri oluşturan moleküllerin daha önceden araştırılmış özellikleri tespit edilmiş ve geçerliliği doğrulanmış olması gerekmektedir. Bu moleküllerin kimyasal sentezi yapılmış, formülasyonu, optimizasyonu ve hayvanlarda toksit etkileri bilinmiş olmalıdır. Bu yüzden ilaç keşfi yaklaşık 12 yılı bulmakta ve yaklaşık maliyeti 1,8 milyar ABD dolarını bulabileceği tahmin edilmiştir (Crampon ve ark., 2021). Bu yüzden ilaç keşfedecek insanlar hem zamandan hem de maliyetten tasarruf sağlamak verimli amacıyla bilgisayar ortamında yapılan moleküler modelleme uygulamaları ile ilaç olmaya aday molekülleri daha kısa sürede belirleyebilmektedirler. Bu şekilde moleküler modelleme yöntemiyle potansiyel moleküllerin yan etkileri de belirlenmiş olmaktadır.

İlaç özelliği gösteren maddelerin benzerlik analizi yapmak için kullanılan moleküler modelleme çalışmaları, günümüzde özellikle enzim-ligand etkileşimini incelemek bununla ilgili daha fazla bilgiye ulaşmak için sıklıkla kullanılmaktadır. Tıpta kullanılan biyolojik faktörlerde etkin olarak önem taşıyan enzimlerin kristal yapılarının incelenmesi ve aydınlatılması amacıyla, bu yapıları bilgisayar ortamında incelenmesi amacıyla birçok bilgisayar destekli programalar kullanılmaktadır. Moleküler doking yöntemleriyle yapısal özellikleri ve buna bağlı olarak inhibitörlerle etkileşimlerinin incelenmesi, bu kinetiğinin belirlenmesi, seçilen enzimlere uygun ve işlevsel olacak vücuttan geri dönüşümü kolay olacak inhibitörün belirlenmesi amaçlanır. Bunu yaparken daha seçici olacak, daha az maliyetli ve kısa sürede elde edilebilecek verilere dayalı tahminlerde bulunmamızı sağlayan hesaplamalar bütünüdür. İlaç kimyasına olumlu katkı sağlayacak gelecekteki çalışmalara ışık tutacak bir alandır. Moleküler modelleme yöntemiyle belirlenen enzimlerin yapılarını aydınlatmak için x-ışınları kullanılır ve bilgisayar ortamında üç boyutlu moleküler modellemesi yapılır. Bilgisayar programları kullanılarak hesapsal sonuçlar ve ilgili simülasyonlar uygulanarak bu maddelerin işlevselliği bunun yanında yapısal bilgileri hesaplanmaktadır. Bununla birlikte sentezlenecek bileşikler ve etkileşimleri önceden belirlenmiş olmaktadır.

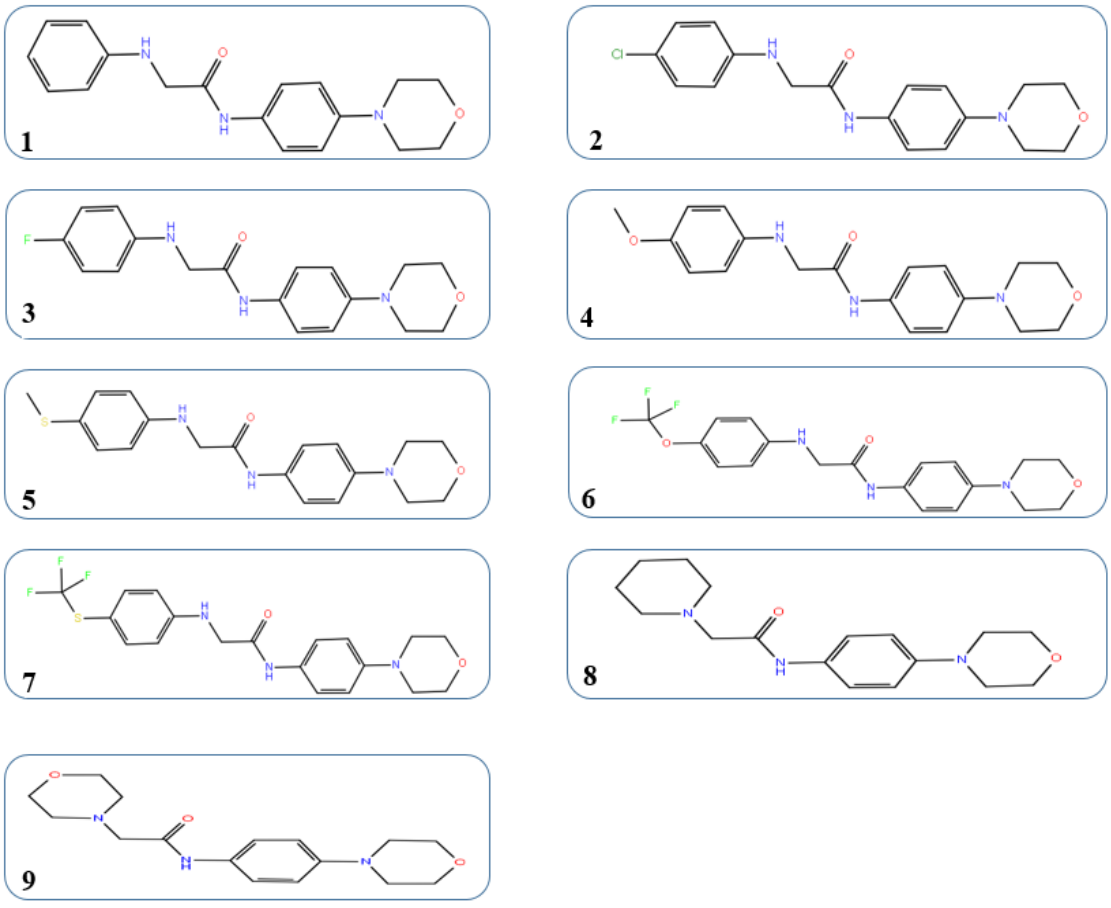
Bu tez çalışmasında kullanılan enzimlere karşı beş tane referans maddesi belirlenmiştir. Bunlar alfa-amilaz için referans maddesi (5J7, L-mimosin), alfa-

glukozidaz için referans maddesi (NOJ, kojik asit) ve üreaz için (AHA) kullanılmıştır. 5J7 bileşiği alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F) enzimi içinde bulunan molekül, NOJ alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enzimi içinde bulunan moleküldür. L-mimosin *mimosa pudica*'dan izole edilmiş protein özelliği olmayan bir bitki aminoasitidir. Bununla beraber EC 1.14.18.1 (tirozinaz) inhibitörü ve bir bitki metaboliti şeklinde görev yapabilmektedir. Proteinojenik özelliği olmayan bir L-alfa aminoasittir. Kojik asit referans maddesi de bazı Acetobacter, Aspergillus ve Penicillium türleri tarafından üretildiği bilinmektedir. Organik bir asit olarak bilinen bu madde tirozinaz enziminin aktif kısmında bulunan bakır iyonlarını yakalayıp; tirozinaz işlevselliğin artmasını aynı zamanda melanin denilen maddenin üretilmesini engeller (Searle ve ark., 2020). Asetohidroksamik asit E.C.1.14.18.1 (üreaz) inhibitörü olan ve işlevsel olarak bir asetamid ile ilişkilendirilen bir madde olduğu bilinmektedir.

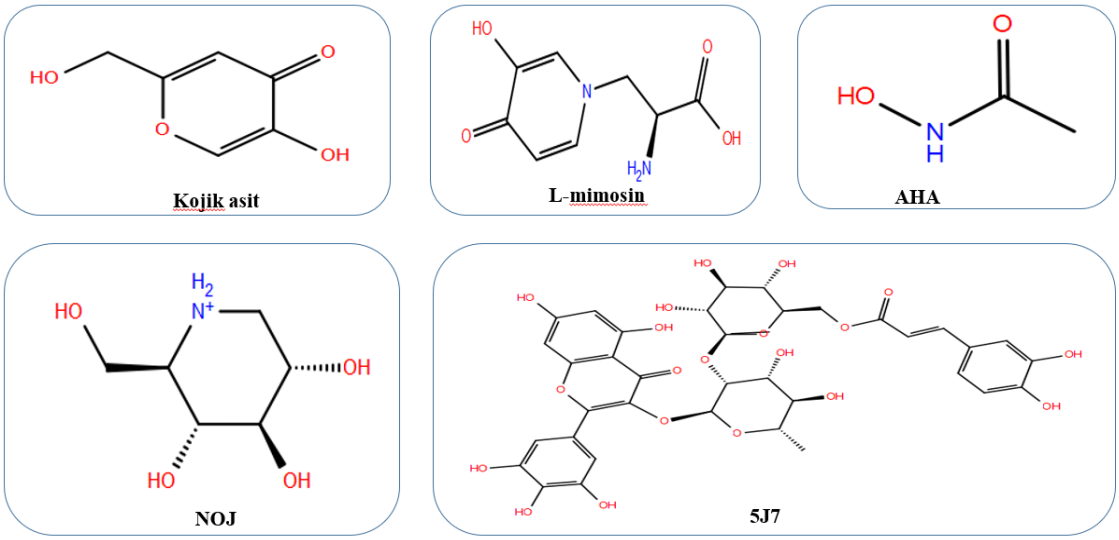
Bu çalışmada Emine Elçin EMRE ve arkadaşları tarafından sentezlenen farklı özelliklere sahip 9 bileşik belirlenen enzim ve referans maddesine göre ilaç olma ihtimallleri incelendi (Ece, 2019). Bu inceleme için bileşikler moleküler doking yöntemi kullanılarak alfa-amilaz, alfa-glukazidaz, ve üreaz enzimleri ile belirlenen hedeflere ve serbest radikal temizleme aktivitelerine karşı test edildi. Bu doğrultuda protein veri bankası aracılığıyla hedef enzimlerin kristal yapılarına ulaşıldı (PDB ID: sırasıyla 5E0F, 5NN4 ve 7ZCY). Bu enzimler içinde daha önce hazır kullanılmış ilaç referans bileşikleri bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmadaki bileşiklerin 2 boyutlu yapıları aşağıdaki şekilde verilmiştir. Kullanılan referans bileşikleri ile etkisini incelediğimiz enzimlerin bağlanma bölgeleri doking yöntemi ile belirlenmiştir. Belirlenen bu bağlanma bölgelerine yapısında bulunan referans bileşiği çıkarılarak bunların yerlerine bu çalışmada belirlenen 9 bileşik ile doking işlemi yapılmıştır. Kullanılan bileşiklerin isimleri Çizelge 1.1'de verilmiştir. Bu bileşiklerin ve referans bileşiklerin iki boyutlu yapıları Şekil1.1'de ve Şekil1.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Bileşiklerin isimleri

No	Bileşikler (n=1-9)
1	N-[4-(Morfolino-4-il)fenil]-2-(fenilamino) asetamit
2	2-[(4-Klorofenil)amino)-N-(4-morfolinofenil)] asetamit
3	2-[(4-Florofenil)amino)-N-(4-morfolinofenil)]asetamit
4	2-[(4-Metoksifenil)amino)-N-(4-morfolinofenil)] asetamit
5	2-[(4-(Metiltiyo)fenil)-N-(4-morfolinofenil)] asetamit
6	N-[4-(Morfolino-4-il)fenil]-2-{[4-(triflorometoksi) fenil]amino}asetamit
7	N-(Morfolinofenil)-2-((4-((triflorometil)tiyo)fenil)amino)asetamit
8	N-(4-Morfolin-4-il-fenil)-2-(piperidin-1-il)asetamit
9	2-(Morfolin-4-il)-N-[4-(morfolin-4-il)fenil]asetamit



Şekil 1.1. Bileşiklerin iki boyutlu yapıları



Şekil 1.2. Referans bileşiklerin iki boyutlu yapıları

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Enzimler kimyasal reaksiyonların hızlarını artıran katalizörlerdir. Enzim adlandırılması, ilk kez 1877 yılında Alman fizyolog Wilhelm Friedrich Kühne tarafından Eski Yunanca "mayada bulunan" anlamındaki "enzume" (İngilizcesi "in yeast") sözcüğünden türetilmiş "enzyme" sözcüğü ile gerçekleştirilmiştir. Yapısı ilk tespit edilen enzim, üreaz enzimidir. Daha sonrasında yapılan araştırmalarla katalaz enziminin yapısı bulunmuştur. Enzim proteinlerinin birbirleriyle veya diğer yapılarla farklı şekillerde bağlanmasıyla özgüllük sağlanmaktadır. Enzimlerin yapısında bulunan proteinlerin farklı olması enzimlerde de farklı tip tepkimelerin katalizlenmesini sağlayacaktır. Bu tepkimelerin gerçekleşmesi enzimlerle olmaktadır.

Aktümsek ve ark. (2018) enzimlerin çalışmasında çok değişken faktörler mevcut olduğunu söylemişlerdir. Bu faktörler substrat yüzeyi, substrat miktarı, ısı, sıcaklık, pH ve zaman gibi faktörlerdir. Ayrıca bazı organik ve inorganik maddeler de enzim üzerinde reaksiyon hızını artırıcı, azaltıcı hatta durdurucu etki gösterirler.

Chin ve ark. (2006) enzimlerin çalışmasını önleyen maddeleri enzim inhibitörleri olarak adlandırmışlar. Enzim inhibitörleri temel olarak geri dönüşebilen ve geri dönüşemeyen olarak ikiye ayrılır. Biyokimyasal tepkimelerin kontrol mekanizması ve metabolik olayların kontrolü enzimlerle sağlanmaktadır. Enzim reaksiyonu sonucu oluşan ürün, enzim inhibitörü olabilmektedir. Enzim inhibisyonu enzimlerinin yapısını bozup, geçici olarak çalışmasını durdurabilmektedir. Bu şekilde enzim inhibisyonu etkinlikleriyle ilaçlarda etken madde olarak kullanılması fikri ortaya çıkmıştır. Bitkilerden enzim inhibisyonu teorisine katkı sağlayacak inhibitörlerin tespiti biyokimyada önemli bir yer tutmaktadır. Günümüzde ilaç etken maddeleri çoğunlukla bitki kaynaklı ya da bitkilerden tespit edilen flavonoidlerden esinlenerek sentezlenen maddelerdir.

1811 yılında amilaz enzimi Kirchhoff tarafından ne olduğu belli olmadan keşfedilmiştir. Daha ilerleyen zamanda 1831 yılından buna benzer bir maddenin insan tükürüğü içinde bulunan yapıdan elde edilebileceğini yaptığı araştırmalar sonucunda Leuchs göstermiştir. Tükürüğün içinde bulunan bu maddeye Berzelius tarafından pityalin adını verildiğini, Bernfeld (1951) yıllarında dile getirmiştir. Bununla beraber maltta nişastayı hidroliz eden etken bir maddenin varlığını ortaya çıkardıklarını ve buna da

diastaz ismini verdiklerini 1833'te Payen ve Persoz yaptıkları çalışmalarda belirtmişlerdir. 1895'te Beijerinck'in ortaya koyduğu öneriden sonra tüm nişasta sindiren enzimler amilazlar şeklinde adlandırılmış. 1930 yılında Ohlsson'un yaptığı çalışmalardan sonra malttan elde ettiği nişasta parçalayıcı enzimler, parçalama ürünlerinin anomerik tiplerine göre α-(alfa) ya da β-(beta) olarak gruplandırmıştır.

