



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOCKING TABANLI TERS SANAL
TARAMA VE MOLEKÜLER DİNAMİK
SİMÜLASYON İLE KARVAKROL'UN
POTANSİYEL ANTI-DİYABETİK
ÖZELLİĞİNİN İNSAN HEDEF
PROTEİNLERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

NAİL BEŞLİ

**TEZ DANIŞMANI
PROF DR. ÜLKAN KILIÇ**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ
ARALIK/2023**

İTHAF

“Bu yolculuk boyunca sarsılmaz desteği ve sınırsız sevgisi yol gösterici ışığım olan bana her zaman inanan anneme, bilgeliği, dayanıklılığı ve sonsuz cesareti beni bugün olduğum kişiye dönüştüren babamın onuruna ve bana olan inancınız benim en büyük motivasyonum olan babama, uzun saatler ve zor zamanlar boyunca sabrı, anlayışı ve sonsuz cesaretiyle beni ayakta tutan sevgili eşime, bu zorlu çaba sırasında masum merakı ve neşeli varlığı hayatıma denge getiren sevgili oğluma bu tezi, sizin benim hayallerime ilham verdiğiniz gibi sizin hayallerinize de ilham vermesi umuduyla ithaf ediyorum.”

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve destekleriyle her daim bana yardımcı olan, yanında çalışmaktan mutluluk duyduğum, karakteriyle ve sağlam duruşuyla her daim bana güç veren, bu araştırma yolculuğu boyunca sarsılmaz rehberliği, uzmanlığı ve sabrı için danışmanım Prof. Dr. Ülkan KILIÇ hocama; Eğitimim sırasında bilgi ve tecrübeleriyle ve desteğini gösteren ekibimizin değerli üyeleri Dr. Öğr. Üyesi Merve BEKER, Nilüfer BİLGİÇ, Bahar SARIKAMIŞ ve Rabia KALKAN'a;

Doktora tez çalışmalarım sırasında, İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarından desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Mustafa Çağlar BEKER'e, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültür Laboratuvarından destek veren Biyolog Sibel Doğan'a; yine bu süreçte yardımlarını esirgemeyen Biruni Üniversitesinden Dr. Öğr. Üyesi Güven YENMİŞ'e ve bu tezin in silico kısmını yaparak çalışmamıza değer kattığını düşündüğüm hesaplamaları yürüten UCAM Katolik Üniversitesi, İspanya, Yapısal Biyoinformatik ve Yüksek Performanslı Hesaplama Araştırma Grubu (BIO-HPC), Bilgisayar Mühendisliği Bölümünden Dr. Horacio Pérez-Sánchez ve değerli ekibine, Doktora çalışmalarım boyunca 100/2000 doktora bursu olarak maddi destek sağlayan YÖK'e ve BİDEB 2211-C yurt içi öncelikli alanlar bursu için TÜBİTAK-BİDEB'e,

ve hayatımın her aşamasında olduğu gibi doktora eğitimim boyunca da her daim yanımda olan, yardımlarını ve muhabbetlerini her zaman yanımda hissettiğim aileme;

Sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmanın mali destekçisi olan Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje No: 2022/237) ve TUBİTAK-ARDEB (1002-B acil destek modülü Proje No: 223S259) kurumuna teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KARVAKROL VE DİYABET	3
2.1.1. Karvakrol	3
2.1.2. Karvakrol ve Diyabet.....	4
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	9
3.1. <i>IN SILICO</i> DENEYİ	9
3.1.1. Karvakrol Kimyasal Yapısının Hazırlanması ve Potansiyel Anti-Diyabetik Aktivitenin Ters Sanal Taraması	9
3.1.2. Aşırı Temsil Analizi (Over-representation Analysis).....	10
3.1.3. Moleküler Dinamik (MD) Simülasyon.....	11
3.2. <i>IN VITRO</i> DENEYİ	11
3.2.1. In Vitro Deneyin Kurgulanması	12
3.2.2. Sitotoksosite Testi (MTT).....	12
3.2.3. Glikoz Konsantrasyonu Ölçümü.....	14
3.2.4. Total Protein İzolasyonu	14
3.2.5. Western Blotlama (WB)	14
3.2.6. İmmünfloresan (IF) ile Protein Analizi	15
3.2.7. İstatistiksel Analiz.....	15
3.2.8. Çalışmada Kullanılan Metaryel ve Teçhizat.....	16
3.2.9. Çalışmadaki Kit ve Kimyasallar	17
4. BULGULAR.....	19
4.1. <i>IN SILICO</i> HESAPLAMALAR.....	19
4.1.1. Yerleştirme Tabanlı Ters Sanal Tarama	19
4.1.2. MD Simülasyonu	29
4.2. <i>IN VITRO</i> ARAŞTIRMALAR	36

4.2.1. Sitotoksisite Testi (MTT).....	36
4.2.2. Glikoz Ölçümü.....	39
4.2.3. Western Blot Sonuçları.....	39
4.2.4. İmmünfloresan (IF) Sonuçları	41
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR	59



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Uçucu yağ ekstraksiyonunun ön analizinden elde edilen sonuçlar	4
Tablo 3.1: Ters sanal taramadan elde edilen proteinlerin Uniprot veritabanı sınıflandırması	10
Tablo 3.2: Oluşturulan deney grupları ve doz serileri	13
Tablo 4.1: DIA-DB web sunucusunun hesaplanmasıyla protein hedefli ligandlar için elde edilen en düşük yerleştirme skorları	25
Tablo 4.2: Bir farmasötik veritabanı olan DRUGBANK (60) ' tan 17 hedef protein için bilinen ligandlar.	26
Tablo 4. 3: 3T3-hücre hattında 24 saat sonra karvakrol ve metforminin IC50 değerleri ...	38
Tablo 4.4: MTT % canlılık değeri	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Karvakrol'ün kimyasal yapısı (Carvacrol (CHEBI:3440)) ve bilinen etki mekanizmaları.....	4
Şekil 2.2: Olası diyabet hedeflerini tahmin etmeye yönelik çalışma şeması	7
Şekil 3.1: 3T3-L1 hücre ekiminin ve pasajlama aşamalarının şematize görseli	12
Şekil 3.2: Uygulanan KV dozları için IC50 değerinin belirlenmesi.	13
Şekil 4.1: Karvakrol ve proteinlerin iki ve üç boyutlu temsili sunumu.	22
Şekil 4.2: Karvakrol ve proteinlerin iki ve üç boyutlu temsili sunumu.	23
Şekil 4.3: Karvakrol ve proteinlerin iki ve üç boyutlu temsili sunumu.	24
Şekil 4.4: WebGestalt sonuçlarının grafikleri	27
Şekil 4.5: In silico sonucu hedeflenen genler.	28
Şekil 4.6: GenMANIA aracından elde edilen görsel.....	29
Şekil 4.7: Desmond ile moleküler dinamik simülasyon ile ilgili grafikler.	30
Şekil 4.8: DDP4' ün karvakrol ile etkileşime girdiği residü ve non kovalent bağ tipleri ...	32
Şekil 4.9: FBP1 'in karvakrol ile etkileşime girdiği residü ve non kovalent bağ tipleri	32
Şekil 4.10: GCK 'nın karvakrol ile etkileşime girdiği residü ve non kovalent bağ tipleri..	33
Şekil 4.11: HSD11B1' in karvakrol ile etkileşime girdiği residü ve non kovalent bağ tipleri	33
Şekil 4.12: INSR 'nin karvakrol ile etkileşime girdiği residü ve non kovalent bağ tipleri.	34
Şekil 4.13: PPARA 'nın karvakrol ile etkileşime girdiği residü ve non kovalent bağ tipleri.	34
Şekil 4.14: PPARG 'nin karvakrol ile etkileşime girdiği residü ve non kovalent bağ tipleri	35
Şekil 4.15: PYGL'nin karvakrol ile etkileşime girdiği residü ve non kovalent bağ tipleri.	35
Şekil 4.16: MTT grafikleri.	37

Şekil 4.17: 3T3 hücrelerinde metformin ve karvakrol dozlarına göre hesaplanan hücre canlılığı yüzdeleri	38
Şekil 4.18: 3T3 hücre besiyerinde zamana bağlı glikoz değişimi	39
Şekil 4.19: Diyabetik 3T3 hücrelerinde deney gruplarındaki western blot analizi ile ilgili görsel.....	41
Şekil 4.20: Diyabetik 3T3-L1 hücrelerinde FBP1 pozitif hücrelerin immünfloresan görseli.	42
Şekil 4.21: Diyabetik 3T3-L1 hücrelerinde HSD11 β 1 pozitif hücrelerin GFP boyama ile immünfloresan görüntüleri.	43
Şekil 4.22: Diyabetik 3T3-L1 hücrelerinde PPARA immunpozitif hücrelerin GFP boyama ile immünfloresan görüntüleri.	44
Şekil 4.23: <i>In vitro</i> diyabetik 3T3-L1 hücrelerinde GCK proteinin Texas-Red boyama ile immünfloresan görüntüleri.	45
Şekil 4.24: 3T3-L1 hücrelerinde PYGL proteinin Texas-Red boyama ile immünfloresan görüntüleri.....	46
Şekil 4.25: 3T3-L1 hücrelerinde INSR proteinin Texas-Red boyama ile immünfloresan görüntüleri.....	47
Şekil 4.26: Diyabetik 3T3-L1 hücrelerinde PPARG immunpozitif hücrelerin GFP boyama ile immünfloresan görüntüleri.	48
Şekil 4.27: Diyabetik 3T3 hücrelerinde deney gruplarındaki IF analizi ile ilgili görsel.	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

DM	: Diabetes Mellitus
DPP4	: Dipeptidil peptidaz-4
FBP1	: fruktoz-bifosfataz-1
GCK	: Glikokinaz
GLP-1	: Glukagon benzeri peptit-1
INSR	: İnsülin reseptör
HK	: Heksokinaz
HSD11B1	: Hidroksisteroid 11-beta dehidrojenaz-1
KV	: Karvakrol
MET	: Metformin
PPARA	: Peroksizom proliferatörü aktive edilmiş reseptör alfa
PPARG	: Peroksizom proliferatörü aktive edilmiş reseptör gamma
PYGL	: Glikojen fosforilaz-L
PFK	: 6-fosfofruktokinaz
T1DM	: Tip1 Diabetes Mellitus

DOCKING TABANLI TERS SANAL TARAMA VE MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYON İLE KARVAKROL'UN POTANSİYEL ANTI-DİYABETİK ÖZELLİĞİNİN İNSAN HEDEF PROTEİNLERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Bu doktora tez çalışmasının amacı, kekik ve kekik benzeri bitkiler tarafından üretilen karvakrol (KV)' un bir dizi yeni insan protein hedefine karşı biyoinformatik analizi sonucu in vitro ortamda anti-diyabetik özelliğinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada ters sanal tarama (inverse virtual screening) metodu ile elde edilen sonuçların biyoinformatik yolak analizi sonrası moleküler dinamik simülasyonla (MD) KV'nin hedef proteinlerle moleküler modellemesi yapılmıştır. Daha sonra bu sonuçların konfirmasyonu, 3T3-L1 hücre soyu hücrelerinin hiperglisemik hücre kültürü ortamında western blot ve immünfloresan yöntemleriyle yapılmıştır.

Bulgular: Bağlanma enerjisine göre KV yerleştirme simülasyonlarının en iyi pozları -7,9 ila -3,5 (kcal/mol) aralığındadır. Protein listesinin GeneMANIA, WebGestalt ve Panther aracılığıyla yolak analizi sonrasında KV ile etkileşime giren yedi protein (DPP4, FBP1, GCK, HSD11B1, INSR, PYGL, PPARA ve PPARG) belirlenmiş ve bu proteinler KV ile MD simülasyon sürecinde kararlı yapılar sergilemiştir. In vitro uygulamada, sadece KV veya MET ile birlikte deney grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır. Tüm bu bulgular göz önüne alındığında, KV'nin bu hedef proteinlerden PPARG ve INSR diyabet tedavisi için FDA onaylı hedeflerdir. Bu da bize KV'nin DM tedavisi için umut verici bir terapötik bileşik olma ihtimalini düşündürmektedir.

Sonuç: Sonuçlarımız, KV'nin in silico sonuçlarının in vitro uygulama ile validasyonunun DM için yürütülecek olan çalışmalara destek verecek potansiyeline sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, In vitro, Karvakrol, Moleküler Dinamik Simülasyon, Ters Sanal Tarama



INVESTIGATION OF THE EFFICACY OF THE POTENTIAL ANTIDIABETIC PROPERTIES OF CARVACROL ON HUMAN TARGET PROTEINS BY DOCKING-BASED INVERSE VIRTUAL SCREENING AND MOLECULAR DYNAMIC SIMULATION

ABSTRACT

Aim: The aim of this doctoral thesis is to investigate the anti-diabetic properties of carvacrol (CAR), produced by thyme and thyme-like plants, against a series of new human protein targets in vitro, as a result of bioinformatics analysis.

Materials and Methods: After the bioinformatics pathway analysis of the calculation results we obtained using the inverse virtual screening method, molecular modeling of CAR to target proteins was carried out with molecular dynamics simulation. Then, the target proteins were verified through western blot and immunofluorescence assays in a diabetes model utilizing 3T3-L1 grown in hyperglycemic cell culture medium.

Results: The best poses of CAR docking simulations with respect to binding energy were in the range of -7.9 to -3.5 (kcal/mol). After pathway analysis of the protein list through GeneMANIA, WebGestalt, and panther, seven CAR-interacting proteins (DPP4, FBP1, GCK, HSD11B1, INSR, PYGL, PPARA, and PPARG) were identified and these proteins exhibited stable structures during the MD process with KV. In in vitro application, we achieved statistically significant results only in combined doses with CAR or MET. Considering all these findings, PPARG and INSR, among these target proteins of CAR, are FDA-approved targets for the treatment of diabetes. Therefore, CAR may be a promising therapeutic compound for the treatment of DM.

Conclusion: Our results have the potential to support studies to be carried out for DM by validating the in silico results of CAR with in vitro application.

Key Words: Carvacrol, Diabetes, Inverse Virtual Screening, In vitro, Molecular Dynamics Simulation,



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hiperglisemi ile karakterize karmaşık bir metabolik bozukluk olan Diabetes Mellitus (DM), dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen epidemik boyutlara ulaşmış bir hastalıktır (1). Artan prevalansı ve ilişkili komplikasyonları, yeni terapötik müdahalelere olan acil ihtiyacın altını çizmektedir. Doğal ürünler uzun süredir potansiyel antidiyabetik ajanlar için değerli kaynaklar olarak kabul edilmektedir ve bu bağlamda bir monoterpenoid fenol olan karvakrol büyük ilgi görmüştür (2). Karvakrol (KV), çeşitli aromatik bitkilerdeki varlığıyla yaygın olarak bilinmektedir ve çeşitli farmakolojik özellikleri, onun bir antidiyabetik ajan olarak potansiyelini ortaya koymaktadır (3,4). Bu çalışmada, yerleştirme tabanlı ters sanal tarama ve moleküler dinamik simülasyonu birleştiren çok yönlü bir yaklaşım aracılığıyla KV'nin antidiyabetik etkinliğinin araştırılması hedeflenmiştir.

In vitro ve in vivo yöntemleri kullanarak araştırılacak bir ligand için mevcut tüm insan proteinlerini analiz edebilmek neredeyse imkansızdır. In silico tahmin yöntemleri, bilgisayar destekli reseptör-ligand (ilaç) tasarımı klinik öncesi aday ilaç geliştirmeye imkân sağlayarak maliyet ve deneylerin azaltılmasını hedefleyen etkili bir yaklaşımdır. Bu bağlamda, bu tez çalışması, karvakrol ile glikoz metabolizmasında, insülin sinyalizasyon ve diyabetle ilişkili diğer önemli yolaklarda önemli rol oynayan spesifik insan hedef proteinleri arasındaki etkileşimlere ışık tutmaktır. Yerleştirme tabanlı ters sanal tarama, karvakrol ile bu hedef proteinler arasındaki potansiyel bağlanma etkileşimlerini tahmin etmemizi sağlayan güçlü bir hesaplama tekniğidir. Moleküler dinamik simülasyonu, bu komplekslerin dinamik davranışına dair içgörüler sağlayarak bu yaklaşımı daha da kuvvetlendirir ve böylece potansiyel terapötik mekanizmaların kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlar (5,6). Elde edilen in silico sonuçlarının validasyonu, in vitro ortamda hiperglisemik hücre kültürü sonrası western blot ve immünfloresan yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, KV'nin potansiyel bir anti-diyabetik ajan olarak bilgisayar temelli ilaç tasarımı ile mantığını inceleyeceğiz, araştırmamız için kullanılan metodolojiyi açıklayacağız ve bulgularımızın sonuçlarını tartışacağız. Bu çalışmanın sonuçları, yalnızca KV'nin anti-diyabetik özelliklerini ortaya çıkarma potansiyeline sahip olmakla kalmayıp, aynı zamanda diyabetin moleküler temellerinin daha derinlemesine

anlaşılmasına katkıda bulunarak bu küresel sağlığa karşı mücadelede yenilikçi tedavilerin geliştirilmesi için yeni yollar açabilecektir.



2. GENEL BİLGİLER

Diyabet, pankreas organının insülini yeterli üretememesi veya ürettiği insülinin efektif olarak kullanamadığı durumlarda kendini gösteren kronik bir vakadır. Hiperglisemi, kontrolsüz diyabetin ciddi bir sonucudur ve başta sinirler ve kan damarları olmak üzere vücuttaki çeşitli sistemlerde ciddi hasara neden olmaktadır (1). Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF), 2021 yılında 536,6 milyon kişinin diyabetle yaşadığını (teşis edilmiş veya edilmemiş) tahmin etmekte ve bu sayının % 46 artarak 2045 yılına kadar 783,2 milyona ulaşacağını öngörmektedir (7). Bu istatistiksel veriler, yeni anti-diyabetik bileşiklerin hızlı gelişimi için tamamen yeni ve yenilikçi bir yöntem oluşturunun ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

2.1. KARVAKROL VE DİYABET

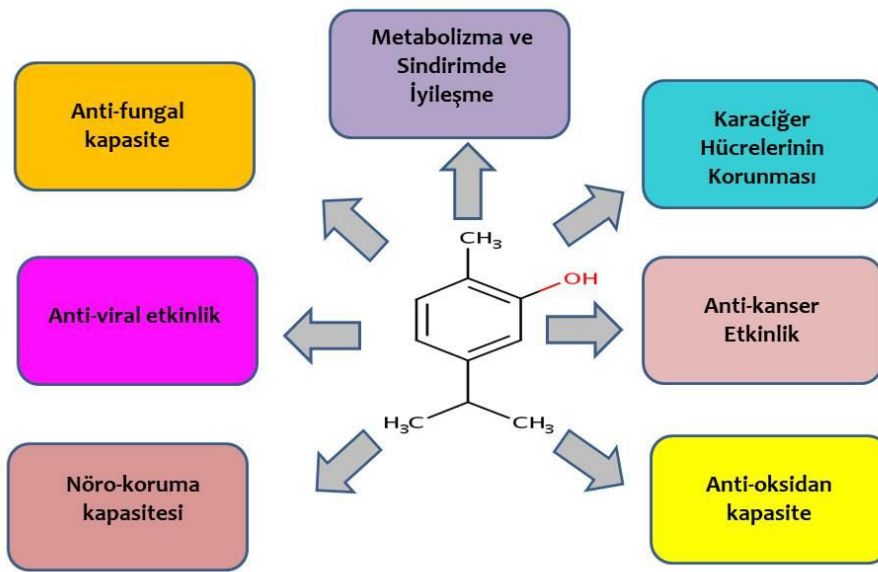
2.1.1. Karvakrol

Bitkiler faydalı ve koruyucu özelliklerinden dolayı geleneksel tıpta yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (2). Kekik ve kekik benzeri gibi birçok aromatik bitki türü tarafından üretilen (Tablo 1) ve normalde sıvı halde bulunan bir monoterpenik fenol olan karvakrol (KV)‘ ün (2-metil-5-izopropil fenol) (Şekil 1), anti-inflamatuvar (8), antioksidan (9), antiapoptotik (10), antimikrobiyal (11) ve antikanser özellikleri (12) ve nöron hücre koruması (13), metabolizma ve sindirimi kolaylaştırma kapasitesi (14) gibi çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Şekil 1). KV en çok kekik ile ilişkilendirilir, ancak aynı zamanda nane, fesleğen, mercanköşk otu, biberiye, lavanta ve adaçayı bitkileri de dahil olmak üzere diğer Labiatae bitkilerinde de mevcuttur (15). Ek olarak, timol, limonen, terpinen, osimen ve karyofillen gibi diğer antioksidanlarla birlikte karvakrolün varlığı, kekik yağının sağlığa olan faydalarına ve kendine özgü tat ve kokusuna önemli ölçüde katkıda bulunur (16). Bu bulgular, karvakrolün bitkisel tıptaki önemini ve sağlıklı yaşamdaki potansiyel uygulamalarını vurgulamaktadır.

Tablo 2.1: Uçucu yağ ekstraksiyonunun ön analizinden elde edilen sonuçlar

Türler	Analiz yöntemleri	İçerik Oranı (%)	Referanslar
<i>Origanum syriacum</i> (Dağ kekiği)	GC ve GC-MS	26.97	(16)
<i>O. syriacum</i> var. <i>Bevanii</i> (Dağ kekiği)	G-MS	64.1	(17)
<i>Thymus vulgaris</i> (Bahçe kekiği)	GC-MS	59.29	(18)
<i>Thymbra spicata</i> (Kara kekik)	GC-MS	70	(19)
<i>Origanum vulgare</i> (Keklik otu)	G –MS	61.08–83.37	(20)
<i>Thymbra capitata</i> (Acı kekik)	GC ve GC-MS	≥ 66	(21)

GC; Gaz kromatografisi ve GC-MS; GC – Kütle spektrometrisi



Şekil 2.1: Karvakrol'ün kimyasal yapısı (Carvacrol (CHEBI:3440)) ve bilinen etki mekanizmaları

2.1.2. Karvakrol ve Diyabet

Diabetes Mellitus, vücudun insülin üretme veya insüline yanıt verme yeteneğini etkileyen, yüksek kan şekeri seviyelerine neden olan kronik bir metabolik hastalıktır (1).

Glikoz homeostazı, aerobik oksidasyon, anaerobik glikoliz ve glikojen sentezi gibi karbonhidrat-metabolizma yolları ile sağlanır (22). Kronik hiperglisemi ve hiperlipidemi, kardiyovasküler hastalıklar, böbrek hasarı ve retina hasarı gibi diyabetik komplikasyonların gelişmesine sebep olan oksidatif stresi aktive eder (23). Kandaki artan glikoz seviyesi, enzimler tarafından kontrol edilen bir karbonhidrat metabolizması bozukluğu ile ilişkilidir (24). Bir dizi anahtar enzim karbonhidrat metabolizmasını

kontrol eder. Örneğin, heksokinaz (HK) ve 6-fosfofruktokinaz (PFK) anaerobik glikolize katılırken (25,26), Sitrat sentetaz (SS), aerobik oksidasyonda yer alan anahtar bir enzimdir (27). Tip1 Diabetes Mellitus (T1DM) 'da HK ve PFK aktivitesi azaldığı bilinmektedir (28).

T1DM'nin birincil tedavisi, kandaki hiperglisemiye kontrol etmek için esas olarak glikoz seviyelerini düşürmeyi ve dengelemeyi sağlayan insülin enjeksiyonudur (29). Çok yönlü özellikleri sayesinde, glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) reseptörü, dipeptidil peptidaz-4 (DPP4) ve alfa-glukozidaz için amaçlanan spesifik inhibitörler ve enzim hedefli ilaçların onaylanmasında kayda değer ilerleme olmuştur (30). Ne yazık ki, bu onaylanmış ilaçların bir kısmının yan etkileri olduğu deneyimlenmiştir (30). T1DM patogenezindeki karmaşıklığın aydınlatılmasıyla, hastalığın tedavisi için daha etkili ve güvenilir ilaçlar geliştirmeye artan bir ihtiyaç vardır.

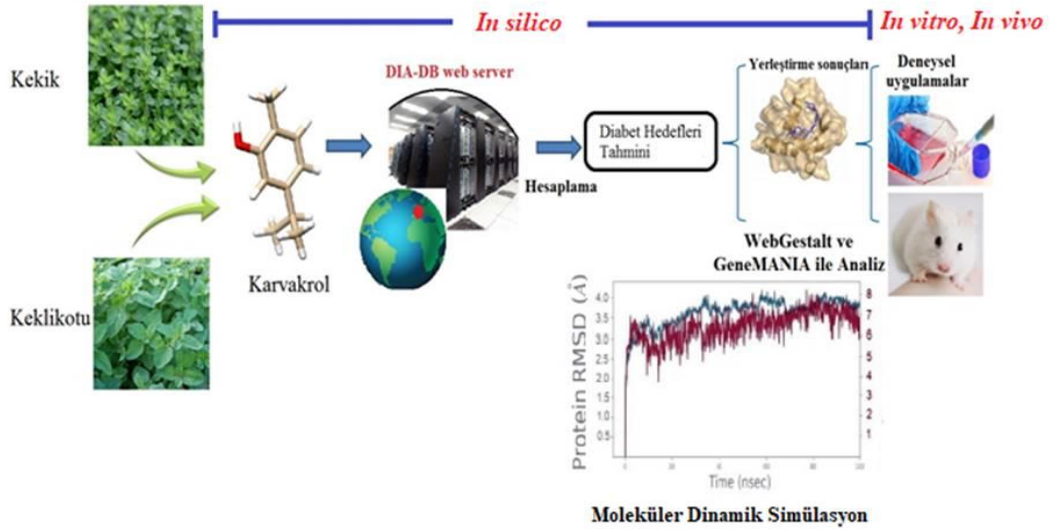
Çeşitli bitkilerde bulunan doğal bir bileşik olan karvakrolün, diyabet tedavisinde potansiyel terapötik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (3,31,32). Bazı çalışmalar karvakrolün diyabetik hastalarda insülin duyarlılığını ve glukoz metabolizmasını modüle edebileceğini öne sürmektedir. Ancak diyabet tedavisinde karvakrol kullanımının olası yan etkileri hala tam olarak anlaşılamamıştır. Ek olarak, tedavi sonuçlarını iyileştirmek için karvakrolün geleneksel anti-diyabetik ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılıp kullanılamayacağı da belirsizdir. Diyabet semptomlarını iyileştirmek için optimal karvakrol dozajının belirlenmesi de devam eden bir araştırma alanıdır. KV'nin anti-diyabetik etkinliği, DM ile ilgili deneysel çalışmalar KV üzerinde yeterince yürütülmediğinden, çok az ilgi çekmektedir. Bu nedenle KV'nin bu özelliği değerlendirilmelidir.

