



RECEP TAYYIP  
ERDOĞAN  
ÜNİVERSİTESİ

T.C.  
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
İLERİ TEKNOLOJİLER ANABİLİM DALI

ANKİLOZAN SPONDİLİT HASTALIĞININ TEDAVİSİNE  
YÖNELİK HESAPLAMALI İLAÇ GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI

(Yüksek Lisans Tezi)

Muhammet Bahattin ŞİHLİ

Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Gözde YALÇIN ÖZKAT

RİZE  
2024

## KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İleri Teknolojiler Anabilim Dalında, Dr. Öğr. Üyesi Gözde YALÇIN ÖZKAT danışmanlığında, Muhammet Bahattin ŞIHLI tarafından hazırlanan *Ankilozan Spondilit Hastalığının Tedavisine Yönelik Hesaplamalı İlaç Geliştirme Çalışmaları* adlı bu tez çalışması, 02/02/2024 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliğiyle/oy çokluğuyla başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Ünvanı, Adı SOYADI	İmza
Başkan	: Dr. Öğr. Üyesi Gözde YALÇIN ÖZKAT	
Üye	: Prof. Dr. Fatih Şaban BERİŞ	
Üye	: Prof. Dr. İlkay YILDIZ	

## ETİK BEYAN

İleri Teknolojiler Tezli Yüksek Lisans Programından mezun olmak üzere “Ankilozan Spondilit Hastalığının Tedavisine Yönelik Hesaplamalı İlaç Geliştirme Çalışmaları” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılacak bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.

02/02/2024

Muhammet Bahattin ŞİHLİ

## ÖN SÖZ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü İleri Teknolojiler Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanan bu çalışmada "Ankilozan Spondilit Hastalığının Tedavisine Yönelik Hesaplamalı İlaç Geliştirme Çalışmaları" araştırılmıştır.

Tezin başlaması, gerçekleştirilmesi ve tamamlanması aşamalarında önerileri ve yardımını esirgemeyen danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Gözde YALÇIN ÖZKAT'a, katkılarından dolayı teşekkür ederim. Verdiğim kararlarda, maddi ve manevi her konuda yanımda olan değerli aileme yürekten teşekkür ederim.

Muhammet Bahattin ŞİHLİ  
RİZE/2024

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	I
ETİK BEYAN.....	II
ÖN SÖZ.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
KISALTMALAR.....	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
GİRİŞ.....	1
1. LİTERATÜR TARAMASI.....	4
1.1. AS Patolojisi.....	4
1.2. AS Etiyoloji.....	5
1.3. Piruvat kinaz Kas izozim M2 (PKM2).....	6
1.3.1. Aktif ve Aktif Olmayan İzomerik Piruvat Kinaz M2.....	7
1.4. Ankilozan Spondilit ve Piruvat Kinaz Kas İzozim M2.....	7
1.5. AS İçin Hâlihazırda Kullanılan İlaçlar.....	8
1.5.1. Farmakolojik Tedaviler.....	8
1.5.2. Cerrahi Tedaviler.....	10
1.5.3. Kombinatoriyal Tedavi Yaklaşımı.....	10
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	12
2.1. Materyal.....	12
2.1.1. Moleküler Kenetlenme Çalışmasında Kullanılacak Reseptörün Belirlenmesi.....	12
2.1.2. Farmakofor Modelleme Çalışmasında Kullanılacak Ligandların Belirlenmesi.....	13
2.2. Yöntem.....	14
2.2.1. Farmakofor Modelleme.....	14
2.2.2. ZINCPharmer Veri tabanı ile Farmakofora Uygun Bileşiklerin Belirlenmesi.....	15
2.2.3. ADME-Toksikoloji Tahminleri.....	15

2.2.4.Hedef Temelli İlaç Tasarımı.....	16
3. BULGULAR VE TARTIŞMALAR.....	17
3.1. Farmakofor Modelleme Sonuçları .....	17
3.1.1. PharmMapper Sonuçları.....	17
3.1.2. Ligandscout Programı ile Farmakofor Modelleme Sonuçları.....	18
3.2. ZINCPharmer Veri tabanından Elde Edilen Bileşiklerin Taranması.....	20
3.3. ADME-Toksikoloji Analizi Bulguları .....	21
3.4. Moleküler Kenetlenme Çalışması Bulguları.....	25
4. SONUÇ.....	29
KAYNAKLAR .....	30



Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Anabilim Dalı : İleri Teknolojiler

Tez Türü : Yüksek Lisans

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Gözde YALÇIN ÖZKAT

Hazırlayan : Muhammet Bahattin ŞİHLİ

Yıl : 2024

Sayfa Sayısı : 33

## ÖZET

### ANKİLOZAN SPONDİLİT HASTALIĞININ TEDAVİSİNE YÖNELİK HESAPLAMALI İLAÇ GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI

Bu tez çalışması ile, hesaplamalı olarak yürütülen çalışmalar vasıtasıyla Ankilozan Spondilit hastalığının tedavisine yönelik yeni bir ilaç önder bileşiğinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda 2 basamaklı bir yöntem kullanılarak; ilk basamakta PharmMAPPER web aracı vasıtasıyla hedefe yönelik farmakofor modelleme, ikinci basamakta ise Ligandscout programı kullanılarak ligand temelli farmakofor modelleme gerçekleştirilmiştir. Ligandscout programından alınan 10 model için ZINCPharmer veri tabanı üzerinden taramalara gerçekleştirilerek 46 adet molekül elde edilmiştir. Daha sonra, bu moleküllerin *in siliko* ortamda ADME/Tox (Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma, İtrah, Toksikite) özellikleri incelenmiş ve ligand sayısı 5'e düşürülmüştür. AutoDock Vina programı vasıtasıyla, PKM2 enzimi ile 5 adet ligand molekülün moleküler kenetleme işlemi yapılarak bağlanma afiniteleri ve bağlanma profilleri belirlenmiştir.

Tüm özellikler değerlendirildiğinde ZINC33366193, ZINC33686099, ZINC49539596, ZINC49539672, ZINC49539770 moleküllerinin Ankilozan Spondilit hastalığı için ilaç önder bileşikleri olabileceği ortaya konmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Ankilozan Spondilit, Piruvat Kinaz M2, farmakofor modelleme, Moleküler kenetlenme

**Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies**

**Department** : Advanced Technologies  
**Thesis Type** : Master Thesis  
**Supervisor** : Asst. Prof. Dr. Gözde YALÇIN ÖZKAT  
**Author** : Muhammet Bahattin ŞİHLİ  
**Year** : 2024  
**Pages** : 33

**ABSTRACT**

**COMPUTATIONAL DRUG DEVELOPMENT STUDIES FOR THE  
TREATMENT OF ANKYLOSING SPONDYLITIS DISEASE**

With this thesis, it is aimed to develop a new drug lead compound for the treatment of Ankylosing Spondylitis disease through computational studies. In this direction, using a 2-step method; In the first step, target-oriented pharmacophore modeling was performed using the PharmMAPPER web tool, and in the second step, ligand-based pharmacophore modeling was performed using the Ligandscout program. 46 molecules were obtained by scanning the ZINCPharmer database for 10 models taken from the Ligandscout program. Later, the ADME/Tox (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity) properties of these molecules were examined *in silico* environment and the number of ligands was reduced to 5. Molecular docking of 5 ligand molecules with the PKM2 enzyme was performed through the AutoDock Vina program, and their binding affinities and binding profiles were determined.

When all features are evaluated, it has been revealed that ZINC33366193, ZINC33686099, ZINC49539596, ZINC49539672, ZINC49539770 molecules may be drug lead compounds for Ankylosing Spondylitis disease.

**Keywords:** Ankylosing Spondylitis, Pyrivate Kinase M2, pharmacophore modeling, molecular docking

## KISALTMALAR

ACR/SAA/SPARTAN	:	Amerika / Spondiloartrit Araştırma ve Tedavi Ağı
ADMET	:	Absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite
AS	:	Ankilozan spondilit
CADD	:	Bilgisayar destekli ilaç tasarımı
CNV	:	Kopya sayısı varyasyonu
EULAR	:	Avrupa Romatizma Birliği
GM-CSF	:	Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
GWAS	:	Genom çapında ilişkilendirme alışmaları
HLA	:	İnsan lökosit antijeni
IBD	:	İnflamatuvar bağırsak hastalığı
IL-12	:	İnterlökin-12
ML	:	Makine öğrenimi
MS	:	Multipl skleroz
NSAID	:	Nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçları
PEP	:	Fosfoenolpiruvat
PKM2	:	Piruvat kinaz Kas izozim M2
QM	:	Kuantum mekaniği
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
TNF- $\alpha$	:	Tümör nekroz faktörü alfa
VMD	:	Visual Molecular Dynamic

## TABLÖLAR LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> PKM için farmakofor geliştirme çalışmalarında kullanılan bazı moleküllerin bileşik kodları .....	13
<b>Tablo 2.</b> PharmMapper web aracından elde edilen moleküller ve özellikleri.....	17
<b>Tablo 3.</b> PharmMapper'dan alınan moleküllerin 3D yapıları .....	18
<b>Tablo 4.</b> Farmakofor modelleme sonucu elde edilen hipotezler ve özellikleri .....	20
<b>Tablo 5.</b> ZINCPharmer veri tabanından elde edilen moleküllerin özellikleri (PKM) .....	21
<b>Tablo 6.</b> 46 bileşiğe ait ADME tahminlemesi (PKM). .....	23
<b>Tablo 7.</b> Bileşiklerin toksikoloji özellikleri (PKM). .....	25
<b>Tablo 8.</b> PKM2 için seçilen inhibitör moleküller.....	27
<b>Tablo 9.</b> Reseptör ve seçili ligandların bağlanma afiniteleri.....	28

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b> Piruvat kinaz m2 yapısı (PDB ID: 6v74) .....	12
<b>Şekil 2.</b> Model 1 ile ChEMBL605425 ve ChEMBL605428 moleküllerinin çakışması .....	19
<b>Şekil 3.</b> Oluk yapısı ve asparajin aminoasiti.....	29
<b>Şekil 4.</b> a) ZINC33366193, b) ZINC33686099, c) ZINC49539596, d) ZINC49539672, e) ZINC49539770 bileşiklerinin PKM2 ile bağlanma profilleri. ....	29
<b>Şekil 5.</b> ZINC33686099 molekülünün oluk içerisindeki çubuk ve yüzey gösterimi...	28



## GİRİŞ

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı, çağdaş klinik öncesi ilaç keşfine yönelik en önemli yaklaşımlardan biridir ve çeşitli hesaplama teknikleri ve yazılım programları, istenen sonuca ulaşmak için tipik olarak kombinasyon halinde kullanılır. CADD'ın yardımıyla birkaç onaylı ilaç geliştirilmiştir. En son trendleri yansıtmak adına en güncel veriler 2015-2020 yılları arasında elde edilmiş olup en sık kullanılan teknikler ve yazılım programları kayıt altına alınmıştır (Sabe vd., 2021).

Çeşitli platformlarda veya Linux, Mac veya Windows gibi işletim sistemlerinde kullanılabilirliği de dahil olmak üzere, bir sanal tarama programının kullanım sıklığını etkileyen çeşitli faktörler vardır. Kullanımları veya uygulamalarıyla ilgili en büyük katkıda bulunan faktörlerden biri bulunabilirlik veya lisanslamadır. Bunlar ticari, kamuya açık ücretsiz yazılımlar, akademik kullanıma yönelik ücretsiz yazılımlar ve açık kaynak arasında değişmektedir. Ligand ve protein hazırlığı için sanal tarama veya yerleştirme öncesinde kullanılan BIOVIA Discovery Studio, UCSF Chimera ve Visual Molecular Dynamic (VMD) gibi diğer popüler tamamlayıcı yazılım programlarını vurgulamak da önemlidir (Sabe vd., 2021).

