



**BAZI BİTKİSEL LİGANDLARIN VE TÜREVLERİNİN
ANTİHELMİNTİK ETKİLERİNİN *IN SILICO*
MOLEKÜLER MODELLEME YÖNTEMİYLE TAHMİN
EDİLMESİ**

Dilara KARAMAN



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI BİTKİSEL LİGANDLARIN VE TÜREVLERİNİN ANTİHELMİNTİK
ETKİLERİNİN *IN SILICO* MOLEKÜLER MODELLEME YÖNTEMİYLE
TAHMİN EDİLMESİ**

Dilara KARAMAN
0000-0003-4386-8531

Doç. Dr. Ahmet Onur GİRİŞGİN
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2022
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI BİTKİSEL LİGANDLARIN VE TÜREVLERİNİN ANTİHELMİNTİK ETKİLERİNİN *IN SILICO* MOLEKÜLER MODELLEME YÖNTEMİYLE TAHMİN EDİLMESİ

Dilara KARAMAN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Onur GİRİŞGİN

Helmintik enfeksiyonlar dünya üzerinde oldukça yaygındır ve 2 milyardan fazla insan en az bir helmint türü ile enfektidir. Bu çalışmada bitkisel ligand iskeletleri kullanılarak piyasadaki en sık kullanılan antihelmintik ilaçlardan daha düşük dozda etki edebilen, daha az yan etkili, ulaşılması kolay ve güvenilir yeni bir antihelmintik ilaç adayının *in silico* modelleme yöntemleriyle modellenmesi ve bazı bitki özütlerinin kılkuurtları üzerindeki antihelmintik etkisinin gösterilmesi hedeflenmiştir. Direnç gelişimi, yeni antihelmintiklerin keşfini gerektirdiği için, antihelmintik direnç gelişimi durumunda ortaya çıkabilecek mutant proteinlerin inhibe edilmesi amacıyla en potent bitkisel ligandlar kenetleme simülasyonları vasıtasıyla araştırılmıştır. Eriositrin molekülü türevlerinin çizilmesi amacıyla iskelet olarak kullanılmıştır. Bazı hedef proteinlerin 3 boyutlu yapısı bilinmediğinden, sekonder yapısı homoloji modelleme ile tahmin edilmiştir. Sonuç olarak kukurbitasin-B'nin fevkalade iyi bir skor değeri ile ($K_i = 57,11$ pikomolar ve $\Delta G = -13,97$ kcal/mol) rat karnitin palmitoil transferaz 2 enzimini inhibe edebildiği, direnç gelişiminde arteannuin-B'nin Mebendazolden daha potent bir ilaç adayı olduğu, tasarlanan 24 eriositrin türevinden E05'in eriositrinden daha düşük K_i değerine sahip olduğu, oreganolün seçici bir inhibitör adayı olduğu ve fumarat redüktaz için selektivite indeksinin 20 310,53 bulunduğu ve *in vivo* deneylerde *Artemisia annua* L. n-hekzan özütünün 1200 mg/kg dozunun kılkuurtlarına karşı %36,91'lik bir antinematodal etki gösterdiği ilk kez bu çalışmada ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antihelmintik, *Artemisia annua*, moleküler modelleme, *Momordica charantia*, *Origanum vulgare*, *Rubus canescens*
2022, xxv + 392 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

PREDICTION ON THE ANTHELMINTIC EFFECTS OF SOME HERBAL LIGANDS AND THEIR DERIVATIVES WITH *IN SILICO* MOLECULAR MODELLING METHOD

Dilara KARAMAN

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet Onur GİRİŞGİN

Helminthic infections are quite common around the world and more than 2 billion people are infected with at least one helminth species. In this study, it was aimed to model a new anthelmintic drug candidate, which can act at lower doses than the most commonly used anthelmintic drugs in the market, with less side effects, easy to access and reliable, using herbal ligand scaffolds, and to show the anthelmintic effect of some plant extracts on pinworms. Since development of resistance requires the discovery of new anthelmintics, the most potent herbal ligands were investigated via docking simulations to inhibit mutant proteins that may arise in the event of anthelmintic resistance development. Eriocitrin was used as a scaffold for drawing derivatives. The secondary structures of some target proteins were predicted by homology modeling because their 3D structures are unknown. As a result, in this study, it was revealed for the first time that cucurbitacin-B can inhibit rat carnitine palmitoyl transferase 2 enzyme with an exceptionally good score value ($K_i = 57,11$ picomolar and $\Delta G = -13,97$ kcal/mol), and arteannuin-B is a more potent drug candidate than Mebendazole in the development of resistance. Among the 24 designed eriocitrin derivatives, E05 has a lower K_i value than eriocitrin, oreganol is a selective inhibitor candidate and the selectivity index for fumarate reductase is 20 310,53, and *in vivo* experiments, *Artemisia annua* L. n-hexane extract was an antinematodal effect of 36,91% at the 1200 mg/kg dose against pinworms.

Key words: Anthelmintic, *Artemisia annua*, molecular modelling, *Momordica charantia*, *Origanum vulgare*, *Rubus canescens*

2022, xxv + 392 pages.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

“Bizler sadece gölgeler ve tozuz” demişti eski gladyatör Proximo, ölmeden biraz önce. İnsan yıldız tozudur. Geceleri bilim için ışıkları hiç sönmeyen kişiye gelince, o, ebediyen sönmeyecek bir ışık yayan bilimyıldızdır.

Teşekkür ederim bu tezi yardım ve inayetiyle yazdıran, bu doktorayı yaptıran, her şeyimi borçlu olduğum Aziz ve Latif Yüce Allah’a, bir kez değil milyonlarca kez, tüm kalbimle çok teşekkür ederim.

Ahlaki değerlerini, çalışma disiplini ve sorumluluk bilincini örnek edindiğim, çok titiz ve başarılı bir şekilde danışmanlık yaparak doktoramın seyrini değiştiren, her konuda desteğini gördüğüm ve öğrencisi olmaktan şeref duyduğum çok değerli tez danışmanım Saygıdeğer Hocam Doç. Dr. Ahmet Onur Girişgin’e ve ikinci danışmanım değerli Hocam Öğretim Görevlisi Dr. Oya Girişgin’e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

En büyük destekçim, beni bugünlere getiren sevgili anneme her zaman minnet borçluyum. Doktora bursu aldığım Devletime ve danışman değişikliği yapılması için beni destekleyen Yüksek Öğretim Kurulu’na çok teşekkür ediyorum.

Özütlerin hazırlanmasında ve temininde destek olan, bilgi ve yardımını esirgemeyen çok değerli Hocamız Prof. Dr. Hulusi Malyer’e minnet borçluyuz. Vefatı bizi derinden etkiledi. Allah rahmet eylesin.

A. *annua* n-hekzan özütünü hazırlayan Dr. Oya Girişgin Hocama (BUÜ, Karacabey Meslek Yüksek Okulu), A. *annua* ekstraktının *in vivo* sonuçlarının grafiklerinin hazırlanmasında yardımcı olan Doç. Dr. Egemen Dere’ye (BUÜ, Fen Edebiyat Fakültesi), Origanum uçucu yağını çıkaran Nurcihan Güven’e (Anadolu Ü. Eczacılık Fakültesi), analizini yapan Prof. Dr. Mine Kürkcüoğlu’na (Anadolu Ü. Eczacılık Fakültesi), uçucu yağın etkisinin istatistiksel analizinde destek olan Doç. Dr. Nurhayat Dalkıran’a (BUÜ, Fen Edebiyat Fakültesi), selofan bant yöntemini öğreten doktora öğrencisi Betül Saygın’a (BUÜ Veteriner Fakültesi) ve tezimizi gözden geçiren jüri üyeleri Prof. Dr. Hüseyin Çetin’e (Akdeniz Ü. Fen Edebiyat Fakültesi), Doç. Dr. Zuhâl Önder’e (Erciyes Ü. Veteriner Fakültesi), Prof. Dr. Özgür Özyiğit’e (BUÜ Veteriner Fakültesi), Prof. Dr. Bayram Şenlik’e (BUÜ Veteriner Fakültesi) ve tez danışmanıma değerli katkıları için çok teşekkür ederim.

İlaç tasarımı bizlere öğreten ve sevdiren yüksek lisans tez danışmanım kıymetli Hocam Prof. Dr. Kemal Yelekçi’ye (Kadir Has Ü. Biyoinformatik ve Genetik Bölümü), kullandığım hesaplamalı biyoloji programlarını geliştirenlere, eserlerinden yararlandığım tüm bilim insanlarına ve bilhassa Büyük Âlim Şeyhü’r Reis İbn Sînâ’ya, bilime adadıkları yaşamları ve sonsuza dek sönmeyecek ışıkları için çok teşekkürler.

Bu tez çalışması Aziz ve Latif Yüce Allah’a ithaf edildi.

Dilara KARAMAN
01/02/2022

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	10
2.1. Alternatif Antihelmintik Terapi.....	10
2.1.1. Antihelmintik Bitkiler.....	13
2.1.2. Antihelmintik Bileşenler.....	19
2.2. Bu Çalışmada Kullanılan Bitki Türleri.....	22
2.2.1. <i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	22
2.2.2. <i>Momordica charantia</i> L.....	28
2.2.3. <i>Rubus canescens</i> DC.	32
2.2.4. <i>Artemisia annua</i> L.	35
2.3. Bitkisel Ligandları Meydana Getiren Temel Moleküler Yapılar.....	40
2.3.1. Terpenler.....	40
2.3.2. Laktonlar.....	43
2.3.3. Kumarinler.....	45
2.3.4. Sakkaritler.....	46
2.3.5. Flavanoidler.....	47
2.4. Bu Çalışmada Kenetleme Deneyine Alınan Bitkisel Ligandlar ve Kontrol Grubundaki İlaçların Genel Özellikleri	50
2.5. Nematodlara Spesifik İlaçlar ve Hedef Proteinleri.....	57
2.5.1. Sentetik Antihelmintik İlaçlar.....	57
2.5.2. Antihelmintik ilaçların etki mekanizmaları.....	61
2.5.3. Modern antihelmintik terapinin yan etkileri, toksisitesi ve sınırlılıkları.....	62
2.5.4. Helmintlerde ilaç direnci.....	63
2.6. Antinematodal İlaç Hedefi Proteinler.....	64
2.6.1. Tubulin.....	64
2.6.2. Fumarat redüktaz.....	69
2.6.3. Karnitin palmitoiltransferaz.....	71
2.6.4. Glukoz transporter reseptörü.....	73
2.6.5. Sitokrom c oksidaz 1 (COX1) ve COX2 enzimleri.....	74
2.6.6. Nikotinik asetilkolin reseptörü.....	76
2.7. Rasyonel İlaç Tasarımı.....	78
2.7.1. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı.....	80
2.7.2. Moleküler modelleme.....	82
2.7.3. Yapı-tabanlı ilaç tasarımı.....	82
2.7.4. Moleküler kenetleme.....	82
2.7.5. Homoloji modelleme.....	83
2.7.6. Ramachandran Grafikleri.....	85
2.7.7. Farmakokinetikler.....	87
2.8. Helmintik Enfeksiyonlar ve Korunma.....	88
2.8.1. Helmintik enfeksiyonların dünya genelinde yaygınlığı.....	88

2.8.2. İnsanlarda bulunabilen helmintler ve bunların tıbbi açıdan en önemlileri.....	90
2.8.3. Paraziter hastalıklardan korunmak için temel adımlar.....	92
2.9. Bu Çalışmadaki Enfekte Konak Organizma: <i>Mus musculus</i>	93
2.9.1. Taksonomisi.....	93
2.9.2. Anatomisi.....	93
2.9.3. Yayılışı.....	94
2.10. Laboratuvar Farelerinde Görülebilen Dış Parazitler.....	95
2.11. Laboratuvar Farelerinde Görülebilen İç Parazitler.....	96
2.11.1. Protozoan parazitler.....	96
2.11.2. Sestodlar.....	97
2.11.3. Nematodlar.....	98
2.12. Farelerin Taşıyabileceği Parazit Türleri.....	105
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	112
3.1. Moleküler Kenetleme Deneyi.....	112
3.1.1. Deneysel prosedür.....	112
3.1.2. Ligandların hazırlanması.....	112
3.1.3. Proteinlerin hazırlanması.....	124
3.2. Homoloji Modelleme ve Hedef-Kalıp Sekansların Hizalanması.....	126
3.3. Proteinlerin Karşılaştırılması.....	127
3.4. Moleküler Kenetleme (Docking) Deneyi.....	127
3.5. ADME Tahmini.....	132
3.6. Bitkisel Ligand Tabanlı Türev Moleküllerin Antihelmintik Amaçlı Kenetlenmeleri.....	133
3.6.1. Türev moleküllerin hazırlanması.....	133
3.6.2. Türev moleküllerin moleküler kenetleme deneyi.....	140
3.6.3. En uygun türev molekülün ADME tahmini.....	141
3.7. Bitkisel Ligandların Antihelmintik Direnç Gelişimi Durumunda Etkinliğinin Araştırılması.....	141
3.7.1. Direnç gelişimi için fonksiyonel mutasyon oluşturulması.....	141
3.7.2. Homoloji modelleme.....	142
3.7.3. Proteinlerin hazırlanması.....	143
3.7.4. Ligandların hazırlanması.....	143
3.7.5. Moleküler kenetleme.....	144
3.8. <i>In vivo</i> Deney.....	145
3.8.1. Bitki özütünün hazırlanması.....	146
3.8.2. Deney hayvanlarının hazırlanması.....	148
3.8.3. Farelerin bakılması.....	149
3.8.4. Özütlerin farelere verilmesi.....	149
3.8.5. Perinal bant ile yumurta sayımı.....	152
3.8.6. Gaita örneklerinin toplanması.....	153
3.8.7. Fekal örneklerin düşen helmintler açısından incelenmesi.....	154
3.8.8. Fulleborn tekniği ile yüzdürme (flotasyon) yöntemi.....	155
3.8.9. Santrifüj kullanılarak parazit yumurtalarının sayılması.....	155
3.8.10. Direkt bakı yöntemi ile parazit yumurtalarının sayılması.....	155
3.9. Nekropside Helmintlerin Tespiti.....	156
3.10. Eritrosit-Lökosit Sayımı.....	157
3.11. İstatistiksel Analiz.....	157

4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	158
4.1. Bitkisel Ligandların Sanal Görüntüleme Sonucu.....	158
4.2. Bitkisel Ligandların AutoDock4.2 Yazılımı ile Kenetleme Sonuçları.....	159
4.3. Homolog Proteinlerin Kenetleme Simülasyonu Sonuçları.....	176
4.4. Homoloji Modelleme ile Oluşturulan Proteinlerin İncelenmesi.....	186
4.4.1. SoCOX1 ve SoCOX2 için tahmin edilen 3D yapıların değerlendirilmesi.....	186
4.4.2. CeGLUT1 reseptörü homoloji modelinin değerlendirilmesi.....	190
4.4.3. Ev β -tubulin proteininin homoloji modelinin değerlendirilmesi.....	192
4.4.4. Farklı organizmalara ait β -tubulin proteinlerinin superimpose sonucu.....	195
4.4.5. Fumarat redüktazın insanda ve nematodda bulunan formunun karşılaştırılması.....	201
4.5. En İyi Skora Sahip Ligandların ADME Değerlendirmesi.....	203
4.6. En İyi Ligandlar ve Etkileşimleri.....	211
4.6.1. Oreganolün Hc β -tubulin proteini içindeki olası etkileşimleri.....	212
4.6.2. Oreganolün insan β -tubulin proteini (Pdb Kodu: 6E7C) içindeki olası etkileşimlerinin değerlendirilmesi.....	215
4.6.3. Oreganolün rata ait karnitin palmitoil transferaz 2 (KPT 2) (Pdb kodu: 2H4T) içindeki etkileşimlerinin değerlendirilmesi.....	218
4.6.4. Oreganolün insan fumarat redüktaz enzimi (pdb kodu: 6VAX) içindeki etkileşimlerinin değerlendirilmesi.....	220
4.6.5. Oreganolün <i>Ascaris suum</i> fumarat redüktaz enzimi (pdb kodu: 4YSX) içindeki bağlanma özelliklerinin değerlendirilmesi.....	224
4.6.6. Momordisin II'nin insan fumarat redüktaz enzimi (6VAX) içindeki etkileşimlerinin değerlendirilmesi.....	227
4.6.7. Momordisin II, karantadiol-A ve kukurbitasin-B'nin rat KPT 2 (pdb kodu: 2FW3) içindeki olası yerleşimleri.....	229
4.6.8. Karantadiol-A ve kukurbitasin-B'nin SoCOX1 içindeki yerleşimleri.....	231
4.6.9. Kukurbitasin-B ile KPT 2 enziminin etkileşimlerinin değerlendirilmesi.....	234
4.6.10. Kukurbitasin-B ile AsFR etkileşimlerinin değerlendirilmesi.....	237
4.6.11. Karantadiol-A'nın CeGLUT1 içindeki olası etkileşimleri.....	240
4.6.12. Apigenin ve <i>H. contortus</i> β -tubulini ile etkileşimleri.....	243
4.6.13. Apigenin ile fare β -tubulin proteini arasındaki etkileşimlerin değerlendirilmesi.....	245
4.6.14. β -karyofilen ile KPT 2 enziminin olası etkileşimlerinin değerlendirilmesi.....	247
4.6.15. β -karyofilen ile Hc β -tubulinin olası etkileşimlerinin değerlendirilmesi.....	249
4.6.16. <i>A. annua</i> içinde bulunan bileşenlerin kenetleme sonuçlarının değerlendirilmesi.....	252
4.6.17. Arteannuin B ile Hc β tubulin etkileşimlerinin değerlendirilmesi.....	258
4.6.18. Arteannuin B ile insan β -tubulinin etkileşimlerinin değerlendirilmesi.....	259
4.6.19. Arteannuin B ile KPT 2 enzimi etkileşimleri.....	260
4.6.20. Pseudoeriositrin ve rat karnitin palmitoil transferaz 2 arasındaki olası etkileşimlerin değerlendirilmesi.....	261
4.6.21. Pseudoeriositrin ile AsFR ve iFR arasındaki olası etkileşimlerin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması.....	266
4.6.22. Pseudoeriositrin ile CeGLUT1 arasındaki olası etkileşimlerin değerlendirilmesi.....	269
4.6.23. Pseudoeriositrin ve SoCOX1 etkileşimleri.....	269
4.6.24. Pseudoeriositrinin tüm proteinlerle kenetleme sonuçları.....	270

4.7. Türev Moleküllerin Kenetleme Simülasyonlarının Sonuçları.....	272
4.8. Direnç Gelişimi Durumunda En Potent Ligandların Etkililikleri.....	279
4.9. <i>In vivo</i> Deney Sonuçları.....	287
4.9.1. <i>A. annua</i> n-hekzan özütü için bulunan makroskobik sonuçlar.....	287
4.9.2. <i>A. annua</i> n-hekzan özütü için perianal bant sonuçları.....	288
4.9.3. <i>A. annua</i> n-hekzan özütü için fekal flotasyon sonuçları.....	291
4.9.4. <i>A. annua</i> n-hekzan özütü uygulanan farelerin nekropsi sonuçları.....	299
4.9.5. <i>A. annua</i> n-hekzan özütü uygulanan farelerin kan değerleri sonuçları.....	302
4.9.6. <i>A. annua</i> n-hekzan ekstraktı uygulama gruplarının istatistiksel analizi.....	304
4.9.7. <i>A. annua</i> n-hekzan ekstraktı uygulanan farelerde bulunan helmintlerde gözlemlenen morfoloji ve anatomi.....	312
4.9.8. Albendazole 5 mg/kg dozda uygulanan farelerin nekropsilerinde toplanan helmintlerin morfolojilerindeki değişimler.....	314
4.9.9. Mısır yağı uygulaması sonucu farelerin nekropsilerinde görülen helmintlerin morfolojileri.....	316
4.9.10. <i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> uçucu yağı (OUY) uygulamasının perianal bant ve fekal flotasyon sonuçları.....	318
4.9.11. OUY uygulamasının istatistiksel sonuçları.....	323
4.9.12. Antihelmintik uygulamaların literatür ile karşılaştırılması.....	324
4.9.13. <i>In vivo</i> ve <i>in silico</i> sonuçların literatüre katkısı ve doldurulması gereken boşluklar.....	335
5. SONUÇ.....	340
KAYNAKLAR.....	346
EKLER.....	390
EK 5 Pseudoeriositrinin SWISSADME sonucu.....	391
ÖZGEÇMİŞ.....	392

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
Å	Angstrom
β	Beta
ΔG	Serbest Bağlanma Enerjisi
γ	Gama
K_i	İnhibisyon katsayısı
μM	Mikromolar
nM	Nanomolar
pM	Pikomolar
1OJ0	<i>Haemonchus contortus</i> β -tubulin proteininin PDB kodu
2H4T	Rat karnitin palmitoil transferaz 2 enziminin PDB kodu
2FW3	Rat karnitin palmitoil transferaz 2 enziminin PDB kodu
4YSX	<i>Ascaris suum</i> fumarat redüktaz enziminin PDB kodu
6E7C	İnsan β -tubulin proteininin PDB kodu
6E88	<i>Caenorhabditis elegans</i> mikrotübülün PDB kodu
6VAX	İnsan fumarat redüktaz enziminin PDB kodu
7DAE	Fare β -tubulin proteininin PDB kodu

Kısaltmalar

Kısaltmalar	Açıklama
<i>A. annua</i>	<i>Artemisia annua</i>
ABZ	Albendazol
ADME	Absorbsiyon Dağılım Metabolizma Eliminasyon (Absorption Distribution Metabolism Excretion)
ADT	Autodock Tools
AsFR	<i>Ascaris suum</i> 'a ait fumarat redüktaz
<i>A. tetraptera</i>	<i>Aspiculuris tetraptera</i>
ATP	Adenozin trifosfat
CADD	Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (Computer Aided Drug Design)
COX1	Sitokrom c oksidaz 1
COX2	Sitokrom c oksidaz 2
CeGlut1	<i>Caenorhabditis elegans</i> 'a ait glukoz transporter 1 (homoloji modeli)
Ce β -tubulin	<i>Caenorhabditis elegans</i> 'a ait β -tubulin (homoloji modeli)
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
Ev β -tubulin	<i>Enterobius vermicularis</i> 'a ait β -tubulin (homoloji modeli)
FAD	Flavin adenin dinükleotit
FDA	Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
FR	Fumarat redüktaz
GABA	Gama-amino-bütirik asit reseptörü
GİS	Gastrointestinal sistem
GTP	Guanozin trifosfat

Hc β -tubulin	<i>Haemonchus contortus</i> 'a ait β -tubulin
IVC	Ivermectin
iFR	İnsana ait fumarat redüktaz
i β -tubulin	İnsana ait β -tubulin
KPT 2	Karnitin palmitoil transferaz 2
MBZ	Mebendazol
<i>M. charantia</i>	<i>Momordica charantia</i>
MT	Mikrotübül
ODTAME	9,12,15-oktadekantrienoikasit metil ester
OUY	Origanum Uçucu Yağı
<i>O. vulgare</i>	<i>Origanum vulgare</i>
PDB	Protein Data Bank
P-gp	P- glikoprotein
PTX	Paclitaxel
PZQ	Praziquantel
<i>R. canescens</i>	<i>Rubus canescens</i>
<i>S. obvelata</i>	<i>Syphacia obvelata</i>
SoCOX1	<i>Syphacia obvelata</i> COX1 enzimi
SoCOX2	<i>Syphacia obvelata</i> COX2 enzimi
STL	Seskiterpen lakton

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Bergama’da bulunan Asklepion Hastanesi’nin girişi (Girgin, 2014).....	10
Şekil 2.2.	Dioscorides tarafından yazılan De Materia Medica’nın (MS 40-90) manuskriptinden bir folyo. Kuzey Mezopotamya’dan ya da Irak’tan (belki Bağdat’tan) bir hekim iksir hazırlarken tasvir edilmekte (“Medievalists”, 2016).....	11
Şekil 2.3.	Antihelmintik bitkilerden sarımsak (solda), Tespih ağacı (<i>Melia azedarach</i>) yaprakları ile meyveleri (ortada) ve nar (sağda) (Orijinal).....	14
Şekil 2.4.	<i>Dioscorea communis</i> L. genç sürgünleri (Orijinal).....	18
Şekil 2.5.	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> , (t.y).....	23
Şekil 2.6.	<i>M. charantia</i> yaprak ve meyvesi A) Bursa Çekmeköy’deki kültüvardan yaş olarak temin edildikten sonra preslenen <i>M. charantia</i> yaprağı B) <i>M. charantia</i> yaş meyvesinin dış görünümü, C) Meyvenin parlak kırmızı tohumlarla dolu içi (Orijinal).....	30
Şekil 2.7.	<i>R. canescens</i> toprak üstü kısımları, A) Bitkinin karakteristiği beyaz çiçekler B) 2017 yılı Ekim ayında Bursa Hüseyinalan köyünden toplanan <i>R. canescens</i> örneği (Orijinal).....	33
Şekil 2.8.	Böğürtlün köklerinde saptanan majör bileşenler. A) Diizooktil fitalat B) 9, 12, 15-oktadekantrienuik asit metil ester C) Hekzadekanoik asit metil ester D) 2-Furankarboksaldehid E) 9, 12, 15-oktadekantrienuik asit propilen diol F) Vitamin E (Abu-Shandi ve diğerleri, 2015).....	34
Şekil 2.9.	<i>A. annua</i> yaprakları (Orijinal) (2020 yılında İstanbul Eyüp’ten toplandı).....	36
Şekil 2.10.	<i>A. annua</i> ’nın dünya üzerindeki dağılımı. Mavi noktalar bulunduğu yerleri temsil etmektedir (Jiang ve diğerleri, 2021’den değiştirilerek alınmıştır).....	38
Şekil 2.11.	İzopren (2-metil-1,3-bütadien) (Orijinal).....	40
Şekil 2.12.	Mirsenin 3D yapısı. Bir izopren yapısının baş kısmı diğer izoprenin kuyruk kısmına bağlanarak (şekilde kesikli çizgilerle gösterilen noktadaki bağ oluşumu ile) terpen meydana gelmiştir (Orijinal).....	40
Şekil 2.13.	Bir seskiterpen örneği olan farnesol ve farnesolü oluşturan izopren birimleri, B: Baş, K: Kuyruk. Kesikli çizgiler izoprenler arası bağı göstermektedir. Karbon atomları yeşil, oksijen atomu kırmızı, hidrojen atomu beyaz renkle temsil edilmiştir (Orijinal).....	41
Şekil 2.14.	Soldaki şekilde verilen α -felantren tek halkalı bir monoterpendir ve okaliptus ağacında bulunur. Sağdaki şekilde gösterilen baş kuyruğa bağlı üç izopren biriminden oluşan α -selinen iki halkalı bir seskiterpendir (Orijinal).....	42
Şekil 2.15.	β -karyofilenin solda 3D ve sağda 2D gösterimi (Orijinal).....	42
Şekil 2.16.	Kukurbitasin-B’nin sağda 3D ve solda 2D gösterimi (Orijinal). Top-çubuk modelinde kırmızı toplar oksijen, beyaz toplar hidrojen, yavruağzı toplar karbon atomlarını temsil etmektedir.....	43
Şekil 2.17.	<i>A. annua</i> ’da bulunan önemli bir seskiterpen lakton olan arteannuin-B’nin 3D gösterimi (Orijinal). Karbon atomları koyu yeşil, oksijen atomları kırmızı renkle temsil edilmiştir.....	44

Şekil 2.18.	Kumarin ve kromon halkalarının moleküler yapıları ve numaralandırılması (Orijinal).....	46
Şekil 2.19.	Rutinozidin solda 3D ve sağda top çubuk modelinde 2D gösterimi. Karbon atomları mavi, oksijenler kırmızı, hidrojenler beyaz renkle temsil edilmektedir (Orijinal).....	46
Şekil 2.20.	Temel flavanoid türlerinin moleküler yapılarının 2D gösterimi ve numaralandırılışları. Kırmızı toplar oksijen, beyaz toplar hidrojen atomları, diğer renkler ise karbon atomlarını temsil etmektedir. Şekildeki moleküllerden sadece flavonolda C2 ve C3 arasında çift bağ bulunmakta, flavan, flavanon ve kateşinde ise tek bağ bulunmaktadır (Orijinal).....	47
Şekil 2.21.	Temel flavanoidlerden biri olan flavon ve karbonların numaralandırılışı (Orijinal).....	48
Şekil 2.22.	Antosiyanin yapısı ve karbon atomlarının numaralandırılışı (Orijinal).....	49
Şekil 2.23.	antihelmintik ilaçlara direnç gelişimi için geçen süreler (Kaplan, 2004'den değiştirilerek alınmıştır).....	64
Şekil 2.24.	İnsan <i>TUBB</i> geninin 6. Kromozom üzerindeki lokalizasyonu. Kırmızı şerit, genin bulunduğu noktayı göstermektedir (Şekil GeneCards'dan alınmıştır, Rosen ve diğerleri, 1996-2019).	65
Şekil 2.25.	<i>H. contortus</i> beta tubulinin hücrede lokalizasyonu. Beta tubulin sitoplazmada sitoiskeleti oluşturmak üzere konumlanmaktadır (Orijinal).....	66
Şekil 2.26.	β -Tubulinin sekans ve ikincil yapısı. Alfa heliksler pembe, β -pililer mavi ve ilmekler sarı görülüyor. M-ilmeği mor, S9-S10 ilmeği yeşil renk. Tüm segmentler Löwe ve diğerleri (2001) tarafından yapılan çalışmadaki gibi tanımlandı ve işaretlendi, PDB kodu: 1JFF. Şekil Field, Díaz ve Miller, 2013'den alınmıştır.....	66
Şekil 2.27.	Bağlanma bölgesinde paclitaxel (PTX) bulunan β -tubulinin görünümü. Çekirdek heliks H7 yeşil, M-ilmeği fuşya, S9-S10 ilmeği sarı, H6-H7 ilmeği mor ve H1-H2 ilmeği mavi renk görülüyor (Field, Díaz ve Miller, 2013)	67
Şekil 2.28.	Tubulinin iki birimi A) α -tubulinin 3D modelinde H7 çekirdek heliks yeşil, M ilmeği magenta, Paclitaxel ile bağlanan rezidüler sarı, GTP ise H7 heliksin hemen üzerinde kırmızı-turuncu renk ile temsil edilmekte. B) β -tubulini meydana getiren sekonder yapılar. Yeşil ile gösterilen H7 α -heliks, magenta ilmek M-ilmeği, kırmızı ile gösterilenler bağlanma bölgesinde yer alan mutasyona uğramış ve direnç gelişimine neden olmuş rezidüleri temsil etmektedir (Field, Díaz ve Miller, 2013'den alınmıştır)	68
Şekil 2.29.	L215H, L217R ve L225M mutasyonlarında beta-tubulinin paclitaxele bağlanma pozisyonlarındaki değişimler. A) Yabani tip beta-tubulin, B) L215H, C) L217R ve D) L225M. Turuncu renk protein yabani tip, ten rengi protein mutant tipi temsil ediyor. Paclitaxale gökkuşağı renklerinde gösteriliyor. L217R mutasyonunda mutant proteinin yabani tipten farklı bir 3 boyutlu katlanma yapısına ve dolayısıyla ilacın bağlanma bölgesinde çok daha değişik bir konuma sahip olduğu görülmektedir. Şekil Tripathi ve diğerleri, 2016'dan alındı.....	69
Şekil 2.30.	antihelmintik ilaç hedefi proteinlerden fumarat redüktaz (<i>Ascaris suum</i> 'a ait ve PDB kodu: 4YSX) ve bağlı haldeki ligandlarının 3 boyutlu	

	gösterimi (Orijinal).....	70
Şekil 2.31.	SDHA geninin lokasyonu. 5p15.33 bölgesi kromozomun en ucunda kırmızı şerit ile gösterilmektedir (GeneCards'dan alınmıştır, Rosen ve diğerleri, 1996-2019a).....	70
Şekil 2.32.	Rat KPT 2 enzimi (PDB kodu: 2H4T). Alfa heliksler kırmızı, beta pililer mavi ve ilmekler beyaz, su molekülleri küçük kırmızı noktalar ile temsil edilmekte (Orijinal).....	71
Şekil 2.33.	İnsanda bulunan CPT2 geninin kromozom 1 üzerindeki lokasyonu (Şekil GeneCards'dan alınmıştır. Rosen ve diğerleri, 1996-2019b).....	72
Şekil 2.34.	<i>C. elegans</i> GLUT1 homolji modeli (PDB kodu: 4ZWB). SWISSMODEL ile modellendi, Discovery Studio ile gösterilmektedir (Orijinal).....	73
Şekil 2.35.	GLUT3 reseptörü çoğunlukla sinaps bölgelerinde yoğun olarak yer almaktadır (Orijinal).....	74
Şekil 2.36.	SLCA3 Geni lokasyonu, genin konumu kırmızı şerit ile gösterilmektedir. Şekil GeneCards'dan alınmıştır (GeneCards'dan alınmıştır, Rosen ve diğerleri, 1996-2019c).....	74
Şekil 2.37.	<i>S. obvelata</i> COX1 (solda) ve SoCOX2 (sağda) homoloji modeli (SWISSMODEL ile oluşturuldu, Discovery Studio ile gösterilmektedir) (Orijinal).....	75
Şekil 2.38.	antihelmintik ilaç hedefi proteinlerden Nikotinik Asetilkolin Reseptörü Alfa 9 altünitesi (PDB kodu: 4UY2) ile bağlı haldeki ligandların 3 boyutlu gösterimi (Discovery Studio ile gösterilmektedir) (Orijinal) ...	76
Şekil 2.39.	İki hedef enzimin 3 boyutlu gösterimi A) 4-coumarate-CoA ligaz enzimi (PDB kodu: 3A9U, Çözünürlük:2.4 Å) (Hu ve diğerleri, 2019). B) Glutasyon Transferaz-2, apo form, nematod <i>Heligmosomoides polygyrus</i> . PDB Kodu:1TW9,Çözünürlük: 1.71 Å (Schuller ve diğerleri, 2005)...	78
Şekil 2.40	Bilgisayar destekli rasyonel ilaç tasarımı temel kurallar ve bu kuralların çiğnenmesi durumunda ortaya çıkabilecek durumlar (İçerik kısmen Prof. Dr. Kemal Yelekçi'nin "Organic Chemistry and Drug Design" dersindeki bilgilerden alınmıştır).....	79
Şekil 2.41.	ADT arayüzü açılış ekranı.....	83
Şekil 2.42.	Ramachandran plot elemanları. A) Aynı Cα atomuna bağlı iki peptit bağının oryantasyonunu tanımlayan dihedral açılar (Brzozowski, 2021) B) Ramachandran grafiği ve yorumlanması (Brzozowski 2021'den değiştirilerek alınmıştır, Paralel β-pili ve Kollajen heliks kısımları ilave edilmiştir).....	86
Şekil 2.43.	Topraktan geçen helmintiyazisin endemik ülkelerdeki dağılımı ve yaşları 1-14 arasında olan çocuklardaki oranı (DSÖ, 2017'den değiştirilerek alınmıştır, http://www.who.int/intestinal_worms/epidemiology/en/).....	89
Şekil 2.44.	Farenin abdominal organları (Orijinal).....	94
Şekil 2.45.	<i>Mus musculus</i> türünün dünyaki yayılışı. Kırmızı alanlar bulunabildiği bölgelerdir (Reid, 2006, https://www.domyown.com/all-about-mice-c-21-579.html)	94
Şekil 2.46.	Farelerde görülen bazı ektoparazitler. A) Selofan bant üzerinde görülen bir <i>Mycoptes musculus</i> erkeği. B) Fekal flotasyonda görülen bir <i>M. musculus</i> dişi C) Gömlek değiştiren bir <i>Myobia musculi</i> , D) İçinde yumurta gelişmiş bir <i>M. musculus</i> kalıntısı ve E) Fekal flotasyonda görülen büzülmüş bir <i>M. musculus</i> erkeği (Orijinal).....	95

Şekil 2.47.	Dişi oksyurid nematodlar. Solda <i>S. obvelata</i> (10x büyütme) ve sağda ise <i>A. tetraptera</i> (5x büyütme) türü 100
Şekil 2.48.	<i>S. obvelata</i> dişi ve erkek bireyin cinsiyet göstergesi olan vücut kısımları (Orijinal).....101
Şekil 2.49.	<i>A. tetraptera</i> dişi birey solda ve erkek birey sağda şematize edilmiş (Orijinal).....103
Şekil 2.50.	Oksyurid yumurtaları. Solda <i>S. obvelata</i> , ortada <i>S. muris</i> ve sağda <i>A. tetraptera</i> 'ya ait yumurtaların şematize edilmiş çizimi (Orijinal)..... 104
Şekil 3.1.	Discovery Studio ile hidrojenleri eklerken (arka plan rengi normalde siyah olmasına rağmen bu görüntü alınmadan önce yavruağzına dönüştürülmüştür) 126
Şekil 3.2.	Superimpose için hazırlık evreleri ve farklılıkların incelenmesi.....129
Şekil 3.3.	AutoDock Tools ile protein-ligand etkileşimlerini analiz ederken (solda hiyerarşi tablosu, ortadaki ekranda β -tubulin ile arteannuin-B'nin sferik etkileşim ağı ve sağdaki panoda üstte hidrojen bağı oluşturan atomun bulunduğu amino asitin numarası ve alta ise bağlanma bölgesindeki etkileşimlerin görüntü opsiyonlarını ayarlama ekranı görülmektedir)..130
Şekil 3.4.	Türev iskeleti olarak seçilen eriositrin üzerinde R gruplarının yerleşimi.....133
Şekil 3.5.	Aktif bölgeler ve mutasyona uğratılan noktaların <i>C. elegans</i> β -tubulin protein fasta sekansında gösterimi. Turuncu bölgeler proteinin aktif bölgesinde ligand ile etkileşen rezidüleri ve mavi çember içindeki rezidüler mutasyona uğratılan noktaları temsil etmektedir.....142
Şekil 3.6.	Mutasyona uğratılan noktalardan bağlanma bölgesinde yer alanlar. Sarı ile gösterilen bölgeler 167. ve 198. amino asitlerin bulunduğu noktaları temsil etmektedir.....142
Şekil 3.7.	Bitkilerden tek bir grup fitokimyasal bileşen eldesi için yapılan hazırlık sürecinin basamaklarını gösteren bu diyagram Hrchova ve Vlebný'den (2013) alınarak değiştirildi 147
Şekil 3.8.	Deney farelerinin bakımı. Enfeksiyona sahip olduğu tespit edilen farelerden bir grup 148
Şekil 3.9.	Farelere gavaj ile özüt ve ilaç uygulaması sırasında aynı hacimde mısır yağı kullanılmış ve aynı biçimde uygulanmıştır. A) <i>A. annua</i> 300 mg/kg dozunun verilmesi B) Mısır yağı verilmesi 150
Şekil 3.10.	Laboratuvar farelerine perianal bant yönteminin tek başına uygulanışı. A) Her bir fare kendi kafesi üzerine alınır. B) Ters dolanan selofan bant, 9 cm'lik bant boyunca fare rektumuna 15 kez bastırılır 152
Şekil 4.1.	Bitkisel ligandların Hc β -tubulin içindeki konumlanmaları. A) Genel görünüm B) Yakınlaştırılmış görünüm 159
Şekil 4.2.	Hc β -tubulin proteini (PDB Kodu:1oj0) ve ABZ ile kontrol kenetleme deneyi sonucu ligandların çakışık konumu. Okside ABZ molekülü 1oj0 içindeki ligandı (üstteki molekül) ve kenetleme simülasyonu ile bağlanma bölgesine yerleştirilen normal ABZ molekülü (alttaki molekül) 160
Şekil 4.3.	<i>H. contortus</i> β -tubulinine karşı en düşük K_i değerlerine sahip ilk on bir molekül 168
Şekil 4.4.	Hc β -tubulin inhibisyonu açısından en iyi ΔG değerlerine sahip ilk on bir molekül 169

Şekil 4.5.	KPT 2 enzimini (PDB ID: 2H4T) en iyi skor değerleriyle inhibe eden ilk yirmi molekülün ΔG değerlerinin karşılaştırılması	170
Şekil 4.6.	KPT 2 enzimi için en iyi K_i değerlerine sahip ilk yirmi molekülün karşılaştırılması	171
Şekil 4.7.	AsFR için en yüksek skora sahip altı molekülün K_i değerleri	172
Şekil 4.8.	AsFR için en iyi serbest bağlanma enerji değerlerine sahip bulunan ilk on bir molekül ve ΔG değerleri.....	173
Şekil 4.9.	KPT 2 (2H4T) için en düşük K_i değerlerine sahip olan ilk yedi bitkisel ligandın KPT 2 ve AsFR'ye (4YSX) karşı K_i değerlerinin karşılaştırılması	174
Şekil 4.10	KPT 2 ve 4ysx'e karşı en iyi ΔG değerlerine sahip on yedi bitkisel molekülün üç hedef protein için serbest bağlanma enerjiler.....	175
Şekil 4.11.	KPT 2, AsFR ve Hc β -tubulin proteinleri için en iyi serbest bağlanma enerjisi değerlerine sahip olduğu hesaplanan moleküllerin ΔG değerlerinin karşılaştırılması.....	176
Şekil 4.12.	Dokuz ligandın 2FW3 ve 2H4T (rat karnitin palmitoil transferaz 2 enzimi) ile kenetleme simülasyonu sonucu bulunan ΔG değerlerinin karşılaştırılması	181
Şekil 4.13.	Dokuz ligandın 6E7C (insan β -tubulini kristalize yapısı), 1OJ0 (<i>Haemonchus contortus</i> β -tubulini teorik yapısı) ve Ev β -tubulin (homoloji modelleme ile tahmin edilen <i>Enterobius vermicularis</i> β -tubulin proteini) ile kenetleme simülasyonu sonucu bulunan ΔG değerlerinin karşılaştırılması	182
Şekil 4.14.	Dokuz ligandın 6VAX (insan fumarat redüktaz enzimi kristalize yapısı) ve 4YSX (<i>Ascaris suum</i> fumarat redüktaz enzimi kristalize yapısı) ile kenetleme simülasyonu sonucu bulunan ΔG değerlerinin karşılaştırılması	183
Şekil 4.15.	Dokuz bitkisel ligandın insanda (6VAX) ve nematodda (4YSX) bulunan fumarat redüktaz enzimleri ile kenetleme sonucu bulunan inhibisyon katsayılarının (K_i) (μM düzeyde) karşılaştırılması	184
Şekil 4.16.	Selektivite indekslerinin karşılaştırılması. Grafikteki tüm bileşenler nematod proteinine karşı daha selektiftir.....	185
Şekil 4.17.	SoCOX1 ve SoCOX2. A) <i>S. obvelata</i> 'ya ait COX1 (sitokrom c oksidaz 1) enziminin homoloji modeli (SoCOX1). B) SoCOX1 için Ramachandran grafiği. C) SoCOX2 homoloji modeli. D) SoCOX2 için Ramachandran grafiği.....	187
Şekil 4.18.	Hidrofobiklik grafiği. A) SoCOX1 için, B) SoCOX2 için.....	188
Şekil 4.19.	<i>S. obvelata</i> 'da bulunan COX2 amino asit sekansının insandaki homoloğu ile karşılaştırılması BLAST sonucu.....	188
Şekil 4.20.	SoCOX2 amino asit sekansının SWISS-MODEL programı ile analizi sonucu 3D yapısının tahmini. Eşleşen bölgeler koyu harflerle, boşluklar kesikli çizgilerle ve eşleşmeyen aminoasitler flu harflerle ikinci sıradaki sekans üzerinde gösterilmektedir.....	189
Şekil 4.21.	COX2 proteininde en olası bağlanma bölgelerinin Discovery Studio ile gösterilmesi. 3D yapıda olası bağlanma bölgeleri sarı renkle, sekans üzerinde ise siyah renkle işaretli olarak gösterilmiştir.....	190
Şekil 4.22.	CeGLUT1. A) <i>Caenorhabditis elegans</i> 'a ait GLUT1 reseptörünün homoloji modeli (CeGLUT1) B) CeGLUT1 için Ramachandran grafiği	

.....	191
Şekil 4.23. CeGLUT1 için hidrofobiklik grafiği.....	192
Şekil 4.24. Evβ-tubulin. A) <i>Enterobius vermicularis</i> 'e ait β-tubulin proteininin homoloji modeli B) Evβ-tubulin için Ramachandran grafiği.....	193
Şekil 4.25. Evβ-tubulin için hidrofobiklik grafiği.....	193
Şekil 4.26. İnsana ve <i>S. muris</i> 'e ait β-tubulin amino asit sekanslarının hizalanması.....	194
Şekil 4.27. Dört farklı organizmaya ait β-tubulin sekanslarının hizalanması. 6E7C_1 Chain insana ait 426 amino asitlik sekans; A0A0N5AKB1 <i>S. muris</i> 'e ait 449 amino asitlik sekans; Q25049 <i>H. contortus</i> 'a ait 448 amino asitlik sekans ve A0A0N4V965 ise <i>E. vermicularis</i> 'e ait 448 amino asitlik sekanslardır. Tamamen eşleşen bölgeler koyu gri, büyük oranda eşleşen bölgeler gri, az eşleşenler açık gri ve en düşük skor ile eşleşen bölgeler ise beyaz ile temsil edilmiştir.....	195
Şekil 4.28. Tubulinlerin superimpose modeli. Sarı renk insan beta tubulini, mor renk <i>H. contortus</i> beta tubulini, kırmızı renk <i>S. muris</i> beta tubulini, turkuaz renk ise <i>E. vermicularis</i> beta tubulini göstermektedir. A) iβ-tubulini dışında kalan üç protein B) Dört protein. C) y eksenini etrafında 180° dönmesiyle elde edilen superimpose modeli. D) ligandın çevresini gösteren büyütülmüş hali.....	196
Şekil 4.29. İnsan tubulin proteini dimer halinde bulunmaktadır. Mor renk alfa tubulini, koyu yeşil renk ise beta tubulini göstermektedir (PDB ID: 6E7C). Şekilde her iki tubulin de ligandları ile bağlı haldedir.....	197
Şekil 4.30. Dört organizmaya ait beta tubulin proteinlerinin süper impose konumundaki Ramachandran Plot. Discovery Studio ile oluşturuldu....	198
Şekil 4.31. Maksimum parsimony yöntemiyle oluşturulan bir OTU ağacının yapısı bu dört organizmanın β-tubulin proteinlerinin benzerlik oranlarının hesaplanması ve kombine olarak karşılaştırılması ile oluşturulmuştur. Şekilde en yakın türler <i>H. contortus</i> ve <i>S. muris</i> iken, en uzak türün <i>E. vermicularis</i> olduğu gösterilmektedir (Orjinal).....	199
Şekil 4.32. Hcβ-tubulin ile fare β-tubulini için superimpose. Sarı renk protein <i>H. contortus</i> 'a, turkuaz protein fareye ait β-tubulindir.....	200
Şekil 4.33. Hcβ-tubulin ile fare β-tubulininin amino asit sekanslarının hizalaması.....	201
Şekil 4.34. 6VAX'a ait A zinciri ile 4YSX'e ait A zincirinin protein sekanslarının hizalanması. Hizalama ve görsel Discovery Studio ile oluşturuldu	201
Şekil 4.35. 4YSX ile 6VAX'in superimpose analizi sonrası görünümü. 6VAX'e ait A zinciri turkuaz, 4YSX'e ait A zinciri ise mor renkle temsil edilmektedir	202
Şekil 4.36. Superimpose sonrası 4YSX ve 6VAX içindeki FAD kofaktörlerinin birbirilerine göre konumu. Her iki proteinde de FAD'ın hemen hemen aynı bölgede yerleştiği görülmektedir	203
Şekil 4.37. Oreganolün 2D gösterimi, karbon atomlarının numaralandırılışı ve oreganolü meydana getiren gruplar (Orjinal)	212
Şekil 4.38. Oreganolün <i>H. contortus</i> β-tubulin içindeki konumlanışı	213
Şekil 4.39. Oreganolün <i>H. contortus</i> β-tubulin proteini yerleştiği bölgedeki rezidülerin A) aromatik ve B) hidrofobik bölgelerinin gösterimi.....	214
Şekil 4.40. Oreganol ile <i>H. contortus</i> β-tubulinin (1OJ0) etkileşimlerinin 2D	

	gösterimi.....	215
Şekil 4.41.	Oreganolün insan β -tubulini (6E7C) içindeki yerleşimi.....	216
Şekil 4.42.	Oreganolün insan β -tubulini içindeki olası etkileşimlerinin 3D gösterimi. Oreganol top-çubuk modeliyle, etkileştiği rezidüler ise ince çubuk modeliyle temsil edilmekte ve bağ oluşumları kesikli çizgiler ile gösterilmektedir.....	217
Şekil 4.43.	Oreganolün insan β -tubulini içindeki olası etkileşimleri ve etkileştiği rezidülerin 2D gösterimi.....	218
Şekil 4.44.	Oreganolün rat karnitin palmitoil transferaz 2 içindeki konumlanışı...	219
Şekil 4.45.	Oreganolün rat KPT 2 (pdb kodu: 2H4T) enzimi içindeki olası kimyasal etkileşimleri ve etkileştiği rezidüler. Etkileşimler kesikli çizgilerle ve oreganol turuncu top-çubuk modeliyle gösterilmektedir.....	219
Şekil 4.46.	Oreganolün Karnitin Palmitoil transferaz 2 (2H4T) içindeki olası etkileşimlerinin 2D gösterimi.....	220
Şekil 4.47.	Oreganolün insan fumarat redüktaz enzimi (pdb kodu: 6VAX) içindeki yerleşimi. Oreganol boşlukta, FAD'ın karşısında top-çubuk modeliyle gösterilmektedir	221
Şekil 4.48.	Oreganolün 6VAX içindeki olası etkileşimlerinin gösterimi. Oreganol sarı top çubuk modeliyle, FAD ise mavi çubuk modeliyle ve etkileştiği rezidüler ince çubuk modeliyle, etkileşimler kesikli çizgilerle gösterilmektedir.....	222
Şekil 4.49.	Oreganolün iFR (6VAX) içindeki yerleşim bölgesindeki rezidülerin hidrofobiklik-hidrofiliklikleri. Proteinin hidrofobik bölgeleri kahverengi ile hidrofilik bölgeleri ise mavi renk ile temsil edilmektedir. Oreganolün karbon atomları sarı, oksijen atomları kırmızı ile gösterilmektedir.....	223
Şekil 4.50.	Oreganolün insan fumarat redüktaz enzimi (6VAX) içindeki olası etkileşimlerinin 2D gösterimi	224
Şekil 4.51.	FAD sarı ince çubuk modeliyle, oreganol ise mor renk top çubuk modeliyle 4YSX içindeki konumlanmalarında gösterilmektedir.....	225
Şekil 4.52.	Oreganol, AsFR enzimi (pdb kodu: 4YSX) içinde etkileşimde olduğu rezidüler ile gösterilmektedir. Oreganol elementer renklerde top-çubuk modeliyle, FAD ince çubuk modeliyle sarı renk, etkileşimde olduğu rezidüler elementer renklerde ince çubuk modeliyle temsil edilmektedir.....	226
Şekil 4.53.	Oreganolün 4YSX içindeki olası etkileşimlerinin 2D gösterimi.....	227
Şekil 4.54.	Momordisin II'nin insan fumarat redüktaz enzimi (6VAX) içindeki konumlanışı.....	228
Şekil 4.55.	Momordisin II ile rat KPT 2 (2FW3) etkileşimlerinin 2D gösterimi...	228
Şekil 4.56.	Momordisin II (sarı renk), karantadiol-A (mor) ve kukurbitasin-B'nin (mavi), 2FW3 içindeki konumlanışları. Protein gökkuşağı renklerde gösterilmektedir.....	230
Şekil 4.57.	Ligandları çevreleyen rezidülerin aromatikliklerinin gösteriminde mavi bölgeler aromatik uçları kırmızı bölgeler aromatik olmayan kısımları temsil etmektedir.....	230
Şekil 4.58.	Ligandları çevreleyen bölgedeki rezidülerin hidrofobikliklerinin gösteriminde mavi bölgeler hidrofilik kısımları kahverengi bölgeler hidrofobik kısımları temsil etmektedir.....	231
Şekil 4.59.	SoCOX1 içinde karantadiol-A (mavi top çubuk) ve kukurbitasin-B	

	(pembe top çubuk modeli) en düşük enerji seviyelerindeki konumlanmalarında, SoCOX1 enziminin hidrofobik bölgeleri kahverengi, hidrofilik bölgeleri ise mavi renk ile gösterilmektedir.....	232
Şekil 4.60.	Kukurbitasin-B ile SoCOX1 etkileşimlerinin 2D gösterimi.....	233
Şekil 4.61.	Karantadiol-A ile SoCOX1 etkileşimlerinin 2D gösterimi.....	233
Şekil 4.62.	Kukurbitasin-B, KPT 2 enzimi (PDB kodu: 2H4T) içinde, birbirilerine paralel konumlanmış üç β -pilin yanında onlara paralel durmakta....	234
Şekil 4.63.	Kukurbitasin-B, KPT 2 enzimi bağlanma bölgesinde, yakın etkileşimde olduğu bölgeler ve amino asitler sarı, van der Waals etkileşimi yapabileceği biraz daha uzaktaki amino asitler ise yeşil ile yazılı.....	235
Şekil 4.64.	Kukurbitasin-B ile KPT 2 enzimi (pdb kodu: 2H4T) arasındaki olası etkileşim ağının 3D gösterimi.....	236
Şekil 4.65.	Kukurbitasin-B ve KPT 2 enzimi olası etkileşim ağının 2D gösterimi. Kukurbitasin-B merkezde top-çubuk modeliyle karbon atomları yeşil, oksijenler kırmızı ve hidrojenler beyaz renk toplarla temsil edilirken, proteinin içindeki pi-alkil etkileşimler pembe kesikli çizgilerle, hidrojen bağları ise yeşil kesikli çizgilerle gösterilmektedir.....	237
Şekil 4.66.	Kukurbitasin-B ile AsFR'ın etkileşimlerinin 3D gösteriminde ligand sarı renk, etkileştiği rezidüer ise elementer renklerde çubuk modeliyle, protein mavi kurdele modeliyle sekonder yapıda gösterilmektedir.....	238
Şekil 4.67.	Kukurbitasin-B ile AsFR'ın olası etkileşimlerinin 2D gösterimi.....	239
Şekil 4.68.	En iyi skora sahip ligandlardan üçünün AsFR içindeki konumlanmaları. Momordisin II mor, kukurbitasin-B sarı ve karantadiol-A koyu yeşil çubuk modeliyle, FAD elementer renklerde, protein sekonder yapıda ve yapısal renklerinde gösterilmektedir.....	240
Şekil 4.69.	Karantadiol-A'nın CeGLUT1 reseptörü içindeki olası yerleşimi (mavi okla gösterilmektedir).....	241
Şekil 4.70.	Karantadiol-A'nın CeGLUT1 içindeki olası etkileşimlerinin 3D gösterimi.....	242
Şekil 4.71.	Karantadiol-A'nın CeGLUT1 içindeki olası etkileşimlerinin 2D gösterimi.....	243
Şekil 4.72.	Apigeninin Hc β -tubulin içindeki konumlanması.....	244
Şekil 4.73.	Apigeninin Hc β -tubulin (1OJ0) içindeki etkileşimleri. Şekil B, Şekil A'nın 90° sağa döndürülmüş halidir.....	244
Şekil 4.74.	Apigeninin Hc β -tubulin içindeki etkileşimlerinin 2D gösterimi.....	245
Şekil 4.75.	Apigenin fare β -tubulini içindeki olası konumunda. Apigenin sarı top-çubuk modeli, protein kahverengi şerit kurdale ile temsil edilmekte...	246
Şekil 4.76.	Apigeninin fare β -tubulini içindeki olası etkileşimlerinin 2D gösteriminde apigenin merkezde top çubuk modelinde karbon atomları sarı, oksijenler kırmızı ve hidrojenler beyaz renk, pi-sülfür bağı turuncu, pi-alkil etkileşimleri pembe, hidrojen bağları ise yeşil kesikli çizgilerle, van der Waals etkileşimleri ise açık yeşil kürelerle temsil edilmekte...	246
Şekil 4.77.	β -karyofilen ile KPT 2 enzimi arasındaki olası etkileşimler A) Etkileşimlerin kesikli çizgiler ile gösterimi, B) KPT 2 enziminin sekonder yapısı gökkuşağı renklerinde, ADT ile bir yüzey alanı içerisinde gösterilen β -karyofilen etkileştiği rezidüer ile çevrili.....	248
Şekil 4.78.	β -karyofilen ile KPT 2 enziminin etkileşimde olabileceği olası rezidüer ve kimyasal bağların 2D gösterimi.....	248

Şekil 4.79.	β -karyofilen ile Hc β -tubulin etkileşimlerinin 3D gösterimi. A) Etkileştiği rezidüler, B) Protein sekonder yapıda, lacivert yüzey β -karyofileni temsil etmekte.....	249
Şekil 4.80.	Hc β -tubulin ile β -karyofilen etkileşimlerinin 3D gösterimi A) Küre biçimli etkileşim ağı. B) Ligandın aktif bölgede konumlanması. β -karyofilen pembe top çubuk modeliyle, protein sekonder yapıda gökkuşağı renklerinde ve etkileşimde olduğu tahmin edilen rezidüler ise ince çubuk modeliyle temsil edilmektedir.....	250
Şekil 4.81.	Artemetin-KPT 2 kenetleme simulasyonu sonucu ligandın bağlanma bölgesindeki rezidülerle kimyasal etkileşimlerinin 3 boyutlu gösterimi. HIS372 ile artemetin H11 atomu arasında bir hidrojen bağı olduğu görülmektedir.....	253
Şekil 4.82.	Friedelin ile Hc β -tubulinin bağlanma bölgesindeki etkileşimler.....	254
Şekil 4.83.	Friedelin-KPT 2 etkileşimleri.....	254
Şekil 4.84.	Friedelin molekülü KPT 2 içinde. Etkileşimlerin daha rahat görülebilmesi için moleküler yüzeylerin de gösterildiği ve farklı 90°'lik açılardan alınmış üç resim.....	255
Şekil 4.85.	Friedelin ile KPT 2 etkileşimleri. A) 2D gösterimi, uzaklıklar Å ölçüsünde verilmiştir. B) 3D gösterimi, üç farklı fenil rezidüsü (PHE131, PHE602 ve PHE370) ile çevrili bir boşluğa çok iyi şekilde yerleşimi ile çok sayıda kimyasal etkileşim yaptığı görülmektedir.....	256
Şekil 4.86.	Stigmasterol ile KPT 2 enzimi aktif bölgesindeki etkileşimler.....	256
Şekil 4.87.	Stigmasterol ile KPT 2 etkileşimleri A) 3 boyutlu gösterimi, B) 2 boyutlu gösterimi.....	257
Şekil 4.88.	Arteannuin B ile Hc β tubulin etkileşimleri A) 3 boyutlu ve B) 2 boyutlu gösterimi.....	258
Şekil 4.89.	Arteannuin-B ile insan β -tubulin proteininin olası etkileşimleri. A) Ligand top çubuk modeliyle, rezidüler ise ince çubuk modeliyle gösterilmektedir. B) Arteannuin-B ile i β -tubulin proteininin etkileşimlerinin 2D gösterimi. İtme kuvvetleri kırmızı çizgilerle, pi-alkil bağları pembe kesikli çizgilerle ve pi-sigma bağı mor kesikli çizgilerle temsil edilmektedir.....	259
Şekil 4.90.	Arteannuin B ile KPT 2 etkileşimleri A) 3 boyutlu gösterimi B) 2 boyutlu gösterimi.....	261
Şekil 4.91.	Eriositrini meydana getiren halkalar (Orijinal). Pseudoeriositrin oluşmasına neden olan bağ kromen4-on halkasının 6. pozisyonu ile O- β -rutinozitin kromene bağlı monosakkariti üzerinde 3. pozisyondaki hidroksil grubunun oksijen atomu arasında oluşacaktır (karbon ile oksijen arasında oluşacak bağın yeri okla gösterilmektedir).....	262
Şekil 4.92.	Pseudoeriositrin ile rat KPT 2 enzimi arasındaki etkileşimler. A) Pseudoeriositrinin karbon atomları mavi, oksijen atomları kırmızı, etkileştiği rezidüler sarı çubuk modeliyle gösterilmektedir. B) Pseudoeriositrin ile rat KPT 2 enziminin etkileşimlerinin 2D gösterimi (AutoDock4.2 programı hatalı moleküldeki anormal bağ oluşumunu dlg dosyası koordinat ekseninde göstermediği için şekilde görülmemektedir).....	263
Şekil 4.93.	Rat KPT 2 enziminin bağlanma bölgesinde pseudoeriositrin etrafındaki yüzeyin hidrofobikliğin gösterilmesi.....	264

Şekil 4.94.	Gerçek eriositrinin rat KPT 2 enzimi (2FW3) içindeki yerleşimi.....	265
Şekil 4.95.	Pseudoeriositrin ve KPT 2 enziminin (PDB kodu: 2FW3) etkileşimleri. A) 3D gösterimi, B) 2D gösterimi.....	265
Şekil 4.96.	KPT 2 enzimi (2FW3). A) Enzimin yüzeyinin gösteriminde turuncu daire içindeki kavite pseudoeriositrinin enzime giriş boşluğu olarak tahmin edilmiştir. Şekilde mavi bölgeler hidrofilik alanları kahverengi bölgeler ise hidrofobik alanları temsil etmektedir. B) A'daki şeklin yüzey alanı olmaksızın gösterilen bu halinde pseudoeriositrin merkezde, en düşük enerji ile konumlandığı bölgede çubuk modelinde görülmektedir.....	266
Şekil 4.97.	Pseudoeriositrin, 6VAX ve 4YSX. Her iki farklı proteindeki yerleşimlerinin karşılaştırılabilmesi için pseudoeriositrin molekülleri AsFR (PDB kodu: 4YSX) ve iFR (PDB kodu: 6VAX) enzimleri içindeki konumlanmalarında gösterilmektedir. AsFR kiremit turuncusu şerit kurdale ve AsFR'a ait FAD lila renk çubuk modeliyle, iFR krem rengi şerit kurdale ve iFR'a ait FAD koyu yeşil çubuk modeliyle, AsFR'a kenetlenen pseudoeriositrin fuşya top-çubuk ve iFR'a kenetlenen pseudoeriositrin ise turkuaz top-çubuk modeliyle temsil edilmektedir.	267
Şekil 4.98.	Pseudoeriositrinler, iFR ve AsFR içindeki konumlanmalarında, FAD'lar mor ve mavi renklerde çubuk modeliyle, isolloksazın halkası pseudoeriositrinlere oldukça yakın, yavruağzı top çubuk modeliyle verilen pseudoeriositrin AsFR içindeki, turkuaz top çubuk modeliyle temsil edilen pseudoeriositrin ise iFR içindeki en düşük enerji seviyesinde bulundukları kenetlenme noktalarında gösterilmektedir.	267
Şekil 4.99.	Pseudoeriositrin ve AsFR (4YSX) etkileşimleri. A) 3D gösterimi, B) 2D gösterimi (Şekilde gerçek eriositrin yapısı görülmesine rağmen aslında pseudoeriositrin).....	268
Şekil 4.100.	Pseudoeriositrin ve iFR enzimi (6VAX) etkileşimleri A) 2D gösteriminde pseudoeriositrinin oluşumuna neden olan hatalı bağ görülmektedir. Şekilde mor küre ile temsil edilen LEU306 rezidüsünün tam karşısında duran oksijen atomunun kromen ile bağ yaparak anormal bir siklik yapı meydana geldiği görülmektedir. B) 3D gösterimi.....	268
Şekil 4.101.	Pseudoeriositrin ile CeGLUT1 etkileşimleri. A) 3D gösteriminde pseudoeriositrin turkuaz top çubuk modeliyle, etkileştiği rezidüler ince çubuk modeliyle, protein ise pudra pembesi şerit kurdale modeliyle temsil edilmektedir. B) Pseudoeriositrin ve CeGLUT1 etkileşimlerinin 2D gösterimi (program gerçek pseudoeriositrini göstermemektedir, şekildeki ligand gerçek eriositrin gibi görünmektedir).....	269
Şekil 4.102	Pseudoeriositrin ve SoCOX1 olası etkileşimleri. A) Pseudoeriositrin sarı top-çubuk, etkileştiği rezidüler mor ince çubuk, etkileşimler kesikli çizgiler, proteinin sekonder yapısı ise krem rengi şerit kurdale modeliyle temsil edilmektedir. B) 2D temsilinde anormal yapılı pseudoeriositrin net şekilde görülmektedir.....	270
Şekil 4.103.	Pseudoeriositrinin SWISSADME sonucu. A) Pseudoeriositrinin moleküler yapısı, B) Radar grafiği, C) Kan beyin bariyerini geçme özelliği.....	271
Şekil 4.104.	Kenetleme sonucu en iyi skor değerlerine sahip ilk dört ligand ve eriositrinin KPT 2 için K_i ve ΔG değerleri.....	272

- Şekil 4.105. En iyi bağlanma ilgisine sahip dört türev molekülün (E05, E11, E23, E25) ve eriositrinin (E01) KPT 2 içinde yerleşimleri. **A)** E01 pembe, E05 mor, E11 sarı, E23 yeşil ve E25 turkuaz renkte, protein ise turuncu katı kurdale biçiminde tam boy gösterilmekte. **B)** Dört türev molekülün ve eriositrinin yerleştikleri bölgede görünümünün büyütülmüş hali. KPT 2 turuncu çizgilerle sekonder yapıda gösterilmektedir.....273
- Şekil 4.106. 24 türev içerisinde en iyi skora sahip bulunan E05'in KPT 2 içerisindeki kimyasal etkileşimleri. **A)** 3D, **B)** 2D gösterimi. **C)** Eriositrin (E01)'in KPT 2 (PDB kodu: 2H4T) içerisindeki kimyasal etkileşimlerinin 3D gösterimi, **D)** 2D temsili 275
- Şekil 4.107. Gökkuşluğu renklerinde şerit kurdale ile temsil edilen KPT 2 enziminin bağlanma bölgesinde iki ligand. Top-çubuk modelindeki turuncu renk ligand E05, turkuaz ligand ise eriositrin.....276
- Şekil 4.108. Yabani tip ile mutant β -tubulinlerin superimpose çakışmaları. **A)** Yabani tip turuncu, E198G lila, F167L açık sarı, F167Y turkuaz ve L225M açık yeşil. Merkezdeki ligandlar olan MBZ'ler ise kenetleme simülasyonu sonucu yerleştikleri konumda ve kenetlendikleri protein ile aynı renkle gösterilmektedir. **B)** Yabani tip β -tubulin lila, E198G ise turkuaz renkte ve 167. ve 198. rezidülerin olduğu yerler sarı renkte, koyu pembe renk top-çubuk modeliyle gösterilen arteannuin-B yabani tip protein ile kenetleme sonucu ve mavi renk arteannuin-B ise E198G ile kenetleme sonucunda yerleştikleri bölgede gösterilmektedir. **C)** MBZ'lerin superimpose sonucu proteinlerdeki konumları. Çakışan tubulinler şerit kurdale modeliyle gökkuşluğu renklerde, **D)** Ligandların daha yakından gösteriminde bu kez yabani tip ile kenetlenen arteannuin-B sarı top-çubuk, mutant E198G ile kenetlenen arteannuin-B ise turkuaz renkte görülmektedir.....282
- Şekil 4.109. Arteannuin-B ile yabani tip β -tubulin ve E198G mutantının kenetleme simülasyonu sonucu olası etkileşimlerinin karşılaştırılması. Kesikli çizgiler etkileşimleri ve üzerlerindeki sayılar Å cinsinden uzaklıkları temsil etmektedir. **A)** Yabani tip ile 3D gösteriminde arteannuin-B top-çubuk modeliyle, etkileştiği rezidüler ise ince çubuk modeliyle, **B)** Yabani tip ile 2D gösteriminde pembe çizgilerle temsil edilen yoğun bir π -alkil etkileşim ağı, **C)** E198G mutantı ile 3D gösteriminde protein sekonder yapıda gökkuşluğu renklerinde, **D)** E198G ile 2D gösteriminde arteannuin-B ve TYR200 ile oluşturulan π -sigma bağı mor çizgilerle 3,63 Å uzunlukta gösterilmektedir.....284
- Şekil 4.110. *A. annua* 600 mg/kg uygulamasının 3. günü bitki özütünün verildiği bir farenin gaitasında bulunan helmintler. **A)** Bir erişkin *S. obvelata* dışısı. **B)** Yumurta içermeyen bir *S. obvelata* örneği. **C)** *S. obvelata*'nın kıvrık posterioru.....287
- Şekil 4.111. Uygulama öncesi (-7. ve -1. günler) ve uygulama boyunca (1., 3., 5. ve 7. günler) selofan bantta sayılan *S. obvelata* yumurtalarının aritmetik ortalamaları.....289
- Şekil 4.112. -7. ve -1. günler bakılan fekal flotasyondaki *A. tetraptera* yumurta sayılarının aritmetik ortalamaları ile 7. günkü yumurta sayılarının ortalamalarının karşılaştırılarak yüzde azalmanın hesaplanması.....292
- Şekil 4.113. Ardışık günler arasındaki farka göre yumurta sayılarının ortalamalarının

	karşılaştırılarak yüzde azalmanın hesaplanması.....	293
Şekil 4.114.	İlk iki bakının ortalamalarıyla karşılaştırıldığında son günkü % azalma.....	294
Şekil 4.115.	Fekal flotasyonda görülen oldukça küçük bir nematod.....	294
Şekil 4.116.	Fekal flotasyonda görülen oksyurid yumurtaları. A) Bir <i>A. tetraptera</i> yumurtası B) <i>S. obvelata</i> yumurtası C) <i>S. muris</i> yumurtası.....	295
Şekil 4.117.	Fekal flotasyonda bulunan <i>A. tetraptera</i> yumurtalarının her bir fare grubu için hesaplanan aritmetik ortalamaları.....	296
Şekil 4.118.	Her bir grup farede nekropsi sonucunda bulunan helmintlerin aritmetik ortalamaları.....	299
Şekil 4.119.	Farelerin nekropsileri sonucu bağırsaklarında bulunan helmintlerin geometrik ortalamaları.....	300
Şekil 4.120.	Nekropsi sonuçlarına göre % etkililik.....	301
Şekil 4.121.	Uygulamanın 8. gününde her bir gruptaki farelerin kan değerlerinin aritmetik ortalamaları.....	304
Şekil 4.122.	Fekal flotasyondaki uygulama gruplarında ayarlanan anlamlılıklar (Adj. Sig.) açısından bağıntılar.....	306
Şekil 4.123.	Selofan bant uygulama gruplarında ayarlanan anlamlılıklar (Adj. Sig.) açısından bağıntılar.....	308
Şekil 4.124.	Kruskal Wallis ile nekropside bulunan helmintlerin ilaç gruplarındaki karşılaştırılmaları.....	312
Şekil 4.125.	<i>A. annua</i> n-hekzan ekstraktının 600 mg/kg dozda uygulandığı 10 nolu erkek farenin bağırsağından çıkan <i>S. obvelata</i> ergin ve yavru nematodlara ait mikroskop görüntüsü (10x büyütmede, Olympus mikroskopta alındı).....	313
Şekil 4.126.	<i>A. annua</i> n-hekzan ekstraktının 600 mg/kg dozda uygulandığı 11 nolu farenin özofagusundan çıkan <i>S. obvelata</i> ergin nematoduna ait mikroskop görüntüsü (5x büyütmede, Olympus mikroskopta alındı).....	314
Şekil 4.127.	Albendazol'ün 5 mg/kg dozda uygulandığı 3 nolu erkek farenin nekropsisinde çıkan erişkin bir <i>A. tetraptera</i> dişisine ait gövdenin medianı. Bu örnek için yorumlandığında; yumurtaların çok sayıda oluşu üç günlük ilaç uygulamasının yumurta oluşumunu azaltmadığını göstermektedir.....	315
Şekil 4.128.	Albendazol'ün 5 mg/kg dozda uygulandığı 3 nolu erkek farenin nekropsisinde çıkan erişkin bir dişi <i>A. tetraptera</i> başı (40 x büyütmede). Bu türün karakteristiği olan duvak benzeri serkival alae oldukça belirgindir.....	315
Şekil 4.129.	Mısır yağı uygulanan bir erkek farenin nekropsisinden çıkan ve yumurta içermeyen bir kılkurdu.....	317
Şekil 4.130.	<i>A. tetraptera</i> erkeği. Solda anterior, sağda ise posterioru gösterilmektedir.....	318
Şekil 4.131.	Mısır yağı verilen fare grubunun nekropsisi sonucu elde edilen <i>Syphacia</i> cinsi bir oksyurid nematod. 10x büyütmede yumurtalar içeren gövdenin bir bölümü gösterilmektedir.....	318
Şekil 4.132.	Selofan bantta görülen bir <i>S. obvelata</i> yumurtası.....	319
Şekil 4.133.	Farklı günlerde yapılan bakılar sonucu sayılan <i>S. obvelata</i> yumurtalarının aritmetik ortalamaları.....	319
Şekil 4.134.	Kukurbitasin-B'nin KPT2 bağlantılı etki mekanizmasının akış şeması.....	343

Şekil 4.135. Kukurbitasin-B'nin KPT2 bağlantılı antihelmintik etki mekanizması.....	343
Şekil 4.136. Bu çalışmadaki en potent ligandlar ve hedefleri.....	344
Şekil 4.137. Karantadiol-A'nın CeGLUT1 inhibisyonu ve etki mekanizması.....	345



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1.	Hindistan'ın Kashmir vadisinde bulunan antihelmintik aktiviteye sahip bitki türleri (Tariq ve Tantry 2012'den Türkçeleştirilerek alınmıştır).....	14-16
Çizelge 2.2.	İnsanlarda ve kemiricilerde bulunan helmintler üzerinde etkili olan bitkilerden bazıları (Jain ve diğerleri, 2013'den Türkçeleştirilerek alınmıştır).....	17
Çizelge 2.3.	Bitkisel antihelmintik biyoaktif moleküller.....	19-22
Çizelge 2.4.	Piyasadaki bazı sentetik antihelmintik ilaçlar ve hedefleri.....	58-59
Çizelge 2.5.	Bazı ilaç hedefi proteinlerin genleri.....	60
Çizelge 2.6.	<i>S. obvelata</i> ve <i>A. tetraptera</i> 'nın karşılaştırılması.....	104
Çizelge 2.7.	<i>Mus musculus</i> türü farelerde bulunabilecek parazit türleri.....	105-111
Çizelge 3.1.	Bu çalışmada kullanılan ligandların moleküler yapıları ve bazı özellikleri.....	113-124
Çizelge 3.2.	Çizilen eriositrin türevleri.....	134-140
Çizelge 3.3.	Seçilen ligandların molekül yapıları.....	144
Çizelge 3.4.	Uygulama grupları.....	151
Çizelge 4.1.	Ligandların hedef proteinler ile kenetleme sonucu K_i değerleri.....	161-162
Çizelge 4.2.	Ligandların hedef proteinler ile kenetleme sonucu ΔG değerleri.....	162-163
Çizelge 4.3.	Potent ligandların homolog proteinler ile kenetleme sonuçları.....	177
Çizelge 4.4.	Potent ligandların diğer hedef proteinler ile kenetleme sonuçları.....	178
Çizelge 4.5.	KPT-2 ve AsFR enzimleri için en iyi bağlanma moduna sahip ilk dört ligandın ADME özellikleri.....	204-206
Çizelge 4.6.	Hc β -tubulin için en iyi bağlanma moduna sahip ilk dört ligandın ADME özellikleri	208-210
Çizelge 4.7.	β -karyofilen için SwissADME değerlendirmesi.....	250-251
Çizelge 4.8.	Pseudoeriositrinin kenetleme sonuçları.....	271
Çizelge 4.9.	Türev moleküllerin kenetleme sonuçları.....	276-277
Çizelge 4.10.	E05'in ADME bağlantılı özellikleri (SwissADME web sunucu ile hesaplandı).....	278-279
Çizelge 4.11.	İnhibitör adaylarının dirençli proteinler ile K_i (μM) ve ΔG değerleri (kcal/mol).....	280-281
Çizelge 4.12.	Enfekte farelerde uygulama öncesi ve uygulama sırasında selofan bantta sayılan <i>S. obvelata</i> yumurtalarının aritmetik ortalamaları.....	289
Çizelge 4.13.	Bireysel selofan bant sonuçları.....	290
Çizelge 4.14.	Bireysel fekal flotasyon sonuçları.....	297-298
Çizelge 4.15.	<i>A. annua</i> etkililiğinin araştırılmasında fare gruplarında bulunan helmint sayıları.....	301
Çizelge 4.16.	Farelerin bireysel nekropsi sonuçları.....	302
Çizelge 4.17.	Kan değerleri ölçülen üç grup farenin bireysel sonuçları.....	303
Çizelge 4.18.	Fekal flotasyonda bulunan parazit yumurta sayıları için normalite testi.....	304
Çizelge 4.19.	Kruskal Wallis testi ile ilaç tipinin iki yanlı karşılaştırılmaları.....	305
Çizelge 4.20.	Selofan bantta bulunan <i>S. obvelata</i> yumurta sayıları için normalite testi.....	306
Çizelge 4.21.	Selofan bantta sayılan yumurtaların ilaç tipine göre iki-yanlı	

	karşılaştırmaları.....	307
Çizelge 4.22.	Nekropside bulunan helmint sayıları için normalite testi.....	308-309
Çizelge 4.23.	Helmint sayılarının karşılaştırılmasında Levene Testi.....	309
Çizelge 4.24.	Nekropsideki helmint sayıları için tanımlayıcı istatistikler.....	310
Çizelge 4.25.	Tamhane 2 testine göre çoklu karşılaştırmalar.....	310-311
Çizelge 4.26.	Bağımsız-Örnekler Kruskal-Wallis Test Özeti.....	311
Çizelge 4.27.	Farklı günlerde yapılan bakılar sonucu sayılan parazit yumurtalarının aritmetik ortalamaları.....	320
Çizelge 4.28.	OUY uygulamasında farelerin bireysel selofan bant sonuçları.....	321
Çizelge 4.29.	OUY uygulamasında selofan bantta bulunan <i>S. obvelata</i> yumurta sayıları için normalite testi.....	323
Çizelge 4.30.	OUY deneyinde selofan bantta sayılan yumurtaların ilaç tipine göre iki-yanlı karşılaştırmaları.....	324



1. GİRİŞ

Teknolojinin ve sağlık hizmetlerinin hızla geliştiği bir dünyada, helmintik enfeksiyonlar halen önemini korumaktadır. 2012 yılı verilerine göre dünya genelinde yaklaşık 2 milyar insanın en az bir helmint türü ile enfekte olduğu tahmin edilmiştir (Dünya Sağlık Örgütü [DSÖ], 2012). Sanitasyonun yeterli olmadığı bölgelerde yaşayan insanlar ve özellikle de okul öncesi dönemdeki çocuklar için enfeksiyonların sık tekrarlanması, sentetik ilaçların yerini alacak alternatif tedavi yöntemlerinin önemini arttırmaktadır. Bu nedenle daha az yan etkiye sahip yeni antihelmintiklerin keşfi oldukça önemli ve zorlu bir görevdir. Oral yolla bulaşan ve otoenfeksiyon nedeniyle sık tekrarlayan Oksyurid nematod enfeksiyonları ise daha çok çocuklarda görülmekte ve gelişimin aksamasına neden olmaktadır (Giray ve Keskinoglu, 2006). Dünya genelinde 400 milyon kişinin *Enterobius vermicularis* ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir (Strelkauskas, Edwards, Fahnert, Pryor & Strelkauskas, 2015).

Laboratuvar farelerini en fazla enfekte eden helmint paraziti *Syphacia obvelata*'dır. Oksyurid grubundaki bu türün yaşam döngüsü doğrudan ve kısadır yani ergin hale gelebilmesi için konak değiştirmesi gerekmez. (Hedrich, 2012). Bu tür, hem laboratuvar farelerinde hem de insanlarda bulunabilmektedir (Flynn, 1973). İnsanlarda *Enterobius vermicularis* enfeksiyonunun tedavisinde kullanılabilecek antihelmintiklerin denenmesinde *S. obvelata* model olarak kullanılmaktadır (Flynn, 1973; Griffiths, 1971).

Dünya Sağlık Örgütüne göre (DSÖ, 2017), helmintik enfeksiyonların en temel sebepleri fekal kontamine toprak üzerinde çıplak ayakla dolaşılması, helmint yumurtaları içeren sebze ve meyvelerin iyi yıkanmadan yenilmesi ve kontamine suların içilmesidir. Bu nedenle özellikle gelişmekte olan ülkelerde helmintik enfeksiyonlar diğer enfeksiyon tiplerinden farklı olarak çok sık tekrarlanmaktadır. Hafif enfeksiyonlara sahip insanlarda semptomlar görülmezken, daha ağır enfeksiyonlar diyare, karın ağrısı, genel zayıflık veya fiziksel ve bilişsel gelişimin bozulması ile kendini gösterir. Kancalı nematodlar kronik intestinal kan kaybı ve dolayısıyla anemiye yol açar. DSÖ bu durumun kontrolü için periyodik olarak helmintlerin giderilmesinin, tekrar eden enfeksiyonları önlemek için verilecek sağlık eğitiminin ve toprağın enfekte yumurtalar ile kontaminasyonunu

azaltmak için sanitasyonu artırmanın önemine dikkat çekmektedir (DSÖ, 2017). Ancak periyodik olarak sentetik ilaçların kullanılması bir süre sonra bu ilaçlara direnç gelişimi sorununu beraberinde getirmektedir (Sargison, 2012). Ayrıca bu ilaçların bazı yan etkilerinin yanı sıra uzun süre kullanılmalarının karaciğer ve böbrek fonksiyonları üzerine olumsuz etkileri olmaktadır (Ogbru, 2017). Bu nedenle sentetik ilaçların yerini alabilecek olan bitkilerden hangilerinin antihelmintik olarak bu ilaçlar kadar başarılı olup olmayacağı sorusu bu tez çalışmasının konusunu oluşturmaktadır.

Hayvancılık sektörü açısından bakıldığında paraziter enfeksiyonlar hayvan sağlığına zarar verebilir ve ekonomik kayıplara yol açabilir. 1984'de Ivermectin'in (IVC) ve sonraki yıllarda diğer makrosiklik laktonların Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration) FDA'dan onay alması ile Amerika'daki veterinerler ve küçükbaş hayvan üreticileri koyun ve keçilerin parazitleri için iyi bir ilk etkiye sahip ilaçlara kolay, ucuz ve güvenli bir şekilde ulaşabildiler (Waters, t.y.). Bu tür antiparazitik ilaçlar başlangıçta %100 parazit öldürme oranına sahip olsalar da yapılan son bilimsel çalışmalar antiparazitik direnç gelişiminin kaçınılmaz olması dolayısıyla bunun sürdürülebilir olmadığını göstermektedir (Kornele ve diğerleri, 2014).

Bazı helmint türlerine ait dokular diğer çoğu organizmanın dokularından farklı olarak yüksek bir rejenarasyon kabiliyetine sahiptir. Bu nedenle helmintleri öldürmek zorlaşmaktadır. Ayrıca çoğu helmint türü yüzlerce yumurta oluşturarak neslinin devamını sağlamakta ve kist oluşturarak ısı değişimleri veya toksik maddelere karşı dirençli hale gelmektedirler (Ustaçelebi, 1999). Bu nedenle helmintlerle mücadelede devamlı olarak kullanılacak ve konak organizmaya zarar vermeyecek ajanlar seçilmelidir. Bu ajanlardan başlıcaları ise pek çok ilacın ham maddesi olan bitkisel ürünlerdir.

İnsanlarda yaklaşık 7 000 enzim ve 20 000 reseptör bulunmaktadır. İlaçların hedefleri bu enzimler veya reseptörlerin biri ya da bir kaçıdır. İlaç adaylarının yan etkilerini azaltabilmek için ilacın inhibisyon katsayısının (K_i) olabildiğince düşük olması ve böylece çok düşük dozlarda kullanılması ile yeterli etkililiğin sağlanabilmesi hedeflenir (Silverman, 2004). Bitkisel ürünlerin kullanılmasıyla çok sayıda aktif bileşen vücuda

alınmış olur ve bunların metabolitleri binlerce enzim ve reseptör içinden bazılarına bağlanabilmekte, agonist veya antagonist olarak çalışabilmekte ve kimi zaman da inhibe edilmesi sakıncalı olan bir enzim veya reseptöre bağlanarak zehirlenmelere neden olabilmektedir. Bu nedenle bitkilerin bilinçsizce ilaç olarak kullanılması oldukça risklidir.

Helmintik enfeksiyonların endemik olduğu bölgelerde enfeksiyonun kontrol altında tutulabilmesi için periyodik olarak helmint düşürülmesi amacıyla en sık kullanılan iki antihelmintik ilaç Albendazol (ABZ) ve Mebendazol'dür (MBZ). Ancak yine de periyodik olarak helmint düşürme uygulaması tüm endemik bölgelerde hedeflenen seviyede değildir (DSÖ, 2015). DSÖ verilerine göre 2013'de, intestinal helmintler için tedaviye ihtiyaç duyan çocukların sadece %40'ına antihelmintik ilaçlar ulaşmıştır (DSÖ, 2015). Gelişmekte olan pek çok ülkede insanlar halen çeşitli bitkisel tedaviler ile helmint enfeksiyonlarını tedavi etmektedir. Asya, Afrika ve bazı Latin Amerika ülkelerinde bitkisel ilaçlar, geleneksel tedaviler ve geleneksel pratisyenler, intestinal helmint enfeksiyonlarını da kapsayan çeşitli yaygın rahatsızlıkları tedavi etmek için sağlığın korunmasında temel kaynakları oluşturmaktadır (DSÖ, 2013). Bu yüzden bu bitkisel ilaçlar sadece yeni ilaçların keşfedilmesinde değil, intestinal helmintlerin tedavi ve kontrolünde bilimsel kanıtların sunulabilmesi için de önemli bir yer tutar (Deori ve Yadav, 2016).

Özellikle kronik veya malign gidişatlı hastalıklar söz konusu olduğunda bitkisel tedavinin binlerce yıldır süregelen önemli bir yeri varsa da sentetik ilaçların başarısı da bir gerçektir. Bu başarının artırılması için ise yeni ve daha iyi ilaçların keşfedilmesi arzu edilmektedir. En az yan etkiye sahip olan, çok düşük dozda tesir gösteren ve ulaşılabilir nitelikteki bir ilacı keşfedebilmek amacıyla mevcut ilaçlara ait veritabanları taranabileceği gibi binlerce yıldır kullanılagelen bitkisel reçeteler de yeniden gözden geçirilebilir. Bunun yanında hepsinden önemlisi gözlem yoluyla keşiftir ki bugün kullanılan en popüler ilaçların bir kısmı gözlem sonucu bulunmuştur (her ne kadar adına “şanslı tesadüf” denilse de).

In silico moleküler modelleme yöntemiyle gerçekleştirilen protein-ligand kenetleme simülasyonları, ilaç geliştirme çalışmalarının ilk basamağını oluştururken, hedef-ilac etkileşimleri konusunda araştırmacılara atomik düzeyde veri sağlamaktadır. Bu tür hesaplamalı deneyler ilaç geliştirilmesinde iş yükünün azaltılması için büyük bir öneme sahiptir.

Yüksek başarımlı tarama (high throughput screening) tekniklerinin ilaç araştırmalarında kullanılmalarının nedeni “rasyonel” ilaç tasarımı ile karşılaştırılabilecek kadar etkin lider moleküller üretmeleridir. Bundan daha önemlisi bu tekniklerin terapötik imkanları genişletmesi ve böylece ilaç keşfinde lider molekülleri arttırmasıdır. Kurulan metodoloji tıbbi kimyagere, çoğu zaman nispeten kısa bir süre içinde, bu yeni lider molekülleri potansiyel bir ilaç adayına yaraşır bir *in vitro* etkinliği olan bileşenlere dönüştürmesi için imkân verir. Keşif işleminin bu aşaması oldukça tahmin edilebilir bir haldedir. Ne var ki, ilaçların büyük bir çoğunluğu oral tedavi için geliştirilmektedir ve oral aktivitenin ne olduğu tahmin edilebilir değildir, *in vitro* aktivitenin optimizasyonundan daha fazla kaynak tüketir ve daha fazla masraf ve zaman anlamına gelir (Lipinski, Lombardo, Dominy ve Feeney, 2001).

Yeni geliştirilecek antihelmintik ilaçlar yüz milyonlarca insanın kullanabileceği güvenilirlikte, ulaşılabilirlikte ve etkililikte olmalıdır. Antinematodal ilaç hedefi olarak *in silico* deneylerde kullanılan Karnitin palmitoiltransferaz (KPT) ailesindeki enzimler (EC 2.3.1.21) nematodlarda bir “chokepoint” yani nematodun hayati fonksiyonlarını tehlikeye sokan “vurucu nokta”lardır. KPT 2 inhibisyonunun nematodun hayati fonksiyonlarını etkilediği ve bazı nematod türlerinin ölümüne yol açtığı Tyagi ve diğerleri (2018) tarafından gösterilmiştir. Yeni antinematodal ilaçların geliştirilmesi için rat KPT 2 enziminin kristalize yapısının kenetleme deneylerinde kullanılmasının önemi Taylor ve diğerleri (2013) ve Tyagi ve diğerleri (2018) tarafından ifade edilmiştir. Metabolik “chokepoint” bileşenler tek bir reaksiyonda üretilen veya tüketilen bileşenlerdir ve “chokepoint” enzimin katalizlediği bu reaksiyonlar bloke olursa, parazit organizma için ters etkiye sebep olabilecek bir reaksiyon bu bileşenin yokluğu veya toksik oluşumu ile meydana gelecektir. Bu “chokepoint” enzimlerin hedeflediği bazı bileşenler *Caenorhabditis elegans*’a karşı Taylor ve diğerleri (2013) tarafından

denenmiş ve etkili bulunmuştur. KPT 2'nin ratta bulunan yapısı (Protein DataBank (PDB) ID:2H4T), Taylor ve diğerleri tarafından kullanılmış, Perhexiline için bağlanma enerjisi -5.8 kcal/mol bulunmuş ve D137 ile hidrojen bağı oluşturduğu ve P133, F134, M135, F370, H372, D376, G377, V378, L381, S590, G601 ve F602 ile etkileştiği görülmüş, H372 ise katalitik rezidü olarak belirlenmiştir.

Yeni bir antihelmintik ilaç iskeletinin bitkisel ligandlar tabanında akılcı ilaç tasarımı yoluyla araştırılması için çeşitli biyoinformatik yazılımları geliştirilmiş ve bunlar kullanılarak bazı bitkisel ligandlar Marrero-Ponce ve diğerleri (2005) tarafından taranmıştır. Marrero-Ponce ve diğerleri tarafından yapılan bu kapsamlı çalışmada ligandların aktiflik/inaktiflik oranına göre tahminde bulunulmuş ve bazı ligandların ileri araştırmalara alınmaya değer olduğu gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında da benzer bir amaçla farklı bir metod kullanılmıştır ve *in silico* moleküler modelleme yöntemiyle bitkisel ligandlar temel alınarak yeni ilaç moleküllerinin tasarlanması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada antihelmintik potansiyellerinin araştırılması için dört bitki türü seçilmiştir. Bu bitki türleri; *Artemisia annua* L. (Peygamber Süpürgesi) (Asteraceae), *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (İstanbul kekiği) (Lamiaceae), *Momordica charantia* L. (Kudret narı) (Cucurbitaceae) ve *Rubus canescens* DC. (Çobankösteği)'dir (Rosaceae). Araştırmanın hipotezi geliştirilirken bu bitkilerin içerdiği bileşenlerden bazılarının nematodlarda kasılma ile, solunum ile veya glukoz transportu ile ilgili hedef proteinlere bağlanarak bu hedef proteinlerin inhibisyonuna sebep olacağı tahmin edilmiştir. Bu tahmini doğrulayabilmek için, bu bileşenlerin hangileri olduğunun hesaplamalı yöntemlerle saptanması hedeflenmiştir.

Bu tez çalışmasının önemli amaçlarından birincisi *in silico* yöntemler kullanılarak seçili bitkilerin içerdiği aktif bileşenlerin antihelmintik ilaç hedefi olan belli başlı proteinler ile bağlanma özelliklerini ortaya çıkarmaktır. Bu hedef proteinlerin yarı kristalize formları RSCB Protein Data Bank'tan alınmıştır. Bu veri tabanında bulunmayan proteinlere ait sekanslar UniProt veritabanından alındıktan sonra homoloji modelleme yöntemiyle 3 boyutlu (3D) yapısı tahmin edilerek bu modeller Biovia Discovery Studio

2020 yazılımı (Dassault Systèmes BIOVIA, 2020) ile hazırlanıp optimize edilmiş ve AutoDock 4.2 yazılımı (Morris ve diğerleri, 2009) ile ligandlara kenetlenmiştir.

Antihelmintik ilaçların hedeflediği proteinlerden başlıcaları beta tubulin (β -tubulin), fumarat redüktaz (FR), Glukoz transporter reseptörü (GLUT), P Glikoprotein (P-Gp), nikotinik reseptör ve asetilkolin esterase reseptörüdür. ABZ ve MBZ, β -tubulini hedefler. β -tubulin enzim değildir, tüm organizmalarda bulunan hücre iskeleti ile ilgili bir proteindir. Albendazole gibi benzimidazollerin hedefi β -tubuline bağlanarak proteinin işlevsel olarak inhibisyonunu sağlamaktır. Bu tür bir inhibisyon helmintin paralizine ve atılmasına neden olur. Ivermectin ve piperazine GABA-A'yı hedefler, enzim hedeflemez. Thiabendazole cytoP450 enzimini hedefler ayrıca fumarat reduktazı inhibe ettiği düşünülür, ancak kesin mod bilinmemektedir (Taylor ve diğerleri, 2013). Bu nedenle bu çalışmada inhibisyonu hedeflenen proteinler nematodlara ait β -tubulin proteini, GLUT3 reseptörü, FR enzimi, rat KPT-2 enzimi ve nematoda ait Sitokrom C Oksidaz I ve II (COX1 ve COX2) enzimleridir. *S. obvelata* türü kılkurdu bu çalışmada *in vivo* deneylerde antihelmintik etkinin gösterilmesinde seçildiği için *S. obvelata*'ya ait mtCOX1 ve mtCOX2 proteinlerini kodlayan gen sekansı homoloji modelleme için kullanılmıştır. Bugün için *S. obvelata* türü için gen sekansı bilinmediğinden dolayı, bu organizma için hayati öneme sahip olan ve genom sekansı bilinen mtCOX1 ve mtCOX2 enzimleri inhibisyon araştırmaları için en ideal iki komponenttir.

Bu çalışmada, bitki özütlerinde bulunabilecek etken maddenin ayrıştırılıp saflaştırılmadan önce hesaplamalı yöntemlerle potansiyel etkisinin tahmin edilmesi ve antihelmintik potansiyele sahip molekül iskeletlerinin kenetleme (docking) simülasyonları sonucu belirlenmesi amaçlanmıştır. Bulunan sonuçlara göre en yüksek skora sahip ligandların, proteinlerin bağlanma bölgelerindeki rezidüer ile etkileşimleri detaylı olarak incelenmiştir.

Kenetlenen bitkisel ligandlar içerisinde seçilen bir molekül üzerine değişik yan gruplar eklenerek türev moleküllerin oluşturulması hedeflenmiştir. Eriositrin, *O. vulgare* subsp. *hirtum* infuzyonunda ve daha çok limon kabuğunda bulunan bir eriodiktyol türevidir (Kulisić ve diğerleri, 2007) ve eriodiktyole 7. pozisyonda O- β -rutinozit eklenmesiyle

meydana gelmiştir. Eriositrin antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklere sahiptir (Guo ve diğerleri, 2019; Miyake, Yamamoto ve Osawa, 1997). Bu çalışmada eriositrinden daha potent bir türevi olup olmayacağını araştırmak için eriositrin tabanlı 24 türev tasarlanmıştır. Bu türevler AutoDock4.2 ile kenetleme simülasyonu sonucu serbest bağlanma enerjileri ve K_i değerleri açısından karşılaştırılmıştır. En iyi skora sahip türev ise KPT 2 içindeki yerleşimi ve kimyasal etkileşimleri bakımından incelenmiştir. En potent eriositrin türevi SwissADME web sunucu ile ilaç olabilme kriterlerinden geçirilmiştir. Eriositrinin KPT 2 içindeki etkileşim ağı ile en iyi skora sahip türevin etkileşim ağı karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar ile, eriositrin tabanlı yeni bir antihelmintik geliştirilmesinde yapı-aktivite ilişkisinin anlaşılmasına yönelik ilk verilerin sağlanması amaçlanmıştır.

Bazı yazarlara göre antihelmintik ilaçlara karşı direnç gelişimi kaçınılmazdır ve er ya da geç, mevcut ilaçların elimine edemeyeceği mutant türler ortaya çıkacaktır (Sargison, 2012). O gün gelmeden, aynı amaçla kullanılabilecek güvenilir ve ulaşılabilir yeni antihelmintiklerin keşfedilmesi gereklidir. Hesaplamalı yöntemler, uygun ilaç iskeletlerinin araştırılmasında, giderek daha önemli bir konuma yükselmektedir. Bu çalışmada, olası bir direnç gelişimi durumunda kullanılabilecek ilaç adaylarının belirlenmesi için *in silico* bir senaryo tasarlanmıştır. En popüler antihelmintiklerden olan MBZ ile benzimidazol grubundaki ilaçların bilinen hedefi β -tubulin proteini, kenetleme simülasyonları için seçilmiştir. Direnç gelişimi ile ilgili olduğu bilinen belli pozisyonlarda tekli nükleotit değişimi sonucu ortaya çıkacak yeni amino asit ve beraberinde üç boyutlu yapı değişimi hesaba katılarak, yeni durumda hem MBZ'ye hem de potent bitkisel ligandlara karşı serbest bağlanma enerjisi hesaplanmıştır. Denenen ligandlar içinde, MBZ'den daha etkili olabilecek bir bitkisel ligand bulunup bulunmadığı araştırılırken, olası direnç gelişimi durumunda faydalanılabilecek veriler sunulması amaçlanmıştır.

Çeşitli protein hedefleri ile yapılacak dockinglerin sonuçlarına göre en yüksek skora sahip ligandların ADME özelliklerinin *in silico* araştırılması ve ilaç adaylarının sentezinden önce bu konuda ihtiyaç duyulacak verilerin sunulması da bu çalışmanın hedeflerinden biridir.

In silico araştırma ile organizmaya selektifliğinin araştırılması da amaçlanmıştır. Bunun için insanlarda ve nematodlarda bulunan homolog hedef proteinlerin kullanılması planlanmıştır. Helmintlerde paralizle ilgili bilinen ilaç hedefi proteinleri kullanarak helmintin paralize edilme ihtimalini araştırmanın yanında helminti öldürmeye yönelik ilaçların hedefi olan çeşitli proteinlerden biri olan glukoz transporter reseptörünün inhibisyonu için K_i değerlerinin de tahmin edilmesi hedeflenmiştir.

Bu tez çalışmasında *A. annua* n-hekzan ekstraktı ve *O. vulgare* subsp. *hirtum* uçucu yağının (OUY) farelerde bulunan kılkuçları üzerinde denenmeleri durumunda piyasadaki mevcut sentetik bir antihelmintik ilaç kadar başarılı olup olamayacakları araştırılmıştır. Böylece bitkide bulunan aktif bileşenlerin sinerjistik etkisinin doğurabileceği sonuçların da gözlemlenebilmesi hedeflenmiştir. Laboratuvar fareleri üzerinde yapılan deneysel çalışmalar vasıtasıyla alternatif ve güvenli bir tedavi olarak helmintlere karşı etkinliğinin saptanması ve bitki özütlerinin en uygun kullanım dozlarının ortaya çıkarılması için *A. annua* ekstraktı üç farklı dozda, OUY ise iki farklı dozda uygulanmıştır.

Farelerde bulunan ve çalışmamızın konusu olan *S. obvelata*'nın insanlara da geçebildiği bildirilmiştir (Flynn, 1973). Her ne kadar insanlarda bulunabilen 342 helmint türünden sadece bazıları farelerde de bulunabiliyorsa da bu çalışmada kullanılan bitki özütlerinin ortak olarak bulunabilen bu helmint türü üzerine ne gibi etkilerde bulunabildiği ortaya çıkarılarak insanlardaki olası etkilerinin de tahmin edilmesinin kolaylaşması amaçlanmıştır.

Yeni ilaçların geliştirilebilmesi için ilgili ilaç iskeletlerinin keşfedilmesi gerekmekte ve bunun için daha önce denenmemiş ancak etki etme olasılığına sahip bitkisel ürünler hedef organizma üzerinde denenmektedir. Ancak bu *in vivo* deneyler hem uzun süreli çalışmaları hem de ciddi bir masrafı beraberinde getirmektedir. Bu nedenle bitkilerde bulunduğu daha önce gösterilmiş bileşenlerin inhibisyon özelliklerinin bilgisayar destekli ilaç tasarımı (Computer Aided Drug Design, CADD) yoluyla araştırılması iş yükünü ve maliyeti önemli derecede azaltmaktadır. Özellikle antidiyabetik olduğu bilinen bitkiler antihelmintik olarak da iyi birer adaydır. 300'den fazla bitkisel

molekölün antidiyabetik olduğu bilinmektedir (Bharti, Krishnan, Kumar ve Kumar, 2018). Bu moleküllerden (genistein, ellajik asit, taninler, kurkumin, zingiberen, stigmasterol, linalool, ursolik asit, kaemferol, apigenin, momordin, kukurbitasin-B ve allicin gibi) bazılarının anthelmintik olmaları bu bileşenleri ihtiva eden bazı antidiyabetik bitkilerin aynı zamanda antihelmintik etkiler göstermelerine neden olabilmektedir. Bahsi geçen bileşenlerin antihelmintik mekanizmaları bir çizelgede (bkz. Çizelge 2.3) ve bu tez çalışmasının sonuçlar kısmında verilmiştir. Ayrıca bazı hipoglisemik etkili antidiyabetik bitkilerin insanlarda glukoz emilimini azaltmaları (Karaman ve Elgin Cebe, 2016), helmintin de glukozdan yararlanmasını azaltabilecektir. *M. charantia* yaprakları (Grover ve Yadav, 2004) ve *R. canescens* köklerinin (Karaman ve Elgin Cebe, 2016) antidiyabetik özellikleri vardır. Mevcut çalışmada bu bitkilerin içerdikleri/içerebilecekleri bileşenlerden antidiyabetik etkiye sahip olanların aynı zamanda antihelmintik olup olmadıklarının gösterilebilmesi için hesaplamalı biyoloji yöntemleri vasıtasıyla olası etkileşimler araştırılmıştır.

Bu çalışmadaki bazı enzim ve ligandların kısaltmalarında literatüre uygun şekilde ligand veya proteinlerin isimlerini oluşturan baş harfler biraraya getirilerek yazılmıştır. *Ascaris suum* fumarat redüktaz enzimi için AsFR, insan fumarat redüktaz enzimi için iFR, *Syphacia obvelata* COX enzimi için SoCOX, *Haemonchus contortus* β -tubulini için Hc β -tubulin, insan β -tubulini için i β -tubulin, *Rattus norvegicus* karnitin palmitoil transferaz 2 enzimi için KPT 2 veya RnKPT 2, *Caenorhabditis elegans* glukoz taşıyıcı (transporter) reseptörü için CeGLUT ve 9,12,15-oktadekantrienoik asit metil ester için ODTAME kısaltmaları kullanılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Alternatif Antihelmintik Terapi

İnsanlar binlerce yıldır şifayı çeşitli kaynaklarda aradılar. Bundan 4000 yıl önce çeşitli hastalıklar bitkiler ile tedavi ediliyordu. M.S. 1000 yıllarında bitkilerin yerini dua, yüzlerce yıl sonra duanın yerini iksirler, sonrasında haplar, antibiyotikler aldı. En son olarak antibiyotiklerin kimyasal olduğu gerekçesiyle bitkiler yine gündeme gelmiş durumdalar (Çankaya, 2014). 4000 yıl öncesine geri mi dönüldü? Her ne kadar tıp tarihi doğru bilinen yanlışlar ve hastaların hayatına mal olan yanlışlar ile dolu aşamalar geçirmiş olsa da edinilen tecrübeler ve birikimler, hep daha iyisinin arayışında olan bilinçle birleşince, geline nokta geriye dönülmediği açıktır. İlk bulunduğu radyumun şifa vereceğine inanılarak insanların göğüs cebinde taşıdığı akla getirildiğinde (Aksoy, 2014), tıbbın en gözde buluşlarının bile bir süre sonra yerini daha doğru gözlem ve sonuçlara bırakacağı bir gerçektir.

Opr. Dr. Ayşe Turan bir bildirisinde “İnsanlık tarihi inanmakla başlar” demiştir. İyileşmek de inanmakla başlar. Bunun en açık kanıtlarından biri Batı Anadolu’da kurulmuş ilk hastanelerden olan Asklepion Hastanesinin (Şekil 2.1) girişinde yazan “Buraya Ölüm Giremez” levhasıdır (Turan, 2014).



Şekil 2.1. Bergama’da bulunan Asklepion Hastanesi’nin girişi (Girgin, 2014)

Gelmiş geçmiş en büyük Âlim, Hekimlerin Pîr-i, Filozofların Prensi, Şeyhü'r Reis Ebû Alî el-Hüseyn b. Abdillâh b. Alî b. Sînâ hastalarından asla ümidini kesmemiş, “değersiz bitki yoktur tanınmamasından başka, şifasız hastalık yoktur irade eksikliğinden başka” diyerek tedavide inancın önemini dile getirmiştir. İbn Sînâ tarafından yazılan 274 kitap içerisinde yer alan yaklaşık bir milyon kelimelik E'l Kânûn Fi't-Tıbb isimli eserde çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere çok sayıda bitkisel drog tanımlanmıştır (İbn Sînâ, çev. 2000). Büyük Âlim bu muazzam eserinde ilaçların hazırlanışı ve uygulanışını tarif etmiş ve böylece ilaç terkibi konusunda Türk İslam tarihindeki o güne kadar yazılmış en kapsamlı farmakopeyi ortaya koymuştur (Turan, 2014).

Tıbbi bitkilerin yazılı kaynakları, bundan en az 5000 yıl önce, defne ve kekik gibi bitkilerin tıbbi amaçlı kullanımını ilk tanımlayan Sümerlere dayanıyorsa da (Falodun, 2010), arkeolojik çalışmalar tıbbi bitkilerin uygulanmasının aslında çok daha gerilere, Irak'ta 60 000 yıl öncesine uzandığını göstermiştir (Leroi Gourhan, 1975).

Bitkiler, geleneksel Materia Medica'nın en önemli öğeleridir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Dioscorides tarafından yazılan De Materia Medica'nın (MS 40-90) manuskriptinden bir folyo. Kuzey Mezopotamya'dan ya da Irak'tan (belki Bağdat'tan) bir hekim iksir hazırlarken tasvir edilmekte ("Medievalists", 2016) (<https://www.medievalists.net/2016/07/monastic-medicine-medieval-herbalism-meets-modern-science/>)

Tohumlu bitkiler, karayosunları ve eğreltileri kapsayan yaklaşık 350 000 tür bitkinin dünya üzerinde varolduğu tahmin edilmektedir ve bunlardan 287 655 tür bitki 2004 yılına kadar tanımlanabilmiştir (“Botanic gardens conservation”, 2013). Dünya üzerindeki iki yüz elli binden fazla yüksek bitki içerisinde seksen binden fazla bitkinin tıbbi değeri vardır (Fabricant ve Farnsworth, 2001).

VIII. yüzyıl boyunca, tarihte ilk kez tıbbi ilimleri farmakolojik ilimlerden ayıranlar Bağdat’taki Araplar olmuştur. O dönemde çalışılan formlar, bugün halen tedavide kullanılmakta ve bazı ilaç formülasyonları günümüz farmakopelerinde bile bulunabilmektedir (“Medicine in the medieval”, 2013). Doğal tedavilerden özellikle bitkisel olanların insan sağlığını korumada katkısı giderek artmaktadır. DSÖ’ye göre, dünya nüfusunun %75’i temel sağlık ihtiyaçları için şifalı bitkileri kullanmaktadır. Birçok geleneksel/farmasötik ilaç, hem doğadan hem de tüm dünyada varolan geleneksel ilaçlardan doğrudan elde edilmektedir. Bugüne kadar yapılmış çalışmalar neticesinde bitkisel ilaç uygulamaları 53 000’den fazla türün kullanımını kapsamakta ve bunların bir kısmı aşırı kullanım nedeniyle yok olma tehlikesi altındadır (Pan ve diğerleri, 2014). 2001 yılına kadar modern tıpta kullanılan bitkisel kökenli bileşenlerin 122’si tanımlanmış olup bunların %80’i, bitkilerin şu anki kullanım sebepleri ile ilgili olan aktif bileşenlerdi (Cordell, 2009). Bu bileşenlerden bazıları: tubokurarin, morfin, kodein, aspirin, atrofin, pilokarpin, efedrin, vinblastin, vinkristin, taksol, podofilotoksin, kamptotekin, dijitoksijenin, jitoksijenin, digoksijenin, kapsaisin, allisin, kurkumin ve artemisininidir. Ne var ki dünya üzerindeki pek çok bitki türünün nesli tükenme tehlikesi altındadır ve bu bitkilerin ve bitkisel ürünlerin tüketimindeki artış devam etmektedir. Artan şifalı ot talebinin karşılanmasında bir süre sonra dikkatler yeryüzündeki bitki kaynaklarının tükenmesine odaklanacaktır (Pan ve diğerleri, 2014).

Ülkemiz üç farklı fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bir noktada yer almasının yanı sıra, iklim, yükseklik ve habitat farklılıkları sebebiyle ılıman iklim kuşağında bulunan ülkeler içinde en fazla bitki çeşitliliğine sahip olan ülkedir. Yaklaşık üçte biri endemik olan 12 000 civarında tohumlu bitki türü yetişen ülkemizdeki floristik zenginliğimiz Avrupa kıtasındakine eşittir. Bitkisel bir kaynaktan hazırlanan bir ürünün farmakoterapide kullanılabilmesi için mutlaka etkin ve standardize edilmiş bir ekstreden

hazırlanmış olması, ürünün stabilitesinin belirlenmiş olması, farmakolojik ve klinik bulguların yanı sıra toksikolojik verilerin de saptanmış olması gerekmektedir (Çankaya, 2014). Ülkemizden diğer ülkelere ihraç edilen en önemli tıbbi bitkiler ve baharatlar kekik, zencefil, çörekotu, defne, kişniş, kimyon, çöven, safran, sarımsak, meyan kökü, nane, çemen, rezene, adaçayı, anason, ıhlamur ve keçiboynuzudur. Tüm bu bitkilerin ihraç miktarları ve değerleri seneden seneye farklılık göstermekte ancak bunların toplam ihracat değeri Dış Ticaret İstatistiklerine göre her yıl artmaktadır. Bu bitkilerden kekik, 2008 yılında tüm bu bitkiler içerisinde en fazla ihracatı yapılan bitki olmuştur ve %42'lik paya sahiptir (Yıldırım, 2010).

2.1.1. Antihelmintik Bitkiler

Antiparaziter ajanlar tıp alanında tedavi amacıyla kullanılan ilk maddelerdendir. Özellikle bağırsak helmintlerinin atılması için bitkisel alkoloidlerden faydalanılmıştır. Çok uzun zaman öncesine uzanan bazı reçeteler bağırsak helmintlerinin düşürülmesine yönelik bitkilerden bahsetmektedir. M.Ö.1550 yıllarından kalma papiruslarda nar ağacı kabuğunun sestodlardan kurtulmaya yaradığı ifade edilmiştir. M.Ö.300 yılında Yunanlı bilgin Theophrastus ise erkek eğrelti otunun (*Aspidium*) antiparazitik olarak kullanılabileceğinden bahsetmiştir (Ustaçelebi, 1999). Ortaçağda Türk İslam Hekimleri gözle görülebilen parazitler ile ilgili bilgilere sahip olup eserleri ile bu bilgilerin dünyaya yayılmasına öncülük etmişlerdir. Büyük Türk İslam Hekimi ve bilgini İbn Sînâ (980-1037), nematodlardan *Ascaris*, *Enterobius* ve *Ancylostoma*'ları tarif etmiş ve bunların insanlardaki bulunuşlarını ve tedavilerini anlatmıştır (Unat, 1995). İbn Sînâ yaklaşık 1000 yıllarında yazdığı *El Kânûn Fi't-Tıbb* adlı emsâlsiz eserinde pelin otunun; özellikle Roma pelin otu ile *Artemisia absinthium* türlerinin bağırsak helmintlerinin atılmasına yaradığını bildirmiştir (İbn Sînâ, çev. 2000).

Antihelmintik olarak bilinen gözde bitkilerden sarımsak ekstraktının *Entamoeba histolytica*, *Leishmania* sp., *Giardia* sp., *Tripanosoma brucei*, *Leptomonas* gibi parazitik protozoonlara karşı antiparazitik özellikte olduğu bildirilmiştir. Özellikle *Giardia* için kullanılan sentetik ilaçlara direnç gelişiminin artışı sarımsağın alternatif tedavideki önemini göstermektedir. Bütün dünyada önemli bir sağlık problemi olan *Giardia*

intestinalis'e karşı sarımsak ekstraktının etki ettiği klinik olarak kanıtlanmıştır (Corzo-Martinez, Nieves Corzo ve Villamiel, 2007).

Anadolu'da kültürel bir miras olarak görülebilecek folklorik tedavi yöntemlerinin en önemli unsurları olan bitkilerden antihelmintik oldukları kanıtlanan sarımsak (*Allivum sativum*), tespih ağacı (*Melia azedarach*) yaprakları, nar (*Punica granatum*) (Şekil 2.3), tatlıpelin (*Artemisia absinthium*), fesleğen (*Ocimum basilicum*) ve ceviz (*Juglans regia*) gibi tıbbi bitkiler hem Çin tıbbında hem de Ayurvedik tıpta benzer amaçlarla yüzlerce yıldır kullanılmaktadır (Tariq ve Tantry, 2012).



Şekil 2.3. Antihelmintik bitkilerden sarımsak (solda), Tespih ağacı (*Melia azedarach*) yaprakları ile meyveleri (ortada) ve nar (sağda) (Orijinal)

Çizelge 2.1'de Ayurvedik tıpta kullanılan antihelmintik bitkilerin bir listesi verilmektedir. Bu listedeki bitkilerin belli başlı bazı kısımları helmintlerin giderilmesi amacıyla kullanılabilir. Bazı tıbbi bitkilerin meyveleri zehirli olabildiği için, ancak literatürde kullanımı tavsiye edilen parçalarından faydalanılabilmektedir

Çizelge 2.1. Hindistan'ın Kashmir vadisinde bulunan antihelmintik aktiviteye sahip bitki türleri (Tariq ve Tantry 2012'den Türkçeleştirilerek alınmıştır)

Bitki türleri	Familiya	Kullanılan parça
<i>Acia arabica</i> willd.	Fabaceae	Kök, gövde, kabuk
<i>Aconitum chasmanthum</i> Stapf.	Ranunculaceae	Kök
<i>Aconitum heterophyllum</i> Wall. ex. Royle.	Ranunculaceae	Kök

Çizelge 2.1. Hindistan'ın Kashmir vadisinde bulunan antihelmintik aktiviteye sahip bitki türleri (Tariq ve Tantry 2012'den Türkçeleştirilerek alınmıştır) (devam)

<i>Aconitum violaceum</i>	Ranunculaceae	Kök
Jacquerm.		
<i>Acorus calamus</i> L.	Araceae	Rizom
<i>Ajuga bracteosa</i> Wall.	Lamiaceae	Tüm bitki
<i>Allium sativum</i> L.	Liliaceae	Soğan
<i>Artemisia absinthium</i> L.	Asteraceae	Tüm bitki
<i>Artemisia maritima</i> L.	Asteraceae	Tüm bitki
<i>Asparagus filicinus</i> Buch.	Liliaceae	Kök
<i>Brassica nigra</i> L.	Brassicaceae	Tohumlar
<i>Cannabis sativa</i> L.	Cannabinaceae	Yaprak
<i>Chenopodium ambrosoides</i> L.	Chenopodaceae	Tüm bitki
<i>Datura stramonium</i> L.	Solanaceae	Tohumlar
<i>Daucus carota</i> L.	Umbelliferae	Kökler
<i>Delphinium denodatum</i> Wall.	Ranunculaceae	Tohumlar
<i>Delphinium elatum</i> L.	Ranunculaceae	Tüm bitki/ Tohumlar
<i>Euphorbia royleana</i> Boiss.	Euphorbiaceae	Aerial kısımlar
<i>Euphorbia thomsoniana</i> Boiss.	Euphorbiaceae	Aerial kısımlar
<i>Ficus carica</i>	Moraceae	Meyve ve kabuk
<i>Fritillaria roylei</i> Hook.	Liliaceae	Soğan
<i>Inula racemosa</i> Hook.	Asteraceae	Kök
<i>Juglans regia</i> L.	Juglandaceae	Kabuk ve yaprak
<i>Juniperus macropoda</i> Boiss.	Cupressaceae	Yaprak
<i>Juniperus communis</i> L.	Cupressaceae	Meyve
<i>Matricaria chammomila</i> L.	Asteraceae	Aerial kısımlar

Çizelge 2.1. Hindistan’ın Kashmir vadisinde bulunan antihelmintik aktiviteye sahip bitki türleri (Tariq ve Tantry 2012’den Türkçeleştirilerek alınmıştır) (devam)

<i>Mentha sylvestris</i> L.	Lamiaceae	Tüm bitki
<i>Myrsine africana</i> L.	Myricaceae	Tüm bitki
<i>Morus alba</i> L.	Moraceae	Kabuk ve yapraklar
<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.	Nymphaeaceae	Tüm bitki
<i>Nepeta cataria</i> L.	Lamiaceae	Yaprak/tüm bitki
<i>Nymphaea alba</i> L.	Nymphaeaceae	Tüm bitki
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae	Tohumlar
<i>Peganum harmala</i> L.	Rutaceae	Tohumlar
<i>Populus alba</i> L.	Silicaceae	Kabuk
<i>Populus nigra</i> L.	Silicaceae	Kabuk
<i>Pinus wallichiana</i> A.B. Jacks	Pinaceae	İğneler
<i>Platanus orientalis</i> L.	Platanaceae	Kabuk, tohum
<i>Punica granatum</i> L.	Punicaceae	Çiçekler
<i>Prunella vulgaris</i> L.	Lamiaceae	Kök, gövde, kabuk
<i>Raphanus sativus</i> L.	Brassicaceae	Kök
<i>Salix alba</i> L.	Salicaceae	Kabuk
<i>Urtica dioica</i> L.	Urticaceae	Yaprak

Ülkemizde parazitik enfeksiyonların, diyabet ve kanser gibi hastalıkların tedavisinde sarımsak (*Allium sativum*), soğan (*Allium cepa*), çörekotu (*Nigella sativa*), ısırgan (*Urtica dioica*) ve dar yapraklı sinirliot (*Plantago lanceolata*) geleneksel olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Sarımsak (*Allium sativum*), kabak çekirdeği (*Cucurbita pepo*) ve çörekotu (*Nigella sativa*) bal ile karıştırılıp gastrointestinal parazitik enfeksiyonların tedavisi amacıyla tavsiye edilmektedir (Baytop, 1999; Ayaz, Yılmaz, Ozbek, Tas ve Orunc, 2007). Ayaz ve diğerleri (2007) tarafından ifade edildiği gibi bugün için parazitik enfeksiyonların kontrolünde en etkili yol sentetik antihelmintik ilaçların kullanılmasıdır. Bununla beraber bu tür ilaçlar pahalı olduğu için gelişmekte olan ülkelerde kırsal kesimdeki hayvan üreticilerinin bunlara ulaşması bazen mümkün olmamaktadır. Ayrıca dünya genelinde kemiricilerde antihelmintik ilaçlara direnç

giderek artmaktadır (Waller, 1997). Çizelge 2.2’de insanlarda ve kemiricilerde bulunan helmintler üzerinde etkili olduğu bilimsel olarak gösterilmiş tıbbi bitkilerin bir listesi verilmiştir. Listedeki bitkilerden *Azadirachta indica* (Neem ağacı) Hindular için kutsal kabul edilen bir ağaçtır (Aslanoğlu, 2021). Her sene başında bu ağacın yapraklarının suyu ile yıkanılırsa sağlıklı kalacaklarına, yüzlerini bu suyla yıkarlarsa yüzlerinin güzelleşeceğine inanırlar. Bu ağacın doğal bir insektisit olduğu ve aynı zamanda parazitlere karşı da etkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Erdoğan, 2013). Bu ağacın meyveleri zehirli olduğu için yaprakları kaynatılarak suyu antihelmintik amaçlı kullanılabilir.

Çizelge 2.2. İnsanlarda ve kemiricilerde bulunan helmintler üzerinde etkili olan bitkilerden bazıları (Jain ve diğerleri, 2013’den Türkçeleştirilerek alınmıştır)

Kullanılan bitki	Kullanılan kısım	Etkilediği helmint	Helmintin konağı
<i>Annona senegalensis</i> (Annonaceae)	Yaprak, kabuk, kökler	<i>Nippostrongylus braziliensis</i>	Ratlarda
<i>Carum copticum</i> (Umbelliferae)	Tohumlar	<i>Ascaris lumbricoides</i>	İnsanlarda
<i>Cucurbita moschata</i> (Cucurbitaceae)	Tohumlar	Sestodlar	İnsanlarda
<i>Helleborus niger</i> (Ranunculaceae)	Gövde	<i>Ascaris lumbricoides</i>	İnsanlarda
<i>Mitragyna stipulosa</i> (Rubiaceae)	Kökler	Guinea-helminti	İnsanlarda
<i>Terminalia avicennoides</i> (Combretaceae)	Yapraklar	<i>Nippostrongylus braziliensis</i>	Ratlarda
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	Yapraklar	Sestod ve nematodlar	Küçük kemiricilerde

Henüz literatüre geçememiş olsa da ülkemizde geleneksel tedavi yöntemlerinden biri olarak *Dioscorea communis* L. genç sürgünleri (Şekil 2.4) kaynatılarak acımsı suyu gastrointestinal helmintlerin düşürülmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu bitkinin diğer kısımları (özellikle meyveleri) çok zehirli olduğu için diğer kısımları dahilen kullanılmamalıdır. Bitkinin kullanıma uygun genç sürgünleri de ancak bir botanikçi tarafından ayırt edilebilir. Halk tarafından toplanıp kullanılması çok risklidir.



Şekil 2.4. *Dioscorea communis* L. genç sürgünleri (Orijinal)

Dünya genelinde kullanılan antihelmintik bitkilerden bazıları; *Salvia hispanica*, *Pongamia pinnata*, *Nerium indicum*, *Oxalis corniculata*, *Pinus roxburghii*, *Podophyllum emodi*, *Abutilon indicum*, *Adiantum capillus*, *Anethum graveolens*, *Callicarpa macrophylla*, *Calotropis procera*, *Cassia occidentalis*, *Cinnamomum camphora*, *Cissampelos pareira*, *Eclipta alba*, *Embelia ribes*, *Gmelina arborea*, *Helicteres isora*, *Moringa oleifera* (“anthelmintic herbs”, 2017), *Pleurotus eryngii*, *Delphinium consolida*, *Ruta graveolence*, *Fraxinus excelsior*, *Berberia spp*, *Artemisia salina*, *Artemisia inculata*, *Artemisia maritima*, *Artemisia abyssinica*, *Artemisia abrotanum*, *Albizia grandibracteata*, *Ficus exasperata*, *Zygophyllum albüm*, *Zygophyllum coccineum*, *Citrullus colocynthis*, *Artemisia vulgaris*, *Calamintha nepeta*, *Datura stramonium*, *Nerium oleander*, *Nicotina tabacum*, *Pteridium aquilinum*, *Polypodium vulgare*, *Sambucus nigra*, *Tanacetum vulgare*, *Salvia officinalis*, *Zingiber officinale*, *Olea europaea*, *Embelia schimperi*, *Teloxys graveolens*, *Thymus vulgaris*, *Milletia thonningii*, *Albizia anthelmintica*, *Butea frondosa* (Karam ve Bhavna, 2013; Chaluvaraju, Makrabbi ve Naveenkumar, 2015), *Ocimum sanctum* L., *Piliostigma thonningii*, *Melia azedarach* Linn, *Moghania vestita*, *Mimusops elengi* L., *Punica granatum* L., *Calotropis procera* (Ait.), *Neolamarkia cadamba* (Roxb.), *Capparis decidua*, *Xylopia aethiopica*, *Butea monosperma* ve *Gynandropsis gynandra* türleridir (Mali ve Mehta, 2008).

2.1.2. Antihelmintik Bileşenler

Antihelmintik oldukları bilinen bazı bitkilerin etken maddelerinin araştırılması için çok sayıda *in vitro/in vivo* çalışma yürütülmüştür. En bilinen bitkisel antihelmintik etken maddeler papain, allisin, ellajik asit, timol ve kurkumindir. Kurkumin, kanser dahil daha pek çok hastalığın tedavisinde olduğu gibi trematodların eliminasyonunda da etkili olduğu gösterilmiş çok değerli bir moleküldür (Cheraghipour Marzban, Ezatpour, Khanizadeh ve Koshki, 2018). Zerdeçal (*Curcuma longa* L.)'ın etken maddesi olan kurkumin, *Fasciola* enfeksiyonlarının tedavisinde denenmiş ve başarılı bulunmuştur (Ullah ve diğerleri, 2017).

Çizelge 2.3'de antihelmintik etkili moleküller ve bulundukları bitkiler verilmiştir. Bu moleküllerden bazıları çizelgede ifade edildiği gibi belirli bir yolağı kullanarak paraziti elimine etmektedir. Belirli parazit türleri ile yapılan deneysel çalışmalar antihelmintik bitkisel moleküllerin etki mekanizmasına dair *in vivo* sonuçları ortaya çıkarmıştır (Wynn ve Fougère, 2007). Buna rağmen *A. annua*'da bulunan arteannuin-B'nin antihelmintik etki mekanizması bilinmemektedir ve diğer antihelmintik moleküller de yeterince araştırılmamıştır. Çizelge 2.3'deki bazı maddelerin birlikte kullanımı sağlık açısından risklidir. Papain ve allisin hiçbir zaman birlikte kullanılmamalıdır çünkü sarımsak ve ananas birlikte tüketildiğinde komaya sebebiyet vermektedir.

Çizelge 2.3. Bitkisel antihelmintik biyoaktif moleküller

Molekül	Bulunduğu bitki	Bitkinin Etki Ettiği Parazit	Etki Mekanizması
Artemisinin	<i>A. annua</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Fasciola hepatica</i>	Demir üreten serbest radikaller ile endoperoksit köprülerinin yıkılması vasıtasıyla oksidatif strese neden olur ve parazite zarar verir.

Çizelge 2.3. Bitkisel antihelmintik biyoaktif moleküller (devam)

Papain	<i>Carica papaya</i> L.	<i>Entamoeba histolitica</i> , <i>Trichuris</i> , <i>Trichostrongylus</i> , <i>Ascaris</i> <i>suum</i> ,	Proteaz enzimi ile nematod kütikülünün sindirilmesi vasıtasıyla paraziti zedeler.
Palasonin	<i>Butea</i> <i>monosperma</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i> , Okseyuridler, <i>Giardia</i> , <i>Dipylidium caninum</i>	
Tanin	<i>Terminalia</i> <i>arjuna</i>	<i>Haemonchus contortus</i>	Büzücü etki gösterir.
Protopin	<i>Fumaria</i> <i>parviflora</i>	<i>H. contortus</i> , <i>Trichuris</i> , <i>Trichostrongylus</i>	
Allisin	<i>Allium sativum</i> L.	<i>A. suum</i> , <i>H. contortus</i> , <i>A.</i> <i>galli</i>	<i>H. contortus</i> kütikülünde deformiteye sebep olur. Allisin <i>Giardia</i> , <i>Leishmania major</i> ve <i>Leptomonas colosoma</i> türlerine etkilidir.
Kukurbitin	<i>Cucurbita</i> <i>maxima</i>	Nematodlar ve sestodlar <i>H. nana</i> , <i>H. diminuta</i> , <i>A.</i> <i>lumbricoides</i>	Parazitin üreme organlarında dejenerasyona neden olur.
Zingiberen	<i>Zingiber</i> <i>officinale</i>	<i>A. lumbricoides</i> , <i>H. nana</i> , <i>H. contortus</i>	
Timokinon	<i>Nigella sativa</i>	Şeritler, kancalı nematodlar, <i>Schistosoma</i> <i>mansoni</i> , <i>Entamoeba</i> <i>histolitica</i>	Timokinon pro- oksidan olarak rol oynayabilir.
Piperin	<i>Piper longum</i>	<i>A. lumbricoides</i>	

Çizelge 2.3. Bitkisel antihelmintik biyoaktif moleküller (devam)

Genistein	<i>Fleminga procumbes</i>	<i>Raillietina echinobothridia</i> , <i>Fasiolopsis buski</i>	Genistein <i>Echinococcus multicularis</i> ve <i>E. granulosus</i> 'a karşı etkilidir. Glikoliz ve glikojenoliz ile ilgili enzimleri inhibe ederek ve Ca^{++} homeostazisine ve NO aktivitesine zarar vererek iş görür.
Mliacaprin	<i>Melia azedarach</i> L.	<i>H. contortus</i> , <i>Taenia solium</i>	<i>H. contortus</i> üzerine larvisidal ve ovisidal etki gösterir.
Skopoletin			
Meliartenin			
Azadirachtin	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	<i>P. falciparum</i> , <i>H. contortus</i> , <i>Trichostrongylus</i>	
Eugenol	<i>Ocimum sanctum</i> L.	<i>P. falciparum</i> , <i>C. elegans</i>	
Urosilik asit			
β -Karyofilen			
Karanjin	<i>Pongamia pinnata</i>	<i>P. falciparum</i>	Larvisidal aktivite gösterir. Nitrifikasyon inhibitor özelliklere sahiptir.
Triterpenoid saponin	<i>Achyranthes aspera</i>	<i>Paramphistomum cervi</i> , <i>A. aegypti</i>	Saponinler <i>A. aegypti</i> 'ye karşı larvisidal aktivite gösterir.

Çizelge 2.3. Bitkisel antihelmintik biyoaktif moleküller (devam)

Calotropain	<i>Calotropis procera</i>	<i>H. contortus</i> , <i>P. falciparum</i> , <i>Leishmania</i> , <i>Trypanosoma</i> , <i>Oesophagostomum columbianum</i> , <i>Bunostomum trigonocephalum</i>	Calotropain proteolitik bir enzimdir.
Alantolakton	<i>Inula helenium</i>	Nematod, kamçılı nematod ve kancalı nematod	
Hidrastin	<i>Hydrastis canadensis</i>	<i>Echinococcus granulosus</i>	Larvisidal etkilidir.

Çizelge içeriğindeki bilgiler Bauri, Tigga ve Kullu (2015) ve Wynn ve Fougère (2007)'den alınmıştır.

2.2. Bu Çalışmada Kullanılan Bitki Türleri

2.2.1. *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*

Origanum vulgare L. subsp *hirtum* (Link) İetswaart (İstanbul kekiği) (Şekil 2.5) Akdeniz ve Asya bölgelerinde dağılım gösteren Lamiaceae familyasına ait bir çalı türüdür (İetswaart, 1982).



Şekil 2.5. *O. vulgare* subsp. *hirtum*, (t.y). (www.gardentags.com/plant-encyclopedia/origanum-vulgare-subsp-hirtum-hot-and-spicy/15518)

Origanum vulgare subsp. *hirtum* aşağıda belirtilen taksonomik kategorilerde yer almaktadır (İetswaart, 1982).

Alem: Plantae

Bölüm (Divisio) : Spermatophyta

Altbölüm (Subdivisio) : Angiospermae

Sınıf (Classis) : Dicotyledonae

Altsınıf (Subclassis) : Dialypetalae

Takım (Ordo) : Tubiflorae

Familiya (Familia) : Labiatae (Lamiaceae)

Cins (Genus) : *Origanum*

Tür (Species): *Origanum vulgare*

Alttür (Subspecies): *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*

Bitkinin genel morfolojisi: Dallar her bir kök başına 12 çift, 25 cm. Yapraklar petiolat veya subsessile, ovat, eliptik veya yuvarlağımsı, 6-40 x 5-30 mm, akut veya küt uçlu. Spiküller 3-30 x 2-8 mm. Korolla mor, pembe veya beyaz, 3-10 mm (İetswaart, 1982).

Dört alttürü vardır: *hirtum*, *gracile*, *vulgare* ve *viride*. Bu alttürlerinin farklı yayılış alanları vardır. *Gracile* alttürünün yayılış alanı: Gümüşhane, Maraş, Malatya, Tunceli, Bitlis, Van, Hakkari. *Hirtum* alttürününki Edirne, Çanakkale, İstanbul, Sakarya, Balıkesir, İzmir, Aydın, Muğla, İçel, Niğde. *Viride* alttürünün yayılış alanı: İstanbul,

Bursa, Sakarya, Balıkesir, İzmir, Aydın, Muğla, İçel, Niğde. Vulgare alttürünün yayılış alanı: Kırklareli, Tekirdağ, İstanbul, Bolu, Zonguldak, Kastamonu, Çankırı, Sinop, Rize, Kars (Davis, 1982).

Türkiye’de yaygın şekilde kullanılan kekik türlerinin tümü Labiatae (Ballıbabagiller) familyasına dahil olan cinsleri şunlardır: *Thymus*, *Satureja*, *Thymbra*, *Coridothymus* ve *Origanum*. Yüksek oranda uçucu yağ içeren yani karvakrol ve timolce zengin olan ve uçucu yağ eldesi amacıyla kullanılıp önemli miktarlarda ihracatı yapılan türler şunlardır: *Origanum onites* (Bilyalı kekik), *O. vulgare* subsp. *hirtum* (İstanbul kekiği, Karakekik), *Origanum minutiflorum* (Sütçüler kekiği), *Origanum majorana* (Beyaz kekik), *Origanum syriacum* var. *bevanii* (Dağ kekiği) (Başer, 2001).

Ülkemiz Oregano için esas üreticidir ve kültüvasyon Batı Anadolu’da 80 000 dekarı aşan alanlarda gerçekleştirilmektedir. Bu hasat Türk Oregano ihracatının büyük bir kısmını oluşturmakla birlikte en çok kültüve edilen tür *O. onites* (bilyalı kekik)’tir. *O. vulgare* subsp. *hirtum* yağ ve karvakrol içeriği bakımından *O. onites*’ten daha zengindir ve eğer agronomik olarak geliştirilirse daha iyi bir alternatif sunabilir (Tınmaz, Başer, Karik, Kürkcüoğlu ve Öztürk, 2009).

Oregano içeriğindeki bileşenlerin saptanan oranları popülasyondan popülasyona değişmektedir. Yine de hemen hemen her popülasyonda bitki içeriğindeki maddelerden karvakrol baskın bileşendir (Tınmaz ve diğerleri, 2009). Esen ve arkadaşları kültüve ve yabani *O. vulgare* subsp. *hirtum* yağlarının karvakrol (sırasıyla %82,9-7,5 ve %85,4-5,3) ve timol (sırasıyla %60,1-0 ve %68,0-0,3) ihtiva ettiklerini belirlemiştir (Esen, Azaz, Kurkcuoglu, Baser ve Tinmaz, 2007). Bu sonuçlar kültüve ve yabani İstanbul kekiğinin karvakrol ve timol içeriği açısından fazla bir farklılığa sahip olmadığını göstermektedir. Ayrıca; *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, *Thymus* ve *Corydothymus* cinsinden elde edilen uçucu yağda ana bileşen olarak öne çıkan karvakrol (S-izopropil-2-metilfenol), antibakteriyal, antifungal, antihelmintik, insektisidal, analjezik ve antioksidan olarak önemli rol oynadığı bilinen monoterpenik bir fenoldür (Koparal ve Zeytinoğlu, 2003). Timol (2-izopropil-5-metilfenol), karvakrolün izomeri olan, antioksidan bir aromatik monoterpendir (Moldao-Martins, Bernardo-Gil, Da Costa, ve

Rouzet, 1999). Timokinon ise antioksidan ve ağrı kesici özelliklere sahip bir bileşendir ve özellikle çörekotunda (*Nigella sativa*) bulunmaktadır. Bu maddenin normal hücreler üzerinde çok düşük toksik etkisi olmasına rağmen kanser hücreleri üzerinde öldürücü etki gösterdiği bulunmuştur (Badary, 1999).

O. vulgare subsp. *hirtum*'un etanol özütündeki β -karoten ve likopenin en yüksek konsantrasyonları sırasıyla 0,79 mg/g ve 0,31 mg/g bulunmuştur (Bejaoui, Boulila ve Boussaid, 2013). Özcan ve arkadaşlarının çalışmalarına göre *O. vulgare* subsp. *hirtum* yapraklarının GC-MS (gaz kromatografisi- kütle spektrometrisi) ile analizi sonucunda yirmisekiz bileşen tanımlanmıştır. Bunların büyük bir kısmı karvakrol (%51,4 ve %63,3), linalool (%28,3 ve %2,3), γ -terpinen (%6,0 ve %9,9) ve p-simen (% 4,8 ve %8,7) oluşturmaktadır. Yağlar ayrıca oksijene monoterpenoidler ve monoterpenoid hidrokarbonları içerir (Özcan ve diğerleri, 2012). Uçucu yağında bulunan diğer bileşenler: borneol, mirsen, β -karyofilen, α -tujen, α -pinen, α -terpinen, terpinen-4-ol ve diğer monoterpenlerdir (Prof. Dr. Mine Kürkçüoğlu'nun analiz sonucu). Bu aktif bileşenler yanı sıra oregano kurutulmuş yapraklarında bitkiye has olarak oreganol maddesi bulunmaktadır. Kuru oregano yaprakları ayrıca rosmarinik asit (Koukoulitsa ve diğerleri, 2006; Shen ve diğerleri, 2010) ursolik asit (Shen ve diğerleri, 2010; Venkateswara, Mukhopadhyay, Annamalai, Radhakrishnan ve Sahoo, 2011), oleanolik asit (Shen ve diğerleri, 2010; Venkateswara ve diğerleri, 2011), kafeik asit (Koukoulitsa ve diğerleri, 2006), Oreganol A ve Oreganol B maddeleri (Matsuura ve diğerleri, 2003) bulundurulur. Flavanoidlerden apigenin, luteolin, eriositrin, krisoeriol, diosmetin, kuersetin (Kulisić, Krisko, Dragović-Uzelac, Milos ve Pifat, 2007) ve eriyodiktiyol (Matsuura ve diğerleri, 2003) içerir. Oregano yapraklarının bulundurduğu diğer başlıca maddeler ise; kosmosid, visenin-2, *p*-ment-3-en-1,2-diol 1-O- β -glukopiranosid, Epi-litospermik asit B, litospermik asit B, 10-epilotospermik asit B, 10-epilotospermik asit, 12-hidroksijasmonik asit ve onun β -glukopiranosidi (Koukoulitsa ve diğerleri, 2006), β -sitosterol ve triacontanol (Venkateswara ve diğerleri, 2011) gibi bileşenlerdir.

Oregano uçucu yağı içeriğindeki timol ve karvakrol fenolik bileşenleri ile bağlantılı olarak antiparazitik aktiviteye sahiptir (Sartoratto ve diğerleri, 2004; Santoro ve diğerleri, 2007). Timol, *Lippia* ve *Thymus* cinsi bitkilerin uçucu yağlarındaki başlıca

bileşen olup (Gomes Nogueira ve Moraes, 2011; Boubaker Elandalousi ve diğerleri, 2013) *H. contortus* üzerine antihelmintik aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır (Camurça-Vasconcelos ve diğerleri, 2007; Boubaker Elandalousi ve diğerleri, 2013; Ferreira ve diğerleri, 2016). Hidroksil radikali bulundurduğu için yüksek toksisiteye neden olan bir fenolik bileşendir. Timolün asetilasyonu, hidroksil radikalının asetil grubuyla yer değiştirmesi, toksisiteyi düşürmek ve biyolojik etkilerini güçlendirmek için bir alternatif olabilir (Andre ve diğerleri, 2016). Timolün oldukça iyi bir antifungal ve antiseptik olduğu ve fenollere kıyasla çok daha fazla antiseptik ve daha az toksik etkisi olduğu bildirilmiştir. (Fakılı, 2010).

Comet analizi karvakrolun *in vivo* DNA hasarını indüklediğini göstermiştir. Aynı zamanda histopatolojik değişimler de gözlenmediği için potansiyel gıda koruyucusu olarak iyi bir profile sahiptir. Timol, karvakrol, *p*-simen, γ -terpinen ve timil asetatın antiradikal aktivitesi yüksek bulunurken, anti-inflamatuvar aktivitesi düşük bulunmuştur (Llana-Ruiz-Cabello ve diğerleri, 2016). *O. vulgare* L. uçucu yağının yaygın bir sestod olan *Echinococcus granulosus* üzerine antihelmintik etkisi olduğu gösterilmiştir (Pensel ve diğerleri, 2014).

Kekik yağı güçlü antimikrobiyal ve antifungal etkilere sahiptir. Gıda endüstrisinde pek çok sosun içeriğinde kekik yağı bulunur. Bu yağ bazı yörelerde kesme şeker üzerine bir damla damlatılarak dahilen kullanılabilmeyle beraber genellikle haricen kullanılır. Kekiğin suyla damıtılması yoluyla elde edilen kekik yağı (esansı) kendine özgü keskin bir kokuya ve yakıcı bir lezzete sahiptir. Kekik çayı hazmettirici ve gaz gidericidir. Yapılan çalışmalar kekik suyunun mide ve bağırsaklardaki kasılmaları çözdüğünü ve ağrıları gidermenin dışında sindirim sisteminin çalışmasını düzenlediğini, safrayı arttırarak sindirimi kolaylaştırdığını kanıtlamıştır. *O. vulgare* subsp. *hirtum* türü genellikle yurdumuzun Batı bölgelerinde nadiren de Güney sahillerinde toplanıp baharat veya tıbbi çay hazırlanması amacıyla kullanılmaktadır. Bu kekik türünden %1-7 oranında uçucu yağ elde edilirken, yağ içeriğindeki karvakrol oranı %23-80 arasında değişmektedir (Başer, 2001).

Kekik yağı deriyi yakıcı özellikte olmasına rağmen açık yara üzerine sürülürse yanma hissine sebep olmaz. Ayrıca içerdiği antimikrobiyal ve antifungal etkili maddeler sayesinde yara iyileşmesini kolaylaştırır. Kekik yağının ana bileşeni olan karvakrolün ağrı kesici özelliği vardır. Halk arasında romatizma ağrıları ve baş ağrısının giderilmesi için ağrılı bölgelere sürülmesi bu özelliğinden dolayıdır. Karvakrol ciltten kolayca emilebilen ve hücre zarını geçebilen bir bileşendir. Kekik, et yemekleri, çorbalar ve salatalarda baharat olarak kullanılmasının yanında ülkemizin çeşitli yörelerinde kekik çayı hazırlamak için de toplanmaktadır. Kekik çayının hazırlanması sırasında kekik yalnızca 1-2 dakika sıcak suda bırakılır veya kuru kekik üzerinden sıcak su geçirilir (Başer, 2001).

Antioksidan özellikte maddeleri içeren gıdaların tüketilmesi sağlığın korunabilmesi için gereklidir. Bitkisel antioksidanlar temelde iki gruptur; flavanoller ve fenolik asitler. Bu maddeler bitkinin kendisini UV ışınları veya yaralanma gibi durumlara karşı korumasında görev almak üzere sentezlenirler. Ayrıca bitkinin hastalıklara karşı dirençli olmasını da sağlarlar (Bennett ve Wallsgrove, 1994). Kekik, antioksidan bitkilerden biridir ve ülkemizin en önemli ihracat ürünlerinin başında gelen baharattır (Gürbüz ve diğerleri, 2011). Kekik içerdiği çeşitli bileşenlerin faydalı özelliklerinden dolayı tarımda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde yer alır (Novak ve diğerleri, 2000). Gıdaların bozulmasına neden olan bakterilere karşı antiseptik özelliğinden dolayı gıda endüstrisinde de son yıllarda daha çok kullanılmaya başlanmıştır (Kılıç ve Bağcı, 2008).

Helicobacter pylori pek çok gastrointestinal ve ekstra-gastrointestinal hastalığa sebep olabilen ve gastrik karsinoma için büyük bir risk faktörü olan bir patojendir. *Satureja hortensis* ile *O. vulgare* subsp. *hirtum* uçucu yağlarının ikiye bir oranında karıştırılması ile hazırlanan karışımın farelerde *in vivo* olarak *H. pylori*'ye karşı denenmesi sonucunda farelerde patojenin %70 oranında başarılı bir şekilde azaltıldığını göstermiştir (Lesjak ve diğerleri, 2016). Adam, Sivropoulou, Kokkini, Lanaras ve Arsenakis, (1998) *O. vulgare* subsp. *hirtum* yağının *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* ve *Salvia fruticosa* uçucu yağlarından daha güçlü bir antifungal etkiye sahip olduğunu kanıtlamışlardır. Bu çalışmada bitkinin uçucu yağının 1/50 000 dilüsyonda 6 saat boyunca uygulanmasının metabolik olarak aktif hücrelerin sayısında %95 azalmaya

sebebi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada yapılan Ames testi ile mutajenik etkisinin olmadığı da ortaya çıkarılmıştır.

2.2.2. *Momordica charantia* L.

Momordica charantia L. (Kudret narı), Cucurbitaceae familyasından, Doğu Afrika, Güney Amerika, Asya, Karayipler, Hindistan ve Güneydoğu Asya'yı kapsayan tropiklerin yerli bitkilerindendir (Gupta, Sharma, Gautam ve Bhadauria, 2011). Türkiye'de bahçelerde ss bitkisi olarak yetiştirilmekle birlikte, Mersin'de ve Bursa ekmeky'de kültüvasyonu yapılmaktadır.

Momordica charantia L. türü aşağıda verilen taksonomik kategoride yer almaktadır (Integrated Taxonomic Information System, [ITIS], t.y.a).

Alem: Plantae

Altalem: Viridiplantae

Superdivision: Embryophyta

Division: Tracheophyta

Subdivision: Spermatophytina

Sınıf: Magnoliopsida

sttakım: Rosanae

Takım: Cucurbitales

Aile: Cucurbitaceae

Cins: *Momordica* L.

Tr: *Momordica charantia* L.

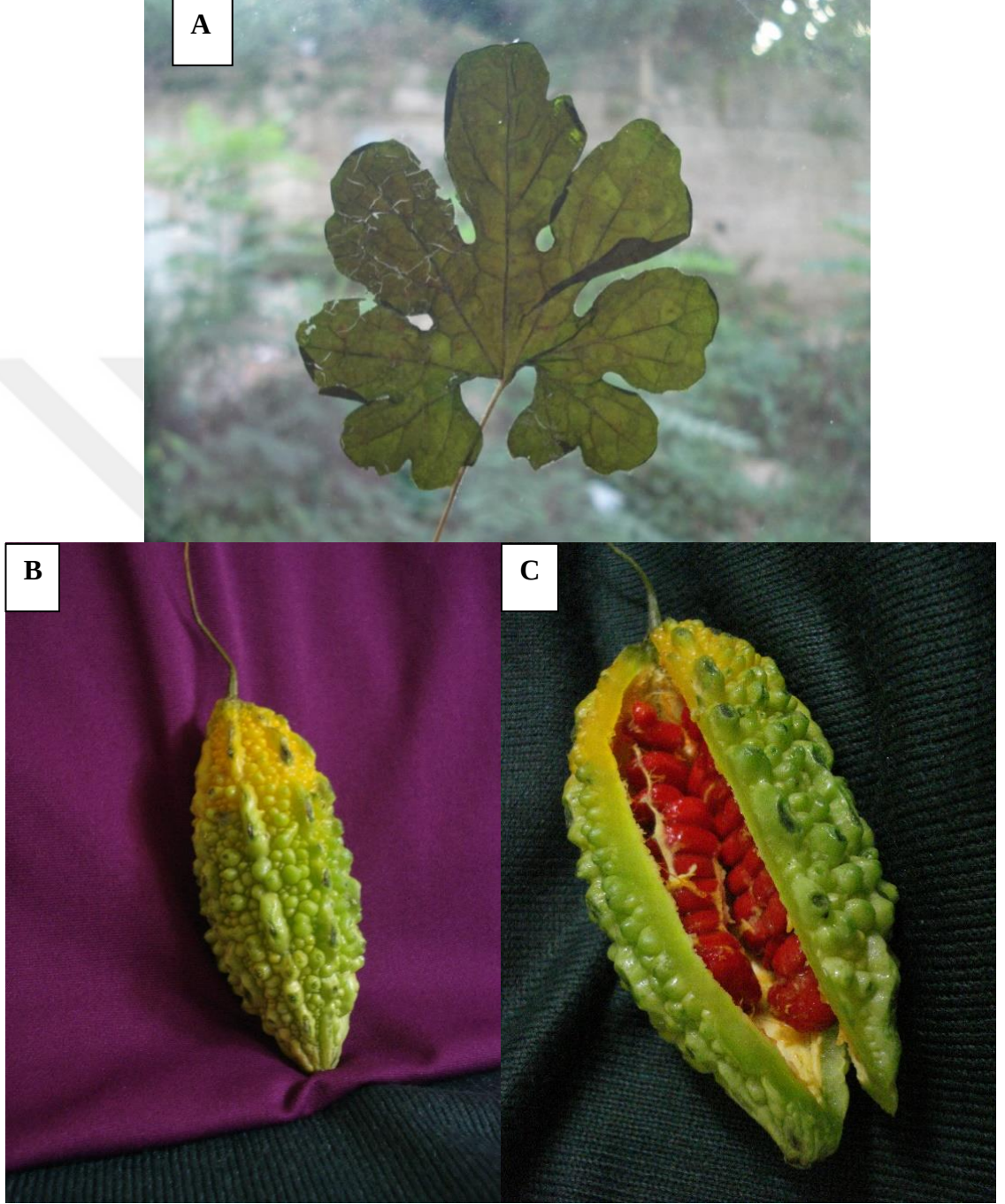
Meyvaları 10-15 cm uzunlukta, iç biçiminde, üzeri pürtüklü, önce yeşil sonra parlak sarı veya turuncu renklidir. Olgunlaşınca kendiliğinden yarıılır ve içinden, üstü kırmızı bir arillus ile kaplı tohumlar görülür. Tohumlar 1 cm kadar uzunlukta, böcek biçiminde, üzerleri desenli ve kenarları tırtıklıdır (Baytop, 1999). Petaller serbest, kırmızı kabuklu tohumları taşıyan meyve etli bir kapsüldür. Tırmanıcı geniş şekilde loplu yapraklı, erkek iek sapları üzerinde belirgin yeşil brakteler median, sarı çiçekler ve turuncu-kırmızı, tuberklat meyveler ile karakterizedir ve genellikle bahçelerde kültürü yapılır (Davis

1972). Tek yıllık, 2-3 metre boya sahip olan, tüysüz veya çok az tüylü, yeşil gövdeli, yaprakları basit alternat bir bitkidir.