1950 yılında Mybrüch ve Necmuler amilazlar için araştırılan endoamilazlar ve ekzoamilazlar olarak farklı bir isimlendirme şekli belirtmişlerdir (Japan, 1988). Tesadüfî olarak endo amilazlar nişastayı parçalayabilmektedir. Parçalanan nişasta molekülleri farklı uzunluklarda düz ya da dallanmış yapıya sahip oligosakkarit zincirlerine dönüşmektedir. Ekzo amilazlar ise elektron alışverişi olan diğer uçta hidroliz olup kısa ürünler meydana getirirler. Günümüzde nişastanın hidrolizi için farklı enzimler kullanarak farklı ürünler oluşturulmaktadır. Uhlig, (1998) nişastanın hidrolizi sonucu açığa çıkan maddelere bağlı olarak bu enzimler α- (endoamilaz), β- (ekzoamilaz) ve γ- (ekzoamilaz) şeklinde üç gruba ayrıldığını söylemiştir. Bütün enzimler etki ettikleri reaksiyonlara göre Milletlerarası Biyokimya Birliği'nin (International Union of Biochemistry) yaptığı sınıflandırmayla 6 sınıfa ayrılmışlardır. Andersen ve ark.(1981) bu sınıflamayla amilazlar 3. sıradaki hidrolazlar sınıfında yer aldığını söylemiştir.

Henrissat, (1991).yaptığı çalışmalara göre iki karbonhidrat molekülü ya da karbonhidrat ve farklı molekül arasındaki bağı koparan enzimler glukozidazlardır. Glukozid hidrolazlar belirlenen glukozidik bağını parçalayan büyük bir enzim grubudur. Bu enzimler için molekül benzerliğinine dayalı bir sınıflandrıma yapılmıştır. Aminoasit benzerliğine göre nişasta parçalayan enzimler glukozid hidrolazlar (GH) grubuna dahil edilmiştir Bu sınıflandırmaya göre (i) α-amilazlar, GH13; (ii) β-amilazlar, GH14 ve (iii) glukoamilazlar (γ-) , GH15 olarak belirlenmiştir. MacGregor, (2005) çalışmalarına göre alfa –amilazın, alfa-gukozidazın da içinde bulunduğu GH13 ailesi zamanla genişlemekte ve içinde 30'a yakın enzim bulunduğunu dile getirmiştir. Bachhawat ve ark. (2011) bazı modifikasyon yöntemleriyle alfa-glukozidaz inhibisyon etki tayini yapmıştır.

Johnston ve ark. (2002) yaptıkları çalışmalar sonucunda doğal olarak kan şekerinin düşürülmesi amacıyla tedaviye yardımcı yöntemlerden birisi, sindirim sistemi organlarındaki alfa-amilaz ve alfa-glukozidaz gibi karbohidratları hidroliz eden enzimlerinin salgısını yavaşlatarak glukoz emilimini biraz daha geciktirmek olduğunu ifade etmişlerdir. Bu yüzden yeni tedavi edici ilaçlar sentezlemek için yapılan

çalışmalarda, α-amilaz ve α-glukozidaz enziminin salgısını geciktirmek üzerine yoğunlaşılmıştır.

Krajewska, (2009) çalışmalarına göre üreaz enzimi üreyi amonyağa (NH_3) ve karbondioksite (CO_2) hidrolize edebildiğini ifade etmiştir. Enzimoloji ve protein kimyası gelişiminde hayati bir rol oynamıştır. Üreaz enzimi mide ve idrar yolu enfeksiyonları gibi sağlık sorunlarına neden olan patojenlerin hayatta kalması ve çoğalması için önemlidir. Collins ve ark. (1999) üreazın aktivitesi, enfeksiyon sırasında midenin pH seviyesini yükselterek patojenlerin daha elverişli bir ortamda yaşamasını sağlayacağını bulmuşlardır. Bununla beraber Bryan ve ark. (2002) amonyak üreten üreazlar, hepatik koma, hepatik ensefalopati, ürolitiyazis ve idrar kateterinin kabuklanmasına neden olabilir. Aynı zamanda, üreazın inhibitörleri, bazı farmakolojik tedavilerde kullanılarak bu patojenlerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde yardımcı olabilir.

1926 yılında Summer tarafından Canavalia ensiformis üreaz saflaştırılmış enzim olarak sentezlenmiş ve aradan 50 yıl geçtikten sonra, üreazın içinde nikel bulunduran ilk enzim olduğunu Dixon bildirilmiştir.

Fishbein ve Carbone tarafından jackbean ve bakteriyel üreazlar üzerinde yapılan ön çalışmalarda, hidroksamik asit (AHA) spesifik, güçlü bir inhibitör olduğu gösterilmiştir. Hidroksamik asidin ve türevlerinin hem bitki hem de bakteriyel üreazlar için tersinir, yavaş bağlanan inhibitörler olduğu bildirilmiştir. AHA referans ligandı bu sınıftaki en yaygın olarak kullanıldığı bilinen inhibitördür ve bu tez çalışmasında referans olarak kullanılmıştır.

Literatürde Amtul ve ark. (2004) üreaz aktivitesinin azaltılması için yapılan çalışmaların bir gereklilik olduğu bildirilmektedir. Buna dayanarak her geçen yıl üreazın inhibisyonuna yönelik birçok alanda çalışmalar yapılmaktadır. Çok küçük kütleli organik molekül, gelişen teknolojiye bağlı olarak bilgisayar programları yardımıyla modellenmiş, sentezlenmiş ve üreaz etkinliği açısından inhibitör maddeler değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda patentleri alınmıştır.

Khan ve arkadaşları (2010) bazı yeni 1,2,4-triazol ve 1,3,4-tiyadiazol bileşikleri sentezleyip sentezledikleri bu bileşikleri üreaz enzimi inhibisyonu özelliği açısından değerlendirmiştir. Daha sonra, Amtul ve arkadaşları (2004) üreaz denilen bu enzim için yeni ve daha farklı olan inhibitör moleküllerini tasarlayıp sentezlemişler. Bu yeni

molekülleri üreaz enziminin inhibisyonu açısından (enzim kinetiği çalışmalarıyla) incelemişler.

Muhammad ve ark. (2014) ilerleyen zamanlarda Viola betonicifolia'dan farklı bir molekül olarak 3-metoksidalbergion sentezlenmiş daha sonra bu molekülün üreazın aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi araştırmıştır. Sentezlenen molekülün kinetik ve yapısal çalışması yapılarak üreaz enzimi üzerinde kompetetif inhibisyon yaptığı tespit edilmiştir. Tespit edilen bu molekül üreazın sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanmak için uygun olabileceği öngörülmüştür.

Prize, (1998) göre günümüzde teknojinin gelişmesiyle hesaplamalı kimya alanında bilgisayar destekli araştırmalar ve ilaç keşfi çalışmaları devam etmektedir. Laboratuvar deneyleri yapılmadan kimya araştırmaları mümkün hale gelmiştir. Bu alanın gelişmesinde ve insanlığa büyük katkısı olan John Pople ve Walter Khan'ın 1998 yılında Nobel ödülüne layık görülmüştür.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında yapılan hesaplamalar Schrödinger programı içinde bulunan Maestro Versiyon 12.5 ile, bileşiklerin en kararlı geometrik yapıları ve bu yapıların konformasyon, optimizasyon analizleri ile yapılmıştır. Bununla birlikte doking ve MM/GBSA hesaplamaları için Schrödinger yazılımı (Schrödinger, 2020-3) içerisinde bulunan Maestro v12.5 (Schrödinger, 2020-3) arayüzü kullanılmıştır. Hesaplamalar için Maestro programının protein hazırlama sihirbazı, LigPrep (Schrödinger, 2020-3), Glide (Friesner ve ark. 2006), Induced fit docking (IFD) (Nabuurs ve ark., 2007) ve Prime modülleri kullanılmıştır. Daha sonra ADME hesaplamaları ve Moleküler Dinamik Simülasyonları yapılmıştır.

3.2. Yöntem

Tez çalışması yapılırken bileşiklerin en kararlı yapılarının konformasyon hesabı, optimizasyon analizi, proteini hazırlama, doking tekniği ve MM/GBSA enerji değerlerinin hesaplanması ve sonrasında en yüksek değerde olan bileşiklerin moleküler dinamik simülasyonları hesaplandı. Çalışılan tüm bileşiklerin ilaç özelliklerini araştırmak için ADME hesaplamaları yapıldı. MM/GBSA göre en iyi sonuç veren bileşik ve referans bileşiklerinin bu enzimlerle etkileşimlerinin Moleküler Dinamik hesapları yapıldı.

3.2.1. Ligand Konformasyon ve Optimizasyon Hesabı

Bu çalışmadaki bileşiklerinin 3 boyutlu yapılar Maestro Versiyon 12.5'da hazırlanarak oluşturuldu. Moleküllerin faklı konformerleri Schrödinger programının içindeki Jaguar QM Confermer and Tautomer Predictor modülü ile çözücü olarak su kullanılarak hesaplanmıştır.

Elde edilen konformasyon analizinden en kararlı molekül seçildi. Bu molekülün optimizasyonu Jaguar programı B3LYP-D3 metodu ve 6-31G** baz seti ile yapılmıştır.

3.2.2. Ligand Hazırlama

Bu çalışmada kullanılan bileşiklerin moleküler doking işlemine hazır hale getirmek amacıyla 3 Boyutlu en uygun şeklini bulmak için Ligpred hesapları Schrödinger programındaki Maestro 12.5 arayüzünün Ligpred modülündeki güç alanı OPLS3e seçilerek pH'ını 7.2 seçerek tautomerik ve iyonizasyon durumlarının, önce, ligandların yapılarına eksik kalıntılar ve hidrojen atomları eklenmiş, bağ sıraları ve uzunlukları belirlendi. Daha sonra disülfit bağları oluşturularak yükler sabitlenmiştir. Prime modülü kullanılarak proteinin döngü bölgeleri rafine edilerek optimize edilmiştir. Bu işlemden sonra su molekülleri protein yapılarından çıkarılmış ve OPLS3e kuvvet alanı kullanılarak yapılar minimize edilmiştir.

3.2.3. Protein Hazırlama

Alfa-amilaz, alfa-glukozidaz ve üreaz–enzimleri Protein Veri Bankasından (PDB numarası: 5E0F, 5NN5, 7ZCY) indirilerek ve Maestro v12.5'in Protein Hazırlama Sihirbazı (Scapin ve ark., 2003) modülü aracılığıyla moleküler doking ve simülasyonları için hazır hale getirilmiştir. Bunun yanında aynı yöntemle L-mimosine, kojik asit ve asetohidroksamik asit referans maddeleri doking için hazır hale getirilmiştir. Bu hesaplamalar için kullanılan Protein Hazırlama Sihirbazı modülü, RCSB Protein Veri Bankasından temin edilebilen veya kullanıcı tarafından yüklenebilen bir PDB dosyası ile akıcı çalışma süreci sağlamak amacıyla tasarlanmıştır (Release, 2020.). Bu modül, Protein Veri Bankası (PDB) formatındaki moleküler yapıları alıp, bunları optimize eder ve en uygun şekilde çalışmaya hazır hale getirir. Bunu sağlarken proteinin yan zincirlerinin düzenlenmesi, hidrojen atomlarının eklenmesi, daha sonra su moleküllerinin uzaklaştırılması gibi işlemler sırasıyla gerçekleştirilir. Böylece kullanılacak bu protein yapıları doking simülasyonları veya başka hesaplamalar için uygun hale getirilmiş olur.

Bu tezde kullanılan hesaplamalar için Protein yapıları hazırlanmasında Maestro 12.5 paket programındaki Protein Hazırlama Sihirbazı etkin bir şekilde kullanılmıştır. Bu hesap seçilirken;

1. Hidrojen atomları ve eksik kalıntıları eklendi.
2. Bağ sıraları ve bağ uzunlukları belirlendi.
3. Disülfür bağları oluşturulup yükler sabitlendi.

4. Prime ile döngü rafine edildi.
5. Su yapıları çıkarıldı.
6. Ligandı hassaslaştırmak için optimize işlemi yapıldı.
7. Daha sonra, optimize edilmiş protein OPLS-3'e kuvvet alanı seçilerek 7.2 pH değerinde minimize işlemi bitmiş oldu.

Bu işlemlerin gerçekleştirilmesiyle protein yapıları düzenlenmiş ve hedeflenen özelliklere uygun hale getirildi.

3.2.4. Moleküler Doking

Daha önceki zamanlarda kullanılan geleneksel yaklaşımlar ile yeni etken ilaçları sentezleyip piyasaya sürmek oldukça maliyetli ve daha fazla zaman almaktadır. Bu yüzden son yıllarda, ilaç keşfinde birçok deneysel ve daha kaliteli simülasyon yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Geliştirilen bu yöntemlerden birisi de "Moleküler Doking Yöntemi" dir. Bilgisayar destekli olan moleküler doking çalışmaları sentezlenen milyonlarca bileşiğin en etkili ve kararlı ilaç maddesi olup olmadığının belirlenmesinde çok büyük önem taşımaktadır. İlaç kabul edilebilecek milyonlarca kimyasal maddenin laboratuvar koşullarında her birinin teker teker çalışılıp sentezlenmesi neredeyse imkansızdır. Bu yüzden Moleküler doking çalışmaları daha önce ilaç kabul edilen ürünlere bakılarak en etkili olabilecek maddelerin seçilmesinde bize kolaylık sağlar.

İlaç tasarımında kullanılan moleküler doking yöntemi iki molekülün birbirlerine kararlı konformasyonlarla bağlanmasını ve bunlar arasındaki ilişkiyi belirleyen bir metottur. Bu doking işlemi, proteinlerin birbirine bağlanan molekülleri ilişkilendirip karşılaştırmada kullanılan anahtar-kilit ilişkisine benzetilebilir. Burada kullanılan protein kilitken, bağlanmak istenen ligand ise anahtar görevi görür. Moleküler doking işlemi de aynı bu şekilde enzimde bulunan ve uygun boşluklara denk gelen substrat ya da bu inhibitörün bağlanma olasılıklarını incelemektedir (Türkkan, 2013).

Moleküler doking, seçilen bir hedef ile buna bağlanacak bileşik arasındaki etkileşim enerjilerini ve bağlanma bölgelerini hesaplayarak bu sonuçlara göre yorum yapmayı öngörmektedir. Kullanılan bu doking yönteminde, belirtilmiş hedef gösterilen proteinin etkin bölgesindeki amino asit yan zincirleri sabit tutulur bunun içindeki ligand ise hareket halindedir. Buna bağlı olarak en etkili ve uygun olacak kenetlenmeyi sağlayan döner, titreşir ve bükülür; bununla beraber hedeflenen amino asit yan zincirleri ile birlikte non-

kovalent etkileşimler yapmış olur. Induced Fit Doking (IFD) gibi moleküler doking programlarında, hedef seçilen maddenin aktif merkezinin bir miktar (bir kaç angström) hareketli olmasına izin verilebilir (Schröder ve ark., 2013).