Kekik yağı etken maddesi olan KV'nin antidiyabetik etkisinin mekanizmasının keşfedilmesiyle -ki Pubmed'te anahtar kelime olarak "Diabetes and Carvacrol" birlikte tarandığında sadece 44 yayına ulaşılabilir (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Diabetes+and+Carvacrol, Erişim tarihi:25 kasım 2023)- kekik cenneti olan ülkemizde antidiyabetik ajan olarak kullanılması muhtemel olacak karvakrol'e ulaşmak hem pazar ve maliyet hem de hammadde açısından primer ajan olan ve yabancı menşeli metformine alternatif olabilecektir. Yerli bitkilerimizden olan kekiğin üretim kolaylığıyla da yerli bir antidiyabetik ajan olarak literatüre girecek olması açısından da önemlidir. Yine sağlıkla ilgili çeşitli alanlarda

ümit verici özellikler göstermesi nedeniyle, KV'nin diyabet yönetimi için potansiyel sağlık yararlarını araştırmak büyüleyici bir konudur. Karvakrol ve diyabet yönetimine odaklanan spesifik araştırmalar bir şekilde sınırlı olsa da, bilinen özelliklerine ve diyabet tedavisi ve yönetiminin daha geniş kapsamına dayanarak potansiyel faydalar çıkarılabilir.

Bu amaçla tez çalışmamızın hedefi, KV'nin *in silico* ve *in vitro* analizler yoluyla etki mekanizmasını aydınlatmak olacaktır. Sonuçlarımızın, şimdiye kadar bu alanda yapılan ve ileride yapılması planlanan diyabet çalışmalarına önemli bir katkı sağlayacağı kanaatindeyiz. Hedeflediğimiz bulgulara ulaşıldığında, ilişkisini *in vitro* da gösterdiğimiz protein ya da proteinlerin diyabet yolağındaki aktivasyon ve etkinliklerinin aydınlatılacağı diabetik hayvan modeli ile daha ileriye taşımayı hedeflemekteyiz. Bu çalışmada;

- KV'nin potansiyel antidiyabetik etkisinin, hesaplamalı biyoloji ile yeni hedef proteinlere olan etkilerinin belirlenmesi,
- KV'nin docking tabanlı ters sanal tarama sonucu hesaplama puanlarıyla listenen FFAR1, AKR1B1, RBP4, PPARG, DPP4, GSK3, PPAR, AMY2A, PDK2, MGAM, HSD11B1, PPAR, NR5A2, INSR, PYGL, PTPN9, ve FBP1 proteinleri GENMANIA ve WebGestalt bioinformatik araçlara tabi tutulması,
- Belirlediğimiz proteinlerin KV ile yerleştirme (docking) komplekslerinin moleküler dinamik simülasyon yöntemiyle atomik seviyede üç boyutlu yapılarının incelenmesi,
- İnsan mezenkimal kök hücrelerinin progenitör pankreas beta hücrelerine benzeyen hücrelere indüklenmesi ve hiperglisemik *in vitro* ortam ile diabetik model oluşturulması,
- KV'nin, artan farklı konsantrasyonlarıyla belirlenen gruplardaki hücrelere olan etkin dozunun sitotoksik hücre canlılığı testiyle analizi,
- Diyabet ile ilişkilendirilen hedef proteinlerin KV uygulanmış diabetik model hücre hattında protein düzeyinde ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi,
- KV'nin diyabet tedavisinde yardımcı bir ajan olarak kullanımının, diyabet alanındaki ilaç denemeleri çalışmalarına katkısının ve diyabet alanında gelecek çalışmalara ışık tutabileceğinin sorgulanması hedeflenmiştir.



Şekil 2.2: Olası diyabet hedeflerini tahmin etmeye yönelik çalışma şeması

Çalışmamız, KV için diyabet ile ilişkilendirilen yeni hedef proteinlerinin araştırılması, KV'nin hangi protein üzerinden kan şekerini düşürdüğünü gösterecek olması adına daha önce yapılmamış bir çalışma olması, birbirini takip eden in silico ve in vitro çalışmalar olması dolayısıyla bildiğimiz kadarıyla konuyla alakalı yapılan ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Ayrıca, bilgisayar destekli ilaç etken madde tasarımı gelişiminde, KV'nin anti-diyabetik özellik kazandırılabilmesinde güncel inovatif algoritmalara sahip kenetleme (docking) bazlı moleküler modelleme ve dinamik simülasyon ile hesaplama sonucu kimyasal yapı temelli ilaç analizi ile biyoyararlanım seviyesinin in vitro uygulamalar ile ölçülmesi, KV'nin istenilen terapötik kategoriye ve güçlü biyolojik etki gösterebilecek seviyeye ulaşabilmesini sağlayacak gelecekteki çalışmalara katkı sağlayacağı amaçlanmıştır. Yine çalışmamız, birçok aromatik bitki özütünde var olan KV'nin doğal ortamından ilaç olarak anlamlandırılması ve onaylanmasına kadar olan süreçte, prelinik çalışmalar ile Faz (1-4) aşamalarına gelmesi için yapılacak olan çalışmalara destek verecektir.

Proje önerimiz, hesaplamalı yapısal biyoloji metodları içermesi, hedefe yönelik karvakrolün yeniden konumlandırılması ve tasarımının tahmini için etkili bir yaklaşımı

temsil ederek, klinik öncesi ilaç gelişimini açıklamayı ve dolayısıyla ilgili süre, maliyet ve deneylerin azaltılmasını sağlamaktadır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. *IN SILICO* DENEYİ

3.1.1. Karvakrol Kimyasal Yapısının Hazırlanması ve Potansiyel Anti-Diyabetik Aktivitenin Ters Sanal Taraması

Çalışmamızın, ilk basamağı olan *in silico* kısımda, KV' nin 17 protein arasından yüksek güvenilirlikle etkileştiği 8 protein ve bu proteinlerin karvakrolle olan moleküller modellemesi analiz edilmiştir. MD simülasyon verileriyle birlikte, bu 8 proteinin farklı KV dozlarındaki ekspresyon farklılıklarının saptanması, bu farklılıkların *in vitro* ortamlarda gösterilmesi, dolayısıyla karvakrolün antidiyabetik etkisinin hangi proteinler üzerinden gerçekleştiğinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Bununla birlikte bu 8 proteinden DPP4'ün KV afinite tahmini her ne kadar MD simülasyonu ile yapılsada, hücre dışına salınan plazma protein olmasından konfirmasyonu *in vitro* analizinden ziyade *in vivo* yöntemle gelecek çalışmamızda yapılması öngörülmüştür.

Çalışmamızın hazırlık ayağında, KV'nin muhtemelen bağlanabileceği yeni protein hedeflerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Buna göre, KV ve olası diyabet hedef proteinlerinin kenetlenmesini hesaplamak için DIA-DB (33) web sunucusu kullanılmıştır. Karvakrol'ün kanonik SMILES (CC1=C(C=C(C=C1)C=C)O) notasyonu ve iki boyutlu yapısı PubChem'den alındı (34). Daha sonra, KV'nin kanonik SMILES'i, Autodock Vina (35) 'nın özelleştirilmiş bir versiyonu ile bileşiklerin ters sanal taramasını kullanan DIA-DB web sunucusuna diyabetle ilişkili 17 protein hedefine karşı yerleştirme (docking) işlemi için gönderildi (**Tablo 1**).

Tablo 3.1: Ters sanal taramadan elde edilen proteinlerin Uniprot veritabanı sınıflandırması

Uniprot ID	PDB	Çözünürlük	Zincir	Sınıf	Protein ismi	Gen ismi
O14842	4PHU	2.33 Å	A	Hidrolaz	Serbest yağ asidi reseptörü 1	FFAR1
P15121	3G5E	1.80 Å	A	Oksidoredüktaz	Aldoz redüktaz	AKR1B1
P02753	2WR	1.80 Å	A	Sinyal proteini	Retinol bağlayıcı protein 4 öncüsü	RBP4
Q03181	3PEQ	2.40 Å	A	Transkripsiyon aktivatörü	Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör delta	PPARD
P27487	4A5S	1.62 Å	A	Hidrolaz	Dipeptidyl peptidaz 4	DPP4
P35557	3IMX	2.00 Å		Transferaz	Glukokinaz	GCK
P37231	2FVJ	1.99 Å	A	Sinyal proteini	Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör gamma	PPARG
P04746	4GQR	1.20 Å	A	Hidrolaz	Pankreas alfa-amilaz öncüsü	AMY2A
Q15119	4MPC	1.70 Å	A	Transferaz	[Piruvat dehidrojenaz (asetil aktaran)] kinaz izozim 2, mitokondriyal öncü	PDK2
O43451	3L4Y	1.80 Å	A	Hidrolaz	Maltaz-glukoamilaz, bağırsak	MGAM
P28845	4K1L	1.96 Å	A/B/C/D	Oksidoredüktaz	Hidroksisteroid 11-beta dehidrojenaz 1	HSD11B1
Q07869	3FEI	2.40 Å	A	Transkripsiyon	Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör alfa	PPARA
O00482	4DOR	1.90 Å	A/B	Transkripsiyon	Nükleer reseptör alt ailesi 5 grup A üyesi 2	NR5A2
P06213	3EKN	2.20 Å	A	Transferaz	insülin reseptörü öncüsü	INSR
P06737	3DDS	1.80 Å	A/B	Transferaz	Glikojen fosforilaz, karaciğer formu	PYGL
P43378	4GE6	1.40 Å	A/B	Hidrolaz	Tirozin-protein fosfataz reseptör olmayan tip 9	PTPN9
P09467	2JJJ	2.00 Å	A/B/C/D	Hidrolaz	Fruktoz-1,6-bifosfataz 1	FBP1

3.1.2. Aşırı Temsil Analizi (Over-representation Analysis)

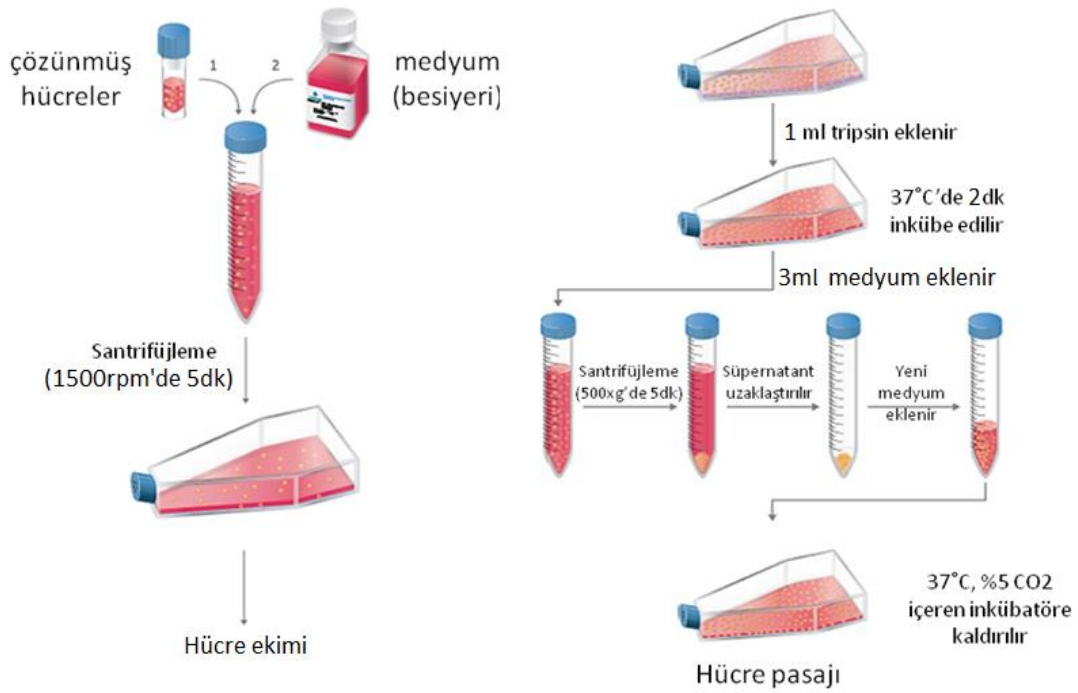
DIA-DB web sunucusundan hedef proteinlerin resmi gen adları WebGestalt'a tabi tutulmuştur (36). WebGestalt sunucusunun gen listelerinin işlevsel zenginleştirme analizi için yaygın bir araç olduğu iyi bilinmektedir. WebGestalt'taki gen listesini analiz etmek için yolak (37), Panther (38) analiz yöntemi ve Fonksiyonel Veri Tabanı DisGeNET (39)'den Aşırı Temsil Analiz (ORA) (40) metodu uygulanmıştır. Referans seti olarak illumina humanwg 6 v3 seçildi ve diğer tüm gelişmiş parametreler varsayılan değerlerinde bırakılmıştır. Ayrıca, gen listesini proteomik verilerle işlevsel olarak benzer genlerle zenginleştirmek için GeneMANIA (41) aracı kullanılmıştır.

3.1.3. Moleküler Dinamik (MD) Simülasyon

Yapısal sabitliği değerlendirmek ve protein-ligand (hedef proteinler-karvakrol) etkileşimlerinin statik tanımını doğrulamak için Desmond, Schrödinger (42) yazılımı kullanılarak MD simülasyonu gerçekleştirilmiştir. Protein-ligand etkileşimlerinin dinamik doğası incelenerek atomik düzeydeki etkileşimlerinin analizi yapıldı. Kompleks, basit nokta yükü (SPC) ile su molekülleri ile dolu boyutları 10x10x10 Å olan bir kutuya daldırıldı. Enerji minimizasyonu, en dik iniş yöntemi kullanılarak 2000 adımda yapıldı, eşik 1.0 kcal/mol/Å olarak ayarlandı. NPT simülasyonları Nosé-Hoover algoritması (43, 44) ile 300 K'da gerçekleştirildi ve Martyna-Tobias-Klein barostat (45) ile basınç 1 bar'da tutuldu. Tüm çalışmalarda periyodik sınır koşulları kullanıldı. Simülasyon uzunluğu 100 ns olarak tercih edildi. Van der Waals etkileşimleri için 9 Å'lik kesim kuruldu ve elektrostatik kısımda 10⁻⁹ toleranslı Particle Mesh Ewald (PME) yöntemi kullanıldı. Koşularda kullanılan kuvvet alanı, OPLS3e (46) idi. Protein-ligand etkileşimlerinin dinamik kalitesi analiz edilmiş ve atomik düzeydeki etkileşimleri dikkate alınmıştır.

3.2. IN VITRO DENEYİ

Bu çalışmada in vitro 'da genellikle diyabet, obezite ve ilgili bozukluklarla ilişkili temel hücresel mekanizmaları incelemek için kullanılan 3T3-L1 (ATCC: CL-173) fare fibroblast hücre soyu hücreleri tercih edilmiştir. ATCC'den elde edilen kriyotüpte donmuş durumda 3T3-L1 embriyonik fare fibroblast hücre soyu hücreleri daha önceki çalışmalarda olduğu şekilde açılarak birkaç dakika 37°C'lik bir su banyosunda tutuldu ve taze ortam ile yeniden süspanse edilmiştir. En az 2 pasajdan sonra deney için kullanıldı (47)(bkz. Şekil 3.1). 3T3-L1 fare fibroblast soyu hücrelerinin in vitro ortamda, büyüme ve çoğalmalarını sağlamak için, uygun besiyeri hazırlanacaktır. Bu amaçla; 100 ml Dulbecco Minimal Eagle's Medium F-12(HAM) (DMEM) besiyerine , % 10 olacak şekilde ısıyla inaktive edilmiş fetal sığır serum (FCS), %1 olacak şekilde penisilin-streptomisin antibiyotiği, %1 olacak şekilde L-glutamin amino asiti eklenerek hazırlanmıştır (47).



Şekil 3.1: 3T3-L1 hücre ekiminin ve pasajlama aşamalarının şematize görseli

3.2.1. In Vitro Deneyin Kurgulanması

Hücreler literatüre göre belirlenmiş 25mM/L (450 mg/dL) ve 33.3 mM/L (600 mg/dL) glikoz dozlarında iki farklı hiperglisemik besiyerinde 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra 25/50/100/150/200/250/300/400 μ M dozlarda KV (KV çözücüsü(DMSO < %0.1) ile hazırlanmış ve filtrelenmiş olarak hazırlanarak belirlenen sürelerde maruz bırakıldı (47, 48). Ayrıca pozitif kontrol grubunun efektif dozunun belirlenmesi için 0.5/1/5/10/15/25/30/40/50 mM dozlarında metformin (MET)(Tip 2 diyabette kullanılan ilaç etken maddesi) uygulaması yapıldı (49). KV ve MET optimum dozunu belirlemek amacıyla MTT testi ve medyumdan glikoz konsantrasyonu ölçümü yapıldı (Su içinde çözünürlüğü; KV: 0,33 g/L, MET:350 g/L 20 °C).

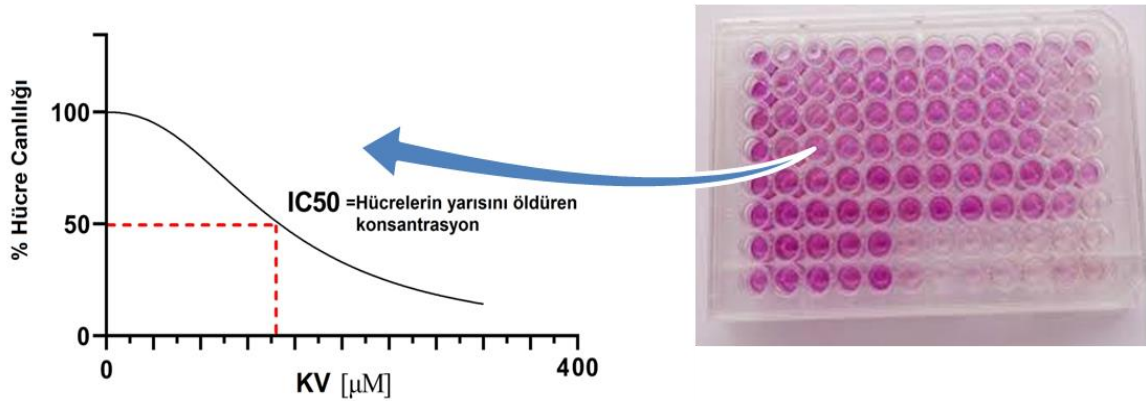
3.2.2. Sitotoksikite Testi (MTT)

Diyabetik *in vitro* modeli oluşturulmuş hücreler üzerinde toksik etki oluşturmayacak optimum KV dozajını tespiti için MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi yapıldı. Bunun için hücreler 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında 1×10^4 hücre/kuyu (100 μ l) olacak şekilde inkübe edildi. İnkübasyon

sonunda 25-400 μM arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanan KV ve 0.5-30 mM dozlarında MET 24 ve 48 saat boyunca hücrelerle muamele edildi. Süreler sonunda, kültür medyumuna üzerine 10 μl , 5 mg/ml MTT eklenerek, 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de 3 saat inkübe edildi. Daha sonra MTT solüsyonu döküldü ve hücrelerin üzerine 100 μl dimethyl sulphoxide (DMSO) eklenerek oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Renkteki değişim kolorimetrik bir okuyucu olan spektrofotometrede 570 nm'de 655 nm referans dalga boyuna karşı okutuldu. Uygulanan dozların absorbans değerleri, kontrol grubunun absorbans değerleri ile karşılaştırılarak, % cinsinden ölen hücre sayısı saptandı ve % inhibisyon konsantrasyonu belirlendi. GraphPad Prism 9 paket programı ile logoritmik büyüme eğrileri ve absorbans değerleri (ortalama $\pm$ SD) zamana karşı çizildi (50). Tablo 3.2 deki gruplardan toksisite oluşturmayacak optimum dozları belirlemek için IC50 (hücrelerin yarisını öldüren konsantrasyon) değeri tespit edildi (bkz.Şekil 3.2).

Tablo 3.2: Oluşturulan deney grupları ve doz serileri

Kontrol	Vehikül	Doz A <IC50	Doz B <IC50	Doz C <IC50
Hücre + Medyum (Negatif Kontrol)	Hücre + Medyum+DMS O(<%0.1)	Hücre + Medyum+DM SO(<%0.1) +KV+MET	Hücre + Medyum+DM SO(<%0.1) +KV+MET	Hücre + Medyum+DM SO(<%0.1) +KV+MET



Şekil 3.2: Uygulanan KV dozları için IC50 değerinin belirlenmesi.

Deney verilerine göre karvakrol(KV) ve metformin (MET) doz grubu sayısı değişebilir. DMSO; KV çözücüsüdür.

3.2.3. Glikoz Konsantrasyonu Ölçümü

Deney grupları oluşturulduktan sonra ilaç etkinliğinin belirlenmesi için kontrol ve deney gruplarının medyumundan GlucCell® cihazı ile (1 saat, 2 saat, 24 saat) zaman aralığında glikoz konsantrasyon (mg/dL) ölçümü yapıldı.

3.2.4. Total Protein İzolasyonu

Total protein izolasyonu için diyabet modeli oluşturulan hücrelere MTT deneyi sonucu belirlenen doz ve sürede KV ve MET uygulandı. Ardından, hücreler kültür kabından kazıyıcı (cell scraper) ile toplandı. Daha sonra 200g'de 5dk +4 °C de santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pellet üzerine proteaz inhibitör kokteyl (%1) içeren lizis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH:8), %1 Triton-X-100) eklenip 20 dk kuru buzda bekletildi. Ardından 14000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek protein izolasyonu gerçekleştirildi (51). Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanttan (1/20 dilüe edilerek) DeNovix DS-11 FX NanoDrop cihazıyla 260/280 OD değerinde protein konsantrasyon (mg/mL) ölçümü yapıldı.

3.2.5. Western Blotlama (WB)

İzole edilen proteinlerden, deneysel diyabet modelinde KV'nin, yolak analizi yapılmış diyabet ile ilişkilendirilen PYGL, HSD11B1, PPARA, PPARG, INSR, GCK, FBP1 genleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla protein seviyeleri western blot yöntemi ile incelendi. 20µgr miktarda protein örnekleri %4-12 SDS-Page jele (THERMO NuPAGE™, BisTris, 1.0 mm) yüklenerek proteinler elektroforeze tabi tutuldu. Jelde yürütülen örnekler transfer sistemi yardımıyla PVDF (ADV-K-12043-C20) membrana aktarıldı. Membran, 1 saat TBS-T (Tween-20 içeren Tris-buffered saline (TBS)) içinde hazırlanan %5 yağsız süt tozu ile inkübe edildi. Daha sonra araştırılacak proteine uygun primer antikorlar (PYGL, HSD11B1, PPARA, PPARG, INSR, GCK, FBP1 ve β-actin(housekeeping protein)) ile (1:1000 konsantrasyonunda) 1 gece +4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün TBS-T ile muhtelif yıkamalar sonrası, 1 saat oda sıcaklığında sekonder antikör ile inkübe edildi ve daha sonra immün kompleksler kemiluminesans yöntemi iBright FL1000 (invitrogen) cihazı ile görüntülendi. Araştırılan proteinlere ait bantların optik dansitesi, housekeeping bandın optik dansitesine oranlanarak ifade edildi (51). Görüntü analiz değerleri için ImageJ 1.54 programı kullanılmıştır.

3.2.6. İmmü floresan (IF) ile Protein Analizi

Diyabet modelinde KV muamelesi sonrası, WB ile total protein seviyeleri belirlenen PYGL, HSD11B1, PPARA, PPARG, INSR, GCK ve FBP1 proteinlerinin hücre kompartımanlarındaki yoğunluklarının izlenerek yorum yapılabilmesi için hücre içi lokalizasyonları da incelendi. Böylece bu proteinlerin hücredeki yoğunlukları ve aktif rol aldıkları hücresel alanları WB sonuçlarıyla kombinasyonlu analizi yapıldı. Bunun için 3T3-L1 hücreleri, 24 kuyucuklu kültür kaplarında 2×10^5 hücre/kuyucuk yoğunluğunda çoğaltılarak deneysel diyabet modeli oluşturuldu. MTT analizi sonucu belirlenen optimum KV ve MET dozu uygulanıp 24 saat inkübe edildi. Ardından hücreler, PBS (Phosphate Buffered Saline) içinde %4 paraformaldehit ile fiks edilip 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. 3 kere PBS ile yıkama sonrası hücreler %1 BSA içeren PBS’de 1 saat, oda sıcaklığında inkübe edildi (blocking). İnkübasyon sonrası PBS çözeltisi uzaklaştırılıp hücreler, %1 BSA içeren PBS içinde hazırlanan primer antikorlarla (anti-PYGL, anti-HSD11B1, anti-PPARA, anti-PPARG, anti-INSR, anti-GCK, anti-FBP1) 4°C ’de 16 saat muamele edildi. Daha sonra PBS ile 3 kere yıkama yapıp %1 BSA içeren PBS içinde hazırlanan floresan işaretli sekonder antikor oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda PBS ile 3 kere yıkama yapıldı ve hücreler DAPI (Fluoroshield Mounting Medium with DAPI (Abcam, AB-104139)) ile muamele edilip floresan mikroskobu altında görüntülenerek 15dk sonra incelendi. EVOS® FL Auto Imaging (AMF4300, Invitrogen) cihazında farklı beş bölge seçilerek x20 büyütmede görüntüler alındı. Elde edilen her fotoğraftaki hücreler Fiji, ImageJ 1.54 programında hücre sayımı yapıldı ve istatistiksel hesaplama ile analiz edildi (52).