Kudret narı içeriğinde demir, kalsiyum, fosfor ve B vitaminleri, %40-50 protein, sabit yağlar; trienasitlerden, α -elaosterinasit ve trichosanasit, alkaloitler, saponinler, kinonlar, reçine, musilaj, steroller, taninler, momordikosid, momordisilin, kukurbitinler, kukurbitasinler ve lektinler bulunur. Momordisin I ve II kudret narının ikincil metabolitleridir ve *Spodoptera litura* yumurta hücrelerine uygulandıklarında glukoz absorpsiyonunu engelleyerek sitotoksik etki gösterir (Liu ve Wang, 2015). Çok sayıda tıbbi özelliğe sahip olan bu bitki antibakteriyel (Costa, Nascimento, Campos ve Rodrigues, 2010), antifungal (Gupta, Sharma ve Bhadauria, 2016) ve antiviral (Puri ve diğerleri, 2009) aktivitelerinin yanı sıra antihelmintik aktiviteye de sahiptir (Tjokropranoto ve Nathania 2011; Pereira ve diğerleri, 2016). *Momordica charantia* yapraklarının %70'lik etanolik özütleri domuz nematodu *Ascaris suum*'a karşı %88'e varan helmint öldürme kabiliyeti göstermiştir (Tjokropranoto ve Nathania, 2011). Başka bir çalışmada 12,5 mg/mL konsantrasyondaki yaprak özütlerinin *Fasciola hepatica* yumurtaları üzerine embriyonik gelişimi engelleyici etki ettiği gösterilmiştir (Pereira ve diğerleri, 2016). *M. charantia*'nın sulu özütlerinin ratların kurşun ile akut zehirlenmesinde karaciğer ve böbrekler üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (H. H. Lee, Cheong, Huh, Song ve Boo, 2009). Bu nedenle daha önce sentetik antihelmintik ilaçlar kullanmış ve kullandıkları ilaçların etkisi ile karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında bozukluk olan kişiler veya hayvanlar tekrarlanan bir helmint enfeksiyonunda *M. charantia* yapraklarını veya yapraklarından elde edilen ekstreyi uygun dozda kullandıklarında hem helmintlerden kurtulabilmekte hem de bu organlar üzerindeki olumlu etkisi sayesinde daha güçlü bir iyileşme sağlayabilmektedir. *Momordica charantia* yapraklarının hidroalkolik özütünün 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarda yedi gün boyunca ratlara verilmesi durumunda ratlarda karbontetraklorid ile indüklenen karaciğer hasarına karşı önemli bir karaciğer koruyucu aktivite gösterdiği bulunmuştur (Chaudhari, Chaware ve Joshi, 2009).

Şekil 2.6'da özütü hazırlanmak üzere Temmuz ayında Bursa Çekmeköy'deki kültüvardan alınıp kurutulan *M. charantia* yapraklarından birinin preslenmiş hali ve

Ekim ayında İstanbul Göktürk köyünden alınan *M. charantia* meyvesinin fotoğrafları görülmektedir.



Şekil 2.6. *M. charantia* yaprak ve meyvesi **A)** Bursa Çekmeköy’deki kültüvardan yaş olarak temin edildikten sonra preslenen *M. charantia* yaprağı **B)** *M. charantia* yaş meyvesinin dış görünümü, **C)** Meyvenin parlak kırmızı tohumlarla dolu içi (Orijinal)

M. charantia Asya’da geleneksel tedavi amacıyla ve bir sebze olarak tüketilmektedir (Gupta ve diğerleri, 2011). Ancak bu bitkinin meyveleri içinde yer alan kırmızı parlak tohumları üzerindeki arillus zarda toksik maddeler bulunmaktadır. Bu nedenle bu bitki toksik etkilere neden olabilir. Bitkinin yaprakları ve meyvesinin etli kısmı dahilen kullanılabilirse de farmakolojik amaçlı kullanımında doza dikkat edilmesi gerekmektedir.

Kudret narı özütlerinin farelerde spontane meme tümörijenезin inhibisyonunda (Nagasawa, Watanabe ve Inatomi, 2002) ve benzo(a)piren-indüklü fare önmide tümörijenезinde (Deep, Dasgupta, Rao ve Kale, 2004) antitümör özellikte olduğu bildirilmiştir. Bunların dışında bitkinin antioksidan (Shi, Hiramatsu, Komatsu ve Kayama, 1996), antiviral (Lee-Huang ve diğerleri, 1995), antidiyabetik ve bağışıklığı düzenleyici (Cunnick, Sakamoto, Chapes, Fortner ve Takemoto, 1990) özellikleri olduğu keşfedilmiştir. *Momordica charantia*’dan izole edilen kimyasal bileşenler insülin-benzeri etki gösterir veya insülin salınmasını teşvik edebilir (Ng, Wong, Li ve Yeung, 1986). Literatüre göre bitkinin hipoglisemik etkisi; hepatik glukoneojenezisi azaltarak ve akâbinde hepatik glikojen sentezini arttırarak veya kırmızı kan hücreleri ve yağ hücrelerinde glukoz oksidasyonunu arttırarak ortaya çıkıyor olabilir (Shibib, Khan ve Rahman, 1993).

Ratlarda yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre *M. charantia* yapraklarının sulu özütleri spermatogonial hücreler üzerinde mutajenik etkiye sahip bulunmuştur. Bunun kromozomal aberasyon etkisinden kaynaklandığı düşünülebilir. 80 mg/kg, 100 mg/kg ve 120 mg/kg dozlarda uygulanan sulu özütlerin istatistiksel olarak anlamlı derecede Dominant Lethal Faktör artışına neden olduğu tespit edilmiştir (Shittu, Adeleye ve Taiwo, 2015). Bu sonuçlar *M. charantia* sulu özütünün veya bitkinin kendisinin genotoksik özelliğinden dolayı antihelminetik amaçla kullanıldığında düşük dozda kullanılması gerektiğini veya bitkiden izole edilecek biyoaktif maddelerin tedavide kullanılmasının daha uygun olacağını düşündürmektedir.

M. charantia’nın antosiyaninler, askorbijen, karoten, likopen ve flavanoidlerden kuersetin, luteolin, saponinlerden momordisin I ve momordisin II, momordin,

momordikosid, karavilagenin, karavilosid ve kuguasin-J, steroidlerden daucosterol, terpenoidler ve kukurbitasin ihtiva ettiği bilinmektedir (Poolperm ve Jiraungkoorskul, 2017). Bunların yanı sıra karantadiol-A, goyaglikozitler, karantozitler ve momordikozitler *M. charantia*'da bulunan biyolojik aktif maddelerdir.

2.2.3. *Rubus canescens* DC.

Rubus canescens DC., (Çobankösteği) Rosaceae (Gülgiller) familyasından çok yıllık dikenli bir çalı türüdür. *Rubus* cins ismi “tatlı çalı” anlamına gelmektedir.

Rubus canescens DC. türünün taksonomik hiyerarşisi (Integrated Taxonomic Information System – Report, t.y.b) şu şekildedir:

Alem: Plantae

Bölüm: Tracheophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Takım: Rosales

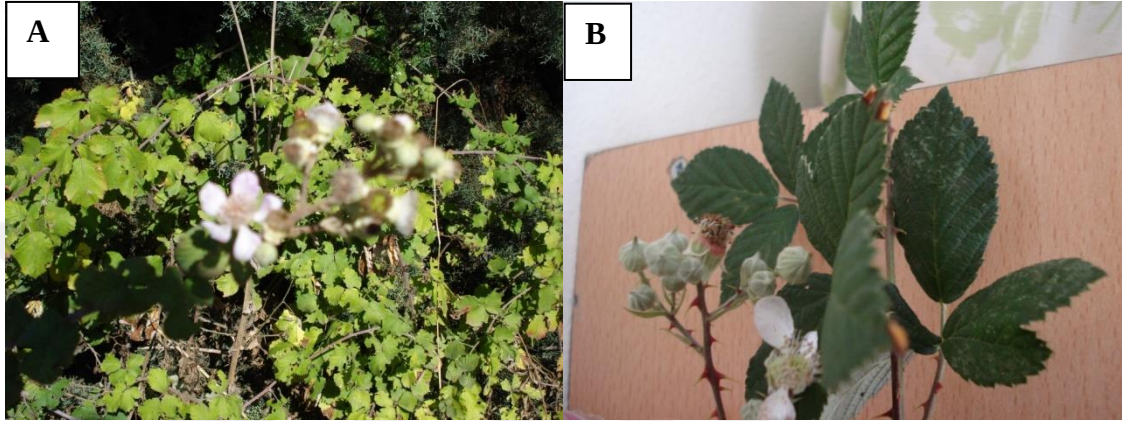
Aile: Rosaceae

Cins: *Rubus* L.

Tür: *Rubus canescens* DC.

Morfolojisi: Yapraklar 3 veya 5 yaprakçıklı, yaprakçıklar alt yüzde tüylü ve dişli kenarlı, yaprakçıklar üzeri pamuk gibi, aşağıdakiler tüysüz yukarıdakiler yıldız şeklinde beyaza çalan pamuğumsu, ısırıcı, lateral olanlar neredeyse sapsız, terminal olan kısa sapçıklı, kamamsı-taban kısmı ince. Çiçek filizleri dik, 15-40 cm, açılı, ince tüylü. Seyrek salkım terminal, çok çiçekli, dar oblong, sadece 1,5-3 cm genişlikte. Petaller beyaz (kuruyunca soluk sarımsı), taban kısmı ince, 5-8 mm. Yapraklar üç yaprakçıklı veya beş yaprakçıklı. Meyva önce yeşil, sonra kırmızı ve olgunlukta siyahımsı renklidir (Davis, 1972). Yayılış alanları çok geniştir; Kırklareli, Balıkesir, İstanbul, Bolu, Kastamonu, Samsun, Amasya, Gümüşhane, İzmir, Kütahya, Eskişehir, Yozgat, Denizli, Sivas, Tunceli, Isparta, İçel ve Adana. Sadece Doğu’da nadir bulunur (Davis, 1972). Şekil 2.7’de özütü çıkarılmak için kökleri sökülen *R. canescens* türünün Bursa’da

çekilen resimleri gösterilmektedir. Şekil 2.7. A'daki resim, özüt hazırlamak üzere böğürtlen köklerinin söküldüğü Bursa Uludağ Üniversitesi Görükle Kampüsü içinde, 5 Ekim 2018 tarihinde çekilmiştir. Şekil 2.7. B'deki resimde ise beyaz çiçek taç yapraklarının bazıları dökülmüş olsa da koyu yeşil yaprakların üst yüzleri ile beyaz alt yüzü ve kırmızı dikenler belirgin şekilde görülmektedir.

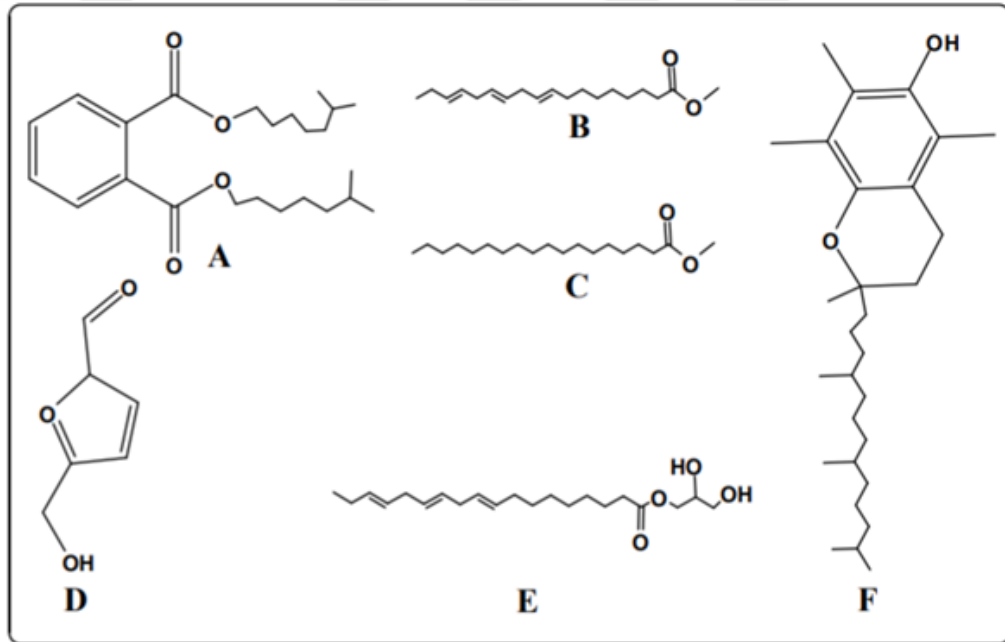


Şekil 2.7. *R. canescens* toprak üstü kısımları, **A)** Bitkinin karakteristiği beyaz çiçekler **B)** 2017 yılı Ekim ayında Bursa Hüseyinalan köyünden toplanan *R. canescens* örneği (Orijinal)

Meyvelerinin akut toksik etkisini göstermeyi amaçlayan bir çalışmaya göre *R. canescens* meyvelerinin metanolik özütleri 800 mg/kg dozda, hayvanlar üzerinde yaklaşık %40 LD₅₀ değerine sahiptir. Aynı çalışmadaki *in vitro* deneyde *R. canescens*'in 40 mg/mL konsantrasyonu *Raillietina spiralis* ve *Ascaridia galli* parazitleri üzerine öldürücü etki ve paraliz süreleri açısından ABZ ve Piperazin sitrat'ın 10 mg/mL konsantrasyonuna yakın bir antihelmintik etki göstermiştir (Ali ve diğerleri, 2013). Bitki aneljezik özelliğe de sahip olduğu için (Riaz ve Rahman, 2015) helmintleri %100 öldürmese bile bazı helmintik enfeksiyonlardan kaynaklanan şiddetli karın ağrısı şikayetlerini de giderebilecek bir bitkidir. Böğürtlende bulunabilen bir bileşen olan ellajik asidin *Haemonchus contortus*'a karşı antihelmintik etki gösterdiği *in vitro* bir çalışmada gösterilmiştir (Mondal ve diğerleri, 2014). Bitkinin içerdiği ellajik asidin antihelmintik etkisinin çok iyi bir elektron alıcısı olması dolayısıyla oksijenli solunumdaki elektron taşıma sistemine müdahale etmesi ve nematodların ATP üretimini aksatması vasıtasıyla olabileceği tahmin edilmektedir (Vattem ve Shetty, 2005). Ellajik

asidin levamisole ve albendazole dirençli *C. elegans* yabancı tiplerinde inhibe edici etki göstermesi ve bu tür ilaçlardan farklı bir aksiyon mekanizmasına sahip olması (Ndjonka Rapado, Silber, Liebau ve Wrenger, 2013), ellajik asidin antihelmintik ilaçlara direnç gelişimi durumunda kullanılabileceğine işaret etmektedir.

Gaz kromatografisi ile yapılan bir çalışmaya göre *R. fruticosus* kökünde bulunan temel bileşenler %40,55 ile 2-furankarboksaldehid, %43,97 ile diizooktil fitalat, %2,13 ile hekzadekanoik asit metil ester, %4,09 ile 12-oktadekanoik asit metil esterdir (Abu-Shandi ve diğerleri, 2015). Bu moleküllerin 2 boyutlu yapıları Şekil 2.8’de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Böğürtlen köklerinde saptanan majör bileşenler. **A)** Diizooktil fitalat **B)** 9, 12, 15-oktadekantrienoik asit metil ester **C)** Hekzadekanoik asit metil ester **D)** 2-Furankarboksaldehid **E)** 9, 12, 15-oktadekantrienoik asit propilen diol **F)** Vitamin E (Abu-Shandi ve diğerleri, 2015)

Böğürtlen yaşlanmaya bağlı problemlerin giderilmesinde önemli faydaları olan bir bitkidir. İçerdiği antioksidan bileşikler (vitamin C, ellajik asit, antosiyaninler ve total fenolikler) sayesinde serbest radikallerin hücrelere zarar vermesini engelleyerek (Elisia, Hu, Popovich ve Kitts, 2007; Wang ve Lin 2000) kanser riskini azaltır. Bitkinin yaprakları diyabetik ratlarda hipoglisemik bir etki göstermiştir (Bailey ve Day, 1989).

Son zamanlarda, hafıza ve öğrenme üzerine yapılan testlerde de bitkinin kullanılmasının sonuçları olumlu etkilediği bildirilmiştir (Gomar, Hosseini ve Mirazi, 2014). Meyvelerinin sulu özütünün hiyalurodinaz inhibitör aktivitesi olması da (Marquina, Corao, Araujo, Buitrago ve Sosa, 2002) derinin sarkmasını önleme özelliği olduğunu göstermektedir. Kanseri, diyabet, hafızanın zayıflaması ve derinin elastikiyetinin azalması yaşa bağlı olarak arttığı için böğürtlen yaşlanmaya karşı kullanılabilecek iyi bir bitkisel seçimdir.

Böğürtlenin içerdiği fenolik asitler, taninler ve flavanoidler açısından araştırıldığı bir çalışmada ise gallik asit; gallokteşin; protokatekuik asit; epigallokteşin; kateşin; 7, p-hidroksibenzoik asit; kaffeik asit; malvidin-3-glukozid; p-kumarik asit; kateşin gallat; siyanidin; ellajik asit; kuersetin (kuersetin-3-ramnozid); sinnamik asit ve luteolin içerdiği gösterilmiştir (Huang, Zhang, Liu ve Li, 2012).

2.2.4. *Artemisia annua* L.

Artemisia annua L. (Peygamber Süpürgesi, Kâbe Süpürgesi, Tatlı pelin) 50-150 cm yükseklikte, tüysüz, keskin ve hoş kokulu, tek yıllık, otsu bir bitkidir (Şekil 2.9). İsmi öfkeli kraliçe Artemis'ten aldığı da rivayet edilmiştir. Kraliçe Artemis kocasının savaşta öldürüldüğünü öğrendiğinde buna çok öfkelenmiş ve o günden sonra içtiği her şeye kocasının küllerini serpiştirmiş. Bu nedenle acımsı tadı sebebiyle bu bitkiye onun isminin verilmiş olabileceği tahmin edilmiştir. Antik Çince “yeşil ot” manasına gelen Qing Hao (Willcox ve diğerleri, 2004), Latince *Artemisia annua*, İngilizce “sweet annie”, Türkçe ise “Peygamber Süpürgesi” olarak isimlendirilmiş ve dünyanın farklı yerlerinde binlerce yıldır farklı tedavi amaçlarıyla kullanılmıştır. Papatyagiller (Asteraceae) familyasına ait *Artemisia* cinsi, dünyada en geniş yayılışa sahip cinstir (Bora ve Sharma, 2011).



Şekil 2.9. *A. annua* yaprakları (Orijinal) (2020 yılında İstanbul Eyüp'ten toplandı)

Artemisia annua L.'nin taksonomisi aşağıda verilmiştir (Babac 2004).

Alem Plantae

Altalem Tracheobionta

Şube Magnoliophyta

Sınıf Magnoliopsida

Altsınıf Asteridae

Takım Asterales

Aile Asteraceae

Cins *Artemisia*

Tür *Artemisia annua* L.

Ülkemizdeki yayılış alanı: Çanakkale, İstanbul, Bursa, Samsun, Elazığ, Konya ve Hatay'dır. *A. annua* uçucu yağ ve rezin taşır. Gövde ince tüylü genellikle kırmızımsıdır. Yapraklar 2-pinnatisekt, segmentler düzenli ve derin şekilde dişli. Kapitula küresel, çok çiçekli, 2-4 mm kalınlıkta. Dıştaki yapraklar oblong, içtekiler ince tabanlı-oblong ve

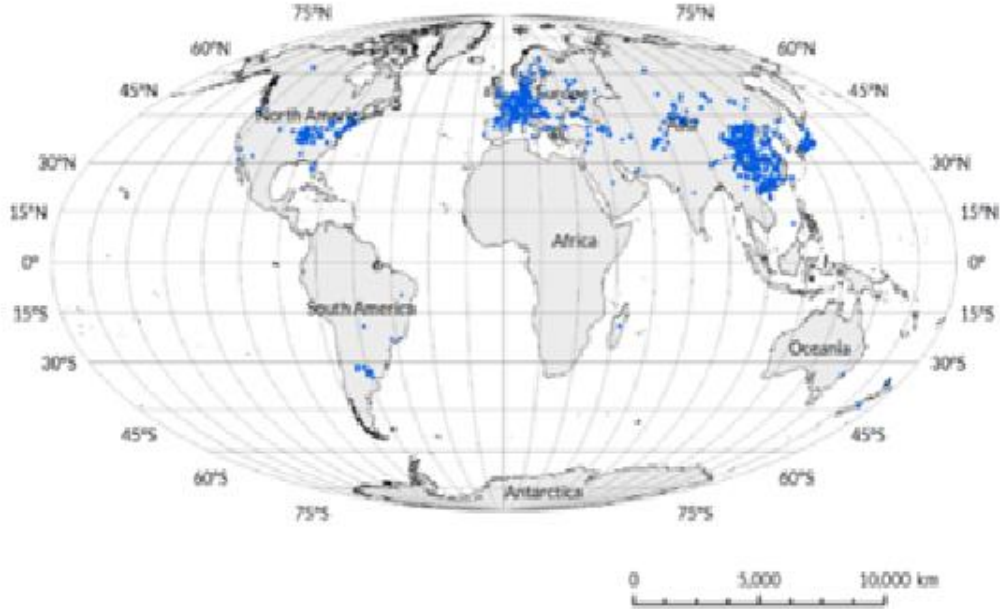
dıştakilerden daha uzun, çoğunlukla ince ve kuru zarlı. Dıştaki çiçekler filiform, dişi, içtekiler hermafrodit, kısır, korolla sarımsı, küresel. Tarlalar ve düşük yüksekliklerde bulunur (Davis, 1975).

Dahilen dizanteri ve vereme karşı, infüzyon (%2-3) halinde, haricen ise çıbanları iyileştirici olarak kullanılmıştır (Baytop, 1999). *A. annua* çeşitli flavanoidler, terpenoidler ve kumarinler içerir ve bu bitkide bulunabilen 600'den fazla ikincil metabolit tanımlanmıştır (Van der Kooy ve Sullivan, 2013). Bunlardan bazıları artemisinin, deoksiartemisinin, artemisinik asit, arteannuin-B, stigmasterol, friedelin ve artemetindir (Zheng, 1994). *A. annua* anti-hiperlipidemik, anti-plasmodial, anti-inflamatuvar, anti-kolestolemik (Abad ve diğerleri, 2012, Wang ve diğerleri, 2020) ve antiviral (Lubbe ve diğerleri, 2012) özelliklere sahiptir. *A. annua* uçucu yağının antibakteriyal, antifungal (Juteau, Masotti, Bessière, Dherbomez ve Viano, 2002) ve akarisidal (Pirali-Kheirabadi ve Teixeirada-Silva, 2011) aktiviteler gösterdiği kaydedilmiştir. Son zamanlarda Corona virüse karşı etkinliği *in vitro* olarak araştırılmış ve SARS-CoV-2'nin replikasyonunu engellediği anlaşılmıştır (Nair ve diğerleri, 2021). Anavatanı Çin olan bu bitki 2000 yıldan uzun süredir Geleneksel Çin Tıbbında yüksek ateşi düşürmek amacıyla kullanılmaktadır (Willcox ve diğerleri, 2004). 1970 yıllarında *A. annua*'dan izole edilen artemisinin maddesinin sıtma tedavisinde etkili olduğu keşfedildikten sonra bitki dünya çapında önemsenmiş ve geniş coğrafyalara yayılmıştır. Artemisinin maddesinin sıtma paraziti *Plasmodium falciparum* üzerindeki inhibisyonu *in silico* bir çalışmayla da gösterilmiştir (Shukla, Gund ve Meshnick, 1995). Artemisinin analoglarının antimalarial mekanizmasının araştırıldığı *in silico* çalışmalar da artemisinin türevlerinin daha detaylı şekilde incelenmesine imkân vermiştir (Cheng ve diğerleri, 2002). Pelin otu (*Artemisia absinthium*) yaklaşık bin yıldır antihelmintik amaçlı kullanılmaktadır. İbn Sînâ'nın meşhur eseri *El Kânûn Fi't-Tıbb*'ta verdiği bilgiler ışığında absintin bebeklerde kılkurduyu yok ettiği ve pelin otu şurubunun bağırsak nematodlarına karşı faydalı olduğu bin yıldır bilinmesine rağmen, *A. annua*'nın antinematodal etki mekanizması halen bilinmemektedir. Cala ve diğerleri (2014) tarafından yapılan çalışmada *A. annua*'da bulunan artemisinin maddesinin antinematodal etkiden sorumlu olduğu öne sürülürken, artemisinin içermeyen *A.*

absinthium türünün de antinematodal olduğunun çok uzun süredir bilinmesi, bu etkiyi meydana getiren başka bileşenlerin varlığını akla getirmektedir.

A. annua biyoaktif maddelerce geniş bir yelpazeye sahip bir bitkidir. İçerdiği flavanoidler, kumarinler, steroidler, fenolikler, purinler, lipitler, alifatik bileşenler, monoterpeneoidler, triterpeneoidler ve sesquiterpeneoidler içerisinde sesquiterpeneoid ailesine mensup artemisinin, dihidroartemisininik asit, artemisininik asit ve arteannuin B yapraklar üzerinde bulunan glandular trikomalarda içinde depolanan en önemli biyoaktif bileşenlerdendir (Ferreira ve Janick, 1995).

A. annua Asya'nın yerli bitkilerindendir ve pek çok ülkede doğal olarak yayılış göstermektedir (Ferreira ve Janick, 2009). Şekil 2.10'da, sonradan getirilip yayıldığı alanlarla birlikte Dünya'daki yayılış alanları gösterilmektedir. Şekilde mavi ile taralı bölgeler *A.annua*'nın doğal olarak yetiştiği veya yetiştirildiği bölgeleri temsil etmektedir.



Şekil 2.10. *A. annua*'nın dünya üzerindeki dağılımı. Mavi noktalar bulunduğu yerleri temsil etmektedir (Jiang ve diğerleri, 2021'den değiştirilerek alınmıştır)

A. annua binlerce yıldır Çin tıbbında geniş bir kullanım alanına sahip olmuştur. Ancak yine de dünya üzerinde büyük bir yayılımı olmasına rağmen bitkinin antimalarial özellikleri 1970'lere kadar bilinmiyordu. Bitkinin tedavideki yeri söz konusu olduğunda ilk olarak sıtma tedavisi akla gelir. Özellikle 1970'de artemisinin saflaştırılıp sıtmayı tedavide etkili bileşen olduğu kanıtlanınca, bitkinin çok eskiden beri yüksek ateş tedavisinde kullanılmasının bilimsel temelleri de açığa çıkmış oldu. *A. annua* yüz kırktan fazla kimyasal madde içermekte ve bunların otuzdan fazlasının antimalarial aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir. *A. annua* aynı zamanda immünosupresif etkiler gösteren bir bitkidir (Tu, 2011).

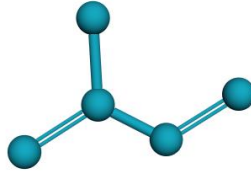
İnsanlarda gastrointestinal sistem (GİS)'de bulunan parazitlerin giderilmesi için bin yıldan uzun bir süredir çeşitli bitkisel droglar kullanılmaktadır. İbn Sînâ'nın yaklaşık bin yıl önce yazdığı *El Kânûn Fi't-Tıbb* adlı eserinde bebeklerde bulunan kılkırtlarının düşürülmesi için "absint" isimli bir ilaçtan bahsetmektedir. *Artemisia absinthium* antinematodal özellikte olduğu bilimsel olarak gösterilmiş bir bitkidir. Yine İbn Sînâ'nın bu eserinde artemisia cinsi bitkilerin (Pelin otu, Roma pelini) antihelmintik amaçla kullanılabileceği ifade edilmektedir. Roma pelin otu ve bazı bitkilerin karıştırılıp pişirilmesi ile hazırlanan pelin otu lapasının karaciğer ağrısı, mide ağrısı, soğğun sebep olduğu ateş, flegmatik ve melankolik şikayetlerde yararlı olduğu yazmaktadır (s. 145). Bu lapa, Roma pelin otunun, anason, kereviz tohumları, Hint kedi otu, rezene tohumları, bataklık sazı kökleri ile birlikte pişirilmesi ile hazırlanır. Suyu alındıktan sonra geri kalan kısımları ilaç olarak kullanılır. Aynı eserde (s. 109) pelin otu ile hazırlanan şurubun diğer bazı faydaları yanısıra bağırsak helmintlerinden kurtulmaya faydalı olduğu da geçmektedir.

A. annua yapraklarında bulunan bazı aktif bileşenler: Artemisinin, artemisinik asit, arteannuin B, deoksiartemisinin, artemetin, dihidroksiartemisinik asit, krisosplenetin, skopoletin, krisosplenol D, kamfer, 1,8-sineol (ökaliptol), kamfen, spatulenol, fridielin, stigmasterol ve kumarinlerden skoparon, 6,8-dimethoksi-7- hidroksi kumarin (izofraksidin) ve umckalin (5,6-dimetoksi-7-hidroksi kumarin)'dir ve bu bileşenler bazı araştırmacılarca çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Cai, Zhang, Ji ve Xing, 2017; Zheng, 1994).

2.3. Bitkisel Ligandları Meydana Getiren Temel Moleküler Yapılar

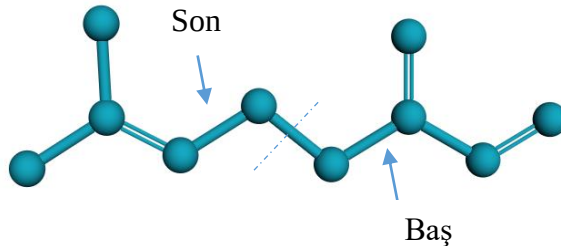
2.3.1. Terpenler

Uçucu yağlarda bulunan bileşenleri çalışmak, kimyasal araştırmaların en eski uygulamalarından biri olmuştur. Uçucu yağ bileşenleri terpenler olarak isimlendirilen bileşiklerden meydana gelmektedir. Terpenlerin en önemli yapısal özelliği, izopren birimlerinden oluşmalarıdır (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. İzopren (2-metil-1,3-bütadien) (Orijinal)

Şekil 2.12’de gösterilen mirsen, mum ağacından izole edilebilen tipik bir terpendir. Mirsenin karbon iskeleti (ikili bağları dışında) tamamen iki izopren biriminden meydana gelmiştir (Atkins ve Carey, 2003).

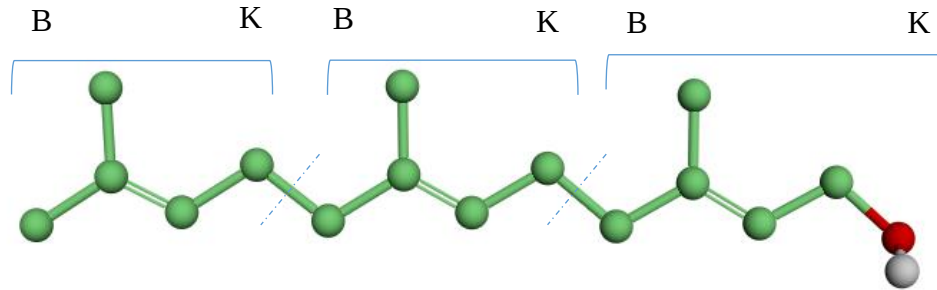


Şekil 2.12. Mirsenin 3D yapısı. Bir izopren yapısının baş kısmı diğer izoprenin kuyruk kısmına bağlanarak (şekilde kesikli çizgilerle gösterilen noktadaki bağ oluşumu ile) terpen meydana gelmiştir (Orijinal)

Monoterpenler son derece önemli, kokulu ve doğada çok çeşitli türlerde (400’den fazla yapı) bulunabilen moleküllerdir. Bunlar parfümeri endüstrisinde kullanılmak üzere çok sayıda bitkinin meyveleri, çiçekleri ve yapraklarından izole edilebilirler. Ayrıca gıda ve

eczacılık endüstrilerinde doğal aroma kimyasallarının biyoteknolojik üretimi için uygun başlangıç materyalleridir (Alcántara, Hernaiz ve Sinisterra, 2011).

Terpenler genel olarak izopren türevi bileşikler olarak bilinmekte ve sahip oldukları karbon atomlarının sayısına göre sınıflandırılmaktadırlar. Terpen terimi yalnızca hidrokarbonları tanımlamak için kullanılırken, bunun türevleri de diğer grupların ilavesiyle adlandırılmaktadır. Bazı terpen türlerinde izopren birimlerinin gösterilmesi nispeten kolayken bazı halkalı terpen türlerinde bu birimleri göstermek biraz daha zor olabilir. Şekil 2.13’de gösterilen seskiterpende 3 izopren birim, baş kuyruk bağlanması şeklinde birleşmişlerdir. Çoğu terpen bir veya daha fazla sayıda halka yapısına sahiptir ve bunlar izopren birimleri topluluğu şeklinde gösterilebilir (Atkins ve Carey, 2003).



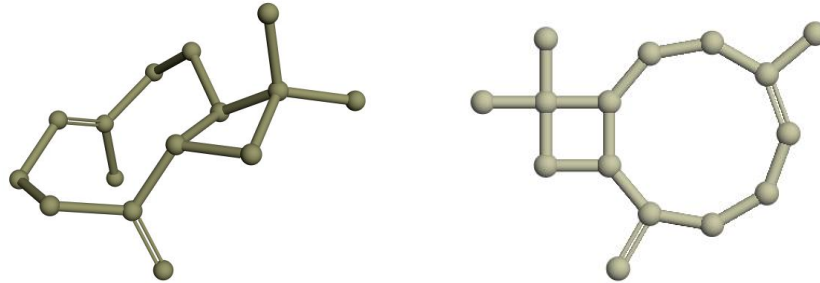
Şekil 2.13. Bir seskiterpen örneği olan farnesol ve farnesolu oluşturan izopren birimleri, B: Baş, K: Kuyruk. Kesikli çizgiler izoprenler arası bağı göstermektedir. Karbon atomları yeşil, oksijen atomu kırmızı, hidrojen atomu beyaz renkle temsil edilmiştir (Orijinal)

Terpenler yapılarındaki karbon atomlarının sayısına göre sınıflandırılmaktadır. Monoterpenler 10; seskiterpenler 15; diterpenler 20; triterpenler 30 ve tetraterpenler 40 karbon atomuna sahip gruplardır. Seskiterpenler renksiz lipofilik bileşiklerdir. Bitkilerde biyosentezleri üç izopren biriminin biraraya gelmesi ve endoplazmik retikulumda farnesil pirofosfat (FPP) yoluyla gerçekleşir (Yu ve Utsumi 2009). Şekil 2.14’de tek halkalı bir monoterpen ve iki halkalı bir seskiterpen yapısı verilmektedir.



Şekil 2.14. Soldaki şekilde verilen α -felantren tek halkalı bir monoterpendir ve okaliptus ağacında bulunur. Sağdaki şekilde gösterilen baş kuyruğa bağlı üç izopren biriminden oluşan α -selinen iki halkalı bir seskiterpendir (Orijinal)

Seskiterpenlerin stres yanıtı olarak üretildiği bazı türlerde yolakların düzenlenmesi yüksek oranda kontrol edilmektedir. *Aquilaria sinensis* (Lour.), seskiterpenleri yalnızca otçullara yanıt olarak üretir ve bunların üretiminden sorumlu yedi enzimi kodlayan 26 unigen karakterize edilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2012). Şekil 2.15’de seskiterpenlere bir örnek olarak β -karyofilenin moleküler yapısı verilmektedir.

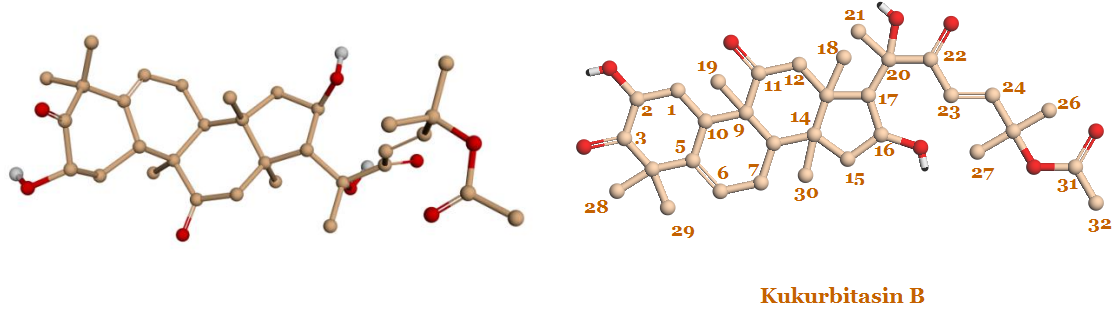


Şekil 2.15. β -karyofilenin solda 3D ve sağda 2D gösterimi (Orijinal)

Diterpenlere örnek olarak çamdan izole edilen kempren ve memelilerin yağ dokusunda ve balık yağında bulunan vitamin A verilebilir. Köpekbalığı karaciğer yağında bulunan skualan triterpenlere bir örnek ve havuçta bulunan β -karoten ise tetraterpenlere bir örnektir (Atkins ve Carey 2003).

Doğal kukurbitasinler, yüksek oranda oksijenli, kukurbitan çekirdek iskeletini içeren tetrasiklik triterpenlerdir ve ağırlıklı olarak, bitkilerde ve hayvanlarda sergiledikleri geniş biyolojik aktivite nedeniyle, doğu ilaçlarında uzun süredir kullanılan

Cucurbitaceae familyasının bitkilerinde bulunur (Duangmano, Sae-Lim, Suksamrarn, Patmasiriwat ve Domann, 2012). Şekil 2.16’da kukurbitasin-B’nin moleküler yapısı ve karbon atomlarının numaralanışı gösterilmektedir.



Şekil 2.16. Kukurbitasin-B’nin sağda 3D ve solda 2D gösterimi (Orijinal). Top-çubuk modelinde kırmızı toplar oksijen, beyaz toplar hidrojen, yavruağzı toplar karbon atomlarını temsil etmektedir

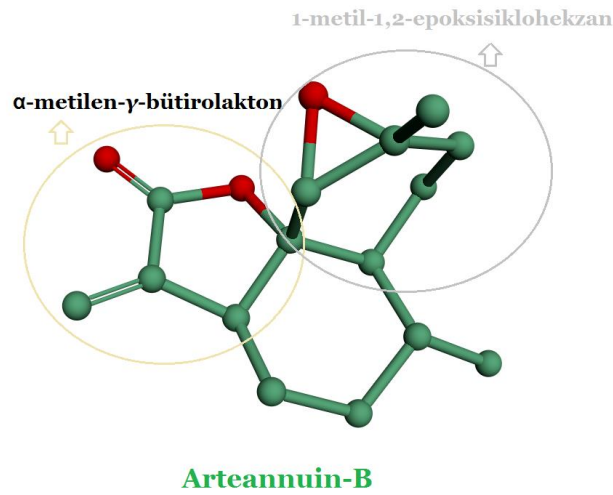
2.3.2. Laktonlar

Laktonlar, hidroksi asitlerin siklik esterleridir. Hidroksi asitler veya aktif formları genellikle laktonların biyosentezindeki doğal öncülerdir. Beş ve altı üyeli laktonlar, ilgili hidroksi asitlerden kolayca oluşturulur. Bu laktonların çeşitli varyantları kimyasal iletişimde kullanılır. Bazı makrosiklik laktonlar böceklerin salgı bezlerinde oluşturulur ve cezbedici feromonlar olarak işlev görürler. Özellikle bazı parazitoidler için bu tür makrosiklik laktonlar önemli bir uyarandır ve bazı erkek parazitler tarafından dişileri çekmek için kullanılır (Schulz ve Hötling 2015).

Seskitерpen laktonlar (STL'lar), bilinen en büyük biyojenetik olarak homojen doğal ürün gruplarından biridir. Halihazırda, Doğal Ürünler Sözlüğü, seskitерpenler hakkında, 11 000'den fazla kayda sahiptir. Bu doğal ürünler sınıfının çok sayıda tekli bileşiklerinin ve ilişkili yapısal çeşitliliğinin bir nedeni, kesinlikle onların muazzam geniş biyolojik aktivite spektrumuyla ilgilidir ve onları sentezleyen organizmalar için oldukça değerli bir savunma aracı haline getirir. Bu nedenle, çoğu STL'ın izole edildiği bitki ailesi, yani Compositae, gezegenimizdeki en büyük ve ekolojik olarak en çeşitli bitki aileleri arasındadır. Bununla birlikte, özellikle nicel yapı-aktivite ilişkileri (QSAR) açısından

bilgi mevcutsa, STL'ların yeni terapötik ajanlara öncülük eden yapılar olarak önemli bir rol oynayabileceği düşünülebilir (Schmidt, 2006).

Asteraceae'de bulunan terpenoidler, alkaloidler, fenolikler ve poliasetilenler gibi biyoaktif bileşiklerin bolluğu, onu hem biyokimyasal hem de farmakolojik olarak oldukça önemli bir familya haline getirir. STL'lar, mevcut sekonder metabolitlerin en yaygın ve biyolojik olarak önemli sınıflarından biridir ve bu nedenle bir dizi çalışmaya konu olmuştur. Seskiterpen laktonlar, en yaygın olarak Cactaceae, Solanaceae, Araceae ve Euphorbiaceae (Canales ve diğerleri, 2005) gibi familyalarda bulunan, büyük bir sekonder metabolit grubudur (Wedge, Galindo ve Macías, 2000). Şekil 2.17'de STL'lara bir örnek olarak arteannuin-B'nin moleküler yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.17. *A. annua*'da bulunan önemli bir seskiterpen lakton olan arteannuin-B'nin 3D gösterimi (Orijinal). Karbon atomları koyu yeşil, oksijen atomları kırmızı renkle temsil edilmiştir

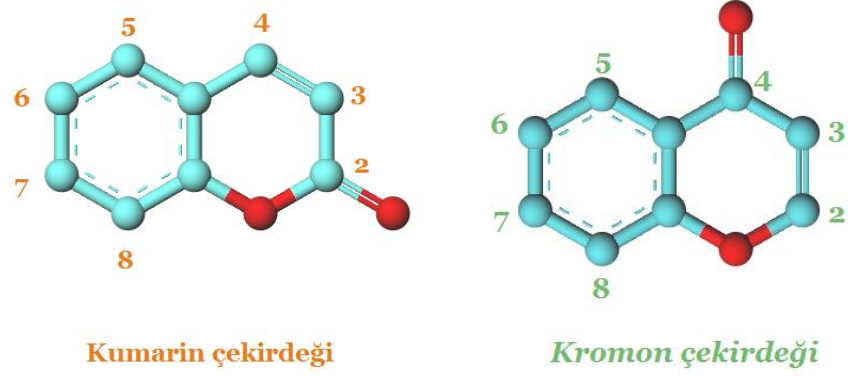
STL içeren birçok bitki yüzyıllardır tüm kültürlerin geleneksel ilaçlarında kullanılmış ve modern fitoterapide de kullanılmaya devam etmektedir. STL'ların saf kimyasallar olarak terapötik kullanımı –bitkiler veya ham ekstraktlar şeklinde geniş kullanımlarına rağmen- çok az örnekle sınırlıdır, bu da temel olarak biyolojik olarak seçicilik konusunda yapısal gerekliliklere ilişkin bilgi eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Modern farmakolojinin ortaya çıkışından yaklaşık bir asır sonra, canlı organizmalarda biyoaktif

bileşiklerin araştırılması, yeni terapötik ilaçlar ve zirai kimyasalların bulunmasında hala en önemli yaklaşımlardan biridir. Son yirmi yılda onaylanan yeni terapötik maddelerin tümü olmasa da çoğu, doğrudan veya dolaylı olarak doğal kaynaklardan elde edilen bileşikler içerir. Çoğunlukla "ikincil metabolitler" olarak adlandırılan (ikincil öneme sahip oldukları anlamına gelmez) düşük moleküler ağırlıklı doğal ürünler, yaşamın farklı alanlarından organizmaların birbirleriyle ve çevreleriyle başa çıkmalarına hizmet eden kimyasal iletişim sistemlerinin ana parçalarıdır (Schmidt, 2006).

2.3.3. Kumarinler

Diğer adı 2-H-kromen-2-on olan kumarin, benzen halkası ve α -piron halkasından oluşan beyaz bir laktondur (Şekil 2.18). Kumarin çekirdeği (benzo-2-piron), biyo-sentezde sinamik asitten elde edilir. Kumarin ailesi üyeleri, biyolojik aktivitelerini değiştirebilen çok değişken yapılar sahiptir. Kumarinler, antikoagülan, antimikrobiyal, anti-inflamatuar, analjezik, antioksidan, antikanser, antiviral, antimalarial (Sahoo, Shukla, Nandy ve Sahoo, 2012), anti-osteoporoz, antiseptik, anti-HIV, anti-hipertansiyon, anti-aritmi, antifungal (Čačić, Pavić, Molnar, Šarkanj ve Has-Schön, 2014) ve antinosiseptif (Alipour ve diğerleri, 2008) özellikler gibi çeşitli biyolojik aktiviteler gösterebilmektedir. Kumarinin kendisinin ve 7-hidroksikumarinin, bir dizi insan malign hücre hattının proliferasyonunu *in vitro* olarak inhibe ettiği ve çeşitli hayvan tümörlerine karşı aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Darla ve diğerleri, 2013). Kumarin hepatotoksik ve kanserojen özelliklere sahip ikincil bir fitokimyasal olmasına rağmen, kumarinin hepatotoksisite etkisi ile ilgili klinik verilere göre, bu bileşik düşük dozda ilaç olarak kullanım için oldukça faydalıdır (Abraham, Wöhrin, Lindtner, Heinemeyer ve Lampen, 2010). Kumarin alkol ve eter içerisinde çok iyi çözünürken suda çözünmez. 69°C’de erir ve oda sıcaklığında ortorombik kristaller halindedir.

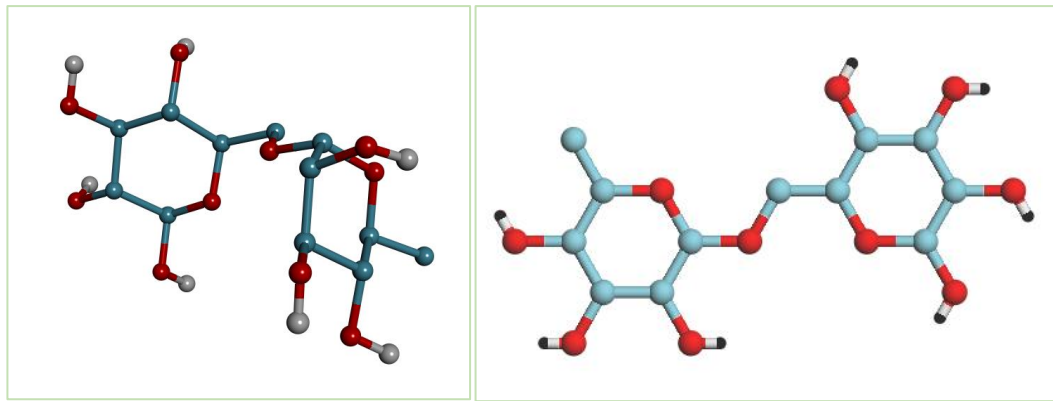
Kromonlar mast hücresi stabilizörü olarak bilinmektedir. Etkilerini mast hücre zarını stabilize ederek veya eozonofil ve epitel hücrelerinin aktivasyonlarını engelleyerek gösterebilirler (Bulut, 2012).



Şekil 2.18. Kumarin ve kromon halkalarının moleküler yapıları ve numaralandırılması (Orijinal)

2.3.4. Sakkaritler

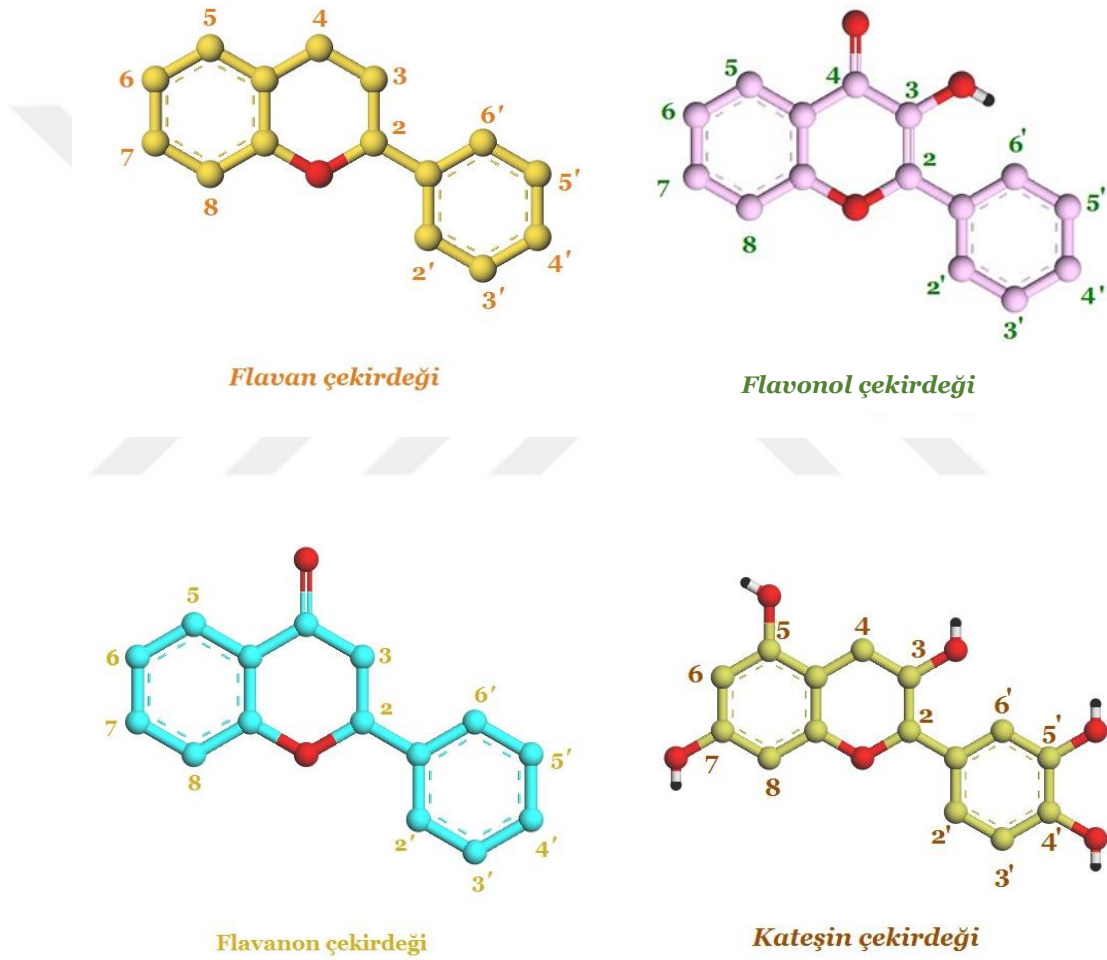
Monosakkaritlerin en bilineni ve organizmalarda en bol bulunanı D-glikozdur. Optik ışığı sağa doğru çevirdiği için dekstroza olarak da bilinir. Karbonhidratların beş üyeli halkaları furanoz, altı üyeli halkaları ise piranozlar olarak adlandırılır. Halka yapısı içerisinde oksijen atomu taşıyan karbona anumerik karbon denilmektedir. Glikozitler, anomerik karbona bağlı atomlara göre O-glikozitler ve S-glikozitler olarak adlandırılır. O-glikozitler karışık asetallerdir. Bunlar furanoz ve piranoz şekillerinin anomerik konumunda eterler oluştururlar (Atkins ve Carey, 2003). Şekil 2.19’da rutinozitin moleküler yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.19. Rutinozidin solda 3D ve sağda top çubuk modelinde 2D gösterimi. Karbon atomları mavimsi, oksijenler kırmızı, hidrojenler beyaz renkle temsil edilmektedir (Orijinal)

2.3.5. Flavanoidler

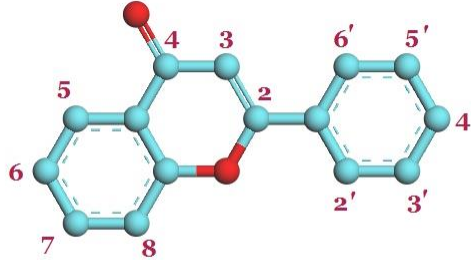
Flavanoidler, tüm karasal vasküler bitkilerde bulunan bitki sekonder metabolitleridir. Flavanoidler kimyasal olarak, türevler de dahil olmak üzere bir veya daha fazla hidroksil ikamesi ile ortak bir fenilkromanon yapısından (C₆)C₃)C₆) oluşan maddeler olarak tanımlanır (Birt ve diğerleri, 2001). Şekil 2.20’de temel flavanoid yapıları gösterilmektedir.



Şekil 2.20. Temel flavanoid türlerinin moleküler yapılarının 2D gösterimi ve numaralandırılışları. Kırmızı toplar oksijen, beyaz toplar hidrojen atomları, diğer renkler ise karbon atomlarını temsil etmektedir. Şekildeki moleküllerden sadece flavonolda C2 ve C3 arasında çift bağ bulunmakta, flavan, flavanon ve kateşinde ise tek bağ bulunmaktadır (Orijinal)

Flavonoidlerin temel yapısı bir aromatik A-halkası ve heterosiklik bir C-halkasından meydana gelir ve bu iki halka birbirine karbon-karbon bağıyla bağlıdır. Heterosiklik C-halkasındaki varyasyonlar nedeniyle flavanoidler altı altsınıfa ayrılır: flavonlar, flavanoller, flavanonlar, kateşinler, antosiyanidinler ve izoflavonlar (Weng ve Yen, 2012). Avustralya Ulusal Beslenme Araştırması (10 851 kişi, >18 yaş) verilerine göre flavanoidlerin anahtar kaynakları çay (siyah ve yeşil), sebze (soğan, kereviz, maydanoz, brokoli, İngiliz ıspanağı ve fasülye), meyveler (elma, üzüm, kahve, portakal, limon, mandalina, kiraz ve yabanmersini) gibi besinlerdir (Somerset ve Johannot, 2008).

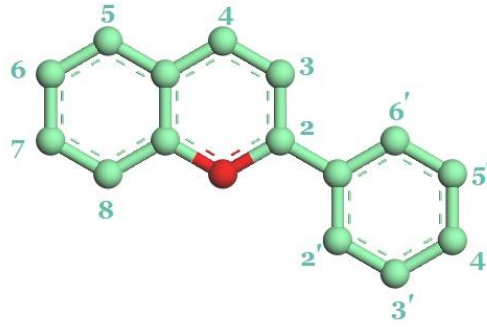
Flavonlar, flavonoid iskeletinde C2 ve C3 arasında çift bağa sahip olmaları bakımından diğer flavonoidlerden farklıdır. C3 konumunda bağlı grup yoktur (Martens ve Mithöfer 2005) ve C4 konumunda oksitlenirler (Hostetler, Ralston ve Schwartz, 2017). Bitkilerden elde edilen flavonlar tipik olarak 7-O-glikozitler olarak konjuge edilir (Martens ve Mithöfer 2005) ve ayrıca asetil veya malonil kısımlarına sahip olabilir (Hostetler ve diğerleri, 2017). Şekil 2.21’de flavon çekirdeği gösterilmektedir.



Flavon çekirdeği

Şekil 2.21. Temel flavanoidlerden biri olan flavon ve karbonların numaralandırılışı (Orijinal)

Bu bileşikler bitkilerde çeşitli rollere sahiptirler. Flavonollerle birlikte beyaz ve krem renkli çiçeklerde birincil pigmentlerdir (Harborne ve Grayer 1994) ve mavi çiçeklerde antosiyaninlerle (Şekil 2.22) kopigment görevi görürler. Flavonlar ve diğer flavonoidler, 280 ila 315 nm aralığındaki ışığı absorbe edebildikleri için bitkilerde UVB koruyucuları olarak da işlev görebilir (Harborne ve Williams 2000).



Antosiyanin çekirdeği

Şekil 2.22. Antosiyanin yapısı ve karbon atomlarının numaralandırılması (Orijinal)

Diyet fenolik bileşiklerin uygun koşullar altında prooksidan ve sitotoksik özellikler sergiledikleri bilinmektedir. Fitofenollerin antioksidan/prooksidan aktiviteleri farklı faktörlere bağlıdır. Flavonoidler, insan diyetinin enerjik olmayan kısmının farklı bileşenlerini temsil eden bir fenolik bileşik ailesidir. Sebze ve meyvelerde bulunurlar. Flavonoidlerin antioksidanları ve serbest radikalleri giderme yetenekleri dolayısıyla çoklu biyolojik etkileri olduğu bildirilmiştir. Bunun yanı sıra çok yüksek dozlarda kullanıldıklarında pro-oksidanlar olarak davrandıklarını kanıtlayan başka farklı etkiler gösterdikleri de bildirilmiştir. Görünüşte sağlığa faydalı etkilerine rağmen, hem bakteriyel hem de memeli deney sistemlerinde bunların mutajenitesini ve genotoksitesini ortaya çıkaran çeşitli çalışmalar mevcuttur (Popp ve Schimmer 1991). Bunun iki olası nedeni vardır: pro-oksidanlar olarak aktiviteleri (Dickançaité, Nemeikaité, Kalvelyte ve Cénas, 1998), DNA'ya zarar veren serbest radikaller oluşturmaları ve topoizomerase gibi DNA ile ilişkili enzimlerin inhibisyonu. Onarılmamış veya yanlış onarılmış DNA oksidatif hasarı, DNA zinciri kopmalarına, mutasyonlara, (Breimer 1990) veya kromozomal anormalliklere neden olabilir (Aruoma 2003). Aynı zamanda antimutajenler ve promutajenler ve ayrıca antioksidanlar ve pro-oksidanlar olarak hareket edebilirler. Gerçekten de toksikolojik alanda, bu biyokimyasal mekanizmalar ve yapı-aktivite ilişkileri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Öte yandan, faydalı nitelikler genellikle aşırı vurgulanır (Hostetler ve diğerleri, 2017).

Kanser oranlarının azalmasıyla ilişkili birçok bitkisel gıdada bulunabildiklerinden dolayı flavonoidlerin (flavonlar ve izoflavonlar) kanseri önleyebileceği öne sürülmüştür.

Bu anlamda, Finlandiya'da 10 054 kişiyi takip eden bir çalışmada (Knekt ve diğerleri, 2002), daha yüksek kuersetin alımı olan erkeklerin akciğer kanseri insidansının daha düşük olduğu ve daha fazla mirisetin alanların prostat kanseri insidansının daha düşük olduğu gösterilmiştir. Olası etki mekanizmaları arasında östrojenik/antiöstrojenik aktiviteler, antiproliferatif etkiler, kanser hücrelerinin özel bir fazda hücre döngüsü bloğunun indüklenmesi ve apoptoz, oksidasyonun önlenmesi, detoksifikasyon enzimlerinin indüksiyonu, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve hücre sinyalleşmesindeki değişiklikler (Birt ve diğerleri, 2001) sayılabilir.

2.4. Bu Çalışmada Kenetleme Deneyine Alınan Bitkisel Ligandlar ve Kontrol Grubundaki İlaçların Genel Özellikleri

Ivermectin (IVC), *Streptomyces avermitilis*'ten türetilen, antiparazitik ve potansiyel anti-viral aktivitelere sahip ağızdan alınabilen bir makrosiklik laktondur. IVC, nematod nöronları ve faringeal kas hücreleri üzerinde eksprese edilen glutamat-kapılı klorür kanallarını (GluCl_s) bağlayarak ve aktive ederek antelmintik etkisini gösterir. Bu, klorür iyonlarının geçirgenliğinin artmasına, hiperpolarizasyon durumuna ve parazitin felç olmasına ve ölümüne neden olur. IVC, viral proteinlerin nükleer salınımından sorumlu olan importin alfa/beta1 heterodimerine bağlanarak, şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs-2'ye (SARS-CoV-2) karşı potansiyel aktivitesi de dahil olmak üzere antiviral etkisini gösterebilir. Bu mekanizma, konakçı hücrelerinde viral proteinlerin çekirdekten salınmasını ve viral replikasyonu inhibe edebilir (National Cancer Institute [NCI], t.y.a)

Praziquantel (PZQ), (2-(sikloheksankarbonil)-3,6,7,11b-tetrahidro-1H-pirazino[2,1-a]izokinolin-4-on) antihelmintik özelliğe sahip bir pirazizokinolin türevidir. PZQ, duyarlı helmintlerin zar geçirgenliğini arttırır, bu da sarkoplazmik retikulumdaki kalsiyum seviyelerinde müteakip bir artışla helmintin kas yapısında hızlı kasılmalara ve felce yol açan intra-tegümental kalsiyumda bir artışa neden olur. Ek olarak, tegumental sınırların vakuolizasyonu, kabarcıklaşma ve tegument parçalanmasına neden olur, antijen maruziyetine yol açar ve helmintin konağa karşı savunma tepkilerini ortaya

ıkarır. Sonuç, granülom ve fagositoz oluşumudur (National Cancer Institue [NCI], t.y.b).

Piperazin, piperazin türevleri için bir omurga görevi gören ve nematodlarda bir gama-amino-butirik asit (GABA) reseptör agonisti olarak görev yapan, 6 üyeli bir heterosiklik halka içinde zıt pozisyonlarda iki nitrojen atomuna sahip olan bir antihelmintiktir. Uygulamanın ardından, piperazin hassas nematodlarda GABA reseptörlere bağlanır ve böylece klorür kanalının açılmasını ve hiperpolarizasyonu indükler. Bu durum, helmint kaslarının felce uğramasına ve helmintin vücuttan atılmasına neden olur. GABA'nın bulunuşunun merkezi sinir sistemi ile sınırlı olduğu omurgalılarından farklı olarak, helmintlerdeki GABA reseptörleri periferik sinir sisteminde de ifade edilir (National Cancer Institue [NCI], t.y.c).

Mebendazol (metil N-(6-benzoil-1H-benzimidazol-2-il) karbamat), sentetik bir benzimidazol türevi ve antelmintik bir ajandır. Mebendazol, sitoplazmik mikrotbllerinin oluşumunu inhibe ederek helmintlerin üremesine ve hayatta kalmasına müdahale eder, böylece seçici ve geri döndürülemez şekilde glikoz alımını bloke eder. Bu inhibisyon, glikojen depolarının tükenmesine neden olur ve helmintin hayatta kalması ve çoğalması için gereken ATP oluşumunun azalmasına yol açar. Bu durum, helmintlerin ölümüne neden olur (National Cancer Institue [NCI], t.y.d).

Albendazol, geniş spektrumlu, sentetik bir benzimidazol türevi antelmintiktir. Albendazol, tubulinden mikrotübül oluşumunu inhibe ederek helmintlerin üremesine ve hayatta kalmasına müdahale eder. Bu inhibisyon, bozulmuş bir glikoz alımına, glikojen depolarının tükenmesine ve helmintin ölümüne neden olur. Albendazol, kist hidatik ve nrosistiserkoz dahil olmak üzere köpek ve domuz tenyasının neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılır. Albendazol ayrıca diğer bazı nematod enfeksiyonlarını tedavi etmek için de kullanılabilir (National Cancer Institue [NCI], t.y.e).

“Flavonoids” kelimesi Latince “flavus” yani sarı kelimesinden gelmektedir. Diosmetin de bir flavanoiddir ve kekik gibi bazı tıbbi bitkilerde ve turunç meyvelerinde bulunur

(Bitis, Kultur, Melikoglu, Ozsoy ve Can, 2010; Mueller ve diğerleri, 2008; Roowi ve Crozier, 2011). Diosmetinin bilinen terapötik etkileri arasında antibakteriyel, anti-inflamatuar ve antioksidan özellikleri sayılabilir. Bazı çalışmalar diosmetinin hepatositler üzerinde anti-kanser etkilere sahip olduğunu da ortaya çıkarmıştır (AlGamdi, Mullen ve Crozier, 2011; Chan ve diğerleri, 2013; Chandler ve diğerleri, 2010). Son yıllarda yapılmış bir çalışma diosmetinin inflamatuvar sitokinlerin seviyesini düşürdüğünü göstermiştir (D. Lee, Park, Choi, Jang ve Seol, 2020).

Arteannuin B alışılmadık bir α -metilen- γ -lakton ile kadınan tip bir iskeletten oluşmuştur. Bu molekül ilk kez 1973'te *Artemisia annua*'dan izole edilmiştir (Jeremić, Jokić, Behbud ve Stefanović, 1973). Arteannuin B'nin anti-tümör özellikte olduğu bilinmektedir (Lang ve diğerleri, 2019). Bunun yanı sıra bazı arteannuin B türevlerinin MCF7 tümör hücrelerinde glikolizisin düzenlenmesi ile ilgili olabileceğini gösteren bir çalışma Klochkov ve diğerleri (2020) tarafından yapılmıştır.

Krisosplenetin, 5-hidroksi-2- (4-hidroksi-3-metoksifenil) -3,6,7-trimetoksikromen-4-on, kuersetagetin'in 3,6,7,3'-tetrametil eter türevi olan bir tetrametoksiflavondur. Bir antiviral ajan ve bir bitki metaboliti olarak rol oynar (Chemical Entities of Biological Interest [ChEBI], t.y.a).

Krisosplenol D, 2-(3,4-dihidroksifenil)-5-hidroksi-3,6,7-trimetoksikromen-4-on, sinonim 3',4',5-trihidroksi-3,6,7-trimetoksiflavon, bir trihidroksiflavon ve bir trimetoksiflavondur. Kuersetagetin'in 3,6,7-trimetil eter türevidir. Bir metabolit olarak rol oynar (Chemical Entities of Biological Interest [ChEBI], t.y.b).

Kamfor, pozisyon 2'de oksijen taşıyan bir siklik monoterpen ketondur. Doğal olarak oluşan bir monoterpenoiddir. Bitki metaboliti olarak rol oynar (Chemical Entities of Biological Interest [ChEBI], t.y.c) Kamfor, naftalin gibi güçlü bir kokuya sahip, renksiz veya beyaz renkli kristal bir toz olarak görünür. Su ile yaklaşık aynı yoğunluktadır. 150°F'ın üzerinde yanıcı buharlar yayar. İlaçlar, bilhassa güve ilaçları ve tatlandırıcılar yapmak için kullanılır ("Cameochemicals", t.y.a). Kamfor yağı, Kamfor ağacı *Cinnamomum camphora*'nın odunundan elde edilen yağdır. Kamfor yağı, anti-

enflamatuar ve analjezik özelliklere sahiptir ve aromatik özellikleri nedeniyle, böcek kovucu olarak, mumyalama sıvılarında ve çeşitli topikal cilt preparatlarında kullanılır (National Cancer Institute [NCI], t.y.f).

Kamfen, bisiklik bir iskelete sahip bir monoterpendir. Birçok uçucu yağda bulunan yaygın bir doğal üründür. Bitki metaboliti ve koku verici olarak rol oynar (Chemical Entities of Biological Interest [ChEBI], t.y.d). Kamfen, kafur benzeri bir kokuya sahip, tatsız, renksiz veya beyaz kristalli bir katı olarak görünür. Toz ve kristaller gözleri, burnu ve boğazı tahriş edicidir. Isıtıldığında yanıcı buharlar yayar. Yüksek sıcaklıkta keskin duman ve tahriş edici dumanlar yayar. Sentetik kafur imalatında kullanılır (“Cameochemicals”, t.y.b).

Ökalyptol, sinonim 1,8-sineol, 1,3,3-trimetil-2-oksabisiklo [2.2.2] oktan, kafur benzeri bir kokuya sahip renksiz bir sıvıdır. Baharatlı serinletici bir tadı vardır. Suda çözünmez (68°F'de <1 mg/ml) Alkollerde, sabit yağların çoğunda, gliserin, propilen glikolde çözünür; %60 alkolde 1: 5 (Burdock 2009). Sineol, okalyptüs yağının ana bileşenidir ve esas olarak iltihaplı hava yolu hastalıklarında mukolitik bir ajan olarak kullanılır (Worth, Schacher ve Dethlefsen 2009).

Spatulenol, (1*aR*,4*aR*,7*S*,7*aR*,7*bR*)-1,1,7-trimetil-4-metiliden-1*a*,2,3,4*a*,5,6,7*a*,7*b*-oktahidrosiklopropan [h] azulen-7-ol, pozisyon 1, 1 ve 7'de üç metil grubu yanı sıra 7. pozisyonda bir hidroksi grubu taşıyan trisiklik bir seskiterpenoiddir. Uçucu bir yağ bileşeni, bir bitki metaboliti, bir anestezi ve bir vazodilatör ajan olarak görev alır. Bir üçüncül alkol ve bir olefinik bileşiktir (Chemical Entities of Biological Interest [ChEBI], t.y.e).

Skoparon, kumarinler ve türevleri olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. Bunlar, C2 karbon atomunda (1-benzopiran-2-on) bir keton grubu ile bir 1-benzopiran kısmı içeren polisiklik aromatik bileşiklerdir. Skoparon, son derece zayıf bazik (esasen nötr) bir bileşiktir (pKa'sına göre). Skoparon, en yüksek konsantrasyonda tatlı portakal ve tarhunlarda bulunur. Skoparon ayrıca limon, rezene, narenciye, yabani kereviz ve

misket limonu gibi birkaç farklı gıdada tespit edilmiş, ancak miktarı belirlenmemiştir (“FoodB”, t.y.a).

İzofraksidin, 6,8-dimetoksi-7-hidroksikumarin veya 7-hidroksi-6,8-dimetoksi-2h-1-benzopiran-2-on olarak da bilinen 7-hidroksi-6,8-dimetoksikromen-2-on, 7-hidroksikumarinler olarak bilinen bileşikler sınıfının bir üyesidir. 7-hidroksikumarinler, C7 pozisyonuna bağlı kumarin iskeletine bağlı bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren kumarinlerdir. İzofraksidin suda az çözünür ve çok zayıf asidik bir bileşiktir (pKa'sına göre). İzofraksidin, *Eleutherococcus senticosus*, misk kavunu, tarhun ve karpuz da dahil olmak üzere çeşitli bitkilerde bulunabilir (“FoodB”, t.y.b)

Momordisin I, *M. charantia*'da kısmen yüksek oranda bulunan bir bileşendir ve kapsüller halinde hipoglisemik ilaç olarak kullanılmaktadır (Li, Lin, Yang, Wang ve Qiao, 2015).

Momordisin II, kükurbitasin glikozitler olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. Bunlar, bir kükurbitan çekirdeğine glikosidik olarak bağlanmış bir karbonhidrat türevi içeren polisiklik bileşiklerdir. Momordisin II, oldukça zayıf bazik (esasen nötr) bir bileşiktir (pKa'sına göre) (“FoodB”, t.y.c).

Kükurbitasin B, 25- (Asetiloksi) -2,16,20-trihidroksi-9-metil-19-norlanosta-5,23-dien-3,11,22-trion, lanostan iskeletinin çoklu olduğu bir kükurbitasindir. Pozisyon 5 ve 23'te doymamış bağlar ihtiva eder ve hidroksi, metil ve okso süstitüentleri ile süstitüe edilmiştir; C-25'teki bir hidroksi grubu asetillenmiştir (Chemical Entities of Biological Interest [ChEBI], t.y.f).

Diizooktil fitalat, bir fitalat ester ve bir diesterdir. Di-izooktil fitalat, hafif bir ester kokusu olan yağlı, renksiz bir sıvıdır. Sudan daha yoğundur. Suda çözünmez (Cameochemicals, t.y.c).

Sabinen, 4-metiliden-1-propan-2-il bisiklo [3.1.0] heksan, çeşitli bitki türlerinin uçucu yağlarından izole edilmiş bisiklik bir monoterpendir. Bitki metaboliti olarak rol oynar (Chemical Entities of Biological Interest [ChEBI], t.y.g).

Ellajik asit, aromatik heteropolisiklik bileşenlerden hidrolize taninler grubunda yer alır ve çilek, böğürtlen, nar gibi çeşitli meyvelerde bulunur. Nar içeriğinde çeşitli terapötik bileşenler vardır fakat en aktif olan ve en bol bulunan molekül ellajik asittir. Ellajik asitin terapötik aksiyonu çoğunlukla antioksidan ve anti-proliferatif etkileri ile ilişkilidir. 7,8-dihidroksikumarinlerden olan bu molekül ilaç araştırmalarında foliküler lenfomanın tedavisinde (faz 2 aşaması), obez olan yetişkinlerde kardiyovasküler fonksiyonun iyileştirilmesinde (faz 2 aşaması) ve güneş lekelerinin topikal tedavisinde denenmektedir (“DrugBank”, t.y.).

Gallik asit 3., 4. ve 5. pozisyonlarında hidroksi grupları olan bir trihidroksibenzoik asittir. Bu molekül bitkilerde bulunan bir metabolit olmasının yanı sıra insanlarda ksenobiyotik bir metabolit olarak bulunur. Siklooksijenaz 2 inhibitörü olarak çalışmakta ve ayrıca antioksidan ve apoptoz indükleyicidir (Haslam ve Cai, 1994). Gallik asit çay yaprakları, meşe kabuğu, sumak, güvercinotu (*Hamamelis virginiana*) ve mazı içinde bulunur. Gallik asit serbest olarak bulunabileceği gibi taninlerin bir parçası olarak da bulunabilir. Genel olarak eczacılık endüstrisinde kullanılır. Halusinojenik bir alkaloid olan mescaline sentezi için de kullanılabilir. Gallik asitin tuzları ve esterleri gallatlar olarak adlandırılır (Human Metabolome Database [HMDB], t.y.a).

Karvakrol, kılkırtlarını kapsayan nematodların öldürülmesinde etkili olduğu bilimsel olarak kanıtlanmış bir moleküldür. Bu nematodlardan bazıları *Bursaphelenchus xylophilus* (Kong, Park, Choi, Shin ve Ahn, 2007) ve bir domuz nematodu olan *A.suum*’dur (Lei, Leser ve Enan, 2010).

p-Simen, hücre veya organel zarlarının fonksiyonu ve yapısal olarak sağlamlığını sağlayan, membran stabilize edici kimyasal bir maddedir (Human Metabolome Database [HMDB], t.y.b)

Artemisinin antimalarial tedavi amacıyla kullanılır. İlaç-dirençli malarial suşlara karşı kullanılması için avantajlar gösterir. Reaktif oksijen radikalleri üretir (ZINC Database, t.y.a).

Kuersetin kılcal damarları koruyucu özellikte olmasının yanı sıra aynı zamanda antioksidan ve anti-HIV olarak da işlevlere sahip bir moleküldür (ZINC Database, t.y.b).

Friedelin, pentasiklik bir triterpenoid ve bir siklik terpen ketondur. Bu molekül 3. pozisyonunda oksijen ve 4, 4a, 6b, 8a, 11, 11, 12b ve 14a pozisyonlarında metil grupları bulundurulur. Bir bitki metaboliti olan bu molekül narkotik olmayan bir ağrı kesici, bir anti-inflamatuvar ve bir ateş düşürücü olarak iş görür (Chemical Entities of Biological Interest, ChEBI, t.y.h).

Stigmasterol, bir steroid türevidir ve yağlarda, soya fasülyesinde, bitki tohumlarında ve çiğ sütte bulunur (National Cancer Institute Thesaurus [NCIt], t.y.).

Luteolin (3', 4', 5, 7-tetrahidroksiflavon) pek çok bitki, meyve ve sebzede bulunan bir polifenolik flavondur ve Çin tıbbında geleneksel olarak kullanılır. Bu madde anti-kanser, anti-oksidan anti-apoptotik ve anti-inflamatuvar özelliklere sahiptir (Molnár ve diğerleri, 1981; Selvi ve diğerleri, 2015; Xia ve diğerleri, 2016). Bununla beraber, bu faydalı etkilerinin altında yatan mekanizmaların detaylı olarak çalışılması daha iyi ilaçların geliştirilmesi için çok önemlidir (Swaminathan, Basu, Bekri, Drapeau ve Kundu, 2019). Luteolinin, gelişimin erken aşamalarında beyin hücrelerindeki mitozu azalttığı ve muhtemelen lizin asetiltransferaz inhibisyonu yoluyla nöronal farklılaşma üzerinde etkisini gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Apigenin ise nöronal farklılaşmayı inhibe etmemiştir (Swaminathan ve diğerleri, 2021). Luteolin en yaygın flavonlardan biridir ve moleküler formülü C₁₅H₁₀O₆'dır. Havuç, kabak, enginar, çay, kereviz ve elma luteolin açısından zengin besinlerdir. Luteolinin günlük ortalama alımı 0,01-0,20 mg/gün (0,0349-0,698 µmol/gün)'dür (Wang ve diğerleri, 2009). Luteolin intestinal mukozada emilir. Oral uygulama ile 143 mg/kg alındıktan sonra plazmadaki maksimum konsantrasyonu 1,97 ± 0,15 gr/ml'dir. Ratların plazmasında luteolin, diosmetin ve

krisoeriole dönüştürülür. Serbest luteolin insan plazmasında da bulunur (Lopez-Lazaro, 2009). Luteolin, sinyal iletim yollarında görev alarak kardiyovasküler koruyucu aktiviteler gösterir. Gerçekten de luteolince zengin bir beslenme akut miyokardiyal infarktüs riskini azaltmaktadır (Qi ve diğerleri, 2011; Si, Wyeth ve Liu, 2014).

Karantadiol-A, *M. charantia*'da bulunan bir triperpenoiddir. Diş eti gingivi etkeni olan *Porphyromonas gingivalis* ile indüklenen inflamasyona karşı potansiyel bir anti inflamatuvar bileşendir (Tsai ve diğerleri, 2021).

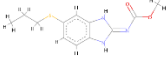
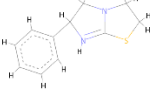
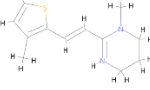
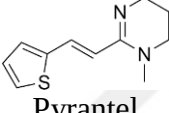
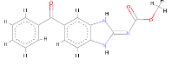
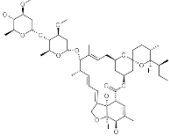
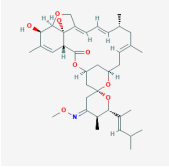
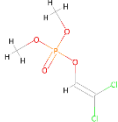
Apigenin bir flavanoiddir ve çok sayıda biyolojik aktivitesi tanımlanmıştır. Salehi ve diğerleri (2019) tarafından hazırlanan bir derleme çalışmasında bildirildiği gibi apigenin hiperglisemik ratlarda oral tedaviden sonra kan şekerini azaltır ve glikoz ile indüklenen insülin sekresyonunu uyarır (Malik ve diğerleri, 2017). MAO-A inhibitörü olduğundan kan beyin bariyerini geçebilmekte ve depresyon tedavisinde kullanılabilmektedir (Sloley ve diğerleri, 2000). 25 ve 50 mg/kg dozda alındığında tümör büyümesini geciktirir (Caltagirone ve diğerleri, 2000). Ayrıca hafıza ve öğrenmeyi geliştirmek gibi önemli bir etkisi vardır (Zhao ve diğerleri, 2013).

2.5. Nematodlara Spesifik İlaçlar ve Hedef Proteinleri

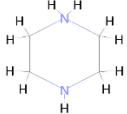
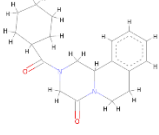
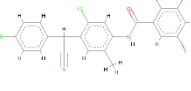
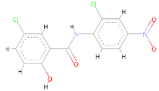
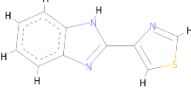
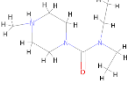
2.5.1. Sentetik antihelmintik İlaçlar

Çeşitli bileşenler parazitik nematodların enfeksiyonunun önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaktadır. Bunların en önemlileri Çizelge 2.4'de listelenmiştir. Ayrıca bu listede bu ilaçların hangilerinin nöron ve kaslarda bulunan hedef moleküllere spesifik olduğu da belirtilmiştir. Bu hedef proteinlerin pek çoğu, memeliler de dahil, hayvanlarda bulunmuştur. İlaçların seçici toksisitesi göz önüne alındığında, nikotinik asetilkolin reseptörleri ve potasyum kanalları gibi bazı kriter proteinler, helmintlere spesifik ilaç geliştirme açısından pek çekici hedefler olarak düşünülmezler. Diğer bir yandan, bu reseptörler ve iyon kanalları çoklu allosterik ve düzenleyici bölgeleri ile kompleks bir farmakolojiye sahiptir ve bu da, sıklıkla çok selektif ve kullanışlı bileşenlerin geniş bir farmakopesine imkân verir (Wolstenholme, 2011).

Çizelge 2.4. Piyasadaki bazı sentetik antihelmintik ilaçlar ve hedefleri

İlacın 2 boyutlu gösterimi ve ilacın ismi	Helmint sınıflarına göre antihelmintik etkisi	Eylem modu	Ait olduğu organik molekül sınıfı
 Albendazole	Antinematodal	Tubuline bağlanır ve hücresel hasar oluşturur	Benzimidazol
 Levamisole	Antinematodal	Nikotik asetilkolin esteraz agonist	Tetrahidropiridin
 Morantel	Antinematodal	Asetilkolin esteraz inhibisyonu ile sinir sistemine zarar verir	Tetrahidropiridin
 Pyrantel	Antinematodal	Nikotik aktivasyon	Hidropirimidin
 Mebendazole	Antinematodal	Glukoz alımı inhibitörü, mikrotübül inhibitörü	Benzimidazol
 Ivermectin	Antinematodal	GluCl ⁺ agonisti	Makrosiklik lakton
 Moxidectin	Antinematodal	Glutamat-geçişli klorid iyon reseptörüne bağlanır	Milbesidin
 Dichlorvos	Antinematodal	Asetilkolin esteraz inhibitörü	Organofosfat

Çizelge 2.4. Piyasadaki bazı sentetik antihelmintik ilaçlar ve hedefleri (devam)

	Antinematodal	GABA agonisti	Piperazin
Piperazine			
	Antitreematodal	Ca ⁺⁺ geçirgenliğini arttırıcı	Tetrahidroizo-kinolon
Praziquantel			
	Antinematodal ve antitreematodal. <i>O. volvulus</i> 'a da etkilidir	Kitinaz enzimini inhibe eder ve ATP üretimine zarar verir	Salisilanilid
Closantel			
	Anticestodal	DNA antagonisti	Benzanilid
Niclosamide			
	Antinematodal	Muhtemelen fumarat redüktazı inhibe eder	Benzimidazol
Thiabendazole			
	Antinematodal, özellikle <i>Wucheria bancrofti</i> veya <i>Loa loa</i> için	Nitrik oksit sentaz ve siklooksijenaz yolağını etkiler	Dietilkarbama-zin
Dietilkarbamazin			

Çizelge 2.4, Saygın ve Karaman'dan (2021) alınmıştır.

Filum içinde iyi korunmuş ve nematodlara spesifik proteinleri kodlayan genlerin bazıları Çizelge 2.5'de verilmiştir. Bu çizelge aynı zamanda pek çok antihelmintik ilacın neden geniş spektrumlu olduklarını da açıklamaktadır. Bu “eski” hedefler önümüzdeki senelerde de yeni ilaçlar için önemli olmaya devam edebilirler. Sentetik bazı ilaçların parazitlerde hedefledikleri enzimler bilinmektedir. Koyun ve keçiler gibi hayvanların paraziter enfeksiyonlarında önemli bir faktör olan *H. contortus* ve model organizma olan *C. elegans*'ta bu enzimleri kodlayan genler de tespit edilmiştir. Bu

hedef enzimlere ait genlerin bazıları ise tüm parazitlerde bulunduklarından korunmuş dizilere sahiptir (Wolstenholme, 2011).

Çizelge 2.5. Bazı ilaç hedefi proteinlerin genleri

İlaç sınıfı	Hedef	<i>C. elegans</i> genleri	<i>H. contortus</i> genleri	Diğer parazitler
Makrosiklik laktonlar	GluCl	<i>glc-1</i>	<i>Hco-glc-2</i>	<i>avr-14</i>
		<i>glc-2</i>	<i>Hco-glc-3</i>	incelenmiş
		<i>glc-3</i>	<i>Hco-avr-14b</i>	tüm türlerde
		<i>avr-14b</i>	<i>Hco-glc-5</i>	mevcuttur
		<i>avr-15</i>	<i>Hco-glc-6</i>	
Piperazin	GABA reseptörleri	<i>unc-49</i>	<i>Hco-unc-49</i>	<i>unc-49</i> nematodlarda çoğunlukla korunmuş
Siklik depsiyeptidler	Potasyum kanalları	<i>slo-1</i>	<i>Hco-slo-1</i>	Çoğunlukla korunmuş
Amino-asetonitril türevleri	Kolin reseptörleri	<i>acr-23</i>	<i>Hco-mptl-1</i>	
		<i>deg-3</i>	<i>Hco-deg-3</i>	
		<i>deg-2</i>	<i>Hco-deg-2</i>	
Tetrahidropirimidinler	nAChR	<i>lev-1</i>	<i>Hco-acr-8</i>	Acr-8, unc-
		<i>lev-8</i>	<i>Hco-lev-1</i>	29, unc-38 ve
		<i>unc-29</i>	<i>Hco-unc-29</i>	unc-63
		<i>unc-38</i>	<i>Hco-unc-38</i>	çoğunlukla
		<i>unc-63</i>	<i>Hco-unc-63</i>	korunmuş

Çizelge 2.5'in içeriği Wolstenholme 2011'den değiştirilerek alınmıştır.

Siklik depsiyeptid sınıfı ilaçlar potasyum kanalları ve latrofilin reseptörlerini inhibe ederler. Bu iki sınıf reseptör parazitlerde korunmuş rezidülerdir. Bu nedenle siklik depsiyeptidler parazit türleri için spesifik değildir (Wolstenholme, 2011).

2.5.2. Antihelmintik ilaçların etki mekanizmaları

Antihelmintik ilaçların mekanizmalarının anlaşılmasında parazitin kendisi veya homojenatı kullanılmaktadır. Radyoizotop yöntemiyle işaretli ilacın parazit tarafından alınıp alınmadığı ve alındıktan sonra bağlandığı proteinlerin hangileri olduğu moleküler analizler ile tespit edilebilmektedir.

Ökaryotik parazitlere karşı kullanılan ilaçların etki mekanizmaları özetle şunlardır:

Karbohidrat metabolizmasının inhibisyonu: Şistozomlara karşı kullanılan antimon bileşiklerinin hedef enzimi fosfofruktokinazdır. *Trypanosoma*'da ise hedef piruvat kinaz enzimidir. Thiabendazole ve levamisole, glikolizde kullanılan fumarat redüktaz enzimini bloke ederler. Niridazole, glikojen fosforilazı inhibe ederek glikojen depolarının tükenmesi yoluyla parazitin ölmesine yol açar.

Protein sentezinin engellenmesi: Emetin, polipeptid uzamasını önleyen bir mekanizmaya sahiptir, Diloxanid ise protein sentezini bloke ederek *Entamoeba histolytica*'nın dokularının harabiyetine yol açar.

Nükleik asit sentezinin blokasyonu: Klorokin, mepakrin, kinin ve primakininin molekülleri interkalasyon ajanları şeklinde DNA'nın baz çiftleri arasına girerler ve transkripsiyonu engellerler.

Nöromüsküler yolun blokasyonu: Bu yolla etki gösteren ilaçlar helmintin felç olmasına neden olarak atılmalarını sağlar. Pyrantel bağırsaktan emilmez ve nematod üzerine direkt paraliz edici etki eder. Bephenium adlı ilaç yapı olarak asetilkoline benzediği için çengelli nematodun büzülmesini ve başını yapıştırdığı yeri bırakmasını sağlar.

Folik asit kullanılmasının engellenmesi: Pyrimethanine ve trimethoprim seçici olarak bazı protozoanların dihidrofolat redüktaz enzimine bağlanır. Dihidro-triozin adlı ilaç ise helmintteki dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederken konaktaki homolog enzime çok az bağlanmaktadır.

Piruvattan H₂ salınımının inhibisyonu yoluyla: Bu gruptaki Metronidazole anaerobik protozoanlar üzerinde etkisini gösterirken elektronları tutar ve piruvatta H₂ salınmasını engeller. Metronidazole ait nitro halkasının parçalanması sonucu oluşan toksisite helmintin ölümünü hızlandırır (Ustaçelebi, 1999).

2.5.3. Modern antihelmintik terapinin yan etkileri, toksisitesi ve sınırlılıkları

Bitkisel drogların binlerce yıldır kullanılmalarının yanı sıra antiparaziter sentetik ilaçlar 1940'lı yıllardan sonra artış göstermiştir. Yeni çıkan ilaçlara rağmen şistozomiyazın şistosomulum evresinin tedavisi için kesin etkili ve toksisitesi az belli bir ilaç yoktur (Ustaçelebi, 1999).

Piyasadaki antihelmintik ilaçların bilinen yan etkilerinden bazıları şunlardır:

Albendazol: Kısa süreli kullanıldığında çok az yan etkisi vardır. En sık karşılaşılan yan etkisi serum aminotransferaz aktivitesindeki artıştır (Ogbru, 2017).

Mebendazol: Yüksek dozda alındığında hipospermi, agranulositozis ve alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir. MBZ potansiyel bir teratojen ve embriyotoksindir. 10 mg/kg ve tek doz uygulandığında bile hamile ratlarda bu etkileri ortaya çıkarmıştır. İnsanlarda böyle bir teratojenite kanıtı olmamasına rağmen hamilelerde ve 2 yaşından küçük çocuklarda kullanılması tavsiye edilmez (Mebendazole, 2013; Pantziarka, Bouche, Meheus, Sukhatme ve Sukhatme, 2014).

Praziquantel: Karın rahatsızlıkları, acı ve bulantı, diyare, baş ağrısı, baş dönmesi gibi etkiler praziquantel alınmasından kısa süre sonra ortaya çıkabilir. Bu etkiler doza bağlıdır ve geçicidir.

Pirantel pamoat: Baş ağrısı, bulantı, ateş gibi geçici ve ılımlı yan etkileri vardır.

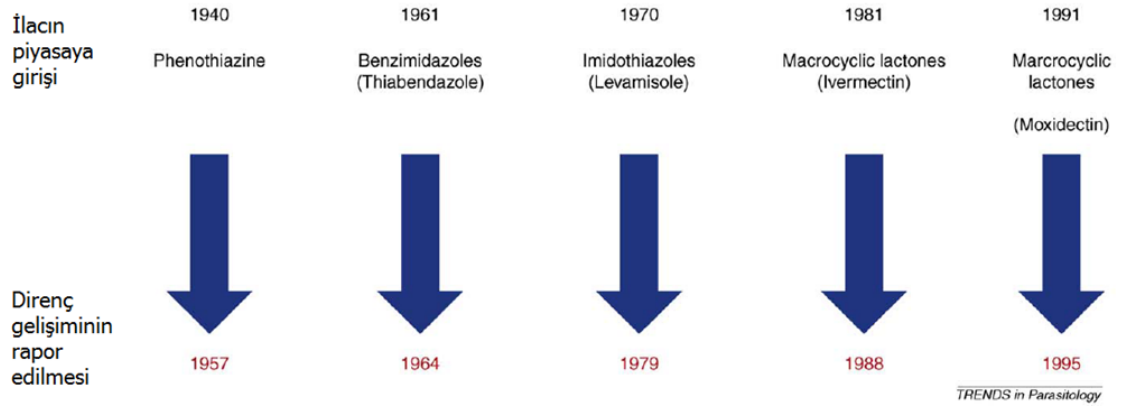
Dietilkarbamazin: Reaksiyonlar *O. volvulus* ile ağır enfekte vakalarda en şiddetlidir. Oncocercosis hastalarında görülen Mazzotti reaksiyonu denilen bu yan etkiler, ilk dozun

uygulanmasından sonra birkaç saat içinde yoğun bir kaşıntı, lenf nodlarının genişlemesi ve hassaslaşması ve bazen de papular döküntü, ateş, taşikardi ve baş ağrısı şeklinde ortaya çıkar (Dominguez-Vazquez ve diğerleri, 1983).

Ivermectin: Hayvanlarda, santral sinir sisteminde toksisite çok yüksek dozlarda verildiğinde ortaya çıkar (Campbell, 1993). İnsanlarda ise filariyal enfeksiyonun tipi ve süresine ve enfeksiyonun şiddetine göre bu reaksiyonların yoğunluğu ve doğası değişse bile çoğunlukla Mazzotti benzeri reaksiyonlar hemen hemen daima yan etki olarak görülmektedir (Campbell ve Benz, 1984).

2.5.4. Helmintlerde ilaç direnci

Helmintler küresel öneme sahip organizmalardır. Helmintik enfeksiyonların tedavisi için henüz bir aşı geliştirilememiş olduğundan tedavi çoğunlukla sınırlı sayıdaki sentetik ilacın kullanılmasına bağlıdır (Keiser ve Utzinger, 2008). Ne var ki özellikle küçükbaş hayvanlarda bulunan helmintlerde bu kimyasallara karşı direnç gelişimi son zamanlarda kritik seviyeye ulaşmıştır (Sargison, 2012). İnsanlarda da aynı tehlikenin ortaya çıkmaya başladığını düşündüren verilerden dolayı (Osei-Atweneboana, Eng, Boakye, Gyapong ve Prichard, 2007) yeni antihelmintik ilaçların keşfedilmesi zorunludur. Pek çok bitki uçucu yağlar ve ikincil metabolitleri de kapsayan antimikrobiyal ve anti-parazitik bileşenlerce zengindir ve bunların kullanılması yeni ilaçların keşfi için önemli bir yere sahiptir (Hoste ve diğerleri, 2012). Çoğu antihelmintik ilaca karşı direnç gelişimi ilaç piyasaya sürüldükten yıllar sonra ortaya çıkmaktadır. Şekil 2.23'te, ilaçların piyasaya sürülüşü ve bunlara karşı direnç gelişiminin rapor edilmesi arasında geçen süreler gösterilmektedir (Kaplan, 2004).



Şekil 2.23. Antihelmintik ilaçlara direnç gelişimi için geçen süreler (Kaplan, 2004'den değiştirilerek alınmıştır)

Çeşitli tekli nükleotit polimorfizmleri (TNPlar) ile ilaç alınmasından sonra helmint genomundaki mutasyonlarının oluşumu sonucunda ilacın hedef proteine bağlanamaması yoluyla (ki bu TNPlar populasyonlarda doğal olarak ortaya çıkar ve örneğin insanların genomunda on iki milyon TNP vardır) helmintlerde ilaca direnç gelişmektedir. İlaç direncinin en temel sebeplerinden biri plazma membranında yer alan P-glikoprotein (P-gp) aşırı ekspresyonu olarak görülmektedir. P-gp, ATP-binding cassette (ABC) süperailisinin oldukça yüksek oranda korunmuş bir üyesidir. P-gp, ATP-kullanan bir hücre dışına atılım pompasıdır ve hücre içi ilaç kümelenmesini azaltmak için görev alır. Bu şekilde kemoterapötik ajanların çoğunun etkinliğini azaltır (Anuchapreeda, Leechanachai, Smith, Ambudkar ve Limtrakul, 2002; Larsen, Escargueil ve Skladanowski, 2000; Lehnert 1998; Schoenlein, Shen, Barrett, Pastan ve Gottesman, 1992). İlacın etki edebilmesi için P-gp'yi inhibe edecek sentetik bileşenler ilaç ile beraber verilse de bunların işe yaramaları için yüksek dozda alınmaları toksisite problemini de beraberinde getirmektedir.

2.6. Antinematodal İlaç Hedefi Proteinler

2.6.1. Tubulin

Tubulin, mikrotübüllerin ana bileşenidir. Biri beta zincirinde değiştirilebilir bir bölgede ve diğeri alfa zincirinde değiştirilemez bir bölgede iki mol GTP'ye bağlanır ("Uniprot Veritabanı", t.y.a). Mikrotübüller (MTler) tüm ökaryotik hücrelerde hücre iskeletinin

anahtar bileşenidir. Çok sayıda hücresel süreç, özellikle de hücre bölünmesi ve mitoz için kritik öneme sahiptirler. MT'ler dinamik davranışları ile karakterizedir. GTP'nin hidrolizi ile enerji elde ederek uzama ve büzülme süreçlerinde görev alırlar. Polimerizasyon sırasında tubulin düz bir konformasyona kavuşurken, potansiyel enerji MT içinde depolanır. Depolarizasyon sırasında bu enerji salıverilir ve dimerler eğik bir konformasyona geçerler (Löwe, Li, Downing ve Nogales, 2001).

İnsan beta-tubulin proteini *TUBB* geni tarafından kodlanır. Kromozom 6'nın p kolu üzerindeki 21.33 kromozom bölgesinde 6 ekzon *TUBB* genini meydana getirir (Şekil 2.24). Bu protein α -tubulin ile dimer halinde bulunur. Bu gendeki mutasyonlar kortikal displaziye (beyin zarının bozuk gelişimine) sebep olur ve diğer beyin malformasyonları ile komplekstir. *TUBB* geni 188 organizmada insan *TUBB* geni ile ortologdur (aynı atadan gelen ve aynı işleve sahip homolog genlerdir). Gen ID: 203068'dir. (National Center for Biotechnology Information [NCBI], t.y.a).



Şekil 2.24. İnsan *TUBB* geninin 6. Kromozom üzerindeki lokalizasyonu. Kırmızı şerit, genin bulunduğu noktayı göstermektedir (Şekil GeneCards'dan alınmıştır, Rosen ve diğerleri, 1996-2019).

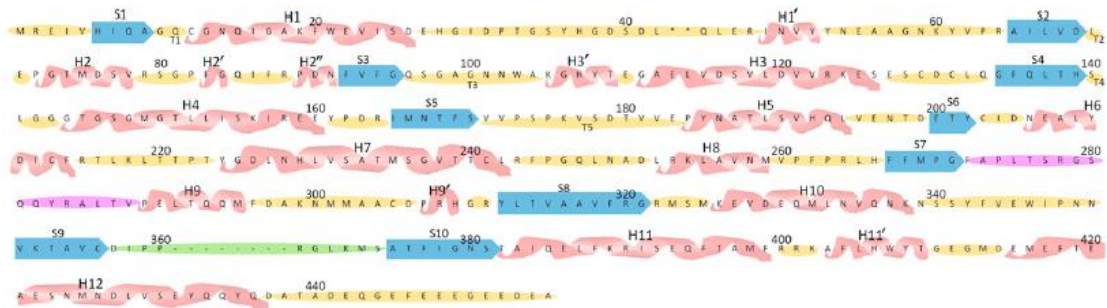
GeneCards verilerine göre *TUBB* geni üzerindeki tekli nükleotit polimorfizmleri şizofreni, unipolar depresyon ve otizm hastalığına neden olabilmektedir (Safran, t.y.).

Haemonchus contortus β -tubulin proteini Şekil 2.25'te gösterildiği gibi sitosolde hücre membranına yakın bölgede bulunmaktadır.



Şekil 2.25. *H. contortus* beta tubulinin hücrede lokalizasyonu. Beta tubulin sitoplazmada sitoiskeleti oluşturmak üzere konumlanmaktadır (Orijinal)

Mikrotübül, altbirim yapısı alfa ve beta zincirlerinden oluşan bir dimerdir. Tipik bir mikrotübül, dış çapı 25 nm ve iç çapı 15 nM olan içi boş su dolu bir tüptür. Alfa-beta heterodimerler, mikrotübül duvarı boyunca uzunlamasına uzanan protofilamentler oluşturmak için, beta-tübülün alt birimi ile mikrotübüle bakan artı uca yapısal bir polarite kazandıran protofilamentler oluşturmak için baştan sona birleşirler. Mikrotübüllerin genellikle 13 protofilamenti vardır, ancak bazı organizmalarda ve özel hücrelerde farklı protofilament sayıları bulunabilir (“Uniprot Veritabanı”, t.y.a). β -tubulin proteininin sekans ve sekonder yapısı Şekil 2.26’da gösterilmektedir.

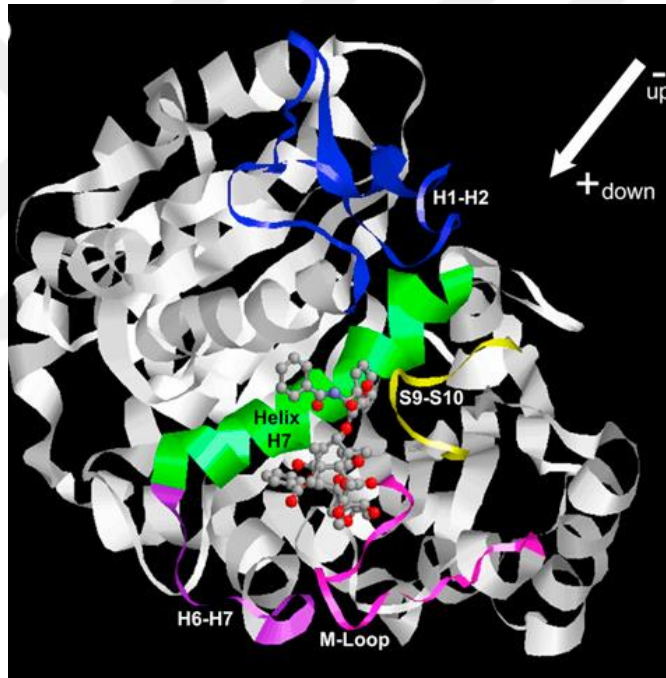


Şekil 2.26. β -Tubulinin sekans ve ikincil yapısı. Alfa heliksler pembe, β -pililer mavi ve ilmekler sarı görülüyor. M-ilmeği mor, S9-S10 ilmeği yeşil renk. Tüm segmentler Löwe ve diğerleri (2001) tarafından yapılan çalışmadaki gibi tanımlandı ve işaretlendi, PDB kodu: 1JFF. Şekil Field, Díaz ve Miller, 2013’den alınmıştır.

Her bir altbirim bir nükleotid bağlama bölgesine sahiptir. α -tubulin değişmez bir nükleotid (GTP) bağlama bölgesine sahipken (N-bölgesi), β -tubulin GTP ya da GDP’ye bağlanan değişebilir bir nükleotid bölgesine (E-bölgesi) sahiptir. GTP bağlandığında

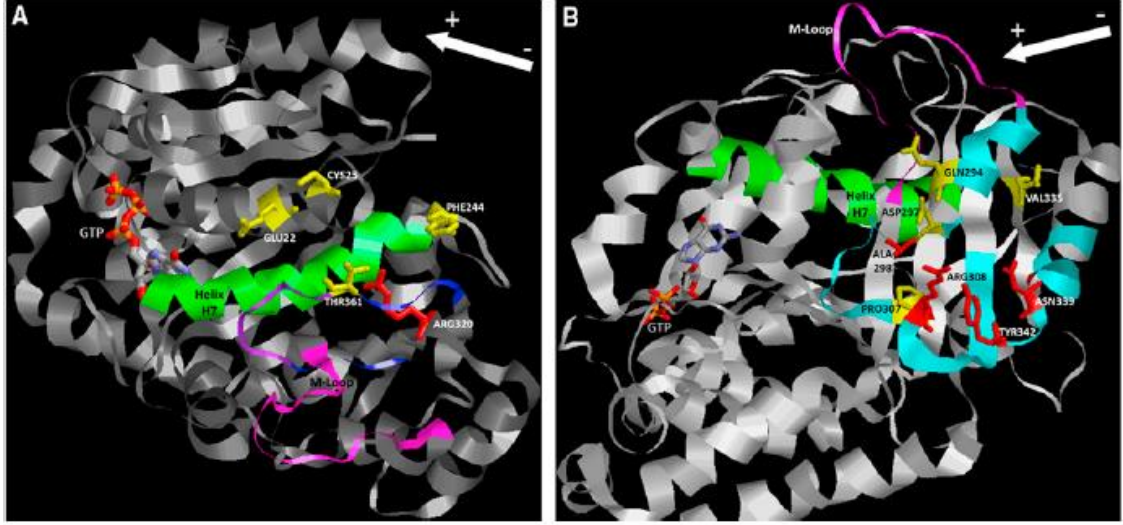
hemen ardından polimerizasyon gerçekleşir. GTP bağlı dimerler protofilamentleri oluşturma yeteneğindedir, GDP bağlı dimerler ise inaktiftir ve Mg^{++} varlığında çift halkalar oluştururlar (Field, Díaz ve Miller, 2013).

Paclitaxel (PTX)'in β -tubuline nasıl bağlandığı 1992 yılında doğrudan fotoafinite-işaretleme yöntemiyle anlaşılmıştır (Rao ve diğerleri, 1992). PTX bağlanma bölgesi β -tubulinin luminal bölgesinde bulunmakta ve S9-S10 ilmeği ve H1, H6 ve H7 helikslerinin parçaları ve S7'den meydana gelmektedir (Şekil 2.27). PTX'e bağlı taxane halkası MT-ilmeğinin (S7'yi H9'a bağlayan M ilmeği) N-terminal bölgesine oturur ve bu yapı MT'nin stabilizasyonu için önemli bir ikincil yapıdır (Field ve diğerleri, 2013).



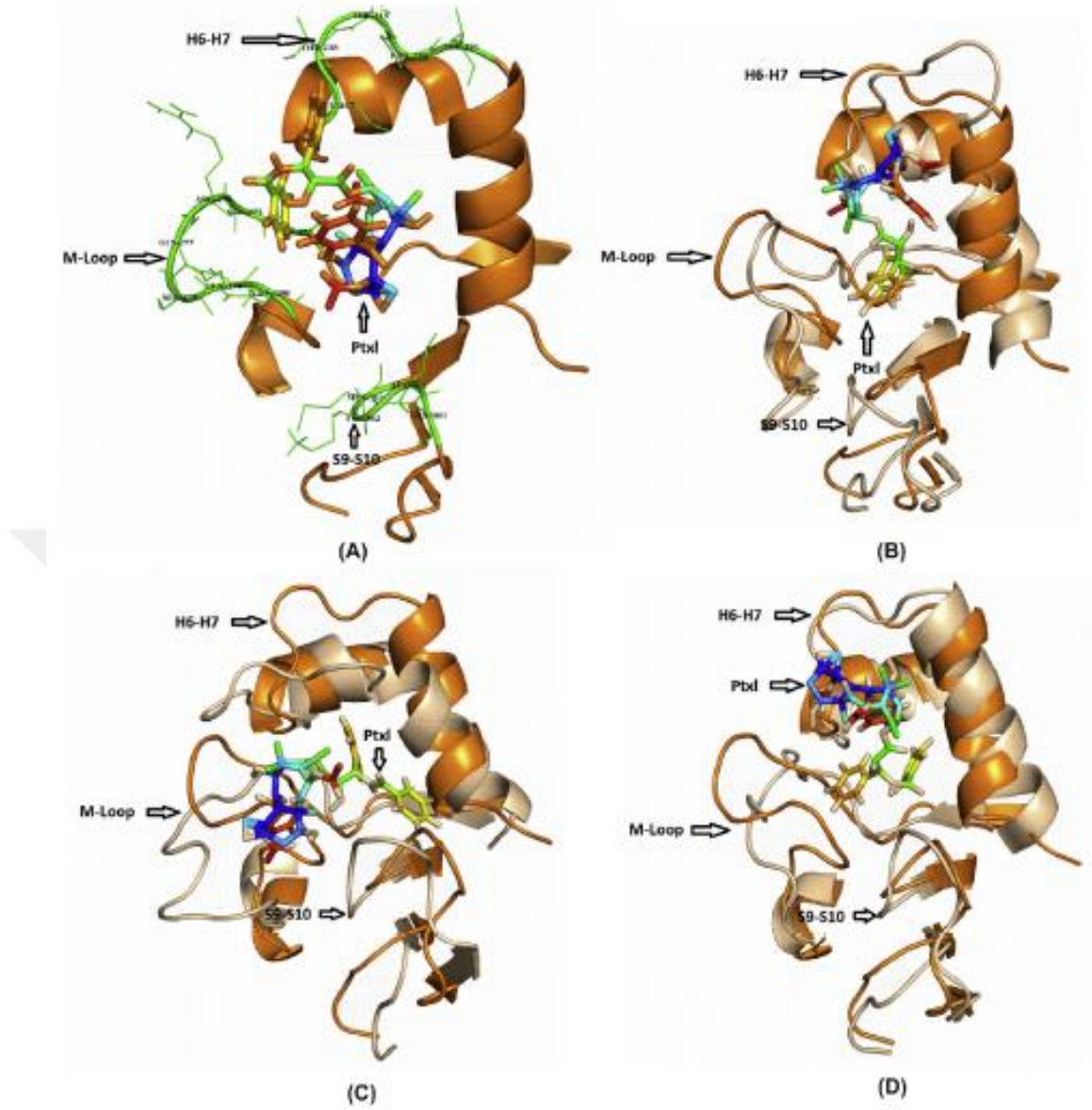
Şekil 2.27. Bağlanma bölgesinde paclitaxel (PTX) bulunan β -tubulinin görünümü. Çekirdek heliks H7 yeşil, M-ilmeği fuşya, S9-S10 ilmeği sarı, H6-H7 ilmeği mor ve H1-H2 ilmeği mavi renk görülüyor (Field, Díaz ve Miller, 2013)

Bazı kanser ilaçları α veya β tubulin birimine bağlanabilirken, ilaca dirençli hücre soylarında mutasyonlar sadece β -tubulinde saptanabilmiştir. PTX dirençli hücrelerde mutasyonlar por tip 1 bölgesinden ziyade luminal bağlanma bölgesinde görülmektedir (Şekil 2.28) (Giannakakou ve diğerleri, 1997).



Şekil 2.28. Tubulinin iki birimi A) α -tubulinin 3D modelinde H7 çekirdek heliks yeşil, M ilmeği magenta, Paclitaxel ile bağlanan rezidüleri sarı, GTP ise H7 heliksin hemen üzerinde kırmızı-turuncu renk ile temsil edilmekte. B) β -tubulini meydana getiren sekonder yapılar. Yeşil ile gösterilen H7 α -heliks, magentailmek M-ilmeği, kırmızı ile gösterilenler bağlanma bölgesinde yer alan mutasyona uğramış ve direnç gelişimine neden olmuş rezidüleri temsil etmektedir (Field, Díaz ve Miller, 2013'den alınmıştır)

İnsan beta tubulin proteini üzerinde belli amino asitlerin mutasyonu sonucu bir antikanser ilacı olan Paclitaxele direnç gelişimi *in silico* bir simulasyon çalışması ile gösterilmiştir (Tripathi, Srivastava ve Sharma, 2016). Aslında proteinin bağlanma bölgesinde yer almayan 225. amino asit olan lösin, methionin ile yer değiştirecek olursa Şekil 2.29'da gösterildiği gibi ligandın bağlanma bölgesindeki konformasyonu değişmektedir. PTX'e direnç gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilen mutasyonlar L225M, L215H ve L217R mutasyonlarıdır (Şekil 2.29). Bu mutasyonlar sonucu direnç gelişiminin ortaya çıkmasına neden olan yapısal değişiklik ve ligandın farklı bir bölgede kenetlenmesi sonucu proteine bağlanma ilgisinin değişimi, beta tubulin üzerindeki bu mutasyonların aynı zamanda benzimidazole direnci ile ilişkili de olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında benzimidazollere direnç gelişiminin araştırıldığı *in silico* deneyde *Caenorhabditis elegans* türü nematoda ait beta tubulin sekansında L225M mutasyonu da oluşturularak MBZ'e direnç gelişimi ile ilişkisi araştırılmıştır.

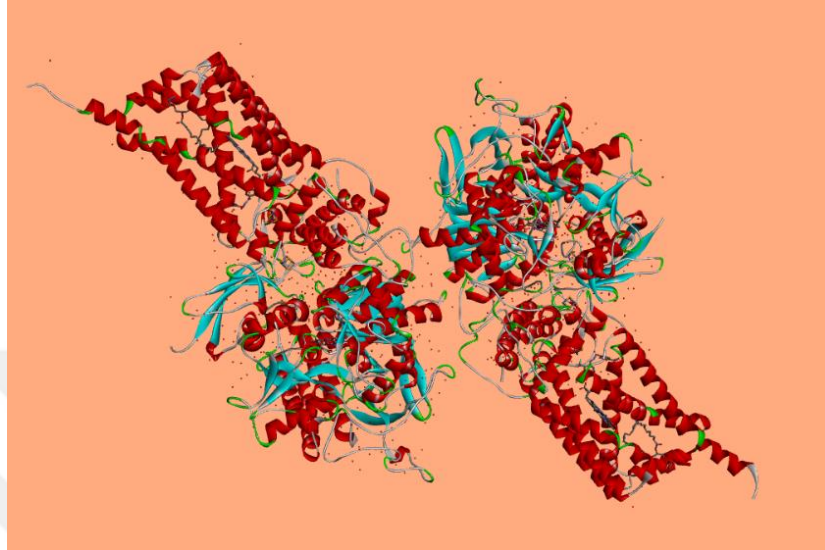


Şekil 2.29. L215H, L217R ve L225M mutasyonlarında beta-tubulinin paclitaxele bağlanma pozisyonlarındaki değişimler. A) Yabani tip beta-tubulin, B) L215H, C) L217R ve D) L225M. Turuncu renk protein yabani tip, ten rengi protein mutant tipi temsil ediyor. Paclitaxale gökkuşağı renklerinde gösteriliyor. L217R mutasyonunda mutant proteinin yabani tipten farklı bir 3 boyutlu katlanma yapısına ve dolayısıyla ilacın bağlanma bölgesinde çok daha değişik bir konuma sahip olduğu görülmektedir. Şekil Tripathi ve diğerleri, 2016'dan alındı

2.6.2. Fumarat redüktaz

Diğer ismiyle suksinat dehidrojenaz mitokondrial bir flavoproteindir (Şekil 2.30). Bu kompleks proteinin flavoprotein altbirimi mitokondrial elektron transfer sisteminde

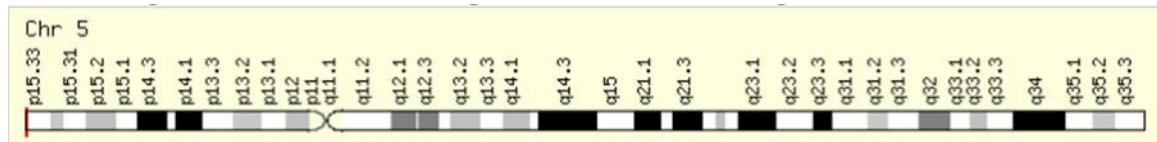
suksinattan ubiquinona elektron transferinde görev alır. (Renkema ve diğerleri, 2015) Ayrıca bir tümör baskılayıcı olarak rol oynayabilir. (Burnichon ve diğerleri, 2010). Protein sembolü: P31040-SDHA_HUMAN'dır.



Şekil 2.30. Antihelmintik ilaç hedefi proteinlerden fumarat redüktaz (*Ascaris suum*'a ait ve PDB kodu: 4YSX) ve bağlı haldeki ligandlarının 3 boyutlu gösterimi (Orijinal)

Fumarat redüktaz (FR) enzimi *SDHA* geni tarafından kodlanır. Bu gen, mitokondriyal solunum zincirinin bir kompleksi olan süksinat-ubikinon oksidoredüktazın büyük bir katalitik alt birimini kodlar. Kompleks, nükleer olarak kodlanmış dört alt birimden oluşur ve mitokondriyal iç zarda lokalizedir. Bu gendeki mutasyonlar, Leigh Sendromu olarak bilinen bir mitokondriyal solunum zinciri eksikliği formuyla ilişkilendirilmiştir (National Center for Biotechnology Information [NCBI], t.y.b).

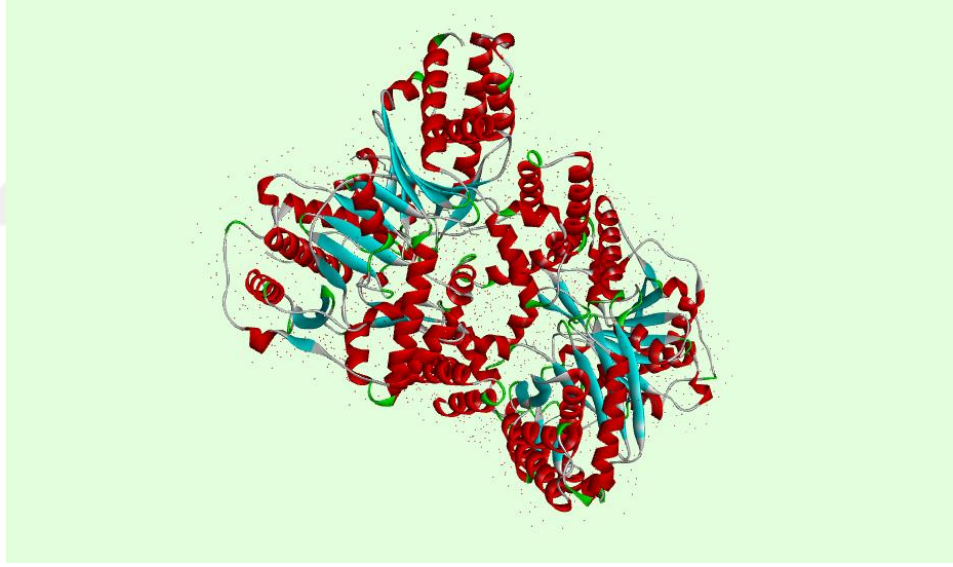
SDHA geni Kromozom 5'in p kolu üzerinde yer alır (Şekil 2.31). 46,576 baz çiftinden meydana gelen *SDHA* geni 664 amino asitlik bir protein kodlar.



Şekil 2.31. *SDHA* geninin lokasyonu. 5p15.33 bölgesi kromozomun en ucunda kırmızı şerit ile gösterilmektedir (GeneCards'dan alınmıştır, Rosen ve diğerleri, 1996-2019a)

2.6.3. Karnitin palmitoiltransferaz

Karnitin palmitoiltransferaz (KPT) ailesindeki enzimler (EC 2.3.1.21) mitokondri zarına bağılı enzimlerdir ve uzun zincirli yağ asitlerinin sitoplazmadan mitokondriye geçişinde görev alırlar, enerji vermek için oksidize olabilirler (Şekil 2.32). Uzun zincirli yağ asitleri mitokondri membranından kolayca geçemezler. Mitokondri zarından karnitin aracılığıyla transfer edilirler ve bu geçiş için mitokondri dış zarında KPT 1, iç zarında ise KPT 2 enzimlerine ihtiyaç vardır (McGarry ve Brown, 1997). KPT 2, karnitinden gelen konjuge yağ asitlerini mitokondriyal matriks içindeki koenzim-A'ya çevirerek mitokondri membranına geri döndürür (Bonfont ve diğerleri, 2004). Bu nedenle mitokondri içindeki uzun zincirli yağ asitlerinin beta-oksidasyonu, vücuttaki enerji homeostazisinde çok önemli bir rol oynar.



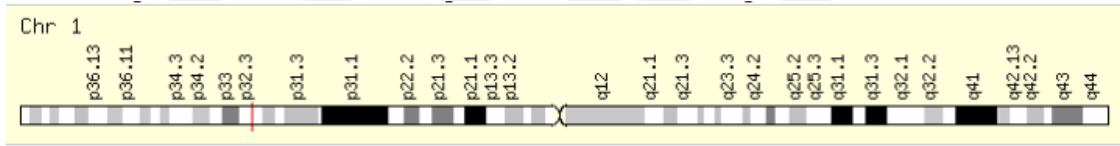
Şekil 2.32. Rat KPT 2 enzimi (PDB kodu: 2H4T). Alfa heliksler kırmızı, beta pililer mavi ve ilmekler beyaz, su molekülleri küçük kırmızı noktalar ile temsil edilmekte (Orijinal)

KPT 2 eksikliğinin üç değişik formu mevcuttur. Bunlar letal neonatal, şiddetli infantil hepatokardiyomuskular ve miyopatik formlardır. KPT 2 eksikliğinin yetişkinlerdeki miyopatik formu otozomal resesif bir biçimde kalıtılır (Wieser, 2004). KPT 2 eksikliği, hem dinlenmede hem de kas aktiviteleri sırasında bir enerji kaynağı olarak uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunun azalmasıyla sonuçlanan, kas yağ asidi metabolizmasının

en sık görülen kalıtsal kas hastalığıdır. KPT2 eksikliği, ölümcül bir yenidoğan hastalığı olan şiddetli infantil hepatokardiyomüsküler hastalıktan hafif bir miyopatik forma kadar değişen çeşitli klinik durumlara yol açar (Boemer ve diğerleri, 2016).

KPT 2 eksikliğinde, semptomları ve rabdomiyolizi önlemek için, mevcut müdahaleler günlük diyet yağ kısıtlamasını ve karbonhidrat alımını artırmayı içerir. Hastada metabolik talebi yükselten ateş veya enfeksiyon varsa, glukoz infüzyonu uygulanır. Önerilen beslenme rejimi, egzersiz toleransında kısa süreli bir artışla sonuçlanır ancak bu vakalarda tekrarlayan rabdomiyoliz de gözlenmiştir (Deschauer ve diğerleri, 2005). Bu nedenle, genellikle fiziksel aktivitenin kısıtlanması önerilir (Roe ve diğerleri, 2008).

KPT 2 proteini insanda *CPT2* geni tarafından kodlanmaktadır. Kromozom 1'in p32.3 bölgesinde bulunur (Şekil 2.33). 658 amino asitlik bir protein kodlar (Rosen ve diğerleri, 1996-2019b)

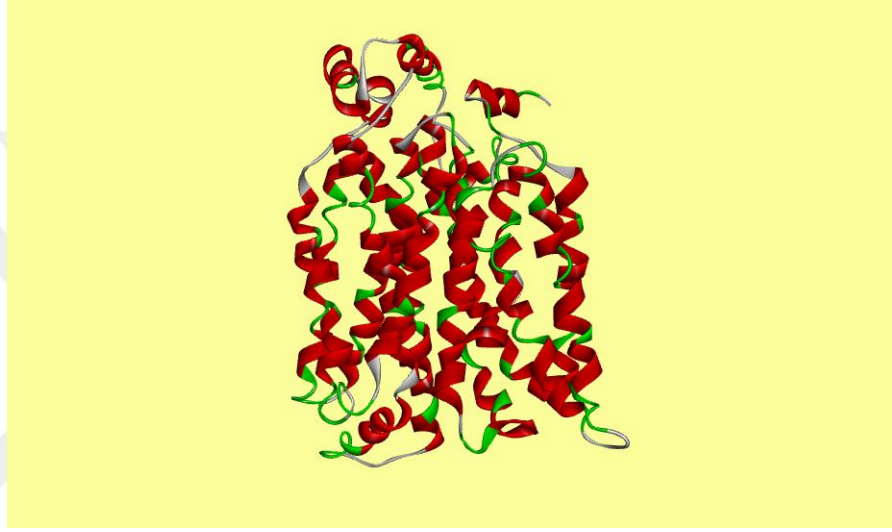


Şekil 2.33. İnsanda bulunan *CPT2* geninin kromozom 1 üzerindeki lokasyonu (Şekil GeneCards'dan alınmıştır. Rosen ve diğerleri, 1996-2019b)

KPT'ler nematodlarda bir "chokepoint" yani nematodun hayati fonksiyonlarını tehlikeye sokan "vurucu nokta"lardır. KPTler için inhibitör olan çeşitli küçük moleküller, tip 2 diyabet ve insülin direnci için uzun zamandır ümit verici hedeflerdir (Ceccarelli, Chomienne, Gubler ve Arduini, 2011; Wagman ve Nuss, 2001). Oksiran karboksilik asit sınıfındaki inhibitörler KPT 2'nin tersinmez kovalent inhibitörleridir ve açılıkarnitin inhibitörleri ise yarışmalı inhibitörleridir (Ceccarelli ve diğerleri, 2011). Ayrıca iskemik kalp hastalığı tedavisinde kullanılan Perhexiline (Winchester ve Pepine, 2015) adlı ilacın insanlardaki homolog enzimleri hedeflediği bildirilmiştir (Ceccarelli ve diğerleri, 2011). Ceccarelli ve diğerleri tarafından Perhexiline'in *Caenorhabditis elegans* larvalarına, kanla beslenen parasitik nematod *H. contortus*'a ve filaryal nematod *Onchocerca linealis* 'e karşı etkili olduğu gösterilmiştir.

2.6.4. Glukoz transporter reseptörü

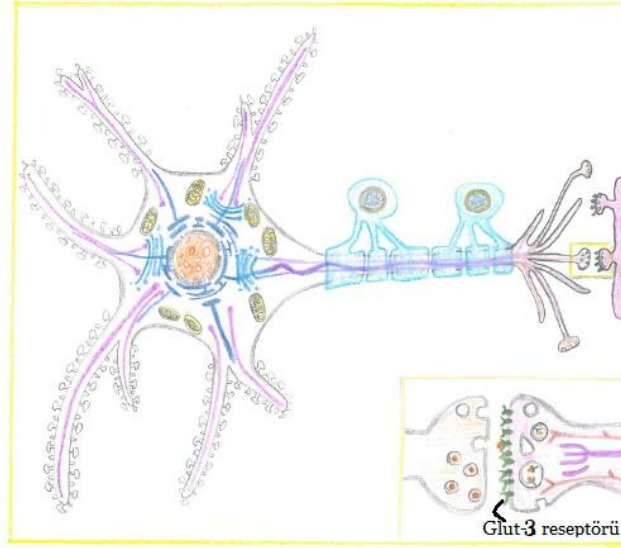
Glukoz transporter 3 proteinin sembolü: P11169-GTR3_HUMAN'dır. GLUT-3, hücresel heksoz transportu, vitamin C metabolizması, nötrofil degranülasyonu gibi yollaklarda görev alır. Bu çalışmada hedef olarak seçilen *C. elegans* GLUT1 proteininin homoloji modeli insan GLUT3 proteini ile aynıdır. Bu model Şekil 2.34'de gösterilmektedir.



Şekil 2.34. *C. elegans* GLUT1 homolji modeli (PDB kodu: 4ZWB). SWISSMODEL ile modellendi, Discovery Studio ile gösterilmektedir (Orişinal)

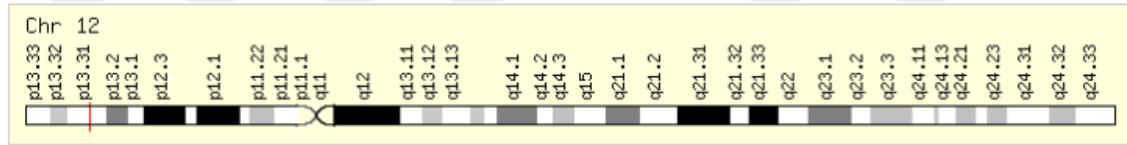
Hücre zarı boyunca diğır çeşitli monosakkaritlerin alımına da aracılık edebilen kolaylaştırıcı glikoz taşıyıcısı, glikoz, 2-deoksiglukoz, galaktoz, mannoz, ksiloz ve fukoz ve muhtemelen dehidroaskorbat alımına aracılık eder. Fruktoz taşınmasına aracılık etmez (Rosen ve diğırleri, 1996-2019c).

GLUT3 reseptörünün hücrede yerleşimi membran üzerinde olmakla birlikte sinir bağlantı noktalarında yoğun olarak bulunmaktadır (Şekil 2.35).



Şekil 2.35. GLUT3 reseptörü çoğunlukla sinaps bölgelerinde yoğun olarak yer almaktadır (Orijinal)

Glikoz Transporter Tip 3 insanlarda SLC2A3 geni tarafından kodlanır. 12. Kromozomun p kolu üzerinde p13.31 bölgesinde bulunur (Şekil 2.36) (Rosen ve diğerleri, 1996-2019c).



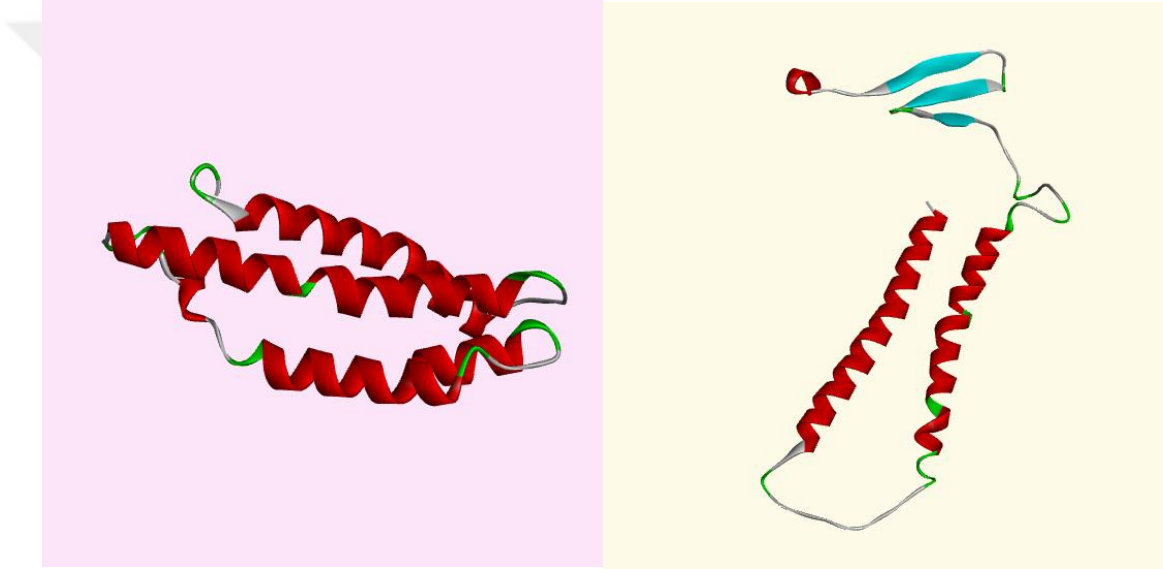
Şekil 2.36. SLC2A3 Geni lokasyonu, genin konumu kırmızı şerit ile gösterilmektedir. Şekil GeneCards'dan alınmıştır (GeneCards'dan alınmıştır, Rosen ve diğerleri, 1996-2019c)

SLC2A3 geni tarafından kodlanan proteinler 496 amino asitten oluşmaktadır. Bu proteinlerin üç boyutlu yapıları veri bankalarında bulunmaktadır. Bu proteinlerin kodları: 4ZW9, 4ZWB, 4ZWC, 5C65 ve 7CRZ'dir.

2.6.5. Sitokrom c oksidaz 1 (COX1) ve COX2 enzimleri

Sitokrom c oksidaz enzimi (EC:7.1.1.9) mitokondrial genomdan kodlanan bir enzimdir. Bu enzim solunum ve elektron taşınması ile ilişkili olduğu için helmintte bulunan formunun inhibisyonu helmintin ölümüne yol açacaktır. İnsanlarda MT-CO1 geni

tarafından kodlanır. MtDNA’da 5 904-7 445 arasında bulunan 1 542 baz çiftlik bir nükleotit sekansını içerir. Gen sembolü MT-CO1, protein sembolü ise P00395-COX_HUMAN’dır. İnsanlarda 513 amino asitlik bir protein sekansına sahiptir. Kofaktör olarak hem taşır. COX1, COX kompleksinin bir altbirimidir ve COX kompleksi 14 altbirimden oluşmaktadır. Bunlardan üçü (MT-CO1, MT-CO2 ve MT-CO3) mtDNA tarafından kodlanırken diğerleri nükleer genom tarafından kodlanmaktadır (“UniProt Veritabanı”, t.y.b). Bu çalışmada kullanılan oksyuridlerin genom sekansı henüz bilinmediği için mtDNA’dan kodlanan COX1 ve COX2 enzimleri *in silico* deneyde araştırılmak üzere seçilmiştir (Şekil 3.37).



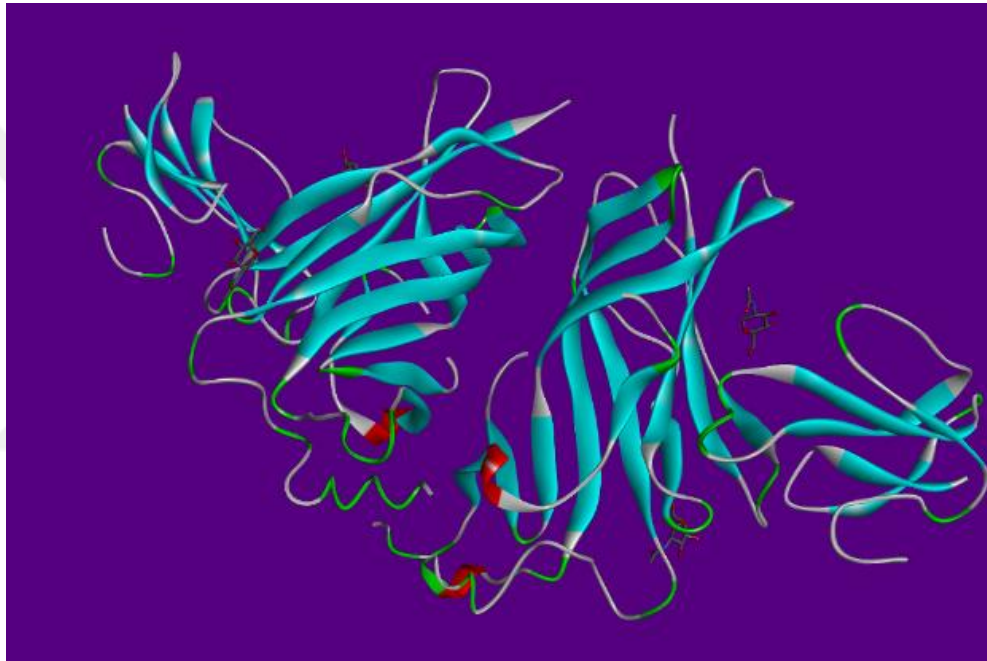
Şekil 3.37. *S. obvelata* COX1 (solda) ve SoCOX2 (sağda) homoloji modeli (SWISSMODEL ile oluşturuldu, Discovery Studio ile gösterilmektedir) (Orişinal)

Solunum zinciri, süksinat dehidrojenaz (kompleks II, CII), ubikinol-sitokrom c oksidoredüktaz (sitokrom b-c1 kompleksi, kompleks III, CIII) ve sitokrom c oksidaz (kompleks IV, CIV) olmak üzere 3 çok alt birimli kompleks içerir ve bunlar, türetilen elektronları transfer etmek için iş birliğı yapar. NADH ve süksinattan moleküler oksijene, iç zar üzerinde transmembran taşımayı ve ATP sentazı harekete geçiren bir elektrokimyasal gradyan oluşturur. Sitokrom c oksidaz, oksijenin suya indirgenmesini katalize eden solunum zincirinin bileşenidir (“UniProt Veritabanı”, t.y.b). *S. obvelata* COX1 enzimi 113 amino asitten oluşmaktadır ve Uniprot

kodu:A0A059P1F9_SYPOB'dir. *S. obvelata* COX2 enzimi 244 amino asitten meydana gelmektedir. Uniprot kodu:A0A0U3CJ84'dir.

2.6.6. Nikotinik asetilkolin reseptörü

Nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChRs) pentamerik ligand-kapılı iyon kanallarıdır (Şekil 2.38). Omurgalı ve omurgasızlarda nöromüsküler bağlantılarda sinaptik geçişlere aracılık ederler (Changeux ve Edelstein, 1998).



Şekil 2.38. Antihelmintik ilaç hedefi proteinlerden Nikotinik Asetilkolin Reseptörü Alfa 9 altünitesi (PDB kodu: 4UY2) ile bağlı haldeki ligandların 3 boyutlu gösterimi (Discovery Studio ile gösterilmektedir) (Orijinal)

Asetilkolin nörotransmitterleri nAChRlerin ekstrasellüler domainindeki orthosteric bağlanma bölgesine bağlanır ve transmembran domainindeki kanal porunun açılmasını tetikler. Nikotinik reseptörlerin açılması, reseptör alttipine göre sodyum veya kalsiyum içeri alınması ve potasyum dışarı atılmasını başlatır. Böylece membran depolarizasyonu ve kas kasılması gerçekleşir. Kas nAChRleri için nikotinik antihelmintikler parazitlerin spastik paralizine neden olan seçici agonistlerdir (Buxton ve diğerleri, 2014).

2.7.7. Diğer hedef proteinler

UniNem'e göre nematodların öldürülmesinde kullanılabilecek hedef enzimler: alkalın fosfataz, β -fruktofuranosidaz, β -ureidopropionaz, fumarilasetoasetaz, 4-coumarate-CoA ligaz (4CL, EC:6.2.1.12) (ideal ilaç hedefidir) nematodlarda bulunur, konakta (*H. sapiens*'te) bulunmaz (Taylor ve diğerleri, 2013).

Diğer ilaç hedefi proteinler şunlardır:

1TW9: Glutasyon Transferaz-2 (*Heligmosomoides polygyrus*'dan elde edilmiştir. Resol=1.71 Å) (Şekil 2.39 A),

3SQ6: insan $\alpha 7$ nAChR chimeras epibatidine bağlı

3SQ9: insan $\alpha 7$ nAChR ligandsız

4HQP: insan $\alpha 7$ nAChR α -bungarotoksine bağlı

2BG9: *T. marmorata* nAChR pentamerik yapısı

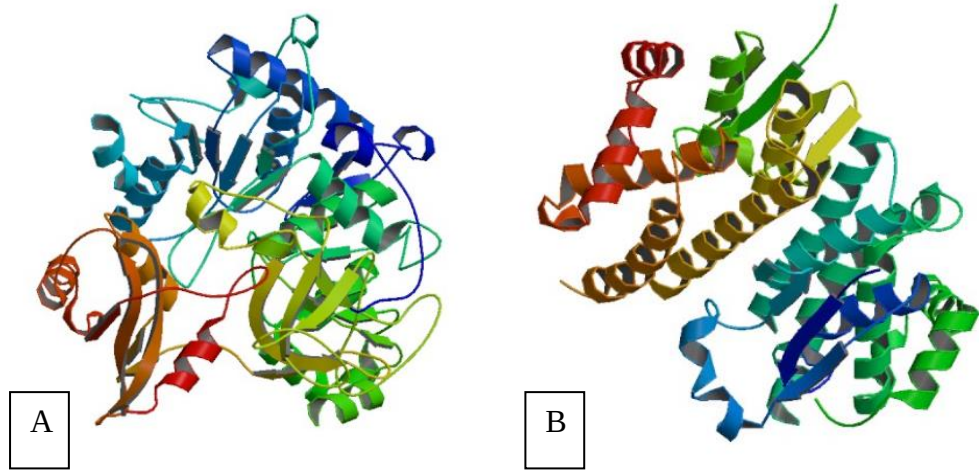
2H4T: Ratta KPT-2 (Karnitin o-palmitoiltransferaz-2)

2FW3: inhibitör ile bağlı KPT-2

F1KYJ9: *Ascaris suum* ACR-16 sekansı UNIPROT KB/Swiss Prot'ta mevcuttur.

Helmintlerde ilaç direnci ile ilgili olan P-glikoprotein büyük bir integral membran proteindir. Pek çok ilaç da dahil çok sayıda lipofilik maddenin transportunda görev alır. İlaçların aktif transportu yoluyla çoklu ilaç direncini (multidrug resistance, MDR) ortaya çıkarır. Bu transport ilacın hedefine ulaşmasını ve ilacın etkisini azaltır (Lage, 2003).

4-coumarate-CoA ligaz (4CL) (Şekil 2.39 B) fenilpropanoid biosentezi yolunda pek çok reaksiyon ile ilişkilidir, chokepoint bileşeni ise Cinnamoyl-CoA (C00540)dır. 4CL'nin nematodlardaki rolü kesin olmamakla birlikte konak-parazit etkileşimleri ile ilgili olabileceği bildirilmektedir (Taylor ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.39. İki hedef enzimin 3 boyutlu gösterimi **A)** 4-coumarate-CoA ligaz enzimi (PDB kodu: 3A9U, Çözünürlük:2.4 Å) (Hu ve diğerleri, 2019). **B)** Glutasyon Transferaz-2, apo form, nematod *Heligmosomoides polygyrus*. PDB Kodu:1TW9,Çözünürlük: 1.71 Å (Schuller ve diğerleri, 2005)

2.7. Rasyonel İlaç Tasarımı

“Primum non nocere” demiştir Hippocrates, “önce zarar verme”. Sadece tıbbi değil, farmakolojiyi, kimyayı, genetiği, nanoteknolojiyi, elektroniği, ekolojiyi; yani insan sağlığını uzaktan yakından ilgilendiren tüm bilim alanlarını bu bakış açısıyla ele alacak olsaydık, ilaçlara bu kadar çok ihtiyaç olmayabilirdi. Hippocrates’ı dinlemek için halen geç kalınmış sayılmaz. Sürekli veya yüksek dozda kullanıldığında bile tamamen yan etkisiz sentetik bir ilaç geliştirebilmek başarılması çok zor bir hedef olsa da, rasyonel ilaç tasarımının doğuş sebebi budur. Üretilecek ilaç adayının olası yan etkilerini tahmin ederek, ilaç iskeleti üzerinde çeşitli modifikasyonlar ile bu yan etkileri ortadan kaldırmak veya azaltmak için son 50-60 yıldır, neredeyse tüm Fen bilimlerini içine alan karmaşık bir simülasyonlar dünyası yaratılmaktadır. Kuantum mekaniğinden organik kimyaya, moleküler biyolojiden bilgisayar programcılığına, birbirinden çok farklı alanların bir arada çalışılmasını gerektiren bu yeni dünya, ilaç tasarımına ufuk ötesi bir boyut kazandırmıştır. Kompleks protein yapılarına ilişkin kristalografi ve NMR çıktılarının bilgisayar ortamına aktarılabilmesi, atomik seviyedeki görselleştirmeler, kompleks makromoleküllerin tüm atom mesafelerinin ve elektron yüklerinin hesaplandığı enerji formülleri ve milyonlarca ilaç adayının hedef makromoleküller ile etkileşimlerinin modellendiği süper bilgisayarlar, bir ilaç molekülünün olası kimyasal-

biyolojik etkilerinin anlaşılmasında çığır açmıştır. Şekil 4.40’da rasyonel ilaç tasarımındaki kurallar ve çiğnenmesi durumunda ortaya çıkabilecek problemler verilmiştir.

1. Kural: Farmakofor seçiminde milyonlarca bileşenin bulunduğu geniş veritabanları taranmalıdır.	1. Kural çiğnenirse: Hedef protein için daha önce denenmiş ve başarısı ispat edilmiş bir ilaç iskeleti mevcut olmasına rağmen tekrar araştırılmış olur.
2. Kural: “Primum non nocere”. İlaç adayı farklı organizmalardaki homolog proteinler veya aynı organizmadaki izoenzimler ile kenetlenerek yan etkileri açısından test edilmelidir.	2. Kural çiğnenirse: Canlılar üzerinde görülecek yan etkiler dolayısıyla ilaç adayı Faz 1 aşamasını geçemez.
3. Kural: İlaç adayının enantiyomerleri zıt etkiye neden olmamalıdır.	3. Kural çiğnenirse: Rasemik karışım halinde bulunması durumunda ilaç görevini yerine getiremez.
4. Kural: İlaç adayının ADME özellikleri, ADME tahmini yapabilen çeşitli yazılımlardan biri kullanılarak araştırılmalıdır.	4. Kural çiğnenirse: İlaç adayının farmakokinetik ve farmakodinamikleri bilinemez.
5. Kural: Hedef organizmadaki inhibisyonu amaçlanan proteinlere karşı ilaç adayının K_i değerleri araştırılarak uygulanabilir en düşük doz konusunda veri elde edilmelidir.	5. Kural çiğnenirse: Canlı hayvan deneylerinde gereğinden fazla hayvan ve emek harcanır.
6. Kural: İlaç adayı geri dönebilir inhibisyona neden olmalı, protein hedefleri ile kovalent bağ oluşturmamalıdır.	6. Kural çiğnenirse: Uzun süreli kullanımı ciddi yan etkilere ve -bağlandığı proteine bağlı olarak- ölüme neden olabilir.

Şekil 2.40. Bilgisayar destekli rasyonel ilaç tasarımında temel kurallar ve bu kuralların çiğnenmesi durumunda ortaya çıkabilecek durumlar (İçerik kısmen Prof. Dr. Kemal Yelekcî’nin “Organic Chemistry and Drug Design” dersindeki bilgilerden alınmıştır)

Doğal bileşenler kimyasal modifikasyon ve optimizasyon için iskelet yapısı olarak hizmet etmekte ve *de novo* ilaç sentezi için yapısal şablonlar sağlamaktadır. Moleküler kenetleme çalışmaları, fitokimyasal ligandların bilinen protein hedeflerine karşı etkili ilaçlar olarak fonksiyon gösterip gösteremeyeceklerini tanımlama imkânı sağlar. Bununla birlikte doğal ürünler ile yapılan kenetleme çalışmalarında düşünülebilecek ilave etkiler vardır: 1) Pek çok doğal ürün sınırlı çözünürlük, membran geçirgenliği ve hidrolizisten, ve diğer metabolik transformasyonlardan dolayı düşük biyoyararlanıma sahiptir. 2) Ligandlar insanlarda homolog izoenzimlerin hedefi olabilirler ve ciddi yan etkilere sahip olabilirler. 3) Kenetleme çalışmaları biyoaktif antiparazitik bileşenlerin olası sinerjizimini hesaplayamamaktadır (Ogungbe ve Setzer, 2016).

Yapıların ayrıntılarıyla incelendiği bir derleme çalışmasına göre ümit verici kenetleme özellikleri olan çeşitli fitokimyasal ligandlar, uygun ilaç-benzeri özelliklere sahip görünmektedir. Bundan dolayı, farmakokinetik ve farmakodinamik çalışmalar, yapı tabanlı tasarım ve optimizasyon çalışmalarına ek olarak, biyoyararlanım ve seçicilik konularını çözmek için gereklidirler (Ogungbe ve Setzer, 2016).

2.7.1. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı

Yeni bir ilacın keşfedilmesi için uzun zamandır kullanılmakta olan bir yöntem, öncü fragmentten türevlenen analog bileşenlerin arzu edilen biyolojik aktivitelere sahip olup olmadıklarının araştırılmasıdır. İlaç keşfinde bilgisayar destekli yöntemler giderek önemini artırmaktadır. Bu yöntemler eski ilaç araştırma yöntemlerine kıyasla çok daha hızlı, etkili ve daha az maliyetlidir. Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (Computer Aided Drug Design CADD), ruhsatlı ilaçların geliştirilmelerinin ilk aşamasında çok önemli bir yere sahiptir ve büyük yarar sağlamaktadır (Eren ve Yalçın, 2020).

Her ne kadar deneyler ilaç keşfinde esas görevi üstlense de, deneyler yalnızca bilgisayar modelleri ve teoriler ile birarada olduğunda anlamlı hale gelir. Biyolojik sistemlerin karmaşık ve zor anlaşılır bir doğasının olması, biyolojik sistemleri oluşturan kimyasal sistemlerin kompleks ve hareketli olmasından kaynaklanmaktadır. Bu tür kompleks yapıların anlaşılması için bilgisayar teknolojileri, gelişen hafıza ve görsel özellikleri ile

faydalı olmaktadır. İlaç keşfinde giderek önemi artan bilgisayar simülasyonları, teorik arka plan ile canlı deney ortamının birbirine bağlanmasında en temel rolü üstlenmektedir (Eren ve Yalçın, 2020).