Normal bir moleküler doking çalışmasında, ligandın aktif bölgesi, 3D koordinat sisteminde farklı gridlere sahip olmalıdır. Aktif bölgedeki bu atomların kısmi yükleriyle grid boyunca hareket ettirilen ligand molekülü ile bunun arasındaki etkileşim enerjileri hesaplanır (I Muegge, 2004). Hesaplanan bu sonuçlar daha sonra, yapılacak her doking işleminde farklı algoritmalar kullanılarak, elde edilecek toplam etkileşim enerjisine dönüştürülür. Bu işleme skorlama denmektedir. Bu hesaplama sonucu elde edilen skorlama fonksiyonundan toplanan etkileşim enerjisi değerine "doking skorlama" denir. Yapılan tüm doking çalışmaları benzer olsa da skorlama fonksiyonları birbirinden farklıdır. Belirlenen bir hastalık için yapılacak ilaç keşfinde, doking ve skorlama fonksiyonları bu çalışmada görevli araştırmacıların ilgi alanlarına, protein ve ligandlardaki atom cinsine ve hesaplanacak molekül sayısına göre belirlenir (HJ., 1994).

Moleküler doking yöntemleri, bilgisayar destekli ilaç tasarımının en önemli parçasıdır. Bu hesaplamalar için kullanılan birçok program vardır. Moleküler doking hesaplamaları ile yeni terapötik ilaçların üretilmesi, tasarımı ve gelişimi sağlanırken, çeşitli enzimatik reaksiyonların moleküler etkileşimlerinin anlaşılması ve yorumlanması da mümkün olabilmektedir. Öne sürülen bu yaklaşım, tıbbi olarak yeni ilaçların tasarlanması ve keşfedilmesi amacıyla, günümüzde görülen çeşitli kronik hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (Kökçü, 2019).

Bu çalışmada Induced fit docking (IFD) hesaplamaları için Schrödinger IFD programı kullanıldı (Fan ve ark., 2019). Bu hesaplama, ligandın reseptör ile etkileşimlerini ve bağlanma bölgesindeki esneklikleri dikkate alarak daha hassas sonuçlar elde etmeyi amaçlamıştır.

İlk olarak, molekül üzerinde bağlanmanın gerçekleşeceği bir alan oluşturuldu. Bu işlem yapılırken kübik bir aktif bölge belirlendi. Seçilen ligand otomatik olarak reseptörün yan zincirleri B faktörüne göre otomatik olarak kırpıldı. B faktörü kristal yapıda atomun titreşim derecesini temsil eden bir parametredir. Bu şekilde daha esnek ve hareketli yan zincirlerin etkisi azaltılarak hesaplamanın daha hızlı ve doğruya yakın sonuçlar elde edildi.

Reseptör Van der Waals ölçekleme faktörü 0.50 olarak ayarlandı, ligand ise varsayılan olarak Van der Waals ölçekleme faktörü 0,50 ile görüntülendi. Daha sonra, ligand pozisyonları 5.0 Å içindeki tüm kalıntılarda rafine edilmek ve bağlanma bölgesinde esneklik sağlamak için Prime Modülü kullanıldı. Prime iyileştirmeleriyle birlikte, OPLS_3e kuvvet alanına sahip Glide SP protokolü kullanılarak en iyi yapı elde edildi. Bu protokol, en iyi yapının reseptöre yeniden kenetlenmesini sağlamak için kullanıldı ve ilk 20 reseptör yapısı 2,5 kcal/mol içinde üretildi. IFD hesaplamaları ile elde edilen yeniden doking sonuçlarının, en iyi yapıların 20 kcal/mol aralığında RMSD değerleri ile oldukça doğru ve uygulanabilir olduğu belirtilmektedir. Bu da yöntemin etkinliğini ve güvenilirliğini doğrulamaktadır.

3.2.5. Bağlanma Enerjisi Hesaplamaları

Alfa-amilaz, alfa-glukozidaz ve üreaz inhibitörlerinin teorik bağlanma enerjilerini hesaplamak için Schrödinger yazılımının Maestro Prime modülü kullanılmıştır. Prime modülü, moleküler modelleme ve simülasyon için etkili bir araçtır ve protein-ligand bileşiklerinin enerji hesabı için MM/GBSA yöntemini kullanılır.

Prime MM/GBSA sabitlenmiş moleküllerin hesaplanan serbest bağlanma enerjileri ve parametreleri varsayılan olarak ayarlanmıştır. Bu modül belirli parametreleri ve standartları kullanarak hesaplamaların tutarlılığını ve karşılaştırılabilmesini amaçlar. Alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F), Alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) ve üreaz (PDB ID: 7ZCY) inhibitörleri için hesaplanan bağlanma enerjileri, bu modülde yapılan işlemlerle elde edilmiştir. Bu enerjilerin analizi, potansiyel ilaç adaylarının değerlendirilmesi ve ilaç tasarımında geçerli sonuçlar elde etmek için oldukça önemlidir.

OPLS_3'e kuvvet alanı, yüksek çözünürlüklü protein enerji modellemesi (VSGB) çözücü modeli kullanılarak alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F), alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) ve üreaz (PDB ID: 7ZCY) inhibitörlerinin bağlanma enerjileri hesaplandı. Hesaplama aşaması Prime MM/GBSA simülasyonu kullanıldı. Daha sonra bağlanma enerjileri Glide poz görüntüleyici dosyası aracılığıyla elde edildi.

Bağlanma enerjileri ve bağlanma olaylarındaki serbest enerji değişimlerini belirlemek için aşağıdaki denklem (3.1) kullanılmıştır. Bu denklem, bu süreçte elde edilen

bağlanma enerjisinin hesaplanmasında kullanılan matematiksel bir ifadedir. Aynı zamanda bağlanma sürecindeki serbest enerji değişimini de temsil eder.

$$\Delta G_{Bağlama\ Enerjisi} = E_{Protein-Ligand\ Kompleksi} - E_{Protein} - E_{Ligand} \quad (3.1)$$

ΔG bağlanma enerjisini, $E_{Protein\text{-}Ligand\ Kompleksi,}$ minimize edilmiş moleküllerin enerjisi, $E_{protein,}$ ligand olmadan proteinin (bağlanmamış, minimize edilmiş) ortalama enerjisi ve $E_{ligand,}$ ligandın molekülden çıkarıldıktan sonraki enerjisini temsil eder (Genheden ve ark., 2015).

3.2.6. Moleküler Dinamik Simülasyon

Moleküler dinamik (MD) moleküllerin veya atomların bir sistemdeki hareketlerini birbiriyle ilişkisini inceleyen yöntemdir. Yaklaşık 25 yıldır yaygın olarak kullanılan moleküler dinamik yöntemle büyük ve karmaşık moleküllerin birçok hesaplamalarla ortaya çıkan modellemelerini kullanmaktadır. Parçacıkların zamana bağlı hareketini ve şeklini inceleyerek sistemdeki bu parçacıklar için bir yörünge belirler. Moleküler dinamik yöntemi, protein fonksiyonları ve atomik yapıları ile ilgili daha net ve güvenilir sonuçlar alabilmek için bu yönteme çeşitli eklemeler yapılmıştır. Proteinlerin işlevselliğini anlamak için aminoasitlerin konum ve şekilleri bu aktif bölgedeki konformasyon ve enerjitik değişimler incelenmiştir (El-Bastawissy, 2001).

Bu çalışmada MD simülasyonları OPLS4 kuvvet alanına sahip Desmond modülü kullanılarak yapıldı. Her bir enzim için en yüksek MMGBSA ΔG değerine sahip bileşik ve her bir enzim için referans bileşikler moleküler dinamik simülasyonu hesaplandı. ortorombik su kutusuna daldırıldı (kenar kutusu ile molekül arasındaki minimum mesafe 10.0Å'a ayarlandı). Sistemler daha sonra TIP3P su modeli kullanılarak çözüldü ve uygun sayıda karşı iyon eklenerek nötrleştirildi. Son olarak 15 M NaCl çözücünün içine rastgele dağıtıldı ve kutudaki çözücü moleküllerinin yerini aldı. Sistem, moleküler dinamik simülasyonlarından önce 6 aşamalı bir gevşeme protokolünden geçirildi. NPT topluluğu, 300 K'de sabit bir sıcaklık ve 1,01 bar'da basınçla kullanıldı. Oluşturulan sistemlerde herhangi bir kısıtlama yoktur ve varsayılan olarak başlangıç hız değerleri kullanılmıştır. Seçilen toplam simülasyon süresi 100 ns idi ve her kare için kayıt aralığı 100 ps idi, bu da toplam 1000 kayıtlı kareye yol açtı. Diğer ayarlar varsayılan olarak kullanıldı.

Bu enzimler (PDB ID: 5E0F, 5NN5 ve 7ZCY) önceden dengelenmiş palmitoil-2-oleoil-sn-glisero-3-fosfokolin (POPC) çift katmanına varsayılan parametrelerle yerleştirildi ve SPC (basit nokta şarjı) su modeliyle çözüldü. ortorombik sınır kutusu ($10\times10\times10$ $Å^3$).

3.2.7. Farmakokinetik Analiz ve Adsorpsiyon-Dağılım-Metabolizma-Eliminasyon (ADME) Çalışması

İlaçların vücutta etkilerini gösterebilmek için belirli bir zaman diliminde orada biyoaktif bir formda kalması gerekir. Bu süreçte ilaç olarak etkisini gösterecek molekülün hedefine istenilen seviyede konsantrasyonunu ve bağlılığını göstermiş olması beklenir. Bu bağlamda çok sayıda ilaç molekülün bulunması fiziksel numunelerin erişilmesinin sınırlı olmasıyla emilim, dağılım, metabolizma ve atılımın (ADME) değerlendirilmesini içerir. Bu nedenle bilgisayar programları deneylere geçerli alternatifler sağlamaktadır. Bilgisayar modellerinde moleküllerin farmakokinetik özellikleri, fizikokimyasal özellikleri, ilaç benzerliği hakkında güçlü bir öngörü oluşturmaktadır. ADME web aracı sayesinde kullanıcılar kısa sürede moleküller hakkında kolay, verimli değerlendirmeler ve yorumlar yapabilmektedirler. Bunun sonucunda kullanıcılar ilaç keşfini destekleyecek bir moleküller diziliminin temel parametrelerine ilişkin tahminleri ortaya konulmasını sağlanmaktadır. Yaygın olarak kullanılmaya başlanan ADME, ilaçların insanlar üzerindeki etkisini inceleyen ve aynı zamanda farmakokinetik özelliklerin nasıl olabileceğini açıklar. Kullanılabilecek ilacın, homojen bir şekilde dağılması, yavaş metabolize edilmesi, daha sonra vücuttan doğru ve zararsız bir şekilde dışarı atılması gerekmektedir. Bahsettiğimiz bu ADME özellikleri yeteri düzeyde değilse, o ilaç genellikle başarısız olmuş demektir (Hodgson, 2001).

Birden fazla *in silico* yöntemler ADME parametrelerini moleküler yapılardan yorumlamayı ve değerlendirmeği hedefler. Lipinski ve arkadaşlarının çalışmalarında ilaca benzerliği için fizikokimyasal özellikleri tanımlamak üzere ağızdan alınan bileşikleri incelediler. Yaptıkları çalışmalar sonucunda elde ettikleri farmakokinetik ve fizikokimyasal parametreler arasındaki ilişkiyi beş kuralı olarak adlandırdılar. Bu kurala göre, bileşiklerin hidrojen bağı vericilerinin ve alıcılarının sayısı, moleküler ağırlık, Log P (lipofiliklik) ve molar kırılma gibi fizikokimyasal parametrelerin olasılığı incelendi.

Araştırılan ligandların farmakokinetik özellikleri, Schrödinger'in QikProp aracı (Schrödinger, 2020-3) kullanılarak değerlendirildi.

Hesaplanan farmakokinetik özellikler ve kabul edilebilir değer aralıkları bileşenleri aşağıdaki gibidir:

- ✓ LogBB: Öngörülen beyin/kan bölmesi katsayısı (-3.0 / 1.2)
- ✓ LogKp: Deri ele geçirme genliği (8.0/ 1.0)

Bu özellikler, ilaçların farmakokinetik davranışını değerlendirmek için kullanılır ve belirli aralıklar içinde olmaları istenir. Örneğin, LogBB, beynin ilaçla etkileşimini tahmin etmek için kullanılırken, LogKp ise deriye olan geçirgenliği değerlendirmektedir. Bu özellikler, ilaçların farmakokinetik profilini ve hedefe uygunluğunu değerlendirmek için önemli parametrelerdir.

Lipinski'nin beş kuralı ilaç keşfinin ne derecede istenilen düzeyde ulaşılabileceğini gösteren araçtır. Bu şekilde ilacın etkisi ve uygunluğu tahmin edilir. Bu kurallar, moleküllerin ilaca benzerliği ve benzer olmayan molekülleri belirtmek için kullanılır ve en az iki veya daha fazla kriterlerin uygun olmaları gerektiğini savunur. Lipinski'nin beş kuralı şu şekildedir:

- ✓ Moleküler ağırlık: 500'den az veya eşit olmalıdır.
- ✓ Hidrojen bağı vericileri: 5'ten az veya eşit sayıda olmalıdır.
- ✓ Hidrojen bağı alıcıları: 10'dan az veya eşit sayıda olmalıdır.
- ✓ LogP değeri: 5'ten az veya eşit olmalıdır. LogP, bölümlerin hidrofobikliğini gösteren bir ölçüdür.