İlgili uygulamaların, erken keşif adımlarının hızını muazzam bir şekilde iyileştirdiği ve ilaç benzeri kimyasal alanın aşırı uçsuz bucaksızlığı arasında arzu edilen bir terapötik ihtiyaç için uygun bileşiklerin yetkin ve rasyonel seçimine izin verdiği gösterilmiştir (Bassani ve Moro, 2023)

Makine öğrenimi (ML), farmasötik bilimciler için hiç bu kadar erişilebilir olmamıştır. Hesaplama performansı ve yüksek hızlı bilgi işlemleri, 1970'lerden bu yana katlanarak artmıştır. ML için başka modern algoritmalar da mevcuttur. Bunların ilaç ürünü geliştirmede uygulanmasına büyük ilgi vardır ve yayınlanmış veriye dayalı modelleme çalışmalarının sayısı her geçen yıl artmaktadır. Buna paralel olarak, ilaç keşfi de önceki yıllarda teknolojik olarak geliştikçe ürün geliştirme daha zorlu hale gelmiştir. Küçük moleküllü ilaç tasarımı, biyolojik hedefin ayrıntılı yapısal bilgisine dayalı öncü moleküller üretmektedir (Murray vd., 2023). Yapay zekâ, özellikle makine öğreniminin uygulanması, yeni ilaç geliştirmenin maliyetini düşürür ve ilaç keşfi ve geliştirmesinin başarı oranını artırır. Bilgisayar destekli ilaç sentezi teknolojisinin yükselişi şüphesiz ilaç sentezine kolaylıklar getirmektedir (Jia vd., 2022).

Günümüzde bilgisayar destekli ilaç keşfi (CADD), bu maliyetleri düşürmenin en etkili yöntemlerinden biridir. Post-genomik çağda CADD, büyük ölçekli genomik dizi bilgisini, protein yapı bilgisini ve küçük molekül bileşik bilgisini kullanma yeteneğine sahip hale geldi. Bu nedenle, hedef proteinleri belirlemek, ligandları aramak ve hatta absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite (ADMET) profillerini tahmin etmek için kullanılmaktadır (Yasuo, Ishida ve Sekijima, 2021)

Nihayetinde, klinik öncesi ilaç keşfinde CADD'ın başlangıcından ve uygulamasından bu yana, 70'ten fazla onaylı ilaç keşfedildi ve bu sayı zaman içinde istikrarlı bir şekilde artmaktadır. Docking yazılım programlarının çoğunun, kuantum mekaniği (QM) ve deneysel veriler tarafından yönlendirilen, bağlanma enerjisinin tahminlerini yapan kuvvet alanı hesaplamaları kullandığı bilinmektedir (Sabe vd., 2021).

Kuantum mekaniği, bilgiyle ilgili disiplinleri yeniden tanımlama potansiyeline sahip yaratıcı bir tekniktir. Kuantum süper pozisyonu ve dolanıklığın benzersiz özellikleri, klasik bilgisayarlara göre daha hızlı ve daha verimli bir hızda güçlü hesaplama ölçeği sağlayacak ve kuantum hesaplama, daha geniş endüstrilerde uygulanmak üzere geliştirilecektir. Kuantum bilgisayarlar, atomların ve parçacıkların davranışlarını inceleyen kuantum fiziğinden ilham alan gelişmiş makinelerdir. Kuantum bilgisayarlar bu parçacıkların davranışlarını inceleyerek ve kontrol ederek çalışmaktadır. Bu, klasik bilgisayarlardan hatta süper bilgisayarlardan da tamamen farklı bir şekilde yapılır (Lu vd., 2023).

Kuantum mekaniği (QM) yöntemleri 1980'lerden bu yana, DFT, MP2 ve CCSD(T) dahil olmak üzere QM yöntemleri doğruluk açısından önemli gelişmeler kaydetmiştir. Bu elektronik yapı yöntemleri hesaplamalı kimya, fizik ve materyallerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda van der Waals dispersiyonu; DFT'ye dahil edilmiştir, periyodik koşullar DFT ve MP2'ye dahil edilmiştir, bu düzeltmeler de *ab initio* hesaplama teorilerini daha doğru ve uygulanabilir hale getirmiştir (Han vd., 2021).

Ankilozan spondilit (AS), çevresel faktörlere yanıt olarak hem doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hem de edinilmiş bağışıklık sisteminin dengesinin bozulması sonucu oluşan kronik inflamatuvar romatizmal bir hastalıktır (Chen vd., 2021)

AS'nin klinik özellikleri inflamatuvar sırt ağrısı, asimetric periferik oligoartrit, entezit ve anterior üveit, sedef hastalığı ve kronik inflamatuvar barsak hastalığı gibi spesifik organ tutulumunu içerir. Başlıca klinik özellikleri sakroilit, spinal hareketlilik kaybı ve spinal inflamasyonu içerir. Kronik inflamasyon fibrozis ve ossifikasyona yol açar, burada sindesmofitler olarak bilinen kemik çıkıntıları özellikle intervertebral disklerin kenarlarında oluşur ve ankiloza neden olur (Zambrano-Zaragoza vd., 2013).

AS esas olarak aksenal iskeleti, özellikle sakroiliak ve spinal eklemleri etkileyerek ciddi kronik ağrı ve sakatlığa neden olur. İlerlemiş hastalıkta AS, omurların kaynaşmasına, hareket kabiliyetinin azalmasına ve uzun süreli sakatlığa neden olan yeni kemik oluşumu olan ankiloz ile karakterize edilir (Voruganti ve Bowness, 2020).

Moleküler yerleştirme, makro moleküler hedefin (protein, DNA veya RNA) bağlanma bölgesine bir ligand (küçük molekül) yerleştirmek için algoritma kullanma işlemidir ve bunun rasyonel yönelimini ve bağlanma konformasyonunu (bağlanma pozunu olarak da bilinir) bulur. Ligand ve hedef arasında optimal bir şekil ve özellik eşleşmesi ile sonuçlanır. Klasik bir MD simülasyonu, Newton'un hareket denklemlerini çözerek tüm atomların yörüngelerini elde etmek ve yörüngelerinden moleküllerin çeşitli özelliklerini hesaplamak için Newton mekaniğinin temel ilkelerini kullanılmaktadır (Zhao vd., 2023).

MD simülasyonu, yerleştirme sonuçlarının ve protein-ilaç kompleksinin insan vücudu koşullarında stabilitesinin doğrulanmasına yardımcı olur. Moleküler yerleştirmenin temel amacı, ilaç keşfi ve tasarım sürecinde en üst sıralarda yer alan ilaçları geliştirmektir (Uzzaman vd., 2023).

AS hastalığında hâlihazırda kullanılan ilaçlar semptomatik tedavi amacı gütmektedir. Ayrıca spesifitesi oldukça düşüktür. Bu tez kapsamında AS'ye yönelik yüksek spesifiteye sahip yeni önder bileşikler belirlenebilecektir. Ankilozan Spondilit ülkemizde ve Dünya'da pek çok bireyi etkileyen otoimmün ve otoinflamatuvar bir hastalıktır. Bu tez kapsamında Moleküler doking, *in siliko* ADME/Toksikoloji analizleri gibi bilgisayar destekli yöntemler kullanılarak AS hastalığının tedavisine yönelik yeni bileşiklerin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

## 1. LİTERATÜR TARAMASI

Kronik AS'li bazı hastalar daha fazla ankiloz ve omurga hareketsizliği geliştirerek yaşam kalitelerini önemli ölçüde düşürür. AS çoğunlukla 45 yaşından önce ortaya çıkar. AS'nin bilinen belirli bir nedeni olmasa da HLA-B27'yi (yüzlerce farklı HLA-B genden biri) taşıyan bireyler çok daha büyük risk altındadır (Sun vd., 2022). Erken teşhis ve uygun tedavi, hastalığın şiddetini ve ilerleme riskini azaltabilir (Perrotta vd., 2022)

### 1.1. AS Patolojisi

AS'nin patogenezi bilinmemektedir. Bununla birlikte, inflamasyonun tetikleyicisi, önceden belirlenmiş bir genetik geçmişe sahip bir kişide çevresel veya bakteriyel bir antijene karşı bir bağışıklık reaksiyonu olabilir. Bu, interlökin-12 (IL-12), IL-17 ve tümör nekroz faktörü alfanın (TNF- $\alpha$ ) aşırı ekspresyonunu tetikleyebilmektedir. AS de dahil olmak üzere anterior üveitin altta yatan farklı nedenleri olan hastaların serumlarında yüksek TNF- $\alpha$  seviyeleri olduğu saptanmıştır (Zhu vd., 2019).

Hastalık patofizyolojisinde yer alan genler için düzenleyici mekanizmaların ifadesi ve koordinasyonunun hücre tipine özgü olması muhtemeldir (Brown vd., 2023). AS patofizyolojisi tedavisinde son on yılda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. İmmün hücreler ve doğal sitokinlerin, özellikle insan lökosit antijeni (HLA) B27 ve interlökin 23/17 ekseninin AS patogenezinde çok önemli olduğu öne sürülmüştür. ERAP1 ve ERAP2'nin aşırı ekspresyonu da AS'nin önemli bir patogenezi olarak kabul edilir. Bu yoldaki birçok faktör ve ilgili gen sürekli olarak keşfedilmektedir. Ek olarak, ilgili araştırmalar IL-23/IL-17 eksenindeki bozukluğa ve lenfosit aktivasyonu ve farklılaşmasındaki anormalliğe odaklanmıştır. Bağışıklık hücrelerinin ve sitokinlerin çoğunun AS'nin patogenezinde yer aldığı bildirilmektedir (Zhu vd., 2019).

TNF- $\alpha$ , inflamasyon ve bozulmuş kemik homeostazı arasında olası bir bağlantı sağlayabildiği için AS patolojisinde oldukça ilginç bir sitokindir (Quaden, De Winter, ve Somers, 2016).

AS patogenezinde bakteri ve lokal mekanik stresin olası rolüne işaret edilmiştir. İlginç bir şekilde, her iki faktör de doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini

aktive edebilir. Ayrıca, genom çapında ilişkilendirme çalışmalarından (GWAS) ve kopya sayısı varyasyonu (CNV) analizlerinden tanımlanan AS duyarlılık genlerinin belirgin bir bölümünün doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bileşenlerini kodladığı gözlemlenmiştir (Vanaki vd., 2018).

Bağırsak mikrobiyotası olmak üzere birçok faktörün çok önemli olduğu keşfedildi. AS patogenezi katkıda bulunabilecek önemli bir faktör, D vitamini eksikliğidir. Kalsiyum homeostazı ve kemik sağlığının korunması için bir prohormon olarak D vitamini önemi iyi bilinmektedir. Bu vitaminin vücutta hücre büyümesi ve farklılaşmasının modülasyonu ve bağışıklık gibi diğer önemli roller oynadığını vurgulamak önemlidir. D vitamini eksikliği, otoimmün ve inflamatuvar romatizmal hastalıkların daha yüksek insidansı ile ilişkilendirilmiştir ve hastalık aktivitesini etkileyebilir (Al-Naggar vd., 2023).