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı hedef proteinin yapı bilgisi mevcutsa protein-ligand kenetleme, moleküler dinamikler ve *de novo* ilaç tasarımı metotları kullanılabilir. Protein bilgisi mevcut değilse QSAR, sanal tarama, farmakofor modelleme, liganda dayalı sanal tarama gibi metotların kullanıldığı ilaç tasarımı yöntemleri devreye girer. Yapıya dayalı ilaç tasarımı ilaç adayının hedef yapıya bağlanıp bağlanmayacağı veya hangi derecelerde bağlanabileceği CADD ile araştırılabilir. Burada CADD ile amaçlanan, sentezlenmeye değer bileşenin hangisi olduğuna dair tahminlerde bulunulmasıdır. Protein ve ligandın bağlanabilmesi için uygun bir konformasyonun sağlanması gerekmektedir (Eren ve Yalçın, 2020). Konformasyon, moleküllerin rotasyonel bağlarının dönüşü ile meydana getirilen en düşük enerjiye sahip üç boyutlu yapıyı ifade etmektedir. Konformasyon değişimi molekülün entropisinin ve dolayısıyla kararlılığının değişimine neden olur. Bu durumda molekül için hesaplanan enerji değerleri değişir ve bu değişim de bağlanma yeteneğini doğrudan etkiler.

Proteinlerin üç boyutlu yapıları, moleküler düzeyde işlevleri hakkında değerli bilgiler sağlar ve yaşam bilimleri araştırmalarında geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. Genellikle, protein kompleksleri birçok hücrel işlemin merkezinde yer alır. Etkileşimlerinin ve genel kuaterner yapının ayrıntılı açıklaması, biyolojik sistemlerin, protein komplekslerinin ve ağların nasıl çalıştığını ve onları nasıl modüle edebileceğimizi kapsamlı bir şekilde anlamak için gereklidir (Fuller, Burgoyne ve Jackson, 2009; Nim ve diğerleri, 2016).

Protein komplekslerinin deneysel olarak daha iyi belirlenmiş yapılarının kullanılabilir hale gelmesiyle, aktif bölgelerin genellikle homolog kompleksler arasında korunduğu ve bu modelleme kalıplarının bilinen protein-protein etkileşimlerinin çoğu için uygun olduğu gözlemlenmiştir (Kundrotas, Zhu, Janin ve Vakser, 2012; Zhang, Petrey, Norel ve Honig, 2010).

2.7.2. Moleküler modelleme

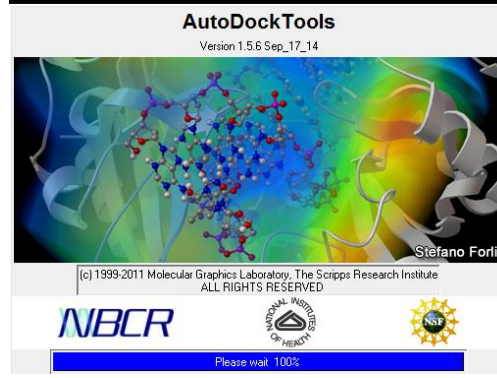
Moleküler modelleme, moleküler yapı ve davranışı tahmin etmek için kullanılan hesaplama yöntemlerini ifade etmektedir. Malzeme biliminden yapısal biyolojiye kadar birçok alanda moleküler modelleme metodolojileri küçük moleküllerden, proteinler, reseptörler ve nükleotid zincirleri gibi biyolojik makromoleküllere kadar çok çeşitli komplekslerden oluşan sistemleri anlamak için kullanılır. Bu sistemler, kuvvet alanları (moleküler mekanik) kullanılarak atomları yüklü ve potansiyel enerjili parçacıklar olarak ele alarak veya atomik ve atom altı ölçeklerde dalga fonksiyonunu uygulayarak (kuantum mekaniği) modellenenir. Kimyasal yapıların çizilmiş temsillerinden biyolojik sistemlerin milisaniyelik simülasyonlarına kadar, moleküler modelleme tarih boyunca büyük bir ilerleme kaydetmiştir (Leach, 2001; Sarı, 2020; Schlecht, 1997)

2.7.3. Yapı-tabanlı ilaç tasarımı

Yapı-tabanlı ilaç tasarımı ilaç firmaları ve akademik araştırma grupları tarafından çokça kullanılmaktadır. Yeni ilaçların keşfi için gereken zamanı ve maliyeti azaltabilmek amacıyla biyolojik hedefin atomistik yapısının bilinmesine dayanan bu yaklaşım x-ışını kristallografisi, NMR spektroskopisi, kriyo-elektron mikroskopinin kullanıldığı deneylerle veya homoloji tabanlı modelleme ile elde edilen bilgileri esas almaktadır. Standart prosedürler çoğunlukla *in silico* docking deneyleri ile başlamakta ve bu deneyler moleküler fragmentler veya binlerce bileşenin sanal taramasını kapsamaktadır (Duarte, Márquez-Miranda, Miossec ve González-Nilo, 2019; Leelananda ve Lindert 2016; Sliwoski, Kothiwale, Meiler ve Lowe, 2014; Souza, Limongelli, Wu, Marrink ve Monticelli, 2021).

2.7.4. Moleküler kenetleme

Protein-ligand kenetleme, bir ligand (çoğu zaman küçük bir organik molekül) ile en muhtemel pozisyon, oryantasyon ve konformasyonun tahmin edilmesi için faydalanan hesaplamalı bir yöntemdir (Sarı, 2020). Şekil 2.41’de bu çalışmada yararlanılan kenetleme simülasyonu arayüzü gösterilmektedir.



Şekil. 2.41. ADT arayüzü açılış ekranı

Bir ligandın bir proteine olan serbest bağlanma enerjisi farklı şekillerde tahmin edilebilir ve bu nedenle kenetleme programları üç kategoriden birinde sınıflandırılabilir. 1. Force-field (kuvvet alanı) tabanlı 2. Empirik skortlama fonksiyonları 3. Bilgi-tabanlı potansiyeller. Empirik skortlama fonksiyonları, protein-ligand bağlanmasının afinitesini veya uyumunu çok sayıda özel terimin yardımıyla hesaplar. Protein-ligand bağlanmasında bu terimlerin her biri genellikle önemli bir enerjetik faktörü temsil eder. Tahminleri daha kesin hale getirebilmek yani geliştirebilmek için modifiye edilebilen bu fonksiyonların her biri ile ilgili çeşitli parametreler mevcuttur. En sonunda tahmin edilecek bağlanma afinitesinin hesaplanmasından önce her bir terim bir sabit ile çarpılır (Liu ve Wang, 2015). Sonuçta bulunan serbest bağlanma enerjileri karşılaştırılarak en uygun ilaç adayı molekül iskeletlerine karar verilir. Antihelmintik bir ilaç molekülü keşfedilebilmesi için bu çalışmada bitkisel kökenli ligandların yanı sıra hedef proteinler olarak nematodlara ait ilaç hedefi olarak bilinen reseptör ve proteinler kullanılmıştır.

2.7.5. Homoloji modelleme

SWISS-MODEL <https://swissmodel.expasy.org> tam otomatik protein homoloji modelleme sunucularının ilkidir ve son 25 yılda sürekli olarak geliştirilmiştir (Peitsch 1996; Guex ve Peitsch 1997; Schwede, Kopp, Guex ve Peitsch, 2003; Arnold, Bordoli, Kopp ve Schwede, 2006; Bordoli ve Schwede 2012; Biasini ve diğerleri, 2014).

Karşılaştırmalı modellemede, bir hedef dizisinin 3D protein modeli kalıp işlevi gören evrimsel ilişkili bir protein yapısından çıkarılan deneysel bilgiler ışığında oluşturulur. SWISS-MODEL'de varsayılan modelleme iş akışı aşağıdaki ana adımlardan oluşur:

Girdi verileri: Hedef protein, ya FASTA, Clustal formatında ya da düz metin olarak amino asit dizisi olarak sağlanabilir. Alternatif olarak, bir UniProtKB erişim kodu belirtilebilir. Hedef protein heteromerik ise yani alt birimler olarak farklı protein zincirlerinden oluşuyorsa amino asit dizileri veya UniProtKB giriş kodları her alt birim için belirtilmelidir.

Kalıp arama: 1. adımda sağlanan veriler, SWISS-MODEL kalıp kitaplığına karşı evrimsel ilişkili protein yapılarını aramak için bir sorgu işlevi görür (Biasini ve diğerleri, 2014). SWISS-MODEL bu görevi iki veritabanı arama yöntemini kullanarak gerçekleştirir: BLAST (Altschul ve diğerleri, 1997; Camacho ve diğerleri, 2009), ki hızlıdır ve birbiriyle yakından ilişkili kalıplar için yeterince doğru sonuçlar verir ve HHblits (Remmert ve diğerleri, 2011) uzak homoloji durumunda hassasiyet de sağlar.

Şablon seçimi: Şablon araması tamamlandığında, şablonlar, Global Model Kalite Tahmini (GMQE) (Biasini ve diğerleri, 2014) ve Kuaterner Yapı Kalite Tahmini (QSQE) (Bertoni, Kiefer, Biasini, Bordoli ve Schwede, 2017) tarafından tahmin edildiği haliyle elde edilen modellerin beklenen kalitesine göre sıralanır. En iyi sonuca sahip olan kalıplar ve hizalamalar alternatif konformasyonel durumları mı temsil ettiklerini yoksa hedef proteinin farklı bölgelerini mi kapsadıklarını doğrulamak için karşılaştırılır. Bu durumda, birden çok kalıp otomatik olarak seçilir ve buna göre farklı modeller oluşturulur.

Model oluşturma: Seçilen her kalıp için, ilk önce hedef-kalıp hizalamasıyla belirlenen korunmuş atom koordinatları aktarılarak bir 3D protein modeli otomatik olarak oluşturulur. Hizalamadaki eklemelere/silmelere karşılık gelen kalıntı koordinatları, ilmek modelleme ile oluşturulur ve korunmamış amino asit yan zincirleri de oluşturularak tam atomlu bir protein modeli elde edilir. SWISS-MODEL, bu adımı

gerçekleştirmek için OpenStructure hesaplamalı yapısal biyoloji çerçevesine (Biasini ve diğerleri, 2013) ve ProMod3 modelleme motoruna güvenir.

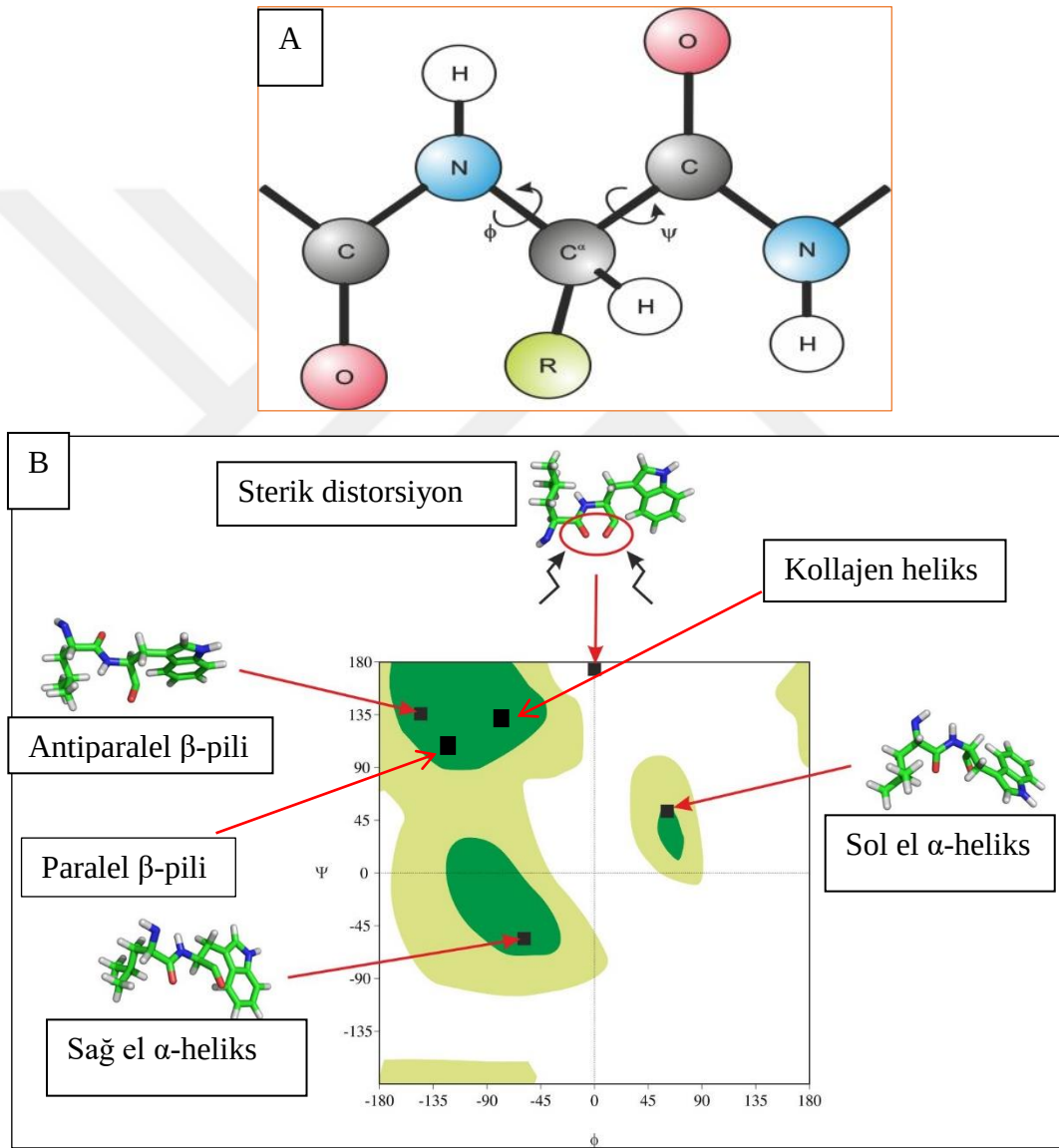
Model kalitesi tahmini: Modelleme hatalarını ölçmek ve beklenen model doğruluğuna ilişkin tahminler vermek için SWISSMODEL, QMEAN puanlama işlevine (Benkert, Biasini ve Schwede, 2011) güvenir. QMEAN global ve her rezidüyü kapsayan kalite tahminleri oluşturmak için ortalama gücün istatistiksel potansiyellerini kullanır. Lokal kalite tahminleri, bulunan tüm kalıp yapılarından elde edilen toplu bilgiyi temsil eden ikili mesafe kısıtlamaları ile geliştirilir.

Niteliksel Model Enerji Analizi (Qualitative Model Energy Analysis, QMEAN) vasıtasıyla protein yapı modellerinin kalitesini tahmin etmek, protein yapısının tahmininde hayati bir adımdır. Çoğu zaman, en iyi adayın seçileceği bir dizi alternatif modele sahip olunur veya sonraki deneyler için uygunluğu hakkında bir fikir sahibi olmak için mutlak kalitenin tahmin edilmesi gereken tek bir model oluşturulmuştur. QMEAN, tek bir model temelinde hem global (yani tüm yapı için) hem de yerel (yani her bir rezidü için) mutlak kalite tahminlerini türetebilen bir bileşik puanlama fonksiyonudur. İki global puan değeri vardır, QMEAN4 ve QMEAN6. QMEAN4, dört istatistiksel potansiyel terimin doğrusal bir kombinasyonudur. Her iki genel puan da başlangıçta [0,1] aralığındadır ve 1'e yaklaşması iyi olur. Varsayılan olarak, onları yüksek çözünürlüklü X-ışını yapılarından beklenebilecek şeyle ilişkilendirmek için Z-skorlarına dönüştürülürler. Yerel puanlar, dört istatistiksel potansiyel terimin ve kalıntı başına değerlendirilen puanların doğrusal bir birleşimidir (Benkert ve diğerleri, 2011).

2.7.6. Ramachandran Grafikleri

Şekil 2.42 A'da gösterilen $C\alpha$ etrafındaki ϕ ve ψ dihedral açıların birçok kombinasyonunu inceleyen Ramakrishnan ve Ramachandran, onların bağıntılarının grafiğini hazırladılar. Protein yapısının anlaşılmasında önemli bir yeri olan Ramachandran grafiğinde, ikincil yapı elemanları ile ilgili alanları tanımladılar (Ramachandran, Ramakrishnan ve Sasisekharan, 1963). Ramachandran grafiği, proteinlerin üç boyutlu yapılarının doğruluğunun anlaşılmasında yararlanılan bir grafik

türüdür. Çeşitli bilgisayar yazılımları bu grafikleri oluşturabilmektedir. Ramachandran ve diğerleri (1963) peptid yapısını şekillendiren psi ve phi açılarının sekonder yapıların meydana gelişi ile olan bağlantılarını detaylı kimyasal tanımlamalar ile ortaya çıkarmışlar ve proteinlerin üç boyutlu yapılarının tahmininde çok önemli bir mihenk taşı olan Ramachandran grafiğini Şekil 2.42 B'deki gibi yorumlanabileceği şekilde tasarlamışlardır.



Şekil 2.42. Ramachandran plot elemanları. A) Aynı C α atomuna bağlı iki peptid bağının oryantasyonunu tanımlayan dihedral açılar (Brzozowski, 2021) B) Ramachandran grafiği ve yorumlanması (Brzozowski 2021'den değiştirilerek alınmıştır, Paralel β -pili ve Kollajen heliks kısımları ilave edilmiştir)

İyi bir modelde genellikle tüm ϕ ve ψ değerlerinin %90'ı arzu edilen alanlarda bulunmalıdır. Şekil 2.42 B'de gösterilen koyu yeşil alanlar arzu edilen alanları, açık yeşil alanlar ise ilaveten izin verilen bölgeleri temsil etmektedir. Konformasyonel analizde Ramachandran grafiği, omurganın elde edilen konformasyonunun doğru şekilde oluşturulup oluşturulmadığını belirlemek için kullanılabilir. Yalnızca görselleştirme yazılımı kullanarak tüm yapıyı kontrol etmek mümkün değildir. Birçok sterik bozulma, omurganın yanlış konformasyonunun sonucudur. Burada sunulan araç, peptit veya protein modellerinin kalitesini kontrol eden en basit, en hızlı ve en popüler araçlardan biridir. Şekil 2.42 B'de ikincil yapı elemanlarının örnekleri ve iki oksijen atomunun birbirine çok yakın olduğu örnek sterik distorsiyon yerleşimi bulunmaktadır (Brzozowski, 2021).

2.7.7. Farmakokinetikler

Farmakokinetikler, bir ilaç adayının hedef hücreye ulaşana kadar geçirdiği ya da geçirebileceği aşamaları içine alan ve ilaç adayının kimyasal ve biyolojik özelliklerini hesaplamak için geliştirilmiş bir formülasyonlar silsilesinin hesaplamalı ortamdaki neticeleridir. Farmakokinetikler temelde ADMET yani ilacın bağırsaklardan, deriden ve hücre zarından absorpsiyonu, vücutta dağılımı (hangi tip hücre, doku ve organa ulaşip orada ne oranda bulunacağı, kan-beyin bariyerini geçip geçemediği), metabolizma sonucu dönüşeceği yan ürünler (karaciğerdeki sitokrom enzimlerinden etkilenip etkilenmeyeceği), tüm bunların vücuttan atılımı ve olası toksisitelerini araştırmak için tanımlanmış olsa da, bilgisayar programları vasıtasıyla geliştirilen ADME araştırma yöntemleri, daha çok ilacın absorpsiyonu ve dağılımına ilişkin tahminlerde bulunulmasına dair bilgiler vermektedir. Bir ilaç molekülü vücuda alındığında, onun ilgili hücreye ulaşip etkisini gösterebilmesi için bazı kriterleri karşılayabilmesi gereklidir. Bu kriterler çeşitli araştırmacılar tarafından yorumlanmış ve molekülün bazı önemli kimyasal özelliklerini değerlendiren belirli sınırlar oluşturulmuştur. Bunlardan en bilinenleri "Lipinski beşin kuralı", Ghose filtresi, Veber filtresi, Egan filtresi ve Muegge filtresi (veya kuralları) olarak ifade edilmektedir (Pathania ve Singh, 2021). Lipinski beşin kuralı, bir molekülün ilaç adayı olabilmesi için dört önemli özelliği şart koşturur: hidrojen donör sayısı<5 olmalı, hidrojen alıcı sayısı<10 olmalı, moleküler

ağırlık $\leq$ 500 olmalı ve $\log P < 5$ olmalıdır (Lipinski ve diğerleri, 2001). Ghose'nin filtresine göre; $160 \leq$ moleküler ağırlık ≤ 480 , $-0,4 \leq WLOGP$ (lipofilisite) $\leq 5,6$, $40 \leq$ molar refraktivite ≤ 130 , $20 \leq$ atom sayısı ≤ 70 olmalı (Ghose, Viswanadhan ve Wendoloski, 1999). Veber'in filtresine göre dönebilen bağ sayısı ≤ 10 , toplam polar yüzey alanı (total polar surface area, TPSA) ≤ 140 olmalı (Veber ve diğerleri, 2002). Egan'ın filtresine göre $WLOGP$ (lipofilisite) $\leq 5,88$ ve $TPSA \leq 131$ olmalı (Egan, Merz ve Baldwin, 2000). Muegge'nin filtresine göre $200 \leq$ moleküler ağırlık ≤ 600 , $-2 \leq XLOGP3$ (lipofilisite) ≤ 5 , $TPSA \leq 150$, halkaların sayısı ≤ 7 , karbonların sayısı > 4 , heteroatomların sayısı > 1 , dönebilen bağ sayısı ≤ 15 , hidrojen bağı alıcıların sayısı ≤ 10 ve hidrojen bağı vericilerin sayısı ≤ 5 olmalıdır (Muegge, Heald ve Brittelli, 2001). Hidrojen donör sayısı moleküldeki toplam nitrojen-hidrojen ve oksijen-hidrojen bağlarının sayısını, hidrojen alıcı sayısı ise moleküldeki tüm oksijen ve nitrojenlerin sayısını vermektedir. $\log P$ ifadesinde logaritması alınan P partiyon katsayıdır. Partiyon katsayısı denge halinde yağ fazında çözünen ilaç derişiminin su fazındaki ilaç derişimine oranını ifade eden bir sabittir ve $([oktanol]/[su])$ olarak da gösterilebilmektedir. Bu değer, ilaç benzeri molekülün yağ tabiatındaki hücre zarından geçebilme yeteneğinin bir göstergesi olduğu için ADME tahmininde absorpsiyona ilişkin bilgi sağlamaktadır. $\log P$ değeri ne kadar küçük olursa molekülün hidrofilisitesi o kadar çok artar ve bu da absorpsiyon ve zardan geçişi o kadar kolaylaştırır. Bunun yanısıra partiyon katsayısının farklı teorilerle yorumlanmasının bir sonucu olarak SWISSADME programına dahil edilen $WLOGP$, $XLOGP$ ve $MLOGP$ gibi parametreler de lipofilliğin anlaşılmasında kullanılan temel göstergelerdir (Daina, Michielin ve Zoete, 2017).

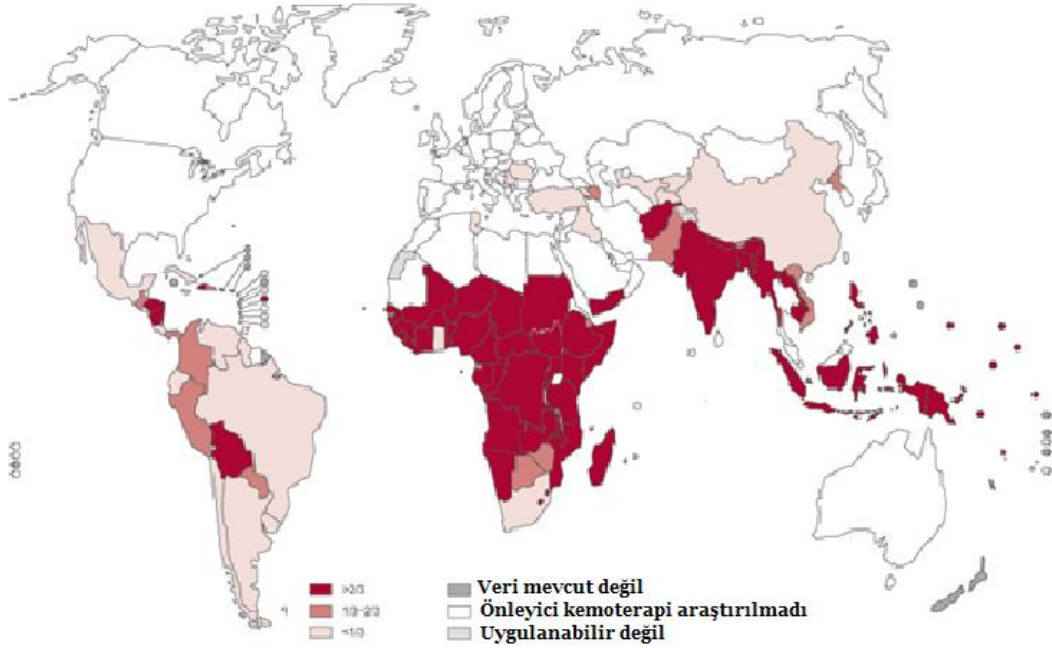
2.8. Helmintik Enfeksiyonlar ve Korunma

2.8.1. Helmintik enfeksiyonların dünya genelinde yaygınlığı

Helmintik enfeksiyonlar hemen hemen tüm ülkelerde görülebilmekle beraber Güney Amerika, Afrika ve Asya ülkelerinde bu enfeksiyonlara daha sık rastlanmaktadır. Şekilde 2.43'te 2018 yılında yapılan tahminlere dayalı bir helmintik enfeksiyon haritası verilmiştir (DSÖ, 2017).

DSÖ verilerine göre tüm dünyada yaklaşık olarak 1,5 milyar insan topraktan geçen helmintler ile enfektir. Bunlardan 819 milyon insanın *Ascaris* ile, 464 milyon insanın *Trichuris* (kamçılı nematod) ile ve 438 milyon insanın kancalı nematod ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Şistosomiyaz 70 ülkede endemiktir ve 200 milyondan fazla insanı etkilemektedir. Lenfatik Filariyazis 83 ülkede endemiktir ve 180 milyon vaka olduğu tahmin edilmektedir (DSÖ, 2017).

Ülkemizde çocuklarda en sık rastlanan helmintik enfeksiyonlar kılkurdu enfeksiyonlarıdır. *Enterobius vermicularis* türü oksyurid nematod daha çok çocuklarda görülmekte ve dünya genelinde 400 milyon insanda bulunduğu tahmin edilmektedir. *A. lumbricoides* enfeksiyonuna tüm yaş gruplarında rastlanmakla beraber, okul öncesi dönemdeki çocuklarda daha yaygın olduğu bildirilmiştir (Steinberg ve diğerleri, 2003).



Şekil. 2.43. Toprakta geçen helmintiyazisin endemik ülkelerdeki dağılımı ve yaşları 1-14 arasında olan çocuklardaki oranı (DSÖ, 2017'den değiştirilerek alınmıştır, http://www.who.int/intestinal_worms/epidemiology/en/)

Dünyada Orta-Doğu ve Güney Amerika’da yer alan gelişmemiş ülkelerde hijyen yetersizliği en önemli risk faktörü olarak ifade edilmektedir (Galzerano, Sabatini ve Duri, 2010). *Trichuris trichiura*’nın Asya ve Afrika’daki sanitasyon koşullarının yetersiz olduğu bölgelerde prevalansı oldukça yüksektir ve dünya genelinde çoğunluğu çocuklardan oluşan 450 milyon ile 1 milyar aktif olgu olabileceği tahmin edilmiştir (Truscott, Turner ve Anderson, 2015).

2.8.2. İnsanlarda bulunabilen helmintler ve bunların tıbbi açıdan en önemlileri

İnsanlarda 342 tür helmint bulunabilir. Bunların içinde insan sağlığını olumsuz etkileme açısından en önemlileri topraktan geçen helmintler ve hayati organlara yerleşebilen nematod, sestod ve trematod türleridir. Bunlar beyin, kalp, göz, akciğerler, karaciğer gibi organlarda çoğalarak bu organların fonksiyonlarının bozulmasına yol açarlar. Nematodların larvaları insan vücudunda parazit olarak bulunabildikleri gibi, larvalar çeşitli organlara göç ederken esas yerleşim yerlerine ulaşana kadar geçtikleri dokularda tahribata neden olurlar. Nematodların insana geçişleri çeşitli yollardan olabilir, fekal kontamine toprakta gelişen yumurtalar ağız yoluyla alınabilir, toprakta bulunan larva konağın derisini delerek içeri girebilir. Bazı vivipar nematodlarda ise gelişim için bir ara konak kullanılır. Bu arakonakta gelişen larva diğer konaklara bulaşır (Ustaçelebi, 1999).

Paraziter enfeksiyonların çocuklarda en sık görüldüğü dönem, ilkokul çağıdır (7-14 yaş aralığı). *E. vermicularis*, *Taneaia saginata*, *A. lumbricoides*, *T. trichiura* ve *Hymenolepis nana* en sık rastlanan parazit türleri olarak bildirilmiştir (Özdemir, t.y.). *E. vermicularis*, tüm dünyada en yaygın nematod enfeksiyonu etkeni olarak tanımlanmıştır (Cook 1994; Markell 1985). Bu türün doğal konağı sadece insandır ve enfeksiyonlar ise çoğunlukla asemptomatiktir. Tedavi oranı yüksek olsa bile, sık sık nüksettiği ifade edilmektedir. Anal bölgedeki parazit yumurtaları, bu bölge ile temas eden ellerin ağza sürülmesinden sonra tekrar sindirim sistemine girer ve böylece otoenfeksiyona neden olur (Rawla ve Sharma 2020). Fekal kontaminasyon ve yumurtaların oral yolla alınması vasıtasıyla bulaşan askariyaz çoğu zaman asemptomatik kalsa bile, çocuklarda zayıflığa ve bağırsak tıkanması neticesinde her yıl yaklaşık 3000- 60 000 kişinin ölümüne sebep olmaktadır (Baba, Ahmad ve Sheikh, 2009; Dold ve Holland, 2011; Hotez, Fenwick,

Savioli ve Molyneux, 2009). *Trichuris trichiura*, insanlarda trişuriyaza neden olan bir nematod türüdür. Posterior uçta kamçı benzeri bir yapı ihtiva ettiği için kamçılı nematod olarak bilinmektedir. Konağına anterior ucu ile tutunan bu nematodların boyları 3-5 cm arasında değişmektedir (Bansal, Huang ve Chun, 2018). Trişuriyaz, topraktan geçen üç önemli helmintten biridir (diğer ikisi *ancylostoma* ve *ascaris*dir). *T. trichiura* fekal-oral yolla konağı enfekte etmektedir. 1-4 yıl boyunca bağırsakların herhangi bir bölümünde yaşayabilir. Enfekte çocuklarda anemi ve gelişme geriliği görülebilmekte, bazen bilişsel gelişimin bozulması da kronik semptomlara eklenmektedir (Viswanath, Yarrarapu ve Williams, 2020). *Hymenolepis nana*; cüce şerit, dünya genelinde yaygın olan ve insanlarda bulunabilen en küçük tenya türüdür. *H. nana* enfeksiyonu Asya (Mirdha ve Samantray 2002), Orta ve Güney Amerika (Diaz, Mondragon, Ramirez ve Bernal, 2003; Jacobsen, Ribeiro, Quist ve Rydbeck, 2007) ve Doğu Avrupa (Waloch, Sobolewska ve Dzbeński, 2010) gibi ılıman iklimlerde daha sık ortaya çıkmaktadır. Hafif *H. nana* enfeksiyonları genellikle asemptomatik olabilir, fakat iki binden fazla sestodun bulunduğu ağır enfeksiyonlar çeşitli gastrointestinal rahatsızlıklar ve alerjik reaksiyonlar ile ciddi şekilde belirti vermektedir (Al-Amry, Al-Amri, ve Khan, 2008; Di Lernia, Ricci ve Albertini, 2004; Marseglia, Marseglia, Licari, Castellazzi ve Ciprandi, 2007). Teniyazis, sık rastlanan bir diğer şerit enfeksiyonudur ve insanları ilgilendiren üç türü: *Taenia solium*, *T. saginata* ve *T. asiatica*'dır (DSÖ, 2020). İnsanlarda *T. saginata* enfeksiyonu enfekte sığır eti tüketilmesiyle gelişir. Sistiserki içeren iyi pişmemiş etin yenilmesinden sekiz hafta sonra bağırsakta erişkin şeritler haline geldiklerinde karın ağrısı, bulantı, diyare veya kabızlık görülebilmektedir. İlaç tedavisinden sonra şeritler giderilinceye kadar bu semptomlar devam edebilmekte veya tedavi edilmezse şeritler yıllarca bağırsaklarda yaşayabilmektedir (DSÖ, 2020). “Ekinokokkosis” ise ekinokok cinsindeki türlerin sebep olduğu bir hastalıktır (Yılmaz ve Babür, 2007). Ekinokok cinsine ait dört tür: *Echinococcus multilocularis*, *E. granulosus*, *E. oligartrus* ve *E. vogeli*'dir (Eckert ve Deplazes, 2004). Bunlardan *E. granulosus* ve *E. multilocularis* Türkiye’de enfeksiyon etkeni olan türler olarak bilinmektedir (Yılmaz ve Babür, 2007). Ülkemizde endemik olan ve toplum sağlığı açısından risk oluşturan tür *E. granulosus*'dur. Fekal kontamine toprak ve kontamine sular en önemli enfeksiyon kaynağıdır. İnsan rastlantısal konak olsa da, *E. granulosus* periton zarına yerleşerek burada gelişip “kist hidatik” olarak bilinen ve içi parazit yumurtaları ile dolu kistlerin

oluşmasına ve kaza ile bu kistlerin yırtılması durumunda şoka ve ölüme neden olmaktadır.

Çengelli nematodlar GİS’de kanamaya ve dolayısıyla anemiye sebep olmaktadır (Fauci ve diğerleri, 2008). İnsanlarda görülebilen iki tür çengelli nematod *Necator americanus* ve *Ancylostoma duodenale*’dir. Bu türler daha çok ılıman ve tropik iklimlerde görülmektedir (Üner ve Ertuğ, 2007). Yaklaşık 1 cm boyunda olan çengelli nematodlar, konağın ince bağırsağına başlarını gömerken günlük yaklaşık 0-0,5 ml kan kaybedilmesine neden olur. Gaitadaki yumurtalar toprakta veya kontamine suda enfektif hale geçtikten sonra larva, insan derisine yapışıp deriyi delerek kan yoluyla akciğerlere göçmekte ve ardından özafagus yoluyla sindirim kanalına inerek burada erişkin hale geçmektedir (Shanson, 1989).

Nematodların büyüklükleri birbirilerinden oldukça farklı olabilmektedir. Çoğunlukla dişi bireyler erkeklere göre daha büyüktür. İnsanlarda bulunabilen türler açısından ele alındığında ise en büyük nematod türü, deri altına yerleşen *Dracunculus medinensis*’tir ve boyu 1 m’den uzun olabilmektedir. En küçük nematod ise *Trichinella spiralis*’tir ve dişileri yaklaşık 1,5 mm boyundadır (Ustaçelebi, 1999).

2.8.3. Paraziter hastalıklardan korunmak için temel adımlar

Konağın ıslahına yönelik çalışmalar: Parazitoz kaynağı, taşıyıcı olan insan veya hayvanlar oldukları için bu kaynakların enfeksiyon açısından tedavi edilmeleri, taşınımların kesilmesini ve enfeksiyon oranının hızla gerilemesini sağlar (Ustaçelebi, 1999). Kaynak evcil hayvan ise uygun kemoteropötikler ile tedavi edilmeli veya karantinaya alınmalıdır. Kaynak yabani hayvanlar veya vektörler ise bunların yaşam alanlarından uzak bölgelerdeki yerleşim alanları devamlı yaşamak için tercih edilmelidir.

Çevrenin hijyene uygun hale getirilmesi: Fekal kontamine toprak önemli bir bulaş faktörü olduğu için kanalizasyon sisteminin var olması ve gübre olarak kullanılan

materyalin sağlık açısından kullanıma uygun ve insan kaynaklı olmaması dikkate alınmalı ve idareciler tarafından halka bu imkânlar sağlanmalıdır (Ustaçelebi, 1999).

Toplumun bilgilendirilmesi: Özellikle okul öncesi dönemdeki çocuklarda bağırsak parazitleri ile enfeksiyonun daha yaygın olduğu düşünüldüğünde hem ilkokul öncesi hem de ilkokul çağındaki çocukların bu konuda bilgilendirilmesi, parazitlerin ve bulaş yollarının, zararlarının, neden olduğu hastalıkların neler olduğunun anlatılması halk sağlığının korunması için önemli bir adımdır (Hazır, Gündeşli, Ozkirim ve Keskin, 2009).

2.9. Bu alışmadaki Enfekte Konak Organizma: *Mus musculus*

Bu çalışmada kullanılan deney hayvanı laboratuvar faresi olarak bilinen Balb-c ırkına ait *Mus musculus albinus* türü fareidir. Bu albino fareler 1-2 yaş arasında yaklaşık 28-40 gr ağırlık aralığında olan, ışığa duyarlı ve geceleri aktif hayvanlardır.

2.9.1. Taksonomisi

Mus musculus taksonomik hiyerarşisi aşağıda verilmiştir (Wilson ve DeeAnn, 1993):

Alem: Animalia

şube: Chordata

Alt şube: Vertabrata

Sınıf: Mammalia

Takım: Rodentia

Familya: Muridae

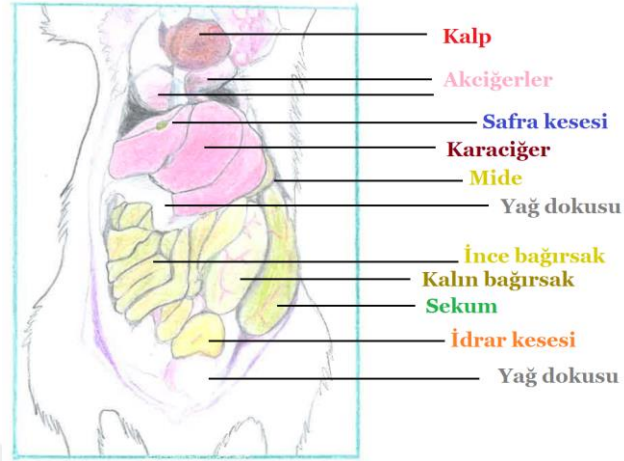
Cins: *Mus*

Tr: *Mus musculus* Linnaeus (1758)

2.9.2. Anatomisi

Farelerin iskelet sisteminde ossa cranii, columnae vertebralis, sternum, thoraks, pelvis ve iki çift ekstremite bulunmaktadır. Sol akciğer bir, sağ akciğer 4 lopludur. n

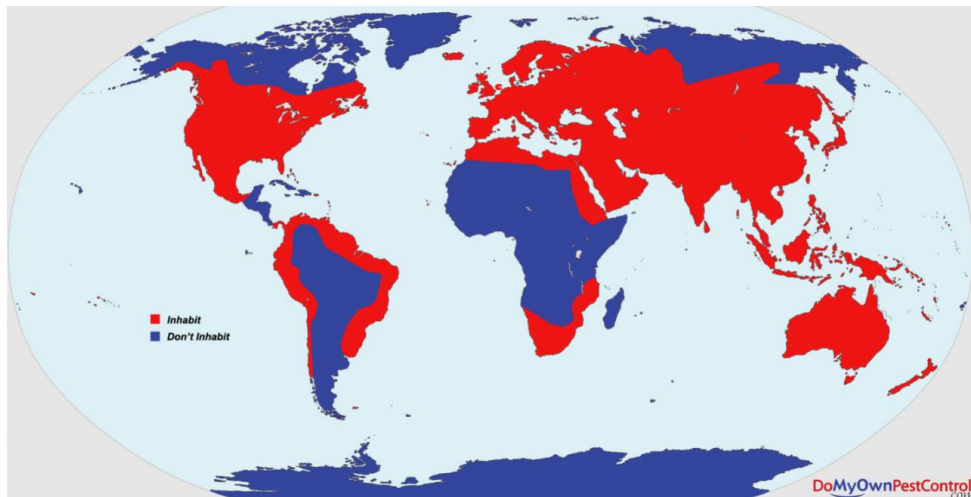
bacakları 4, arka bacakları 5 parmaklıdır. Bu çalışmanın nekropsi aşamasında çıkarılan abdominal organların yerleşimini gösterebilmek amacıyla, *Mus musculus* abdominal organları genel hatları ile şematize edilerek Şekil 2.44’de verilmiştir.



Şekil 2.44. Farenin abdominal organları (Orijinal)

2.9.3. Yayılışı

Şekil 2.45’te ev faresinin (*Mus musculus*) dünyadaki yayılışı gösterilmektedir (Reid, 2006). Çok geniş bir yayılış alanına sahip olan ev faresi kozmopolit bir türdür ve çok sayıda helmint türü için uygun bir konaktır.



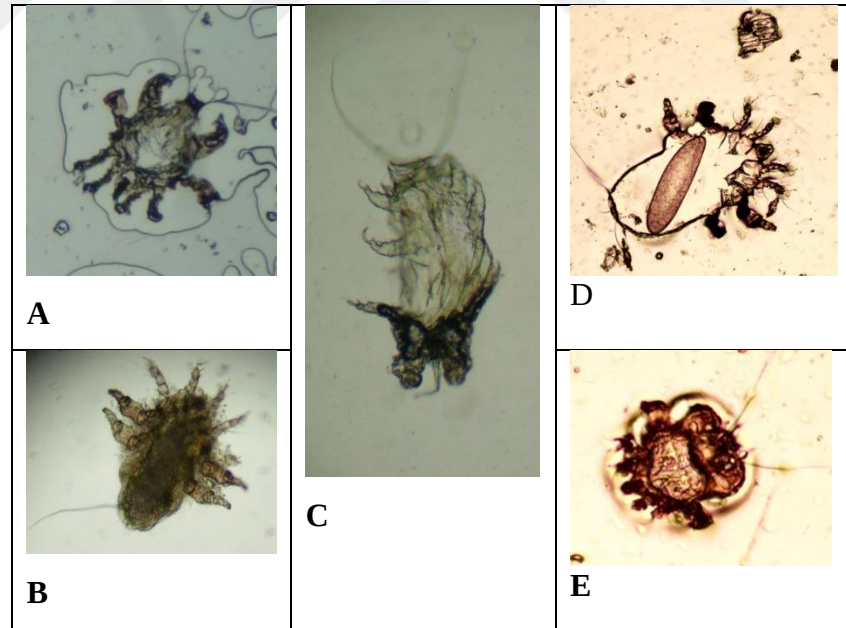
Şekil 2.45. *Mus musculus* türünün dünyaki yayılışı. Kırmızı alanlar bulunabildiği bölgelerdir (Reid, 2006, https://www.domyown.com/all-about-mice-c-21_579.html)

2.10. Laboratuvar Farelerinde Görülebilen Dış Parazitler

Laboratuvar farelerini en fazla enfeste eden ektoparazit türleri *Myobia musculi*, *Myocoptes musculinus* ve *Radfordia affinis*'tir. Nadir bulunan türler ise *Demodex musculi* ve *Ornithonyssus bacoti*'dir. Bu ektoparazitlerin hiçbiri zoonotik değildir (Hedrich, 2012).

Myobia musculi türünün hayat devri 23 gündür. *Myobia* dişileri erkeklerinden büyüktür. Dişileri yumurtaları taşırken görülebilir. Dişiler 400-500 mikrometre uzunluğunda ve 160-180 mikrometre genişliktedir. *M. musculi* hücrel dokular arası sıvı ile beslenir. *Myocoptes musculinus* 300-325 mikrometre uzunlukta ve 130-135 mikrometre genişliktedir. Deri yıgıntılarını ile beslenir. Yaşam döngüsü 14 gündür (Hedrich, 2012).

Farelerin kılkurdu enfeksiyonu açıdan taranması sırasında fekal flotasyonda ve selofan bantta görülen ektoparazitlerden bazıları Şekil 2.46'da verilmiştir.



Şekil 2.46. Farelerde görülen bazı ektoparazitler. **A)** Selofan bant üzerinde görülen bir *Myocoptes musculinus* erkeği. **B)** Fekal flotasyonda görülen bir *M. musculinus* dişisi **C)** Gömlek değiştiren bir *Myobia musculi*, **D)** İçinde yumurta gelişmiş bir *M. musculinus* kalıntısı ve **E)** Fekal flotasyonda görülen büzülmüş bir *M. musculinus* erkeği (Orijinal)

2.11. Laboratuvar Farelerinde Görülebilen İç Parazitler

Bunlar protozoa ve helmintler olarak iki gruptur. Sestod parazitler modern koşullara sahip laboratuvar farelerinde çok nadiren bulunurlar. Kılkırtları çok daha sık görülür. *Heligmosomoides polygyrus*, parazitik immunoloji ve antihelmintik bileşenlerin etkilerinin değerlendirilmesi için düzenli olarak kullanılır (Hedrich, 2012).

2.11.1. Protozoan parazitler

Protozoan parazitler bağırsaklar veya dokularda bulunabilirler. Dokularda bulunanlar *Klossiella*, *Hepatozoon*, *Babesia*, *Toxoplasma* ve *Plasmodium*dur. Bunlar modern laboratuvar farelerinde neredeyse hiçbir zaman bulunmazlar. Non-patojenik enterik protozoan türleri ise *Entamoeba muris*, *Chilomastix bettencourti* ve çeşitli trichomonad türleridir (Hedrich, 2012).

Entamoeba muris, farelerde bulunan kamçısız enterik bir protozoa parazittir. Sekiz çekirdekçiğin bulunmasıyla kist yapısı karakteristiktir. Farenin kolonunda veya çekumunda bulunabilir (Lin, 1971). Teşhisi kistlerin fekal flotasyon yöntemiyle bulunması ile gerçekleştirilebilir. Kistler yuvarlak ve 9-20 µm çapındadır.

Chilomastix bettencourti kamçılı bir enterik protozoan parazittir. Çekum lümeni ve çıkan kolonda bulunabilir. Kist ve trofozoit olmak üzere iki formu vardır (Baker, 2007). Kistler 15 µm ve 7 µm boyutlarında trofozoitler ise armut biçimindedir. Flagella ve nükleus anterior uçta bulunur. Yaşam döngüsü doğrudandır ve kistler gaita içinde açılır (Hedrich, 2012).

Trichomonad cinsine dahil olan en az dört türün laboratuvar farelerini enfekte ettiği bilinmektedir. Bunlardan en sık rastlanana *T. muris*'tir. Üç adet anterior flagellumu bulunmaktadır. Mikroskop altında kolayca görülebilen membranı sayesinde diğer protozoalardan kolayca ayrılır. Gerçek bir kist yapısı oluşmaz.

Patojenik protozoaların neredeyse hiçbirisi modern laboratuvar farelerinde bulunmaz. Sadece *Spironucleus muris* modern laboratuvar farelerinde bazen bulunabilmekte ancak *Giardia muris* ve *Cryptosporidium muris* oldukça nadir görülmektedir.

2.11.2. Sestodlar

Hymenolepis diminuta, *Rodentolepis microstoma* ve *Hymenolepis nana* son konağı fareler olan üç sestod türüdür. Sestodlar genel olarak skoleks (baş) ve strobila (vücut) olmak üzere iki kısımdan oluşur. Strobila proglottid denilen segmentlerden oluşur ki bunlar çok sayıda yumurta taşır.

Hymenolepis diminuta rat şeridi olarak bilinmesine rağmen fareleri de enfekte edebilir. *H. diminuta* yumurtaları polar filamentler taşımaz ve *H. nana* ve *R. microstoma*'ya göre daha küreseldir. *H. diminuta* yumurtaları yaklaşık 70 x 68 µm boyutlarındadır ve üç çift küçük kanca içerir.

Rodentolepis microstoma farelerin safra kesesinde bulunan bir şerittir. Skoleks 4 vantuz taşır ve rostellum yaklaşık olarak 25 küçük kanca ile kollara ayrılmıştır. Yumurtalar ovoid şekilde 72 x 60 µm boyutlarında, hem polar filamentler hem de 3 çift küçük kanca taşır. Hem *R. microstoma* hem de *H. diminuta* ara konak olarak güve ve pireleri kullanırlar.

***Rodentolepis nana* (*Hymenolepis nana*)** cüce şerit olarak bilinir. Fare sestodları içinde en küçükleridir. Skoleks 4 vantuzludur ve rostellum yaklaşık 25 küçük kanca taşır. *R. nana* yumurtaları oval, yaklaşık 50 x 35 µm boyutlarındadır. Embriyo taşıyan yumurta 3 çift kanca ve polar filamentler taşır. *R. nana* ara konağa girmeksizin de yaşayabilir. Direkt yaşam döngüsünde, yumurtaları içeren gaitayı sindiren farenin intestinal villüslerinin mukozası içinde sistiserkoid larva haline gelir, buradan tekrar intestinal lümene geçer. Doğrudan yaşam döngüsü 14-16 gün sürer. İndirekt yaşam döngüsünde ise pireleri ara konak olarak kullanır.

Sestod enfeksiyonunun teşhisi genellikle fekal flotasyon ile yumurtaların görülmesi veya ergin sestodların tipik lokasyonlarında araştırılmaları ile gerçekleşir (Hedrich, 2012).

***Taenia taeniaeformis* (kedi tenyası)** normalde laboratuvar farelerinde görülmez. Fare kedi tenyasının arakonağıdır. Yumurtaların yutulmasından yaklaşık 30 gün sonra enfekte olan farenin karaciğer ya da kaslarında bu parazitin strobiloserkusu bulunabilir. Strobiloserkus 4-10 mm çapındadır ve segmenli bir strobila ile bir skoleks taşır. Eski kaynaklarda strobiloserki *Cysticercus fasciolaris* olarak geçmektedir (Balk, 1970). Bu parazit ile ilgili genel olarak klinik belirti yoktur ve yalnızca nekropside görülebilir. Kedi gaitasının fare tarafından alınmasıyla fareye geçmektedir (Hedrich, 2012).

2.11.3. Nematodlar

Nematodlar silindirik yapılı yuvarlak helmintlerdir. Ayrı eşeylidirler. Çoğunlukla intestinal sisteme yerleşirler ancak deri ve iç organlara yerleşip hastalıklara sebep olanlar da mevcuttur.

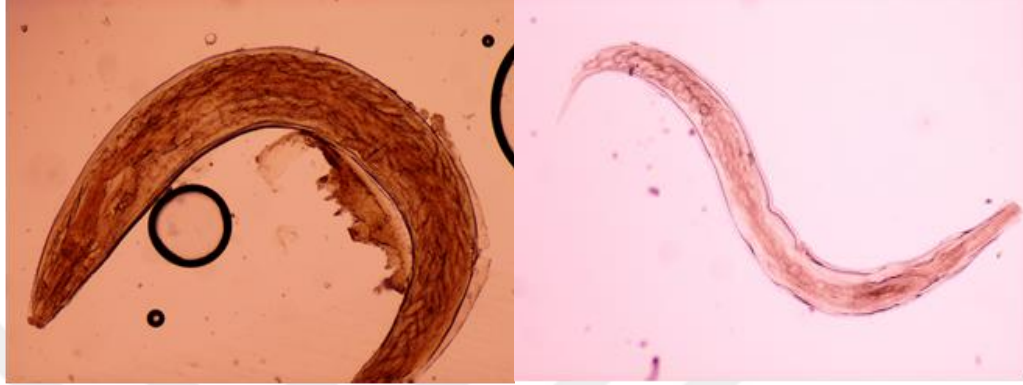
Tüm nematodlar silindirik yapılı olmalarının yanı sıra bazı nematodlar kamçı, kıl, iplik gibi ilave yapılar taşır. Ön ve arka uçlar çoğunlukla sivridir ancak bazı türlerde ön uç kalın ve küt, arka kısım ise sivridir. Bazı türlerde baş bölgesi belirgin bir şekilde vücuttan boğumla ayrılmıştır, bazı tür nematodlarda ise arka uç kıvrılmış halde durur. Nematodların en dış kısımlarında kütikula denilen koruyucu bir tabaka bulunur. Bu tabaka saydam, yarı geçirgen ve vücudun bazı kısımlarında daha kalın veya genişlemiş bir halde bulunur. Bu tabaka özellikle vücudun son kısmında veya baş bölgesinde daha çok gelişmiş olabilir ve helmintin larva döneminde birkaç kez değiştirilir (gömlek değiştirme). Kütikula tabakasının altında hipoderma, onun altında ise bir kas tabakası bulunur. Kan emen nematod türleri genellikle pembe renkteyken, diğer türler beyazımsı-grimsi renktedir. Sindirim sistemleri gelişmiştir ve ağız kapsülü, ağız, özofagus, bağırsak, rektum ve anüsten oluşur. Ağız boşluğu da kütikula ile çevrilidir ve iki, üç veya dört dudaktan meydana gelmiştir. Ağız etrafında kuvvetli dişler bulunur. Özofagus iki tipten biridir: rhabtidiform özofagusta bir boğum ve ardında ise bir

şişkinlik bulunur, strongyloid özafagusta ise boğum ve şişkinlik bulunmaz. Özafagusta bulunan kütikula yapısı dıştakinden farklıdır ve hareketli bir kas dokusunu örter, bağırsak ve rektum ise bir özelliğe sahip değildir. Boşaltım sistemi oldukça basit yapıdadır; ikişer veya üçer adet kanal karnın ortaya yakın bir bölgesindeki çıkıntı ile sonlanmaktadır. Sinir sistemleri özafagusu saran bir halka yapısı ve gangliyonlar ile eşey organlarına uzanan bir lif yapısından ibarettir. Dişilerde eşey organları genital borucuk üzerindeki ovaryum, ovidukt, uterus, vulva ve vajenden oluşur. Erkeklerde ise üç kısma ayrılır; testisler, vas deferens ve vesicula seminalis ile ductus ejaculatorius. Son kısımda ise spikül adlı bir yapı bulunur ki görevi vulvayı açmaktır. Nematod yumurtaları oval, yuvarlak veya elips şeklinde, tek veya çift çeperli olabilmektedir. Nematod yumurtalarında kapak bulunmaz. Yumurtadan larva gelişebilmesi için yumurtanın bölünmeler geçirmesi gereklidir. Larvanın baş ve kuyruk kısımları vardır. Larva yumurtadan çıkmadan iki kez gömlek değiştirebilir. Nematod olgun hale gelene kadar dört kez gömlek değişir. Nematodlarda yumurta oluşumu üç şekildedir: ovovivipar (içlerinde larva oluşmuş yumurta), ovipar (içlerinde larva oluşmamış yumurta) ve vivipar (uterusta oluşmuş yumurtadan larva çıkması) (Ustaçelebi, 1999).

Heligsomoides polygyrus araştırma amaçlı çok kullanılan bir nematod türüdür ve modern koşullara sahip olan labratuvarlarda yetişen farelerde bulunmaz. Hayat döngüsü doğrudandır ve yumurtadan çıktıktan 4-5 gün sonra larva enfektif hale gelir. Larva küçük bağırsağın dokuları içine girer ve burada olgunlaşır. Prepatent dönemi 9-12 gün sürer. Teşhisi fekal flotasyon yöntemi ile veya nekropsi sırasında bağırsakta parazitlerin görülmesi ile olur. Konağa etkileri genellikle immün sistem ile ilgilidir. Tedavisinde IVC etkilidir (Hedrich, 2012).

Oksyuridler (Kılkurtları) halk sağlığı açısından önemli kosmopolit nematod parazitlerdir (Khalil, Lashein, Morsy ve Abdel-Mottaleb, 2014). Hayvanlarda hafif enfestasyon genellikle subkliniktir, ancak yoğun parazit enfeksiyonu aktivitede azalmaya, kilo kaybına ve bazen de bağırsak lezyonlarına neden olabilir (Heatley ve Harris, 2008; Whary, Baumgarth, Fox ve Barthold, 2015). Hayvanların sağlığı üzerindeki olumsuz etkiye ek olarak, Oxyuridae ailesinin bazı üyelerinin zoonotik potansiyeli de bulunmakta ancak önemli bir zarara sebep olmamaktadırlar (Pritchett,

2007). Oksyuridlerden sadece *S. obvelata*'nın insana geçtiğine dair bilgi mevcuttur (Flynn, 1973). Erkek fareler dişilere kıyasla kılkurdu enfeksiyonlarında daha çok parazit taşımaktadır (Derothe, Loubès, Orth, Renaud ve Moulia, 1997). Şekil 2.47'de bu tez çalışmasının konusu olan iki oksyurid nematod türü gösterilmektedir.

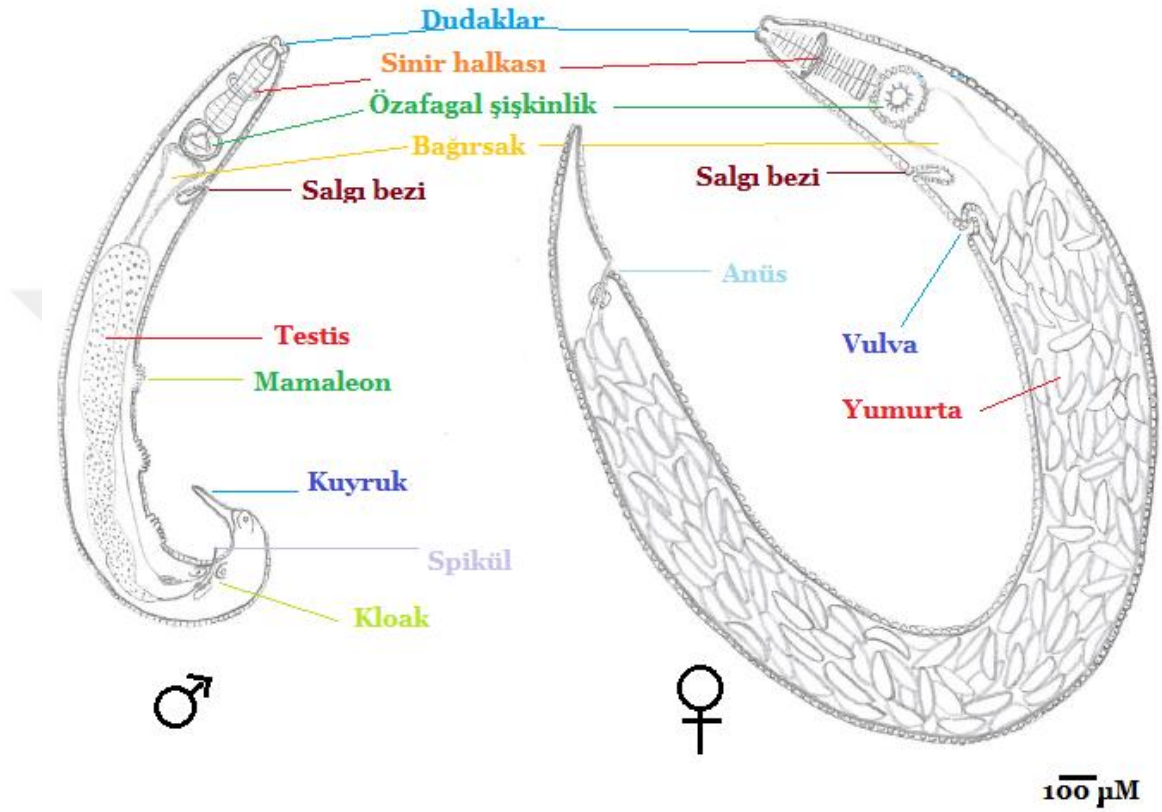


Şekil 2.47. Dişi oksyurid nematodlar. Solda *S. obvelata* (10x büyütme) ve sağda ise *A. tetraptera* (5x büyütme) türü

Syphacia obvelata Laboratuvar farelerini en fazla enfekte eden helmint parazitidir. Yumurtalar yaklaşık 134 x 36 µm boyutlarında ve muz şeklindedir. Yaşam döngüsü doğrudan ve kısadır, yani gelişimini tamamlayabilmek için konak değiştirmesine gerek yoktur. Dişiler yumurtladıktan sonra yumurtaların çatlaması yaklaşık 5-20 saat sürer. Prepatent dönem 11-15 gündür. Dişilerin boyutları 3,5-6 mm, erkekler 1-1,5 mm'dir. Dişinin kuyruğu uzun ve sivridir (Hedrich, 2012).

Bu çalışmada bulunan *S. obvelata* türleri küçük, renksiz veya soluk beyaz, dar posterior ekstremiteli türlerdi. Kutikül enine çizgilere sahiptir. Ağzı bir yutak izler, üç-ışınlı bukkal kavite keskin diş benzeri dentiküller ile distal olarak desteklenen üç kalın kitinize plaka ile çizgilidir. Bukkal kavite kısa bir özafagusa açılır ki burası anterior silindirik kısım, bir korpus, ve bir globular bulbdan oluşur. Özafagus uzun bir bağırsağa bağlıdır ve bağırsak da dişilerde anal açıklık ile erkeklerde ise kloakal açıklık ile dışarı açılır. Dişilerin vücudu erkeklerden daha büyüktür. Abdel-Gaber (2014) tarafından gerçekleştirilen *S. obvelata* morfolojisi ile ilgili çalışmaya göre 10 olgun örneğe dayanarak dişilerin vücudu 2,9-4,6 ($3,5 \pm 0,1$) mm uzunluğunda ve 0,12-0,23 ($0,15 \pm 0,001$) mm genişlikte ölçülmüştür. Lateral alae yoktur. Özafagus 0,213-0,410 ($0,342 \pm$

0,01) mm uzunluğundadır. Farinks 0,146-0,192 (0,181 $\pm$ 0,01) mm uzunluğunda, korpus 0,018-0,062 (0,051 $\pm$ 0,01) mm uzunlukta, bulb ise 0,049-0,156 (1,10 $\pm$ 0,01) mm uzunlukta ölçülmüştür. Şekil 2.48’de *S. obvelata* ergini dişi ve erkek bireylerin vücut kısımları şematize edilerek gösterilmektedir.



Şekil 2.48. *S. obvelata* dişi ve erkek bireyin cinsiyet göstergesi olan vücut kısımları (Orijinal)

Syphacia obvelata taksonomisi şu şekildedir:

Parazit- *Syphacia obvelata* Rudolphi, 1802 (F: Oxyuridae Cobbold 1864)

Konak tipi- Laboratuvar faresi *Mus musculus* Linnaeus (1758) (F: Muridae)

Enfeksiyon bölgesi- İnce bağırsak, sekum, kolon ve anal açıklık

Lokalite tipi- Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi, Bursa

Numunelerin muhafaza edildiği yer- Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü Parazitoloji Laboratuvarı

Syphacia obvelata'nın taksonomik hiyerarşisi (Gargominy, 2020):

Alem : Animalia

Şube : Nematoda

Sınıf : Chromadorea

Takım : Rhabditida Chitwood, 1933

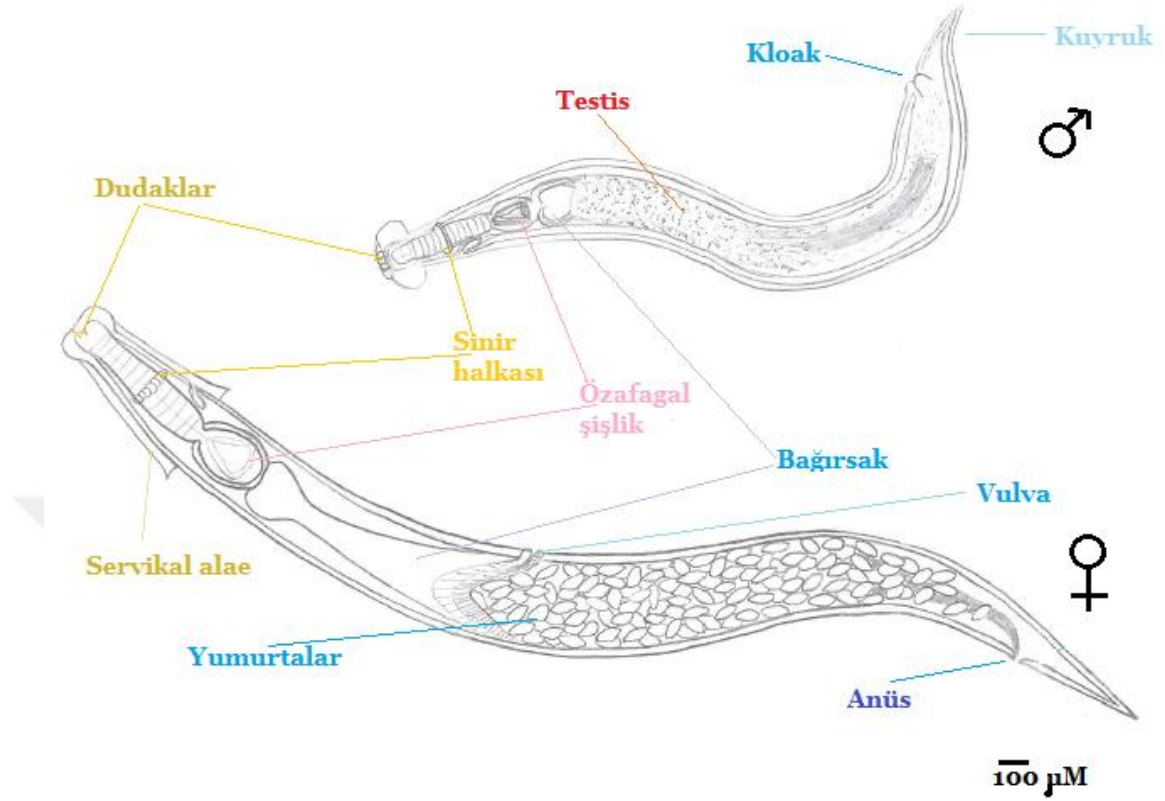
Aile : Oxyuridae

Cins : *Syphacia* Seurat, 1916

Tür : *Syphacia obvelata* (Rudolphi 1802)

Bu tür, zoonoz karakterdedir. *S. obvelata* ile insan enfeksiyonuna ilişkin ilk rapor 1919'da Riley'in (1919) Filipinler, Zamboanga'dan bir çocukta parazitin yumurtalarını ve iki olgun dişisini tanımlamasıyla ortaya çıkmıştır. Aynı yıl, Amerika Birleşik Devletleri'nde Teksas, Oklahoma, New Mexico ve Arizona'da muayene edilen 140 000 asker arasında 429 vakada oksyurid yumurta bildirilmiştir (Kofoid ve White, 1919). 2009 yılında enfeksiyon taraması yapılan 200 hastanın 25'inde (%12,5) açıklanamayan karın ağrısı ve eozinofili tespit edilmiş ve bunların *Syphacia* spp. enfeksiyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Mahmoud ve diğerleri, 2009). Ayrıca M.Ö. 700-300 yıllarına tarihlenen Nubia'dan mumyalanmış insan bedenlerinde *S. obvelata* yumurtalarının bulunduğu dair kayıtlar bulunmaktadır (Harter, 2003).

Aspicularis tetraptera laboratuvar farelerinde en sık rastlanan bir diğer kılkurdu türüdür. *A. tetraptera*'da oval özafagal şişkinlik, daha küçük dudaklar ve daha kalın servikal alae bulunur. *A. tetraptera*'nın yaşam döngüsü kısa ve direkt olup *S. obvelata*'ninkinden daha uzundur. Her bir dişi günlük 17 yumurta yumurtlar. Toplam yaşam süresi 45-50 gündür. Dişiler 3-4 mm boyunda ve 250 µm genişlikte, erkekler, 2-4 mm uzunlukta ve 160 µm genişliktedir. Şekil 2.49'da *A. tetraptera* dişi ve erkek bireyleri şematize edilmiştir.



Şekil 2.49. *A. tetraptera* dişi birey solda ve erkek birey sağda şematize edilmiş (Orijinal)

Aspiculuris tetraptera'nın taksonomik hiyerarşisi (Liljeblad, 2021):

Alem : Animalia

Şube : Nematoda

Sınıf : Chromadorea

Takım : Rhabditida

Aile : Oxyuridae

Cins : *Aspiculuris* Schulz, 1927

Tür : *Aspiculuris tetraptera* (Nitzsch, 1821)

Sinonim *Aspicularis tetraptera*

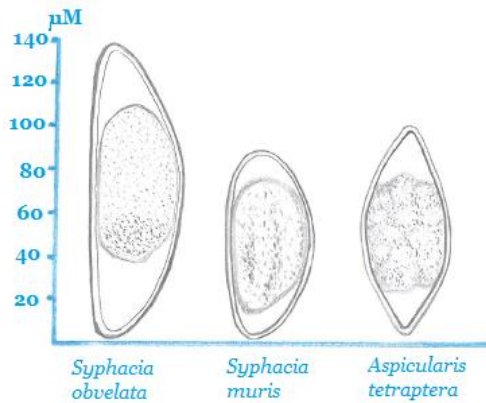
S. obvelata ile *A. tetraptera*'nın morfolojik ayırımında faydalanılan özellikleri Çizelge 2.6'da verilmiştir (Pritchett, 2007).

Çizelge 2.6. *S. obvelata* ve *A. tetraptera*'nın karşılaştırılması

	<i>S. obvelata</i>	<i>A. tetraptera</i>
Servikal alae	Gelişmemiş	Gelişmiş
Dişi kuyruğunun biçimi	Uzun ve ince	Konik
Vulvanın lokasyonu	Vücudun anteriorunda	Vücudun ortasında
Erkekte mameleonlar	Mevcut	Mevcut değil
Spikül	Mevcut	Mevcut değil
Yumurta büyüklüğü	134 x 36 µM, bir yanı düz	86 x 37 µM, ovoid, simetrik

Syphacia muris laboratuvar farelerini daha nadir enfekte eden bir diğer önemli kılkurdudur. Bu türün *S. obvelata*'dan ayırt edilmesi biraz zor olsa da vulvanın konumu ve erişkin helmintin boyu morfolojik olarak ayırt edilmesine yardım edebilir. Vulvanın konumu posteriora biraz daha yakındır. *S. muris* erişkini *S. obvelata*'dan biraz daha küçüktür ve yumurtaları da hem daha küçük hem de daha simetriktir, yumurta boyutu yaklaşık 75 x 29 µm civarındadır. Hem *S. obvelata* hem de *S. muris* ile aynı anda enfeksiyona çok nadiren rastlanır (Pritchett, 2007).

Teşhiste altın standart nekropside kolon ve çekumda bulunan muhtevanın erişkin helmintler açısından incelenmesidir. *A. tetraptera* yumurtaları gaitada, *S. obvelata* ve *S. muris* yumurtaları ise perianal deride kolonize olurlar. Teşhiste PCR kullanılabilir. *A. tetraptera* ve *S. obvelata* için 16S ribozomal DNA gen bölgesini içeren PCR analizleri kullanılmaktadır (Hedrich, 2012). Şekil 2.50'de *A. tetraptera*, *S. obvelata* ve *S. muris*'e ait yumurtalar boyut ve biçimlerinin kıyaslanması amacıyla gösterilmektedir.



Şekil 2.50. Oksyurid yumurtaları. Solda *S. obvelata*, ortada *S. muris* ve sağda *A. tetraptera*'ya ait yumurtaların şematize edilmiş çizimi (Orijinal)

Trichuris muris laboratuvar farelerini nadiren de olsa enfekte edebilen bir kamçılı nematoddur. *T. muris* enfeksiyonu yabani farelerde oldukça yaygın olsa da konak-parazit ilişkisinin çalışılmasında model olarak kullanılması amacıyla laboratuvar farelerinin deneysel olarak enfekte edildiği çalışmalar dışında doğal enfekte farelerde neredeyse hiç bulunmaz. Yumurtalar dışıdan çıktıktan sonra 30 gün boyunca enfekte hale geçemeyeceği için hijyenik laboratuvarlarda bu türe rastlanmamaktadır (Fahmy, 1954). Erişkin bir *T. muris*'in boyu yaklaşık 16-25 mm kadardır ve erişkinler bağırsağın sekum kısmında bulunur (Pritchett, 2007).

2.12. Farelerin Taşıyabileceği Parazit Türleri

Dünya genelinde yapılmış çalışmalara göre *Mus musculus* türü ev fareleri çok çeşitli parazit türleri ile enfekte olabilmektedir. Bu türlerin bilinmesi hem doğadan toplanan fareler ile çalışacak araştırmacıların sağlığı hem de yeterli hijyenin sağlanamadığı koşullarda bakılan laboratuvar farelerinde karşılaşılabilecek bazı türlerin neler olabileceğinin tahmin edilebilmesi açısından fayda sağlayacaktır. *Mus musculus* türü fareleri doğal olarak enfekte edebilen helmint, protozoan ve ektoparazit türleri ile laboratuvar da yapay olarak enfekte edilebildikleri helmint türlerinin bir listesi Çizelge 2.7'de verilmiştir.

Çizelge 2.7. *Mus musculus* türü farelerde bulunabilecek parazit türleri

Helmintin türü	Bulunduğu organ	Bulunduğu ülke	Referans
Acanthocephala			
<i>Moniliformis moniliformis</i>	İnce bağırsak, küçük bağırsak	İran, Kanarya adaları	Zarei ve diğerleri, 2016, Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Prosthorrhynchus cylindraceus</i> (larva)	Peritoneal kavite	Kanarya adaları	Feliu ve diğerleri, 2012
Trematoda			
Digenea			

Çizelge 2.7. *Mus musculus* türü farelerde bulunabilecek parazit türleri (devam)

<i>Brachylaima</i> spp.	İntestin	Sicilya	Milazzo ve diğerleri, 2003
<i>Corrigia</i> spp.		Corsica	Jimenez Piqueras, 1992
<i>Fasciola hepatica</i>		Corsica	Jimenez Piqueras, 1992
<i>Mesostephanus aegypticus</i>		Mısır	Elshazly ve diğerleri, 2008
<i>Prosthodendrium ascidia</i>		Mısır	Elshazly ve diğerleri, 2008
<i>Stictodora tridactyla</i>		Mısır	Elshazly ve diğerleri, 2008
<i>Zoonorchis</i> sp.		Corsica	Jimenez Piqueras, 1992
Cestoda			
<i>Catenotaenia pusilla</i>	İntestin	Sicilya, Corsica	Milazzo ve diğerleri, 2003; Jimenez Piqueras, 1992
<i>Cysticercus fasciolaris</i>	Karaciğer	İran, Portekiz	Zarei ve diğerleri, 2016; Sumangali, Rajapakse ve Rajakaruna, 2011
<i>Hymenolepis diminuta</i>	İntestin	Sicilya, Nijerya, Kanarya adaları, Uttarakhand	Milazzo ve diğerleri, 2003; Isaac, Igbinosa, Ohiole ve Osimen, 2018; Feliu ve diğerleri, 2012; Sharma, Joshi, Vatsya ve Yadav, 2013
<i>Hymenolepis nana</i>	İnce bağırsak	İran, Nijerya, Mısır, Brezilya	Zarei ve diğerleri, 2016; Isaac ve diğerleri, 2018; Elshazly ve diğerleri, 2008; Guimarães ve diğerleri, 2014
<i>Hymenolepis</i> sp.	İntestin	Formentera	Mas-Coma ve diğerleri, 1998
<i>Mesocostoides</i> sp.	Peritonal boşluk	Formentera, Kanarya Adaları	Mas-Coma ve diğerleri, 1998; Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Paranoplocephala</i> sp.	İnce bağırsak	İran	Zarei ve diğerleri, 2016
<i>Rodentolepis fraterna</i>	Küçük bağırsak	Kanarya adaları	Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Rodentolepis microstoma</i>	İntestin	Sicilya, Kanarya Adaları	Milazzo ve diğerleri, 2003; Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Rodentolepis stramina</i>	Karaciğer	Corsica, Kanarya Adaları	Jimenez Piqueras 1992; Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Taenia taeniaformis</i>	Karaciğer	Kanarya adaları, Mısır	Feliu ve diğerleri, 2012; Elshazly ve diğerleri, 2008

Çizelge 2.7. *Mus musculus* türü farelerde bulunabilecek parazit türleri (devam)

Nematoda			
<i>Angiostrongylus</i> sp.		Nijerya, İran	Isaac ve diğerleri, 2018; Gholipoury, Rezai, Namroodi ve Arab Khazaeli, 2018
<i>Aonchotheca annulosa</i>		Sicilya	Milazzo ve diğerleri, 2003
<i>Aspicularis tetraptera</i>	Sekum	Sicilya, Filistin, Şili, Mısır, Brezilya	Milazzo ve diğerleri, 2003; Al-Hindi, Meqdad ve Kishta 2021; Landaeta-Aqueveque, Robles ve Cattán, 2007; Elshazly ve diğerleri, 2008; Guimarães ve diğerleri, 2014
<i>Capillaria hepatica</i> (<i>Calodium hepaticum</i>)	Karaciğer, Sekum, GI	Sicilya, İran, Portekiz, Kanarya adaları, Uttarakhand	Milazzo ve diğerleri, 2003; Zarei ve diğerleri, 2016; Valente ve diğerleri, 2014; Feliu ve diğerleri, 2012; Sharma ve diğerleri, 2013
<i>Eucolens bacillatus</i>		Sicilya, Mısır	Guimarães ve diğerleri, 2014
<i>Heligmonoides josephi</i>		Filistin	Al-Hindi ve diğerleri, 2021
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>		Corsica	Jimenez Piqueras 1992
<i>Heligmosomum</i> sp.	İnce bağırsak	İran, Kore	Zarei ve diğerleri, 2016; Seo, Rim, Yoon, Koo ve Hong, 1968
<i>Heterakis spumosa</i>	Sekum	Nijerya, Kanarya adaları	Isaac ve diğerleri, 2018; Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Gallegostrongylus ibicensis</i>		Eivissa	Mas-Coma ve diğerleri, 2000
<i>Gongylonema brevispiculum</i>		Kanarya Adaları	Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Gongylonema musculi</i>	Mide	Sicilya	Milazzo ve diğerleri, 2003
<i>Gongylonema neoplasticum</i>	Mide	Kanarya Adaları	Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Gongylonema</i> sp.		Formentera, Eivisia, Sicilya	Mas-Coma ve diğerleri, 1998; Mas-Coma ve diğerleri, 2000; Milazzo ve diğerleri, 2003

Çizelge 2.7. *Mus musculus* türü farelerde bulunabilecek parazit türleri (devam)

<i>Mastophorus muris</i>		Sicilya, Corsica, Nijerya, Kanarya Adaları	Milazzo ve diğerleri, 2003; Jimenez Piqueras 1992; Isaac ve diğerleri, 2018; Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>		Nijerya	Isaac ve diğerleri, 2018
<i>Nippostrongylus muris</i>	İntestin	Kore	Seo ve diğerleri, 1968
<i>Physaloptera calnuensi</i>	GI	Şili	Landaeta-Aqueveque ve diğerleri, 2007
<i>Physaloptera getula</i>		Formentera, Sicilya	Mas-Coma ve diğerleri, 1998; Milazzo ve diğerleri, 2003
<i>Protopirura marsupialis</i>		Mısır	Elshazly ve diğerleri, 2008
<i>Protopirura muris</i>		Mısır	Elshazly ve diğerleri, 2008
<i>Protopirura</i> sp.	Mide	Kanarya adaları	Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Rictularia</i> sp.	Mide	Kanarya adaları	Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Specularis</i>		İran	Rahdar ve diğerleri, 2017
<i>Spiruridae</i> gen sp.	Mide	İran	Zarei ve diğerleri, 2016
<i>Streptopharagus greenbergi</i>	Mide	Kanarya adaları	Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Streptopharagus kuntzi</i>	İnce bağırsak	İran	Zarei ve diğerleri, 2016
<i>Strongyloides ratti</i>		Mısır	Elshazly ve diğerleri, 2008
<i>Strongyloides</i> sp.	GI	Nijerya, Uttarakhand	Isaac ve diğerleri, 2018; Sharma ve diğerleri, 2013
<i>Syphacia frederici</i>	Kalın bağırsak	İran	Zarei ve diğerleri, 2016
<i>Syphacia muscoli</i>	İntestin	İran	Usafi, Eslami ve Mobedi, 2012
<i>Syphacia muris</i>	Sekum	Kanarya adaları, Uttarakhand	Feliu ve diğerleri, 2012; Sharma ve diğerleri, 2013

Çizelge 2.7. *Mus musculus* türü farelerde bulunabilecek parazit türleri (devam)

<i>S. obvelata</i>	Sekum	Formentera, Eivisia, Corsica, Sicilya, Kanarya adaları, Filistin, Kore, Şili, İran, Brezilya, Mısır	Mas-Coma ve diğerleri, 1998; Mas-Coma ve diğerleri, 2000; Jimenez Piqueras 1992; Milazzo ve diğerleri, 2003; Feliu ve diğerleri, 2012; Al-Hindi ve diğerleri, 2021; Seo ve diğerleri, 1968; Landaeta-Aqueveque ve diğerleri, 2007; Rahdar, Sadat Roointan, Vazirianzadeh ve Alborzi, 2017; Guimarães ve diğerleri, 2014; Elshazly ve diğerleri, 2008
<i>Syphacia ratti</i>		İran	Rahdar ve diğerleri, 2017
<i>Trichosomoides crassicauda</i>	Safra kesesi	Kanarya adaları	Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Trichosomoides</i> sp.		Nijerya	Isaac ve diğerleri, 2018
<i>Trichuris muris</i>	Sekum	Sicilya, Formentera, Corsica, Kanarya adaları, Filistin, Uttarakhand, Mısır	Milazzo ve diğerleri, 2003; Mas-Coma ve diğerleri, 1998; Jimenez Piqueras 1992; Feliu ve diğerleri, 2012; Al-Hindi ve diğerleri, 2021; Sharma ve diğerleri, 2013; Elshazly ve diğerleri, 2008
<i>Trichuris rombomidis</i>	Kalın bağırsak	İran	Zarei ve diğerleri, 2016
<i>Trichuris</i> sp.	Kalın bağırsak	İran, Nijerya	Zarei ve diğerleri, 2016; Isaac ve diğerleri, 2018
Laboratuvarıda enfekte etmesi sağlanan helmint türleri			
<i>Heligmosomoides bakeri</i>			Clark, Ward, Lang, Saghbini ve Kristan, 2013
<i>Nematospiroides dubius</i>			Behnke ve Robinson 1985
<i>Schistosoma mansoni</i>			Simões ve diğerleri, 2015
<i>Strongyloides venezuelensis</i>			Marra, Amarante ve Amarante, 2007
<i>Trichinella spiralis</i>			Wakelin ve Donachie, 1980

Çizelge 2.7. *Mus musculus* türü farelerde bulunabilecek parazit türleri (devam)

Protozoa	Bulunduğu organ	Bulunduğu ülke	Referans
<i>Babesia</i> sp.		Nijerya, Brezilya	Isaac ve diğerleri, 2018; Guimarães ve diğerleri, 2014
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Bağırsak	Kanarya adaları	Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Eimeria</i> sp.	Bağırsak	Nijerya, Kanarya adaları	Isaac ve diğerleri, 2018; Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Giardia muris</i>	Bağırsak	Kanarya adaları	Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Isospora</i> sp.		Nijerya	Isaac ve diğerleri, 2018
<i>Plasmodium</i> sp.	Kan	Nijerya	Isaac ve diğerleri, 2018
<i>Toxoplasma gondii</i>		Nijerya	Isaac ve diğerleri, 2018
<i>Trypanosoma lewis</i>		Nijerya	Isaac ve diğerleri, 2018
<i>Trypanosoma musculi</i>	Kan	Finlandiya	Laakkonen ve diğerleri, 2007
Ektoparazitler			
<i>Ctenophthalmus agrytes agrytes</i>		Finlandiya	Laakkonen ve diğerleri, 2007
<i>Echidnophaga murina</i>	Kürk	Kanarya adaları	Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Lealaps nuttalli</i>		İran	Gholipoury ve diğerleri, 2018
<i>Leptosylla segnis</i>	Kürk	Kanarya adaları	Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Liponyssoides sanguineus</i>	Kürk	Kuzey Karolina, ABD	Reeves ve Cobb 2005
<i>Myobia musculi</i>	Kürk	Kuzey Karolina, ABD	Reeves ve Cobb 2005
<i>Myocoptes musculinus</i>	Kürk	Kuzey Karolina, ABD	Reeves ve Cobb 2005
<i>Nosopsyllus barbarus</i>	Kürk	Kanarya adaları	Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Nosopsyllus fasciatus</i>		Finlandiya, İran	Laakkonen ve diğerleri, 2007; Gholipoury ve diğerleri, 2018
<i>Radfordia affinis</i>	Kürk	Kuzey Karolina, ABD	Reeves ve Cobb 2005
<i>Ornithonyssus bacoti</i>	Kürk	Kuzey Karolina, ABD	Reeves ve Cobb 2005
<i>Peromyscopsylla silvatica</i>		Finlandiya	Laakkonen ve diğerleri, 2007
<i>Polyplax serrate</i>	Kürk	Kuzey Karolina, ABD	Reeves ve Cobb 2005
<i>Rhipicephalus</i> spp.		İran	Gholipoury ve diğerleri, 2018

Çizelge 2.7. *Mus musculus* türü farelerde bulunabilecek parazit türleri (devam)

<i>Stenoponia tripectinata tripectinata</i>	Kürk	Kanarya adaları	Feliu ve diğerleri, 2012
<i>Xenopsylla cheopis</i>	Kürk	Kanarya adaları	Feliu ve diğerleri, 2012

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Moleküler Kenetleme Deneyi

3.1.1. Deneysel prosedür

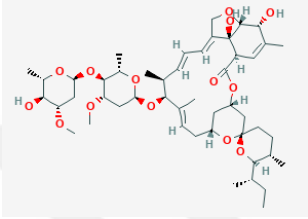
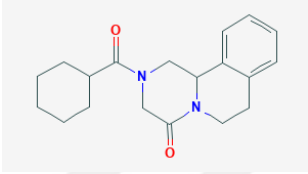
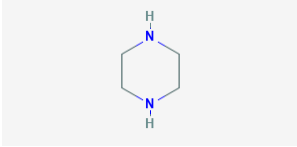
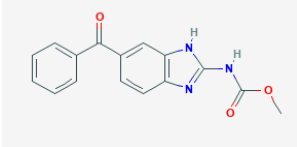
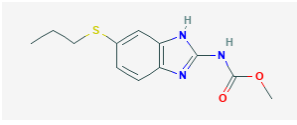
Bitkisel ligandların hedef proteinler içindeki yerleşimleri anahtar-kilit uyum modeline göre incelenirken, AutoDock 4.2 (Morris ve diğerleri, 1998) ve ADT (Huey, Morris, Olson ve Goodsell, 2007; Morris ve diğerleri, 2009) ile kenetleme simülasyonu gerçekleştirilmiştir. Proteinin bağlanma bölgesindeki ligandların olası kimyasal etkileşimleri Discovery Studio 2020 Client (Dassault Systèmes Biovia Inc., 2020) ile görselleştirilmiştir. Intel core işlemci 2GB RAM ile Asus laptop bilgisayarda kenetleme simülasyonunun gerçekleştirilmesi için Linux işletim sistemi kullanılmıştır.

3.1.2. Ligandların hazırlanması

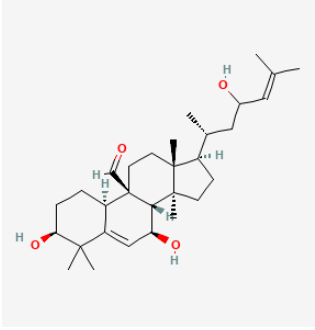
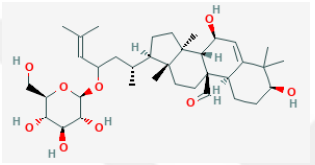
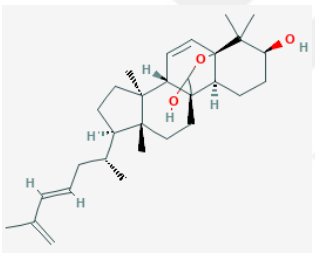
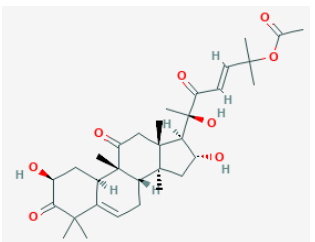
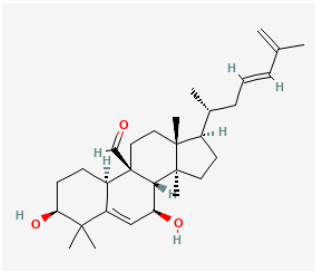
A. annua için artemisinin, arteannuin B, artemisinik asit, deoksiartemisinin, artemetin, krisosplenetin, dihidroksiartemisinik asit, krisosplenol D, kamfen, kamfor, 1,8-sineol (ökaliptol), spatulenol, friedelin, stigmasterol, sabinen ve kumarinlerden skoparon, skopoletin, 6,8-dimethoksi-7- hidroksi kumarin (izofraksidin) ve 5,6-dimetoksi-7- hidroksi kumarin (umckalin), *O. vulgare* subsp. *hirtum* için karvakrol, timol, p-simen, γ -terpinen, linalool, α -pinen, α -tujen, mirsen, α -terpinen, β -karyofilen, borneol, terpinen-4-ol, apigenin, luteolin, eriodiktyol, eriositrin, krisoeriol, diosmetin, kuersetin; *M. charantia* için: momordisin I, momordisin II, karavilagenin-D, kuguacin-J, karantadiol-A, kukurbitasin B, *R. canescens* için: gallik asit, ellajik asit, diizooktil fitalat, hekzadekanoik asit metil ester, 9,12,15-oktadekantrienoik asit metil ester ve 2-furankarboksaldehid molekülleri kenetleme deneylerinde kullanılan bitkisel ligandlardır. Bu bileşenlerden bazıları mol2 formatında ZincDataBase (Sterling ve Irwin 2015), bazıları sdf formatında PubChem (Kim ve diğerleri, 2021) veritabanlarından alınarak Discovery Studio 2020 (Biovia Inc.) ile optimize edilmiş ve pdb olarak kaydedilmiştir. Mol2 formatındaki bitkisel ligandlar ADT (Huey ve diğerleri, 2007; Morris ve diğerleri, 2009) programı ile ve sdf formatındakiler Open Babel (O'Boyle ve

diğerleri, 2011) ile pdbqt formatına dönüştürülmüştür. Çizelge 3.1’de bu çalışmanın kenetleme deneylerinde kullanılan ligandların moleküler yapıları yanı sıra biyoygunluk ve kenetleme prosedürü açısından önemli özellikleri verilmiştir.

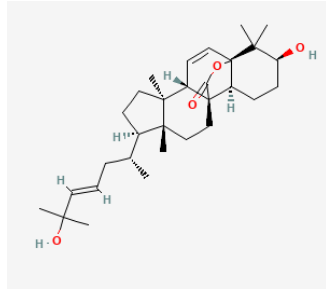
Çizelge 3.1. Bu çalışmada kullanılan ligandların moleküler yapıları ve bazı özellikleri

Molekül yapısı	H bağı verici sayısı	H bağı alıcı sayısı	Döne bilen bağ sayısı	Moleküler ağırlık (gr/mol)	PubChem CID (referans)
 Ivermectin	3	14	8	875,1	6 321 424
 Praziquantel	0	2	1	312,4	4 891
 Piperazine	2	2	0	86,14	4 837
 Mebendazole	2	4	4	295,29	4 030
 Albendazole	2	4	5	265,33	2 082

Çizelge 3.1. Bu çalışmada kullanılan ligandların moleküler yapıları ve bazı özellikleri (devam)

<i>M. charantia</i> 'da bulunabilen moleküller					
	3	4	5	472,7	101 293 615
Momordisin 1					
	6	9	8	634,8	101 019 708
Momordisin II					
	2	3	4	454,68	102 004 718
Karantadiol-A					
	3	8	6	558,7	5 281 316
Kukurbitasin-B					
	2	3	5	454,7	25 243 357
Kuguasin J					

Çizelge 3.1. Bu çalışmada kullanılan ligandların moleküler yapıları ve bazı özellikleri (devam)



2

4

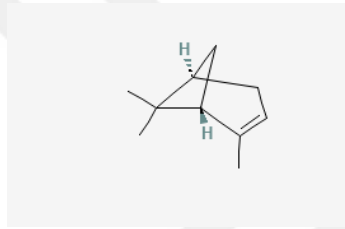
4

470,694

57 330 179

Karavilagenin D

O. vulgare subsp. *hirtum*'da bulunabilen moleküller



0

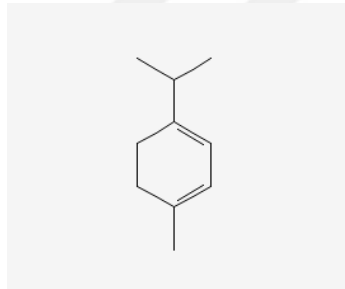
0

0

136,23

82 227

α -Pinen



0

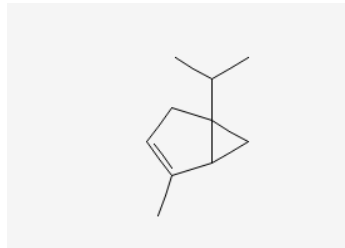
0

1

136,23

7 462

α -Terpinen



0

0

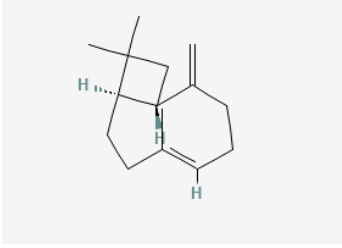
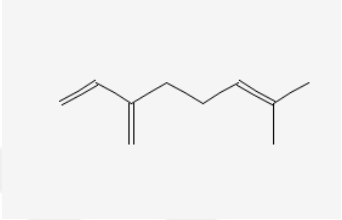
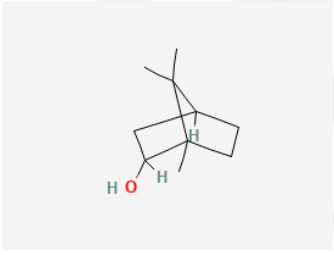
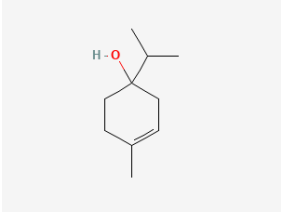
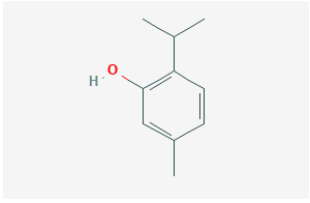
1

136,23

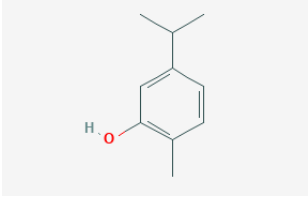
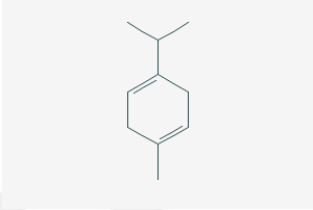
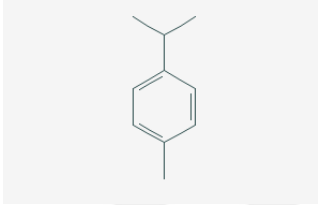
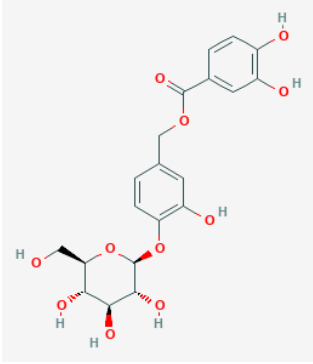
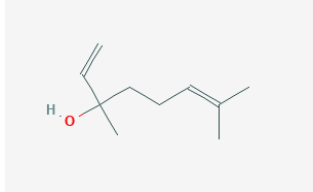
17 868

α -Tujen

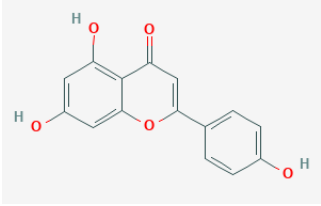
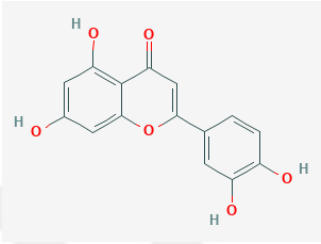
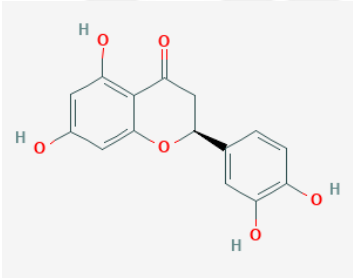
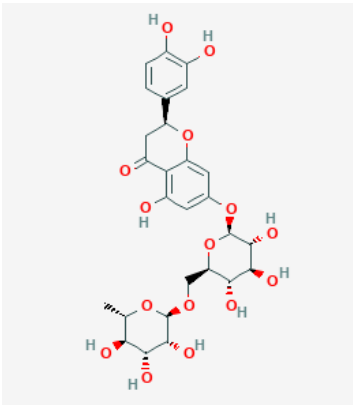
Çizelge 3.1. Bu çalışmada kullanılan ligandların moleküler yapıları ve bazı özellikleri (devam)

	0	0	0	204,35	5 281 515
β -Karyofilen					
	0	0	4	136,23	31 253
Mirsen					
	1	1	0	154,25	64 685
Borneol					
	1	1	1	154,25	11 230
Terpinen-4-ol					
	1	1	1	150,221	6 989
Timol					

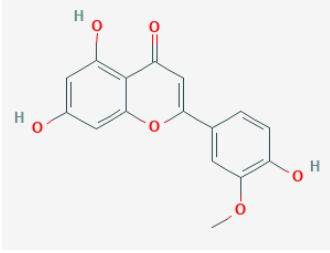
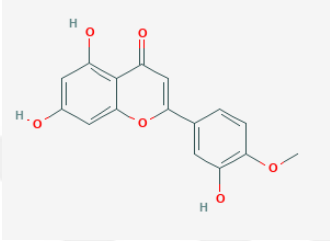
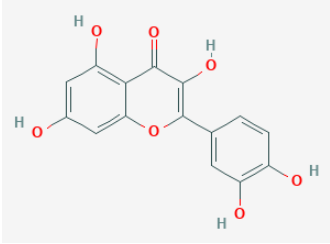
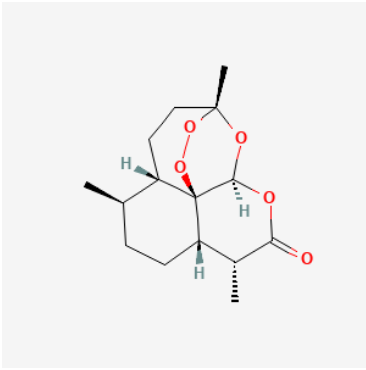
Çizelge 3.1. Bu çalışmada kullanılan ligandların moleküler yapıları ve bazı özellikleri (devam)

	1	1	1	150,221	10 364
Karvakrol					
	0	0	1	136,23	7 461
γ-terpinen					
	0	0	1	134,22	7 463
p-simen					
	7	11	7	438,4	5 320 735
Oreganol					
	1	1	4	154,25	6 549
Linalool					

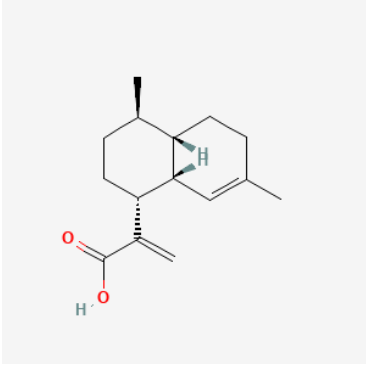
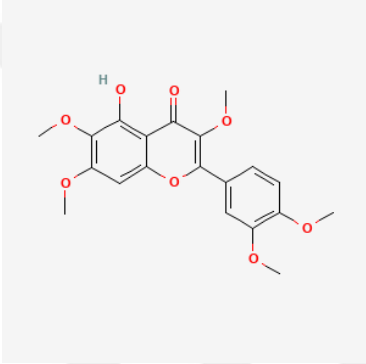
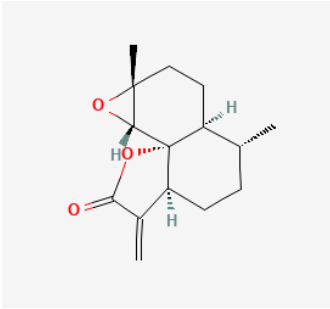
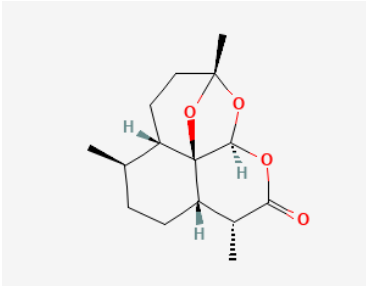
Çizelge 3.1. Bu çalışmada kullanılan ligandların moleküler yapıları ve bazı özellikleri (devam)

	3	5	1	270,24	5 280 443
Apigenin					
	4	6	1	286,24	5 280 445
Luteolin					
	4	6	1	288,25	440 735
Eriodiktýol					
	9	15	6	596,5	83 489
Eriositrin					

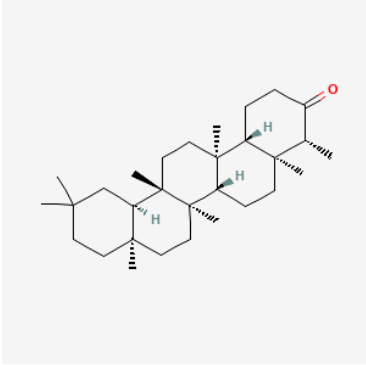
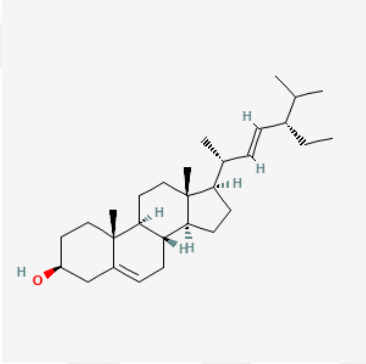
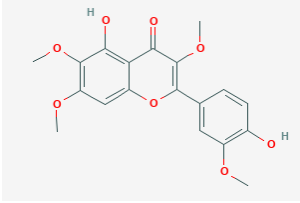
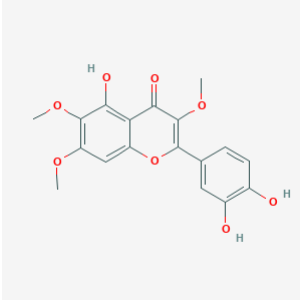
Çizelge 3.1. Bu çalışmada kullanılan ligandların moleküler yapıları ve bazı özellikleri (devam)

	3	6	2	300,26	5 280 666
Krioseriol					
	3	6	2	300,26	5 281 612
Diosmetin					
	5	7	1	302,238	5 280 343
Kuersetin					
<i>A. annua</i> 'da bulunabilen moleküller					
	0	5	0	282,33	68 827
Artemisinin					

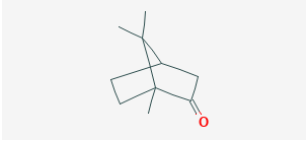
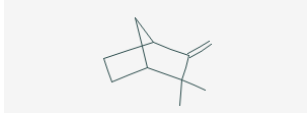
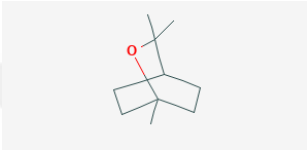
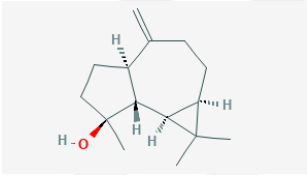
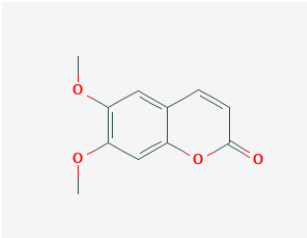
Çizelge 3.1. Bu çalışmada kullanılan ligandların moleküler yapıları ve bazı özellikleri (devam)

	0	2	2	233,33	10 922 465
Artemisinik asit					
	1	8	6	388,37	5 320 351
Artemetin					
	0	3	0	248,32	6 543 478
Arteannuin-B					
	0	4	0	266,337	12 814 879
Deoksiartemisinin					

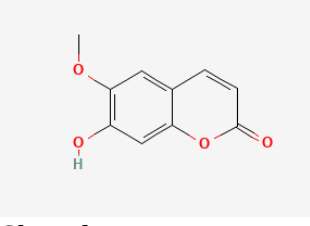
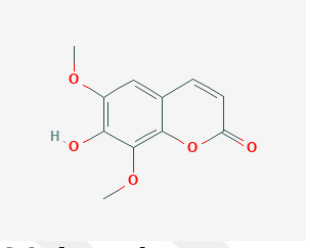
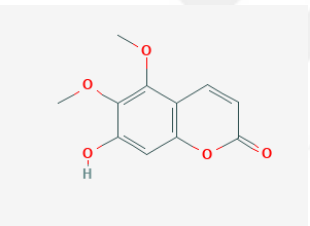
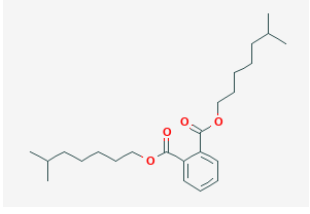
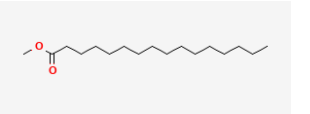
Çizelge 3.1. Bu çalışmada kullanılan ligandların moleküler yapıları ve bazı özellikleri (devam)

	0	1	0	426,729	91 472
Friedelin					
	1	1	5	412,702	5 280 794
Stigmasterol					
	2	8	5	374,3	5 281 608
Krisosplenetin					
	3	8	4	360,3	5 280 699
Krisosplenol D					

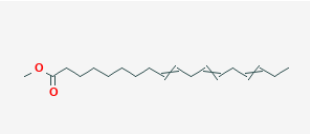
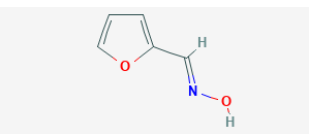
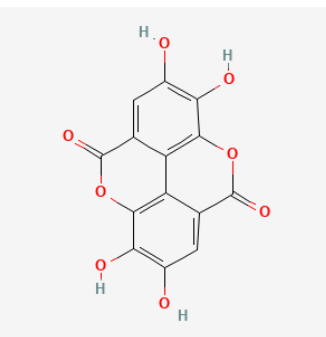
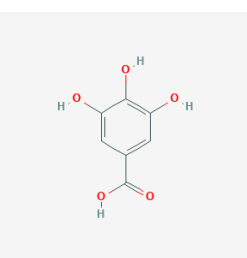
Çizelge 3.1. Bu çalışmada kullanılan ligandların moleküler yapıları ve bazı özellikleri (devam)

	0	1	0	152,23	2 537
Kamfor					
	0	0	0	136,23	6 616
Kamfen					
	0	1	0	154,25	2 758
1,8-sineol (Ökalyptol)					
	1	1	0	220,35	92 231
Spatulenol					
	0	0	1	136,23	18 818
Sabinen					
	0	4	2	206,19	8 417
Skoparon					

Çizelge 3.1. Bu çalışmada kullanılan ligandların moleküler yapıları ve bazı özellikleri (devam)

	1	4	1	192,17	5 280 460
Skopoletin					
	1	5	2	222,2	5 318 565
6,8-dimetoksi-7-hidroksikumarin (Izofraksidin)					
	1	5	2	222,2	5 316 862
5,6-dimetoksi-7-hidroksikumarin (Umckalin)					
<i>R. canescens</i> 'de bulunabilen moleküller					
	0	4	16	390,6	33 934
Diizooktil fitalat					
	0	2	15	270,5	8 181
Hekzadekanoik asit metil ester (metil palmitat)					

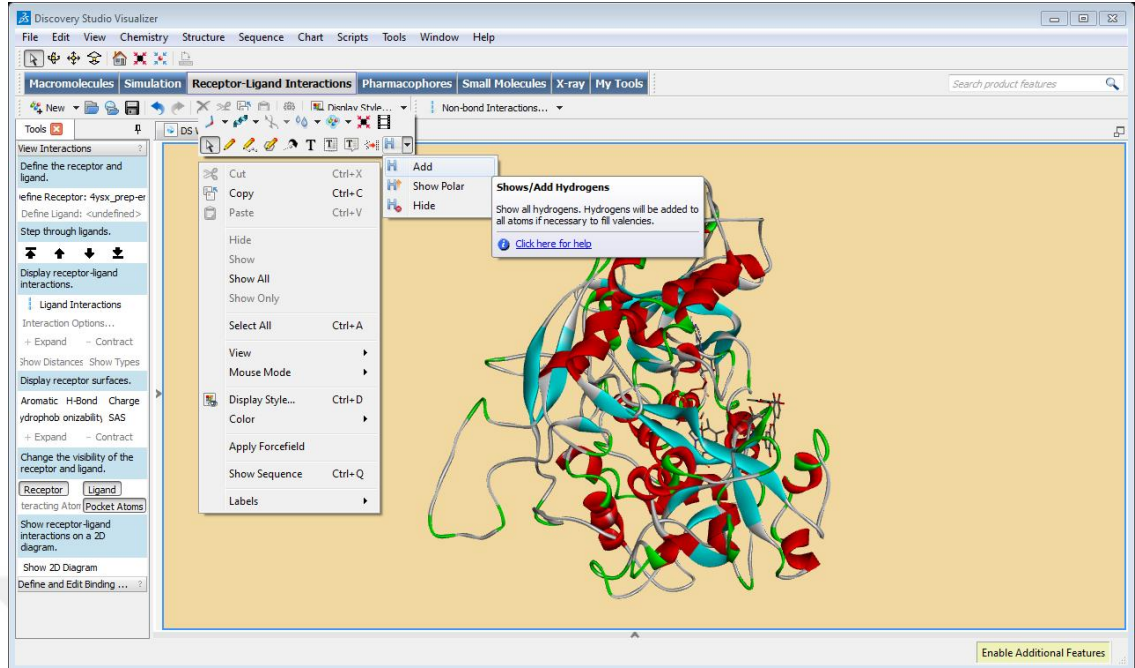
Çizelge 3.1. Bu çalışmada kullanılan ligandların moleküler yapıları ve bazı özellikleri (devam)

	0	2	14	292,5	9 316
9,12,15-oktadekantrienoik asit metil ester					
	1	3	1	111,1	6 871 288
2-furan karboksaldehit					
	4	8	0	302,19	5 281 855
Ellajik Asit					
	0	1	1	170,12	370
Gallik asit					

3.1.3. Proteinlerin hazırlanması

Nematodlarda ilaç hedefi olan protein ve enzimler araştırılmıştır. Proteinlerin hazırlanması için Biovia Discovery Studio 2020 ve Autodock 4.2 yazılımları kullanılmıştır. Bu amaçla, hedef protein ve enzimlerin nematodlarda bulunanları ve insanlardaki homologları kristalize yapıları ile Brookhaven Protein Databank'tan (<http://www.rcsb.org/pdb>) elde edilmiştir. Bu proteinler şunlardır: *Ascaris suum* fumarat redüktaz enzimi PDB ID: 4YSX (mitokondriyal rodokinol-fumarat redüktaz,

çözünürlük: 2,25 Å, NN23 inhibitörü ile bağlı halde) (Inaoka ve diğerleri, 2015), insan furmarat redüktaz enzimi PDB ID: 6VAX (çözünürlük: 2,59 Å) (Sharma, Maklashina, Cecchini ve Iverson, 2020); insan β -tubulin proteini PDB ID: 6E7C (çözünürlük: 3,65 Å) (Ti, Alushin ve Kapoor, 2018); *Haemonchus contortus* β -tubulin proteini PDB ID: 1OJ0 (ABZ ile kompleks halinde, teorik yapı) (Robinson, McFerran, Trudgett, Houy ve Fairweather, 2004); literatürde önemli bir “chokepoint enzyme” olarak görülen antihelmintik ilaç hedefi rat karnitin o-palmitoiltransferaz PDB ID: 2H4T (çözünürlük: 1,90 Å) (Hsiao, Jogl, Esser ve Tong, 2006) ve PDB ID: 2FW3 (çözünürlük: 2,50 Å) (Rufer ve diğerleri, 2006); direnç gelişimi durumunu araştırmak üzere seçilen *C. elegans*’a ait tubulin proteini PDB ID: 6E88 (çözünürlük: 4.80 Å) (Chaaban ve diğerleri, 2018). ADME sonuçları en iyi bulunan ligandların üçüncü kenetlemesinde kullanılmak üzere fare β -tubulin proteini EPB ile kompleks halde PDB ID: 7DAE (çözünürlük: 2.39 Å) (Xiao ve diğerleri, 2021) kenetleme simülasyonlarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Bazı hedef proteinlerin belirlenmesinde Taylor ve diğerleri (2013) referans alınmıştır. *Haemonchus contortus*’a ait β -tubulinin kristalize formu protein veri tabanlarında bulunmadığı için teorik yapısı kullanılmıştır. Kofaktör dışında kalan iyon ve ligandlar ile su molekülleri çıkarılmıştır. Eksik hidrojen atomları eklenmiştir (Şekil. 3.1). Proteine ait rezidülerdeki eksik atom ve bağların tamamlanması için manuel olarak kontrol edilmiştir. Tüm hidrojenler eklendikten sonra ilk önce “Clean Geometry” aracı ile sonrasında ise Charmforcefield ile optimize edilmiştir. Optimize edilen proteinler Discovery Studio 2020 Client ile pdb formatında kaydedildikten sonra ADT ile açılarak Gasteiger yükler eklenmiş ve sonrasında pdbqt formatında kaydedilmiştir.



Şekil 3.1. Discovery Studio ile hidrojenleri eklerken (arka plan rengi normalde siyah olmasına rağmen bu görüntü alınmadan önce yavruağzına dönüştürülmüştür)

3.2. Homoloji Modelleme ve Hedef-Kalıp Sekansların Hizalanması

UniProt Knowledgebase (UniProtKB)'den *S. obvelata* için bilinen protein dizileri araştırılmıştır. Bilinen bir antihelmintik ilaç hedefi olmamakla beraber oksyurid nematodlarda hayati önemi olduğu için Mt genomdan üretilen Sitokrom C Oksidaz 1 (COX1) ve COX2 proteinleri seçilmiştir. *S. obvelata* genom sekansı ve SoCOX1, SoCOX2 proteinlerinin deneysel kristal yapısı bilinmediği için 3D yapısı modellenmiştir. Başka bir oksyurid nematod olan *Enterobius vermicularis* β -tubulin proteini ve *C. elegans* GLUT1 (Glukoz transporter) reseptörü de homoloji modelleme ile modellenmiştir. SWISS-MODEL (Waterhouse ve diğerleri, 2018) ve Zhang Lab I-TASSER web sunucuları (Roy, Kucukural ve Zhang, 2010; Yang, Yan, Roy, Xu, Poisson ve Zhang, 2015; Yang ve Zhang, 2015) sekansların örtüşmesini temel olarak bir model geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır. En uygun 3D yapı Global Model Quality Estimating (GMQE) ve Qualitative Model Energy Analysis (QMEAN) değerleri göz önüne alınarak seçilmiştir. QMEAN için 4.0 altındaki değerler güvenilirliği gösterirken, GMQE için 0-1 arasında en yüksek değer en güvenilir tahmini yapıyı göstermektedir. Hedef-kalıp sekansların benzerlik oranı Discovery Studio ile gösterilmiştir. RMSD

(Root mean square deviation) hesabı model ve kalıptaki karbonlar arasındaki pozisyonların farklılığına göre yapılmıştır. Tahmin edilen 3D yapıların kimyasal örtüşmeleri Ramachandran grafiği ile gösterilmiştir.

RMSD hesaplanmasında kullanılan formül Denklem 3.1’de verilmiştir (Kabsch, 1978).

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n d_i^2}{N}} \quad (3.1)$$

Formüldeki d_i iki atom arasındaki uzaklığı, N ise atom sayısını temsil etmektedir.

3.3. Proteinlerin karşılaştırılması

Hedef proteinin insan ve farelerde bulunan iki formunun sekansları Discovery Studio kullanılarak pairwise alignment ile karşılaştırılmıştır. En iyi sonucu veren ligandlar ile her iki proteinin docking deneyleri yapılmıştır. Sonuçta en yüksek skoru veren ligandların dlg dosyaları içindeki yerleşim koordinatları Discovery Studio ile görselleştirilerek bağlanma bölgelerindeki farklılıklar incelenmiştir.

3.4. Moleküler Kenetleme (Docking) Deneyi

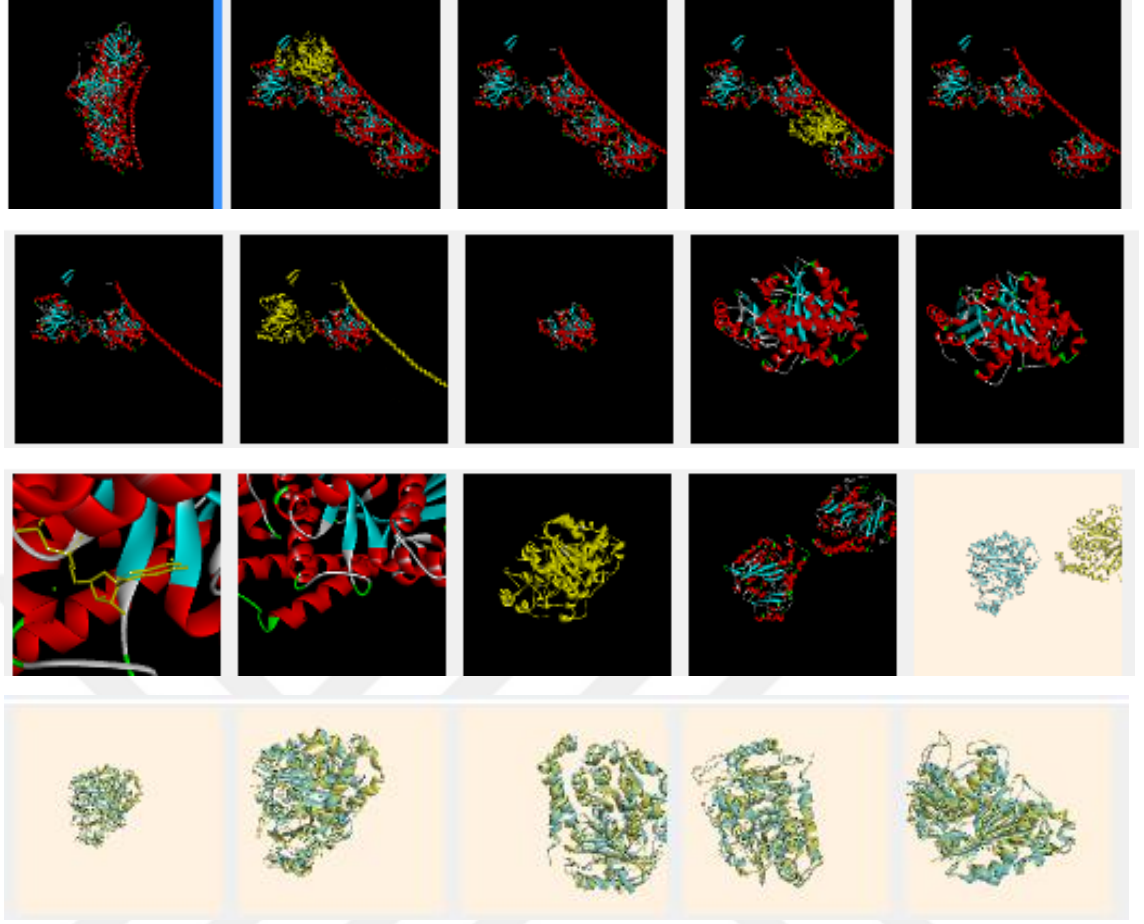
Bu çalışmada farklı aşamalarda farklı amaçlarla kenetleme (docking) deneyi yapılması planlanmıştır.

1. **Aşama-Proteinlerin hazırlanması:** Kristalize proteinlerin PDB’den alındıktan sonra hazırlanması sırasında Re-docking prosedürü uygulanmıştır. Bunun için doğal ligandı ile bağlı haldeki proteinin ligandı ve suları silinip hazırlandıktan sonra doğal ligandı ile kenetlenmiştir, RMSD hesabı sonucu uygun değere ulaşıncaya kadar parametreler değiştirilerek re-docking işlemi tekrarlanmıştır.
2. **Aşama-Hedef Proteinler ile bitkisel ligandların dockingi:** Bitkilerde bulunduğu bilimsel olarak gösterilmiş olan bazı bileşenler birinci aşamayı geçebilmiş ilaç hedefi proteinler ile kenetlenmiştir. Karşılaştırma yapılması amacıyla aynı hedef proteinler piyasada kullanılan ilaç molekülleri olan

antinematodal Albendazole, Mebendazole, Ivermectin, Piperazine ve anticestodal Praziquantel ile de kenetleme simülasyonuna tabi tutulmuştur. Praziquantelin de kullanılma nedeni aynı zamanda antitrematodal oluşudur. Böylece bu ilaç *in silico* yöntemle antinematodal açıdan da araştırılmıştır.

3. **Aşama-Homoloji modelleme ile tahmin edilen proteinler ile en yüksek skora sahip ligandların dockingi:** İlk üç aşama sonunda en iyi sonuçlara sahip moleküller seçilerek bilinen ilaç hedefi proteinler dışında kalan, 3 boyutlu yapısı bilinmediği için homoloji modelleme ile tahmin edilen ve bağlanma potansiyeli yüksek olan protein yapılarıyla kenetlenmiştir.
4. **Aşama-ADMET sonucu en ideal ilaç adayının farelerde, insanlarda ve nematodlarda bulunan ilaç hedefi olabilecek homolog proteinler ile dockingi:** *In silico* ADMET araştırması sonucunda en uygun sonuçlara sahip ligand, seçiciliğinin ikinci kez sınanması amacıyla üç farklı organizmadaki homolog proteinler ile kenetlenmiştir. Böylece organizmaya özgülük konusunda karşılaştırma yapılmıştır.

Fare tubulini (PDB kodu: 7DAE) kompleks bir yapıdır ve farklı alt birimlerden oluşmaktadır. Bu çalışmada pdb dosyasındaki B zinciri alınmış, diğer tüm ligandlar, iyon ve proteinler silinmiştir. Superimpose işlemi öncesi hazırlıkların resimleri Şekil 3.2’de görülmektedir. İlk on resimde sarı ile işaretlenen tüm yapılar sırayla silinmiştir. Şekil büyütülerek dokuzuncu resimde gösterildiği gibi kalan iyonlardan Mg^{++} ve Ca^{++} da bulunmuş ve silinmiştir. On üçüncü resimde yalnız kalan B zinciri optimizasyon için seçilmiştir. Protein optimize edildikten sonra on dördüncü resimde görüldüğü gibi Hcβ-tubulin ithal edilmiş, proteinlerin kolayca ayırt edilebilmesi için proteinlerin ve arka planın rengi değiştirilmiştir. Superimpose sonucu on altıncı resimdeki 3D yapı elde edilmiş ve şekil yakınlştırılıp proteinler döndürülerek farklılıklar incelenmiştir.

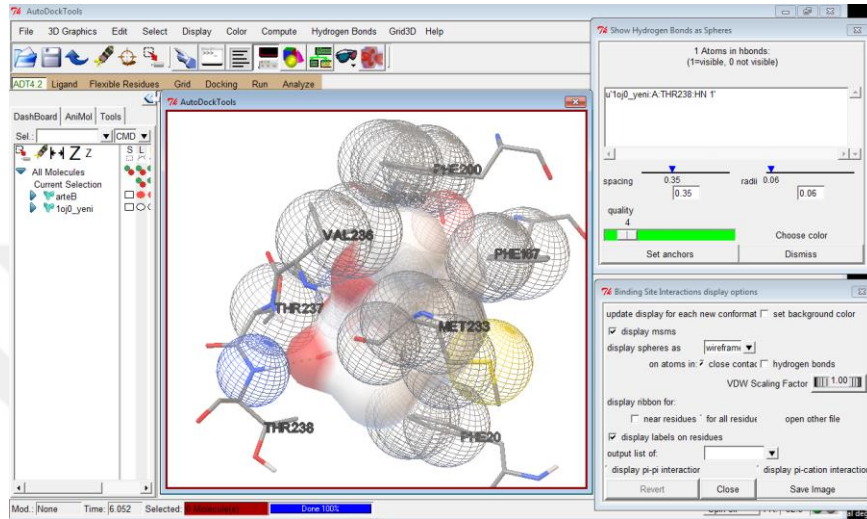


Şekil 3.2. Superimpose için hazırlık evreleri ve farklılıkların incelenmesi

Docking prosedürü kısaca şu şekildedir:

Protein Data Bank'tan alınan veya homoloji modelleme yöntemiyle 3 boyutlu yapısı tahmin edilen proteinler ile seçili ligandlar AutoDock4.2 programı kullanılarak kenetlenmiştir. Gridbox boyutu, ligandın büyüklüğü veya torsiyon sayısına göre belirlenmiştir. Proteinin kofaktörü merkez olarak seçilmiş veya kofaktör taşınamaması durumunda proteinin içindeki doğal ligandı Gridbox merkezine alınmıştır. Beta tubulin proteininin kenetleme simülasyonunda proteine bağlı haldeki ligand merkez olarak seçilmiştir. KPT enzimi için ise Taylor ve diğerleri (2013) tarafından verilen koordinatlar kullanılmıştır. Proteinin, aktif bölgesinde yer alan atomlar hareketlerinde serbest bırakılırken, diğer kısımları hareketsiz tutulmuştur. Yarı kristalize formlarında doğal ligandları ile bağlı bulunan proteinlerin docking (kenetleme) işlemlerinde doğal ligandları referans alınmıştır. İyonik kuvvet 0,145 ve dielektrik sabiti 10 olacak şekilde

ayarlanmıştır. Docking analizi Lamarkian Genetic Algorithm 4.2 ile gerçekleştirilmiştir. AutoDock 4.2 skorum fonksiyonları kullanılarak her bir ligand için 10 farklı konformasyon oluşturulmuştur. Serbest bağlanma ilgilerine göre sıralandıktan sonra en yüksek skora sahip ligandlar bağlanma bölgesinde yaptıkları etkileşimler açısından AutoDock Tools (Şekil 3.3), PyMOL ve Discovery Studio 2020 ile analiz edilmiştir.



Şekil 3.3. AutoDock Tools ile protein-ligand etkileşimlerini analiz ederken (solda hiyerarşi tablosu, ortadaki ekranda β -tubulin ile arteannuin-B'nin sferik etkileşim ağı ve sağdaki panoda üstte hidrojen bağı oluşturan atomun bulunduğu amino asitin numarası ve altta ise bağlanma bölgesindeki etkileşimlerin görüntü opsiyonlarını ayarlama ekranı görülmektedir)

AutoDock 4.2, protein ligand etkileşimlerinin, AMBER kuvvet alanı kullanılarak skorum fonksiyonu ile hesaplanmasına dayalı en düşük K_i değerleri ve serbest bağlanma enerjilerini bulmak için hesaplamalı yöntemleri kullanan oldukça kullanışlı bir moleküler kenetleme programıdır (Morris ve diğerleri, 1998). AutoDock programında moleküler serbest bağlanma enerjisi (ΔG) hesaplamalarında kullanılan tüm enerjiler Denklem 3.2'de gösterilmektedir.

$$\Delta G_{vdW} = W_{vdW} \sum_{i,j} (A_{ij} / r_{ij}^{12} - B_{ij} / r_{ij}^6)$$

$$\Delta G_{H-bağı} = W_{H-bağı} \sum_{i,j} E(t) * (C_{ij} / r_{ij}^{12} - D_{ij} / r_{ij}^{10} + E_{Hbağı})$$

$$\Delta G_{elek} = W_{elek} \sum_{i,j} (q_i * q_j) / (\epsilon(r_{ij}) * r_{ij})$$

$$\Delta G_{desolv} = W_{desolv} \sum_{i(C), j} (S_i * V_j * \exp(-r_{ij}^2 / (2 * \sigma^2)))$$

$$\Delta G_{tor} = W_{G_{tor}} N_{tor}$$

$$\Delta G = (V_{bağlı}^{L-L} - V_{ayrı}^{L-L}) + (V_{bağlı}^{P-P} - V_{ayrı}^{P-P}) + (V_{bağlı}^{P-L} - V_{ayrı}^{P-L} + \Delta S_{konf}) \quad (3.2)$$

Yukarıdaki denklemlerde ΔG_{vdW} , çekme/itme etkileşimleri için hesaplanan Lenard-Jones 6/12 potansiyelidir ve van der Waals kuvvetlerinden kaynaklanan enerjiyi ifade etmektedir. A ve B, Amber kuvvet alanının parametreleridir. İkinci denklemde hidrojen bağlarından kaynaklanan enerji hesaplanmaktadır ve burada r_{ij} , i ve j atomları arasındaki mesafedir. E(t), seçili atom ile hedef atom arasındaki açığa (t) bağlı olan yönlü bağıl değerdir. Üçüncü denklem elektrostatik çekim kuvvetinin hesaplandığı Coulomb potansiyeline dayanmaktadır. Yüklü parçacıklar q_i ve q_j arasındaki elektrostatik etkileşim, atomların kısmi yükleridir. Dördüncü denklem, belirli bir atomu çevreleyen atomların hacmine (V_j) dayalı desolvasyon potansiyelini hesaplar, S_i ve σ , hacimler ve mesafe için bağıl faktörlerdir. Beşinci denklemde ΔG_{tor} , bağlanmadaki torsiyonal entropidir. N_{tor} , dönebilen bağ sayısıdır. ΔS_{konf} bağlanma sırasında kaybedilen tahmini konformasyonel entropi, V ikili değerlendirme, L ligand ve P ise proteini temsil etmektedir. Formüldeki V; van der Waals, hidrojen bağı, elektrostatik ve çözünme enerjilerinin toplamıdır. Bağlı halde bulunan enerjilerin bağlı olmayan halde bulunan enerjilerden çıkarılması ve hem ligand-ligand hem protein-protein hem de protein-ligand kompleksleri için bulunan enerjilerin tahmini konformasyonel entropi ile toplanması sonucu serbest bağlanma enerjisi hesaplanır (Morris ve diğerleri, 2014).

İnhibisyon sabiti K_i , protein ligand bağlanmasında maksimum inhibisyon için harcanan substrat konsantrasyonunun yarısını ifade etmektedir. K_i 'nin hesaplanmasında kullanılan formül Denklem 3.3'te verilmiştir.

$$\Delta G = RT \ln K_i \quad (3.3)$$

Formüldeki T Kelvin cinsinden ortamın sıcaklığını ifade etmektedir. R gaz sabitidir ($R=8,314 \text{ K}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ J}$).

$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln K_i$ formülü Gibbs enerji değeri için önerilmiştir. Denge halindeki bir ortamda $\Delta G=0$ olduğu için standart şartlarda $\Delta G^\circ = -RT \ln K$ olarak ifade edilmektedir (Lehmann, Fuentes-Arderiu ve Bertello, 1996).

Sistemin iç enerjisi ile ilgili olan potansiyel fonksiyon, potansiyel ve kinetik enerjilerin toplamıdır. Potansiyel enerjinin minimizasyonu sistemin doğal haline en yakın duruma gelmesini amaçlar. Moleküler potansiyel enerjinin oluşumu Denklem 3.4'te gösterilmektedir.

$$E = E_{bağlar} + E_{açı} + E_{dihedral} + E_{elektrostatik} + E_{van\ der\ Waals} \quad (3.4)$$

Bir potansiyel fonksiyon (Denklem 3.4) moleküler potansiyel enerjiyi bağ uzunlukları, bağ açıları, torsiyon açıları, elektrostatik etkileşimler ve van der Waals kuvvetlerinden kaynaklanan enerjilerin bir toplamı olarak hesaplar. Bağ açıları, bağ uzunlukları, kuvvet sabitleri, kısmi yükler ve van der Waals kuvvetlerini kapsayan bir parametreler dizisi kuvvet alanını meydana getirir. Bir kuvvet alanı kuantum hesaplamaları ve deneysel veriler ile geliştirilir. Enerji minimizasyonu ile bağlantılı olarak, biyolojik süreçlerde en düşük enerjili aşamalar daha duranıdır. Moleküler mekanikler molekülün fiziksel durumunu açıklayabilmek için Newton mekaniklerine dayanmaktadır. Atomlar spesifik iç koordinatlara yerleştirilir ve sistemin sıcaklığı ile bağlantılı şekilde, atomik hareketler dinamik simülasyonlar ile belirlenir (Heinz ve Ramezani-Dakhel, 2016).

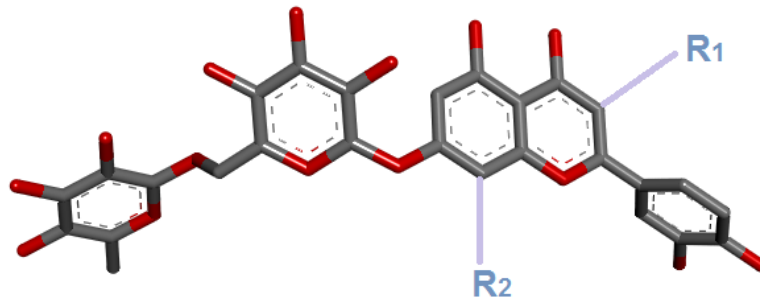
3.5. ADME Tahmini

Bitkisel ligandların kenetleme simülasyonlarının sonuçlarına göre en yüksek bağlanma ilgisine sahip moleküllerin ve tubulin ile bağlı haldeki Albendazole'un ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) özellikleri SwissADME (Daina ve diğerleri, 2017) web sunucu aracılığıyla tahmin edilmiştir. Kan beyin bariyerini geçme yetenekleri, gastrointestinal absorpsiyonları, lipofilik özellikleri, deriden geçebilme hızları, karaciğer enzimlerini inhibisyonları, p-gp substratı olup olmayacakları ve oral biyoygunlukları karşılaştırılarak hesaplamalı yöntemlere dayalı bir tahminde bulunulmuştur.

3.6. Bitkisel Ligand Tabanlı Türev Moleküllerin Antihelmintik Amaçlı Kenetlenmeleri

3.6.1. Türev moleküllerin hazırlanması

De novo antihelmintik ilaç tasarlanması amacıyla bu çalışmada iskelet olarak eriositrin kullanılmıştır. Eriositrin Pubchem (Kim ve diğerleri, 2021) veritabanından alınarak OpenBabel (O’Boyle ve diğerleri, 2011) programı ile pdb formatına dönüştürüldükten sonra optimize edilmiştir. R gruplarının yerleştirilmesi için kromen halkasının 3. ve 8. pozisyonları seçilmiştir (Şekil 3.4). Yerleştirilen R grupları hidrojen (-H), asetat (CH₃COO-), fenol (-C₆H₆O), anilin (-C₆H₅NH₂) ve propilsulfanil (C₃H₇S-) gruplarıdır.

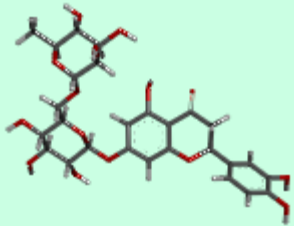
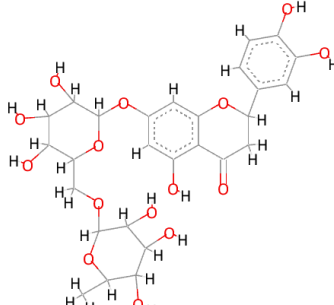
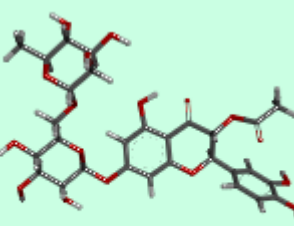
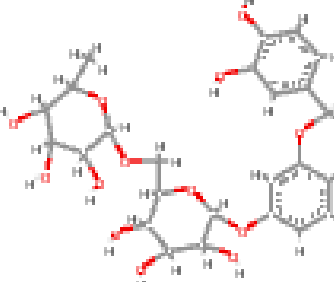
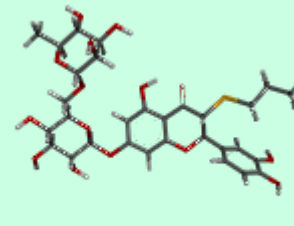
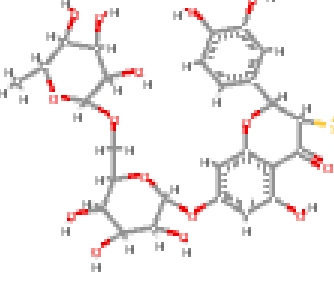


Şekil 3.4. Türev iskeleti olarak seçilen eriositrin üzerinde R gruplarının yerleşimi

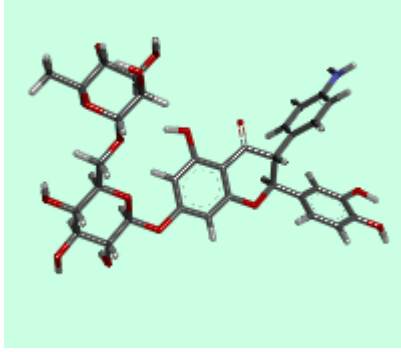
Türev moleküller Discovery Studio 2020 Client (Biovia Inc.) ile çizilmiş ve Drieden benzeri hızlı bir minimizasyon aracı olan “Clean Geometry” ile optimize edilmiştir. Pdb formatındaki türev moleküller ADT (Huey ve diğerleri, 2007; Morris ve diğerleri, 2009) programı ile pdbqt formatına dönüştürülmüştür. Yan grupların seçilmesinde iki kriter göz önüne alınmıştır; 1) mevcut ilaç yapısında ve antihelmintik bitkisel moleküllerin yapısında rastlanan bir yan grup olması, 2) olası kimyasal etkileşimlerin artmasına sebep olacak aromatik yan gruplardan sentezi mümkün olabilecek bir grup olması. Buna göre propilsulfanil grubu Albendazolün yapısında olduğu ve oldukça etkili antihelmintik bir bitkisel ligand olan allicin de kükürtlü bir bileşen olduğu için yan grup

olarak seçilmiştir. Daha önceki çalışmamızda en iyi antihelmintik bileşenlerden biri olduğunu saptadığımız oreganolün yapısında bulunduğu ve yapısındaki oksijen atomları ile hidrojen bağı oluşumuna imkan verebileceği için bir diğer yan grup olarak asetat seçilmiştir. Fenol ve anilin aromatik etkileşimleri arttırabilecek ve sentezi kolay olabilecek iki grup oldukları için ve hidrojen ise yan grup eklenmediğinde görülecek etkiyi (başka bir ifadeyle eklenen diğer grubun tek başına etkisini) anlamak amacıyla seçilmiştir. 3. ve 8. pozisyonların seçilmelerinin nedeni ise kromen halkasının kumarin halkası ile büyük benzerlik göstermesi ve 3. ve 8. pozisyonların sentezlenebilir biyoaktif kumarin türevleri tasarlanmasında kullanılıyor olmasıdır. Çizilen eriositrin türevlerinin 3D ve 2D yapıları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

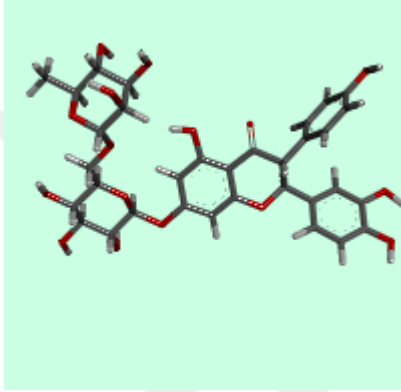
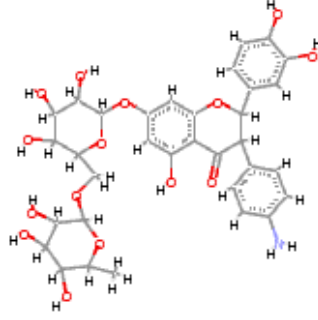
Çizelge 3.2. Çizilen eriositrin türevleri

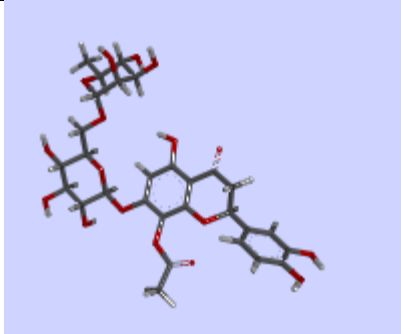
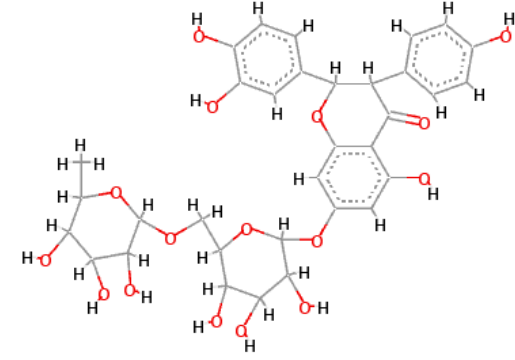
Çizelge 3.2. Çizilen eriositrin türevleri (devam)



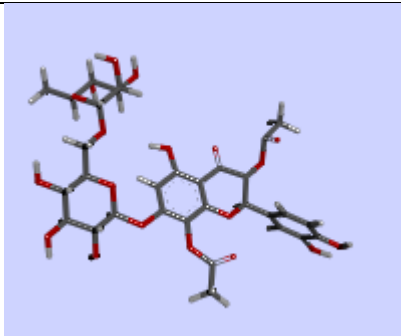
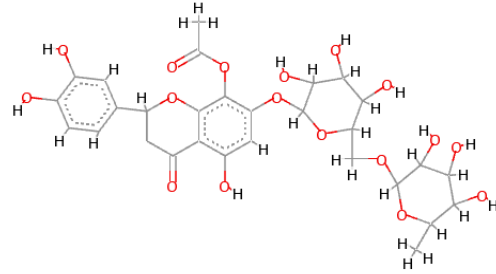
E04



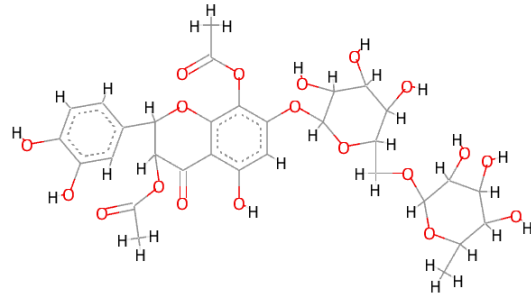
E05



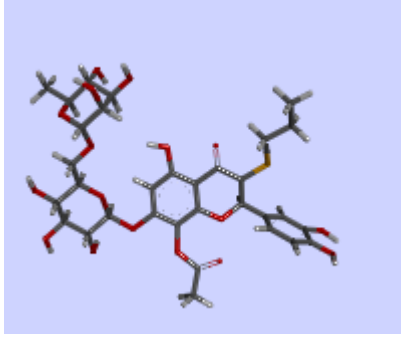
E06



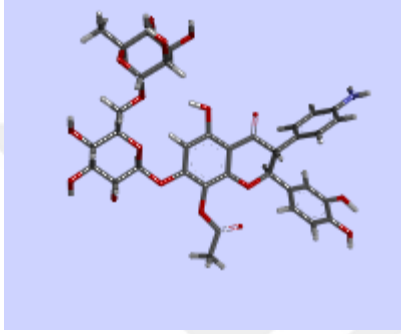
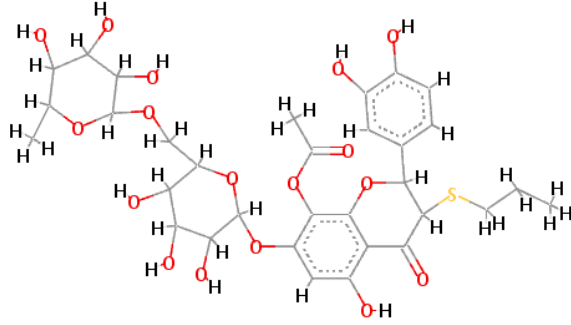
E07



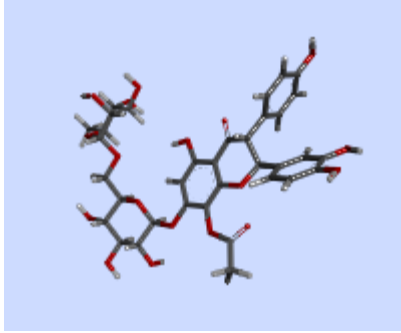
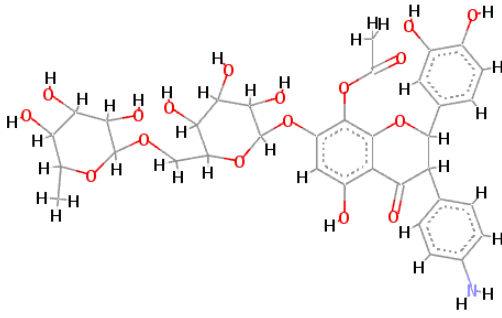
Çizelge 3.2. Çizilen eriositrin türevleri (devam)



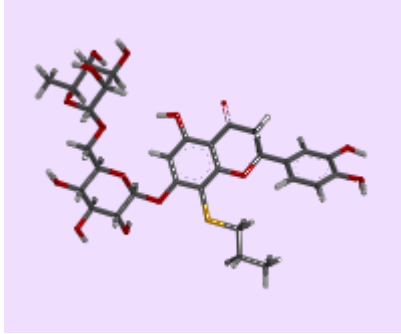
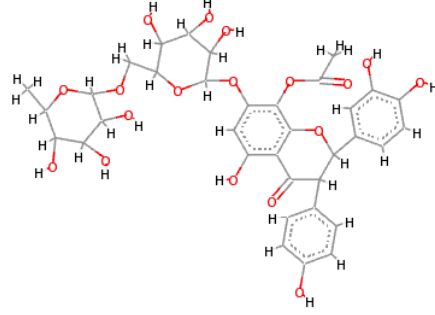
E08



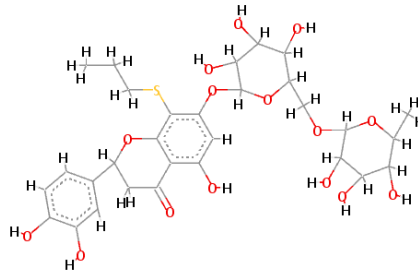
E09



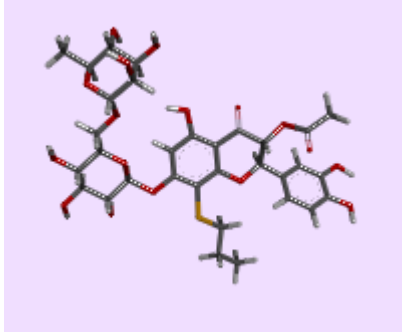
E10



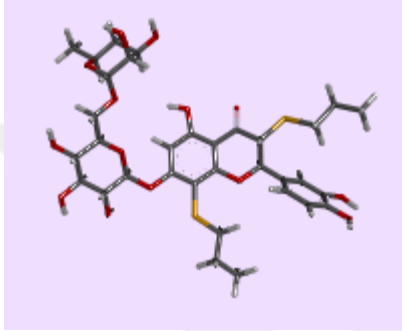
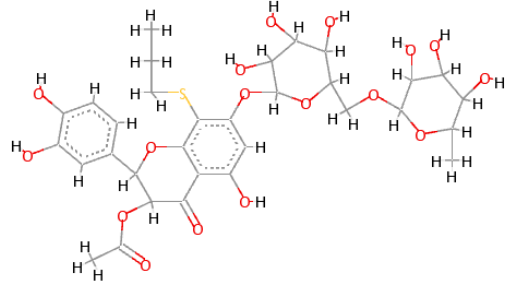
E11



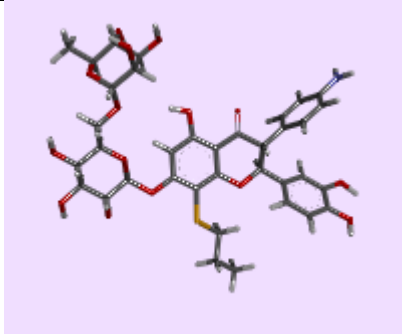
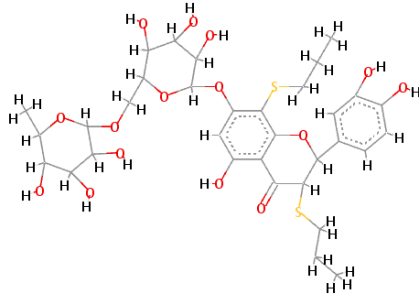
Çizelge 3.2. Çizilen eriositrin türevleri (devam)



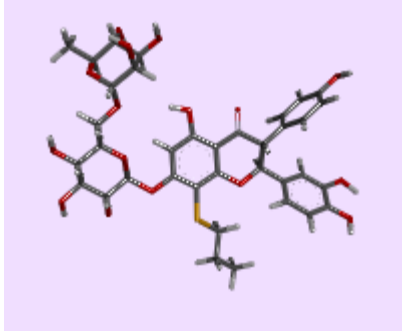
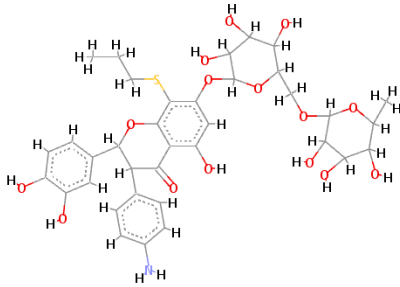
E12



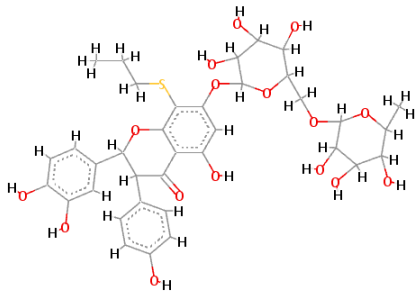
E13



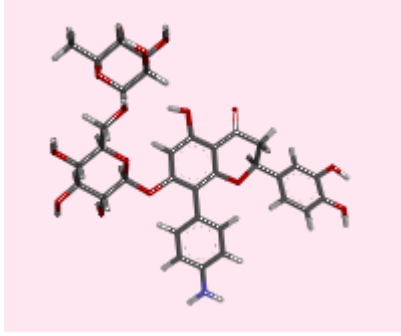
E14



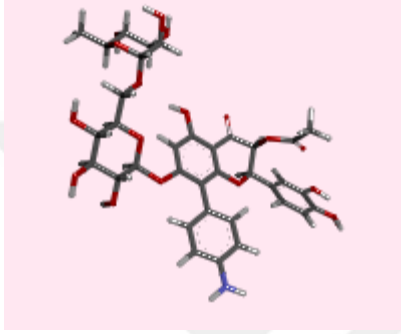
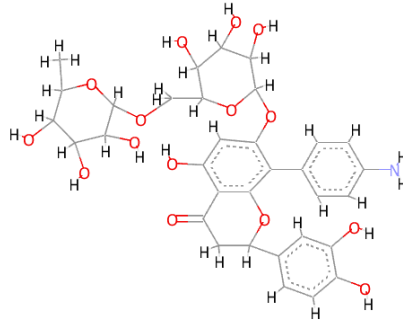
E15



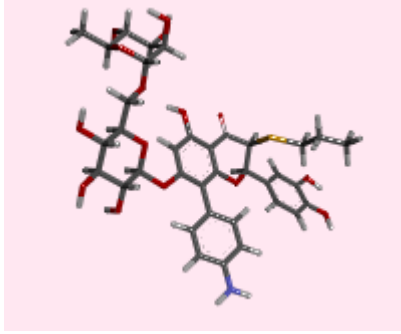
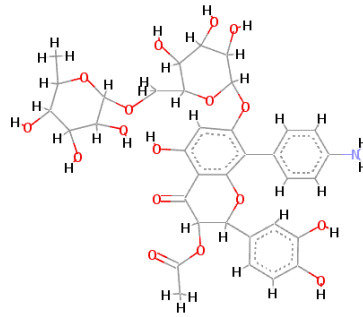
Çizelge 3.2. Çizilen eriositrin türevleri (devam)



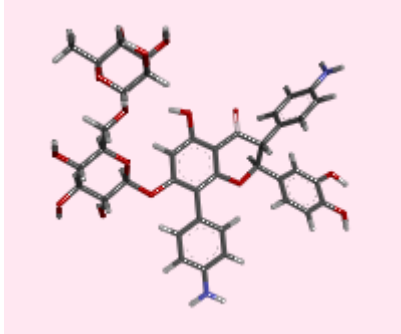
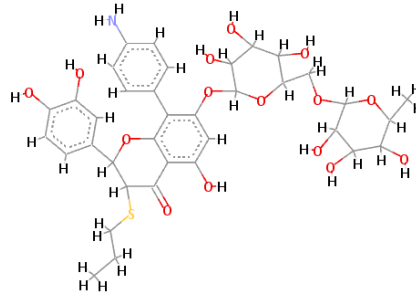
E16



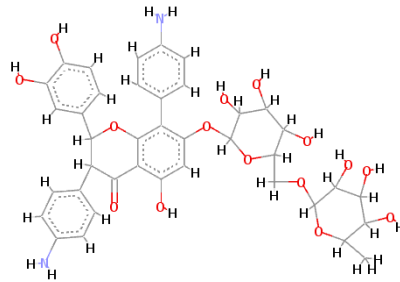
E17



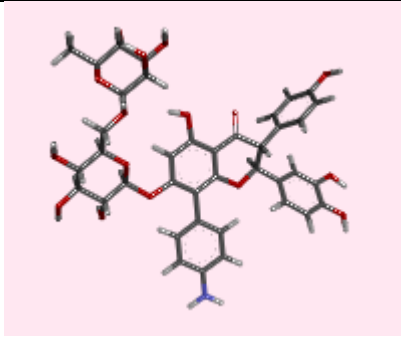
E18



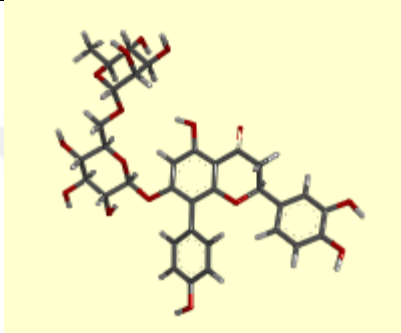
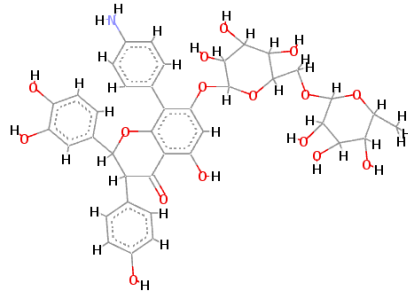
E19



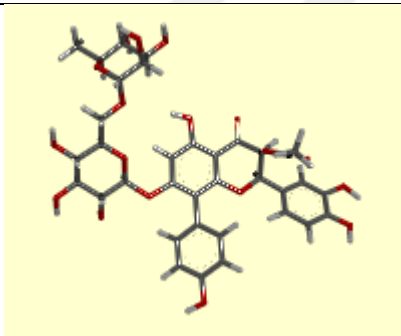
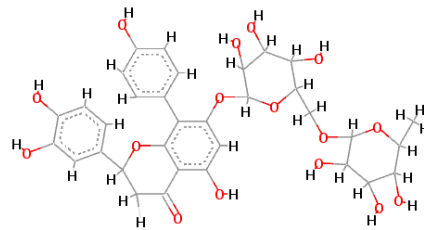
Çizelge 3.2. Çizilen eriositrin türevleri (devam)



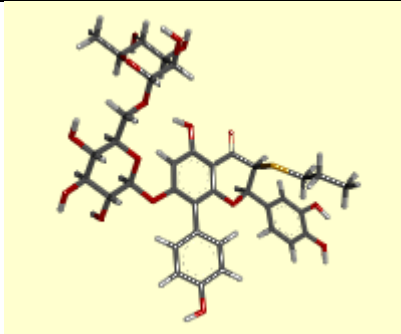
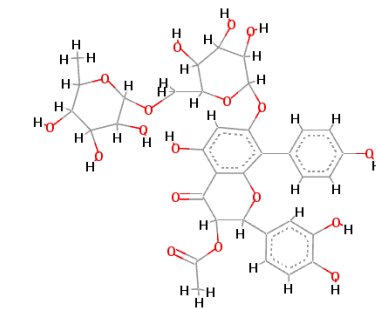
E20



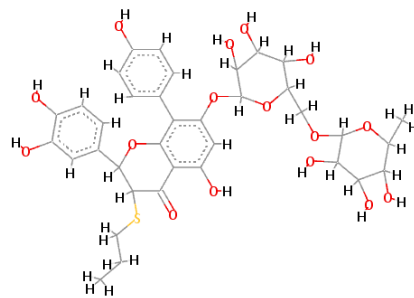
E21



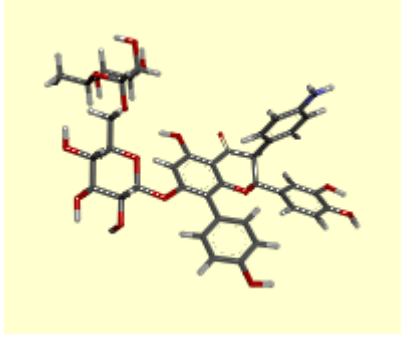
E22



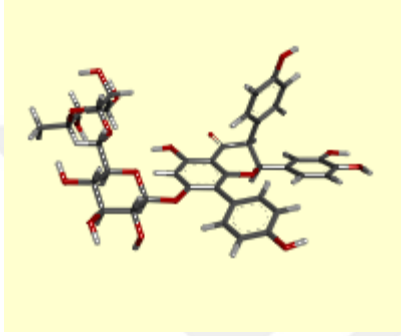
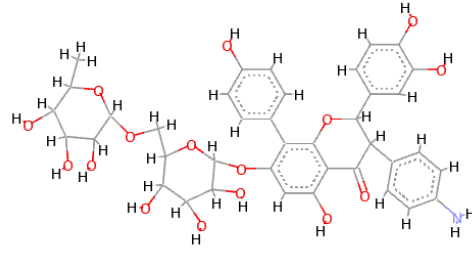
E23



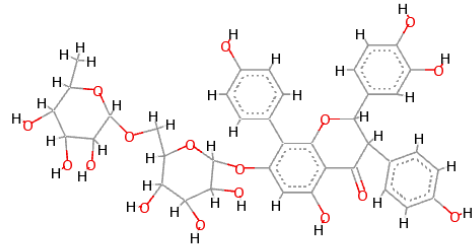
Çizelge 3.2. Çizilen eriositrin türevleri (devam)



E24



E25



Eriositrin türevlerinin sol sütunda 3 boyutlu ve sağ sütunda 2 boyutlu gösterimi

3.6.2. Türev moleküllerin moleküler kenetleme deneyi

KPT 2 enziminin kenetleme simülasyonu için Taylor ve diğerleri (2013) tarafından verilen koordinatlar kullanılmıştır ve merkez kabul edilen x, y, z koordinatları: 61,752, 72,800 ve 52,032'dir. Kenetleme prosedüründe protein katı halde tutulmuş, ancak hidrojenlerin, sadece proteinin aktif bölgesinde olan hareketlerinde serbest bırakılmasına izin verilmiştir. Dielektrik sabiti 10, iyonik güç 0,145, grid kutusu boyutları 60x60x60 ve grid noktası 0,375Å olarak ayarlanmıştır. Rotasyonel bağ sayısı 10'dan küçük olduğu için maksimum jenerasyon sayısı 27 000'e ayarlanmış ve maximum geliştirme sayısı ise 2 500 000 olarak seçilmiştir. Lamarkian genetik algoritması kullanılmıştır. Tüm kenetleme prosedürü için Autodock4.2 programı seçilmiştir. Kenetleme simülasyonu 20 çalıştırma ile gerçekleştirilmiştir.