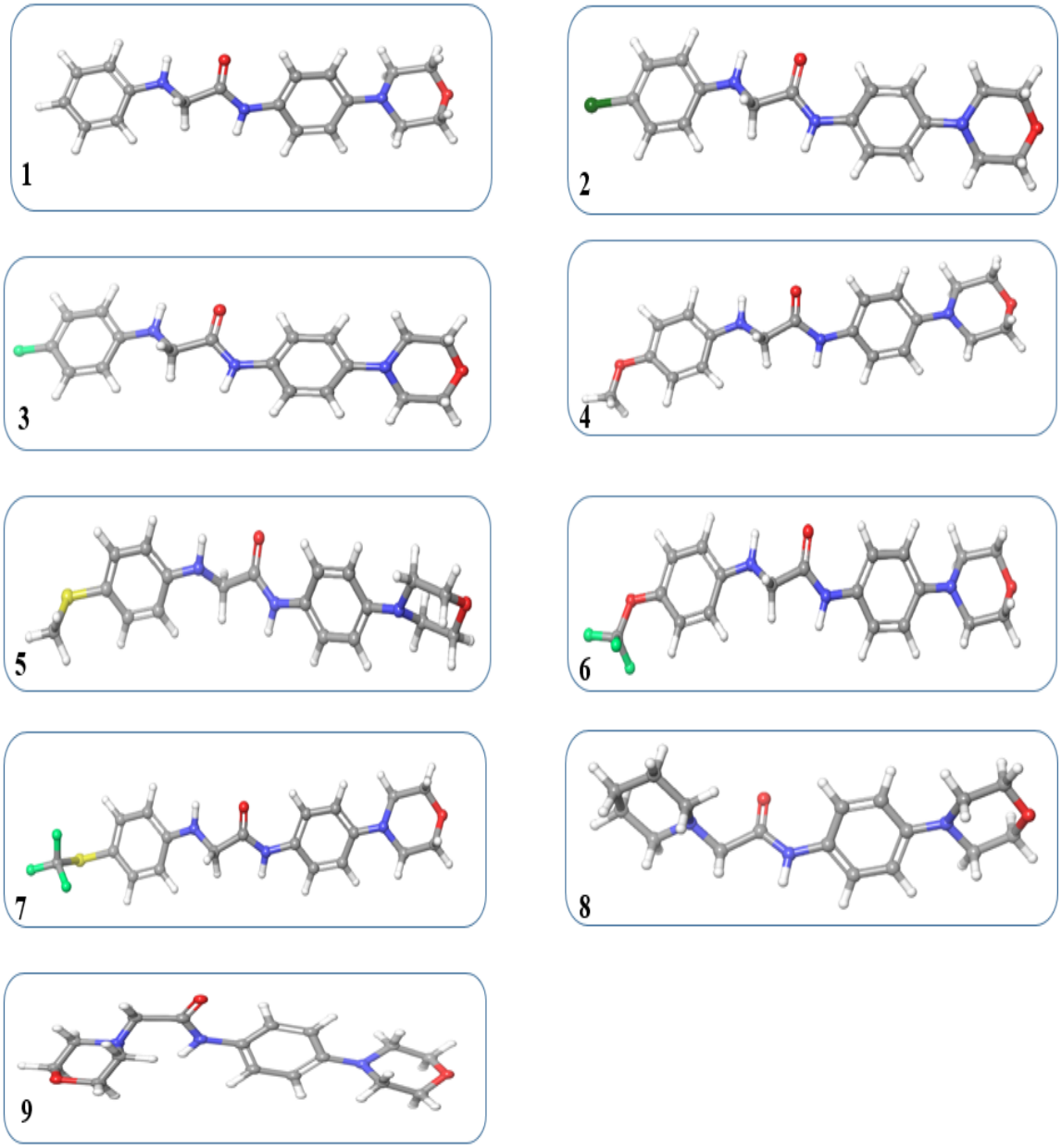
Bu kuralların birbiriyle uyumlu ve uygunluğunun yüksek olması ilaç benzerliğini arttırır fakat kesin bir sonuç göstermez. Buna rağmen Lipinski'nin beş kuralı ilaç üretme sürecinde kullanılan yaygın araçlardandır (Lipinski ve ark., 2012) .

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

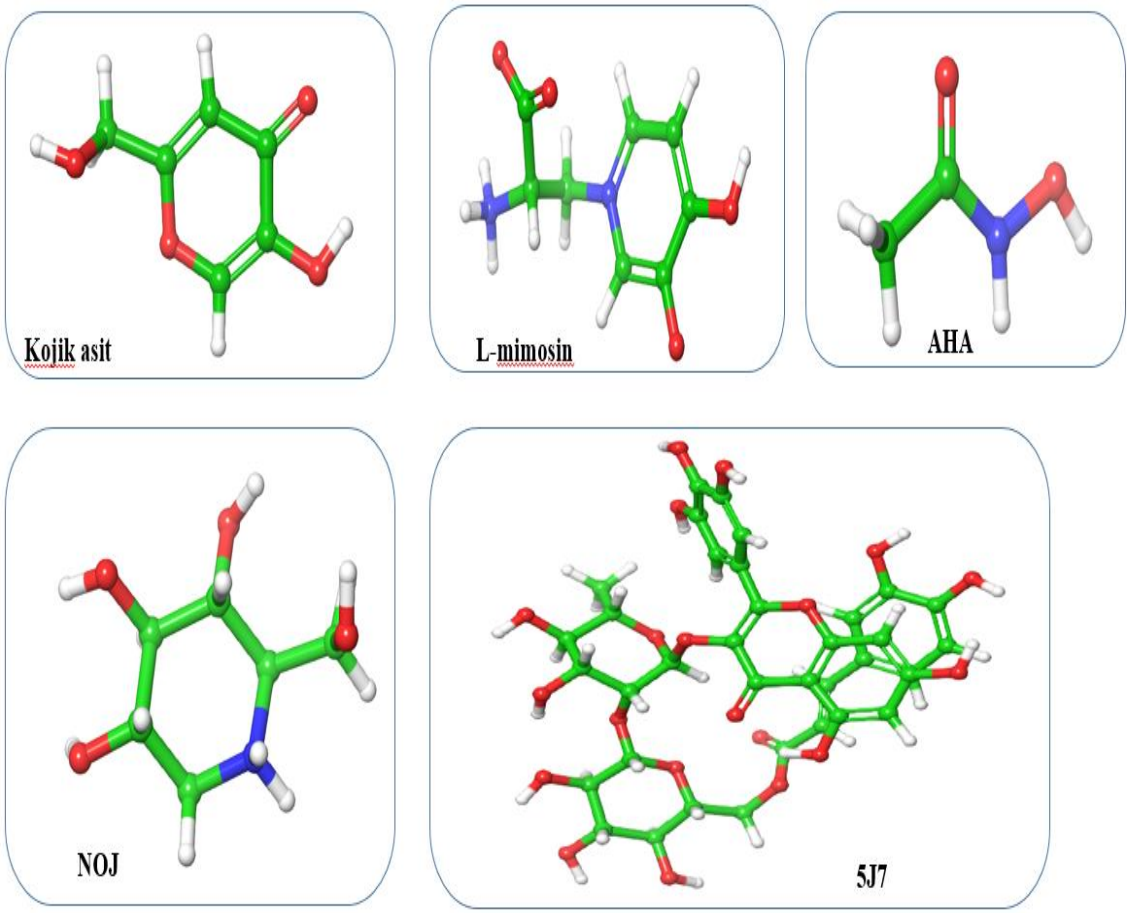
Bu çalışmada diyabet, ülser, gastrit, hastalığı için seçilen hedef enzimler alfa-amilaz, alfa-glukozidaz, üreaz (PDB ID: 5NN5, 5E0F ve 7ZCY) ve daha önce bu enzimlerle kullanılmış referans bileşikler Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Bu enzimler içinde daha önce hazır ilaç olarak kullanılmış L-mimosin, kojik asit, asetohidroksamik asit (AHA) ve 5J7 ve NOJ referans bileşikleridir. Bu referans maddeler de bağlanma bölgelerine diğer bileşikler gibi yerleştirilerek doking işlemi yapılmıştır. Hedef organizmalar, enzim ve referans bileşiklerin isimleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Kullanılan 9 bileşiğin ve referans bileşiklerin üç boyutlu yapıları Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hedef enzimler ve referans bileşikler

PDB ID	Organizma	Hedef Enzim	Referans bileşikler
5E0F	İnsan	Alfa-amilaz	5J7, L-mimosin
5NN5	İnsan	Alfa-glukozidaz	NOJ, Kojik asit
7ZCY	*Sporosarcina bakterisi*	Üreaz	Asetohidroksamik asit (AHA)



Şekil 4.1. Bileşiklerin üç boyutlu yapıları



Şekil 4.2 Referans bileşiklerin üç boyutlu yapıları

4.1. Doking ve MM/GBSA Analizi

Tez çalışması kapsamında seçilen hedef enzimler (Çizelge 4.1.) ile 9 adet bileşik ve referans bileşikler (Çizelge 1.1.) doking yöntemi ile incelenmiştir. Doking hesaplamaları sonucu en düşük enerjide olan dört doking sonucunun daha sonraki adımda MM/GBSA bağlanma enerjileri hesaplanmıştır. Bağlanma enerjileri hesaplandıktan sonra elde edilen veriler değerlendirilerek her enzime en iyi bağlanan yani en düşük enerji değeri (ΔG) ve ona karşılık gelen doking skoru (DS) Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Bu çalışmada, alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F) enzimi için 2 numaralı bileşiğin, alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enzimi için 4 numaralı bileşiğin, üreaz (PDB ID: 7ZCY) enzimi için 7 numaralı bileşiğin hesaplanan ΔG değerleri diğer bileşiklere göre daha düşük çıkmıştır.

Çizelge 4.2'de ve Çizelge 4.3'te verilen sonuçlara göre, 2, 4 ve 7 numaralı bileşiklerin daha güçlü bağlanma enerjilerine sahip olduğu görülmektedir. Bu durumda

daha düşük bağlanma enerjisi hesaplanmış olması ise doking sonucunda bileşiğin enzime diğerlerine göre daha iyi bağlandığını göstermektedir.

Alfa-amilaz (5E0F) enzimine 2 numaralı bileşiğin referans maddesi L-mimosin'den daha iyi bağlandığı görülmektedir. Alfa-glukozidaz (5NN5) için gösterilen referans maddeleri, 7 numaralı bileşiğe göre bağlanma enerjisi daha yüksek çıkmıştır. 7 numaralı bileşik referans gösterilen bileşiklere göre bu enzim için daha kararlı bağlanmıştır.

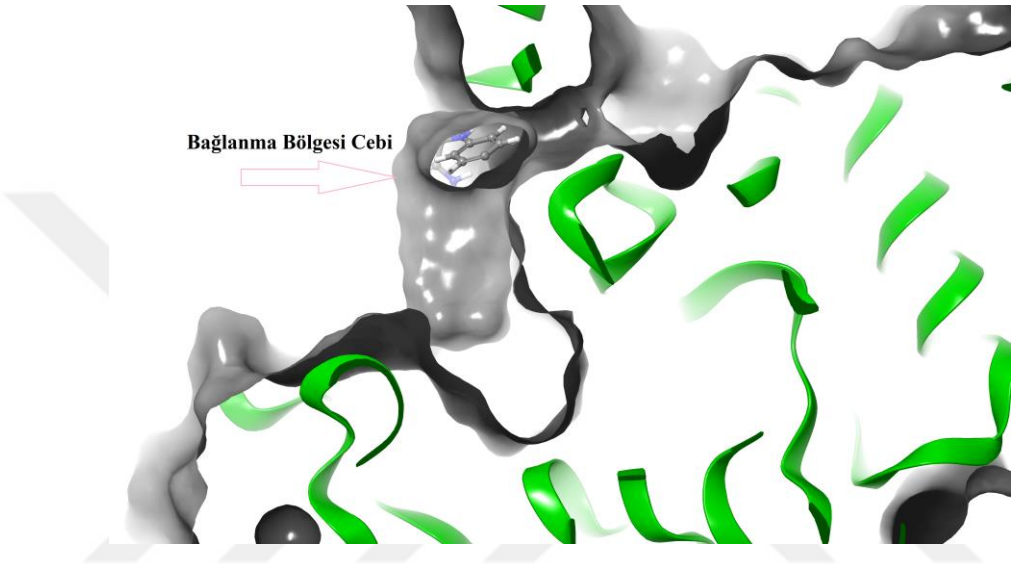
Çizelge 4.2. Alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F) ve alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enzimleri ile bileşiklerin ve referansların doking skore (DS) ve bağlanma enerjileri (ΔG)

	5E0F		**5NN5**	
	DS	**ΔG**	**DS**	**ΔG**
1	-5.337	-45.56	-5.707	-33.31
2	**-5.646**	**-47.46**	-4.881	-26.32
3	-6.336	-46.46	-6.316	-32.43
4	-6.222	-37.72	-4.800	-36.85
5	-6.921	-30.51	-5.441	-28.93
6	-6.221	-40.62	-3.267	-31.76
7	-5.542	-44.34	**-5.211**	**-38.00**
8	-6.270	-40.76	-5.204	-29.68
9	-6.838	-45.01	-5.224	-35.75
L-mimosin	-5.130	-22.30		
5J7	-9.166	**-58.87**		
Kojik asit			-5.5.08	-21.47
NOJ			-8.271	**-37.63**

Moleküler doking yöntemi kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda, alfa-amilaz enzimi için 2 numaralı ligand en iyi bağlanmıştır. Bağlanma enerjisi 47.46 kcal/mol bulunmuştur. Bu sonuç L-mimosin referans maddesinden daha iyi bağlandığını göstermektedir. Bu sonuca göre 2 numaralı bileşikte klor atomunun bağlı olduğunu görmekteyiz ve bunun sonucu daha iyi etkilediğini söyleyebiliriz. Bunun yanında Alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F) enzimi için en kötü sonuç 4 numaralı ve 5 numaralı molekül olmuştur ve bu moleküle bağlanan oksijen ve kükürt atomları sonucu olumlu yönde

etkilememiştir. Yapılan hesaplamalar sonucu bağlanma enerjisi en iyi olan ikinci bileşikte 3 numaralı bileşik olmuştur ve doking sonucu 2 numaralı bileşiğe göre daha iyi sonuç vermiştir.

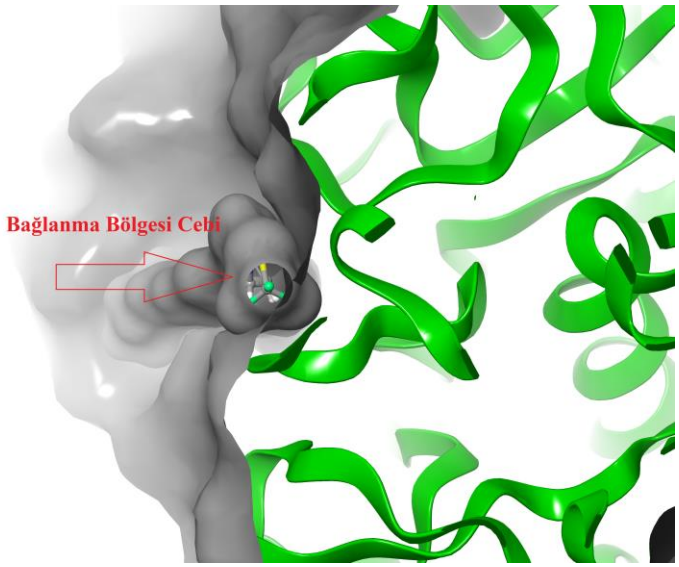
Maestro programı kullanılarak doking işlemi yapıldığında alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F) enziminin bağlanma bölgesindeki cep içinde 2 numaralı bileşiğin üç boyutlu olarak Şekil 4.3'de görülmektedir.



Şekil 4.3. Alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F) enziminin bağlanma bölgesindeki cep içinde 2 numaralı bileşik.

Alfa–glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enzimi için 7 numaralı ligand diğerlerine göre daha kararlı sonuç çıkarmıştır. Bağlanma enerjisi -38.00 kcal/mol olarak bulunmuştur. Bu değere göre bu molekül enzime ve diğer referans bileşiklere göre daha iyi bağlanmıştır. 7 numaralı molekülde flor ve kükürt atomu bağlanmıştır ve bu sonucu olumlu yönde etkilediğini görmekteyiz. Bunun yanında Alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enzimi için 2 numaralı ve 5 numaralı molekül en kötü sonucu vermiştir ve bu moleküllere bağlanan klor ve kükürt atomu sonucu olumlu yönde etkilemediğini görmekteyiz.

Maestro programı kullanılarak doking işlemi yapıldığında alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enziminin bağlanma bölgesindeki cep içinde 7 numaralı bileşiğin üç boyutlu olarak Şekil 4.4'de görülmektedir.