3.2.7. İstatistiksel Analiz

En az üç kez tekrarlanan deneylerin sonuçları grup içi değerlendirmeler için “GraphPad Prism 9.5.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) programı kullanılarak” tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirildi. Tüm deneylerde KV ve MET’in etkileri, KV ve MET uygulaması yapılmamış kontroller ile karşılaştırılarak istatistik analize tabi tutuldu. $p < 0.01$ veya $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.2.8. Çalışmada Kullanılan Materyel ve Teçhizat

- ✓ Spektrofotometre+ Florometre (DENOVIK/ DS- 11FX)
- ✓ Laminar Flow Kabin (Metisafe)
- ✓ İnkübatör (DAIHAN/ IG-50)
- ✓ CO₂'li inkübatör (Phcbi)
- ✓ Countess II (Invitrogen)
- ✓ Iblot II (Invitrogen)
- ✓ Mikropipet seti (Gilson)
- ✓ iBind Flex (Invitrogen)
- ✓ iBRIGHT FL1000 (Invitrogen)
- ✓ Microplate reader (Allsheng AMR-100)
- ✓ (DAIHAN/ DuoFreez U500)
- ✓ Derin Dondurucu (-20oC)(BOSCH/ GSN36AI31)
- ✓ Hassas terazi, 0,1 mg hassasiyetli (SHIMADZU/ATX224,SEG)
- ✓ Derin Dondurucu (-80°C)
- ✓ Isıtıcı Blok (Stuart SBH130D)
- ✓ Vortex 4S (DAIHAN- Wisd/ VM-10)
- ✓ Masaüstü soğutmalı santrifüj
- ✓ Manyetik Karıştırıcı (Daihan Scientific)
- ✓ Distile Su Cihazı (Elga)
- ✓ Ultra Saf Su Sistemi (Elga)
- ✓ Buz makinesi (IMS-50)
- ✓ Çalkalamalı Su Banyosu (Daihan Scientific)
- ✓ Otoklav (ALP)
- ✓ Evos FL (Invitrogen)
- ✓ Marker Ladder, Invitrogen see Blue Plus2 Ref:LC5925

- ✓ THERMO NuPAGE™ 4 to 12%, BisTris, 1.0 mm, MiniProtein Gel, NW04120BOX
- ✓ ADV-K-12043-C20 PVDF Transfer Stacks

3.2.9. Çalışmadaki Kit ve Kimyasallar

- ✓ PPARA primer antikoru (PPAR α monoclonal mouse Antibody (H-2): sc-398394 Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- ✓ PPARG primer antikoru (PPAR γ monoclonal mouse Antibody (E-8): sc-7273 Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- ✓ HSD11B1 primer antikoru (11 β -HSD1 monoclonal mouse Antibody (D-5): sc-518168 Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- ✓ Beta aktin primer antikoru (β -Actin (8H10D10) Mouse mAb #3700)
- ✓ INSR primer antikoru (INSR Polyclonal Antibody, ABP54912, Abbkine, Atlanta 30303, Georgia, USA)
- ✓ PYGL primer antikoru (PYGL Polyclonal Antibody, E-AB-11510, Elabscience Biotechnology Inc.)
- ✓ GCK primer antikoru (GCK Polyclonal Antibody, E-AB-40270, Elabscience Biotechnology Inc.)
- ✓ FBP1 primer antikoru (FBP1 Polyclonal Antibody, E-AB-60949 Elabscience Biotechnology Inc.)
- ✓ Sekonder antikoru western blot (HRP Donkey anti-rabbit IgG (minimal x-reactivity) Antibody, Cat#:406401, BioLegend, Inc.)
- ✓ Sekonder antikoru western blot (HRP Goat anti-mouse IgG (minimal x-reactivity) Antibody, Cat#:405306, BioLegend, Inc.)
- ✓ Sekonder antikoru immüno Floresan, (Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 633, Cat#:A-21070, Thermo Fisher Scientific Inc.)
- ✓ LDS örnek tamponu, (B0007, Thermo Fisher Scientific)
- ✓ DAPI immüno Floresan nükleus boyama, Fluoroshield Mounting Medium With DAPI (Abcam, AB-104139)

- ✓ Sekonder antikor immünfloresan,(Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488, Cat#: A-11001, Thermo Fisher Scientific Inc.)
- ✓ Trisma Base, (T-1503-1kg, Sigma Aldrich Inc.)
- ✓ Antioksidan BT-005 Invitrogen,Thermo Fisher Scientific
- ✓ Proteaz Fosfataz İnhibitör Kokteyli (5872S, Cell Signaling Technology Inc.)
- ✓ Yürütme tamponu, (B0002,Thermo Fisher Scientific)
- ✓ LDS örnek tamponu, (B0007,Thermo Fisher Scientific)
- ✓ İndirgenme ajanı, (B0009,Thermo Fisher Scientific)
- ✓ Tween-20 (Sc-29113, Santa Cruz Inc.)
- ✓ Yağsız Süt Tozu (sc-2325, ChemCruz Inc.)
- ✓ WesternBright Sirius Kemilüminesans Görüntüleme Kiti (K-12043-D10, Advansta Inc.)
- ✓ Stripping Buffer (Tris-HCL (1M PH:6.8) 62,5 ml, SDS (%20) 100 ml, Beta mercaptoethanol 7 ml, dH2O 830,5 ml, Total Hacim 1000 ml)
- ✓ 10X TBST (pH:7.6) (Trisma Base (Tris) 24,2 gr, NaCl 80 gr, Tween 20 10 ml, Total Hacim 1000 ml)
- ✓ Lyzis Buffer (Tris-HCL (1M PH:6.8) 10 ml, 5 M NaCl 6 ml, Triton X-100 2 ml, dH2O 182 ml)
- ✓ Karvakrol (CAS:499-75-2, Sigma-Aldrich Inc.)
- ✓ Metformin (H10000691, HCL-Wanbury)
- ✓ DMEM (Gibco)
- ✓ Trypsin % 0.25 (Thermofisher)
- ✓ Penisilin (Wisent)
- ✓ PBS tablet
- ✓ FBS (Fetal Sığır Serumu) (Thermofisher)
- ✓ Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)

4. BULGULAR

4.1. *IN SILICO* HESAPLAMALAR

4.1.1. Yerleştirme Tabanlı Ters Sanal Tarama

Bu çalışmada, aromatik bitkilerden karvakrol adlı doğal bileşiğin anti-diyabetik olasılığı, diyabete bağlı ilaçlar ve proteinler hakkındaki bilgileri birleştiren DIA-DB (33) adlı bir keminformatik sunucusu ile incelenmiştir. Bu bilgi sayesinde, yaklaşımımız, *in silico* analizi ile KV'ye karşı 17 diyabet hedefinin yerleşik tabanlı bir taramasıdır. Her protein hedefi ile kristalize olduğu bulunan ligandlar, -7.9 ila -3.5 (kcal/mol) kenetlenme (docking) skoru arasındadır. Moleküler aktivitelere göre bu 17 hedef proteini üç grup altında topladık (bkz. Tablo 4.1). Yerleştirme hesaplama sonuçları, insülin sekresyonu ve duyarlılığının düzenlenmesinde FFAR1 (Serbest yağ asidi reseptörü 1), glikoz metabolizmasının düzenlenmesinde AKR1B1 (Aldoz redüktaz) ve lipid metabolizması, her grubun en yüksek hedef proteinleridir (bkz. Şekil 4.1-3). Bu sonuçlara göre, bu hedef proteinlerin bilinen ligandları, FDA onaylı, deneysel, faz ve klinik geliştirme çalışması gibi farklı statülerde mevcuttur (bkz. Tablo 4.2). Srivastava ve arkadaşları (53) Fasiglifam'ın veya FFAR1'in bir agonisti olan TAK-875'in FFAR1 ile ARG183, ARG258 ve TYR240 residüleri ile etkileşime girdiğini öne sürmüşlerdir. Şekil 4.1'de görülebileceği gibi, FFAR1 ve KV'nin ARG183 residüsü ile hidrofobik bir etkileşim vardır. Daha derin analiz için yörüngesel olarak bağlantı kurduğu residülerin analizi için MD simülasyonu önerilmektedir. Diyabetle ilişkili bir başka hedef protein olan glukokinaz, hücre içinde bir glikoz sensörü olarak hayati bir rol oynar. Önceki bir çalışmada Behera ve ark. (54) glukokinaz aktivatörlerinin glukokinaza bağlanma bölgelerinin VAL62, ARG63, SER64, TRP65, GLN68, SER69, GLN72, VAL91, MET210, ILE211, TYR214, TYR215, MET235, VAL452 ve V455 residülerinin olduğunu iddia etmiştir; ve bunlardan VAL62, ILE211, TYR214, VAL452 ve SER64 glukokinaz ile KV arasında yüksek afinite ile bağlanma bölgeleridir.

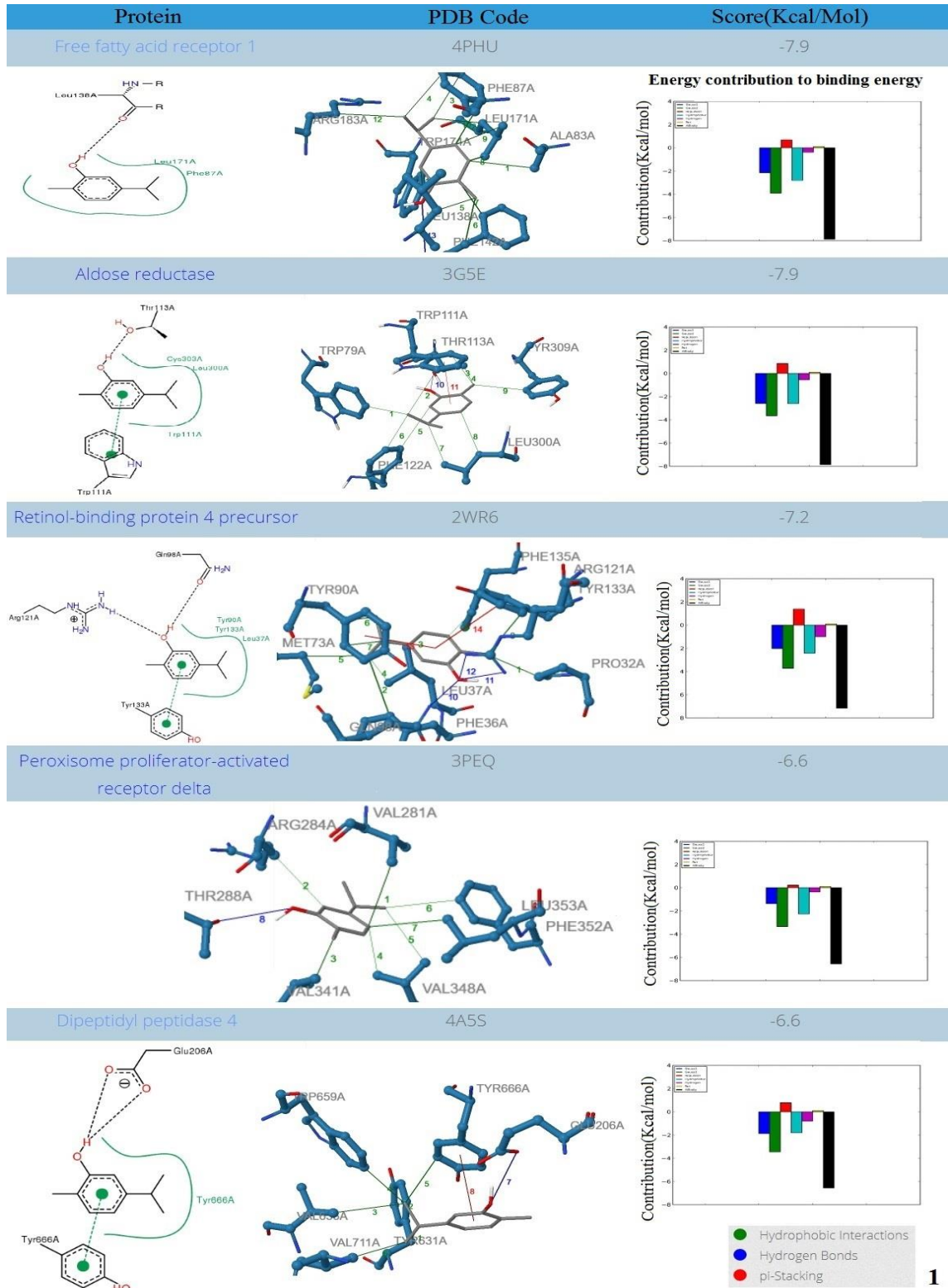
Örneğin dipeptidil peptidaz 4 (DPP4) için bilinen onaylanmış ligand sitagliptindir. Arulmozhiraja ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada olduğu gibi, Sitagliptin, Alogliptin, Teneligliptin ve Linagliptin gibi onaylı ligandlar DPP4'ü

GLU206, TRY666, TRY631, VAL656 ve TRP659 residülerinden elektrostatik ve van der Waals etkileşimleri ile bağlıdır (bkz. Şekil 4.1). Bu kalıntılardan, hidrojen bağıyla GLU206 'ya ve hidrofobik etkileşimler yoluyla TRY666 ya afinite göstermiştir (55). Ebdrup ve ark. tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışmada. hPPAR'ın (PPARD, PPARA, PPARG) hidrofobik kısmındaki kalıntıları temsil etmektedir, bunlar agonist raglitazar için ligand bağlanma bölgeleridir (56). Bu kalıntılardan KV, PPARA'nın MET220, MET320, VAL324 residüsü ile ve PPARG'nin ILE281, LEU356 ve PHE363 residüsüyle PPARD'ın VAL281, VAK341, VAL348, PHE352 residüsü ile hidrofobik bağlar oluşturmuştur (bkz. Şekil 4.1-3).

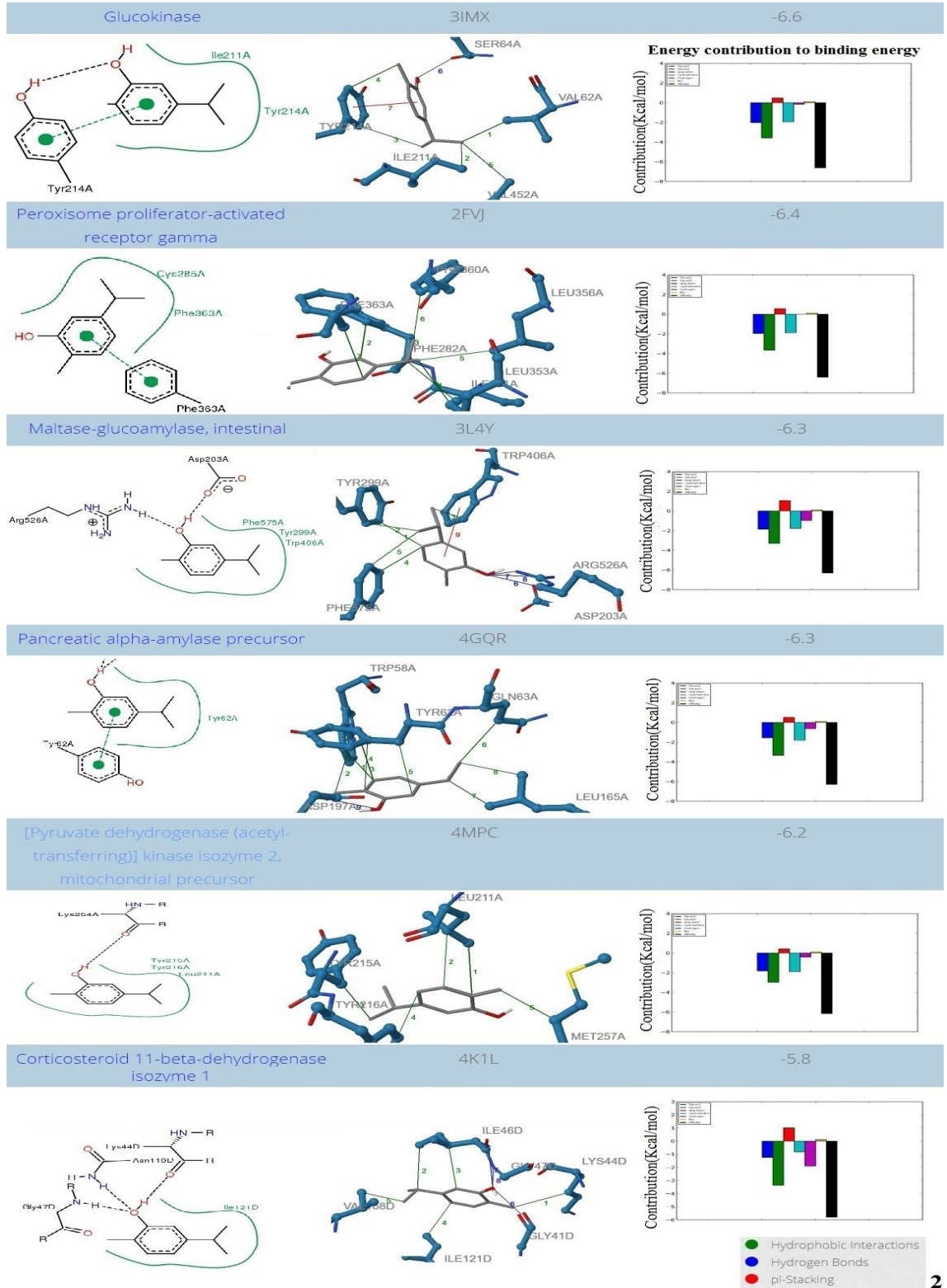
Doking tabanlı çıktılardan elde edilen hedef proteinlerin glikoz metabolizmasıyla ilgili referans Tablo 3.1'de listelenmiştir. Diyabet bozuklukları ile ilişkili hedef proteinleri doğrulamak ve belirlemek için, WebGestalt (36) web sunucusu aracılığıyla Fonksiyonel Veri Tabanı DisGeNET'i kullandık (39). Bu zenginleştirme sonuçları istatistiksel olarak Hiperglisemi, İnsülin direnci ve Diabetes mellitus-deneyisel ve Hipoglisemi ve Diabetes mellitus-insülin dışı bağımlılık (FDR-0,05) gibi bazı diyabetik semptomlara işaret etmektedir (bkz. Şekil 4.4). Hedef proteininin hangi yolağa entegre edildiği ile ilgili analiz sonuçları 17 proteinden 7'si istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($FDR \leq 0.05$) (Şekil 4.5). Bu proteinlerden GCK, hipoglisemi dışındaki tüm semptomlarla ilişkilidir; HSD11B1, Hiperglisemi, İnsülin direnci ve Diabetes mellitus-deneyisel semptomlarla ilişkilidir ve INSR tüm semptomlarla ilişkilidir. Ek olarak, PPARG, Hipoglisemi hariç tümü ile ilişkilidir ve PPARA, Hiperglisemi hariç tümü ile ilişkilidir. Bu proteinlerden FBP1 ve PYGL sadece Hipoglisemi semptomları ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 4.5 A). Yolak analizine göre, GCK geni hem apoptoz sinyallemede hem de gonadotropin salgılayan hormon reseptör yollarında aktifken, PPARG geni hem CCKR sinyallemede hem de gonadotropin salgılayan hormon reseptör yolunda aktiftir. Ayrıca INSR geni, İnsülin / IGF yolu-mitojenle aktive edilmiş protein kinaz / MAP kinaz kaskadında, İnsülin / IGF yolağı-protein kinaz B sinyalleme kaskadında ve PI3 kinaz ve gonadotropin salgılayan hormon reseptör yollarında işleve sahiptir. Ek olarak, PPARA ve PYGL genleri sırasıyla tek bir yolla, gonadotropin salgılayan hormon reseptör yolu ve Heterotrimerik G-protein sinyal yolu ile ilişkilidir (Şekil 4.5B). Gen önceliklendirmesi için protein listesi entegrasyonunun biyolojik ağ analizini temsil eden ve GeneMANIA'da (41) kaynak olarak Wu-stein ve ark. (57)' dan bazı ek gen fonksiyonunu tahmin eden Şekil

6'ya göre, genler, INSR, PYGL, ve GCK, PDK2 ve RBP4 karbonhidrat metabolizmasında merkezi rollere sahipken, PPARA, PPARD ve FBP1 dolaylı olarak karbonhidrat metabolizmasıyla, ancak çoğunlukla lipid metabolizmasıyla ilişkilidir (Şekil 4.6).



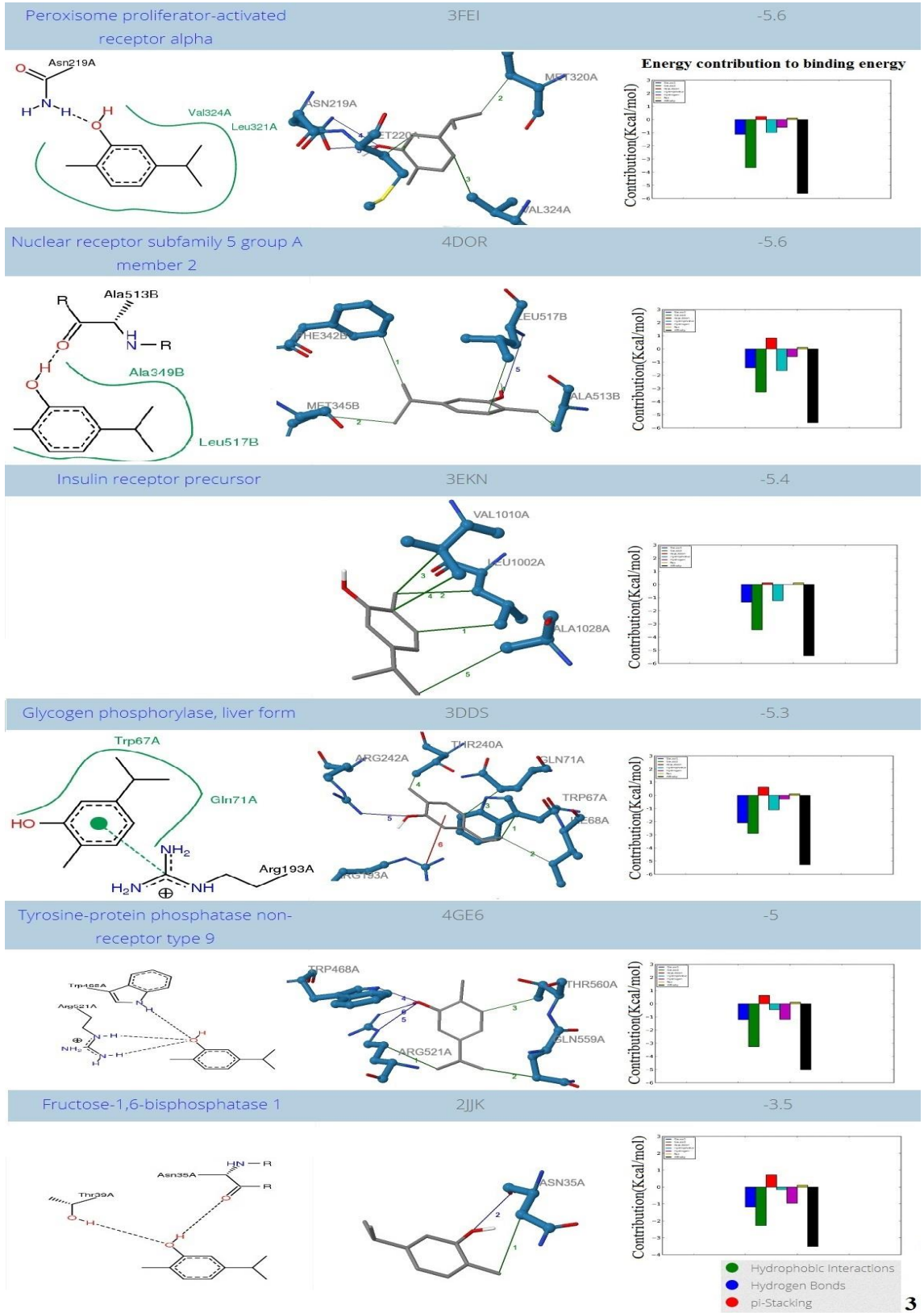


Şekil 4.1: Karvakol ve proteinlerin iki ve üç boyutlu temsili sunumu.



2

Şekil 4.2: Karvakrol ve proteinlerin iki ve üç boyutlu temsili sunumu.



3

Şekil 4.3: Karvakrol ve proteinlerin iki ve üç boyutlu temsili sunumu.

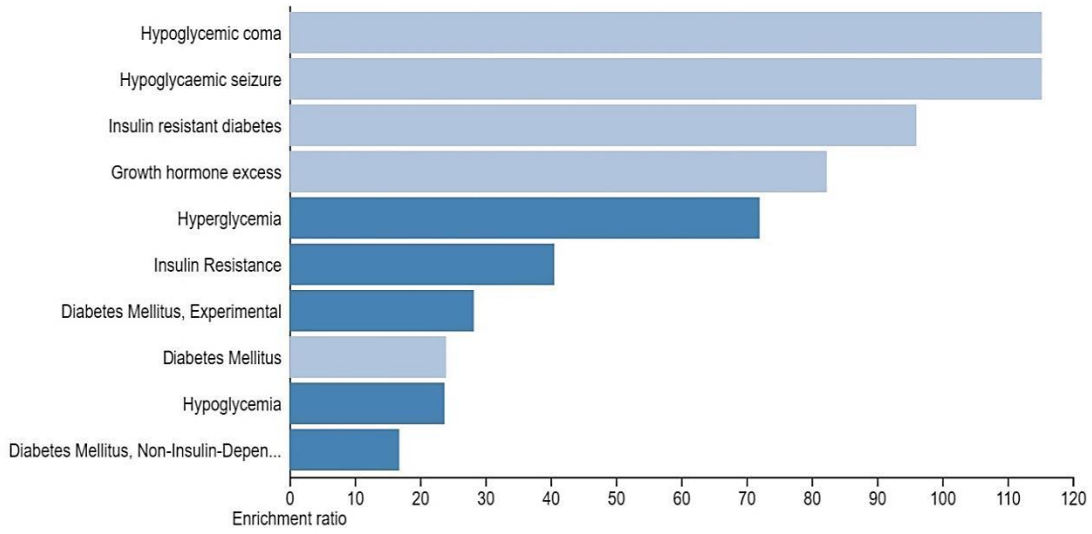
PoseView'un full-otomat analiziyle oluşturulmuştur (58). Kenetlenme KV pozlarının 17 hedef proteinin bağlanma bölgesine 3 boyutlu temsilleri PLIP (59) ile oluşturulmuştur. Bulunan kristalize ligand ve proteinlerin kalıntılarıyla (residü) etkileşen, hidrofobik etkileşim (yeşil), hidrojen (mavi) ve pi-istifleme (kırmızı) olmak üzere bazı bağlarla gösterilmektedir. Bağlanma enerjisine enerjik katkıların grafiğindeki bir ligand afinitesi, siyah çubukla gösterilmiştir.