Özellikle, IL-23/IL-17 yolu, hastalığın gelişiminde çok önemli bir rol oynar. Şu anda, AS'nin patogenezinin esas olarak immün T hücrelerini içerdiği kabul edilirken, B hücrelerinin de biraz dahil olduğu düşünülmektedir. B hücrelerinin aracılık ettiği AS'nin patogenezi ile ilgili bazı çalışmalar mevcuttur ve gelecekte bu konudaki çalışmalar güçlendirilebilir. Son kırk yılda, AS'nin patogenezi üzerine yapılan araştırmalar MHC genlerine odaklanmıştır. Bununla birlikte, GWAS yöntemlerinin geliştirilmesi ve önemli sayıda genetik varyantın tanımlanması, MHC olmayan genlerin önemini ortaya çıkarmıştır. HLA-B27'nin genel katkısı yalnızca ~%20 olmasına ve HLA-B27'yi önemli bir katkı yapmasına rağmen, kalıtsal riskin ~%7'si MHC olmayan varyantlardan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, MHC dışı genetik de AS'nin patogenezinde işlev görebilmektedir. Ayrıca son yıllarda AS süreçlerinde bazı yolaklar veya mekanizmaların rol oynadığı bildirilmektedir (Zhu vd., 2019).

## **1.2. AS Etiyoloji**

Otoimmün bir hastalık olarak AS, genetik arka plan ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşimler yoluyla gelişir. Son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, AS'nin etiyojisi bir dereceye kadar belirsizliğini korumaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, genetik arka plan, immün reaksiyon,

mikrobiyal enfeksiyon ve endokrin al anormallik dahil olmak üzere AS'nin ortaya çıkmasıyla ilişkili olabilecek bazı faktörleri ortaya çıkarmıştır (Zhu vd., 2019).

Hastalığı geliştirme riskinin >%90'ının genetik olarak belirlendiği gösterildiğinden, yüksek oranda kalıtsal olduğu bilinmektedir (Zambrano-Zaragoza vd., 2013).

### **1.3. Piruvat kinaz Kas izozim M2 (PKM2)**

Piruvat kinaz izozim tip M2 (PKM2), memeli hücrelerinde ifade edilen dört PK izoformundan biridir ve genellikle embriyonik izoform olarak kabul edilir, ayrıca kanserde ve lenfositler ve bağırsak epitel hücreleri gibi normal çoğalan hücrelerde de ifade edilir. PKM2, glikolizde önemli bir kontrol noktası olmasının yanı sıra, mitojenik, onkojenik ve LPS stimülasyonu üzerine, çok sayıda proglükolitik enzimin ekspresyonunu düzenlediği çekirdeğe yer değiştirir (Alves-Filho ve Pålsson-McDermott, 2016).

Piruvat kinaz, hücre metabolizmasının düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Glikolizin son ve hız sınırlayıcı adımı, fosfoenolpiruvat'ın (PEP), piruvat kinaz tarafından katalize edilen piruvat'a dönüştürülmesidir. PKM2'nin oligomerleri, yüksek aktiviteli tetramer ve düşük aktiviteli dimer formlarında bulunmaktadır. Dimer PKM2, glikoz metabolizmasını normal solunum zincirinden tümör hücrelerinde laktat üretimine kaydıran hız sınırlayıcı glikoliz adımını düzenler.

Metabolik düzenleyici rolünün yanı sıra, tümör oluşumuna katkıda bulunan protein kinaz olarak da işlev görmektedir. Hücrenin normal solunum yolundan aerobik glikolize geçmesi Warburg etkisi olarak bilinir (Zahra vd., 2020).

PKM2'nin dokuya özgü fonksiyonlarının sürekli araştırılması, daha kesin hedefleme ve potansiyel olarak daha az yan etki ile gelişmiş farmakolojik müdahaleye yol açabilmektedir. Ayrıca, PKM2'nin pankreas ve karaciğer gibi kritik metabolik dokulardaki rolünü anlamak, PKM2 ve kanseri içeren etkileşimlerin açıklığa kavuşturulmasına yardımcı olur (Puckett vd., 2021).

### **1.3.1. Aktif ve Aktif Olmayan İzomerik Piruvat Kinaz M2**

Piruvat kinaz izozimleri tip PKM1, PKL ve PKR, kararsız ve yüksek aktiviteli tetramer formlarda bulunurken, PKM2 hem oldukça aktif bir tetramer formda hem de düşük aktiviteli bir dimer formda bulunur. PKM2, glikolizde hayati bir rol oynar ve glikolizin son reaksiyonunda ATP üretimi ile fosfoenolpiruvat'ın (PEP) piruvata dönüşümünü katalize eder. PKM2, tercihli ekspresyonu ve ROS birikimi olmadan allosterik enzimatik aktivitesi ile kanser hücrelerinde *in vivo* büyüme avantajı sağlar. PKM2'nin yüksek aktivite ve düşük aktivite durumları arasındaki geçiş, allosterik düzenlemeye tabidir. Tetramerik PKM2'nin artan katalitik aktivitesi, normal bir hücrede artan ATP üretimi ve glikolitik ara ürünlerin katabolizması ile ilgilidir (Zahra vd., 2020).

### **1.4. Ankilozan Spondilit ve Piruvat Kinaz Kas İzozim M2**

Hücrel metabolizma esas olarak glikoliz, amino asit (örneğin glutaminoliz) ve yağ asidi metabolizması yoluyla çalışır. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, her T hücresi alt kümesinin tercih edilen bir metabolik yola sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca hücrel metabolizma, T hücresinin hayatta kalmasını, aktivasyonunu, farklılaşmasını ve fonksiyonunu düzenler. Th1, Th2 ve Th17 hücreleri de dahil olmak üzere kısa ömürlü efektör T hücresi alt grupları tarafından kullanılan birincil metabolik yol, aerobik glikolizdir. Saf T hücreleri, Treg hücreleri ve hafıza T hücreleri ise yağ asidi oksidasyonunu ve oksidatif fosforilasyonu (Kono, 2022).

Piruvat kinaz kas izoenzimi 2 (PKM2), glikolizin son aşamasında yer alan bir enzimdir. PKM2 aynı zamanda Th1 ve Th17 hücre farklılaşması için de bir gerekliliktir. PKM2'nin Shikonin tarafından farmakolojik olarak inhibisyonu Th1 ve Th17 hücre farklılaşmasını azaltır ve EAE'de hastalık aktivitesini iyileştirir. TEPP-46'nın PKM2 tetramerizasyonunu indüklediği, PKM2 nükleer translokasyonunu bloke ettiği ve EAE gelişiminin yanı sıra Th1 ve Th17 polarizasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Kono, 2022).

Th17 hücreleri, sitokin IL-17A, IL-17F ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörün (GM-CSF) üretimi ile karakterize edilen bir CD4 + T yardımcı hücre alt kümesidir. STAT3'ün fosforilasyonunu ve RAR ile ilişkili yetim reseptör gama

(ROR $\gamma$ t ) transkripsiyonunu indükleyerek Th17 hücre farklılaşmasını yönlendirmek için sitokin ortamları IL-6, TGF- $\beta$ 1 ve IL-23 ile birleştirilmiş T hücresi reseptörü ( TCR ) sinyali , Th17 hücrelerinin soya özgü transkripsiyon faktörü. Th17 hücreleri, epitelyal bütünlüğü korumak ve homeostazda konakçıları hücre dışı bakteri ve mantar enfeksiyonlarından korumak için bağırsak mukozal bariyerinde bol miktarda bulunur. Bununla birlikte, kontrolsüz Th17 hücre tepkileri, multipl skleroz (MS), inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD), sedef hastalığı ve ankilozan spondilit (AS) dahil olmak üzere otoimmün inflamasyona yol açar. Th17 hücre farklılaşmasını ve patojenitesini yöneten mekanizmaların anlaşılması, Th17 hücresiyle ilişkili birçok otoimmün hastalığın tedavisi için potansiyel terapötik müdahale sağlayabilir (Chen vd., 2022).

Piruvat kinaz izoformu 2 (PKM2), fosfoenolpiruvatın (PEP) piruvata dönüşümünü katalize eden glikolitik bir enzimdir ve makrofajda metabolik yeniden programlamanın önemli bir belirleyicisi olduğu gösterilmiştir. PKM2'nin dimerik ve monomerik formları, tetramerik izoformdan enzimatik olarak daha az aktiftir ve çekirdeğe yer değiştirebilirler; burada glikolitik gen ekspresyonunu düzenlemek için HIF1a ile etkileşime girebilirler. Buna karşılık, tetramerik PKM2 sitozolde lokalizedir ve glikolizin son aşamasını katalize etme işlevi görür: fosfoenolpiruvatın PKM1 aktivitesi ile gereksiz piruvat'a dönüştürülmesi. Th17 hücre farklılaşması sırasında, PKM2'nin enzimatik aktivitesinin shikonin tarafından inhibe edilmesinin, hem glikolizi hem de proinflamatuvar sitokin üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Chen vd., 2022).

## **1.5. AS İçin Hâlihazırda Kullanılan İlaçlar**

### **1.5.1. Farmakolojik Tedaviler**

AS tedavisinin amacı, omurga esnekliğini ve normal duruşu iyileştirmek ve sürdürmek, semptomları hafifletmek, fonksiyonel sınırlamaları azaltmak ve komplikasyonları azaltmaktır. Farmakolojik tedavinin temel dayanakları nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçları (NSAID'ler) ve TNF- $\alpha$  inhibitörlerini (TNFi'ler) içerir. Ek tedaviler arasında TNFi olmayan biyolojik maddeler (secukinumab), metotreksat ve sülfasalazin bulunur (Zhu vd., 2019).

En az iki NSAIDS'in başarısız olduğu hastalarda aktif AS tedavisi için TNF-  $\alpha$  inhibitörleri (TNFi) önerilmektedir. Sitokin TNF- $\alpha$ 'nın osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunu aktive ettiği gösterilmiştir; bu nedenle, AS'de meydana geldiği bilinen TNF-  $\alpha$  yükselmesi AS'de kemik kaybını modüle edebilir. TNFi'nin, TNF-  $\alpha$  kaynaklı osteoklast stimülasyonunu azaltarak kemik rezorpsiyonunu azaltmak için hareket edebileceği varsayılmaktadır (Hinze ve Louie, 2016).

Dört TNF- $\alpha$  antagonistinin de AS ve üveitin spinal belirtilerini kontrol etmede eşit derecede etkili olduğu kanıtlanmıştır; bununla birlikte infliksimab ve adalimumabın akut üveit dahil olmak üzere hastalığın omurga dışı özelliklerinin tedavisinde biraz daha etkili olduğu gösterilmiştir. Bu iki ajan, özellikle infliximab, üveit alevlenmelerinin sayısını önemli ölçüde azaltır. TNF- $\alpha$  inhibitörleri de dahil olmak üzere biyolojik ajanlar, hastalığın seyrini değiştirdikleri ve üveit nüks oranını önemli ölçüde azalttığı gösterildiği için spondiloartropatilerin tedavisinde devrim yaratmıştır. TNF- $\alpha$  inhibitörleri dört monoklonal antikordan (adalimumab, certolizumab, golimumab ve infliximab) ve bir TNF-reseptör füzyon proteininden (etanersept) oluşur. TNF- $\alpha$ 'ya bağlanarak, lenfosit Fc reseptörlerine bağlanmasını önlerler. Bu nedenle hücresel bağışıklık baskılanır. Hızlı etki başlangıçlarına ve hastalığın inflamatuvar seyrini değiştirmedeki umut verici sonuçlarına ek olarak, bu ilaç sınıfı eklem hareketliliğinin ve görsel iyileşmenin iyileşmesine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur ve monoterapi olarak kullanılabilir (Ebrahimiadib ve diğ., 2021).

Anatomik patoloji bulguları göz önünde bulundurularak adalimumab kesilerek kortikosteroid tedavisi başlatılmıştır. 3 gün intravenöz 500 mg metilprednizolon ardından 20 mg/gün idame dozuna ulaşana kadar azalan dozlarda oral prednizon başlatılmıştır. 6 ayda CK seviyeleri 120-130 IU/L'ye düşmüş ve kas ağrısı devam etmesine rağmen motor defisitlerde hafif bir iyileşme oluşturulmuştur. Azatiyoprin 50 mg/12 h ağrıyı düşük düzeyde iyileştirmiştir (Douds vd., 2019).