3.6.3. En uygun türev molekülün ADME tahmini

Türev moleküllerin kenetleme simülasyonlarının sonuçlarına göre en yüksek bağlanma ilgisine sahip eriositrin türevi molekülün ADME özellikleri SwissADME (Daina ve diğerleri, 2017) web sunucu aracılığıyla tahmin edilmiştir. Kan beyin bariyerini geçme yetenekleri, gastrointestinal absorpsiyonları ve oral biyoyougunlukları karşılaştırılarak hesaplamalı yöntemlere dayalı bir tahminde bulunulmuştur.

3.7. Bitkisel Ligandların Antihelmintik Direnç Gelişimi Durumunda Etkinliğinin Araştırılması

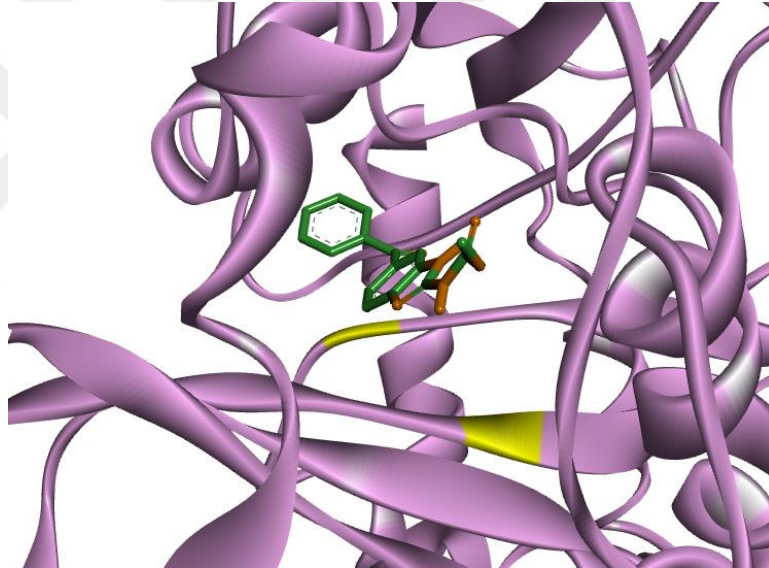
3.7.1. Direnç gelişimi için fonksiyonel mutasyon oluşturulması

β -tubulin proteininde benzimidazole direnci ile ilgili bazı mutasyonlar Diawara, Schwenkenbecher, Kaplan ve Prichard (2013) tarafından tanımlanmıştır. Bunlardan ikisi β -tubulinin 198. ve 167. amino asidinde görülen mutasyonlardır. Tripathi ve diğerleri (2016) tarafından bir antikanser ilacı olan Paclitaxel'e direnç gelişiminin β -tubulinin 225. amino asidindeki lösin-methionin dönüşümüne bağlı olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda β -tubulinin amino asit sekansı üzerindeki 198., 167. ve 225. pozisyonlar mutasyona uğratılmak üzere seçilmiştir (Şekil 3.5). *Caenorhabditis elegans*'a ait β -tubulin Fasta sekansı UniProt'tan elde edilmiştir ("The UniProt Consortium 2021", 2021). Protein sekansı üzerindeki 167., 198. ve 225. amino asitler tespit edilmiştir. Bu amino asitleri kodlayan üçlü kodonlar araştırılmıştır. DNA'nın replikasyonu sırasında hatalı baz eşleşmesinden kaynaklanabilecek nokta mutasyonu yaratılması amacıyla bilgisayar ortamında üç transisyon meydana getirilmiştir. Bu transisyonlar sonucu yeni kodonların kodlayacağı amino asitler içerisinden seçim yapılmıştır. Yeni oluşturulan dört mutant protein sekansından E198G mutantında 198. rezidüde glutamin→ glisin, F167L mutantında 167. rezidüde fenilalanin→ lösin, F167Y mutantında 167. rezidüde fenilalanin→ tirozin ve L225M mutantında 225. rezidüde lösin→ methiyonin dönüşümü yapılmıştır (Karaman, Girişgin ve Girişgin, 2021).

10	20	30	40	50	60	70	80
MRE	VHVQAGCGNQIGSK	FEVET	SDEHGIQPDGTFKGET	DQLERIDV	YNEANNKYVPRAVLVDLE	PGMTDSVRS	GP
90	100	110	120	130	140	150	160
FGQLFRPDNFVFGSGAGNNWAKGHYTEGAELVDNVL	DVIRKEAEGCDCLOGF	Q	LTHSLGGTGSGMGT	LLISKIREEP			
170	180	190	200	210	220	230	240
DRIM	S	F	VVPSPKVS	DTVVEPNATLSVHOLVENT	E	YCIDNEALYD	CYRTLKLTNP
250	260	270	280	290	300	310	320
RFPGQLNAD	L	R	K	L	VNMVPP	RLHFFMP	GFAPLSAKGTQAYRALTVAEL
330	340	350	360	370	380	390	400
MSMR	EVDEQMLNVQNKSSYF	VEWIPNNVKTAYCD	I	PPRGLKMAATFVGN	STAIQELFKRI	SEQFTAMFR	RKAFLHWYTG
410	420	430	440	450	460	470	480
EGMDEMEFTEAESNMNDL	I	SEYQYQ					

Şekil 3.5. Aktif bölgeler ve mutasyona uğratılan noktaların *C. elegans* β -tubulin protein fasta sekansında gösterimi. Turuncu bölgeler proteinin aktif bölgesinde ligand ile etkileşen rezidüleri ve mavi çember içindeki rezidüler mutasyona uğratılan noktaları temsil etmektedir

Mutasyona uğratılan rezidülerin liganda göre konumları Discovery Studio yazılımı ile görülmüştür (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Mutasyona uğratılan noktalardan bağlanma bölgesinde yer alanlar. Sarı ile gösterilen bölgeler 167. ve 198. amino asitlerin bulunduğu noktaları temsil etmektedir

3.7.2. Homoloji modelleme

Tekli nükleotit değişimi ile dört farklı mutant protein sekansı (E198G, F167L, F167Y ve L225M) meydana getirildikten sonra bu mutasyonun üç boyutlu yapıda değişime neden olabileceği varsayımına uygun olarak SWISS-MODEL web sunucu yardımıyla homoloji modelleme yapılmıştır (Waterhouse ve diğerleri, 2018). *C. elegans*'a ait β -tubulin yapısı (ce β -tubulin) kristalize halde Protein Data Bank'tan

(<http://www.rcsb.org/pdb>) elde edilmiştir (PDB ID: 6E88, Çözünürlük: 4.8 Å, Chaaban ve diğerleri, 2018). Bu kristalize yapı kalıp olarak kullanılmış ve mutant sekanslar bu kalıp eşliğinde modellenmiştir.

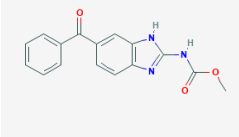
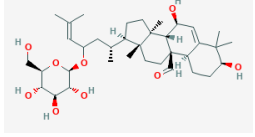
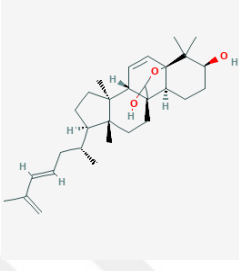
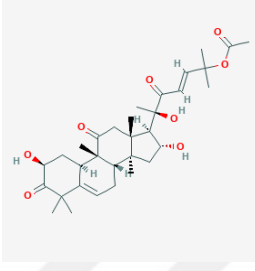
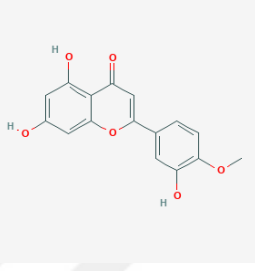
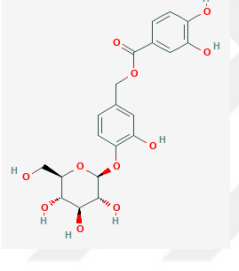
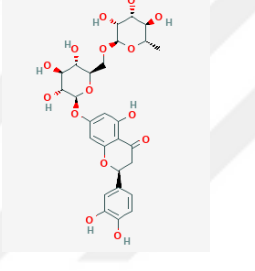
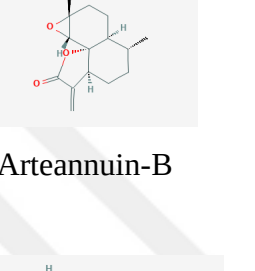
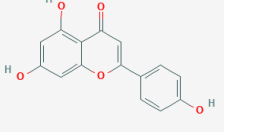
3.7.3. Proteinlerin hazırlanması

Proteinlerin hazırlanması için Discovery Studio 2020 Client (Dassault Systèmes Biovia Inc., 2020) programı kullanılmıştır. 6E88 kodlu polimerize mikrotubulin yapısından β -tubulinin seçilmesi için sekans başlangıcı mutant protein ile aynı olan yapı tespit edilmiştir. B zincir tutulup diğer polipeptidler, heteroatomlar ve GDP molekülleri silinmiştir. Homoloji modelleme ile oluşturulan mutant β -tubulin 3D yapıları da GDP ile beraber bulunduğu için bunlardaki GDP molekülleri de silinmiştir. Tüm hidrojenler eklenmiştir. Histidin rezidüleri manuel olarak kontrol edilmiş ve eksik atom olmadığından emin olunmuştur. “Clean Geometry” aracı ile proteinler optimize edilmiştir. Ayrıca Charm Forcefield uygulanmıştır.

3.7.4. Ligandların hazırlanması

Direnç gelişimine karşı kullanılabilecek bitkisel ligandların seçimi, bundan önceki kenetleme deneylerinin sonuçlarına bağlıydı. Dört farklı bitki (*A. annua*, *R. canescens*, *M. charantia* ve *O. vulgare* subsp. *hirtum*) türünde bulunan toplam 50 bitkisel biyoaktif bileşen ile beş sentetik antihelmintik ilaç molekülü *Haemonchus contortus* β -tubulin (hc β -tubulin) proteinine, *Ascaris suum* Suksinat dehidrojenaz enzimine (AsFR) ve *Rattus norvegicus* Karnitin Palmitoiltransferaz II (rnKPT II) enzimine karşı inhibisyonları açısından araştırılmıştı. Bulunan K_i değerlerine göre en potent 10 ligand, mutant β -tubulin proteinlerine inhibisyonları açısından değerlendirilmek üzere seçilmiştir. Bu ligandlar; Mebendazole (aynı zamanda kontrol ilaç), arteannuin-B, kukurbitasin-B, karantadiol-A, momordisin II, eriositrin, apigenin, diosmetin, oreganol ve 9,12,15-oktadekantrienoik asit metil esterdir (Çizelge 3.3). Seçilen ligandların 3D yapıları PubChem (Kim ve diğerleri, 2021) veritabanından sdf formatında alınmıştır. OpenBabel programı (O’Boyle ve diğerleri, 2011) ile pdbqt formatına dönüştürülmüştür.

Çizelge 3.3. Seçilen ligandların molekül yapıları

		
Mebendazole	Momordisin II	9,12,15-oktadekantrienoik asit metil ester
		
Karantadiol-A	Kukurbitasin-B	Diosmetin
		
Oreganol	Eriositrin	Arteannuin-B
		
		Apigenin

3.7.5. Moleküler kenetleme

Intel core işlemcili Asus laptop bilgisayarda (2GB RAM), Linux ve Windows işletim sistemlerinin ikisi de kullanılarak kenetleme simülasyonları yapılmıştır. Parametre dosyalarının hazırlanmasında ADT (Huey ve diğerleri, 2007; Morris ve diğerleri, 2009) programı kullanılmıştır. Dielektrik sabiti 10, iyonik güç 0,145, grid kutusu boyutları 60x60x60 ve grid noktası 0,375Å olarak ayarlanmıştır. Maksimum jenerasyon sayısı 27 000 ve maksimum geliştirme sayısı 2 500 000 olarak seçilmiştir. Lamarkian genetik algoritması kullanılmıştır. Kenetleme prosedürü için Autodock4.2 programı (Morris ve

diğerleri, 1998) seçilmiştir. Kenetleme simülasyonu 10 çalıştırma ile gerçekleştirilmiştir (Karaman, Girişgin ve Girişgin, 2021).

3.8. *In vivo* Deney

Kullanılan teknik malzemeler

Stereo mikroskop, Leica E24 ve Nikon marka

Binoküler mikroskop, Nikon Eclipse E100 ve Nikon ALPHAPOT2 marka

Hassas terazi AND marka GX200 model 210 model kapasiteli

Kameralı binoküler mikroskop, Olympus

Masaüstü Bilgisayar, LG FLATRON W1942S

Buzdolabı, Altus A+ Enerji, Tek kapılı

Elektrikli su ısıtıcı, Sinbo

Derin dondurucu, Vestel

Isıtıcı tabla, MTOPS MS300HS

Rotary evaporator cihazı

Liyofilizatör

-80°C’de soğutucu

Çelik gavaj

Çelik süzgeç

Mikropipet

Hematokrit ölçüm kiti

Santrifüj

Sarf malzemeleri

Entellan

Çinko sülfat

Sodyum klorür

Soya yağı

Mısır yağı

Sevoflurone (Anestezik madde)

İnsülin iğnesi

Ependorf

Petri kabı

Cam vial

Lam lamel

Etil alkol

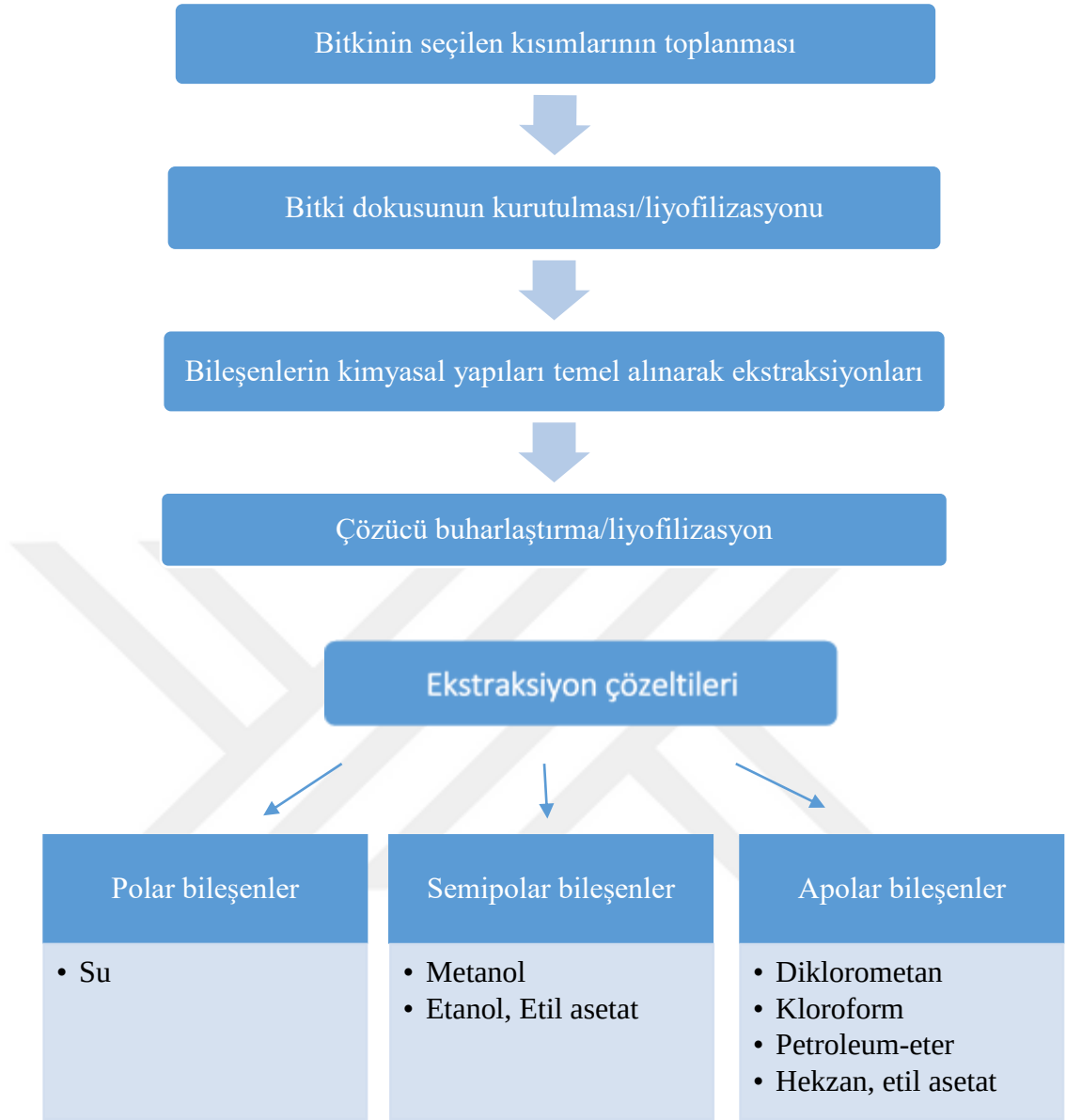
Şeffaf oje

Fare yemi kuru pelet

Talaş

3.8.1. Bitki özütünün hazırlanması

A. annua'nın toprak üstü kısımları Dr. Oya Girişgin (Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı) ve Prof. Dr. Hulusi Malyer (Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü) tarafından 12.11.2005 tarihinde Bursa Acemler bölgesindeki açık araziden toplanmıştır. Bitkiler Prof. Dr. Hulusi Malyer tarafından teşhis edilmiştir. Bitki özütü Dr. Oya Girişgin tarafından çıkarılmıştır. Bitkiler gölgede ve açık havada kurutulmuş, öğütücü ile toz haline getirilmiştir. Soxhlet cihazındaki balon joje içerisine alabildiği kadar n-hekzan doldurulmuştur. Yaklaşık 90 gr bitki tozu kurutma kâğıdına sarıldıktan sonra ekstraktöre yerleştirilmiştir. N-hekzan kaynayıp buharı çözücü çıkış borusundaki ekstrakt seviyesi ile aynı seviyeye gelince renkli ekstrakt balona geçmiştir. Ekstraksiyon sonunda n-hekzan rotary evaporator ile uzaklaştırılmıştır. Özüt koyu renk cam şişede buzdolabında -20°C'de muhafaza edilmiştir. Genel bir ekstraksiyon prosedürünün aşamaları Şekil 3.7'de gösterilmektedir.



Şekil 3.7. Bitkilerden tek bir grup fitokimyasal bileşen eldesi için yapılan hazırlık sürecinin basamaklarını gösteren bu diyagram Hrchova ve Vlebný’den (2013) alınarak değiştirildi

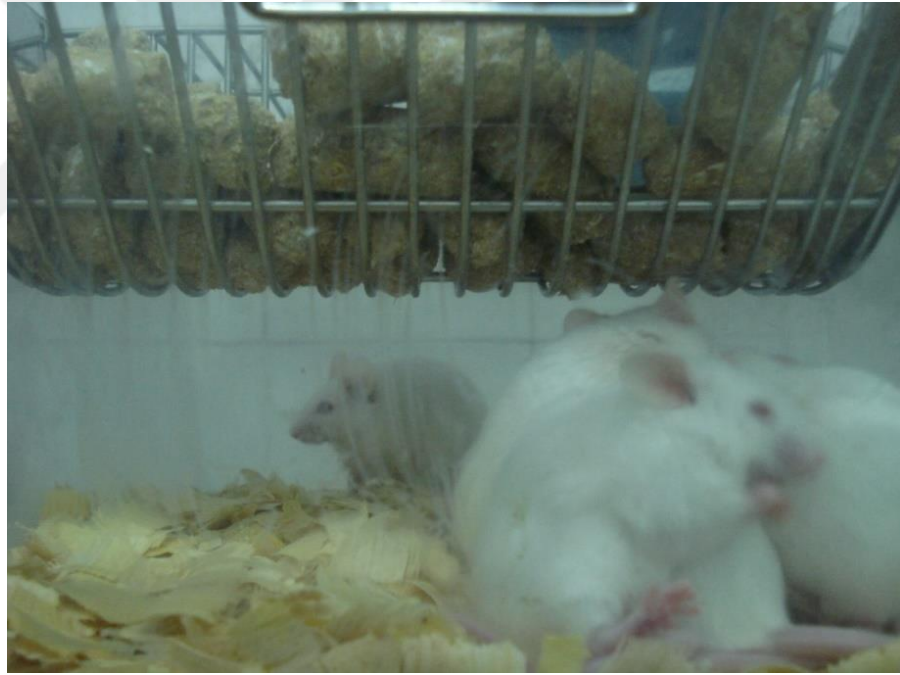
O. vulgare subsp *hirtum* uçucu yağı (OUY) Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden Prof. Dr. Hulusi Malyer tarafından temin edilmiştir. Uçucu yağ, Nurcihan Güven tarafından hazırlanmış ve içeriği Prof. Dr. Mine Kürkcüoğlu tarafından Kütle/Gaz kromatografisi ile analiz edilmiştir.

OUY çıkarılışı kısaca şu şekildedir: Öncelikle bitkiler toplanıp yıkanmış ve gölgede kurutulmuştur. Blender ile toz haline getirilmiştir. Clevenger aparatındaki soğutucuya

bağlanan bir cam balon içerisine kekik tozu ile birlikte su konularak 2-8 saat kaynatılmış, su buharı ile birlikte kolonda yükselen yağ molekülleri soğutucuda yoğunlaşıp sudan ayrılmıştır.

3.8.2. Deney hayvanlarının hazırlanması

Her iki cinsiyetten (28-35 gr) Balb-c fareleri Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Uygulama Merkezinden temin edilmiştir. Hayvanlar 20-24°C'de, %55 bağıl nemde, standart polipropilen kafeslerde tutularak istedikleri kadar standart pelet ve su ile beslenmiştir. *S. obvelata* veya *A. tetraptera* ile doğal enfekte deney hayvanları, perianal selofan bant ve fulleborn fekal flotasyon yöntemleri kullanılarak 250 fareden seçilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Deney farelerinin bakımı. Enfeksiyona sahip olduğu tespit edilen farelerden bir grup

Her grup altı hayvandan oluşturulmuştur. Tüm deneyler Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu (no: 2017-10 / 07) tarafından onaylanmıştır.

3.8.3. Farelerin bakılması

HADYEK'ten temin edilen fareler -7. günün öncesine kadar gruplar halinde bakılmıştır. Yaklaşık 1,5 ay boyunca enfeksiyonun fareler arasında dengeli yayılması için fareler ayrılmadan bakılmıştır. Bu süre sonunda deneye alınacak fareler ayrı kafeslere alınmıştır. 18 fare ilk olarak deneye alınmıştır. Hemen deneye alınmayan fareler ile beraber toplam 54 fare (yaklaşık 30 kafes) iki günde bir kafesleri yıkanarak, yem, su ve talaşları yenilenerek bakılmaya devam edilmiştir. Kafesler sadece su ile yıkanmış ve kâğıt havlu ile kurulanmıştır. Suluklar kaynar su, tuz ve alkolle yıkanıp iyice durulanmıştır.

3.8.4. Özütlere verilmesi

Bu çalışmada *A. annua* n- hekzan özütü 300mg/kg, 600 mg/kg ve 1200 mg/kg olmak üzere üç dozda uygulanmıştır. Bunlar mısır yağında dilüe edildikten sonra farelere gavaj ile 7 gün boyunca verilmiştir. *O. vulgare* uçucu yağının seyreltilmesi için ise soya yağı kullanılmıştır.

Önce literatürden n-hekzan ve *A. annua* özütlerinin çözülmesinde (seyreltilmesinde) kullanılan solüsyonlar araştırılmıştır. Çözücü olarak kullanılan DMSO, tween 80 gibi solüsyonlar kısmen toksik olabileceği için bu solüsyonlar yerine saf su, normal salin veya diğer polar çözücüler kullanılmasına karar verilmiştir. Uygun çözücünün seçilmesinde: 1) hayvan için toksik olmayan, 2) özütü tamamen çözen, 3) literatürde kullanılması tavsiye edilen bir sıvı olmasına dikkat edilmiştir. Daha önceki araştırmalar soya yağı veya mısır yağının hayvanlardaki nematodlara karşı antihelmintik bir ajanın denenebilmesi için oral uygulamada en uygun çözücü yağlar olduğunu göstermişti (Harvey, 1996). Bu nedenle çalışmamızda her iki yağ da çözücü olarak kullanılmış ve birbirileri ile kıyaslanmıştır. Başka bir çalışmada ise ABZ'nin çözünme problemi olduğu ve bu nedenle soya yağı içinde emülsifiye edilerek verilmesinin daha iyi bir etki göstermesini sağladığı ifade edilmişti. Bu çalışmada ABZ iyice ezildikten sonra *A. annua* grubunda 5 mg/kg dozda ve mısır yağı içerisinde; OUY grubunda ise 20 mg/kg

dozda ayarlandıktan sonra soya yağında emülsifiye edilmiştir. *A. annua* grubundakilere gavaj ile, OUY grubundakilere ise yemlerine katılarak verilmiştir.

Albendazolun 5 mg/kg'lık dozunun seçilmesinde Albani ve arkadaşlarının (2015) çalışmaları; ilaç ve özütlerin normal salin içinde dilüe edilmeleri konusunda İslamuddin ve diğerleri (2014) tarafından gerçekleştirilen çalışma örnek alınmıştır. Çalışmada tek tek tartımları yapılan farelere, tartım ağırlıklarına göre solüsyon hazırlanmıştır ve solüsyonun sıvı kısmı sabit tutularak hayvanların ağırlıklarına bağlı olarak özüt miktarı verilecek doza uygun olarak ayarlanmıştır. *A. annua* n-hekzan özütünün tüm dozları ve karşılaştırılma yapılan pozitif kontrol grubunun mısır yağında dilüe edilen 5 mg/kg dozdaki ABZ ve negatif kontrol grubunun saf mısır yağı 2 ml hacimde, paslanmaz gavaj kullanılarak oral olarak verilmiştir (Şekil 3.9).



A

B

Şekil 3.9. Farelere gavaj ile özüt ve ilaç uygulaması sırasında aynı hacimde mısır yağı kullanılmış ve aynı biçimde uygulanmıştır. **A)** *A. annua* 300 mg/kg dozunun verilmesi **B)** Mısır yağı verilmesi

Deney hayvanları her iki cinsiyetten ve her biri 6 fareden oluşan gruplara bölünmüştür. 1. gruba negatif kontrol amacıyla mısır yağı, 2-4. gruplara sırasıyla 300 mg/kg, 600 mg/kg ve 1200 mg/kg dozlarda *A. annua* bitkisi hekzan özütü yedi gün boyunca ve pozitif kontrol amacıyla mısır yağında süspansiyeye edilen 5 mg/kg ABZ üç gün boyunca gavaj ile oral olarak verilmiştir. 6. ve 7. gruplara OUY 300 mg/kg ve 600 mg/kg dozlarda ve 8. gruba da *O. vulgare* yağını seyreltmek için kullanılan soya yağı ise 2. çözücü kontrol olarak yedi gün boyunca, 9. gruba ise OUY grubu için pozitif kontrol amacıyla soya yağında süspansiyeye edilen ABZ 20 mg/kg dozda birer gün arayla üç gün

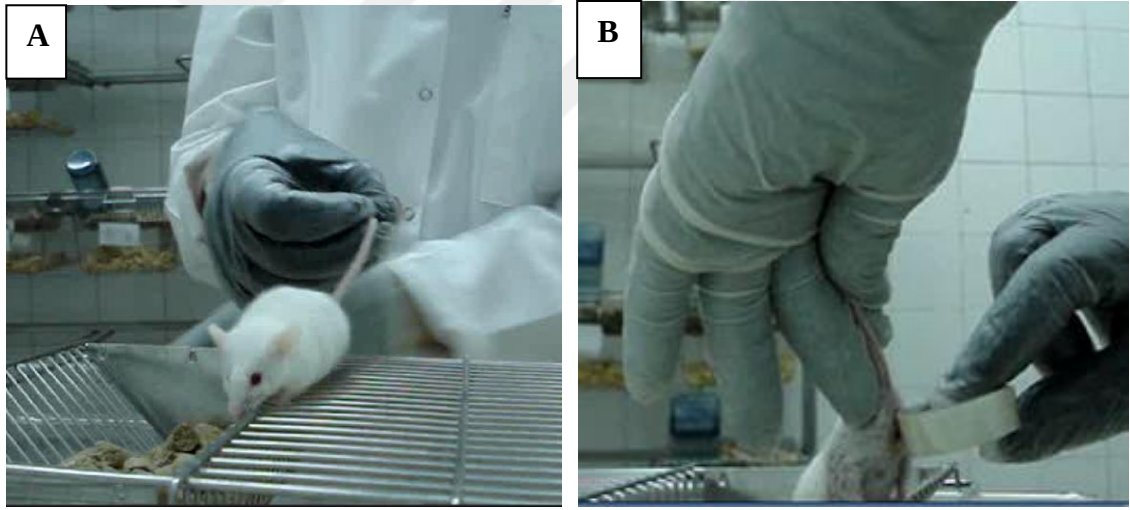
yemlerine katılarak uygulanmıştır (Çizelge 3.4). 10. gruptaki farelere gavajla uygulama yapılmamış ancak her bir farenin uygulama yapılanlarla aynı günlerde, fekal flotasyon ve selofan bant ile parazit yumurtaları sayılmıştır. Tüm fareler ayrı kafeslere alındıkları için yemleri yeyip yemedikleri izlenebilmiştir. Nekropside çekumları incelenmeyen üç fare (ikisi mısır yağı, biri *A. annua* 600 grubundaki fareler) nedeniyle bu uygulamalar için üç fare daha bir hafta boyunca gavajla beslenerek fekal flotasyon ve selofan bant ile yumurtaları sayılmış ancak bu fareler ve bundan sonraki OUY uygulamasının yapıldığı fareler ötenazi edilmemiştir. Ötenazi edilmeyen fareler içinde özüt ve ilaç uygulanmayan farelerden enfeksiyonu devam edenler deneylerde tekrar kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. Uygulama grupları

	Uygulama	Çözücü	Uygulama süresi (gün)
1. Grup	Mısır yağı		7
2. Grup	<i>A. annua</i> n-hekzan ekstraktı 300 mg/kg	Mısır yağı	7
3. Grup	<i>A. annua</i> n-hekzan ekstraktı 600 mg/kg	Mısır yağı	7
4. Grup	<i>A. annua</i> n-hekzan ekstraktı 1200 mg/kg	Mısır yağı	7
5. Grup	ABZ 5 mg/kg	Mısır yağı	3
6. Grup	OUY 300 mg/kg	Soya yağı	7
7. Grup	OUY 600 mg/kg	Soya yağı	7
8. Grup	Soya yağı		7
9. Grup	ABZ 20 mg/kg	Soya yağı (süspansiyon edici)	3 (birer gün arayla)
10. Grup	İçme suyu kontrol		7

3.8.5. Perianal bant ile yumurta sayımı

Farelerin gruplandırılmasından sonra, tüm farelerde *S. obvelata* enfeksiyonunun devam ettiğinin kesin olarak tespit edilmesi için perianal selofan bant yöntemi kullanılmıştır. Bitki özütünün yumurta sayıları üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi amacıyla, *A. annua* deney gruplarında (1.-5. arası ilk beş grup ve 10.grup, 36 fare) uygulama öncesi -7. ve -1. günlerde ve uygulama süresince 1., 3., 5. ve 7. günlerde, OUY deneyi grubundaki (6.-10. gruptaki) fareler ötenazi edilmedikleri için bakı süresi uzun tutularak -7., 0., 7, 14., 21. günlerde yumurta sayılarındaki % azalmanın hesaplanabilmesi için selofan bant üzerindeki parazit yumurtalarının aritmetik ortalamaları karşılaştırılmıştır. Bu yöntemi uygulamak için farenin rektumuna 10-15 kez yaklaşık 9 cm uzunluğunda selofan bant bastırılıp mikroskop lamı üzerine yapıştırıldıktan sonra, *S. obvelata* yumurtaları sayılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Laboratuvar farelerine perianal bant yönteminin tek başına uygulanışı. **A)** Her bir fare kendi kafesi üzerine alınır. **B)** Ters dolanan selofan bant, 9 cm'lik bant boyunca fare rektumuna 15 kez bastırılır

S. obvelata enfeksiyonunun belirlenmesinde selofan bant yöntemi tavsiye edilmektedir (Hill, Randolph ve Mandrell, 2009). Her bir lamın sağ veya sol uçlarına farelerin numaraları ve tarih yazılarak tüm fareler için lamlar önceden hazırlanmıştır. Her bir lama iki bant sığdırılabildiği için, örneğin, 1 ve 2 nolu farelerin selofan bantları lama yan yana yapıştırılmıştır. Böylece daha az sayıda lama ihtiyaç duyulurken, bandın lama

düzgün bir şekilde yapışması ve yumurtaların doğru şekilde sayılması kolaylaştırılmıştır.

Bu tekniğin uygulanması için selofan bant biraz çekilerek yapışkan yüzey dışa gelecek şekilde bant üzerine tersten dolanmıştır. Tek elle farenin kuyruğundan tutulup farenin ön ayakları ile kafes tellerine tutunması sağlandıktan sonra arka ayaklar yukarıda olacak şekilde hafifçe yukarı kaldırılıp, çok fazla yürümemesi için orta ve yüzük parmakları ile farenin kaidesine hafifçe bastırılarak gövdesi sabit tutulmuş, diğer eldeki selofan bant farenin rektumuna tüm bant boyunca bastırılıp çekilmiştir. Tüm lam uzunluğunu kaplayacak kadar bir alan bu işlem için kullanılmıştır. Fareler bu işlemde hiçbir zarar görmemiş ve rahatsızlık hissetmemiştir. Fareler devamlı hareket ettikleri için bu yöntemin bu şekilde uygulanması daha fazla zaman almasına rağmen hayvan refahı düşünülerek çoğunlukla bu şekilde örnek alınmıştır. Bir makasla kesilen bant lam üzerine düzgün bir şekilde yapıştırıldıktan sonra tüm örnekler Parazitoloji laboratuvarına getirilmiştir. 5x'lik objektifte numaranın olduğu noktadan başlanarak lam boyunca, muz biçimindeki *S. obvelata* veya daha küçük olan *S. muris* yumurtaları araştırılıp görülen yumurtalar sayılmıştır. Bir bant 3 parçaya bölünerek taranmıştır. Aynı alanın tekrar sayılmamasına dikkat edilmiştir. Bazı preparatlar iki veya üç tekrarlı olarak sayılmıştır. Bazı parazit yumurtalarının resimleri Olympus marka mikroskopta çekilmiştir. Preparatlar Parazitoloji laboratuvarında saklanmaktadır.

3.8.6. Gaita örneklerinin toplanması

Fekal flotasyon yönteminin uygulanması için uygulama yapılacak tüm fareler ayrı kafeslere alınmış ve deney süresince her bir kafeste tek bir fare tutulmuştur. Kafesler numaralandırıldıktan sonra özüt uygulamasından önce en az iki kez fekal flotasyon yöntemi ile enfekte farelerin enfeksiyonunun devam ettiği kesinleştirilmiştir. Her bir farenin kafesinden pens ile gaita materyalleri toplanmıştır. Fareler hayvan refahı düşünülerek daima talaş içinde bakılmıştır. Fekal örnekler talaşlar içinden araştırılarak tek tek alınmış ve önceden her bir farenin numarasına göre numaralandırılmış steril plastik numune kaplarına konularak veya etiketli naylonlar içine sarılarak deney hayvanları merkezinden Parazitoloji laboratuvarına taşınmıştır.

3.8.7. Fekal örneklerin düşen helmintler açısından incelenmesi

A. annua n-hekzan özütü için yapılan deneyde, deney süresince -7,-1, 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde 36 farenin her birinin kafeslerinden ayrı ayrı alınan fekal örnekler düşen helmintler açısından araştırılmıştır. Fekal materyal plastik kaplar içinde açılarak hassas terazide tartılmıştır. Her bir fareden toplanan gaita ağırlığı yaklaşık birer gr'dı. Bu örnekler bekletilmeden tuzlu su ilave edilmiş ve helmint bulunup bulunmadığını anlamak için stereomikroskop altında incelenmiştir. Gaitada bulunan helmintler lam üzerine alınarak ışık mikroskobunda teşhis edilmiştir. Bu helmintler resimleri çekildikten sonra %70'lik alkol içerisine alınmış, sonrasında lam üzerinde gliserine gömülüp daimi preparat haline getirilerek Parazitoloji laboratuvarında muhafaza edilmiştir.

3.8.8. Fulleborn tekniği ile yüzdürme (flotasyon) yöntemi

Öncelikle her bir fareye ait gaita örneği darası alınmış kağıt üzerinde hassas terzide tartılarak gaita ağırlıkları deftere kaydedilmiştir. Fekal örnekler her bir fare numarası ile numaralandırılmış plastik bardaklara alınmıştır. Fekal flotasyon için daha önceden hazırlanıp soğutulan doymuş tuzlu su solüsyonu kullanılmıştır. Bu solüsyon hazırlanırken bir litre suya 450 gr yemek tuzu ilave edilerek iyice karıştırılarak kaynatılıp süzölmüştür. Gaita üzerine doymuş tuzlu sudan azar azar ilave edilerek, plastik bagetle süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyon tel süzgeç yardımıyla başka bir kaba süzölüp, kapta 1-2 cm'lik boşluk kalacak şekilde tuzlu su ilave edilmiştir. Üzerine yüzecek biçimde 2 lamel atılarak 15-20 dakika beklenilmiştir. Lamel pens ile su yüzeyine paralel kaldırılıp, damlanın düşmemesine dikkat edilerek lam üzerine yerleştirildikten sonra mikroskopta 5x ve 10x büyötmelerde incelenmiştir (Kasım, 1994). Her bir fareye ait gaita örneğinde görölen parazitler, parazit yumurta türleri ve her bir türe ait yumurta sayıları her gün için ayrı tarih atılan deftere kaydedilmiştir. *A. tetraptera* ve *S. obvelata* yumurtalarının sayıları bir tablo oluşturulması için kullanılırken bunların dışında kalan değişik yumurtalar ve ektoparazitler de resimleri çekilerek not edilmiştir. Her bir fareye ait gaita örneğinde 1 gr'daki kılkurdu yumurta sayılarının hesaplanabilmesi için fekal flotasyonda iki lamel

üzerindeki toplam kılkurdu yumurta sayısı, tartım sonucu bulunan gaita ağırlığına bölünmüştür.

3.8.9. Santrifüj kullanılarak parazit yumurtalarının sayılması

Her bir fareye ait gaita numunesi stereomikroskopta incelendikten sonra tuzlu su solüsyonu ile ezilip karıştırılmıştır. Solüsyonun hazırlanması için bir litre kaynar suya 250 gr yemek tuzu ve 250 gr toz şeker atılıp iyice karıştırıldıktan sonra süzölmüştür. Plastik kap içinde bu solüsyon ile yumuşatılan gaita ezilerek dağıtılmış ve tel süzgeçten ikinci numune kabına geçirilmiştir. Her bir bakıda yaklaşık 18 fareye ait numune incelenmiştir. Plastik kaplardan huni vasıtasıyla plastik santrifüj tüplerine geçirilmiştir. Doymuş şekerli tuzlu su solüsyonu sıvı yüzeyde bombe yapana kadar ilave edilmiştir. 2 dk. 1200 rpm devirde santrifüj edilmiştir. Yüzeydeki kısımdan damlalık ile bir damla lam üzerine alınarak 5x büyütmede *A. tetraptera* ve *S. obvelata* yumurtaları sayılmıştır (Şenlik, 2006). Bu yönteme alternatif bir modifikasyonla bazı bakılarda santrifüj tüpü ağzına kadar süspansiyon ile doldurulduktan sonra tüpün tıpası kapatılmadan selofan bant ile örtölmüş ve tuzlu su ile santrifüj sonrasında bu bant lam üzerine yapıştırılarak yumurtalar sayılmıştır. Santrifüj uygulaması yapılan tüm örnekler aynı zamanda fekal flotasyonun yüzdürme yöntemi ile de bakılmış ve yumurta sayıları karşılaştırılmıştır. Yüzdürme yönteminde daha fazla parazit yumurtası sayıldığı için yüzdürme yöntemi diğer bakılar için de tercih edilmiştir.

3.8.10. Direkt bakı yöntemi ile parazit yumurtalarının sayılması

Fekal flotasyon için yeterli zaman olmadığı ve yumurta sayımının yalnızca enfeksiyonun belirlenmesi için yapılacağı bazı durumlarda lam üzerine alınan bir damla su üzerine gaitadan alınan pirinç tanesi büyüklüğündeki bir parça dağıtılarak 5x'lik objektifte incelenmiştir. Buradaki görüntü daha bulanık olduğu ve yumurta sayısı flotasyona kıyasla daha az olduğu için bu yöntem yumurta sayımı amacıyla kullanılmamıştır.

3.9. Nekropside Helmintlerin Tespiti

A. annua n-hekzan özütünün etkisinin araştırıldığı gruplardaki (1-5. Gruplar) fareler 8. gün Sevofluron anestezisi altında kalpten kan alınarak ötanazi edilmiştir. Her bir fare karın tarafı yukarı gelecek şekilde yatırılarak anüsten anteriöre doğru makasla açılmıştır. Farelerin beyin, pankreas ve üreme organları dışında kalan tüm iç organları (özafagus, akciğerler, mide, karaciğer, böbrekler, kalp ve bağırsaklar) tek tek açılarak içinde tuzlu su veya %70'lik alkol bulunan petri kaplarına alınmış ve stereomikroskop altında incelenmiştir. Bu organlardaki helmintler fırça, damlalık ve iğne ucu yardımıyla toplanmış ve %70'lik alkol bulunan etiketli vialler içine alınmıştır. Her bir vial üzerine, toplandıkları tarih, helmint türü, alındıkları fare numarası ve alındıkları organ adı yazılmıştır.

Bitki özütlerinin helmintler üzerindeki etkisinin cinsiyete göre değişip değişmediğinin saptanması için nematodlar cinsiyetlerine göre ayrılarak toplam dişi ve erkek helmintlerin sayıları belirlenmiştir. Işık mikroskopunda incelenmeye uygun olan helmintler gliserinli su içinde Nikon marka ışık mikroskopunda tür teşhislerinin yapılması ve resimlerinin çekilmesi için kullanılmıştır.

Tüm helmintler alındıkları fare numaralarının yazılı olduğu lamalar üzerinde sabitlenerek daimi preparat haline getirilmiştir. Gliserinin lam ile lamel arasına girebilmesi için lamelin bir ucundan kurutma kâğıdı ile alkollü su çekilirken diğer ucundan gliserin yavaşça damlatılarak lamelin arasına dolması ve alkollü su ile yer değiştirmesi sağlanmıştır. Bundan sonra yine kurutma kâğıdı ile lamel üzeri ve çevresindeki fazla malzeme temizlenip lamel kenarlarına şeffaf oje sürülerek kurumaya bırakılmıştır.

Tüm preparatlar Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Parazitoloji laboratuvarında muhafaza edilmektedir.

3.10. Eritrosit-Lökosit Sayımı

A. annua n-hekzan özütlerine ait 3 grupta (*A. annua* n-hekzan özütü 600 mg/kg doz, saf mısır yağı 2 ml, mısır yağında süspansiyeye edilen 5 mg/kg Albendazole gruplarında) eritrosit lökosit sayımı yapılmıştır. Kalpten alınan kanlar, her biri için iki ependorf tüpünde toplanmıştır. İçinde EDTA olan tüpteki kanlar eritrosit-lökosit sayımı için kullanılırken boş tüpler ise serum elde edilmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.11. İstatistiksel Analiz

A. annua uygulama gruplarında fekal flotasyonda sayılan parazit yumurtalarının, selofanda sayılan *S. obvelata* yumurtalarının ve nekropside bulunan helmintlerin, OUY uygulama gruplarında selofan bantta sayılan yumurta sayılarının değişimlerinde tedavi türü ve haftalara göre anlamlı bir fark olup olmadığının anlaşılması için öncelikle normallik analizi yapılarak, kullanılabilecek posthoc teste karar verilmiştir. Normalitenin belirlenmesi için Shapiro Wilk testinin sonuçları kullanılmıştır. Varyansın homojenliğinin belirlenebilmesi için Levene istatistiği sonucuna bakılmıştır. Parazit yumurta sayılarının ortalamalarının karşılaştırılması için SPSS programı ile Kruskal Wallis non-parametrik one way ANOVA analiz metodu, nekropside bulunan helmintlerin uygulama gruplarındaki ortalamalarının karşılaştırılması için ise Tamhane-T2 testi ve ayrıca Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. $P < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

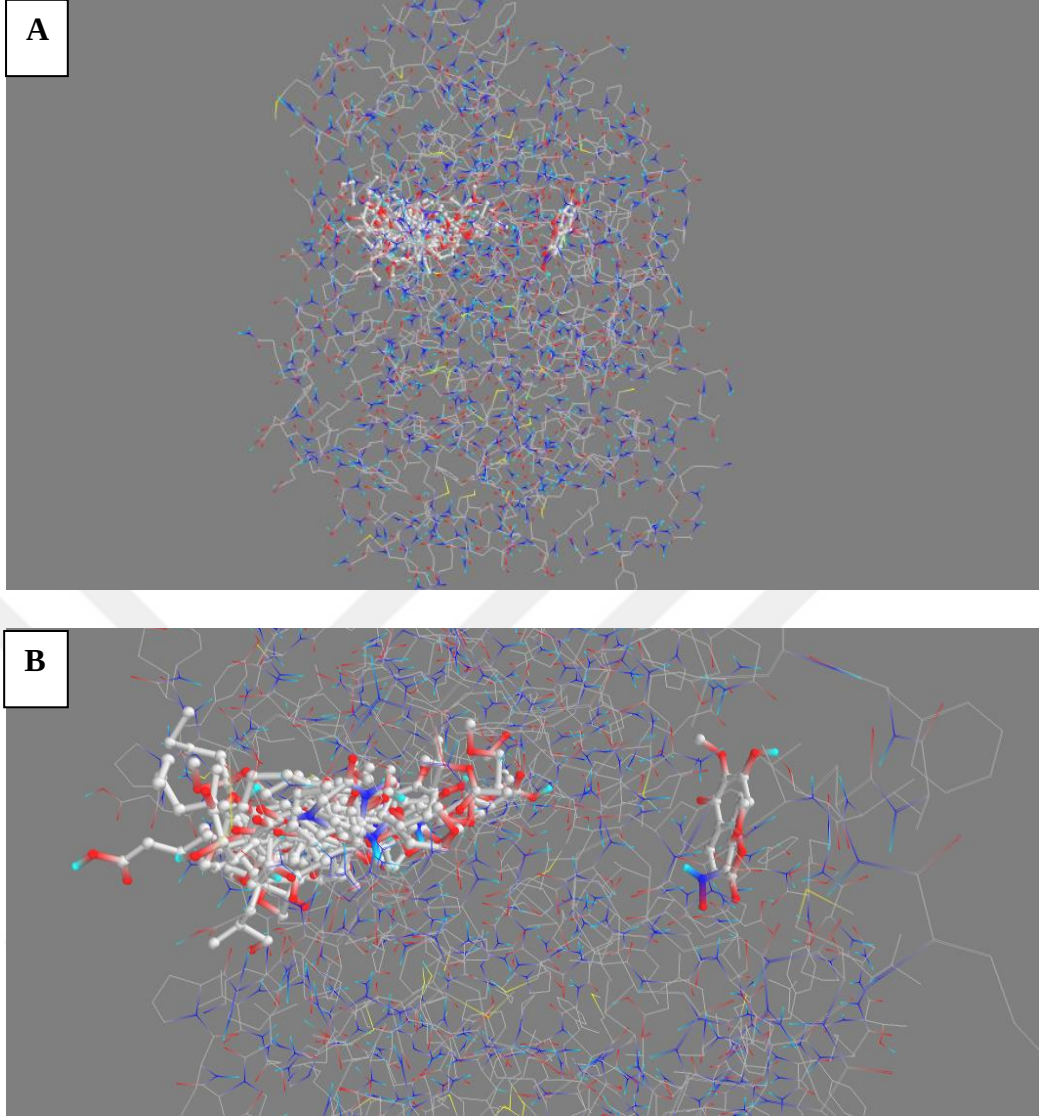
4. BULGULAR (BULGULAR ve TARTIŞMA)

4.1. Bitkisel Ligandların Sanal Görüntüleme Sonucu

İlaç tasarımı sanal görüntüleme (virtual screening), milyonlarca bileşenden oluşan çok geniş ligand veritabanlarının taranması için en ideal yöntemlerden biridir. Bu çalışmada, AutoDock4.2 ile karşılaştırılma yapılabilmesi amacıyla 55 liganddan bazıları öncelikle AutoDock Vina ile taranmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında Vina programı ile bulunan serbest bağlanma enerjilerinin AutoDock4.2 ile bulunanlar kadar iyi olmadıkları görülmüş ve bu nedenle diğer tüm kenetleme prosedürlerinde, başarılı sonuçlar veren iyi bir skorlama fonksiyonu kullanan AutoDock4.2 tercih edilmiştir. İlerleyen sayfalarda görülebileceği gibi AutoDock4.2 ile yapılan kenetleme simülasyonları ilaçların gerçek etkileri ile paralel sonuçlar vermiş ve bu sonuçlar kenetlemelerin doğruluğunu işaret etmiştir. Bu nedenle bu çalışmadaki *in silico* sonuçlar yeni antihelmintikler geliştirmek için çalışan araştırmacılara önemli veriler sağlayacaktır.

Sanal görüntüleme sonucunda iki kumarin türevi dışındaki tüm ligandların yaklaşık olarak aynı bölgede ve aynı doğrultuda konumlandıkları görülmektedir (Şekil 4.1 A). Şekildeki iki kumarin türevi ise hem doğrultu hem konum bakımından farklı bir açıya sahiptir (Şekil 4.1 B). Bu kenetleme simülasyonunda, proteinin bağlı halde bulunduğu ABZ molekülü grid merkezine alınmıştır ve hemen hemen aynı bölgede konumlanan ligandların enerji hesaplamaları sonucunda +18,5 kcal/mol ile -7,4 kcal/mol arasında serbest bağlanma enerjisi (ΔG) değerleri gözlenmiştir. Bu ligandlardan kukurbitasin-B ve krisoplenolün, *Haemonchus contortus* β -tubulin (Hc β -tubulin) için inhibitör özelliklerinin olmadığı anlaşılmıştır.

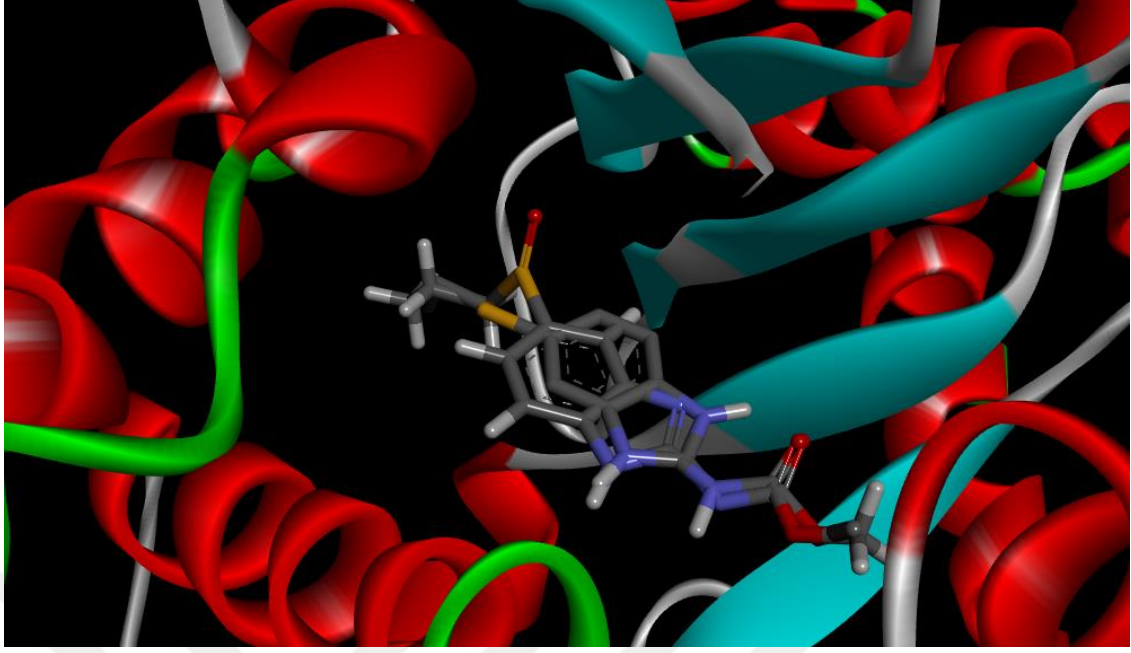
Vina sonuçları genel olarak ele alındığında, Hc β -tubulin inhibisyonu açısından bulunan ΔG değerleri içerisinde anılmadan geçilemeyecek ikisi, mebendazol ve 9,12,15-oktadekantrienoik asit metil ester (ODTAME) için bulunan -5,2 kcal/mol ve -7 kcal/mol değerleridir ki bu iki ligand aslında Hc β -tubulin için en iyi sonuçları veren ligandlardır ancak Vina bunu farklı tahmin etmiştir.



Şekil 4.1. Bitkisel ligandların Hcβ-tubulin içindeki konumlanmaları. **A)** Genel görünüm **B)** Yakınlaştırılmış görünüm

4.2. Bitkisel Ligandların AutoDock4.2 Yazılımı ile Kenetleme Sonuçları

Bitkisel ligandların kenetleme deneyine geçilmeden önce *in silico* deneyin doğruluğunu test edebilmek amacıyla Hcβ-tubulin içindeki doğal ligandı ABZ ile rekenetleme işlemi yapılmıştır. Zanglag web sunucu hizmetlerinden biri olan DockRMSD (Bell ve Zhang 2019) aracı kullanılarak RMSD 1,564 Å olarak hesaplanmıştır. Bulunan bu değere göre kenetleme simülasyonunun doğruluğu anlaşılmıştır. Şekil 4.2’de görüldüğü gibi ABZ’ler çakışık bir durumda konumlanmıştır.



Şekil 4.2. Hcβ-tubulin proteini (PDB Kodu:1oj0) ve ABZ ile kontrol kenetleme deneyi sonucu ligandların çakışık konumu. Okside ABZ molekülü 1oj0 içindeki ligandı (üstteki molekül) ve kenetleme simülasyonu ile bağlanma bölgesine yerleştirilen normal ABZ molekülü (alttaki molekül)

A. annua, *M. charantia*, *R. canescens* ve *O. vulgare* subsp. *hirtum* türlerinde bulunabilecek bitkisel ligandlar daha önce literatürden araştırılmış ve seçilmişti. Bu ligandların antihelmintik etkilerini araştırabilmek için antinematodal hedefler oldukları bilinen proteinler (FR enzimi, β-tubulin ve KPT 2 enzimi) ve ayrıca antinematodal bir etkiyle bağlantılı olabileceği tahmin edilen bazı enzim ve reseptörler (SoCOX1, SoCOX2 enzimi ve CeGLUT1 kanalı) ile *in silico* kenetleme araçları kullanılarak Amber kuvvet-alanı tabanında kenetlendiler. Bu ligandların yanı sıra, piyasada en sık başvuru alan antihelmintikler de aynı yöntemle kenetlenerek serbest bağlanma enerjileri ve inhibisyon katsayılarının hesaplanması yoluyla hem kullanılan parametrelerin doğruluğu hem de ilaçların bu proteinlere olan bağlanma ilgileri açısından araştırıldı. Tüm bu ligandların *H. contortus* β-tubulin proteini (1OJ0), rat karnitin palmitoil transferaz 2 enzimi (2H4T) ve *A. suum* fumarat redüktaz enzimi (4YSX) ile AutoDock 4.2 yazılımı kullanılarak kenetleme sonuçları aşağıdaki Çizelge 4.1’de verilmiştir. Çizelge 4.1’de her bir ligandın kenetleme simülasyonları sonucu hesaplanan inhibisyon sabiti (K_i) değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Ligandların hedef proteinler ile kenetleme sonucu K_i değerleri

Molekül	1OJ0 K_i (nM)	2H4T K_i (nM)	4YSX K_i (nM)
ABZ	225,44	9 130	87 690
Ivermectin		0,29	
MBZ	1,09	4,6	96,25
Piperazine	246 090	178 530	52 170
Praziquantel	902 330	42,51	555,35
Karantadiol-A	-	2,06	16,6
Momordisin I	-	11,59	1 980
Momordisin II	-	0,072 69	40,78
Kuguasin-J	-	8,06	1 640
Karavilagenin-D	-	8,77	141,17
Kukurbitasin-B	-	0,057 11	5,31
α -Pinen	22 500	32 890	374 820
α -Terpinen	10 300	41 190	326 840
α -Tujen	13 960	34 460	85 810
β -Karyofilen	873,99	1 190	32 850
γ -Terpinen	10 310	42 970	288 340
Mirsen	36 210	101 540	891 000
Borneol	15 060	9 780	167 750
Terpinen-4-ol	6 730	12 850	86 610
<i>p</i> -Simen	37 390	134 630	1 030 000
Timol	26 020	84 850	438 160
Karvakrol	22 480	73 840	477 120
Diosmetin	31,13	12,72	88,95
Apigenin	13,23	36,26	369,08
Oreganol	24,32	0,137 8	1,9
Eriodiktyol	94,95	12,94	124,2
Eriositrin	-	663,49	14 130
Linalool	8 960	13 430	120 960
Luteolin	60,09	22,59	161,45
Krisoeriol	32,84	11,86	337,21
Artemisinin	6 370	255,16	18 710
Artemetin	140 870 000	10 750	37 710
Artemisinik asit	7 380	5 590	26 250
Deoksiartemisinin	2 820	476,99	41 280
Friedelin	-	13,07	1 280
Arteannuin-B	14,93	170,29	1 850
Stigmasterol	-	9,43	673,11
Skopoletin	158,57	962,7	4 990
Kuersetin	146 930	8 530	41 860
Kamfen	33 020	30 900	317 190
Kamfor	26 120	14 060	253 310
Krisosplenetin	4 820	17,68	151,64
Krisosplenol-D	5 740	24,12	187,45

Çizelge 4.1. Ligandların hedef proteinler ile kenetleme sonucu K_i değerleri (devam)

Ökalyptol (1,8-sineol)	15 440	15 970	181 480
İzofraksidin	33,07	512,38	7 030
Sabinen	13 100	32 340	306 470
Skoparon	128,73	1 490	5 740
Spatulenol	785,19	232,16	14 990
Umckalin	78,21	600,35	2 530
Diizooktil fitalat	2 880	1 380	8 640
2-furankarboksaldehid	29 670	25 640	8 280
Hekzadekanoik asit metil ester (Metil palmitat)	13 720	62 200	1 340 000
9,12,15-oktadekantrienoik asit metil ester (ODTAME)	18,71	1 410	29 140
Ellajik asit	145 840 000	6 160	44 010
Gallik asit	817 360	142 750	1 780 000

Kenetlenen ligandların hesaplanan serbest bağlanma enerjisi (ΔG) Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge.4.2. Ligandların hedef proteinler ile kenetleme sonucu ΔG değerleri

Molekül	1OJ0 ΔG (kcal/mol)	2H4T ΔG (kcal/mol)	4YSX ΔG (kcal/mol)
ABZ	-9,07	-6,87	-5,53
Ivermectin	1,25E+03	-13,01	8,98
MBZ	-12,23	-11,37	-9,57
Piperazine	-4,92	-5,11	-5,84
Praziquantel	-4,15	-10,06	-8,53
Karantadiol-A	18,06	-11,85	-10,61
Momordisin I	26,17	-10,83	-7,78
Momordisin II	72,67	-13,83	-10,08
Kuguasin-J	14,54	-11,04	-7,89
Karavilagenin-D	21,91	-10,99	-9,35
Kukurbitasin-B	17,9	-13,97	-11,29
α -Pinen	-6,34	-6,12	-4,67
α -Terpinen	-6,8	-5,98	-4,76
α -Tujene	-6,62	-6,09	-5,55
β -Karyofilen	-8,27	-8,08	-6,12
γ -Terpinen	-6,8	-5,96	-4,83
Mirsen	-6,06	-5,45	-4,16
Borneol	-6,58	-6,83	-5,15
Terpinen-4-ol	-7,06	-6,67	-5,54

Çizelge.4.2. Ligandların hedef proteinler ile kenetleme sonucu ΔG değerleri (devam)

<i>p</i> -Simen	-6,04	-5,28	-4,07
Timol	-6,25	-5,55	-4,58
Karvakrol	-6,34	-5,64	-4,53
Diosmetin	-10,24	-10,77	-9,62
Apigenin	-10,75	-10,15	-8,78
Oreganol	-10,39	-13,45	-11,9
Eriodiktyol	-9,58	-10,76	-9,42
Eriositrin	+15,66	-8,43	-6,62
Linalool	-6,89	-6,65	-5,34
Luteolin	-9,85	-10,43	-9,27
Krisoeriol	-10,21	-10,81	-8,83
Artemisinin	-7,09	-8,99	-6,45
Artemetin	-1,16	-6,78	-6,03
Artemisinik asit	-7,01	-7,17	-6,25
Deoksiartemisinin	-7,57	-8,62	-5,98
Friedelin	72,37	-10,76	-8,04
Arteannuin B	-10,68	-9,23	-7,82
Stigmasterol	5,17	-10,95	-8,42
Skopoletin	-9,28	-8,21	-7,23
Kuersetin	-5,23	-6,92	-5,97
Kamfen	-6,11	-6,15	-4,77
Kamfor	-6,25	-6,62	-4,91
Krisosplenetin	-7,25	-10,58	-9,3
Krisosplenol-D	-7,15	-10,39	-9,18
Ökaliptol	-6,56	-6,54	-5,1
İzofraksidin	-10,21	-8,58	-7,03
Sabinen	-6,66	-6,13	-4,79
Skoparon	-9,4	-7,95	-7,15
Spatulenol	-8,33	-9,05	-6,58
Umckalin	-9,7	-8,49	-7,64
Diizooktil fitalat	-7,56	-8	-6,91
2-furankarboksaldehid	-6,18	-6,26	-6,93
Hekzadekanoik asit metil ester (metil palmitat)	-6,63	-5,69	-3,92
9,12,15-oktadekantrienoik asit metil ester (ODTAME)	-10,54	-7,98	-6,19
Ellajik asit	-1,14	-7,11	-5,94
Gallik asit	-4,21	-5,25	-3,75

Çizelge 4.2'deki sonuçlara göre küçük moleküllerin kenetleme sonuçları düşük skor değerleri göstermiştir. Bu moleküllerin bazıları (karvakrol, timol, ellajik asit ve bir ilaç olarak piperazine) antihelmintik olmalarına rağmen, serbest bağlanma enerjisinin

hesaplanmasında kullanılan formüller açısından yeterli sayıda etkileşim yapmadıklarından dolayı kenetleme sonuçları moleküllerin bu üç proteine afinitelerini düşük göstermiştir. Diğer bir ihtimal de bu moleküllerin başka reseptör veya proteinlere bağlanmasıyla antihelmintik etkinin ortaya çıkıyor olmasıdır.

MBZ'nin helmintlerde bulunan β -tubulini inhibe ettiği bilinmektedir. Bu çalışmada MBZ'nin Hc β -tubulini inhibisyonu 1 nM düzeyde bulunmuştur ve bu sonuç literatürle uyumludur. Ayrıca diğer iki protein için de (KPT 2 için 4,6 nM ve AsFR için 96,25 nM inhibisyon sabiti (K_i) değerleri ile) iyi bir afiniteye sahip bulunmuştur.

Çizelge 4.1'deki sonuçlar IVC'nin antinematodal olduğunu *in silico* olarak da göstermektedir. Bunun dışında IVC, Hc β -tubuline ve AsFR'a bağlanmamaktadır ve bu sonuç IVC'nin GABA ve glutamat geçişli klorid kanallarının agonisti olmasıyla örtüşmektedir. Dikkat çekici olan ise IVC'nin rat KPT 2 enzimine 290 pM K_i değeri ile çok iyi bir afiniteye sahip bulunmuş olmasıdır. Rat KPT 2 enzimi *Onchocerca linealis* türü için hedef bir enzim olarak literatürde işaret edildiği (Tyagi ve diğerleri, 2018) ve IVC *O. volvulus* tedavisinde kullanılan tek ilaç olduğu için bu sonuç çalışmadaki *in silico* deneyin literatürle uyumlu ve önemli veriler sağladığını göstermektedir.

ABZ ve MBZ benzer etkili benzimidazol türevleri olmalarına rağmen ABZ'nin KPT 2 ve AsFR enzimlerine ilgisi MBZ'den farklı bulunmuştur. ABZ'nin Hc β -tubulin inhibisyonu beklendiği gibi nanomolar düzeyde bulunurken KPT 2'ye karşı yaklaşık 9 μ M ve AsFR'ye karşı 87,7 μ M K_i değerlerine sahip bulunmuştur. Bu sonuç, ABZ'nin öncelikli olarak nematoddaki β -tubulini inhibe ettiğini ve ayrıca diğer iki hedef enzime de bağlanabildiğini *in silico* olarak göstermiştir.

AutoDock4.2 sonuçlarına göre kukurbitasin-B, momordisin II ve oreganol, pM düzeyde rat KPT 2 enzimini inhibe etmektedir. Bu moleküllerden kukurbitasin-B, 2H4T pdb kodlu KPT 2 enzimine karşı 57,11 pikomolar (pM) gibi fevkalade iyi bir K_i değerine sahip bulunmuştur. 57,11 pM nadiren bulunabilecek elzem bir sonuçtur ve molekülün çok önemli bir antihelmintik potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Piperazine Çizelge 4.2'deki diğer dört ilaca kıyasla küçük bir molekül olduğu için hedef proteinlerle pek fazla kimyasal bağ oluşturmamış ve AutoDock4.2 ile hesaplanan K_i değerleri yüksek bulunmuştur. Piperazine piyasada sık başvurulanan ilaçlardan olmasına rağmen kenetleme sonuçları antihelmintik olduğunu göstermemiştir. Bunun temel sebebi piperazinin bir GABA agonisti olmasıdır. PZQ antitrematodal ve anticestodal bir ilaç olarak kullanılmaktadır ve kenetleme sonuçları antinematodal olabileceğini de göstermiştir. Çizelgede gösterildiği gibi PZQ'nın rat KPT 2 enzimine karşı -10,06 kcal/mol serbest bağlanma enerjisine ve 42,51 nM gibi oldukça düşük bir konsantrasyonda inhibisyona sahip olacağı tahmin edilmiştir. Bu ilaç AsFR'a da 555,35 nM K_i değerine sahip bulunmuştur. İlaçlar için bulunan bu *in silico* değerler, doğru hedef proteinlerin seçilmesi ve doğru parametrelerin kullanılması durumunda, beş ilaçtan dördünün antinematodal etkisinin hesaplamalı yöntemlerle doğrulanabildiğini göstermektedir. Piperazin GABA agonisti olduğu ve normal biyolojik şartlarda da bu enzimleri inhibe etmediği için, bu çalışmada bulunan sonuçlar kenetleme prosedürünün doğruluğuna işaret etmekte ve literatür ile örtüşmektedir.

Çizelge 4.1'deki monoterpenoidlerin büyük bir kısmı (β -karyofilen dışında kalan hepsi) bu üç hedef proteine μ M ve mM düzeyde K_i değerleri ile bağlanabilmektedir. Bu monoterpenoidlerden α -pinen, α -terpinen, α -tujen, γ -terpinen, mirsen, borneol, terpinen-4-ol, p-simen, timol ve karvakrol Prof. Dr. Mine Kürkçüoğlu tarafından *O. vulgare* subsp. *hirtum* uçucu yağında (OUY) saptanmıştır (henüz yayınlanmamış çalışma). Bu moleküllerin inhibisyon sabitleri birbirilerine yakın değerlerde bulunmuştur. Hc β -tubuline karşı bu değerler yaklaşık olarak 20 μ M civarında iken, KPT 2'ye karşı 30 μ M ve AsFR'ye karşı ise 300 μ M civarındadır. Kamfor, kamfen ve ökaliptol gibi monoterpenoidler ise *A. annua*'da bulunabilen bileşenlerdir ve benzer yapılarıyla paralel olarak benzer inhibisyon değerleri göstermişlerdir. ΔG tablosunda monoterpenler için gösterilen enerji değerlerinin birbirine yakın olmaları yapı-aktivite ilişkisi konusunda bir fikir vermiştir. İnhibitör aday moleküllerin geniş spektrumlu antihelmintik etki gösterebilmeleri için tek halkalı ve hidroksil grupları içeren yan zincirlere sahip olmaları yeterli olmamaktadır. Hidroksil grubunun monosiklik yapı üzerindeki konumu bağlanma enerjisi üzerinde önemli bir değişime neden olmamaktadır. Bu durum, izomer olan timol ve karvakrol örneğinde görülebildiği gibi, γ -terpinen ve α -terpinen örneğinde

de görülebilir. Bu izomer ikililerin ΔG değerleri birbirine oldukça yakın bulunmuştur. Çizelge 4.1'deki monoterpenlerin bağlanabilmesi için fazlasıyla geniş bir bağlanma kavitesine sahip olan AsFR, KPT 2 ve β -tubulin proteinlerinin inhibisyonunda, hem en azından bisiklik veya tetrasiklik kor yapısı hem de oksijen veya kükürt içeren dallı yan gruplar tercih edilmelidir. Çizelge 4.1'deki değerler, monoterpen iskeletinin ilaç hedefi olarak daha küçük bağlanma kavitesine sahip olan enzim veya reseptörlere uyabileceğini ve bu nedenle GABA agonisti olup olmayacaklarının da *in silico* olarak araştırılabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar monoterpen iskeletinin benzimidazoller veya makrosiklik laktonlardan farklı bir aksiyon mekanizmasına sahip olduğunu göstermiştir.

Çizelgede 4.1'de en dikkat çekici sonuç *M. charantia*'da bulunan bileşenlerin tümünün Hc β -tubulini inhibe etmiyor olmasıdır. Bu bileşenler karantadiol-A, momordisin I ve II, kuguasin-J, karavilagenin-D ve kukurbitasin-B'dir. Bunlardan ikisi (kukurbitasin-B ve momordisin II) ise bu çalışmada en yüksek skor değerine sahip olan ve dolayısıyla antihelmintik açıdan en potent bulunan iki bitkisel ligandır. Momordisin II 72,69 pM K_i değeriyle bu çalışmada denenen elli bitkisel ligand içinde en iyi inhibisyon skoruna sahip ikinci ligandır. Öyle ki bu fevkaleden iyi inhibisyon derecesiyle, denenen beş sentetik ilaçtan daha iyi bir sonuç göstermiştir. 2H4T'ye (KPT 2 enzimine) karşı çok iyi bir bağlanma enerjisine sahip olması beklenen IVC her ne kadar 290 pM değerle gerçekten çok başarılı bir inhibisyon yeteneği göstermiş olsa da momordisin II ve kukurbitasin-B bu ilaçtan bile iyi bir bağlanma ilgisi göstermiştir.

Bir diğer önemli sonuç *M.charantia* içeriğindeki bu altı bitkisel ligandın da çok iyi inhibisyon sabitlerine sahip bulunmuş olması dolayısıyla bu bitkinin yağ bazlı çözücülerde hazırlanacak ekstraktının bitkisel bir ilaç olarak kullanımının çok etkili olabileceğidir. Bu altı liganddan dördü (karantadiol-A, momordisin II, karavilagenin-D ve kukurbitasin-B) bir diğer önemli antinematodal hedef olan AsFR enzimine karşı da nanomolar düzeyde etki göstermektedir. Bu arzu edilen sonuç, *M. charantia*'ya ait bu triterpenoidlerin çift eylemli ilaç geliştirilmesinde değerlendirilebileceğini göstermiştir. Bu sonuçlar gerçekten de yeni ve piyasadaki ilaçlardan daha etkili bir antihelmintik geliştirilmesi için ihtiyaç duyulan bilgileri sağlamıştır. Gelecekte üretilecek en etkili

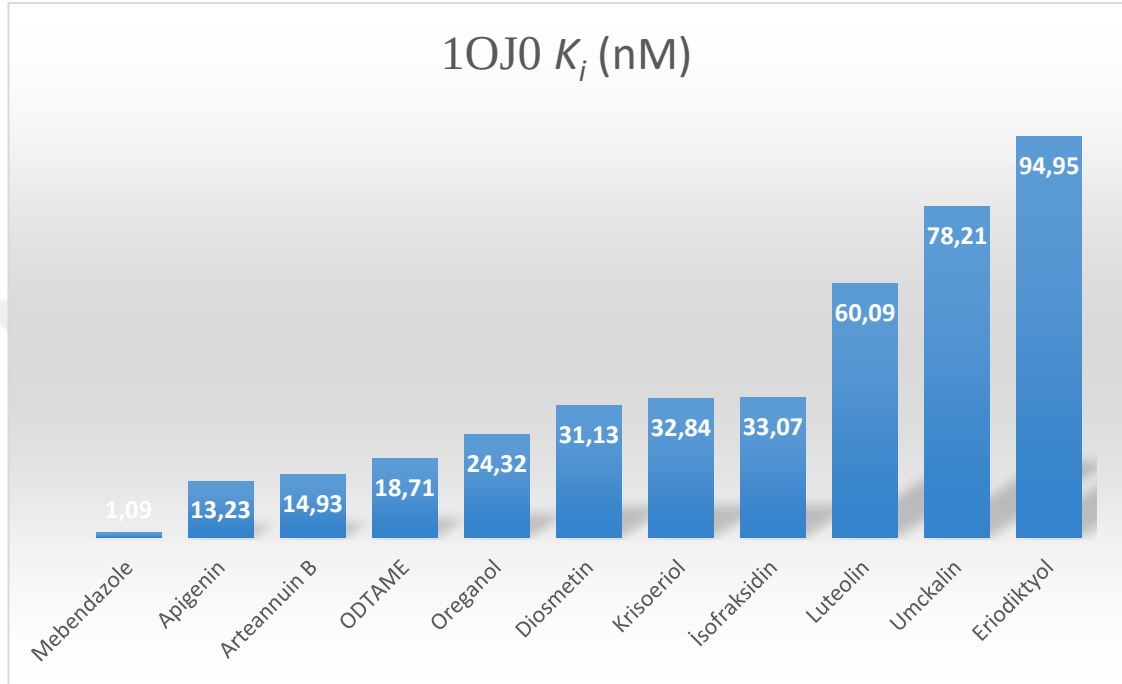
antihelmintiklerden bazıları kukurbitanlar temelinde olacaktır. Bugün için en etkili antihelmintik sınıfları olan benzimidazoller ve makrosiklik laktonlara önümüzdeki senelerde kukurbitanlar sınıfı da eklenecektir. Bunun için gerekli olan *in silico* bilimsel verilere ise ilk kez bu çalışmada ulaşılmıştır.

Çizelge 4.1’de gösterilen moleküllerden *M. charantia*’da bulunanların tümünde steroid yapıda bir çekirdek olduğu gibi bu yapı friedelin ve stigmasterolde de mevcuttur. Bu nedenle bu iki molekülün de kenetleme sonuçları kukurbitan halka içeren *M. charantia* bileşenleri ile benzer bulunmuştur. *In silico* deneyde, bu iki molekül Hc β -tubulini inhibe etmemiş ancak KPT 2’yi çok iyi düzeyde inhibe edebilmiştir (stigmasterol için 9,43 nM ve friedelin için 13,07 nM).

O. vulgare subsp. *hirtum* infüzyonunda bulunabilen diosmetin, apigenin, oreganol, eriodiktyol, luteolin ve krisoeriol; *A. annua*’da bulunabilen arteannuin-B, izofraksidin, umckalin ve skopoletin kenetlendikleri her üç protein ile de çok iyi K_i değerleri ile inhibisyon yeteneğine sahip bulunmuştur. Bu nedenle bu moleküller geniş spektrumlu antihelmintiklerin geliştirilmesinde uygun ilaç adaylarıdır. Bu moleküllerin, İstanbul kekiği ve Kâbe süpürgesi’nde bulunmaları, bu iki bitkinin antihelmintik potansiyellerini doğrulamaktadır. Bu moleküllerin yapıları göz önüne alındığında bunların bir kısmı semi-polar tabiâttaki flavonoidler, kumarin türevleri ve sakkarit türevleri, bir kısmı da apolar tabiâttaki terpenler ve bir kısmı da polar tabiâttaki flavanoidler (diosmetin) ve fenoller (oreganol) oldukları için çözücü olarak alkol veya su kullanılabilir. Ayrıca bitkilerin içeriğinin salınabilmesi için yağ bazlı çözücülerde de bekletilebilir.

Hc β -tubulin proteini ile kenetleme simülasyonlarına göre bitkilerde bulunan elli aktif bileşen ve beş ilaç içerisinde en iyi skor değerlerine sahip ilk on bir bileşenin K_i değerleri Şekil 4.3’te gösterilmiştir. Bu bileşenlerden MBZ 1,09 nM ile en düşük K_i değerine sahip bileşendir. Şekil 4.3’e göre ABZ ilk on bir içerisine girememiştir. MBZ, ABZ’ye kıyasla daha etkili bir ilaç olduğu için bu sonuçlar literatür ile uyumludur. Arteannuin-B, izofraksidin ve umckalin her üç proteini de inhibe edebilirken 9,12,15-oktadekantrienoik asit metil ester (ODTAME) bu çalışmaya göre yalnız Hc β -tubulini iyi derecede inhibe edebilmektedir. Hc β -tubulin inhibisyonu açısından apigenin,

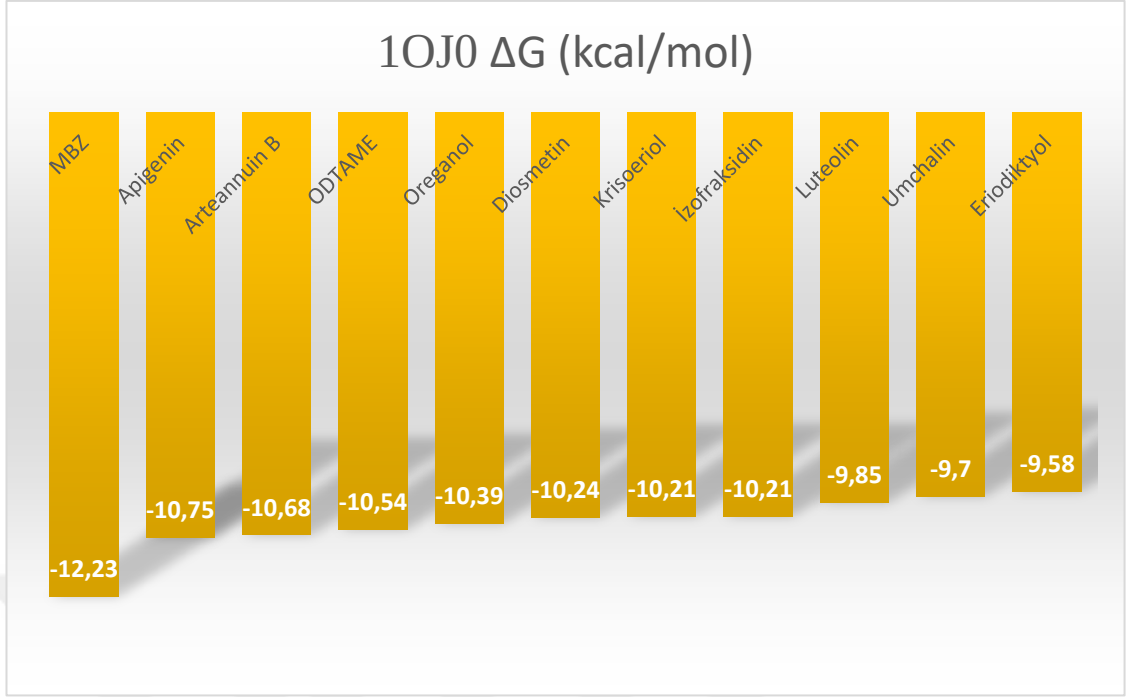
arteannuin-B, 9,12,15-oktadekantrienoik asit metil ester ve oreganol 25 nM’ın altında K_i değerine sahip olan en potent ilk dört bitkisel liganddır. Bunlardan apigenin ve oreganol *O. vulgare* spp. *hirtum*’da, arteannuin-B *A. annua*’da ve 9,12,15-oktadekantrienoik asit metil ester ise *R. canescens* köklerinde bulunmaktadır.



Şekil 4.3. *H. contortus* β -tubulinine karşı en düşük K_i değerlerine sahip ilk on bir molekül

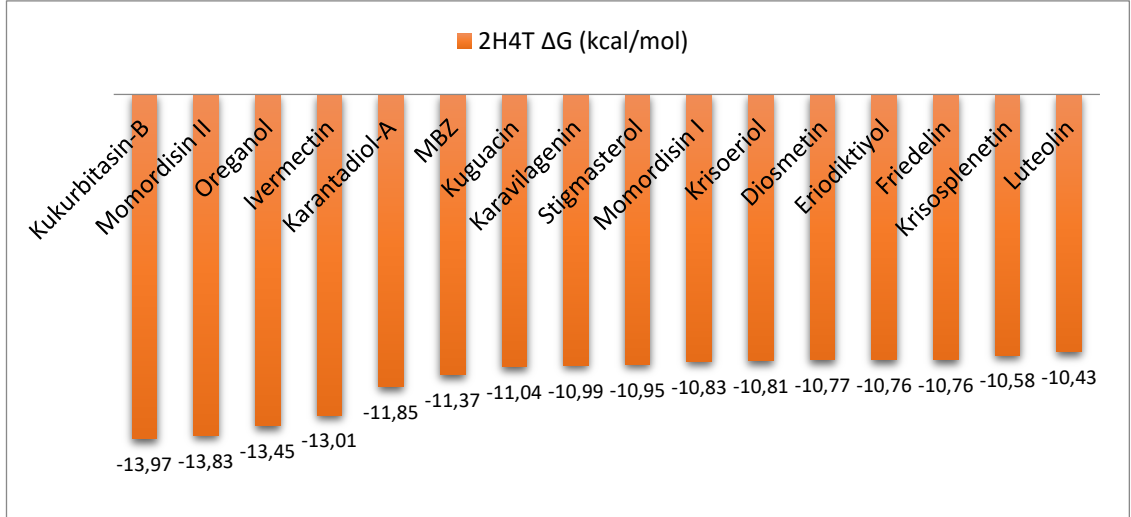
Her ne kadar ilk on bire girmese de bir kumarin türevi olan skoparon da Hc β -tubuline karşı 128,73 nM düzeyde K_i değeriyle potansiyel Hc β -tubulin inhibitörü bitkisel ligandlardan biridir. Başka bir kumarin türevi olan spathulenol ise hem Hc β -tubulini hem de KPT 2’yi nM düzeyde inhibe edebilmektedir.

Şekil 4.4’te sentetik bir benzimidazol türevi olan MBZ’nin önemli bir farkla bitkisel ligandlardan daha düşük serbest bağlanma enerjisine sahip olduğu görülmektedir. MBZ dışındaki on molekülün ortalama ΔG değerleri -10 kcal/mol civarında hesaplanmıştır. Bu moleküllerden üçü *A. annua* L’ye (arteannuin B, izofraksidin ve umckalin), altısı (apigenin, oreganol, diosmetin, krisoeriol, luteolin ve eriodiktyol) *O. vulgare* spp. *hirtum*’a ve biri (9,12,15-oktadekantrienoik asit metil ester) *R. canescens*’e aittir.



Şekil 4.4. Hc β -tubulin inhibisyonu açısından en iyi ΔG değerlerine sahip ilk on bir molekül

Şekil 4.5'te kukurbitasin-B'nin diğer moleküllerden daha yüksek skora sahip olduğu görülmektedir. Çizelge 4.2'deki değerlere göre kukurbitasin-B -13,97 kcal/mol serbest bağlanma enerjisiyle çok önemli bir KPT 2 inhibitörüdür ve aktif bölgede oldukça düşük bir entalpi ile uyumlu bir şekilde konumlanmaktadır. Kenetleme sonuçlarına göre kukurbitasin-B, KPT 2 için uygun bir anahtardır. Bu arzu edilen serbest bağlanma enerjisi kukurbitasin-B'nin çok düşük dozda etkili olacak ideal bir antinematodal ilaç olabileceğini işaret etmektedir.

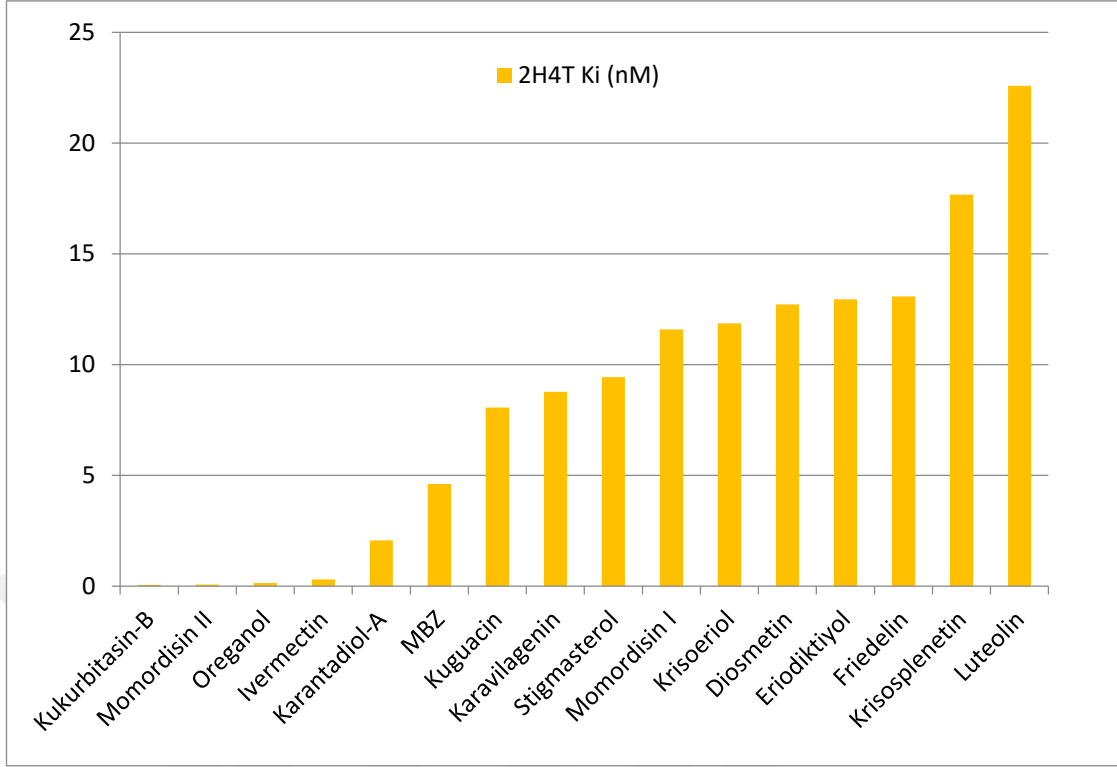


Şekil 4.5. KPT 2 enzimini (PDB ID: 2H4T) en iyi skor değerleriyle inhibe eden ilk yirmi molekülün ΔG değerlerinin karşılaştırılması

Bu sonuç tek ilaç seçeneği olan *Onchocerca volvulus* tedavisinde yeni ve daha etkili bir ilaç adayının hesaplamalı yöntemlerle keşfedildiğini göstermektedir. Daha önce hiçbir *in silico* çalışmada kukurbitasin-B'nin antihelmintik özelliği keşfedilmediği için bu çalışma kukurbitasin-B'nin antihelmintik olduğunu kanıtlayan ilk *in silico* çalışmadır.

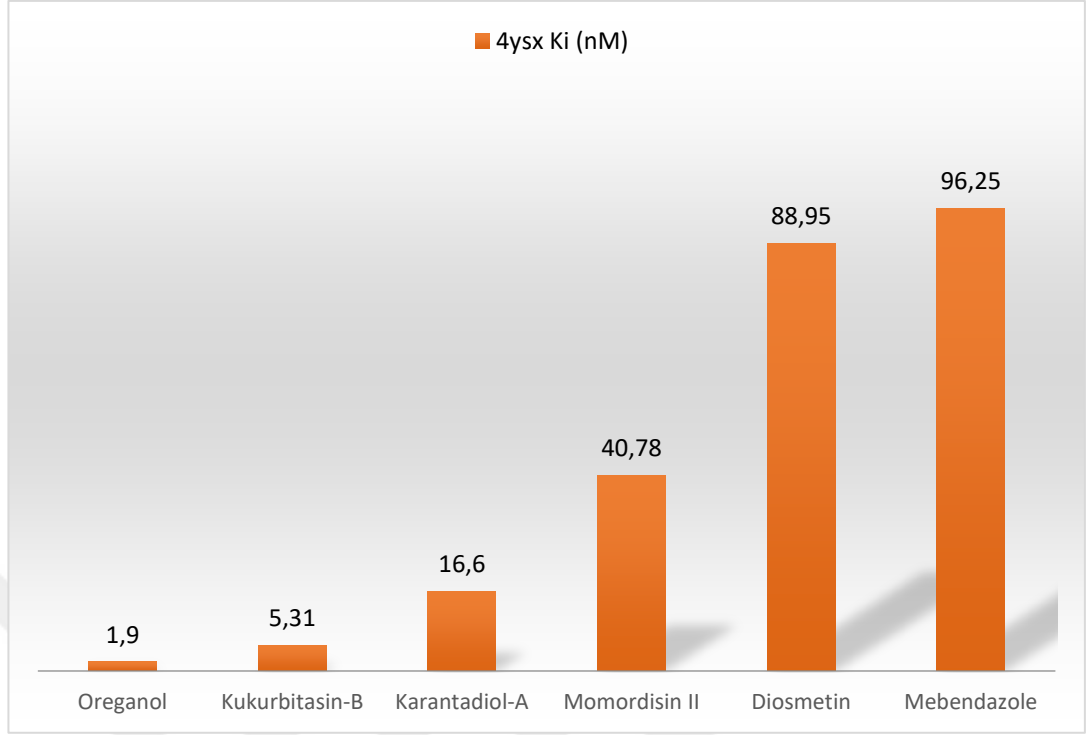
Diğer grafiklerle karşılaştırıldığında kenetleme yapılan elli beş molekülün çoğunun KPT 2'yi yüksek skor değerleriyle inhibe ettikleri görülmektedir. Beş ilaçtan üçü (Ivermectin, MBZ ve Praziquantel) ilk yirmi içerisine girmiştir ve grafikte de görüldüğü gibi bu moleküllerin serbest bağlanma enerjileri yaklaşık olarak -11 kcal/mol civarındadır. Kuguasin-J ile Praziquantel arasındaki liganların ΔG değerleri birbirine yakın görülmele beraber serbest bağlanma enerjilerindeki küçük farkların önemli afinite değişimlerine sebep olduğu K_i değerlerinin verildiği grafikten anlaşılmaktadır.

Şekil 4.6'ya göre en iyi K_i değerlerine sahip moleküllerden 5 nM değerinin altında altı molekül vardır ve bunlardan ikisi piyasada yaygın olarak kullanılan iki sentetik ilaç Ivermectin ve MBZ'dir. En iyi ilk dört ligand olan kukurbitasin-B, momordisin II, oreganol ve karantadiol ise *O. vulgare* ve *M. charantia*'da bulunan biyoaktif molekülüdür. Bu sonuçlar bitkisel ligandların sentetik ilaçlardan daha etkin ve daha az yan etkili ilaçlar olabileceklerini göstermektedir.



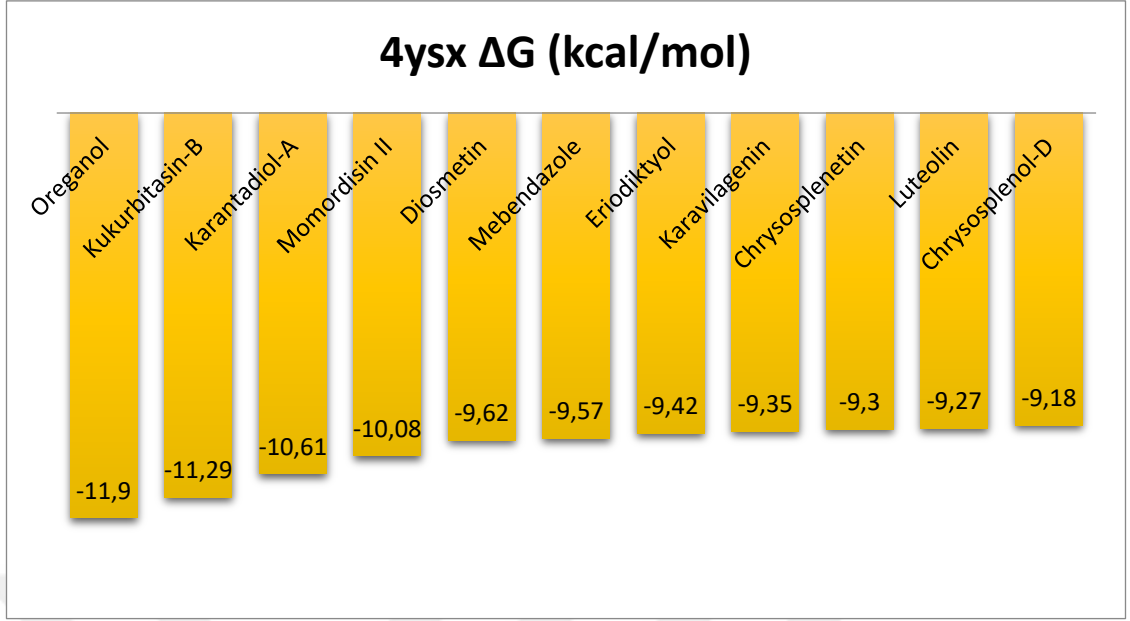
Şekil 4.6. KPT 2 enzimi için en iyi K_i değerlerine sahip ilk yirmi molekülün karşılaştırılması

Ascaris suum'a ait suksinat dehidrojenaz (fumarat redüktaz) enzimi (AsFR) (PDB ID: 4ysx) helmintin hayati fonksiyonları ile doğrudan ilişkili bir enzimdir. Bu çalışmada AsFR ile kenetlenen elli beş molekülden altısının K_i değerleri 100 nM'dan küçük bulunmuştur. Bu moleküller ve inhibisyon sabitleri Şekil 4.7'de verilmiştir. Grafikteki moleküllerden oreganol 1,9 nM düzeyde K_i değeriyle en yüksek skora sahip bitkisel ligand olarak görülmektedir. Oreganol hem KPT 2 enzime hem de AsFR'ye karşı uygun bir inhibitör adaydır. Oreganol bu sonuçlara göre oldukça iyi bir antihelmintik ilaç adaydır ve İstanbul kekiğinde bulunan bu biyoaktif molekül ilk kez bu çalışmada antihelmintik olarak araştırılmıştır.



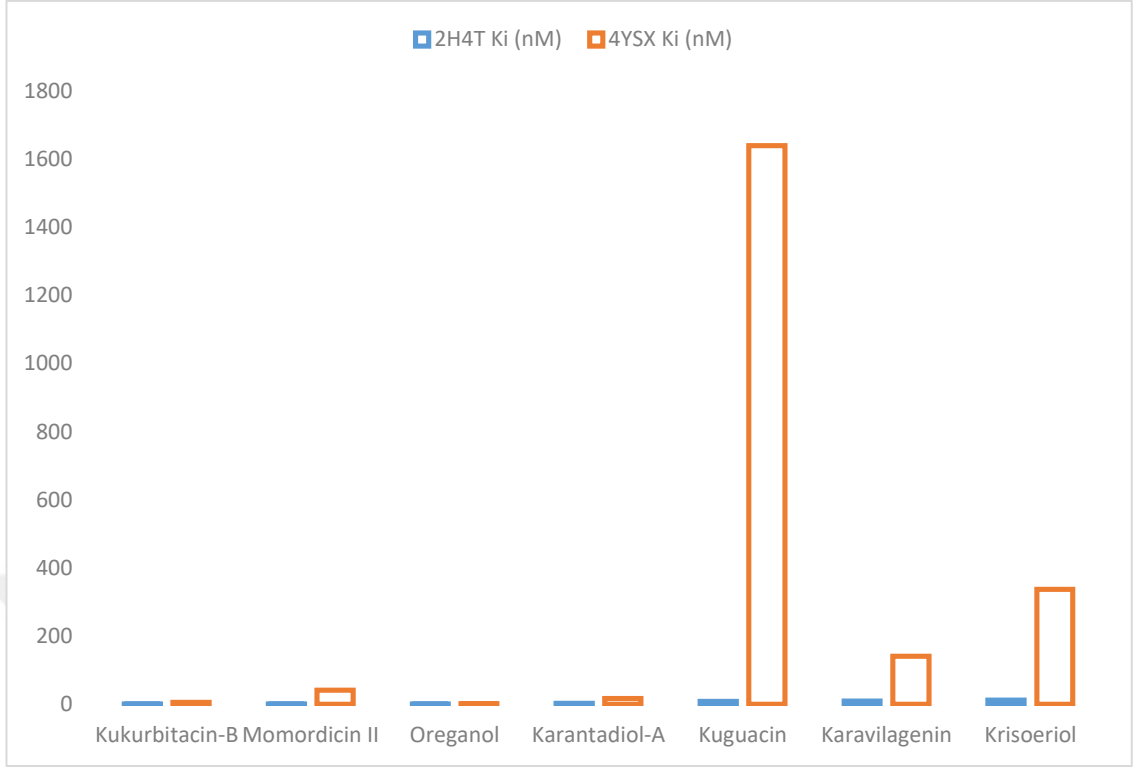
Şekil 4.7. AsFR için en yüksek skora sahip altı molekülün K_i değerleri

Şekil 4.8’de moleküllerin serbest bağlanma enerjilerinin önemli farklara sahip olduğu görülmektedir. En iyi sonucu veren bitkisel ligand oreganol ile sentetik ilaç MBZ arasında 2,33 kcal/mol’lük bir enerji farkı vardır. Bu enerji farkları ligandların AsFR içinde yaptıkları kimyasal etkileşimlerin önemli değişiklikler gösterdiğini işaret etmektedir. Şekil 4.8’de görüldüğü gibi en iyi ΔG değerlerine sahip ilk on bir molekülün onu bitkisel liganddır ve AsFR’e karşı hesaplanan değerler -9,18 kcal/mol’ün altındadır. Bu grafikteki moleküllerin tümü *O. vulgare* subsp. *hirtum* veya *M. charantia*’da bulunan bileşenlerdir. Bu nedenle hem KPT 2 enzimi hem de AsFR enziminin inhibisyonunda bu iki tür bitkinin bileşenleri en potent inhibitör adayları olarak saptanmıştır.



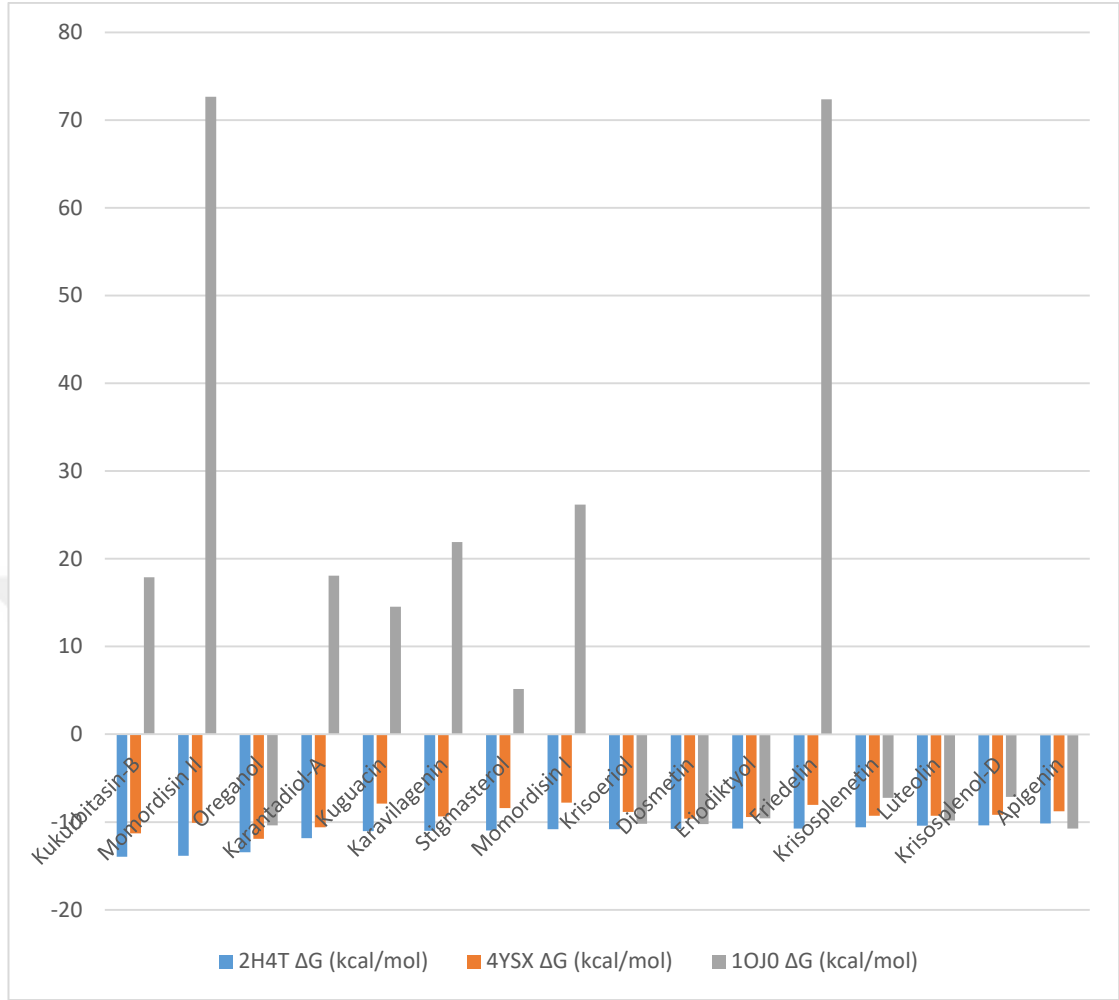
Şekil 4.8. AsFR için en iyi serbest bağlanma enerji değerlerine sahip bulunan ilk on bir molekül ve ΔG değerleri

Şekil 4.9'a göre kukurbitasin-B, momordisin II ve oreganol KPT 2'ye pikomolar düzeyde K_i değerlerine sahip bulunmuştur. Grafikte gösterilen beş molekül hem KPT 2 hem de AsFR'ye çok iyi derecelerde bağlanma ilgisine sahip moleküllerdir. Grafikte momordisin II her ne kadar AsFR'ye karşı yüksek bir K_i değerine sahip görünse de 35-40 nM K_i değeri oldukça iyi bir inhibisyon potansiyeline işaret etmektedir.



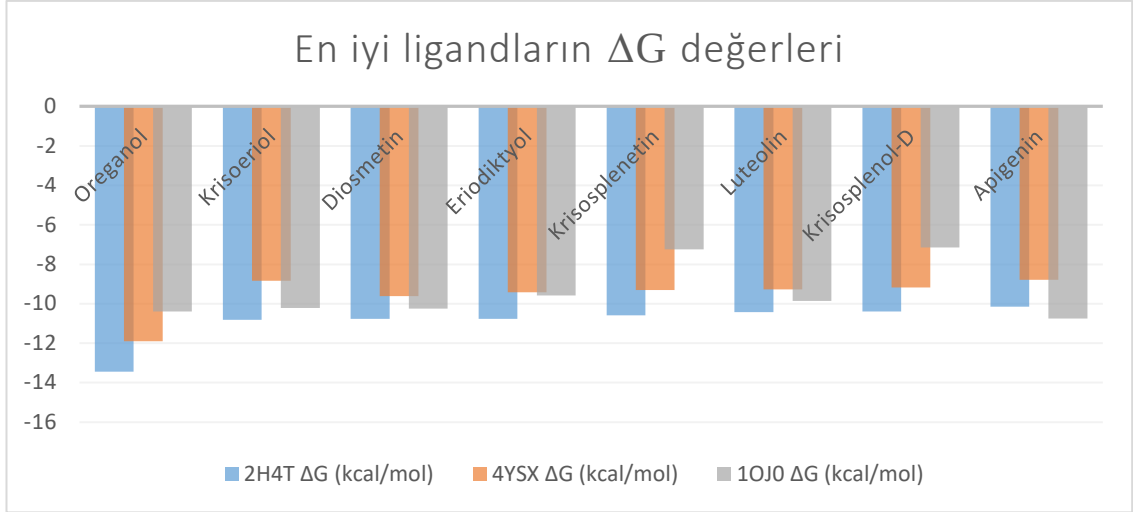
Şekil 4.9. KPT 2 (2H4T) için en düşük K_i değerlerine sahip olan ilk yedi bitkisel ligandın KPT 2 ve AsFR'ye (4YSX) karşı K_i değerlerinin karşılaştırılması

Şekil 4.10'da KPT 2 ve AsFR'ye karşı en iyi ΔG değerlerine sahip 17 bitkisel molekülün üç hedef protein için serbest bağlanma enerjilerini göstermektedir. Grafik özellikle momordisin II ve friedelin için antinematodal etkinin β -tubulin inhibisyonundan bağımsız bir yolla ortaya çıktığını işaret etmektedir. Aynı tahmin kukurbitasin-B, karantadiol-A, kuguasin-J, karavilagenin-D, stigmasterol ve momordisin I için de yapılabilir. Kukurbitasin-B ve karantadiol-A'nın AsFR'ye ve Hc β -tubuline serbest bağlanma enerjileri birbirine çok yakındır ve her iki molekül de *M. charantia*'nın bileşenleridir. Oreganolün her üç proteine de yüksek inhibisyon yeteneği dikkat çekicidir.



Şekil 4.10. KPT 2 ve 4ysx'e karşı en iyi ΔG değerlerine sahip on yedi bitkisel molekülün üç hedef protein için serbest bağlanma enerjileri

Şekil 4.11'e göre oreganol, krisoeriol, diosmetin, eriodiktyol, luteolin ve apigenin bu çalışmada her üç hedef protein için de birbirine yakın ve en iyi derecelerde bağlanma ilgisine sahip moleküllerdir. Grafikte Hc β -tubulin için en düşük skora sahip iki molekül krisosplenetin ve krisosplenol-D olsa da KPT 2 inhibisyonu açısından sırasıyla -10,58 kcal/mol ve -10,39 kcal/mol gibi düşük enerji değerleriyle bu iki ligand da en potent moleküller içinde yer almaktadır. Moleküler yapıları da benzer olan krisosplenetin ve krisosplenol D her üç protein için de yaklaşık olarak aynı değerde serbest bağlanma enerjilerine sahiptir ve *A. annua*'da bulunmaktadır. Bu iki molekül dışında kalan ve grafikte gösterilen tüm moleküller *O. vulgare* spp. *hirtum*'da bulunmaktadır.



Şekil 4.11. KPT 2, AsFR ve Hcβ-tubulin proteinleri için en iyi serbest bağlanma enerjisi değerlerine sahip olduğu hesaplanan moleküllerin ΔG değerlerinin karşılaştırılması

4.3. Homolog Proteinlerin Kenetleme Simülasyonu Sonuçları

Çizelge 4.3'teki moleküllerden apigenin, arteannuin-B, ODTAME, oreganol ve diosmetin HcB-tubulin için en iyi inhibisyon değerlerinin bulunmuş olduğu ilk beş bitkisel ligandır. Karantadiol-A, momordisin II, kukurbitasin-B ve oreganol ise hem KPT 2 hem de AsFR enzimleri için en iyi inhibisyona sahip olduğu bulunan ilk dört bitkisel ligandır. Bu dört ligandın her iki hedef proteine de en yüksek skor değerleriyle bağlanabiliyor olmaları çift eylemli ilaç geliştirilmesi açısından çok değerli bir bilgi sağlayan en önemli sonuçlardan biridir.

S. obvelata mitokondrial sitokrom c oksidaz 1 (SoCOX1), SoCOX2 ve *Caenorhabditis elegans* glukoz transporter 1 reseptörü (CeGLUT1) ile ilgili 3D yapıları SwissModel ile tahmin edilmiştir. *Enterobius vermicularis* β-tubulin proteini (Evβ-tubulin) 3D yapı tahmininde Zhang Lab Web sunucusuna ait I-TASSER aracı kullanılmış ve aktif bölgelere ait bilgi bu yazılım vasıtasıyla elde edilmiştir. Mitokondriyal sitokrom c oksidaz 2 (COX2) enzimi, helmint için hayati fonksiyona sahip olduğu ve *S. obvelata*'nın genom sekansı bilinmediği için mitokondriyal genomdaki en uygun sekans olarak düşünülerek seçilmiştir. İlk olarak COX2 proteinine ait protein sekansı UniProt'tan alınmıştır. Protein sekansının 3D yapısı Zhang Lab web sunucusuna ait I-TASSER yazılımı ile tahmin edildikten sonra proteinin bağlanma bölgesi saptanmış,

aynı sekansın 3D yapısı homoloji modelleme yoluyla SwissModel ile de tahmin edilmiştir. QMEAN değeri -5,2 bulunduğu için hem bu protein, hem de QMEAN değeri -3,26 bulunan COX1 proteinine ait sekanstan modellenen 3D yapı kullanılmıştır. Çizelge 4.4'teki 2FW3 pdb kodlu KPT-2 enzimi ise 2H4T'den farklı bir 3D yapısıdır ve kenetleme doğruluğunun test edilmesi için grid merkezi değiştirilmiştir.

Çizelge 4.3. Potent ligandların homolog proteinler ile kenetleme sonuçları

	6E7C (iβ-tubulin)		Evβ-tubulin	
Molekül	ΔG (kcal/mol)	K_i (μM)	ΔG (kcal/mol)	K_i (μM)
ODTAME	+0,20	-	-1,76	50 850
Apigenin	+4,37	-	-2,27	21 600
Arteannuin-B	+1,20	-	+12,25	-
Kukurbitasin-B	+263,11	-	+142,05	-
Diosmetin	+8,93	-	-1,75	51 960
Eriositrin	+72,3	-	+52,50	-
Karantadiol-A	+130,39	-	+64,38	-
Momordisin II	+287,60	-	+166,41	-
Oreganol	+13,18	-	+8,30	-

Çizelge 4.3. Potent ligandların homolog proteinler ile kenetleme sonuçları (devam)

	7DAE (fare β-tubulini)		6VAX (iFR)	
Molekül	ΔG (kcal/mol)	K_i (μM)	ΔG (kcal/mol)	K_i (μM)
ODTAME	+4,24	-	-5,08	187,87
Apigenin	-0,94	204 300	-6,56	15,65
Arteannuin-B	+2,92	-	-7,28	4,58
Kukurbitasin-B			-8,97	0,267 14
Diosmetin	+1,93	-	-7,52	3,07
Eriositrin			-12,87	0,000 370 31
Karantadiol-A			-8,43	0,662 65
Momordisin II			-7,19	5,33
Oreganol	+37,46	-	-6,02	38,59

7DAE (fare β -tubulini) için yapılan kenetlemeler için ADME özellikleri en uygun ligandlar seçilmiştir.

Çizelge 4.4. Potent ligandların diğer hedef proteinler ile kenetleme sonuçları

	CeGlut1		2FW3 (rat KPT 2)	
Molekül	ΔG (kcal/mol)	K_i (μM)	ΔG (kcal/mol)	K_i (μM)
ODTAME	-5,75	60,48	-6,55	15,89
Apigenin	-7,58	2,79	-8,85	0,324 32
Arteannuin-B	-7,67	2,40	-8,07	1,22
Kukurbitasin-B	-7,47	3,35	-10,64	0,015 81
Diosmetin	-8,42	0,676 44	-8,10	1,15
Eriositrin	-6,61	14,24	-9,72	0,075 32
Karantadiol-A	-8,82	0,340 52	-10,92	0,009 95
Momordisin II	-6,85	9,58	-9,43	0,122 26
Oreganol	-7,60	2,69	-6,72	11,83

Çizelge 4.4. Potent ligandların diğer hedef proteinler ile kenetleme sonuçları (devam)

	SoCOX1		SoCOX2	
Molekül	ΔG (kcal/mol)	K_i (μM)	ΔG (kcal/mol)	K_i (μM)
ODTAME	-6,18	29,40	-3,32	3 690
Apigenin	-6,84	9,61	-5,59	79,80
Arteannuin-B	-6,73	11,61	-5,69	67,39
Kukurbitasin-B	-9,48	0,113 39	-7,67	2,39
Diosmetin	-6,84	9,65	-5,55	84,83
Eriositrin	-5,92	45,64	-3,92	1 340
Karantadiol-A	-9,56	98,21 nM	-8,09	1,18
Momordisin II	-5,85	51,89	-4,33	671,20
Oreganol	-5,14	169,70	-3,60	2 310

Çizelge 4.4'teki CeGLUT1 proteinin sekans bilgisi Uniprottan alınmıştır. Modellenen 3D yapı incelendiğinde insan GLUT3 proteini ile aynı olduğu görülmüştür ve bu nedenle insandaki GLUT3 proteini ile kenetleme deneyleri tekrar yapılmamıştır çünkü

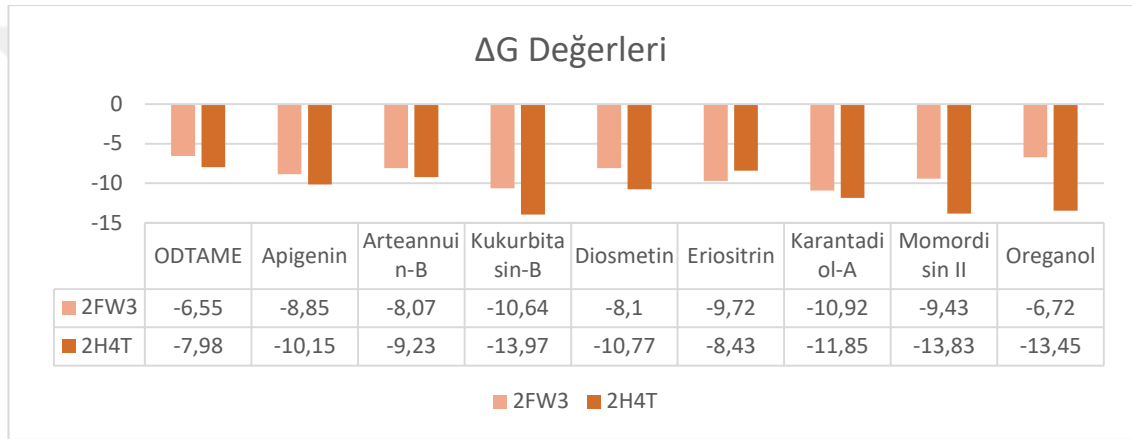
bu çalışmada insanda bulunan homolog proteinlerin kullanılmasının amacı selektiviteye yönelik karşılaştırma yapılmasıdır.

Çizelge 4.3'teki sonuçlar, denenen proteinler içerisinde seçili bitkisel ligandlara bağlanmayan iki proteinin insan β -tubulin (i β -tubulin, pdb ID: 6E7C) ve *Enterobius vermicularis* β -tubulin (Ev β -tubulin) proteinleri olduğunu göstermektedir. 6E7C için hesaplanan ΔG değerleri oldukça ilginçtir. Bu sonuçlar kukurbitasin-B, karantadiol-A ve momordisin II'nin en potansiyel ilaç adayları olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu üç bitkisel ligand nematodlardaki hedef proteinlere bağlanabilirken, insandaki β -tubuline bağlanamamaktadır. Bu sonuç, bu ligandların daha az yan etkiye neden olacağını göstermektedir ve yeni bir ilacın geliştirilmesi için önemli bir bilgi sağlamaktadır. Çizelge 4.3'teki sonuçlara göre momordisin II hem i β -tubulin hem de Ev β -tubulin için en yüksek ΔG değerlerine sahip bileşendir. En yüksek ΔG değerlerine sahip diğer iki bileşen kukurbitasin-B ve karantadiol-A'dır. Bu iki molekül i β -tubulinine bağlanamazken rat karnitin palmitoil transferaz 2 enzimi (pdb ID: 2FW3) ve insan fumarat redüktaz enzimi (iFR, pdb ID: 6VAX) için oldukça iyi inhibisyon katsayılarına sahiptir. Bu çalışmada kullanılan fumarat redüktaz enzimlerinin her ikisi de PDB'den kristalize formda elde edildiği ve kenetleme prosedüründe flavin adenin dinükleotit (FAD) N5 atomu merkeze alındığı için bu sonuçlar, homoloji modelleme ile elde edilen proteinlerin kenetleme sonuçlarına kıyasla daha güvenilir değerlerdir. Oreganol, fumarat redüktazın nematodda bulunan formuna (4YSX) -11,9 kcal/mol ΔG ve insandaki formuna (6VAX) -6,02 kcal/mol ΔG değerlerine sahip bulunarak en selektif bitkisel ligand olarak tahmin edilmiştir. Çizelge 4.4'te gösterildiği gibi *S. obvelata* mt sitokrom c oksidaz 2 (SoCOX2) proteinine karşı eriositrin dışında kalan ligandların bağlanma ilgileri daha düşük olmakla birlikte rat KPT 2 enziminin (2FW3) sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Bu sonuç oldukça dikkat çekicidir ve moleküllerin yapılarının, serbest bağlanma enerjisinin hesaplanmasında ve entalpi değerlerinin artışında ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Bu iki protein birbirinden oldukça farklı bağlanma bölgesine sahip olmalarına rağmen orantılı ΔG sonuçları bulunması bu moleküllerin birden fazla antihelmintik hedef proteine bağlanabilecek moleküler yapılarda olduklarını da işaret etmektedir. SoCOX2 için hesaplanan değerlerde karantadiol-A en iyi skora sahipken (-9,56 kcal/mol serbest bağlanma enerjisi, 98,21 nM K_i), ikinci sırada kukurbitasin-B

gelmektedir. 9,12,15-oktadekantrienoik asit metil ester (ODTAME) her iki enzim için de en düşük afiniteye sahip liganddır. Çizelge 4.3'teki bileşenler içinde ODTAME aynı zamanda iFR enzimi (6VAX) ve CeGLUT1 reseptörüne karşı da en düşük bağlanma ilgisine sahip bitkisel ligand olarak görünmektedir. Ancak bu çalışmada Hc β -tubulin ile iyi derecede bağlanma ilgisine sahip bulunmuş olması homolog proteinler ile de denenmesini gerektirmiştir. ODTAME'nin çok sayıda rotasyonel bağa sahip esnek bir molekül olması kenetleme programının doğru tahmin edebilme başarısını etkilemektedir. Oreganol de bazı proteinlerin inhibisyonlarında ODTAME ile paralel sonuçlar göstermiştir ve SoCOX2 enzimi için inhibisyon katsayısı 2.31 μ M olarak hesaplanmıştır. SoCOX2 modeli homoloji modelleme ile oluşturulduğu için bu tahmini sonuçlar SoCOX2 inhibisyonuna yönelik kesin veriler sunulmasından uzaktır. ODTAME, SoCOX1 inhibisyonu açısından ise en yüksek Δ G değerine sahip bulunan bitkisel liganddır ve bu tahmini protein yapısı için de en elverişsiz inhibitör olarak görünmektedir. Bu tahmini protein yapısının QMEAN değeri -3,26 olarak hesaplanmış ve karantadiol-A için Δ G değeri -9,56 kcal/mol olarak tahmin edilerek iyi kabul edilebilecek sonuçlar bulunmuştur. CeGLUT1 inhibisyonu ile ilgili sonuçlar SoCOX2'e kıyasla daha güvenilirdir çünkü kalıp model olarak insan GLUT3 proteininin kristalize yapısı kullanılmıştır. Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi karantadiol-A ve diosmetin CeGLUT1 için nanomolar seviyede inhibisyon değerlerine sahiptir ve apigenin, arteannuin B, oreganol ve kukurbitasin-B de -7,47 kcal/mol'den daha küçük serbest bağlanma enerjileri ile reseptöre bağlanmaktadır. Bu sonuçlar bu altı molekülün antidiyabetiklere benzer bir mekanizma ile helmintleri elimine edebileceğini *in silico* yöntemlerle ortaya çıkarmıştır. İnsan GLUT3 reseptörünün antagonisti olabilecek bu moleküllerin yüksek doz ve devamlı kullanımında hipoglisemiye bağlı yan etkilerin ortaya çıkabileceği unutulmamalıdır. Karantadiol-A oral yolla yüksek dozda alınsa bile gastrointestinal absorpsiyonu çok düşüktür ve yalnız bitkisel bir diyetle alınımı durumunda bu oran çok daha fazla düşecek ve yan etki görülme olasılığı azalacaktır. KPT 2 enzimi (2FW3) ve i β -tubulin proteini (6Y3C) inhibisyonu için gösterilen değerler bu moleküllerden kukurbitasin-B, momordisin II, oreganol ve karantadiol-A'nın yağ metabolizmasını etkileyerek antihelmintik etki gösterebileceklerini kanıtlamaktadır. KPT 2 enziminin tersinir inhibisyonu önemli bir yan etkiye yol

açmazken, kısa süreli inhibisyonu durumunda üretilecek metabolitler bazı helmint türlerinin ölümüne yol açmaktadır (Taylor ve diğerleri, 2014).

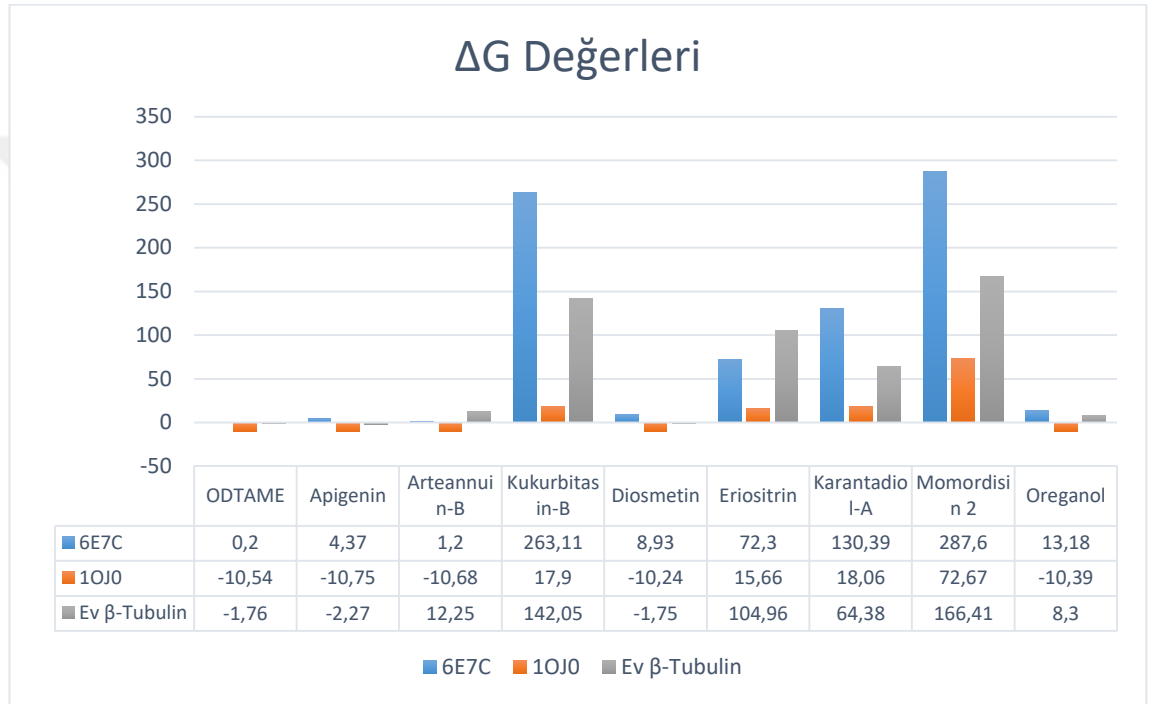
Şekil 4.12'deki sonuçlar kenetleme prosedüründe grid kutusu merkezinin seçiminde doğru noktaların kullanılmasının sonuçları ne kadar çok etkilediğini göstermektedir. 2H4T için seçilen merkezin koordinatları Taylor ve diğerleri (2014)'dan alınmıştı. 2FW3 için ise proteinin merkez bölgesi merkeze alındı. Her ikisi için de 60x60x60 boyutlarında grid kutusu oluşturulmasına rağmen 2FW3 için merkezin otomatik olarak belirlenmesi ΔG değerlerinin değişmesine neden olmuştur.



Şekil 4.12. Dokuz ligandın 2FW3 ve 2H4T (rat karnitin palmitoil transferaz 2 enzimi) ile kenetleme simülasyonu sonucu bulunan ΔG değerlerinin karşılaştırılması

Farklı organizmalardaki β -tubulin inhibisyonları açısından değerlendirildiğinde, Şekil 4.13'te görüldüğü gibi denenen bitkisel ligandlar içinde en iyi ΔG değerlerine sahip bileşen apigenindir. Apigenin, Hc β -tubulin (1OJ0) için -10,75 kcal/mol, i β -tubulin (6E7C) için 4,37 kcal/mol ve Ev β -tubulin için ise -2,27 kcal/mol serbest bağlanma enerjilerine sahip bulunmuştur. Şekil 4.13'te Ev β -tubulinin inhibisyon değerleri i β -tubulin ile benzer sonuçlar göstermiştir. Bunun en olası nedeni Ev β -tubulin proteinin homoloji modellenmesinde I-Tasser yazılımı tarafından insan β -tubulinin kalıp olarak alınmış olmasıdır. Bu nedenle Ev β -tubulin inhibisyonu gerçek anlamda *Enterobius vermicularis*'e ait hedef proteinin inhibisyonunu göstermez. Ev β -tubulin, 3D protein yapısı olarak i β -tubulinine benzediği için grafikte gösterilen sonuçlar Ev β -tubulin ile i β -tubulinini selektivite açısından karşılaştırmak için kullanılamayacaktır. İkisine ait

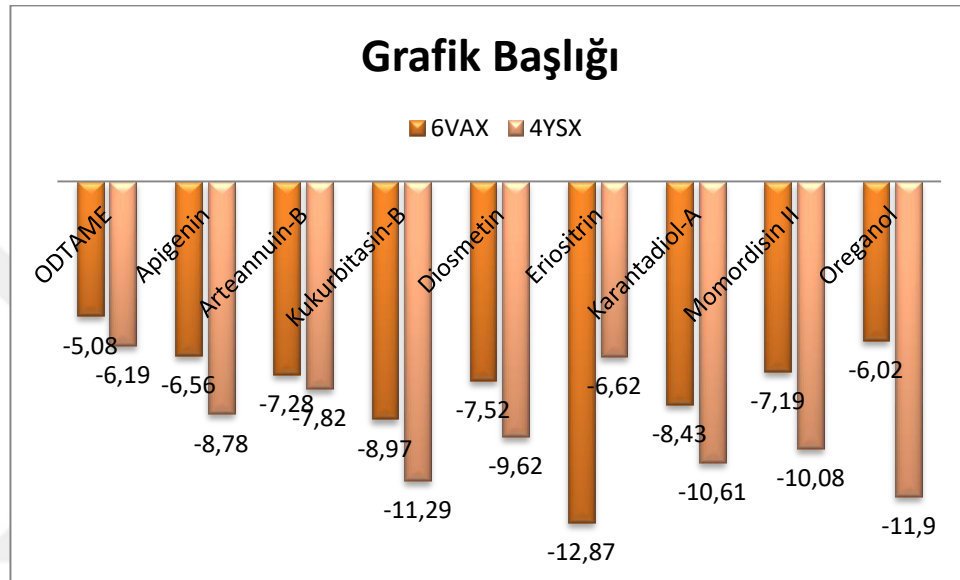
inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması, benzer proteinlerin benzer kenetleme sonuçlarına sahip olduğunu göstermektedir. *Haemonchus contortus*'a ait teorik β -tubulin yapısı ise, kenetlenen ligandlardan bazıları için oldukça uygun bir bağlanma bölgesine sahiptir. Şekil 4.13'te gösterildiği gibi arteannuin-B, apigenin, ODTAME, diosmetin ve oreganol, Hc β -tubulini (1OJ0) oldukça iyi değerlerde inhibe ederken, i β -tubulini inhibe etmemektedir. Bu sonuç bu bitkisel ligandların β -tubulin inhibisyonu açısından insanda yan etkiye neden olmayacağını gösterdiği için çok önemlidir.



Şekil 4.13. Dokuz ligandın 6E7C (insan β -tubulini kristalize yapısı), 1OJ0 (*Haemonchus contortus* β -tubulini teorik yapısı) ve Ev β -tubulin (homoloji modelleme ile tahmin edilen *Enterobius vermicularis* β -tubulin proteini) ile kenetleme simülasyonu sonucu bulunan ΔG değerlerinin karşılaştırılması

Şekil 4.14'te görüldüğü gibi denenen dokuz ligandan sekizi nematoda ait proteine (AsFR, PDB kodu:4YSX) daha iyi bağlanmaktadır. Grafikteki ligandlar içinde eriositrin, ODTAME ve arteannuin-B -8 kcal/mol'ün üzerinde ΔG değerine sahip bulunurken diğer altı molekül oldukça iyi bağlanma enerjilerine sahip bulunmuştur. Şekil 4.14'te ilk göze çarpan sonuç oreganolun istenen selektiviteyi göstermiş olmasıdır. *Ascaris suum*'da bulunan fumarat redüktaz enzimine karşı oldukça iyi bir skora sahipken insanda bulunan homolog proteine bağlanma ilgisi düşüktür.

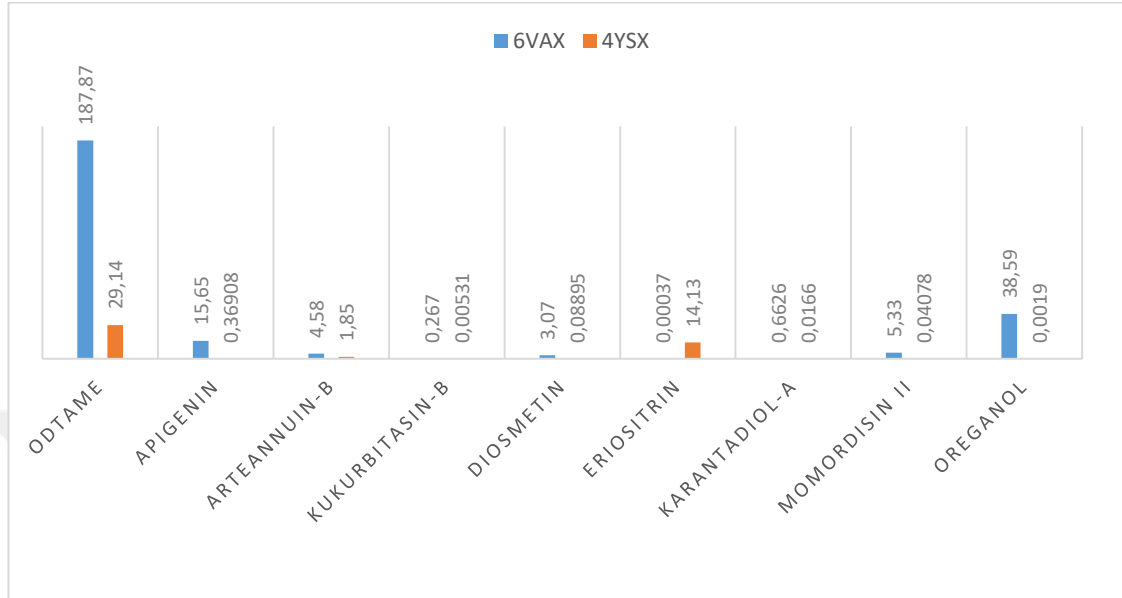
Bu ligandlar içerisinde momordisin II ikinci en selektif ligandır. Eriositrin ise fumarat redüktazın insandaki formuna karşı çok daha iyi bir skora sahip olmakla beraber her iki organizmadaki formuna da bağlanma ilgisi göstermiştir (4YSX için -6,62 kcal/mol, 6VAX için -12,87 kcal/mol). Dokuz liganddan dördü (kukurbitasin-B, karantadiol-A, momordisin II ve oreganol) proteinin nematoddaki formuna karşı -10 kcal/mol'den daha düşük serbest bağlanma enerjilerine sahip bulunmuştur.



Şekil 4.14. Dokuz ligandın 6VAX (insan fumarat redüktaz enzimi kristalize yapısı) ve 4YSX (*Ascaris suum* fumarat redüktaz enzimi kristalize yapısı) ile kenetleme simülasyonu sonucu bulunan ΔG değerlerinin karşılaştırılması

Fumarat redüktaz için K_i değerlerinin karşılaştırılması ise apigenin, kukurbitasin-B, diosmetin, karantadiol-A, momordisin II ve oreganolün nematoddaki hedef proteine karşı nanomolar düzeyde inhibisyon katsayısına sahip olduklarını göstermektedir (Şekil 4.15). Bunlardan diosmetin, apigenin, momordisin II ve oreganol ise hedef proteinin insandaki homologuna karşı mikromolar düzeyde inhibisyona sahip bulunmuştur. İstenmeyen yan etkiler açısından eriositrinin en önemli dezavantajı, insan hücrelerinde suksinat dehidrojenaz inhibisyonuna bağlı olarak hücre ölümüne neden olması olabilir. Bu yan etki eriositrinin düşük dozda kullanılması ile giderilebilir. İnsanlar için düşük dozda toksik madde sınıfına girmemesi ise eriositrinin geridönebilir inhibisyonuna bağlanabilir. Eriositrinin oldukça iyi değerlere sahip bulunan suksinat dehidrojenaz inhibisyonu, antikanser ilaç araştırmalarında da bu molekülün denenmesinin fayda

sağlayabileceğini göstermiştir. Antihelmintik amaçlı kullanımında ise eriositrin yerine oreganol, momordisin II, karantadiol-A veya kukurbitasin-B tercih edilebilir.

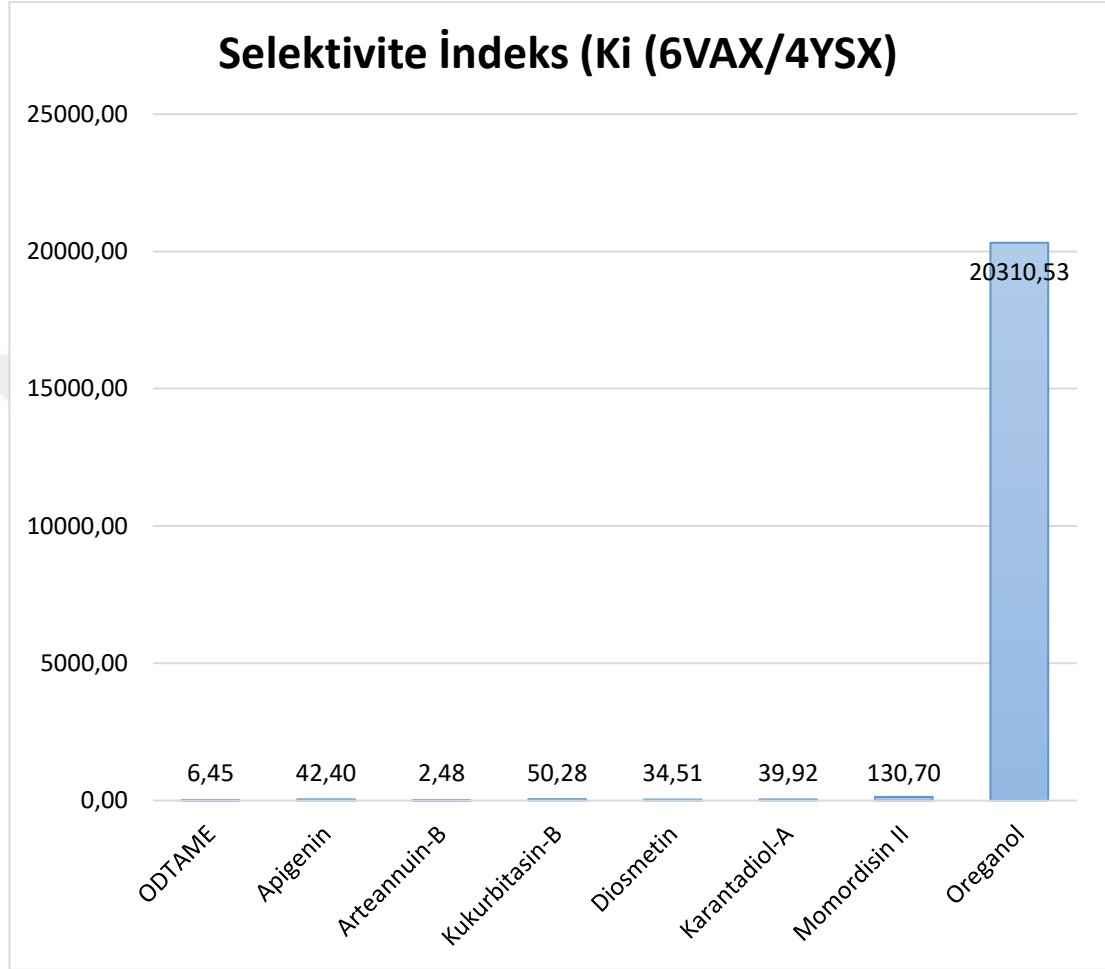


Şekil 4.15. Dokuz bitkisel ligandın insanda (6VAX) ve nematodda (4YSX) bulunan fumarat redüktaz enzimleri ile kenetleme sonucu bulunan inhibisyon katsayılarının (K_i) (μM düzeyde) karşılaştırılması

Oreganol, fumarat redüktazın nematodda bulunan formuna -11,9 kcal/mol ΔG ve 1,9 nM K_i değerlerine ve insandaki formuna -6,02 kcal/mol ΔG ve 38,59 μM K_i değerlerine sahip bulunarak 20 310,53 selektivite indeksi ile en selektif bitkisel ligand olarak tahmin edilmiştir.

Selektivite indeksi grafiğine göre momordisin II, nematod FR proteinini için 130 kat daha seçicidir. Kukurbitasin-B 50,28 kat, apigenin 42,4 kat, karantadiol-A 39,92 kat ve diosmetin 34,51 kat selektivite göstermiştir (Şekil 4.16). Eriositrin ise iFR için çok yüksek bir bağlanma ilgisine sahiptir ve AsFR'ye kıyasla daha iyi bir inhibisyon katsayısı tahmin edilmiştir. Bu nedenle selektivite indeksi grafiğine dahil edilememiştir. Eriositrin dışında kalan tüm bu bileşenlerin nematod proteinine karşı daha iyi bağlanma moduna sahip olmaları fumarat redüktazı hedefleyen yeni inhibitörlerin geliştirilmesi açısından önemlidir. Her ne kadar K_i değerleri grafiğinde ODTAME, proteinin iki homologuna karşı önemli bir inhibisyon farkı meydana getiriyor gibi görünse de,

selektivite grafiğinde görüldüğü gibi 6,45 kat seçiciliğe sahiptir ve seçili bileşenler içinde selektiflik açısından sekizinci sıradadır. Oreganol, fumarat redüktaz inhibisyonu açısından değerlendirildiğinde en uygun ilaç adayıdır.