Tablo 4.1: DIA-DB web sunucusunun hesaplanmasıyla protein hedefli ligandlar için elde edilen en düşük yerleştirme skorları

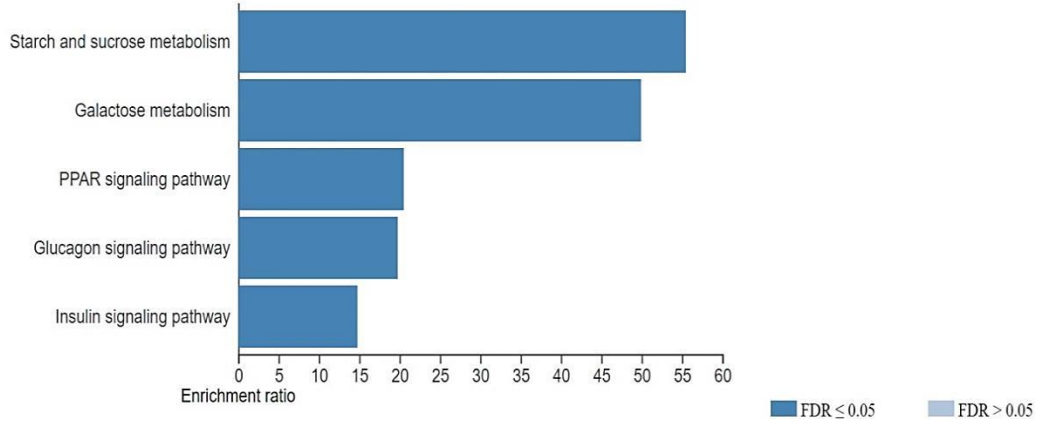
Etki modu	Hedef gen	Moleküler Fonksiyon	Ligand–Docking Skor (kcal/mol)
Lipid metabolizma regülasyonu	PPARD	Yağ asidi katabolizmasıyla ilişkili gen ifadelerinin düzenlenmesi	-6.6
	PPARG	Lipid metabolizmasının düzenlenmesi (trigliseritlerin lipolizi ve triaçilgliserol metabolizması) ilişkili gen ekspresyonları	-6.4
	PPARA	Lipoprotein birleşiminin düzenlenmesi, lipid taşınması ve yağ asitleri ile ilişkili gen ekspresyonlarının oksidasyonu	-5.8
	NR5A2	Safra asidi sentezi, kolesterol sentezi ve steroidogenez ile ilişkili gen ekspresyon düzenlemesi	-5.6
	FBP1	Glukoneojenezde fruktoz 1,6-bifosfatın fruktoz 6-fosfata hidrolizi	-3.5
İnsülin hassasiyeti ve salgılanması regülasyonu	FFAR1	Serbest yağ asitlerinin reseptöre bağlanması yoluyla artan glukoz ile uyarılan insülin sekresyonu	-7.9
	RBP4	Adipokin olarak salgılanarak uyarılmış glukoneogenez ve azalmış insülin sinyali	-7.2
	DPP4	Pankreas beta hücrelerinden insülin salgılanmasını tetikleyen glukagon benzeri peptid-1'in bozunması yoluyla inhibisyon	-6.6
	HSD11B1	İnaktif glukokortikoid öncüllerini aktif olanlarla kaplayarak düzenleme	-5.9
	INSR	Glikoz metabolizması protein sentezinin düzenlenmesi	-5.4
	PTPN9	İnsülin reseptör defosforilasyonu ile insülin duyarlılığının en aza indirilmesi	-5
Glukoz metabolizma regülasyonu	AKR1B1	Poliol yolunda glikozun sorbitole indirgenmesinin düzenlenmesi	-7.2
	GCK	Glikoliz için glukozun glukoz-6-fosfata dönüşümünün düzenlenmesi	-6.6
	AMY2A	Nişastanın glikoza sindirilmesi yoluyla alfa-1,4-glikosidik bağların hidrolizi	-6.3
	MGAM	Nişastanın glikoza sindirilmesi yoluyla alfa-1,4-glikosidik bağların hidrolizi	-6.2
	PDK2	Glikoz oksidasyonu için gerekli olan piruvat dehidrojenazın inaktivasyonu	-6.2
	PYGL	Glikojenolizde glikojenin glukoz-1-fosfata fosforilasyonu	-5.3

Tablo 4.2: Bir farmasötik veritabanı olan DRUGBANK (60) ' tan 17 hedef protein için bilinen ligandlar.

Hedef protein	İlaç ismi	Seviye
Free fatty acid receptor 1	Fasiglifam	Onaylandı
	Glucose-dependent insulin secretagogues	Klinik gelişim
Aldose reductase	Q74	Deneyssel
Retinol-binding protein 4 precursor	linolenic acid	Deneyssel
Peroxisome proliferator-activated receptor delta	3EQ	Aşama II
Dipeptidyl peptidase 4	Sitagliptin, Alogliptin, Teneligliptin, Linagliptin	Onaylandı
Glucokinase	AMG-151	Faz III
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Pioglitazone, Glipizide, Repaglinide, Mitiglinide, Telmisartan, Nateglinide, Muraglitazar, Saroglitazar	Onaylandı
	4-oxodocosahexaenoic acid, Amorfrutin B, Amorfrutin 1	Aşama I
	Ionomycin, 4HD, Amorfrutin 2, INT-131	Aşama II
Pancreatic alpha-amylase precursor	Beta-acarbose	Onaylandı
	Ethyl-cafeate	Faz I
Maltase-glucoamylase, intestinal	Voglibose, Beta-acarbose, Miglitol	Onaylandı
[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 2, mitochondrial precursor	PFT, PV1, PV2, PV8	Deneyssel
Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	SFF	Deneyssel
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	Reglitazar	Klinik denemeler
	Aleglitazar	Faz III
Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2	Diundecyl phosphatidyl choline	Deneyssel
Insulin receptor precursor	Insulin porcine, Insulin Detemir, Insulin Lispro, Insulin Regular, Insulin Aspart, Insulin Glulisine, Inhaled insulin	Onaylandı
Glycogen phosphorylase, liver form	25D	Aşama II
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 9	75A	Aşama II
Fructose-1,6-bisphosphatase 1	RO3, RO5, FBPase-1 Inhibitor, A74, AC100V3G, ROK	Aşama II



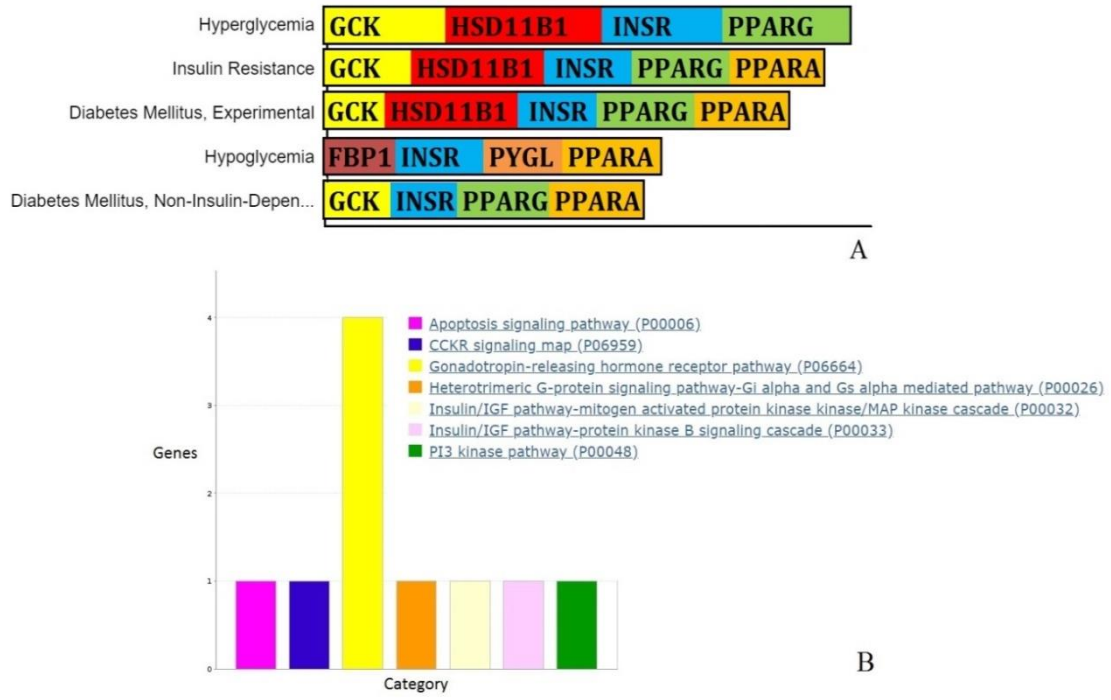
A



B

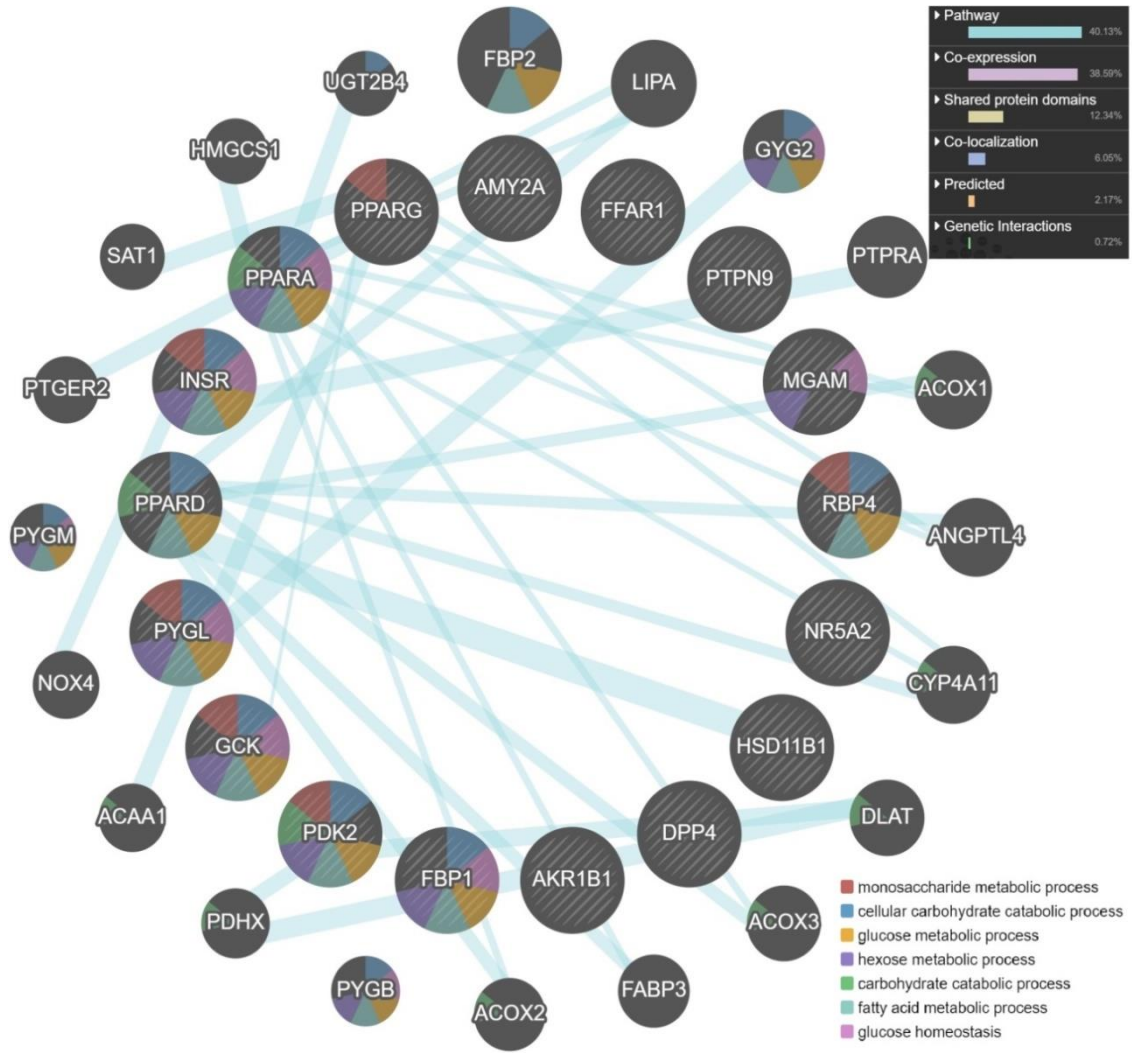
Şekil 4.4: WebGestalt sonuçlarının grafikleri

A) WebGestalt sonuçlarına göre DisGeNET veritabanından diyabet ile ilişkili 17 hedef genin çubuk grafiği. Hiperglisemi (FDR: 0.00034259), İnsülin direnci (FDR: 0.00028878), Diabetes mellitus-Deneysel (FDR: 0.00059891), Hipoglisemi (FDR: 0.015500) Diabetes mellitus, insüline bağımlı olmayan (FDR: 0.048348). B) WebGestalt'a (FDR≤0.05) göre yolak (KEGG, Panther) analizi ile ilgili 17 hedef proteinden oluşan bir çubuk grafik. Nişasta ve sükröz metabolizması (AMY2A, GCK, MGAM, PYGL) (FDR: 0.00025752), Galaktoz metabolizması (AKR1B1, GCK, MGAM) (FDR: 0.0055103), PPAR sinyal yolu (PPARA, PPARG, PPARD) (FDR: 0.0055103), Glukagon sinyal yolu (FBP1, GCK, PPARA, PYGL) (FDR: 0.0055103), İnsülin sinyal yolu (FBP1, GCK, INSR, PYGL) (FDR: 0.012866).



Şekil 4.5: In silico sonucu hedeflenen genler.

A) Grafik, 17 hedef genden hangi genlerin en iyi 5 diyabetik semptomda yer aldığına dair bir görünümü temsil ediyor. B) Çubuk grafik, Panther'e göre yollarla GCK, HSD11B1, INSR, PPARG, PPARA, FBP1 ve PYGL gen ilişkilerine genel bir bakış.

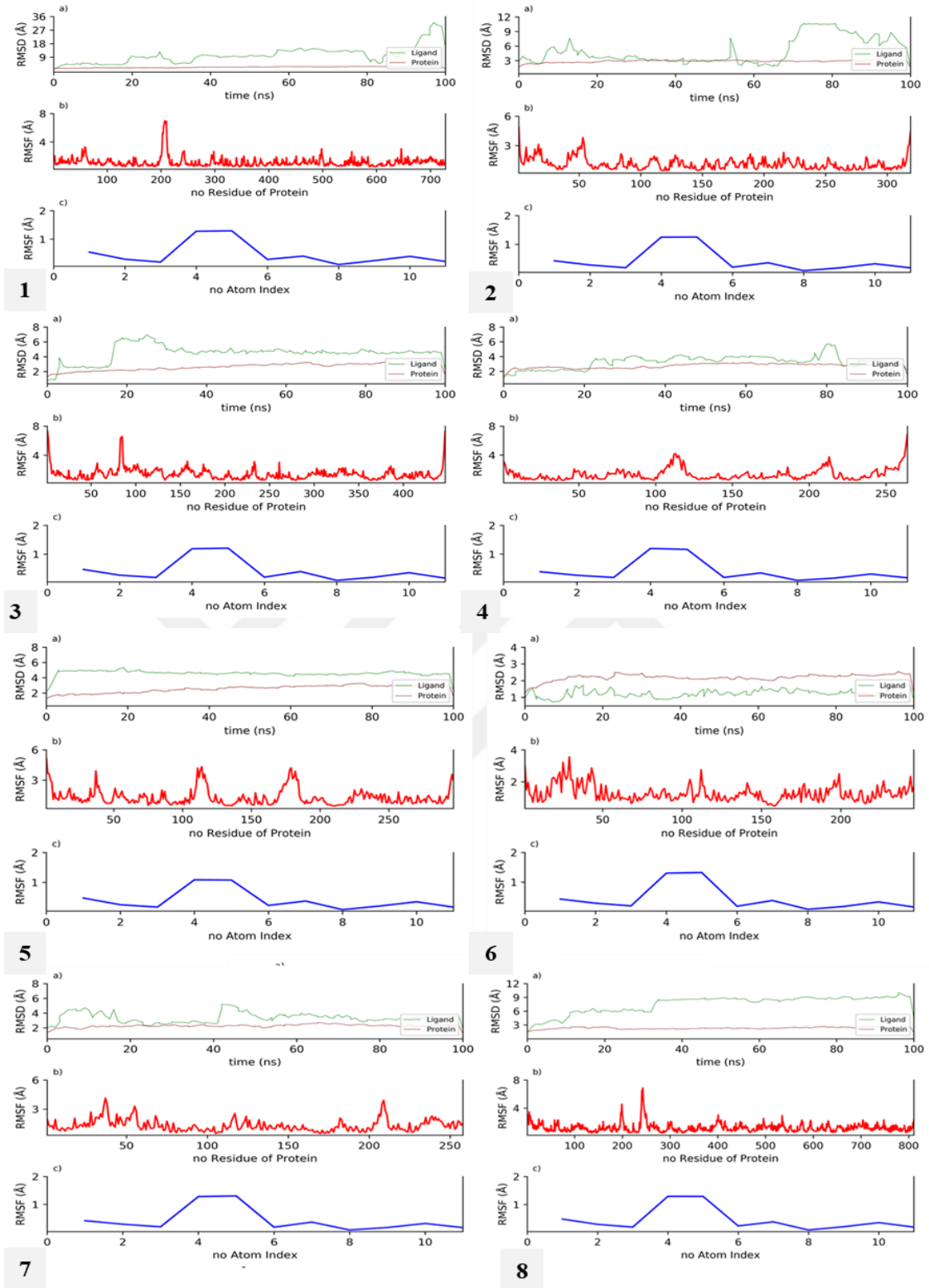


Şekil 4.6: GenMANIA aracından elde edilen görsel.

GeneMANIA, hedef proteinlerin çok sayıda genomik ve proteomik verilerini kullanarak işlevsel olarak benzer genler buldu. İstatistiksel olarak 17 protein gen adının sorgulanmasına göre yolak analizi % 40.13 ve birlikte ifade oranı % 38.59'dur. Düğümler(nodes) arasındaki çizgiler bir yolak ilişkisini gösterir. Ağın iç yuvarlak sıradaki düğümler(nodes) hedef proteinlerdir. Ağın dışında bulunan bazı düğümler, aynı yoldaki bazı hedef proteinlerle etkileşimle temsil edilir. Kenarların düğüm noktaları arası boyutları istatistiksel değere göre farklı kalınlıklardadır.

4.1.2. MD Simülasyonu

DPP4, FBP1, GCK ve HSD11B1, INSR, PPARG ve PYGL genlerinin proteinleri moleküler kenetleme, ters sanal tarama, aşırı temsil analizi gibi *in silico* metodların sonucu MD işlemine tabi tutuldu.



Şekil 4.7: Desmond ile moleküler dinamik simülasyon ile ilgili grafikler.

100 ns periyodunda protein-ligand RMSD ve RMSF grafikleri değerlendirildi. 1: DPP4 ve karvakrol, 2: FBP1 ve karvakrol, 3: GCK ve karvakrol, 4: HSD11B1 ve karvakrol, 5: INSR ve karvakrol, 6: PPARA ve karvakrol, 7: PPARG ve karvakrol, 8: PYGL ve karvakrol (RMSD: ortalama kök kare sapma; RMSF: kök ortalama kare dalgalanma). a) Her proteinin RMSD grafiği b) Her protein için Protein RMSF grafiği c) Ligand-karvakrol'un RMSF grafiği

Çalışmamızda, aday diyabetik hedef proteinlerin ve KV 'nin doking kompleksleri ortalama kare sapması (RMSD) ve ortalama kare dalgalanması (RMSF) moleküler dinamik simülasyon aracılığıyla değerlendirilmiştir.

Protein RMSD (kırmızı çizgi) (Şekil 4.7'deki Bölüm a), belirli çerçeve için bir atom seçiminin yer değiştirmesindeki ortalama değişikliği bir referans çerçevesiyle karşılaştırarak ölçer. RMSD aynı zamanda simülasyon dengesinin ölçümüdür. Küresel ve küçük proteinler için 1-3 Å aralığındaki değişiklikler tamamen kabul edilebilir. Protein ve bağlayıcı cebi ile ilgili ligandın stabilitesi, Ligand RMSD (yeşil çizgi) tarafından belirlenir. (Şekil 4.7'deki Bölüm a). Eğer ligandın RMSD'si > proteinin RMSD'si ise, ligand muhtemelen ilk bağlanma bölgesinden uzaklaşmıştır.

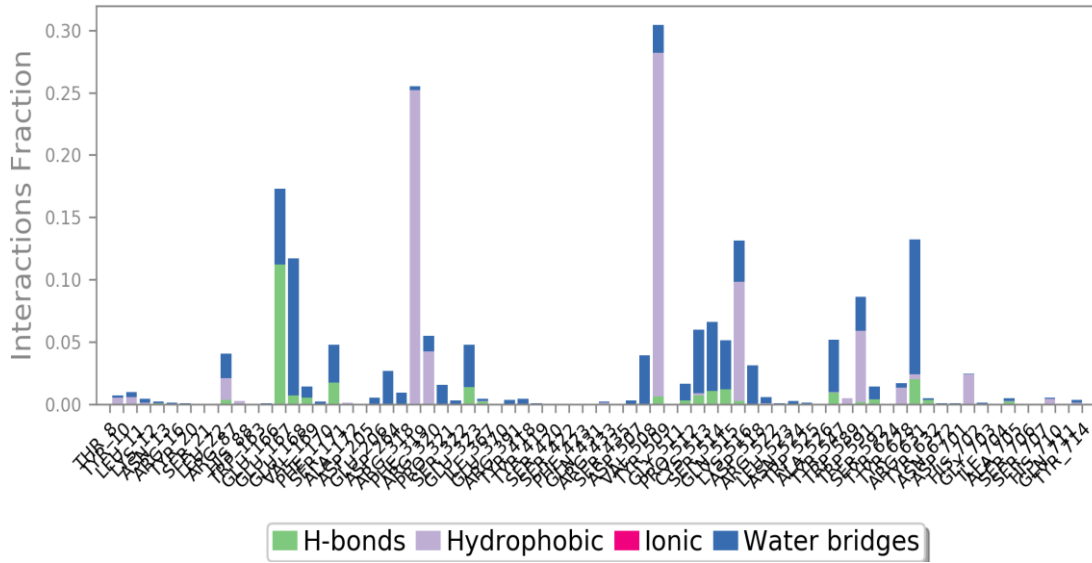
En yüksek doking skorlu protein-ligand komplekslerinin RMSD'si, hedef proteinler ve KV ile etkileşimin stabilitesini belirleyen simülasyon boyunca tutarlı olduğunu sergilemiştir. Hedef proteinlere sahip her bir ligand, birkaç ns'de dengeye ulaşmış ve simülasyon süresi boyunca 100 ns'ye kadar stabil kalmıştır. Başlangıçta, yerleştirme kompleksleri için RMSD grafiği de birkaç ns'de dengeye ulaşmış ve simülasyon boyunca sürekli stabil kalmıştır. Her ne kadar bazı sapmalar izlenmiş olsa da, analizimizde 1-3 Å mertebesinde daha büyük kaymalar görülmemiştir (Şekil 4.7 Bölüm a).

RMSF analizi kullanılarak, protein zinciri boyunca lokal değişiklikler karakterize edilebilir. Simülasyon sırasında proteinin en çok dalgalanan kısımları tepe noktaları olarak gözlemlenebilir. (Şekil 4.7'deki Bölüm b ve c). Proteinlerin farklı bölümlerinin esnekliği, residülerin her biri için RMSF ile gösterilmiştir. b ve c bölümlerinde RMSF analizi, proteinlerin residü ve KV'nin atomik hareketi, ilmek bölgesinde yaklaşık 2-3.5 Å dalgalanmaları ve C-terminalinde daha yüksek dalgalanmalar sergileyen tüm ligandlar için benzer modeller göstermiştir.

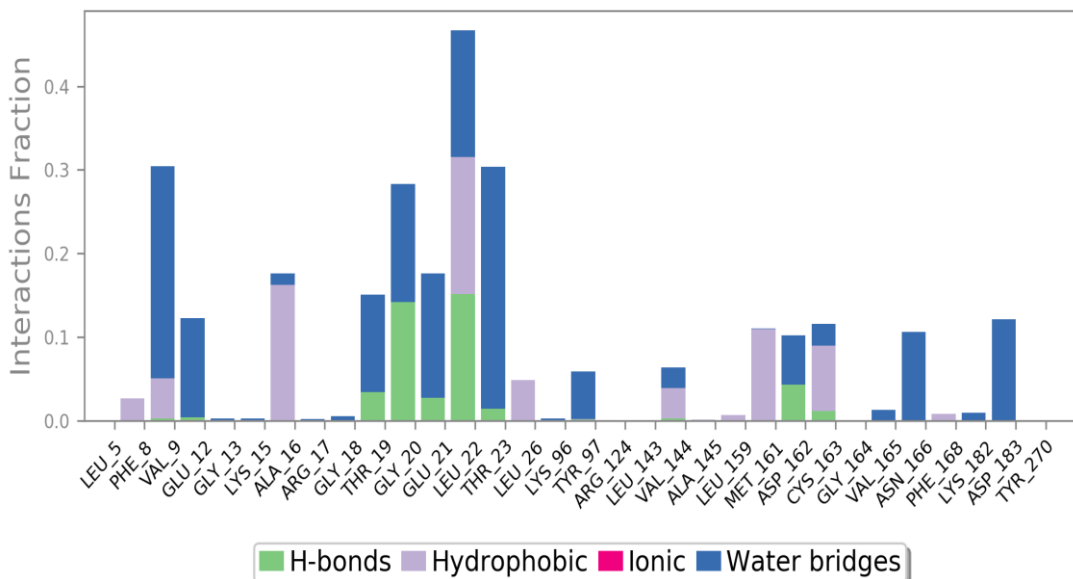
Ek olarak, KV ile protein etkileşimleri simülasyon boyunca atomik seviyede izlendi. Protein-ligand etkileşimleri hidrojen bağları, iyonik bağ, su Köprüleri ve hidrofobik etkileşimler olarak sınıflandırıldı. Her etkileşim modeli, simülasyon etkileşimleri diyagramı paneli aracılığıyla analiz edilebilen daha spesifik alt türleri içermektedir. Etkileşimler, ligand bağlanmasında önemli roller oynayan H bağları bakımından zengindir. Protein kalıntıları ile detaylı ligand atom temaslarının diyagramında, seçilen yörüngede (0 ile 100 ns) simülasyon süresinin % 30'unu

kapsayan etkileşimler gözlemledik. Elbette bu sonuçların güvenilirliği, *in vitro* ve *in vivo* deneyler ile nihayi konfirmasyonu sonucu daha anlamlı hale gelecektir.