Şekil 4.4. Alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enziminin bağlanma bölgesindeki cep içinde 7 numaralı bileşik

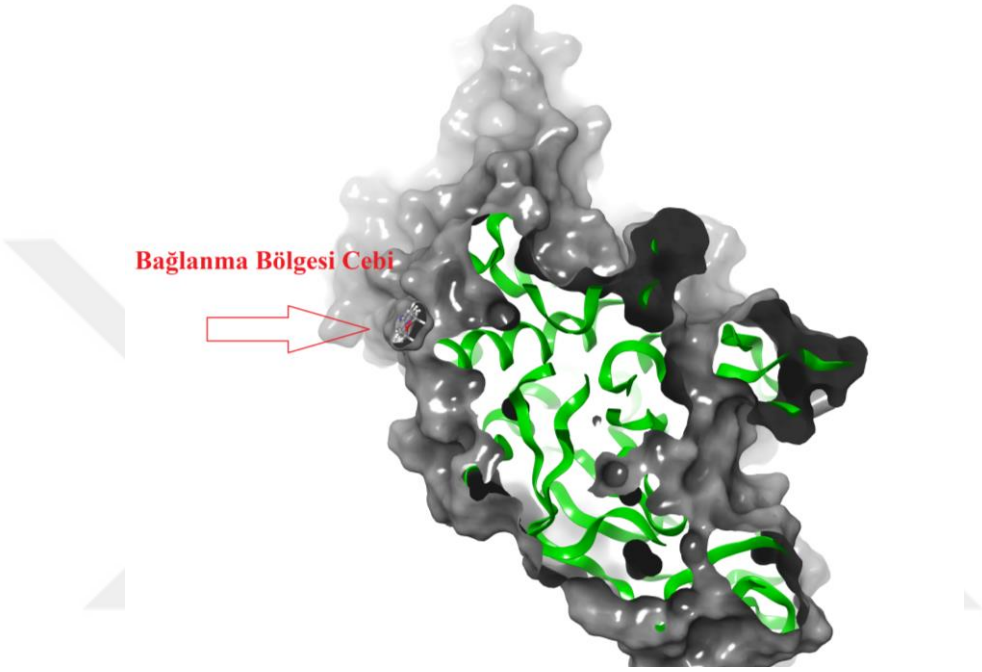
Çizelge 4.3. Üreaz enzimi (PDB ID: 7ZCY) ile bileşikler ve referansların doking skorları (DS) ve bağlanma enerjileri (ΔG).

	7ZCY	
	DS	**ΔG**
1	-4.911	-41.67
2	-4.907	-46.74
3	-4.825	-43.13
4	**-4.916**	**-52.86**
5	-4.818	-45.15
6	-3.817	-27.83
7	-4.864	-49.56
8	-4.219	-38.54
9	-4.997	-40.81
AHA	-5.016	**-16.37**

Üreaz (PDB ID: 7ZCY) enzimi için referans gösterilen asetohidroksamik asit inhibitöründeki doking sonucu 4 numaralı liganda göre daha yüksek çıkmıştır. Üreaz enzimi için 4 numaralı bileşiğin bağlanma enerjisi -52.86 kcal/mol olarak bulunmuştur ve bu hesap sonucu referans maddesi ve bileşiklere göre daha kararlı çıkmıştır. 4 numaralı

molekülde oksijen atomunun bağlı olması sonucu olumlu etkilemiştir. Bununla beraber 6 numaralı ve 8 numaralı moleküllerin sonucu en kötü çıkmıştır ve bu moleküllere bağlanan flor ve azot atomları sonucu olumlu etkilememiştir.

Maestro programı kullanılarak doking işlemi yapıldığında üreaz (PDB ID: 7ZCY) enziminin bağlanma bölgesindeki cep içinde 4 numaralı bileşiğin üç boyutlu olarak Şekil 4.5'de görülmektedir.

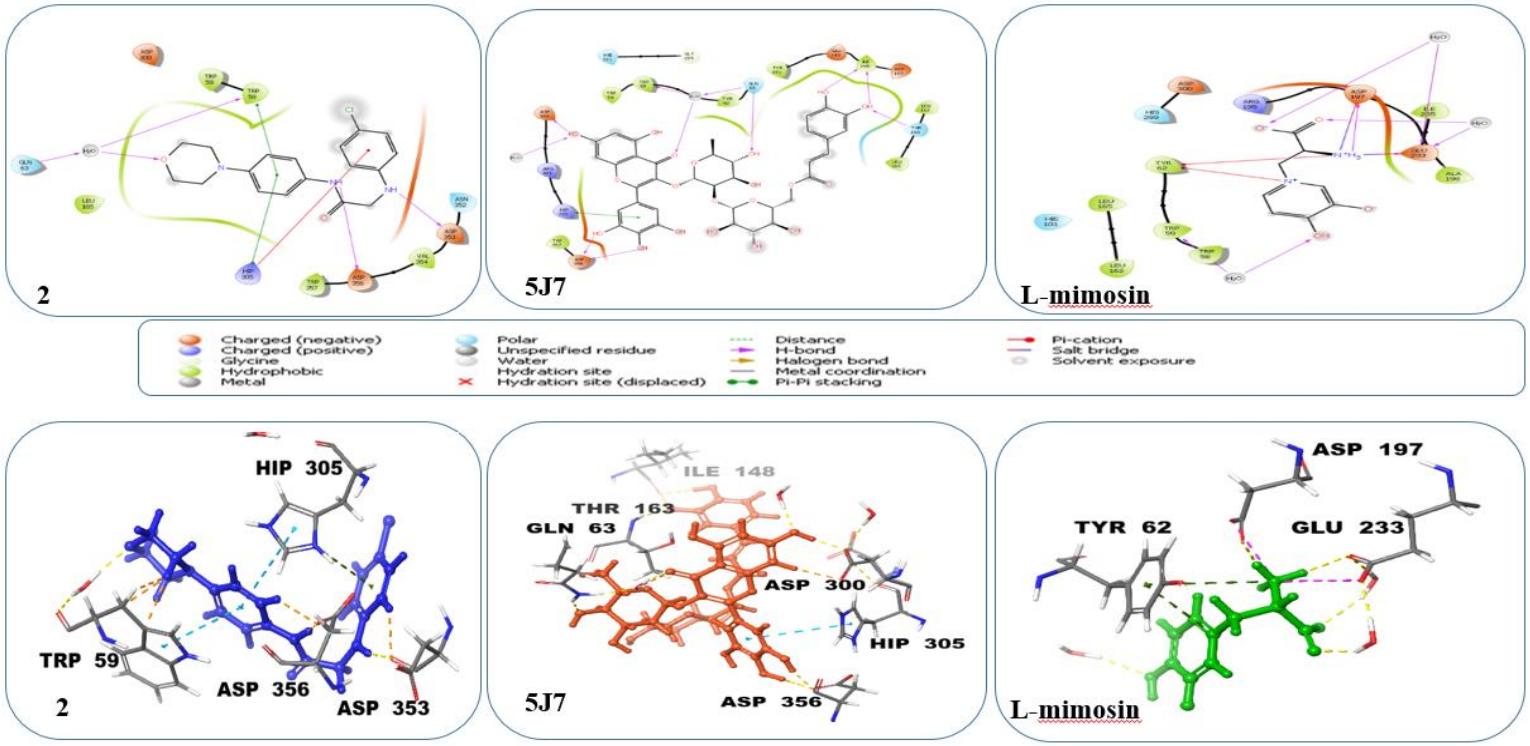


Şekil 4.5. Üreaz (PDB ID: 7ZCY) enziminin bağlanma bölgesindeki cep içinde 4 numaralı bileşik

Genel olarak tüm doking ve MM/GBSA hesaplamalarının sonuçlarına göre ligandların bağlanma enerjileri (ΔG) bileşiklerinden daha yüksektir. Tez çalışmasında kullanılan tüm bileşikler arasında 2, 4 ve 7 numaralı bileşiğin en yüksek bağlanma enerjisine sahiptir. Buna göre 2, 4 ve 7 numaralı bileşikler bu enzimlerle referans bileşiklere göre daha kararlı bir doking gerçekleşmiştir.

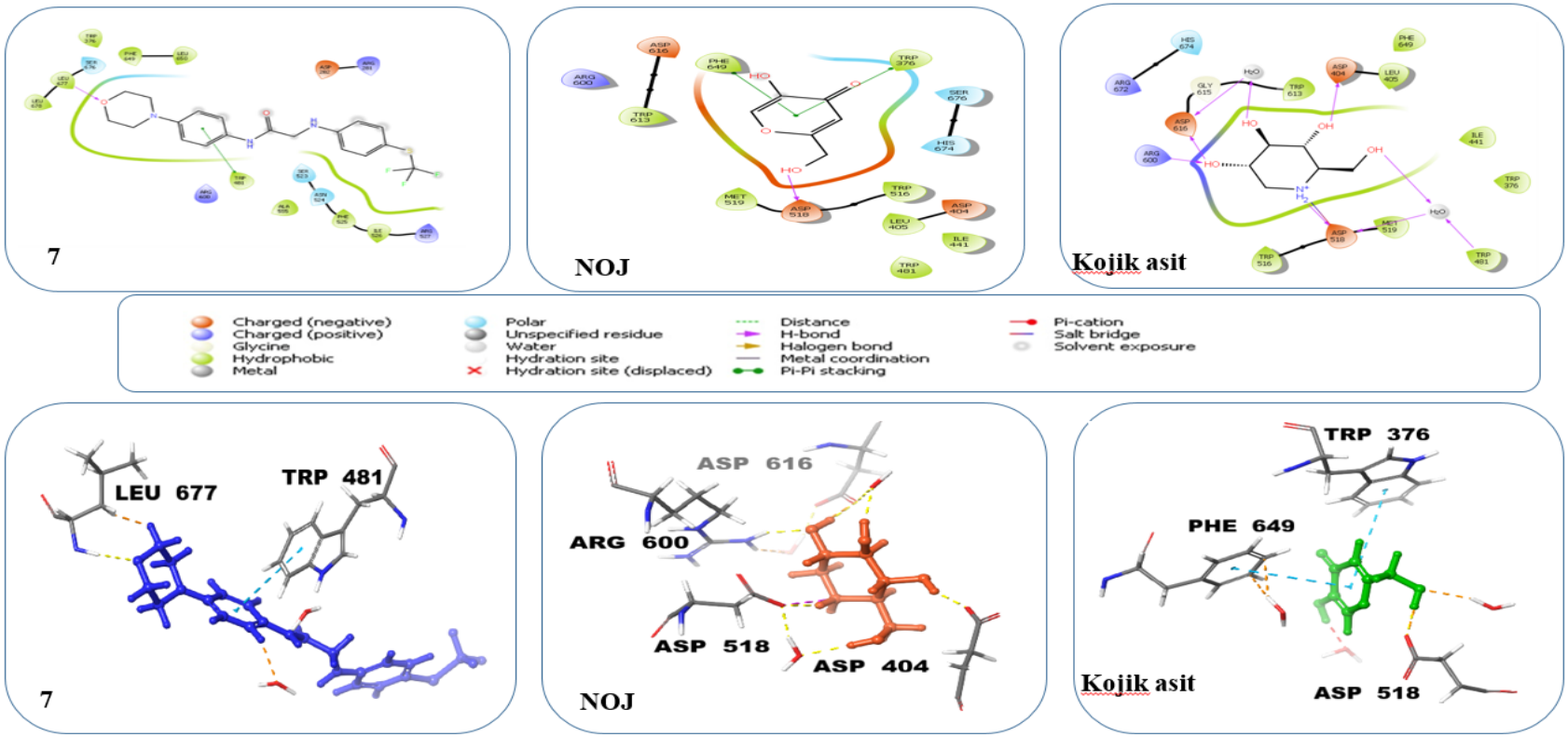
Bu çalışmada kullanılan her bir hedef enzim için en yüksek ΔG değerliklerine sahip bileşik ve aynı enzimin referans bileşiğine ait iki boyutlu ve üç boyutlu doking etkileşimleri Şekil 4.6-8'de verilmiştir.

Alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F) enzimi ile 2 numaralı molekül TRP59, HIP305, ASP353, ASP356 bağ etkileşimi 5J7 referansın GLN63, ILE148, THR163, ASP300, HIP305, ASP356 bağ etkileşimi L-Mimosin referans maddesiyle TYR62, ASP197, GLE233 ile hidrojen bağ etkileşimi yapmıştır.



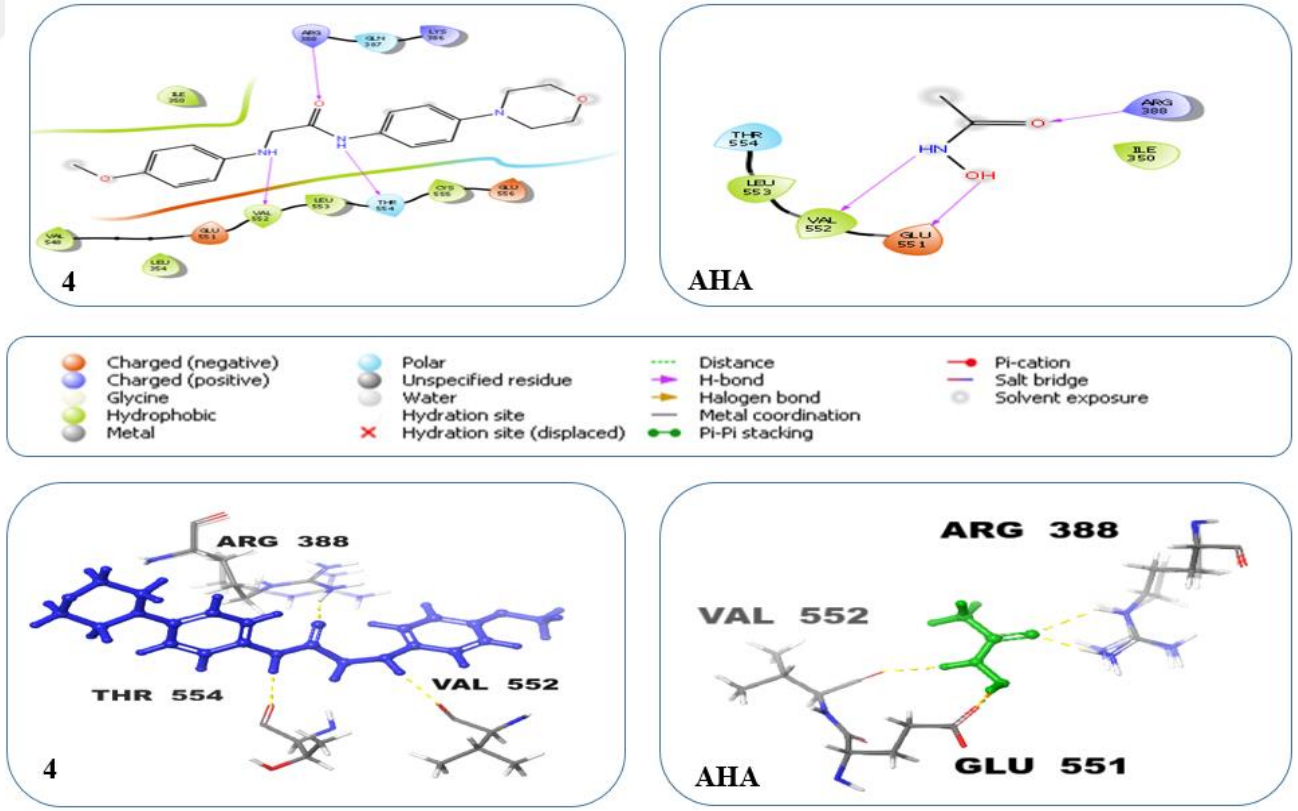
Şekil 4.6. Alfa-amilz (PDB ID: 5E0F) enzimi için 2 numaralı bileşik ve referans bileşiklerin (5J7 ve L-mimosin) kovalent olmayan etkileşimlerinin iki boyutlu ve üç boyutlu resimleri

Alfa-glukozidaz (PDB: 5NN5) enzimi ile 7 numaralı molekül TRP481, LEU677 bağ etkileşimi NOJ referans ile ASP404, ASP518, ARG600, ASP616 bağ etkileşimi kojik asit referans maddesiyle TRP376, ASP518, PHE649 ile hidrojen bağ etkileşimi yapmıştır.



