

## Doğal Biyoaktif Bileşenlerin iNOS Aktivitesi Üzerine Etkisinin İn-Sliko Olarak İncelenmesi

### Investigation of the Effect of Natural Bioactive Components on iNOS Activity in-Silico

Fadime GÖKTAŞ<sup>1\*</sup>, Mehmet KARATAŞ<sup>2</sup>, Sibel Çiğdem TUNCER<sup>3</sup>, Neslihan TEKİN KARACAER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aksaray Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Aksaray / TÜRKİYE

<sup>2</sup>Aksaray Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Aksaray / TÜRKİYE

<sup>3</sup>Aksaray Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Aksaray / TÜRKİYE

## ÖZET

**Amaç:** Nitrik oksit sentazın indüklenebilir izoformu (iNOS) makrofajlar başta olmak üzere pek çok hücrede sentezlenir ve immün yanıtta sorumludur. iNOS ekspresyonunun ve dolayısıyla NO üretiminin yararlı antiviral, antiparazital, mikrobisidal, immün modülatör ve antitümör etkilerinin olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan iNOS'un aşırı ekspresyonu veya düzensizliğinin bir sonucu olarak aşırı miktarda NO salınımı birçok hastalığın patofizyolojisinde rol oynamaktadır. Bitkilerden elde edilen biyoaktif bileşenlerin iNOS bağlanmasına ilişkin hesaplamalı çalışmalar yapmak, inhibitör mekanizmaları hakkında kesin bir doğruluk düzeyi ile ayrıntılı bilgi elde etmeyi sağlar. Bu çalışmada, resveratrol, s-allilsistein (SAC), hiperisin ve timokinonun iNOS enzimi ile moleküler etkileşimlerinin in-silico yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Hedef protein olan iNOS'un kristal yapısı protein veri tabanından alınmıştır. Biyoaktif bileşiklerin 3D yapıları ise PubChem'den elde edilmiştir. iNOS inhibitör moleküllerin kenetlenme simülasyonları, AutoDock Vina programı kullanılarak yerleştirme çalışması yapıldı.

**Bulgular:** Moleküler yerleştirme sonuçlarına göre seçilen biyoaktif bileşiklerin tamamı iNOS'a karşı inhibitör aktivite sergilemiştir. Ayrıca kenetlenme analizi sonuçlarının hepsinde moleküller aynı noktadan ana proteaza bağlanmıştır.

**Sonuç:** Hiperisin dışında diğer biyoaktif bileşikler iNOS inhibisyonu için alternatif ilaç adayları olmaya hazırdır. Ancak bilgisayar simülasyonları inhibitör bileşiklerin geliştirilmesi için ilk adımdır ve daha fazla araştırma ve klinik uygulama yapılması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyoaktif bileşenler, nitrik oksit, İnos, in-silico

## ABSTRACT

**Aim:** The inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS) is synthesized in many cells, especially macrophages, and is responsible for the immune response. It is known that the expression of iNOS, and therefore the production of NO, has beneficial antiviral, antiparasitic, microbicidal, immunomodulatory, and antitumor effects. On the other hand, excessive NO release because of overexpression or dysregulation of iNOS plays a role in the pathophysiology of many diseases. Conducting computational studies of iNOS binding of bioactive components obtained from plants allows us to obtain detailed information about their inhibitory mechanisms accurately. This study investigated the molecular interactions of resveratrol, s-allylcysteine (SAC), hypericin, and thymoquinone with the iNOS enzyme by in-silico methods. All of the bioactive compounds selected according to the results of molecular placement exhibited inhibitory activity against iNOS.

**Materials and Methods:** The crystal structure of the target protein, iNOS, was taken from the protein database. 3D structures of bioactive compounds were obtained from PubChem. Docking simulations of iNOS inhibitor molecules were performed using AutoDock Vina program.

**Results:** All of the bioactive compounds selected according to the molecular placement results exhibited inhibitory activity against iNOS. In addition, in all of the docking analysis results, the molecules were connected to the main protease from the same point.

**Conclusion:** Apart from hypericin, other bioactive compounds are ready to become alternative drug candidates for iNOS inhibition. However, computer simulations are the first step for the development of inhibitory compounds, and further research and clinical applications are required.

**Keywords:** Bioactive components, nitric oxide, iNOS, in-silico.

## GİRİŞ

Nitrik oksit (NO) damar endotel hücrelerinden köken alan, suda çözünebilen, kısa ömürlü, renksiz bir gazdır. Hücre içi NO üretimi nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından, L-arginin amino asidinin L-sitruiline çevrilmesiyle gerçekleştirilir. NOS'un bilinen üç farklı izoformu vardır. Bunlar: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS), Nöronal Nitrik Oksit Sentaz (nNOS) ve İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) olarak adlandırılırlar. nNOS; santral, otonom ve enterik sinir sisteminin belli hücrelerinde, eNOS; vasküler endotel hücrelerinde, iNOS ise; makrofajlarla birlikte, immün savunmada görev alır (1, 2). Tüm NOS enzimleri, aktif formlarında kalmodulin, flavin adenin dinükleotit (FAD), flavin mononükleotit (FMN) ve tetrahidrobiopterin (BH4) olan birkaç kofaktör içermektedir. eNOS ve nNOS, aktiviteleri için hücre içi kalsiyum (Ca<sup>2+</sup>) düzeyinde artışa gerek duyarken, iNOS aktivitesi için Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonundaki değişikliklere gereksinim duymamaktadır (3).