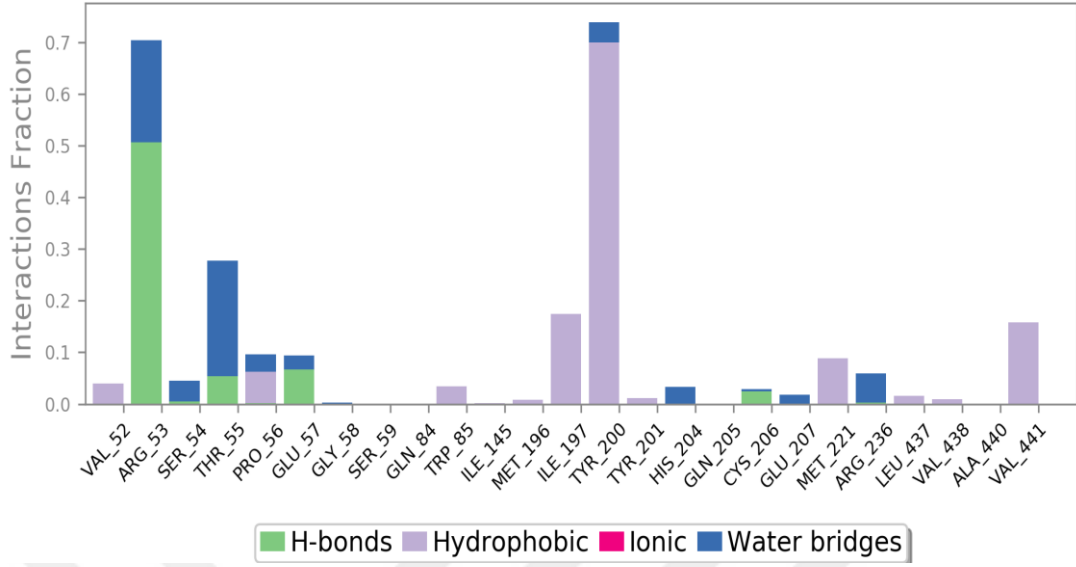
Buradaki analizin asıl amacı hedef proteinlerimizi ve etken maddemizin kimyasal yapısının incelenmesi ve *in vitro*, *in vivo* işlem basamaklarında bir yol gösterici olmasıyla zaman ve bütçe tasarrufu sağlamasıdır. Buna ilaveten *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile ulaşamayacağımız atomik seviyedeki detaylara ulaşmaktır.



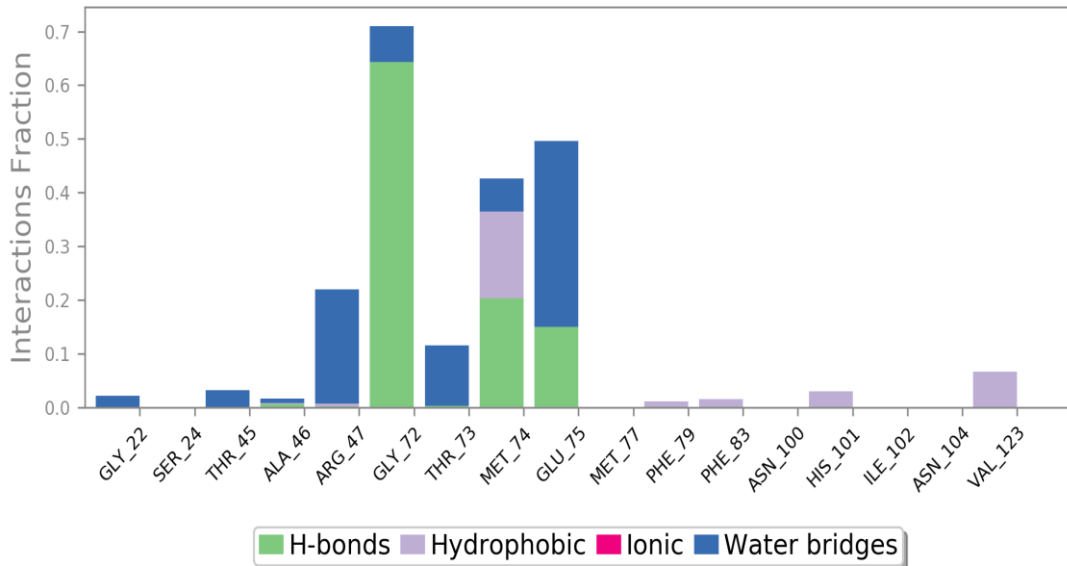
Şekil 4.8: DDP4' ün karvakrol ile etkileşime girdiği residü ve non kovalent bağ tipleri



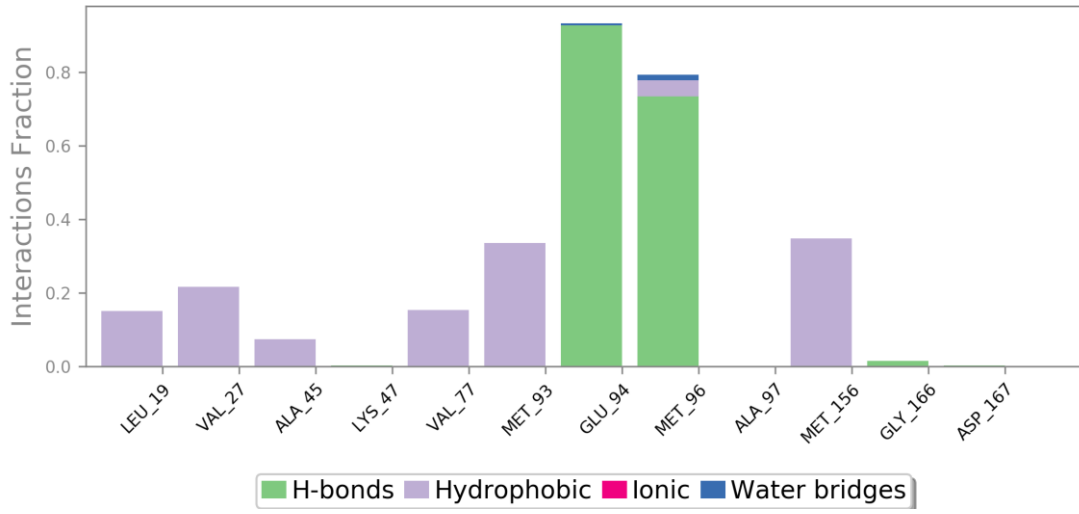
Şekil 4.9: FBP1 'in karvakrol ile etkileşime girdiği residü ve non kovalent bağ tipleri



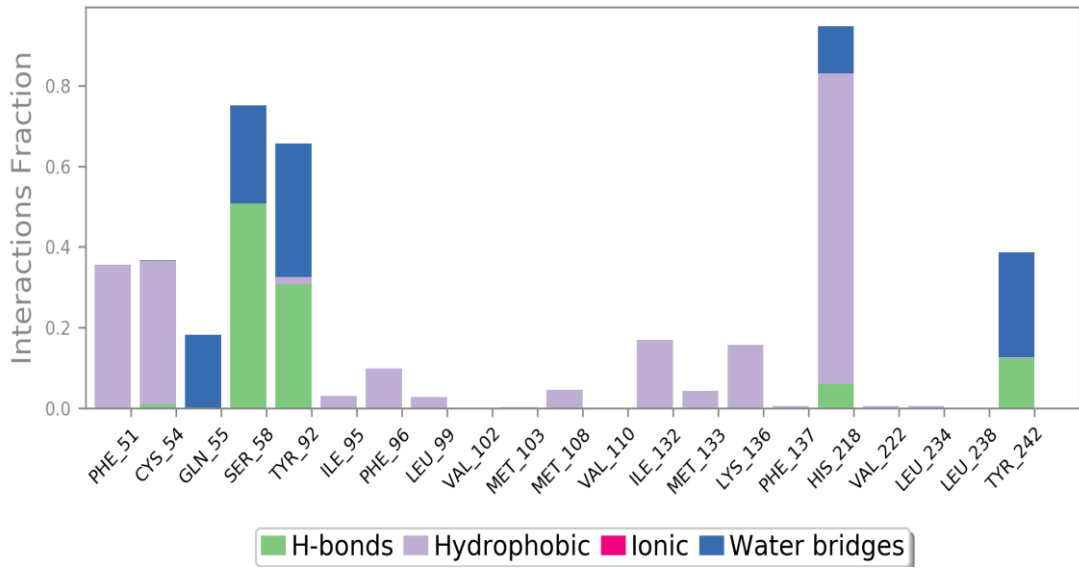
Şekil 4.10: GCK ‘nın karvakrol ile etkileşime girdiği residü ve non kovalent bağ tipleri



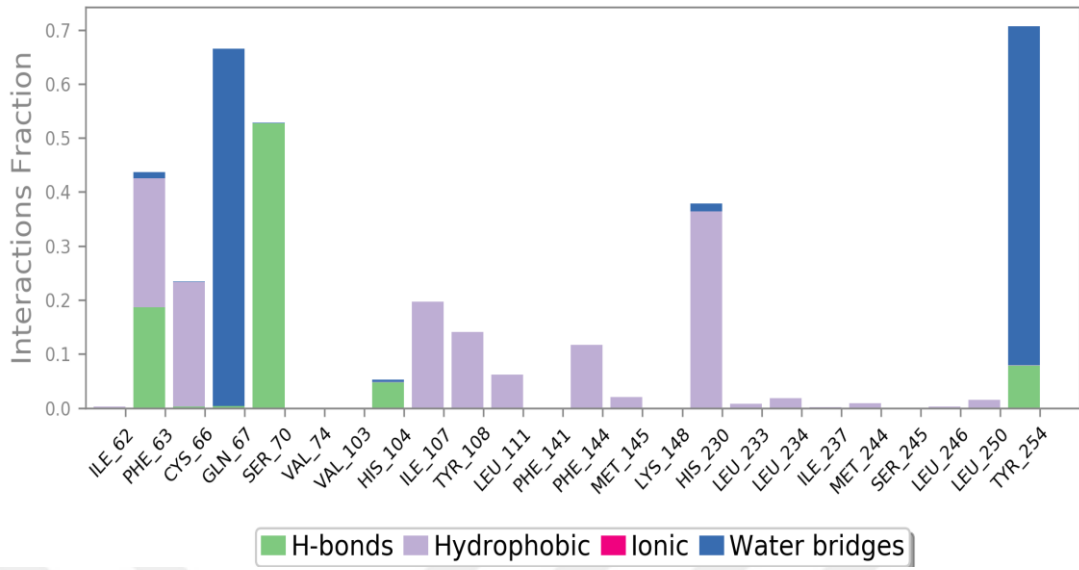
Şekil 4.11: HSD11B1’ in karvakrol ile etkileşime girdiği residü ve non kovalent bağ tipleri



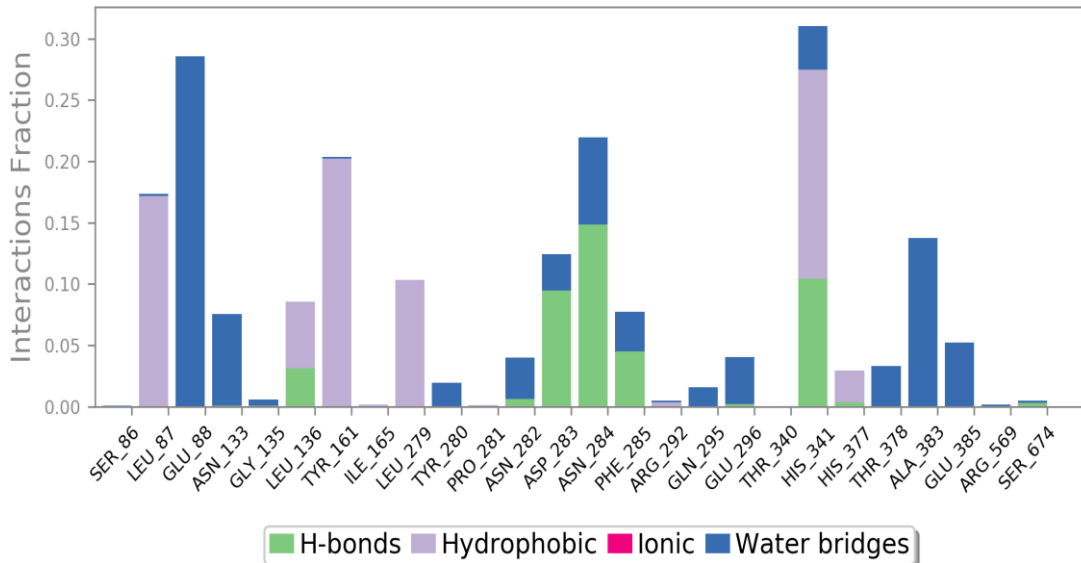
Şekil 4.12: INSR ‘nin karvakrol ile etkileşime girdiği residü ve non kovalent bağ tipleri.



Şekil 4.13: PPARA ‘nın karvakrol ile etkileşime girdiği residü ve non kovalent bağ tipleri.



Şekil 4.14: PPARG ‘nin karvakrol ile etkileşime girdiği residü ve non kovalent bağ tipleri



Şekil 4.15: PYGL ‘nin karvakrol ile etkileşime girdiği residü ve non kovalent bağ tipleri

Ligand ile protein etkileşimleri simülasyon boyunca izlendi. Bu etkileşimler, türe göre kategorize edilebilir ve yukarıdaki grafiklerde gösterildiği gibi özetlenebilir (bkz. Şekil 4.8-15). Protein-ligand etkileşimler dört türde sınıflandırılabilir: Su Köprüleri, Hidrofobik, İyonik ve Hidrojen Bağları. Bu bağlardan Hidrojen bağları (H-bağları) ligand bağlanmasında önemli bir rol oynar. İlaç tasarımı hidrojen bağlama özelliklerinin dikkate alınması, ilaç özgüllüğü, metabolizasyon ve adsorpsiyon

üzerindeki güçlü etkileri nedeniyle önemlidir. Bir protein ve bir ligand arasındaki hidrojen bağları ayrıca dört alt tipe ayrılabilir: omurga alıcısı; omurga donörü; yan zincir alıcısı; yan zincir bağışçısı gibi. Protein-ligand H-bağı için mevcut geometrik kriter şudur: verici ve alıcı atomlar ($D-H\cdots A$) arasında 2,5 Å'lık bir mesafe; verici-hidrojen alıcı atomlar arasında 120°'lik bir verici açısı ($D-H\cdots A$); ve hidrojen-alıcı-bağlı atom atomları ($H\cdots A-X$) arasında 90°'lik bir alıcı açısıdır. Her etkileşim türü, 'Simülasyon Etkileşimleri Şeması' paneli aracılığıyla keşfedilebilecek daha spesifik alt türler içerebilmektedir. Şekil 4.8-15'deki çubuk grafikler, yörünge boyunca normalleştirilir: örneğin, 0,7 değeri, simülasyon süresinin %70'inde belirli etkileşimin korunduğunu gösterir. 1.0'ın üzerindeki değerler mümkündür, çünkü bazı protein kalıntıları ligand ile aynı alt tipte çoklu temaslar yapabilir.

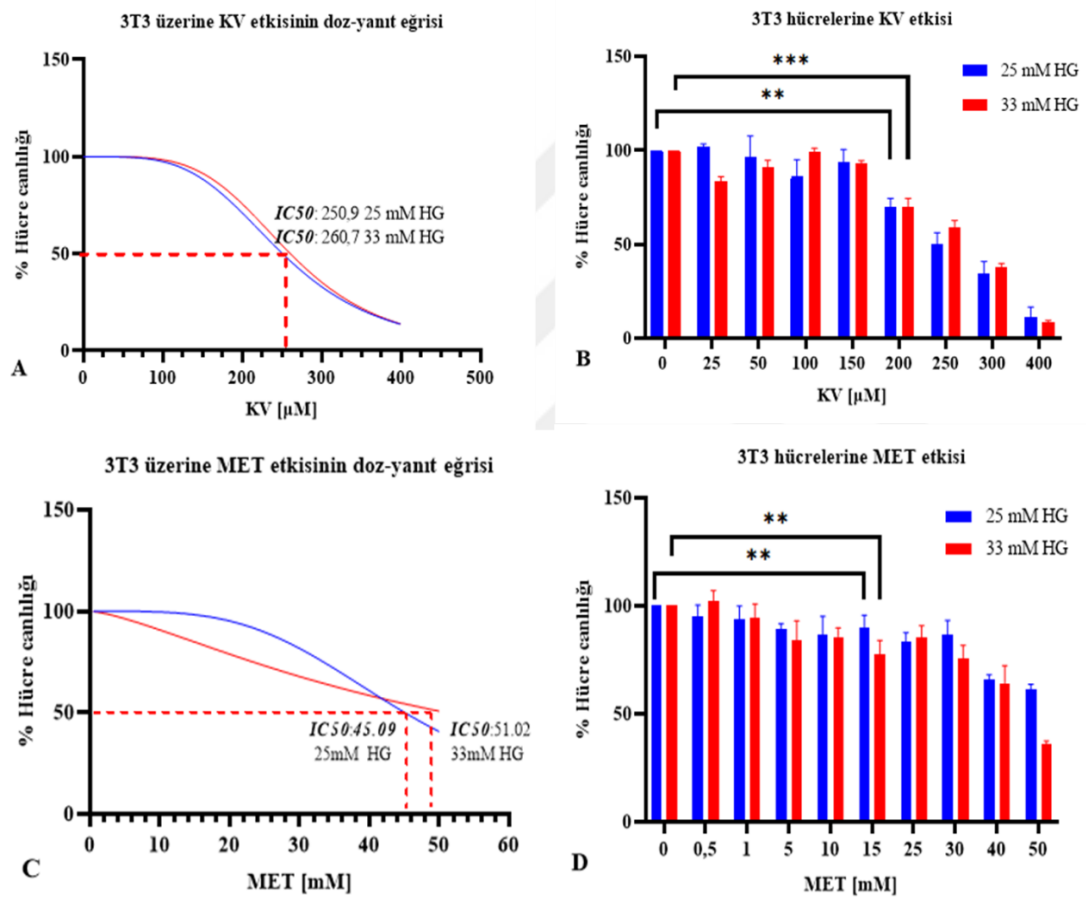
Bazı kalıntılar (residue) aynı ligand atomu ile tek tipte çoklu etkileşimlere sahip olabileceğinden, >%100 ile etkileşimlere sahip olmak mümkündür. Buna göre, DPP4 proteininde simülasyon boyunca GLU_166 ve GLU_167 residüsü, FBP1 proteininde LEU_22, GCK proteininde TYR_200, ARG_53, HSD11B1 proteininde ise GLY_72 residüsü, INSR proteininde GLU_94 ve MET_96 residüsü, PPARA proteininde SER_58 ve HIS_218, PPARG proteininde ILE_62, SER67 ve TYR_254, PYGL proteininde ise ASN_282, ASP_283 ve THR_340 residüsü en fazla karvakrol güçlü bağ kuran residülerdir.

4.2. IN VITRO ARAŞTIRMALAR

4.2.1. Sitotoksikite Testi (MTT)

24 saat sonra, 3T3'te karvakrolün ve metforminin MTT testi sonuçları (bkz. Şekil 4.16-17). Şekil 4.16, B'de, tek yönlü ANOVA ve Tukeys çoklu karşılaştırmalarının kullanılmasıyla istatistiksel analiz, ortalama hücre canlılığının artan KV konsantrasyonu boyunca önemli ölçüde farklı olduğunu ortaya çıkardı ($p < 0,0001$, ***, $p < 0,0046$, **). Aynı şekilde, Şekil 4.16 D'de ise tek yönlü ANOVA ve Tukeys çoklu karşılaştırmalarının kullanılmasıyla yapılan istatistiksel analizde, artan MET konsantrasyonu boyunca ortalama hücre canlılığının önemli ölçüde farklı olduğunu ortaya çıkardı ($p < 0,0078$, **).

Toksisite oluşturmayacak optimum dozları belirlemek için IC50 (hücrelerin yarısını öldüren konsantrasyon) değeri tespit edildi (bkz. Tablo 4.3). IC50'nin altındaki istatistiksel olarak anlamlı olan KV için 200 μ M, MET için 15 mM dozlar, süre için ise 24 saat seçildi (Şekil 4.16 A-D). Seçilen bu dozların kombine etkisi de değerlendirildi ve hücre canlılığı %50 nin üstünde olduğu için sitotoksik olmadıkları tespit edildi (Şekil 4.17). Buna göre WB ve IF metodunda efektif doz olarak deney grupları; 200 μ M KV, 15 mM MET ve bu iki grubun kombinasyonu olan 200 μ M KV ve 15 mM MET grubu seçilmiştir.

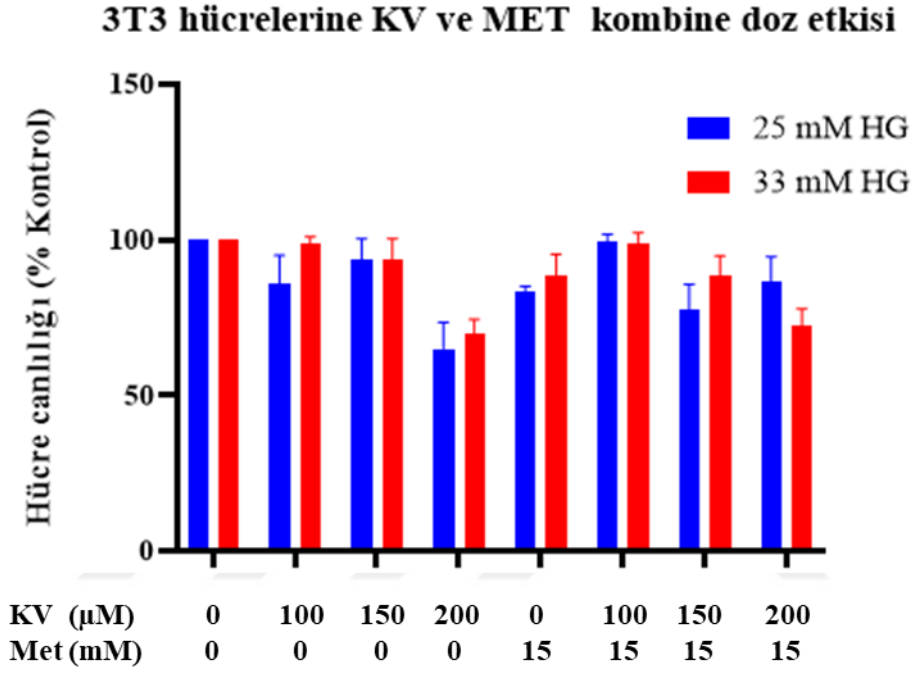


Şekil 4.16: MTT grafikleri.

A. 3T3-L1'de karvakrol etkisi için doz-yanıt eğrisi. B. 3T3-L1 hücrelerinde karvakrol için hesaplanan IC50 değeri, 25 mM HG için 250,9 μ M (%95 IC: 235,7 ile 267,0 μ M), 33 mM HG için 260,7 μ M (%95 IC: 247,3 ile 274,7 μ M)'dir. C. 3T3-L1 'de metformin etkisi için doz-yanıt eğrisi. D. 3T3-L1 hücrelerinde metformin için hesaplanan IC50 değeri, 25 mM HG için 45,09 mM (%95 IC: 41,98 ile 50,41 mM), 33 mM HG için 51,02 mM (%95 IC: 41,37 ile 81,88 mM)'dir. HG;Yüksek glikoz

Tablo 4. 3: 3T3-hücre hattında 24 saat sonra karvakrol ve metforminin IC50 değerleri

Glikoz durumu	IC50 değerleri	
	Karvakrol (μM)	Metformin (mM)
25 mM	250,9 $\pm$ 25	45,09 $\pm$ 28
33 mM	260,7 $\pm$ 25	51,02 $\pm$ 28



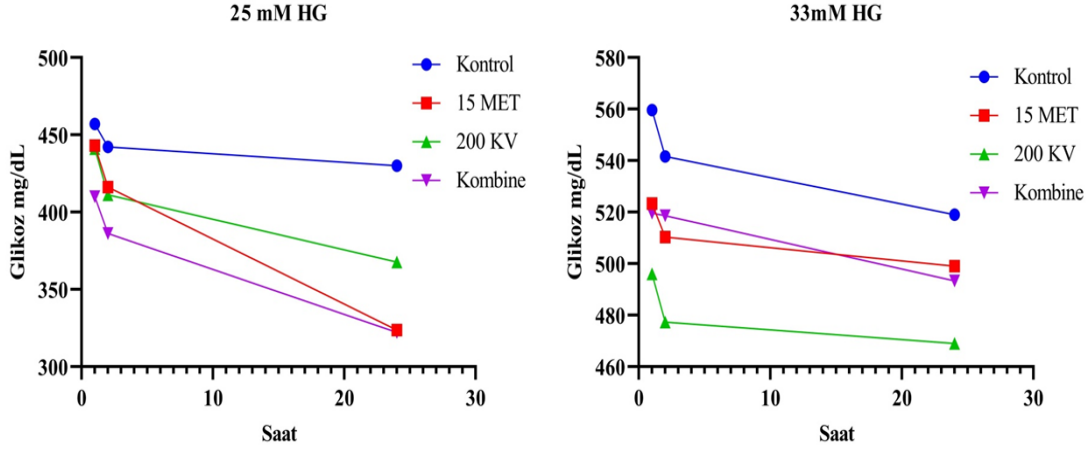
Şekil 4.17: 3T3 hücrelerinde metformin ve karvakrol dozlarınına göre hesaplanan hücre canlılığı yüzdeleri. HG;Yüksek glikoz

Tablo 4.4: MTT % canlılık değeri

Glikoz(mM)	% Ortalama hücre canlılığı değerleri		Ortalama	Standart sapma (SS)	%SS
	Şekil 4.16 D. (15mM MET)	Şekil 4.17 (0 μM ve 15mM)			
25 HG	90,10728979	83,53994	86,82362	4,643816	5,348563
33 HG	77,72497391	88,67654	83,20076	7,743925	9,307518

4.2.2. Glikoz Ölçümü

In vitro diyabetik 3T3-L1 hücrelerindeki KV ve MET doz uygulaması sonrası medyundan glikoz konsantrasyonu ölçümü yapılarak deney gruplarından zaman bağlı glikoz seviyeleri elde edilerek aşağıdaki grafik elde edilmiştir.



Şekil 4.18: 3T3 hücre besiyerinde zamana bağlı glikoz değişimi

4.2.3. Western Blot Sonuçları

In vitro diyabetik 3T3-L1 hücrelerinde KV ve MET deney gruplarındaki protein seviyelerinin western blot membran görüntüleri ve istatistik grafikleri Şekil 4.19’da sunulmuştur. Western blot analizi yapılan proteinlerin bant yoğunlukları ImageJ programı kullanılarak elde edilmiştir. Proteinlerin bant yoğunluk değerleri β -aktinin bant yoğunluklarına oranlanarak, elde edilen oransal değerlerden GraphPad Prism 9.5.1 programında one-way ANOVA ve Tukeys çoklu karşılaştırma test ile kontrol grubu deney gruplarıyla karşılaştırılarak istatistiksel analiz yapılmıştır (bkz. Şekil 4.19).