Şekil 4.7. Alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enzimi için 7 numaralı bileşik ve referans bileşiklerin (NOJ ve kojik asit) kovalent olmayan etkileşimlerinin iki boyutlu ve üç boyutlu resimleri

Üreaz (PDB ID: 7ZCY) enzimi ile 4 numaralı molekül ARG388, VAL552, THR554 bağ etkileşimi AHA referans maddesiyle ARG388, GLU551, VAL552 ile hidrojen bağ etkileşimi yapmıştır.



Şekil 4.8. Üreaz (PDB ID: 7ZCY) enzimi için 4 numaralı bileşik ve referans bileşiğin (AHA) kovalent olmayan etkileşimlerinin iki boyutlu ve üç boyutlu resimleri

Bu çalışmada bileşikler için bulunan moleküler doking değerleri ve MM/GBSA değerleri ile bu moleküllerin kovalent olmayan etkileşimleri Maestro v12.5 modülü kullanılarak bulunmuştur. Çizelge 4.3-5.'de diğerleri kısmında yer alan pi-pi (π-π) etkileşimi, doymamış aromatik hidrokarbonlar birimleri arasında oluşan ve Van der Waals kuvvetlerine dayanan yani konjuge çift karbon-karbon bağları olan siklik moleküller arasındaki özel bir dispersiyon kuvveti türlerine etki eder. Pi-katyon (π-cation) etkileşimi, elektronca zengin bir π sisteminin (örneğin benzen, etilen, asetilen) yüzü ile bitişik bir katyon (örneğin Li^+, Na^+) arasındaki kovalent olmayan bir moleküler etkileşimidir. Bu etkileşim, bir monopol (katyon) ile bir kuadrupol (π sistemi) arasındaki kovalent olmayan bağın bir örneğidir. Tuz köprüsü (Salt-brige) etkileşimleri ise yüklü amino asit kalıntıları arasındaki elektrostatik etkileşimlerdir. Bazik amino asitler (örneğin lizin, arginin) ile asidik amino asitler (örneğin aspartik asit, glutamik asit) arasında zıt yüklü kalıntılar, tuz köprüsü etkileşimlerini oluşur. Bu etkileşimler proteinlerin stabilitesini ve yapısını sağlar. Her bir enzim için kullanılan ligandların kovalent olmayan etkileşimleri Çizelge 4.4-6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Bileşikler ve referans bileşiklerin alfa-amilaz (PDB ID: 5EF0) enzimi ile etkileşmesi

5E0F	HB	Hidrofobik	Polar	(pi-pi)
1	ASP356	TRP58, TRP59, TYR62, LEU165	GLN63, THR163, ASN352	TRP59, HJP305
2	TRP59,GLN63, ASP353, ASP356	TRP58, TRP59, LEU165, VAL354, TRP357	GLN63,ASN 352	TRP59, HIP305
3	TRP59, ASP356,	PRO54, TRP58, TRP59, TYR62, LEU162, LEU165, VAL354, TRP357	HIE101, HIS299	TRP58, TRP59
4	TRP59,TYR62, GLN63, THR163, GLU233, ILE235	ILE51, PRO54, PRO57, TRP59, TYR62, LEU162, LEU165, ALA198, ILE235, TRP357	GLN63, THR163, HIS201	TRP59
5	TYR151, ASP300, HIP305,	TRP58, TRP59, TYR65, TYR151, LEU162, LEU165, ILE235, LEU237	HIE101, THR163	
6	GLN63, THR163, ARG195	ILE51, TRP58, TRP59, TYR62, ALA106, VAL107, LEU165, ALA198, ILE235	GLN63, THR163, ASN298, HIS299	TRP58
7	ASP300, HIP305	TRP58, TRP59, TYR62, LEU162, LEU165, ALA198, ILE235, LEU237, ALA307	HIE101	
8	SER43	PHE17, PRO44, TRP58, TRP59, TYR62, LEU162, LEU165	SER43,HIE1 5,THR163, GLN41,HIS2 99	TYR62
9	TRP59, GLU233, ASP300	PRO54, TRP58, TRP59, TYR62, VAL98, LEU162, LEU165, ALA198,T RP357	HIE101	TRP58, TRP59
L-mimosin	GLU18, SER43	PHE17, PRO44, TRP58, TRP59, TYR62, VAL98	HIS15, SER43, HIS299	
5J7	GLN63, ILE148, THR163, ASP300, ASP356	TRP58, TRP59, TYR62, ILE148, TYR151, LEU162, LEU165, TRP357	GLN63, HIE101	HIP305

Çizelge 4.5. Bileşikler ve referans bileşiklerin alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enzimi ile etkileşmesi

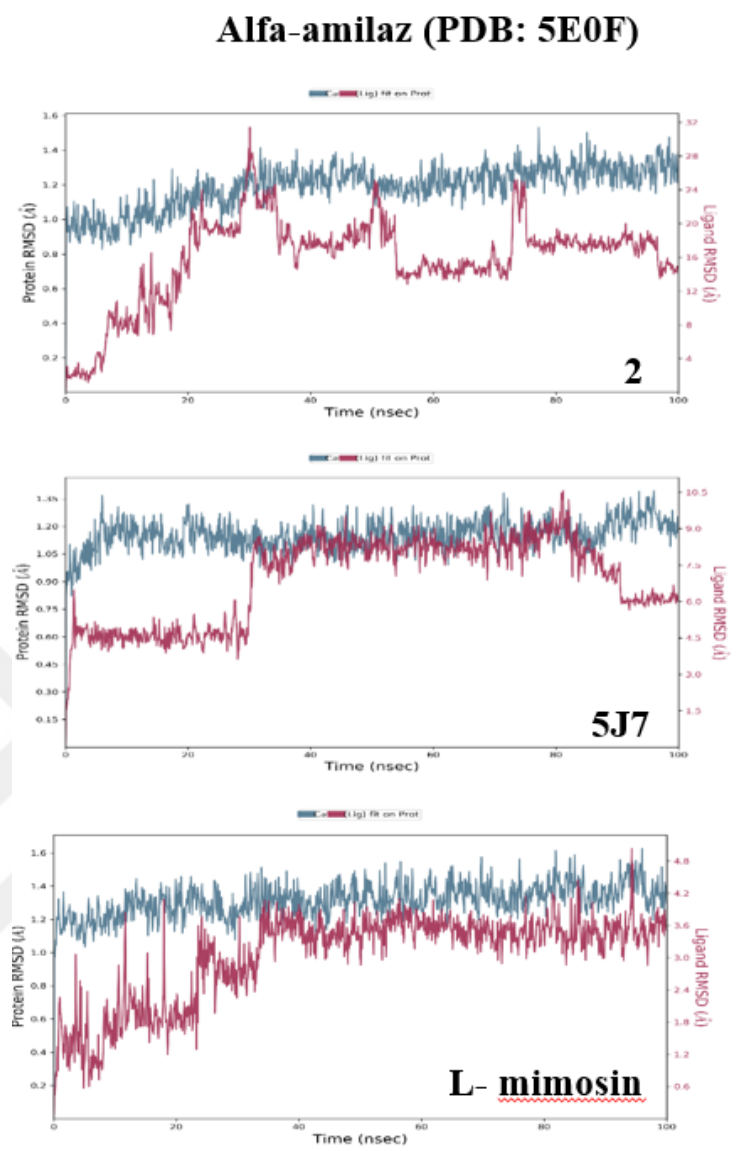
5NN5	HB	Hidrofobik	Polar	(pi-pi)
1	TRP59, GLN63, ILE148, HR163, ASP300, ASP356	TRP58, TRP59, TYR62, ILE148, TYR151, LEU162, LEU165, TRP357	HIS674, SER676	HIP305
2	LEU677	TRP376, LEU405, ILE441, TRP481, TRP516, MET519, TRP613, TRP618, PHE649, LEU650, LEU677, LEU678	HIS674, SER676, SER679	PHE649
3	LEU677, TRP613	TRP376, ILE441, TRP481, TRP516, MET519, TRP613, PHE649, LEU677, LEU678	HIS674, SER676	TRP481, PHE649
4	ASP616	TRP376, ILE441, VAL480, TRP481, TRP516, MET519, PHE525, PHE649, LEU650, TRP613, LEU677	HIS674	TRP481
5		TRP376, LEU405, ILE441, TRP481, TRP516, MET519, TRP613, TRP618, LEU650, LEU677, LEU678	HIS674, SER676, SER679	PHE649
6	TRP481	TRP376, LEU405,I LE441, VAL480, TRP481, TRP516, MET519, PHE525, TRP613, PHE649	HIS674	TRP481
7	LEU677	TRP376, TRP481, PHE525,I LE526, ALA555, PHE649, LEU650, LEU677, LEU678	ASN523, ASN524 SER676	TRP481
8	LEU405, ASP616	LEU283, ALA284, TYR292, TRP376, LEU405, ILE441, TRP481, TRP516, MET519, PHE649, LEU650, LEU678	SER676	PHE649
9	ARG411	TRP376, LEU405, ILE441,T RP481, TRP516, MET519, TRP613, PHE649, LEU650, LEU677, LEU678	HIS674, SER676	
Kojik asit	ASP404, ARG600, ASP616	TYR292, TRP376, LEU405, ILE441, TRP481, PHE649	HIS674	
NOJ	ASP404, TRP481, ASP518, ARG600, ASP616	TRP376, LEU405, ILE441, TRP481, TRP516, MET519, TRP613, PHE649	HIS674	

Çizelge 4.6. Bileşikler ve referans bileşiklerin üreaz (PDB ID: 7ZCY) enzimi ile etkileşmesi

7ZCY	HB	Hidrofobik	Polar
1	ARG388, VAL552, THR554	VAL533, ILE350, LEU354, ILE356, VAL552, LEU553, CYS555	GLN387, THR554
2	ARG388, VAL552, THR554	VAL548, LEU350, VAL552, LEU553, CYS555	GLN387, THR554
3	ARG388, VAL552, THR554	ILE350, LEU354, VAL548, VAL552, LEU553, CYS555	GLN387, THR554
4	ARG388, VAL552, THR554,	ILE350, LEU354, VAL548, VAL552, LEU553, CYS555	GLN387, THR554
5	ARG388, THR554	ILE350, LEU354, MET384, VAL548, VAL552, LEU553, CYS555	GLN387, THR554
6	ARG388, ALA392, GLU551, VAL552,	ILE350, LEU354, PRO390, LEU391, ALA392, VAL552, LEU553, CYS555	GLN387, THR554
7	ARG388, VAL552, THR554	ILE350, LEU354, ILE356, VAL552, LEU553, CYS555	GLN387, THR554
8	ARG388, THR554	ILE350, LEU354, VAL552, LEU553, CYS555	GLN387, THR554
9	GLN387, ARG388, AL552	ILE350, LEU354, ILE356, VAL548, VAL552, LEU553, CYS555	GLN387, THR554
AHA	ARG388, GLU551, VAL552	ILE350, VAL552, LEU553	THR554

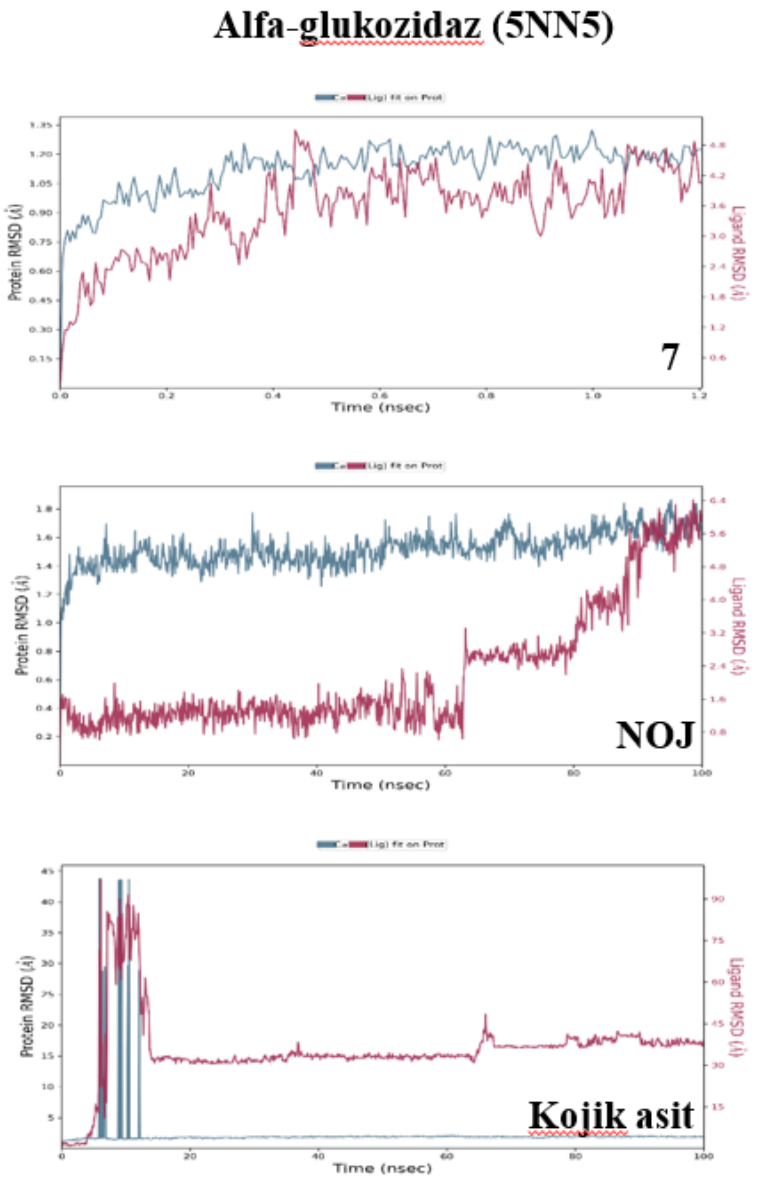
4.2. Moleküler Dinamik Simülasyon

Doking skorlarına ve MM/GBSA serbest bağlanma enerjilerine göre en iyi sonuçlara sahip bileşiklerin-ve referans maddelerin kararlılığını belirlemek amacıyla 100 ns süresi boyunca moleküler dinamik simülasyonu yapıldı. Moleküler dinamik simülasyonunda elde edilen bileşik ve referans bileşiklerin etkileşimlerinin simülasyon zamanı boyunca bileşiklerin enzim ile etkileşimlerini gösteren Ortalama Kare Sapma Kökü (RMSD) ait grafik Şekil 4.9-11'de verilmiştir. Burada grafiğin referans maddesiyle paralel gitmesi bu bileşiğin ilaç olma ihtimalini arttırırken, dalgalanmaların fazla olması ilaç olma ihtimalini düşürmektedir.