Şekil 4.16. Selektivite indekslerinin karşılaştırılması. Grafikteki tüm bileşenler nematod proteinine karşı daha selektiftir

Oreganol tüm kenetlemeler genelinde değerlendirildiğinde SoCOX2'e bağlanma ilgisi çok düşüktür (bkz. Çizelge 4.3). β -tubulinin insandaki formuna bağlanmamaktadır ancak nematoddaki formuna karşı (1OJ0) oldukça iyi bir serbest bağlanma enerjisi değerine sahip olduğu (-10,39 kcal/mol ΔG) hesaplanmış ve rat KPT 2 enzimi (2H4T) için de 0,1378 nM K_i değerlerine sahip bulunmuştur. CeGLUT1 için ise inhibisyon özelliği çok zayıftır ki bu aynı zamanda insandaki GLUT3 reseptörüne de bağlanamayacağını göstermektedir. Özetle denenen proteinler içinde en iyi bağlandığı

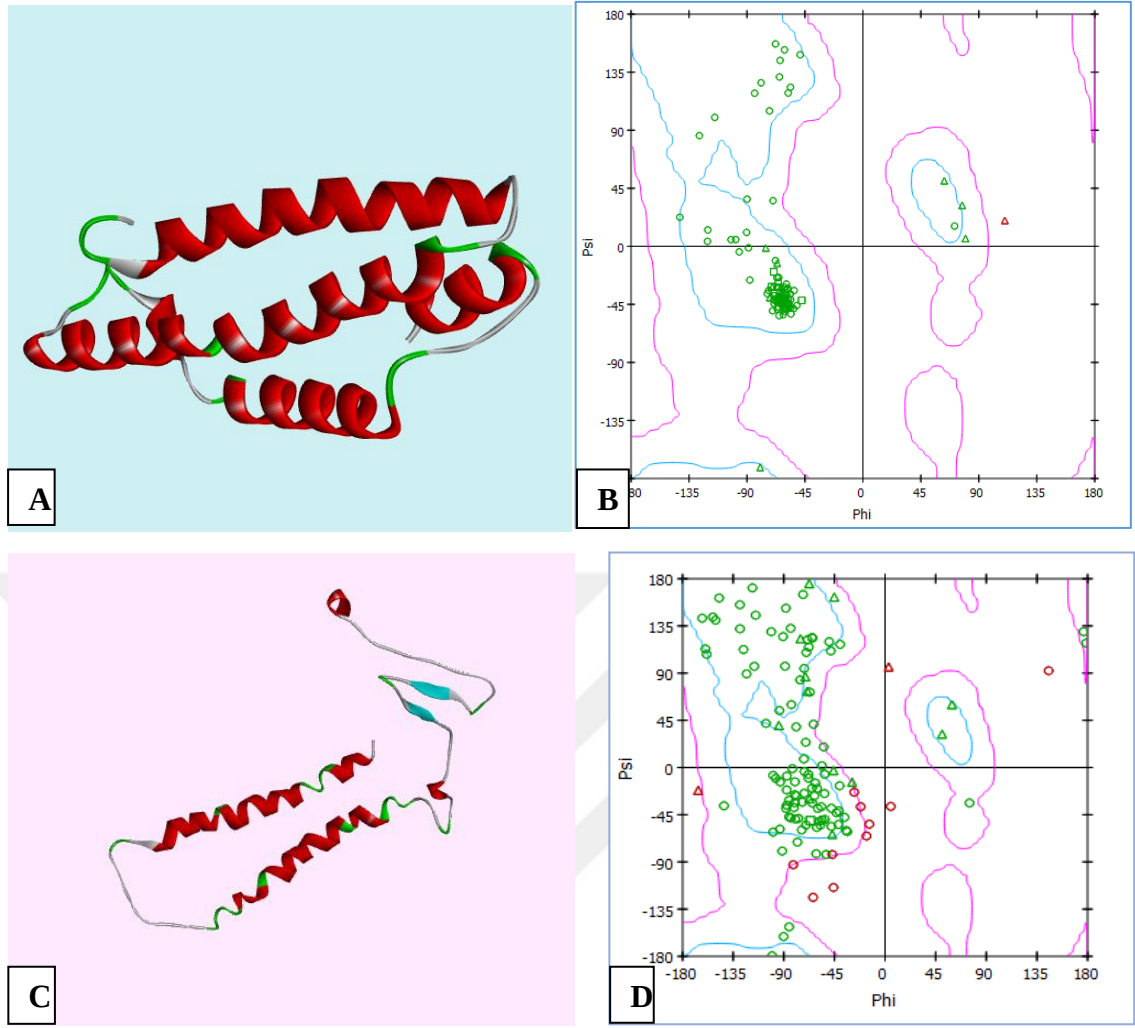
proteinler nematod fumarat redüktaz enzimi (4YSX), nematod β -tubulin proteini (1OJ0) ve rat KPT 2 (2H4T) enzimidir. Oreganol hem fumarat redüktaz hem de β -tubulin inhibisyonu açısından seçicidir ve ümid verici bir ilaç adayıdır. COX enzimleri ve GLUT3 reseptörü ile bağlanma ilgisi çok düşük bulunduğu için bu açıdan yan etkisinin de olmayabileceği *in silico* hesaplamalar ile ilk kez gösterilmiştir.

4.4. Homoloji Modelleme ile Oluşturulan Proteinlerin İncelenmesi

Homoloji modelleme ile oluşturulan proteinlerin 3D yapıları tahmin edildikten sonra Ramachandran grafikleri, proteinlerin hidrofobik rezidülerini gösteren grafikler ve 3D resimler Discovery Studio ile oluşturulmuştur.

4.4.1. SoCOX1 ve SoCOX2 için tahmin edilen 3D yapıların değerlendirilmesi

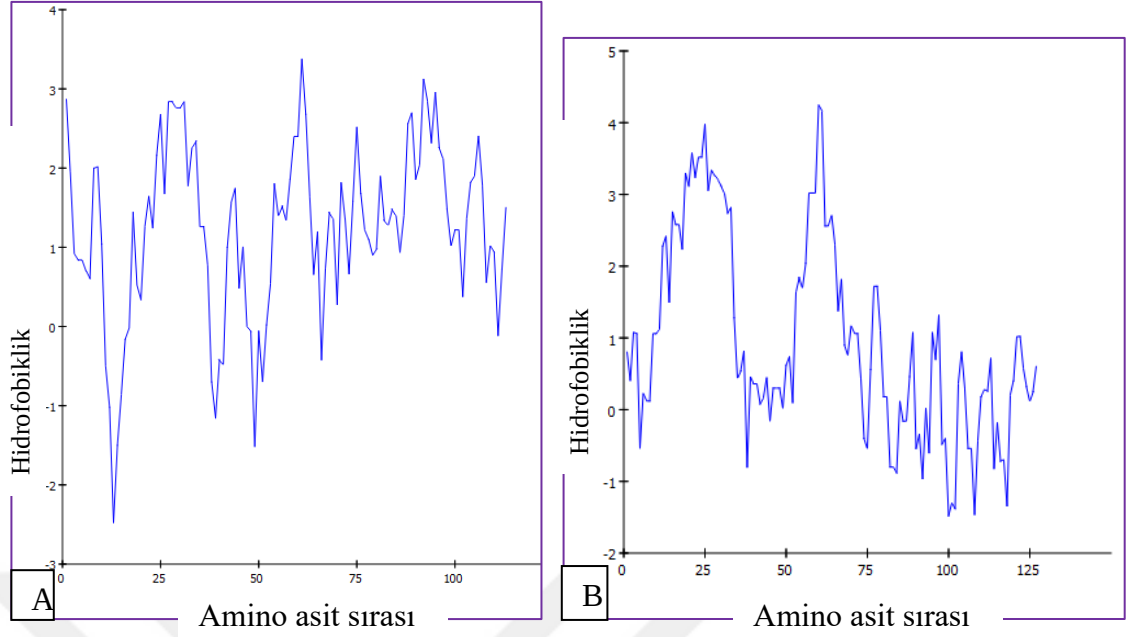
SoCOX1 ve SoCOX2 enzimlerinin üç boyutlu yapıları veritabanlarında bulunmadığı için bunlara ait amino asit sekansları Uniprot veritabanından alındıktan sonra SWISSMODEL ile modellenmiş ve kullanılmıştır. SoCOX1 protein sekansı 113 amino asitten oluşmakta ve beş heliks yapısı ile ilmek yapılarından meydana gelmektedir (Şekil 4.17 A). Bu homoloji modeli için oluşturulan Ramachandran grafiğinde de sağ el α -heliks için uygun açının olduğu bölgede amino asitlerin yoğunlaştığı görülmektedir (Şekil 4.17 B). SoCOX2 proteini oldukça küçük ve basit yapılı bir proteindir (Şekil 4.17 C). Yapıyı oluşturan iki uzun α -heliks birbirine paralel dururken, Şekil 4.17 D'deki Ramachandran grafiğinde bu heliks yapılarının sağ el α -heliks yapısında oldukları ve yalnızca bir amino asidin sol el α -heliks yapısında olabileceği gösterilmektedir. Ayrıca hem paralel β -pili hem de antiparalel β -pili yapılarının bulunduğu görülmektedir. Şekil 4.17 D'deki yapıların çoğu $-\psi$ ve $-\phi$ açılara sahip oldukları için izin verilen konfigürasyonları temsil etmektedir. Şekil 4.17 D'de sadece dört amino asidin zıt konformasyonda olabileceği tahmin edilmiştir ve bunlardan ikisi sol el α -heliks bölgesine denk düşmüştür.



Şekil 4.17. SoCOX1 ve SoCOX2. **A)** *S. obvelata*'ya ait COX1 (sitokrom c oksidaz 1) enziminin homoloji modeli (SoCOX1). **B)** SoCOX1 için Ramachandran grafiği. **C)** SoCOX2 homoloji modeli. **D)** SoCOX2 için Ramachandran grafiği

SoCOX1 proteini homoloji modeli için çizilen Şekil 4.18 A'daki hidrofobisite grafiğine göre 10.-15. amino asitler arasında kalan bölgede ve 50. amino asitte oldukça hidrofilik bir yapı olduğu, 23.-26. ve 55.-60. arasındaki amino asitlerin ise bu proteindeki en hidrofilik karakterdeki amino asitler olduğu görülmektedir.

Şekil 4.18 B'de SoCOX2 için çizilen hidrofobisite grafiğinde hidrofobik amino asitlerin 20.- 30. ve 55.- 70. amino asitler arasında oldukları, bunlardan muhtemelen 25. ve 60. amino asitlerin ise en hidrofobik iki amino asit oldukları gösterilmektedir. En hidrofilik amino asitler ise proteinin son kısımlarındaki ilmek yapısı üzerinde bulunmaktadır.



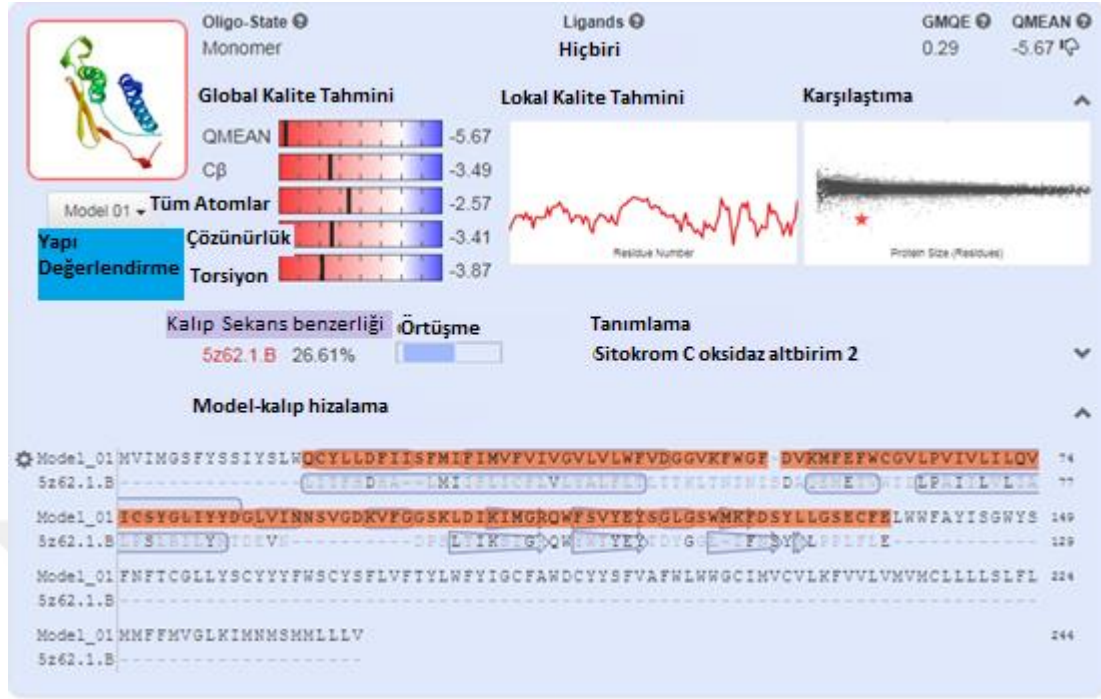
Şekil 4.18. Hidrofobiklik grafiği. A) SoCOX1 için, B) SoCOX2 için

Uniprot veritabanından alınan *S. obvelata* mtCOX2 amino asit sekansı ile insandaki homolog proteinin BLAST ile karşılaştırılması sonucunda Şekil 4.19’da gösterilen %28,6 oranında benzerlik saptanmıştır. Bu sonuç, aynı zamanda *S. obvelata* tür teşhisinde PCR için kullanılan bu sekansın, inhibisyon için uygun olabileceğini göstermiştir. Ne var ki bu gen sekansı ve amino asit sekansı bilinmesine rağmen proteinin kristalografik yapısı veri tabanlarında mevcut olmadığı için bu çalışmada kullanılan SoCOX2 proteini homoloji modelleme ile üretilmiş ve QMEAN değeri -5,67 bulunduğu için kesin bir tahminde bulunulmasına imkân verememiştir (Şekil 4.20).



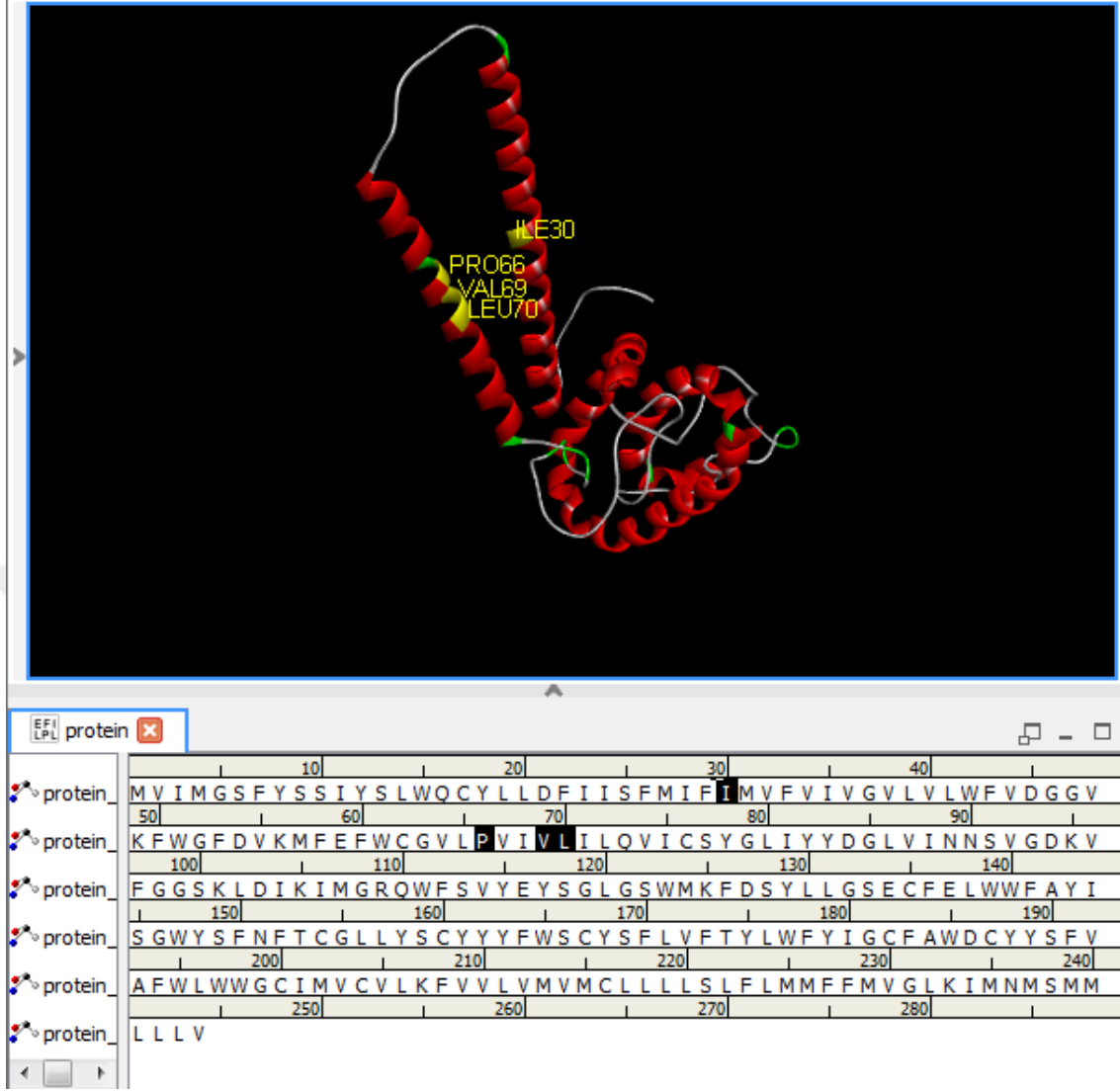
Şekil 4.19. *S. obvelata*’da bulunan COX2 amino asit sekansının insandaki homoloğu ile karşılaştırılması BLAST sonucu

SoCOX2 için oluşturulan homoloji modelinde kalıp olarak kullanılan protein ile *S. obvelata* amino asit sekansı arasındaki örtüşme Şekil 4.20’de gösterilmektedir. Kalıp olarak kullanılan başka bir türe ait COX2 enzimi (pdb kodu: 5z62) ile benzerlik oranı %26,61 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.20. SoCOX2 amino asit sekansının SWISS-MODEL programı ile analizi sonucu 3D yapısının tahmini. Eşleşen bölgeler koyu harflerle, boşluklar kesikli çizgilerle ve eşleşmeyen aminoasitler flu harflerle ikinci sıradaki sekans üzerinde gösterilmektedir

Zhang Lab web sunucusunun bir opsiyonu olan COACH analizi (Yang, Roy ve Zhang, 2012; Yang, Roy ve Zhang, 2013) vasıtasıyla SoCOX2 proteininin liganda bağlanma bölgesi tahmin edilmiştir. Korunmuş bölgelerdeki bağlanma noktalarından en fazla kullanılan amino asitler seçilerek dört amino asit sekans üzerinde işaretlenmiş (Şekil 4.21) ve bu noktaların denk geldiği bölgeler Discovery Studio ekranında görüldükten sonra bu bölgeleri kapsayacak şekilde grid kutusu merkezi seçilmiştir. Bu korunmuş amino asitler izolösin 30, prolin 66, valin 69 ve lösin 70'dir.

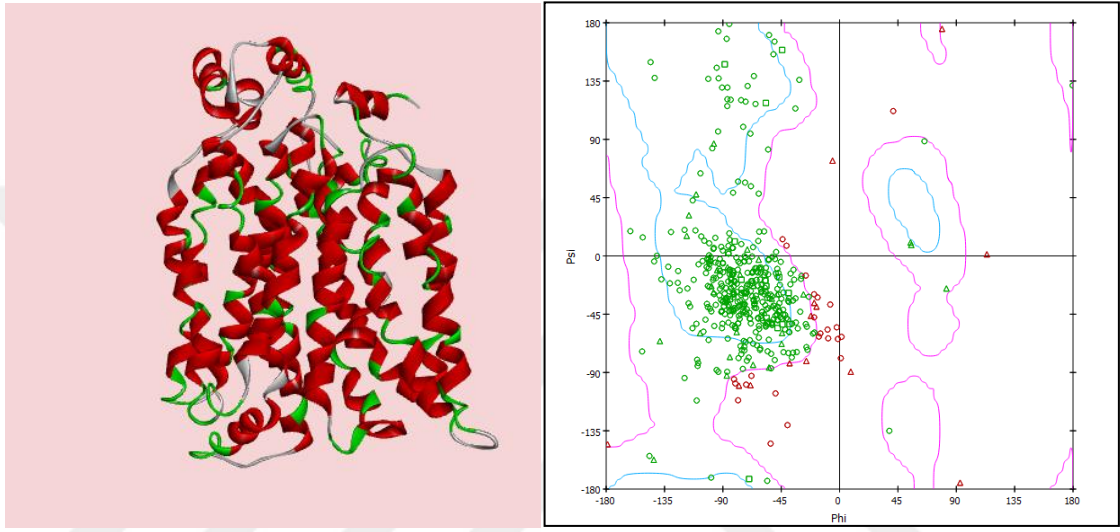


Şekil 4.21. COX2 proteininde en olası bağlanma bölgelerinin Discovery Studio ile gösterilmesi. 3D yapıda olası bağlanma bölgeleri sarı renkle, sekans üzerinde ise siyah renkle işaretli olarak gösterilmiştir

4.4.2. CeGLUT1 reseptörü homoloji modelinin değerlendirilmesi

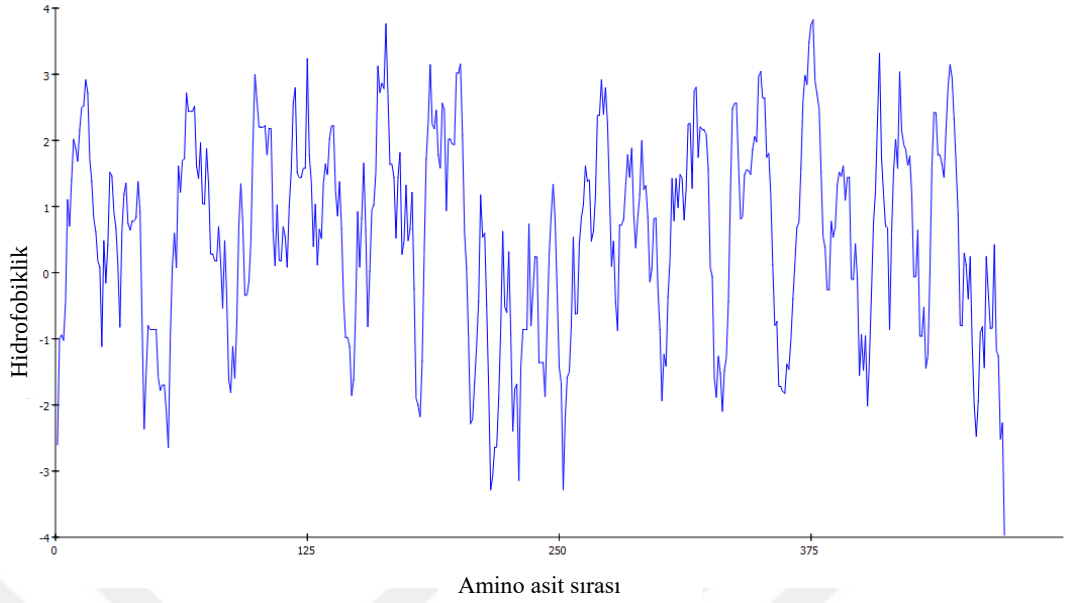
CeGLUT1 reseptörü için amino asit sekansı Uniprottan alındıktan sonra SWISSMODEL ile üç boyutlu yapısı modellenmiştir. CeGLUT1 reseptörü glukoz gibi sakkaritlerin geçişinden sorumlu bir kanal sistemi olduğu için Şekil 4.22 A'da gösterilen halkasal olarak dizilmiş α -helikslerden meydana gelmektedir ve yapının merkezinde bir por bulunmaktadır. Şekil 4.22 A'da sadece α -heliks ve ilmek yapıları görülse de Şekil 4.22 B'deki Ramachandran grafiğinde β -tabakaların bölgesinde de tek

tük amino asitler var görünmektedir. Ayrıca kollajen helikslerin arzu edilen bölgede oldukları ve çok sayıda sağ el α -heliksin de hem arzu edilen hem de ilaveten izin verilen bölgelerde oldukları görülmektedir. Yaklaşık 10-15 amino asitin ise adacıkların dışında kalan izin verilmeyen alanlarda oldukları tahmin edilmiştir. Şekildeki CeGLUT1 homoloji modeli insan GLUT3 reseptörü kalıbında modellenmiş olduğu için bu amino asitlerin çoğunun cömertçe izin verilen alanlara tekabül ettiği de varsayılabilir.



Şekil 4.22. CeGLUT1. **A)** *Caenorhabditis elegans*'a ait GLUT1 reseptörünün homoloji modeli (CeGLUT1) **B)** CeGLUT1 için Ramachandran grafiği

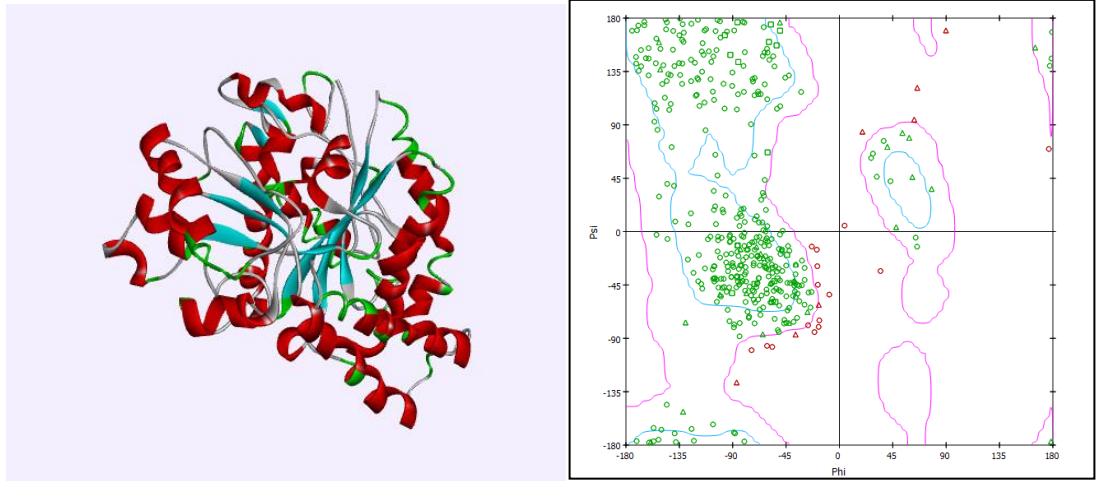
Hidrofobisite grafiğinde protein sekansının tam merkezindeki ve sekansın en sonundaki amino asitlerin hidrofilik oldukları, bunun dışında sekans boyunca α -heliksler ile ilmek yapılarının arıdışık sıralanmaları dolayısıyla hidrofobik amino asitlerin dağılımının da iniş çıkışlarla tüm sekans boyunca homojen bir şekilde olduğu Şekil 4.23'te görülmektedir.



Şekil 4.23. CeGLUT1 için hidrofobiklik grafiği

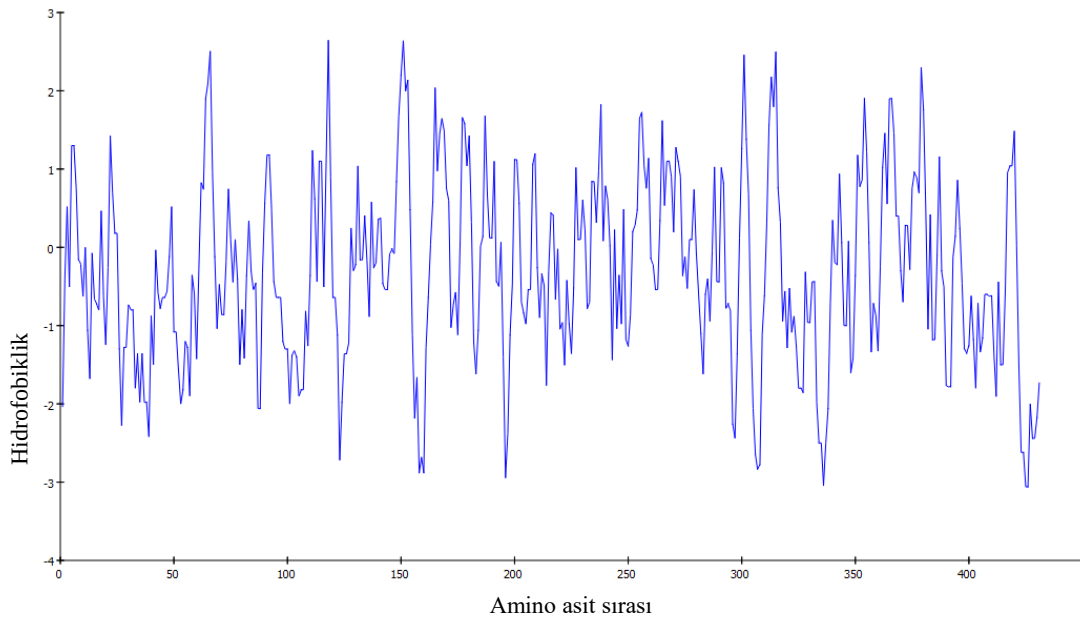
4.4.3. Ev β -tubulin proteininin homoloji modelinin değerlendirilmesi

E. vermicularis β -tubulin üç boyutlu kristalografik yapısı bilinmemekte ancak *E. vermicularis*'e ait genom sekansı Genbank veritabanında bulunmaktadır (Erişim no: PRJEB503). Proteine ait fasta sekansı UniProt veritabanında mevcuttur. *E. vermicularis* tubulin Beta zinciri, *EVEC_LOCUS6493* geni tarafından eksprese edilmekte ve iki domainden oluşmaktadır. Bunlar 47-244 pozisyonları arasında 198 amino asitlik ve 246-383 pozisyonları arasında 138 amino asitlik iki domaindir ("UniProt Veritabanı", t.y.c). Bu çalışmadaki homoloji modeli oluşturulurken memeli hücrelerindeki β -tubulinin kalıp olarak alınmış olabileceği tahmin edilmektedir çünkü kenetleme sonuçları fare ve insanda bulunan β -tubulin ile benzerlik göstermekte, Hc β -tubuline ise uymamaktadır. Sekonder yapının görselinde proteinin en az sekiz α -heliks yapısına ilaveten en az altı uzun β -tabaka ve heliksler ile β -tabakaları birbirine bağlayan ilmek yapılarından meydana geldiği anlaşılmaktadır (Şekil 4.24 A). Ev β -tubulin için oluşturulan Ramachandran grafiğinde her tür β -tabaka yapısı ve hem sağ el hem de sol el α -heliksler ile en az on amino asidin kollajen heliks yapıda olduğu gösterilmektedir (Şekil 4.24 B). Bu homoloji modelinde izin verilmeyen bölgede olan amino asit sayısı çok azdır ve şekildeki noktaların çok büyük bir kısmının arzu edilen veya ilaveten izin verilen alanlarda bulunduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.24. Evβ-tubulin. A) *E. vermicularis*'e ait β-tubulin proteininin homoloji modeli
B) Evβ-tubulin için Ramachandran grafiği

Şekil 4.25'te gösterilen hidrofobisite grafiğinde proteini meydana getiren hidrofilik ve hidrofobik amino asitler arasında, sayı ve sekans üzerindeki dağılım açısından, bir denge olduğu görülmektedir. En hidrofobik amino asitler 55.-60., 120.-125., 145.-149., 298.-300., 305.-310. ve 365-375. amino asitler arasında bulunmaktadır. Grafikteki çoğu amino asit median bölge civarında yer almaktadır. En hidrofilik olanlar ile en hidrofobik olanların sayıları benzer olduğu için, protein genel olarak orta seviyede hidrofobiktir.



Şekil 4.25. Evβ-tubulin için hidrofobiklik grafiği

S. muris tubulin beta zinciri (Uniprot ID: A0A0N5AKB1) ve *H. contortus* tubulin beta zincirinin (Uniprot ID: Q25049) sekans hizalaması sonucu benzerlik oranı %83,964 olarak saptanırken, *S. muris*, *H. contortus* ve *E. vermicularis* tubulin beta zincirinin fasta sekanslarının karşılaştırılması sonucu üçünün benzerlik oranı %76,615 olarak bulunmuştur. Aşağıdaki Şekil 4.27’de boşluklar, eşleşmeyen ve eşleşen bölgeler gösterilmektedir.

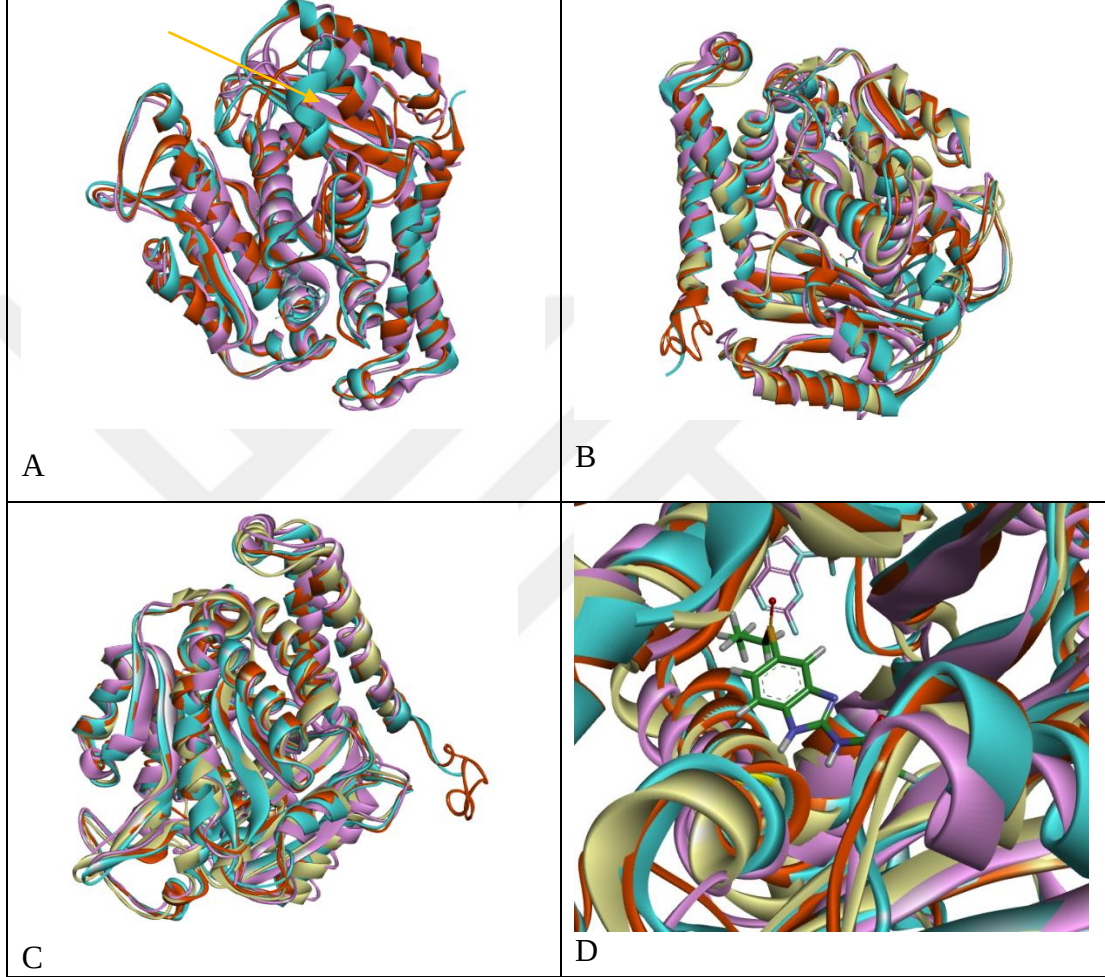
6E7C_1 Chain	1	MREIVHIOAGQCGNQIGAKFEVISDEHGI	DPTG	SYHGDS	SDLQLE	IN	VYNEA	TG	KYV	60
A0A0N5AKB1	A0A0N5AKB1_9BILA	1	MREIVHVOAGQCGNQIGAKFEVISDEHGI	QPDG	SYKGD	SDLQLE	IN	VYNEA	NG	60
Q25049	Q25049_HAE	1	MREIVHVOAGQCGNQIGSKFEVISDEHGI	QPDG	YKGE	SDLQLE	IN	VYNEA	HG	60
A0A0N4V965	A0A0N4V965_ENTVE	1	MREIVHIOAGQCGNQIGAKFEVISDEHGI	QSDG	SYKGE	SDLQLE	IN	VYNEA	CG	60
			*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
6E7C_1 Chain	61	PRAILVDLEPGTMDSVRS	SGP	QIFRP	DNFVFG	QSGAG	NNWAKGHYTE	GAE	LIV	120
A0A0N5AKB1	A0A0N5AKB1_9BILA	61	PRAILVDLEPGTMDSVRS	SGP	QIFRP	DNFVFG	QSGAG	NNWAKGHYTE	GAE	120
Q25049	Q25049_HAE	61	PRAILVDLEPGTMDSVRS	SGP	QIFRP	DNFVFG	QSGAG	NNWAKGHYTE	GAE	120
A0A0N4V965	A0A0N4V965_ENTVE	61	PRAILVDLEPGTMDSVRS	SGP	QIFRP	DNFVFG	QSGAG	NNWAKGHYTE	GAE	120
			*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
6E7C_1 Chain	121	RKESE	SCDCLQGF	QF	LT	HS	SLGGGT	GSGM	GTL	180
A0A0N5AKB1	A0A0N5AKB1_9BILA	121	RKESE	SCDCLQGF	QF	LT	HS	SLGGGT	GSGM	180
Q25049	Q25049_HAE	121	RKESE	SCDCLQGF	QF	LT	HS	SLGGGT	GSGM	180
A0A0N4V965	A0A0N4V965_ENTVE	121	RKESE	SCDCLQGF	QF	LT	HS	SLGGGT	GSGM	180
			*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
6E7C_1 Chain	181	EPYNATL	SVHQL	VENT	DET	FC	IDNEAL	YD	IC	240
A0A0N5AKB1	A0A0N5AKB1_9BILA	181	EPYNATL	SVHQL	VENT	DET	FC	IDNEAL	YD	240
Q25049	Q25049_HAE	181	EPYNATL	SVHQL	VENT	DET	FC	IDNEAL	YD	240
A0A0N4V965	A0A0N4V965_ENTVE	181	EPYNATL	SVHQL	VENT	DET	FC	IDNEAL	YD	240
			*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
6E7C_1 Chain	241	RFPGQL	NADLR	KLAV	NMV	VP	FR	LH	FF	300
A0A0N5AKB1	A0A0N5AKB1_9BILA	241	RFPGQL	NADLR	KLAV	NMV	VP	FR	LH	300
Q25049	Q25049_HAE	241	RFPGQL	NADLR	KLAV	NMV	VP	FR	LH	300
A0A0N4V965	A0A0N4V965_ENTVE	241	RFPGQL	NADLR	KLAV	NMV	VP	FR	LH	300
			*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
6E7C_1 Chain	301	AACDPR	HGRYL	TVAA	I	FRGR	MS	KE	VDE	360
A0A0N5AKB1	A0A0N5AKB1_9BILA	301	AACDPR	HGRYL	TVAA	I	FRGR	MS	KE	360
Q25049	Q25049_HAE	301	AACDPR	HGRYL	TVAA	I	FRGR	MS	KE	360
A0A0N4V965	A0A0N4V965_ENTVE	301	AACDPR	HGRYL	TVAA	I	FRGR	MS	KE	360
			*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
6E7C_1 Chain	361	LKMSAT	FIGN	STAI	QEL	E	KR	ISE	Q	420
A0A0N5AKB1	A0A0N5AKB1_9BILA	361	LKMSAT	FIGN	STAI	QEL	E	KR	ISE	420
Q25049	Q25049_HAE	361	LKMSAT	FIGN	STAI	QEL	E	KR	ISE	420
A0A0N4V965	A0A0N4V965_ENTVE	361	LKMSAT	FIGN	STAI	QEL	E	KR	ISE	420
			*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
6E7C_1 Chain	421	EYQOY	Q	DATA	ED	EG	EL	DH	GE	426
A0A0N5AKB1	A0A0N5AKB1_9BILA	421	EYQOY	Q	DATA	ED	EG	EL	DH	426
Q25049	Q25049_HAE	421	EYQOY	Q	DATA	ED	EG	EL	DH	426
A0A0N4V965	A0A0N4V965_ENTVE	421	EYQOY	Q	DATA	ED	EG	EL	DH	426
			*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

Şekil 4.27. Dört farklı organizmaya ait β -tubulin sekanslarının hizalanması. 6E7C_1 Chain insana ait 426 amino asitlik sekans; A0A0N5AKB1 *S. muris*’e ait 449 amino asitlik sekans; Q25049 *H. contortus*’a ait 448 amino asitlik sekans ve A0A0N4V965 ise *E. vermicularis*’e ait 448 amino asitlik sekanslardır. Tamamen eşleşen bölgeler koyu gri, büyük oranda eşleşen bölgeler gri, az eşleşenler açık gri ve en düşük skor ile eşleşen bölgeler ise beyaz ile temsil edilmiştir

4.4.4. Farklı organizmalara ait β -tubulin proteinlerinin superimpose sonucu

Şekil 4.28’de dört farklı organizmaya ait β -tubulin proteinlerinin 3D yapılarının superimpose analizi sonucu dört proteinin çok iyi bir şekilde örtüştüğü görülmektedir.

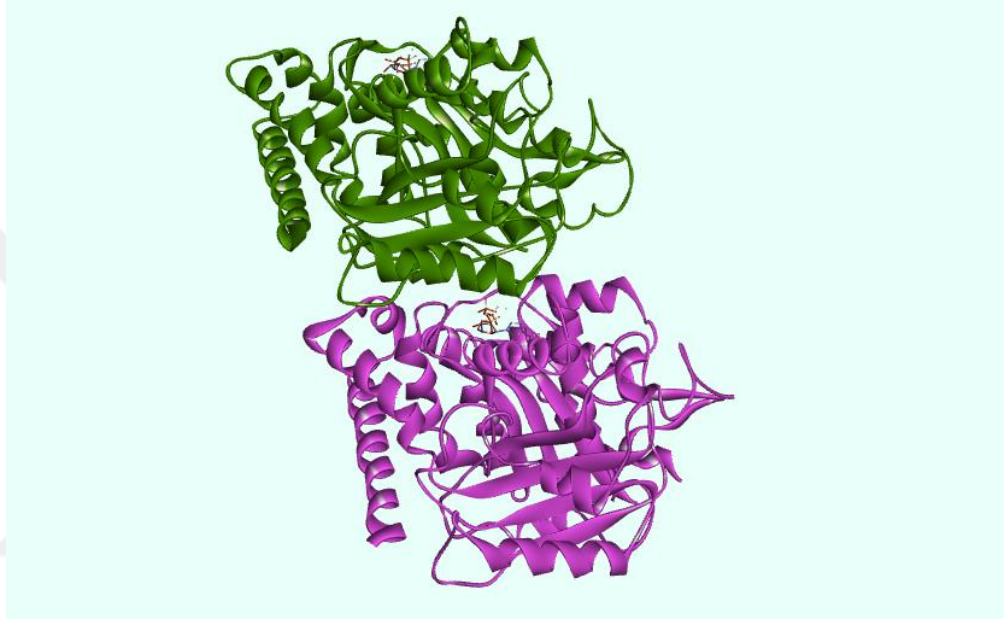
Proteinlerin sekans uzunluklarındaki farklılığa bağlı olarak N terminal ucunda belirgin bir fark olmasına rağmen diğer kısımlar büyük oranda üst üste gelmiştir. Bu durum, tüm organizmalarda var olan β -tubulinin üç boyutlu yapısının korunmuş dizilere bağlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.28. Tubulinlerin superimpose modeli. Sarı renk insan beta tubulini, mor renk *H. contortus* beta tubulini, kırmızı renk *S. muris* beta tubulini, turkuaz renk is *E. vermicularis* beta tubulinini göstermektedir. **A)** i β -tubulini dışında kalan üç protein. **B)** Dört protein. **C)** y eksenini etrafında 180° dönmesiyle elde edilen superimpose modeli. **D)** ligandın çevresini gösteren büyütülmüş hali

Şekilde 4.28’de görüldüğü gibi *S. muris* β -tubulin en uzun N terminal yapısına sahip proteindir ve onu mavi renkte gösterilen *E. vermicularis* β -tubulin izlemektedir. İnsan β -tubulin ve *H. contortus* β -tubulini ise hemen hemen aynı hizada sonlanmaktadır. İnsan β -tubulin çoğunlukla diğer tubulin grupları ile kompleks halde bulunmaktadır. Şekil

4.29’da gösterilen insan β -tubulini α -tubulin ile kompleks halinde dimer olarak bulunmakta ve β -tubulinin N terminal ucu α -helikse dönük vaziyette iki tubulin bir arada durmaktadır. Diğer proteinlerden *H. contortus* β -tubulinin teorik yapısı PDB’den alındığında sadece Albendazol ile kompleks halinde bir monomerdi. *E. vermicularis* ve *S. muris*’e ait kristalize yapılar bilinmediği için bu organizmalara ait protein sekansları kullanılarak tahmin edilen 3D yapıları da yine monomer yapıdaydı.

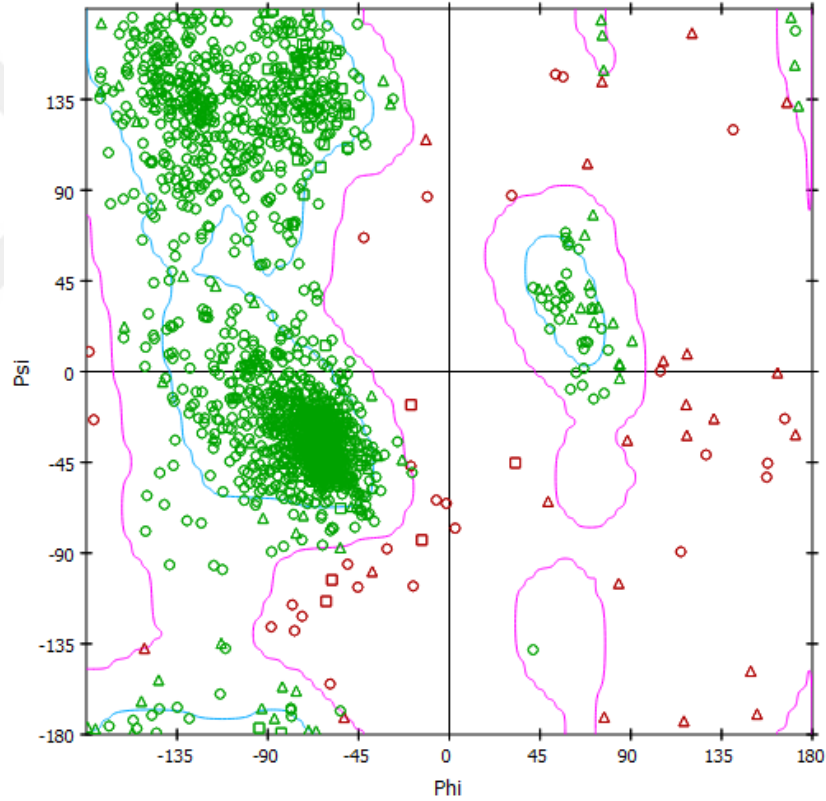


Şekil 4.29. İnsan tubulin proteini dimer halinde bulunmaktadır. Mor renk alfa tubulini, koyu yeşil renk ise beta tubulini göstermektedir (PDB ID: 6E7C). Şekilde her iki tubulin de ligandları ile bağlı haldedir

Bu dört proteinin superimpose analizinde en dikkat çekici nokta (Şekil 4.28A’da okla gösterilen) *E. vermicularis* β -tubulininde görülen ekstra bir α -heliks oluşumudur ve Ala275 ile Arg282 amino asit rezidüleri arasında kalan bölgedeki protein katlanması diğer üç organizmadakinden farklılık göstermektedir; diğer organizmalarda ilmek yapısı, *E. vermicularis*’de ise α -heliks yapısı oluşmuştur. Bağlanma bölgesindeki rezidülerin örtüşmeleri incelendiğinde büyük oranda çakıştıkları görülmektedir. Ancak Thr238 ile Pro243 arasında kalan bölgede bu dört tubulin yapısı için farklı katlanma konformasyonları göze çarpmaktadır. Bu bölgede Ev β -tubulin α -heliks yaparken, Hc ve Sm β -tubulinleri ilmek yapısında görülmekte, insan β -tubulininin ise Ev β -tubulininden farklı bir açıdan α -heliks yaptığı ve sonuçta bu bölgede hiçbirinin çakışmadığı

anlaşılmaktadır. Bunun dışında Hc β -tubulinin bağlanma bölgesi çok az bir farkla diğer üç tubulin yapısından daha geniş görünmektedir. Hc β -tubulin için Gly223 ile Val236 arasındaki α -heliks biraz daha liganddan uzakta görünmektedir. Bu mesafe farkı diğer tubulinlerin ligand ile etkileşimlerinde bir enerji farkına neden olabilecektir.

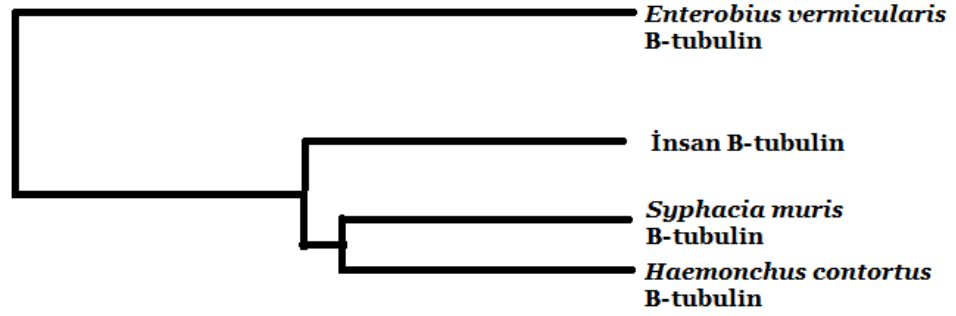
Şekil 4.30’da dört farklı organizmaya ait β -tubulin proteinlerinin superimpose sonrası Discovery Studio programı ile tahmin edilen Ramachandran grafiği verilmiştir. Beklendiği gibi β -plaka bölgesinde çok sayıda uygun Psi açısı görülmektedir. En yoğun bölge ise sağ el α -heliks konformasyonunun beklendiği bölge olarak görülmektedir ki bu protein çok sayıda α -heliks içerdiği için bu da 3D yapılar ile örtüşmektedir.



Şekil 4.30. Dört organizmaya ait beta tubulin proteinlerinin süper impose konumundaki Ramachandran Plot. Discovery Studio ile oluşturuldu

Dört farklı β -tubulin için Uniprot veritabanındaki opsiyonlar kullanılarak akrabalık ilişkisine yönelik bir ağaç oluşturulduğunda Şekil 4.31’deki ağaca benzer bir sonuç elde edilmiştir (Şekil, net görülebilmesi için paint ile çizilmiştir). Bu ağaç yapısı

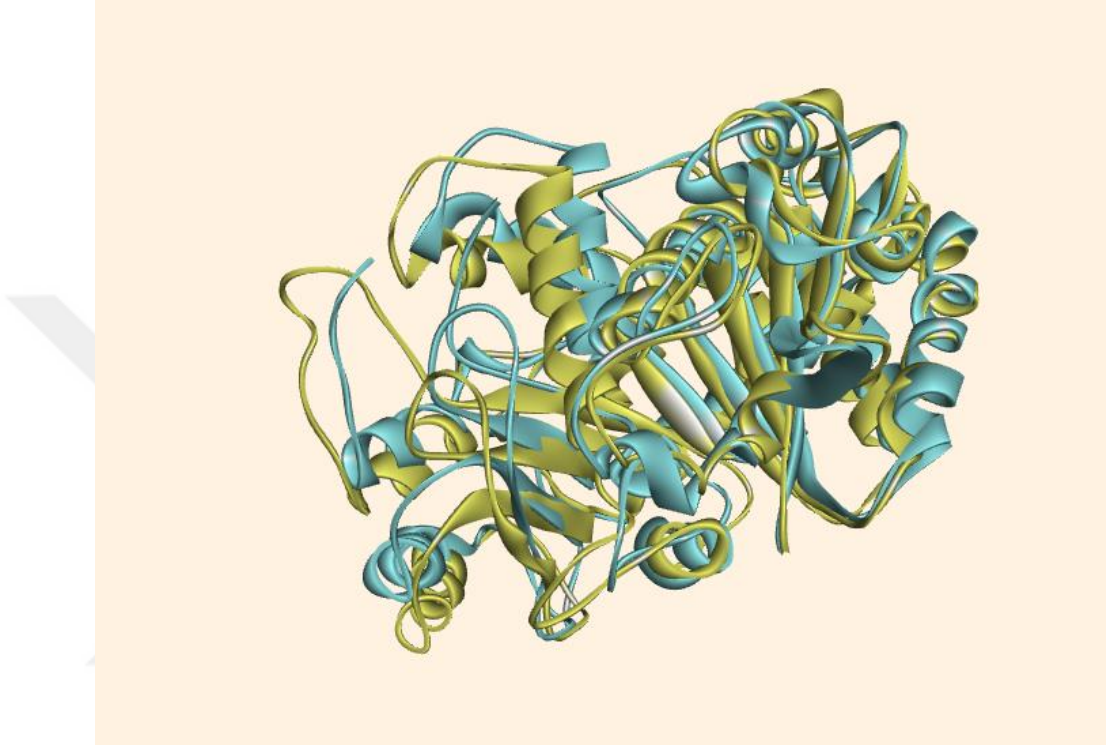
yorumlandığında beklendiği gibi *S. muris* ve *H. contortus*'un en yakın akraba türler olduğu görülmektedir. Ancak *E. vermicularis*'in en uzak tür olması ilginçtir çünkü en uzak türün insan olması beklenmektedir.



Şekil 4.31. Maksimum parsimony yöntemiyle oluşturulan bir OTU ağacının yapısı bu dört organizmanın β -tubulin proteinlerinin benzerlik oranlarının hesaplanması ve kombine olarak karşılaştırılması ile oluşturulmuştur. Şekilde en yakın türler *H. contortus* ve *S. muris* iken, en uzak türün *E. vermicularis* olduğu gösterilmektedir (Orijinal)

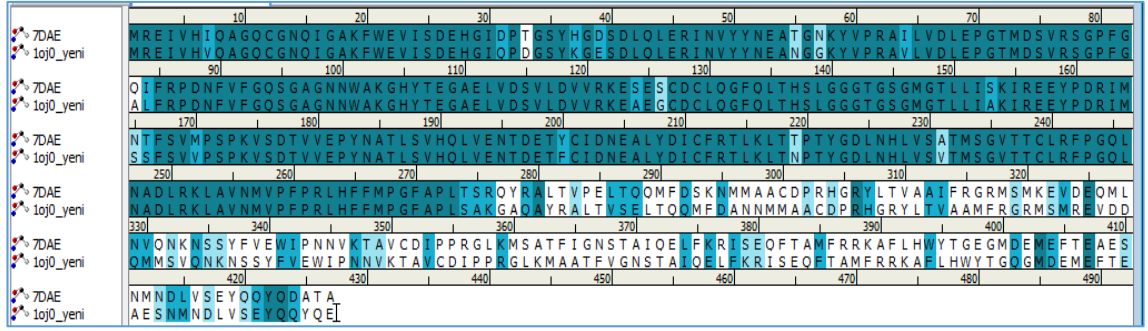
Bu çalışmada kenetlenen bitkisel ligandlar içerisinde en yüksek skora sahip ligandlardan ADME sonuçları en uygun kriterlere sahip olanlar; arteannuin-b, apigenin, diosmetin, oreganol ve ODTAME'dir. Bunların hem nematod hem insan hem de farelerde bulunan homolog proteinlerle kenetlenmesi amacıyla fare β -tubulin proteini (PDB kodu: 7DAE) üçüncü yapılan kenetlemeler için seçilmiştir. Kenetleme öncesi grid merkezinin bulunabilmesi için Hc β -tubulin ile fare β -tubulin proteini superimpose ile biraraya getirilmiş ve Şekil 4.32'de görüldüğü gibi bu iki proteinin birbirlerine uyumları da incelenmiştir. İki proteinden sarı renkle gösterilen Hc β -tubulin ve turkuaz olan fare β -tubulinidir. Bunlardan fare β -tubulininin ilmek yapısında bazı eksiklikler olduğu ve ayrıca heliks yapıları benzer olsa da bazı bölgelerde fare β -tubulininin α -heliks yaptığı ancak Hc β -tubulinin ilmek olarak devam ettiği görülmektedir. En çarpıcı özellik ise ilmek yapılarındaki farklılıktan kaynaklanan bir konformasyonel kayma ve dolayısıyla α -helikslerin tam olarak üst üste gelememesidir. İlginç olarak α -helikslerin aksine proteinlerdeki β -tabakalar üst üste çakışık durmaktadır. Proteinin merkezinde yer alan bağlanma bölgesindeki üç β -tabaka ise neredeyse çakışık pozisyonadadır. Ancak resme dikkatli bakılacak olursa çekirdek heliks iki proteinde yakın dursa da tam olarak örtüşmemektedir. Ayrıca ligandın bağlanma bölgesinde yer aldığı tahmin edilen bir

diğer α -helikste farklılık vardır ve bu bölge de örtüşmemektedir. Tamamen örtüşen uç kısmına rağmen onun hemen yanında yer alan bu sekonder yapıdaki farklılık muhtemelen ligandın bağlanma ilgisindeki farklılığın da en önemli nedenlerinden biridir.



Şekil 4.32. Hc β -tubulin ile fare β -tubulini için superimpose. Sarı renk protein *H. contortus*'a, turkuaz protein fareye ait β -tubulindir

Superimpose resminde M-ilmeğinin örtüşemediği ve turkuaz renkle temsil edilen, fareye ait β -tubulininin kopmuş iki parça halinde bulunduğu görülmektedir. Elbette gerçek proteinde böyle bir kopukluk yoktur, görseldeki bu durum, superimposedan kaynaklanmaktadır. Ayrıca S9 ilmeğinde de yapılar aynı olsa da önemli bir konum farkı vardır ve aynı durum H6-H7 ilmeği için de geçerlidir. Sonuç olarak bu iki türe ait olan β -tubulin proteinlerinin β -tabaka yapıları ve heliks yapıları büyük benzerlik göstermekte ancak ilmek yapıları kimi bölgelerde hiç örtüşmemekte ve sekanslar arasındaki uzunluk farkı da bu konformasyonel farklılığı doğurmaktadır. Şekil 4.33'te bu iki proteinin amino asitlerinin hizalanması ile eşleşen ve eşleşmeyen bölgeler görülmektedir.

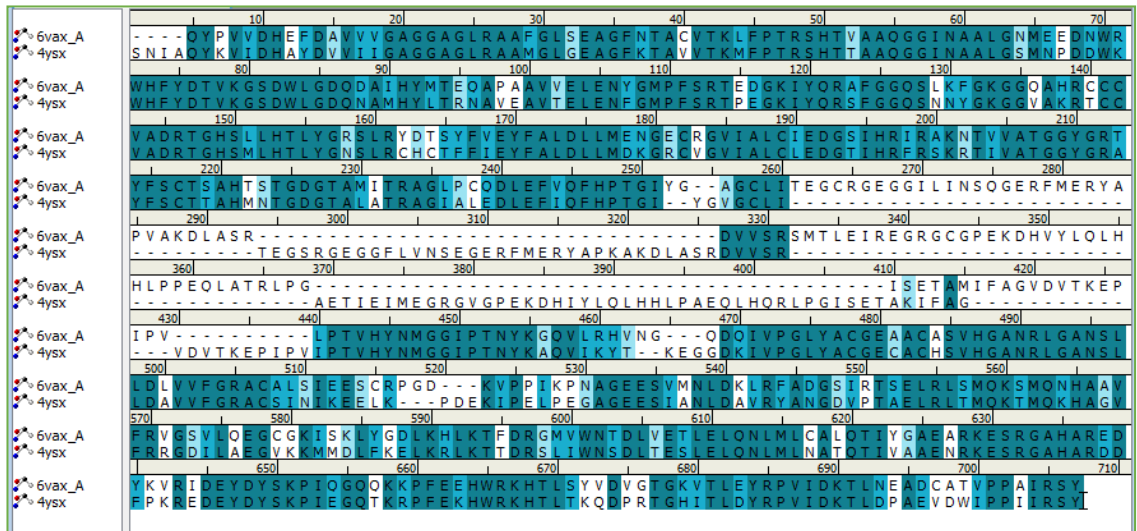


Şekil 4.33. Hcβ-tubulin ile fare β-tubulininin amino asit sekanslarının hizalaması

Bu iki β-tubulinin 280. amino aside kadar büyük oranda eşleştiği, 280-428 arasında ise sadece altı noktada eşleştiği ve aynı sekans uzunluğuna sahip oldukları görülmektedir.

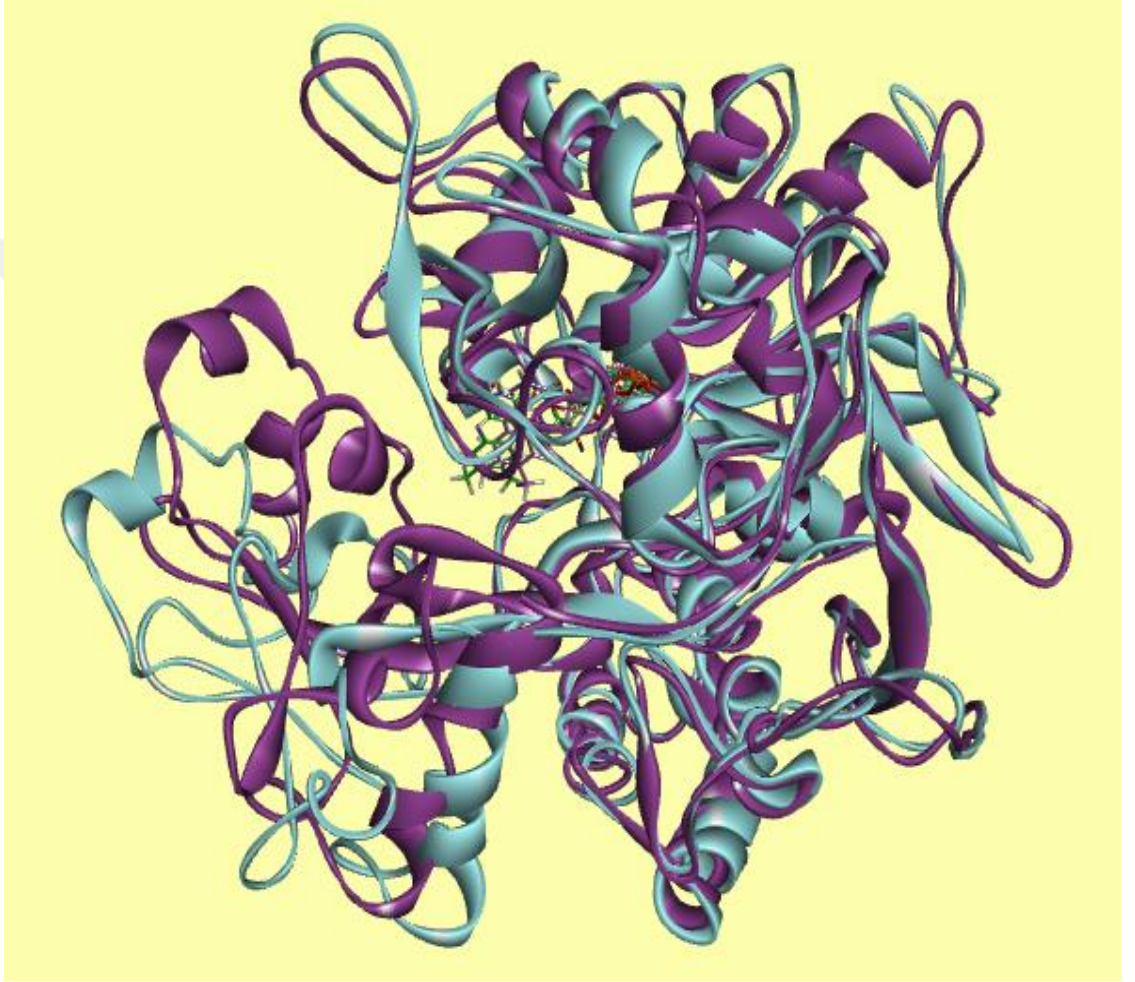
4.4.5. Fumarat redüktazın insanda ve nematodda bulunan formunun karşılaştırılması

Fumarat redüktazın insandaki formu ile *A. suum*'daki formunun sekans örtüşmeleri karşılaştırıldığında Şekil 4.34'te gösterildiği gibi 260. ve 440. pozisyonlar arasında yalnızca altı amino asidin eşleştiği, diğer kısımların ise eşleşmediği, bazı kısımlarda boşlukların bazı kısımlarda da birbirinden farklı amino asitlerin bulunduğu görülmektedir.



Şekil 4.34. 6VAX'a ait A zinciri ile 4YSX'e ait A zincirinin protein sekanslarının hizalanması. Hizalama ve görsel Discovery Studio ile oluşturuldu

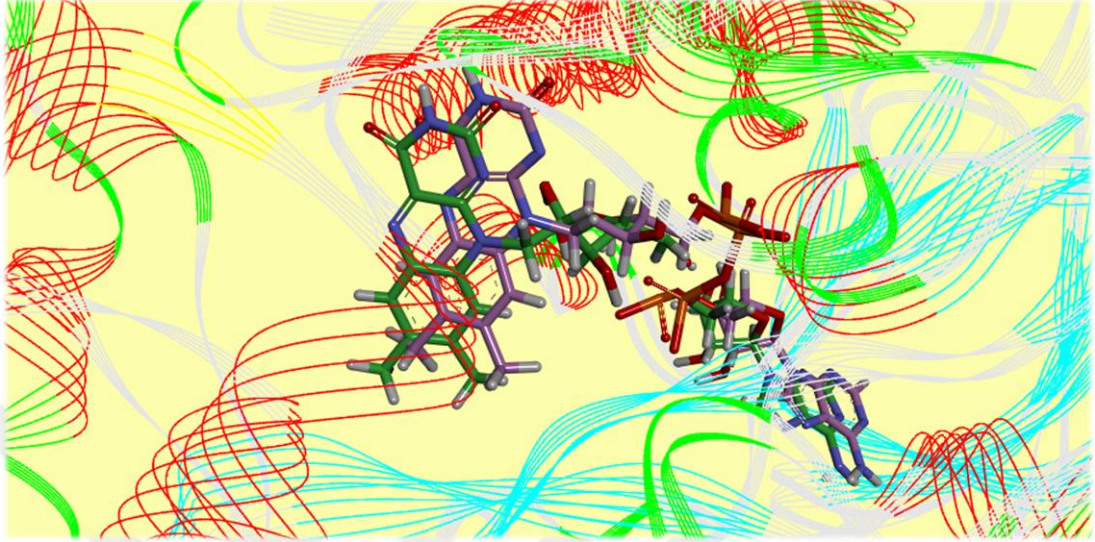
Fumarat redüktazın insanda ve *A. suum*'da bulunan iki homologunun üç boyutlu yapılarının karşılaştırılmaları için bir superimpose modeli oluşturulmuştur. Aşağıda bu superimpose modeli gösterilmektedir (Şekil 4.35). Şekle göre ligandların bulunduğu bölgedeki ilmek yapıları büyük oranda örtüşmekle beraber aktif bölgede kalan alfa heliks ve beta konformasyonlar arasında hiç örtüşmeyen bölgeler mevcuttur.



Şekil 4.35. 4YSX ile 6VAX'in superimpose analizi sonrası görünümü. 6VAX'e ait A zinciri turkuaz, 4YSX'e ait A zinciri ise mor renkle temsil edilmektedir

Fumarat redüktazın aktivitesinde önemli bir yere sahip olduğu tahmin edilen FAD kofaktörü her iki enzimde de neredeyse çakışık şekilde konumlanmıştır. Kenetleme prosedüründe FAD N5 atomu merkeze alındığı için FAD'ın bu yerleşimi deney sonuçlarının karşılaştırılabilmesi açısından önemlidir. Ne var ki Şekil 4.36'da da görüldüğü gibi FAD etrafındaki protein sekonder yapıları kimi kısımlarda

örtüşmemektedir. Bu durum da aktif bölgeye dahil olan rezidülerde ve dolayısıyla ortaya çıkacak etkileşimlerde değişikliğe yol açacaktır.



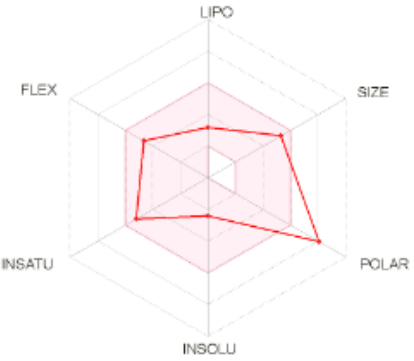
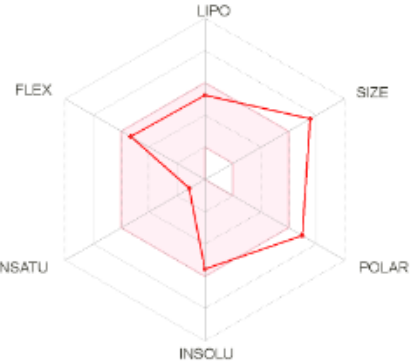
Şekil 4.36. Superimpose sonrası 4YSX ve 6VAX içindeki FAD kofaktörlerinin birbirilerine göre konumu. Her iki proteinde de FAD'ın hemen hemen aynı bölgede yerleştiği görülmektedir

4.5. En İyi Skora Sahip Ligandların ADME Değerlendirmesi

Bu çalışmada kenetleme deneylerinde AsFR, KPT 2 ve Hc β -tubulin inhibisyonları açısından araştırılan elli bitkisel ligand içerisinde en iyi bağlanma ilgisine sahip bulunan ligandlar, farmakokinetiklerinin araştırılabilmesi amacıyla SWISSADME web sunucu vasıtasıyla değerlendirilmiştir. Bu programdaki formülasyonlar tamamen molekülün kimyasal özellikleri göz önüne alınarak ADME özelliklerinin tahmin edilmesine dayanmaktadır. Çizelge 4.5'deki moleküllerden oreganol her üç hedef proteine de iyi derecede bağlanabilen bir ligand olduğu için ADME özellikleri araştırılmıştır. Oreganolün radar grafiği, molekülün çözünürlüğünün, doymamışlığının, esnekliğinin, lipofilitesinin ve büyüklüğünün makul sınırlar içerisinde olduğunu, yalnızca polarlığının arzu edilenden daha fazla olması dolayısıyla oral kullanıma uygun olmadığını göstermektedir. Oreganolün GI absorpsiyonu zayıftır ve kan beyin bariyerini de geçemez. Çizelgedeki sitokrom enzimlerinin hiçbirini inhibe etmeyeceği ve p-gp substratı da olmayacağı tahmin edilmiştir. Bu özellikleri oreganolün yan etki açısından

problem yaratmayacağını göstermektedir. Her ne kadar yan etkilerinin araştırılması için daha başka çalışmalara ihtiyaç olsa da, bu *in silico* çalışmada oreganol fumarat redüktaz enziminin insanda bulunan formuna düşük bir ilgi gösteren en selektif ligand olduğu için hem hedefe özgünlük hem de ADME sonuçları açısından en az yan etki meydana getirebilecek ideal bir ligand olarak öne çıkmıştır. GIS'deki helmintlerin öldürülmesinde etkili olabilecek bu molekülün olası inhibisyon mekanizması nematoddaki beta tubulin proteini ve FR enziminin aynı anda inhibisyonu yoluyla ortaya çıkacak gibi görünmektedir.

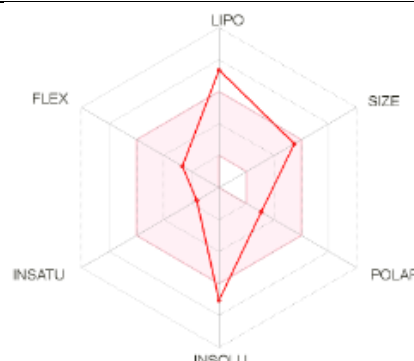
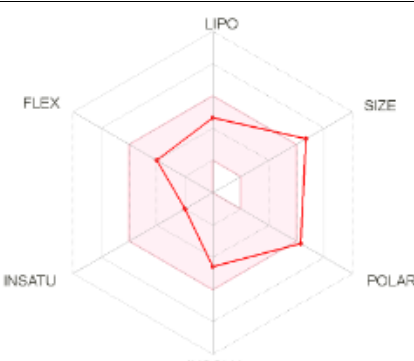
Çizelge 4.5. KPT-2 ve AsFR enzimleri için en iyi bağlanma moduna sahip ilk dört ligandın ADME özellikleri

Molekül ismi	Oreganol	Momordisin II
Kimyasal özellikleri		
Moleküler Formül	C20H22O11	C36H58O9
Moleküler Ağırlık	438,38 g/mol	634,84 g/mol
Dönebilen bağ sayısı	7	8
Hidrojen-bağı alıcı sayısı	11	9
Hidrojen-bağı sunucu sayısı	7	6
GI absorpsiyonu	Zayıf	Zayıf
KBB geçebilirliği	Yok	Yok
P-gp substratlığı	Yok	Var
Deriden geçebilirliği	-8,95 cm/s	-7,57 cm/s

Çizelge 4.5. KPT-2 ve AsFR enzimleri için en iyi bağlanma moduna sahip ilk dört ligandın ADME özellikleri (devam)

Lipinski'nin beşer kuralına uygunluğu	Yok, 2 ihlal; N veya O sayısı>10, NH veya OH sayısı>5	Yok, 2 ihlal; MA>500, NH veya OH sayısı>5
Ghose, Veber, Egan ve Muegge'nin kurallarına uygunluğu	Yok	Yok
Biyoygunluk Skoru	0,17	0,17
CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 enzimleri için inhibitörlüğü	Yok	Yalnızca CYP3A4 inhibitörü
TPSA	186,37 Å ²	156,91 Å ²

Çizelge 4.5. KPT-2 ve AsFR enzimleri için en iyi bağlanma moduna sahip ilk dört ligandın ADME özellikleri (devam)

Molekül ismi	Karantadiol-A	Kukurbitasin-B
Kimyasal özellikleri		
Moleküler Formül	C30H46O3	C32H46O8
Moleküler Ağırlık	454,68 g/mol	558,70 g/mol
Dönebilen bağ sayısı	4	6
Hidrojen-bağı alıcı sayısı	3	8
Hidrojen-bağı sunucu sayısı	2	3

Çizelge 4.5. KPT-2 ve AsFR enzimleri için en iyi bağlanma moduna sahip ilk dört ligandın ADME özellikleri (devam)

GI absorpsiyonu	Yüksek	Zayıf
KBB geçebilirliği	Yok	Yok
P-gp substratlığı	Var	Var
Deriden geçebilirliği	-3,85 cm/s	-7,83 cm/s
Lipinski'nin beşer kuralına uygunluğu	Var, 1 ihlal; MLOGP>4,15	Var, 1 ihlal, MA>500
Ghose, Veber, Egan ve Muegge'nin kurallarına uygunluğu	Veber'e göre uygun	Veber'e ve Muegge'ye göre uygun
Biyouygunluk Skoru	0,55	0,55
CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 enzimleri için inhibitörlüğü	Yalnızca CYP2C9 inhibitörü	Yalnızca CYP3A4 inhibitörü
TPSA	49,69 Å ²	138,20 Å ²

Bu dört molekül içerisinde oreganol -8,95 cm/s değeriyle deriden en hızlı geçebilen moleküldür. Oreganolden daha büyük bir molekül olan momordisin II ise oreganol kadar olmasa da hızlı şekilde deriden geçebilir. Oreganolden daha az hidrojen bağı alıcı ve verici atoma sahip olsa da momordisin II de kan beyin bariyerini geçemez ve GI absorpsiyonu zayıftır. Oreganolden farklı olarak momordisin II, P-gp substratı olarak da görev alabilir ve böylece ilacın atılımını yavaşlatma potansiyeli ortaya çıkabilir.

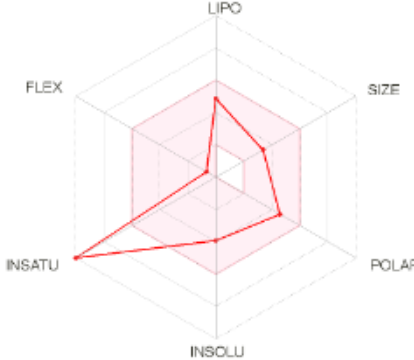
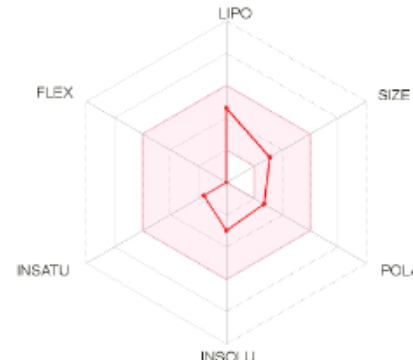
Karantadiol-A molekül ağırlığı ve büyüklüğü açısından oreganole yakındır ancak farklı olarak hidrojen bağı alıcı ve verici sayısı çok daha azdır. Böylece Lipinski'nin kurallarından üçüne uyar. TPSA değeri 49,69 Å² bulunmuştur, molekül radar grafiğinde görüldüğü gibi oldukça lipofildir ve suda çözünürlüğü de çok düşüktür. Karantadiol-A

Çizelge 4.5’deki dört molekülden GI absorpsiyonu yüksek tek moleküldür. GIS dışında bulunabilen helmintlerin giderilmesinde etkili olabilecek bu triterpenoid yapıdaki molekül, CeGLUT reseptörü inhibisyonunda en iyi skora sahip bulunan bitkisel ligand olduğu için, glukozdan faydalanılmasını azaltma yoluyla doku nematodlarına etki edebilecek bir ilaç adayı olduğu, bu sonuçlardan anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.5’te ADME özellikleri gösterilen dört molekülden hiçbiri ağızdan alınabilecek bir ilaç olma açısından biouygunluk sergilememiştir. Bu dört molekülden yalnızca kukurbitasin-B kriterleri sağlamaya oldukça yaklaşmıştır ve bu molekülün molekül büyüklüğü istenen ölçüleri hafifçe aşmakta olduğu için son kriteri sağlayamamıştır. Çizelge 4.5’te görüldüğü gibi kukurbitasin-B, GI absorpsiyonu zayıf olan 558,7 g/mol molekül ağırlıkta ve deriden -7,83 cm/s hızla emilebilen bir triterpenoiddir. Bir halk tedavisi olarak zeytinyağında bekletilen *M. charantia* meyvelerinin deri üzerine sürülerek uygulanması bu ADME sonuçları ile uyumludur ve bu bileşenin deri yoluyla uygulanması doğru bir uygulama şeklidir. Çizelgede gösterilmese de kukurbitasin-B’nin ILOGP değeri 3,77 bulunmuştur ve 5’ten küçük olduğu için bu molekül lipofilik karakterdedir, bu nedenle hücre zarından da kolayca geçebilir ve yağda çözündürülerek kullanılabilir.

Kenetleme deneylerine göre Hc β -tubulin için en yüksek skor değerleri gösteren ilk dört bitkisel ligandın ADME değerlendirmesi Çizelge 4.6’da verilmiştir. 13,24 nM K_i değeriyle en potent inhibitör olan apigenin hem Lipinski’nin hem de Egan, Muegge, Veber ve Ghose’nin kurallarına tam olarak uymaktadır. Kan beyin bariyerini geçemez ancak GI absorpsiyonu yüksektir. Radar grafiğine göre apigenin doymamış ikili bağlar açısından çok zengindir, tek bir rotasyonal bağı olduğu için molekül esnek değildir, lipofillik, polarlık ve büyüklük açısından makul sınırlar içerisinde yer alır. Çizelgedeki sitokrom enzimlerinden bazılarını inhibe edebilir. Ayrıca hücreden atılım açısından değerlendirildiğinde p-gp substratı olmadığı ve bu nedenle atılıma etki etmeyeceği tahmin edilmiştir.

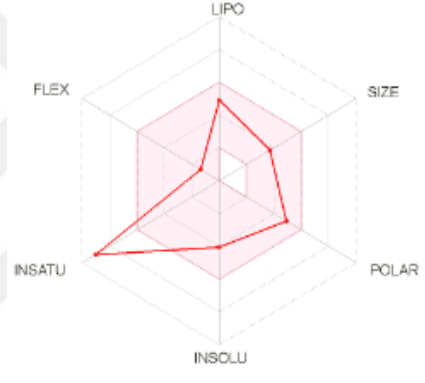
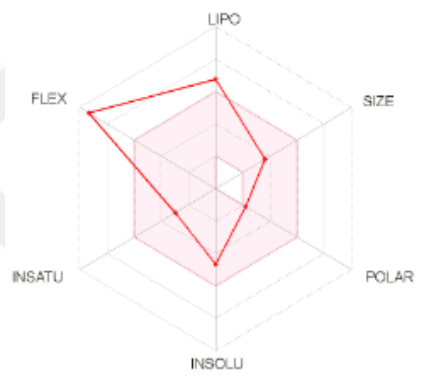
Çizelge 4.6. Hc β -tubulin için en iyi bağlanma moduna sahip ilk dört ligandın ADME özellikleri

Molekül ismi	Apigenin	Arteannuin-B
Kimyasal özellikleri		
Moleküler Formül	C ₁₅ H ₁₉ O ₅	C ₁₅ H ₂₀ O ₃
Moleküler Ağırlık	270,24 gr/mol	248,32 gr/mol
Dönebilen bağ sayısı	1	0
Hidrojen-bağı alıcı sayısı	5	3
Hidrojen-bağı sunucu sayısı	3	0
GI absorpsiyonu	Yüksek	Yüksek
KBB geçebilirliği	Yok	Geçebilir
P-gp substratlığı	Yok	Yok
Deriden geçebilirliği	-5,80 cm/s	-5,98 cm/s
Lipinski'nin beşer kuralına uygunluğu	Tamamen uygun	Tamamen uygun
Ghose, Veber, Egan ve Muegge'nin kurallarına uygunluğu	Hepsine uygun	Hepsine uygun
Biyouygunluk Skoru	0,55	0,55

Çizelge 4.6. Hcβ-tubulin için en iyi bağlanma moduna sahip ilk dört ligandın ADME özellikleri (devam)

CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 enzimleri için inhibitörlüğü	CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4 inhibitörü	Hiçbirini inhibe etmez
TPSA	90,90 Å ²	38,83 Å ²

Çizelge 4.6. Hcβ-tubulin için en iyi bağlanma moduna sahip ilk dört ligandın ADME özellikleri (devam)

Molekül ismi	Diosmetin	ODTAME
Kimyasal özellikleri		
Moleküler Formül	C16H12O6	C19H32O2
Moleküler Ağırlık	300,26 gr/mol	292,46 gr/mol
Dönebilen bağ sayısı	2	14
Hidrojen-bağı alıcı sayısı	6	2
Hidrojen-bağı sunucu sayısı	3	0
GI absorpsiyonu	Yüksek	Yüksek
KBB geçebilirliği	Yok	Geçebilir
P-gp substratlığı	Yok	Yok
Deriden geçebilirliği	-5,93 cm/s	-3,62 cm/s

Çizelge 4.6. Hcβ-tubulin için en iyi bağlanma moduna sahip ilk dört ligandın ADME özellikleri (devam)

Lipinski'nin beşer kuralına uygunluğu	Tamamen uygun	Uygun ancak MLOGP>4,15
Ghose, Veber, Egan ve Muegge'nin kurallarına uygunluğu	Hepsine uygun	Ghose, Veber ve Muegge'nin kurallarına uygun değil, Egan'inkilere uygun
Biyoygunluk Skoru	0,55	0,55
CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 enzimleri için inhibitörlüğü	CYP1A2, CYP2D6, CYP2D6, CYP3A4 inhibitörü	CYP1A2, CYP2C9 inhibitörü
TPSA	100,13 Å ²	26,30 Å ²

(SwissADME ile tahmin edildi) GI: Gastrointestinal, KBB: Kan-beyin bariyeri, P-gp: P-glikoprotein, TPSA: Topolojik Polar Yüzey Alanı (Topological Polar Surface Area), MA: Moleküler Ağırlık, FLEX: Fleksibilite, Esneklik, LIPO: Lipofiliklik, SIZE: Büyüklük, POLAR: Polarlık, INSOLU: Çözünmezlik, INSATU: Doymamışlık

ADME özellikleri değerlendirilen ligandlar içinde en uygun sonuçlara sahip olan, oral olarak alınmaya müsâit ve aynı zamanda kan beyin bariyerini geçebilen tek molekül arteannuin-B'dir. Bu küçük molekül Hcβ-tubulini 14,95 nM gibi oldukça düşük bir *Ki* değeriyle inhibe edebilmektedir. Arteannuin-B'nin hiç rotasyonel bağı yoktur ki bu da kenetlemelerin doğruluğunu ve *in silico* deneyin güvenilirliğini artıran bir faktördür. Bu molekül esnek olmadığı gibi hidrojen bağı donörü de yoktur. Arteannuin-B'nin GI absorpsiyonu yüksektir ve deriden de ortalama sayılabilecek bir hızla emilebilir. Lipinski'nin, Ghose, Egan, Veber ve Muegge'nin tüm kurallarını sağlar ve kimyasal özellikleri ile, radar grafiğindeki oral alımının makul sınırları içerisinde kalır. Bu molekül orta derecede apolar ve yağda çözünür bir karakter göstermektedir. Karaciğerdeki önemli sitokrom enzimlerinden Çizelge 4.6'da yer alanların hiçbirini inhibe etmez. 38,83 Å² TPSA değeriyle oldukça arzu edilen bir polar yüzey alanına sahiptir. Tüm bu olumlu özellikleri arteannuin-B'nin oral olarak alınabilecek ve sinir sistemine yerleşen helmintlerin giderilmesinde bile kullanılabilecek çok önemli bir ilaç adayı olduğunu

göstermiştir. Özellikle MBZ ve ABZ gibi rekor seviyede bağışlanan ve yüz milyonlarca insan tarafından uzun yıllardır kullanılan benzimidazollere karşı direnç gelişimi gibi bir durumda, arteannuin-B bu muazzam ADME özellikleri ve oldukça başarılı inhibisyon yeteneği ile benzimidazollerin yerini alabilecek çok değerli bir bitkisel ligand ve potansiyel bir ilaç olarak öne çıkmıştır.

Farmakokinetikler açısından arteannuin-B'den sonra en önemli sonuçlara sahip ligand ODTAME'dir (9,12,15-oktadekantrienoik asit metil ester). Bu molekül de kan beyin bariyerini geçebilir, Lipinski'nin kurallarından üçünü sağlarken sadece yüksek lipofilisite özelliği dolayısıyla son kuralını sağlamaz. Bu küçük molekül on dört rotasyonel bağa sahip olduğu için çok esnektir ve uzun yan zinciri ona fazlasıyla lipofilik bir özellik kazandırmaktadır. Radar grafiğinde görüldüğü gibi, ODTAME apolar bir yapıya sahip, çözünmezliği ve doymamışlığı makul sınırlar içerisinde kalan bir bitkisel liganddır. İlginç olarak, küçük molekül boyutu ve lipofilik karakterine rağmen deriden geçebilirliği -3,26 cm/s gibi düşük bir değerde tahmin edilmiştir.

Diosmetin yapı olarak apigenine benzediği için radar grafiğinde doymamışlık açısından makul sınırların dışına çıkmıştır. Sadece iki rotasyonel bağa sahip olduğu için bu molekül çok az esneyebilir. Molekül büyüklüğü, lipofilisite, polarlık ve çözünmezlik açısından oral alımının makul sınırları içinde yer alır. Kan beyin bariyerini geçemez ancak GI absorpsiyonu yüksektir. Bu nedenle akciğer veya karaciğere yerleşen helmintlerin giderilmesi için uygundur. Lipinski'nin, Ghose, Veber, Egan ve Muegge'nin tüm kurallarını karşılar. Bu molekülün oral alımındaki tek engel çok sayıda çift bağ içeren siklik yapılardan meydana geliyor olmasıdır.

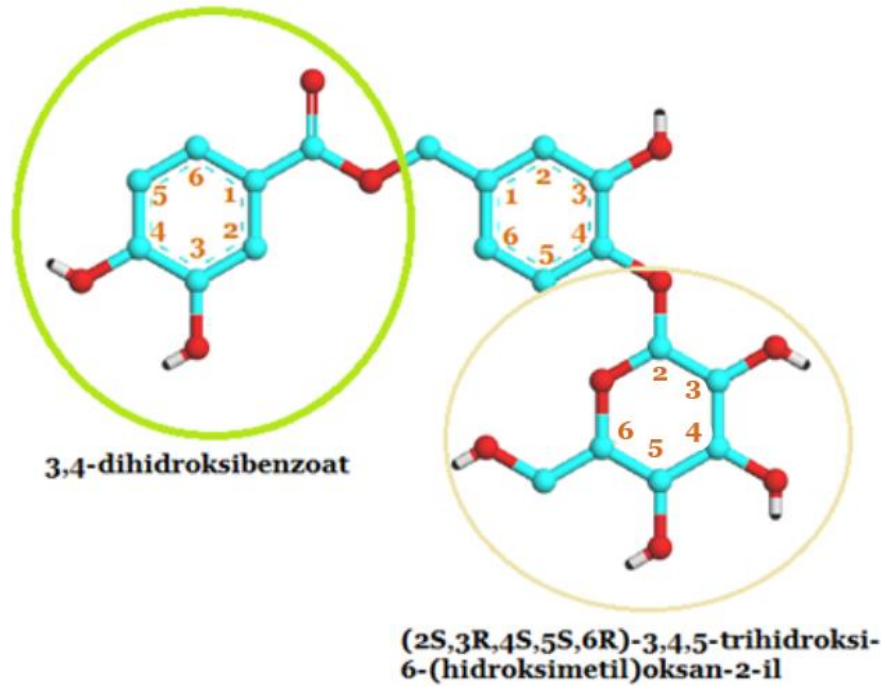
4.6. En İyi Ligandlar ve Etkileşimleri

Bu çalışmadaki bitkisel ligandlar içinde *O. vulgare* subsp. *hirtum* içeriğinde bulunabilecek bileşenlerden oreganol ve apigenin yanı sıra bitkinin uçucu yağında saptanan monoterpenlerden en yüksek skora sahip olan β -karyofilen; *M. charantia* içeriğindeki kukurbitasin-B, momordisin II ve karantadiol-A; *A. annua* içeriğindeki arteannuin-B, friedelin ve stigmasterol hedef proteinler ile yaptıkları olası etkileşimleri

açısından detaylı olarak incelenmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu çalışmada gösterilen kimyasal etkileşimler ve biyolojik aktivite bir arada değerlendirildiğinde CADD aracılığıyla geliştirilecek yeni ilaç adaylarının keşfi için faydalanılabilecek bazı yeni mekanizma ve yollar tahmin edilebilecektir. Bu açıdan, olası etkileşimlerin dikkatle incelenmesi ve yapı-aktivite konusunda öne sürülen yeni verilerin yorumlanması, antihelmintik bitkisel ligandlar konusunda çalışacak araştırmacılara önemli bilgiler sağlayacaktır.

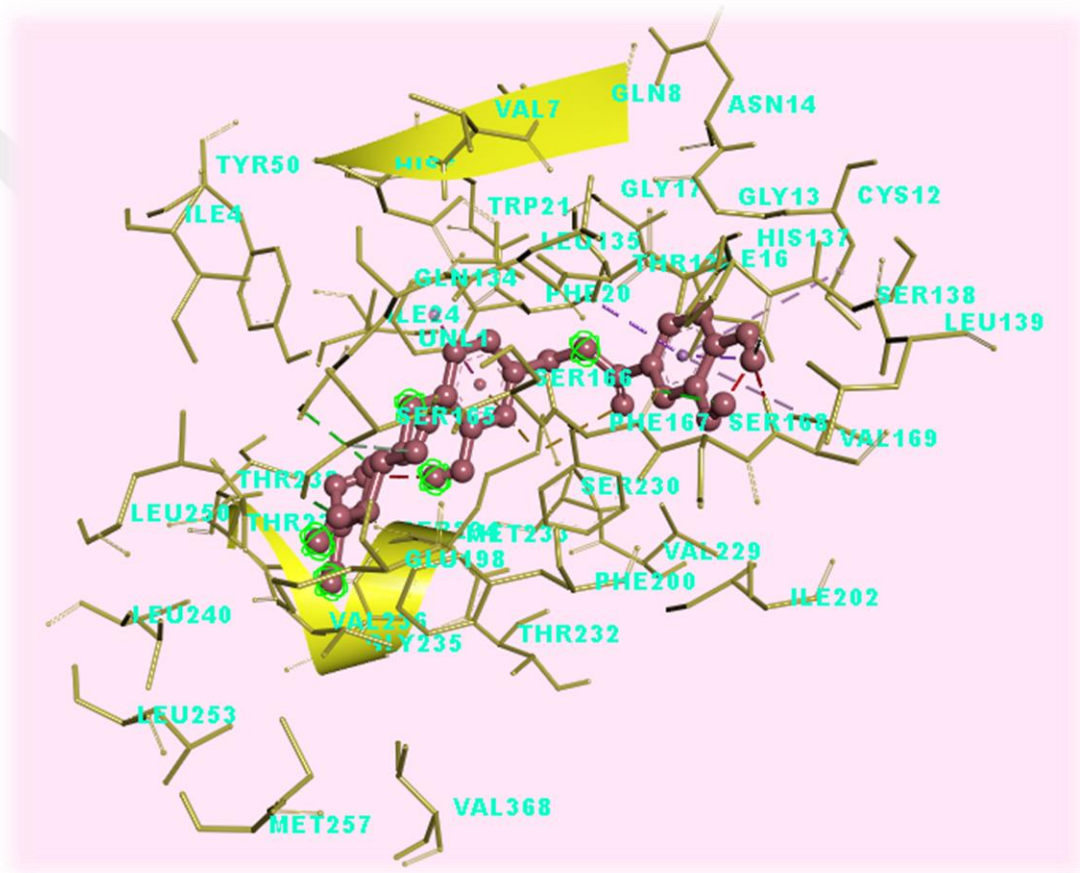
4.6.1. Oreganolün Hc β -tubulin proteini içindeki olası etkileşimleri

Oreganol (3-hidroksi-4-((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il)oksifenil)metil 3,4-dihidroksibenzoat) moleküler etkileşimlerinin daha rahat anlaşılabilmesi için moleküler yapısı ve karbon atomlarının numaralandırılışı şekilde verilmiştir (Şekil. 4.37).



Şekil 4.37. Oreganolün 2D gösterimi, karbon atomlarının numaralandırılışı ve oreganolü meydana getiren gruplar (Orijinal)

Oreganolün *H. contortus* β -tubulini içindeki yerleşiminde ilk dikkat çeken durum çok yoğun bir etkileşim ağı olmasıdır. Şekil 4.38’de gösterildiği gibi HIS6 ve VAL7 rezidülerinin üzerinde bulunduğu α -heliks yapısı ve GLU198, VAL233 gibi rezidülerin meydana getirdiği α -heliks, oreganolün bu bölgede çok sayıda etkileşim yapmasına imkân veren rezidüleri bulundurmaktadır. Oreganole en yakın konumda bulunan beş serinil rezidüsü polar etkileşimlerin oluşmasında önemli bir role sahip görünmektedir. Bu serinil rezidüleri SER165, SER166, SER168, SER230 ve SER138’dir.



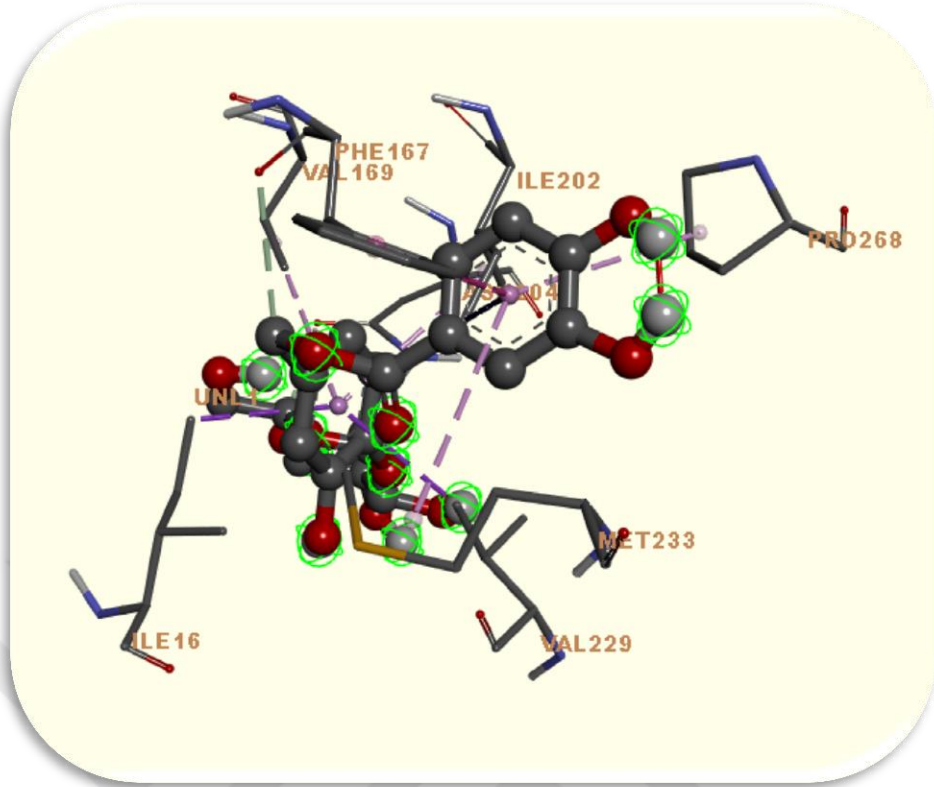
Şekil 4.38. Oreganolün *H. contortus* β -tubulin içindeki konumlanması

Şekil 4.39’da oreganolün yerleştiği kavitede HIS137, GLN134 ve PHE20 gibi rezidülerin bulunduğu bölgenin daha aromatik olduğu, resme göre ligandın aşağısında kalan serinil ve fenilalaninil rezidüleri ile çevrili kısmın ise aromatik olmadığı görülmektedir. Bu kavitede hemen her alanın hidrofobik olduğu Şekil 4.39’da



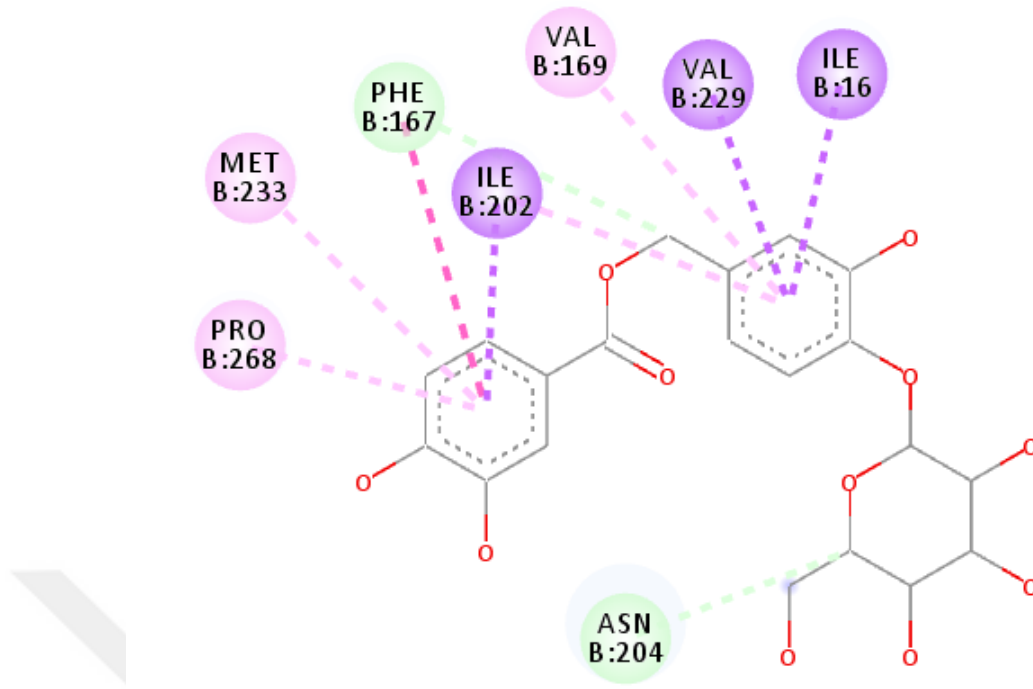
Şekil 4.41. Oreganolün insan β -tubulini (6E7C) içindeki yerleşimi

Şekil 4.42’de insan β -tubulini içerisindeki az sayıda rezidünün oreganol ile etkileşim yaptığı görülmektedir. Oreganol iki izolösini ve iki valinil rezidüsü arasına girmektedir. Oreganol bir taraftan ILE16 ve VAL229 tarafından diğer taraftan da ILE202 ve VAL169 tarafından uygulanan çekim kuvvetine maruz kalmaktadır. Ayrıca şekilde görülebileceği gibi PHE167 ve PRO268, oreganolün halkaları ile paralel durarak aromatik etkileşimleri meydana getirmektedir.



Şekil 4.42. Oreganolün insan β -tubulini içindeki olası etkileşimlerinin 3D gösterimi. Oreganol top-çubuk modeliyle, etkileştiği rezidüler ise ince çubuk modeliyle temsil edilmekte ve bağ oluşumları kesikli çizgiler ile gösterilmektedir

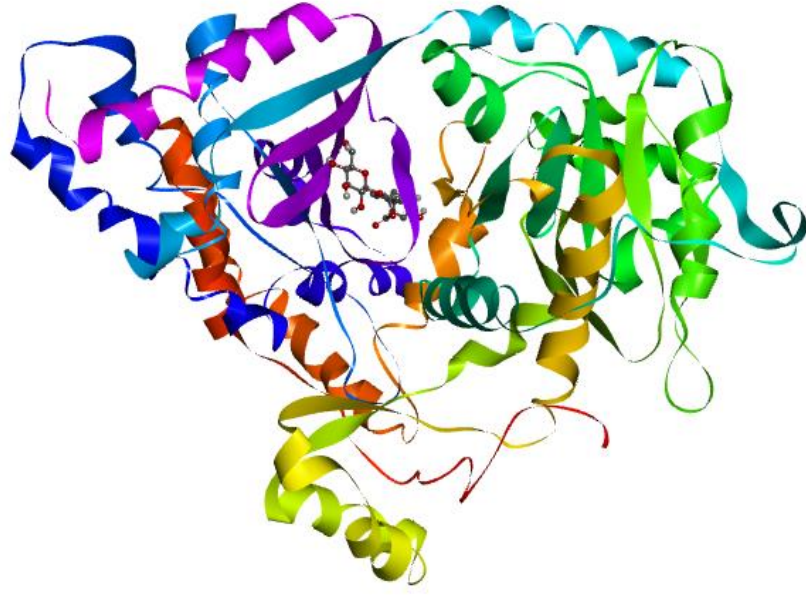
Oreganolün insan β -tubulini içindeki en önemli etkileşimleri Şekil 4.43'te görüldüğü gibi PRO268, MET233 ve VAL169 rezidüleri ile ligand arasında oluşan π -alkil etkileşimleri ve VAL229, ILE202 ve ILE16 rezidüleri ile oluşturulan π -sigma bağlarıdır. Bunların dışında PHE167, oreganolün her iki halkası ile etkileşmektedir ve metil 3,4-dihidroksibenzoat grubu ile π -sigma etkileşimi yaparken merkezdeki halka ile aromatik etkileşimler yapmaktadır.



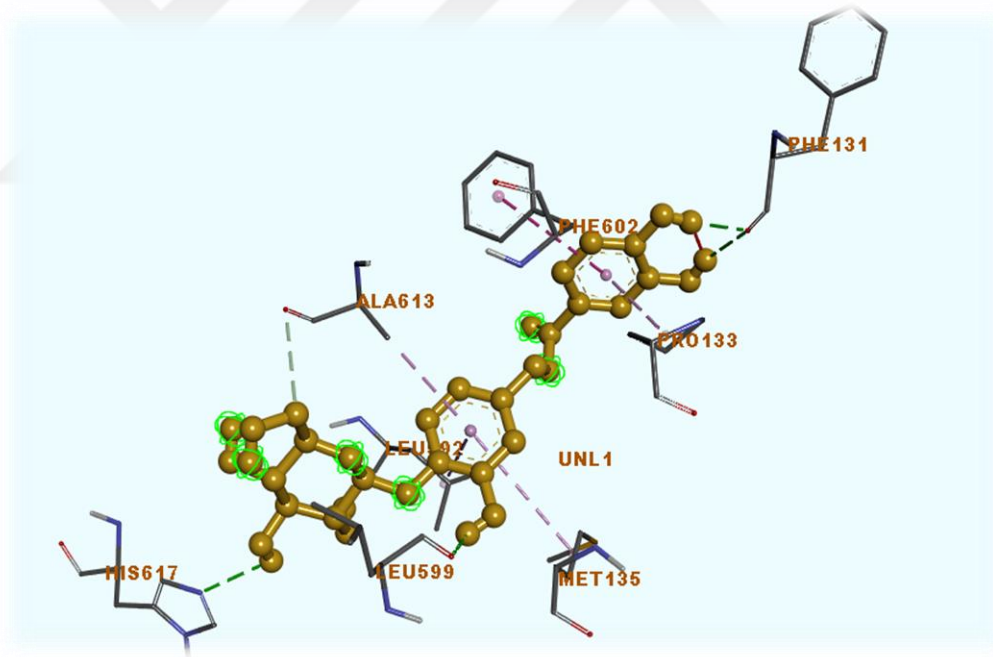
Şekil 4.43. Oreganolün insan β -tubulini içindeki olası etkileşimleri ve etkileştiği rezidülerin 2D gösterimi

4.6.3. Oreganolün rata ait karnitin palmitoil transferaz 2 (KPT 2) (Pdb kodu: 2H4T) içindeki etkileşimlerinin değerlendirilmesi

KPT 2 enzimine ait aktif bölge β -tubulinin aktif bölgesine kıyasla daha geniştir ve oreganolün rat KPT 2 enzimi içindeki konumlanışı Şekil 4.44’de gösterilmektedir. Ligandın bağlandığı bölgenin koordinatları daha önce belirlenmiş olduğu için bu çalışmadaki kenetleme simülasyonlarında da aynı koordinatlar kullanılmıştır. Bu nedenle ligandın aktif bölgedeki yerleşimi literatür ile uyumludur. Şekil 4.44’de gösterildiği gibi oreganol, β -konformasyon ve ilmek yapısının oluşturduğu alana uyum sağlayarak yerleşmiştir. Şekil 4.45’te oreganolün yaptığı etkileşimler içerisinde PHE131 ile yaptığı iki hidrojen bağı dikkat çekicidir. PHE131 rezidüsü ligand ile aromatik etkileşim de yapabilecekken hidrojen bağları oluşabilecek bir açı sağlandığından daha kuvvetli bağlar olan hidrojen bağları hesaba katılmıştır. Oreganolün merkez halkası ALA613 ile MET135 arasında sıkışmaktadır. Dihidroksifenil rezidüsü de PHE602 ile PRO133 arasında aromatik sandviç oluşturmuştur.



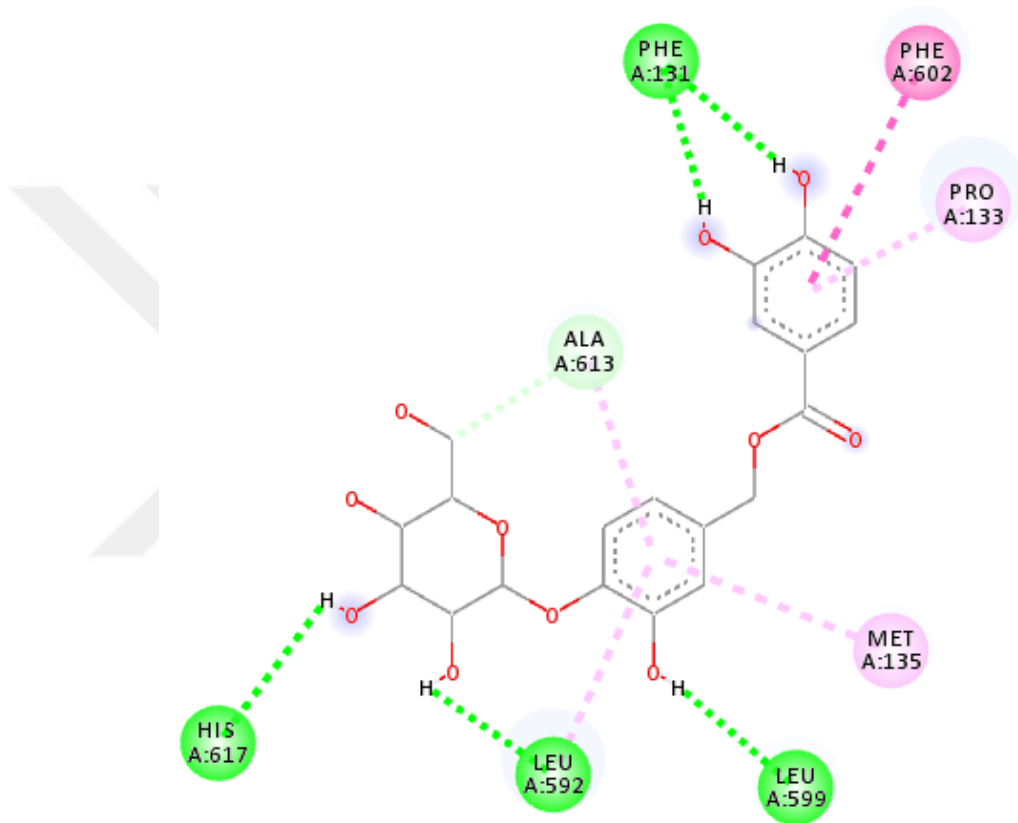
Şekil 4.44. Oreganolün rat karnitin palmitoil transferaz 2 içindeki konumlanması



Şekil 4.45. Oreganolün rat KPT 2 (pdb kodu: 2H4T) enzimi içindeki olası kimyasal etkileşimleri ve etkileştiği rezidüler. Etkileşimler kesikli çizgilerle ve oreganol turuncu top-çubuk modeliyle gösterilmektedir

Oreganolün rat KPT 2 enzimi içindeki olası etkileşimlerinin şeması Şekil 4.46'da gösterilmektedir. Şekil 4.46'ya göre KPT 2 aktif bölgesinde yer alan dört rezidü, oreganolün hidroksil gruplarındaki hidrojen atomları ile hidrojen bağları oluşturmuştur.

Bu rezidüler PHE131, HIS617, LEU592 ve LEU599'dur. Ayrıca PRO133, oreganolün dihidroksifenil halkası ile çok yakın bir mesafede kuvvetli bir π -alkil etkileşimi yapmıştır. MET135 de merkezdeki halka ile daha uzak mesafeli başka bir π -alkil bağı oluşturmuştur. PHE602 rezidüsü oreganolün dihidroksifenil grubu ile π - π T biçimli etkileşim yaparken, ALA613 rezidüsü de ligandın merkez halkası ile π -alkil etkileşimi yapmıştır.

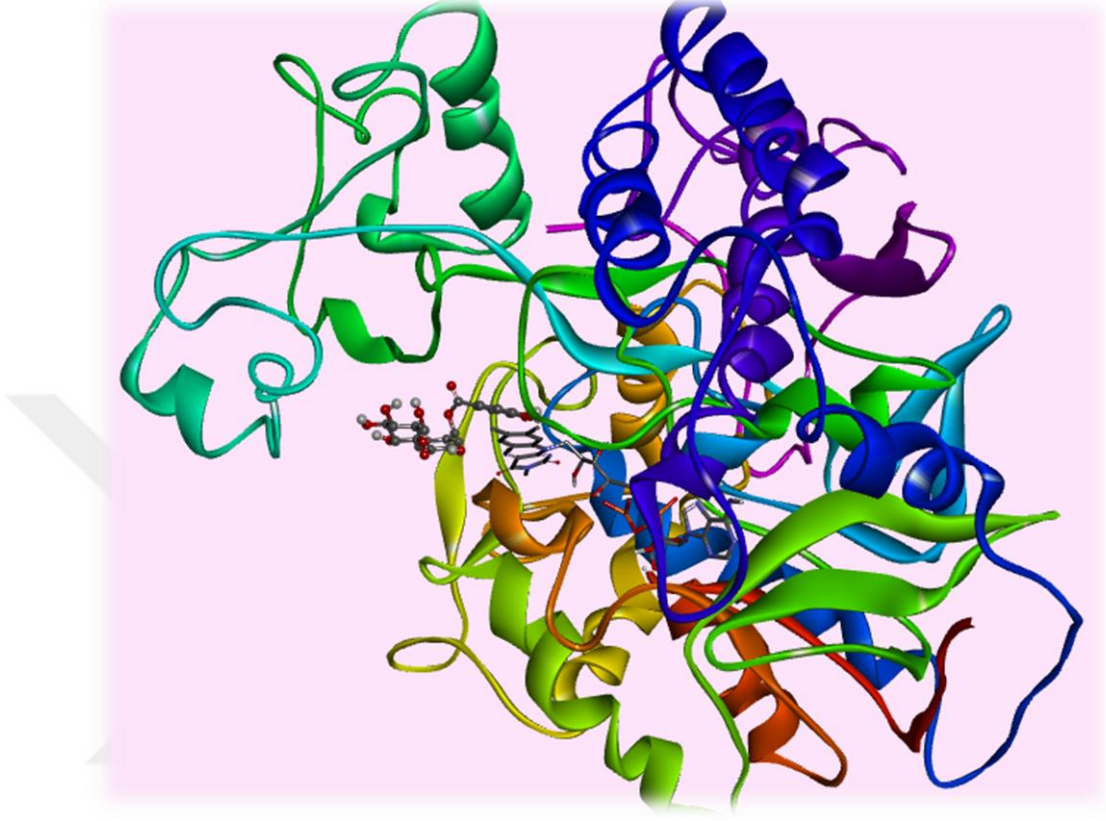


Şekil 4.46. Oreganolün Karnitin Palmitoil transferaz 2 (2H4T) içindeki olası etkileşimlerinin 2D gösterimi

4.6.4. Oreganolün insan fumarat redüktaz enzimi (pdb kodu: 6VAX) içindeki etkileşimlerinin değerlendirilmesi

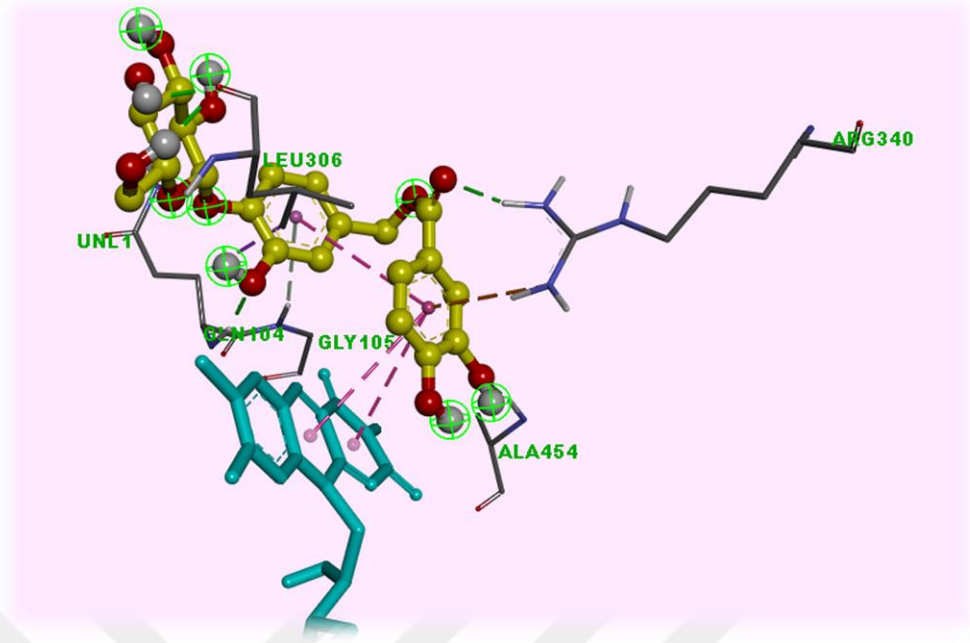
Oreganolün 6VAX içinde kenetleme simülasyonları yapılırken FAD (Flavin adenin dinükleotit) N5 atomu grid merkezine alınmıştı. Sonuç olarak oreganol FAD'a çok yakın olarak konumlanmıştır. Şekil 4.47'de FAD'a ait izoalloksazin halkası belirgin

olarak görülürken oreganol, FAD'ın izoalloksazin halkasının hemen karşısında, proteinin sarı renkle gösterilen beta konformasyon yapısının önünde durmaktadır.



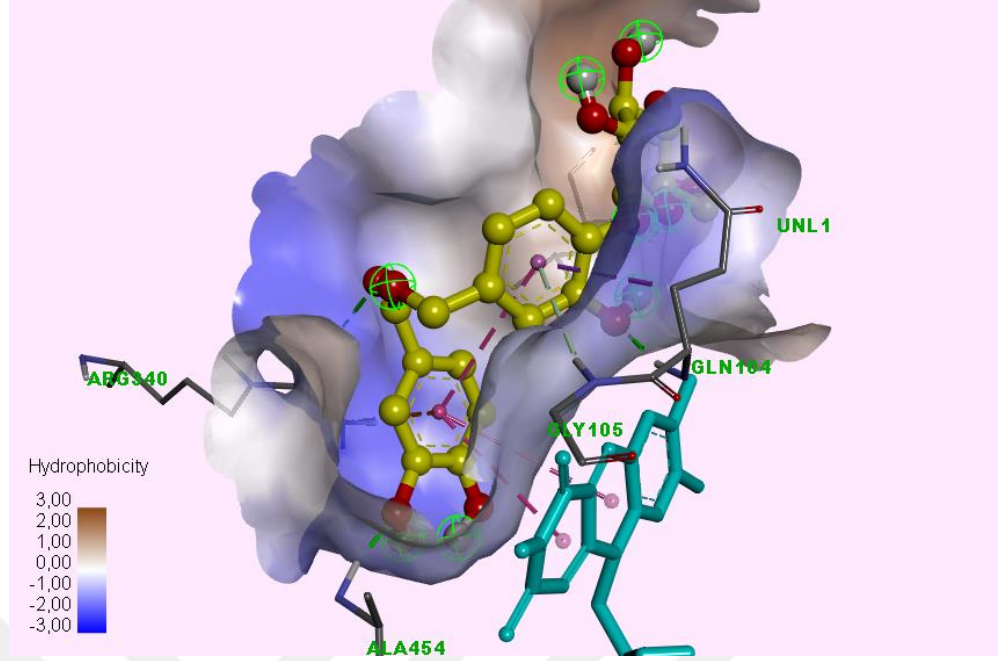
Şekil 4.47. Oreganolün insan fumarat redüktaz enzimi (pdb kodu: 6VAX) içindeki yerleşimi. Oreganol boşlukta, FAD'ın karşısında top-çubuk modeliyle gösterilmektedir

Şekil 4.48'de oreganolün dihidroksifenil grubu ile FAD'ın izoalloksazinin iki halkası arasında aromatik etkileşimler görülmektedir. ARG340 rezidüsünün amino grupları oreganolün dihidroksifenil grubuna çok yakın bir noktada bulunmaktadır ve ligandın bulunduğu konumu almasında en önemli rezidülerden biri olarak görünmektedir.



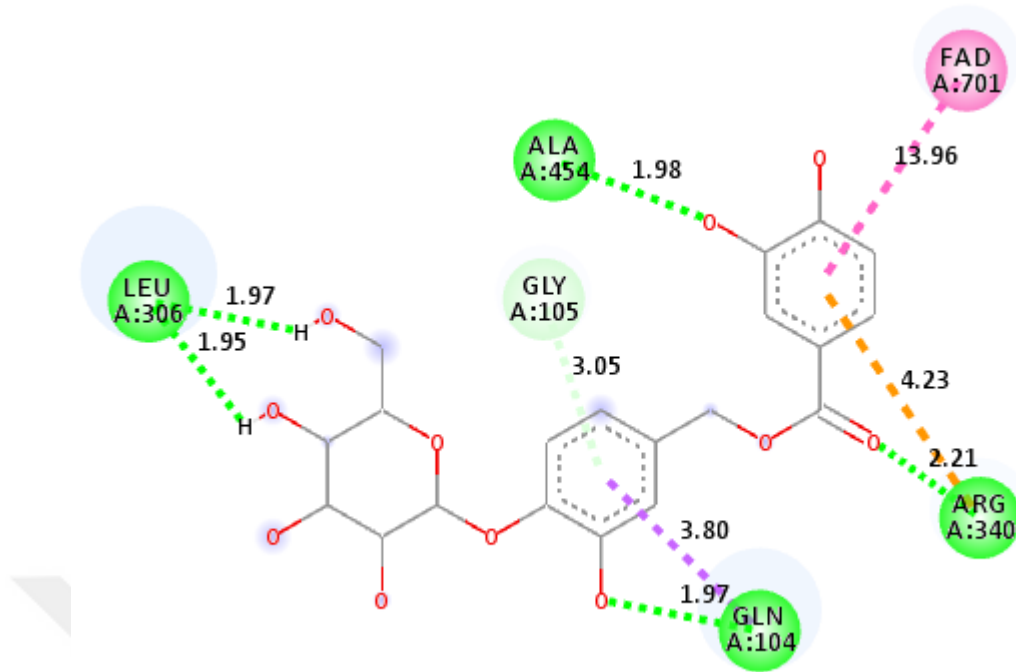
Şekil 4.48. Oreganolün 6VAX içindeki olası etkileşimlerinin gösterimi. Oreganol sarı top çubuk modeliyle, FAD ise mavi çubuk modeliyle ve etkileştiği rezidüler ince çubuk modeliyle, etkileşimler kesikli çizgilerle gösterilmektedir

Oreganolün 6VAX içinde yerleştiği bölgedeki rezidülerin hidrofobik-hidrofiliklik açısından incelenmesinde FAD'ın bulunduğu bölgedeki rezidülerin hidrofilik ve oreganolün 3,4,5-trihidroksifenil grubunun olduğu kısımlarda yer alan rezidülerin ise hidrofobik oldukları görülmektedir. ARG340 ve ALA464 rezidülerinin bulunduğu kısımlar ise hidrofiliktir ve bu bölgeye oreganolün dihidroksifenil grubu yerleşmiştir (Şekil 4.49).



Şekil 4.49. Oreganolün iFR (6VAX) içindeki yerleşim bölgesindeki rezidülerin hidrofobiklik-hidrofiliklikleri. Proteinin hidrofobik bölgeleri kahverengi ile hidrofilik bölgeleri ise mavi renk ile temsil edilmektedir. Oreganolün karbon atomları sarı, oksijen atomları kırmızı ile gösterilmektedir

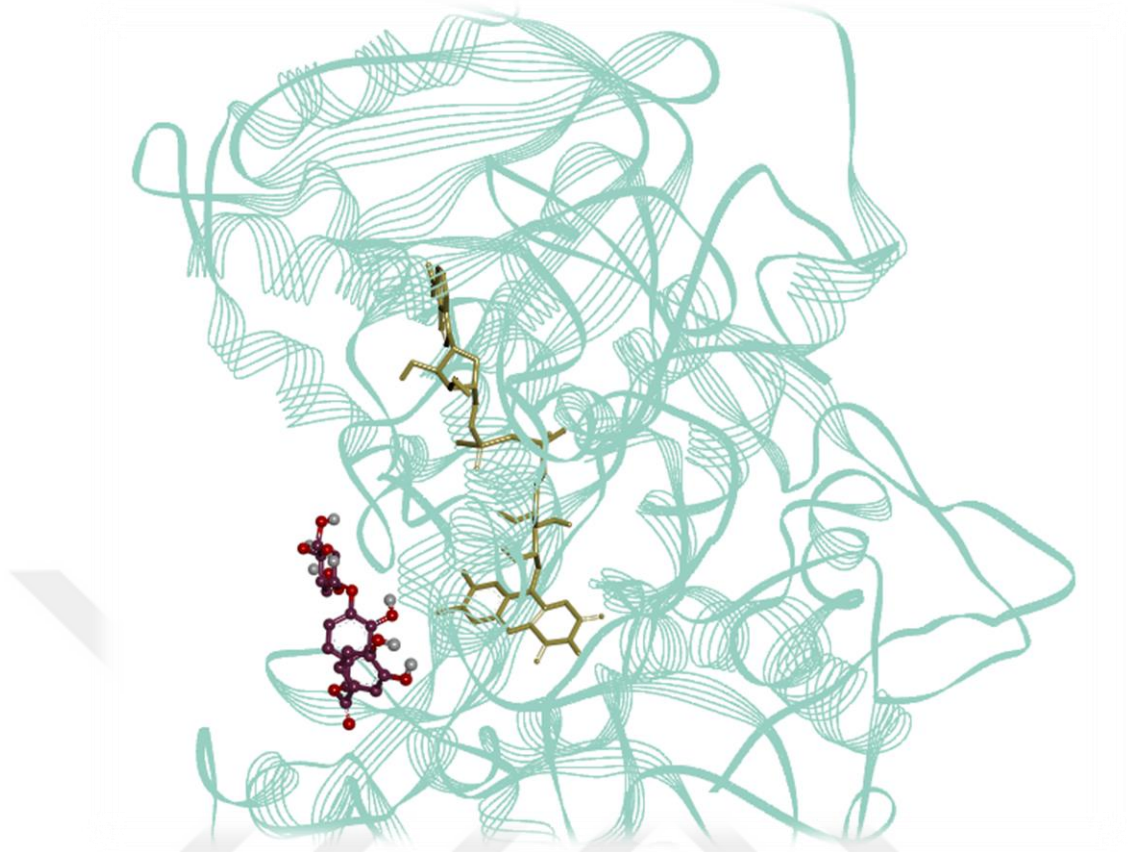
Şekil 4.50’de oreganolün insan fumarat redüktaz (iFR) enzimi (PDB kodu: 6VAX) içindeki olası etkileşimlerinin 2D gösteriminde çeşitli rezidüler ile hidrojen bağı oluşumları görülmektedir. Bunlardan LEU306 en güçlü etkileşime giren rezidüdür ve trihidroksi oksan-2-il halkasındaki hidroksil grupları ile iki hidrojen bağı oluşturmuştur. Bunlardan biri 6-hidroksimetil grubunun hidrojeni ile 1,97 Å mesafede ve diğeri 5-hidroksi grubunun hidrojeni ile 1,95 Å mesafede oluşturulmuştur. Hidrojen bağı oluşumu gözlenen diğer üç rezidü GLN104, ALA454 ve ARG340’dır. GLN104 ile merkez halkanın oksijen atomu arasında 1,97 Å uzunlukta bir hidrojen bağı meydana gelirken, ALA454 ile benzoat grubunun 3. pozisyonundaki oksijen atomu arasında 1,98 Å mesafede ve ARG340 ile halkanın dışında kalan oksijen atomu arasında 2,21 Å mesafede hidrojen bağları oluşmuştur. GLN104 ile oreganolün merkez halkası arasında 3,8 Å mesafede bir π -sigma bağı oluşumu ve ARG340 ile benzoat halkası arasında 4,23 Å mesafede bir π -katyon etkileşimi görülmektedir.



Şekil 4.50. Oreganolün insan fumarat redüktaz enzimi (6VAX) içindeki olası etkileşimlerinin 2D gösterimi

4.6.5. Oreganolün *Ascaris suum* fumarat redüktaz enzimi (pdb kodu: 4YSX) içindeki bağlanma özelliklerinin değerlendirilmesi

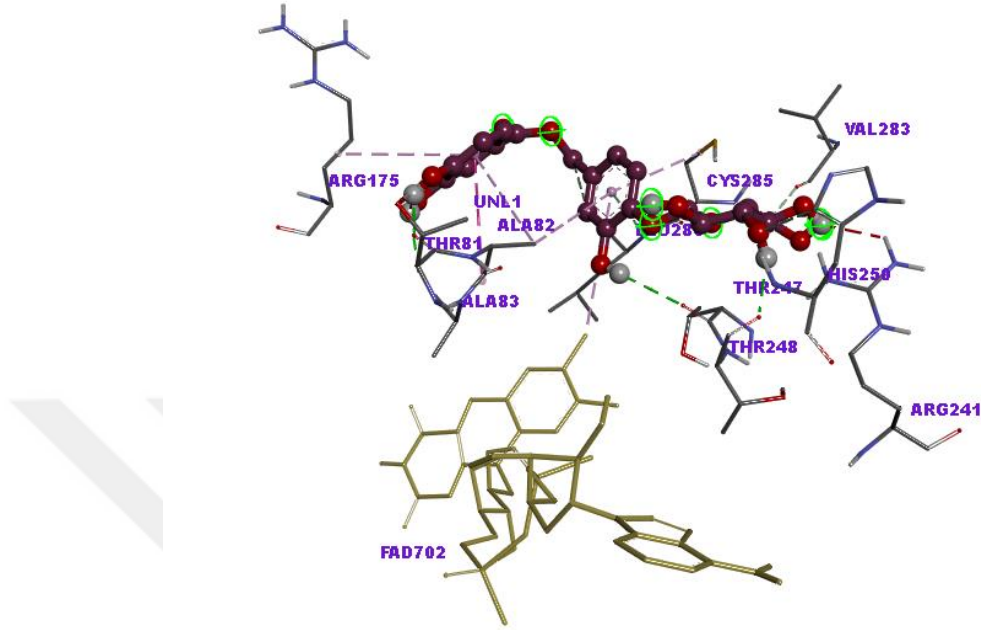
Kenetleme sonuçlarına göre oreganol nematodlardaki bilinen bir hedef protein olan fumarat redüktaz enzimi için iyi bir inhibitör adaydır ve K_i değeri 1,9 nM olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.51’de oreganolün nematoda ait fumarat redüktaz enzimi içinde FAD’a yakın bir bölgede yerleştiği ancak izoalloksazin halkasının tam karşısına gelmediği görülmektedir. Kenetleme simülasyonları için merkez olarak FAD N5 atomu seçildiği ve 60x60x60 boyutlarında grid kutusu içinde hareketlerine izin verildiği için her ne kadar FAD ile etkileşime girebileceği bir alan içerisinde bulunsun da insan fumarat redüktaz enzimi (6VAX) içindeki konumlanmasına kıyasla FAD’a biraz daha uzakta bir noktada konumlanmıştır. Konumu enzimin içindeki bir kavite değil yüzeye yakın bir alan gibi görünmektedir.



Şekil 4.51. FAD sarı ince çubuk modeliyle, oreganol ise mor renk top çubuk modeliyle 4YSX içindeki konumlanmalarında gösterilmektedir

Oreganol ile *A. suum* fumarat redüktaz (AsFR) enziminin etkileşimde olduğu rezidüler incelendiğinde bunların büyük çoğunluğunun polar aminoasitler olduğu Şekil 4.52’de görülmektedir. Bunların da çoğu tirionin rezidüleridir ve ligandı üç taraftan çevirmektedir. Bunların yanı sıra ligandı iki ucundan çeken iki arjinil rezidüsü göze çarpmaktadır. Şekil 4.52’ye göre FAD, oreganolün merkez halkası ile etkileşmekte ancak oreganol nematod fumarat redüktaz enzimi içinde, insandaki homologuna kıyasla FAD N5 atomundan daha uzak bir noktada konumlanmaktadır. İlginç bir şekilde buna rağmen hesaplanan serbest bağlanma enerjileri ve inhibisyon katsayıları incelendiğinde oreganolün nematoddaki fumarat redüktazı insandaki homologuna kıyasla çok daha iyi bir skor değeriyle inhibe edebildiği görülmektedir (bkz. Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Çizelge 4.3 ve Şekil 4.16). Bu sonuçlar oreganolün AsFR içindeki konumunun inhibisyon için daha potent bir yerleşim bölgesi olduğunu ortaya çıkaran önemli bir veri

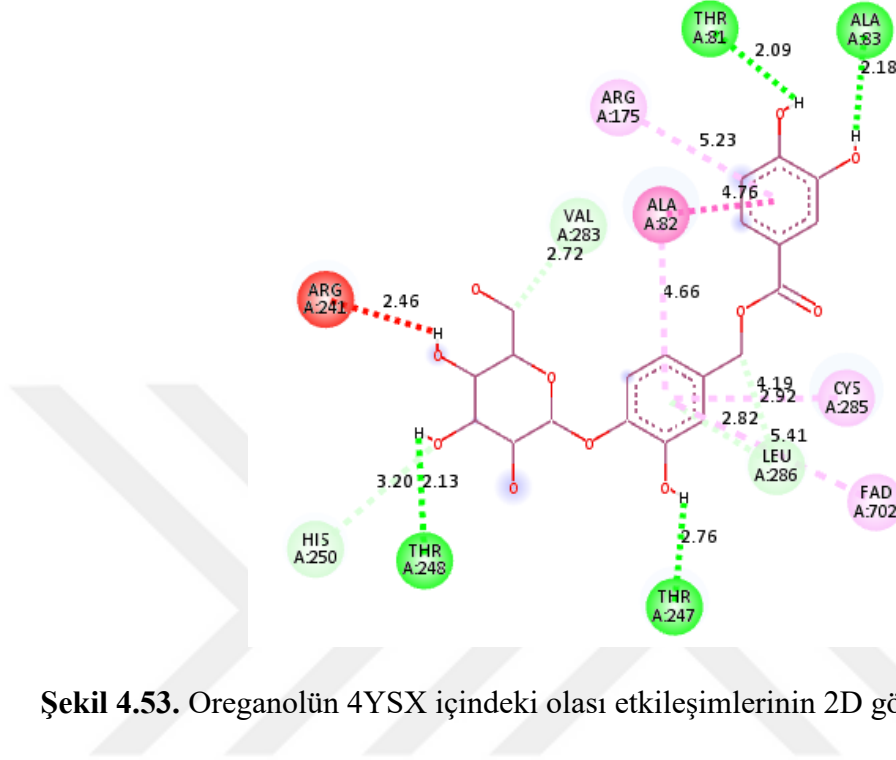
sağlamıştır. Ayrıca bu incelemeler vasıtasıyla iki homolog proteinin bağlanma bölgelerindeki farklılığa dair ilk bilgiler literatüre kazandırılmıştır.



Şekil 4.52. Oreganol, AsFR enzimi (pdb kodu: 4YSX) içinde etkileşimde olduğu rezidüler ile gösterilmektedir. Oreganol elementer renklerde top-çubuk modeliyle, FAD ince çubuk modeliyle sarı renk, etkileşimde olduğu rezidüler elementer renklerde ince çubuk modeliyle temsil edilmektedir

Oreganolün AsFR içindeki etkileşimlerinde en dikkat çekici nokta dört rezidü ile yaptığı tahmin edilen hidrojen bağlarıdır. Bunlardan ALA 83 ile ligandın hidroksil grubu arasında 2,18 Å mesafede, diğer üç farklı hidroksil grubundan biri ile proteinin THR 81 rezidüsü arasında 2,09 Å, bir diğeri ile THR 248 arasında 2,13 Å ve başka bir hidroksil grubunun hidrojen atomu ile THR 247 arasında 2,76 Å mesafede hidrojen bağları oluşumu Şekil 4.53'te gösterilmektedir. Bunların dışında HIS 250, VAL 283 ve LEU 286 rezidüleri ile ligandın çeşitli atomları arasında konvensiyonel hidrojen bağları meydana geldiği tahmin edilmiştir. Ancak şekilde gösterilen mesafeler hidrojen bağı oluşumu için biraz geniştir. Bu bağlar polar etkileşimler olarak da değerlendirilebilir. ALA 82 oreganolün dihidroksifenil grubu ile amid-pi etkileşimi (koyu pembe ile gösterilen kesikli çizgi) ve merkezdeki halka ile pi-alkil etkileşimi yapmaktadır (açık pembe kesikli çizgiler). Şekil 4.53'te kırmızı küre içine alınan ARG 241 ile oreganolün

hidroksil grubunun hidrojeni arasında bir itme kuvveti meydana geleceği gösterilmektedir.

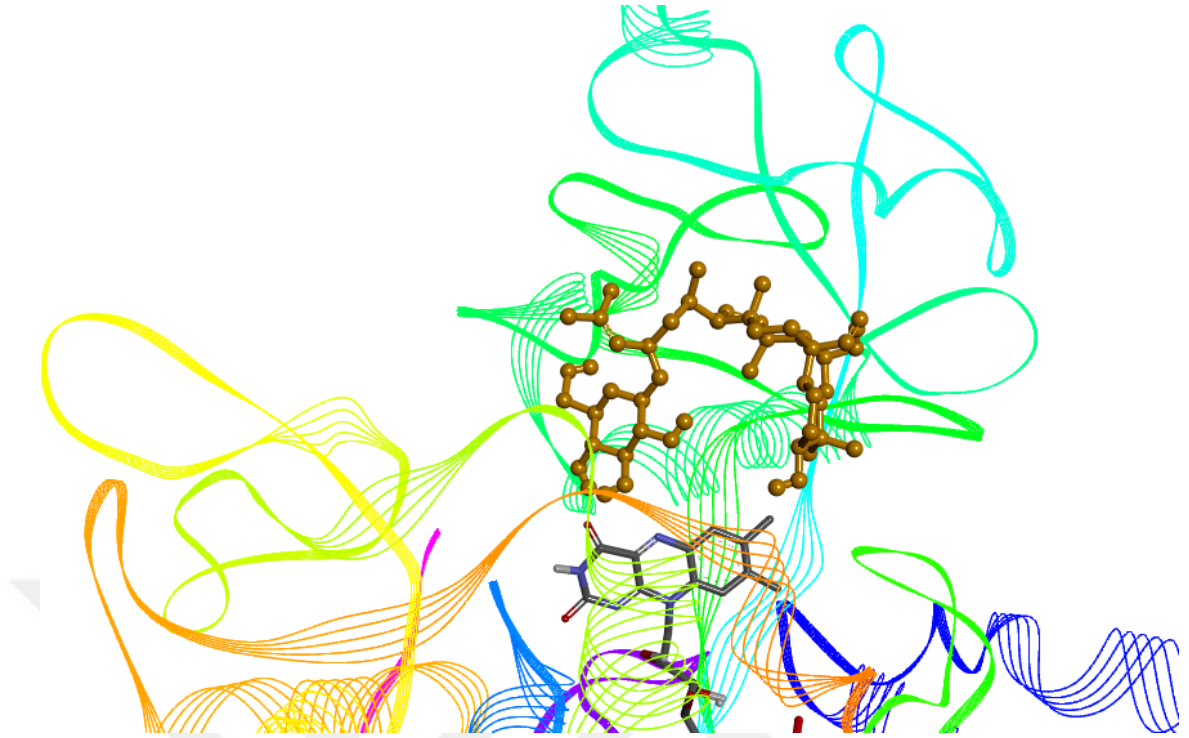


Şekil 4.53. Oreganolün 4YSX içindeki olası etkileşimlerinin 2D gösterimi

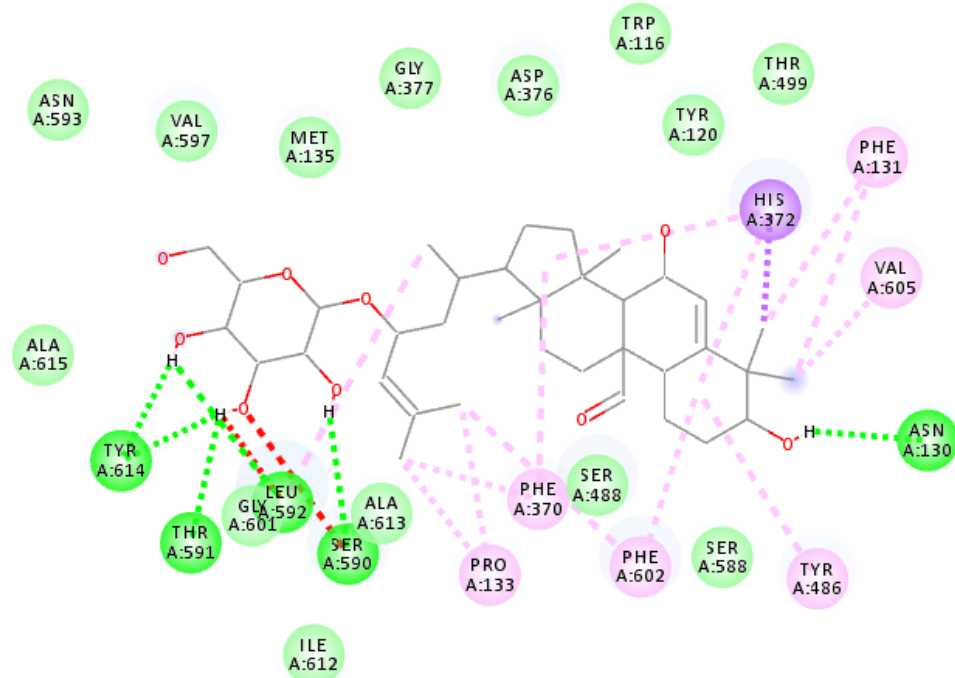
4.6.6. Momordisin II'nin insan fumarat redüktaz enzimi (6VAX) içindeki etkileşimlerinin değerlendirilmesi

Oreganolde olduğu gibi momordisin II de FAD'ın izoalloksazin halkasına yakın bir pozisyonda konumlanmıştır. Şekil 4.54'te görüldüğü gibi momordisin II büyük bir molekül olduğu için çeşitli rotasyonel bağlar etrafında kıvrılarak U biçiminde bir yapıya kavuşmuş ve bu biçimde aktif bölgeye yerleşmiştir. Ligandın aromatik yapıdaki iki ucu FAD'a yaklaşacak biçimde kıvrılmış ve ligandın merkezindeki karbon zinciri, proteinin ilmek yapılarının olduğu kısma denk gelecek şekilde bir kambur oluşturmuştur.

Momordisin II'nin rat KPT 2 enzimi (pdb kodu: 2FW3) içindeki olası etkileşimlerinin gösterildiği Şekil 4.55'te yoğun bir etkileşim ağı görülmektedir. Şekil 4.55'teki bu etkileşimlerden büyük bir çoğunluğu van der Waals çekim kuvvetleri olsa da hidrojen bağı oluşumunun tahmin edildiği dört polar ve bir apolar rezidü mevcuttur.



Şekil 4.54. Momordisin II'nin insan fumarat redüktaz enzimi (6VAX) içindeki konumlanması



Şekil 4.55. Momordisin II ile rat KPT 2 (2FW3) etkileşimlerinin 2D gösterimi

Bu hidrojen bağları TYR614, THR591, LEU592, SER590 ve ASN130 rezidüleri vasıtasıyla oluşturulmuştur. Bunun dışında HIS372 hem pi-sigma bağı hem de pi-alkil etkileşimleri yapmıştır. Pi-alkil etkileşimlerinden sorumlu diğer rezidüler PRO133, PHE370, PHE602, TYR486, VAL605 ve PHE131'dir. Van der Waals etkileşimleri yapan rezidüler ise SER588, SER488, ALA613, ILE612, GLU601, ALA615, ASN593, VAL587, MET135, GLY377, ASP376, TRP116, TYR120 ve THR499'dur.

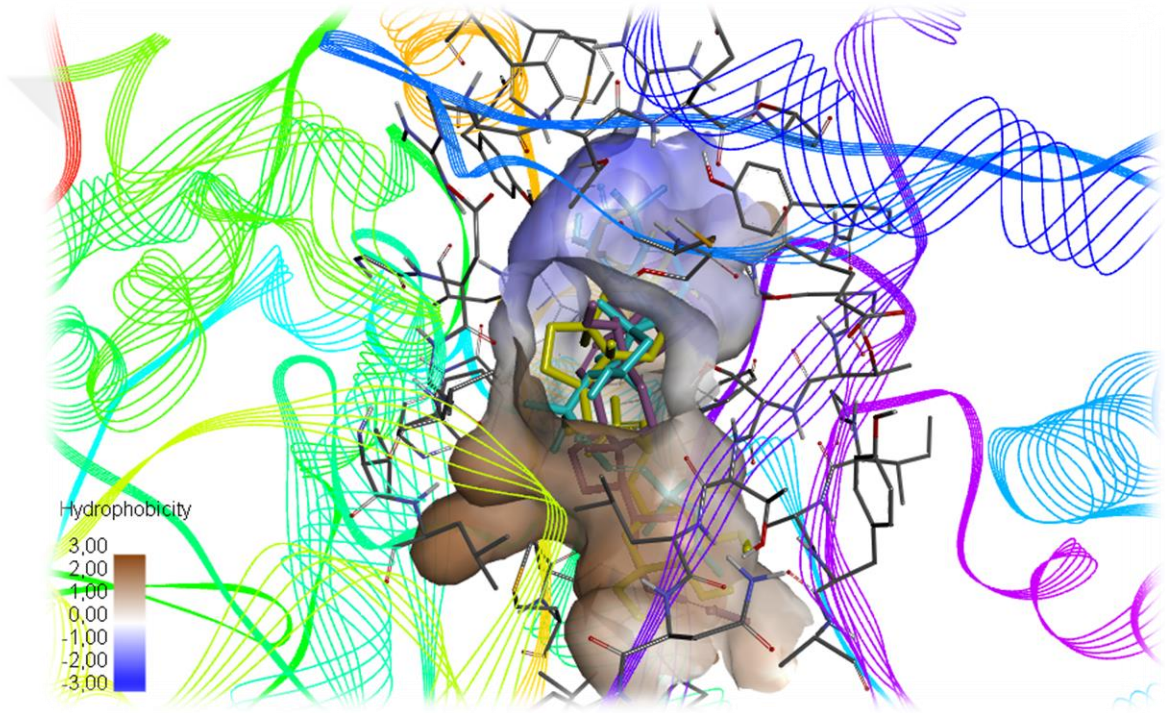
Şekil 4.55'te polar bir rezidü olan SER590 ile momordisin II'nin oksijen atomu arasındaki itme kuvvetine ve apolar bir rezidü olan LEU592'nin hidrojen atomu ile momordisin II'nin hidroksil grubuna bağlı hidrojen atomu arasında oluşacağı tahmin edilen bir diğer itme kuvvetine rağmen ligandın bu hidroksil grubunu taşıyan kısmı ile çevredeki rezidüler arasında görülen çok sayıdaki hidrojen bağı oluşumu serbest bağlanma enerjisinin düşmesini sağlamıştır.

4.6.7. Momordisin II, karantadiol-A ve kukurbitasin-B'nin rat KPT 2 (pdb kodu: 2FW3) içindeki olası yerleşimleri

Hem karantadiol-A hem de kukurbitasin-B molekül büyüklüğü açısından momordisin II'ye benzerlik göstermekte ve bu üç molekül rat KPT 2 enzimi için en iyi bağlanma enerjilerine sahip ilk beş molekül içerisinde yer almaktadır (bkz. Çizelge 4.2). Ayrıca moleküllerin yapıları ve torsiyonları bakımından da benzerlik olduğu Şekil 4.56'da görülmektedir.

Aromatik bölgeler karşılaştırıldığında ligandları çevreleyen rezidüler içinde sadece THR501 rezidüsünün bulunduğu bölgede aromatik olmayan bir yüz bulunurken, diğer bölgeler aromatik bir yüzeye sahiptir. Özellikle ligandların merkezi etrafındaki rezidüler en aromatik alanı meydana getirmiştir (Şekil 4.57).

Şekil 4.58’de ise hidrofilik bölgeler mavi ile gösterilmekte ve proteinin bağlanma bölgesinde aromatik olmayan yüzeylerin hidrofilik karakterde oldukları görülmektedir. Şekil 4.58’de mavi şerit ile gösterilen ilmek yapısının oluşturduğu boşluk içinde konumlanan amino asitlerin yan zincirleri bu hidrofilik özelliğe neden olmakta ve çeşitli serinil ve tirioninil rezidüleri bu bölgeyi meydana getirmektedir (bkz. Şekil 4.57). Ligandların yerleştiği alandaki diğer uçta ise valinil, glisinil, alaninil ve lösinil gibi apolar rezidüler daha hidrofobik bir bağlanma yüzeyinin oluşumuna imkân sağlamaktadır.