Şekil 4.19’ da görüldüğü gibi;

Fruktoz-bifosfataz-1 (FBP1) proteinin ekspresyon analizinde; 15 mM MET ve 200 μ M KV olan gruplar kontrol (0 mM MET ve 0 μ M KV) grubuyla ile kıyaslandığında istatistiksel olarak artış gözlemlenmiştir ($p = 0,0027$, **; $p = 0,0011$, **), yine kombine (15 mM MET ve 200 μ M KV) deney grubunun kontrol grubuna kıyasla istatistiksel bir artış olduğu saptanmıştır. ($p < 0,0001$, ****)

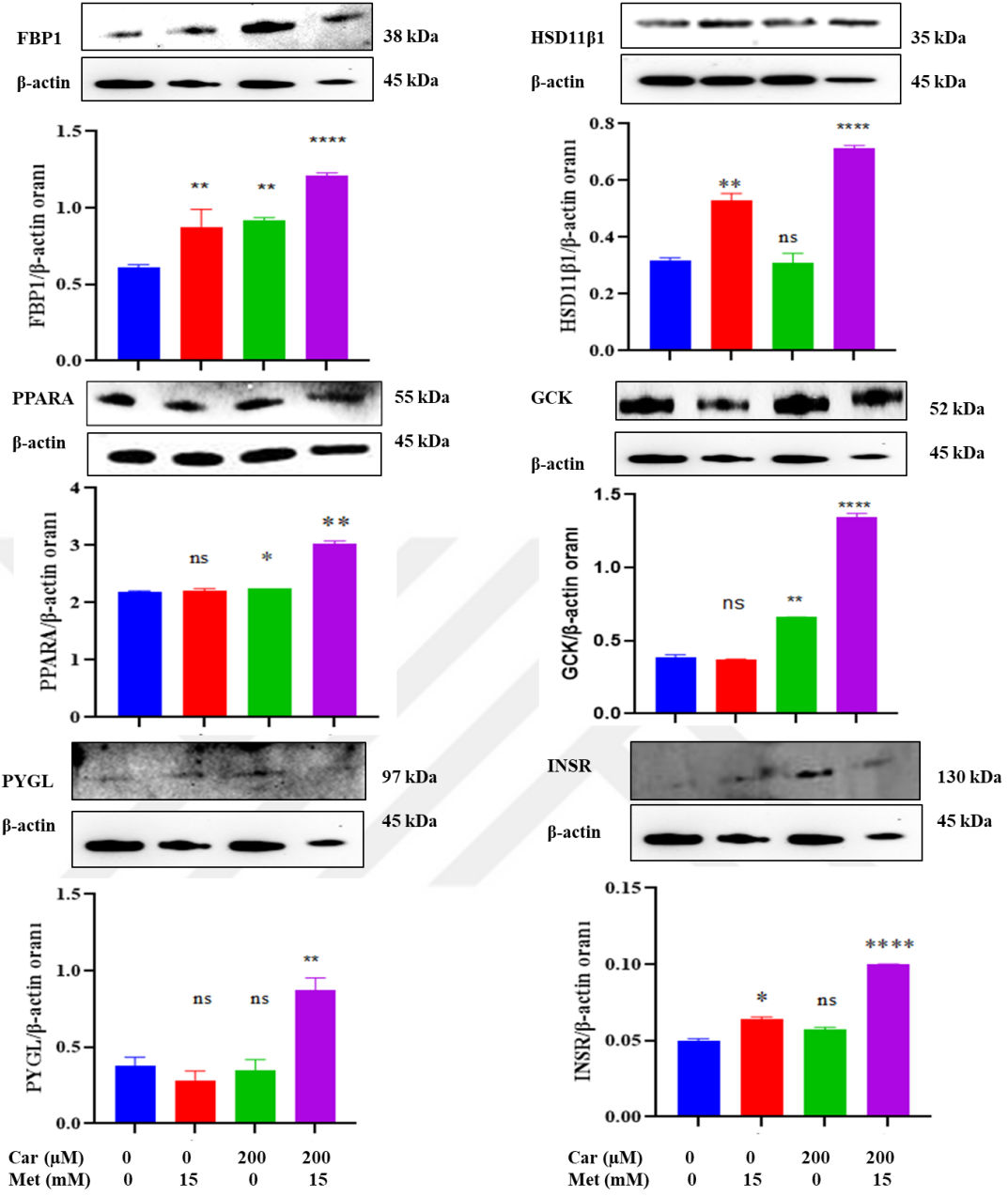
Hidroksisteroid 11-beta dehidrojenaz-1 (HSD11 β 1) proteinin istatistiksel analizinde, 15 mM MET grubu kontrol grubuyla ile kıyaslandığında istatistiksel olarak artış gözlemlendi ($p = 0,0068$, **), yine kombine deney grubu kontrol grubuna kıyasla anlamlı oranda bir artış gözlemlendi ($p < 0,0001$, ****).

Peroksizom proliferatörü aktive edilmiş reseptör alfa (PPARA) proteinin ifadesi analizinde, 200 μ M KV olan grup kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı oranda artış tespit gözlemlendi ($p = 0,0466$, *), kombine deney grubu kontrol grubuna kıyasla anlamlı oranda bir artış gözlemlendi ($p < 0,0033$, **).

Glikokinaz (GCK) proteini, 200 μ M KV ve kombine deney grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı ($p < 0,0047$, **) ($p < 0,0001$, ****).

Glikojen fosforilaz-L (PYGL) proteininde ise, sadece kombine deney grubu kontrol grubuna kıyasla anlamlı oranda bir artış gözlemlenmiştir ($p < 0,0015$, **).

İnsülin reseptör (INSR), 15 mM MET grubu kontrol grubuyla ile kıyaslandığında istatistiksel olarak artış gözlemlendi ($p = 0,0329$, *), yine kombine deney grubu kontrol grubuna kıyasla anlamlı oranda bir artış gözlemlendi ($p < 0,0001$, ****).



Şekil 4.19: Diyabetik 3T3 hücrelerindeki deney gruplarındaki western blot analizi ile ilgili görsel.

FBP1, HSD11β1, PPARA, GCK, PYGL ve INSR genlerinin protein seviyelerinin Western blot analizi. β-Aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Veriler ortalama ± SD(standart sapma) alınarak one-way ANOVA ve Tukeys çoklu karşılaştırma test ile sunulmuştur ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,0001$, ****).

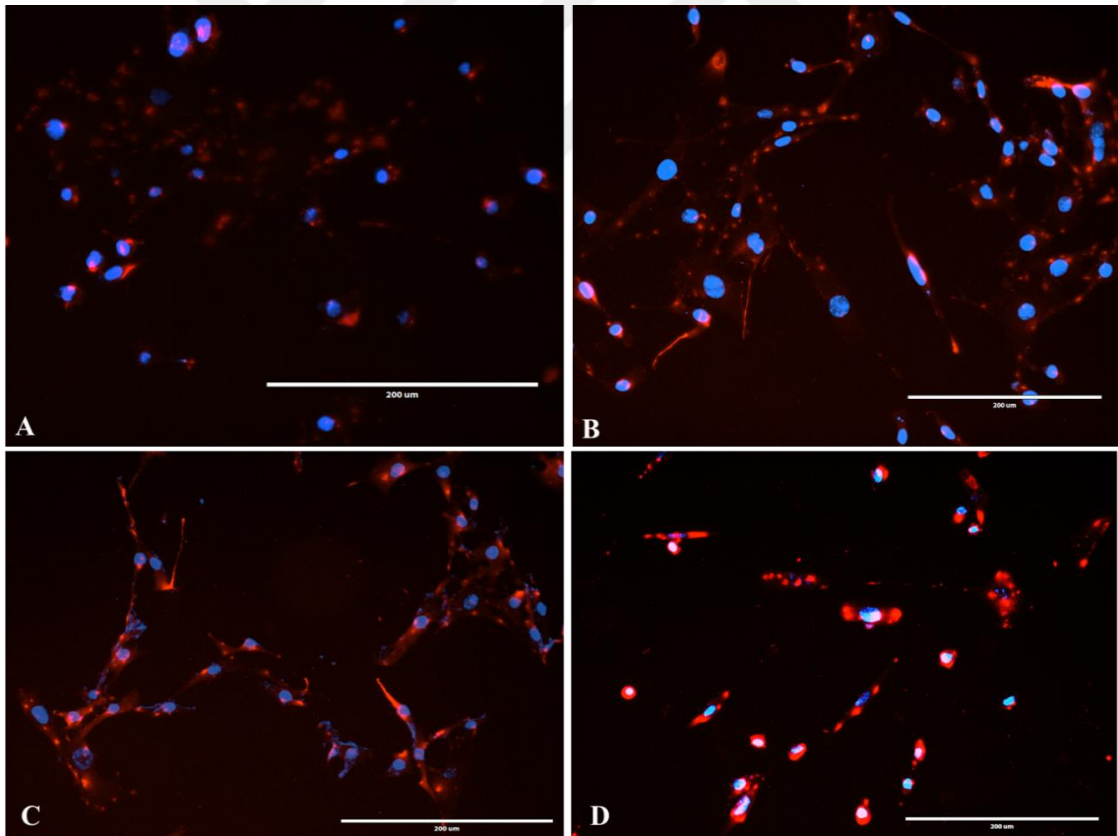
4.2.4. İmmünfloresan (IF) Sonuçları

Kültüre edilen 3T3-L1 hücrelerinde KV ve MET deney gruplarındaki FBP1, GCK, HSD11B1, INSR, PPARA, PPARG ve PYGL genlerine ait proteinlerin hücre içi

lokasyon ve ekspresyonu IF yöntemiyle analiz edildi. Hücrelerin EVOS® FL Auto Imaging (AMF4300, Invitrogen) cihazında farklı beş bölge seçilerek x20 büyütmede görüntüler alınarak ImageJ programında “cell counter” aracı ile sayıldı. Sayılan hücrelerin immunoreaktivite yoğunlukları hesaplandı ve 100, 200 ve 300 sayısal puanlar ile gruplandırılarak deney grupları % H-SCORE değerleri ile one-way ANOVA ve Tukeys çoklu karşılaştırma test ile istatistiksel analizleri yapıldı.

Şekil 4.20’ de görüldüğü gibi; fruktoz-bifosfataz-1 (FBP1) proteinin immünfloresan boyanmasının incelenmesinde 15 MET, 200 KV ve kombine doz uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla belirgin bir FBP1 immunopozitifliği gözlemlendi.

3T3-L1 hücreleri deney gruplarına ait FBP1 immunpozitif hücre sayımı sonuçlarının (% olarak) istatistiksel analizinde 15 mM MET, 200 μ M ve kombine uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artma olduğu saptandı (**p=0,0015, *p=0,0366, **p=0,0058). (Şekil 4. a)

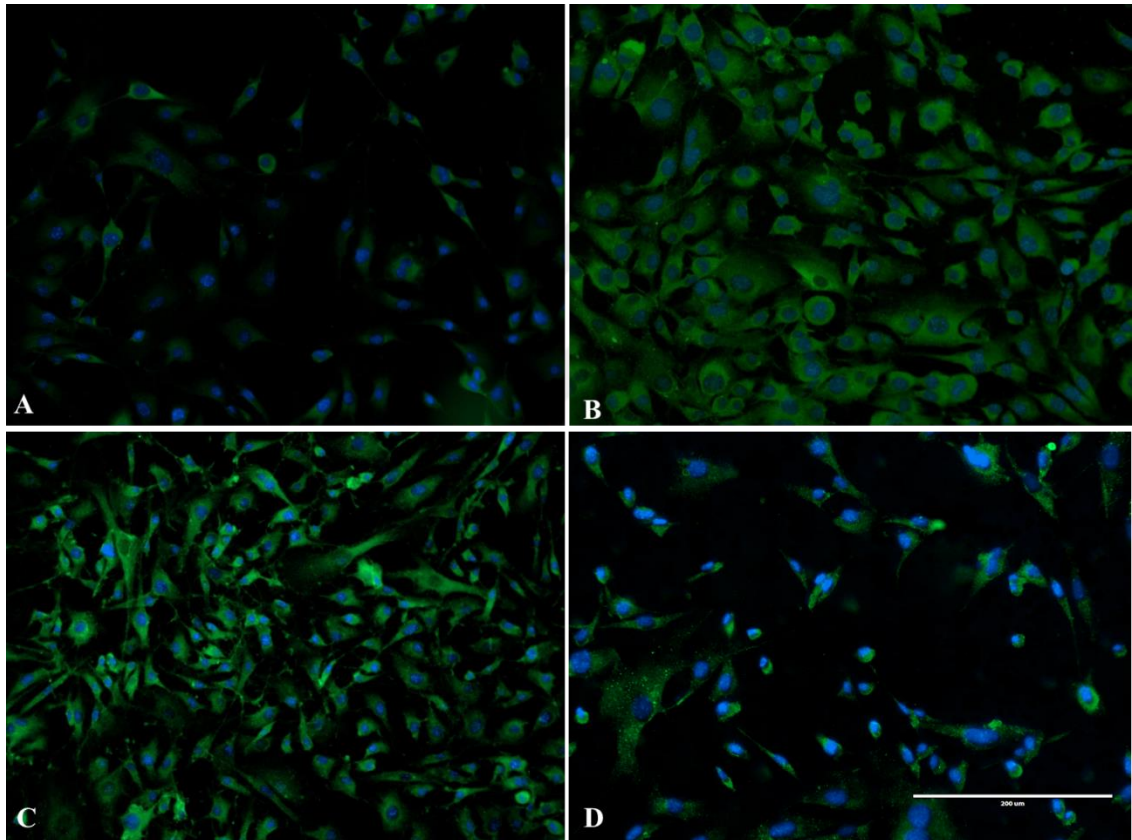


Şekil 4. 20: Diyabetik 3T3-L1 hücrelerinde FBP1 pozitif hücrelerin immünfloresan görseli.

Texas-Red boyama ile elde edilmiştir. A: 0 μ M KV ve 0 mM MET, B: 15 mM MET, C: 200 μ M KV, D: 15 mM MET ve 200 μ M KV, (x20). DAPI boyama ile nükleus mavi renkte gösterilmiştir.

Şekil 4.21' de görüldüğü gibi; hidroksisteroid 11-beta dehidrojenaz-1 (HSD11B1), proteinin immünfloresan görüntüleri incelendiğinde 15 MET, 200 KV ve kombine doz uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla belirgin bir HSD11 β immunopozitifliği gözlenmiştir.

3T3-L1 hücreleri deney gruplarına ait HSD11 β immunpozitif hücre sayımı sonuçlarının (% olarak) istatistiksel analizinde 15 mM MET, 200 μ M ve kombine uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artma olduğu saptanmıştır (*p=0,0424, **p=0,0070, ***p=0,0006). (Şekil 4. b)



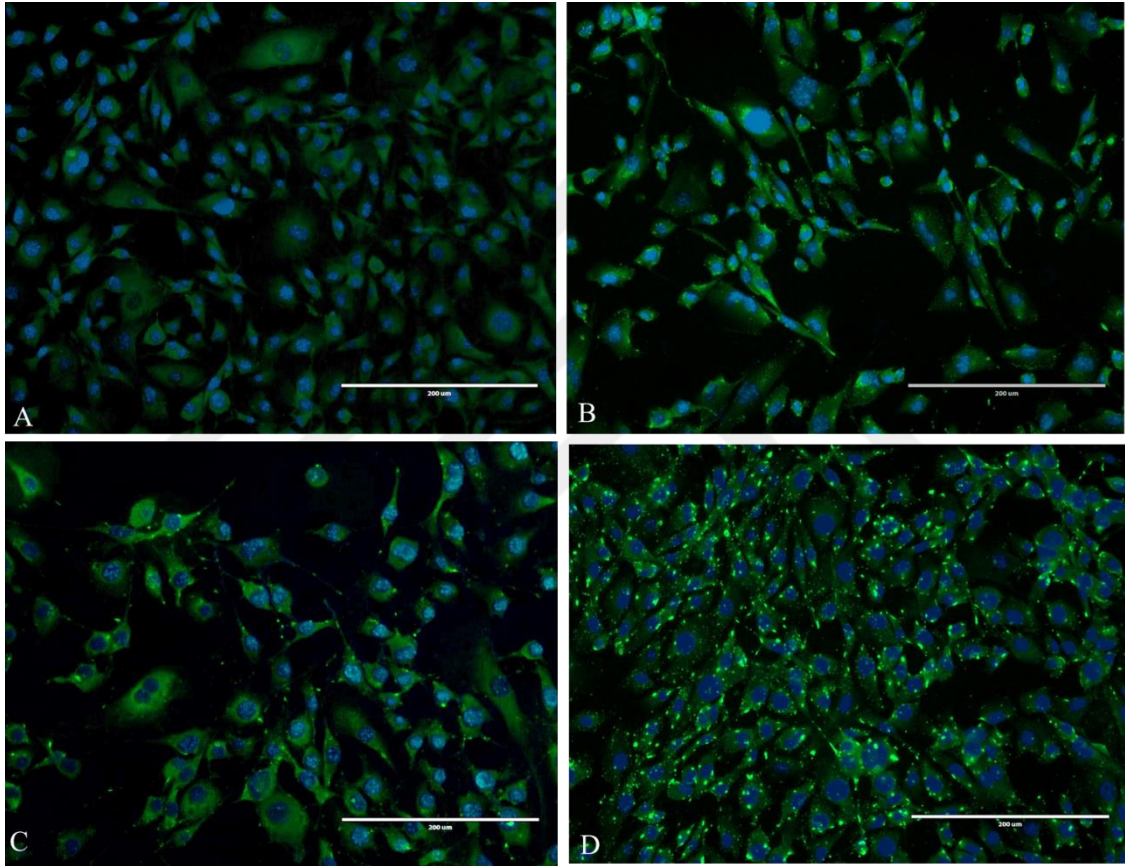
Şekil 4.21: Diyabetik 3T3-L1 hücrelerinde HSD11 β pozitif hücrelerin GFP boyama ile immünfloresan görüntüleri.

A: 0 μ M KV ve 0 mM MET, B: 15 mM MET, C: 200 μ M KV, D: 15 mM MET ve 200 μ M KV, (x20). Nükleus DAPI boyama ile mavi renkte gösterilmiştir.

Şekil 4.22'de sunulan peroksizom proliferatörü aktive edilmiş reseptör alfa (PPARA) proteinin immünfloresan görüntülerinde 15 MET, 200 KV ve kombine doz

uygulanan gruplarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli derecede bir PPARA immunopozitifliği gözlenmiştir.

3T3-L1 hücreleri deney gruplarına ait PPARA immunopozitif hücre sayımı sonuçlarının (% olarak) istatistiksel analizinde 15 mM MET, 200 μ M ve kombine uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artma olduğu saptanmıştır (**p=0,0070, **p=0,0019, ***p=0,0004). (Şekil 4. c)

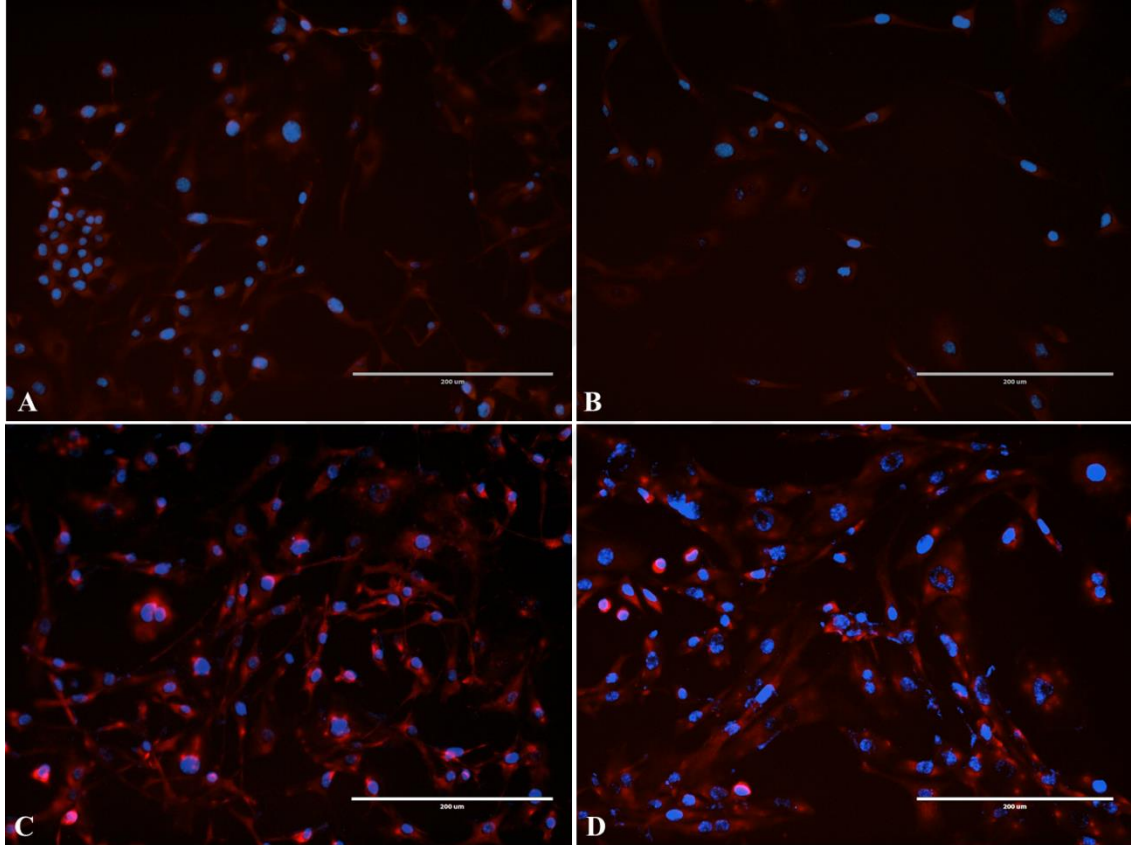


Şekil 4.22: Diyabetik 3T3-L1 hücrelerinde PPARA immunopozitif hücrelerin GFP boyama ile immünfloresan görüntüleri.

A: 0 μ M KV ve 0 mM MET, B: 15 mM MET, C: 200 μ M KV, D: 15 mM MET ve 200 μ M KV, (x20). Nükleus DAPI boyama ile mavi renkte gösterilmiştir.

Şekil 4.23’de sunulan glikokinaz (GCK) proteinin immünfloresan görüntülerinde 200 KV ve kombine doz uygulanan gruplarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli derecede bir GCK immunopozitifliği tespit edilmiştir.

3T3-L1 hücreleri deney gruplarına ait GCK immunpozitif hücre sayımı sonuçlarının (% olarak) istatistiksel analizinde 200 μ M ve kombine doz uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artma olduğu saptanmıştır (**** $p < 0,0001$, **** $p < 0,0001$). (Şekil 4. d)

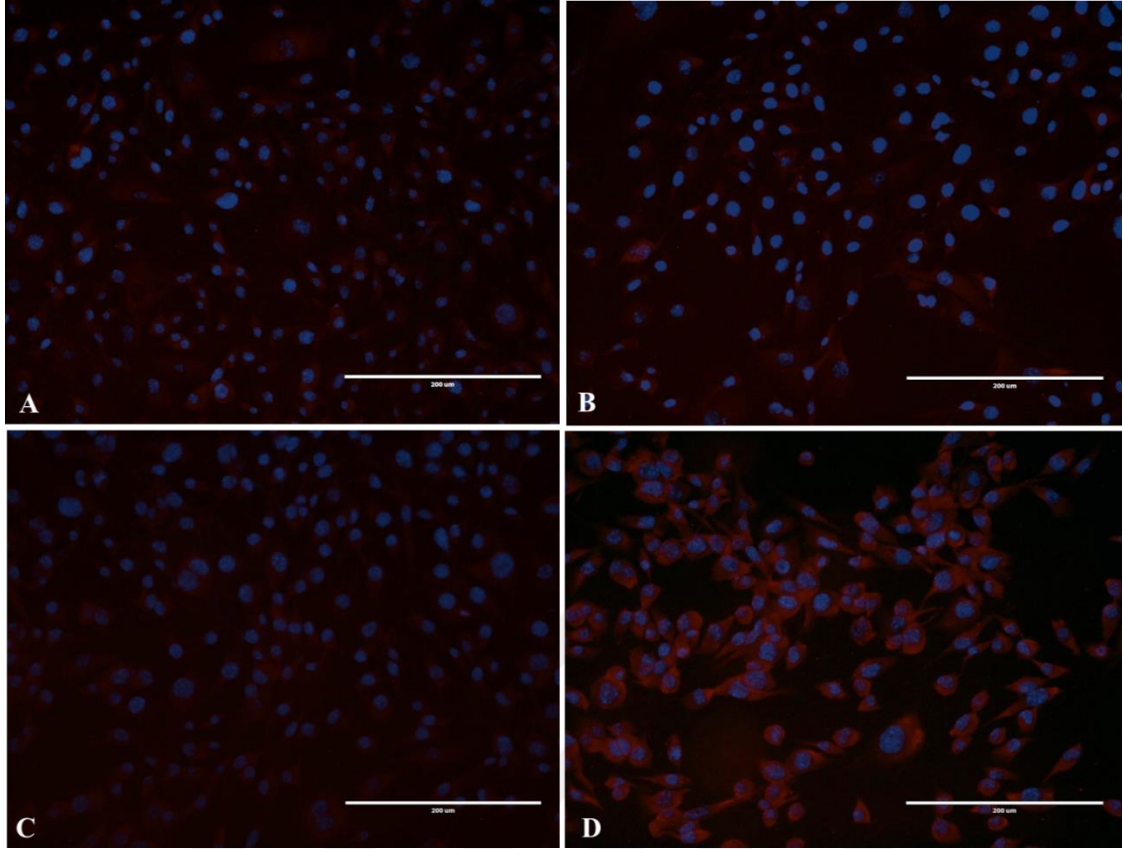


Şekil 4.23: *In vitro* diyabetik 3T3-L1 hücrelerinde glikokinaz proteinin Texas-Red boyama ile immünfloresan görüntüleri.

A: 0 μ M KV ve 0 mM MET, B: 15 mM MET, C: 200 μ M KV, D: 15 mM MET ve 200 μ M KV, (x20).

Şekil 4.24’de sunulan glikojen fosforilaz-L (PYGL) proteinin immünfloresan görüntülerinde sadece kombine doz uygulanan grubun kontrol grubuna kıyasla önemli derecede bir PYGL immunpozitifliği tespit edildi.