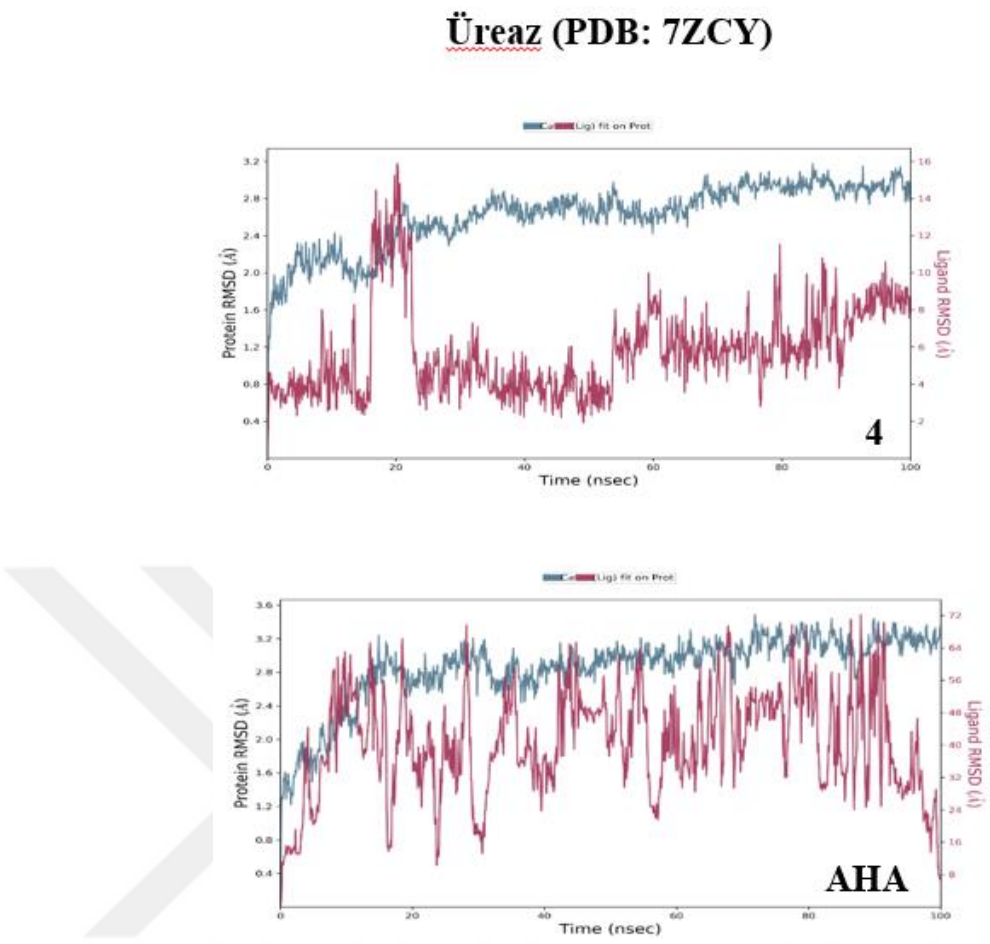
Şekil 4.9. Alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F) enzimi ile aktif bölgesine bağlanan 2 numaralı bileşik ve referans bileşiklerin (5J7 ve L-mimosin) 100ns süre için RMSD grafikleri

Belirlenen 4 numaralı bileşik referans maddesine (5J7, L-mimosin) göre RMSD grafiği daha düzensiz çıkmıştır. Şekil(4.9) Alfa-amilaz için 2 numaralı bileşiğin RMSD grafiğine göre 30 ns, 50 ns, 70 ns zaman aralığında sonuç referans maddesine göre paralel giderken diğer aralıklarda kopukluk olmuştur. Bu da ilaç olma ihtimalini düşürmektedir.



Şekil 4.10. Alfa- glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enzimi ile aktif bölgesine bağlanan 7 numaralı bileşik ve referans bileşiklerin (NOJ ve kojik asit) 100 ns süre için RMSD grafikleri

Bu enzim için edilen RMSD grafiği referans maddelerine (NOJ, kojik asit) göre daha iyi çıkmıştır. 7 numaralı molekül alfa-glukozidaz enzimi için RMSD grafiğine göre 0.3 ns, 0.5 ns, 0.6 ns, 0.7 ns, 1.1 ns zaman aralığında sonuç referans maddesine göre paralel giderken diğer zaman aralıklarında kopukluk olmuştur.

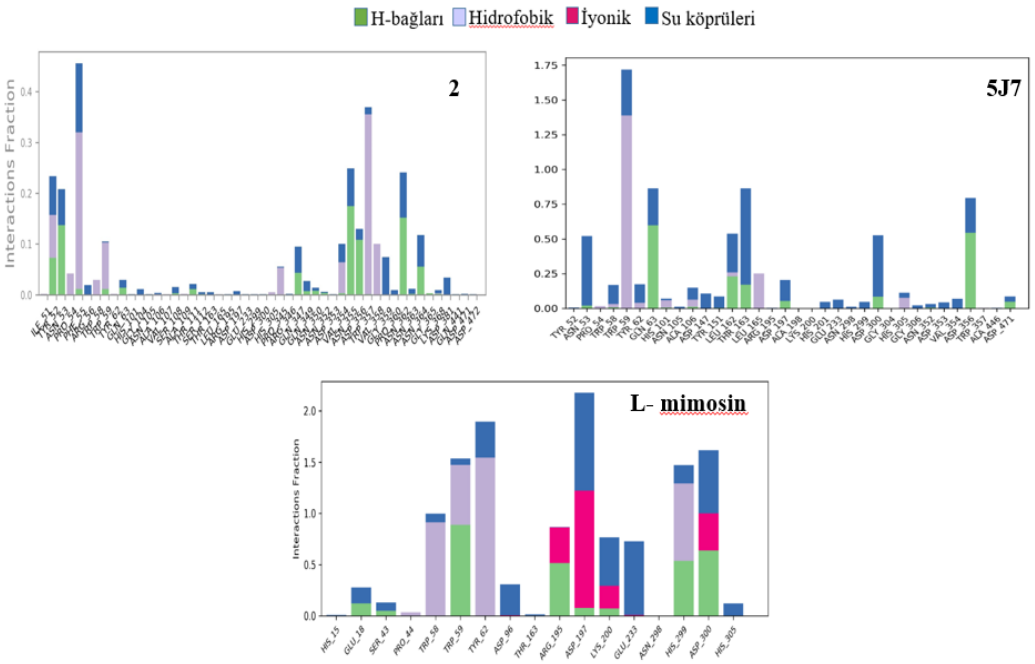


Şekil 4.11. Üreaz (PDB ID: 7ZCY) enzimi ile aktif bölgesine bağlanan 4 numaralı bileşik ve referans bileşiğin (AHA) 100 ns süre için RMSD grafikleri

4 numaralı bileşiğin üreaz (7ZCY) enzimi ile etkileşmesinden elde edilen RMSD grafiği referans maddesine göre daha düzensiz çıkmıştır. Bu grafiğe göre sonuç referans maddesine göre çok kopuk olduğu için ilaç olma özelliği taşımamaktadır.

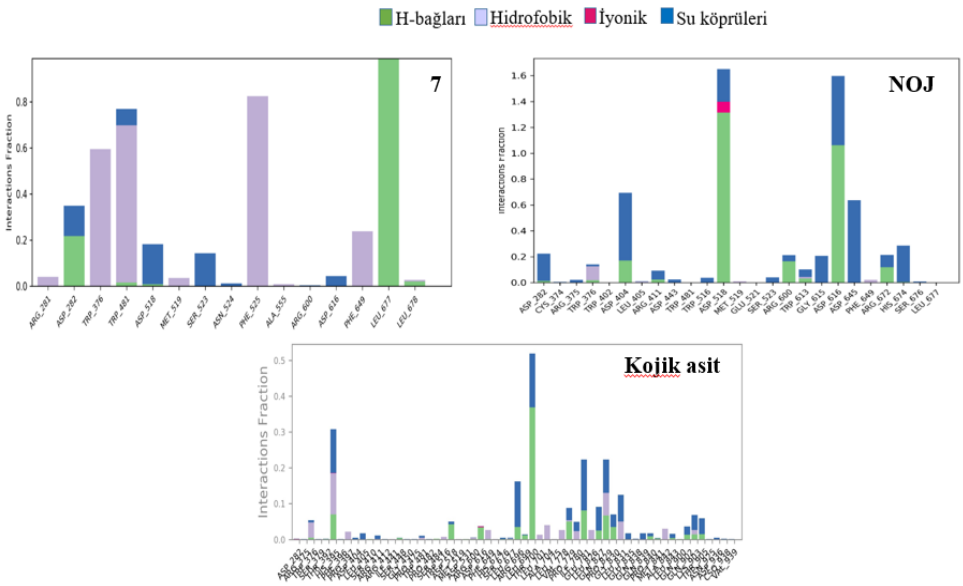
Aşağıda protein-ligand temas diyagramı Şekil 4.12-14'te verilmiştir. Yeşil renkler Hidrojen-bağı etkileşimini, mor renk hidrofobik, pembe renk iyonik bağı, koyu mavi renk su köprülerini göstermektedir.

2 numaralı molekül ve referans gösterilen maddeler için (5J7 ve L-mimosin) bileşiklerin Alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F) ile moleküler dinamik protein ligandı temasları. Simülasyon sırasında kalıntıların ve ligandların etkileşimleri aşağıdaki gibidir.



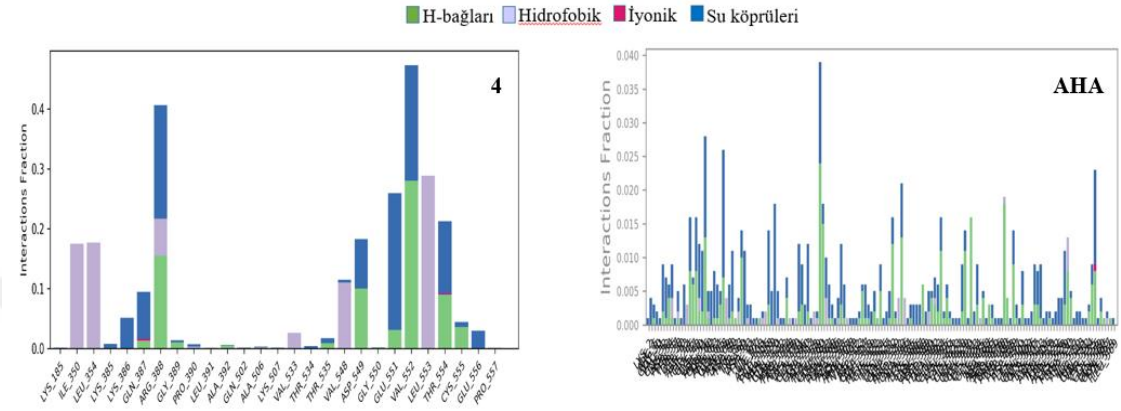
Şekil 4.12. Alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F) enziminin 2 nolu ve referans bileşikleri ile etkileşimi

Alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) ile 7 numaralı molekül ve referans maddeleri (NOJ, kojik asit) bileşiklerinin moleküler dinamik simülasyonunda etkileştiği amino asitler aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.13. Alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enziminin7 nolu ve referans bileşikleri ile etkileşimİ

4 numaralı molekül ve asetohidroksamik asit bileşiklerinin ve aynı kökenli ligandların üreaz (PDB ID: 7ZCY) ile moleküler dinamik protein ligandı temasları. Simülasyon sırasında enzimlerin aminoasitleri ile bileşiklerin ve etkileşimleri aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.14. Üreaz (PDB ID: 7ZCY) enziminin 4 nolu ve referans bileşiği ile etkileşimi

4.3. Farmakokinetik Analiz ve ADME Çalışması

Ligandların ADME profilleri, ilaç hazırlama aşamasına geçmeden önce ilaç kabiliyetinin bilinmesi açısından oldukça önemlidir. ADME hesaplamalarının ardından moleküllere ait çok sayıda parametre hesaplandı. Araştırılan ligandların farmakokinetik özellikleri, Schrödinger'in QikProp aracı (QikProp, versiyon 6.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020-3) kullanılarak değerlendirildi.

Bu çalışmada Çizelge 1.1.'deki bileşiklerin hidrojen bağı donörlerinin sayısı, molekül ağırlığı, lipofilikliği (Log Po/w), hidrojen bağı alıcılarının sayısı ve molar refraktivitesi, LogKp değerleri Çizelge 4.7'de gösterilmiştir. Bu çalışmadaki tüm bileşiklerin Lipinski'nin beş kuralı kullanılarak ilaç benzerlik özellikleri açısından değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.7. Çalışılan bileşiklerin ilaç benzerlik özellikleri

	MW (g/mol)	Alıcı HB sayısı	Verici HB sayısı	LogP	QPlogKp	%HOA (*)	BBB geçirgen	İlaç benzerlik
1	311	6.2	2	3.12	-1.14	100	HAYIR	EVET
2	346	6.2	2	3.60	-1.30	100	HAYIR	EVET
3	329	6.2	2	3.35	-1.27	100	HAYIR	EVET
4	341	6.95	2	3.21	-1.24	100	HAYIR	EVET
5	357	6.7	2	3.75	-1.26	100	HAYIR	EVET
6	395	6.2	2	4.22	-1.27	100	HAYIR	EVET
7	411	6.2	2	4.60	-1.29	100	HAYIR	EVET
8	303	7.2	1	2.18	-3.68	93	HAYIR	EVET
9	305	8.9	1	1.15	-3.77	86	HAYIR	EVET
Standart	130-725	2.0-20.0	0-6	2.0-6.5	(-8.0/-1.0)			

HB: Hidrojen bağı

HOA: İnsan ağız emilimi, *<25 zayıf ve *>80 iyi

Tüm bileşiklerin molekül ağırlığı (mol MW) uygun değerlerde çıkmıştır. Hacimleri verilen standart değerler arasındadır. Hidrojen bağı alıcı değerleri 4'den büyük, hidrojen bağı verici değerleri 3'den küçük olarak hesaplanmıştır. Bileşikler için LogP değerleri 5'ten küçüktür ve biyolojik membrandan geçme eğiliminin daha yüksek olduğu öngörülmüştür. Bu bileşiklerin öngörülen lipofiliklik değerleri (3.75)-(1.15) Log Po/w aralığındadır. Bileşiklerin cilt geçirgenliği PlogKp değerleri verilen ilaç benzerlik değer sınırları içindedir. Bunun yanında HOA değerleri tüm bileşikler için 80 ve üzeri çıkmıştır. Bu bileşiklerin sonuç değerleri ilaç benzerliği açısından avantajlı olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasında belirlenen 9 ligandın alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F), alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) ve üreaz (PDB ID: 7ZCY) enzimlerinin moleküler doking, moleküler dinamik ve ADME yöntemleriyle test edilip hesaplanmıştır. Çalışılan bileşikler moleküler doking yöntemleriyle analiz edildi ve sonuçlar referans bileşikleriyle (5J7, L-mimosin, NOJ, kojik asit, asetohidroksamik asit) karşılaştırıldı.