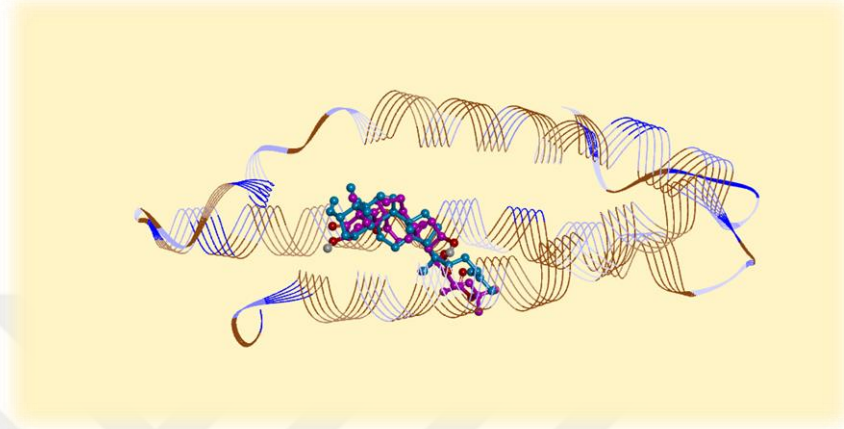


Şekil 4.58. Ligandları çevreleyen bölgedeki rezidülerin hidrofobikliklerinin gösteriminde mavi bölgeler hidrofilik kısımları kahverengi bölgeler hidrofobik kısımları temsil etmektedir

4.6.8. Karantadiol-A ve kukurbitasin-B’nin SoCOX1 içindeki yerleşimleri

Bu çalışmada yapılan kenetleme deneyleri karantadiol-A ve kukurbitasin-B’nin SoCOX1 enzimi için -9 kcal/mol’den daha küçük ΔG değerine sahip iki önemli bitkisel ligand olduğunu göstermiştir. Şekil 4.59’da mavi ile gösterilen karantadiol-A ve pembe top-çubuk modelindeki kukurbitasin-B, homoloji modelleme ile tahmin edilen SoCOX1 enzimi içinde aynı bölgede yerleşmiştir. Ligandların farklı kimyasal yapılarına rağmen

yaklaşık olarak aynı boyutlarda olmaları ve karbon atomları arasındaki rotasyonel açıların benzerliği, kenetleme bölgesindeki yerleşimlerinde çakışık bir görünüm meydana getirmiş ve aynı zamanda iki ligandın benzer K_i değerlerine sahip olmasına neden olmuştur.



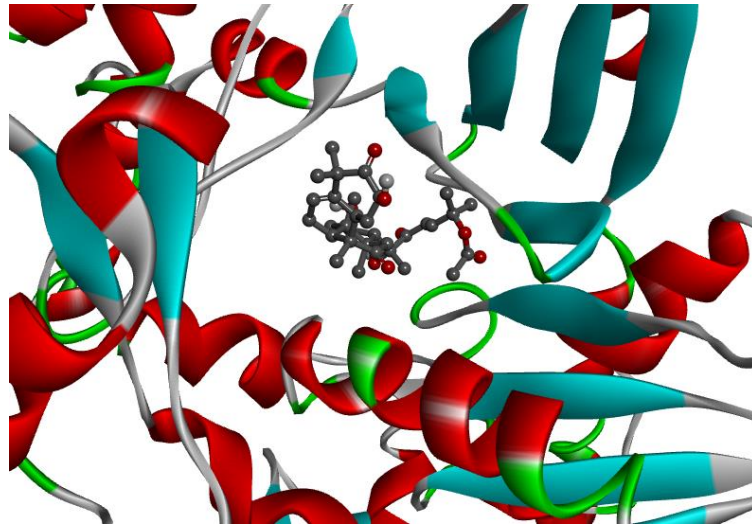
Şekil 4.59. SoCOX1 içinde karantadiol-A (mavi top çubuk) ve kukurbitasin-B (pembe top çubuk modeli) en düşük enerji seviyelerindeki konumlanmalarında, SoCOX1 enziminin hidrofobik bölgeleri kahverengi, hidrofilik bölgeleri ise mavi renk ile gösterilmektedir

Kukurbitasin-B'nin SoCOX1 içinde yaptığı tahmin edilen en önemli etkileşimler Şekil 4.60'da gösterilmiştir. Bunlardan en dikkat çekici olanları PHE97, ILE105 ve GLY104 rezidüleri ile kukurbitasin-B'nin hidrojen atomları arasında oluşabileceği tahmin edilen hidrojen bağlarıdır. Şekil 4.60'da ilginç olarak nitelendirilebilecek bir sonuç, ligandı saran rezidülerden büyük çoğunluğunun aromatik halkalar içermesine rağmen bunların kukurbitasin-B'nin merkezindeki siklik yapılar ile aromatik etkileşim yapmamış olmasıdır. HIS39, THR58, THR65 ve THR98 aromatik etkileşimler yerine yalnızca van der Waals çekim kuvveti meydana getirmiştir. Ligandla pi-alkil etkileşimleri yapan rezidüler ise VAL69, PHE70, ILE91 ve LEU102'dir.

4.6.9. Kukurbitasin-B ile KPT 2 enziminin etkileşimlerinin değerlendirilmesi

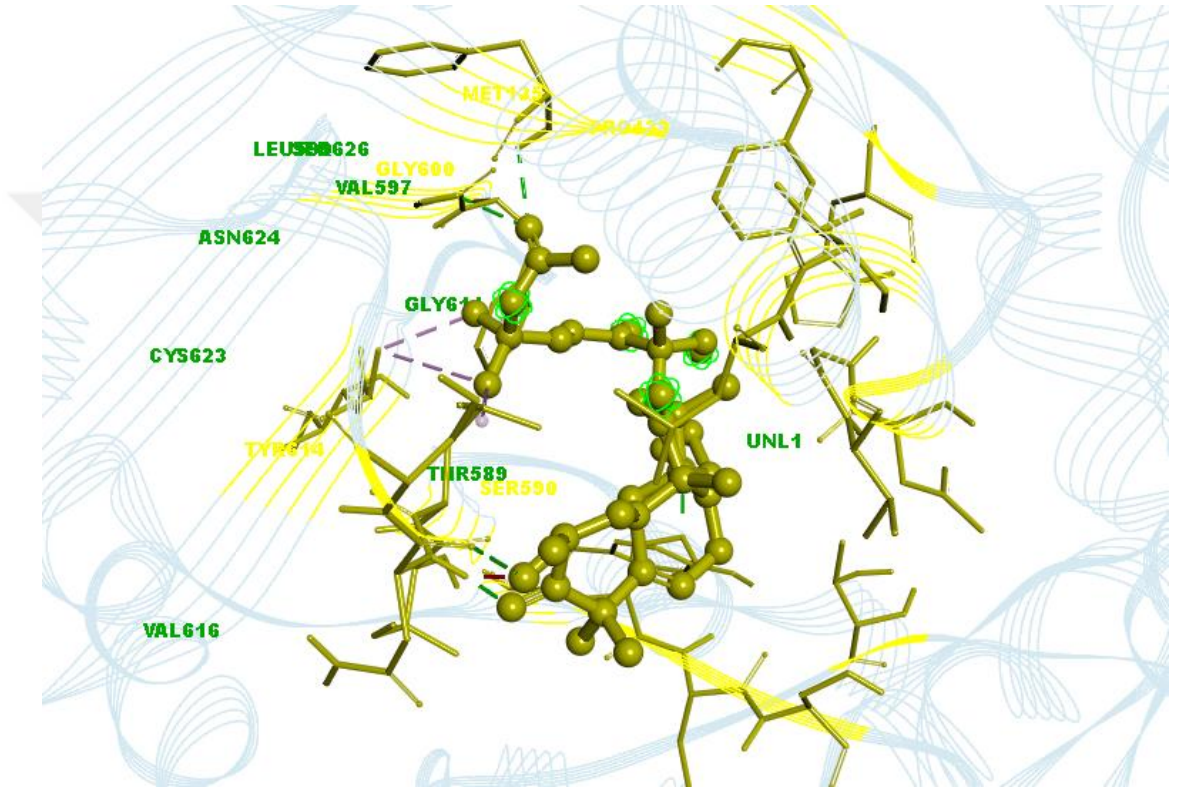
Bu çalışmada KPT 2 enzimini (pdb kodu: 2H4T) en iyi inhibe edebilen bitkisel ligand kukurbitasin-B'dir ve K_i değeri 57,11 pM, ΔG değeri -13,98 kcal/mol olarak bulunmuştur. Kukurbitasin-B'nin sonuçlarını bir diğer kukurbitan sınıfı molekül olan momordisin II izlemiştir ve 72,69 pM değeriyle o da çok başarılı bir inhibitör adaydır. Momordisin II ile kukurbitasin-B'nin KPT 2 enzimi (pdb kodu: 2FW3) içindeki yerleşimleri, birbirleriyle daha kolay kıyaslanması için üst üste getirilerek incelenmiştir (bkz. Şekil 4.52). Aşağıda ise kukurbitasin-B'nin 2H4T içindeki etkileşimleri şekiller üzerinden detaylı şekilde anlatılacaktır.

Kukurbitasin-B KPT 2 enziminin bağlanma bölgesindeki kaviteye yerleşirken etrafını bir yönden α -heliksler diğer yönden β -tabaka yapıları sarmıştır. Kukurbitasin-B triterpenoid sınıfında büyük bir molekül olduğundan bu kaviteye ancak kendisini çeviren paralel β -tabakalara paralel durarak sığabilmiştir. Şekil 4.62'de görüldüğü gibi ligandın kor yapısına bağlı uzun yan zincir proteinin iki ilmek yapısına çok yakın durmaktadır ve yarım ay şeklini alan mavi renkle gösterilen β -tabaka yapısının oluşturduğu girintiye yaklaşılarak kaviteye iyi bir şekilde yerleşmeyi başarmıştır.



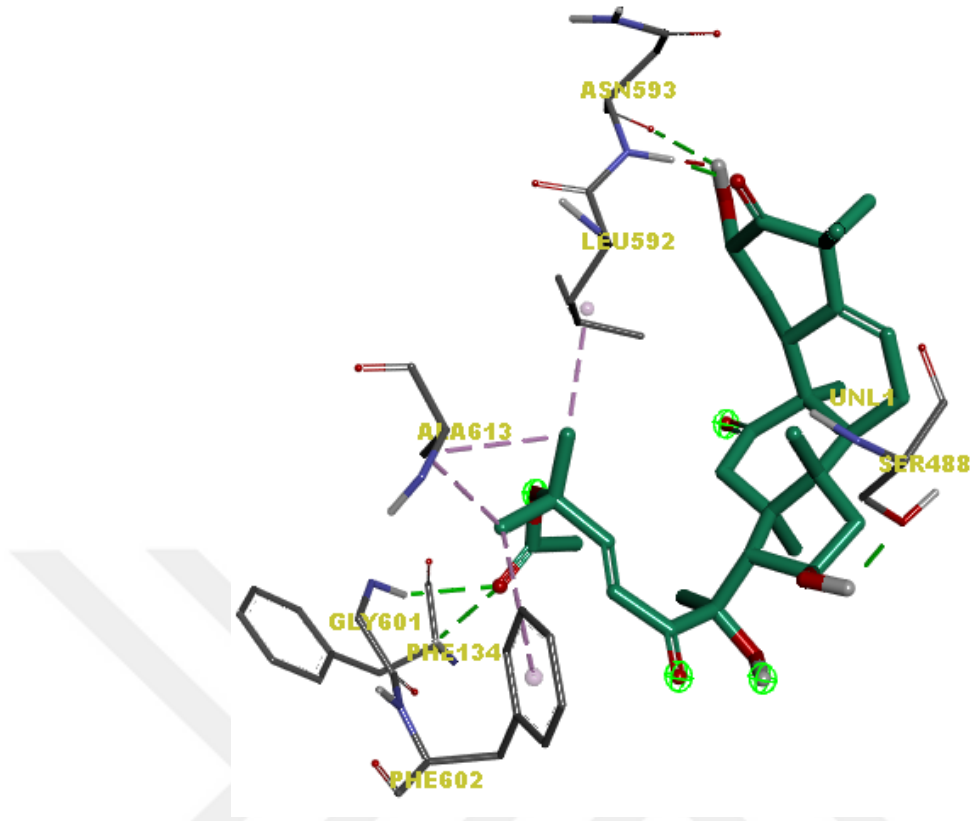
Şekil 4.62. Kukurbitasin-B, KPT 2 enzimi (PDB kodu: 2H4T) içinde, birbirlerine paralel konumlanmış üç β -pilin yanında onlara paralel durmakta

MET 135, GLY 600, SER 590, TYR 614 ve PRO 133 Şekil 4.63'te sarı renkle gösterilen ve kukurbitasin-B ile etkileşen sekonder yapıların üzerinde bulunan rezidülerdir. Kukurbitasin-B'nin etkileştiği yapıların iki ilmek yapısı ile β -tabakalar üzerinde bulunan bazı ufak bölgeler olduğu, α -heliksler ile etkileşim yapmadığı, ancak sadece bir α -heliksin küçük bir parçası ile etkileşebileceği Şekil 4.63'te gösterilmektedir.



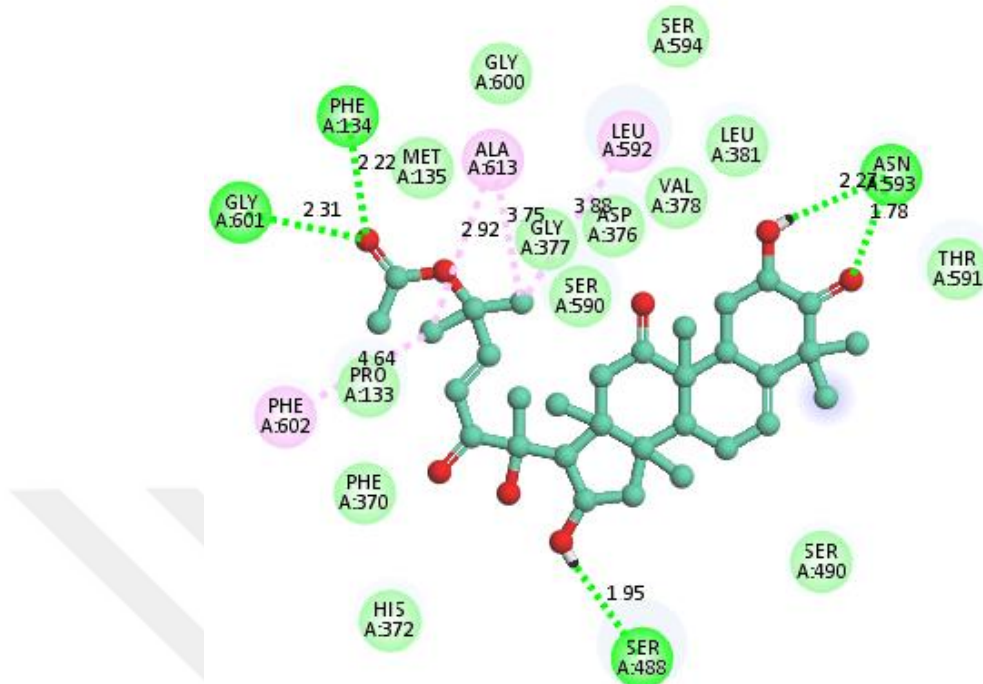
Şekil 4.63. Kukurbitasin-B, KPT 2 enzimi bağlanma bölgesinde, yakın etkileşimde olduğu bölgeler ve amino asitler sarı, van der Waals etkileşimi yapabileceği biraz daha uzaktaki amino asitler ise yeşil ile yazılı

Kukurbitasin-B'nin uzun yan zinciri üç farklı β -tabaka ile etkileşmekte ve Şekil 4.64'te bu etkileştiği rezidülerin ALA 613, GLY 601, PHE 134, LEU 592 ve PHE 602 oldukları görülmektedir. Ligandın steroid halkası ise proteinin ilmek yapıları üzerinde bulunduğu tahmin edilen ASN 593 ve SER 488 tarafından çekilmektedir. Bu rezidüler içinde ligandı zıt yönden çeken tek rezidünün SER 488 olduğu ve ligandın steroid halka yapısının L şeklinde katlanmış olmasının diğer taraftaki çok sayıda rezidü tarafından çekilebilmesini kolaylaştırdığı tahmin edilmektedir.



Şekil 4.64. Kukurbitasin-B ile KPT 2 enzimi (pdb kodu: 2H4T) arasındaki olası etkileşim ağının 3D gösterimi

Kukurbitasin-B merkezde bulunan halka yapılarını aromatik etkileşimlerde kullanmamış ve şekildeki iki fenilalanil rezidüsü yalnızca ligandın polar yan zinciriyle geri dönebilir bağlar oluşturmuştur. Bunlardan en önemlileri PHE 134 ile ligandın oksijen atomu arasında oluşan 2,2 Å uzunlukta ve aynı oksijen ile GLY 601 arasında oluşan 2,31 Å uzunlukta hidrojen bağlarıdır. Diğer önemli hidrojen bağları lanostan halka ile ASN 593 arasında görülen çifte bağlardır ki bunlardan biri 1,78 Å uzunluktadır ve ligandın oksijen atomu ile oluşmuştur, diğeri de ligandın hidroksil grubu ile oluşan 2,27 Å uzunluktaki hidrojen bağıdır (Şekil 4.65). Kukurbitasin-B'nin pentan halkasına bağlı hidroksil grubu ile SER 488 arasında 1,95 Å mesafede oldukça güçlü olduğu gösterilen bir hidrojen bağı daha meydana gelmiştir. Bu hidrojen bağları uzunluk olarak gerçek hidrojen bağı olmaya uygundur ve bu nedenle inhibisyon sabiti oldukça küçük bulunmuştur. Şekilde gösterildiği gibi LEU 592 ve PHE 602 ligandla birer pi-alkil etkileşimi, ALA 613 ise iki pi-alkil etkileşimi yapmıştır.



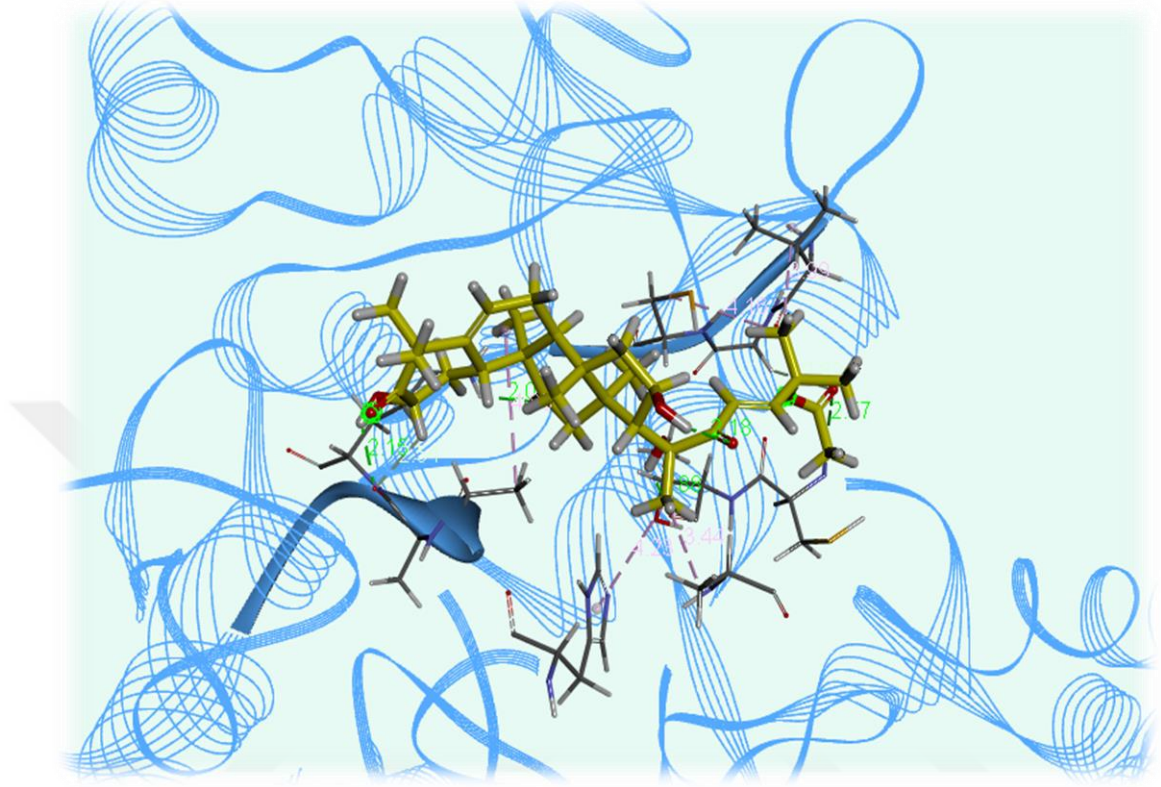
Şekil 4.65. Kukurbitasin-B ve KPT 2 enzimi olası etkileşim ağıının 2D gösterimi. Kukurbitasin-B merkezde top-çubuk modeliyle karbon atomları yeşil, oksijenler kırmızı ve hidrojenler beyaz renk toplarla temsil edilirken, proteinin içindeki pi-alkil etkileşimler pembe kesikli çizgilerle, hidrojen bağları ise yeşil kesikli çizgilerle gösterilmektedir

Kukurbitasin-B'nin KPT 2 enzimi içinde van der Waals etkileşimi yaptığı rezidüler ise açık yeşil kürelerle gösterilen HIS 372, PHE 370, SER 490, GLY600, MET 135, SER 590, THR 591, LEU 381 ve VAL 378 rezidüleridir.

4.6.10. Kukurbitasin-B ile AsFR etkileşimlerinin değerlendirilmesi

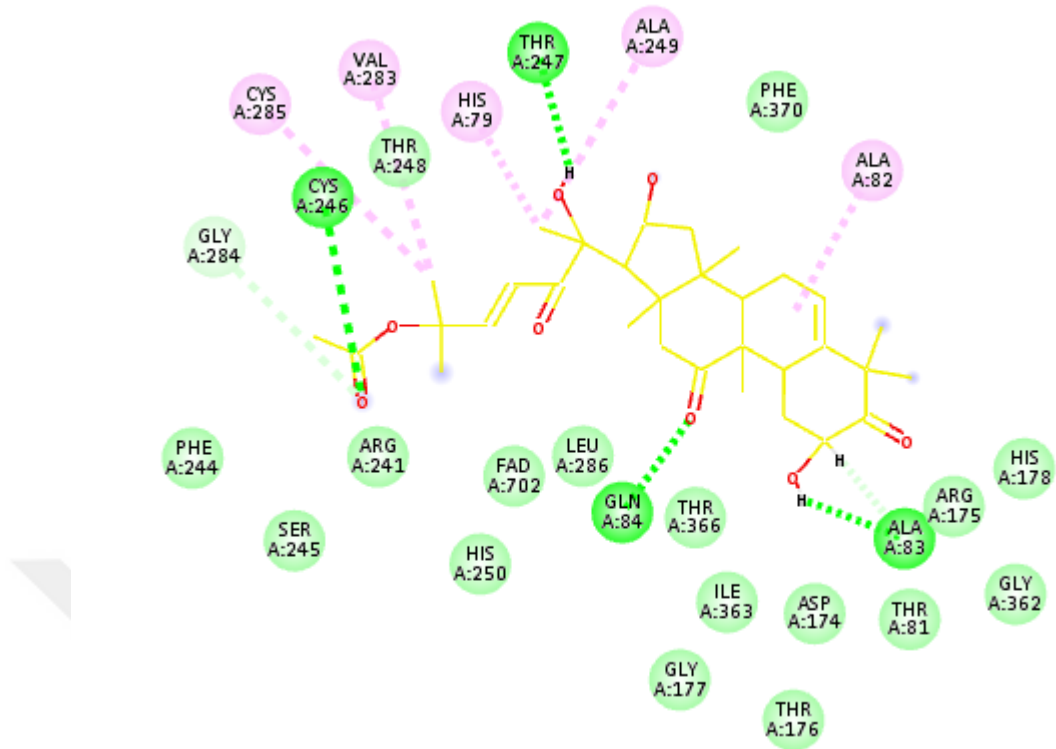
Bu çalışmada AsFR enzimini en iyi skor değerleri ile inhibe eden beş bitkisel ligandan üçünün ilginç şekilde *M. charantia*'da bulunan moleküller olması bitkinin suksinat dehidrojenaz inhibisyonu vasıtasıyla antihelmintik etki gösterebileceğini ortaya çıkarmıştır. Bu üç önemli molekül kukurbitasin-B, momordisin II ve karantadiol-A'dır. Şekil 4.66'da kukurbitasin-B'nin AsFR içindeki konumlanması gösterilmektedir. Kukurbitasin-B'nin etkileşimde bulunduğu rezidülerin önemli bir kısmının liganda paralel uzanan bir ilmek yapısı boyunca dizildikleri görülmektedir. Ligandı diğer

yönden çeken rezidüler ise α -heliks yapısı üzerinde bulunmakta, bu nedenle kukurbitasin-B, ilmek ile α -heliks arasında kalmış görünmektedir.



Şekil 4.66. Kukurbitasin-B ile AsFR'nin etkileşimlerinin 3D gösteriminde ligand sarı renk, etkileştiği rezidüler ise elementer renklerde çubuk modeliyle, protein mavi kurdele modeliyle sekonder yapıda gösterilmektedir

Kukurbitasin-B'nin AsFR içindeki olası etkileşimlerinde üç önemli hidrojen bağı oluşumunun yanı sıra çeşitli rezidülerle oluşturulan pi-alkil etkileşimleri görülmektedir. Bu hidrojen bağlarının THR247, ALA83 ve GLN84 rezidülerinden kaynaklandığı tahmin edilmiştir. Ayrıca CYS246 ile ligandın oksijen atomu arasında polar etkileşim görülmüştür. Discovery Studio programı tarafından yeşil çizgilerle temsil edilen konvansiyonel hidrojen bağları olarak gösterilmiş olsa da aradaki mesafe hidrojen bağı oluşumuna imkân veremeyecek derecede geniştir. Kukurbitasin-B'nin AsFR aktif bölgesinde pi-alkil etkileşiminde bulunduğu rezidüler şekilde pembe küreler ile gösterilmiş olup bunlar CYS285, VAL283, HIS79, ALA249 ve ALA82 rezidüleridir. Şekil 4.67'de GLY284'ün de CYS246 ile aynı oksijen atomuna çekim kuvveti uyguladığı görülmektedir.



Şekil 4.67. Kukurbitasin-B ile AsFR'nin olası etkileşimlerinin 2D gösterimi

Kukurbitasin-B'nin van der Waals etkileşimleri meydana getirdiği rezidüler ise PHE244, LEU286, GLY362, GLY177 gibi apolar rezidüler ile SER245, ARG175, ARG241, HIS250 ve ASP174 gibi polar rezidülerdir. Ayrıca FAD702 atomu da van der Waals etkileşimlerine katılmıştır.

Kukurbitasin-B, karantadiol-A ve momordisin II'nin AsFR içindeki konumlanmaları, birbirilerine göre yerleşimlerinin karşılaştırılabilmesi için tek bir şekil üzerinde (Şekil 4.68) gösterilmiştir. Bu şekilde çok dikkat çekici olan, her üç bileşende de ilk halkaların tam olarak aynı noktada konumlanmalarıdır ve bu konum FAD N5 atomunun karşısına denk gelmektedir. Diğer bir önemli sonuç ise farklı gruplar taşıyan bu üç molekülün adeta aynı molekülmiş gibi üst üste çakışık bir konumda yerleşmeleridir. Moleküllerin düzlemsel olarak aynı açıda durmaları da bu bölgedeki aromatik etkileşimlerin, enerjinin düşürülmesinde ne derecede önemli olduğunu göstermiştir. Şekle göre bu açının korunmasında ligandların ilmek ve α -heliks tarafından iki yönden çekilmesinin de payı vardır.

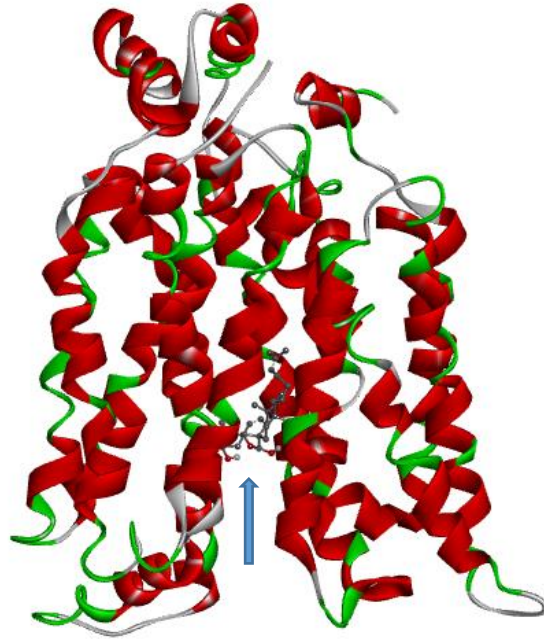


Şekil 4.68. En iyi skora sahip ligandlardan üçünün AsFR içindeki konumlanmaları. Momordisin II mor, kukurbitasin-B sarı ve karantadiol-A koyu yeşil çubuk modeliyle, FAD elementer renklerde, protein sekonder yapıda ve yapısal renklerinde gösterilmektedir

4.6.11. Karantadiol-A'nın CeGLUT1 içindeki olası etkileşimleri

Bu çalışmada kenetleme deneyinde kullanılan CeGLUT1 resetörünün 3 boyutlu yapısı SwissMODEL web sunucu ile tahmin edilmiş ve bu tahmini yapının insanda bulunan GLUT3 reseptörünün birebir aynısı (PDB kodu: 4ZWB) olduğu anlaşıldığında insandaki homologunun bulunabilmesi amacıyla PDB kayıtlarında mevcut GLUT1

reseptörleri araştırılmıştır. Ancak insan GLUT1 reseptörünün kriztalize yapısı PDB’da bulunamadığı için SwissMODEL analizine göre CeGLUT1 reseptörünün protein sekansı ile %43 oranında örtüşen 4ZWB kodlu 3D yapı kullanılmıştır. Şekil 4.69’da CeGLUT1 için tahmin edilen 3D yapı ve kenetleme simülasyonuna göre en iyi sonuçları veren iki liganddan biri olan karantadiol-A’nın yerleşimi gösterilmiştir.

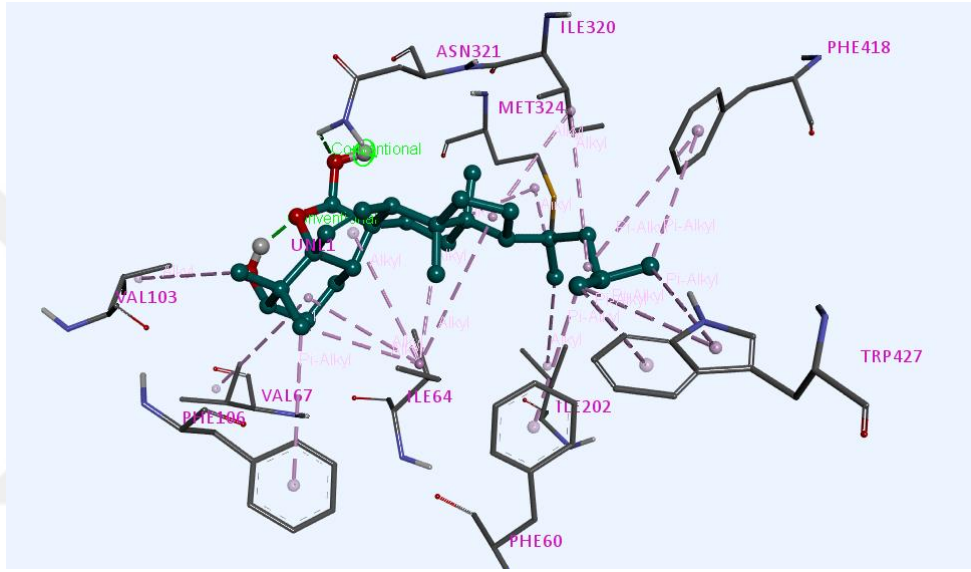


Şekil 4.69. Karantadiol-A’nın CeGLUT1 reseptörü içindeki olası yerleşimi (mavi okla gösterilmektedir)

Karantadiol-A CeGLUT1’e en iyi bağlanma ilgisine sahip ikinci bitkisel ligandır. Bu çalışmada kullanılan CeGLUT1 3D yapısının aslında insan GLUT3 reseptörü olduğu ve sonuçta CeGLUT1 ile çok düşük konsantrasyonda bağlanma yeteneğindeki moleküller aynı zamanda insandaki GLUT3 reseptörüne bağlandıkları için yan etkilerin ortaya çıkabileceği de göz önüne alınmalıdır. Bu moleküllerin ilaç olarak kombine kullanımında hipoglisemik ajanların kombinasyonundan kaçınılması gereklidir.

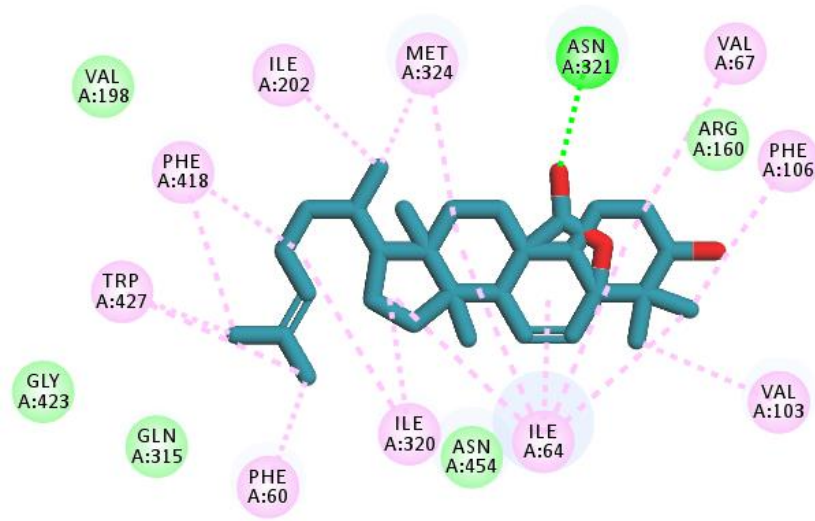
Şekil 4.70’de gösterildiği gibi karantadiol-A çok sayıda apolar amino asit ile etkileşim halindedir ve bu apolar rezidüer ligandı dört bir yandan çekmektedir. Bunlar içerisinde en önemlileri şekilde tam merkezde duran ve ligand üzerindeki beş farklı nokta ile etkileşimleri pembe kesikli çizgilerle gösterilen ILE64’dür. ILE64 tarafından çekilen

ligand üzerindeki gruplara VAL67 ve PHE106 gibi diğer apolar amino asitler de ilgi göstermiştir. Şekil 4.70’de karantadiol-A’nın PHE106, PHE60, TRP427 ve PHE418 ile çevrili aromatik bir kaviteye yerleşmiş olmasına rağmen ligandın merkez halkalarının herhangi bir aromatik sandviç yapmadığı görülmektedir. Oysa ki ligandın merkezindeki halka, PHE418 ile TRP427 arasına girerek aromatik sandviç meydana getirebilir ve entropiyi düşürebilirdi. Ne var ki bu durumda ILE64’ten de uzaklaşacak ve pek çok olası elektrostatik etkileşim hesaba katılamayacaktı.



Şekil 4.70. Karantadiol-A’nın CeGLUT1 içindeki olası etkileşimlerinin 3D gösterimi

Karantadiol-A’nın CeGLUT1 içindeki etkileştiği rezidülerden ASN321’in, ligandın oksijen atomu ile bir hidrojen bağı oluşturduğu Şekil 4.71’de gösterilmektedir. Şekilde pembe kesikli çizgiler pi-alkil bağlarını, pembe kürelerin etrafındaki gri haleler ise elektrostatik çekim kuvvetinin gücünü temsil etmektedir. Buna göre ILE64 en güçlü çekim alanını oluştururken, pi-alkil bağlarının kuvveti açısından MET324 ikinci sıradadır. ASN454 her ne kadar van der Waals kuvvetleri ile ligandı çekse bile yine de güçlü bir kuvvet uygulamaktadır. PHE60 ve VAL103 de diğer rezidülere kıyasla daha yakın mesafeden pi-alkil bağı oluşturmuştur. Pi-alkil etkileşimleri yaptığı tahmin edilen diğer rezidüler PHE418, TRP427, ILE320, PHE106, VAL67 ve ILE202’dir. Van der Waals etkileşimi yapan diğer rezidüler ise VAL198, GLY423, GLN315 ve ARG160’dır.

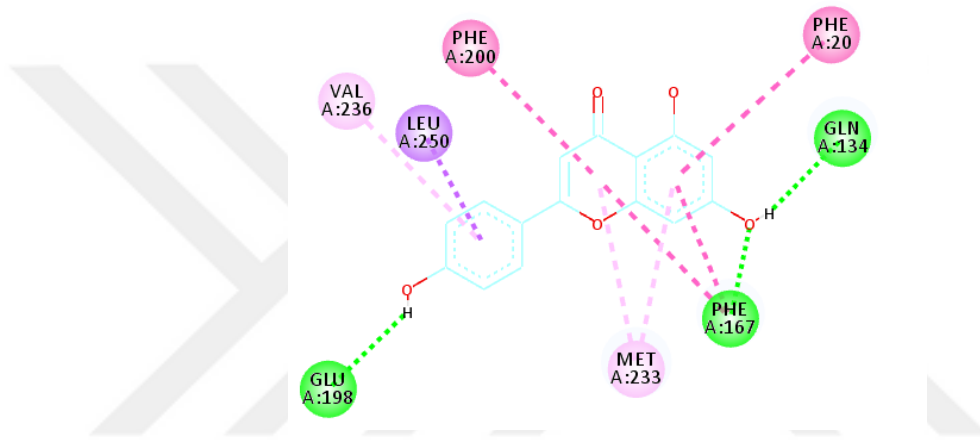


Şekil 4.71. Karantadiol-A'nın CeGLUT1 içindeki olası etkileşimlerinin 2D gösterimi

4.6.12. Apigenin ve *H. contortus* β -tubulini ile etkileşimleri

Apigenin, *O. vulgare* subsp. *hirtum* infuzyonu içerisinde bulunabilen bir flavanoiddir. Şekil 4.72'de gösterildiği gibi apigenin *H. contortus* β -tubulini içinde dört beta konformasyonu, iki ilmek yapısı ve üç α -heliks ile çevrili bir alanda durmaktadır. İlmek yapıları beyaz, beta konformasyon mavi ve α -heliks yapıları ise kırmızı renk ile sekonder yapıda gösterilmektedir. Şekil 4.72'deki beta konformasyonlar liganda daha uzakta bulunurken en yakında konumlandığı yapılar iki α -heliks yapısı ve bir ilmek yapısıdır. Bu heliks yapılarında ligand ile etkileşen bölgeler Şekil 4.72'de yeşil ile gösterilmektedir. Etkileşimde olduğu tahmin edilen rezidüler ASN247, VAL236, THR237, THR238, ILE16, TYR60 ve ARG46'dır. Bunlar dışında van der Waals etkileşimi yapabileceği bir mesafede bulunan pek çok rezidü de mevcuttur. MET1 ile gösterilen proteinin C-terminal ucu da liganda çok yakın durmaktadır. Apigenini çevreleyen rezidülerin pek çoğu polar olmakla beraber LEU260, ALA248, VAL169 ve ILE202 gibi apolar rezidüler apigenine oldukça yakın rezidüler olarak görünmektedir.

Şekil 4.74'te gösterildiği gibi apigeninde bulunan hidroksil grupları çeşitli rezidüler ile hidrojen bağları oluşturmuştur. Fenol üzerindeki hidroksil grubunun hidrojeni ile GLU198 arasında ve bunun yanı sıra bisiklik yapıda 7. pozisyonundaki hidroksil grubunun hidrojeni ile GLN134 arasında ve aynı hidroksil grubunun oksijen atomu ile PHE167 arasında hidrojen bağları oluşmuştur. MET233 ile apigeninin bisiklik yapısındaki her iki halka arasında π -alkil etkileşimleri görülmektedir. PHE20 ve PHE200 bu halkalar ile π - π T biçimli etkileşimler yapmıştır. Fenol halkası LEU250 ile π -sigma bağı oluşturmuş, VAL236 ile ise π -alkil etkileşimi yapmıştır.

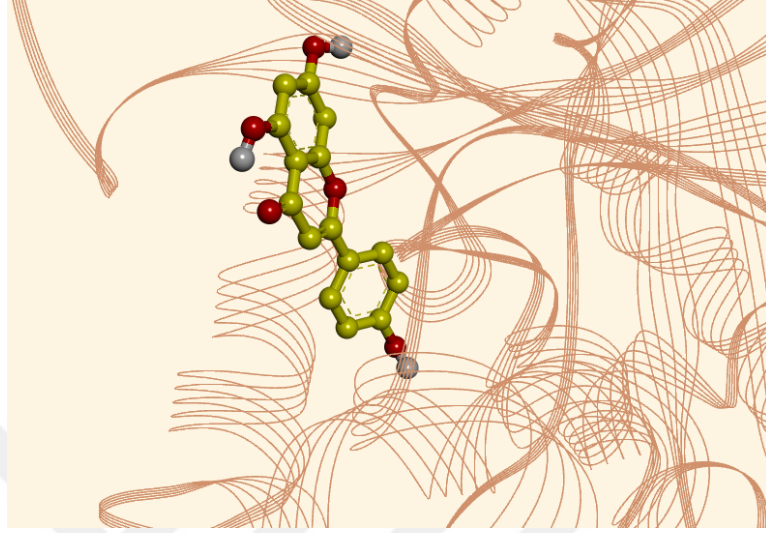


Şekil 4.74. Apigeninin Hc β -tubulin içindeki etkileşimlerinin 2D gösterimi

4.6.13. Apigenin ile fare β -tubulin proteini arasındaki etkileşimlerin değerlendirilmesi

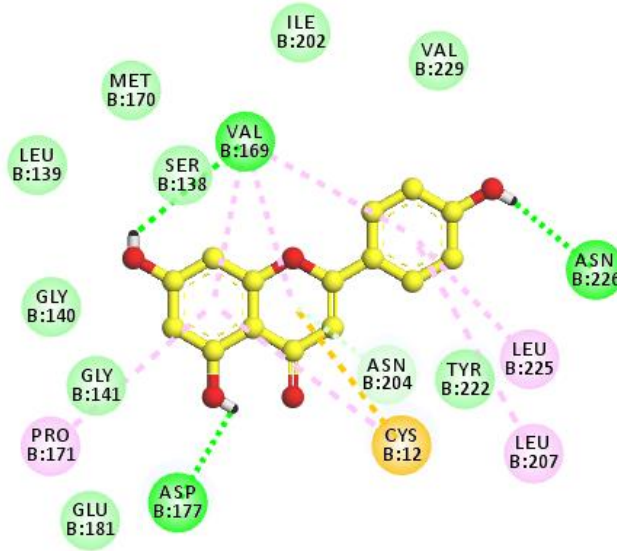
Hc β -tubulini için kenetlenen ligandlar içinde en iyi skora sahip ligandlar ADME özellikleri açısından değerlendirildikten sonra en uygun özellikteki ligandlar farede bulunan β -tubulin ile de kenetlenmiştir. Bu işlemin amacı bitkisel bile olsa ligandların olası yan etkisinin *in silico* yöntemlerle araştırılmasıdır. Apigenin, fare β -tubulini ile kenetleme sonucu bağlanabilecek tek molekül olduğu için olası etkileşimi incelenmiştir. Bununla beraber kenetleme sonucu bulunan bağlanma ilgisi çok düşüktür (-0,94 kcal/mol serbest bağlanma enerjisi ve yaklaşık 204,3 milimolar K_i değeri). Diğer ligandlar ise bu homologa hiç bağlanamamıştır (bkz. Çizelge 4.13). Bu sonuç, β -tubulin inhibisyonuna bağlı bir yan etkinin görülmeyeceğini hesaplamalı ortamda kanıtlamıştır. Apigenin ligandın merkezindeki grid kutusunun bir kenarında en düşük enerji değeriyle

konumlanabilmiştir. Ligandın fare β -tubulini içindeki yerleşimi, tubulinin üç paralel beta pili yapısının hemen önünde onlara dik bir konumdadır (Şekil 4.75).



Şekil 4.75. Apigenin fare β -tubulini içindeki olası konumunda. Apigenin sarı top-çubuk modeli, protein kahverengi şerit kurdale ile temsil edilmekte

Apigeninin sadece fenol grubu, proteinin iç kısmına girebilmiş ve buradaki α - heliks ile etkileşime imkân verebilecek bir mesafede konumlanmıştır. Bu fenol grubuna ait hidrojen, ASN226 rezidüsü ile bir hidrojen bağı meydana getirmiştir (Şekil 4.76).



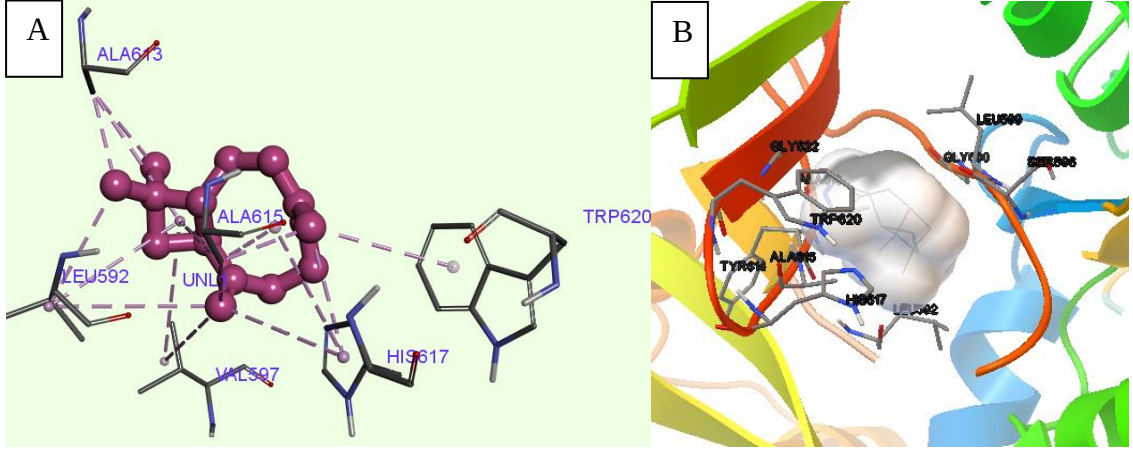
Şekil 4.76. Apigeninin fare β -tubulini içindeki olası etkileşimlerinin 2D gösteriminde apigenin merkezde top çubuk modelinde karbon atomları sarı, oksijenler kırmızı ve

hidrojenler beyaz renk, pi-sülfür bağı turuncu, pi-alkil etkileşimleri pembe, hidrojen bağları ise yeşil kesikli çizgilerle, van der Waals etkileşimleri ise açık yeşil kürelerle temsil edilmekte

Proteinin CYS12 rezidüsü apigeninin her iki çekirdek halkası ile pi-sülfür bağları meydana getirmiştir. Bu tez çalışmasında incelenen etkileşimlerin başka hiçbirinde bu tip pi-sülfür etkileşimi görülmemiştir. Bu nedenle bu sonuç oldukça dikkat çekicidir. Ayrıca SER138 ve ASP177 ile apigeninin hidroksil grupları arasında hidrojen bağları oluşacağı tahmin edilmiştir. VAL169 ise apigeninin üç siklik yapısı ile de pi-alkil bağı yapmış görünmektedir. Pro171, Leu207 ve Leu225 ise pi-alkil etkileşimi yapacağı tahmin edilen diğer rezidülerdir. Bu kuvvetli etkileşimlere rağmen enerjinin yeterince düşmemesi ilginç görünse de, ligandın proteinin içine giremediğini gösteren Şekil 4.76, yeterince yoğun olmayan etkileşim ağını ve hesaplanan bu sonucu normal göstermiştir.

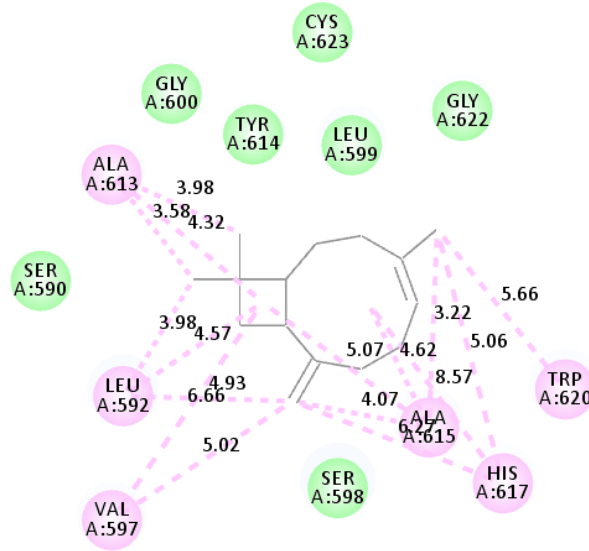
4.6.14. β -karyofilen ile KPT 2 enziminin olası etkileşimlerinin değerlendirilmesi

O. vulgare subsp. *hirtum* uçucu yağından izole edilen başlıca bileşenler olan on molekül (karvakrol, timol, *p*-simen, γ -terpinen, α -pinen, β -karyofilen, α -tujene, α -terpinen, terpinen-4-ol, mirsen ve borneol) içerisinde β -karyofilen ((1R, 9S, E) -4,11,11-trimetil-8-metilenbisiklo (7.2.0) undec-4-en), kenetleme simülasyonu sonucuna göre hem KPT 2 enzimine hem Hc β -tubuline karşı en yüksek bağlanma ilgisi gösteren moleküldü. β -karyofilenin kenetleme sonuçları KPT 2 için $\Delta G = -8.08$ kcal/mol ve $K_i = 1,19$ uM, Hc β -tubulin için $\Delta G = -8,27$ kcal/mol ve $K_i = 873,99$ nM bulunmuştur. β -karyofilenin KPT 2 içindeki yerleşiminde apolar dört rezidü (ALA615, ALA613, LEU592 ve VAL597) ile çevrelendiği ve bu rezidülerle elektrostatik etkileşimler yaptığı görülmüştür (Şekil 4.77 A ve B). β -karyofilenin dokuz karbonlu siklo yapısı HIS617 ve TRP620 ile aromatik etkileşimler yapmasında etkili oldu. Bileşen ile van der Waals etkileşimleri yapan rezidüler ise SER590, GLY600, TYR614, CYS623, LEU599, GLY622 ve SER598 idi.



Şekil 4.77. β -karyofilen ile KPT 2 enzimi arasındaki olası etkileşimler **A)** Etkileşimlerin kesikli çizgiler ile gösterimi, **B)** KPT 2 enziminin sekonder yapısı gökkuşağı renklerinde, ADT ile analizinde bir yüzey alanı içerisinde gösterilen β -karyofilen etkileştiği rezidüler ile çevrili

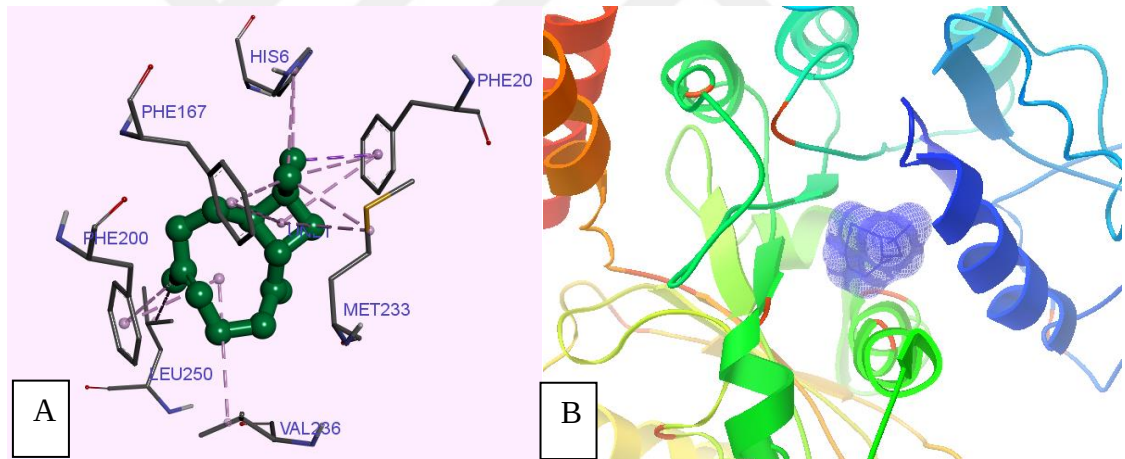
β -karyofilen sahip olduğu üç metil grubu ve bir metilen grubu sayesinde KPT 2 içinde çok sayıda pi-alkil etkileşimi yapabilmektedir. Bu pi-alkil bağları Şekil 4.78’de pembe kesikli çizgilerle gösterilmektedir.



Şekil 4.78. β -karyofilen ile KPT 2 enziminin etkileşimde olabileceği olası rezidüler ve kimyasal bağların 2D gösterimi

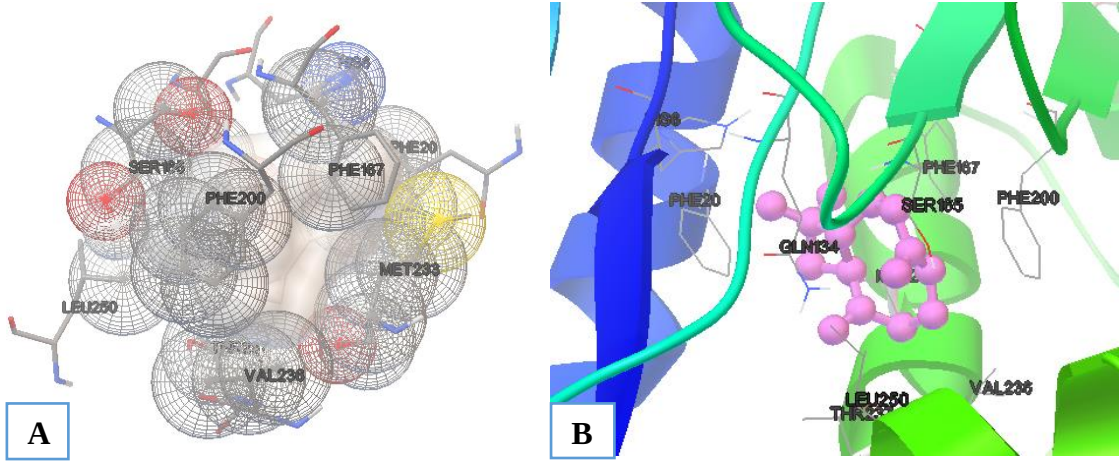
4.6.15. β -karyofilen ile Hc β -tubulinin olası etkileşimlerinin değerlendirilmesi

Ligand ve üzerindeki metil gruplarının tetrasiklik kısmı PHE20 ile pi-sigma etkileşimi yaparken, PHE167 ve MET233 ile pi-alkil etkileşimleri, metil gruplarının karşısında kalan HIS6 ile alkil bağları oluşturmuştur (Şekil 4.79 A ve B). Bu tetrasiklik halka ve metil grupları, PHE20 ve PHE167 rezidüleri arasında aromatik bir sandviç meydana gelmiştir. PHE200, ligandın dokuz karbonlu çekirdeğine en yakın bulunan rezidülerden biridir ve 4. pozisyonda metil grubu ile hem aromatik etkileşimi hem de pi-alkil etkileşimini gerçekleştirmiştir. LEU250 ve VAL236, ligand ile alkil etkileşimleri yapan hidrofobik amino asit rezidüleridir. THR136, THR237, TYR50, SER165 ve GLN134, Hc β -tubulin aktif bölgesinde β -karyofilen ile van der Waals etkileşimleri yapmıştır. Bu molekül, hem KPT 2 hem de Hc β -tubuline karşı inhibe edici özelliğe sahiptir çünkü ΔG değeri = -8 kcal/mol'den daha küçüktür.



Şekil 4.79. β -karyofilen ile Hc β -tubulin etkileşimlerinin 3D gösterimi. **A)** Etkileştiği rezidüler, **B)** Protein sekonder yapıda, lacivert yüzey β -karyofileni temsil etmekte

Aşağıdaki Şekil 4.80'de β -karyofilen ile Hc β -tubulin etkileşimlerinin ADT programı ile oluşturulan 3D görselleri verilmektedir. Şekil 4.80 A'da liganda en yakın konumdaki rezidülerin işgal ettikleri alanlar kürelerle gösterilirken polar etkileşimde bulunduğu rezidüler kırmızı ve mavi kürelerle temsil edilmektedir. Şekil 4.80 B'de ligand pembe top çubuk modeliyle gösterilirken, etkileşimde olduğu rezidüler çubuk modeliyle ve protein sekonder yapıda gösterilmektedir. Şekil 4.80 B'de en dikkat çekici yerleşim özelliği ligandın üç farklı fenil rezidüsü arasına sıkışmış olmasıdır.



Şekil 4.80. Hcβ-tubulin ile β-karyofilen etkileşimlerinin 3D gösterimi **A)** Küre biçimli etkileşim ağı. **B)** Ligandın aktif bölgede konumlanması. β-karyofilen pembe top çubuk modeliyle, protein sekonder yapıda gökkuşağı renklerinde ve etkileşimde olduğu tahmin edilen rezidüer ise ince çubuk modeliyle temsil edilmektedir

Beta-karyofilen SwissADME tabanında farmakokinetik açıdan değerlendirildiğinde P-glikoprotein substratı değildir, gastrointestinal absorpsiyonu düşüktür, kan-beyin bariyerini geçemez, CYP1A2 enzimini, CYP2D6 enzimini, CYP3A4 enzimini inhibe edemezken, CYPC19 enzimini ve CYC2C9 enzimini inhibe edebilir. Çizelge 4.7’de gösterildiği gibi ağızdan alınabilen bir ilaç olma potansiyeli açısından Ghose, Veber ve Egan’ın kurallarına uyarken, Muegge’nin kurallarına uymaz ve Lipinski’nin dört kuralından üçünü sağlar. Moleküler ağırlığı 250’den küçük (204,35 gr/mol) olduğu ve lipofillik özelliği Log $P_{o/w}$ (XLOGP3) >3,5 (4,38) olduğu için tıbbi kimya açısından ilaç iskeleti olmak için uygun değildir. Çizelgede gösterildiği gibi apolar bir moleküldür.

Çizelge 4.7. β-karyofilen için SwissADME değerlendirmesi

Kimyasal özellikleri	
Moleküler Formül	C15H24

Çizelge 4.7. β -karyofilen için SwissADME değerlendirmesi (devam)

Moleküler Ağırlık	204,35 g/mol
Dönebilen bağ sayısı	0
Hidrojen-bağı alıcı sayısı	0
Hidrojen-bağı sunucu sayısı	0
GI absorpsiyonu	Zayıf
KBB geçebilirliği	Yok
P-gp substratlığı	Yok
Deriden geçebilirliği	-4,44 cm/s
Lipinski'nin beşer kuralına uygunluğu	Uygun
Ghose, Veber, Egan ve Muegge'nin kurallarına uygunluğu	Muegge hariç diğerleri için uygun
Biyouygunluk Skoru	0.55
CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 enzimleri için inhibitörlüğü	CYP2C19 ve CYP2C9 inhibitörü, diğerleri için değil
TPSA	0,00 Å ²

GI: Gastrointestinal, KBB: Kan-beyin bariyeri, P-gp: P-glikoprotein, TPSA: Topolojik Polar Yüzey Alanı (Topological Polar Surface Area), MA: Moleküler Ağırlık, FLEX: Fleksibilite, Esneklik, LIPO: Lipofilik, SIZE: Büyüklük, POLAR: Polarlık, INSOLU: Suda çözünmezlik, INSATU: Doymamışlık

Gastrointestinal sistemde bulunan helmintlerin atılması için β -karyofilenin absorpsiyonunun düşük olması avantajdır. Böylece helmintler daha yüksek konsantrasyonda β -karyofilene maruz kalabileceklerdir. SwissADME sonuçlarına göre radar grafiğindeki kimyasal özellikleri göz önüne alındığında ağızdan alınmak için uygun görünmekte ve çoğu kriteri karşılamaktadır.

In silico kenetleme yöntemi ile inhibisyon özellikleri araştırılan ve bu çalışmadaki *in vivo* deneyde farelere verilen Oreganum uçucu yağı içerisinde bulunduğu Prof. Dr. Mine Kürkçüoğlu (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi) tarafından tespit edilen ve kenetleme simülasyonları yapılan on molekülden dokuzunun (karvakrol, timol, *p*-simen, γ -terpinen, α -pinen, α -tujen, α -terpinen, terpinen-4-ol, mirsen ve borneol) ΔG değerleri KPT 2 için -5,28 ile -6,83 kcal/mol ve β -tubulin için ise -6,04 ile -7,06 kcal/mol arasında bulunmuştur. Bu sonuç bu dokuz molekülün antihelmintik etkisinin Hc β -tubulin veya KPT 2 inhibisyonu dışında bir yola bağlı olduğunu göstermektedir.

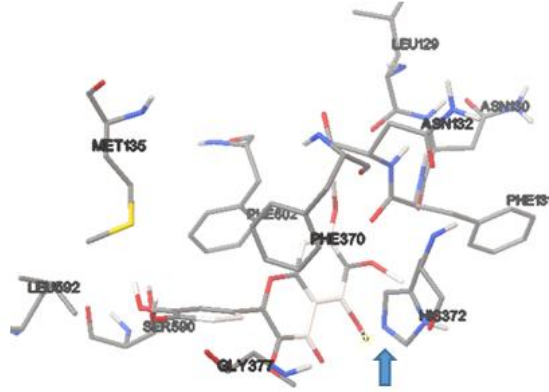
Bu moleküller içerisinde *p*-simen KPT 2 ve Hc β -tubulin için en düşük bağlanma ilgisine sahip molekülken (K_i değerleri sırasıyla 134,63 μ M ve 37,79 μ M), β -karyofilen dışındaki diğer sekiz molekül de *p*-simene yakın değerler göstermiştir. Çok küçük molekül yapıları ve az sayıdaki yan zincir, proteinlerdeki olası kimyasal etkileşimlerin sayısının ve çeşitliliğinin sınırlı kalmasına neden olmuştur. Test edilen bu moleküller antelmintik etkili olabilse de, diğer antelmintik protein hedefleriyle *in silico* modelleme yöntemiyle test edilmesi ve *in vitro* olarak da araştırılması yararlı olabilir.

β -karyofilen, kannabinoid reseptörünün bir agonistidir (Francomano ve diğerleri, 2019). Kannabinoid reseptörü, G proteini (protein bağlayıcı GTP)-ilişkili reseptörler grubundadır ve bazı G-bağlı reseptörler, antihelmintik ilaçların hedefleridir (Martin ve diğerleri, 2014; Lacey, 1990). Bu nedenle β -karyofilenin bu tip ilaç hedefi G bağli reseptörlerle kenetlenme deneyleri yapılmalıdır. Moleküler kenetleme çalışmaları, β -karyofilenin, aktif bölgede (valin-113, fenilalanin-117, izölösün-198, triptofan-258 ve metiyonin-265) CBR-2'nin (kannabinoid reseptörü) hidrofobik aminoasit rezidüleri ile etkileşime girdiğini göstermiştir (Gertsch ve diğerleri, 2008). Bu çalışmada ise β -karyofilen, KPT 2 enzimi ve Hc β -tubulindeki hidrofobik kalıntılarla etkileşime girmiştir. Bu amino asit rezidüleri şunlardır: KPT 2'de TRP620, ALA613, LEU592, VAL597 ve ALA615; ve GLY134, VAL236, LEU250, Hc β -tubulin içinde PHE200, PHE20, PHE167 ve MET233.

4.6.16. A. annua içerisinde bulunan bileşenlerin kenetleme sonuçlarının değerlendirilmesi

A. annua için seçilen aktif bileşenlerin moleküler kenetleme analizleri *Haemonchus contortus* β -tubulin proteini Hc β -tubulin ve *Rattus norvegicus* karnitin palmitoil transferaz 2 enzimi rnKPT 2 (PDB ID: 2H4T) için oldukça farklı ve ilginç sonuçlar vermiştir. Bu moleküllerden arteannuin-B ve izofraksidinin Hc β -tubulin ile serbest bağlanma enerjileri (ΔG) -10 kcal/mol'den küçük bulunmuştur. KPT 2 enzimi için ise *A. annua*'da bulunduğu tahmin edilen on dokuz molekülden dördünün (friedelin, stigmasterol, krisoplenetin ve krisoplenol-D) ΔG değerleri -10 kcal/mol'ün altında bulunmuştur. Bu moleküller içerisinde KPT 2 enzimine karşı düşük ilgiye sahip olduğu

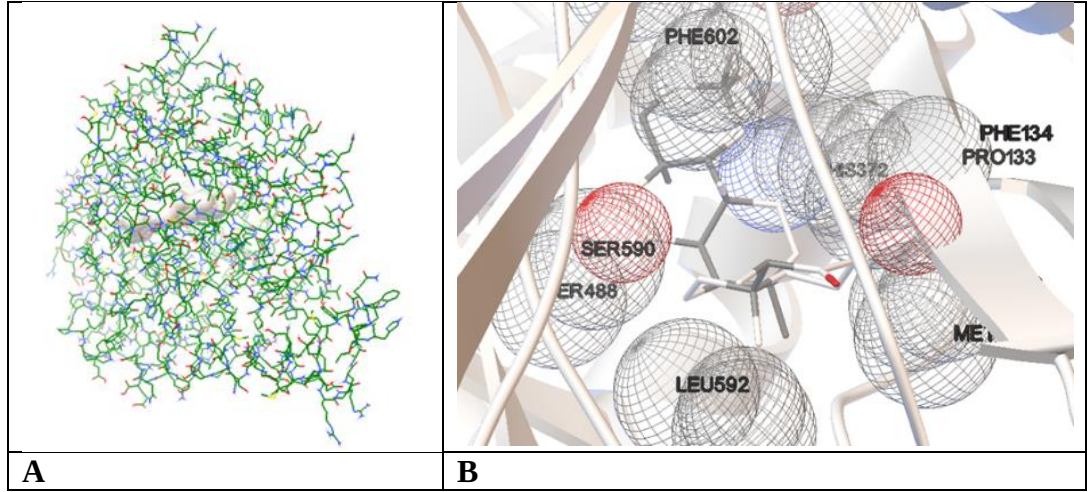
tahmin edilen artemetin ($\Delta G = -6,78$ kcal/mol) ise Autodock4.2 analizlerine göre KPT 2 bağlanma bölgesi içinde bir hidrojen bağı oluşturmıştır ve çeşitli rezidülerle van der Waals etkileşimleri yapmıştır (Şekil 4.81).



Şekil 4.81. Artemetin-KPT 2 kenetleme simulasyonu sonucu ligandın bağlanma bölgesindeki rezidülerle kimyasal etkileşimlerinin 3 boyutlu gösterimi. HIS372 ile artemetin H11 atomu arasında bir hidrojen bağı olduğu görülmektedir

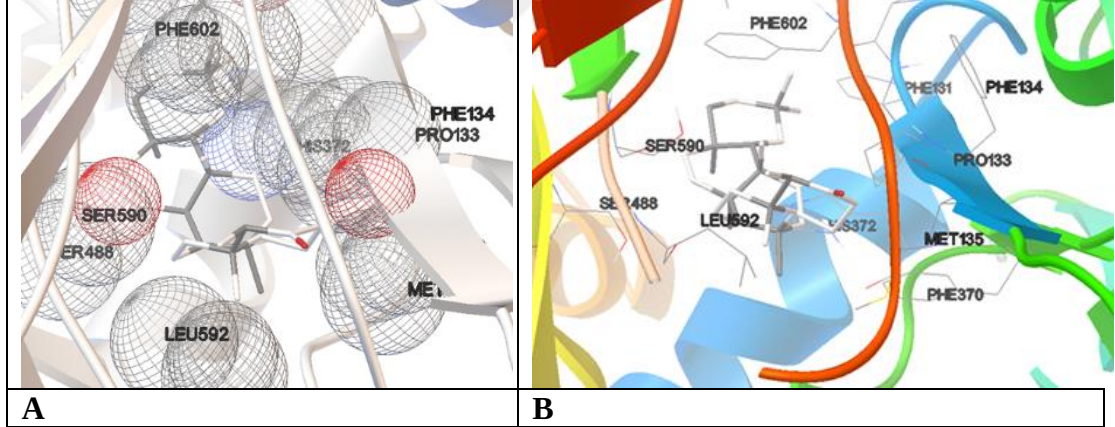
Friedelin ve stigmasterolün KPT 2 enzimine afinitelerinin oldukça yüksek olması (13,07 nM ve 9,43 nM, sırasıyla), Hc β -tubulin ile bulunan K_i değerlerinin ise hesaplanamayacak bir durumda olması dikkat çekici bir sonuçtur (bkz. Çizelge 4.2). Bu moleküllerin dlg dosyaları incelendiğinde Hc β -tubulin içinde aktif bölgede yerleştikleri ve kenetleme simulasyonunun doğru yapıldığı görülmüştür (Şekil 4.82 A). Bu sonuçlar bu iki molekülün *A. annua* bitkisinin antinematodal etkisinden sorumlu başlıca moleküllerden olabileceklerini ve Hc β -tubulini inhibe etmediklerini göstermektedir. Bu moleküllerin ABZ'den farklı bir etki mekanizmasına sahip olduğunu kanıtlayan bu sonuçlar, bitkinin antinematodal etki mekanizmasının tahmin edilmesinde önemli bir veri sağlamıştır.

Hc β -tubulin proteininde ABZ'nin bağlanma bölgesine yerleşen friedelinin çok sayıda polar veya aromatik amino asit yan zincirleriyle çevrili olmasına rağmen serbest bağlanma enerjisinin +72,37 kcal/mol düzeyinde bulunmuş olması enerjinin düşürülmesi için gerekli olan konum değiştirilmesinin yapıldığı alanının çok dar olmasından kaynaklanmış olabilir (Şekil 4.82 B).



Şekil 4.82. Friedelin ile Hcβ-tubulinin bağlanma bölgesindeki etkileşimler

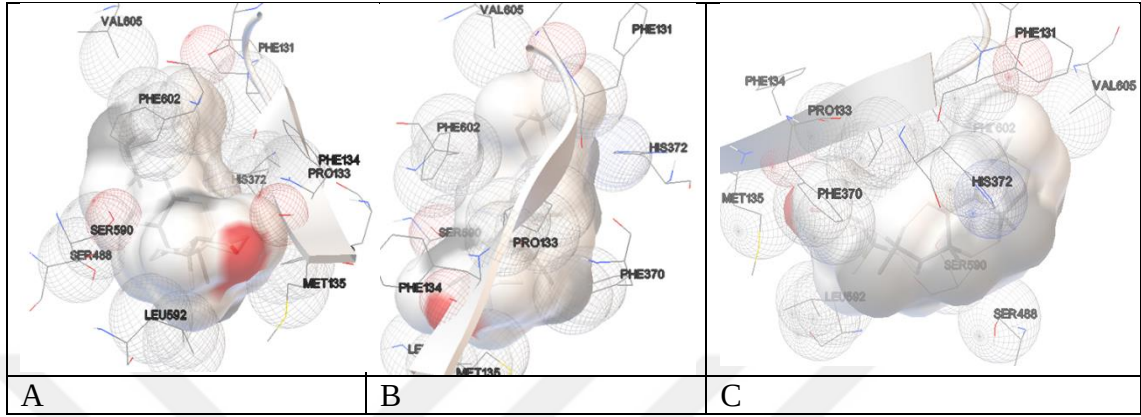
Friedelinin KPT 2 içindeki konumlanmasında ise yeterli boşluk mevcut olduğu için enerjinin düşürülebileceği konum değişikliği sağlanabilmiştir (Şekil 4.83A). KPT 2 içindeki aktif bölgede bulunan iki α -helix yapısı da bu konformasyonun oluşturulmasında etkili olmuştur (Şekil 4.83B).



Şekil 4.83. Friedelin–KPT 2 etkileşimleri

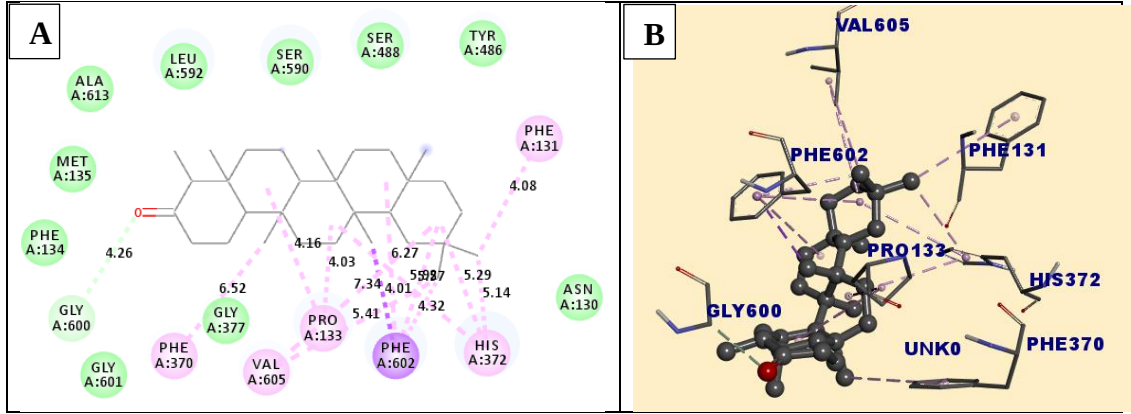
Hcβ-tubulinde ise birbirine yakın konumlu çok sayıda β -konformasyon yapısı friedelinin rotasyonunu güçleştirmiştir (bkz. Şekil 4.82 B). Friedelinin yerleşiminde en dikkat çekici özellik molekülün bir yüzeyinin etrafındaki rezidüer ile etkileşim yapmaması, diğer yöndeki rezidülerin ise molekülü adeta bir hamakta duruyor gibi yukarıdan çevirip van der Waals kuvvetleri ve aromatik etkileşimler ile çekiyor

olmalarıdır (Şekil 4.84A). Bu yerleşim, molekülün enzime giriş boşluğu konusunda da bir fikir vermektedir. Şekil 4.84 B ve C’de görüldüğü gibi SER488 ve PHE370 amino asitlerinin olduğu bölgeden ligandın bağlanma boşluğuna giriş yapacak olması olasıdır.



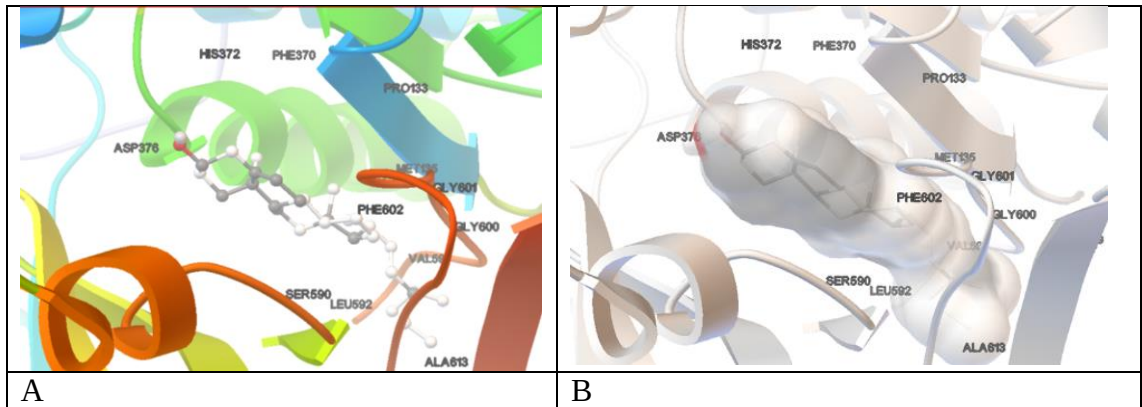
Şekil 4.84. Friedelin molekülü KPT 2 içinde. Etkileşimlerin daha rahat görülebilmesi için moleküler yüzeylerin de gösterildiği ve farklı 90°’lik açılardan alınmış üç resim

Şekil 4.85 A’da gösterildiği gibi friedelinin 4 halkası da çevresindeki rezidülerle güçlü alkil etkileşimleri yaparken özellikle ligandın 3. ve 5. halkaları, PRO133 ve HIS372 ile çok sayıda aromatik etkileşim yapmıştır. Karşılıklı etkileşen halkalar arasındaki mesafeler 4-5 Å civarında olmasına rağmen ligandı çepeçevre saran beş aromatik yan zincir (PHE370, PRO133, PHE602, HIS372, PHE131) yoğun bir etkileşim ağı meydana getirmiştir (Şekil 4.85 A). Pentasiklik yapının 11. karbon düzleminde kıvrılarak üç farklı fenilalanin rezidüsü (PHE131, PHE602 ve PHE370) arasında değişik bir tür aromatik sandviç oluşturması dikkat çekicidir. Friedelinin 5. halkası PHE602 ile PHE131 arasına girerken, 2. halkası PHE370 ile PHE602 rezidülerinin etkisinde kalıyor gibi görünmektedir (Şekil 4.85 B). Şekil 4.85 A’da ise PHE370 ile PHE131’in liganddaki metil grupları ile π -alkil etkileşimleri yaptığı gösterilmektedir.



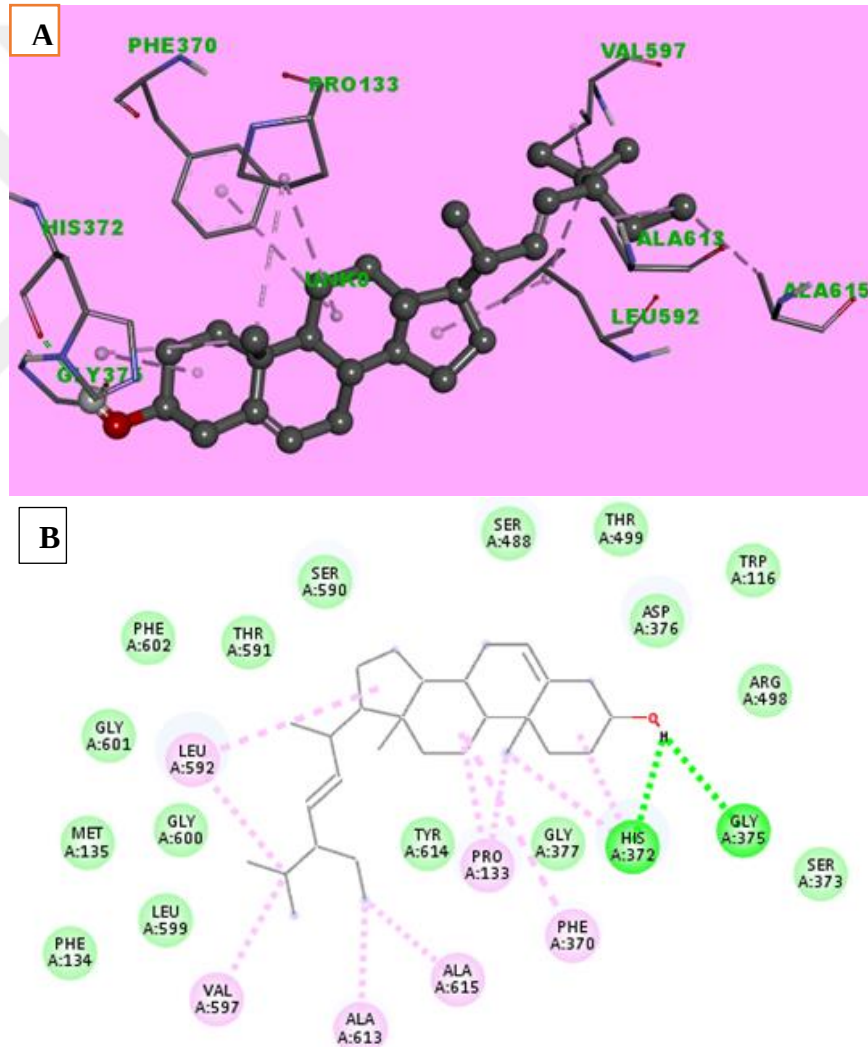
Şekil 4.85. Friedelin ile KPT 2 etkileşimleri. **A)** 2D gösterimi, uzaklıklar Å ölçüsünde verilmiştir. **B)** 3D gösterimi, üç farklı fenil rezidüsü (PHE131, PHE602 ve PHE370) ile çevrili bir boşluğa çok iyi şekilde yerleşimi ile çok sayıda kimyasal etkileşim yaptığı görülmektedir

PHE602 ise hem 11. metil grubu ile π -sigma hem de 14. metil grubu ile π -alkil etkileşimleri yaparken aynı zamanda 4. ve 5. halkalar ile de aromatik etkileşimler yapmaktadır. KPT 2 enziminin aktif bölgesinde friedelin ile van der Waals çekim kuvveti meydana getiren diğer rezidüler ASN130, TYR486, SER488, SER590, LEU592, ALA613, MET135, PHE134, GLY600, GLY601 VE GLY377'dir. Bunlardan SER488, SER590 VE LEU592 daha güçlü bir çekim kuvveti uygulamıştır. *A. annua* içeriğinde bulunabilen ve serbest bağlanma enerjileri açısından karşılaştırılan bu on dokuz bitkisel ligand içerisinde KPT 2 enzimi ile en yüksek bağlanma ilgisine sahip molekül -10,95 kcal/mol enerji değeriyle stigmaterol olarak bulunmuştur. Stigmaterolün KPT 2 içindeki olası etkileşimleri Şekil 4.86 A ve B'de görülmektedir.



Şekil 4.86. Stigmaterol ile KPT 2 enzimi aktif bölgesindeki etkileşimler

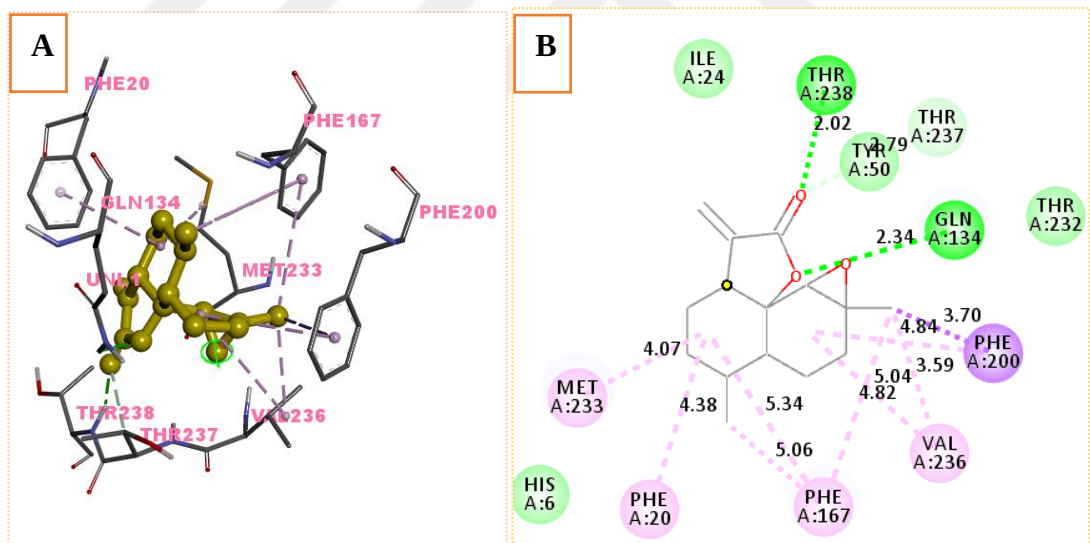
Stigmasterolün birbirine paralel iki α -heliks ile birbirine dik duran iki β -konformasyon arasına girmesinde molekülün tetrasiklik çekirdeğinin yanı sıra siklopentan halkasına bağlı dallanmış bir yan zincirin bulunmasının önemli bir payı vardır. Friedelinde olduğu gibi stigmasterolde de merkezdeki halkalar PHE370, PRO133 ve HIS372 rezidüleri ile aromatik etkileşimler yapmıştır (Şekil 4.87 A) ve HIS372 yine liganda en yakın konumdaki rezidülerden biridir. Friedelin için merkez halkalara bağlı metil grupları etkileşimlerin önemli bir kısmından sorumluyken stigmasterolde de 1. halkada bulunan metil grubu hem PRO133 hem de HIS372 ile alkil bağı oluşturmuştur. 3. pozisyonundaki hidroksi grubu da HIS372 ve GLY375 ile polar etkileşimler yapmıştır (Şekil 4.87 B).



Şekil 4.87. Stigmasterol ile KPT 2 etkileşimleri **A)** 3 boyutlu gösterimi, **B)** 2 boyutlu gösterimi

4.6.17. Arteannuin B ile Hc β tubulin etkileşimlerinin değerlendirilmesi

Arteannuin B, artemisinin ve deoskiartemisinin aksine Hc β -tubuline daha yüksek bir bağlanma ilgisine sahip bulunmuştur (bkz. Çizelge 4.1). Hc β -tubulin ile hesaplanan ΔG değeri = -10,68 kcal/mol ve K_i = 14,93 nM iken, KPT 2'ye karşı ΔG = -9,23 kcal/mol ve K_i = 170,29 nM'dır. Arteannuin B'nin Hc β -tubulin içerisinde üç fenilalanin (PHE20, PHE200 ve PHE167), iki trionin (THR238 ve THR 237) ve tirozinden (TYR50) oluşan aromatik yan zincirli amino asitler ile çevrili bir alanda yerleşiminde bileşenin dörtlü halka yapısının ve özellikle α -metilen- γ -bütirolakton halkasının önemli bir rolü olduğu Şekil 4.88 A'da görülmektedir. Arteannuin B ile Hc β -tubulin arasında Şekil 4.88 B'de gösterilen etkileşimler içerisinde en önemlileri Arteannuin B'nin α -metilen- γ -bütirolakton halkasındaki oksijen atomları ile THR238 arasında 2,02 Å uzunluğunda ve GLN134 arasında 2,34 Å uzunluğunda olduğu görülen hidrojen bağları oluşumudur. Aynı zamanda PHE200 ile bir π -sigma bağı olduğu görülmektedir (Şekil 4.88 B).



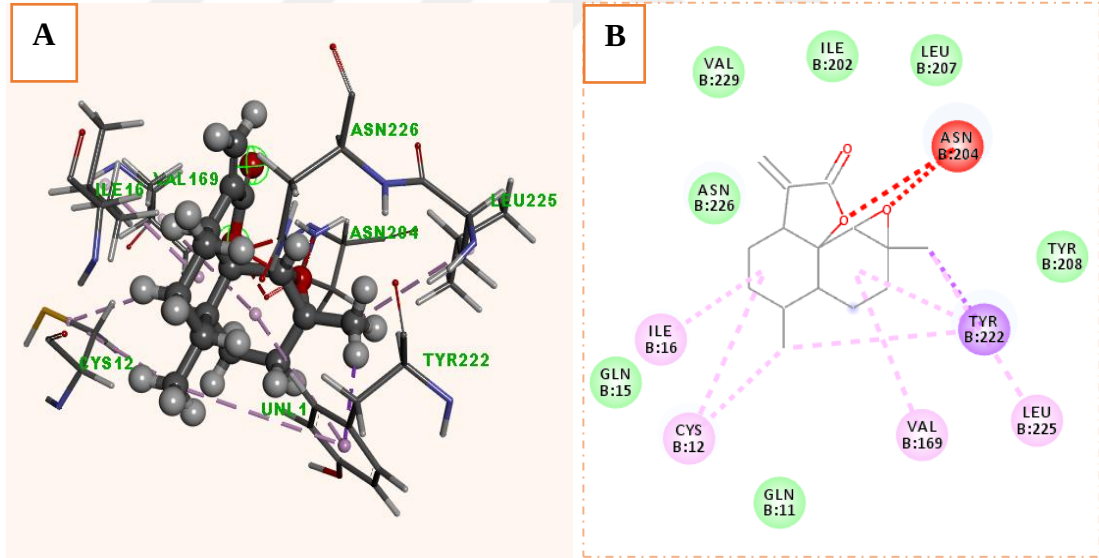
Şekil 4.88. Arteannuin B ile Hc β tubulin etkileşimleri **A)** 3 boyutlu ve **B)** 2 boyutlu gösterimi

4.6.18. Arteannuin-B ile insan β -tubulinin etkileşimlerinin değerlendirilmesi

Arteannuin-B'nin i β -tubulin ile etkileşimlerinin gösterilmesinin nedeni beta-tubulinin insanda bulunan homologu ile de olası etkileşimlerinin gösterilmesi ve böylece i β -

tubuline karşı afinitesinin oldukça düşük bulunmasının nedenlerinin etkileşim görseli vasıtasıyla karşılaştırılabilmesidir. Kenetleme deneyleri ile arteannuin-B'nin i β -tubuline karşı ΔG değeri +1,2 olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4. 89 A ve B'de arteannuin-B ile insan β -tubulin proteini (i β -tubulin) arasında olası etkileşimler gösterilmektedir. Arteannuin-B ile i β -tubulin etkileşimlerinde ilk göze çarpan ligandın dar bir alanda sıkışmış olduğudur. Resimde tirozin 222 ligandın üç farklı grubu ile aromatik etkileşimler yaparken bu etkileşimlerde tirozinin fenol halkası ile ligandın metil grupları arasında oluşan çekim kuvvetleri kadar iki sikloheksan halkası arasında meydana gelen aromatik etkileşim de rol oynamıştır. Bunun yanı sıra CYS12 rezidüsünün karboksil grubuna ait oksijen atomu ile arteannuin-B'nin hidrojen atomu arasında yakın mesafeli bir etkileşim olduğunun gösterildiği bu şekilden, ligandı çevreleyen rezidülerin bazılarının rotasyon ile liganda yer açtıkları ve bazı yan grupların dışarı doğru yönelerek olası etkileşimlerin arttırıldığı tahmin edilmektedir.



Şekil 4.89. Arteannuin-B ile insan β -tubulin proteininin olası etkileşimleri. **A)** Ligand top çubuk modeliyle, rezidüler ise ince çubuk modeliyle gösterilmektedir. **B)** Arteannuin-B ile i β -tubulin proteininin etkileşimlerinin 2D gösterimi. İtme kuvvetleri kırmızı çizgilerle, pi-alkil bağları pembe kesikli çizgilerle ve pi-sigma bağı mor kesikli çizgilerle temsil edilmektedir

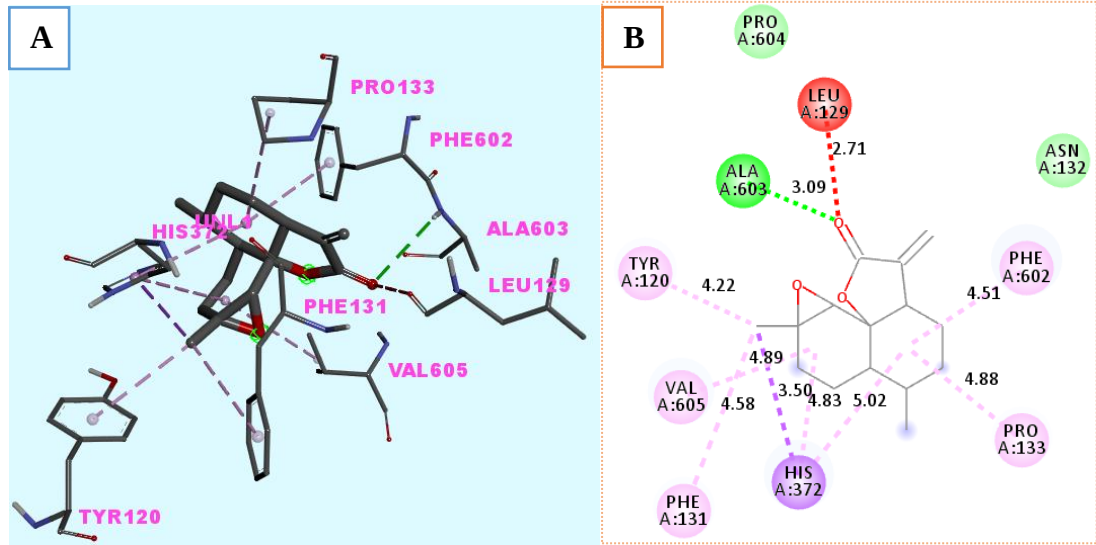
Şekil 4.89 B'de gösterilen rezidülerden VAL229, ILE203, LEU207, ASN226, GLN15, GLN11 ve TYR208 van der Waals kuvvetleri ile arteannuin-B'yi çekerken, ASN204

rezidüsü ise ligandı itmektedir. Ayrıca van der Waals etkileşimi yaptığı rezidü sayısı da oldukça sınırlıdır. ILE16, CYS12, VAL169 ve LEU225 rezidüleri ligandın sikloheksan halkaları ve metil grupları ile π -alkil bağları meydana getirmiştir. TYR222 ise arteannuin-B'nin 3 farklı grubu ile 3 π -alkil bağı yanı sıra pi-sigma bağı da oluşturmuştur.

Şekil 4.89 B'de gösterilen etkileşimlerin azlığı enerjinin düşürülememesinde önemli bir faktör olarak değerlendirilirken, ASN204 ile meydana geldiği tahmin edilen itme kuvveti de ligandın bağlanma bölgesine uyumunu engelleyen en önemli bir diğer unsur olarak göze çarpmaktadır. Etkileşim görselinde en ilginç nokta ise bağlanma bölgesinde yer aldığı bilinen en önemli üç amino asitten 167., 198, ve 200. amino asitlerin hiç biri ile ligandın etkileşim yapmamış olmasıdır. 169. ve 202. rezidüler ile ise uzak mesafeden bile olsa etkileşmektedir. Ligandın protein içindeki konumu doğru görünmekle beraber i β -tubuline bağlanamadığını kanıtlayan ΔG değeri (+1,2 kcal/mol), arteannuin-B'nin β -tubulin inhibisyonu açısından uygun bir ilaç adayı olduğunu göstermektedir çünkü Hc β -tubulin için serbest bağlanma enerjisi -10,68 kcal/mol olarak hesaplanmıştır (bkz. Çizelge 4.1).

4.6.19. Arteannuin-B ile KPT 2 enzimi etkileşimleri

Arteannuin B ile KPT 2 enzimi aktif bölgesindeki etkileşimler ise daha da ilgi çekicidir (Şekil 4.90 A ve B). LEU329 rezidüsünde karboksiliasitte yer alan oksijen ile bileşenin α -metilen- γ -bütirolakton halkasında 3. pozisyonundaki oksijen atomu arasındaki itme kuvvetine rağmen lösinin hemen yanında yer alan ALA603 ile yaklaşık 3,09 Å'luk bir konvensiyonel hidrojen bağı oluşumu Şekil 4.90 B'de görülmektedir. Ancak bu mesafe gerçek bir hidrojen bağı oluşumu için fazlasıyla geniştir ve bu nedenle bu etkileşim polar etkileşimlerden biri olarak değerlendirilebilir. Molekülün TYR120, PHE131, PHE602, PRO133 ve HIS372 ile aromatik etkileşimler yapması elektrostatik çekim kuvvetinin artmasını ve dolayısıyla aktif bölgedeki serbest bağlanma enerjisinin azalmasını sağlamıştır.



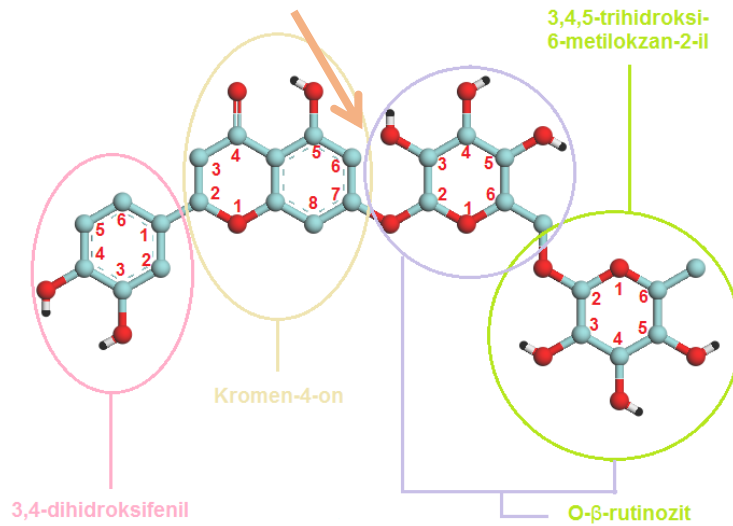
Şekil 4.90. Arteannuin B ile KPT 2 etkileşimleri **A)** 3 boyutlu gösterimi **B)** 2 boyutlu gösterimi

SwissADME web sunucu, friedelin ve stigmasterolün ADME özelliklerinin tahmin edilmesi için kullanılmıştır. Friedelin ve stigmasterolün her ikisinin de kan beyin bariyerini geçemediği anlaşılmıştır. SwissADME sonuçlarına göre ABZ de kan beyin bariyerini geçememektedir, ancak GI absorpsiyonu yüksektir. Friedelin ve stigmasterolün ise GI absorpsiyonları düşüktür. Oral biyoygunluk açısından karşılaştırılacak olursa, friedelin ve stigmasterol molekülleri Lipinski ve Veber'in kurallarına göre ağızdan alınmak için uygun bulunurken; Ghose, Egan ve Muegge kurallarına göre uygun değildir. ABZ ise oral biyoygunluk açısından tümü için uygundur.

4.6.20. Pseudoeriositrin ve rat karnitin palmitoil transferaz 2 arasındaki olası etkileşimlerin değerlendirilmesi

Eriositrin ((2S)-2-(3,4-dihidroksifenil)-5-hidroksi-7-{[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-({[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroksi-6-metilokzan-2-il]oksi]metil]okzan-2-il]oksi-kromen-4-on) daha çok limon kabuğu ve turunçgil posasında bulunan bir eriodiktyol türevi flavanon bileşenidir. Eriodiktyola 7. pozisyonda O-β-rutinozit eklenmesiyle oluşmuştur. Yaptığı etkileşimlerin daha rahat anlaşılabilmesi için eriositrinin moleküler yapısı aşağıda detaylı şekilde

gösterilmektedir (Şekil 4.91). Pseudoeriositrin ise FooDB (<https://foodb.ca/>) veritabanından indirilen eriositrin molekülüdür ki bu molekülün gerçek bir eriositrin olmadığı çünkü pdb dosyasındaki z koordinatlarının sıfır olduğu ve buna ilaveten pdbqt dosyasında bir hidrojen donorünün eksik olduğu sonradan anlaşılmıştır. Dockingler bittikten sonra etkileşimlerin incelenmesi sırasında fazladan bir bağ oluşumu fark edilmiş ve üçüncü kez dockingler yapıldıktan sonra AutoDock programının yazarı Dr. Stefano Forli ile görüşülmüştür. Bu eriositrin molekülünün veritabanında hatalı formatta bulunduğu ve programın da bazen bunu görselleştirip bazen görselleştirmedeği öğrenilmiştir. Bu çalışmada pseudoeriositrin olarak adlandırılan bu molekülün olağanüstü yüksek skor değerleri ile yaptığı etkileşimler yapı-aktivite ilişkisine dair önemli bilgiler verebileceği göz önüne alınarak aşağıda verilmiştir.

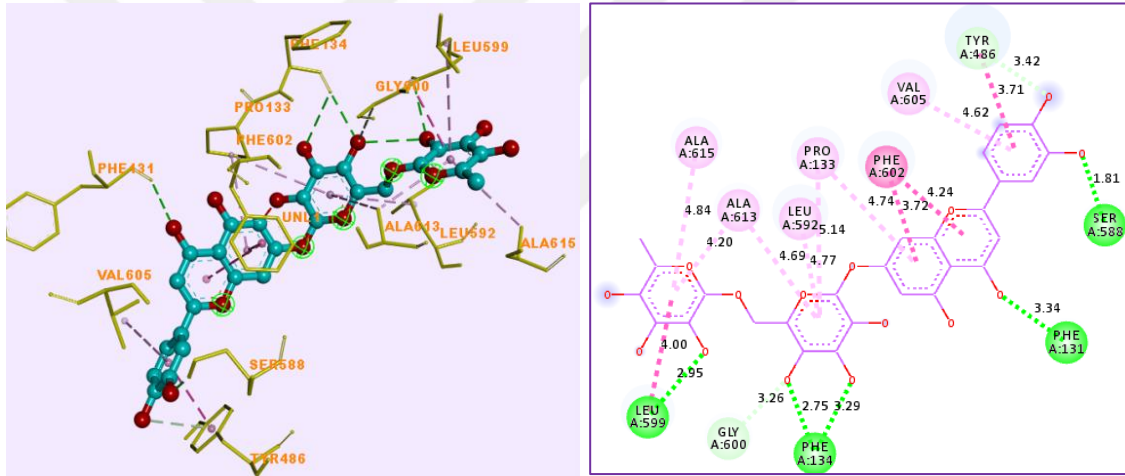


Şekil 4.91. Eriositrini meydana getiren halkalar (Orijinal). Pseudoeriositrin oluşmasına neden olan bağ kromen4-on halkasının 6. pozisyonu ile O-β-rutinozitin kromene bağlı monosakkariti üzerinde 3. pozisyonundaki hidroksil grubunun oksijen atomu arasında oluşacaktır (karbon ile oksijen arasında oluşacak bağın yeri okla gösterilmektedir)

Bu çalışmadaki en ilginç sonuçlardan biri pseudoeriositrinin rat KPT 2'ye (2H4T) karşı inhibisyon sabitinin 15,83 femtomolar bulunmuş olmasıdır. Bu sonuç pseudoeriositrinin çok başarılı bir KPT 2 inhibitörü olabileceğini göstermektedir. Eriositrinin gastrointestinal sistemden emilimi zayıf olmasına rağmen pseudoeriositrinin gastroabsorbsiyonunun yüksek olacağı SWISSADME web sunucu ile tahmin edilmiştir.

Ne var ki pseudoeriositrinin bu özellikleri ancak *de novo* bir ilaç adayı molekül tasarlanmasında faydalanılabilecek bilgi vermede kullanılabilir, gerçekte bu moleküle veritabanlarında erişilememiştir.

Pseudoeriositrinin 2H4T pdb kodlu rat KPT 2 enzimi içindeki olası etkileşimleri incelendiğinde Şekil 4.92 A'da gösterilen çok sayıda rezidü ile etkileşim görülmektedir. Bunların büyük bir kısmı apolar amino asitler olmakla beraber serinil ve tirozinil gibi rezidülerin de pseudoeriositrine oldukça yakın bir konumda bulundukları ve TYR486'nın aromatik etkileşimler meydana getirdiği görülmektedir. Ayrıca PHE131 ve PHE134 gibi siklik yan zincirli rezidülerin aromatik etkileşimlerden ziyade hidrojen bağı oluşumuna katkıda bulundukları da Şekil 4.92 B'de gösterilmektedir.

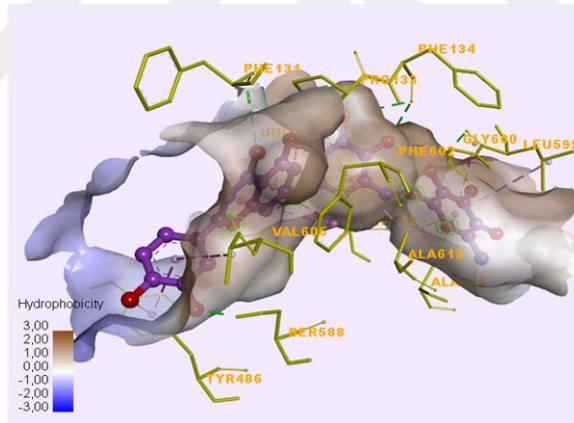


Şekil 4.92. Pseudoeriositrin ile rat KPT 2 enzimi arasındaki etkileşimler. **A)** Pseudoeriositrinin karbon atomları mavi, oksijen atomları kırmızı, etkileştiği rezidüler sarı çubuk modeliyle gösterilmektedir. **B)** Pseudoeriositrin ile rat KPT 2 enziminin etkileşimlerinin 2D gösterimi (AutoDock4.2 programı hatalı moleküldeki anormal bağ oluşumunu dlg dosyası koordinat ekseninde göstermediği için şekilde görülmemektedir)

Pseudoeriositrinin etkileşimlerinde en önemli faktörlerden biri ligandın her halkasında bulunan oksijen atomları ile oluşturulan kimyasal çekim kuvvetleridir. Şekil 4.92 B'de gösterildiği gibi LEU599, GLY600, PHE134, PHE131, SER588 ve TYR486 rezidüleri ligand üzerindeki hidroksil gruplarının oksijeni ile hidrojen bağları oluşturmuştur. Bunlardan PHE134 ligandın oksijen atomları ile biri 2,75 Å diğeri 3,29 Å mesafede iki hidrojen bağı ve SER588 ise 1.81 Å mesafede konvansiyonel bir hidrojen bağı meydana

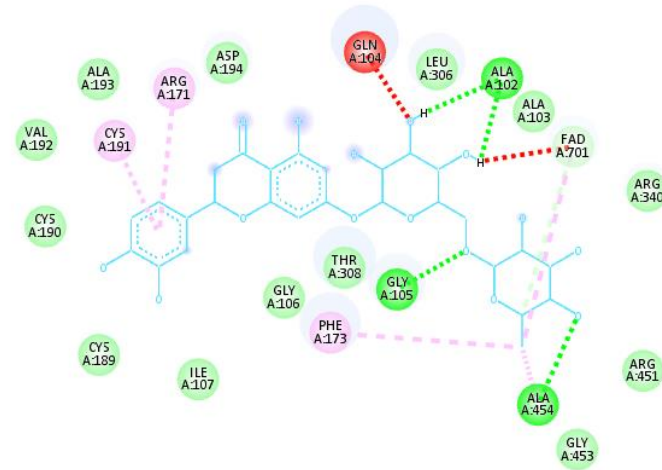
getirmiştir. PHE602 ise ligandın merkezindeki iki halkadan biri ile aromatik etkileşim diğeri ile amid-pi etkileşimi yapmıştır. PRO ve ALA rezidüleri de ligandın iki farklı halkası ile pi-alkil etkileşimleri yapmıştır. Ligandın tüm halkaları en az bir pi-alkil etkileşimi altındadır.

Pseudoeriositrin etrafındaki rezidülerin oluşturduğu alanın hidrofobiklik özelliği ligandın etkileşimlerini doğrudan etkilediği için sonuçlar açısından önemlidir. Aşağıdaki Şekil 4.93'te hidrofobik ve hidrofilik alanlar gösterilmektedir. Ligandın bir yönünü çevreleyen apolar rezidülerden alanin, valin, glisin, fenilalanin ve lösin gibi amino asitlerin yan zincirlerinin yol açtığı hidrofobik yüzey alanının ilerisinde bazı polar rezidülerin bulunması, bu kısımların hidrofilik karakter göstermesine neden olmuştur. Şekil 4.93'te mavi ile gösterilen yüzeyler en hidrofilik bölgeleri temsil ederken, kahverengi yüzeyler ise hidrofobik alanları göstermektedir. Tirozinil ve serinil rezidülerinin bulunduğu uç kısımdaki hidrofilik alan göze çarpmaktadır.

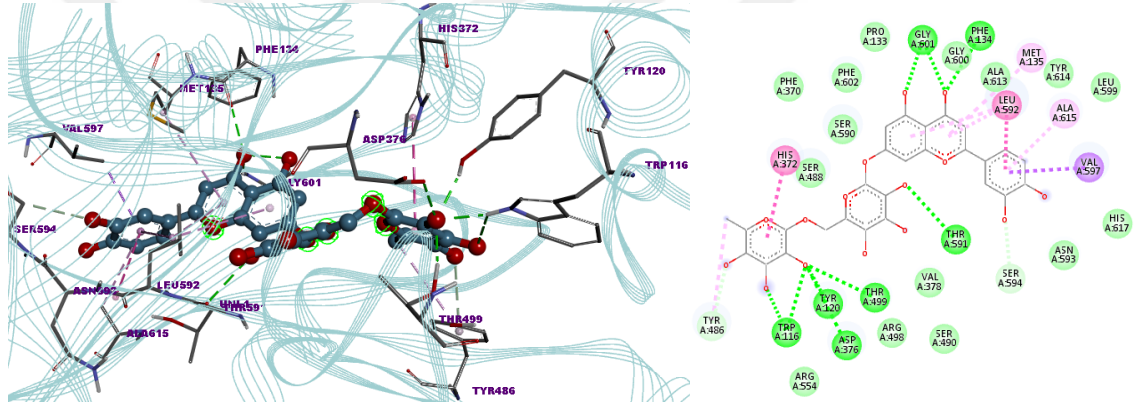


Şekil 4.93. Rat KPT 2 enziminin bağlanma bölgesinde pseudoeriositrin etrafındaki yüzeyin hidrofobikliğinin gösterilmesi

Etkileşimlerin karşılaştırılabilmesi amacıyla Şekil 4.94'te gerçek eriositrinin rat KPT 2 (2FW3) enzimi içindeki konumu ve bağlandığı rezidüler gösterilmektedir. Şekil 4.95 A ve B'de ise pseudoeriositrinin aynı enzim içindeki farklı durumu gösterilmektedir.



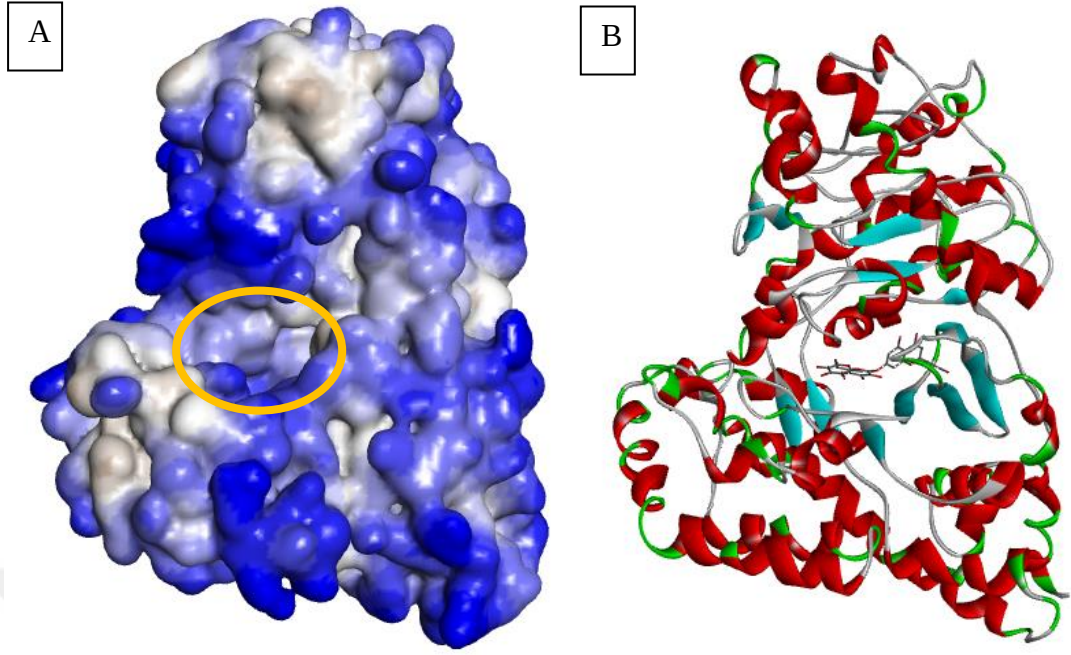
Şekil 4.94. Gerçek eriositrinin rat KPT 2 enzimi (2FW3) içindeki yerleşimi



Şekil 4.95. Pseudoeriositrin ve KPT 2 enziminin (PDB kodu: 2FW3) etkileşimleri. **A)** 3D gösterimi, **B)** 2D gösterimi

Pseudoeriositrinin KPT 2 enzimi (2FW3) içindeki yerleşiminin daha iyi görülebilmesi için hazırlanan video, tezin arka cebindeki CD’de Ek-1 başlığı ile verilmiştir.

KPT 2 enziminin yüzey alanını ve ligandın muhtemel giriş bölgesini gösteren Şekil 4.96 A’da turuncu çember içine alınan oyuk kısım enzimin bağlanma bölgesi için giriş kavitesi olarak tahmin edilmiş ve ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Şekil 4.96 B’de ise pseudoeriositrin enzim içinde bağlandığı noktada karşılaştırma amacıyla gösterilmektedir.



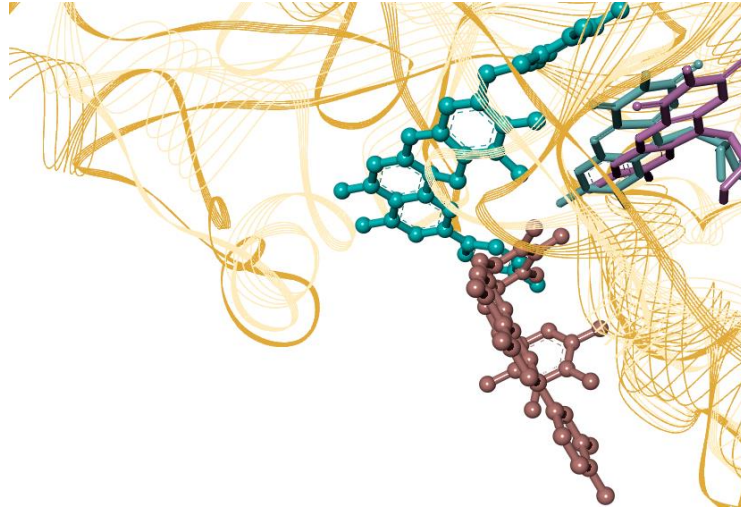
Şekil 4.96. KPT 2 enzimi (2FW3). **A)** Enzimin yüzeyinin gösteriminde turuncu daire içindeki kavite pseudoeriositrinin enzime giriş boşluğu olarak tahmin edilmiştir. Şekilde mavi bölgeler hidrofilik alanları kahverengi bölgeler ise hidrofobik alanları temsil etmektedir. **B)** A'daki şeklin yüzey alanı olmaksızın gösterilen bu halinde pseudoeriositrin merkezde, en düşük enerji ile konumlandığı bölgede çubuk modelinde görülmektedir

4.6.21. Pseudoeriositrin ile AsFR ve iFR arasındaki olası etkileşimlerin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması

Pseudoeriositrin AsFr'ye 512 pM K_i değeriyle bağlandığı için, bu enzim için de çok başarılı bir inhibisyon göstermiştir. Pseudoeriositrinin AsFR ve iFR enzimleri içindeki konumu Şekil 4.97 ve Şekil 4.98'de gösterilmektedir. Şekillere dikkatle bakılacak olursa pseudoeriositrin yapısına sebep olan anormal bağ oluşumu ile meydana gelen iki oksijenli siklik yapı (molekülün tam ortasındaki halka) görülmektedir. Pseudoeriositrinin iFr içindeki yerleşimi ve etkileşimlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için hazırlanan kısa video Ek-2'de verilmiştir.

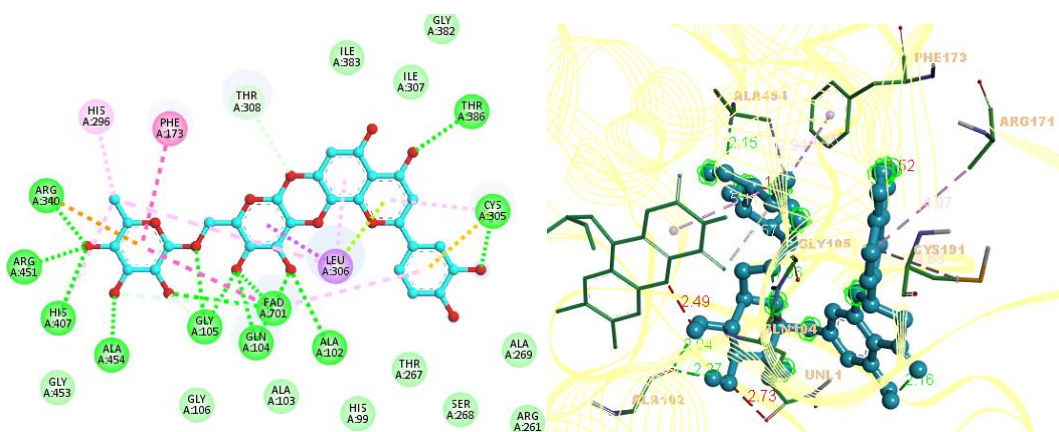


Şekil 4.97. Pseudoeriositrin, 6VAX ve 4YSX. Her iki farklı proteindeki yerleşimlerinin karşılaştırılabilmesi için pseudoeriositrin molekülleri AsFR (PDB kodu: 4YSX) ve iFR (PDB kodu: 6VAX) enzimleri içindeki konumlanmalarında gösterilmektedir. AsFR kiremit turuncusu şerit kurdale ve AsFR'a ait FAD lila renk çubuk modeliyle, iFR krem rengi şerit kurdale ve iFR'a ait FAD koyu yeşil çubuk modeliyle, AsFR'a kenetlenen pseudoeriositrin fuşya top-çubuk ve iFR'a kenetlenen pseudoeriositrin ise turkuaz top-çubuk modeliyle temsil edilmektedir



Şekil 4.98. Pseudoeriositrinler, iFR ve AsFR içindeki konumlanmalarında, FAD'lar mor ve mavi renklerde çubuk modeliyle, isolloksazin halkası pseudoeriositrinlere oldukça yakın, yavruağzı top çubuk modeliyle verilen pseudoeriositrin AsFR içindeki, turkuaz top çubuk modeliyle temsil edilen pseudoeriositrin ise iFR içindeki en düşük enerji seviyesinde bulundukları kenetlenme noktalarında gösterilmektedir

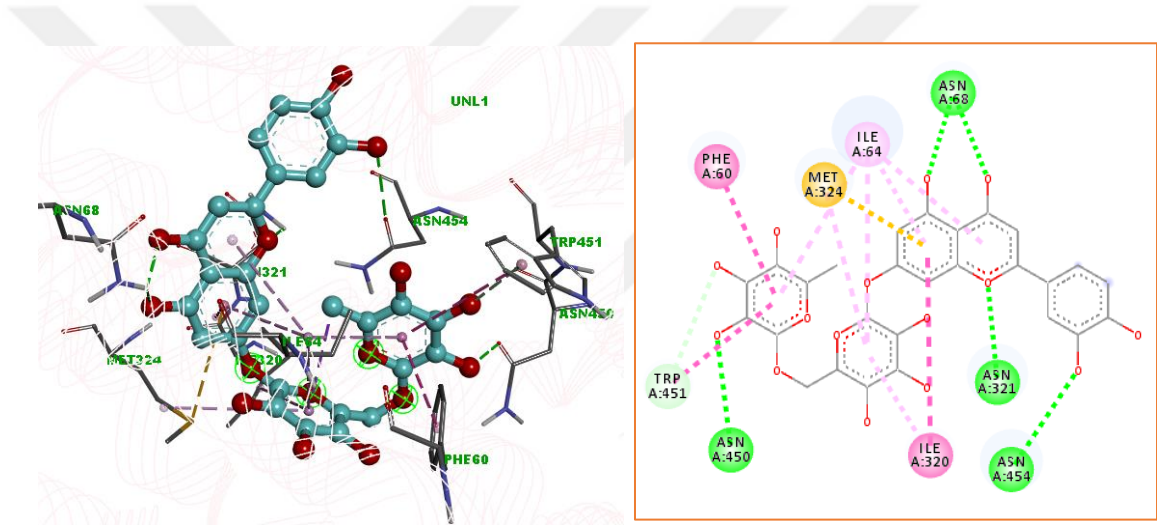
Etkileşimlerin karşılaştırılabilmesi için pseudoerisitrinin iFR içindeki etkileşimleri Şekil 4.100 A ve B’de gösterilmektedir. 6VAX ile çok iyi bir inhibisyona sahip olduğu için on iki hidrojen bağı oluşumu tahmin edilmiştir.



268

4.6.22. Pseudoeriositrin ile CeGLUT1 arasındaki olası etkileşimlerin değerlendirilmesi

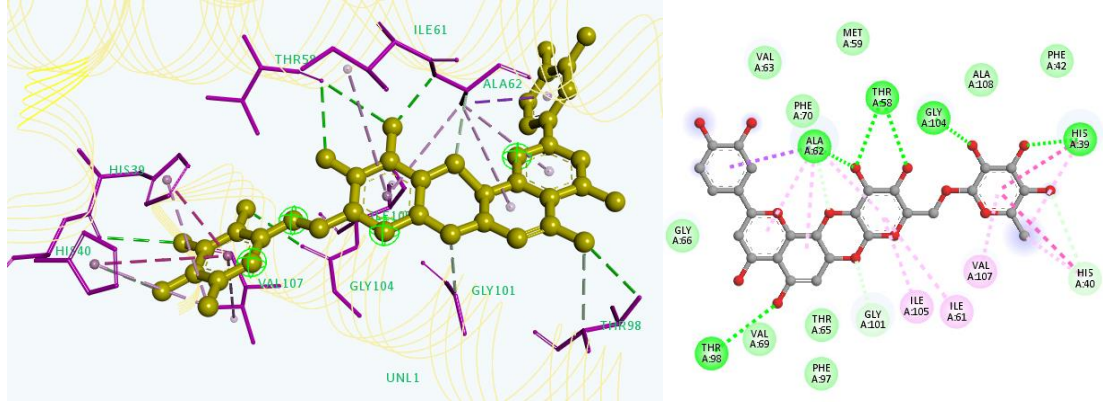
Kenetleme simülasyonlarının sonucunda son derece iyi bir bağlanma ilgisine sahip olduğu anlaşılan pseudoeriositrinin CeGLUT1 içindeki konumu ve etkileştiği rezidüler Şekil 4.101 A ve B’de gösterilmiştir. CeGLUT1 yapısı homoloji modelleme ile tahmin edilmiş olmasına rağmen pseudoeriositrin için bulunan ΔG değeri -17,18 kcal/mol olduğu için, söz konusu etkileşimlerin daha detaylı olarak gösterilebilmesi amacıyla Ek-3’teki video hazırlanmıştır. Bu videoda pseudoeriositrin mor renk top çubuk modeli ile, protein pembe şerit kurdale ve rezidüler ince çubuk modeliyle gösterilmektedir.



Şekil 4.101. Pseudoeriositrin ile CeGLUT1 etkileşimleri. **A)** 3D gösteriminde pseudoeriositrin turkuaz top çubuk modeliyle, etkileştiği rezidüler ince çubuk modeliyle, protein ise pudra pembe şerit kurdale modeliyle temsil edilmektedir. **B)** Pseudoeriositrin ve CeGLUT1 etkileşimlerinin 2D gösterimi (program gerçek pseudoeriositrini göstermemektedir, şekildeki ligand gerçek eriositrin gibi görünmektedir)

4.6.23. Pseudoeriositrin ve SoCOX1 etkileşimleri

Pseudoeriositrinin kromen halkası ile rutinozit yapısı arasında ekstra bir bağ oluşumu ile meydana gelen halka yapısı, pseudoeriositrine Şekil 4.102 A ve B’de görülen etkileşimler için olanak tanımıştır. SoCOX1 ile etkileşimlerinin daha rahat incelenebilmesi için Ek-4’teki kısa video izlenebilir.



Şekil 4.102. Pseudoeriositrin ve SoCOX1 olası etkileşimleri. **A)** Pseudoeriositrin sarı top-çubuk, etkileştiği rezidüler mor ince çubuk, etkileşimler kesikli çizgiler, proteinin sekonder yapısı ise krem rengi şerit kurdale modeliyle temsil edilmektedir. **B)** 2D temsilinde anormal yapıyla pseudoeriositrin net şekilde görülmektedir

Şekil 4.102 A’da görüldüğü gibi ligandın halkalarının meydana getirdiği L şeklindeki yapı ALA62 tarafından kuvvetli şekilde çekilmektedir. Ayrıca ligandın diğer ucundaki rutinozit grubunun ramnosil halkası HIS39 ve HIS40 rezidülerinin siklik yan grupları tarafından aromatik etkileşimleri ile çekilmekte, diğer bir α -heliks üzerindeki VAL107 ise aynı gruba zıt yönden çekim uygulamakta böylece ligand bulunduğu konuma çok iyi bir şekilde uyum sağlamaktadır. Şekil 4.102 B’de gösterilen kimyasal etkileşimler içinde en önemlileri HIS39 ve GLY104 rezidülerinin ligandın oksijen atomları ile meydana getirdiği hidrojen bağlarıdır. Bunun yanı sıra ALA62 ligandın farklı noktaları ile altı etkileşim meydana getirmiştir. Bu etkileşimlerden şekilde kesik çizgilerle gösterilenler renklerine göre sınıflandırılacak olursa mor renk olan pi-sigma bağı, koyu yeşil kısa mesafeli çizgilerle gösterilen hidrojen bağı, pembe çizgiler pi-alkil bağı ve açık yeşil uzun mesafeli olan çizgiler ise polar etkileşimleri temsil etmektedir.

4.6.24. Pseudoeriositrinin tüm proteinlerle kenetleme sonuçları

Pseudoeriositrinin kenetleme deneyleri diğer moleküllerden farklı olarak üç kez yapılmıştır. Bunun sebebi molekülde optimizasyon prosedüründen kaynaklandığı tahmin edilen bir yapı değişikliğinin görülmüş olmasıdır. Gerçek sebebin ise ligandın alındığı FoodDB veritabanında hatalı moleküllerin bulunması olduğu sonradan anlaşılmıştır. Pseudoeriositrinin sahip olduğu değişik moleküler yapıda, ilave bir bağ

oluşumu molekülün çok iyi bir skor değerine sahip olmasını sağlamıştır. Çizelge 4.8’de pseudoeriositrinin kenetleme sonuçları gösterilmektedir.

Çizelge 4.8. Pseudoeriositrinin kenetleme sonuçları

	1OJ0	2H4T	4YSX	6VAX	SoCO X1	SoCO X2	6E7C	Ev Tub 1	CeGlut 1	2FW3
Erio- sitrin	+15,6	-8,43	-6,62	-12,87	-5,92	-3,92	+72,30	+10 4,9	-6,61	-9,72
PE	-3,21	-18,83	-13,84	-12,30		-8,70	+169,7	+11 8,6	-8,62	-12,17
PE	+3,67	-18,09	-12,67	-18,45	-16,93	-11,22	+49,1	+52 ,5	-17,18	-19,73

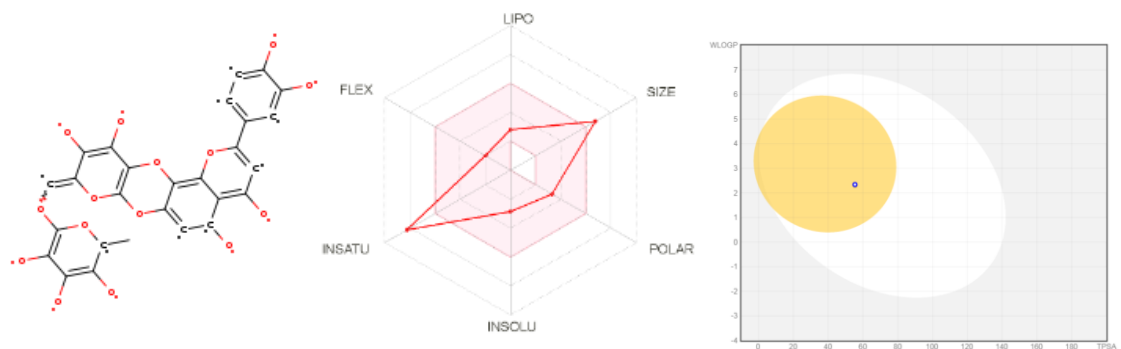
ΔG değerleri (kcal/mol)

Çizelge 4.8. Pseudoeriositrinin kenetleme sonuçları (devam)

	1OJ0	2H4T	4YSX	6VAX	SoCO X1	SoCO X2	6E7C	Ev Tub 1	CeGlut 1	2FW3
Erio- sitrin	-	663,49 nM	14,13 uM	370,31 pM	45,64 uM	1,34 mM	-	-	14,24 uM	75,23 nM
PE	2270 uM	15,83 fM	71,76 pM	971,51 pM		417,7 nM	-	-	479,82 nM	1,19 nM
PE	-	55,00 fM	512 pM	29,86 fM	389,40 fM	59,4 nM	-	-	257,26 fM	3,45 fM

K_i değerleri. (Çizelgedeki PE: Pseudoeriositrin, fM: femtomolar)

Şekil 4.103 A ve B’de bu molekülün SwissADME sonuçları verilmektedir.

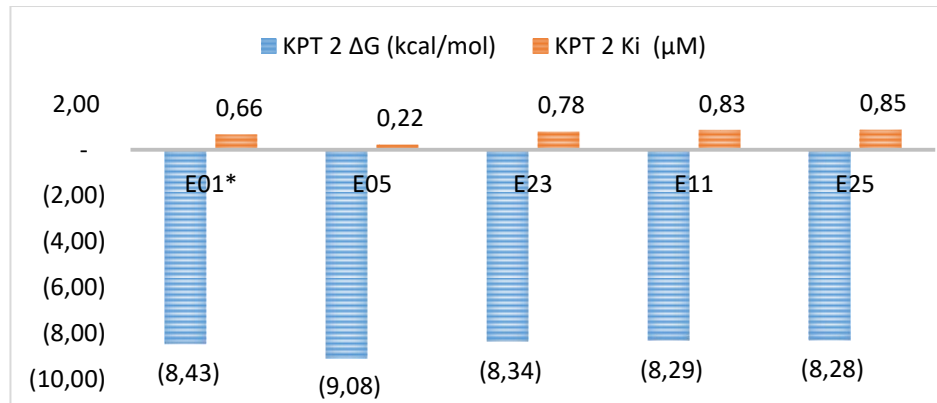


Şekil 4.103. Pseudoeriositrinin SWISSADME sonucu. **A)** Pseudoeriositrinin moleküler yapısı, **B)** Radar grafiği, **C)** Kan beyin bariyerini geçme özelliği

İlginç şekilde bu molekül kan beyin bariyerini geçebilmekte, gastrointestinal sistemde çok iyi şekilde absorbe edilmekte ve eriositrinin inhibe etmediği bazı sitokrom enzimlerine de bağlanabilmektedir. Bu özelliklerinin gösterildiği SWISSADME sunucusundan alınan çıktının orijinal hali Ek-5'te verilmiştir. Ne var ki ZincDatabase'de araştırılan bu molekül veritabanında mevcut değildir. Pseudoeriositrinle ilgili etkileşimler, oldukça elverişli bağlanma enerjilerine istinaden yeni bir antihelmintik keşfinde kullanılabilmesi amacıyla verilmiştir.

4.7. Türev Moleküllerin Kenetleme Simülasyonlarının Sonuçları

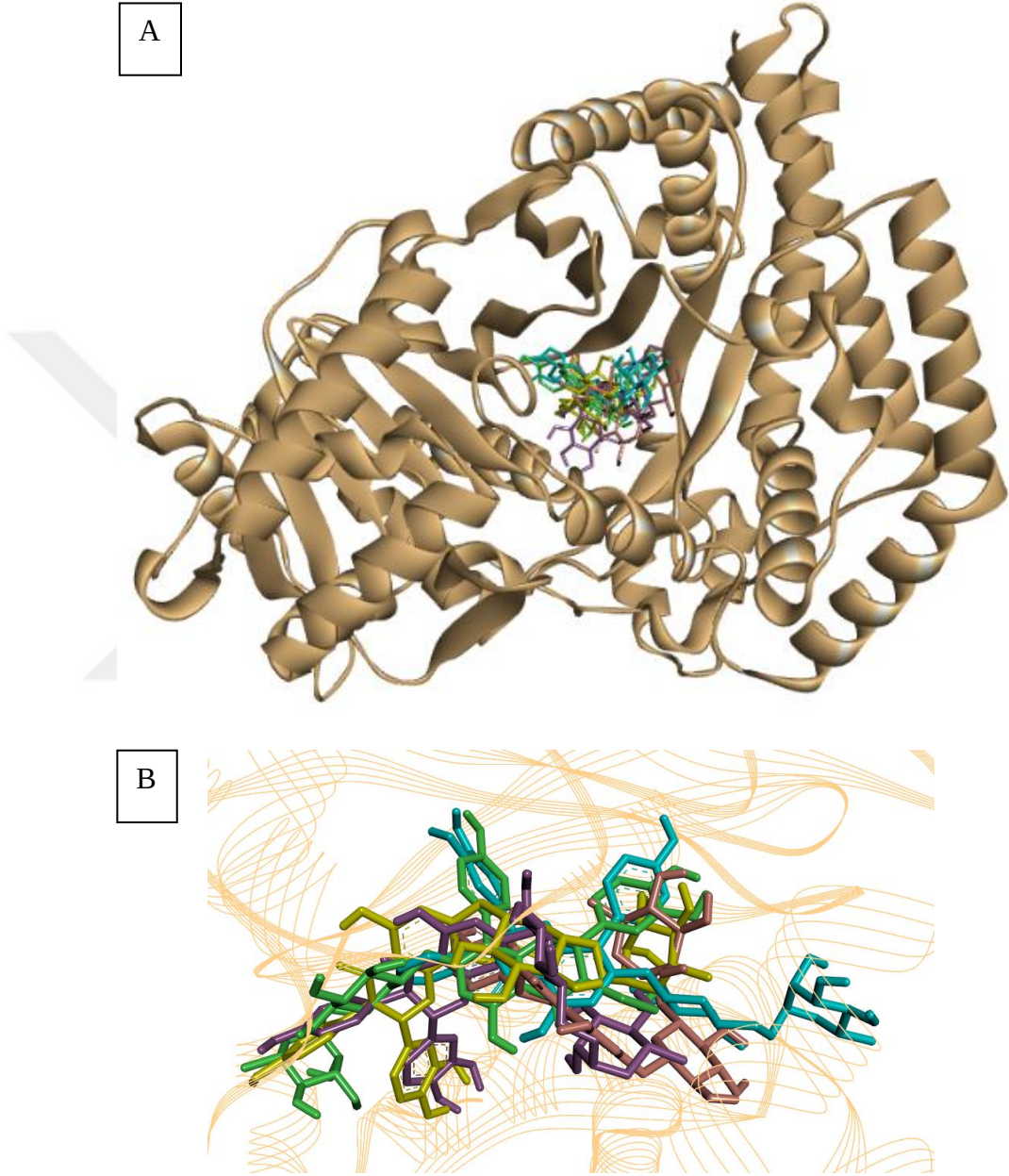
Bu çalışmada eriositrin tabanlı 24 türev molekül çizilerek, KPT 2 enzimine karşı bağlanma yetenekleri eriositrin ile karşılaştırılmıştır. Bu türevler içerisinde en iyi sonuca sahip ilk dört molekülün K_i değerleri Şekil 4.104'te gösterilmiştir. Grafiğe göre bu moleküller E05, E23, E11 ve E25'tir. Bu türevlerin 3. ve 8. pozisyonlarında taşıdıkları gruplar sırasıyla şöyledir; E05: fenol ve hidrojen, E11: hidrojen ve propilsülfanil, E23: propilsülfanil ve fenol, E25: fenol ve fenol. Bu moleküllerin 3 boyutlu ve 2 boyutlu yapıları Materyal ve Metod kısmında verilmiştir (bkz. Çizelge 3.2).



Şekil 4.104. Kenetleme sonucu en iyi skor değerlerine sahip ilk dört ligand ve eriositrinin KPT 2 için K_i ve ΔG değerleri

Şekil 4.105 A'da 5 ligandın (4 türev ve eriositrin) KPT 2 içinde olası yerleşim bölgeleri gösterilmektedir. Yaklaşık $24 \times 24 \times 24 \text{ Å}^3$ 'lük bir hacim içinde moleküllerin çoğunlukla üst üste geldikleri görülmekte, ligandların rotasyonel bağlarından kaynaklanan esneklik

ise şekilde görülen farklı konformasyonlara neden olmaktadır. 3. ve 8. pozisyonlardaki farklı gruplar da molekülün proteinin aktif bölgesi içerisindeki yerleşiminde görülen değişimlerde önemli yere sahiptir (Şekil 4.105 A ve B).



Şekil 4.105. En iyi bağlanma ilgisine sahip dört türev molekülün (E05, E11, E23, E25) ve eriositrinin (E01) KPT 2 içinde yerleşimleri. **A)** E01 pembe, E05 mor, E11 sarı, E23 yeşil ve E25 turkuaz renkte, protein ise turuncu katı kurdale biçiminde tam boy gösterilmekte. **B)** Dört türev molekülün ve eriositrinin yerleştikleri bölgede görünümlerinin büyütülmüş hali. KPT 2 turuncu çizgilerle sekonder yapıda gösterilmektedir

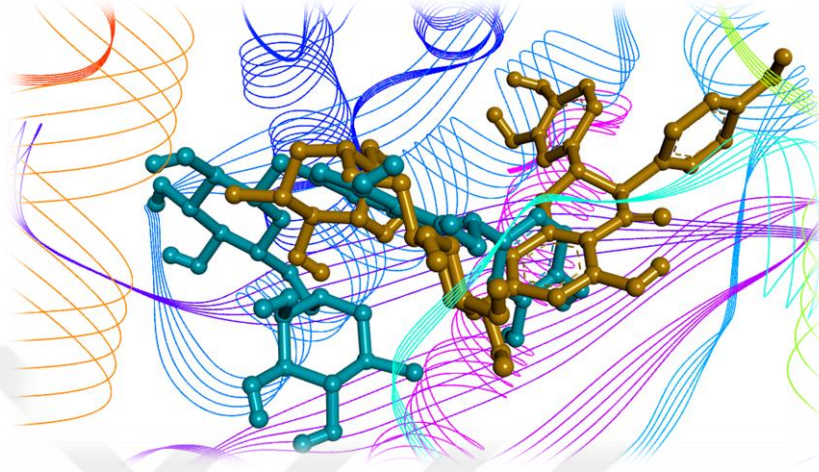
Şekil 4.105 B’de neredeyse çakışık denilebilecek kadar birbirine yakın konumlanan dört türevden en farklı şekilde konumlanan türev turkuaz ile gösterilen E25’tir. E25 3. ve 8. pozisyonda fenol taşımaktadır. K_i değerleri verilen ligandlardan en iyi değere sahip olan türev ise E05’tir (bkz. Şekil 4.104).

E05’in KPT 2 ile yaptığı etkileşimler Şekil 4.106 A ve B’de detaylı şekilde gösterilmektedir. Şekil 4.106A’daki 3 boyutlu gösteriminde E05 sarı top ve çubuk yapıda, çevresindeki rezidüler ince çubuk yapıda, etkileşimler kesikli çizgilerle, hidrojen alıcı ve verici atomlar etrafları yeşil halelerle ve liganda en yakında bulunan beta konformasyonel protein bölgeleri lila renk sekonder yapılar ile temsil edilmektedir. Etkileşimde bulunan atomlar arası mesafeler Å cinsinden ve en yakın olanlar kırmızı, 1,85-4 Å arasındakiler yeşil ve 4 Å’dan büyük olanlar pembe yazı renklerinde görülmektedir. Şekil 4.106B’deki 2 boyutlu gösteriminde kırmızı kesikli çizgiler itme kuvvetlerini ve yeşil kesikli çizgiler konvansiyonel hidrojen bağlarını, mor kesikli çizgiler π -sigma bağlarını, pembe kesikli çizgiler π -alkil bağlarını temsil etmektedir

Gly375 rezidüsünün oksijen atomu ile ligandın H70 atomu arasında 1,86 Å mesafede (yeşil ile gösterilen) konvansiyonel hidrojen bağı oluşmuştur ve aynı oksijen ile ligandın H71 atomu arasında 1,6 Å mesafede (kırmızı ile gösterilen) bir itme kuvveti tahmin edilmiştir (Şekil 4.106 A). Ser488 ile ligandın kromen halkasında 2. pozisyonda yer alan dihidroksi fenil halkasının 3-hidroksi grubundaki hidrojen arasında 1,45 Å mesafede konvansiyonel hidrojen bağı meydana gelmiştir (Şekil 4.106 B).

Şekil 4.106 C’de eriositrinin KPT 2 enzimi içindeki etkileşimlerinde altı farklı rezidü ile hidrojen bağı oluşturduğu görülmektedir. Bu rezidüler TRP 116, ASP 376, SER 590, TYR 486, ASN 130 ve TYR 120’dır. Ne var ki ASN 585 ile eriositrinin glikozit yapısı üzerindeki iki hidroksil grubu arasında 2,63 Å mesafede istenmeyen bir donör-donör itme kuvveti olabileceği tahmin edilmiştir (Şekil 4.106 D). Bu durum enerjinin biraz daha düşmesine engel olmuş olabilir. E05’in böyle bir itme kuvvetine maruz kalmıyor olması, onun daha iyi bir skor değeri göstermesine imkân vermiştir. Şekil 4.106 C’deki 3D gösteriminde eriositrin merkezde top-çubuk modeliyle ve etkileştiği rezidüler ise

E05'in bu ilmek yapısı üzerinde etkileştiği iki rezidünün LEU 381 ve LEU 592 olduğu ve bu amino asitler ile pi-alkil etkileşimleri yaptığı görülmektedir (bkz. Şekil 4.106 A ve B).



Şekil 4.107. Gökkuşağı renklerinde şerit kurdale ile temsil edilen KPT 2 enziminin bağlanma bölgesinde iki ligand. Top-çubuk modelindeki turuncu renk ligand E05, turkuaz ligand ise eriositrin

Çizelge 4.9'da 24 türev molekülün AutoDock4.2 kullanılarak hesaplanan serbest bağlanma enerjileri ve K_i değerleri verilmiştir. Tablodaki değerler denenen türevlerin on ikisinin (%50) -7 kcal/mol'den büyük ΔG değerlerine sahip olduğunu göstermektedir. Bu türevler içerisinde KPT 2 ile en düşük bağlanma ilgisine sahip olan türev E12'dir. E12, 3. pozisyonda asetat ve 8. pozisyonda propilsülfanil taşımaktadır ve bu durum afiniteyi azaltmaktadır. Tablodaki türevlerin kenetleme sonuçları genel olarak mikromolar düzeyde K_i değerleri göstermektedir. En iyi ve en kötü sonuçlara sahip türevlerin serbest bağlanma enerjileri arasındaki fark -3,8 kcal/mol'dür.

Çizelge 4.9. Türev moleküllerin kenetleme sonuçları

Türev molekül	R1	R2	KPT 2 ΔG (kcal/mol)	KPT 2 K_i (μM)
E01*	H	H	-8,43	0,66349
E02	CH ₃ COO-	H	-6,83	9,85
E03	C ₃ H ₇ S-	H	-7,29	4,55

Çizelge 4.9. Türev moleküllerin kenetleme sonuçları (devam)

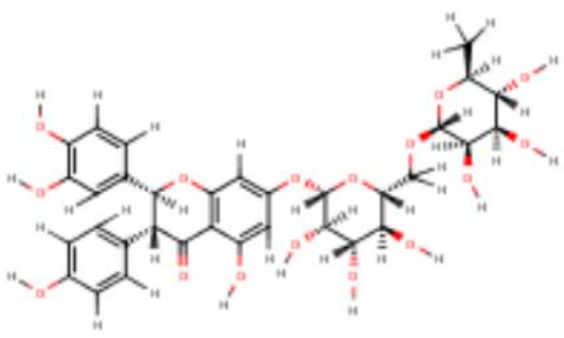
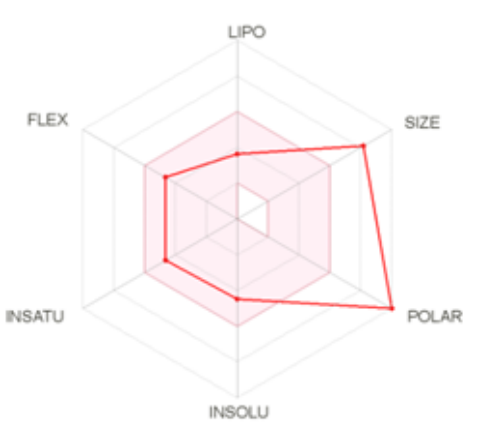
E04	-C6H5NH2	H	-7,66	2,41
E05	-C6H6O	H	-9,08	0,22017
E06	H	CH3COO-	-6,28	24,75
E07	CH3COO-	CH3COO-	-5,98	41,11
E08	C3H7S-	CH3COO-	-5,96	42,90
E09	-C6H5NH2	CH3COO-	-7,61	2,62
E10	-C6H6O	CH3COO-	-6,18	29,69
E11	H	C3H7S-	-8,29	0,83333
E12	CH3COO-	C3H7S-	-5,28	133,88
E13	C3H7S-	C3H7S-	-6,73	11,61
E14	-C6H5NH2	C3H7S-	-6,82	10,00
E15	-C6H6O	C3H7S-	-8,01	1,33
E16	H	-C6H5NH2	-8,04	1,28
E17	CH3COO-	-C6H5NH2	-6,06	36,03
E18	C3H7S-	-C6H5NH2	-6,01	39,31
E19	-C6H5NH2	-C6H5NH2	-7,78	1,97
E20	-C6H6O	-C6H5NH2	-7,50	3,16
E21	H	-C6H6O	-6,36	21,73
E22	CH3COO-	-C6H6O	-7,57	2,85
E23	C3H7S-	-C6H6O	-8,34	0,77585
E24	-C6H5NH2	-C6H6O	-6,88	9,10
E25	-C6H6O	-C6H6O	-8,28	0,85338

* Kontrol ligandı eriositrin, ΔG : Serbest Bağlanma enerjisi, K_i : İnhibisyon sabiti (mikromolar seviyede)

Çizelge 4.10'da en düşük bağlanma enerjisine sahip olan ligandın SwissADME web sunucusuna göre oral biyouygunluk, gastrointestinal (GI) absorpsiyon, kan-beyin bariyerini geçebilme gibi önemli özellikleri gösterilmektedir. Farmakokinetik açıdan

ilacın TPSA değerin 140 Å²'den küçük olması arzu edilir. Çizilen türev molekül E05'in moleküler ağırlığı (MA) 500'den büyük, moleküldeki OH (hidroksil grubu) sayısı 5'dan fazla ve oksijen atomu sayısı 10'dan fazla olduğu için Lipinski'nin kurallarından 3'üne uymamaktadır. Yanı sıra Muegge, Veber ve Ghose'nin kurallarını da sağlamamaktadır. MA>480, WLOGP<-0,4, Moleküler Refraktivite (MR)>130 ve atom sayısı >70 olduğu için Ghose'nin kurallarından dördüne, topolojik polar yüzey alanı (TPSA)>140 olduğu için Veber'e ve TPSA>131,6 olduğu için Egan'a uymaz. MA>600, TPSA>150 ve H alıcı sayısı>10 ve H donör sayısı>5 olduğu için en hoşgörülü olan Muegge'nin kurallarına dahi uymamaktadır. Bu türev molekül kan-beyin bariyerini geçemez ve GI absorpsiyonu da oldukça zayıftır. Ancak bu özellikleriyle GI'deki nematodların giderilmesi için avantajlıdır. Çizelge 4.10'daki geometrik diyagramda kırmızı konveks ile gösterilen şekil, E05'in moleküler polaritesinin en üst düzeyde ve büyüklüğünün de oldukça fazla olduğunu, esneklik, lipofillik, doymamışlık ve çözünmezlik değerlerinin ise makul sınırlar içerisinde kaldığını göstermektedir. SwissADME programı tarafından hesaplanan n-oktanol/su partiyon katsayısı (log P), ligandın yağ ve su ortamlarındaki derişimi arasındaki oranı vermektedir. E05'in Log P (WLOGP) değeri -0,68 ve TPSA (topolojik polar yüzey alanı) ise 265,5 Å² olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.10. E05'in ADME bağlantılı özellikleri (SwissADME web sunucu ile hesaplandı)

E05'in konformasyonel yapısı 	E05'in kimyasal özellikleri 
Moleküler Formül	C33H36O16
Moleküler Ağırlık	688,63 g/mol
Döneabilen bağ sayısı	7

Çizelge 4.10. E05'in ADME bağlantılı özellikleri (SwissADME web sunucu ile hesaplandı) (devam)

Hidrojen-bağı alıcı sayısı	16
Hidrojen-bağı sunucu sayısı	10
GI absorpsiyonu	Zayıf
KBB geçebilirliği	Yok
P-gp substratlığı	Var
Deriden geçebilirliği	-9,88 cm/saniye
Lipinski'nin beşer kuralına uygunluğu	Yok, 3 ihlal; MA>500, N veya O sayısı>10, NH veya OH sayısı>5
Ghose, Veber, Egan ve Muegge'nin kurallarına uygunluğu	Yok
Biyoygunluk Skoru	0,17
CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 enzimleri için inhibitörlüğü	Yok
TPSA	265,52 Å ²

GI: Gastrointestinal, KBB: Kan-beyin bariyeri, P-gp: P-glikoprotein, TPSA: Topolojik Polar Yüzey Alanı (Topological Polar Surface Area), MA: Moleküler Ağırlık, FLEX: Fleksibilite, Esneklik, LIPO: Lipofillik, SIZE: Büyüklük, POLAR: Polarlık, INSOLU: Suda çözünmezlik, INSATU: Doymamışlık

4.8. Direnç Gelişimi Durumunda En Potent Ligandların Etkililikleri

Antihelmintiklere direnç gelişimi bazı tekli nükleotit polimorfizmlerinin bir sonucu olarak da meydana gelebilmektedir. Benzimidazollere karşı ortaya çıkan direnç durumunda antihelmintik olarak kullanılabilecek bitkisel ligandların ortaya çıkarılması için bu çalışmada *in silico* bir senaryo tasarlanmıştır. Direnç gelişimi ile ilgili noktalar literatürden araştırıldıktan sonra tekli nükleotit değişimi ve mutant sekanslar oluşturulmuştur. Mutant protein sekanslarının tahmini 3D yapıları ile bitkisel ligandların kenetleme deneyi yapılmıştır. Bu deneyin sonuçları Çizelge 4.11'de gösterilmektedir. Denenen ligandlardan Hcβ-tubuline karşı iyi sonuçlar verenler *C. elegans* β-tubuline (Ceβ-tubuline) karşı da diğer ligandlara kıyasla daha iyi sonuçlar vermiştir. Bu ligandlar Mebendazole, apigenin, arteannuin-B, diosmetin ve oreganoldür. Çizelge 4.11'de de gösterildiği gibi eriositrin, kukurbitasin-B, karantadiol-A ve momordisin II ise hem yabani tip hem de mutant β-tubulinleri (Ceβ-tubulinleri) inhibe etmemektedir.