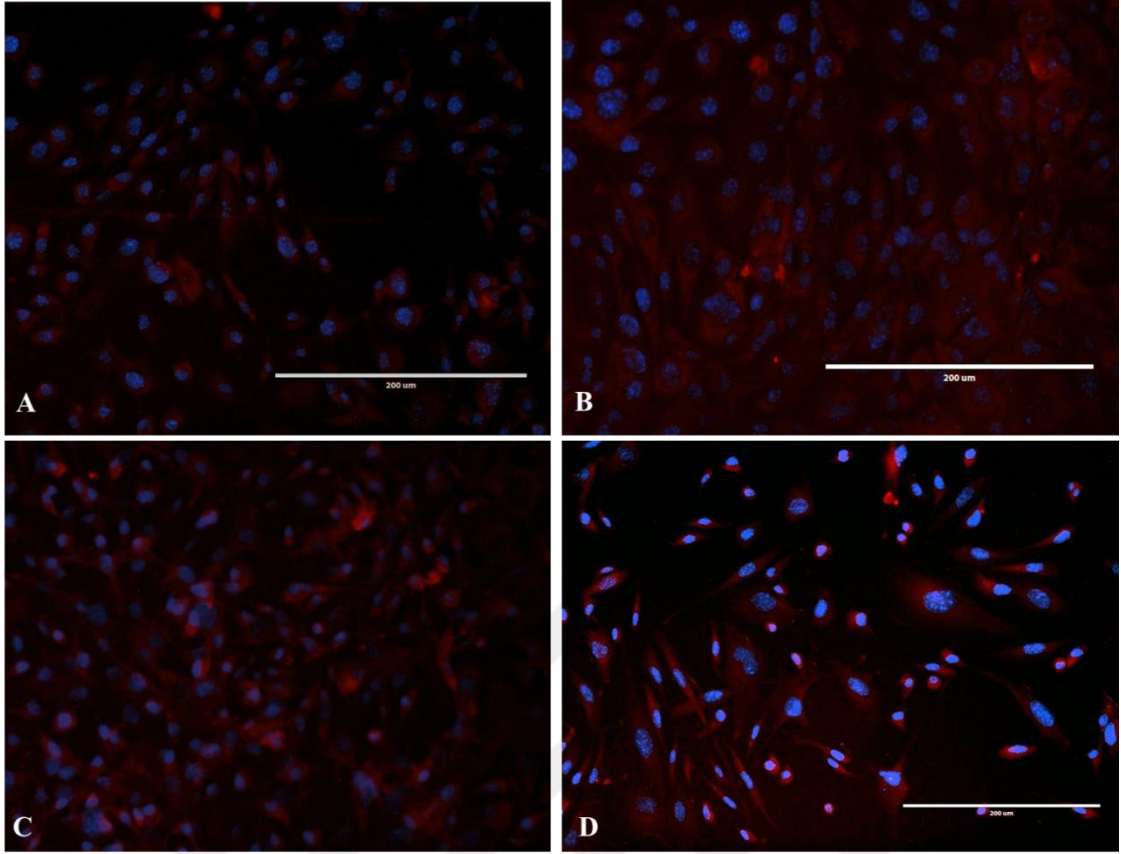
3T3-L1 hücreleri deney gruplarına ait PYGL immunpozitif % olarak hücre sayımı sonuçlarının istatistiksel analizinde kombine doz uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artma olduğu saptandı (* $p = 0,0302$). (Şekil 4. e)



Şekil 4.24: 3T3-L1 hücrelerinde PYGL proteinin Texas-Red boyama ile immünfloresan görüntüleri.

A: 0 μ M KV ve 0 mM MET, B: 15 mM MET, C: 200 μ M KV, D: 15 mM MET ve 200 μ M KV, (x20).

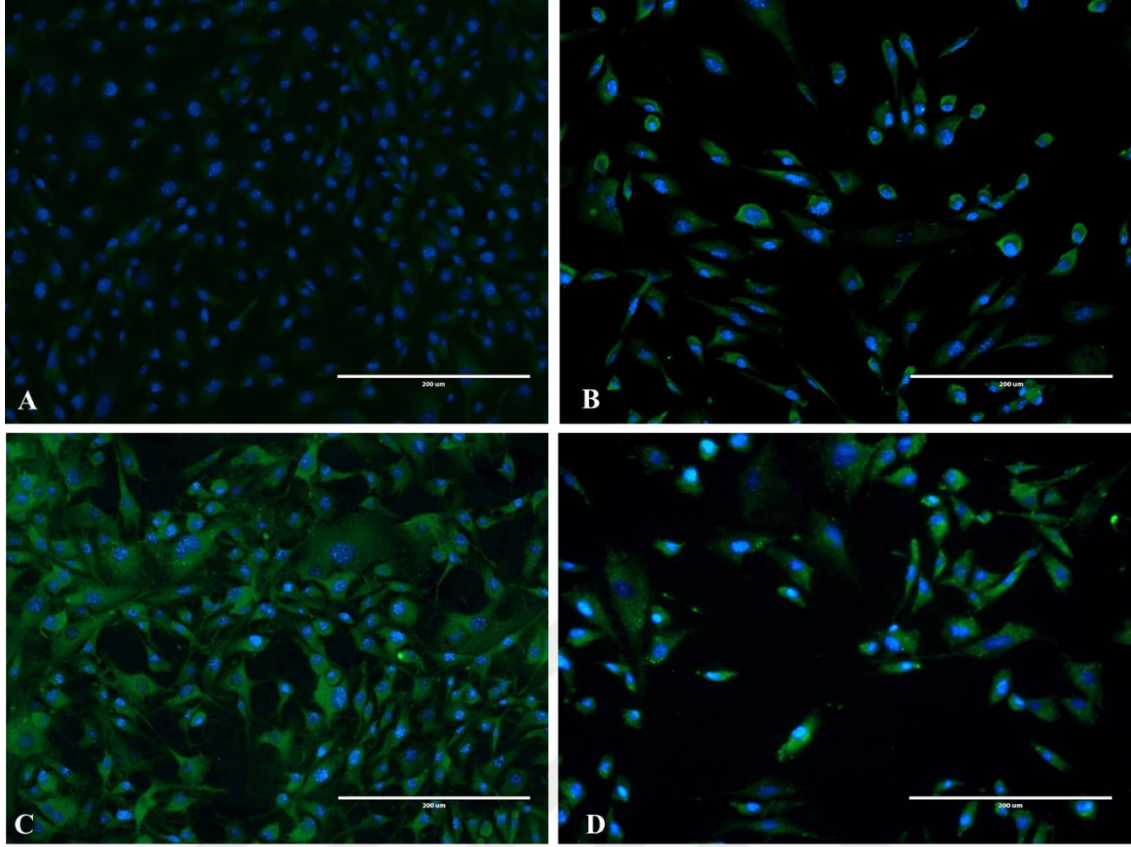
Şekil 4.25’de insülin reseptör (INSR) proteinin immünfloresan görüntülerinde 15 mM MET, 200 μ M ve kombine doz uygulanan grupların kontrol grubuna kıyasla önemli derecede bir INSR immunopozitifliği tespit edilmiştir. 3T3-L1 hücreleri deney gruplarına ait INSR immunopozitif hücre sayımı sonuçlarının istatistiksel analizinde 15 mM MET, 200 μ M ve kombine doz uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artma olduğu saptanmıştır (*p=0,0137, *p=0,0103, ****p<0,0001). (Şekil 4. f)



Şekil 4. 25: 3T3-L1 hücrelerinde INSR proteinin Texas-Red boyama ile immünfloresan görüntüleri.

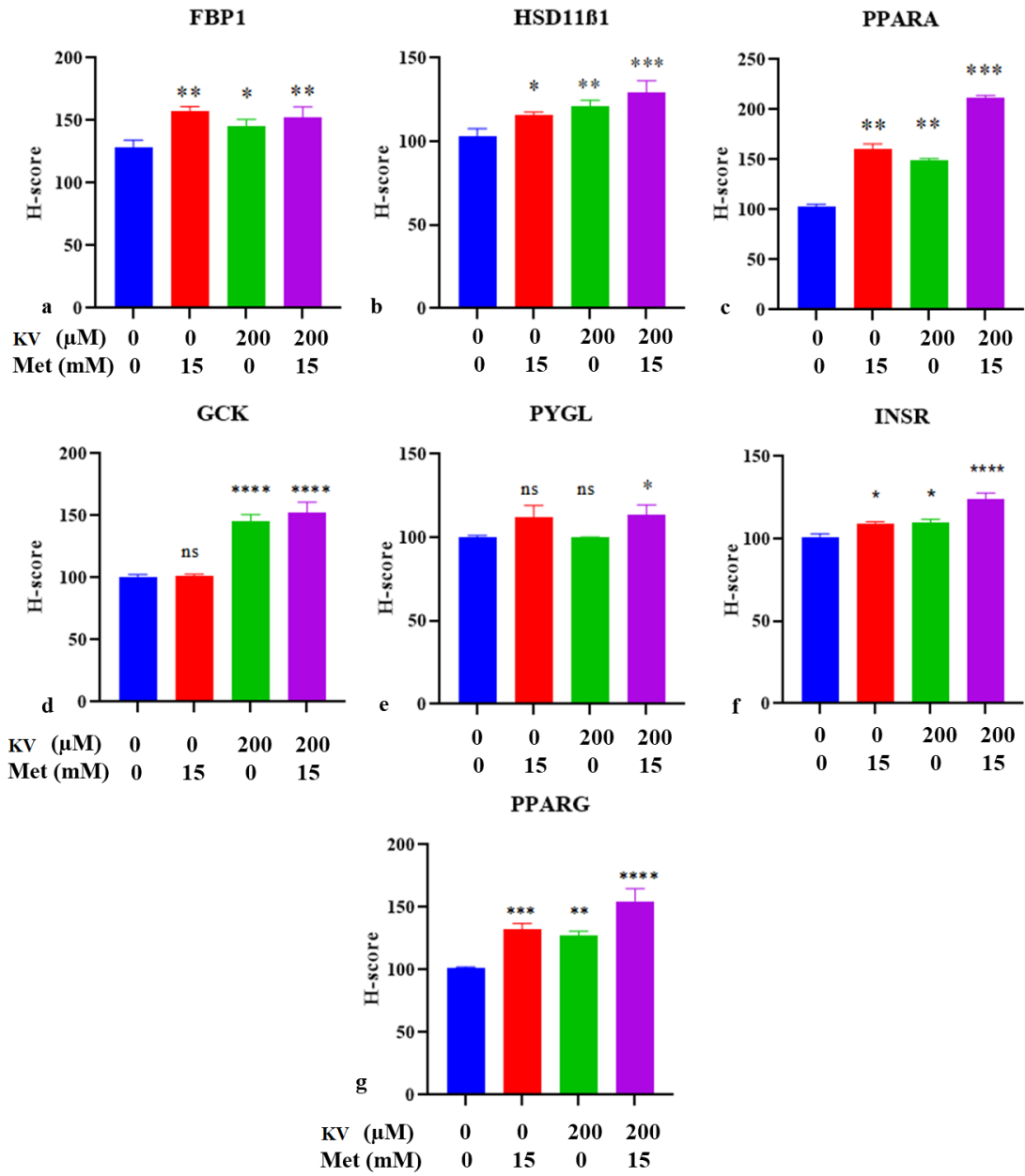
A: 0 µM KV ve 0 mM MET, B: 15 mM MET, C: 200 µM KV, D: 15 mM MET ve 200 µM KV, (x20).

Şekil 4.26’de sunulan peroksizom proliferatörü aktive edilmiş reseptör gamma (PPARG) proteinin immünfloresan görüntülerinde 15 MET, 200 KV ve kombine doz uygulanan gruplarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli derecede bir PPARG immunopozitifliği gözlenmiştir. 3T3-L1 hücreleri deney gruplarına ait PPARG immunopozitif hücre sayımı sonuçlarının (%) istatistiksel analizinde 15 mM MET, 200 µM ve kombine uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artma olduğu saptanmıştır (**p=0,0008, **p=0,002, ****p<0,0001). (Şekil 4. g)



Şekil 4.26: Diyabetik 3T3-L1 hücrelerinde PPARG immunpozitif hücrelerin GFP boyama ile immünfloresan görüntüleri.

A: 0 μ M KV ve 0 mM MET, B: 15 mM MET, C: 200 μ M KV, D: 15 mM MET ve 200 μ M KV, (x20). Nükleus DAPI boyama ile mavi renkte gösterilmiştir.



Şekil 4.27: Diyabetik 3T3 hücrelerinde deney gruplarındaki IF analizi ile ilgili görsel.

FBP1, HSD11 β 1, PPARA, GCK, PYGL, INSR ve PPARG genlerinin pozitif hücre sayımı sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi. Veriler ortalama $\pm$ SD(standart sapma) alınarak one-way ANOVA ve Tukeys çoklu karşılaştırma test ile (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p<0,001; ****p <0,0001).

5. TARTIŞMA

Son yıllarda birçok doğal ürünün farmakolojik mekanizmaları araştırılmaktadır. Ancak, birçok çabaya rağmen, çok sayıda şifalı bitki hala keşfedilmemiştir. Birçok in vivo ve in vitro biyolojik testin bu konuyu daha fazla ele alması zorunlu hale gelmekte, bu da bu çalışmaların maliyetini artırmaktadır.

Diyabet, dünya genelinde geniş yaş aralığı görülme sıklığıyla birlikte glisemik kontrol, ilaca uyum ve önemli sağlık bakım maliyetleriyle ilgili sorunlar gibi bir takım terapötik zorluklar doğurmaktadır. Bu zorluklar, etkili diyabet yönetiminin ele alınması ve ilgili sağlık ve ekonomik yüklerin azaltılması açısından kritik öneme sahiptir.

Glisemik kontroldeki zorluklar ve komplikasyonlar, optimum glisemik kontrolün sağlanması ve sürdürülmesinde diyabet ile mücadeledeki zorluklardan biridir. Anormal glisemik kontrol, kardiyovasküler hastalıklar, periferik damar hastalıkları, son dönem böbrek hastalığı ve retinopati gibi mikrovasküler hastalıklar gibi yaşamı tehdit eden çeşitli komplikasyonlarla önemli derecede ilişkilidir (61). Amerikan Diyabet Derneği, çoğu yetişkin hasta için <7%'lik bir HbA1c hedefi ile glisemik seviyeleri izlemek için düzenli HbA1c testi yapılmasını önermektedir (62). Ancak bu hedeflere ulaşmak çoğu kişi için hala bir zorluk olmaya devam etmektedir.

Diyabet ilaçlarına bağlılık, glisemik kontrolü ve genel tedavi etkinliğini etkileyen önemli diğer bir zorluktur (63). Çalışmalar, glikoz düşürücü tedaviye bağlılık ile HbA1c'deki azalmalar arasında açık bir ilişki olduğunu göstermiştir (64). Bununla birlikte, birçok hasta ilaç rejimlerine uymamakta, bu da yetersiz glisemik kontrole ve tedavinin etkinliğinin azalmasına neden olabilmektedir. İlaç uyumsuzluğunu, hastanın yaşı, eğitimi, sağlık ile ilgili inancı, sigorta kapsamı, yüksek masraflar, ilaç yükü, tedavi sürecinin karmaşıklığı ve reçeteyi yazanın uzmanlığı gibi faktörler etkilemektedir (65). Bu faktörler de diyabet ile mücadeleyi zor duruma sokmaktadır.

İlaçlara zayıf uyum ve bunun sonucunda ortaya çıkan zayıf glisemik kontrol, hastaneye kaldırılma ve tüm nedenlere bağlı ölüm riskinin artmasına neden olmakta ve doğrudan tıbbi maliyetleri önemli ölçüde artırmaktadır. 2015 yılında diyabetin

tahmini küresel maliyeti 1,31 trilyon dolardır ve işgücünü bırakma, devamsızlık ve ölüm gibi dolaylı maliyetler bu ekonomik yükün önemli bir kısmını oluşturmaktadır (66). Buna rağmen, ilaç uyumunun iyileştirilmesi ve sürdürülmesi, alternatif ilaç adayları bu ekonomik sağlık harcamalarında önemli maliyet tasarruflarını sağlayabilir.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, çok sayıda bitki türünün esansiyel yağlarında bir bileşen olan karvakrol (KV)'ün biyoinformatik hesaplamalar sonucu belirlediğimiz hedef proteinler üzerinden in vitro'da potansiyel etkilerini gösterdik. Çalışmamızda hücre kültürü hiperglisemik ortamda (25 mM ve 33 mM yüksek glukoz) 3T3-L1 (fare fibroblast) hücre soyu üzerinde MTT testi sonucu belirlediğimiz 200 μ M KV, 15 mM MET ve kombine deney grupları olacak şekilde efektif dozlar olarak belirledik.

Tablo 4.3'de belirtilen IC50 değerlerinin altında seçilen değerler kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak sitotoksik olmadığını yani hücre büyümesi, gelişimi ve çoğalmasını anlamlı olarak inhibe etmediğini göstermektedir.

Günes-Bayir ve arkadaşları da 96-kuyucuklu plaklarda 15×10^3 WS-1 (normal insan fibroblast) hücre soyu hücrelerinde CellTiter-Glo Lüminesans hücre canlılığı testiyle KV'nin (24 saat) uygulama ile IC50 değerini $138,1 \pm 8,7 \mu$ M olarak bulmuşlar ve deney gruplarında 0–50 μ M doz serisini test etmişlerdir (67). Yine Aydın ve ark. sağlıklı primer sıçan nöron kültüründe 24 saat boyunca 200 mg/L (~ 1.33 mM)'nin altındaki konsantrasyonlarda KV'nin sitotoksik olmadığını yani hücre canlılığında herhangi bir değişikliğe neden olmadığını buldular (68). Buna ilave olarak, diğer bir araştırmacı grubun yürüttüğü MTT testinde ise normal deri fibroblast (CCD) hücrelerinde 96 kuyucuklu plaklarda 10^4 hücrede 24 saatlik KV uygulaması sonrası 100 μ g/mL ($\sim 665 \mu$ M)'de hücre canlılığını önemli ölçüde (%50'den fazla) azalttığı bulunmuştur. Tez çalışmamızda da yürütülen bu çalışmalara benzer şekilde 90-well plaklarda 0.1×10^5 3T3-L1 hücre üzerindeki MTT deneyinde 24 saatte IC50 değerlerinin tespitinden sonra KV için 200 μ M, MET için 15 mM dozlar hücre poliferasyonu üzerine önemli derecede toksik etki göstermediğini istatistiksel olarak belirledik ($p < 0,0001$, ***, $p < 0,0046$, **, $p < 0,0078$, **). (Şekil 4.16 B ve D)

Şekil 4.16 ve Şekil 4.17 ye bakıldığında grafikler arasında KV ve MET dozlarının hücre canlılığı değerleri tutarlılık göstermektedir. Örneğin Şekil 4.16 D. (15mM MET) dozunda ve Şekil 4.17 (0 μ M KV ve 15mM MET) değerleri arasında farklılık görülse de Tablo 4.4' de verilen bu iki doz grubunun değerlerinin % standart sapma (SS) değerleri %10'u geçmemektedir. %1-10 arasındaki %SS değeri analizler için göz ardı edilebilmektedir. Bu grafiklerin oluşturulması için elde edilen optik densite değerleri, hücre kültürünün farklı zamanlarda yapılması, MTT testinin klorometrik yöntem olması göz önünde bulundurulduğunda farklı değerler verme durumu beklenebilmektedir.

Karvakrol'un anti-diyabetik etkisi yapılan araştırmalarla desteklenmekte yalnız hücresel süreçte biyolojik ve moleküler aktivitesini belirsizliğini korumaktadır. Bununla birlikte, çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak kullanılan dünya genelinde Tip 2 diyabet tedavisinde reçete edilen metformin, karvakrol ile sinerjik etki edebilecek potansiyelinde olduğu araştırılmıştır. Bunun yanında metforminin KV için yeni hedef proteinlere olan etkisi de analiz edildi.

Metforminin kan glukozunu düşürücü etkisine esas olarak, glukoneojenezi azaltarak ve karaciğerde glukagon aracılı sinyallemeyle bloke ederek hepatik glukoz üretiminin baskılanması yoluyla aracılık ettiğine inanılmaktadır (69,70). Ayrıca, metforminin yukarı akış karaciğer kinaz B1 (69) tarafından AMPK'yi (AMP ile aktive edilen protein kinaz) aktive edebileceği, AMP/ATP oranını artırabileceği ve mitokondriyal solunum zinciri kompleks I' i sınırlayabileceği öne sürülmüştür (71). Metformin, insülin reseptörünün (INSR) ve IRS-2'nin (insülin reseptörü substrat 2) aktivitesini iyileştirir ve GLUT-1 gibi glikoz taşıyıcılarının plazma zarına daha fazla translokasyonu yoluyla glikoz alımını artırmaktadır (72).

Anti-diyabetik etkileri, diyabetik hayvan ve hücre modellerinde incelenmiştir (3,31,32). Bu, geleneksel diyabetik ilaçlara doğal bir alternatif olma potansiyelini göstermektedir. Yine de KV'nin potansiyel ilaç olma sürecinde birçok moleküler mekanizmasının aydınlatılması gerekmektedir. Tez çalışmamız bu bağlamda, ilaç hedefi potansiyeli olan KV'nin etkisine yönelik hesaplamalı yapısal biyoloji çalışmaları ve yolak analizi ile yeni terapötik hedef proteinlerin belirlenmesi ve hesaplama sonuçlarının moleküler biyoloji teknikleri altında in vitro gibi preklinik

denemeler ile güvenliği ve etki gücünün ölçümü için hem emek hem de zaman tasarruf sağlaması açısından önem taşımaktadır.

Karvakrol'un in vitro karakterizasyonunda hedef proteinlerden FBP1, glukoneogenezde hız sınırlayıcı bir enzim olarak görev yapmaktadır. Pankreas beta hücrelerinin glikoz algılamasını ve insülin salgılanmasını düzenlemede rol oynamaktadır (73). Ayrıca iştah ve yağlanmanın önemli düzenleyicisi; Besin fazlalığının ardından karaciğerde proteinin ekspresyonunun artması, dolaşımdaki tokluk hormonlarını artırması ve iştahı uyaran nöropeptitleri azaltması ve dolayısıyla kilo alımını sınırlamak için bir geri bildirim mekanizması sağladığı ileri sürülmektedir (74). Sonuçlarımızda FBP1 proteini -3.5 (kcal/mol) doking skoruyla Şekil 4.7 bölüm 2 de gösterildiği gibi MD simülasyonu boyunca kararlı bir yapı sergilemiştir. FBP1 protein ekspresyon seviyelerinde WB ve IF sonuçları tutarlılık göstererek hem KV grubu hem de MET grubunda önemli oranda kontrol gruplarına göre artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.19 ve Şekil 4.27 a). HSD11B1 proteini -5.9 (kcal/mol) yerleştirme skoruyla Şekil 4.7 bölüm 4'te MD simülasyonu boyunca kararlı bir yapı sergilemiş, ekspresyon seviyesinde ise MET grubunda anlamlı bir artış varken KV grubunda ise istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Kombine doz grubunda ise kontrol grubuna göre daha anlamlı bir artış görülmüştür. HSD11B1 geninin IF sonuçlarında ise tüm deney gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı artış tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda HSD11B1 geninin, kortizonun kortizole dönüştürülmesinden sorumlu olduğunu daha sonra insülin direnci ve hiperglisemi gibi metabolik değişikliklere yol açabileceği ileri sürülmüştür. Bu nedenle aktivasyonun anormal derecede artmasından dolayı diyabet ve ilgili durumlardaki bu metabolik değişiklikleri hedef alarak inhibe edilmesi ileri sürülmüştür (75, 76). Bununla birlikte metforminin, Tip 2 diyabet olan ve olmayan obez erkeklerde HSD11B1 aktivasyonun artırdığı rapor edilmiştir (77). Sonuçlarımızda ise protein ekspresyonunda KV grubunda önemli bir azalma görülmemişken, MET grubunda anlamlı oranda artış görülmüştür. Kombine grupta ise kontrol grubuna kıyasla daha anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 4.19).

Analizlerimize göre diyabetle ilişkilendirilen hem PPAR- α hem de PPAR- γ , ligandla aktive edilen transkripsiyon faktörleri olarak işlev gören Tablo 4.1'de belirtildiği gibi lipid metabolizma regülasyonunda rol alan nükleer reseptörlerdir. Bu

iki proteinin metabolik bozukluklarla (78–80) bağlantılı olmasından dolayı farmasötik hedefler haline gelmişlerdir; PPAR- α ve PPAR-Y agonistleri sırasıyla hiperlipidemi ve tip 2 diyabetin tedavisinde klinik kullanımdadır (bkz. Tablo 4.2). KV, üzerinde COX-2 ekspresyonu baskılayarak PPAR α ve PPARY proteinlerini aktive ederek anti-inflamatuar etki gösterdiği rapor edilmiştir (81). Çalışmamızda ise bu iki protein yolak analizi yapılarak diyabet ile ilişkilendirilmiş (bkz. Tablo 4.4 ve 4.5) ve KV ile moleküler modellemesi yapılarak -5.8 / -6.4 (kcal/mol) yerleştirme skoruyla MD simülasyonu boyunca kararlı bir yapı sergilemiştir. Protein ekspresyon sonuçlarında ise, WB sonuçlarında 15 MET grubu haricinde kontrol grubuna kıyasla tüm deney gruplarında PPAR- α ve PPAR-Y istatistiksek olarak anlamlı oranda artmıştır. Hatta kombine (15 MET ve 200 KV) grup kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha anlamlı bir artış göstermiştir (bkz. Şekil 4.19 ve Şekil 4.27 a). Buna ilave olarak, PPAR- α proteini 200 KV grubunda kontrol grubuna kıyasla sitozolden nukleusa translokasyonun arttığı, kombine grupta ise nukleusa translokasyonun daha da fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.22 C ve D). Bu sonuç, MET ve KV'nin PPAR- α proteinin üzerine aktivasyonunu sinerjik olarak göstermiştir. PPAR-Y' nin nukleusa translokasyonu bu derece gözlenmemiştir. Genel olarak, KV'nin bu iki proteini aktive etme yeteneği ve diyabetle ilişkili çeşitli yollar üzerindeki etkileri, onun diyabet kontrolünde terapötik bir ajan olarak potansiyelinin altını çizmektedir. Yine, PPAR- α ve PPAR-Y 'nın üzerine metforminin pozitif yönde aktive ettiği çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (82–84). Bu çalışmada da benzer şekilde in vitro diyabetik modelde metforminin aktivatör etkisi ilk defa gösterilmiştir.