Lokal glukokortikoid enjeksiyonları, entesopati ve artrit tedavisi için bir seçenek gibi görünmektedir. İlgili periferik eklemlere, sakroiliak eklemlere veya entezlere glukokortikoid enjeksiyonları, ani semptomlarda rahatlama sağlayabilir. Önceki çalışmalar, kısmen artmış osteoporoz, hiperlipidemi ve insülin direnci riskleri nedeniyle, sistemik glukokortikoidlerle uzun süreli tedavinin nispeten kontrendike olduğunu göstermiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, AS hastalarının yüksek

dozda glukokortikoidlerle (50 mg/gün) kısa süreli tedaviden sonra belirti ve semptomlardan kurtulduğunu bildirilmiştir (Zhu vd., 2019).

### **1.5.2. Cerrahi Tedaviler**

Tedavi edilmeyen AS, spinal deformiteye neden olabilir ve AS hastalarının %30'undan fazlası torakolomber kifozdan muzdariptir. Düzeltici osteotomi ve stabilizasyon, cerrahi prosedürlerde çok yaygındır ve şiddetli kifoz veya ilerlemiş kalça artritli olan yetişkin hastalar gibi belirli koşullar altında tavsiye edilir. Bu prosedürün perioperatif mortalite oranı %4 ve kalıcı nörolojik sekel oranı %5'tir. 202 Bu ameliyatın, ilerleyici deformitenin doğal süreçlerinin önlenmesine, kas yorgunluğunun neden olduğu ağrının azaltılmasına, sakatlığın iyileştirilmesine, genel dengenin ve yatay görüş ekseninin yeniden sağlanmasına ve solunum ve sindirim fonksiyonunun iyileştirilmesine katkıda bulunduğu onaylanmıştır (Zhu vd., 2019).

### **1.5.3. Kombinatoriyal Tedavi Yaklaşımı**

Kore Ulusal Sağlık Sigortası Sistemi, veri setini kullanarak 2006'dan 2016'ya kadar Kore'de AS için tedavi eğilimleri üzerine bir çalışma yürüttü. En çok reçete edilen ilaçlar non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAID) idi, bunu DMARD'lar ve TNF $\alpha$  inhibitörleri izledi. 10 yıllık çalışma döneminde TNF $\alpha$  inhibitörleri için reçeteler %10'dan %35'e yükseldi. AS kombinasyon tedavisinde NSAİİ+DMARD 2006 yılında tüm ilaç tedavilerinin %90'ını oluştururken bu oran 2016'da %65'e düşmüş, TNF $\alpha$  inhibitörü+NSAİİ kullanımını ise %3'ten %28'e çıkarmıştır. İlaç kullanımındaki bu değişiklik, TNF $\alpha$  inhibitörünün ulusal sigorta kapsamına kabulüne karşılık gelmektedir. 1.352 AS hastasının yer aldığı iki yıllık retrospektif bir çalışmada TNF $\alpha$  inhibitörünün doz azalmıştır %17.8 oranında bulunmuştur ve tıbbi maliyetler %30 oranında azalmıştır (Kwon vd., 2022).

Secukinumab, aktif AS'nin tedavisi için onaylanmış sınıfının birincisi bir IL-17A inhibitörüdür. Secukinumabın ABD'de onaylanmasından önce yayınlanan America/Spondyloarthritis Research and Treatment Network (ACR/SAA/SPARTAN) kılavuzları, NSAID'lerle birinci basamak tedaviye rağmen hastalığı aktif kalan AS hastaları için TNF $\alpha$  inhibitörlerini kuvvetle tavsiye etmektedir. Ancak, şu anda secukinumab, JAK inhibitörü tofasitinib ve TNF $\alpha$  inhibitörü biyobenzerler dahil

olmak üzere yeni tedavi seçeneklerini dahil etmek için güncellenmiş tavsiyeler geliştirilmektedir. Yakın zamanda güncellenen ASAS-European League Against Rheumatism (EULAR) kılavuzları, geleneksel tedavilere (NSAID'ler dahil) rağmen sürekli olarak yüksek hastalık aktivitesi olan hastalarda biyolojik hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçların (yani TNF inhibitörleri ve IL-17 inhibitörleri) düşünülmesini önermektedir (Blair, 2019).



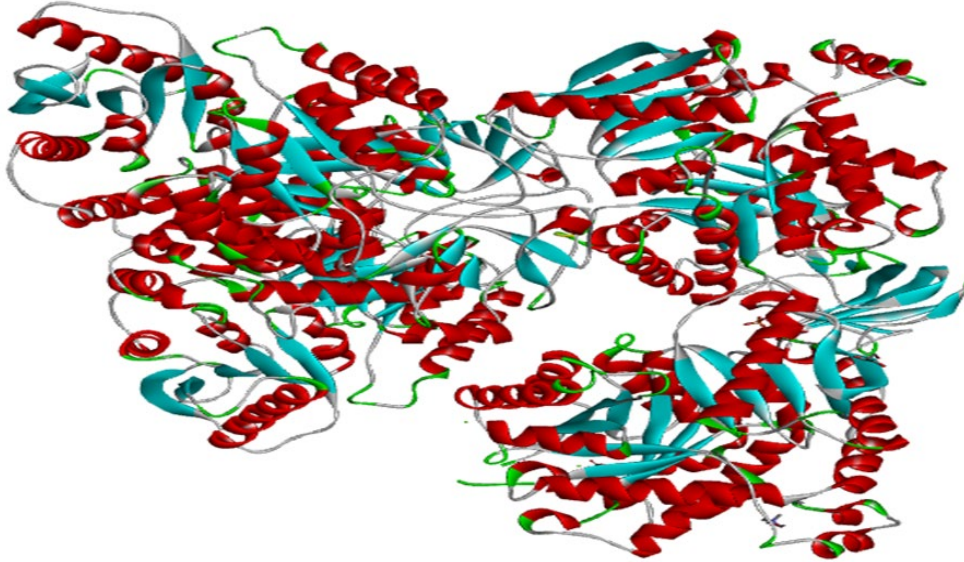
## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Moleküler Kenetlenme Çalışmasında Kullanılacak Reseptörün Belirlenmesi

Reseptörlerin tayini için RCSB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics) protein veri tabanı ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) kullanılmıştır. Reseptörlerin aktif kısımları, X-RAY rezolüsyonları ve içerdikleri inhibitör moleküller gözden geçirilerek en elverişli 3 boyutlu protein yapıları seçilmiştir.

Piruvat kinaz m2 reseptörüne ait 3 boyutlu (3D) yapılar gözden geçirilerek PDB ID: 6V74 (Nandi ve Dey, 2020) çalışma için en elverişli 3D yapı olarak tayin edilmiştir. *Homo sapiens*'ten yalıtılmış olan 3D yapıdaki reseptör proteini, *Escherichia coli* ekspresyon sisteminde ifade edilmiştir. Kristal yapının saptanmasında, X-RAY Kırınım Kristalografi yöntemi kullanılmıştır, rezolüsyon değeri 2,32 Å'dur. Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Piruvat kinaz m2 yapısı (PDB ID: 6v74)

### 2.1.2. Farmakofor Modelleme Çalışmasında Kullanılacak Ligandların Belirlenmesi

BindingDB (Liu vd.,2007) veri tabanı aracılığıyla çalışmada kullanılacak ligandlar tayin edilmiştir. BindingDB veri tabanında pkm'i modüle eden 173 adet molekül tayin edilmiştir. Tablo 1'de verilen moleküller ile farmakofor geliştirme çalışmaları uygulanmıştır.

**Tablo 1.** PKM için farmakofor geliştirme çalışmalarında kullanılan bazı moleküllerin bileşik kodları

Bileşik Kodları			
CHEMBL6922	CHEMBL15870	CHEMBL1358228	CHEMBL1938914
CHEMBL28013	CHEMBL16171	CHEMBL1376335	CHEMBL1938915
CHEMBL 26	CHEMBL16807	CHEMBL1377752	CHEMBL1938916
CHEMBL 141	CHEMBL19612	CHEMBL1397295	CHEMBL1938917
CHEMBL28	CHEMBL31574	CHEMBL1413238	CHEMBL1938918
CHEMBL35	CHEMBL32749	CHEMBL1509101	CHEMBL1939074
CHEMBL49	CHEMBL129451	CHEMBL1514868	CHEMBL1939075
CHEMBL50	CHEMBL138649	CHEMBL1877309	CHEMBL1939076
CHEMBL62	CHEMBL276915	CHEMBL1938901	CHEMBL1939077
CHEMBL97	CHEMBL294009	CHEMBL1938902	CHEMBL1939078
CHEMBL98	CHEMBL331627	CHEMBL1938903	CHEMBL1939079
CHEMBL100	CHEMBL450866	CHEMBL1938904	CHEMBL1939080
CHEMBL134	CHEMBL605425	CHEMBL1938905	CHEMBL1939081
CHEMBL143	CHEMBL605428	CHEMBL1938906	CHEMBL1939092
CHEMBL142	CHEMBL606006	CHEMBL1938907	CHEMBL1939093
CHEMBL590	CHEMBL606059	CHEMBL1938908	CHEMBL1939094
CHEMBL1414	CHEMBL606476	CHEMBL1938909	CHEMBL1939095
CHEMBL9470	CHEMBL1084625	CHEMBL1938910	CHEMBL1939096
CHEMBL1089334	CHEMBL1085587	CHEMBL1938911	CHEMBL1939097
CHEMBL1311880	CHEMBL1085588	CHEMBL1938912	CHEMBL1939098
CHEMBL1939099	CHEMBL1939100	CHEMBL1938913	CHEMBL1939101
CHEMBL4128346	CHEMBL4128501	CHEMBL4128703	CHEMBL4128827
CHEMBL1939091	US10252984	CHEMBL1939084	CHEMBL4128900
US9144538	US11337935	CHEMBL1939085	CHEMBL4128970
CHEMBL5187654	CHEMBL1939090	CHEMBL1939086	CHEMBL4129013
CHEMBL5189727	CHEMBL1939082	CHEMBL1939087	CHEMBL4129165

**Tablo 1 (Devam).** PKM için farmakofor geliştirme çalışmalarında kullanılan bazı moleküllerin bileşik kodları

CHEMBL5189951	CHEMBL1939083	CHEMBL1939088	CHEMBL4129306
CHEMBL5190040	CHEMBL5200796	CHEMBL1939089	CHEMBL4128010
CHEMBL5191355	CHEMBL5201754	CHEMBL3142968	CHEMBL4125882
CHEMBL4127929	SMR000387068	CHEMBL3142978	CHEMBL4126021
CHEMBL4218770	SMR000440556	CHEMBL3339205	CHEMBL4126536
CHEMBL5178887	US8877791, A1	CHEMBL3609603	CHEMBL4126628
CHEMBL5179096	CHEMBL4877010	CHEMBL3727658	CHEMBL4126776
CHEMBL5170943	CHEMBL3732472	CHEMBL4126950	CHEMBL4127769
CHEMBL5171047	CHEMBL4125726	CHEMBL4127005	CHEMBL4127909
CHEMBL4127111	CHEMBL4129726	CHEMBL1939121	CHEMBL1939116
CHEMBL4127266	CHEMBL4130043	CHEMBL2385099	CHEMBL1939117
CHEMBL4127315	CHEMBL4130187	CHEMBL2386917	CHEMBL1939118
CHEMBL4127501	CHEMBL4130222	CHEMBL3104587	CHEMBL1939119
CHEMBL4127576	CHEMBL4130279	CHEMBL4129340	CHEMBL1939120
CHEMBL1939102	CHEMBL1939106	CHEMBL1939109	CHEMBL1939112
CHEMBL1939103	CHEMBL1939107	CHEMBL1939110	CHEMBL1939113
CHEMBL1939104	CHEMBL1939108	CHEMBL1939111	CHEMBL1939114
CHEMBL1939115			

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Farmakofor Modelleme

#### 2.2.1.1. PharmMapper

BindingDB veri tabanından elde edilen inhibitör moleküller PharmMapper web aracına (Wang vd.,2017) yüklenmiştir. PharmMapper çevrimiçi aracı, sorgulanan bileşiğe karşı kendi veri tabanındaki bir farmakofor modeli ters farmakofor yoluyla eşleştiren bu sayede potansiyel ilaç hedefinin tanımlanmasına yönelik bir web sunucusudur. PKM2'ye özgü moleküller web aracına yüklenerek PKM2 hedefine yönelik farmakofor modelleriyle eşleşmeleri incelenmiştir.