NO, hem sağlıkta hem de hastalıkta geniş işlev yelpazesine sahip bir sinyal molekülüdür. Birkaç saniyelik kısa bir yarı ömre sahip oldukça yayılabilir bir gaz olan NO, tüm biyolojik membranlardan kolaylıkla geçerek hem otokrin hem de parakrin eylemlere aracılık eder (4). Yapılan araştırmalarda NO'nun sinir sistemi, dolaşım sistemi, solunum sistemi, sindirim sistemi ve immün sistem gibi pek çok sistemde önemli fonksiyonlarının bulunduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca taşıdığı çiftlenmemiş elektron nedeniyle oldukça kararsız bir serbest radikal özelliğine de sahiptir. Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda zararlıyken NO düşük konsantrasyonlarda önemli fizyolojik olaylarda görev alır, ancak kontrolsüz ve aşırı NO sentezi ise hücreler için zararlıdır. NO bu özellikleri sayesinde ideal bir fizyolojik haberci molekül özelliği kazanmaktadır (5).

iNOS başlangıçta makrofajlarda tanımlanmış olmasına rağmen artık insanlarda iskelet kası, yağ dokusu ve karaciğer gibi insüline duyarlı organlar da dahil olmak üzere birçok dokuda yaygın olarak ifade edildiği bilinmektedir (6, 2). iNOS'un ifadesi sağlıklı durumda mevcut değildir. iNOS, diğer izoformlardan farklı olarak oksidatif stres ve inflamatuvar yanıt sırasında de novo olarak ifade edilir. Hücrelerde fizyolojik koşullarda iNOS olmamasına rağmen özellikle bakteriyel lipopolisakkaritler (LPS), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), sitokinler (interlökin-1, -2, -6, tümör nekroz faktör vb.) ile uyarıma bağlı olarak ekspresyonu aktive olmaktadır. Aktif hale geçen iNOS enzimi makrofaj ve damar endotel hücrelerinde sentezlenmeye başlar (3). iNOS tarafından üretilen NO miktarı uzun süreli (saatler, günler) ve yüksek derişimde (normalin 40 katına kadar çıkabilmekte) salgılanmaktadır. iNOS, eksprese edildikten sonra uzun bir süre boyunca (saatler/günler) nanomollerde büyük miktarda NO üretebilir (4). Bu yol ile üretilen NO, bakteriyel enfeksiyonların temizlenmesi için bir inflamasyon efektörü ve ayrıca adaptif immün yanıtların düzenleyicisi olarak görev yapar (7).

iNOS aracılığı ile üretilen NO daha çok inflamatuvar cevaplarda ve kanser gibi hastalıklarda önemlidir (8). İ inflamatuvar hastalıklarda immün yanıt mekanizmalarında iNOS tarafından yüksek konsantrasyonlarda üretilen NO, hızlı bir şekilde reaktif nitrojen türlerine (RNT) oksitlenir ve NO'nun bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinin çoğuna aracılık eder (9). iNOS kanser hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak tümör gelişimini hem destekleyici hem de baskılayıcı rol oynar. Sitotoksik etkisi aracılığı ile kanser hücrelerini yok ederken tümör mikroçevresinde anjiyogenez ve metastaza neden olarak tümör gelişimini destekleyici etki gösterir (8). Öte yandan, iNOS'un aşırı ekspresyonundan veya düzensizliğinden kaynaklanan uygun olmayan yüksek NO konsantrasyonları, toksik etkilere neden olabilir. Aşırı NO üretimi septik şok, kardiyak fonksiyon bozukluğu, ağrı, diyabet ve kanserler dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar ile ilişkilidir (2).

iNOS indüksiyonu ayrıca diyabet ve obezite ilişkili insülin direnci ile bağlantılı olabilir. Çünkü iNOS'un insüline duyarlı dokularda ifade edildiği ve obezitenin kas, yağ dokusu ve damar yapısındaki iNOS seviyelerini arttırdığı bilinmektedir (2). Rat pankreas hücrelerinin NO toksisitesine çok duyarlı olduğunu ve prediyabetik sıçanların pankreas makrofajlarında iNOS ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (10). Bu nedenle, iNOS ekspresyonunun inhibisyonunun, insülin duyarlaştırıcıların yeni bir etki mekanizması olduğu yakın zamanda öne sürülmüştür. Bu amaçla yapılan bir çalışmada LPS uygulanan sıçanlarda iNOS inhibitörünün açlık hiperglisemisini önlediğini ve insülin direncini azalttığı bildirilmiştir (11).

iNOS'un ekspresyonunun ve/veya aktivitesinin inhibisyonu, iNOS ilişkili hastalıkların başlangıcında ve/veya ilerlemesinde bu enzimin patolojik rollerini frenlemek için bir strateji olarak düşünülmüştür. Bu amaçla doğal ve sentetik kaynaklardan üretilen iNOS inhibitörleri araştırmalarda kullanılmaktadır (8). Geleneksel tıpta anti-inflamatuvar etki için kullanılan birçok bitkinin NO üretimini engelleyerek etki gösterdiği bildirilmektedir. Bu bitkilerden edilen biyoaktif bileşenler hakkındaki bilgiler, güçlü ve seçici iNOS inhibitörlerini tanımlamada araştırmacılara önemli ipuçları sağlayabilir. Bitkilerden elde edilen biyoaktif bileşenlerin iNOS bağlanmasına ilişkin hesaplamalı çalışmalar yapmak ve inhibitör mekanizmaları hakkında kesin bir doğruluk düzeyi ile ayrıntılı bilgi elde etmeyi sağlar. Bu çalışmada resveratrol, s-allilsistein (SAC), hiperisin ve timokinonun iNOS enzimi ile moleküler etkileşimlerini in-silico yöntemler ile incelenmesi amaçlanmıştır.