GCK, INSR ve PYGL genleri FBP1 ile beraber Şekil 4.22 B'ye bakıldığında insülin sinyal yoluyla bağlantılı oldukları sonucuna varılmıştır (FDR: 0.012866). Bu sonuç ile beraber docking skorları sırasıyla -6.6, -5.4, -5.3 (bkz. Tablo 4.1) elde edilerek MD işlemi yürütülmüş ve simülasyon boyunca KV ile etkileşimde stabil bir denge sağlanmıştır (Şekil 4.7.Bölüm 3, 5, 8). In vitro analizimizde, Heksokinaz-4 protein seviyelerinde KV grubunda anlamlı bir oranda artış varken, MET grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmamıştır. Kombine grupta ise kontrol grubuna kıyasla daha anlamlı bir artış tespit edilmiştir (Şekil 4.19). Şekil 4.27 d' de görüldüğü gibi, IF sonuçları tutarlılık göstermiş KV ve kombine deney gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış olduğu halde MET grubunda anlamlı bir fark

görülmemiştir. INSR protein seviyesinde ise kontrol grubuna göre MET grubunda anlamlı bir artış varken KV grubunda anlamlı bir oranda artış olamadığı, kombine grubunda ise daha anlamlı bir artış olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlara göre KV etkisini kombine gruplarda göstermiş olabilir. Yine PYGL protein ekspresyonunda, WB ve IF analiz sonuçları tutarlılık göstermiş, KV ve MET gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark yokken, kombine grupta istatistiksel olarak önemli artış görülmüştür. Bu sonuç KV ve MET 'in beraberce sinerjik etki gösterdiğini göstermektedir.

Heksokinaz IV proteinini kodlayan GCK, glukoz metabolizmasında anahtar bir enzimdir ve ekspresyon düzeylerinin diyabet, özellikle de tip 2 diyabet (T2D) için önemli etkileri vardır. Glikoz metabolizması yolunda ilk katalizör olarak görev yapmakta ve hücreler içindeki glikoz seviyelerinin sensörü rolündedir (85). Bu rolüne bağlı olarak T2D hastalarında açlık kan şekeri (AKS) ve Hba1c ile diyabetik β hücrelerinde GCK ekspresyonu arasında negatif bir ilişkinin mevcut olduğu kaydedilmiştir (86); bu da başarılı pankreatik β hücresi fonksiyonu için GCK aktivasyonunun gerekli olabileceğini düşündürmektedir. Güncel kapsamlı bir çalışmada, yüksek kan şekeri seviyelerinin GCK ekspresyonunun azalmasıyla ilişkili olduğu kaydedilmiştir; bu da diyabetin tedavisinde GCK ekspresyonunu hedefleyen tedavilerin potansiyelini ortaya koymuştur. Diğer bir çalışmada, T2D, büyük ölçüde artan hepatik glikoz üretimine bağlı olarak artan endojen glikoz üretimi ile karakterize edilir. Bu süreçte hız sınırlayıcı bir enzim olan GCK, T2D'de gözlenen metabolik düzensizlikte önemli bir rol oynar (87). Bu bulgular, GCK'nin diyabetin patofizyolojisinde, özellikle de beta hücre fonksiyonu ve glukoz metabolizmasındaki kritik rolünün altını çizmektedir. GCK ekspresyonunu ve aktivitesini hedeflemek, diyabet tedavisi ve yönetimi için potansiyel bir yol olabilir.

INSR geni ile KV'nin arasındaki ilişki çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Mevcut araştırmalardan elde edilen temel bulgular, INSR protein seviyelerinin 5 ve 10 mg/kg konsantrasyonlarda KV uygulamasında, HUVEC (İnsan Göbek Ven Endotel Hücrelerinde) 'lerde fosforile edilmiş INSR seviyelerini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Bu, KV'nin belirli koşullar altında ekspresyonunu modüle ederek INSR geninin aktivitesini etkileyebileceğini göstermektedir (88). PYGL'nin karaciğer glikoz üretimini düzenlemedeki işlevi diyabette de rol oynadığını

göstermektedir. Tip 2 diyabette hiperglisemi, karaciğerin aşırı glikoz üretiminin bir sonucu olduğundan, PYGL'yi hedef alan bir ilacın geliştirilmesi, kan şekeri seviyelerinin kontrolünde etkili olabilir.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Anti-diyabetik etkileri, diyabetik hayvan ve hücre modellerinde araştırılması KV'nin geleneksel diyabetik ilaçlara doğal bir alternatif olma potansiyelini göstermektedir. Diyabet yönetimindeki zorlukların analizi, sonuçları iyileştirmek için pratik çözümlere duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır. Göz önünde bulundurulması gereken önemli noktalar arasında diyabet tedavi rejimlerinin karmaşıklığı, ilaç kullanımının kolaylığı ve tedaviye uyumu artırmak ve daha iyi glisemik kontrol için etki gücü yüksek ajanlara ihtiyaç olamasıdır. Bu sorunların ele alınması, hem sağlık üzerindeki etkilerin hem de diyabetle ilişkili ekonomik maliyetlerin azaltılması açısından hayati önem taşımaktadır.

KV 'nin anti-diyabetik özelliğinin ortaya çıkarılması için daha çok in-vitro ve in vivo çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışmada bazı kısıtlamaları vardır. Yetersiz klinik kanıt, KV'nin diyabet yönetimindeki etkinliğini değerlendiren kapsamlı klinik çalışmaların eksikliği, mevcut araştırmanın çoğu ön hazırlık niteliğindedir ve in vitro modellere dayandığından in vivo diyabetik hayvan modellerinde de yapılmalıdır. KV'nin güvenliği ve efektif doz profili, özellikle diyabet yönetimi için terapötik dozlarda tam olarak oluşturulmamıştır. Bu sebeple, uygun dozajı ve potansiyel yan etkileri anlamak için daha çok toksisite testleri yapılması önemlidir. Yine önemli bir husus olarak başka geleneksel diyabetik ilaçlarla etkileşime girebilir ve bu da öngörülemeyen komplikasyonlara yol açabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada çeşitli Diyabetik semptom ve yolaklarla ilişkilendirilen 17 insan protein yapısı arasında potansiyel KV hedefleri tespit edilmiştir. Bu proteinlerden GCK, INSR, PPARA, PPARG, FBP1, PYGL ve HSD11B1 gibi 7 aday proteinin hem moleküler modellemesi hem de in vitro uygulamada sadece KV veya MET ile birlikte kombine dozlarda istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır. Tüm bu bulgular göz önüne alındığında, KV'nin bu hedef proteinlerden PPARG ve INSR diyabet tedavisi için FDA onaylı hedeflerdir. Bu da bize KV'nin DM tedavisi için umut verici bir terapötik bileşik olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızın KV biyoaktivitesi üzerine daha ileri deneysel araştırmalara yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte, çalışmamızdaki hesaplama tabanlı yerleştirme bağlantılı ilaç tasarımının yararlılığını

göstermek için daha fazla çalışma yapılması önerilir. DIA-DB web sunucusunun sonuçlarından karvakrolün potansiyel biyoaktivitesini doğrulamak için daha fazla in vitro ve in vivo incelemelere ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

1. Diabetes. (n.d.). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
2. Kara, M., Uslu, S., Demirci, F., Temel, H. E., & Baydemir, C. (2015). Supplemental carvacrol can reduce the severity of inflammation by influencing the production of mediators of inflammation. *Inflammation*, 38, 1020–1027.
3. Ezhumalai, M., Radhiga, T., & Pugalendi, K. V. (2014). Antihyperglycemic effect of carvacrol in combination with rosiglitazone in high-fat diet-induced type 2 diabetic C57BL/6J mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 385, 23–31.
4. Imran, M., Aslam, M., Alsagaby, S. A., Saeed, F., Ahmad, I., Afzaal, M., Arshad, M. U., Abdelgawad, M. A., El-Ghorab, A. H., Khames, A., & others. (2022). Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review. *Food Science & Nutrition*, 10(11), 3544–3561.
5. Kumar, R., & Saran, S. (2018). Structure, molecular dynamics simulation, and docking studies of Dictyostelium discoideum and human STRAPs. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(9), 7177–7191.
6. Peña-García, J., & Pérez-Sánchez, H. (2020). Assessment of interaction of human OCT 1-3 proteins and metformin using silico analyses. *Acta Chim. Slov*, 67.
7. Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B. B., Stein, C., Basit, A., Chan, J. C. N., Mbanya, J. C., & others. (2022). IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 109119.
8. Xiao, Y., Li, B., Liu, J., & Ma, X. (2018). Carvacrol ameliorates inflammatory response in interleukin 1 β -stimulated human chondrocytes. *Molecular Medicine Reports*, 17(3), 3987–3992.
9. Manouchehrabadi, M., Farhadi, M., Azizi, Z., & Torkaman-Boutorabi, A. (2020). Carvacrol protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in in vivo and in vitro models of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 37, 156–170.
10. Khan, F., Singh, V. K., Saeed, M., Kausar, M. A., & Ansari, I. A. (2019). Carvacrol induced program cell death and cell cycle arrest in androgen-independent human prostate cancer cells via inhibition of notch signaling. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 19(13), 1588–1608.
11. Shoorei, H., Khaki, A., Khaki, A. A., Hemmati, A. A., Moghimian, M., & Shokoohi, M. (2019). The ameliorative effect of carvacrol on oxidative stress and germ cell apoptosis in testicular tissue of adult diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 568–578.
12. Jung, C. Y., Kim, S.-Y., & Lee, C. (2018). Carvacrol targets AXL to inhibit cell proliferation and migration in non-small cell lung cancer cells. *Anticancer Research*, 38(1), 279–286.
13. Dati, L. M., Ulrich, H., Real, C. C., Feng, Z. P., Sun, H. S., & Britto, L. R. (2017). Carvacrol promotes neuroprotection in the mouse hemiparkinsonian model. *Neuroscience*, 356, 176–181.
14. Sridhar, M., Thammaiah, V., & Suganthi, R. U. (2016). Evaluation of carvacrol in ameliorating aflatoxin induced changes with reference to growth and oxidative stress in broiler chickens. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 16(2), 283–296.
15. Healthy Focus:8 Proven Benefits of Carvacrol. (n.d.). <https://healthyfocus.org/6-proven-benefits-carvacrol/#:~:text=Carvacrol or 5,marjoram%2C rosemary%2C lavender and sage>
16. Alma, M. H., Mavi, A., Yildirim, A., Digrak, M., & Hirata, T. (2003). Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(12), 1725–1729.
17. Bačser, K. H. C., Kürkçüoğlu, M., Demirci, B., & Özek, T. (2003). The essential oil of *Origanum syriacum* L. var. *sinaicum* (Boiss.) letsweet. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(2), 98–99.
18. Alsaraf, S., Hadi, Z., Al-Lawati, W. M., Al Lawati, A. A., & Khan, S. A. (2020). Chemical composition, in vitro antibacterial and antioxidant potential of Omani Thyme essential oil along with in silico studies of its major constituent. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1), 1021–1028.
19. Tisserand, R., & Young, R. (2013). *Essential oil safety: a guide for health care professionals*. Elsevier Health Sciences.

20. Béjaoui, A., Chaabane, H., Jemli, M., Boulila, A., & Boussaid, M. (2013). Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at different phenological stages. *Journal of Medicinal Food*, 16(12), 1115–1120.
21. Kuštrak, D., Martinis, Z., Kuftinec, J., & Blažević, N. (1990). Composition of the essential oils of some *Thymus* and *Thymbra* species. *Flavour and Fragrance Journal*, 5(4), 227–231.
22. Adeva-Andany, M. M., Pérez-Felpete, N., Fernández-Fernández, C., Donapetry-García, C., & Pazos-García, C. (2016). Liver glucose metabolism in humans. *Bioscience Reports*, 36(6). <https://doi.org/10.1042/BSR20160385>
23. Ban, C. R., & Twigg, S. M. (2008). Fibrosis in diabetes complications: pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers. *Vascular Health and Risk Management*, 4(3), 575–596.
24. Singh, J., & Kakkar, P. (2009). Antihyperglycemic and antioxidant effect of *Berberis aristata* root extract and its role in regulating carbohydrate metabolism in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(1), 22–26.
25. Yang, Y., Zhao, M., Yu, X.-J., Liu, L.-Z., He, X., Deng, J., & Zang, W.-J. (2019). Pyridostigmine regulates glucose metabolism and mitochondrial homeostasis to reduce myocardial vulnerability to injury in diabetic mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 317(2), E312–E326.
26. Latha, M., & Pari, L. (2003). Antihyperglycaemic effect of *Cassia auriculata* in experimental diabetes and its effects on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 30(1–2), 38–43.
27. Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177.
28. Kaga, A. K., Barbanera, P. O., Carmo, N. O. L. do, Rosa, L. R. de O., Fernandes, A. A. H., & others. (2018). Effect of N-acetylcysteine on dyslipidemia and carbohydrate metabolism in STZ-induced diabetic rats. *International Journal of Vascular Medicine*, 2018.
29. DeFronzo, R. A., Triplitt, C. L., Abdul-Ghani, M., & Cersosimo, E. (2014). Novel agents for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Spectrum*, 27(2), 100–112.
30. Gourgari, E., Wilhelm, E. E., Hassanzadeh, H., Aroda, V. R., & Shoulson, I. (2017). A comprehensive review of the FDA-approved labels of diabetes drugs: Indications, safety, and emerging cardiovascular safety data. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 31(12), 1719–1727.
31. Li, Y., Mai, Y., Qiu, X., Chen, X., Li, C., Yuan, W., & Hou, N. (2020). Effect of long-term treatment of Carvacrol on glucose metabolism in Streptozotocin-induced diabetic mice. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 1–8.
32. Zhao, W., Deng, C., Han, Q., Xu, H., & Chen, Y. (2023). [Corrigendum] Carvacrol may alleviate vascular inflammation in diabetic db/db mice. *International Journal of Molecular Medicine*, 52(4), 1–2.
33. Perez-Sanchez, H., Den-Haan, H., Peña-García, J., Lozano-Sánchez, J., Martínez Moreno, M. E., Sánchez-Pérez, A., Muñoz, A., Ruiz-Espinosa, P., Pereira, A. S. P., Katsikoudi, A., & others. (2020). DIA-DB: A database and web server for the prediction of diabetes drugs. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(9), 4124–4130.
34. Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B. A., & others. (2016). PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1202–D1213.
35. Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461.
36. Liao, Y., Wang, J., Jaehrig, E. J., Shi, Z., & Zhang, B. (2019). WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Research*.
37. Kanehisa, M., Sato, Y., Furumichi, M., Morishima, K., & Tanabe, M. (2019). New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D590–D595.
38. Mi, H., Dong, Q., Muruganujan, A., Gaudet, P., Lewis, S., & Thomas, P. D. (2010). PANTHER version 7: improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl_1), D204–D210.
39. Piñero, J., Ramírez-Anguita, J. M., Saüch-Pitarch, J., Ronzano, F., Centeno, E., Sanz, F., & Furlong, L. I. (2020). The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D845–D855.
40. Khatri, P., Sirota, M., & Butte, A. J. (2012). Ten years of pathway analysis: current approaches and outstanding challenges. *PLoS Computational Biology*, 8(2), e1002375.
41. Zuberi, K., Franz, M., Rodriguez, H., Montojo, J., Lopes, C. T., Bader, G. D., & Morris, Q.

- (2013). GeneMANIA prediction server 2013 update. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), W115--W122.
42. Release, S., & others. (2017). 3: Desmond molecular dynamics system, DE Shaw research, New York, NY, 2017. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY.
 43. Nosé, S. (1984). A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular Physics*, 52(2), 255–268.
 44. Hoover, W. G. (1985). Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Physical Review A*, 31(3), 1695.
 45. Martyna, G. J., Tobias, D. J., & Klein, M. L. (1994). Constant pressure molecular dynamics algorithms. *The Journal of Chemical Physics*, 101(5), 4177–4189.
 46. Roos, K., Wu, C., Damm, W., Reboul, M., Stevenson, J. M., Lu, C., Dahlgren, M. K., Mondal, S., Chen, W., Wang, L., & others. (2019). OPLS3e: Extending force field coverage for drug-like small molecules. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 15(3), 1863–1874.
 47. Soydas, T., Yaprak Sarac, E., Cinar, S., Dogan, S., Solakoglu, S., Tuncdemir, M., & Kanigur Sultuybek, G. (2018). The protective effects of metformin in an in vitro model of aging 3T3 fibroblast under the high glucose conditions. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 74, 273–281.
 48. Ranjithkar, S., Zhang, D., Sun, F., Salman, S., He, W., Venkitanarayanan, K., Tulman, E. R., & Tian, X. (2021). Cytotoxic effects on cancerous and non-cancerous cells of trans-cinnamaldehyde, carvacrol, and eugenol. *Scientific Reports*, 11(1), 16281.
 49. Xiao, Z., Wu, W., Poltoratsky, V., & others. (2017). Metformin suppressed CXCL8 expression and cell migration in HEK293/TLR4 cell line. *Mediators of Inflammation*, 2017.
 50. Li, J., Hu, J., Shao, B., Zhou, W., Cui, Y., Dong, C., Ezoulin, J.-M. M., Zhu, X., Ding, W., Heymans, F., & others. (2009). Protection of PMS777, a New AChE Inhibitor with PAF Antagonism, Against Amyloid- β -Induced Neuronal Apoptosis and Neuroinflammation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29, 589–595.
 51. Beker, M., Gunay, N., Sarikamis, B., Cakmak, R. K., Ercin, N., Altintas, M. O., Altunay, S., Beker, M. C., Ak, D. S., & Kilic, U. (2022). Dual action of exosomes derived from in vitro A β toxicity model: the role of age for pathological response. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 104874. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.archger.2022.104874>
 52. Karakas, N., Bay, S., Türkel, N., Öztunç, N., Öncül, M., Bilgen, H., Shah, K., Sahin, F., & Öztürk, G. (2020). Neurons from human mesenchymal stem cells display both spontaneous and stimuli responsive activity. *PLoS One*, 15(5), e0228510.
 53. Srivastava, A., Yano, J., Hirozane, Y., Kefala, G., Gruswitz, F., Snell, G., Lane, W., Ivetac, A., Aertgeerts, K., Nguyen, J., & others. (2014). High-resolution structure of the human GPR40 receptor bound to allosteric agonist TAK-875. *Nature*, 513(7516), 124–127.
 54. Behera, P. M., Behera, D. K., Satpati, S., Agnihotri, G., Nayak, S., Padhi, P., & Dixit, A. (2015). Molecular modeling and identification of novel glucokinase activators through stepwise virtual screening. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 57, 122–130.
 55. Arulmozhiraja, S., Matsuo, N., Ishitsubo, E., Okazaki, S., Shimano, H., & Tokiwa, H. (2016). Comparative binding analysis of dipeptidyl peptidase IV (DPP-4) with antidiabetic drugs--an ab initio fragment molecular orbital study. *PLoS One*, 11(11), e0166275.
 56. Ebdrup, S., Pettersson, I., Rasmussen, H. B., Deussen, H.-J., Frost Jensen, A., Mortensen, S. B., Fleckner, J., Pridal, L., Nygaard, L., & Sauerberg, P. (2003). Synthesis and biological and structural characterization of the dual-acting peroxisome proliferator-activated receptor α/γ agonist ragaglitazar. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(8), 1306–1317.
 57. Wu, G., Feng, X., & Stein, L. (2010). A human functional protein interaction network and its application to cancer data analysis. *Genome Biology*, 11, 1–23.
 58. Stierand, K., & Rarey, M. (2010). Drawing the PDB: protein- ligand complexes in two dimensions. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1(9), 540–545.
 59. Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F., & Schroeder, M. (2015). PLIP: fully automated protein--ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W443--W447.
 60. Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Sayeeda, Z., & others. (2018). DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D1074--D1082.
 61. Stratton, I. M., Adler, A. I., Neil, H. A. W., Matthews, D. R., Manley, S. E., Cull, C. A., Hadden, D., Turner, R. C., & Holman, R. R. (2000). Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *Bmj*, 321(7258), 405–412.

62. Association, A. D. (2017). 6. Glycemic targets. *Diabetes Care*, 40(Supplement\1), S48--S56.
63. Iglay, K., Cartier, S. E., Rosen, V. M., Zarotsky, V., Rajpathak, S. N., Radican, L., & Tunceli, K. (2015). Meta-analysis of studies examining medication adherence, persistence, and discontinuation of oral antihyperglycemic agents in type 2 diabetes. *Current Medical Research and Opinion*, 31(7), 1283–1296.
64. Lin, L.-K., Sun, Y., Heng, B. H., Chew, D. E. K., & Chong, P.-N. (2017). Medication adherence and glycemic control among newly diagnosed diabetes patients. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 5(1), e000429.
65. Capoccia, K., Odegard, P. S., & Letassy, N. (2016). Medication adherence with diabetes medication: a systematic review of the literature. *The Diabetes Educator*, 42(1), 34–71.
66. Bommer, C., Heesemann, E., Sagalova, V., Manne-Goehler, J., Atun, R., Bärnighausen, T., & Vollmer, S. (2017). The global economic burden of diabetes in adults aged 20--79 years: a cost-of-illness study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 5(6), 423–430.
67. Günes-Bayir, A., Kocyigit, A., Güler, E. M., Bilgin, M. G., Ergün, \.Ilyas Samet, & Dadak, A. (2018). Effects of carvacrol on human fibroblast (WS-1) and gastric adenocarcinoma (AGS) cells in vitro and on Wistar rats in vivo. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 448, 237–249.
68. Aydıñ, E., Türkez, H., & Keleş, M. S. (2014). The effect of carvacrol on healthy neurons and N2a cancer cells: some biochemical, anticarcinogenicity and genotoxicity studies. *Cytotechnology*, 66, 149–157.
69. Shaw, R. J., Lamia, K. A., Vasquez, D., Koo, S.-H., Bardeesy, N., DePinho, R. A., Montminy, M., & Cantley, L. C. (2005). The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science*, 310(5754), 1642–1646.
70. McIntyre, H. D., Paterson, C. A., Ma, A., Ravenscroft, P. J., Bird, D. M., & Cameron, D. P. (1991). Metformin increases insulin sensitivity and basal glucose clearance in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, 21(5), 714–719.
71. Owen, M. R., Doran, E., & Halestrap, A. P. (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochemical Journal*, 348(3), 607–614.
72. Gunton, J. E., Delhanty, P. J. D., Takahashi, S.-I., & Baxter, R. C. (2003). Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(3), 1323–1332.
73. Kebede, M., Favaloro, J., Gunton, J. E., Laybutt, D. R., Shaw, M., Wong, N., Fam, B. C., Aston-Mourney, K., Rantza, C., Zulli, A., & others. (2008). Fructose-1, 6-bisphosphatase overexpression in pancreatic β -cells results in reduced insulin secretion: a new mechanism for fat-induced impairment of β -cell function. *Diabetes*, 57(7), 1887–1895.
74. Visinoni, S., Khalid, N. F. I., Joannides, C. N., Shulkes, A., Yim, M., Whitehead, J., Tiganis, T., Lamont, B. J., Favaloro, J. M., Proietto, J., & others. (2012). The role of liver fructose-1, 6-bisphosphatase in regulating appetite and adiposity. *Diabetes*, 61(5), 1122–1132.
75. Shukla, R., Basu, A. K., Mandal, B., Mukhopadhyay, P., Maity, A., Chakraborty, S., & Devrabhai, P. K. (2019). 11 β Hydroxysteroid dehydrogenase--1 activity in type 2 diabetes mellitus: a comparative study. *BMC Endocrine Disorders*, 19(1), 1–9.
76. Valsamakis, G., Anwar, A., Tomlinson, J. W., Shackleton, C. H. L., McTernan, P. G., Chetty, R., Wood, P. J., Banerjee, A. K., Holder, G., Barnett, A. H., & others. (2004). 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in lean and obese males with type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(9), 4755–4761.
77. Anderson, A. J., Andrew, R., Homer, N. Z., Jones, G. C., Smith, K., Livingstone, D. E., Walker, B. R., & Stimson, R. H. (2016). Metformin increases cortisol regeneration by 11 β HSD1 in obese men with and without type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(10), 3787–3793.
78. Wagner, N., & Wagner, K.-D. (2020). The role of PPARs in disease. In *Cells* (Vol. 9, Issue 11, p. 2367). MDPI.
79. Cataldi, S., Costa, V., Ciccodicola, A., & Aprile, M. (2021). PPAR γ and diabetes: beyond the genome and towards personalized medicine. *Current Diabetes Reports*, 21, 1–15.
80. Ji, X., Zhang, W., Yin, L., Shi, Z., Luan, J., Chen, L., & Liu, L. (2022). The Potential Roles of Post-Translational Modifications of PPAR γ in Treating Diabetes. *Biomolecules*, 12(12), 1832.
81. Hotta, M., Nakata, R., Katsukawa, M., Hori, K., Takahashi, S., & Inoue, H. (2010). Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression [S]. *Journal of Lipid Research*, 51(1), 132–139.
82. Okishio, S., Yamaguchi, K., Ishiba, H., Tochiki, N., Yano, K., Takahashi, A., Kataoka, S., Okuda,

- K., Seko, Y., Liu, Y., & others. (2020). PPAR α agonist and metformin co-treatment ameliorates NASH in mice induced by a choline-deficient, amino acid-defined diet with 45% fat. *Scientific Reports*, 10(1), 19578.
83. Zhou, Z., Luo, G., Li, C., Zhang, P., Chen, W., Li, X., Tang, J., & Qing, L. (2023). Metformin induces M2 polarization via AMPK/PGC-1 α /PPAR- γ pathway to improve peripheral nerve regeneration. *American Journal of Translational Research*, 15(5), 3778.
 84. Elia, E. M., Pustovrh, C., Amalfi, S., Devoto, L., & Motta, A. B. (2011). Link between metformin and the peroxisome proliferator-activated receptor γ pathway in the uterine tissue of hyperandrogenized prepubertal mice. *Fertility and Sterility*, 95(8), 2534–2537.
 85. Lu, G., Teng, X., Zheng, Z., Zhang, R., Peng, L., Zheng, F., Liu, J., Huang, H., & Xiong, H. (2016). Overexpression of a glucokinase point mutant in the treatment of diabetes mellitus. *Gene Therapy*, 23(4), 323–329.
 86. Haeusler, R. A., Camastra, S., Astiarraga, B., Nannipieri, M., Anselmino, M., & Ferrannini, E. (2015). Decreased expression of hepatic glucokinase in type 2 diabetes. *Molecular Metabolism*, 4(3), 222–226.
 87. Liu, J., Fu, H., Kang, F., Ning, G., Ni, Q., Wang, W., & Wang, Q. (2023). β -Cell glucokinase expression was increased in type 2 diabetes subjects with better glycemic control. *Journal of Diabetes*, 15(5), 409–418.
 88. Zhao, W., Chen, L., Zhou, H., Deng, C., Han, Q., Chen, Y., Wu, Q., & Li, S. (2021). Protective effect of carvacrol on liver injury in type 2 diabetic db/db mice. *Molecular Medicine Reports*, 24(5), 1–11.