Çizelge 4.11. İnhibitör adaylarının dirençli proteinler ile K_i (μM) ve ΔG değerleri (kcal/mol)

	Yabani tip		E198G		F167L	
Molekül	K_i	ΔG	K_i	ΔG	K_i	ΔG
Mebendazole*	0,307 3	-8,88	1,16	-8,10	0,346 7	-8,81
ODTAME	20,87	-6,39	48,07	-5,89	13,92	-6,63
Apigenin	16,60	-6,52	6,22	-7,10	8,48	-6,92
Arteannuin-B	2 490	-3,55	0,642 6	-8,45	8,22	-6,94
Kukurbitasin-B	-	+81,81	843 630	-0,10	-	+22,27
Diosmetin	7,59	-6,98	4,46	-7,30	10,68	-6,78
Eriositrin	-	+28,90	-	+16,40	-	+31,93
Karantadiol-A	-	+25,11	291 540	-0,73	-	+9,83
Momordisin II	-	+111,88	-	+40,09	-	+29,77
Oreganol	325,55	-4,76	141,76	-5,25	4,64	-7,28

Çizelge 4.11. İnhibitör adaylarının dirençli proteinler ile K_i (μM) ve ΔG değerleri (kcal/mol) (devam)

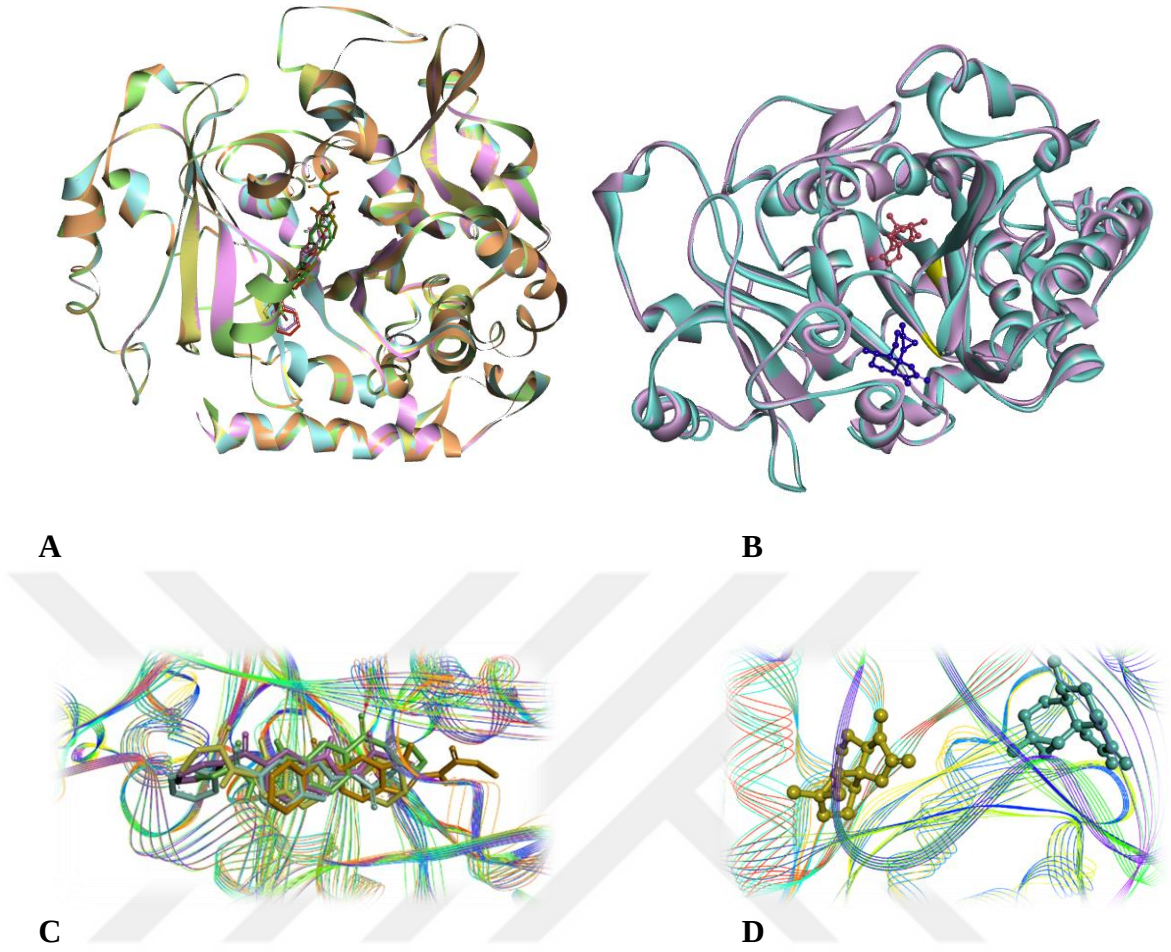
	F167Y		L225M	
Molekül	K_i	ΔG	K_i	ΔG
Mebendazole*	0,380 6	-8,76	0,193 2	-9,16
ODTAME	12,49	-6,69	35,89	-6,06
Apigenin	8,16	-6,94	4,98	-7,23
Arteannuin-B	8 540	-2,82	1 950	-3,70
Kukurbitasin-B	-	+50,29	-	+38,19
Diosmetin	5,05	-7,23	2,12	-7,74

Çizelge 4.11. İnhibitör adaylarının dirençli proteinler ile K_i (μM) ve ΔG değerleri (kcal/mol) (devam)

Eriositrin	-	+75,24	-	+46,93
Karantadiol-A	-	+33,28	-	+12,67
Momordisin II	-	+94,55	-	+69,24
Oreganol	1580	-3,82	41,08	-5,98

ΔG : Serbest bağlanma enerjisi (kcal/mol), K_i : İnhibisyon katsayısı, ODTAME: 9,12,15-oktadekantrienoik asit metil ester, Mebendazole*: ilaç kontrol, Yabani tip: *C. elegans* β -tubulin (Ce β -tubulin) (PDB ID: 6E88, B-zincir)

Çizelge 4.11’de en dikkat çekici sonuç -9,16 kcal/mol bağlanma enerjisi ile MBZ’nin yabani tip proteine kıyasla L225M mutantında çok daha iyi bir bağlanma moduna sahip olmasıdır. Bu sonuç, L225M mutasyonu ile antinematodal ilaçlara direnç gelişimi söz konusu olsa bile bu durumda MBZ’nin bu sorunu çözebileceğini işaret etmektedir. Aslında bu çalışmadaki tüm mutant proteinler için MBZ iyi bir inhibisyon göstermiştir. Ancak E198G mutasyonunda arteannuin-B, Ce β -tubulin inhibisyonu açısından MBZ’den bile daha iyi sonuç vermiştir. Mutant (E198G) Ce β -tubulin ile MBZ’nin ΔG değeri -8,1 kcal/mol olarak hesaplanırken, arteannuin-B için -8,45 kcal/mol bulunmuştur. Şekil 4.108 A’da MBZ’lerin Ce β -tubulinleri (yabani ve mutant tipler) içindeki konumlanmaları gösterilmektedir. Bu şekilde ilk göze çarpan, ilaçların neredeyse çakışık bir modda konumlanmalarıdır. Şekilde gösterilen beş proteinin superimpose ile çok iyi şekilde örtüşmeleri, tekli nükleotit değişimi sonrasında 3D yapıları SWISS-MODEL web sunucu kullanılarak homoloji modelleme ile tahmin edilen dört mutant proteinin sekonder yapılarında önemli bir değişim olmadığını göstermektedir. Ancak bazı ilmek yapılarının hafif bir farkla yabani tipteki normal koordinatlarından uzaklaştıkları görülmektedir. Şekil 4.108 B’de arteannuin-B’nin yabani tipteki Ce β -tubulin ve mutant E198G ile kenetleme simülasyonu sonucu proteinler içindeki konumu gösterilmektedir. Bu resimde aynı zamanda proteinlerdeki 167. ve 198. amino asitlerin bulundukları yerler sarı renk ile işaretlenmiştir. Bu pozisyonların ligandlara oldukça yakın durdukları görülmektedir.

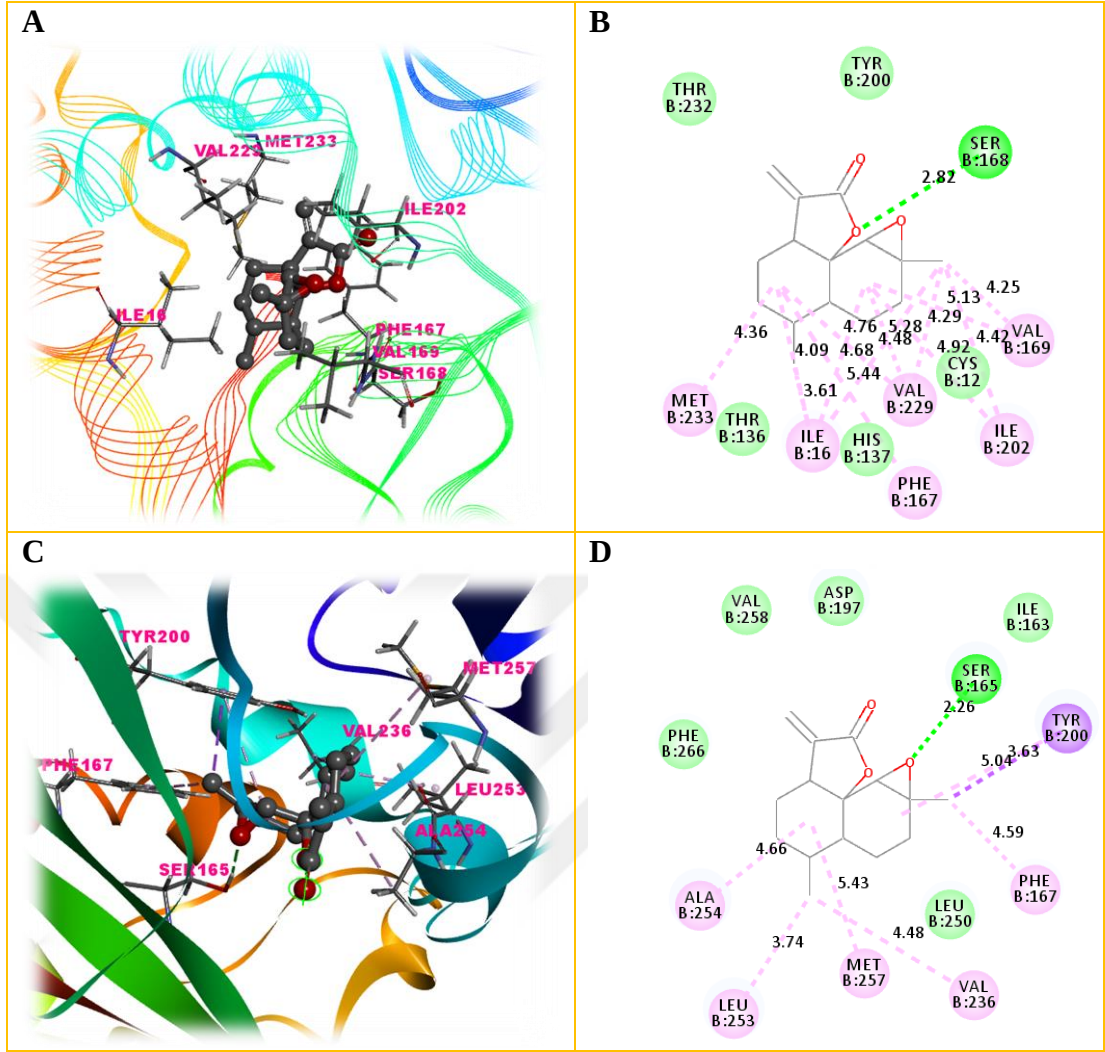


Şekil 4.108. Yabani tip ile mutant β -tubulinlerin superimpose çakışmaları. **A)** Yabani tip turuncu, E198G lila, F167L açık sarı, F167Y turkuaz ve L225M açık yeşil. Merkezdeki ligandlar olan MBZ'ler ise kenetleme simülasyonu sonucu yerleştikleri konumda ve kenetlendikleri protein ile aynı renkle gösterilmektedir. **B)** Yabani tip β -tubulin lila, E198G ise turkuaz renkte ve 167. ve 198. rezidülerin olduğu yerler sarı renkte, koyu pembe renk top-çubuk modeliyle gösterilen arteannuin-B yabani tip protein ile kenetleme sonucu ve mavi renk arteannuin-B ise E198G ile kenetleme sonucunda yerleştikleri bölgede gösterilmektedir. **C)** MBZ'lerin superimpose sonucu proteinlerdeki konumları. Çakışan tubulinler şerit kurdale modeliyle gökkuşağı renklerde, **D)** Ligandların daha yakından gösteriminde bu kez yabani tip ile kenetlenen arteannuin-B sarı top-çubuk, mutant E198G ile kenetlenen arteannuin-B ise turkuaz renkte görülmektedir

Resimde pembe top-çubuk modeliyle gösterilen arteannuin-B yabani tip protein ile kenetlendiği konumda bulunmakta ve 167. amino aside daha yakın durmaktadır. Mavi renkle gösterilen arteannuin-B ise E198G mutanti ile kenetlendiği konumda bulunmakta ve 198. amino aside yakın durmaktadır. Şekil 4.109 B ve D'de gösterildiği gibi her iki konumda da hem 167. amino asit ile hem de TYR200 ile etkileşim yapmaktadır. Şekil

4.108 C’de turuncu (yabani tipe ait) MBZ, diğer MBZ’lerden biraz daha farklı bir bölgede, L225M ile çok iyi sonuç veren açık yeşil MBZ ise tam merkezde konumlanarak proteine uyum sağlamış görünmektedir. Şekil 4.108 D’de arteannuin-B’nin yabani tip ve E198G mutant proteini içindeki olası yerleşimlerinin görüntüsü, E198G içindeki yeni konumunun, (turkuaz renkle gösterilen) enerjinin düşürülmesi ve güçlü etkileşimlerin sağlanabilmesi için arteannuin-B’ye önemli bir imkân verdiğini göstermiştir.

Şekil 4.109 A’da arteannuin-B’nin yabani tip Ce β -tubulin içinde etkileştiği rezidüler ve gökkuşağı renklerindeki proteinin bağlanma bölgesinde α -heliksler ile çevrili bir alanda konumlandığı gösterilmektedir. Burada en yakın konumda olduğu ve 2,82Å mesafede güçlü bir polar etkileşim yaptığı SER168 rezidüsü dışında, diğer polar rezidülerden TYR200, THR232, THR136, HIS137 ve CYS12 ile van der Waals etkileşimleri yaptığı ve ayrıca MET233, ILE16, PHE167, VAL229, ILE202 ve VAL169 ile 3,61 Å-5,44 Å arasında değişen mesafelerde π -alkil etkileşimleri yaptığı görülmektedir (Şekil 4.109 B). Şekil 4.109 C’deki mutant E198G içindeki yerleşiminde ise üç α -heliksin ve (mavi ve turuncu ile gösterilen) iki ilmek yapısının arasında kalmaktadır. Bu α -helikslerde bulunan PHE167, ALA254, VAL236, LEU253 ve MET257 ile π -alkil etkileşimleri yaparken, β -konformasyon üzerindeki TYR200 ile hem π -alkil hem de π -sigma bağı oluşturmuştur. Diğer bir β -konformasyon üzerindeki SER165 ile 2,26 Å uzunlukta bir hidrojen bağı meydana gelmiştir (Şekil 4.109 C ve Şekil 4.109 D). PHE266, VAL258, ASP197, ILE163 ve LEU250 ise van der Waals etkileşimleri yaptığı rezidülerdir. Şekil 4.109 D’de gösterildiği gibi arteannuin-B, 198. pozisyonda polar glutaminil rezidüsünün apolar glisinil ile yer değiştirmesi durumunda proteinin bağlanma bölgesinde farklı bir konuma yerleşerek TYR200 ile π -sigma bağı oluşturmuştur. Arteannuin-B, MBZ’ye kıyasla küçük bir molekül olmasına rağmen çok sayıda etkileşim yapması, başarılı bir inhibitör adayı olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.109. Arteannuin-B ile yabani tip β -tubulin ve E198G mutantının kenetleme simülasyonu sonucu olası etkileşimlerinin karşılaştırılması. Kesikli çizgiler etkileşimleri ve üzerlerindeki sayılar Å cinsinden uzaklıkları temsil etmektedir. **A)** Yabani tip ile 3D gösteriminde arteannuin-B top-çubuk modeliyle, etkileştiği rezidüleri ince çubuk modeliyle, **B)** Yabani tip ile 2D gösteriminde pembe çizgilerle temsil edilen yoğun bir π -alkil etkileşim ağı, **C)** E198G mutantı ile 3D gösteriminde protein sekonder yapıda gökkuşağı renklerinde, **D)** E198G ile 2D gösteriminde arteannuin-B ve TYR200 ile oluşturulan π -sigma bağı mor çizgilerle 3,63 Å uzunlukta gösterilmektedir

Önemsiz olmayan tropikal hastalıklar ile benzer bir kadere sahip olursa, helmantik enfeksiyonlarda ilaca direnç gelişimi problemi XXI. yüzyılda bile bir tıbbî kâbus olarak görülebilir. Özellikle de tek ilaç seçeneğinin olduğu *Onchocerca volvulus* enfeksiyonu gibi olgularda yaklaşan tehlikeye dikkat çekilmektedir (Osei-Atweneboana ve diğ.leri, 2007). Bazı mutant proteinlere karşı inhibisyonun moleküler modelleme araçlarıyla araştırıldığı bu çalışmada arteannuin-B gelecek vaat eden bir bitkisel

molekül olarak öne çıksa da daha fazla ligand ve mutant protein ile bu tür çalışmaların kapsamının genişletilmesi, uygun inhibitörlerin bulunabilmesi için gerekli görünmektedir.

Tripathi ve diğerleri (2016) insan β -tubulini üzerinde L225M mutasyonunun bir antikanser ilaç olan Paclitaxel'e direnç gelişimi ile ilgili olduğunu göstermişlerdi. Mevcut çalışmada ise ilginç şekilde L225M mutasyonu Ce β -tubulini MBZ için daha duyarlı hale getirmiştir. Ancak daha net bir yorumda bulunabilmek için bu *in silico* sonuçların *in vitro* şartlarda da araştırılması gereklidir. Nokta mutasyonları, her ne kadar, bu çalışmada gösterildiği gibi, bağlanma bölgesindeki rezidülere isabet etse bile (bkz. Şekil 4.109), superimpose sonuçlarından da anlaşıldığı üzere proteinin üç boyutlu yapısında önemli bir değişime neden olmamış ancak yine de ligand ile etkileşimlerinde bir fark yaratmıştır. Bu çalışmada denenen dört mutant içerisinde E198G mutanı dirençli bir varyant olmaya aday görünmüştür. Diğer üç mutant ise MBZ'ye direnç gelişimi ile ilgili bulunmamıştır (Karaman, Girişgin ve Girişgin, 2021).

Tekli nükleotit polimorfizmleri pek çok parazitik organizmada ilaç direnci ile ilişkilendirilmiştir (Gilleard 2006). Ancak bu ikisi arasındaki korelasyon helmint türlerine göre değişiklik göstermektedir (Prichard ve diğerleri, 2007).

Dirençli organizmalarda tanımlanan tekli nükleotit polimorfizmlerinden biri de artemisininin uzun zamandan beri sıtma tedavisinde kullanılması dolayısıyla *P. falciparum* üzerinde yaptığı *ATPase6* genindeki S769N dönüşümüdür (Jambou ve diğerleri, 2005). İlginç olarak mevcut çalışmada artemisininin bulunduğu *A. annua* bitkisinin içerdiği bir diğer önemli bileşen arteannuin-B direnç gelişimi durumunda kullanılabilecek en potent ilaç adayı olarak tahmin edilmiştir. Artemisinin her ne kadar nematodlara direnç gelişimi ile ilgili bulunmamışsa da, sık kullanımı dolayısıyla böyle bir direnç gelişimi durumunda arteannuin-B'nin işe yarayabileceğini gösteren mevcut sonuçlar, içerdiği tek bir maddedense, bitkinin kendisinin antihelmintik amaçlı kullanılmasının direnç gelişiminin önlenmesinde de önemli bir yeri olabileceğini göstermiştir. Bitki mi yoksa bitkiden elde edilen madde mi kullanılmalı sorusuna yanıt verilmesi açısından bu çalışmanın özgün *in silico* sonucu gelecekte kullanılabilecektir.

Tayland'dan elde edilen kudret narı yaprak özütünün servikal karsinomada görülen çoklu ilaç direncini tersine çevirdiği ve kemoterapötik bir ajan olan vinblastine duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir (Limtrakul ve diğerleri, 2004, Pitchakarna ve diğerleri, 2012). Bu nedenle bu bitki yapraklarının özütünün antihelminetik ilaçlara karşı direnç gelişimini de tersine çevirme özelliğinin olup olmadığı araştırılmalıdır. Bu tez çalışmasında *M. charantia*'da bulunan bazı önemli biyoaktif moleküller antinematodal hedef proteinlerine karşı çok düşük düzeyde inhibisyon katsayısına sahip bulunmuştur. KPT 2 enzimine karşı; karantadiol-A 2,06 nM, momordisin II 72,69 pM ve kukurbitasin-B ise 57,11 pM düzeyde *Ki* değerlerine sahip oldukları için bu çalışmada en potent antihelminetik bitkisel ligandlar olarak öne çıkmışlardır. Bu üç molekül her ne kadar Hc β -tubulini inhibe etmiyor olarak bulunmuş olsalar da beta-tubulin üzerindeki mutasyonlardan kaynaklanacak olası bir direnç gelişimi durumunda direnci tersine çevirme potansiyelleri olabileceği için direnç bağlantılı olmaya aday dört farklı mutant protein ile kenetlenmiştir. Sonuçlar, bu üç bitkisel molekülün söz konusu mutant proteinleri inhibe etmediklerini ve bu nedenle oluşturulacak diğer mutant proteinlerle de *in silico* ortamda denenmeleri gerektiğini göstermiştir. Kudret narı yapraklarında bulunan bir bileşen veya bazı bileşenler monooksijenazları baskılar (Kusamran ve diğerleri, 1998). *S. muris* enfeksiyonu farelerde büyüüp gelişmeyi geciktirir ve hepatik monooksijenaz sisteminin gelişimini hızlandırır (Mohn ve Philip, 1981). Bu çalışmada kudret narı yapraklarında bulunabilen iki önemli bileşen olan momordisin II ve kukurbitasin B, benzimidazollere direnç gelişimi durumunda kullanılabilirlikleri açısından araştırıldıklarında MBZ kadar etkili bulunmamıştır. Ancak diğer mutant proteinler ve farklı mutant reseptörler ile de denenmeleri, olası inhibisyon yolunun anlaşılabilmesi için faydalı olabilir.

Dünyanın dört bir yanında direnç gelişimine karşı araştırmalar yapan değerli araştırmacılar ve iyi olanaklara sahip laboratuvarların varlığı hesaba katılınca, uyanma zamanı geldiği anlaşılmaktadır.

4.9. In vivo Deney Sonuçları

4.9.1. *A. annua* n-hekzan özütü için bulunan makroskopik sonuçlar

A. annua n-hekzan özütü verilen farelerin gaitalarında üçüncü günden sonra düşen helmintler bulunmuştur. Bu helmintler ışık mikroskopunda teşhis edilmiştir. Düşen helmintlerin tümü *S. obvelata* türü helmintlerdi (Şekil 4.110 A, B, C).



Şekil 4.110. *A. annua* 600 mg/kg uygulamasının 3. günü bitki özütünün verildiği bir farenin gaitasında bulunan helmintler. **A)** Bir erişkin *S. obvelata* dişisi. **B)** Yumurta içermeyen bir *S. obvelata* örneği. **C)** *S. obvelata*'nın kıvrık posterioru

Dişi helmintler içindeki spesifik muz biçimli yumurtalar çok sayıda ve belirgindi. *S. obvelata* erkekleri fertilizasyondan sonra atıldıkları için bu örneğe rastlanmamıştır.

A. annua özütünün uygulandığı günler boyunca farelerden toplanan fekal örneklerde bulunan oksyurid nematod sayısı 3'tür. Makroskopik incelemede görülen nematod örneklerinden ikisinde görülen anüs açıklığındaki dışarı doğru hafif çıkıntı erkek üreme organındaki spikül yapısıyla karıştırılabilirse de dikkatli incelendiğinde posteriorun mameleon taşımadığı ve testis benzeri partiküllerin bulunmadığı anlaşılmaktadır (anüs yapısı okla gösterilmektedir) (Şekil 4.110 C). Düşen bu helmintler tuzlu su içinde bulundukları için morfolojileri biraz değişmişti. Deplazmoliz sonucu tegümenin buruştuğu Şekil 4.110 B'de görülmektedir.

4.9.2. *A. annua* n-hekzan özütü için perianal bant sonuçları

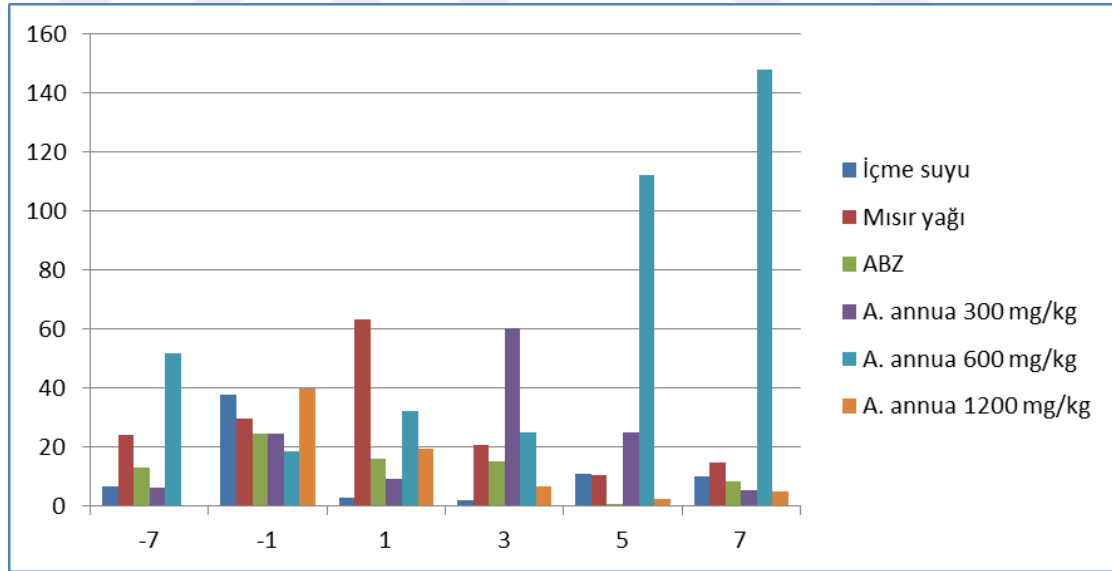
Uygulama öncesi (-7. ve -1. günler) ve uygulama boyunca (1., 3., 5. ve 7. günler) selofan bantta sayılan *S. obvelata* yumurtalarının aritmetik ortalamalarındaki değişimler Şekil 4.111'de gösterilmiştir. Günlere göre parazit yumurta sayılarındaki değişimler incelendiğinde çok şaşırtıcı sonuçlarla karşılaşmıştır. Son uygulama gününde anal bantta sayılan *S. obvelata* yumurta sayılarının ortalamaları *A. annua* n-hekzan özütünün 600 mg/kg dozda uygulandığı fare grubunda (V. grup) 147,9 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.12). V. grupta 2. günden itibaren uygulamanın son gününe kadar yumurta sayılarının ortalamalarında artış görülmüştür. IV. Grup (*A. annua* 300) içinse son günde sayılan yumurtaların aritmetik ortalaması -1. güne kıyasla %77,55 azalmıştır. IV. grupta V. gruptakinin aksine uygulamanın ilk gününden itibaren devamlı bir azalma görülmüştür. Buna benzer bir durum özütün 1200 mg/kg dozda uygulandığı VI. grupta gözlenmiştir ve -1.günden son güne kadar devamlı azalışları son gün hafif bir artış izlemiştir. Ancak yine de son günkü ortalama -1. günkü ile karşılaştırıldığında %88 oranında bir azalma saptanmıştır. ABZ'nin 5 mg/kg dozda üç ardışık gün uygulandığı III. grupta da IV. ve VI. gruplardakine benzer bir durum gözlenmiştir ve -1. günden 7. güne kadar ortalama yumurta sayısı devamlı azalmıştır. Son günkü gözlenen artışa rağmen -1. günkü ile kıyaslandığında %65,58'lik bir azalma saptanmıştır. *In vivo* deneyin sonuçlarındaki en ilginç bulgu içme suyu verilen gruptaki yumurta sayısı

ortalamalarında görülen azalışlardır. -1. güne kıyasla son günkü ortalamada %73,47 azalma görülmüştür. Mısır yağı çözücü kontrol grubunda ise bu azalma %50,84 olmuştur. Farelerin bireysel selofan bant sonuçları Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Enfekte farelerde uygulama öncesi ve uygulama sırasında selofan bantta sayılan *S. obvelata* yumurtalarının aritmetik ortalamaları

	-7. gün	-1. gün	1. gün	3. gün	5. gün	7. gün
İçme suyu	6,4	37,7	2,7	1,9	10,8	10
Mısır Yağı	24,1	29,7	63,1	20,6	10,5	14,6
ABZ	13	24,7	16,2	15	0,5	8,5
<i>A. annua</i> 300 mg/kg	6	24,5	9,3	60,1	25	5,5
<i>A. annua</i> 600 mg/kg	51,7	18,7	32	24,7	112,3	147,9
<i>A. annua</i> 1200 mg/kg	0,3	40	19,3	6,7	2,5	4,8

Özütün 300 mg/kg dozda uygulandığı IV. grupta ise artış ve azalışlar birbirini takip etmiştir (Şekil 4.111).



Şekil 4.111. Uygulama öncesi (-7. ve -1. günler) ve uygulama boyunca (1., 3., 5. ve 7. günler) selofan bantta sayılan *S. obvelata* yumurtalarının aritmetik ortalamaları

Çizelge 4.13. Bireysel selofan bant sonuçları

Uygulama	Fare no	Selofan -7. gün	Selofan -1. gün	Selofan 1. gün	Selofan 3. gün	Selofan 5. gün	Selofan 7. gün
Saf su	28E	0	10	5	0	22	0
Saf su	29E	29	198	9	3	0	30
Saf su	30E	0	0	0	0	45	40
Saf su	31D	0	10	0	0	0	0
Saf su	32D	0	0	0	0	8	0
Saf su	34E	16	46	4	9	0	0
Saf su	36E	0	0	1	1	0	0
Mısır yağı	2E	0	33	2	51	9	17
Mısır yağı	4E	1	21	123	4	30	31
Mısır yağı	5E	42	39	186	5	7	10
Mısır yağı	10K	92	0	18	0	0	0
Mısır yağı	11K	33	0	2	37	11	0
Mısır yağı	12K	25	0	13	4	9	38
Mısır yağı	38E	0	145	72	5	0	0
Mısır yağı	43E	0	0	89	59	18	21
ABZ 5mg/kg	3E	6	31	1	6	0	0
ABZ 5mg/kg	7E	7	5	59	71	3	27
ABZ 5mg/kg	9E	45	108	28	13	0	0
ABZ 5mg/kg	13K	5	0	9	0	0	0
ABZ 5mg/kg	14K	12	0	0	0	0	0
ABZ 5mg/kg	15K	3	4	0	0	0	24
A. annua 300	20E	1	11	45	259	4	12
A. annua 300	21E	15	22	2	71	69	15
A. annua 300	23D	0	0	0	0	0	0
A. annua 300	27D	0	11	3	0	5	0
A. annua 300	35E	20	1	6	30	72	1
A. annua 300	44D	0	102	0	1	0	5
A. annua 600	16K	43	0	0	8	32	344
A. annua 600	17K	3	0	0	0	0	0
A. annua 600	18K	13	26	145	105	581	453
A. annua 600	1E	0	92	5	1	5	77
A. annua 600	6E	1	1	12	6	140	158
A. annua 600	8E	302	10	32	53	21	0
A. annua 600	42E	0	2	30	0	7	3
A. annua 1200	19E	1	5	10	8	7	0
A. annua 1200	22K	1	0	0	0	0	0
A. annua 1200	24K	0	11	1	0	1	0
A. annua 1200	26K	0	0	19	0	0	0
A. annua 1200	37E	0	57	80	16	7	12
A. annua 1200	41E	0	167	6	16	0	17

A. annua 600 grubundaki üç farede ilk duruma kıyasla ciddi bir artış görülmüş, bu grupta yalnızca 8E kodlu bir farede sayılan *S. obvelata* yumurtalarında gün geçtikçe azalma olduğu saptanmıştır.

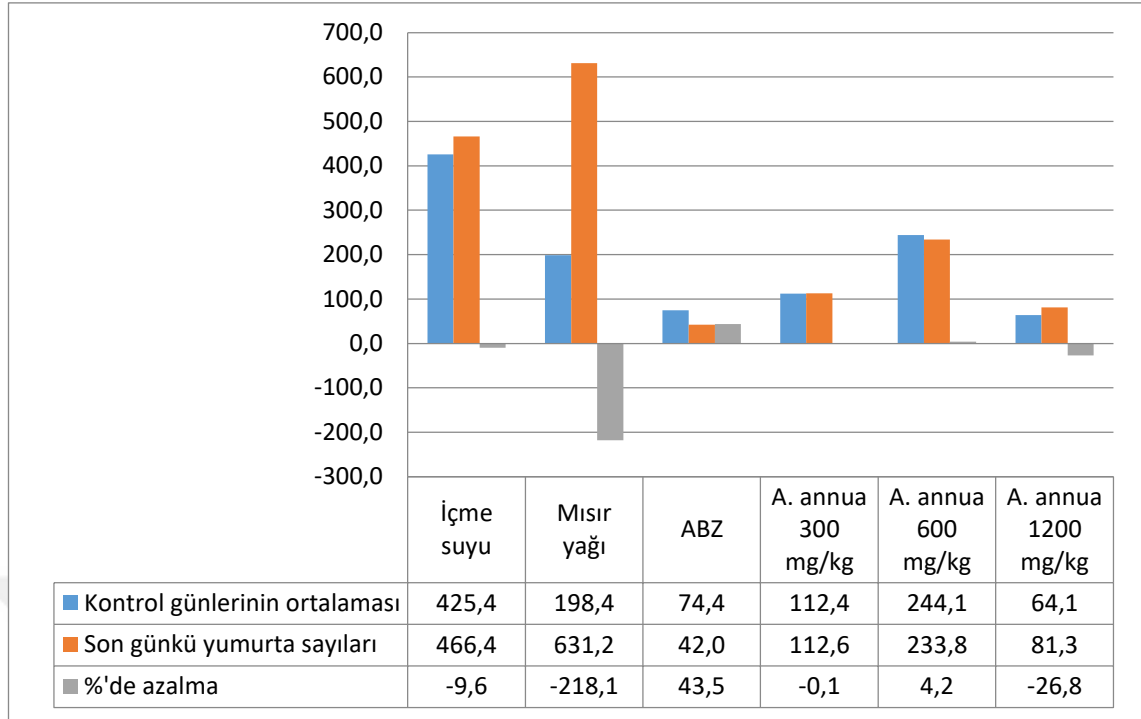
4.9.3. *A. annua* n-hekzan özütü için fekal flotasyon sonuçları

Oksyurid nematodlara karşı etkinliğin göstergesi olan yüzde azalma aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$\% \text{ azalma} = 100 \times ((\bar{I} - S) / \bar{I}) \quad (4.1)$$

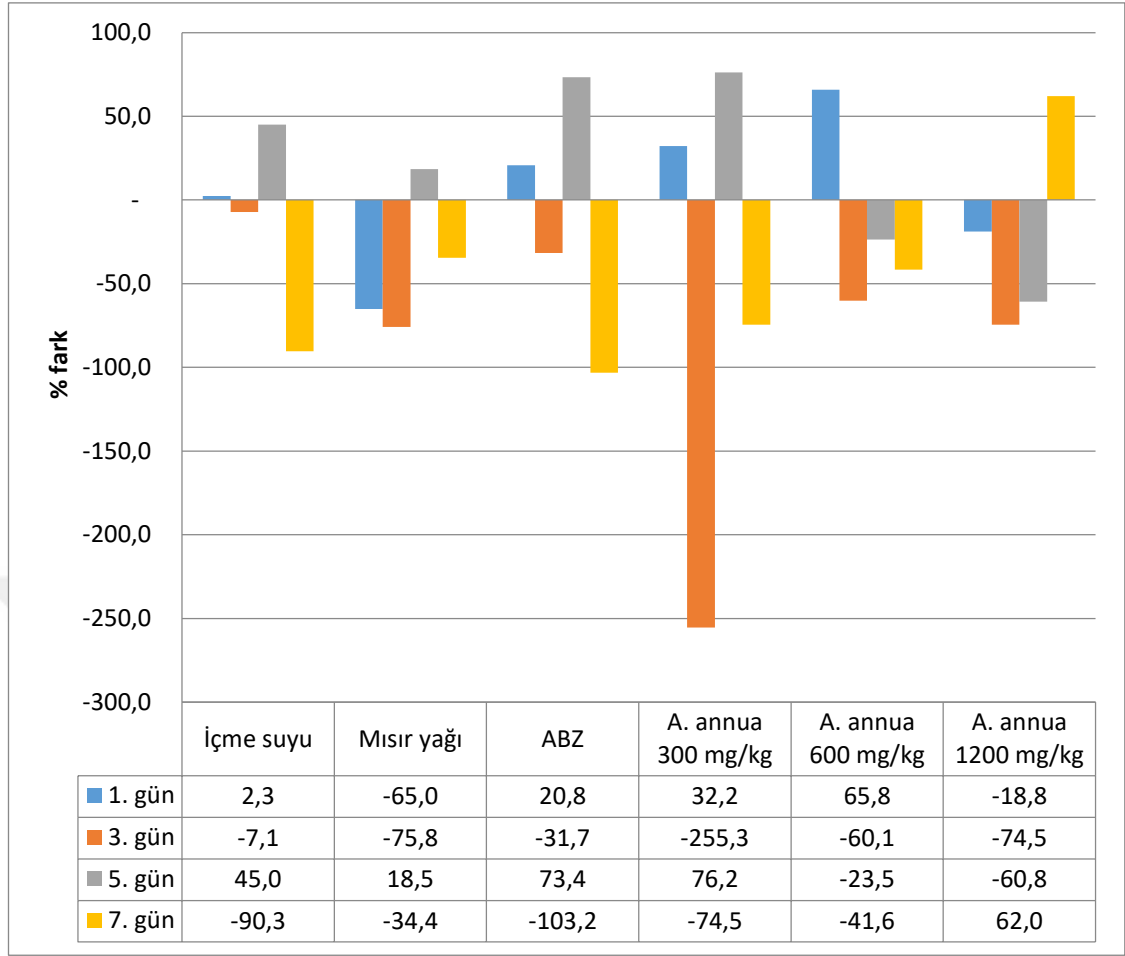
Burada $\bar{I}$ karşılaştırma yapılan parazit yumurtalarının ilk durumdaki aritmetik ortalaması, S ise son durumdaki aritmetik ortalamasıdır.

Fare gruplarındaki *A. tetraptera* yumurtalarının sayıları yüzde azalma açısından karşılaştırıldığında ABZ uygulanan gruptaki fareler dışındaki gruplarda önemli bir azalma görülmemiştir. Ancak mısır yağı verilen grupta önemli bir yüzde artış gözlenmiştir. Aslında mısır yağı verilen farelerde de laksatif etkiye bağlı olarak helmintlerin bazılarının düşmesi ve buna bağlı olarak yumurta sayısında da azalma görülebilirdi. Ancak tam aksine bu grupta %218,1'lik bir artış olması, mısır yağının muhtemelen helmint sayısını veya yumurtlama yeteneğini arttırdığını göstermektedir. İçme suyu grubunda ise yine belirgin bir artış gözlenmiştir. Bunun yanısıra *A. annua* ekstraktlarının 300 ve 1200'lük iki dozunun gaita içinde yumurta bulunma yüzdesini arttırması, bunların da artışa neden olan mısır yağı içinde seyreltilmiş olmalarından kaynaklanabilir. Burada her ne kadar *A. annua* 600 mg/kg uygulamasının yumurta yüzdesini çok az bir oranla aşağı çektiği görülse de bu önemsizmeyecek derecede düşüktür ve sonuç olarak ABZ dışında hiçbir uygulamanın yumurta yüzdesi üzerine antihelmintik bir etki göstermediği anlaşılmaktadır (Şekil 4.112).



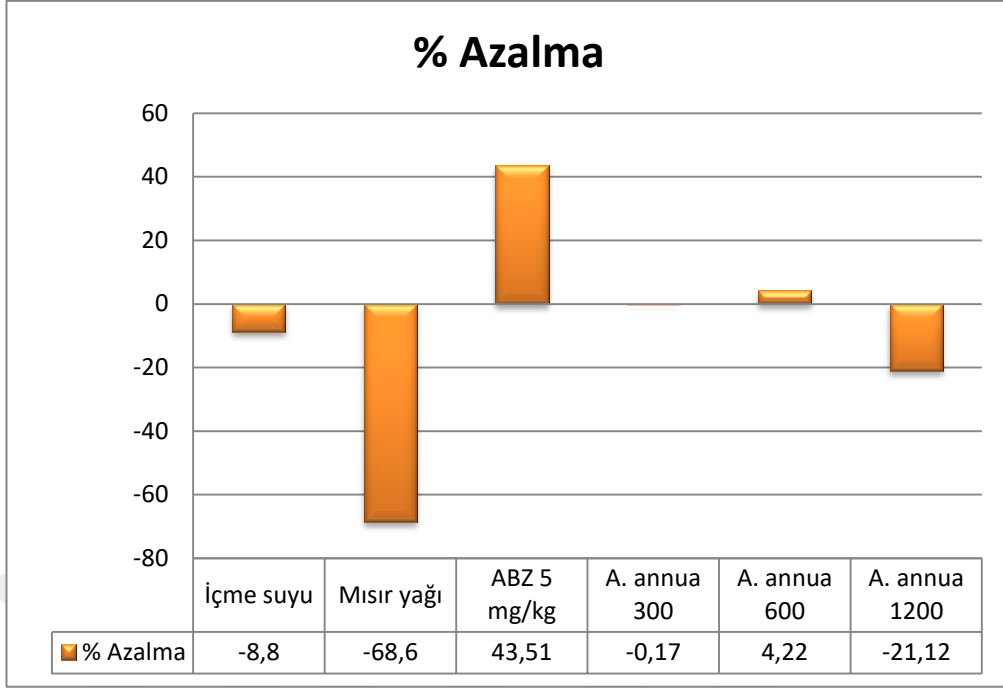
Şekil 4.112. -7. ve -1. günler bakılan fekal flotasyondaki *A. tetraoptera* yumurta sayılarının aritmetik ortalamaları ile 7. günkü yumurta sayılarının ortalamalarının karşılaştırılarak yüzde azalmanın hesaplanması

Ardışık günler arasındaki farka göre yumurta sayılarının ortalamalarının karşılaştırılması ise özellikle 3. günün ardından yumurta bulunma oranlarının artış gösterdiğini ve bu durumun %255,3'lük bir artış ile en fazla *A. annua* 300 mg/kg dozda uygulanan grupta görüldüğünü ifade etmektedir. Mısır yağı verilen gruptaki fareler ile *A. annua* 1200 mg/kg dozda verilen gruptaki farelerin durumu ise neredeyse aynıdır. ABZ uygulanan gruptaki fareler ise *A. annua* 600 mg/kg dozda uygulanan farelere göre daha büyük oranda bir yüzde azalma göstermiştir. ABZ uygulaması sadece ilk üç gün 5 mg/kg dozda uygulandığı ve özütler ise yedi gün boyunca uygulandığı için ABZ uygulanan grupta özellikle 3. ve 5. günlerdeki bakılarda diğer gruplara göre daha yüksek bir yüzde azalma beklenmiştir. Ancak bu sonuçlara göre ABZ uygulanan grupta 3. gün ve 7. günlerde azalma yerine yumurta yüzdesinde artış görülmüştür. Buna benzer sonuçlar mısır yağı ve *A. annua*'nın 300 mg/kg grubunda da görülmektedir. Buna rağmen 5. gündeki bakı sonuçları karşılaştırıldığında en fazla yüzde azalma ABZ ve *A. annua* 300 mg/kg dozda uygulanan farelerde görülmüştür (Şekil 4.113).



Şekil 4.113. Ardışık günler arasındaki farka göre yumurta sayılarının ortalamalarının karşılaştırılarak yüzde azalmanın hesaplanması

Fekal flotasyon sonuçlarına göre mısır yağı verilen grupta uygulamanın 7. gününde ilk duruma göre %68,56 artış görülmüştür (Şekil 4.114). İlk durum, uygulama öncesi -7. ve -1. günlerde sayılan yumurtaların ortalamasıdır. ABZ grubu en fazla azalışın görüldüğü gruptur ancak %43,51 oranında bulunan bu azalma hafif bir etkinin göstergesidir. *A. annua* 600 grubunda çok az bir azalış (%4,22) ve *A. annua* 1200 grubundaki %21,12 oranındaki artış özütün antinematodal etkisinin fekal flotasyon ile saptanamadığını veya etkisinin görülebilmesi için biraz daha süre geçmesi gerektiğini göstermiştir.



Şekil 4.114. İlk iki bakının ortalamalarıyla karşılaştırıldığında son günkü % azalma

Fekal flotasyonda çok sayıda kılkurdu yumurtası yanı sıra nadiren çok küçük nematodlar da görülmüştür (Şekil 4.115).



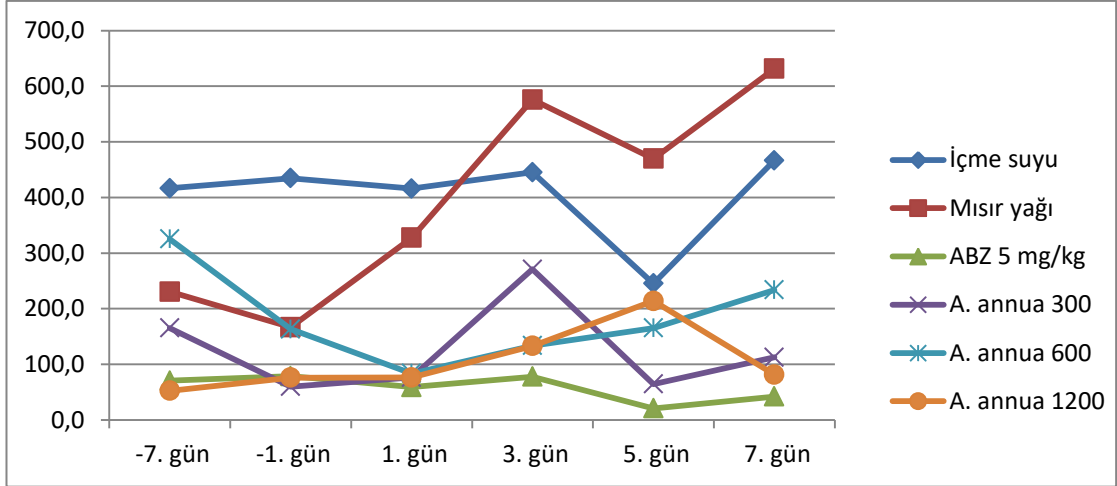
Şekil 4.115. Fekal flotasyonda görülen oldukça küçük bir nematod

Fekal flotasyonda görülen oksyurid yumurtaları *A. tetraptera*, *S. obvelata* ve *S. muris* türüne ait yumurtalardı. Bunlara ait fotoğraflar Şekil 4.116’da verilmektedir.



Şekil 4.116. Fekal flotasyonda görülen oksyurid yumurtaları. A) Bir *A. tetraptera* yumurtası B) *S. obvelata* yumurtası C) *S. muris* yumurtası

Uygulama süresince bakılan fekal flotasyonda bulunan *A. tetraptera* yumurta sayılarının mg’daki yüzdeleri karşılaştırıldığında mısır yağı uygulanan grupta diğer gruplara kıyasla daha yüksek oranda yumurta bulunurken ABZ ve *A. annua* 300 mg/kg dozdaki uygulama gruplarında en düşük oranda yumurta bulunduğu gözlenmiştir. Bu grafikte ilk göze çarpan yumurta sayılarındaki artış ve azalışların hem gruplar arasında hem de günler bazında devamlı bir seyirde olmamasıdır. Hemen hemen tüm gruplarda artış-azalış-artış-azalış tarzında bir değişim görülmektedir. Oysa ki beklenen ABZ grubunda devamlı bir azalış görülmesi ve içme suyu grubunda ise günler arasında belirgin bir farkın olmamasıdır. Özütlü grupları arasında ise şöyle bir beklenti vardır: en yüksek dozda uygulanan grupta diğer özütlü gruplarına kıyasla özellikle 5. ve 7. günlerde en az sayıda helmint yumurtasına rastlanmalı, en düşük doz uygulanan grupta ise en fazla sayıda yumurta bulunmalıdır. Bu çalışmada bulunan sonuçlara göre özütlü gruplarında beklenenden farklı bazı oranlar gözlenmiştir. *A. annua* 600 mg/kg ve *A. annua* 1200 mg/kg gruplarında ilk 5 gün iki grup arasında birbirine benzer sonuçlar bulunurken 7. gün bakılarında yüksek doz uygulanan grupta önemli bir azalma olduğu görülmektedir (Şekil 4.117).



Şekil 4.117. Fekal flotasyonda bulunan *A. tetraptera* yumurtalarının her bir fare grubu için hesaplanan aritmetik ortalamaları

A. annua deneyinde grupları oluşturan tüm farelerin bireysel olarak bakı sonuçları objektif bir karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir. Çizelge 4.14’de F. A. feçes ağırlığını (gr), İLTYS iki lamelde sayılan toplam *A. tetraptera* yumurta sayısını, 1gTYS ise 1 gr’daki toplam yumurta sayısını ifade etmektedir.

Çizelge 4.14’de içme suyu kontrol grubundaki, ABZ grubundaki ve *A. annua* 300 grubundaki birer farede son günlük bakıda hiç helmint yumurtası görülmemiştir. Ayrıca çoğu farenin bakılarında azalışları artışların takip ettiği görülmektedir.

Gruplar arasında başlangıç durumunda enfeksiyon ağırlığı ve parazit yumurtası sayısı açısından bir dengenin olabilmesi için -7. günlük bakıda en yüksek yumurta sayısı değerlerine sahip olan fareler her bir gruba bir ağır enfekte fare denk gelecek şekilde dağıtılmıştır. Bu nedenle Çizelge 4.14’de her bir grupta bir farenin gruptaki diğer farelerden çok daha fazla enfekte olduğu ve yaklaşık 2000 yumurta sayıldığı görülmektedir. Bu farelerin numaraları 36E, 43E, 21E, 42E ve 40E’dir. E harfi erkek fareyi temsil ettiği için en ağır enfekte farelerin tümünün erkek fareler olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç literatür ile uyumludur.

Çizelge 4.14. Bireysel fekal flotasyon sonuçları

Uygulama	Fare No	Flotasyon -7. gün			Flotasyon -1. gün			Flotasyon 1. gün		
		F. A.	İLTYS	1gTYS	F. A.	İLTYS	1gTYS	F. A.	İLTYS	1gTYS
Saf su	28E	0,64	2	3,125	0,81	2	2,469	0,78	20	25,64
Saf su	29E	0,3	5	16,67	0,9	100	111,1	0,72	69	95,83
Saf su	30E	0,47	0	0	0,85	0	0	0,69	1	1,449
Saf su	31D	0,15	19	126,7	0,77	84	109,1	0,5	66	132
Saf su	32D	0,36	49	136,1	0,76	0	0	0,65	384	590,8
Saf su	34E	0,2	75	375	0,6	6	10	0,66	0	0
Saf su	36E	0,3	677	2257	0,9	2528	2809	0,42	867	2064
Mısır yağı	2E	0,36	8	22,22	0,75	0	0	0,45	0	0
Mısır yağı	4E	0,35	30	85,71	0,72	57	79,17	0,3	56	186,7
Mısır yağı	5E	0,45	80	177,8	0,67	60	89,55	0,42	270	642,9
Mısır yağı	10K	0,3	137	456,7	0,25	225	900	0,35	310	885,7
Mısır yağı	11K	0,4	16	40	0,44	13	29,55	0,7	14	20
Mısır yağı	12K	0,2	0	0	0,6	17	28,33	0,75	12	16
Mısır yağı	38E	0,75	2	2,667	1,22	1	0,82	0,48	1	2,083
Mısır yağı	43E	0,5	529	1058	0,9	184	204,4	0,42	364	866,7
ABZ 5mg/kg	3E	0,68	11	16,18	0,64	0	0	0,41	13	31,71
ABZ 5mg/kg	7E	0,28	3	10,71	0,96	10	10,42	0,42	108	257,1
ABZ 5mg/kg	9E	0,47	31	65,96	0,56	0	0	0,3	13	43,33
ABZ 5mg/kg	13K	0,4	19	47,5	0,13	7	53,85	0,43	1	2,326
ABZ 5mg/kg	14K	0,3	81	270	0,25	100	400	0,97	14	14,43
ABZ 5mg/kg	15K	0,5	6	12	0,45	3	6,667	1	5	5
A. annua 300	20E	0,29	1	3,448	0,53	1	1,887	0,78	3	3,846
A. annua 300	21E	0,38	295	776,3	0,63	187	296,8	1,02	337	330,4
A. annua 300	23D	0,42	1	2,381	0,74	5	6,757	1,03	0	0
A. annua 300	27D	0,2	0	0	0,65	1	1,538	0,72	1	1,389
A. annua 300	35E	0,17	23	135,3	0,67	12	17,91	0,37	1	2,703
A. annua 300	44D	0,26	19	73,08	1,12	38	33,93	0,37	44	118,9
A. annua 600	16K	0,2	2	10	0,3	38	126,7	0,8	22	27,5
A. annua 600	17K	0,8	6	7,5	0,42	0	0	0,4	1	2,5
A. annua 600	18K	0,4	49	122,5	0,43	19	44,19	0,7	2	2,857
A. annua 600	1E	0,28	133	475	0,67	142	211,9	0,66	174	263,6
A. annua 600	6E	0,52	16	30,77	0,86	2	2,326	0,24	6	25
A. annua 600	8E	0,48	0	0	0,45	5	11,11	0,3	47	156,7
A. annua 600	42E	0,5	815	1630	0,8	596	745	0,5	53	106
A. annua 1200	19E	0,44	0	0	0,41	38	92,68	0,41	36	87,8
A. annua 1200	22K	0,26	1	3,846	0,48	115	239,6	0,61	120	196,7
A. annua 1200	24K	0,17	3	17,65	0,61	19	31,15	1	42	42
A. annua 1200	26K	0,26	19	73,08	0,59	9	15,25	1,05	1	0,952
A. annua 1200	37E	0,53	7	13,21	1,07	28	26,17	0,49	13	26,53
A. annua 1200	41E	0,5	103	206	0,88	45	51,14	0,6	62	103,3

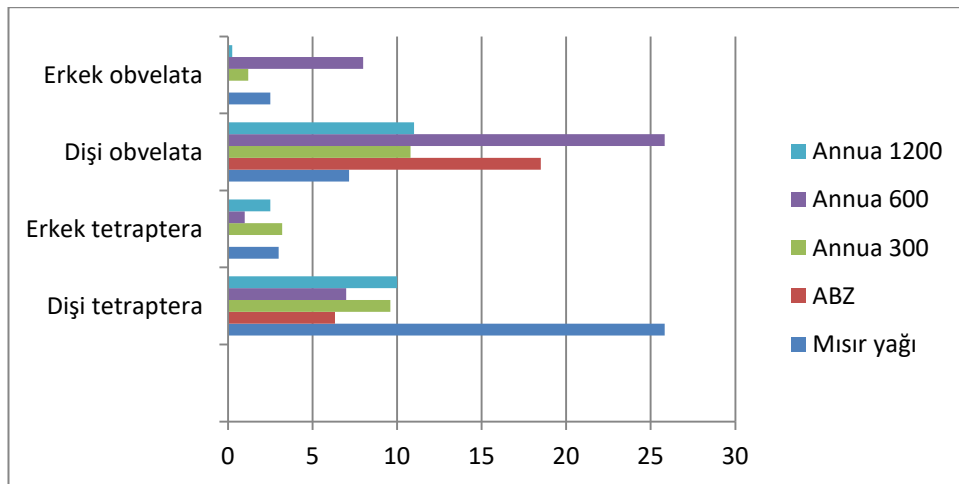
Çizelge 4.14. Bireysel fekal flotasyon sonuçları (devam)

Uygulama	Fare No	Flotasyon 3. gün			Flotasyon 5. gün			Flotasyon 7. gün		
		F. A.	İLTYS	1gTYS	F. A.	İLTYS	1gTYS	F. A.	İLTYS	1gTYS
Saf su	28E	0,39	1	2,564	0,7	41	58,57	0,73	1	1,37
Saf su	29E	0,41	0	0	0,6	1	1,667	0,77	0	0
Saf su	30E	0,77	0	0	0,7	20	28,57	0,81	108	133,3
Saf su	31D	0,31	59	190,3	0,64	120	187,5	0,72	77	106,9
Saf su	32D	0,22	13	59,09	0,53	7	13,21	0,76	121	159,2
Saf su	34E	0,47	1	2,128	0,57	12	21,05	0,6	1	1,667
Saf su	36E	0,95	2720	2863	0,6	843	1405	0,8	2290	2863
Mısır yağı	2E	1,02	3	2,941	0,37	0	0	0,67	1	1,493
Mısır yağı	4E	0,54	57	105,6	0,35	132	377,1	0,31	79	254,8
Mısır yağı	5E	1,04	208	200	0,46	453	984,8	0,29	227	782,8
Mısır yağı	10K	0,38	1365	3592	0,5	570	1140	0,1	84	840
Mısır yağı	11K	1,02	115	112,7	0,29	64	220,7	0,8	251	313,8
Mısır yağı	12K	0,44	86	195,5	0,86	141	164	0,7	95	135,7
Mısır yağı	38E	0,81	6	7,407	0,67	2	2,985	0,7	1	1,429
Mısır yağı	43E	0,7	273	390	0,66	572	866,7	0,2	544	2720
ABZ 5mg/kg	3E	1,14	15	13,16	0,45	6	13,33	0,8	24	30
ABZ 5mg/kg	7E	1,03	46	44,66	0,55	40	72,73	0,73	94	128,8
ABZ 5mg/kg	9E	0,42	14	33,33	0,35	0	0	0,29	0	0
ABZ 5mg/kg	13K	0,33	7	21,21	0,45	0	0	0,5	7	14
ABZ 5mg/kg	14K	0,38	126	331,6	0,42	16	38,1	0,4	23	57,5
ABZ 5mg/kg	15K	0,36	8	22,22	1,24	0	0	0,5	11	22
A. annua 300	20E	0,3	25	83,33	0,4	1	2,5	0,36	1	2,778
A. annua 300	21E	0,67	835	1246	0,8	225	281,3	0,33	189	572,7
A. annua 300	23D	0,8	5	6,25	0,7	11	15,71	0,58	0	0
A. annua 300	27D	0,4	17	42,5	0,5	1	2	0,46	0	0
A. annua 300	35E	0,67	10	14,93	0,3	3	10	0,7	2	2,857
A. annua 300	44D	0,7	162	231,4	0,41	31	75,61	0,35	34	97,14
A. annua 600	16K	0,33	8	24,24	0,5	19	38	0,6	144	240
A. annua 600	17K	0,09	0	0	0,14	0	0	0,3	2	6,667
A. annua 600	18K	0,53	105	198,1	0,61	141	231,1	0,4	60	150
A. annua 600	1E	0,51	242	474,5	0,4	48	120	0,74	305	412,2
A. annua 600	6E	0,44	34	77,27	0,69	16	23,19	0,4	12	30
A. annua 600	8E	0,29	0	0	0,34	4	11,76	0,33	1	3,03
A. annua 600	42E	0,85	137	161,2	0,7	512	731,4	0,72	572	794,4
A. annua 1200	19E	0,3	74	246,7	0,5	63	126	0,41	6	14,63
A. annua 1200	22K	0,64	172	268,8	0,7	186	265,7	0,35	112	320
A. annua 1200	24K	0,52	87	167,3	1,1	125	113,6	0,4	10	25
A. annua 1200	26K	0,6	12	20	0,8	16	20	0,37	6	16,22
A. annua 1200	37E	0,33	18	54,55	0,7	512	731,4	0,45	7	15,56
A. annua 1200	41E	0,66	27	40,91	0,6	16	26,67	0,58	56	96,55

4.9.4. *A. annua* n-hekzan özütü uygulanan farelerin nekropsi sonuçları

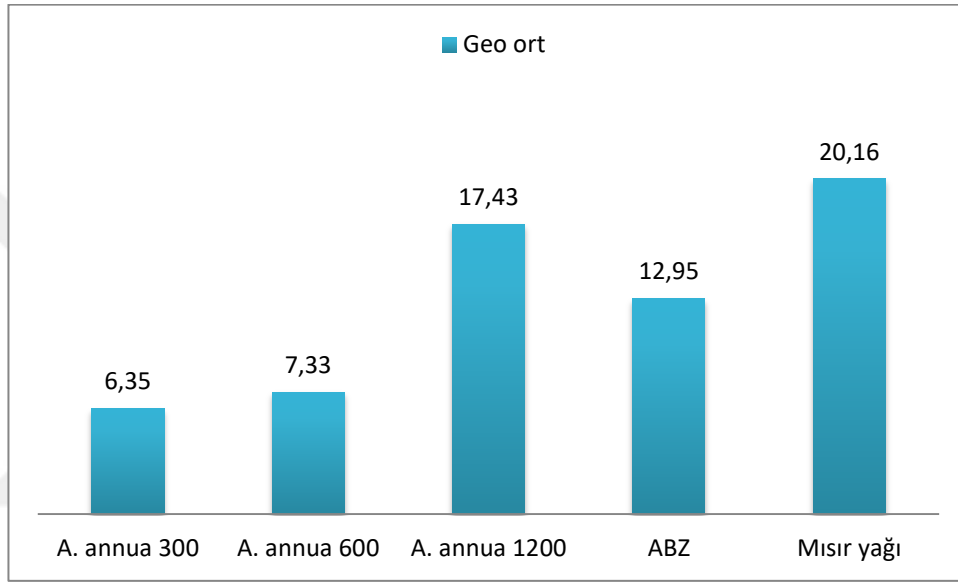
Laboratuvar farelerinin ince bağırsak, sekum ve kolonlarında toplam 808 adet oksyurid nematod bulunmuştur. Enfeksiyon bakımından taranan 250 fareden 54'ü (%21,6) en az bir nematod türü ile doğal enfekteydi. Dişi farelerde enfeksiyon oranı %16 (24 /150) iken, erkek farelerde enfeksiyon oranı %30 (30/100) ile dişilerdekinden daha yüksekti.

Nekropsi sonuçlarına göre hem toplam helmint sayısı hem de geometrik ortalamaları açısından en yüksek değerlere sahip olan mısır yağı verilen fare grubuydu. Bu durum normal olarak beklenen bir durumdu. Mısır yağı verilen grupta bulunan helmintler tür ve cinsiyetlerine göre değerlendirildiğinde toplamda 155 adet dişi *A. tetraptera* erginine rastlanmıştır. Bunların aritmetik ortalamaları 25,83 olarak hesaplanmıştır. Diğer hiçbir gruptaki dişi *A. tetraptera* sayısı bu kadar yüksek bulunmamıştır. Bunun en muhtemel nedeni mısır yağının *A. tetraptera* üzerine helmint düşürme etkisinin olmaması veya ilaç veya özüt gruplarıyla karşılaştırıldığında daha düşük olmasıdır. Bu gruptaki erkek ve dişi farelerin intestinlerinde bulunan helmintlerin toplam sayıları birbirine çok yakın bulunmuştur ve bu gruptaki farelerde her iki helmint türünün dişi ve erkeklerine de rastlanmıştır. Oysaki ABZ verilen gruptaki farelerde ilginç bir şekilde hiç erkek helminte rastlanmamıştır (Şekil 4.118).



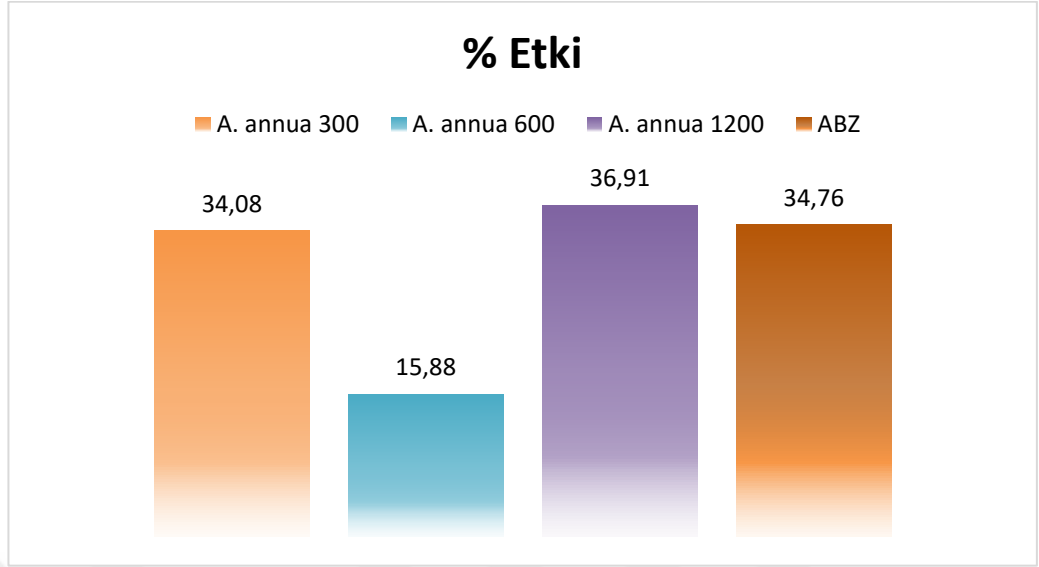
Şekil 4.118. Her bir grup farede nekropsi sonucunda bulunan helmintlerin aritmetik ortalamaları

Nekropsi sonuçlarına göre helmint sayılarının gruplardaki geometrik ortalamaları göz önüne alındığında *A. annua* n-hekzan ekstraktının dozu arttıkça helmint düşürme veya öldürme etkisi azalmaktadır (Şekil 4.119). Normalde beklenen durum bunun tam tersi olduğu için ekstrakt içindeki biyolojik aktif bileşenlerin çözücü mısır yağı içine tam olarak geçemediği düşünülebilir. Bir diğer bakış açısıyla çalışmada kullanılan fareler doğal enfekte oldukları için gruplar arası helmint dağılımı homojen değildir ve sonuçları etkileyen en önemli faktörün bu durum olduğu düşünülebilir.



Şekil 4.119. Farelerin nekropsileri sonucu bağırsaklarında bulunan helmintlerin geometrik ortalamaları

Nekropsi sonuçlarına göre fare başına düşen helmint ortalamaları göz önüne alındığında 5 mg/kg dozda uygulanan ABZ grubundaki ile Artemisia 300 grubundaki antihelmintik etkinlik hemen hemen aynı düzeyde bulunmuştur (Şekil 4.120). Sırasıyla %34,76 ve %34,08 azalma olarak saptanan bu antihelmintik etkinlik *A. annua* n-hekzan özütünün 300 mg/kg dozunun ve 5 mg/kg dozda 3 gün süreyle uygulanan ABZ'nin hafif bir etkisi olduğunu göstermektedir. *A. annua* 1200 mg/kg dozu da bunlara yakın bir etki göstermektedir (%36,91). *A. annua* 600 mg/kg dozunun da bu değerlerde olması beklenirken çok az bir azalma görülmüştür (%15,88).



Şekil 4.120. Nekropsi sonuçlarına göre % etki

Çizelge 4.15'te uygulamanın bitiminde 8. gün sevofluron anestezisi ile kalplerinden kan alınarak ötanazi edilen farelerin iç organlarından toplanan helmint sayıları grup bazında verilmektedir.

Çizelge 4.15. *A. annua* etkililiğinin araştırılmasında fare gruplarında bulunan helmint sayıları

	Nekropsideki helmint sayısı			
Uygulama	Toplam sayı	Min-Maks	Aritmetik ortalama	Etkinlik
Mısır yağı 2 ml	233	4-107	38,83	
ABZ 5 mg/kg	152	2-78	25,33	34,76
<i>A. annua</i> 300 mg/kg	128	2-115	24,5	34,08
<i>A. annua</i> 600 mg/kg	196	0-125	32,83	15,88
<i>A. annua</i> 1200 mg/kg	98	3-38	25,6	36,91

Çizelge 4.16’da nekropsilerden çıkan helmint sayıları farelerin bireysel sonuçları tablosunda gösterilmektedir.

Çizelge 4.16. Farelerin bireysel nekropsi sonuçları

Fare no	Uygulama	Dişi A. <i>tetraptera</i>	Erkek A. <i>tetraptera</i>	Dişi S. <i>obvelata</i>	Erkek S. <i>obvelata</i>	Dişi S. <i>muris</i>	Erkek S. <i>muris</i>	Değişik <i>Syphacia</i>	Toplam nematod
31D	A. <i>annua</i> 300	0		3					3
22E	A. <i>annua</i> 300	0		3		1		1	5
23E	A. <i>annua</i> 300	46	16	45	6	1		1	115
26D	A. <i>annua</i> 300	1		1					2
35E	A. <i>annua</i> 300	1		2					3
1E	A. <i>annua</i> 600	0	2						2
13E	A. <i>annua</i> 600	1		120	4				125
10E	A. <i>annua</i> 600	29	4	28				1	62
7K	A. <i>annua</i> 600	0		4				1	5
8K	A. <i>annua</i> 600	0		0					0
9K	A. <i>annua</i> 600	2							2
20E	A. <i>annua</i> 1200	0		3					3
25D	A. <i>annua</i> 1200	29	5	4					38
27D	A. <i>annua</i> 1200	10	5	12					27
29D	A. <i>annua</i> 1200	2		27	1				30
11E	Albendazole	12		20		3			35
14E	Albendazole	4		74					78
4K	Albendazole	2							2
5K	Albendazole	16	0	0	0				16
6K	Albendazole	1		17					18
3E	Albendazole	3							3
2E	Yağ	1	1	1	1				4
5E	Yağ	19	2				1		22
7E	Yağ	58	3	9	11				81
1K	Yağ	62	12	30	3				107
2K	Yağ	7		1					8
3K	Yağ	8		2				1	11

4.9.5. A. *annua* n-hekzan özütü uygulanan farelerin kan değerleri sonuçları

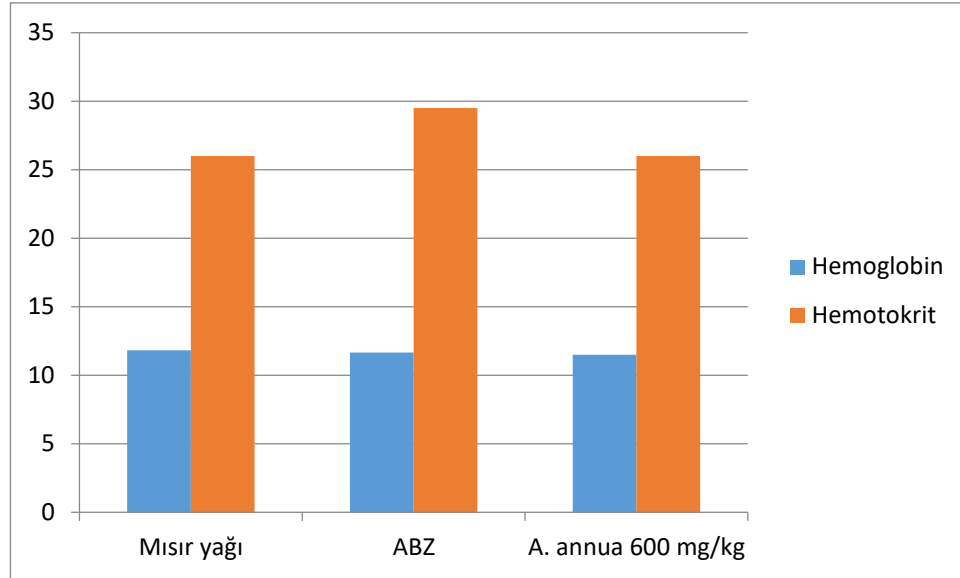
Farelerin kan değerlerinin sonuçları ABZ uygulanan gruptaki farelerin diğer gruplara göre başlangıçtan itibaren daha düşük enfeksiyona sahip olmasının hematokrit düzeylerinin diğer farelerden yüksek çıkmasına neden olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.17). Bu sonuç beklenen ile uyumludur.

Çizelge 4.17. Kan değerleri ölçülen üç grup farenin bireysel sonuçları

Fare no	Uygulama	Hemoglobin	Hematokrit
2E	Mısır yağı	13	20
5E	Mısır yağı	10	26
7E	Mısır yağı	14	30
10K	Mısır yağı	11	27
11K	Mısır yağı	13	28
12K	Mısır yağı	10	25
3E	ABZ	9	30
11E	ABZ	11	29
14E	ABZ	13	34
13K	ABZ	12	27
14K	ABZ	11	23
15K	ABZ	14	34
13E	<i>A. annua</i> 600	13	30
10E	<i>A. annua</i> 600	11	26
1E	<i>A. annua</i> 600	12	30
16K	<i>A. annua</i> 600	8	20
17K	<i>A. annua</i> 600	11	25
18K	<i>A. annua</i> 600	14	25

Fare gruplarındaki hemoglobin ve hematokrit sayılarının aritmetik ortalamalarının karşılaştırılması Şekil 4.121’de gösterilmektedir.

Daha yoğun enfeksiyona sahip oldukları hem fekal flotasyon hem de nekropsi sonuçlarına göre anlaşılan diğer iki gruptaki (çözücü kontrol olarak mısır yağı uygulanan gruptaki fareler ile 600 mg/kg dozda *A. annua* ekstraktı uygulanan gruptaki) farelerin hem hematokrit hem de hemoglobin değerleri birbirine oldukça yakın bulunmuştur. Bu durum özütün bu dozunun farelerin hemoglobin ve hematokrit sayılarını etkilemediğini göstermiştir.



Şekil 4.121. Uygulamanın 8. gününde her bir gruptaki farelerin kan değerlerinin aritmetik ortalamaları

4.9.6. *A. annua* n-hekzan ekstraktı uygulama gruplarının istatistiksel analizi

İstatistik açıdan kullanılabilecek testin seçilmesi amacıyla fekal flotasyonda sayılan parazit yumurtaları için öncelikle normallik ve uç değer kontrolleri yapılmıştır. Sonuç tablosu Çizelge 4.18’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.18. Fekal flotasyonda bulunan parazit yumurta sayıları için normalite testi

	İlaç tipi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		İstatistik	df	Sig.	İstatistik	df	Sig.
Parazit yumurtası sayısı	İçme suyu	,409	42	<,001	,519	42	<,001
	Mısır yağı	,279	48	<,001	,603	48	<,001
	ABZ	,295	36	<,001	,607	36	<,001
	<i>A. annua</i> 300	,314	36	<,001	,548	36	<,001
	<i>A. annua</i> 600	,278	42	<,001	,622	42	<,001
	<i>A. annua</i> 1200	,227	36	<,001	,687	36	<,001

a. Lilliefors Anlamlılık Düzeltmesi

A. annua deneyindeki gruplar için normalliğin sağlanamadığı anlaşılmıştır. Bu durumda yapılabilecek şeylerden biri non-parametrik testleri kullanmaktır. Karşılaştırma yapılan

gruplar içme suyu kontrol, mısır yağı, ABZ, *A. annua* 300, *A. annua* 600 ve *A. annua* 1200 gruplarıdır. Kruskal Wallis analizi sonuçları Çizelge 4.19’da verilmektedir.

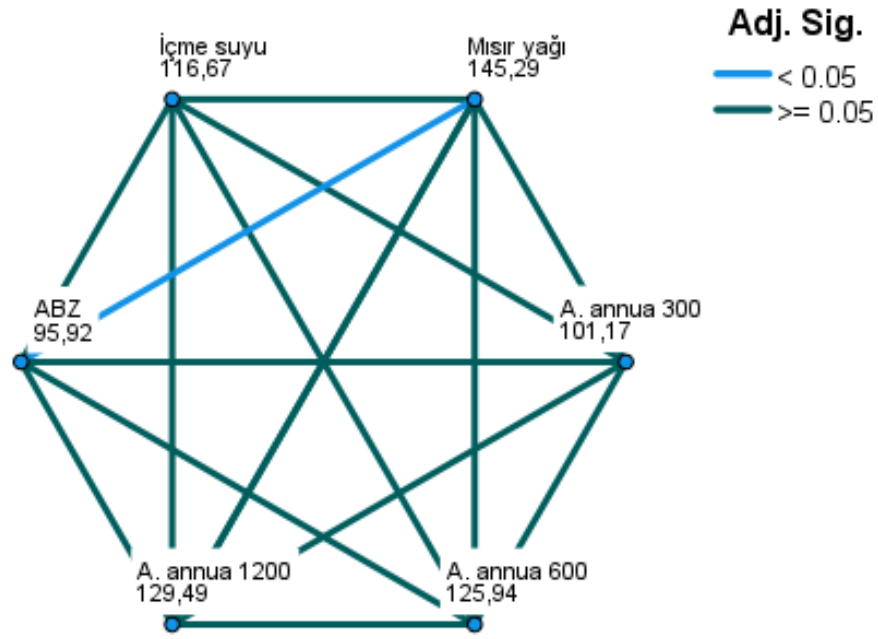
Çizelge 4.19. Kruskal Wallis testi ile ilaç tipinin iki yanlı karşılaştırılmaları

Örnek 1-Örnek 2	Test İstatistiği	Std. Hata	Std. Test İstatistiği	Sig.	Ayar. Sig. ^a
ABZ-A. annua 300	-5,250	16,352	-,321	,748	1,000
ABZ-İçme suyu	20,750	15,757	1,317	,188	1,000
ABZ-A. annua 600	-30,024	15,757	-1,905	,057	,851
ABZ-A. annua 1200	-33,569	16,352	-2,053	,040	,601
ABZ-Mısır yağı	49,375	15,296	3,228	,001	,019
A. annua 300-İçme suyu	15,500	15,757	,984	,325	1,000
A. annua 300-A. annua 600	-24,774	15,757	-1,572	,116	1,000
A. annua 300-A. annua 1200	-28,319	16,352	-1,732	,083	1,000
A. annua 300-Mısır yağı	44,125	15,296	2,885	,004	,059
İçme suyu-A. annua 600	-9,274	15,139	-,613	,540	1,000
İçme suyu-A. annua 1200	-12,819	15,757	-,814	,416	1,000
İçme suyu-Mısır yağı	-28,625	14,658	-1,953	,051	,763
A. annua 600-A. annua 1200	-3,546	15,757	-,225	,822	1,000
A. annua 600-Mısır yağı	19,351	14,658	1,320	,187	1,000
A. annua 1200-Mısır yağı	15,806	15,296	1,033	,301	1,000

Her bir satır için Ho hipotezi Örnek 1 ve Örnek 2’nin dağılımlarının aynı olduğudur. Aseptomatik anlamlılıklar (2-yönlü testler) gösterilmektedir. Anlamlılık seviyesi 0,05.

a. Anlamlı değerler çoklu testler için Bonferroni düzeltme ile ayarlanır

Çizelge 4.19’a göre fekal flotasyonda sayılan yumurtalar açısından sadece ABZ ile mısır yağı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($P=0,019$) saptanmıştır. Bu sonuç üç farklı dozda uygulanan *A. annua* n-hekzan özütlerinin *A. tetraptera* yumurta sayıları üzerinde önemli bir etkisi olmadığını göstermiştir. Uygulama grupları arasındaki istatistiksel bağıntı Şekil 4.122’de gösterilmektedir.



Şekil 4.122. Fekal flotasyondaki uygulama gruplarında ayarlanan anlamlılıklar (Adj. Sig.) açısından bağıntılar

Selofan bant üzerinde sayılan *S. obvelata* yumurta sayılarının gruplar arasında karşılaştırılması için yine ilk olarak normallik ve uç değer kontrolleri yapılmıştır (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20. Selofan bantta bulunan *S. obvelata* yumurta sayıları için normalite testi

	İlaç tipi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		İstatistik	df	Sig.	İstatistik	df	Sig.
S. obvelata yumurta sayısı	İçme suyu	,359	42	<,001	,387	42	<,001
	Mısır yağı	,250	48	<,001	,698	48	<,001
	ABZ	,294	36	<,001	,615	36	<,001
	A. annua 300	,325	36	<,001	,500	36	<,001
	A. annua 600	,314	42	<,001	,566	42	<,001
	A. annua 1200	,347	36	<,001	,435	36	<,001

a. Lilliefors Anlamlılık Düzeltmesi

Çizelge 4.20'ye göre normal dağılım olmadığı için non-parametrik one way ANOVA testi Kruskal Wallis kullanılmıştır. Çizelge 4.21'de sonuçlar yer almaktadır.

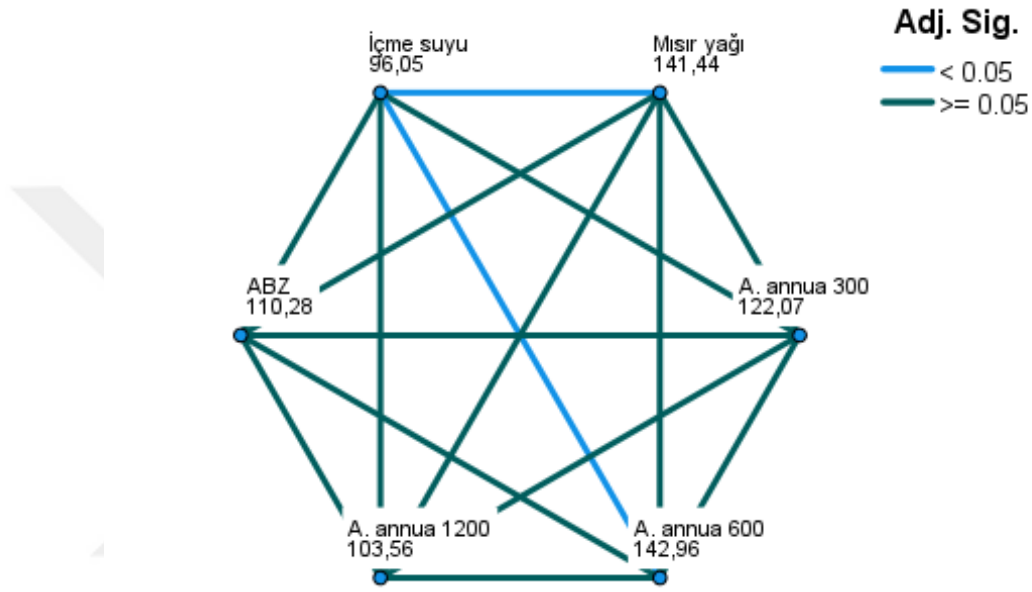
Çizelge 4.21. Selofan bantta sayılan yumurtaların ilaç tipine göre iki-yanlı karşılaştırmaları

Örnek 1-Örnek 2	Test İstatistiği	Std. Hata	Std. Test İstatistiği	Sig.	Ayar. Sig. ^a
İçme suyu-A. annua 1200	-7,508	15,300	-,491	,624	1,000
İçme suyu-ABZ	-14,230	15,300	-,930	,352	1,000
İçme suyu-A. annua 300	-26,022	15,300	-1,701	,089	1,000
İçme suyu-Mısır yağı	-45,390	14,233	-3,189	,001	,021
İçme suyu-A. annua 600	-46,917	14,700	-3,192	,001	,021
A. annua 1200-ABZ	6,722	15,877	,423	,672	1,000
A. annua 1200-A. annua 300	18,514	15,877	1,166	,244	1,000
A. annua 1200-Mısır yağı	37,882	14,852	2,551	,011	,161
A. annua 1200-A. annua 600	39,409	15,300	2,576	,010	,150
ABZ-A. annua 300	-11,792	15,877	-,743	,458	1,000
ABZ-Mısır yağı	31,160	14,852	2,098	,036	,539
ABZ-A. annua 600	-32,687	15,300	-2,136	,033	,490
A. annua 300-Mısır yağı	19,368	14,852	1,304	,192	1,000
A. annua 300-A. annua 600	-20,895	15,300	-1,366	,172	1,000
Mısır yağı-A. annua 600	-1,527	14,233	-,107	,915	1,000

Her bir satır için Ho hipotezi Örnek 1 ve Örnek 2'nin dağılımlarının aynı olduğudur. Aseptomatik anlamlılıklar (2-yönlü testler) gösterilmektedir. Anlamlılık seviyesi 0,05. a. Anlamlı değerler çoklu testler için Bonferroni düzeltme ile ayarlanır

A. annua 600 grubu ile içme suyu grubu arasında ve içme suyu (negatif kontrol) ile çözücü kontrol (mısır yağı: ikinci negatif kontrol) grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (her ikisi için de P = 0, 021). A. annua n-hekzan özütlerinin 300 ve 1200 mg/kg dozlarının uygulandığı gruplarda ve ilaç kontrol ABZ 5 mg/kg gruplarında

anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Gruplar arası istatistik bağıntı şeması Şekil 4.123'te gösterilmektedir. Boncuk mavisi çizgiler gruplar arası anlamlı fark olduğunu, koyu yeşil çizgiler ise olmadığını işaret etmektedir. İlginç olarak şemadaki ortalamalar dikkate alındığında *A. annua* 600 grubunda azalma değil içme suyu grubuna kıyasla *S. obvelata* yumurta ortalamalarında artış olduğu saptanmıştır. Aynı artış mısır yağı grubu için de söz konusudur.



Şekil 4.123. Selofan bant uygulama gruplarında ayarlanan anlamlılıklar (Adj. Sig.) açısından bağıntılar

Nekropsilerden sonra çıkarılan helmintlerin sayıları açısından normal dağılımın araştırıldığı aşağıdaki Çizelge 4.22 diğer çizelgelerden farklıdır. Bu çizelgede Shapiro-Wilk testine göre *A. annua* 600, *A. annua* 1200, ABZ ve Mısır yağı gruplarında normal dağılım gözlenmiştir. Sadece *A. annua* 300 grubunda normal dağılım sağlanamamıştır.

Çizelge 4.22. Nekropside bulunan helmint sayıları için normalite testi

	İlaç tipi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		İstatistik	df	Sig.	İstatistik	df	Sig.
helmint	<i>A. annua</i> 300	,460	5	<,001	,572	5	<,001
	<i>A. annua</i> 600	,372	6	,009	,725	6	,011

Çizelge 4.22. Nekropside bulunan helmint sayıları için normalite testi (devam)

A. annua 1200	,316	4	.	,885	4	,362
ABZ	,268	6	,200*	,831	6	,110
Mısır yağı	,316	6	,062	,797	6	,055

*. Bu gerçek anlamlılığın bir alt sınırıdır.

a. Lilliefors Anlamlılık Düzeltmesi

Nekropsi sonucu her bir farenin iç organlarından toplanan helmintlerin sayıları karşılaştırıldığında Levene istatistiklerine göre varyans homojenliği kabul edilemez (Çizelge 4.23).

Çizelge 4.23. Helmint sayılarının karşılaştırılmasında Levene Testi

		Levene İstatistik	df1	df2	Sig.
helmint	Ortalamalara dayalı	1,699	4	22	,186
	Ortadaki sayıya dayalı	,288	4	22	,883
	Ortadaki sayıya ve ayarlanan serbestlik derecesine (df) dayalı	,288	4	15,531	,882
	Trimmed ortalamaya dayalı	1,334	4	22	,289

Ho hipotezi bağımsız değişkenin hata varyansının karşı gruplara denk olduğudur

a. Bağımlı değişken: helmint

b. Tasarım: Intercept + ilac_tipi

ANOVA, gruplardaki birey sayıları eşit olduğunda normallik ve grup varyans homojenliği varsayımı ihlallerine dirençlidir. Ancak bu çalışmada uygulama yapılan farelerin bazıları sekizinci günden önce öldükleri için gruplardaki fare sayıları son durumda eşit değildi. Gruplardaki fare sayıları (N) ve gruplarda bulunan helmint sayılarının ortalaması Çizelge 4.24'te verilmektedir.

Çizelge 4.24. Nekropsideki helmint sayıları için tanımlayıcı istatistikler

Bağımlı değişken: helmint			
İlaç tipi	Ortalama	Std. Sapma	N
A. annua 300	25,60	49,988	5
A. annua 600	32,67	51,185	6
A. annua 1200	24,50	15,067	4
ABZ	25,33	28,465	6
Mısır yağı	38,83	43,925	6
Toplam	29,89	38,397	27

Varyanslar eşit değilse seçilebilecek posthoc testleri Tamhane T2 veya Tamhane T3, Dunnet's C, Dunnets T3 ve Games-Howell oldukları için öncelikle Tamhane 2 testi denenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.25'te verilmiştir.

Çizelge 4.25. Tamhane 2 testine göre çoklu karşılaştırmalar

(I) ilaç tipi	(J) ilaç tipi	Ortalama Farklılık		Sig.	%95 Güven aralığı	
		(I-J)	Std. Hata		En alt sınır	En üst sınır
A. annua 300	A. annua 600	-7,07	30,601	1,000	-120,61	106,48
	A. annua 1200	1,10	23,590	1,000	-112,66	114,86
	ABZ	,27	25,195	1,000	-107,13	107,66
	Mısır yağı	-13,23	28,659	1,000	-122,07	95,60
A. annua 600	A. annua 300	7,07	30,601	1,000	-106,48	120,61
	A. annua 1200	8,17	22,212	1,000	-85,70	102,04
	ABZ	7,33	23,910	1,000	-84,63	99,30
	Mısır yağı	-6,17	27,536	1,000	-105,00	92,67
A. annua 1200	A. annua 300	-1,10	23,590	1,000	-114,86	112,66
	A. annua 600	-8,17	22,212	1,000	-102,04	85,70
	ABZ	-,83	13,849	1,000	-54,17	52,51
	Mısır yağı	-14,33	19,450	,999	-94,41	65,74

Çizelge 4.25. Tamhane 2 testine göre çoklu karşılaştırmalar (devam)

ABZ	A. annua 300	-,27	25,195	1,000	-107,66	107,13
	A. annua 600	-7,33	23,910	1,000	-99,30	84,63
	A. annua 1200	,83	13,849	1,000	-52,51	54,17
	Mısır yağı	-13,50	21,368	1,000	-93,22	66,22
Mısır yağı	A. annua 300	13,23	28,659	1,000	-95,60	122,07
	A. annua 600	6,17	27,536	1,000	-92,67	105,00
	A. annua 1200	14,33	19,450	,999	-65,74	94,41
	ABZ	13,50	21,368	1,000	-66,22	93,22

Gözlenen ortalamalara dayalı

Hata terimi Ortalamanın Karesidir(Hata) = 1703,350

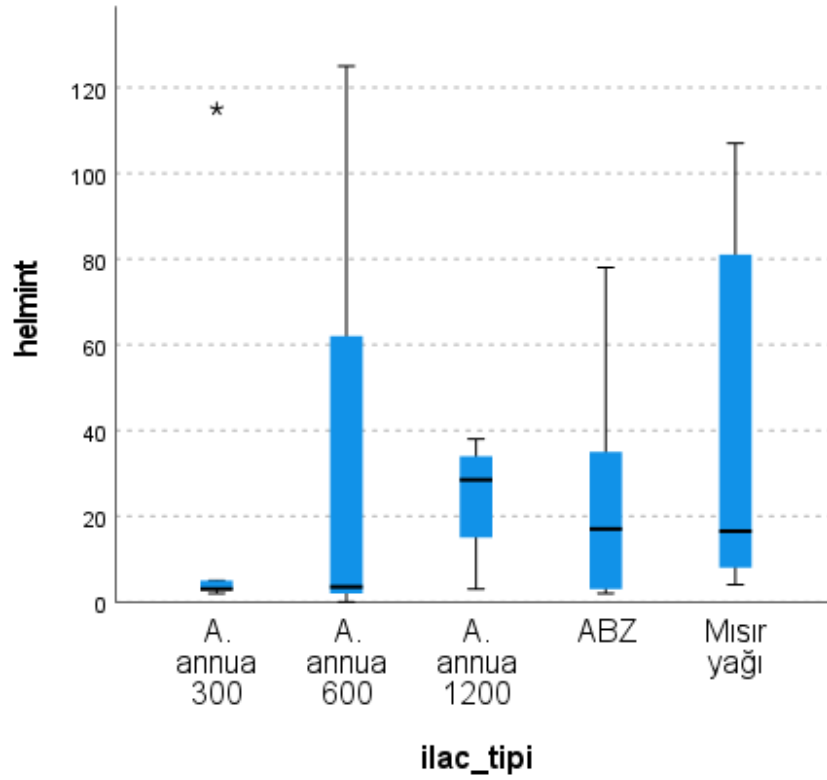
Tamhane 2 testinin sonuçlarına göre nekropsiden çıkan helmint sayıları açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur.

Nekropside bulunan helmintlerin ilaç türüne göre anlamlı derecede bir azalma göstermediği Kruskal Wallis testi ile de anlaşılmıştır (Çizelge 4.26). Bağımsız örneklerin karşılaştırılması için oluşturulan Şekil 4.124'e göre grup ortalamaları ile standart sapmalar arasında çok ciddi fark vardır ve bunun en belirgin örneği *A. annua* 600 grubudur. Grup içindeki enfeksiyon dağılımının en baştan beri çok farklı olması bu sonucu doğurmuştur. Nekropsi sonuçlarına göre özütlerden beklenen etki görülmemiştir.

Çizelge 4.26. Bağımsız-Örnekler Kruskal-Wallis Test Özeti

Toplam N	27
Test İstatistiği	2,590 ^a
Serbestlik derecesi	4
Aseptomatik Sig.(2-yönlü test)	,629

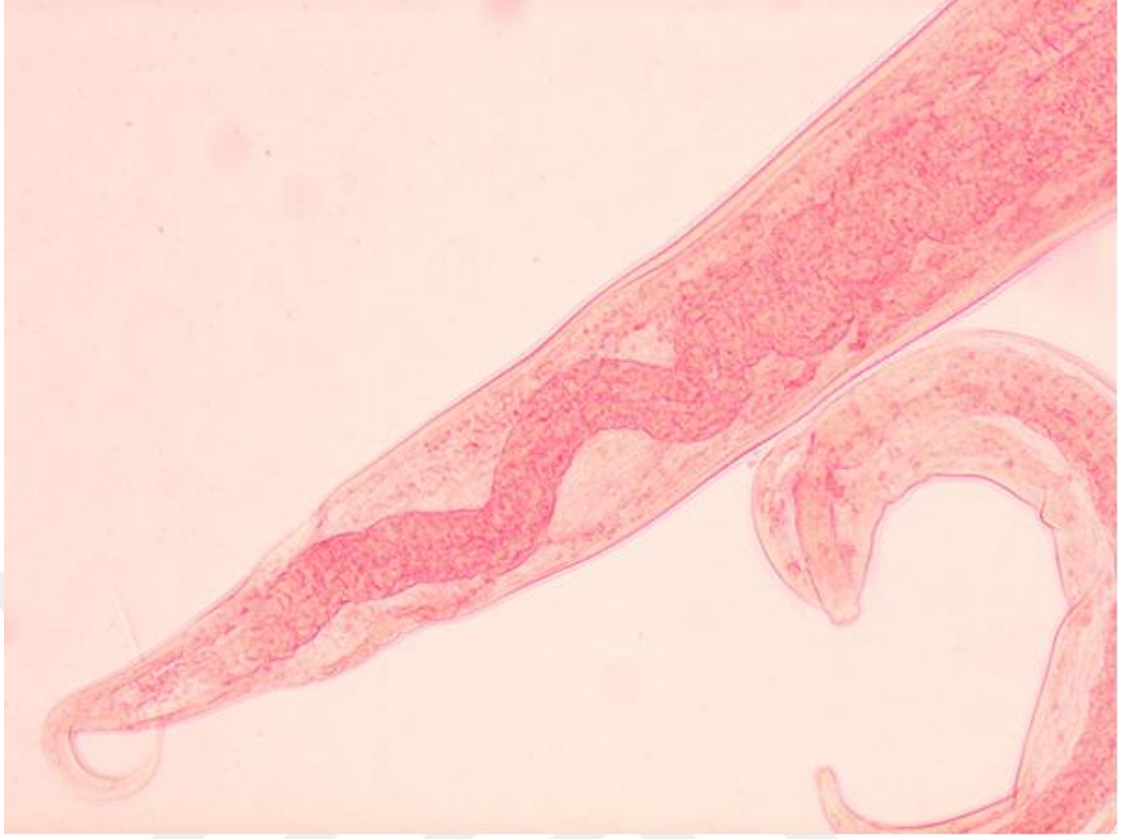
a. Test istatistiği bağlantılar için ayarlandı



Şekil 4.124. Kruskal Wallis ile nekropside bulunan helmintlerin ilaç gruplarındaki karşılaştırmaları

4.9.7. *A. annua* n-hekzan ekstraktı uygulanan farelerde bulunan helmintlerde gözlemlenen morfoloji ve anatomi

A. annua özüt uygulaması sonrası farelerin nekropsilerinden elde edilen çeşitli nematodlardan bazılarının resimleri aşağıda verilmiştir. Bu nematodların tümü, resimleri çekildikten sonra entellan ile kapatılarak daimi preparat haline getirilmiştir. İncelenen nematodlarda dikkat çekici bir özellik *S. obvelata* veya *S. muris* türlerinin bazılarının erişkin formlarının hiç yumurta bulundurmamasıydı. Bu kılkırtlarında kıvrık bir posteriora rastlansa bile spikül, mameleon veya testis benzeri yapıların görülmemesi erkek birey olmadıklarını da düşündürmektedir. Şekil 4.125'te kıvrık bir posteriora sahip ancak yumurta içermeyen bir *Syphacia* cinsi erişkin nematod ve hemen yanında yavru bir nematod görülmektedir.



Şekil 4.125. *A. annua* n-hekzan ekstraktının 600 mg/kg dozda uygulandığı 10 nolu erkek farenin bağırsağından çıkan *S. obvelata* ergin ve yavru nematodlara ait mikroskop görüntüsü (10x büyütmede, Olympus mikroskopta alındı)

Şekil 4.126’da *A. annua* 600 mg/kg uygulamasına maruz kalan bir farenin özafagusunda bulunan bir *S. obvelata* erişkin helminti görülmektedir. Bu örneğin bulunduğu 11 nolu fare kılkırtıları ile yoğun olarak enfekteydi ve çekumdan çok sayıda *S. obvelata* ergini çıkarılmıştır. Şekil 4.126’daki helmintte hiç yumurta bulunmaması da dikkat çekicidir.



Şekil 4.126. *A. annua* n-hekzan ekstraktının 600 mg/kg dozda uygulandığı 11 nolu farenin özofagusundan çıkan *S. obvelata* ergin nematoduna ait mikroskop görüntüsü (5x büyütmede, Olympus mikroskopta alındı)

A. annua n-hekzan özütünün 600 mg/kg uygulamasında nekropsiden çıkarılan *Syphacia* cinsi dişi kılkırtlarının yumurta içermemesi her ne kadar özütün yumurta üretilmesi üzerine etkisi olduğunu gösterse bile fekal flotasyonda yumurtalara rastlanması kesin bir yorum yapılmasını güçleştirmektedir.

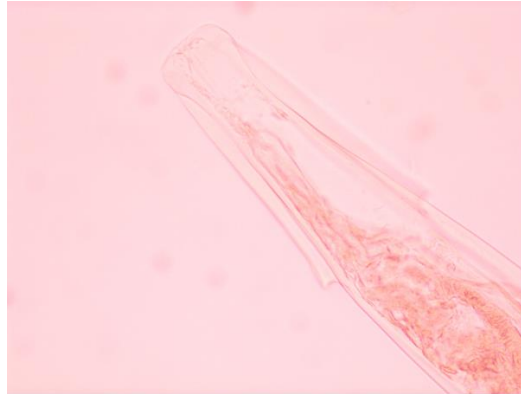
4.9.8. Albendazole 5 mg/kg dozda uygulanan farelerin nekropsilerinde toplanan helmintlerin morfolojilerindeki değişimler

ABZ 5 mg/kg uygulamasının helmint morfolojilerine önemli bir etkisi olmadığı ve bazı dişi kılkırtlarının çok sayıda yumurta içermeye devam ettiği nekropsisi sonrası incelenen çok sayıda helmintin morfolojileri ve anatomilerinden anlaşılmıştır. Şekil 4.127’de gösterilen *A. tetraptera* örneğinde gövde çok sayıda yumurta ile doludur.



Şekil 4.127. Albendazol'un 5 mg/kg dozda uygulandığı 3 nolu erkek farenin nekropsisinde çıkan erişkin bir *A. tetraptera* dişisine ait gövdenin medianı. Bu örnek için yorumlandığında; yumurtaların çok sayıda oluşu üç günlük ilaç uygulamasının yumurta oluşumunu azaltmadığını göstermektedir

Nekropsi sonunda çıkarılan kılkurtlarının boyutları birbirinden farklı olmakla beraber türlerin teşhisinde yardımcı olan yumurta biçimleri, servikal alae ve kuyruk yapılarının karakteristik biçimleri özellikle dişi ve erkek *A. tetraptera* bireylerinin ayrımında anahtar rolü oynamıştır. Bu özellikler tüm helmintlerde benzerlik göstermiştir. Şekil 4.128'de gösterildiği gibi dişi *A. tetraptera*'larda servikal alae oldukça belirgindir.



Şekil 4.128. Albendazol'un 5 mg/kg dozda uygulandığı 3 nolu erkek farenin nekropsisinde çıkan erişkin bir dişi *A. tetraptera* başı (40 x büyütmede). Bu türün karakteristiği olan duvak benzeri servikal alae oldukça belirgindir

Bunun yanısıra tüm dişi *A. tetraptera*'ların gövdelerinde çok sayıda yumurta taşıdıkları görülmüştür. Bu sonuç hem özüt hem de ilacın *A. tetraptera* yumurtaları üzerinde antihelmintik bir etki göstermediklerine işaret etmektedir. Ne var ki *S. obvelata* için bulunan sonuçlar bunun aksidir. İncelenen örneklerin çoğunda hiç yumurta içermeyen erişkin *Syphacia* cinsi dişiler görülmüştür. Bunların hem boyutları hem de özafagusun konumu birbirinden farklıydı. Bu nedenle türlerini tespit etmek oldukça zordu. *S. muris*'e ait yumurtalar *S. obvelata*'nınakilere kıyasla biraz daha küçük olmakla beraber bu dişiler hem yumurta içermedikleri, hem de vulvanın konumu resimlerde görülemediği için *S. muris* mi yoksa *S. obvelata* mı olduğu kesinleştirilememiştir. Bu iki türün ayırımında vücut büyüklüğü de bir gösterge olarak kullanılabilirse de bulunan nematodların gelişimlerinin hangi aşamasında olduğu bilinemediği için vücut büyüklüğü bir kriter olarak alınmadı. Erkekleri ise fertilizasyondan sonra atıldığı için nekropside çok az sayıda erkeğe rastlanmıştır. Ancak *A. tetraptera* erkekleri spesifik kuyruk yapıları ile kolayca tanınmış ve pek çok *A. tetraptera* bireyi sayılmış ve resimleri çekilmiştir.

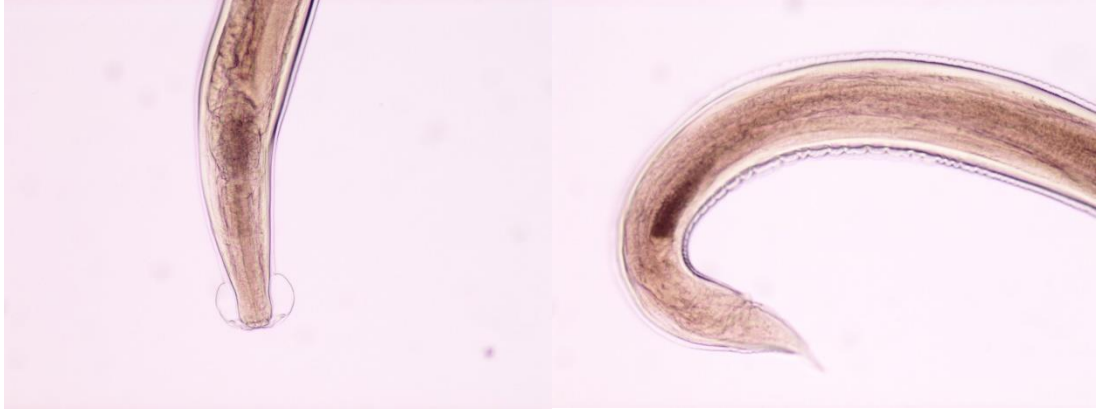
4.9.9. Mısır yağı uygulaması sonucu farelerin nekropsilerinde görülen helmintlerin morfolojileri

Mısır yağı verilen farelerin nekropsilerinden çıkan nematodlarda da ABZ grubunda olduğu gibi hiç yumurta içermeyen pek çok *Syphacia* cinsi kılkurdu görülmüştür. Bunların biri aşağıdaki resimde gösterilmektedir (Şekil 4.129). Resimde hem vulva hem de spikül görülmemekte ve türün cinsiyeti konusunda kesin bir şey söylenememektedir. Yalnız ağız yapısı ve özafagusun konumu *Syphacia* türlerine benzerlik gösterdiği ve fekal flotasyonda bu türlere ait yumurtalar görülmüş olduğu için *Syphacia muris* veya *S. obvelata* olduğu tahmin edilmiştir.



Şekil 4.129. Mısır yağı uygulanan bir erkek farenin nekropsisinden çıkan ve yumurta içermeyen bir kılkurdu

İncelen örneklerde dikkat çekici bir sonuç labiayı çevreleyen alae yapısının oldukça farklı biçimlerde gelişmiş olmasıdır. Bazı *A. tetraptera* örneklerinde çok gelişmiş yarım ay şeklinde bir alae görülürken (Şekil 4.130), bazı örneklerde dudak çevresindeki alae hafifçe bombe yapmış, bazı örneklerde ise enteresan şekilde asimetrik olarak gelişmiştir. İncelenen helmintlerde *A. tetraptera* örneklerinin büyük çoğunluğunda labiayı çevreleyen alae yapısının bombeli halde bulunduğu ve bazı erkek bireylerde yarım ay şeklinde oldukça iyi geliştiği ancak bu bireylerde servikal alaenin gelişmediği görülmüştür (Şekil 4.130).



Şekil 4.130. *A. tetraptera* erkeği. Solda anterior, sağda ise posterioru gösterilmektedir

Syphacia türlerinde ise genellikle gelişmiş bir alae yapısı hiç görülmezken bir örnekte asimetrik alae yapısına rastlanmıştır (Şekil 4.131). Literatür araştırmasına göre bu oldukça nadir bir durumdur ve literatürde bunun örneğine rastlanmamıştır.

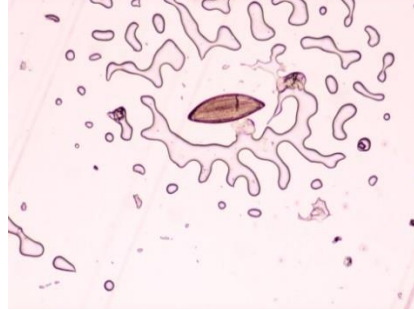


Şekil 4.131. Mısır yağı verilen fare grubunun nekropsisi sonucu elde edilen *Syphacia* cinsi bir oksyurid nematod. 10x büyütmede yumurtalar içeren gövdenin bir bölümü gösterilmektedir

4.9.10. *O. vulgare* subsp. *hirtum* uçucu yağı (OUY) uygulamasının perianal bant ve fekal flotasyon sonuçları

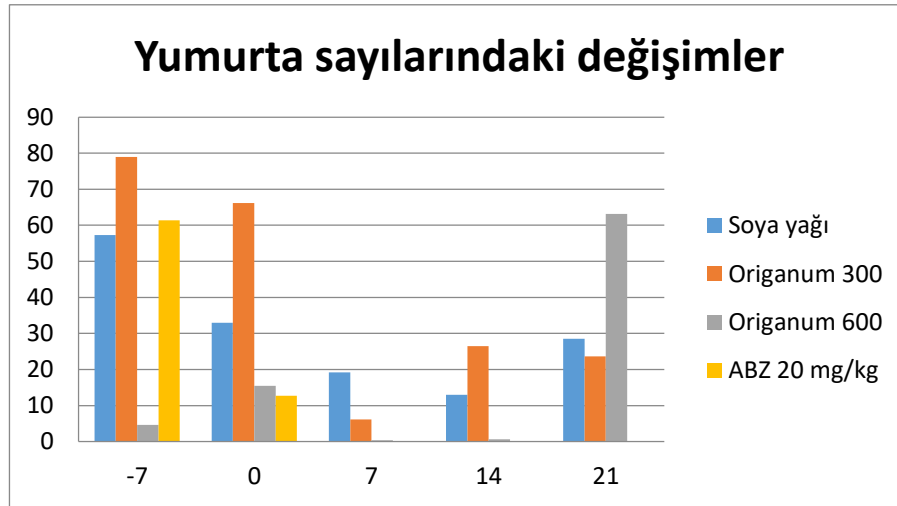
Yedi gün boyunca OUY uygulanması sonucu farelerin anüsleri etrafında bulunan *S. obvelata* yumurtaları perianal bant yöntemi ile toplanmış ve mikroskopta muz biçimli

parazit yumurtaları araştırılarak bulunan yumurtalar sayılmıştır. *S. obvelata* yumurtalarından birinin selofan üzerindeki görünümü Şekil 4.132’de verilmiştir.



Şekil 4.132. Selofan bantta görülen bir *S. obvelata* yumurtası

Perianal bant yöntemi ile sayılan *S. obvelata* yumurtalarının aritmetik ortalamaları Şekil 4.133’te verilmiştir. Çözücü kontrol olarak soya yağı verilen grup ile ilaç kontrol olarak ABZ’nin 20 mg/kg dozda birer gün arayla üç gün verildiği gruptaki bulunan parazit yumurtası sayıları arasında 7. günden itibaren önemli bir fark ortaya çıkmıştır. Böyle bir farkın görülmesi beklenen bir durumdur. Soya yağı verilen farelerde 14. güne kadar parazit yumurtası sayısında devamlı bir azalma görülmesi bu yağın laksatif etkisinden dolayı parazitlerin kısmen atılmış olabileceğini veya soya yağının tek başına antihelmintik bir etkisi olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.133. Farklı günlerde yapılan bakılar sonucu sayılan *S. obvelata* yumurtalarının aritmetik ortalamaları

Bu yapılan bakılar sonucu uygulamanın 7. gününde tüm gruplarda yumurta sayısında önemli bir azalma fark edilmiştir. Bu azalma % olarak ele alındığında, uygulama öncesi -7. ve 0. günlerin ortalaması ile kıyaslandığında %99 ile ABZ uygulanan grupta görülmüştür. Bunu OUY 600 grubu %80 ile takip etmiştir. Bu sonuçlar literatür ve uygulanan dozlar ile uyumludur. 14. günkü bakıda ABZ grubunda hiç yumurta sayılmazken OUY uygulanan gruplarda ise 7. güne kıyasla artış görülmesine rağmen hiç uygulama yapılmayan -7. ve 0.günlerdeki sayılan yumurta sayısı ile kıyaslandığında yine de başlangıca göre önemli oranda bir azalma mevcuttur. Bu durum OUY'nin uygulamadan 7 gün sonra dahi etkisini sürdürdüğünü göstermektedir. İlginç olarak 21. günkü bakılarda OUY 600 uygulanan farelerdeki *S. obvelata* yumurtası sayısında ciddi bir artış görülmüştür (Çizelge 4.27).

Çizelge 4.27. Farklı günlerde yapılan bakılar sonucu sayılan parazit yumurtalarının aritmetik ortalamaları

Uygulama	-7. gün	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün
Soya yağı	57,3	33	19,2	13	28,5
OUY 300 mg/kg	79	66,2	6,2	26,5	23,7
OUY 600 mg/kg	4,7	15,5	0,3	0,7	63,2
ABZ 20 mg/kg	61,4	12,8	0,1	0	0

21. gün ABZ grubunda hiç yumurta bulunmazken, ABZ dışındaki tüm gruplarda 7. güne kıyasla bir artış görülmüştür. Bunun en muhtemel sebebi OUY ve soya yağının helmintlerin üzerinde vermifüj etki göstermelerine rağmen %100 bir verimlilik etki göstermemesidir. Uygulama öncesi -7. ve 0. günlerde ise yumurta sayılarının pek fazla değişim göstermemesi beklenirken üç grupta azalma görülmüştür. ABZ grubunda ise bu iki gün arasında önemli bir fark olması uygulamaya başlamadan önce görülen bu azalmanın *in vivo* koşullara bağlı olarak ortaya çıkan durumlardan biri olduğunu göstermektedir. OUY uygulamasının yapıldığı deney gruplarındaki farelerin bireysel sonuçları Çizelge 4.28'de gösterilmektedir. Çizelgedeki tüm fareler -7. gün öncesinde

A. tetraptera veya *S. obvelata* ile enfekte olmalarına rağmen bazı farelerde selofan bantta hiç *S. obvelata* yumurtası görülmemiştir.

Çizelge 4.28. OUY uygulamasında farelerin bireysel selofan bant sonuçları

Fare no	-7. gün	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün
soya 1	0	0	0	0	0
soya 2	0	48	0	50	0
soya 3	0	6	81	5	0
soya 4	324	22	28	17	0
soya 5	10	35	4	3	161
soya 6	10	87	2	3	10
OUY 300 7	37	320	15	85	0
OUY 300 8	0	6	0	67	0
OUY 300 9	194	3	11	5	32
OUY 300 10	227	33	1	0	5
OUY 300 11	5	0	4	0	16
OUY 300 12	11	35	6	2	89
OUY 600 13	10	81	0	4	0
OUY 600 14	5	0	2	0	351
OUY 600 15	0	0	0	0	0
OUY 600 16	0	11	0	0	0
OUY 600 17	3	1	0	0	10
OUY 600 18	10	0	0	0	18
ABZ 19	127	13	0	0	0
ABZ 20	24	48	0	0	0
ABZ 21	128	29	0	0	0
ABZ 22	149	12	0	0	0
ABZ 23	0	0	0	0	0
ABZ 24	60	0	0	0	0
ABZ 25	3	0	0	0	0
ABZ 26	0	0	1	0	0

Bu çalışmada antihelmintik olduğu bilinen *A. annua* bitkisine ait n-hekzan özütü, nekropsi sonuçlarına göre literatüre uyumlu bir antihelmintik etki göstermediği için, OUY etkisinin araştırıldığı deneyde nekropsi yapılmadı ve fareler yaşatıldılar. Gavaj uygulaması sırasında fareler strese girdikleri, bu durum immün sistemi ve çalışma sonuçlarını etkilediği için OUY yemlerine katılarak verilmiştir. Fareler ayrı kafeslere ayrılarak yemleri verildiği için, farelerin yemleri yediği gözlenebilmiştir. Bu çalışmada iki farklı çözücü kullanılmıştır. *A. annua* özütünün seyreltilmesinde mısır yağı, OUY

için ise soya yağı kullanılmıştır. Mısır yağı, *A. annua* özütlerinin verildiği şekilde gavaj ile verilmiştir. Fareler yeme sürülen mısır yağın yemek istemezlerken, soya yağı sürülen yemleri iştahla yedikleri gözlemlenmiştir. Literatüre göre antihelmintik ilaçların uygulanması amacıyla soya yağı da mısır yağı da öncelikli olarak tercih edilmektedir (Harvey, 1996). Bu tez çalışmasında ise bu tür ilaç ve özüt uygulamalarında soya yağının tercih edilmesi daha doğru bulunmuştur. Yine literatüre göre 5 mg/kg dozda ABZ uygulaması farelerde helmintlerin elimine edilmesinde akciğerde bulunabilen *Metastrongylus apri* üzerinde yaklaşık %32,6 oranında etkili bulunurken (Ferguson, 1981), mevcut çalışmada ABZ'nin 5 mg/kg dozunun ayçiçek yağında emülsifiye edilerek 3 gün uygulanması %42'lik (nekropsi sonuçlarına göre aritmetik ortalama alındığında) bir etkililiğe sahip olduğu bulunmuştur. Bu sonuç 5 mg/kg'lık dozun 3 gün uygulanmasının yetersiz olduğunu göstermekle beraber mısır yağının etkisine de bağlanabilir. 20 mg/kg dozda 3 gün uygulanan ABZ soya yağında emülsifiye edilip yemlerine katılarak verildiğinde ise (anal bant sonuçlarına göre) %100'lük bir antihelmintik etki göstermiştir. Gavaj uygulaması hayvanları irrite ettiği için ilk ilaç uygulama grubunda (ABZ 5 mg/kg) beklenen sonuç gözlenmemesine rağmen, yemlerine katılan ve 4 misli yüksek doz uygulanan farelerde beklenen etki gözlenmiştir. ABZ için 20 mg/kg doz insanlarda antinematodal olarak kullanılması tavsiye edilen dozun 2 mislidir. Ancak bu çalışmada 20 mg/kg dozun hayvanlar üzerinde bir yan etkisi gözlenmemiştir. Bu çalışma sonunda hayvanların dış görünüşleri, çeviklikleri, uysallıkları ve genel sağlık durumlarının çalışma başlangıcından daha iyi oldukları gözlemlenmiştir. Buna, hayvanların tutuldukları şartların etkisi olmakla beraber (12 saat aydınlık/karanlık periyod, özel olarak sterile edilen suluklardan temiz suya ulaşmaları, daima çalışan ventilasyonun yanı sıra her gün temiz hava girişi ve 2-3 günde bir talaşlarının değiştirilip kafeslerin steril edilmesi), stresi azaltılmış bir uygulama şekli ve verilen maddelerin kalitesi de etki etmiş olabilir. OUY grubundaki fareler Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Histoloji Laboratuvarında bakılmıştır. Burada hayvanların bakımı ve tutuldukları şartlar literatüre ve hayvan refahına uygundu. Burada hasta fareler bile iyileşti. *A. annua* grubundaki fareler ise Deney Hayvanları Merkezinde ayrılan bir odada bakılmıştır. Burada tutulan farelerin bir kısmı daha deney başlamadan ölmüştür. Geri kalan fareler OUY uygulaması için Histoloji Laboratuvarına taşınmıştır.

OUY'nin 300 mg/kg ve 600 mg/kg dozlarda yedi gün boyunca verildiği bu farelerde uygulama sonrası yirmi bir gün boyunca gözlemlenebilir bir yan etkiye rastlanmamıştır. OUY oldukça keskin ve irrite edici özellikte olduğundan bunun 4 ml'ye kadar soya yağı ile tamamlanması, farelerin yemleri ile beraber yemeleri için yeterli olmuştur. Böylece fareler strese girmeden ve aç kalmadan uygulama yapılmıştır.

4.9.11. OUY uygulamasının istatistiksel sonuçları

ABZ'nin 20 mg/kg dozda birer gün arayla üç gün uygulandığı farelerde perianal banttaki yumurta sayısında, beklendiği gibi, %100 azalma görülmüştür. 7. günün sonunda ve ilerleyen tüm bakılarda parazit yumurtasına hiç rastlanmamıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da bu durumun parazit yumurta sayısının gruplar arasında eşit (homojen) dağılım göstermemesinden kaynaklandığı düşünülebilir. Normalitenin araştırıldığı istatistiksel analizin sonuçları Çizelge 4.29'da verilmiştir.

Çizelge 4.29. OUY uygulamasında selofan bantta bulunan *S. obvelata* yumurta sayıları için normalite testi

	İlaç tipi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		İstatistik	df	Sig.	İstatistik	df	Sig.
<i>S. obvelata</i> yumurta sayısı	ABZ 20 mg/kg	,356	30	<,001	,542	30	<,001
	Soya yağı	,323	30	<,001	,512	30	<,001
	Origanum 300	,317	30	<,001	,584	30	<,001
	Origanum 600	,436	30	<,001	,277	30	<,001

a. Lilliefors Anlamlılık Düzeltmesi

Daha güvenilir olması nedeniyle Shapiro-Wilk testinin sonuçları dikkate alındığında gruplarda normal dağılımın olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca Levene istatistiğine göre varyanslar homojen değildir. Bu nedenle tek yönlü ANOVA testinin yanı sıra Kruskal Wallis testi de uygulanmıştır (Çizelge 4.30).

Çizelge 4.30. OUY deneyinde selofan bantta sayılan yumurtaların ilaç tipine göre iki-yanlı karşılaştırmaları

Örnek 1-Örnek 2	Test İstatistiği	Std. Hata	Std. Test İstatistiği	Test Sig.	Ayar. Sig. ^a
Origanum 600-ABZ mg/kg	202,167	8,511	,255	,799	1,000
Origanum 600-Soya yağı	17,167	8,511	2,017	,044	,262
Origanum 600-Origanum 300	25,267	8,511	2,969	,003	,018
ABZ 20 mg/kg-Soya yağı	-15,000	8,511	-1,762	,078	,468
ABZ 20 mg/kg-Origanum 300	-23,100	8,511	-2,714	,007	,040
Soya yağı-Origanum 300	-8,100	8,511	-,952	,341	1,000

Her bir satır için Ho hipotezi Örnek 1 ve Örnek 2'nin dağılımlarının aynı olduğudur. Aseptomatik anlamlılıklar (2-yönlü testler) gösterilmektedir. Anlamlılık seviyesi 0,05. a. Anlamlı değerler çoklu testler için Bonferroni düzeltme ile ayarlanır

Kruskal Wallis testine göre Origanum grupları ile negatif kontrol grubu olan Soya grubu arasında anlamlı bir fark saptanmazken, Origanum 600 ve Origanum 300 grupları arasında ve ABZ 20 mg/kg ile Origanum 300 grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. Anova tek yönlü analizinde Tamhane-T2 sonuçları ise OUY deneyinde selofanda sayılan *S. obvelata* yumurtaları açısından hiçbir grup arasında anlamlı bir fark göstermemiştir.

4.9.12. Antihelmintik uygulamaların literatür ile karşılaştırılması

Bu çalışmada *A. annua* özütlerinin uygulandığı farelere gavaj uygulanmasına bağlı olarak, bazı farelerin mide veya özafagus delinmesi nedeniyle öldükleri gözlenmiştir. Bunun en temel sebebi farelerin tek elle tutulup diğer elle gavajın mideye kadar indirilmesi sırasında, fare baş-gövde-kuyruk boyunca dik tutulmuş olsa bile gavajdan irrite olması nedeniyle ani hareketler yapıp kurtulmaya çalışırken gavajın iç organlara zarar vermesi ve özütün çok keskin olması nedeniyle bu irritasyonun artmasıdır. Özüt

yaklaşık on misli seyreltilmiş olmasına rağmen yine de tadı oldukça rahatsız edici olduğu için 2-3 uygulamadan sonra farelerde tiksime refleksine yol açtığı gözlenmiştir. Bu nedenle artemisia özütü yemlerine katılarak verilememiştir. Çünkü fareler aç kalsalar bile, artemisia özütü katılmış yemleri yemedikleri gözlenmiştir. Ayrıca soya yağının albendazolün süspansiyeye edilmesinde kullanılmasının antihelmintik olarak etkisini göstermesi için uygun olduğu görüşü (Harvey, 1996) bu çalışmanın sonuçları ile desteklenmektedir.

OÜY soya yağında seyreltikten sonra yemlerine katılarak verilen farelerde uygulama sonrasındaki yirmi bir gün boyunca herhangi bir yan etki gözlenmemiştir. Ayrıca farelerin yemlerine katıldığı için hiçbir irritasyona neden olmamıştır. Daha önceki uygulamalarda mısır yağı ile seyreltikten sonra gavaj yoluyla verilen OÜY'nin farenin ağız çevresindeki deriye bulaşması ve/veya muhtemelen mide delinmesi sonucu irritasyona neden olmuş ve bu uygulamanın yapıldığı bazı fareler deney süresi tamamlanmadan ölmüştür. Yemlerine katılarak verilen fareler ise deney süresi ve sonrasında da yaşamaya devam etmiştir. Bu yemlerden kontrol grubundaki fareler sadece soya yağı katılmış yemleri büyük iştahla yemiştir. OÜY'nin 600 mg/kg ve 300 mg/kg dozlarında uygulandığı farelere ise bu yemler gece boyunca aktif oldukları süreçte yemeleri için verilmiştir. Bu fareler, bu yemler dışında, gündüz periyodunda uçucu yağ katılmamış normal yemler ile de beslenmiştir. Bu fareler gayet sağlıklı görünmelerinin yanı sıra hayvan refahına, havalandırma ve hijyen koşullarına dikkat edildiği için deney sonunda genel sağlık durumlarının başlangıca göre daha iyi durumda olduğu gözlenmiş ve buna bağlı olarak helmintik enfeksiyonun gerilemesi normal olarak düşünülmüştür.

Farelerin bağışıklık sisteminin kuvvetlenmesi, stres faktörlerine de bağlı olduğu için, bu çalışmada gavaj uygulaması yerine farelerin yemlerine OÜY katılması uygulamasının farelerin stresini azalttığı gözlemlenmiştir. Bu durum, bu yağın gerçek etkisini saptamak için, insanlarda uygulanmadan önce hayvanlar üzerinde denenmesi amacına daha uygundur çünkü insanlara bu uygulama gavaj uygulaması ile yapılmamakta ve strese yol açmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada insanlardaki uygulama şekline benzer bir yol kullanılmıştır.

Bu çalışmadaki deneylerde her iki cinsten fare kullanılmasının başlıca nedeni her iki cinsiyete olan etkisinin ve özellikle dişilerdeki menstürel siklusun ilacın antihelmintik etkisine bir etkisi olacaksa bunun da bu çalışmada gözlemlenebilmesidir.

Literatüre göre en yaygın fare kılkırtları *S. obvelata* ve *A. tetraptera*'dır (Baker 1998; Percy ve Barthold 1993). *S. obvelata*'nın insanları da enfekte edebildiği bildirilmiştir (Flynn 1973; National Research Council [NRC], 1991). Brezilya'da yapılan bir çalışmada, fare yetiştirilen bir merkezde bulunan fare kolonilerindeki helmintlerin yaygınlığı araştırıldığında, *S. obvelata* %86,6, *A. tetraptera* %60 ve *H. nana* %53,3 oranında bulunmuştur (Gilioli ve diğerleri, 1996). Kashan'da (İran) yakalanan 120 fare helmintik olarak incelendiğinde bunların 68'inde sindirim sisteminde helmintlere rastlanmıştır. Bulunan nematodlar; *S. obvelata*, *A. tetraptera*, *Trichuris muris*, *Capillaria annulosa*, *Trichosomoides crassicauda* ve *Gongylonema* cinsidir. Cestodlar; *Hymenolepis nana fraterna*, *H. diminuta*, *Mathevataenia symmetrica*, *Meggittina* spp. olarak teşhis edilmiştir. Bunlardan *Meggittina* İran için ilk kez farelerde tanımlanmıştı (Rasti, Moubedi, Dehghani ve Abas, 2000). Bu tez çalışmasında ise parazitik açıdan taranan 250 fareden 54'ünde helmint yumurtalarına rastlanmış, yumurta şekilleri ve nekropsiler birlikte değerlendirildiğinde üç tür helmint tespit edilmiştir. Bu türler *S. obvelata*, *S. muris* ve *A. tetraptera*'dır.

Daha önce yapılmış bazı deneysel çalışmalar çeşitli bitki özütlerinin oksyuridler üzerindeki antihelmintik etkilerini ortaya çıkarmıştır. Gogoi ve Yadav (2016) *Caselpinia bonducella*'nın *in vivo* ve *in vitro* antihelmintik etkisini *S. obvelata* üzerinde göstermiştir. Anal bant ve fekal inceleme ile araştırıldığında *C. bonducella* özütü doğal enfekte farelerde *S. obvelata* yumurtalarının %41 oranında azalmasına ve *in vitro* çalışmada *S. obvelata* erginlerinin %93 oranında daha hızlı paralyze uğraması ve bunun sonucunda ölmelerine yol açmıştır. Turel, Oto, Ayaz, Yılmaz ve Mercan (2008) yaptıkları çalışmaya göre *Urtica dioica* L. yapraklarının ve tohumlarının metanolik özütlerinin *Aspicularis tetraptera* ile doğal enfekte farelere oral olarak 250 µL dozda yedi gün boyunca verilmesi sonucunda tohumlarının metanolik özütünün önemli bir etkisi olmazken, yapraklarının metanolik özütü ise potent antihelmintik aktivite göstermiştir. Kozan ve diğerleri (2011) tarafından Türkiye'deki *Verbascum* türlerinin

doğal enfekte farelerdeki *Aspicularis tetraptera* üzerine antihelmintik etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya göre, 100 mg/kg dozda *V. lasianthum*, *V. latisealum*, *V. mucronatum* ve *V. salvifolium* özütleri, 0,5 mg/kg dozdaki Fenbendazole ile karşılaştırıldığında, Fenbendazole kadar etki göstermeseler de %50'ye yakın etki göstermişlerdir. De Amorin, Borba, Carauta, Lopes ve Kaplan (1998) iki farklı incir türünün lateksinin *in vivo* antihelmintik etkisini inceledikleri bir çalışmalarında, *Ficus insipida* Willd'den elde edilen lateks 4 ml/kg dozda üç ardışık gün *S. obvelata*, *A. tetraptera* ve *Vampirolepis nana* ile enfekte farelere oral olarak verildiğinde, *S. obvelata* üzerine %38,6 öldürücü etki gösterirken, *A. tetraptera* üzerine pek az etki göstermiştir (%8,4). *Ficus carica* lateksi ise 3 ml/kg dozda üç ardışık gün verildiğinde *S. obvelata* üzerindeki antihelmintik etkisi daha yüksek (%41,7) olmakla beraber, *A. tetraptera* üzerinde önemli bir etki yaratmamıştır (%2,6). Lateksin yüksek akut toksisitesine ve hemorajik enteritise neden olmasına rağmen zayıf bir antihelmintik etkiye sahip olması bitkinin lateksinin bu amaçla kullanılmamasının daha uygun olacağını göstermiştir. Mevcut çalışmada ise *A. annua* n-hekzan özütünün 1200 mg/kg'lık dozunun *S. obvelata* üzerine antihelmintik etkili olduğu ve içme suyu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ABZ'nin 5 mg/kg'lık dozunun önemli bir etkiye yol açmadığı söylenebilir.

Topraktan geçen helmintler için çeşitli model organizmalar laboratuvardaki deney hayvanlarında bulundurulabilmektedir. Bunlardan *Trichuris muris* farelerde trichuriasis için çok elverişli bir modeldir (Keeling 1961a; Keeling 1961b). *Strongyloides ratti* ratlarda strongyloidiasis için yaygın olarak kullanılmaktadır (Wertheim ve Lengy, 1965). *Ascaris suum* ile enfekte kemiriciler *Ascaris lumbricoides*'in enfeksiyon başlangıcını taklit eden bir model oluşturmaktadır. Bu çalışmada ise *A. tetraptera* ve *S. obvelata* türü oksyurid nematodlar bitki özütünün GİS'deki antinematodal etkisini kanıtlayabilmek için uygun model organizmalar olarak görülmüştür. Bu iki tür nematodun önemi, hem laboratuvar farelerinde yaygın olarak bulunmaları hem de *S. obvelata*'nın insanlara geçerek asemptomatik bile olsa enfeksiyon oluşturabilmesinden kaynaklanmaktadır. Piyasada en sık kullanılan antinematodal ilaçlar genellikle geniş spektrumlu oldukları için bu amaçla kullanılabilecek bitkilere de aynı bakış açısıyla bakıldığında bu çalışma, *A. annua*'nın gastrointestinal sistemdeki nematodlara hafif de

olsa etki ettiğini gösteren bir kanıt niteliğindedir. Bu nedenle topraktan geçen helmintlere etki edebileceği de göz önüne alınmalıdır.

Bazı deneysel çalışmalar antidiyabetik besinlerin antihelmintik olma bakımından öncelikli adaylar olduklarını ortaya çıkarmıştır. Borba ve diğerleri (2010) antidiyabetik bir bitki olan patatesin (*Solanum lycocarpum* L.), *A. tetraaptera*'ya karşı *in vivo* etkisini göstermiştir. Bu tür çoğu bitkide glikozdan yararlanılmasını önleyen bazı bileşenler mevcuttur ve bunlar helmintler üzerinde öldürücü etki yapmaktadır. Bunların yanısıra diğer antihelmintik bitkilerde bulunan glikoproteinler parazitin kütikülü üzerine etki ederek (Thompson ve Geary, 2010), taninler ise konak hayvanın gastrointestinal boşluğundaki serbest proteinlere bağlanarak antihelmintik aktivite göstermektedir (Athanasiadou, Kyriazakis, Jackson ve Coop, 2001). Fenolik bileşenler helmintlerde oksidatif fosforilasyona müdahale ederek enerji üretimini durdurmakta (Martin, 1997) ve helmintlerin ölmelerine sebep olmaktadır. *A. annua* içeriğinde çok sayıda fenolik bileşenin yanı sıra taninler, glikoproteinler ve kumarin türevleri bulunmaktadır.

A. annua'nın taze veya soğuk kurutulmuş materyalleri besleyicilik ve antioksidanlık açısından analiz edilecek olursa içerdiği mineral, amino asit, demir, çinko, sodyum ve E vitamini gibi öğeler bakımlardan zengin olması, özellikle insan ve damızlık hayvan diyetine katılmasının faydalı olacağını düşündürmektedir. Ayrıca bu bitki oldukça yüksek miktarda esansiyel amino asitler içerir ve bunlardan izolösin, lizin ve triptofan gibi aminoasitler DSÖ (1973) verilerine göre okul öncesi dönemdeki çocuklarda alınması tavsiye edilen standart miktarlardan daha fazla bulunmaktadır (Noack, 1973). Dahası bitki hem vitamin E ve antioksidanlar açısından hem de kuersetin gibi flavonoidlerce zengindir (Bahorun, Luximon-Ramma, Crozier ve Aruoma, 2004). *A. annua* yaprak özütlerinin potansiyel antioksidan aktivitesinin insan sağlığına olumlu etkileri vardır. *A. annua* yapraklarının etanolik özütleri ile yapılmış bir *in vitro* çalışmaya göre bitkinin %70'lik etanolik özütü saf etanolik özütüne göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir ve özütlerin antioksidan aktivitesi hidroksil, nitrikoksit ve hidrojen peroksit radikal yakalama aktiviteleri göz önüne alındığında yüksektir. Özellikle hidroksil yakalama aktivitesi standartların üstünde ($IC_{50} = 2,39-3,81$ mg/mL)

ve aynı zamanda lipid peroksidasyonunu inhibe edişi de fevkalade (%79,81- %86,70) bulunmuştur (Chukwurah, Brisibe, Osuagwu ve Okoko, 2014).

A. annua özütünün 200 ve 400 mg/kg'lık dozlarda verilmesi, kimyasal bir bileşen tarafından indüklenen sistemik anafilaktik şoku, doza bağlı olarak baskılar. Genel olarak artemisia özütü, bir kimyasal ajan tarafından indüklenen histamin salınımını, kaşıma davranışını ve vaskular geçirgenliği etkili şekilde azaltabilme kabiliyetindedir (Deng, Liu ve Geng, 2016).

A. annua'nın özütleri farelerde *Cryptosporidium parvum*'a karşı %81,6–83,2 oranında baskılayıcı bulunmuştur (Youn ve Noh 2001).

Visceral leishmaniasis, sıtımadan sonra en çok korkulan ikinci parazitik hastalıktır ve 88 ülkede halen endemiktir. Enfeksiyon oranındaki dramatik artış, ilaç direncinin ortaya çıkmış olması ve güvenilir aşıların olmaması yeni ve ucuz anti-leishmanial ajanların doğal kaynaklardan elde edilmesinin gerekliliğine işaret etmektedir. *A. annua* yapraklarının uçucu yağının *Leishmania donovani*'ye karşı leishmanisidal etkisi *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir. Bu etki apoptozisin indüklenmesi aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (Islamuddin ve diğerleri, 2014). *A. annua* uçucu yağının antibakteriyel, antifungal (Juteau ve diğerleri, 2002) ve akarisidal (Pirali-Kheirabadi ve Teixeira da Silva, 2011) aktiviteler gösterdiği kaydedilmiştir. Bitkinin, kümes hayvanlarını kok bakterilerinden korumak için gıda takviyesi olarak kullanılıp kullanılamayacağına ilişkin bilimsel çalışmalar (Brisibe ve diğerleri, 2008; Drăgan ve diğerleri, 2014), bu bitkinin aynı zamanda antibakteriyel amaçla kullanılabilecek uygun bir gıda takviyesi olduğunu göstermektedir.

Haemonchus contortus ile enfekte koyunlarda yapılan bir çalışma *A. annua* sulu özütünün ve bu bitkiden elde edilen artemisin maddesinin oral uygulamasının düşük seviyede bir antihelmintik etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Cala ve diğerleri, 2014). *Fasciola hepatica* ile enfekte koyunlarda, *A. annua*'dan elde edilen artesunate 40 mg/kg (i.v.) tek doz uygulaması yumurta sayısını %69, trematod sayısını ise %77 azaltmıştır.

Aynı bitkiden elde edilen artemetherin aynı şekilde uygulanması ise yumurta sayısını %97,6 trematod sayısını ise %91,9 azaltmıştır (Keiser ve diğerleri, 2010).

Artemisinin alışılmadık bir peroksit köprüsü ihtiva eden sesquiterpen bir laktondur. Bu peroksidin, ilacın etki mekanizmasından sorumlu olduğuna inanılır. Prekürsör bileşen genetik olarak modifiye edilmiş maya kullanılarak da üretilebilir (“Chemical studies on qinghaosu (artemisinin)”, 1982). Artemisinin, *Eimeria* spp. (protozoan) ile enfekte tavuklarda ve *Schistosoma* spp. (trematoda) ile enfekte farelerde faydalı bulunmuş olmasına rağmen, *H. contortus* (nematod) ile enfekte EPG sayısı yüksek hayvanlarda bitkinin ikincil metabolitlerinin antihelmintik etkisini aynı seviyede ve tek dozda elde etmek tipik olarak zor olmuştur (Cala ve diğerleri, 2014). Artemisinin-türevli ilaçların *F. hepatica* ve gastrointestinal nematodlardan (küçükbaş hayvanlarda bulunan) *Plasmodium* spp., *Coccidia* spp., *Babesia* spp., *Leishmania* spp., *Neospora caninum* ve *Schistosoma* spp. gibi pek çok parazite karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Tariq, Chishti, Ahmad ve Shawl, 2009).

Artemisininin, sitokinler ve diğer pro-inflamasyon faktörlerinin -NF- κ B gibi ilgili olduğu genlerin- baskılanmasında etkili olduğu rapor edilmiştir (Salminen, Lehtonen, Suuronen, Kaarniranta ve Huuskonen, 2008).

Artemisininin antihelmintik etkisi bilinmekle beraber çok uzun zamandır (1972’de saflaştırılmasından itibaren) kullanılması dolayısıyla artemisininine direnç gelişimi de rapor edilmiştir. Bu nedenle özellikle *Schistosoma* ve sıtmanın birlikte yaygın olduğu bölgelerde kullanılmak amacıyla her iki parazite birden etki edebilecek çift etkili ilaçların geliştirilmesine yönelik çalışmalar sürmektedir. Örneğin Praziquantel ve artesunatin etkisini birleştirmek için üretilen bir dual etkili ilaç ilk verildiği günlerde (1. ve 3. gün) *Schistosoma japonicum* üzerinde %85 ve %75’lik bir trematod azalmasına neden olmuştur (Dong ve diğerleri, 2014). Bu gibi çalışmalar *A. annua* bitkisinin etkisini arttırabilecek ikincil bitkilerin araştırılmasının önemine işaret etmektedir. Mevcut çalışmanın sonuçlarına göre *A. annua* n-hekzan özütü fare nematodlarına karşı etkili bulunmakla birlikte, antihelmintik etkinin arttırılabilmesi için diğer bitkiler ile birlikte kullanılmasının sonuçları da gelecek çalışmalarla araştırılmalıdır.

İçerdiği artemisinin gibi bileşenlerin her ne kadar sıtma tedavisinde işe yaradığı (özellikle 1970’de saflaştırılıp sıtma için etken madde olduğu ileri sürüldükten sonra) genel olarak kabul görse de artemisinin maddesini hiç içermeyen *Artemisia* cinsi bitkiler de (*Artemisia absinthium*) sıtmanın tedavisinde iyi sonuç vermiştir. Bu nedenle bu konunun halen araştırmaya açık olduğu söylenebilir. Tıpkı sıtmanın tedavisinde olduğu gibi, pelin otu bin yıldan uzun süredir antihelmintik amaçla kullanılmasına rağmen bitkinin etki mekanizması bugün halen bilinmemektedir. İçerdiği etken maddelerden hangisi veya hangileri görev almakta veya bir sinerji varsa hangi moleküller hangi yollarla etkilemektedir? Bir inhibisyon mu yoksa aktivasyon mu söz konusudur? Bitkinin antihelmintik etkisini arttırabilmek için ikincil faktörler nelerdir? Bu gibi sorulara verilecek yanıtlar hem yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi hem de ilaç direnci gibi problemlerin azaltılması için önemlidir.

DSÖ verilerine göre dünya genelinde yaklaşık olarak 20 000 bitki medikal alanda kullanıma sahiptir. Bu bitkilerden 4000 kadarı çeşitli drogların içeriğinde yaygın olarak kullanılırken, yaklaşık 2000 bitkisel ilaç Avrupa’da satışa sunulmaktadır (Özgüven ve diğerleri, 2005).

Antihelmintik amaçla kullanılan çeşitli ilaçların bazı istenmeyen yan etkileri olması ve direnç gelişimi gibi problemler nedeniyle antihelmintik etki gösterebilecek bitkilerin araştırılması için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğu, bitkilerden elde edilen ekstraktların *in vivo* veya *in vitro* olarak antihelmintik etkilerini göstermeye dayalıdır. Yapılan deneysel çalışmalar hindistan cevizi, sarımsak, soğan, incir, günlük ağacı ve ananas gibi bitkilerden hazırlanan ekstraktların *Hymenolepis diminuta*, *H. microstoma* ve *Taenia taeniaformis* cestodlara karşı önemli etkilere sahip olduklarını göstermiştir (Ayaz, Gökbulut, Coşkun, Türker, Özsoy ve Ceylan, 2015).

Geniş spektrumlu oluşları, iyi tolere edilebilirlikleri ve düşük maliyetleri nedeniyle son elli yıldan uzun zamandır antihelmintik ilaçlar uzun süreli kullanılan ilaçlardan olmuşlardır (Lanusse ve diğerleri, 2014). Ne var ki, bu tip ilaçların aşırı ve yanlış şekilde kullanılması dirençli nematod populasyonlarının seleksiyonuna zemin hazırlamaktadır (Dos Santos ve diğerleri, 2014). Geleneksel Tamamlayıcı Tıp

uygulamalarından biri olan fitoterapi geleneğine uygun olarak, helmintik hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek bitkilerin anlaşılmasına dair bilimsel çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Piyasadaki mevcut ilaçlara kıyasla çok daha fazla sayıda alternatif oluşturabileceği için bitkilerden antihelmintik amaçla faydalanılması akılcı bir yaklaşımdır. Özellikle dünyanın bazı bölgelerinde helmintik enfeksiyonlar sık tekrarlayan enfeksiyonlardan olduğu için devamlı kullanılabilecek güvenli terapötiklerin keşfedilmesi önemli bir yere sahiptir.

İnsanlarda ve veteriner tıbbında en yaygın kullanılan antinematodal ilaçlar kolinerjik agonistler, imidazothiazole (levamisole), tetrahidropirimidinler (pyrantel, morantel ve oxantel), dördüncül/üçüncül aminler (bephenium ve tribendimidine), piridinler (methyridine) ve amino-asetonitril türevleridir. İkincil grup antinematodal ilaçlar ise avermectinlerdir ki bunlar GABA ve glutamat-geçişli klorid kanallarının agonistleridir. Son olarak, benzimidazoller antinematodal tedavide önemli yere sahip geniş spektrumlu antihelmintik bileşenlerdir ki bunlar β -tubuline bağlanarak nematodlardaki mikrotübül formasyonunu inhibe ederler (Lacey 1990; Martin ve diğerleri, 1997).

ABZ nematodlara karşı etkili bir ilaç olmakla beraber belli yan etkileri de vardır. En genel yan etkileri karın ağrısı, ruhi bunalım, baş ağrısı ve sık idrara çıkmadır. Bu ilaç aynı zamanda karaciğer enzimlerinin sentezinin artmasına ve bazen de karaciğer bozukluğuna neden olabilir. Yaygın olmamakla beraber, bazı hayvanlar bu ilaca alerjiktir ve aşırı hassasiyet gösterirler. Bu ilaç gebe hayvanlarda kullanılmamalıdır. ABZ tedavisi alan bazı hastalarda kemik iliğinin baskılanmasına ek olarak akyuvar hücrelerinde azalma gözlenmiştir ("Mayoclinic", t.y.). Bu nedenle gebe hayvanlarda da kullanılabilecek güvenli ve etkili yeni ilaçların keşfedilmesi için bitkisel özütlerin veya bitkilere ait uçucu yağların enfekte hayvanlara uygulandığı çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Bu çalışmada OUY'nin hem fare hem de insanlarda ortak olarak bulunabilen bir oksyurid nematoda karşı antinematodal etkileri gösterilmiş ve yeni ilaç molekülü iskeletlerinin keşfedilmesi için uçucu yağ içerisinde en yüksek oranda bulunan biyoaktif moleküllerin hedef proteinler ile etkileşimleri *in silico* yöntemler ile araştırılmıştır. Sonuç olarak OUY içeriğinde bulunan β -karyofilenin kenetleme deneyinde Hc β -tubulini inhibe edebildiği gösterilmiştir. Bu çalışma β -karyofilenin

antihelmintik etkisini hesaplayan ilk çalışmadır. Ayrıca OUY içerisinde bulunmasa da *O. vulgare* subsp. *hirtum* infuzyonunda bulunduğu gösterilmiş olan (Kulisić ve diğerleri, 2007) oreganol, *in silico* deneyde çok selektif ve potent bir inhibitör olarak keşfedildiği için, yeni ilaçların geliştirilmesinde önemli bir başlangıç noktası olabilir.

Parazitik helmintlerin tedavisinde kullanılabilen çeşitli ilaçlardan yararlanım konusundaki görüşler bazı farklara sahiptir. Bu amaçla ilaçların kullanımı için yapılan çeşitli gruplandırılmalarından bazıları aşağıda verilmiştir.

DSÖ'ye göre lenfatik filaryasiz; dietilkarbamazin ve ABZ'nin beraber kullanılmasıyla tedavi edilir. Hamilelerde, iki yaş altı çocuklarda ve şiddetli hastalıkta kullanılması uygun değildir. Onchocerciasis; ivermectin ile tedavi edilir. Mezo ve hiperendemik komunitelerde kullanılması gerekir. Hamile kadınlar, 90 cm'den kısa çocuklar ve ağır enfekte hastalar kullanamaz. Schistosomiasis, Praziquantel veya ABZ ve MBZ ikilisi ile tedavi edilir. PZQ hamileler tarafından da kullanılabilir. Toprakten geçen helmintler ABZ veya MBZ ile tedavi edilir. Yılda bir veya iki kez tekrarlanır. Bir yaşından büyük çocuklar kullanabilir, hamileler ise 3. ayın sonundan itibaren kullanabilir (DSÖ, 2006).

Toprakten geçen helmintler şunlardır; *Ascaris lumbricoides* (nematodlar), *Trichuris trichiura* (kamçılı nematodlar), *Necator americanus* ve *Ancylostoma duodenale* (kancalı nematodlar). DSÖ'nün 2016 yılındaki verilerine göre toprakten geçen helmintlere karşı önleyici tedavi 103 ülkede gereklidir ve enfeksiyonların kontrol altında tutulabilmesi için okul öncesi dönemdeki 267,5 milyon çocuk, okul çağındaki 568,8 milyon çocuk ve 688 milyon kadın (çocuk sahibi olabilecek yaş aralığında bulunan kadınlar) ABZ veya MBZ ile korunmalıdır (DSÖ, 2017).

Toprakten geçen helmintiyazis, schistosomiasis, onchocerciasis, lenfatik filariyazise yönelik önleyici tedavi şu faydalara da sahiptir: bit ve pireler gibi diğer ektoparazitik enfeksiyonlardan ve diğer helmintik enfeksiyonlardan da kurtulmaya - epidemiyolojik kanıtlara göre- schistosomiasis ve toprakten geçen helmint enfeksiyonları tedavi edildiğinde, HIV enfeksiyonunun yerleşmesini azaltmaya, toprakten geçen helmint

enfeksiyonlarının tedavisi sıtmanın azalmasına, helmint enfeksiyonlarının tedavisi veremin azalmasına yardım edebilir (DSÖ, 2006).