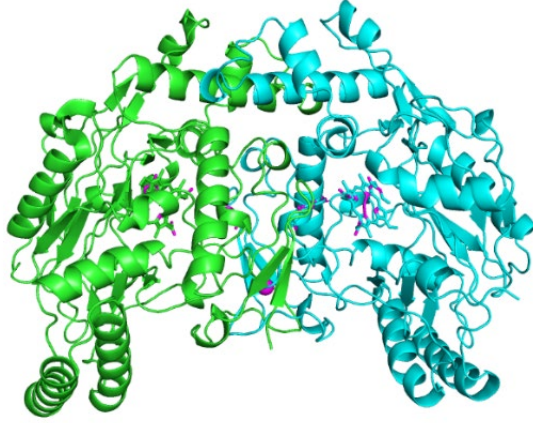
## MATERYAL ve METOT

### Hedef Proteinin Bulunması ve Hazırlanması

Bu çalışmada ele aldığımız hedef protein iNOS'tur. Protein Veri Bankası (<https://www.rcsb.org/>) veri tabanında tutulan veriler kullanılarak, insan nitrik oksit enzimine ait ve kristal olarak tanımlanan iNOS enziminin yapısı ücretsiz

olarak elde edildi. İnsan nitrik oksit sentaz enzimlerinin hazırlık sürecinde Discovery Studio programı kullanılarak tüm kalıntılar ile birlikte su molekülleri ortamdaki kaldırıldı, polar hidrojen bağlar eklenerek moleküler kenetlenme işlemi için hazır duruma getirildi (Şekil 1).

**Şekil 1.** iNOS enziminin yapısı. Sağdan başlayarak; Mavi bölge alan I (amino asit kalıntısı 81-501), yeşil bölge alan II (amino asit kalıntısı 82-501). PDB ID: 4NOS, Erişim Tarihi:01/09/2022, Çözünürlük: 2.25 Å.



### Ligandların Toplanması ve İşlenmesi

Moleküler kenetlenmesi yapılacak olan moleküller (resveratrol, SAC, hiperisin ve timokinon) PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) veri tabanından elde edilmiştir. Moleküllerin enerji optimizasyonları için Avogadro (sürüm 1.2.0) programında (12) 50 adım başına güncelleme sayısı, MMFF94 (Merck Moleküler Kuvvet Alanı 94) ve en dik iniş algoritması seçilerek moleküllerin enerji optimizasyonları yapıldı (Tablo 1).

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan ligandlar ve özellikleri

| No | Ligandlar   | PubChem CID | Moleküler ağırlık (g/mol) | 2D <sup>#</sup> | 3D <sup>##</sup> |
|----|-------------|-------------|---------------------------|-----------------|------------------|
| 1  | Hiperisin   | 3663        | 504.4 g/mol               |                 |                  |
| 2  | Resveratrol | 445154      | 228.24 g/mol              |                 |                  |
| 3  | SAC         | 9793905     | 161.22 g/mol              |                 |                  |
| 4  | Timokinon   | 10281       | 164.2 g/mol               |                 |                  |

#2D: 2-Boyutlu Görsel, ##3D: 3-Boyutlu Görsel

### Ligandlar İçin ADMET ve İlaç Benzerliği Tahmini

Bilgisayar tabanlı ADMET ve ilaç benzerliği tahminleri, ilaç keşifleri için bir avantaj oluşturmaktadır (13). ADMET (Emilim, Dağıtım, Metabolizma, Boşaltım, Toksikite) tahminleri için <http://biosig.unimelb.edu.au/pkscm/> ve BMDRC <https://preadmet.qsarhub.com/> veri tabanından yararlanılmıştır. İlaç benzerliği tahminleri için SwissAdme

(<http://www.swissadme.ch/>) veri tabanından yararlanılmıştır (14,15). İlaç benzerlik sürecinde Lipinski, Ghose ve Veber kuralları, ek olarak gastrointestinal sistem emilimleri, kan beyin bariyeri emilimleri, hepatotoksitesite, deri geçirgenliği ve biyoyararlanım puanları da incelenmiştir.

### Moleküler Yerleştirme

iNOS inhibitör moleküllerin kenetlenme simülasyonları, AutoDock Vina (sürüm 1.1.2) programı kullanılarak, 3 yollu çoklu okuma, Lamarck Genetik Algoritması (16) ile kenetlenme çalışması yapıldı. Kenetlenme bölgesi olarak protein veri bankası (PDB) veri tabanından elde edilen enzim ile hali hazırda bağlı olarak gelen inhibitör çıkarıldı. Çıkarılan inhibitörün yerine moleküler kenetlenme yapıldı. Figürler, Discovery Studio Visualizer (17) kullanılarak oluşturuldu.