### **2.2.1.2. Ligandscout**

Ligandscout programının (Wolber ve Langer, 2005) deneme sürümü kullanılarak PharmMapper'dan alınan 10 molekül üzerinden farmakofor hipotezleri elde edilmiştir. Programın "Create ligand-based 3D pharmacophores" protokolü uygulanmış ilk basamakta 3 boyutlu kümeleme gerçekleştirilmiş bu işlem için "default" parametreler kullanılmış, kümeleme mesafesi 0,4 kümeleme mesafesi hesaplama yöntemi "AVARAGE" olarak belirlenmiştir. Bu sayede moleküller arasındaki özellikler eşleştirilerek model özelliklerinin belirlenmesi için ilk basamak gerçekleştirilmiştir. İkinci basamakta ise eşleşen özelliklere uygun 10 tane farmakofor modeli bulunmuştur. Bu işlem için yine "default" parametreler kullanılarak, "Pharmacophore fit and atom overlap" skorum fonksiyonu ve "Merged feature pharmacophore" farmakofor tipi seçilmiştir.

### **2.2.2. ZINCPharmer Veri tabanı ile Farmakofora Uygun Bileşiklerin Belirlenmesi**

Hipotezler ZINCPharmer (Koes ve Camacho, 2012) web aracı kullanılarak hipotezler ile yüksek çakışma sağlayan moleküller tayin edilmiştir. İkinci basamakta moleküller düşük Kök Ortalama Kare Hatası (RMSD) değeri, düşük moleküler ağırlık ve yüksek döndürülebilir bağ sayısı (Rbnds) özelliklerine göre taranarak hedef ligandlar seçilmiştir. Seçilen moleküller ADME-Toksikoloji tahminlemesine alınmıştır.

### **2.2.3. ADME-Toksikoloji Tahminleri**

ADME (Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma, Atılım) özellikleri klinik yönden çok önemlidir. İlaç özelliği gösterebilmesi için molekülün Lipinski yasalarına uyması gerekir. Lipinski yasalarına göre; molekülün ağırlığı 500 Da'dan küçük, hidrojen bağı donörü adedi 5'ten küçük, hidrojen bağı akseptörü adedi 10'dan küçük, MLogP değeri 4'ten küçük değerlerde olmalıdır. Çalışma kapsamında SwissADME (Diana vd., 2017) veri tabanından faydalanarak ADME-Toksikoloji analizi yapılmıştır. Moleküllerin logP değerleri, moleküler ağırlık, H-bağı akseptör ve donör adetleri, biyoyararlanım skoru, moleküler polar yüzey alanı, plazma proteinlerine tutunma, CYP2D6

inhibisyonu, insan intestinal sisteminde emilim ve kan beyin bariyerinden geçiş özellikleri araştırılmıştır.

#### **2.2.4. Hedef Temelli İlaç Tasarımı**

Moleküler doking (kenetleme), reseptör ve ligand arasındaki etkileşimi hesaplamalı şekilde analiz eden bir yöntemdir. Moleküllerin bağlanma afinitesinin ve bağlanma konformasyonunun tayin edilmesi hedeflenmektedir. Moleküler kenetleme çalışmaları, ADME-Toksikoloji tahminlemesi neticesinde en başarılı görülen ligandlar ile, AutodockVina (Trott ve Olson, 2010) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reseptör olarak PKM2 için PDB ID: 6V74 kodlu yapı kullanılmıştır.

Discovery Studio Visualizer (Dassault Systèmes, 2019) programı aracılığıyla reseptörler hazırlanmıştır. 3 boyutlu 6V74 yapısının içerisindeki heteroatomlar (su molekülleri, ligandlar vb.) çıkarılmıştır, protein yapı kaydedilmiştir. Yapı içerisindeki ligand olan asparajin aminoasiti ve ADME-Toksikoloji tahminlemesi sonucunda en başarılı görülen ligandlar, Discovery Studio Visualizer 2020 programı aracılığıyla çizilip “clean geometry” seçeneğiyle düzeltilmiştir.

Ardından reseptör protein, orijinal ligand molekül ve tüm ligand moleküller Autodock Tools (Morris vd., 2009) paketi kullanılarak doking için uygun hale getirilmiştir. Proteinlere polar hidrojenler ve Gasteiger yükleri eklenip “pdbqt” formatında kaydedilmiştir. Küçük moleküller ise programın “Ligand” modülü vasıtasıyla “pdbqt” formatında düzenlenmiştir.

Reseptörler ile ligandların bağlanma paketi için Autodock Tools ile Grid kutusu oluşturulmuştur. Bu işlem için ilgili programın “Grid” modülü kullanılmıştır. Piruvat Kinaz M2 (PKM2) için Grid kutusu oluşturulurken, 6V74 kodlu yapıdaki arjinin bağlanma bölgesi kaynak olarak kullanılmıştır. PKM2 için Grid kutusunun x, y, z değerleri sırasıyla 25, 25, 25 olarak; Grid kutusunun x, y, z merkezleri sırasıyla -62.763, 36.41, -9.348 olarak tayin edilmiştir. Sonrasında, reseptörler ile ligandların moleküler doking işlemi gerçekleştirilmiştir. Moleküler doking ile varılan sonuçlar AutoDock Tools’da ve Discovery Studio Visualizer programında analiz edilmiştir.

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

#### 3.1. Farmakofor Modelleme Sonuçları

Farmakofor incelemesi sonucunda, yüksek skor adedi ve fazla özellik eşleşmesi (aromatiklik, hidrofobiklik, hidrojen bağı akseptörü, hidrojen bağı donörü, negatif iyonize olma) özelliklerinden esas alınarak hipotezler tayin edilmiştir.

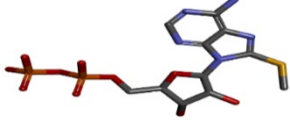
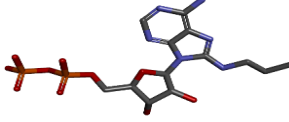
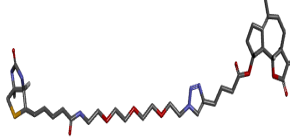
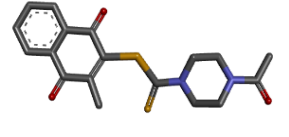
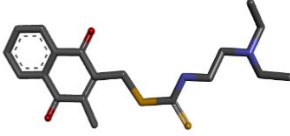
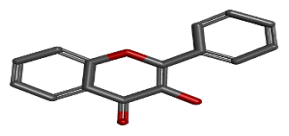
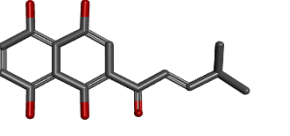
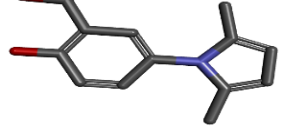
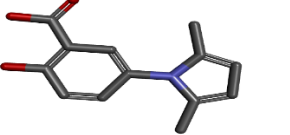
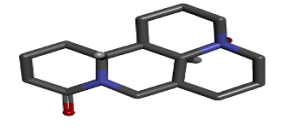
##### 3.1.1. PharmMapper Sonuçları

PKM2'ye özgü moleküller web aracına yüklenerek PKM2 hedefine yönelik farmakofor modelleriyle eşleşmeleri incelenmiş 173 bileşik içerisinde diğer hedeflere göre PKM2 ile daha yüksek potansiyelde (derece, "rank") model oluşturan 10 adet molekül seçilmiştir. Elde edilen moleküllerin dereceleri ve moleküllerin örtüşmesi muhtemel farmakofor modellerinin özellikleri Tablo 2'de verilmiştir. Tablo 3'te ise ilgili moleküllerin 3D yapıları verilmiştir.

**Tablo 2.** PharmMapper web aracından elde edilen moleküller ve özellikleri

Bileşik adı	Derece	Hidrofobik	Pozitif	Negatif	Donör	Akseptör
<b>ChEMBL605428</b>	260	3	1	2	1	2
<b>ChEMBL605425</b>	173	3	1	2	1	2
<b>ChEMBL4218770</b>	257	3	1	2	1	2
<b>ChEMBL4129726</b>	247	3	1	2	1	2
<b>ChEMBL4127266</b>	248	5	0	0	2	2
<b>ChEMBL294009</b>	204	6	2	0	2	1
<b>ChEMBL9470</b>	322	6	2	0	2	1
<b>ChEMBL 62</b>	255	3	1	2	1	2
<b>ChEMBL49</b>	255	3	1	2	1	2
<b>ChEMBL2672</b>	328	3	1	2	1	2

**Tablo 3.** PharmMapper’den alınan moleküllerin 3D yapıları

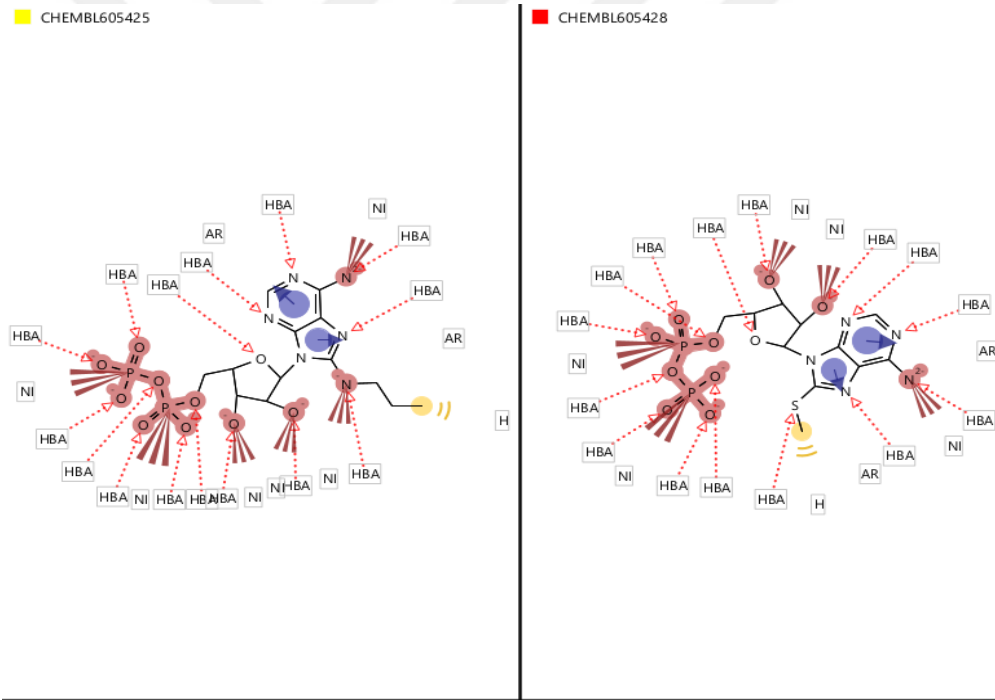
Bileşik	3 Boyutlu Yapısı	Bileşik	3 Boyutlu Yapısı
CHEMBL 605428		CHEMBL 605425	
CHEMBL 4218770		CHEMBL 4129726	
CHEMBL 4127266		CHEMBL 294009	
CHEMBL 9470		CHEMBL 62	
CHEMBL 49		CHEMBL 2672	

### 3.1.2. Ligandscout Programı ile Farmakofor Modelleme Sonuçları

Tablo 3’de verilen moleküller vasıtasıyla gerçekleştirilen farmakofor analizi sonucu Tablo 4’de verilen modelleme skorları ve farmakofor modele ait özellikler elde edilmiştir. Farmakofor modellemede en yüksek kümeleme büyüklüğüne sahip 2 molekül ve model 1’in çakışması Şekil 2’de verilmiştir.