Bugün için yalnızca beş ilaç, topraktan geçen helmintler ile enfekte insanların tedavi edilebilmesi için DSÖ tarafından oluşturulan esansiyel ilaçlar listesine alınmıştır. Bu antihelmintiklerin pek çoğu 1980'lerden önce keşfedilmiştir. Bu ilaçlara karşı direnç gelişiminin acilen önlem alınmasını gerektiren cinsten olduğuna dair henüz bir kanıt olmamasına rağmen, antihelmintik etkinliğin düşebileceğine dair bazı endişeler mevcuttur (De Clercq ve diğerleri, 1997; Albonico ve diğerleri, 2003).

Hayvan yetiştiricileri hayvanlarını koruma amacıyla çoğu kez sentetik antihelmintik ilaçları kullanabilirler. Ancak hayvanın bağışıklık sistemini bozan oksidatif stres, çoğu zaman bu tür ilaçların metabolitlerinin bir sonucudur. Böylece bir süre sonra hayvan kolay hastalanır hale gelir ve helmintik enfeksiyonlar da daha sık tekrarlanmaya başlar. Bu durumda üretici bilmeden bir kısır döngüye girmiş olur. Üretici, her seferinde enfeksiyonu tedavi etmek için ilaç verir ve her seferinde iyileştiğini düşündüğü hayvanın durumu aslında daha kötüye gitmektedir. Organizmanın bağışıklık sistemi çoğu paraziter enfeksiyonun gelişmesini ve yayılmasını baskılama kabiliyetindedir. Bağışıklık sistemi yeterince güçlü olduğu sürece organizma sahip olduğu parazitler ve de trilyonlarca bakteri ile sorunsuzca yaşayabilir. Ancak gereksiz ilaç kullanmak homeostazisi bozar ve vücudun dengesi bir kez bozulduğunda onu eski haline getirmek çok zordur. Tedavide doğru bitki kısımlarından elde edilen ekstraktlar uygun dozda kullanıldıklarında; içerdikleri antioksidan maddeler sayesinde helmintik enfeksiyonların tekrarlanmaması için doğal yollarla hayvanların bağışıklık sisteminin kuvvetlendirilmesi, hayvanların taşıdıkları parazitlerde ilaca direnç gelişiminin önüne geçilmesi ve tedavide sentetik ilaçlara duyulan ihtiyacın azaltılması gibi faydalara sahip olabilir.

Bu tez çalışmasında çeşitli bitki özütlerinin antinematodal etkileri ABZ ile karşılaştırılmış ve OUY'nin etkisi ABZ 20 mg/kg dozunun üç günlük uygulamasına kıyasla daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar bu çalışmada kullanılan bitki özütlerinin ABZ'nin yerini tutamayacağını göstermekte ve tedavide öncelikli seçeneğin ABZ

olmasının daha sağlıklı olacağını ortaya çıkarmıştır. Ne var ki helmintik enfeksiyonların sık tekrarlanması durumunda sadece ABZ kullanılması yerine antihelmintik etkili bitkilerden yararlanılması da önemlidir. Bu nedenle çalışmamızın sonuçlarına göre antinematodal etki gösteren OUY soya yağında seyreltilerek ve yiyeceklere katılarak, kılkırtılarının giderilmesi amacıyla sağlıklı bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilir. Ancak 300 mg/kg dozda kullanımı bile insanlar için oldukça fazla miktarda tüketilmesi anlamına geleceği için daha küçük miktarlarda kullanılması gereklidir. Gıdaları bakteriyel kontaminasyondan koruma amacıyla eklenen kekik yağı, aynı zamanda gıdaları parazitlerin üreyemeyeceği bir ortam haline getirmektedir. Bu nedenle hem gıdaların uzun süreli muhafazası hem de bireylerin helmintik enfeksiyonlardan korunması için oldukça uygun bir seçenektir. *O. vulgare* subsp. *hirtum* türü ülkemizde bol miktarda yetişmekte ve dünyaya rekor miktarda ihraç edilmektedir. Ülkemizde yetiştirilen bu kekik türü diğer ülkelerdekilere kıyasla çok daha kaliteli bulunmuş ve içeriğindeki aktif bileşenler de daha yüksek oranda tespit edilmiştir (Yıldırım, 2010). Bu nedenle bu türün içerdiği bileşenlerin saflaştırılarak helmintler üzerinde *in vitro* çalışmalar ile denenmesi ve etki mekanizmasının anlaşılması, antihelmintik ilaçların geliştirilmesinde ülkemizdeki imkânların kullanılması açısından yerinde olacaktır.

4.9.13. *In vivo* ve *in silico* sonuçların literatüre katkısı ve doldurulması gereken boşluklar

Bu çalışmanın sonuçları ile birleştirilerek yeni analizler yapılabilir. Örneğin *in vivo* deney sonuçları kullanılarak buradaki bitkilerin diğer nematod türleri üzerine olan etkileri araştırılarak karşılaştırma yapılabilir. Bu bitkilerin *O. volvulus* ve *Şistosoma* gibi oldukça yaygın ve mortalitesi yüksek nematod ve trematod enfeksiyonlarına karşı etkisi ileriki çalışmalarla araştırılabilir çünkü bu çalışmada söz konusu bitkilerin içerdikleri bazı moleküllerin nematodlara karşı etkili olabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle dünyada çok yaygın olan ve tedavisi için tek bir ilaç seçeneği olan *O. volvulus* gibi türlerin tedavisinde geliştirilecek yeni ilaç modelleri için bu bitkilerdeki oreganol, kukurbitasin-B ve momordisin II gibi komponentler denenmeli ve araştırmalar *in vitro* ve *in silico* deneylerle de desteklenmelidir.

Moleküler modelleme çalışmaları için kullanılan bilgisayar programları bugün için rasyonel ilaç tasarımı amacıyla kullanılan en faydalı araçlardır. Bunlardan Autodock 4.2 ve Discovery Studio programları ise ligand-protein etkileşimlerinin biyolojik ortamdakine benzer şekilde oluşumunu tahmin etmede kullanılabilecek en güvenilir programlardan ikisidir. Bu çalışmada kenetleme hesaplamaları, grid haritaları oluşturulması gibi işlemler için Autodock4.2 programından faydalanılırken, etkileşimleri farklı açılardan inceleyebilmek içinse Discovery Studio programı tercih edilmiştir. Zinc Database yanı sıra PubChem gibi gelişmiş veritabanları, bu çalışmadaki seçili bitkilerde bulunan ligandları araştırmak ve kimyasal özellikleri, 3 boyutlu yapıları ve enzimlere olan afiniteleri konularında bilgi sahibi olmak için kullanılmıştır. Ligandların hazırlanması ve optimizasyonu için yine Discovery Studio programı kullanılmış ve bu programlar vasıtasıyla elde edilen sonuçlar bitkisel organik molekülleri esas alan yeni ilaç iskeletlerinin keşfedilmesinin ilk basamaklarını oluşturmuştur.

Bu çalışmadaki hedef organizmalar olan *A. tetraptera* ve *S. obvelata* türlerinin genom sekansı bilinmemektedir. Bu iki türün model organizma olarak kullanılabilmesi için yeni nesil sekanslama teknikleri ile genom haritalarının çıkarılması, hem bu çalışmanın sonuçlarının değerlendirilmesinde yeni analizlere imkân verecek hem de bu alanda önemli veri girişi sağlayacaktır. Bu nedenle bu konuda çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu iki türün oldukça küçük olmaları numunenin biyokimyasal ve genetik analizini zorlaştırdığı için bu güne kadar yeterli veri toplanamamış olsa da bu eksiklik ileriki çalışmalarla kapatılabilir.

Bu çalışmadaki kenetleme (docking) işlemlerinin *A. tetraptera* ve *S. obvelata*'ya ait proteinler ile yapılamamış olması bu türlere ait sekansların henüz bilinmemesinden kaynaklanmıştır. PDB'den alınan proteinler diğer nematodlara ait hedef proteinler ile ve mekanizma teorilerine göre hedef olabileceği bu tez çalışmasında tahmin edilen bazı proteinler ile kenetleme işlemleri ve analizleri gerçekleştirilmiştir. *A. tetraptera* ve *S. obvelata* türlerine ait kristolografik protein yapılarının elde edilmesi ve PDB'ye yüklenmesi gerekmektedir. Bu iki türe ait protein ve DNA saflaştırma çalışmalarının gerçekleştirilmesi önemli bir ihtiyaçtır çünkü bu iki tür nematod deney hayvanlarından

laboratuvar farelerinde yaygın olarak bulunmaktadır ve çok sayıda *in vivo* antihelmintik araştırmada kullanılmıştır. Rasyonel ilaç tasarımı için önemli bir kaynak teşkil eden bu yarı-kristalize formların bilinmesi sadece bitkisel kaynaklı ligandların denenmesini değil, *de novo* ilaç geliştirilmesini de kolaylaştıracaktır. Sadece bu iki tür nematod için değil, şistosomiyaz gibi her yıl 200 000 insanın ölümüne yol açan çok ciddi bir enfeksiyonun kaynağı olan şistosoma türlerine ait deneysel yarı-kristalize yapıların PDB’de mevcut olmayışı ve hedef proteinlerin 3D yapılarının tahmini için homoloji modelleme yöntemi kullanılarak kenetleme deneyinin yapılması bu hastalığın tedavisinde ilaç geliştirilmesini kısıtlamaktadır. Dünya’da 1 milyara yakın sayıda insanı etkileyen bazı helmintik enfeksiyonların önemli bir kısmında halen tek bir ilaç seçeneğinin olması (Nehir körlüğü tedavisinde sadece hayvanlarda kullanım ruhsatlı olan IVC’nin tek ilaç olması ve şistosoma tedavisinde ise çoğunlukla PZQ’nin tek ilaç seçeneği olarak ele alınması), bu alanda büyük bir boşluk olduğunu ve bitkisel veya sentetik yeni ilaçların acilen geliştirilmesi gerektiğini gözler önüne sermektedir. Bu hastalıklar yoksul insanların deneyimlediği şeyler olarak görüldükleri için ilaç geliştirilmesi amacıyla yeterli finansman ayrılmamakta ve araştırmacılar teşvik edilmemektedir. Bu nedenle bu konudaki araştırmaların küçük bütçeli olmaları yöntemin gerçekçi kanıtlar sunmasında yeterli olamamaktadır. Enfeksiyonlar daha çok yetersiz hijyen koşullarından kaynaklanmakta, bu durumun düzeltilmesinde eğitim ve temiz su ihtiyacının karşılanması ilk sırayı almaktadır. Global ölçekte bu sorunların çözülmesi için adımlar atılmasına rağmen henüz tam anlamıyla bir çözüm getirilememiştir. 2020 yılı istatistiklerine göre bir yılda dünya genelinde açlık nedeniyle beş yaşını dolduramadan ölen çocuk sayısı 3,1 milyon (Child International [CI], 2021), yetersiz beslenmeye bağlı sebeplerden yaşamını yitiren beş yaş altı çocuk sayısı ise 5 milyon civarındadır (Feed The Children [FTC], 2021). 2020 yılında yaklaşık olarak 720-811 milyon insan açlıkla yüzyüze gelmiştir ve 2019 yılına kıyasla açlık çeken insanların sayısı artış göstermiştir (Food and Agriculture Organization [FAO], 2020). Bununla birlikte, bir paradoks olarak yılda 1,3 milyar ton gıda kaybolmakta veya israf edilmektedir (FAO, 2021). Dünya genelinde açlığın azaltılması amacıyla gıda israfını önlemeye yönelik bazı projeler ve yardım kuruluşlarının devamlı çalışmalarına rağmen FAO verilerine göre henüz hedeflenen seviyeye ulaşamamıştır. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)’nun hedefi 2030 yılında dünyada “sıfır açlık” olarak açıklanmıştır. 2020

yılı BM raporunun önsözüne göre ise: Dünyanın açlığa, gıda güvensizliğine ve kötü beslenmeye son vermeyi taahhüt etmesinin üzerinden beş yıl geçti. Ancak halen, 2030 yılına kadar bu hedefe ulaşma yolunda değiliz (DSÖ, 2020b). Gıda tasarrufu ve gıda paylaşımı, beslenme saati sponsorluğu ve gıda bağıışı gibi kitlesel hareketler vasıtasıyla gıda eşitsizliği ve buna bağlı sağlık sorunlarının önüne geçilebilir (Karaman, 2021). Dünya’da iki milyardan fazla sayıda insanı etkilediği tahmin edilen helmintik enfeksiyonların bu denli yaygın olmasının en önemli sebeplerinden biri şüphesiz temiz gıdalara ulaşmadaki imkansızlıklar ve beraberinde gelen hastalıklardır. Ne kadar çok antihelmintik bağıışlansa bile, israf edilen gıdalar ve umarsamazlık nedeniyle gıda eşitliğinin sağlanamadığı bir dünyada helmintik enfeksiyonların kontrolü de sağlanamaz. Bu nedenle helmintik enfeksiyonların tedavisinde gıda bağıışı, ilaç geliştirilmesinden daha öncelikli olmalıdır.

Bitkilerde bulunan aktif bileşenlerin *in silico* yöntemlerle antihelmintik açıdan araştırıldığı bazı önemli çalışmalarda bitkisel ligandların aktivitelerine dair tahminlerde bulunulmuştur. Bu tez çalışmasında kullanılan Hc β -tubulin teorik yapısı daha önce Satyendra ve diğerleri (2011) tarafından bazı türev moleküllerin antihelmintik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla moleküler kenetleme deneyinde kullanılmıştır. Başka bir çalışmada *Achyrocline satureioides* türü tıbbi bitkide bulunan ellajik asit, kuersetin, izokuersetin ve kafeik asit gibi bileşenler saflaştırılmış, kafeik asit antioksidan ve toksikolojik aktiviteleri açısından *in silico* ve *in vitro* yöntemlerle araştırılmış, sonuçta kuersetin, izokuersetin ve kafeik asitin *in silico* toksisite tahminleri düşük toksik risk ihtimalini göstermiştir (Salgueiro ve diğerleri, 2016). Jamkhane ve Barde (2014) tarafından yapılan çalışmada ise *Cordia dichotoma* (Forst.) kök ekstraktının antihelmintik etkisi *in vivo* olarak araştırılırken, literatüre göre bitkide bulunduğu gösterilen bileşenler de *in silico* olarak araştırılmıştır. Bu çalışmada olduğu gibi onlar da bileşenleri saflaştırmaksızın literatür taraması sonucunda seçerek hedef protein ile kenetleme deneyleri gerçekleştirmişlerdir. Bu şekilde özütlerin biyolojik aktivitesinin hangi bileşenden kaynaklandığını tahmin etmişlerdir.

Bu çalışmada değerlendirilen bitkilerin içerdikleri biyoaktif bileşenlerden bitkiye has olarak en yüksek oranda bulunanlar daha önce yapılmış spektroskopi ve kromatografi

analizlerinin sonuçlarına göre belirlenmiştir (Özcan ve diğerleri, 2012; Li ve diğerleri, 2015; Abu-Shandi ve diğerleri, 2015). Bu bileşenlerin gelecek çalışmalarda tek tek saflaştırılarak *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla antihelmintik etkilerinin araştırılmasından önce hem iş yükünü hem de maliyeti düşürmek için bu çalışmanın sonuçları kullanılabilir. Çalışmamızın sonucunda ortaya çıkarılmış olan bu moleküler etkileşimlere ait yeni bilgiler moleküler biyoloji veya biyoinformatik çalışmalarında araştırma yapacak bilim insanlarına veri sağlayacaktır.

Bu çalışmadaki sonuçlar çok büyük bir eksikliği kapatmaya yönelik veriler sağlamıştır. Bugün için helmintik enfeksiyonların dünyadaki yaygınlığı (çeşitli helmint türleri ile enfekte yaklaşık 2 milyar insan ve nematod türleri ile enfekte yaklaşık 1,5 milyar insan) düşünüldüğünde ucuz, ulaşılabilir ve güvenli yeni antihelmintiklerin keşfinin çok büyük bir ihtiyaç olduğu anlaşılmaktadır.

Yeni ilaçların geliştirilebilmesi için ilgili ilaç iskeletleri keşfedilmeli ve bunun için daha önce denenmemiş ancak etki etme olasılığına sahip bileşenler öncelikle hesaplamalı yöntemler kullanılarak denenmelidir. Bu çalışmada dört farklı bitkide bulunan majör bileşenlerin antinematodal etkisi bilgisayar ortamında araştırılmış ve ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere arteannuin-B, β -karyofilen, oreganol, friedelin ve stigmasterol gibi pek çok yeni ilaç iskeleti öne sürülmüştür.

Pek çok helmint türü vücutlarının dış kısmındaki hücrelerin glukozu absorblaması sayesinde beslenmekte ve hayatta kalmaktadır. Kudret narında bulunan aktif bileşenlerden ikisi olan momordisin I ve II, glukoz absorpsiyonunu engelleyebildiği için (Liu ve diğerleri, 2015) bu iki aktif bileşen antihelmintik etki göstermek için iyi birer adaydır. Literatürde, kullanmayı planladığımız bitkilerin bazılarının antihelmintik etki gösterebildiklerine dair bazı *in vitro* çalışmalar bulunmaktadır. Ancak *M. charantia* (kudret narı) bitkisinin içerdiği majör bileşenleri temel alan bu çalışmadaki gibi bir *in silico* antihelmintik araştırma henüz yapılmamıştır. Bu çalışma sonucunda momordisin II bazı antihelmintik hedef proteinlere karşı çok iyi bir inhibisyon katsayısına sahip bulunmuştur.

Bu tez çalışması sonucunda hem ülkemizde hem de helmintik enfeksiyonların yaygın olduğu ülkelerde bulunan (doğal olarak yetişen veya kültüvasyonu yapılan) bu bitkilerin antinematodal etkileri *in silico* deneylerle gösterilerek, sentetik antihelmintik ilaçlara direnç gelişimi durumunda bu bitkilerden de aynı amaçla yararlanılabilmesi için insanlar üzerinde denenmeden önce yapılması gereken ön çalışmalardan bir kısmı gerçekleştirilmiştir. Sonuçta hem ciddi bir sağlık sorununa sürdürülebilir bir çözüm getirilmesine önemli bir katkı sağlanabilmiş hem de ülkemizdeki bitki zenginliğinden tıbbi olarak daha fazla yararlanılabilmesi için önemli nedenler ortaya konulmuştur. *M. charantia* meyvesinin ve yapraklarının antihelmintik etkisini göstermeye yönelik yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmaları destekleyen *in silico* sonuçlar ilk kez bu çalışmada literatüre kazandırılmıştır. Bu çalışma, kukurbitasin-B ve momordisin II'nin pM seviyede K_i değerleriyle antinematodal hedefleri inhibe edebileceğini gösteren ilk çalışmadır. Aynı zamanda bu bitkisel ligandların antihelmintik hedef enzim ve reseptörler içindeki olası kimyasal etkileşimleri ilk kez çalışılmıştır.

5. SONUÇ

Daha az yan etkili ilaçların keşfi için bu çalışmanın sonuçlarının farklı açılardan değerlendirilmesi ve *A. annua*'da bulunabilen arteannuin-B, friedelin ve stigmasterolün *in vitro* ve *in vivo* deneylere alınması faydalı olacaktır. Bu çalışmadaki olası kimyasal etkileşim görselleri antihelmintik ilaç geliştirilmesinde yalnızca etkileşimleri atomik düzeyde tahmin etmeyi değil aynı zamanda yapı-aktivite ilişkisinin önemine dikkat çekmeyi amaçlamıştır. Çalışmadan çıkan en önemli sonuçlardan biri steroid halkada siklopentana bağlı dallanmış bir yan zincirin KPT 2 bağlanma bölgesine olan affiniteyi doğrudan etkilediğidir. Ayrıca en az dört halkanın birleşmesi ile geniş bir çekirdeğe sahip olan kukurbitasin-B, momordisin II, karantadiol-A, stigmasterol ve friedelinin protein içinde yerleşebilmek için biraz geniş bir kaviteye ihtiyaç duymaları, tubulin içinde konumlanmasını engellemektedir. Bu sonuç ABZ'den daha az yan etkili alternatif ilaçların keşfinde değerlendirilebilecek yeni bir veri sağlamıştır. Bu moleküllerin kenetleme analizleri bunu desteklemektedir. Bu bileşenler, gastrointestinal sistemde bulunan ve özellikle de çocukların bilişsel ve fiziksel gelişimini aksatan nematod türlerinin elimine edilmesinde gelecek vaat etmektedir. SwissADME web

sunucu ile yapılan tarama sonucu bu bileşenlerin GI absorpsiyonu düşük bulunmuştur. Ne var ki bu özellikleri GIS'de bulunan helmintlere karşı inhibisyonunun arttırılmasında pozitif bir etki yapacaktır. Böylece GIS'de bu moleküllerin konsantrasyonu kolayca azalmayacak ve helmintler daha yoğun şekilde bu moleküllere maruz kalabileceklerdir. Triterpenoid yapıdaki bu moleküllerin suda çözünmemeleri normaldir ve bu bileşenler ağızdan alındıklarında yağ bazlı çözücüler ile beraber alınabilir. *In vivo* deneyde mısır yağında çözünen *A. annua* n-hekzan özütünün 300 mg/kg ve 1200 mg/kg dozlarda uygulandıklarında uygulamanın son gününde *S. obvelata* yumurta sayısında azalmaya neden olması arteannuin-B, stigmasterol ve friedelinden kaynaklanmış olabilir. Bitkisel ligand tabanlı yeni bir antihelmintik molekülün keşfi için yararlanılabilecek sonuçlar bu bileşenlerin saflaştırılarak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla araştırılmaya değer olduklarını göstermektedir.

Bu çalışmada kullanılan ve Türkiye'de yetiştirilen *O. vulgare* spp. *hirtum*, Türk kekikinin muhteşem tıbbi değerini gösteren yüksek oranda (%84) karvakrol içerir. Karvakrolün antelmintik etkisi, moleküler modelleme yoluyla diğer antihelmintik ilaç hedef proteinleri üzerinde araştırılmalıdır. OUY, doza bağlı olarak parazit yumurta azalımı açısından oksyurid nematodlar üzerinde antinematodal özelliğine sahiptir. Kenetleme sonuçlarına göre β -karyofilen, OUY'nin antinematod etkisinden sorumlu bileşik olabilir. OUY'nin uygulama sırasında ve sonrasında iki hafta boyunca gözle görülür bir yan etkisi olmazken, yumurta sayısında azalmaya neden olmuştur. Bu bitki uçucu yağının antihelmintik etkisi, ABZ'den daha düşük, ancak aynı zamanda çözücü kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, *O. vulgare* subsp. *hirtum* parazit yumurtalarını azaltmakta ancak bu etkisi uzun süreli olmadığı için sürekli kullanılması gerekmektedir. Düşük dozlarda kullanılması da etkili olduğu için çok düşük dozda tekrarlanabilir bir kür tercih edilmelidir.

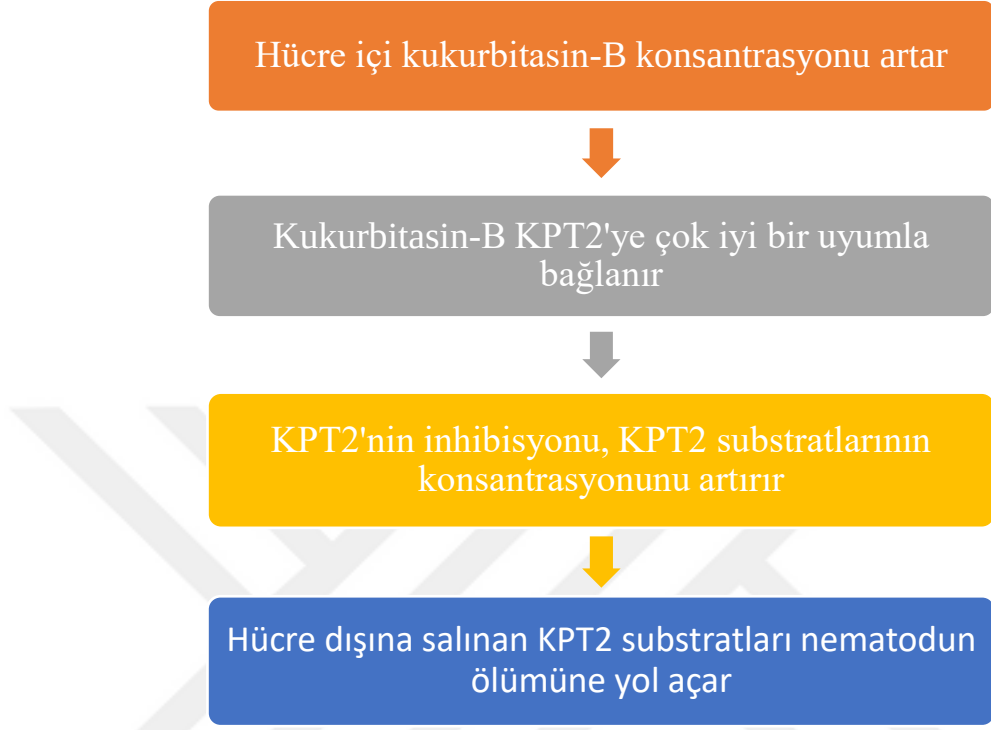
OUY içeriğinde bulunan monoterpenler hücre zarından kolayca geçebildikleri ve deriden nüfus edebildikleri için, deride nodüller oluşturan parazitlere karşı merhem olarak uygulanabilecek ilaçların geliştirilmesinde değerlendirilebilirler. Bu açıdan, Dracunculiasis gibi parazitlere has GABA reseptörlerinin, monoterpen bazlı inhibitör geliştirilmesinde öncelikli hedefler olarak araştırılmaları akılcı bir yaklaşımdır.

In silico kenetleme simülasyonlarının sonuçlarına göre eriositrin tabanlı bazı türev moleküller eriositrinden daha iyi bir antinematodal aktivite göstermeye adaydır. Kromen halkasına eklenen ekstra gruplar afiniteyi değiştirmektedir. 3. pozisyona fenol eklenmesi KPT 2'ye karşı daha iyi bir bağlama enerjisinin görülmesine imkan vermektedir. Bu türevler içerisinde E05 eriositrinden daha iyi inhibisyon değerlerine sahiptir. Bu çalışmada eriositrin baz alınarak tasarlanan türevlerinin yarısı -7 kcal/mol'den daha düşük bir serbest bağlanma enerjisine sahip bulunmuştur. Tasarlanan türevler içerisinde eriositrinden daha potent olduğu tahmin edilen E05'in ileri araştırmalara alınması yeni bir antinematodal ilaç geliştirilmesinde faydalı görünmektedir.

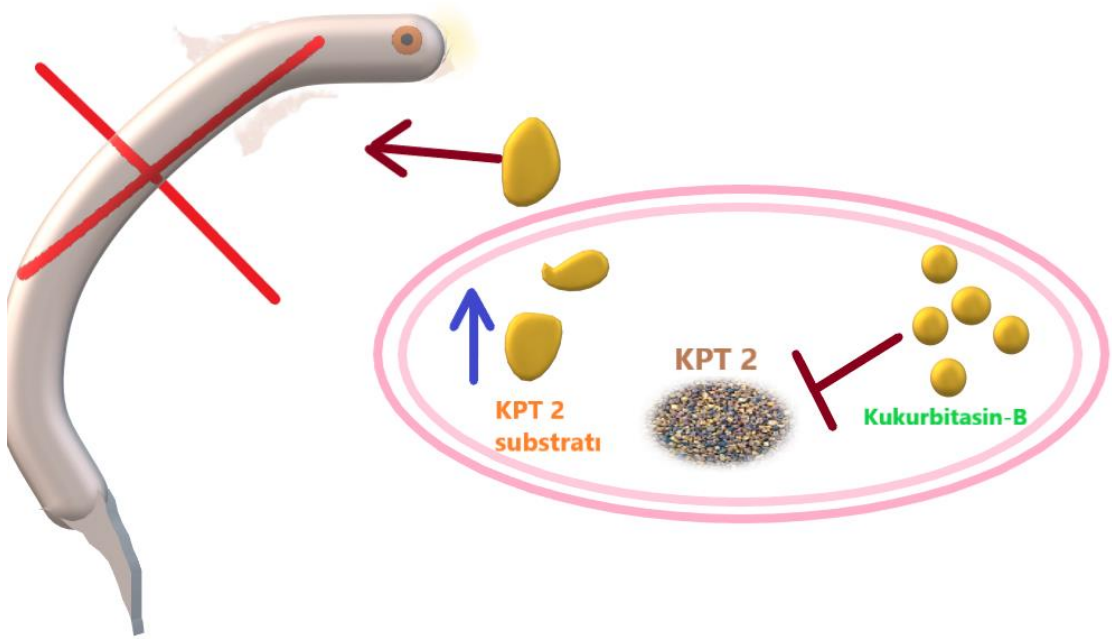
Benzimidazollere direnç gelişimi durumunda kullanılabilme açısından değerlendirildiğinde bu çalışmada denenen ligandlar içinde arteannuin-B olası direnç gelişimi durumunda MBZ'den daha etkili olabilecek tek bitkisel liganddır ve E198G mutasyonu durumunda başarılı bir inhibitör olarak rol oynamaktadır. Bu sonuçlar hesaplamalı yöntemlerle gerçekleştirilen bu çalışmanın, *in vitro* uygulamasının yapılmasının ve arteannuin-B'nin ileri çalışmalara alınmasının gerçek bir direnç gelişimi durumunda işe yarar veriler sunulması açısından büyük bir önemi olabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmanın en önemli sonuçlarından biri AsFR, KPT 2 ve Hc β -tubulin ile kenetleme deneyinin sonucunda elli bitkisel ligand içinde dört ligandın hem KPT 2 hem de AsFR için en iyi ilk dört ligand olduklarının anlaşılmasıdır. Bu ligandlardan oreganol İstanbul kekiğinin bileşeni; kukurbitasin-B, momordisin II ve karantadiol-A ise kudret narının bileşenleridir ve bu moleküller çift etkili antihelmintik geliştirilmesinde kullanılabilir ilaç adaylarıdır. Oreganol, kekik yağında bulunmazken kekik suyunda bulunabilmektedir. Bu sonuçlar antihelmintik amaçlı kekik kullanımında uçucu yağı yerine kekik çayı veya kekik baharatının kullanılmasının daha isabetli olacağını göstermiştir. Kukurbitasin-B ise bu çalışmada en iyi inhibisyon özelliklerine sahip ligand olarak bulunmuş ve KPT 2 enzimine karşı *Ki* değeri 57,11 pM olduğu için inhibisyon mekanizmasının KPT 2 aracılığıyla olabileceği tahmin edilmiştir. Bu

mekanizmaya ilişkin akış şeması Şekil 4.134'te verilmiş ve tahmini mekanizma yolağı Şekil 4.135'te gösterilmiştir.

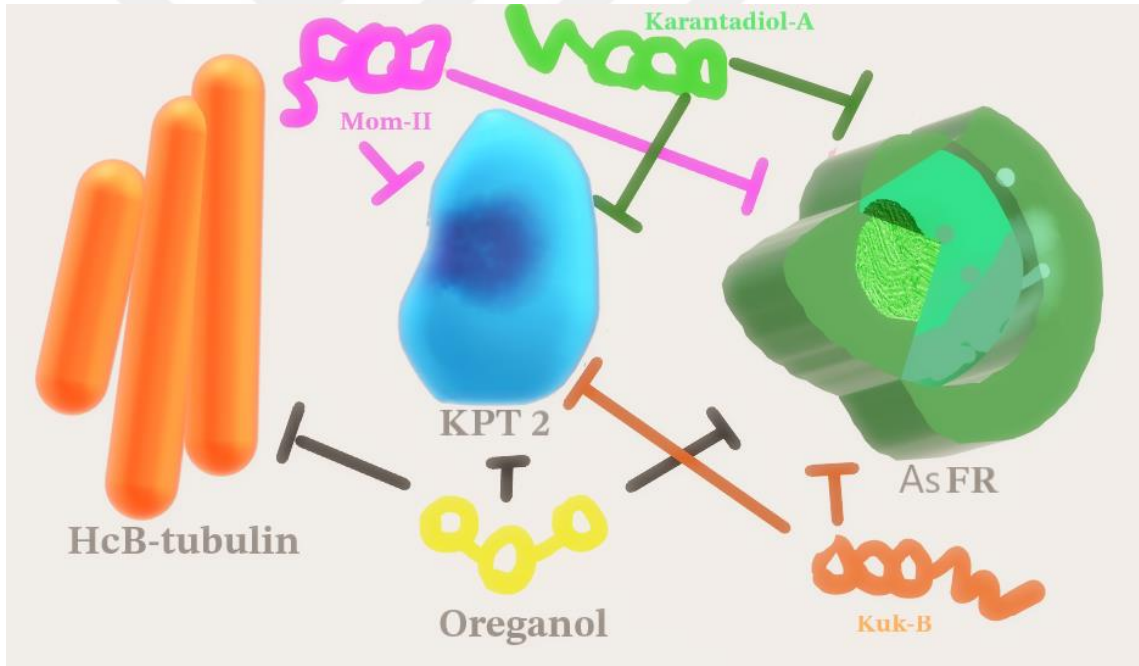


Şekil 4.134. Kukurbitasin-B'nin KPT2 bağlantılı etki mekanizmasının akış şeması



Şekil 4.135. Kukurbitasin-B'nin KPT2 bağlantılı antihelminitik etki mekanizması

Bu bitkisel moleküllerden oreganol, gastrointestinal absorpsiyonu oldukça zayıf bir molekül olduğu için oreganol açısından zengin olan İstanbul kekiği ve karantadiol-A açısından zengin olan kudret narı yaprağının birlikte tüketilmesi yan etkiye sebep olmayabilir. Ancak bunların saflaştırılarak kombine bir ilaç olarak kullanılmadan önce deney hayvanlarında denenmesi ve özellikle hipoglisemi açısından etkisinin test edilmesi, öncelikle dikkat edilmesi gereken hususlardandır. Bu çalışmanın kenetleme simülasyonları, en rasyonel ilaç kombinasyonlarının, en seçici bitkisel ligand olan oreganol ile en etkili ligandlardan kukurbitanlar (oreganol + karantadiol-A, momordisin II, kukurbitasin-B) şeklinde olabileceğini ortaya çıkarmıştır. Bu tür bir kombinasyon geniş spektrumlu bir ilaç adayı olmak için de uygun görünmekte çünkü oreganol Hc β -tubulini inhibe ederken, kukurbitan ligandlar CeGLUT1, SoCOX1, AsFR ve KPT 2'yi düşük bir konsantrasyonda inhibe edebilmektedir (Şekil 4.136).

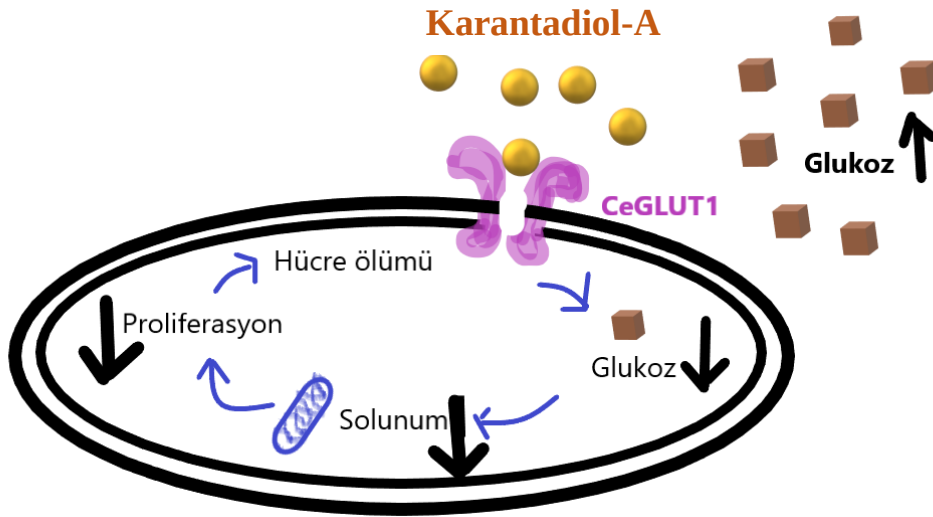


Şekil 4.136. Bu çalışmadaki en potent ligandlar ve hedefleri

Oreganol hem AsFR hem de Hc β -tubulin inhibisyonu açısından seçicidir. Aynı zamanda insan GLUT3 reseptörü ile bağlanma ilgisi çok düşük bulunduğu için bu açıdan yan etkisinin de olmayabileceği *in silico* hesaplamalar ile ilk kez gösterilmiştir.

Kukurbitasin- B ve momordisin II için bulunan sonuçlar bu iki molekülün IVC'den bile daha iyi inhibitörler olabileceğini göstermiştir. Bu arzu edilen sonuç, *O. volvulus* tedavisinde tek ilaç seçeneği olan IVC yerine, ondan daha etkili bir ilaç geliştirilebilmesi için kukurbitasin-B ve momordisin II'nin bitkilerden izole edilerek denenmesi gerektiğini göstermiştir. Bu sonuçlar gerçekten de yeni ve piyasadaki ilaçlardan daha etkili bir antihelmintik geliştirilmesi için ihtiyaç duyulan bilgileri sağlamıştır.

Bu çalışmaya göre karantadiol-A, CeGLUT1 reseptörü için denenen elli bitkisel ligand içinde en potent inhibitör adaydır ve olası inhibisyon mekanizması Şekil 4.137'de verilmiştir.



Şekil 4.137. Karantadiol-A'nın CeGLUT1 inhibisyonu ve etki mekanizması

Tezin arka cebindeki Ek-6'da bir parçası eksik olan bir yapboz bulunmaktadır. Bitkisel ligandlar tabanında yeni bir ilacın keşfini, ihtiyaçlar ve potansiyel faydalar eksenleri ile resmeden bu yapboz, resmin bütününe görebilmek için parçaları doğru şekilde bir araya getirme azmini gösteren araştırmacılar tarafından çözülebilecektir. Yeni bir ilaç keşfinin sabır isteyen sonucunu görebilmek için, doğru yöntem ve materyalleri bir araya getirmeye çalışan ve önemli bir sağlık sorununun çözümünde azimle çalışan araştırmacıların yaptığı binlerce işten biri gibi...

KAYNAKLAR

- Abad, M. J., Bedoya, I.M., Apaza, L., & Bermejo, P. (2012). The *Artemisia* L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils, *Molecules*, 17, 2542–2566. <https://doi.org/10.3390/molecules17032542>.
- Abdel-Gaber R. (2016). *Syphacia obvelata* (Nematode, Oxyuridae) infecting laboratory mice *Mus musculus* (Rodentia, Muridae): phylogeny and host-parasite relationship. *Parasitology Research*, 115, 975–985. DOI 10.1007/s00436-015-4825-0
- Abraham, K., Wöhrlin, F., Lindtner, O., Heinemeyer, G., & Lampen, A. (2010). Toxicology and risk assessment of coumarin: focus on human data. *Molecular nutrition & food research*, 54(2), 228–239. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900281>
- Abu-Shandi, K., Al-Rawashdeh, A., Al-Mazaideh, G., Abu-Nameh, E., Al-Amro, A., Al-Soufi, H., ... Al-Dawdeyah, A. (2015). A Novel Strategy for the Identification of the Medicinal Natural Products in *Rubus Fruticosus* Plant by Using GC/MS Technique: A Study on Leaves, Stems and Roots of the Plant. *Advances in Analytical Chemistry*, 5(2), 31-41. doi: 10.5923/j.aac.20150502.02.
- Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1998). Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1739-1745. <https://doi.org/10.1021/jf9708296>
- Aksoy, D. Y. (2014, Şubat). *Gelecekte Geleneksel Alternatif Tıp ve Şifa Algısı*. Geleneksel, Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Uygulamalarına Uluslararası Bakış Konferansında sunulan bildiri, Ankara. (s. 121).
- Al-Amry, M. A., Al-Amri, A., & Khan, A. O. (2008). Resolution of childhood recurrent corneal phlyctenulosis following eradication of an intestinal parasite. *Journal of AAPOS : the official publication of the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*, 12(1), 89–90. <https://doi.org/10.1016/j.jaapos.2007.07.011>
- Albani, C. M., Pensel, P. E., Elissondo, N., Gambino, G., & Elissondo, M. C. (2015). In vivo activity of albendazole in combination with thymol against *Echinococcus multilocularis*. *Veterinary Parasitology*, 212, 193–199. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.030>
- Albonico, M., Bickle, Q., Ramsan, M., Montresor, A., Savioli, L., & Taylor, M. (2003). Efficacy of mebendazole and levamisole alone or in combination against intestinal nematode infections after repeated targeted mebendazole treatment in Zanzibar. *Bulletin of the World Health Organization*, 81(5), 343–352. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2572452/>
- Alcántara, A. R., Hernaiz, M. J., & Sinisterra, J. V. (2011). 3.28 Biocatalyzed Production of Fine Chemicals. M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*

(İkinci bs.) içinde (s. 309-331). Pergamon: Academic Press. eBook ISBN: 9780080885049, Hardcover ISBN: 9780444533524.

AlGamdi, N., Mullen, W., & Crozier, A. (2011). Tea prepared from *Anastatica hirerochuntica* seeds contains a diversity of antioxidant flavonoids, chlorogenic acids and phenolic compounds. *Phytochemistry*, 72(2-3), 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.11.017>

Al-Hindi, A. I., Meqdad, B., & Kishta, R. (2021) Occurrence of intestinal parasitic diseases of mice *Mus musculus* in Gaza and Rafah, Gaza Strip, Palestine. *Munis Entomology & Zoology*, 16(1),268-274. Erişim adresi: <https://www.researchgate.net/publication/345079267> Occurrence of intestinal parasites of mice *Mus musculus* in Gaza and Rafah Gaza Strip Palestine

Ali, N., Aleem, U., Ali Shah, S. W., Shah, I., Junaid, M., Ahmed, G., ... Ghias, M. (2013). Acute toxicity, brine shrimp cytotoxicity, anthelmintic and relaxant potentials of fruits of *Rubus fruticosus* Agg. *BMC complementary and alternative medicine*, 13, 138. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-138>

Alipour, M., Khoobi, M., Emami, S., Fallah-Benakohal, S., Ghasemi-Niri, S. F., Abdollahi, M., ... Shafiee, A. (2014). Antinociceptive Properties of New Coumarin Derivatives Bearing Substituted 3,4-dihydro-2H-benzothiazines; *Daru-Journal of Faculty of Pharmacy*, 22(1), 9. DOI: 10.1186/2008-2231-22-9

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>

Andre, W. P. P., Ribeiro, W. L. C., Cavalcante, G. S., Santos, J. M. L., Macedo, I. T. F., Paula, ... Bevilaqua, C. M. L. (2016). Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. *Veterinary Parasitology*, 218, 52-58. PMid:26872928. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.01.001>.

Anthelmintic herbs. (2017). Erişim adresi: <http://www.motherherbs.com/anthelmintic.html>. (Erişim tarihi: 10.10.2017)

Anuchapreeda, S., Leechanachai, P., Smith, M. M., Ambudkar, S. V., & Limtrakul, P. N. (2002). Modulation of P-glycoprotein expression and function by curcumin in multidrug-resistant human KB cells. *Biochemical pharmacology*, 64(4), 573–582. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01224-8](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01224-8)

Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 22(2), 195–201. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti770>

Aruoma O. I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation research*, 523-524, 9–20. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(02\)00317-2](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(02)00317-2)

Aslanoğlu, A. (2021). Hindu Geleneğindeki Bazı Kutsal Ağaçlarla İlgili İnanış ve Uygulamalar. *Kilitbahir*, 18, 127-153. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4625783>

Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., & Coop, R. L. (2001). Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Veterinary parasitology*, 99(3), 205–219. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00467-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00467-8)

Atkins, R. C., Carey, F. A. (2003). *Organik Kimya, Kısa ve Öz*. (Türkçe çeviri) G. Okay, Y. Yıldırım (Çev.Ed.), İkinci baskı, (s. 464-466) Ankara: Bilim Kitabevi.

Ayaz, E., Yilmaz, H., Ozbek, H., Tas, Z., & Orunc, O. (2007). The effect of *Nigella sativa* oil against *Aspicularis tetraptera* and *Hymenolepis nana* in naturally infected mice. *Saudi medical journal*, 28(11), 1654–1657.
Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17965783/>

Ayaz, E., Gökbulut, C., Coşkun, H., Türker, A., Özsoy, Ş., & Ceylan, K. (2015). Evaluation of the anthelmintic activity of pumpkin seeds (*Cucurbita maxima*) in mice naturally infected with *Aspicularis tetraptera*. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 7(9), 189-193. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/283678017_Evaluation_of_the_anthelmintic_activity_of_pumpkin_seeds_Cucurbita_maxima_in_mice_naturally_infected_with_Aspiculuris_tetraptera

Baba, A. A., Ahmad, S. M., & Sheikh, K. A. (2009). Intestinal ascariasis: the commonest cause of bowel obstruction in children at a tertiary care center in Kashmir. *Pediatric surgery international*, 25(12), 1099–1102. <https://doi.org/10.1007/s00383-009-2486-8>

Babac M.T. (2004). "Possibility of an information system on plants of South-West Asia with particular reference to the Turkish Plants Data Service (TÜBİVES)" *Turkish Journal of Botany*, 28(1-2), 119-127. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/tbtkbotany/issue/11829/141325>

Badary O. A. (1999). Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 67(2), 135–142. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(98\)00242-6](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00242-6)

Bahorun, T., Luximon-Ramma, A., Crozier, A., & Aruoma, O. I. (2004). Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1553–1561. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1820>

Bailey, C. J., & Day, C. (1989). Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes care*, 12(8), 553–564. <https://doi.org/10.2337/diacare.12.8.553>

Baker D. G. (1998). Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clinical microbiology reviews*, 11(2), 231–266. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.231>

Baker D. G. (2007). Parasites of rats and mice. D. G. Baker (Ed.), *Flynn's Parasites of Laboratory Animals* (2. bs) içinde (s. 303-98). Blackwell. UK: Oxford.

Bansal, R., Huang, T., & Chun, S. (2018). Trichuriasis. *The American journal of the medical sciences*, 355(2), e3. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2017.09.003>

Başer K. H. C. (2001, Mayıs). Her Derde Deva Bir Bitki Kekik, *Bilim ve Teknik Dergisi*, 74-77.

Bauri, R. K., Tigga, M. N., & Kullu, S. S. (2015). A Review on use of medicinal plants to control parasites. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 6(4), 268-277. Erişim adresi: <http://op.niscair.res.in/index.php/IJNPR/article/view/8837>

Baytop T. (1999). *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*, Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri.

Behnke, J. M., & Robinson, M. (1985). Genetic control of immunity to *Nematospiroides dubius*: a 9-day anthelmintic abbreviated immunizing regime which separates weak and strong responder strains of mice. *Parasite immunology*, 7(3), 235–253. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1985.tb00073.x>

Bejaoui A., Boulila A., & Boussaid M. (2013). Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils and Solvent Extracts of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. From Tunisia. *The Journal of Medicinal Plants Research*, 7 (32), 2429. <https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5043>

Bell, E. W., & Zhang, Y. (2019). DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *Journal of cheminformatics*, 11(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0362-7>

Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(3), 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>

Bennett, R. N., & Wallsgrove, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *The New phytologist*, 127(4), 617–633. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x>

Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific reports*, 7(1), 10480. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8>

Bharti, S. K., Krishnan, S., Kumar, A., & Kumar, A. (2018). Antidiabetic phytoconstituents and their mode of action on metabolic pathways. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 9(3), 81–100.

Biasini, M., Schmidt, T., Bienert, S., Mariani, V., Studer, G., Haas, J., ... Schwede, T. (2013). OpenStructure: an integrated software framework for computational structural biology. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 69(Pt 5), 701–709. <https://doi.org/10.1107/S0907444913007051>

Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, ... Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*, 42(Web Server issue), W252–W258. <https://doi.org/10.1093/nar/gku340>

Binder, J., Frankild, S., Tsafou, K., Stolte, C., O'Donoghue, S., Schneider, R., & Jensen. L. J. (2021). Uniprot. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q25049> Erişim tarihi: 04.03.2021

Birt, D. F., Hendrich, S., & Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90(2-3), 157-177. doi: 10.1016/s0163-7258(01)00137-1.

Bitis, L., Kultur, S., Melikoglu, G., Ozsoy, N., & Can, A. (2010). Flavonoids and antioxidant activity of *Rosa agrestis* leaves. *Natural product research*, 24(6), 580–589. <https://doi.org/10.1080/14786410903075507>

Boemer, F., Deberg, M., Schoos, R., Caberg, J. H., Gaillez, S., Dugauquier, C., ... Debray, F. G. (2016). Diagnostic pitfall in antenatal manifestations of CPT II deficiency. *Clinical genetics*, 89(2), 193–197. <https://doi.org/10.1111/cge.12593>

Bonnefont, J. P., Djouadi, F., Prip-Buus, C., Gobin, S., Munnich, A., & Bastin, J. (2004). Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Molecular aspects of medicine*, 25(5-6), 495–520. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.06.004>

Bora, K.S., & Sharma, A. (2011). The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review, *Pharmaceutical Biology*, 49, 101–109. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.497815>.

Borba, H. R., Freire, R. B., Albuquerque, A. C., Cardoso, M. E. O., Braga, I. G., Almeida, S. T. P., ... Diré, G.F. (2010). Anthelmintic comparative study of *Solanum lycocarpum* St. Hill extracts in mice naturally infected with *Aspicularis tetraptera*. *Nature and Science*, 8(4), 95-100. Erişim adresi: http://www.sciencepub.net/nature/ns0804/15_2384_ART_ns0804_95_100.pdf

Bordoli, L., & Schwede, T. (2012). Automated protein structure modeling with SWISS-MODEL Workspace and the Protein Model Portal. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 857, 107–136. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6_5

Botanic gardens conservation international. (2013). Erişim adresi: http://www.bgci.org/index.php?option=com_content&id=2016&status=published. (Erişim tarihi: 08.10.2021)

Boubaker Elandalousi, R., Akkari, H., B'chir, F., Gharbi, M., Mhadhbi, M., Awadi, S., & Darghouth, M. A. (2013). *Thymus capitatus* from Tunisian arid zone: chemical composition and in vitro anthelmintic effects on *Haemonchus contortus*. *Veterinary parasitology*, 197(1-2), 374–378. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.05.016>

Breimer L. H. (1990). Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Molecular carcinogenesis*, 3(4), 188–197. <https://doi.org/10.1002/mc.2940030405>

Brisibe E. A., Umoren U. E., Brisibe F., Magalhães P. M., Ferreira J. F. S., Luthria D., ... Prior R. L. (2009). Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. *Food Chemistry*, 115(4), 1240-1246. doi:10.1016/j.foodchem.2009.01.033

Brzozowski K. (2021). Ramachandran Plot as a Tool for Peptide and Protein Structures' Quality Determination [Blog yazısı]. <https://www.peptideweb.com/ramachandran-plot-as-a-tool-for-peptide-and-protein-structures-quality-determination>. (Erişim tarihi: 29.10.2021)

Bulut İ. (2012). Mast Hücre Stabilizatörleri. *Türkiye Klinikleri J Allergy-Special Topics*. 5(1), 40-44. Erişim adresi: <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/tr-mast-hucre-stabilizatorleri-62754.html>

Burdock G.A. (2009). *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. 6. bs., Boca Raton, FL: CRC Press.

Burnichon, N., Brière, J. J., Libé, R., Vescovo, L., Rivière, J., Tissier, F., ... Gimenez-Roqueplo, A. P. (2010). SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Human molecular genetics*, 19(15), 3011–3020. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq206>

Buxton, S. K., Charvet, C. L., Neveu, C., Cabaret, J., Cortet, J., Peineau, N., ... Martin, R. J. (2014). Investigation of acetylcholine receptor diversity in a nematode parasite leads to characterization of tribendimidine- and derquantel-sensitive nAChRs. *PLoS pathogens*, 10(1), e1003870. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003870>

Čačić, M., Pavić, V., Molnar, M., Šarkanj, B., & Has-Schön, E. (2014). Design and Synthesis of Some New 1,3,4-Thiadiazines with Coumarin Moieties and Their Antioxidative and Antifungal Activity; *Molecules*, 19(1), 1163-1177. DOI: 10.3390/molecules19011163

Cai, T. Y., Zhang, Y. R., Ji, J. B., & Xing, J. (2017). Investigation of the component in *Artemisia annua* L. leading to enhanced antiplasmodial potency of artemisinin via

regulation of its metabolism. *Journal of ethnopharmacology*, 207, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.06.025>

Cala, A. C., Ferreira, J. F., Chagas, A. C., Gonzalez, J. M., Rodrigues, R. A., Foglio, M. A., ... Barioni Júnior, W. (2014). Anthelmintic activity of *Artemisia annua* L. extracts in vitro and the effect of an aqueous extract and artemisinin in sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Parasitology research*, 113(6), 2345–2353. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3891-z>

Caltagirone, S., Rossi, C., Poggi, A., Ranelletti, F. O., Natali, P. G., Brunetti, M., ... Piantelli, M. (2000). Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *International journal of cancer*, 87(4), 595–600. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20000815\)87:4<595::aid-ijc21>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20000815)87:4<595::aid-ijc21>3.0.co;2-5)

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>

Cameochemicals. (t.y.a). Erişim adresi: <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/2797>, (Erişim tarihi: 07.03.2021)

Cameochemicals. (t.y.b). Erişim adresi: <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/318>, (Erişim tarihi: 07.03.2021)

Cameochemicals. (t.y.c). Erişim adresi: <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/11097>, (Erişim tarihi: 07.03.2021)

Campbell W. C. (1993). Ivermectin, an antiparasitic agent. *Medicinal research reviews*, 13(1), 61–79. <https://doi.org/10.1002/med.2610130103>

Campbell, W. C., & Benz, G. W. (1984). Ivermectin: a review of efficacy and safety. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1984.tb00872.x>

Camurça-Vasconcelos, A. L., Bevilaqua, C. M., Morais, S. M., Maciel, M. V., Costa, C. T., Macedo, I. T., Oliveira, L. M., Braga, R. R., Silva, R. A., & Vieira, L. S. (2007). Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary parasitology*, 148(3-4), 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.012>

Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Duran, A., & Lira, R. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of ethnopharmacology*, 97(3), 429–439. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.013>

Ceccarelli, S. M., Chomienne, O., Gubler, M., & Arduini, A. (2011). Carnitine palmitoyltransferase (CPT) modulators: a medicinal chemistry perspective on 35 years of research. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(9), 3109–52. DOI: 10.1021/jm100809g

Chaaban, S., Jariwala, S., Hsu, C. T., Redemann, S., Kollman, J. M., Müller-Reichert, T., ... Brouhard, G. J. (2018). The Structure and Dynamics of *C. elegans* Tubulin Reveals the Mechanistic Basis of Microtubule Growth. *Developmental cell*, 47(2), 191–204.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.08.023>

Chaluvaraju, K.C., Makrabbi, K., & Naveenkumar, Z.K. (2015). Anthelmintic potentials of leaf extracts of medicinal plants; a brief review. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(12), 436-452. Erişim adresi: <https://www.semanticscholar.org/paper/ANTHELMINTIC-POTENTIALS-OF-LEAF-EXTRACTS-OF-PLANTS%3B-Review-Chaluvaraju/64ecc8fa23a578b419cff2bbcb262a775f5fbdb>

Chan, B. C., Ip, M., Gong, H., Lui, S. L., See, R. H., Jolival, C., ... Lau, C. B. (2013). Synergistic effects of diosmetin with erythromycin against ABC transporter over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) RN4220/pUL5054 and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 20(7), 611–614. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.02.007>

Changeux, J. P., & Edelstein, S. J. (1998). Allosteric receptors after 30 years. *Neuron*, 21(5), 959–980. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80616-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80616-9)

Chaudhari, B.P., Chaware, V.J., & Joshi, Y.R. (2009). Hepatoprotective activity of hydroalcoholic extract of *Momordica charantia* Linn. leaves against carbon tetra chloride induced hepatopathy in rats. *International Journal of ChemTech Research*, 1(2), 355-358. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/285695970_Hepatoprotective_activity_of_hydroalcoholic_extract_of_Momordica_charantia_Linn_leaves_against_carbon_tetra_chloride_induced_hepatopathy_in_rats

Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI). (t.y.a). Erişim adresi: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:3689>, (Erişim tarihi: 06.03.2021)

Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI). (t.y.b). Erişim adresi: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:18016>, (Erişim tarihi: 06.03.2021)

Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI). (t.y.c). Erişim adresi: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:36773>, (Erişim tarihi: 07.03.2021)

Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI). (t.y.d). Erişim adresi: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:3830>, (Erişim tarihi: 07.03.2021)

Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI). (t.y.e).
<http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:132824>, (Erişim tarihi:
07.03.2021)

Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI). (t.y.f). Erişim adresi:
<http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:3941>, (Erişim tarihi:
07.03.2021)

Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI). (t.y.g). Erişim adresi:
<http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:50027>, (Erişim tarihi:
07.03.2021)

Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI). (t.y.h). Friedelin.
Erişim adresi: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:5171>

Chemical studies on qinghaosu (artemisinin). China Cooperative Research Group on qinghaosu and its derivatives as antimalarials. (1982). *Journal of traditional Chinese medicine = Chung i tsa chih ying wen pan*, 2(1), 3–8. PMID: 6765845

Cheng, F., Shen, J., Luo, X., Zhu, W., Gu, J., Ji, R., ... Chen, K. (2002). Molecular docking and 3-D-QSAR studies on the possible antimalarial mechanism of artemisinin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10(9), 2883-91. doi: 10.1016/s0968-0896(02)00161-x.

Cheraghipour, K., Marzban, A., Ezatpour, B., Khanizadeh, S., & Koshki, J. (2018). Antiparasitic properties of curcumin: A review[J]. *AIMS Agriculture and Food*, 3(4), 561-578. doi: 10.3934/agrfood.2018.4.561 shu

Child International, CI. (2021). Global poverty and hunger, Facts & Global Hunger Statistics. Erişim adresi: <https://www.children.org/global-poverty/global-poverty-facts/facst-about-world-poverty-and-hunger> Erişim tarihi: 08.07.2021

Chukwurah, P. N., Brisibe, E. A., Osuagwu, A. N., & Okoko, T. (2014). Protective capacity of *Artemisia annua* as a potent antioxidant remedy against free radical damage. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4(Suppl 1), S92–S98. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C731>

Clark, P.R., Ward, W.T., Lang, S.A., Saghbini, A., & Kristan, D.M. (2013). Order of Inoculation during *Heligmosomoides bakeri* and *Hymenolepis microstoma* Coinfection Alters Parasite Life History and Host Responses. *Pathogens*, 2, 130-152. doi:10.3390/pathogens2010130

Cook G. C. (1994). *Enterobius vermicularis* infection. *Gut*, 35(9), 1159–1162. <https://doi.org/10.1136/gut.35.9.1159>

Cordell, G.A. (2009). Sustainable drugs and global health care. *Quimica Nova*, 32(5), 1356–1364. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000500047>

Corzo-Martinez, M., Nieves Corzo, N., & Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 609–625. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.011>

Costa, J. G., Nascimento, E. M., Campos, A. R., & Rodrigues, F. F. (2010). Antibacterial activity of *Momordica charantia* (Curcubitaceae) extracts and fractions. *Journal of basic and clinical pharmacy*, 2(1), 45–51. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3979203/>

Cunnick, J. E., Sakamoto, K., Chapes, S. K., Fortner, G. W., & Takemoto, D. J. (1990). Induction of tumor cytotoxic immune cells using a protein from the bitter melon (*Momordica charantia*). *Cellular immunology*, 126(2), 278–289. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(90\)90321-h](https://doi.org/10.1016/0008-8749(90)90321-h)

Çankaya, İ. T. (2014, Şubat). *Fitoterapiye Genel Yaklaşım*. Geleneksel, Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Uygulamalarına Uluslararası Bakış Konferansında sunulan bildiri. Ankara.

Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7 (42717), 1-13. doi: 10.1038/srep42717

Darla, M.M., Krishna, B.S., Rao, K.U., Reddy, N.B., Srivash, M.K., & Adeppa, K. (2013). Synthesis and Bio-Evaluation of Novel 7-Hydroxy Coumarin Derivatives via Knoevenagel Reaction; *Research on Chemical Intermediates*; 41, 1115–1133. DOI 10.1007/s11164-013-1258-1

Dassault Systèmes BIOVIA. (2020). Discovery Studio Modeling Environment, Release 2020, San Diego: Dassault Systèmes, 2020.

Davis, P. H. (1975). *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Cilt 5. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.

Davis, P. H. (1977). *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Cilt 3. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.

Davis, P.H. (1982). *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Cilt 7. (s. 309). Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.

Davis, P. H. & Meikle, R. D. (1972). *Rubus canescens* L., PH Davis (Ed.) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands: Cilt 4*. (s. 35) içinde. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.

de Amorin, A., Borba, H. R., Carauta, J. P., Lopes, D., & Kaplan, M. A. (1999). Anthelmintic activity of the latex of *Ficus* species. *Journal of ethnopharmacology*, 64(3), 255–258. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(98\)00139-1](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00139-1)

- de Clercq, D., Sacko, M., Behnke, J., Gilbert, F., Dorny, P., & Vercruysse, J. (1997). Failure of mebendazole in treatment of human hookworm infections in the southern region of Mali. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 57(1), 25–30. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.57.25>
- Deep, G., Dasgupta, T., Rao, A. R., & Kale, R. K. (2004). Cancer preventive potential of *Momordica charantia* L. against benzo(a)pyrene induced fore-stomach tumourigenesis in murine model system. *Indian journal of experimental biology*, 42(3), 319–322. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/152333304/>
- Deng, Y., Liu, Z., & Geng, Y. (2016). Anti-allergic effect of *Artemisia* extract in rats. *Experimental and therapeutic medicine*, 12(2), 1130–1134. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3361>
- Deori, K., & Yadav, A. K. (2016). Anthelmintic effects of *Oroxylum indicum* stem bark extract on juvenile and adult stages of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda), an in vitro and in vivo study. *Parasitology research*, 115(3), 1275–1285. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4864-6>
- Derothe, J. M., Loubès, C., Orth, A., Renaud, F., & Moulia, C. (1997). Comparison between patterns of pinworm infection (*Aspicularis tetraptera*) in wild and laboratory strains of mice, *Mus musculus*. *International journal for parasitology*, 27(6), 645–651. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(96\)00196-8](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(96)00196-8)
- Deschauer, M., Wieser, T., & Zierz, S. (2005). Muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency: clinical and molecular genetic features and diagnostic aspects. *Archives of neurology*, 62(1), 37–41. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.1.37>
- Diawara, A., Schwenkenbecher, J. M., Kaplan, R. M., & Prichard, R. K. (2013). Molecular and biological diagnostic tests for monitoring benzimidazole resistance in human soil-transmitted helminths. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(6), 1052–1061. doi:10.4269/ajtmh.12-0484
- Diaz, E., Mondragon, J., Ramirez, E., & Bernal, R. (2003). Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 68(4), 384–385. DOI:10.4269/ajtmh.2003.68.384
- Dickancaité, E., Nemeikaitė, A., Kalvelytė, A., & Cėnas, N. (1998). Prooxidant character of flavonoid cytotoxicity: structure-activity relationships. *Biochemistry and molecular biology international*, 45(5), 923–930. <https://doi.org/10.1002/iub.7510450510>
- Di Lernia, V., Ricci, C., & Albertini, G. (2004). Skin eruption associated with *Hymenolepis nana* infection. *International journal of dermatology*, 43(5), 357–359. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.02021.x>
- Dold, C., & Holland, C. V. (2011). *Ascaris* and ascariasis. *Microbes and infection*, 13(7), 632–637. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.012>

Dominguez-Vazquez, A., Taylor, H. R., Greene, B. M., Ruvalcaba-Macias, A. M., Rivas-Alcala, A. R., Murphy, R. P., & Beltran-Hernandez, F. (1983). Comparison of flubendazole and diethylcarbamazine in treatment of onchocerciasis. *Lancet (London, England)*, 1(8317), 139–143. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(83\)92753-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(83)92753-8)

Dong, L., Duan, W., Chen, J., Sun, H., Qiao, C., Xia, C. (2014). An Artemisinin Derivative of Praziquantel as an Orally Active Antischistosomal Agent. *PLOS ONE*, 9(11), e112163. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112163>

Dos Santos, S. C., Teixeira, M. C., Dias, P. J., Sá-Correia, I. (2014). MFS transporters required for multidrug/multixenobiotic (MD/MX) resistance in the model yeast: understanding their physiological function through post-genomic approaches. *Frontiers in Physiology*, 5,180. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00180>

Drăgan, L., Györke, A., Ferreira, J. F., Pop, I. A., Dunca, I., Drăgan, M., ... Cozma, V. (2014). Effects of *Artemisia annua* and *Foeniculum vulgare* on chickens highly infected with *Eimeria tenella* (phylum Apicomplexa). *Acta veterinaria Scandinavica*, 56(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-56-22>

Drugbank. (t.y.). Ellagic acid. Erişim adresi: <https://go.drugbank.com/drugs/DB08846> (Erişim tarihi: 11.12.2019)

Duangmano, S., Sae-Lim, P., Suksamrarn, A., Patmasiriwat, P., & Domann, F. E. (2012). Cucurbitacin B Causes Increased Radiation Sensitivity of Human Breast Cancer Cells via G2/M Cell Cycle Arrest. *Journal of oncology*, 2012, 601682. <https://doi.org/10.1155/2012/601682>

Duarte, Y., Márquez-Miranda, V., Miossec, M. J., & González-Nilo, F. (2019). Integration of target discovery, drug discovery and drug delivery: a review on computational strategies. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 11, e1554. doi: 10.1002/wnan.1554

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ). (2006). Preventive Chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers. World Health Organization 2006. Erişim adresi <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43545>

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ). (2008). *Helmintik Enfeksiyonların Dünya Üzerindeki Dağılımı*. Erişim adresi: http://www.who.int/intestinal_worms/epidemiology/en/. (Erişim tarihi: 18.07.2017)

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ). (2012, Ocak). *Accelerating Work to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: A Roadmap for Implementation*. Washington: WHO. 2012, 1-42. Erişim adresi: https://www.who.int/neglected_diseases/NTD_RoadMap_2012_Fullversion.pdf

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ). (2013, Mayıs). *WHO Traditional Medicine Strategy: 2014–2023*. Geneva: World Health Organization; 2013. Erişim adresi: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241506096>

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ). (2015). *PCT Data Bank. Soil Transmitted Helminthiasis*. Erişim adresi: https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sth/sth.html (Erişim tarihi: 10.12. 2018).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ). (2017). *Parasitic Infections*. paragraf 5. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/en/> (Erişim tarihi: 18 .07. 2017)

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ). (2020). *Taeniasis-cysticercosis*. Erişim adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/taeniasis-cysticercosis> Erişim tarihi: 21.12.2020

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ). (2020b, 13 Temmuz). *As more go hungry and malnutrition persists, achieving Zero Hunger by 2030 in doubt, UN report warns*. DSÖ online haberi. Erişim adresi <https://www.who.int/news/item/13-07-2020-as-more-go-hungry-and-malnutrition-persists-achieving-zero-hunger-by-2030-in-doubt-un-report-warns> (Erişim tarihi 28.11.2021).

Eckert, J., & Deplazes, P. (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clinical microbiology reviews*, 17(1), 107–135. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.107-135.2004>

Egan, W. J., Merz, K. M., Jr, & Baldwin, J. J. (2000). Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *Journal of medicinal chemistry*, 43(21), 3867–3877. <https://doi.org/10.1021/jm000292e>

Elisia, I., Hu, C., Popovich, D. G. & Kitts, D. D. (2007). Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. *Food Chemistry*, 101(3), 1052-1058. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814606002068>

Elshazly, A. M., Awad, S. I., Azab, M. S., Elsheikha, H. M., Abdel-Gawad, A. G., Khalil, H. H., & Morsy, T. A. (2008). Helminthes of synanthropic rodents (Rodentia: Muridae) from Dakahlia and Menoufia, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 38(3), 727–740.

Erdoğan P. (2013). *Azadirachta indica* A. Juss İle *Melia azedarach* L. Bitkilerinden Elde Edilen İnsektisitlerin Özellikleri ve Zararlılara Etkisi. *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 3(2), 14-25. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/1329699>

Eren, D., & Yalçın, İ. (2020). Rasyonel İlaç Tasarımında Moleküler Mekanik Ve Moleküler Dinamik Yöntemlerin Kullanılma Amacı. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 44(2), 334-355. Doi: 10.33483/jfpau.688351

- Esen, G., Azaz, A. D., Kurkcuoglu, M., Baser, K. H. C., Tinmaz, A. (2007). Essential oil and antimicrobial activity of wild and cultivated *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) letswaart from the Marmara region, Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(5), 371-376. DOI: 10.1002/ffj.1808. Erişim adresi: <http://dspace.balikesir.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12462/8216/gulden-esen.pdf?sequence=3>
- Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental health perspectives*, 109 Suppl 1(Suppl 1), 69–75. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s169>
- Fahmy M. A. (1954). An investigation on the life cycle of *Trichuris muris*. *Parasitology*, 44(1-2), 50–57. <https://doi.org/10.1017/s003118200001876x>
- Fakılı O. (2010). *Türkiye’de Kekik Adı İle Anılan Bitkiler Konusunda Yapılan Çalışmaların Envanteri*. (Yüksek Lisans Tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Adana. Erişim adresi: <http://traglor.cu.edu.tr/objects/objectFile/2x5rCuOF-3082013-55.pdf>
- Falodun A. (2010). Herbal medicine in Africa-distribution, standardization and prospects. *Research Journal of Phytochemistry*, 4(3), 154–161. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/247914093_Herbal_Medicine_in_Africa-Distribution_Standardization_and_Prospects
- Fauci, A. S., Braunwald, E., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., Loscalzo, J. (Ed.) (2008). *Harrison’s Principles of Internal Medicine*. 17. bs. (s. 355-372, 1319-1323). New York, NY: The McGraw-Hill Comp.
- Feliu, C., López, M., Gómez, M. S., Torres, J., Sánchez, S., Miquel, J., ... Foronda, P. (2012). Parasite fauna of rodents (Murinae) from El Hierro (Canary Islands, Spain): a multidisciplinary approach. *Acta parasitologica*, 57(2), 171–178. <https://doi.org/10.2478/s11686-012-0016-7>
- Felt, S. A., & White, C. E. (2005). Evaluation of a timed and repeated perianal tape test for the detection of pinworms (*Trypanoxyuris microon*) in owl monkeys (*Aotus nancymae*). *Journal of medical primatology*, 34(4), 209–214. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2005.00111.x>
- Ferguson D. L. (1981). Anthelmintic activity of albendazole against adult *Metastrongylus apri* in artificially infected swine. *Journal of animal science*, 53(6), 1511–1515. <https://doi.org/10.2527/jas1982.5361511x>
- Ferreira, J. F. S., & Janick, J. (1995). Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. *International Journal of Plant Sciences*, 156, 807-815. Erişim adresi: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/297304>

Ferreira, J. F. S., & Janick, J. (2009). Annual wormwood (*Artemisia annua* L.). *New Crop FactSEET*. Purdue University. Erişim adresi: www.hort.purdue.edu/newcrop/CropFactSheets/artemisia.pdf

Ferreira, L. E., Benincasa, B. I., Fachin, A. L., França, S. C., Contini, S., Chagas, A., & Belebani, R. O. (2016). *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. *Veterinary parasitology*, 228, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.08.011>

Field, J. J., Díaz, J. F., & Miller, J. H. (2013). The binding sites of microtubule-stabilizing agents. *Chemistry & biology*, 20(3), 301–315. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.01.014>

Flynn R. J. (1973). Nematodes. *Parasites of laboratory animals* içinde (s. 203-320). Ames: Iowa State University Press. Erişim adresi: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19730805699>

Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. (2020). State of Food Insecurity and Nutrition in the World 2020 online summary, <http://www.fao.org/state-of-food-security-nutrition/en/> (Erişim tarihi: 08.07.2021)

Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. (2021). Food Loss and Food Waste. <http://www.fao.org/food-loss-and-food-waste/flw-data>) (Erişim tarihi: 08.07.2021)

FoodB. (t.y.a). Erişim adresi: <https://foodb.ca/compounds/FDB002774>, (Erişim tarihi: 07.03.2021)

FoodB. (t.y.b). Erişim adresi: <https://foodb.ca/compounds/FDB000696>, (Erişim tarihi: 07.03.2021)

FoodB. (t.y.c). Erişim adresi: <https://foodb.ca/compounds/FDB014770>, (Erişim tarihi: 07.03.2021)

Fuller, J. C., Burgoyne, N. J., & Jackson, R. M. (2009). Predicting druggable binding sites at the protein-protein interface. *Drug discovery today*, 14(3-4), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.10.009>

Galzerano, A., Sabatini, E., & Duri, D. (2010). *Ascaris lumbricoides* infection: an unexpected cause of pancreatitis in a western Mediterranean country. *Eastern Mediterranean health journal = La revue de sante de la Mediterranee orientale = al-Majallah al-sihhiyah li-sharq al-mutawassit*, 16(3), 350–351. Erişim adresi: https://applications.emro.who.int/emhj/V16/03/16_3_2010_0350_0351.pdf

García, G., Sánchez, N., García, A., Refoyo, P. & Pardos, F. (2016, Mart). Does sympatric speciation in species of the genus *Eimeria*, 1875 Schneider? University Complutense of Madrid 2016 Poster. [10.13140/RG.2.1.2080.4085](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2080.4085)

Gargominy O. (2020). Taxonomic Repository: Fauna, Flora And Fungus Of Metropolitan and Overseas France Taxref V14.0 Erişim adresi: (https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/238792/tab/taxo?lg=en) (Erişim tarihi: 02.09.2021)

Gholipoury, M., Rezai, H. R., Namroodi, S., & Arab Khazaeli, F. (2018). Response to: Comment on "Zoonotic and Non-zoonotic Parasites of Wild Rodents in Turkman Sahra, Northeastern Iran". *Iranian journal of parasitology*, 13(4), 681–682. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6348219/>

Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., & Wendoloski, J. J. (1999). A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of combinatorial chemistry*, 1(1), 55–68. <https://doi.org/10.1021/cc9800071>

Giannakakou, P., Sackett, D. L., Kang, Y. K., Zhan, Z., Buters, J. T., Fojo, T., & Poruchynsky, M. S. (1997). Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *The Journal of biological chemistry*, 272(27), 17118–17125. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.27.17118>

Gilioli, R., Sakurada, J. K., Andrade, L. A., Kraft, V., Meyer, B., & Rangel, H. A. (1996). Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. *Laboratory animal science*, 46(5), 582–584. PMID: 8905597

Gilleard J. S. (2006). Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and genetics. *International journal for parasitology*, 36(12), 1227–1239. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.06.010>

Giray, H., & Keskinoglu, P. (2006). İlkokul öğrencilerinde *Enterobius vermicularis* varlığı ve etkileyen etmenler [The prevalence of *Enterobius vermicularis* in schoolchildren and affecting factors]. *Turkiye parazitolojii dergisi*, 30(2), 99–102. Erişim adresi: http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_22736/TPD-30-99.pdf

Girgin A. (2014). “Asklepion girişi” fotoğrafı. Erişim adresi: <http://www.girgin.org/asklepion/> Erişim tarihi: (15.11.2021)

Gogoi, S., & Yadav, A. K. (2016). *In vitro* and *in vivo* anthelmintic effects of *Caesalpinia bonducella* (L.) Roxb. leaf extract on *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) and *Syphacia obvelata* (Nematoda). *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 5(4), 427–433. <https://doi.org/10.5455/jice.20160821024821>

Gomar, A., Hosseini, A. & Mirazi, N. (2014). Preventive effect of *Rubus fruticosus* on learning and memory impairment in an experimental model of diabetic neuropathy in male rats. *PharmaNutrition*, 2(4), 155-160. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2014.09.001>

Gomes, S. V. F, Nogueira, P. C. L., & Moraes, V. R. S. (2011). Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. *Eclet Quím*, 36(1), 64-77. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702011000100005>

Griffiths H. J. (1971). Some common parasites of small laboratory animals. *Laboratory animals*, 5(1), 123–135. <https://doi.org/10.1258/002367771781006717>

Grover, J. K. & Yadav S. P. (2004). Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2004), 123–132.

Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15), 2714–2723. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181505>

Guimarães, A.O., Valença, F.M., Sousa, J.B.S., Souza, S.A., Madi, R.R., & Melo, C.M. (2014). Parasitic and fungal infections in synanthropic rodents in an area of urban expansion, Aracaju, Sergipe State, Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 36(1), 113-120, <https://doi.org/10.4025/actasciobiols.v36i1.19760>

Guo, G., Shi, W., Shi, F., Gong, W., Li, F., Zhou, G., & She, J. (2019). Anti-inflammatory effects of eriocitrin against the dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in murine model. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 33(11), 22400. doi: 10.1002/jbt.22400.

Gupta, M., Sharma, S., Gautam, A., & Bhadauria, R. (2011). *Momordica charantia* Linn. (Karela): Nature's silent healer. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 11, 32–7. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/285966662_Momordica_charantia_linn_Karela_Nature's_silent_healer

Gupta, M., Sharma, S., & Bhadauria, R. (2016). *In vitro* efficacy of *Momordica charantia* extracts against phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biopesticides*. 9, 8–22. https://www.jbiopest.com/users/LW8/efiles/vol_9_1_8-22.pdf

Gürbüz, B., İpek, A., & Ayvaz, N. (2011). Türkiye Florasındaki *Origanum* Türlerinin Yayılış Alanları ve Ticareti. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4(2), 55–58. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/derleme/issue/35083/389086>

Harborne, J. B., & Grayer, R. J. (1994). Flavonoids and insects. J. B. Harborne (Ed.), *The flavonoids: advances in research since 1986*. 1. bs. İçinde (s. 589–618). Londra, UK: Chapman & Hall.

Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481–504. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00235-1)

Harter S. (2003). Implication de la paléoparasitologie dans l'étude des populations anciennes de la vallée du nil et du Proche-orient: études de cas. [Doktora Tezi]

Université de Reims Champagne-Ardenne, Fransa. Erişim adresi: <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-00930943/>

Harvey C. M. (1996). Anthelmintic macrocyclic lactone compositions. *European Patent Office*, EP0873127A4, 1-9. Erişim adresi: <https://patents.google.com/patent/EP0873127A4/en>

Haslam, E., & Cai, Y. (1994). "Plant polyphenols (vegetable tannins): Gallic acid metabolism". *Natural Product Reports*. 11 (1), 41-66. doi:10.1039/NP9941100041.

Hazır, C., Gündeşli, H., Ozkırım, A., & Keskin, N. (2009). Ankara'da Farklı Sosyoekonomik Düzeye Sahip İki İlköğretim Okulu Öğrencileri Arasında *Enterobius vermicularis*'in Dağılımı [Distribution of *Enterobius vermicularis* among the schoolchildren of two primary schools with different social-economic status in the Ankara province]. *Türkiye parazitolojii dergisi*, 33(1), 54–58. Erişim adresi: http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_23060/TPD-33-54.pdf

Heatley, J.J., & Harris, M.C. (2008). Hamsters and gerbils. M. Michell, T.N. Tully (Ed.), *Manual of exotic pet practice* içinde (s. 406-432). USA: Saunders Elsevier.

Hedrich H. J. (2012). *The Laboratory Mouse* (ikinci basım) (s. 504-512). London, UK: Elsevier.

Heinz, H., & Ramezani-Dakhel, H. (2016). "Simulations of inorganic-bioorganic interfaces to discover new materials: insights, comparisons to experiment, challenges, and opportunities". *Chemical Society Reviews*. 45 (2), 412–48. doi:10.1039/C5CS00890E. PMID 26750724.

Hill, W. A., Randolph, M. M., & Mandrell, T. D. (2009). Sensitivity of perianal tape impressions to diagnose pinworm (*Syphacia* spp.) infections in rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* : JAALAS, 48(4), 378–380. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2715927/>

Hrchova, G. & Velebny, S. (2013). Pharmacological Potential of Selected Natural Compounds in the Control of Parasitic Diseases, *Springer Briefs in Pharmaceutical Science & Drug Development*, (s. 125). DOI: 10.1007/978-3-7091-1325-7_2 Erişim adresi: https://www.readcube.com/articles/10.1007%2F978-3-7091-1325-7_2

Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., ... Sandoval-Castro, C. A. (2012). Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary parasitology*, 186(1-2), 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.042>

Hostetler, G. L., Ralston, R. A., & Schwartz, S. J. (2017). Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. *Advances in nutrition* (Bethesda, Md.), 8(3), 423–435. <https://doi.org/10.3945/an.116.012948>

Hotez, P. J., Fenwick, A., Savioli, L., & Molyneux, D. H. (2009). Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *Lancet (London, England)*, 373(9674), 1570–1575. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60233-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60233-6)

Hsiao, Y. S., Jogl, G., Esser, V., & Tong, L. (2006). Crystal structure of rat carnitine palmitoyltransferase II (CPT-II). *Biochemical and biophysical research communications*, 346(3), 974–980. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.006>

Hu, Y., Gai, Y., Yin, L., Wang, X., Feng, C., Feng, L., ... Wang, D. C. (2010). Crystal structures of a *Populus tomentosa* 4-coumarate:CoA ligase shed light on its enzymatic mechanisms. *The Plant cell*, 22(9), 3093–3104. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072652>

Huang, W. Y., Zhang, H. C., Liu, W. X., & Li, C. Y. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 13(2), 94–102. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1100137>

Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., & Goodsell, D. S. (2007). A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of computational chemistry*, 28(6), 1145–1152. <https://doi.org/10.1002/jcc.20634>

Human Metabolome Database (HMDB). (t.y.a). Gallic acid. Erişim adresi: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0240519>. Erişim tarihi: 20.10.2019

Human Metabolome DataBase (HMBD). (t.y.b). P-cymen. Erişim adresi: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0005805> (Erişim tarihi: 10.11.2019)

Ietswaart J. H. (1982). *Origanum* L. P.H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Cilt 7 içinde (s. 309). Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.

Inaoka, D. K., Shiba, T., Sato, D., Balogun, E. O., Sasaki, T., Nagahama, M., ... Harada, S. (2015). Structural Insights into the Molecular Design of Flutolanil Derivatives Targeted for Fumarate Respiration of Parasite Mitochondria. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 15287–15308. <https://doi.org/10.3390/ijms160715287>

Integrated Taxonomic Information System (ITIS). (t.y.a). *Momordica charantia* L. on-line database, www.itis.gov, CC0 <https://doi.org/10.5066/F7KH0KBK> Erişim adresi: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=22399#null. (Erişim tarihi: 12.10.2021)

Integrated Taxonomic Information System – Report. (t.y.b). *Rubus canescens* DC. taksonomisi. Taxonomic Serial No.: 837316 https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=837316#null (Erişim tarihi: 11.09.2021)

Isaac, C., Igbinsosa, B.I., Ohiolei, J.A., & Osimen, C.E. (2018). Endoparasites of Small Mammals in Edo State, Nigeria: Public Health Implications. *The Korean Journal of Parasitology*, 56 (1), 93-100. <https://doi.org/10.3347/kjp.2018.56.1.93>

Islamuddin, M., Chouhan, G., Tyagi, M., Abdin, M. Z., Sahal, D., & Afrin, F. (2014). Leishmanicidal activities of *Artemisia annua* leaf essential oil against Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in microbiology*, 5, 626. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00626>

İbn-i Sina. (çev. 2010). *El-kanun fi't-tıbb*. Cilt 5. E. Kahya (Çev.) (s. 108-146). Ankara: Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu Atatürk Kültür Merkezi.

Jacobsen, K. H., Ribeiro, P. S., Quist, B. K., & Rydbeck, B. V. (2007). Prevalence of intestinal parasites in young Quichua children in the highlands of rural Ecuador. *Journal of health, population, and nutrition*, 25(4), 399–405. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2754013/>

Jain, P., Singh, S., Singh, S.K., Verma, S.K., Kharya, M.D., & Solanki, S. (2013). Anthelmintic Potential Of Herbal Drugs. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences*, 2(3), 412-427. Erişim adresi: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.300.5506&rep=rep1&type=pdf>

Jambou, R., Legrand, E., Niang, M., Khim, N., Lim, P., Volney, B., ... Mercereau-Puijalon, O. (2005). Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet (London, England)*, 366(9501), 1960–1963. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67787-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67787-2)

Jamkhande, P. G., & Barde, S. R. (2014). Evaluation of anthelmintic activity and in silico PASS assisted prediction of *Cordia dichotoma* (Forst.) root extract. *Ancient science of life*, 34(1), 39–43. <https://doi.org/10.4103/0257-7941.150779>

Jeremić, D., Jokić, A., Behbud, A., & Stefanović, M. (1973). A new type of sesquiterpene lactone isolated from *Artemisia annua* L. arteannuin B, *Tetrahedron Letters*, 14(32), 3039-3042. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)96314-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)96314-2).

Jiang, H., Liu, T., Gao, S., Wang, R., Zhang, R., Meng, H., Li, L., (2021). Potential distribution of *Artemisia annua* L. under climate change. *Authorea*. (baskıda)
DOI: 10.22541/au.161476488.83887871/v1

Jimenez Piqueras A. M. (1992). *Contribucion al conocimiento de la parasitofauna de micromamiferos de las islas de Corcega (Francia)*. (Doktora tezi). University of Valencia, Valencia. Erişim adresi: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=227204>

Juteau, F., Masotti, V., Bessière, J. M., Dherbomez, M., & Viano, J. (2002). Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. *Fitoterapia*, 73(6), 532–535. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(02\)00175-2](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(02)00175-2)

Kabsch W. (1978). A discussion of the solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Crystallogr.*, 34, 827-828. <https://doi.org/10.1107/S0567739478001680>

Kaplan R. M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in parasitology*, 20(10), 477–481. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.001>

Karam, S., & Bhavna, V. (2013). Scope of herbal anthelmintics: An ayurvedic perspective. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 4(4), 589-594. DOI:[10.7897/2277-4343.04428](https://doi.org/10.7897/2277-4343.04428)

Karaman D. (2021, Temmuz). *Ambalaj Aldanmasından Artakalan: İsrâf ve Açlık*. International Multi-Diciplinary Children's Studies Congress'de sunulan bildiri (s. 371-380), Ankara. ISBN:978-625-7720-44-1. Erişim adresi: https://2dc40e33-085f-40e0-8172-9a1f898c1942.filesusr.com/ugd/d0a9b7_2e9ee4d3af454e6eab405b0a0748b3bc.pdf

Karaman, D., Girişgin, A.O., Girişgin, O. (2021, Temmuz). *Kaçınılmaz Son Mu, Mutlu Son Mu? In Silico Anthelmintik Direnç Gelişimi Senaryosu, Başrolde Arteannuin-B*. International Asian Congress On Contemporary Sciences-V kongresinde sunulan bildiri (s. 768-776). Nakhchivan State University, Azerbaycan. Erişim adresi: https://www.asyakongresi.org/_files/ugd/614b1f_b7dfcee814a640408067b8dd25f58b2f.pdf

Karaman, Ö, Elgin Cebe, G. (2016). Diyabet ve Türkiye’de antidiyabetik olarak kullanılan bitkiler. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 40(3), 47-61.

Kasım H. (1994). *Bursa yöresi ilkokul çocuklarında gastro-intestinal parazitlerin yayılışı*. (Yüksek Lisans Tezi). (s. 29-30). Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı, Bursa.

Keeling J. E. (1961a). Experimental trichuriasis. I. Antagonism between *Trichuris muris* and *Aspiculuris tetraptera* in the albino mouse. *The Journal of parasitology*, 47, 641–646. PMID: 13752159

Keeling J. E. (1961b). Experimental trichuriasis. II. Anthelmintic screening against *Trichuris muris* in the albino mouse. *Journal of Parasitology*, 47: 647–651. PMID: 13752160

Keiser, J., & Utzinger, J. (2008). Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 299(16), 1937–1948. <https://doi.org/10.1001/jama.299.16.1937>

Keiser, J., Veneziano, V., Rinaldi, L., Mezzino, L., Duthaler, U., & Cringoli, G. (2010). Anthelmintic activity of artesunate against *Fasciola hepatica* in naturally infected sheep. *Research in veterinary science*, 88(1), 107–110. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.05.007>

Khalil, A.I., Lashein, G.H., Morsy, G.H., & Abdel-Mottaleb, D.I. (2014). Oxyurids of wild and laboratory rodents from Egypt. *Life Science Journal*, 11(3), 94–107. Erişim adresi: http://www.lifesciencesite.com/ljsj/life1103/013_22963life110314_94_107.pdf

Kılıç, Ö., & Bağcı, E. (2008). *Origanum vulgare* L. subsp. *gracile* (C. Koch) Ietswaart'nin Uçucu Yağ Verimi, Kompozisyonu ve Çay olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması Üzerine Bir Çalışma. *Fırat Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 20(1), 83-89. Erişim adresi: <http://acikerisim.bingol.edu.tr:8080/bitstream/handle/20.500.12898/568/C1origanum%20FIRATENST.%20DER.%20bas%C4%B1ld%C4%B1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., ... Bolton, E. E. (2021). PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1388–D1395. doi:10.1093/nar/gkaa971.

Klochkov, S. G., Pukhov, S. A., Afanasieva, S. V., Anikina, L. V., & Ermatova, A. B. (2015). Amination Products Of *Inula Britannica* Lactones And Their Antitumor Activity. *Chemistry of Natural Compounds*, 51(3), 435-443. DOI 10.1007/s10600-015-1310-z

Klochkov, S. G., Neganova, M. E., Pukhov, S. A., Afanas'eva, S., Yu, A., Yandulova, R., & Yu, E. (2020). New Arteannuin B Derivatives And Their Cytotoxic Activity. *Chemistry of Natural Compounds*, 56(3), 445-451. DOI: 10.1007/s10600-020-03059-2

Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., & Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American journal of clinical nutrition*, 76(3), 560–568. <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.3.560>

Kofoed, C. A., & White, A. W. (1919). A new nematode infection of man. *JAMA*, 72(8): 567-579. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1919.02610080033010>.

Kong, J. O., Park, I. K., Choi, K. S., Shin, S. C., & Ahn, Y. J. (2007). Nematicidal and Propagation Activities of Thyme Red and White Oil Compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). *Journal of nematology*, 39(3), 237–242. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2586503/>

Kornele, M. L., McLean, M. J., O'Brien, A. E., & Phillippi-Taylor, A. M. (2014). Antiparasitic resistance and grazing livestock in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244(9), 1020–1022. <https://doi.org/10.2460/javma.244.9.1020>

Koparal, A. T., & Zeytinoglu, M. (2003). Effects of Carvacrol on a Human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cell Line, A549. *Cytotechnology*, 43(1-3), 149–154. <https://doi.org/10.1023/b:cyto.0000039917.60348.45>

Koukoulitsa, C., Karioti, A., Bergonzi, M. C., Pescitelli, G., Di Bari, L., & Skaltsa, H. (2006). Polar constituents from the aerial parts of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* growing wild in Greece. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(15), 5388–5392. <https://doi.org/10.1021/jf061477i>

Kozan, E., Çankaya, I. T., Kahraman, C., Akkol, E. K., & Akdemir, Z. (2011). The in vivo anthelmintic efficacy of some *Verbascum* species growing in Turkey. *Experimental parasitology*, 129(2), 211–214. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.06.005>

Kulisić, T., Krisko, A., Dragović-Uzelac, V., Milos, M., & Pifat, G. (2007). The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. *International journal of food sciences and nutrition*, 58(2), 87–93. <https://doi.org/10.1080/09637480601108307>

Kundrotas, P. J., Zhu, Z., Janin, J., & Vakser, I. A. (2012). Templates are available to model nearly all complexes of structurally characterized proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(24), 9438–9441. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200678109>

Kusamran, W. R., Ratanavila, A., & Tepsuwan, A. (1998). Effects of neem flowers, Thai and Chinese bitter gourd fruits and sweet basil leaves on hepatic monooxygenases and glutathione S-transferase activities, and in vitro metabolic activation of chemical carcinogens in rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 36(6), 475–484. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(98\)00011-8](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(98)00011-8)

Laakkonen, J., Kallio-Kokko, H., Vapalahti, O., Vaheri, A., Vyskočilová, M., Munclinger, P., ... Henttonen, H. (2007). The screening of parasites and viral pathogens of small mammals from a farm in southern Finland, and genetic identification of the Finnish house mouse, *Mus musculus*. — *Annales Zoologici Fennici*, 44, 202–208. Erişim adresi: <https://web.natur.cuni.cz/~munclinger/Laakkonen%2007.pdf>

Lacey E. (1990). Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology today (Personal ed.)*, 6(4), 112–115. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(90\)90227-u](https://doi.org/10.1016/0169-4758(90)90227-u)

Lage H. (2003). ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *International journal of antimicrobial agents*, 22(3), 188–199. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(03\)00203-6](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(03)00203-6)

Landaeta-Aqueveque, C., Robles, M. & Cattán, P. (2007). The community of gastrointestinal helminthes in the house mouse, *Mus musculus*, in Santiago, Chile. *Parasitology*, 62, 165-169. Erişim adresi: <https://pdfs.semanticscholar.org/19ab/55dc5828a4bde420650f63c65a22f2a363c5.pdf>

Lang, S. J., Schmiech, M., Hafner, S., Paetz, C., Steinborn, C., Huber, R., ... Simmet, T. (2019). Antitumor activity of an *Artemisia annua* herbal preparation and

identification of active ingredients. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 62, 152962. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152962>

Lanusse, C., Alvarez, L., & Lifschitz, A. (2014). Pharmacological knowledge and sustainable anthelmintic therapy in ruminants, *Veterinary Parasitology*, 204(1–2), 18–33. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.003>.

Larsen, A. K., Escargueil, A. E., & Skladanowski, A. (2000). Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacology & therapeutics*, 85(3), 217–229. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(99\)00073-x](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(99)00073-x)

Leach A. R. (2001). *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Essex, UK: Pearson Education Ltd.

Lee, D., Park, J., Choi, J., Jang, H., & Seol, J. (2020). Anti-inflammatory effects of natural flavonoid diosmetin in IL-4 and LPS-induced macrophage activation and atopic dermatitis model. *International Immunopharmacology*, 89(A), 107046. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107046>.

Lee, H. H., Cheong, M. J., Huh, J., Song, S. Y., & Boo, H. O. (2009). Effects of *Momordica charantia* L. Water Extracts on the Rat Liver and Kidney with Acute Toxicated by Lead. [Öz]. *Applied Microscopy*. 39(4), 355–363. (İngilizce öz ile Korece) Öze erişilen adres: <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200919061725799.pdf>

Lee-Huang, S., Huang, P. L., Chen, H. C., Huang, P. L., Bourinbaiar, A., Huang, H. I., & Kung, H. F. (1995). Anti-HIV and anti-tumor activities of recombinant MAP30 from bitter melon. *Gene*, 161(2), 151–156. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00186-a](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00186-a)

Leelananda, S.P., & Lindert, S. (2016). Computational methods in drug discovery. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 12, 2694–2718. doi: 10.3762/bjoc.12.267

Lehmann, H. P., Fuentes-Arderiu, X. & Bertello, L. F. (1996). Glossary of terms in quantities and units in Clinical Chemistry (IUPAC-IFCC Recommendations 1996). *Pure and Applied Chemistry*, Cilt 68, no: 4 içinde (s. 957-1000). <https://doi.org/10.1351/pac199668040957>

Lehnert M. (1998). Chemotherapy resistance in breast cancer. *Anticancer Research*, 18(3C), 2225–2226. PMID: 9703789. <https://europepmc.org/article/med/9703789>.

Lei J., Leser M., & Enan E. (2010). Nematicidal activity of two monoterpenoids and SER-2 tyramine receptor of *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Pharmacology*, 79(7), 1062–1071. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.11.002>.

Leroi Gourhan A. (1975). “The flowers found with Shanidar IV, a Neanderthal burial in Iraq,” *Science*, 190(4214), 562– 564. DOI: 10.1126/science.190.4214.562

Lesjak, M., Simin, N., Orcic, D., Franciskovic, M., Knezevic, P., Beara, I., ... Mimica-Dukic, N. (2016). Binary and Tertiary Mixtures of *Satureja hortensis* and *Origanum vulgare* Essential Oils as Potent Antimicrobial Agents Against *Helicobacter pylori*. *Phytotherapy research : PTR*, 30(3), 476–484. <https://doi.org/10.1002/ptr.5552>

Li, W., Lin, Z., Yang, C., Wang, Y., & Qiao, Y. (2015). Study on the chemical constituents of *Momordica charantia* L. leaves and method for their quantitative determination. *Biomedical Research*, 26(3), 415-419. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/282311489_Study_on_the_chemical_constituents_of_Momordica_charantia_L_leaves_and_method_for_their_quantitative_determination

Liljeblad J. (2021). Dyntaxa. Svensk taxonomisk databas. Version 1.2. SLU Artdatabanken. Checklist dataset. Erişim adresi <https://www.gbif.org/species/7849037> (Erişim tarihi: 16.09.2021)

Limtrakul, P., Khantamat, O., & Pintha, K. (2004). Inhibition of P-glycoprotein activity and reversal of cancer multidrug resistance by *Momordica charantia* extract. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 54(6), 525–530. <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0848-4>

Lin T. M. (1971). Colonization and encystation of *Entamoeba muris* in the rat and the mouse. *The Journal of parasitology*, 57(2), 375–382. PMID: 4101750

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 46(1-3), 3–26. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)

Liu, J., & Wang, R. (2015). Classification of current scoring functions. *Journal of chemical information and modeling*, 55(3), 475–482. <https://doi.org/10.1021/ci500731a>

Liu, H., Wang, G. C., Zhang, M. X., & Ling, B. (2015). The cytotoxicology of momordicins I and II on *Spodoptera litura* cultured cell line SL-1. *Pesticide biochemistry and physiology*, 122, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.007>

Llana-Ruiz-Cabello, M., Maisanaba, S., Puerto, M., Prieto, A. I., Pichardo, S., Moyano, R., González-Pérez, J. A., & Cameán, A. M. (2016). Genotoxicity evaluation of carvacrol in rats using a combined micronucleus and comet assay. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 98(Pt B), 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.005>

Lopez-Lazaro M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Rev. Medicinal Chemistry*, 9, 31–59. doi: 10.2174/138955709787001712

Löwe, J., Li, H., Downing, K. H., & Nogales, E. (2001). Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 313(5), 1045–1057. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5077>

Lubbe, A., Seibert, I., Klimkait, T., & van der Kooy, F. (2012). Ethnopharmacology in overdrive: the remarkable anti-HIV activity of *Artemisia annua*. *Journal of ethnopharmacology*, 141(3), 854–859. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.024>

Luo, Y., Shang, P., & Li, D. (2017). Luteolin: A Flavonoid that Has Multiple Cardio-Protective Effects and Its Molecular Mechanisms. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 692. doi: 10.3389/fphar.2017.00692

Mahmoud, A .E., Attia, R. A. H., Eldeek, H. E.M., Abdel Baki, L., & Oshaish, H. A. (2009). Oxyurid nematodes detected by colonoscopy in patients with unexplained abdominal pain. *Parasitologists United Journal*, 2, 93-102. Erişim adresi: <https://vlibrary.emro.who.int/imemr/oxyurid-nematodes-detected-by-cotonoscopy-in-patients-with-unexplalnea-abdominal-pain-2/>

Mali, R. G., & Mehta, A. A. (2008). A review on Anthelmintic Plants. *Natural Product Radiance*, 7(5), 466-475. Erişim adresi: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5709/1/NPR%207%285%29%20466-475.pdf>

Malik, S., Suchal, K., Khan, S. I., Bhatia, J., Kishore, K., Dinda, A. K., & Arya, D. S. (2017). Apigenin ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via MAPK-NF- κ B-TNF- α and TGF- β 1-MAPK-fibronectin pathways. *American journal of physiology. Renal physiology*, 313(2), F414–F422. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00393.2016>

Markell E. K. (1985). Intestinal nematode infections. *Pediatric clinics of North America*, 32(4), 971–986. [https://doi.org/10.1016/s0031-3955\(16\)34865-9](https://doi.org/10.1016/s0031-3955(16)34865-9)

Marquina, M. A., Corao, G. M., Araujo, L., Buitrago, D., & Sosa, M. (2002). Hyaluronidase inhibitory activity from the polyphenols in the fruit of blackberry (*Rubus fruticosus* B.). *Fitoterapia*, 73(7-8), 727–729. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(02\)00222-8](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(02)00222-8)

Marra, N. M., Amarante, A. F. T., & Amarante, M. R. V. (2007). Genetic basis of the resistance to *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda, Rhabdiasidae) infection in mice (*Mus musculus*). *Genetics and Molecular Biology*, 30(1), 60-64. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572007000100012>

Marrero-Ponce, Y., Iyarreta-Veitía, M., Montero-Torres, A., Romero-Zaldivar, C., Brandt, C. A., Avila, P. E., ... Machado, Y. (2005). Ligand-based virtual screening and in silico design of new antimalarial compounds using nonstochastic and stochastic total and atom-type quadratic maps. *Journal of chemical information and modeling*, 45(4), 1082–1100. <https://doi.org/10.1021/ci050085t>

Marseglia, G. L., Marseglia, A., Licari, A., Castellazzi, A. M., & Ciprandi, G. (2007). Chronic urticaria caused by *Hymenolepis nana* in an adopted girl. *Allergy*, 62(7), 821–822. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01362.x>

Martens, S., & Mithöfer, A. (2005). Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, 66(20), 2399–407. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.07.013>

Martin R. J. (1997). Modes of action of anthelmintic drugs. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 154(1), 11–34. [https://doi.org/10.1016/s1090-0233\(05\)80005-x](https://doi.org/10.1016/s1090-0233(05)80005-x)

Martin, R. J., Robertson, A. P., & Bjorn, H. (1997). Target sites of anthelmintics. *Parasitology*, 114, S111–S124. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9309773/>

Mas-Coma, S., Esteban, J. G., Fuentes, M. V., Bargues, M. D., Valero, M. A., & Galan-Puchades, M. T. (1998). Helminth parasites of small mammals (insectivores and rodents) on the pityusic island of Formentera (Balearic ½sn18 Archipelago). *Research and Reviews in Parasitology*, 58, 125–133. Erişim adresi: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013178886>

Mas-Coma, S., Esteban, J. G., Fuentes, M. V., Bargues, M. D., Valero, M. A., & Galan-Puchades, M. T. (2000). Helminth parasites of small mammals (insectivores and rodents) on the pityusic island of Eivissa (Balearic Archipelago). *Research and Reviews in Parasitology*, 60, 41–49. Erişim adresi: https://web.archive.org/web/20200320214657id_/http://bibliotecavirtual.ranf.com/es/catalogo_imagenes/grupo.cmd?path=1001940

Matsuura, H., Chiji, H., Asakawa, C., Amano, M., Yoshihara, T., & Mizutani, J. (2003). DPPH radical scavengers from dried leaves of oregano (*Origanum vulgare*). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67(11), 2311–2316. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.2311>

Mayoclinic. (t.y.). Albendazole. Erişim adresi: <https://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/albendazole-oral-route/side-effects/drg-20061505?p=1>

McGarry, J. D., & Brown, N. F. (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *European journal of biochemistry*, 244(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00001.x>

Mebendazole. (2013). Janssen Vermox - Product monograph.

Medicine in the medieval Islamic world. (2013). *Vikipedi içinde*. Erişim adresi: https://en.wikipedia.org/wiki/Medicine_in_the_medieval_Islamic_world (Erişim tarihi: 22.10.2021).

Medievalist. (2016). Materia Medica'nın resimli bir sayfası. Erişim adresi: <https://www.medievalists.net/2016/07/monastic-medicine-medieval-herbalism-meets-modern-science/> (Erişim tarihi: 18.10.2021)

Milazzo, C., Bellocq, J. G., Cagnin, M., Casanova, J. C., Bella, C., Feliu, C., ... Santalla, F. (2003). Helminths and Ectoparasites of *Rattus rattus* and *Mus musculus* from Sicily, Italy. *Comparative Parasitology*. 70(2), 99–104.

Mirdha, B. R., & Samantray, J. C. (2002). *Hymenolepis nana*: a common cause of paediatric diarrhoea in urban slum dwellers in India. *Journal of tropical pediatrics*, 48(6), 331–334. <https://doi.org/10.1093/tropej/48.6.331>

Miyake, Y., Yamamoto, K., & Osawa, T. (1997). Isolation of Eriocitrin (Eriodictyol 7-rutinoside) from Lemon Fruit (*Citrus limon* BURM. F.) and Its Antioxidative Activity. *Food Science and Technology International Tokyo*, 3(1), 84-89. Erişim adresi: https://www.jstage.jst.go.jp/article/fsti9596t9798/3/1/3_1_84/_pdf

Mohn, G., & Philip, E.M. (1981). Effects of *Syphacia obvelata* on the microsomal monooxygenase system in mouse liver. *Laboratory Animals*, 15(2), 89–95. <https://doi.org/10.1258/002367781780958982>

Moldao-Martins, M., Bernardo-Gil, M. G., Beirao Da Costa, M. L., Rouzet, M., (1999). Seasonal variation in yield and composition of *Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* essential oil. *Flavour Fragrance Journal*, 14(3), 177-182. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199905/06\)14:3<177::AID-FFJ806>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199905/06)14:3<177::AID-FFJ806>3.0.CO;2-B)

Molnár, J., Béládi, I., Domonkos, K., Földeák, S., Boda, K., & Veckenstedt, A. (1981). Antitumor activity of flavonoids on NK/Ly ascites tumor cells. *Neoplasma*, 28, 11–18. PMID: 7279054

Mondal, H., Hossain, H., Awang, K., Saha, S., Rashid, S.M.U., Islam, M.K., ... Shilpi, J.A. (2015). Anthelmintic activity of ellagic acid, a major constituent of *Alternanthera sessilis* against *Haemonchus contortus*. *Pakistan Veterinary Journal*, 35(1), 58-62. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/270507981_Anthelmintic_Activity_of_Ellagic_Acid_a_Major_Constituent_of_Alternanthera_sessilis_Against_Haemonchus_contortus

Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J. (1998). Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function. *Journal of Computational Chemistry*, 19, 1639-62. Erişim adresi: <https://dasher.wustl.edu/chem430/readings/jcc-19-1639-98.pdf>

Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J. (2009). Autodock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30, 2785–91. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21256>

Morris, G. M., Goodsell, D. S., Pique, M. E., Lindstrom, W., Huey, R., Forli, S., ... Olson, A. J. (2014). *User Guide AutoDock Version 4.2*. (s. 9-10). Erişim adresi: <http://autodock.scripps.edu/>

Muegge, I., Heald, S. L., & Brittelli, D. (2001). Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *Journal of medicinal chemistry*, 44(12), 1841–1846. <https://doi.org/10.1021/jm015507e>

Mueller, M., Lukas, B., Novak, J., Simoncini, T., Genazzani, A. R., & Jungbauer, A. (2008). Oregano: a source for peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonists. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(24), 11621–11630. <https://doi.org/10.1021/jf802298w>

Nagasawa, H., Watanabe, K., & Inatomi, H. (2002). Effects of bitter melon (*Momordica charantia* L.) or ginger rhizome (*Zingiber officinale* Rosc) on spontaneous mammary tumorigenesis in SHN mice. *The American journal of Chinese medicine*, 30(2-3), 195–205. <https://doi.org/10.1142/S0192415X02000302>

Nair, M. S., Huang, Y., Fidock, D. A., Polyak, S. J., Wagoner, J., Towler, M. J., & Weathers, P. J. (2021). *Artemisia annua* L. extracts inhibit the in vitro replication of SARS-CoV-2 and two of its variants. *Journal of ethnopharmacology*, 274, 114016. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114016>

National Cancer Institute (NCI). (t.y.a). Erişim adresi: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C61796, (Erişim tarihi: 05.03.2021)

National Cancer Institute (NCI). (t.y.b). Erişim adresi: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C47683, (Erişim tarihi: 05.03.2021)

National Cancer Institute (NCI). (t.y.c). Erişim adresi: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C61892, (Erişim tarihi: 05.03.2021)

National Cancer Institute (NCI). (t.y.d). Erişim adresi: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C47595, (Erişim tarihi: 05.03.2021)

National Cancer Institute (NCI). (t.y.e). Erişim adresi: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C47384, (Erişim tarihi: 05.03.2021)

National Cancer Institute (NCI). (t.y.f). Erişim adresi: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C72193, (Erişim tarihi: 07.03.2021)

National Cancer Institute Thesaurus (NCIt). (t.y.). Stigmasterol. Erişim adresi: https://ncithesaurus.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=ncit&code=C68427

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (t.y.a). TUBB Gene, Erişim adresi: [ncbi.nlm.nih.gov.tr/gene/203068](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/203068), (Erişim tarihi: 04.03.2021)

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (t.y.b). Fumarate Reductase. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6389>. (Erişim tarihi: 19.10.2021)

National Research Council (NRC). (1991). Infectious diseases of mice and rats: a report of the Institute of Laboratory Animal Resources Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats. National Academy Press, Washington, D.C., USA DOI: [10.17226/1429](https://doi.org/10.17226/1429)

Ndjonka, D., Rapado, L. N., Silber, A. M., Liebau, E., & Wrenger, C. (2013). Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. *International journal of molecular sciences*, 14(2), 3395–3439. <https://doi.org/10.3390/ijms14023395>

Ng, T. B., Wong, C. M., Li, W. W., & Yeung, H. W. (1986). Insulin-like molecules in *Momordica charantia* seeds. *Journal of ethnopharmacology*, 15(1): 107–117. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(86\)90106-6](https://doi.org/10.1016/0378-8741(86)90106-6)

Nim, S., Jeon, J., Corbi-Verge, C., Seo, M. H., Ivarsson, Y., Moffat, J., Tarasova, N., & Kim, P. M. (2016). Pooled screening for antiproliferative inhibitors of protein-protein interactions. *Nature chemical biology*, 12(4), 275–281. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2026>

Noack R. (1973). Energy and Protein Requirements. Report of a Joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee. *WHO Technical Report Series No. 522, Food / Nahrung*, 18, 329–332. <https://doi.org/10.1002%2Ffood.19740180314>.

Novak, J., Bitsch, C., Langbehn, J., Pank, F., Skoula, M., Gotsiou, Y., & M Franz C (2000). Ratios of cis- and trans-Sabinene Hydrate in *Origanum majorana* L. and *Origanum microphyllum* (Benth) Vogel. *Biochemical systematics and ecology*, 28(7), 697–704. [https://doi.org/10.1016/s0305-1978\(99\)00098-8](https://doi.org/10.1016/s0305-1978(99)00098-8)

O’Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: an open chemical toolbox, *Journal of Cheminformatics*, 3, 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>

Ogbru, O., 2017. Albendazole. Paragraf 2. [https://www.medicinenet.com/albendazole-oral/article.htm#what are the side effects of albendazole-oral?](https://www.medicinenet.com/albendazole-oral/article.htm#what+are+the+side+effects+of+albendazole-oral?) (Erişim tarihi: 26.12.2017)

Ogungbe, I. V., & Setzer, W. N. (2016). The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads against Protozoan Neglected Diseases-Part III: In-Silico Molecular Docking Investigations. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(10), 1389. <https://doi.org/10.3390/molecules21101389>

Origanum vulgare subsp. *hirtum*. (t.y.). www.gardentags.com/plant-encyclopedia/origanum-vulgare-subsp-hirtum-hot-and-spicy/15518. (Erişim tarihi: 09.04.2019)

Osei-Atweneboana, M. Y., Eng, J. K., Boakye, D. A., Gyapong, J. O., & Prichard, R. K. (2007). Prevalence and intensity of *Onchocerca volvulus* infection and efficacy of ivermectin in endemic communities in Ghana: a two-phase epidemiological study. *Lancet* (London, England), 369(9578), 2021–2029. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60942-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60942-8)

Özcan, M. M., Pedro, L. G., Al-Juhaimi, F., Endes, Z., Erol, A. S., Duman, E., & Er, F. (2012). Constituents of the Essential oil of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* Growing Wild in Turkey, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(4), 572 – 576. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/261681616_Constituents_of_the_Essential_oil_of_Origanum_vulgare_subsp_hirtum_Growing_Wild_in_Turkey/link/56a09cff08ae21a5642b1f2e/download

Özdemir H. (t.y). 0-8 Yaş Arası Çocuklarda Görülen Çocuk Hastalıkları. (Powerpoint sunumu). Erişim adresi: https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/155752/mod_resource/content/1/0-8%20Ya%C5%9F%20Aras%C4%B1%20%C3%87ocuklarda%20G%C3%B6r%C3%BClen%20%C3%87ocuk%20Hastal%C4%B1klar%C4%B1.pdf (Erişim tarihi: 05.08.2020)

Özgüven, M., Sekin, S., Gürbüz, b., Şekeroğlu, N., Ayanoğlu, F., & Ekren, S. (2005). *Tütün, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretimi ve Ticareti* (s. 481-501). Türkiye Ziraat Mühendisliğı VI: Teknik Kongresinde sunulan bildiri. Milli Kütüphane, Ankara. https://www.researchgate.net/publication/321825261_Tutun_Tibbi_ve_Aromatik_Bitkiler_Uretimi_ve_Ticareti

Pan, S.Y., Litscher, G., Gao, S.H., Zhou, S.F., Yu, Z.L., Chen, H.Q., ... Ko, K.M. (2014). Historical Perspective of Traditional Indigenous Medical Practices: The Current Renaissance and Conservation of Herbal Resources. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Hindawi Publishing Corporation, 2014, 1-20. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/525340>

Pantziarka, P., Bouche, G., Meheus, L., Sukhatme, V., & Sukhatme, V.P. (2014). Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-mebendazole as an anti-cancer agent. *Ecancermedicalscience*, 8, 443. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2014.443>

Pathania, S. & Singh, P.K. (2021). Analyzing FDA-approved drugs for compliance of pharmacokinetic principles: should there be a critical screening parameter in drug designing protocols? *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 17(4), 351-354. DOI:10.1080/17425255.2021.1865309

Peitsch M. C. (1996). ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochemical Society transactions*, 24(1), 274–279. <https://doi.org/10.1042/bst0240274>

Pensel, P. E., Maggiore, M. A., Gende, L. B., Eguaras, M. J., Denegri M. G. & Elisondo, M. C. (2014). Efficacy of Essential Oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on *Echinococcus granulosus*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014, 693289. doi: 10.1155/2014/693289.

Percy, D. H., & Barthold, S. W. (1993). *Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits*. Ames, IA: Iowa State University Press.

Pereira, C., Oliveira, L., Coaglio, A. L., Santos, F., Cezar, R., Mendes, T., ... Lima, W. S. (2016). Anti-helminthic activity of *Momordica charantia* L. against *Fasciola hepatica* eggs after twelve days of incubation in vitro. *Veterinary parasitology*, 228, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.08.025>

Pirali-Kheirabadi, K. H., & Teixeira da Silva, J. (2011). In-Vitro Assessment of the Acaricidal Properties of *Artemisia annua* and *Zataria multiflora* Essential Oils to Control Cattle Ticks. *Iranian journal of parasitology*, 6(1), 58–65. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3279866/>

Pitchakarna, P., Ohnumab, S., Pinthaa, K., Pompimonc, W., Ambudkarb, S. V., & Limtrakula, P. (2012). Kuguacin J isolated from *Momordica charantia* leaves inhibits Pglycoprotein (ABCB1)-mediated multidrug resistance. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 23(1), 76–84. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.11.005.

Prichard, R. K., von Samson-Himmelstjerna, G., Blackhall, W. J., & Geary, T. G. (2007). Foreword: towards markers for anthelmintic resistance in helminths of importance in animal and human health. *Parasitology*, 134(Pt 8), 1073–1076. <https://doi.org/10.1017/S0031182007000078>.

Pritchett K. R. (2007). Helminth Parasites of Laboratory Mice. *The Mouse in Biomedical Research*, (ikinci bs.) Bölüm 22 içinde (s. 551-564). UK: Elsevier.

Poolperm, S. & Jiraungkoorskul, W. (2017). An Update Review on the Anthelmintic Activity of Bitter Gourd, *Momordica charantia*. *Pharmacognosy Reviews*. 11(21), 31. DOI:10.4103/phrev.phrev_52_16

Popp, R., & Schimmer, O. (1991). Induction of sister-chromatid exchanges (SCE), polyploidy, and micronuclei by plant flavonoids in human lymphocyte cultures. A comparative study of 19 flavonoids. *Mutation research*, 246(1), 205–213. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(91\)90123-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(91)90123-6)

Puri, M., Kaur, I., Kanwar, R. K., Gupta, R. C., Chauhan, A., & Kanwar, J. R. (2009). Ribosome inactivating proteins (RIPs) from *Momordica charantia* for anti viral therapy. *Current molecular medicine*, 9(9), 1080–1094. <https://doi.org/10.2174/156652409789839071>

Qi, L., Pan, H., Li, D., Fang, F., Chen, D., & Sun, H. (2011). Luteolin improves contractile function and attenuates apoptosis following ischemia-reperfusion in adult rat cardiomyocytes. *European Journal of Pharmacology*, 668, 201–207. doi: 10.1016/j.ejphar. 2011.06.020

Rahdar, M., Sadat Roointan, E., Vazirianzadeh, B., Alborzi, A. (2017). Study of Internal Parasites of Rodents in Ahvaz, South-West of Iran, *Jundishapur Journal of Health Sciences*, 9(1):e29067. doi: 10.17795/jjhs-29067.

Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C., & Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations, *Journal of molecular biology*, 7, 95–99. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(63\)80023-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(63)80023-6)

Rao, S., Horwitz, S. B., & Ringel, I. (1992). Direct photoaffinity labeling of tubulin with taxol. *Journal of the National Cancer Institute*, 84(10), 785–788. <https://doi.org/10.1093/jnci/84.10.785>

Rasti, S., Moubedi, I., Dehghani, R. A., & Abas, D. (2000). The survey of Gastointestinal helminths of mice in Kashan. [Öz]. *Journal of Veterinary research*, 55(4), 57-59. Öze erişilen adres: <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=121702>

Rawla, P., Sharma, S. (2020). *Enterobius Vermicularis*. [20 Kasım 2020 tarihinde güncellendi]. *StatPearls* [Internet] içinde. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. PMID: 30725659. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536974/>

Reeves, W.K., & Cobb K.D. (2005). Ectoparasites of House Mice (*Mus musculus*) from Pet Stores in South Carolina, USA, *Comparative Parasitology*, 72(2), 193–195. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/profile/Will-Reeves/publication/287697768_Ectoparasites_of_house_mice_Mus_musculus_from_pet_stores_in_South_Carolina_USA/links/5a6a79f6458515b2d0532c46/Ectoparasites-of-house-mice-Mus-musculus-from-pet-stores-in-South-Carolina-USA.pdf

Reid F. (2006). *A Field Guide to Mammals of North America North of Mexico*. Boston: Houghton Mifflin, Print. Erişim adresi: https://www.domyown.com/all-about-mice-c-21_579.html. Erişim tarihi: 18.11.2021.

Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A., & Söding, J. (2011). HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nature methods*, 9(2), 173–175. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1818>

Renkema, G.H., Wortmann, S.B., Smeets, R.J., Venselaar, H., Antoine, M., Visser, G., ... Rodenburg, R.J. (2015). SDHA mutations causing a multisystem mitochondrial disease: novel mutations and genetic overlap with hereditary tumors. *European journal of human genetics : EJHG*, 23(2), 202–209. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.80>

Riaz, M. & Rahman, N.U. (2015). Biological Activities of *Rubus canescens* L. Collected From Dir (L), Pakistan, *Pakistan Journal of Botany*, 47(SI), 127-131.

Riley W.A. (1919). A Mouse Oxyurid, *Syphacia obvelata*, as a parasite of man. *Journal of Parasitology*, 6(2), 89-93. <http://dx.doi.org/10.2307/3270899>.

Rivas-Alcalá, A. R., Greene, B. M., Taylor, H. R., Domínguez-Vázquez, A., Ruvalcaba-Macías, A. M., Lugo-Pfeiffer, C., ... Beltrán, F. (1981). Chemotherapy of onchocerciasis: a controlled comparison of mebendazole, levamisole, and diethylcarbamazine. *Lancet* (London, England), 2(8245), 485-490. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(81\)90880-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)90880-1)

Robinson, M.W., McFerran, N., Trudgett, A., Houy, L. & Fairweather, I. (2004). A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 23(3), 275-84. doi: 10.1016/j.jmgm.2004.08.001.

Roe, C. R., Yang, B. Z., Brunengraber, H., Roe, D. S., Wallace, M., & Garritson, B. K. (2008). Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: successful anaplerotic diet therapy. *Neurology*, 71, 260-264. doi: 10.1212/01.wnl.0000318283.42961.e9

Roowi, S., & Crozier, A. (2011). Flavonoids in tropical citrus species. *J. Agric. Food Chem.*, 59(22), 12217-12225. <https://doi.org/10.1021/jf203022f>

Rosen, N., Fishilevich, S., Stein, T. I., Twik, M., Safran, M., & Lancet, D. (1996-2019). GeneCards. Weizmann Institute of Science. <https://genecards.weizmann.ac.il/geneloc/index.shtml> (Erişim tarihi: 04.03.2021)

Rosen, N., Fishilevich, S., Stein, T. I., Twik, M., Safran, M., & Lancet, D. (1996-2019a). GeneCards, SDHA. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SDHA&keywords=Fumarate,Reductase>. (Erişim tarihi: 19.10.2021)

Rosen, N., Fishilevich, S., Stein, T. I., Twik, M., Safran, M., & Lancet, D. (1996-2019b). GeneCards, CPT 2. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CPT2&keywords=CPT,2> (Erişim tarihi: 19.10.2021)

Rosen, N., Fishilevich, S., Stein, T. I., Twik, M., Safran, M., & Lancet, D. (1996-2019c). GeneCards, SLC2A3. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC2A3>. (Erişim tarihi: 18.10.2021)

Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5, 725-738. https://zhanggroup.org/papers/2010_3.pdf

Rufer, A. C., Thoma, R., Benz, J., Stihle, M., Gsell, B., De Roo, E., ... Hennig, M. (2006). The crystal structure of carnitine palmitoyltransferase 2 and implications for diabetes treatment. *Structure (London, England : 1993)*, 14(4), 713–723. <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.01.008>

Safran M., (t.y.). Genecards, TUBB Gene, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TUBB>, (Erişim tarihi: 04.03.2021)

Sahoo, S. S., Shukla, S., Nandy, S., & Sahoo, H. B. (2012). Synthesis of Novel Coumarin Derivatives and Its Biological Evaluations. *European Journal of Experimental Biology*, 2(4), 899-908. Erişim adresi: <https://www.semanticscholar.org/paper/Synthesis-of-novel-coumarin-derivatives-and-its-Sahoo-Shukla/eefde5639559740ae738b1af533892fd96bdd62d>

Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kregiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., ... Martins, N. (2019). The Therapeutic Potential of Apigenin. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1305), 1-26. doi:10.3390/ijms20061305

Salgueiro, A. C., Folmer, V., da Rosa, H. S., Costa, M. T., Boligon, A. A., Paula, F., ... Puntel, G. O. (2016). In vitro and in silico antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. *Journal of ethnopharmacology*, 194, 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.08.048>

Salminen, A., Lehtonen, M., Suuronen, T., Kaarniranta, K., & Huuskonen, J. (2008). Terpenoids: natural inhibitors of NF-κB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(19), 2979–2999. doi:10.1007/s00018-008-8103-5

Santoro, G. F., das Graças Cardoso, M., Guimarães, L. G., Salgado, A. P., Menna-Barreto, R. F., & Soares, M. J. (2007). Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitology research*, 100(4), 783–790. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0326-5>

Sari S. (2020). Molecular Modelling and Computer-Aided Drug Design: The Skill Set Every Scientist in Drug Research Needs and Can Easily Get. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 40(1), 34-47. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/1151388>

Sargison N. D. (2012). Pharmaceutical treatments of gastrointestinal nematode infections of sheep--future of anthelmintic drugs. *Veterinary parasitology*, 189(1), 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.035>

Sartoratto, A.L.M., Machado, C., Delarmelina, G.M., Figueira, M.C.T., Duarte, V., & Rehder, L.G. (2004). “Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil,” *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(4), 275–280. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>

Satyendra, R. V., Vishnumurthy, K. A., Vagdevi, H. M., Rajesh, K. P., Manjunatha, H., & Shruthi, A. (2011). Synthesis, in vitro antioxidant, anthelmintic and molecular docking studies of novel dichloro substituted benzoxazole-triazolo-thione derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 46(7), 3078–3084. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.03.017>

Saygın, B., & Karaman, D. (2021, Temmuz). *Çocuklarda Sık Görülen Bağırsak Parazitleri Ve Sağlık Açısından Önemi; Risk Değerlendirmesi*. International Multi-Diciplinary Children's Studies Congress'de sunulan bildiri (s. 353-370), Ankara. Bildiri kitabı ISBN:978-625-7720-44-1. Erişim adresi: https://2dc40e33-085f-40e0-8172-9a1f898c1942.filesusr.com/ugd/d0a9b7_2e9ee4d3af454e6eab405b0a0748b3bc.pdf

Schlecht M. F. (1997). *Molecular Modeling on the PC*. New York, USA: Wiley-VCH.

Schmidt T. J. (2006). Structure-activity relationships of Sesquiterpene Lactones. Atta-Ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry (Cilt 33)*, s. 309-392). London: Elsevier.

Schoenlein, P. V., Shen, D. W., Barrett, J. T., Pastan, I., & Gottesman, M. M. (1992). Double minute chromosomes carrying the human multidrug resistance 1 and 2 genes are generated from the dimerization of submicroscopic circular DNAs in colchicine-selected KB carcinoma cells. *Molecular biology of the cell*, 3(5), 507–520. <https://doi.org/10.1091/mbc.3.5.507>

Schuller, D. J., Liu, Q., Kriksunov, I. A., Campbell, A. M., Barrett, J., Brophy, P. M., & Hao, Q. (2005). Crystal structure of a new class of glutathione transferase from the model human hookworm nematode *Heligmosomoides polygyrus*. *Proteins*, 61(4), 1024–1031. <https://doi.org/10.1002/prot.20649>

Schulz, S., & Hötling, S. (2015). The use of the lactone motif in chemical communication. *Natural product reports*, 32(7), 1042–1066. <https://doi.org/10.1039/c5np00006h>

Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic acids research*, 31(13), 3381–3385. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg520>

Seo, B. S., Rim, H. J., Yoon, J. J., Koo, B. Y., & Hong, N. T. (1968). Studies On The Parasitic Helminths Of Korea: III. Nematodes And Cestodes Of Rodents. *Kisaengch'unghak chapchi. The Korean journal of parasitology*, 6(3), 123–131. <https://doi.org/10.3347/kjp.1968.6.3.123>

Selvi, R. B., Swaminathan, A., Chatterjee, S., Shanmugam, M. K., Li, F., Ramakrishnan, G. B., ... Kundu, T. K. (2015). Inhibition of p300 lysine acetyltransferase activity by luteolin reduces tumor growth in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) xenograft mouse model. *Oncotarget*, 6(41), 43806–43818. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6245>

Shanson D.C. (1989). FRC Path, *Microbiology in Clinical Practice* (2. bs.) içinde (s. 550-572). Guildford, UK: Butterworth Scientific Ltd.

Sharma, D., Joshi, S., Vatsya, S., & Yadav, C. L. (2013). Prevalence of gastrointestinal helminth infections in rodents of Tarai region of Uttarakhand. *Journal of Parasitic Diseases*, 37(2). DOI 10.1007/s12639-012-0158-4

Sharma, P., Maklashina, E., Cecchini, G., & Iverson, T. M. (2020). The roles of SDHAF2 and dicarboxylate in covalent flavinylation of SDHA, the human complex II flavoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117, 23548-23556. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007391117>

Shen, D., Pan, M. H., Wu, Q. L., Park, C. H., Juliani, H. R., Ho, C. T., & Simon, J. E. (2010). LC-MS method for the simultaneous quantitation of the anti-inflammatory constituents in oregano (*Origanum* species). *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(12), 7119–7125. <https://doi.org/10.1021/jf100636h>

Shi, H., Hiramatsu, M., Komatsu, M., & Kayama, T. (1996). Antioxidant property of *Fructus Momordicae* extract. *Biochemistry and molecular biology international*, 40(6), 1111–1121. <https://doi.org/10.1080/15216549600201753>

Shibib, B. A., Khan, L. A., & Rahman, R. (1993). Hypoglycaemic activity of *Coccinia indica* and *Momordica charantia* in diabetic rats: depression of the hepatic gluconeogenic enzymes glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase and elevation of both liver and red-cell shunt enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase. *The Biochemical journal*, 292 (Pt 1)(Pt 1), 267–270. <https://doi.org/10.1042/bj2920267>

Shittu, M., Makinde, O., & Taiwo, I. (2015). Genotoxic Potential of *Momordica charantia* Linn. in a Rat-Based Test System. [Öz]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56, S79-S79. Öze erişilen adres: https://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl=en&user=udaAqU0A-AAAJ&citation_for_view=udaAqU0AAAJ:Tyk-4Ss8FVUC

Shukla, K. L., Gund, T. M., & Meshnick, S. R. (1995). Molecular modeling studies of the artemisinin (qinghaosu)-hemin interaction: docking between the antimalarial agent and its putative receptor. *Journal of Molecular Graphics*, 13(4), 215-22. doi: 10.1016/0263-7855(94)00001-9.

Si, H., Wyeth, R. P., & Liu, D. (2014). The flavonoid luteolin induces nitric oxide production and arterial relaxation. *European Journal of Nutrition*, 53, 269–275. doi: 10.1007/s00394-013-0525-7

Silverman R. B. (2004). *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, (2. bs.). Burlington: Elsevier Academic Press.

Simões, L. F., Kawano, T., Allegretti, S. M., Linhares, A. X., Magalhães, L. A., & Zanotti-Magalhães, E. M. (2015). Effect of *Piper tuberculatum* Extract on Adult

Schistosoma mansoni: in vitro and in vivo Tests. *Revista De Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology*, 44(1), 56-66. <https://doi.org/10.5216/rpt.v44i1.34803>

Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., & Lowe, E. W. (2014). Computational methods in drug discovery. *Pharmacological Reviews*, 66, 334–395. doi: 10.1124/pr.112. 007336

Sloley, B. D., Urichuk, L. J., Morley, P., Durkin, J., Shan, J. J., Pang, P. K., & Coutts, R. T. (2000). Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential Neuroprotectant in extracts of *Ginkgo biloba* leaves. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 52(4), 451–459. <https://doi.org/10.1211/0022357001774075>

Somerset, S. M., & Johannot, L. (2008). Dietary flavonoid sources in Australian adults. *Nutrition and Cancer*, 60, 442–449. doi: 10.1080/0163558080 2143836

Souza, P. C. T., Limongelli, V., Wu, S., Marrink, S. J., & Monticelli L. (2021). Perspectives on High-Throughput Ligand/Protein Docking With Martini MD Simulations. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 657222. doi: 10.3389/fmolb.2021.657222

Steinberg, R., Davies, J., Millar, A. J., Brown, R. A., & Rode, H. (2003). Unusual intestinal sequelae after operations for *Ascaris lumbricoides* infestation. *Pediatric surgery international*, 19(1-2), 85–87. <https://doi.org/10.1007/s00383-002-0880-6>

Sterling, T., & Irwin, J. J. (2015). Zinc 15-ligand discovery for everyone, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55, 2324-2337. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00559>

Strelkauskas, A., Edwards, A., Fahnert, B., Pryor, G., & Strelkauskas, J. (2015). *Microbiology: A Clinical Approach* (2. bs.). NY, USA: Garland Science. <https://doi.org/10.1201/9780429258701>

Sumangali, K., Rajapakse, R. P. V. J., & Rajakaruna, R. S. (2012). Urban rodents as potential reservoirs of zoonoses: a parasitic survey in two selected areas in Kandy district. *The Ceylon Journal of Science (Bio. Sci.)* 41(1), 71-77. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/237091807_Urban_rodents_as_potential_reservoirs_of_zoonoses_a_parasitic_survey_in_two_selected_areas_in_Kandy_district

Swaminathan, A., Basu, M., Bekri, A., Drapeau, P., & Kundu, T. K. (2019). The Dietary Flavonoid, Luteolin, Negatively Affects Neuronal Differentiation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 41. doi: 10.3389/fnmol.2019.00041

Şenlik, B. (2006). Teşhis Yöntemleri, R. Tınar (Ed.), *Helmintoloji* içinde (s.463-535). Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.

Tariq, K. A., Chishti, M. Z., Ahmad, F., & Shawl, A. S. (2009). Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. *Veterinary parasitology*, 160(1-2), 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.084>

Tariq, K. A., & Tantry M. A. (2012). Preliminary Studies on Plants with Anthelmintic Properties in Kashmir—The North-West Temperate Himalayan Region of India. *Chinese Medicine*, 3,106-112. <http://dx.doi.org/10.4236/cm.2012.32017>
Erişim adresi: https://file.scirp.org/pdf/CM20120200002_44197281.pdf

Taylor, C. M., Wang, Q, Rosa, B. A., Huang, S. C.-C., Powell, K., Schedl, T., ... Mitreva, M. (2013). Discovery of Anthelmintic Drug Targets and Drugs Using Chokepoints in Nematode Metabolic Pathways. *PLOS Pathogens*, 9(8), 1003505. doi:10.1371/journal.ppat.1003505

The UniProt Consortium 2021. (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49:D1

Thompson, D. P., & Geary, T. G. (2010). The structure and function of helminth surfaces. J. J. Marr & M. Muller (Ed.) *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*. (1. bs.) içinde (s. 203-232). UK: Elsevier.

Tınmaz, A. B., Başer, K. H. C., Karik, Ü., Kürkçüoğlu, M., Öztürk, M. (2009). Determination of Quality Specifications of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* Populations Growing in Marmara Region of Turkey. *Acta Horticulturae*, 826, 153-158.
Erişim adresi: researchgate.net/publication/291971989_Istanbul_kekigi_Origanum_vulgare_subsp_hirtum_populasyonlarinda_farkli_bicim_zamanlari_verim_ve_kaliteye_etkisi/link/56a80bce08ae0fd8b3fe45fa/download

Ti, S. C., Alushin, G. M., & Kapoor, T. M. (2018). Human β -Tubulin Isotypes Can Regulate Microtubule Protofilament Number and Stability. *Developmental cell*, 47(2), 175–190.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.08.014>

Tjokropranoto, R., & Nathania, M. (2011). Anthelmintic effect of ethanol extract of pare leaf (*Momordica charantia* L.) against female *Ascaris suum* worm *in vitro*. *Jurnal Medika Planta*, 1, 33–9. Erişim adresi: <https://www.neliti.com/publications/245875/anthelmintic-effect-of-ethanol-extract-of-pare-leaf-momordica-charantia-l-agains>

Tripathi, S., Srivastava, G., & Sharma, A. (2016). Molecular dynamics simulation and free energy landscape methods in probing L215H, L217R and L225M β -tubulin mutations causing paclitaxel resistance in cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 476, 273-279. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.05.112

Truscott, J. E., Turner, H. C., & Anderson, R. M. (2015). What impact will the achievement of the current World Health Organisation targets for anthelmintic treatment coverage in children have on the intensity of soil transmitted helminth infections? *Parasites & vectors*, 8, 551. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1135-4>

Tsai, T. H., Chang, C. I., Hung, Y. L., Huang, W. C., Chang, H., Kuo, Y. H., ... Tsai, P. J. (2021). Anti-Inflammatory Effect of Charantadiol A, Isolated from Wild Bitter Melon Leaf, on Heat-Inactivated *Porphyromonas gingivalis*-Stimulated THP-1 Monocytes and

a Periodontitis Mouse Model. *Molecules*, 26, 5651. <https://doi.org/10.3390/molecules26185651>

Tu Y. (2011). The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature medicine*, 17(10), 1217–1220. <https://doi.org/10.1038/nm.2471>

Turan A. (2014, Şubat). Geleneksel, Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Uygulamalarına Uluslararası Bakış Konferansında sunulan bildiri (Sağlık Bakanı Baş Danışmanının açılış konuşması). (s. 13-15). Ankara.

Turel, I., Oto, G., Ayaz, E., Yilmaz, O., & Mercan, U. (2008). Anthelmintic Activity of *Urtica dioica* L. in Mice Naturally Infected with *Aspiculuris tetraptera*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7, 1628-1630. Erişim adresi: <https://www.medwelljournals.com/abstract/?doi=javaa.2008.1628.1630>

Tyagi, R., Maddirala, A. R., Elfawal, M., Fischer, C., Bulman, C. A., Rosa, B. A., ... Mitreva, M. (2018). Small Molecule Inhibitors of Metabolic Enzymes Repurposed as a New Class of Anthelmintics. *ACS Infectious Diseases*, 4 (7), 1130-1145. Doi:10.1021/acsinfecdis.8b00090

Ullah, R., Rehman, A., Zafeer, M. F., Rehman, L., Khan, Y. A., Khan, M. A., ... Abidi, S.M. (2017). Anthelmintic Potential of Thymoquinone and Curcumin on *Fasciola gigantica*. *PloS one*, 12(2), e0171267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171267>

Unat, E. K., (1995). *Unat'ın Tıp Parazitolojisi*, (5. bs), İstanbul: Cerrahpaşa Tıp fakültesi Vakfı Yayınları.

Uniprot Veritabanı. (t.y.a). Tubulin. Erişim adresi: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9H4B7>, Erişim tarihi: 09.03.2021

UniProt Veritabanı. (t.y.b). Cytochrome C Oxidase I. Erişim adresi: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00395>. (Erişim tarihi: 18.10.2021)

Uniprot Veritabanı. (t.y.c). Erişim adresi: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9H4B7>, Erişim tarihi: 09.03.2021

Usafi, A., Eslami, A., & Mobedi, I. (2012). *New Species of Rodents Oxyuridae in Hamadan Regions of Iran. Parasitology and Parasitic Diseases in Iran*. 1st International and 8th National Congress. 1442 p.

Ustaçelebi, Ş. (Ed.) (1999). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi.

Üner, A., & Ertuğ, S. (2007). Çengelli Solucan Hastalıkları. M. A. Özcel, Y. Özbel, M. Ak. (Ed.) *Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları* içinde. No:22. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları.

Valente, A., Gabriel, S. I., Gomes, L., Correia, J., Mathias, M. L., & Madeira de Carvalho, L. M. (2014, Ağustos). Helminthic infections in the liver of *Mus musculus*

from Madeira Archipelago – Preliminary Results. 14th Rodens et Spatium – International Conference on Rodent Biology Konferansında sunulan bildiri, Lisbon. DOI: 10.13140/2.1.4380.7041

Van der Kooy, F., & Sullivan, S. E. (2013). The Complexity of Medicinal Plants: The Traditional *Artemisia annua* Formulation, Current Status and Future Perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.021>.

Vattem, D. A., & Shetty, K. (2005). Biological functionality of ellagic acid: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 29, 234-266. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2005.00031.x>

Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of medicinal chemistry*, 45(12), 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>

Venkateswara, R. G., Mukhopadhyay, T., Annamalai, T., Radhakrishnan, N., & Sahoo, M. R. (2011). Chemical constituents and biological studies of *Origanum vulgare* Linn. *Pharmacognosy research*, 3(2), 143–145. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.81964>

Viswanath, A., Yarrarapu, S. N. S., & Williams, M. (2020). *Trichuris Trichiura*. [28 Ağustos 2020 tarihinde güncellendi]. *StatPearls* [Internet] içinde. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507843/>

Wagman, A. S., & Nuss, J. M. (2001). Current therapies and emerging targets for the treatment of diabetes. *Current pharmaceutical design*, 7(6), 417–450. <https://doi.org/10.2174/1381612013397915>

Wakelin, D., & Donachie, A. M. (1980). Genetic control of immunity to parasites: adoptive transfer of immunity between inbred strains of mice characterized by rapid and slow immune expulsion of *Trichinella spiralis*. *Parasite immunology*, 2(4), 249–260. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1980.tb00057.x>

Waller P. J. (1997). Sustainable helminth control of ruminants in developing countries. *Veterinary parasitology*, 71(2-3), 195–207. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(97\)00032-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(97)00032-0)

Waloch, M., Sobolewska, A., & Dzbeński, T. H. (2010). Analiza sytuacji epidemiologicznej tasiemczyc w Polsce w latach 1997-2006 na podstawie danych z wojewódzkich stacji san-epid [Evaluation of epidemiological situation of cestode infections in Poland in the years 1997-2006 on the basis of data from san-epid stations]. *Przegląd epidemiologiczny*, 64(4), 533–536. PMID: 21473070

Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental

stage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(2), 140–146.
<https://doi.org/10.1021/jf9908345>

Wang, L., Lee, I. M., Zhang, S. M., Blumberg, J. B., Buring, J. E., & Sesso, H. D. (2009). Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 905–912. doi: 10.3945/ajcn.2008.26913

Wang, D., Cui, L., Chang, X., & Guan, D. (2020). Biosynthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles from *Artemisia annua* and investigate their effect on proliferation, osteogenic differentiation and mineralization in human osteoblast-like MG-63 Cells. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 202, 111652.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111652>

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46(W1), W296–W303.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky427>

Waters E. (t.y.). New Antiparasitic Drugs Needed for Sheep and Goats. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/safety-health/new-antiparasitic-drugs-needed-sheep-and-goats#2>

Wedge, D. E., Galindo, J. C., & Macías, F. A. (2000). Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. *Phytochemistry*, 53(7), 747–757.
[https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00008-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00008-x)

Weng, C. J., & Yen, G. C. (2012). Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31, 323–351. doi: 10.1007/s10555-012- 9347-y

Wertheim, G., & Lengy, J. (1965). Growth and Development of *Strongyloides ratti* Sandground, 1925, in the Albino Rat. *Journal of Parasitology*, 51, 636–639. PMID: 14339380

Whary, M. T., Baumgarth, N., Fox, J. G., & Barthold, S. W. (2015). Biology and diseases of mice. J. Fox, L. Anderson, G. Otto, K. Pritchett-Corning, M. Whary (Ed.) *Laboratory animal medicine* (3. bs.) içinde (s. 124-125). USA: Academic Press.
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00003-1>.

Wieser, T. (2004). Carnitine Palmitoyltransferase II Deficiency. [3 Ocak 2019 tarihinde güncellendi]. M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon (Ed.). *GeneReviews®* [Internet] içinde. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021, USA. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1253/>

Willcox, M., Bodeker, G., Geneviève, B., Dhingra, V., Falquet, J., Ferreira, J. F. S., ... Wright, C. W. (2004). *Artemisia annua* as a traditional herbal antimalarial. M. Willcox,

G. Bodeker, P. Rasaoanaivo (Ed.) *Traditional medicine, medicinal plants and malaria* içinde (s. 43-59). Boca Raton: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203502327>.

Wilson, D. E., & DeeAnn M. R. (Ed.) (1993). *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference* (2. bs.), (3. baskı). Washington, DC, USA: Smithsonian Institution

Winchester, D. E., & Pepine, C. J. (2015). Angina treatments and prevention of cardiac events: an appraisal of the evidence. *European Heart Journal Supplements*, 17(Suppl G): G10–G18. DOI: 10.1093/eurheartj/suv054

Wolstenholme A. J. (2011). Ion channels and receptor as targets for the control of parasitic nematodes. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*, 1(1), 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2011.09.003>

Worth, H., Schacher, C., & Dethlefsen, U. (2009). Concomitant therapy with Cineole (Eucalyptole) reduces exacerbations in COPD: a placebo-controlled double-blind trial. *Respiratory research*, 10(1), 69. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-10-69>

Wynn, S. G., & Fougère, B. (2007). *Veterinary Herbal Medicine* (s. 328). St. Louis, Missouri, USA: Mosby Elsevier.

Xia, N., Chen, G., Liu, M., Ye, X., Pan, Y., Ge, J., ... Xie, S. (2016). Anti-inflammatory effects of luteolin on experimental autoimmune thyroiditis in mice. *Experimental and therapeutic medicine*, 12(6), 4049–4054. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3854>

Xiao, Q., Xue, T., Shuai, W., Wu, C., Zhang, Z., Zhang, T., Zeng, S., Sun, B., & Wang, Y. (2021). High-resolution X-ray structure of three microtubule-stabilizing agents in complex with tubulin provide a rationale for drug design. *Biochemical and biophysical research communications*, 534, 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.082>

Yang, J., Roy, A., & Zhang, Y. (2012). Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics* (Oxford, England), 29(20), 2588–2595. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt447>

Yang, J., Roy, A., & Zhang, Y. (2013). BioLiP: a semi-manually curated database for biologically relevant ligand-protein interactions. *Nucleic acids research*, 41(Database issue), D1096–D1103. <https://doi.org/10.1093/nar/gks966>

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12, 7-8 https://zhanggroup.org/papers/2015_1.pdf

Yang, J., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, 43, 174-181. doi: 10.1093/nar/gkv342

Yıldırım, T. Ş. (2010). *Terapötik etkili bazı gıdalar ve kullanım alanları*. (Yüksek Lisans Tezi) (s. 41). Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Bursa.

Yılmaz, G. R., & Babür, C. (2007). Ekinokokkosis Tanısı. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 64(3), 35-44. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/thdbd/issue/64034/968699>

Youn, H. J., & Noh, J. W. (2001). Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. *Veterinary parasitology*, 96(4), 257–263. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00385-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00385-5)

Yu, F., & Utsumi, R. (2009). Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(18), 3043–3052. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0066-7>

Zarei, Z., Mohebbi, M., Heidari, Z., Davoodi, J., Shabestari, A., Motevalli Haghi, A., ... Kia, E. B. (2016). Helminth Infections of *Meriones persicus* (Persian Jird), *Mus musculus* (House Mice) and *Cricetulus migratorius* (Grey Hamster): A Cross-Sectional Study in Meshkin-Shahr District, Northwest Iran. *Iranian journal of parasitology*, 11(2), 213–220. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5236098/>

Zhang, Q. C., Petrey, D., Norel, R., & Honig, B. H. (2010). Protein interface conservation across structure space. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(24), 10896–10901. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005894107>

Zhang, Z., Gao, Z. H., Wei, J. H., Xu, Y. H., Li, Y., Yang, Y., ... Wang, M. X. (2012). The mechanical wound transcriptome of three-year-old *Aquilaria sinensis*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 47, 1106–1110. PMID: 23162911

Zhao, L., Wang, J. L., Liu, R., Li, X. X., Li, J. F., & Zhang, L. (2013). Neuroprotective, anti-amyloidogenic and neurotrophic effects of apigenin in an Alzheimer's disease mouse model. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(8), 9949–9965. <https://doi.org/10.3390/molecules18089949>

Zheng G. Q. (1994). Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta medica*, 60(1), 54–57. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959408>

ZINC Database. (t.y.a). Artemisinin, ID: 8143788. Erişim adresi: <https://zinc.docking.org/substances/search/?q=8143788> (Erişim tarihi: 29.10.2018)

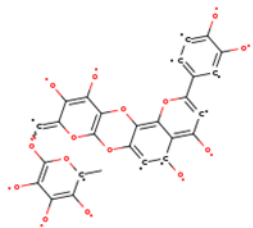
ZINC Database. (t.y.b). Quercetin. <https://zinc.docking.org/substances/ZINC000004175638/>

EKLER

- EK 1** Pseudoeriositrinin KPT2 (2FW3) içindeki konumlanışının video gösterimi
- EK 2** Pseudoeriositrinin iFR (6VAX) içindeki konumlanışının ve olası etkileşimlerinin video gösterimi
- EK 3** Pseudoeriositrinin CeGLUT1 içindeki konumlanışının video gösterimi
- EK 4** Pseudoeriositrinin SoCOX1 içindeki konumlanışının video gösterimi
- EK 5** Pseudoeriositrinin SWISSADME sonucu
- EK 6** Yapboz



Molecule 1



SMILES [O]C1=C([O])/C(=[C])OC2=C([O])C(=[C])([O2])[C]([O])
[O])/OC2=C1OC1=C3OC(=[C])C(=[C3][C])([C]=C1O2)[O])
[O])c1ccc(cc1)[O])[O]

Physicochemical Properties

Formula	C27O15
Molecular weight	564.28 g/mol
Num. heavy atoms	42
Num. arom. heavy atoms	6
Fraction Csp3	0.11
Num. rotatable bonds	3
Num. H-bond acceptors	15
Num. H-bond donors	0
Molar Refractivity	105.55
TPSA	55.38 Å²

Lipophilicity

Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	0.00
Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	-0.63
Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	2.34
Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	-4.41
Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	-1.61
Consensus Log $P_{o/w}$	-0.86

Water Solubility

Log S (ESOL)	-2.85
Solubility	7.98e-01 mg/ml ; 1.41e-03 mol/l
Class	Soluble
Log S (Ali)	-0.06
Solubility	4.91e+02 mg/ml ; 8.70e-01 mol/l
Class	Very soluble
Log S (SILICOS-IT)	0.07
Solubility	6.61e+02 mg/ml ; 1.17e+00 mol/l
Class	Soluble

Pharmacokinetics

GI absorption	High
BBB permeant	Yes
P-gp substrate	Yes
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	Yes
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K_p (skin permeation)	-10.19 cm/s

Druglikeness

Lipinski	No; 2 violations: MW>500, NorO>10
Ghose	No; 1 violation: MW>480
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	No; 1 violation: H-acc>10
Bioavailability Score	0.17

Medicinal Chemistry

PAINS	0 alert
Brenk	1 alert: acyclic_C=C-O
Leadlikeness	No; 1 violation: MW>350
Synthetic accessibility	4.88

Ek-5. Pseudoeriositrinin SWISSADME sonucu