### BULGULAR

Bu in-silico çalışmasında, biyoaktif bileşiklerin tamamı iNOS'a karşı inhibitör aktivite sergilemiştir. Kenetlenme analizi sonuçlarının hepsinde moleküller aynı noktadan ana proteaza bağlanmıştır. Vina tarafından hesaplanan kenetlenme sonuçları ile hidrojen bağı sayısı, hidrojen bağı yapılan amino asit kalıntıları gösterilmiştir (Tablo 2).

**Tablo 2.** Ligandların moleküler yerleştirme sonuçları

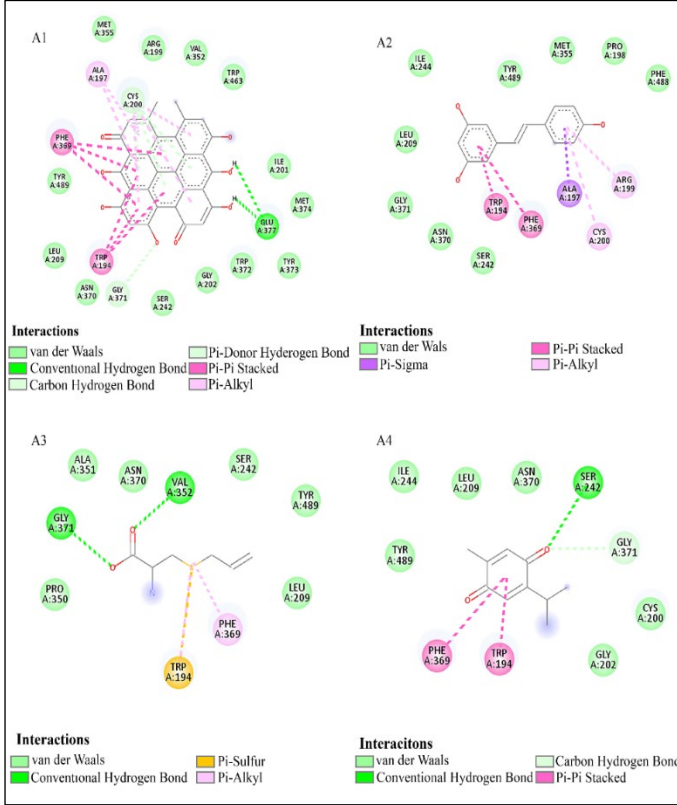
| Ligandlar   | Bağlanma Enerjisi (kcal/mol) | Hidrojen Bağ Sayısı | Aminoasit kalıntıları | Aminoasit Kalıntıları ile Yaptığı Farklı Bağlar   |
|-------------|------------------------------|---------------------|-----------------------|---|
| Hiperisin   | -10.1                        | 2                   | GLU-377               | ALA-194 ALA-197 ARG-199 CYS-200 ILE-201 GLY-202 LEU-209 SER-242 VAL-352 MET-355 PHE-369 ASN-370 GLY-371 TRP-372 TYR-373 MET-374 TRP-463 TYR-489 |
| Resveratrol | -8.9                         | -                   | -                     | TRP-194 ALA-197 ARG-199 PRO-198 CYS-200 LEU-209 SER-242 ILE-244 MET-355 ASN-370 GLY-371 PHE-488 TYR-489   |
| SAC         | -4.8                         | 2                   | VAL-352 GLY-371       | TRP-194 LEU-209 SER-242 PRO-350 ALA-351 PHE-369 ASN-370 TYR-489   |
| Timokinon   | -6.5                         | 1                   | SER-242               | TRP-194 CYS-200 GLY-202 LEU-202 ILE-244 PHE-369 ASN-370 GLY-371 TRY-489   |

Hiperisin, resveratrol, SAC ve timokinon iNOS'a sırası ile -10.1, -8.9, -4.8, -6.5 kcal/mol bağlama enerjilerine sahiptir. Bağlanma enerjisi seviyesi (negatif) ne kadar düşükse, reseptör (enzim) ve ligandlar (bileşik veya inhibitör) arasındaki bağlanma daha güçlü olacaktır (18). Çalışılan biyoaktif bileşikler arasında -10.1 kcal/mol değeri ile hiperisin en düşük bağlanma enerjisi gösterdiğinden en yüksek inhibitör etkiyi sağlayabileceği öngörülmüştür.

Moleküler yerleştirme sonuçlarına göre; Hiperisin iNOS enzimi ile GLU-377 amino asidi ile iki hidrojen bağı yapmıştır. Bu molekül ayrıca ALA-194, ALA-197, ARG-199, CYS-200, ILE-201, GLY-202, LEU-209, SER-242, VAL-352, MET-355, PHE-369, ASN-370, GLY-371, TRP-372, TYR-373, MET-374, TRP-463, TYR-489 aminoasitleri ile farklı bağlar yapmıştır ve bu bağlar Pi-Sigma, Pi-Alkyl ve diğer hidrojen olmayan bağlardır (Şekil 2-A1). Resveratrol ise herhangi bir aminoasit ile geleneksel hidrojen bağı etkileşimine girmezken TRP-194, ALA-197, ARG-199, PRO-198, CYS-200, LEU-209, SER-242, ILE-244, MET-355, ASN-370, GLY-371, PHE-488, TYR-489 amino asitleri ile hidrojen olmayan bağlarla etkileşime girmiştir (Şekil 2-A2). SAC ligandı iNOS enzimi ile VAL-352 ve GLY-371 amino asitleri ile geleneksel iki hidrojen bağı yapmıştır. Ek olarak