**Tablo 4.** Farmakofor modelleme sonucu elde edilen hipotezler ve özellikleri

Model	Skor	Aromatik	Hidrofobik	H-donörü	H-akseptörü	Negatif iyonize
1	0.9886	2	2	0	15	6
2	0.9886	2	2	0	15	6
3	0.9886	2	2	0	15	6
4	0.9886	2	2	0	15	6
5	0.9886	2	2	0	15	6
6	0.9638	2	1	0	15	6
7	0.9578	2	2	0	15	6
8	0.9322	2	2	0	15	6
9	0.9287	2	2	0	15	6
10	0.9025	2	2	0	15	6



**Şekil 2.** Model 1 ile CHEMBL605425 ve CHEMBL605428 moleküllerinin çakışması

### 3.2. ZINCPharmer Veri tabanından Elde Edilen Bileşiklerin Taranması

Farmakofor modelleme sonucu elde edilen 10 farmakofor modeli ZINCPharmer veri tabanına alınmış model 1 dışındaki bütün modeller için ZINCPharmer veri tabanında çakışan hiçbir liganda rastlanmamıştır. Model 1 hipotezi ile örtüşen moleküller arasından RMSD, moleküler ağırlık ve Rbnds değerleri gözetilerek bir seçim gerçekleştirilmiş ve molekül sayısı 46'a düşürülmüştür. Moleküllerin özellikleri Tablo 5'te verilmiştir.

**Tablo 5.** ZINCPharmer veri tabanından elde edilen moleküllerin özellikleri (PKM).

RMSD	Moleküler Ağırlık	RBnds	Zinc No	RMSD	Moleküler Ağırlık	RBnds	Zinc No
0.651	451	6	49539770	0.646	486	10	33686756
0.653	465	7	33366193	0.646	466	11	33900101
0.586	205	7	86855578	0.644	486	11	33880527
0.652	431	7	49539596	0.647	500	11	33672628
0.651	465	7	49539672	0.647	466	11	33686122
0.651	447	8	49539779	0.644	500	11	33721787
0.644	456	8	33540446	0.644	500	11	33682685
0.673	386	8	63529389	0.643	500	11	33617324
0.673	440	8	63526767	0.642	500	11	49539590
0.642	456	8	38007306	0.644	466	11	49539715
0.646	500	8	33750348	0.647	500	11	33594504
0.646	436	9	33686099	0.521	402	11	20784884
0.643	470	9	33672662	0.642	466	11	33726453
0.590	434	9	39943080	0.644	514	12	33551432
0.539	400	9	78602654	0.644	480	12	33386157
0.640	470	9	33396269	0.534	373	12	78534331
0.641	470	9	33721791	0.647	482	12	33541729
0.644	470	9	33594505	0.647	482	12	33690074
0.509	404	10	46028894	0.644	482	12	33856660
0.647	486	10	33686797	0.646	480	12	33554954
0.642	486	10	33692069	0.644	480	12	33560108
0.642	486	10	33695257	0.647	496	13	33679581

### 3.3. ADME-Toksikoloji Analizi Bulguları

Hipotez 1 ile çakışan 46 molekülün ADME/toksikoloji sonuçları Tablo 6 ve Tablo 7’de verilmiştir.

**Tablo 6.** 46 bileşiğe ait ADME tahminlemesi (PKM).

Bileşik	ZINC No	Lipinski Kuralları	TPSA (Å <sup>2</sup> )	Konsensus Log Po/W	Biyo yararlanım Skoru	Log Kp (Cm/S)	GI Absorbsiyon
1	49539770	Uygun	131.14 Å <sup>2</sup>	2.23	0.55	-6.79	Yüksek
2	33366193	Uygun	131.14 Å <sup>2</sup>	2.48	0.55	-6.62	Yüksek
3	86855578	Uygun	69.61 Å <sup>2</sup>	0.62	0.55	-7.80	Yüksek
4	49539596	Uygun	131.14 Å <sup>2</sup>	2.02	0.55	-6.85	Yüksek
5	49539672	Uygun	131.14 Å <sup>2</sup>	2.48	0.55	-6.62	Yüksek
6	49539779	Uygun	140.37 Å <sup>2</sup>	1.71	0.55	-7.23	Düşük
7	33540446	Uygun	135.10 Å <sup>2</sup>	2.45	0.55	-5.99	Düşük
8	63529389	Uygun	146.04 Å <sup>2</sup>	2.95	0.55	-6.64	Düşük
9	63526767	Uygun	140.97 Å <sup>2</sup>	3.56	0.55	-5.91	Düşük
10	38007306	Uygun	135.10 Å <sup>2</sup>	2.59	0.55	-5.99	Düşük
11	33750348	Uygun	135.10 Å <sup>2</sup>	2.57	0.55	-6.21	Düşük
12	33686099	Uygun	135.10 Å <sup>2</sup>	2.37	0.55	-6.05	Yüksek
13	33672662	Uygun	135.10 Å <sup>2</sup>	2.82	0.55	-5.82	Düşük
14	39943080	Uygun	98.35 Å <sup>2</sup>	3.75	0.55	-5.32	Yüksek
15	78602654	Uygun	86.72 Å <sup>2</sup>	3.68	0.55	-5.47	Yüksek
16	33396269	Uygun	135.10 Å <sup>2</sup>	2.87	0.55	-5.82	Düşük
17	33721791	Uygun	135.10 Å <sup>2</sup>	2.90	0.55	-5.82	Düşük
18	33594505	Uygun	135.10 Å <sup>2</sup>	2.77	0.55	-5.82	Düşük
19	46028894	Uygun	101.76 Å <sup>2</sup>	2.26	0.55	-7.50	Yüksek
20	33686797	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.44	0.55	-6.19	Düşük
21	33692069	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.57	0.55	-6.19	Düşük
22	33695257	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.52	0.55	-6.19	Düşük
23	33857009	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.02	0.55	-6.43	Düşük
24	27105110	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	1.95	0.55	-6.43	Düşük
25	33686756	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.50	0.55	-6.19	Düşük
26	33880527	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.74	0.55	-6.02	Düşük
27	33900101	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.38	0.55	-6.26	Düşük
28	33672628	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.78	0.55	-6.02	Düşük

**Tablo 6 (Devam).** 46 bileşiğe ait ADME tahminlemesi (PKM).

29	33686122	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.86	0.55	-6.02	Düşük
30	33721787	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.83	0.55	-6.02	Düşük
31	33682685	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.31	0.55	-6.26	Düşük
32	33617324	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.80	0.55	-6.02	Düşük
33	49539590	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.82	0.55	-6.02	Düşük
34	49539715	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.23	0.55	-6.25	Düşük
35	33594504	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.78	0.55	-6.02	Düşük
36	20784884	Uygun	79.48 Å <sup>2</sup>	2.89	0.55	-6.73	Yüksek
37	33726453	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.37	0.55	-6.26	Düşük
38	33551432	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	3.24	0.55	-5.80	Düşük
39	33386157	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.55	0.55	-6.03	Düşük
40	78534331	Uygun	86.72 Å <sup>2</sup>	3.35	0.55	-5.63	Yüksek
41	33541729	Uygun	153.56 Å <sup>2</sup>	1.90	0.55	-6.63	Düşük
42	33690074	Uygun	153.56 Å <sup>2</sup>	2.07	0.55	-6.63	Düşük
43	33856660	Uygun	153.56 Å <sup>2</sup>	2.01	0.55	-6.63	Düşük
44	33554954	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.49	0.55	-6.03	Düşük
45	33560108	Uygun	144.33 Å <sup>2</sup>	2.67	0.55	-6.03	Düşük
46	33679581	Uygun	153.56 Å <sup>2</sup>	2.31	0.55	-6.45	Düşük

Bileşiklerin tümü Lipinski yasalarını sağlamaktadır. Model 1 ile çakışan ZINC33366193, ZINC33686099, ZINC49539596, ZINC49539672, ZINC49539770 moleküllerinin uygun ADME/Toksosite özelliklerine sahip olduğu tayin edilmiştir. Consensus Log Po/w değeri lipofilik davranışı simgeler ve değerin 5'ten küçük olması beklenir. Consensus LogPo/w değeri ZINC33366193 için 2.48, ZINC33686099 için 2.37, ZINC49539596 için 2.02, ZINC49539770 için 2.23 ve ZINC49539672 için 2.48'dir, bu değerler beklenen aralıktadır. Moleküllerin 0.1'den yüksek biyoyararlanım skoruna sahip olması gerekir, bu dört molekül de 0.55 biyoyararlanım skoruna sahiptir. TPSA değerinin 30'dan büyük olması beklenir. Bu değer ZINC33366193 molekülünde 131.14 Å<sup>2</sup>, ZINC33686099 molekülünde 135.10 Å<sup>2</sup>, ZINC49539596 molekülünde 131.14 Å<sup>2</sup>, ZINC49539672 molekülünde 131.14 Å<sup>2</sup> ve ZINC49539770 moleküllerinde 131.14 Å<sup>2</sup>'dir. Moleküller yüksek gastrointestinal absorpsiyon (GI) özelliğine sahiptir. Seçilen 5 bileşikte P-glikoprotein substrat (P-gp) özelliğine sahiptir, bu, proteinlere tutunarak gastrointestinal sistemde absorpsiyonlarının düşmesine sebep olabilmektedir. Sitokrom P (CYP) enzimleri

karaciğer fonksiyonları üzerinde etkilidir, inhibe olmamaları gerekir. CYP2D6, çoğunlukla ilaçların metabolizmasından ve eliminasyonundan görevlidir, seçili 5 molekül de CYP2D6 enzimini inhibe etmemektedir.

**Tablo 7.** Bileşiklerin toksikoloji özellikleri (PKM)

Bileşik	KBB Geçebilme	P-gp Substrat Özellik	CYP1A2 İnhibitörü	CYP2C19 İnhibitörü	CYP2C9 İnhibitörü	CYP2D6 İnhibitörü	CYP3A4 İnhibitörü
1	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
2	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
3	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
4	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
5	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
6	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
7	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
8	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Evet
9	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
10	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet
11	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
12	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Evet
13	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet
14	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
15	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
16	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet
17	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet
18	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Evet
19	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
20	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet
21	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet
22	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet
23	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Evet
24	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Evet
25	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet
26	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Evet
27	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
28	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Evet
29	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet

**Tablo 7 (Devam).** Bileşiklerin toksikoloji özellikleri (PKM)

30	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
31	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Evet
32	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Evet
33	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Evet
34	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
35	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Evet
36	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet
37	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
38	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
39	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
40	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Evet
41	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Evet
42	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
43	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
44	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
45	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
46	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet

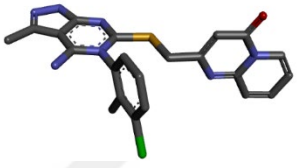
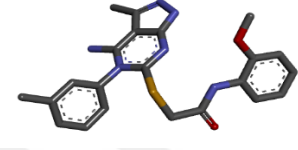
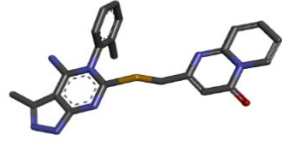
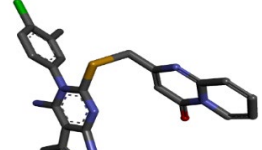
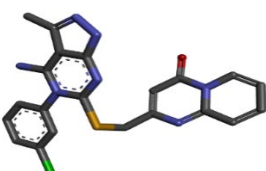
Tüm özellikler değerlendirildiğinde ZINC33366193, ZINC33686099, ZINC49539596, ZINC49539672, ZINC49539770 molekülleri moleküler kenetlenme çalışmaları için seçilmiştir.