Bu çalışmada, belirlenmiş bu bileşiklerin diyabet, ülser ve gastrit hastalığına etkisini anlamak için moleküler doking analizi yapıldı. Yapılan analizler, bu ligandların belirlenen hastalıklar üzerinde potansiyel terapötik etkiye sahip olup olmadığı hakkında bilgi sahibi olmak için bilgiler toplandı. Moleküler doking analizi, belirlenen bileşiklerin alfa-amilaz (PDB ID: 5E0F), alfa- glukozidaz (PDB ID: 5NN5) ve üreaz (PDB ID: 7ZCY) hedef enzimleri ile olası etkileşim mekanizmalarını ve bağlanma enerjilerini (ΔG) değerlendirmek için kullanıldı. Bu bileşiklerin aktivitelerini daha iyi anlamak için farmakokinetik analiz ve ADME çalışmaları yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir.

ADME verilerine göre bu 9 bileşik ilaç olma özelliği taşımaktadır. Fakat belirlenen hastalıklara karşı Moleküler Dinamik Simülasyonuna göre RMSD grafiği istenilen düzeyde dengeli ve kararlı çıkmamıştır. Alfa -amilaz (PDB ID: 5E0F) enzimi yapılan hesaplamalar ve çalışmalar sonucunda en kararlı olan 2 numaralı bileşiğin diyabet ve şeker hastalığına karşı inhibitör madde olma olasılığı düşük çıkmıştır. Bunun yanında alfa-glukozidaz (PDB ID: 5NN5) enzimi için yapılan çalışmalar sonucunda en kararlı olan 7 numaralı bileşiğin inhibitör madde olma olasılığı diğerlerine göre yüksek çıkmıştır.

Üreaz (PDB ID: 7ZCY) enzimi için yapılan çalışmalar sonucunda en kararlı ve en düşük enerjiye sahip olan 4 numaralı bileşiğin ülser, gastrit hastalığına karşı inhibitör madde olma olasılığı düşük çıkmıştır.

KAYNAKLAR

Aktumsek, A., Güler, G. Ö., Çakmak, Y. S. ve Zengin, G., 2018. **Temel Biyokimya**, Nobel Akademik Yayıncılık

Amtul, Z., Rasheed, M. ve Choudhary, M., 2004. Kinetics of novel competitive inhibitors urease enzymes by a focused library of oxadiazoles/thiadiazoles and triazoles, **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 1053-1063.

Andersen, M. E., & McKenna, M. J., 1981. Saturable metabolism and its relationship to toxicity. **CRC Critical Reviews in Toxicology**, 9(2), 105–150.

Ari, A., 2006. Histolojik olarak mide kanseri ile Helicobacter pylori arasındaki ilişki. Uzmanlık Tezi, **TC Sağlık Bakanlığı İstanbul Eğitim Hastanesi Genel Cerrahi Bilim Dalı,** İstanbul, 60 sayfa.

Balbaa, M., Mansour, H., El-Sawy, H., & El-Ashry, E.-S. H. (2002). Inhibition of some hepatic glycosidases by the diseco nucleoside, 4-amino-3-(D-glucopentitol-1-yl)-5-mercapto-1, 2, 4-triazole and its 3-methyl analog. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, 21(10), 695–708.

Balcı, K., 2019. **Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi**, İstanbul, Armoni Nüans Baskı Sanatları. 192.

Bourne, Y. and Henrissat, B., 2001. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. **Current Opinion in Structural Biology**. 11: 593-60015.

Bryan, R. F.,2002. Handbook of metalloproteins. Vols. 1 \& 2. Edited by Albrecht Messerschmidt, Robert Huber, Thomas Poulos and Karl Wieghardt. Chichester: John Wiley \& Sons, 2001. Pp. xxviii + 1472. Price US\$945.00. ISBN 0-471-62743-7. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, 58, 1084.

Burne, R. A. and Chen, Y., 2000. Bacterial ureases in infectious diseases, **Microbes and Infection**. 533–542.

Chin, Y.-W., Balunas, M. J., Chai, H. B. ve Kinghorn, A. D., 2006. 2006 Drug discovery from natural sources, **The AAPS Journal**,. E239–E253.

Collins, C. M., & D'Orazio, S. E. F., 1993. Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis. **Molecular Microbiology**, 9(5), 907–913.

Copeland, R. A., 2005. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery, **New Jers**.

Crampon, K., Giorkallos, A., Deldossi, M., Baud, S., & Steffenel, L. A. (2022;2021;). Machine-learning methods for ligand–protein molecular docking. **Drug Discovery Today**, 27(1), 151-164.

https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.09.007. Machine-Learning Methods for Ligand–Protein Molecular Docking. Drug Discovery Today, 151–164.

Dinç, Y., 2009. Üreaz Enziminin Bazi Tibbi Bitkiler Tarafindan İnhibisyonu, Yüksek Lisans Tezi, **İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,** İstanbul, 89 sayfa.

Dindar B., K. E. ve A. F., 2011. New urea biosensor based on urease enzyme obtained from Helicobacter pylori, **Appl Biochem Biotechnol**. 5–6.

Dunn, B.E., Campbell, G.P., Perez-Perez, G.L. and Blaser, M.J., 1990. Purification and characteriz., 1990. Purification and characterization of urease from Helicobacter pylori, **The Journal of Biological Chemistry**. 9464–9469.

Ece Şeyma., 2019. 4-(morfolin-4-il)anilinden türeyen amit bileşiklerinin sentezi ve karakterizasyonu, **Gaziantep Üniversitesi,Fen Bilimleri Enstitüsü**, Kimya Ana Bilim Dalı.Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep, 97 Sayfa.

El-Bastawissy, E. . K. M. H. . G. I. ., 2001. "Molecular Dynamics Simulations Of Wild-

type And Point Mutation Human Prion Protein At Normal And Elevated Temperature, **"J Mol Graph Model"**. 145-54.

El-Hefnawy, M. E., Sakran, M., Ismail, A. I., & Aboelfetoh, E. F., 2014. Extraction, purification, kinetic and thermodynamic properties of urease from germinating Pisum Sativum L. seeds. **BMC Biochemistry**, 15, 1–8.

Fan, J., Fu, A., Z. L., 2019. **Progress in molecular docking**. Quantitative Biology. 8389.

Fishbein, W. N., & Carbone, P. P., 1965. Urease Catalysis: II. Inhibition of the enzyme by hydroxyurea, hydroxylamine, and acetohydroxamic acid. **Journal of Biological Chemistry**, 240(6), 2407–2414.

Follmer C., Real-Guerra R., Wasserman G., O.-S. D. ve C. C., 2004. Jackbean, Soybean and Bacillus pasteurii ureases biological effects unrelated to ureolytic activity, **Europen Journal of Biochemitry**. 1357–1363.

Genheden, S. and Ryde, U., 2015. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. **Expert Opinion on Drug Discovery**, 10(5), 449–461. https://doi.org/1. 449–461.

Ghous, T., Akhtar, K., Nasim, F. U. H., & Choudhry, M. A., 2010. Screening of selected medicinal plants for urease inhibitory activity. **Biology and Medicine,** 2(4), 64–69.

HJ., B., 1994. **J Comput Aided Mol Des**. 1994 Jun;8(3):243-56. doi: 10.1007/BF00126743. PMID: 7964925.

Hodgson, J., 2001. ADMET—turning chemicals into drugs. **Nature Biotechnology**, 19(8), 722726. https://doi.org/10.1080/00958972.2015.1055258.

Houimel, M., Mach, J., Corthésy-Theulaz, I., Corthésy, B., & Fisch, I., 1999. New inhibitors of Helicobacter pylori urease holoenzyme selected from phage-displayed peptide libraries. **European Journal of Biochemistry**, 262(3), 774–780.

I Muegge, I. E., 2004. **Current medicinal chemistry**. 693–707.

Japan, A. R. S. of., 1988. Handbook of Amylases and Related Enzymes: Their Sources, Isolation Methods, **Properties and Applications**. Pergamon.

Johnston B D, Ghavami A, Jensen M T, Svensson B, P. B. Mj., 2002. Synthesis of Selenium Analogues of the Naturally Occurring Glycosidase İnhibitor Salacinol and their Evaluation as Glycosidase İnhibitors, **Journal of the American Chemical Society**. 8245–8250.

Kara, F., 2006a. Üreazın alginat-kitosan polielektrolit ve poli(akrilat-ko-akrilik asit)/kkarrogenan interpolimer komplekslerine immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi, Ankara, Fen Bilimleri Enstitüsü**, 10-28. 2006. Üreazın alginat-kitosan polielektrolit ve. 10–28.

Kara, F., 2006b. Üreazın alginat-kitosan polielektrolit ve poli(akrilat-ko-akrilik asit)/kkarrogenan interpolimer komplekslerine immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi, Ankara, Fen Bilimleri Enstitüsü**. 10–28.

Kökçü, Y., 2019. "Antitümör ve Antioksidant Özellikli Tripeptid Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Geliştirilmesi" 2019, **İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü** Yüksek Lisans Tezi.

Krajewska, B., Zaborska, W. ve Leszko, M., 2001a. İnhibition of chitosan- immobilizated urease by slow- binding inhibitors, **Journal of Moleculer Catalysis B:Enzymatic**,. 101-109.

Krajewska, B., Zaborska, W. ve Leszko, M., 2001b. İnhibition of chitosan- immobilizated urease by slow-binding inhibitors, J**ournal of Moleculer Catalysis B:Enzymatic**. 101–109.

Krajewska, B., 2009. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review.

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 59(1–3), 9–21.

Li, X., & Mobley, H. L. T.,2002. Vaccines for Proteus mirabilis in urinary tract infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 19(6), 461–465. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0924-8579(02)00102-4

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. and Feeney, P. J., 2012. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. and Feeney, P. J., 2012. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 64, 4–17. https://doi.org/h. 4–17.

MacGregor, E. A., 2005. An overview of clan GH-H and distantly-related families. **Biologia**, 60(Supplement 16), 5–12.

Mai TT, T. N., 2007. Alpha-Glucosidase İnhibitory and Antioxidant Activities of Vietnamese Edile Plants au NN, Tien PG, **Vann Their Relationship ith Polyphenol Contents. J Nutr Sci Vitaminol**. 267–276.

Mann S, Beedie C, Balducci S, Zanuso S, Allgrove J, Bertiato F, J. A., 2014. Changes in İnsulin Sensitivity in Response to Different Modalities of Exercise: a Review of the Evidence, **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**. 257268.

Memişoğulları.R., 2005. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkileri, **Düzce Tıp Fakültesi Dergisi**. 30–39.

Mir, M. A., Sawhney, S. ve Jassal, M., 2015. In-vitro antidiabetic studies of various extracts of Taraxacum officinale, **The Pharma Innovation**. 4 (1, Part B), 61.

Mobley, H. L., & Hausinger, R. P., 1989. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiological Reviews**, 53(1), 85–108.

Muhammad, N., Saeed, M., Khan, A., Adhikari, A., Wadood, A., Khan, K.M. ve De Feo, V., 2014. A New Urease İnhibitor from Viola betonicifo. **Molecules**. 19, 1677016778.

Nigam, P., & Singh, D., 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. **Enzyme and Microbial Technology**, 17(9), 770–778.

Richter, G., 1990. **Handbook of Amylases and Related Enzymes**. Edited by the Amylase Research Society of Japan. Pergamon Press, Oxford 1988. 274 pp., with 57 Figures and 102 Tables. ISBN 0-08-036141-2. Hardcover DM 152,-. Wiley Online Library.

Salmanoğlu, M., 2020. Type 2 Diabetes Treatment With Oral Antidiabetic Drugs. **Klinik Tıp Bilimleri Dergisi**, 20, 20–23.

Scapin, G., Patel, S. B., Becker, J. W., Wang, Q., Desponts, C., Waddleton, D., and Asante- Appiah, E., 2003. The structural basis for the selectivity of benzotriazole inhibitors of PTP1B. **Biochemistry**, 42(39), 11451-11459.

Schröder, J., Klinger, A., Oellien, F., Marhöfer, R. J., Duszenko, M., and Selzer, P. M., 2013. Schröder, J., Klinger, A., Oellien, F., Marhöfer, R. J., Duszenko, M., and Selzer, P. M., 2013a. rnal of Medicinal discovery approac. Jou ChemisthDocking-based virtual screening of covalently binding ligands: **An orthogonal leadry**, 56(4), 1478–1490.

Schrödinger Release QikProp, versiyon 6.5, Schrödinger, LLC, New York, NY.

Schrödinger Release 2020–3: https://www.schrodinger.com/releases/release-2020-3. Erişim tarihi: 25.03.2024

Schrödinger Release 2020–3: LigPrep, LLC, New York, NY, 2020.

Schrödinger Release 2020–3: Maestro, LLC, New York, NY, 2020.

Searle T, Al-Niaimi F, A. F., 2020. The top 10 cosmeceuticals for facial

hyperpigmentation. **Dermatologic Therapy** 2020,.

Türkkan, S., 2013. Monoamin Oksidaz (MOA) İnhibitör Etkili Pirozolin Türevleri İle Moleküler Doking. **Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,** Kimya Anabilimdalı Organik Kimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 105 sayfa.

Uhlig, H., 1998. Industrial enzymes and their applications. John Wiley & Sons.

Umezawa, K., Kojima, I., Simizu, S., Lin, Y., Fukatsu, H., Koide, N., Nakade, Y., &

Yoneda, M., 2018. Therapeutic activity of plant-derived alkaloid conophylline on metabolic syndrome and neurodegenerative disease models. **Human Cell**, 31, 95–101.

Wirngo, F. E., Lambert, M. N. ve Jeppesen, P. B., 2016. 2016, The Physiological Effects of Dandelion (Taraxacum Officinale) in Type 2 Diabetes, **The Review of Diabetic Studies**. 113–131.

Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R. ve Ceylan, O., 2014. A comprehensive study on phytochemical characterization of Haplophyllum myrtifolium Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes, **Industrial Crops and Products**. 244–251.

Zengin, G., 2016. A study on in vitro enzyme inhibitory properties of Asphodeline anatolica: New sources of natural inhibitors for public health problems, **Industrial Crops and Products**. 39-43.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar, ilk ve ortaokul eğitimini ve Lise öğrenimini Hatay Samandağ'da tamamladı. Çukurova Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliğinden 2012 yılında mezun oldu. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalında Yüksek Lisans derecesiyle mezun oldu. Evli ve iki çocuk annesidir. 10 yıldır bir devlet okulunda Fen Bilgisi Öğretmeni olarak görev yapmaktadır.