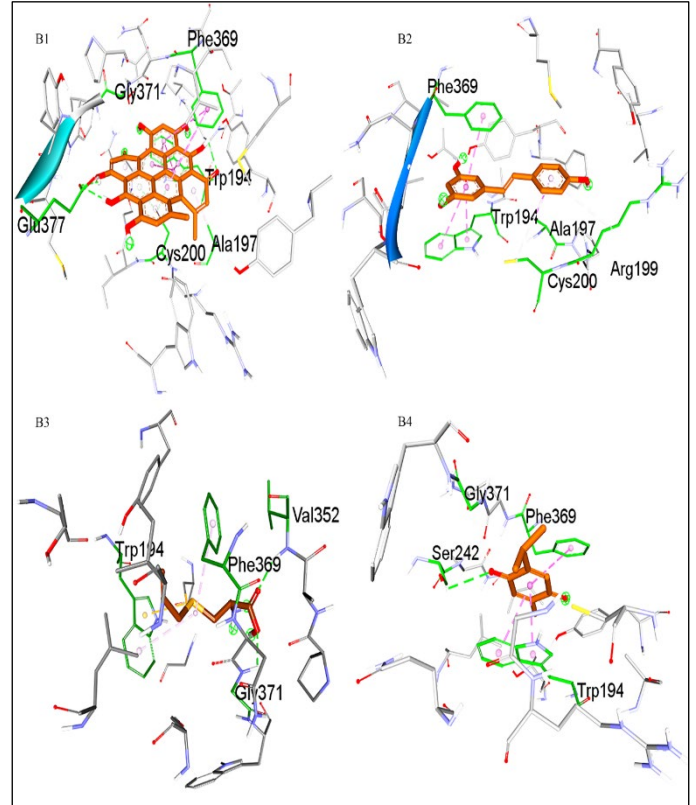
TRP-194, LEU-209, SER-242, PRO-350, ALA-351, PHE-369, ASN-370, TYR-489 amino asitleri ile hidrojen olmayan bağlar yapmıştır (Şekil 2–A3). Timokinon molekülü iNOS enzimi ile SER-242 aminoasidi ile geleneksel bir hidrojen bağı, GLY-371 aminoasidi ile bir karbon hidrojen bağı yapmıştır. Ayrıca timokinon TRP-194, CYS-200, GLY-202, LEU-202, ILE-244, PHE-369, ASN-370, TRY-489 amino asitleri ile hidrojen olmayan bağlar yapmıştır (Şekil 2–A4).

**Şekil 2.** Sırası ile hiperisin (A1), resveratrol (A2), SAC (A3), timokinon (A4) bitkisel etken maddelerin ve iNOS kenetlenme simülasyonunun 2D görüntüleri.



Biyoaktif bileşiklerin iNOS ile kenetlenme simülasyonunun 3D görüntüleri de aynı programdan elde edilmiştir (Şekil 3).

**Şekil 3.** Sırası ile hiperisin (B1), resveratrol (B2), SAC (B3) ve timokinon (B4) bitkisel etken maddelerin ve iNOS kenetlenme simülasyonunun 3D görüntüleri.



**Tablo 3.** Ligandların ADMET ve İlaç Benzerliği Sonuçları

| Ligandlar   | İlaç-Benzerlikleri                                    |   |                              | Biyoyararlanım Skoru | KBB geçebilirliği<br>( $C_{\text{brain}}/C_{\text{blood}}$ ) | + GI absorpsiyonu (%) | Hepatotoksisite | Deriden geçebilirliği | Akut Oral Toksikite (LD50)<br>(mol/kg) | Maksimum Tolere Edilebilir<br>Doz (log mg/kg/day) |
|-------------|---|---|------------------------------|----------------------|--|-----------------------|-----------------|-----------------------|--|---|
|             | Lipinski'nin beşer kuralına uygunluğu                 | Ghose kuralına uygunluğu                                | Veber kuralına uygunluğu     |                      |  |                       |                 |                       |  |   |
| Hiperisin   | Hayır;<br>2 ihlal: *MW>500,<br>**NH <sub>2</sub> OH>5 | Hayır;<br>3 ihlal: *MW>480,<br>^WLOGP>5.6,<br>***MR>130 | Hayır;<br>1 ihlal: #TPSA>140 | 0.17                 | 0.692667   | 100                   | Yok             | Yok                   | 2.482                                  | 0.438   |
| Resveratrol | Evet; 0 ihlal   | Evet; 0 ihlal   | Evet; 0 ihlal                | 0.55                 | 1.73812  | 90.935                | Yok             | Yok                   | 2.529                                  | 0.331   |
| SAC         | Evet; 0 ihlal   | Evet; 0 ihlal   | Evet; 0 ihlal                | 0.55                 | 0.229899   | 79.971                | Yok             | Yok                   | 2.02                                   | 1.115   |
| Timokinon   | Evet; 0 ihlal   | Evet; 0 ihlal   | Evet; 0 ihlal                | 0.55                 | 1.78938  | 99.382                | Var             | Var                   | 1.743                                  | 0.89  |