### 3.4. Moleküler Kenetlenme Çalışması Bulguları

ADME/ Toksikoloji sonucuna göre seçilen tüm moleküller (Tablo 8) ile 6V74 reseptörlerinin bağlanma afinitesi değerleri Tablo 9’te gösterilmiştir.

Tüm ligandların RMSD değerleri ve bağlanma afiniteleri incelenerek Tablo 9’te verilen modlar için bağlanma profillerinin incelenmesine karar verilmiştir.

**Tablo 8.** PKM2 için seçilen inhibitör moleküller.

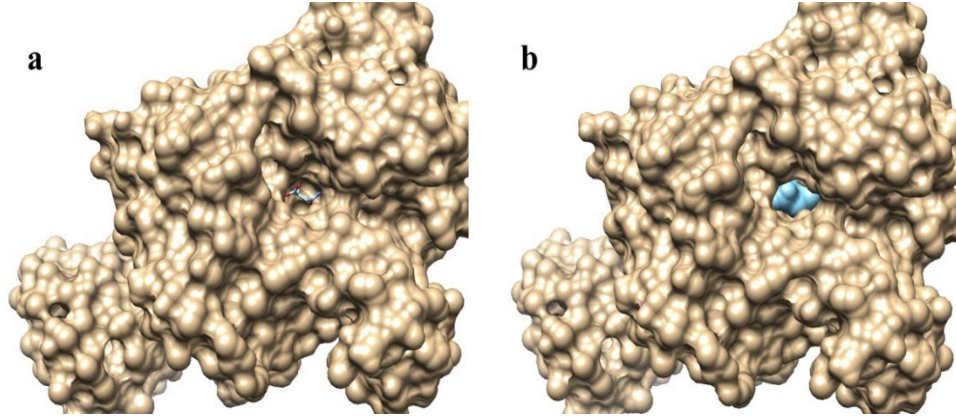
Bileşik	IUPAC Adı	3 Boyutlu Yapı
<b>ZINC33366193</b>	5-(3-Kloro-2-tolil)-3-metil-6-[(4-okzo-1,4a-diaza-2-naftil)metiltiyo]-1H-1,2,5,7-tetraazinden-5-yum-4-amin	
<b>ZINC33686099</b>	3-Metil-6-[(N-o metoksifenilkarbamol)metiltiyo]-5-(m-tolil)-1H-1,2,5,7-tetraazinden-5-yum-4-amin	
<b>ZINC49539596</b>	3-Metil-6-[(4-okso-1,4a-diaza-2-naftil)metilltiyo]-5-(o-tolil)-1H-1,2,5,7-tetraazinden-5-yum-4-amin	
<b>ZINC49539672</b>	5-(4-Kloro-3-tolil)-3-metil-6-[(4-okzo-1,4a-diaza-2-naftil)metiltiyo]-1H-1,2,5,7-tetraazinden-5-yum-4-amin	
<b>ZINC49539770</b>	5-(m-Klorofenil)-3-metil-6-[(4-okzo-1,4a-diaza-2-naftil)metilltiyo]-1H-1,2,5,7-tetraazinden-5-yum-4-amin	

**Tablo 9.** Reseptör ve seçili ligandların bağlanma afiniteleri.

Bileşik	PKM2 ile doking			
	Bağlanma modu	Bağlanma Afinitesi	En iyi moddan uzaklık (Å)	
			RMSD l.b.	RMSD U.b.
ZINC33366193	1	-7.5	0.000	0.000
	13	-6.3	2.662	3.917
	19	-6.2	2.714	4.744
ZINC33686099	1	-6.5	0.000	0.000
	11	-6.0	2.306	5.950
	18	-5.5	2.139	6.215
ZINC49539596	1	-7.4	0.000	0.000
	4	-6.8	2.385	3.714
	13	-6.4	2.660	5.248
ZINC49539672	1	-7.7	0.000	0.000
	5	-7.1	2.497	6.403
	11	-6.8	2.075	3.147
ZINC49539770	1	-7.5	0.000	0.000
	6	-6.9	2.647	6.668
	17	-6.5	2.630	4.587
İnhibitör	1	-4.6	0.000	0.000
	6	-3.5	2.678	5.331
	4	-3.7	2.682	4.852

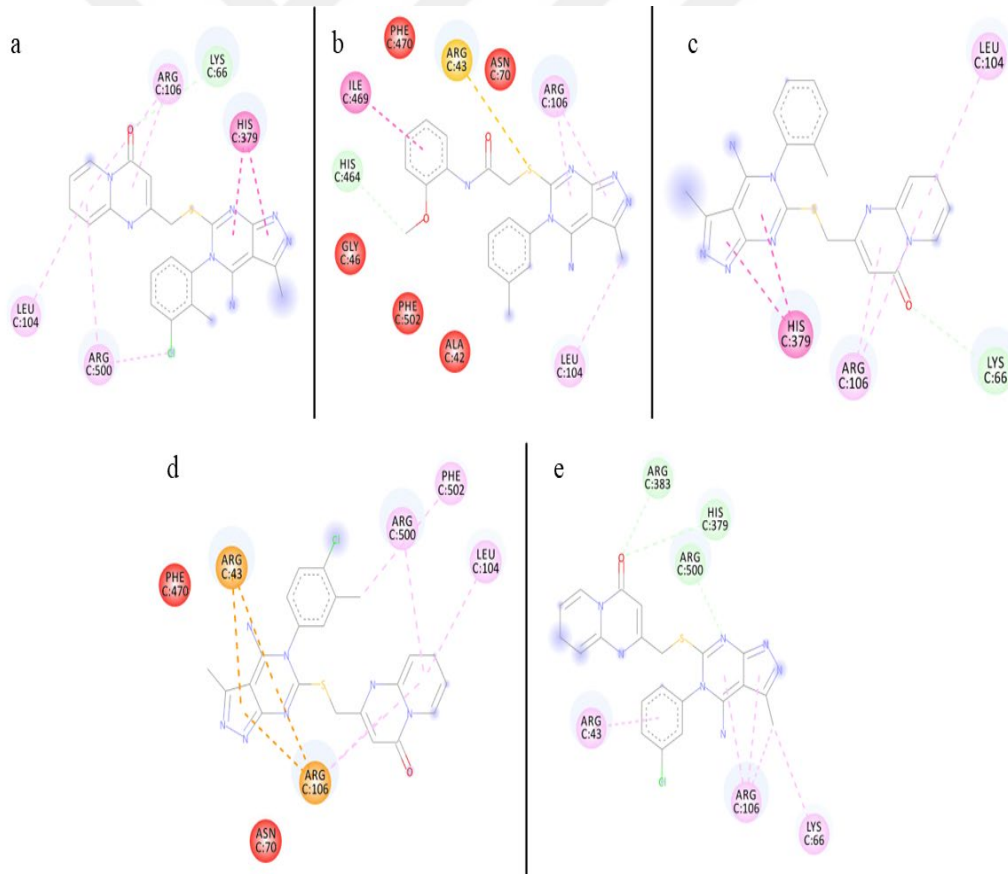
Tablo 9 incelendiğinde ZINC49539672 kodlu bileşiğin ilk bağlanma modunun afinitesinin -7.7 kcal/mol olduğu belirlenmiştir. ZINC33366193, ZINC33686099, ZINC49539596, ZINC49539770 moleküllerinin ise en yüksek bağlanma skorları sırasıyla -7.5, -6.5, -7.4 ve -7.5 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

Chimera programı vasıtasıyla asparajinin bağlı bulunduğu oluk yapısı incelenmiş, bu oluk yapısının farklı bileşikler tarafından kapatılma biçimi incelenmiştir. Şekil 3'te PKM2 de bağlanma bölgesini oluşturan oluk yapısı ve Asparajin aminoasiti hem çubuk modeliyle hem de kapanmanın anlaşılması için yüzey modeliyle gösterilmiştir.



**Şekil 3.** Oluk yapısı ve asparajin aminoasiti

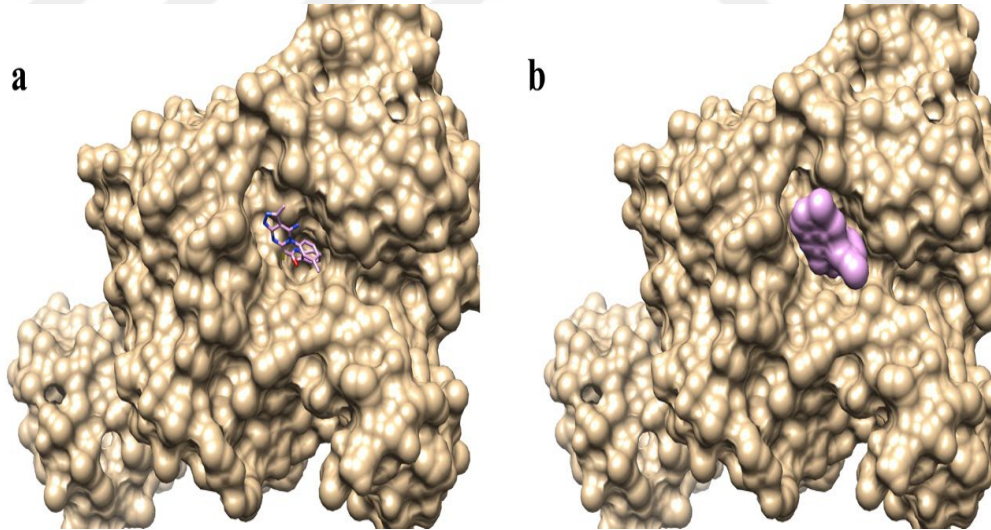
Piruvat kinaz Kas izozim M2 (6V74) ile 5 bileşiğin bağlanma profili Şekil 3'te verilmiştir.



**Şekil 4.** a) ZINC33366193, b) ZINC33686099, c) ZINC49539596, d) ZINC49539672, e) ZINC49539770 bileşiklerinin PKM2 ile bağlanma profilleri

Şekil 4'teki gösterimde sarı noktalar sülfür etkileşimlerini, turuncu noktalar pi-pi etkileşimlerini, açık pembe noktalar alkil ve pi-alkil etkileşimlerini, koyu pembe noktalar pi-pi küme etkileşimleri ile pi-amid etkileşimlerini, yeşil noktalar ise karbon-hidrojen bağlarını ifade etmektedir. Buna göre bağlanma paketindeki bütün moleküllerin etkileşimlerle sıkıca paketlenmiş olduğu ortadadır. ZINC49539672 kodlu molekül hariç bütün moleküller karbon hidrojen bağı yapmış olmasının yanısıra ZINC49539770 molekülünün His379, Arg383 ve Arg500 aminoasitleri ile 3 adet hidrojen bağı gerçekleştirdiği gözlenmiştir. Öte yandan Leu104 aminoasiti ise pi ve pi-alkil etkileşimleri açısından oldukça önemli bir aminoasit olarak belirlenmiştir. Bunun yanısıra ZINC33366193 ve ZINC49539672 molekülleri Arg500 aminoasiti ile pi ve pi-alkil etkileşimi gerçekleştirirken, ZINC49539770 hidrojen bağı gerçekleştirmiştir.