\*MW (Moleküler Ağırlık), \*\*NH<sub>2</sub>OH (Hidrojen Bağı Alıcısı), \*\*\*MR (Molar Kırılma) ^WLOGP (Lipofilit), #TPSA (Toplam Polar Yüzey Alanı), +KBB(Kan Beyin Bariyeri), ++GI(Gastrointestinal Sistem)

Lipinski kuralı, Veber kuralı, Ghose kuralı lipofiliklik, suda çözünürlük biyolojik aktiviteye sahip olan ligandların ilaç benzerliğini değerlendirmeye yardımcı olan kurallardan bazılarıdır. Bu kurallardan olan Lipinski'nin beş kuralına göre ilaç adayı olan molekülde; moleküler ağırlık (MW)  $\leq 500$  g/mol, lipofilisite katsayısı  $\text{LogP} \leq 5$ , hidrojen bağı vericisi  $\leq 5$ , hidrojen bağı alıcısı  $\leq 10$ , molar kırılma değerleri 4-130 arasında olmalıdır (19). Veber'in kurallarına göre ilaç adayı olan bir molekülde olması gereken özellikler; ilaç molekülünün hidrojen bağı  $\leq 12$ , dönebilir bağ sayısı  $\leq 10$  ve toplam polar yüzey alanı (total polar surface area, TPSA)  $\leq 140$ , oral biyoyararlanımı  $\geq \%20$  olmalıdır (20). Ghose kurallarına göre ilaç adayı olan bir molekülde;  $\text{LogP}$  (0.4~5.6), molar refraktivite (MR) değeri 40~150, molekül ağırlığı (MW) 160~480 g/mol, atom sayısı 20~70, ve polar yüzey alanı (PYA)  $< 140$  değerlerinde olmalıdır (21).

Çalışmamızda ele aldığımız ligandların intestinal sistem absorpsiyonu, deri geçirgenliği, hepatotoksisite ve kan beyin bariyeri absorpsiyonu ve ADMET özellikleri, SwissADME çevrimiçi veritabanının yardımıyla listelenmiştir. Ligandların intestinal sistemden emilim yüzdeleri sıra ile hiperisin (%100), timokinon (%99.3), resveratrol (%90.9), SAC (%79.9). Kan beyin bariyeri absorpsiyon skorları ise sırası ile timokinon (1.789), resveratrol (1.738), SAC (0.229), hiperisin (0.692667). Diğer taraftan incelenen ligandlardan sadece timokinonun hepatotoksisite ve deri geçirgenliğinin olduğu tahmin edilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız hiperisin molekülü Lipinski, Veber ve Ghose kurallarının birçoğunu ihlal etmesine karşın iNOS enzimine en yüksek bağlanma enerjisi ile bağlandığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan resveratrol, SAC ve timokinon bu kurallara uygun olarak bulunmuştur (Tablo 3).

## TARTIŞMA

Moleküler yerleştirme, bilgisayar ortamında yapılan bir proteinin (enzim, reseptör) bir ligand ile (biyoaktif bileşikler, ilaç molekülü) kararlı bir kompleks oluşturmak için yapabileceği bağlanma etkileşiminin üç boyutlu yapısının bir tahminini sunmaktadır (22). Geliştirilen bu teknik sayesinde çeşitli hastalıklara ilişkin yeni ilaçların keşfi ve geliştirilmesinde, laboratuvar uygulamalarından önce moleküler yapılar arasındaki bağlanmalar belirlenebilmektedir. Ayrıca ADME çalışmaları da moleküler yerleştirme yöntemiyle analiz edilen moleküllerin ilaç adayı olma özelliklerinin belirlenmesinde ipuçları sağlamaktadır.

Geleneksel şifalı bitkilerin bilimsel olarak incelenmesi insan sağlığı için büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda, doğal kaynaklar ve bu tür bitkilerin çeşitliliği, modern farmakolojik yaklaşımları tamamlamalarına izin verdiği için, geleneksel tıbbi bitkilerle ilgili çalışmalar dünya çapında giderek artmıştır. Bu çalışmada da kullanılan ligandlar dünya üzerinde oldukça yaygın olarak bulunan ve metabolik etkileri üzerinde

en çok çalışılan bitkilerin etken maddeleri ve/veya metabolitlerinden seçilmiştir.

Türkiye'de sarı kantaron, binbirdelik otu, kan otu, koyunkıranen isimleri ile bilinen dünyada ise yaygın olarak "Saint John's Wort" olarak tanınan *Hypericum perforatum* eski çağlardan beri şifalı bir bitki olarak kullanılmaktadır. Özellikle yara iyileştirici olarak ün kazanan *H. perforatum* yanıklar, yaralar, ülserler ve hayvan ısırıkları için merhem olarak kullanılmıştır. *H. perforatum* ekstraktlarında yer alan bileşikler arasında bitkinin yoğun kırmızı rengini oluşturan naftodiantronların önemli bir bileşeni olan hiperisin en iyi karakterize edilmiş moleküller arasındadır (23). Hiperisinin antibakteriyel ve antiviral etkilerinin yanısıra fototerapide antitümör özelliklerinin de olduğu bildirilmiştir. Hiperisinin antiinflamatuvar etkilerinin gösterildiği bir çalışmada LPS ile indüklenen makrofajlarda NO üretiminin ve iNOS gen ekspresyonlarının önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (24). Diğer taraftan çeşitli biyoaktivitelere sahip olan bu bileşiğin moleküler tiplendirme ve karakterizasyon üzerinde bir fikir birliği sağlanamamıştır.

Resveratrol, üzüm, yaban mersini, ahududu, kırmızı şarap, yer fıstığı, asma yaprağı ve keçi boynuzunda bulunan doğal polifenolik bir bileşiktir (25). Resveratrolün ilk olarak 1997'de anti-tümör aktiviteler gösterdiği bildirilmiştir. Daha sonraki yıllarda resveratrolün antioksidan, anti-inflamatuvar, anti-proliferatif ve anti-anjiyogenik etkilerinin olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Hemorajik şok kaynaklı karaciğer hasarı iNOS'un up-regülasyonu sonucu artan NO üretimi ile ilişkilendirilmiş ve hemorajik şoktan sonra aşırı miktarda salınan NO üretiminin azaltılması ile karaciğer hasarını ve inflamasyonunun hafiflediği bildirilmiştir (26). Buradan yola çıkarak iNOS'un up-regülasyonu zararlı NO üretiminin ana kaynağı olduğundan iNOS aktivasyonunun inhibisyonu, şoka karşı inflamatuvar yanıtı modüle etmek için umut verici bir strateji olarak düşünülmüştür. Resveratrolün metabolik ve antiinflamatuvar etkilerinden sorumlu olan temel mekanizmalar halen araştırmaların konusu olmaya devam etmektedir.

Binlerce yıldır gıda ve tıbbi bitki olarak kullanılan sarımsak (*Allium sativum*) 200'den fazla kimyasal bileşik içermektedir. Bunların içerisinde insan sağlığı açısından son derece önemli olan s-allilsistein (SAC) bileşiğidir. Taze ezilmiş sarımsak kokusuna en çok katkıda bulunan bu bileşik suda çözünür bir organosülfür bileşiğidir. SAC, sistein ile benzer bir yapıya sahip ve oldukça kararlı bir amino asittir (27). Literatürde, anti-inflamatuvar, anti-apoptotik, antihipertansif ve antioksidan etkiler dahil olmak üzere SAC'nin çeşitli biyolojik aktiviteleri bildirilmiştir. SAC'ın sahip olduğu bu faydalı etkilerin iyi bir antioksidan ve reaktif oksijen türleri (ROS) üzerindeki temizleyici etkileriyle bağlantılı olduğu üzerinde durulmaktadır. SAC'ın makrofajlarda iNOS ekspresyonunu inhibe ederek NO üretimini düzenler, böylece anti-enflamatuvar etki gösterir.

Ayrıca yüksek biyoyararlanımı (%98) nedeniyle bir antidiyabetik ve antikanser etkilerine sahip olduğu bildirilmektedir (28).

Timokinon, çörek otu (*Nigella sativa*) uçucu yağının başlıca biyoaktif bileşenidir. Yapılan çalışmalarda timokinonun anti-oksidatif, anti-inflamatuar ve anti-kanser aktivitesinin olduğu bildirilmiştir. Spesifik olarak, timokinon kanser, sepsis, diyabet, astım, ensefalomiyelit ve artrit dahil olmak üzere çeşitli hastalık modellerinde semptomları hafiflettiği gösterilmiştir (29). Timokinonun NO üretimine karşı inhibitör etkisinin olduğu bildirilmiştir. Örneğin bir çalışmada ratlarda lipopolisakkarit ile indüklenen sepsis modelinde timokinonun iNOS ve iNOS mRNA ekspresyonunu baskılayarak NO üretimini düzenlediği bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ise ratlarda STZ ile indüklenen diyabette  $\beta$ -hücrelerinin timokinon tarafından korunduğu ve NO salınımının azaltılması yoluyla antidiyabetik etki gösterdiği ortaya konulmuştur (30).