Aynı zamanda bütün bileşiklerin oluk içerisindeki konumları incelenmiş, ZINC33686099 molekülü hariç bütün bileşiklerin oluk dışarısında kaldığı gözlenirken ZINC33686099'un oluğu asparajine benzer biçimde kapattığı tespit edilmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. ZINC33686099 molekülünün oluk içerisindeki çubuk ve yüzey gösterimi

#### 4. SONUÇ

Bu çalışma kapsamında ligand temelli ve hedef temelli yöntemler kullanılarak yeni bir Ankilozan Spondilit ilaç aday molekülü geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmada 2 basamaklı bir farmakofor modelleme çalışması gerçekleştirilmiş, ilk basamakta PharmMapper web aracı kullanılarak ilk veri setindeki 173 molekül içerisinde farmakofor modelleme uygun veri setini oluşturacak 10 molekül seçilerek Ligandscout programı vasıtasıyla 10 adet farmakofor modeli elde edilmiştir.

ZINCPharmer veri tabanı vasıtasıyla, tüm farmakofor modelleri uygun moleküller taranarak 46 adet molekül bulunmuştur. Daha sonra bu moleküller arasında ADME/Toksikoloji özellikleri üzerinden bir inceleme yürütülmüştür. İnhibitörlerin KBB'yi geçebilmesine ve CYP2D6 enzimini inhibe etmemesine dikkat edilerek S1P1 çalışma seti için inhibitör sayısı 5'e (ZINC33366193, ZINC33686099, ZINC49539596, ZINC49539672, ZINC49539770) düşürülmüştür.

Bu 5 inhibitör ile gerçekleştirilen moleküler kenetlenme sonuçlarına bakıldığında her ne kadar ZINC49539672 molekülü en yüksek bağlanma afinitesini -7.7 kcal/mol vermiş olsa da oluk yapısı üzerindeki etki ve bağlanma profili incelendiğinde ZINC33686099 molekülü daha etkili bulunmuştur.

Sonuç olarak, çalışmalarımız kapsamında her 5 molekülün de (ZINC33366193, ZINC33686099, ZINC49539596, ZINC49539672, ZINC49539770) potansiyel ilaç öncül molekül olabileceği düşünülmektedir.

5 farklı molekül içerisinde özellikle bağlanma afinitesi en yüksek olan ZINC49539672 molekülü ve literatüre oldukça uygun olan ZINC33686099 moleküllerinin moleküler dinamik simülasyonlarıyla ve farklı simülasyon yöntemleriyle incelenmesi önerilmektedir. Devamında, molekül ile *in vitro* ve *in vivo* deneyler yapılmalı ve başarılı bulunmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Al-Naggar, E. M., El-Sawy, S. S., Abdo, D. M., Attia, D. H., & ElSawy, W. S. (2023). Vitamin D level in ankylosing spondylitis male patients: A potential association with the functional status and platelet count. *The Egyptian Rheumatologist*, 45(4), 289–293. <https://doi.org/10.1016/j.ejr.2023.07.001>
- Alves-Filho, J. C., & Pålsson-McDermott, E. M. (2016). Pyruvate Kinase M2: A Potential Target for Regulating Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00145>
- Bassani, D., & Moro, S. (2023). Past, Present, and Future Perspectives on Computer-Aided Drug Design Methodologies. *Molecules*, 28(9), 3906. <https://doi.org/10.3390/molecules28093906>
- Blair, H. A. (2019). Secukinumab: A Review in Ankylosing Spondylitis. *Drugs*, 79(4), 433–443. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01075-3>
- Brown, A. C., Cohen, C. J., Mielczarek, O., Migliorini, G., Costantino, F., Allcock, A., . . . Knight, J. C. (2023). Comprehensive epigenomic profiling reveals the extent of disease-specific chromatin states and informs target discovery in ankylosing spondylitis. *Cell Genomics*, 3(6), 100306. <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2023.100306>
- Chen L, Morrow JK, Tran HT, Phatak SS, Du-Cuny L, Zhang S., 2012. From laptop to benchtop to bedside: structure-based drug design on protein targets. *Current Pharmaceutical Design*, 1217–39.
- Chen, C. W., Wei, J. C. C., Gu, J., & Yu, D. (2021). Editorial: Advances in Pathogenesis, Etiology, and Therapies for Ankylosing Spondylitis. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.822582>
- Chen, C., Zhang, W., Zhou, T., Liu, Q., Han, C., Huang, Z., Chen, S., Mei, Q., Zhang, C., Zhang, K., Ma, H., Zhou, R., Jiang, W., Pan, W., & Zhu, S. (2022). Vitamin B5 rewires Th17 cell metabolism via impeding PKM2 nuclear translocation. *Cell Reports*, 41(9), 111741. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111741>
- Daina, Antoine, Olivier Michielin, ve Vincent Zoete. 2017. “SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules.” *Scientific Reports* 7:1–13. doi: 10.1038/srep42717.
- Dassault Systèmes. 2019. “Discovery Studio Visualizer.”

- Douds, J. J., Johnson, J. E., Abel, T. W., Greer, J. P., Thompson, M. A., & Kovach, A. E. (2019). Post-transplant lymphoproliferative disorder manifesting as lymphomatoid granulomatosis: report of two cases and review of the literature highlighting current challenges in pathologic classification. *Journal of Hematopathology*, *12*(3), 149–156. <https://doi.org/10.1007/s12308-019-00364-w>
- Ebrahimiadib, N., Berijani, S., Ghahari, M., & Pahlaviani, F. G. (2021, July 29). *Ankylosing Spondylitis*. <https://doi.org/10.18502/jovr.v16i3.9440>
- Han, Y., Ali, I., Wang, Z., Cai, J., Wu, S., Tang, J., . . . Li, J. (2021). Machine learning accelerates quantum mechanics predictions of molecular crystals. *Physics Reports*, *934*, 1–71. <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2021.08.002>
- Hinze, A. M., & Louie, G. H. (2016). Osteoporosis Management in Ankylosing Spondylitis. *Current Treatment Options in Rheumatology*, *2*(4), 271–282. <https://doi.org/10.1007/s40674-016-0055-6>
- Jia, P., Pei, J., Wang, G., Pan, X., Zhu, Y., Wu, Y., & Ouyang, L. (2022). The roles of computer-aided drug synthesis in drug development. *Green Synthesis and Catalysis*, *3*(1), 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.gresc.2021.11.007>
- Koes, D. R. ve Carlos J. C., 2012. “ZINCPharmer: Pharmacophore Search of the ZINC Database.” *Nucleic Acids Research* *40*(W1): 409–14. doi: 10.1093/nar/gks378.
- Kono, M. (2022). New insights into the metabolism of Th17 cells. *Immunological Medicine*, *46*(1), 15–24. <https://doi.org/10.1080/25785826.2022.2140503>
- Kwon, S. R., Kim, T. H., Kim, T. J., Park, W., & Shim, S. C. (2022). The Epidemiology and Treatment of Ankylosing Spondylitis in Korea. *Journal of Rheumatic Diseases*, *29*(4), 193–199. <https://doi.org/10.4078/jrd.22.0023>
- Liu, T., Lin, Y., Wen, X., Jorissen, R. N., & Gilson, M. K. (2007). BindingDB: a web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities. *Nucleic acids research*, *35*(Database issue), D198–D201. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl999>
- Lu, Y., Sigov, A., Ratkin, L., Ivanov, L. A., & Zuo, M. (2023). Quantum computing and industrial information integration: A review. *Journal of Industrial Information Integration*, *35*, 100511. <https://doi.org/10.1016/j.jii.2023.100511>
- Morris, Garrett M., Huey Ruth, William Lindstrom, Michel F. Sanner, Richard K. Belew, David S. Goodsell, and Arthur J. Olson. 2009. “AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility.” *Journal of Computational Chemistry* *30*(16): 2785–91. doi: 10.1002/jcc.21256.
- Murray, J. D., Lange, J. J., Bennett-Lenane, H., Holm, R., Kuentz, M., O’Dwyer, P. J., & Griffin, B. T. (2023). Advancing algorithmic drug product development: Recommendations for machine learning approaches in drug formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *191*, 106562.

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106562>

- Nandi, S., & Dey, M. (2020). Biochemical and structural insights into how amino acids regulate pyruvate kinase muscle isoform 2. *The Journal of biological chemistry*, 295(16), 5390–5403. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013030>
- Perrotta, F. M., Scriffignano, S., Ciccia, F., & Lubrano, E. (2022). Therapeutic Targets for Ankylosing Spondylitis – Recent Insights and Future Prospects. *Open Access Rheumatology: Research and Reviews*, Volume 14, 57–66. <https://doi.org/10.2147/oarr.s295033>
- Puckett, D. L., Alquraishi, M., Chowanadisai, W., & Bettaieb, A. (2021). The Role of PKM2 in Metabolic Reprogramming: Insights into the Regulatory Roles of Non-Coding RNAs. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1171. <https://doi.org/10.3390/ijms22031171>
- Quaden, D. H., De Winter, L. M., & Somers, V. (2016). Detection of novel diagnostic antibodies in ankylosing spondylitis: An overview. *Autoimmunity Reviews*, 15(8), 820–832. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.06.001>
- Sabe, V. T., Ntombela, T., Jhamba, L. A., Maguire, G. E., Govender, T., Naicker, T., & Kruger, H. G. (2021). Current trends in computer aided drug design and a highlight of drugs discovered via computational techniques: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 224, 113705. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113705>
- Sun, R., Wang, X., Sun, X., Zhao, B., Zhang, X., Gong, X., . . . Wu, W. K. K. (2022). Emerging Roles of Long Non-Coding RNAs in Ankylosing Spondylitis. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.790924>
- Trott, Oleg, and Aj Olson. 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):455–61. doi: 10.1002/jcc.21334.AutoDock.
- Uzzaman, M., Fatema, K., Akhter, S., Hossain, M. R., Akter, N., Tasnuva, S., . . . Afrin, M. F. (2023). Medicinal and toxicological investigation of some common NSAIDs; A computer-aided drug design approach. *Journal of Molecular Structure*, 1292, 136124. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.136124>
- Vanaki, N., Aslani, S., Jamshidi, A., & Mahmoudi, M. (2018). Role of innate immune system in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 130–143. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.097>
- Voruganti, A., & Bowness, P. (2020, August 17). New developments in our understanding of ankylosing spondylitis pathogenesis. *Immunology*, 161(2), 94–102. <https://doi.org/10.1111/imm.13242>

- Wang, X., Shen, Y., Wang, S., Li, S., Zhang, W., Liu, X., Lai, L., Pei, J., & Li, H. (2017). PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database. *Nucleic acids research*, 45(W1), W356–W360
- Wolber, G., & Langer, T. (2005). LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45(1), 160–169. <https://doi.org/10.1021/ci049885e>
- Yasuo, N., Ishida, T., & Sekijima, M. (2021). Computer aided drug discovery review for infectious diseases with case study of anti-Chagas project. *Parasitology International*, 83, 102366. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102366>
- Zahra, K., Dey, T., Ashish, Mishra, S. P., & Pandey, U. (2020). Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00159>
- Zambrano-Zaragoza, J. F., Agraz-Cibrian, J. M., González-Reyes, C., Durán-Avelar, M. D. J., & Vibanco-Pérez, N. (2013). Ankylosing Spondylitis: From Cells to Genes. *International Journal of Inflammation*, 2013, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/501653>
- Zhao, S., Zhang, X., da Silva-Júnior, E. F., Zhan, P., & Liu, X. (2023). Computer-aided drug design in seeking viral capsid modulators. *Drug Discovery Today*, 28(6), 103581. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103581>
- Zhu, W., He, X., Cheng, K., Zhang, L., Chen, D., Wang, X., . . . Weng, X. (2019). Ankylosing spondylitis: etiology, pathogenesis, and treatments. *Bone Research*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41413-019-0057-8>