## SONUÇ

Moleküler yerleştirme sonuçlarına göre seçilen biyoaktif bileşiklerin tamamı iNOS'a karşı inhibitör aktivite sergilemiştir. Ayrıca kenetlenme analizi sonuçlarının hepsinde moleküller aynı noktadan ana proteaza bağlanmıştır. Çalışılan biyoaktif bileşikler arasında -10.1 kcal/mol değeriyle hiperisin en düşük bağlanma enerjisi gösterdiğinden en yüksek inhibitör etkiyi sağlayabileceği öngörülmüştür. İlaç benzerliği analizine göre resveratrol, SAC, timokinonun Lipinski, Veber veya Ghose kurallarına uygun olarak bulundu. Ancak Lipinski'nin beş kuralı doğal bileşikler için her zaman geçerli olmayabilir. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration (FDA)) onaylı tüm küçük moleküllü ilaçların sadece yarısı hem kullanılır hemde "beş kuralı" ile uyumludur. Bu nedenle seçilen ligandların ilaç benzerlikleri ve moleküler yerleştirme sonuçları ilaç adayı olabilme potansiyellerinin olduğunu göstermektedir. Ancak bilgisayar simülasyonları inhibitör bileşiklerin geliştirilmesi için ilk adımdır ve daha fazla araştırma ve klinik uygulama yapılması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric Oxide Synthases: Structure, Function and Inhibition. *Biochemical Journal*. 2001; 357:593–615.
- Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible Nitric Oxide Synthase: Regulation, Structure, and Inhibition. *Medicinal Research Reviews*. 2020; 40(1):158-189.
- Forstermann U, Sessa WC. Nitric Oxide Synthases: Regulation and Function. *European Heart Journal*. 2012; 33(7):829-37.
- Peter M, Gayathry R, Peter VS. Inducible Nitric Oxide Synthase/Nitric Oxide System as a Biomarker for Stress and Ease Response in Fish: Implication on Na<sup>+</sup> Homeostasis During Hypoxia. *Frontiers in physiology*. 2022;13, 821300.
- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric Oxide: A Physiologic Messenger. *Annals of Internal Medicine*. 1994; 120: 227-37.
- Soskić SS, Dobutović BD, Sudar EM, Obradović MM, Nikolić DM, Djordjević JD, et al. Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase (Inos) and Its Potential Role in Insulin Resistance, Diabetes and Heart Failure. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*. 2011; 5:153-63.
- Lee M, Rey K, Besler K, Wang C, Choy J. Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Results and Problems in Cell Differentiation*. 2017; 62:181-207.
- Vannini F, Kashfi K, Nath N. The Dual Role of Inos in Cancer. *Redox Biology*. 2015; 6:334-43.
- Montezano AC, Touyz RM. Reactive Oxygen Species and Endothelial Function-Role of Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Nox Family Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2012; 110(1):87-94.
- Kröncke KD, Brenner HH, Rodriguez ML, Eitzkorn K, Noack EA, et al. Pancreatic Islet Cells are Highly Susceptible Towards the Cytotoxic Effects of Chemically Generated Nitric Oxide. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1993; 8;1182 (2): 221-9.
- Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JA, Ueki K, Kaneki M. A Role for iNOS in Fasting Hyperglycemia and Impaired Insulin Signaling in the Liver of Obese Diabetic Mice. *Diabetes*. 2005; 54(5):1340-8.
- Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform. *Journal of Cheminformatics*. 2005; 4:17.
- Ntie-Kang F, Zofou D, Babiaka SB, Meudom R, Scharfe M, Lifongo LL, et al. A Select Highly Potent and Diverse Natural Product Library from African Medicinal Plants. *PLoS One*. 2013; 30;8(10):78085.
- Zoete V, Daina A, Bovigny C, Michielin O. SwissSimilarity: A Web Tool for Low to Ultra High Throughput Ligand-Based Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2016; 56, 1399–1404.
- Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Scientific Reports*. 2017; 7, 42717.
- Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina. Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 2010; 30:31(2):455-61.
- Biovia DS, 2016. Discovery Studio Modeling Environment Release 2017.
- Sadeghi M, Moradi M, Madanchi H, Johari B. In Silico Study of Garlic (*Allium Sativum* L.) -Derived Compounds Molecular Interactions With A-Glucosidase. *In Silico Pharmacology*. 2021; 9(1), 11.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001; 1; 46 (1-3) :3-26.
- Veber DF, Johnson S, Cheng, HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular Properties that Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002; 45, 2615–2623.
- Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski JJ. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 1999; 1(1): 55-68.
- Umar HI, Saliu TP, Josiah SS. In Silico Studies of Bioactive Compounds from Selected African Plants with Inhibitory Activity Against Nitric Oxide Synthase and Arginase Implicated in Asthma. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2021; 22, 60.
- Haas P, Gaid M, Zarinwall A, Beerhues L, Scholl S. Downstream Processing of Hyperforin from *Hypericum Perforatum* Root Cultures. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018; 126:104-107.
- Berköz M, Allahverdiyev O, Yıldırım M. Investigation of the Effect of Hyperforin and Hypericin on Inflammatory Response in RAW 264.7. *Van Tıp Dergisi*. 2018; 25(2): 124-131.
- Sahu RK, Verma VV, Kumar A, Tandon S, Chandra Das B, Hedau ST. In Silico Prediction and Interaction of Resveratrol on Methyl-Cpg Binding Proteins by Molecular Docking and MD Simulations Study. *The Royal Society of Chemistry advances*. 2022; 12(18), 11493–11504.
- Menezes M, Hierholzer C, Watkins SC, Billiar TR, Peitzman AB. The Modulation of Hepatic Injury and Heat Shock Expression by Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase After Hemorrhagic Shock. *Shock*. 2002; 17, 13-18.
- Yudhistira B, Punthi F, Lin JA, Sulaimana AS, Chang CK, Hsieh CW. S-Allyl Cysteine in Garlic (*Allium Sativum*): Formation, Biofunction, and Resistance to Food Processing for Value-Added Product Development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2022; 21(3): 2665-2687.
- Yu J, Feng L, Hu Y, Zhou Y. Effects of SAC on Oxidative Stress and NO Availability in Placenta: Potential Benefits to Preeclampsia. *Placenta*. 2012; 33(6):487-94.
- Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KHB. Thymoquinone: Potential Cure for Inflammatory Disorders and Cancer. *Biochemical Pharmacology*. 2012; 83, 443–451.
- El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, Matsuyama H, El-Sayed M, Takewaki T. Successful Abrogation by Thymoquinone Against Induction of Diabetes Mellitus with Streptozotocin Via Nitric Oxide Inhibitory Mechanism. *International Immunopharmacology*. 2005; 5(1), 195-207.