



**PLATELET AGREGASYONUNDA GLİKOPROTEİN VI (GPVI)
RESEPTÖR İNHİBİTÖRÜ ADAY MOLEKÜLLERİN ETKİ
MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

Simla OLĞAÇ

**DOKTORA TEZİ
BİYOKİMYA (ECZ) ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

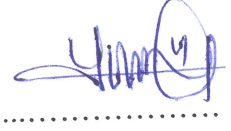
TEMMUZ 2018

Simla OLĞAÇ tarafından hazırlanan “Platelet Agregasyonunda Glikoprotein VI (GPVI) Reseptör İnhibitörü Aday Moleküllerin Etki Mekanizmasının Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyokimya (ECZ) Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Yeşim ÖZKAN

Biyokimya (ECZ) Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Başkan : Prof. Dr. Meral TORUN

Biyokimya (ECZ) Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye : Prof. Dr. Erden BANOĞLU

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

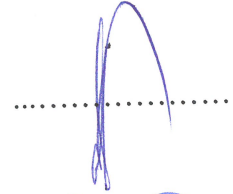
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye : Prof. Dr. Fügen AKTAN

Biyokimya (ECZ) Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye : Doç. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ

Biyokimya (ECZ) Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Tez Savunma Tarihi: 18/07/2018

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Simla OLĞAÇ

18/07/2018



PLATELET AGREGASYONUNDA GLİKOPROTEİN VI (GPVI) RESEPTÖR
İNHİBİTÖRÜ ADAY MOLEKÜLLERİN ETKİ
MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI
(Doktora Tezi)

Simla OLĞAÇ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2018

ÖZET

Vasküler hasar durumunda kanamayı durdurarak hemostazı sağlayan plateletler aşırı aktivasyon sonucu trombüs oluşumuna yol açmaktadır. Trombüs kan damarlarını bloke ederek miyokard enfarktüs veya inme gibi iskemik komplikasyonlara sebep olmaktadır. Piyasada var olan antiplatelet ilaçların kanama riskini arttırıcı ve primer hemostazı bozan yan etkilerinden dolayı kullanımları kısıtlanmaktadır. Dolayısıyla, dünyada ölüm nedenleri arasında birinci sırada yer alan kardiyovasküler hastalıkları azaltmak için halen etkili ve güvenli antitrombotik ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Platelet temel kollajen reseptörü Glikoprotein VI (GPVI)'nın sadece plateletlerde ve prekürsörleri olan megakaryositlerde eksprese olması ve ana kanama komplikasyonlarına sebebiyet vermeden önemli ölçüde patolojik trombüs oluşumunu azaltması nedeniyle son zamanlarda GPVI güçlü ve güvenli antitrombotik tedavi için hedef olmuştur. Yeni ilaç keşfi ve geliştirilmesinde ilaçların yeniden konumlandırılarak kullanımı için, uygunluğu onaylanmış mevcut ilaçların ikincil etkilerinin bulunmasına yönelik stratejiden hareketle FDA onaylı ilaçlardan ve satışa hazır milyonlarca sentezlenmiş bileşiklerin sanal tarama için oldukça zengin bir kütüphane olması sebebiyle Molport veri tabanından GPVI reseptörü antagonistleri baz alınarak yapılan sanal tarama sonucu bileşikler seçilmiştir. Antiplatelet aktivitelerini tespit etmek amacıyla yıkanmış plateletlerde (2×10^8 platelet/ml) GPVI agonistleri (kollajen $3 \mu\text{g/ml}$, konvalksin 50 ng/ml) ve en güçlü platelet agonisti trombin ($0,1 \text{ U/ml}$) ile indükleyerek oluşturulan platelet agregasyonu üzerine seçilen bileşiklerin inhibitör etkileri incelenmiştir. Güçlü platelet agregasyonu inhibitörü ve GPVI antagonisti olabilecek bileşikler bulunmuştur. Elde edilen veriler güçlü ve güvenli antitrombotik bileşiklerin geliştirilmesine ışık tutacaktır.

Bilim Kodu : 1010.1

Anahtar Kelimeler : Platelet Agregasyonu, GPVI, Antiplatelet Etki, Sanal Tarama

Sayfa Adedi : 154

Danışman : Prof. Dr. Yeşim ÖZKAN

INVESTIGATION OF MOLECULAR MECHANISM OF GLYCOPROTEIN VI
(GPVI) RECEPTOR INHIBITOR CANDIDATES
IN PLATELET AGGREGATION

(Ph. D. Thesis)

Simla OLĞAÇ

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

July 2018

ABSTRACT

Platelets that maintain homeostasis by stopping bleeding in vascular injury lead to formation of thrombus after excessive platelet activation. Thrombus causes ischemic complications like myocardial infarction and stroke blocking blood vessels. Antiplatelet drugs in the market have limitations in use because of the risk of increasing bleeding and side effects that impair primary homeostasis. Hence, safe and effective antithrombotic drugs have been still needed to reduce the cardiovascular diseases which are primary reason of deaths in the world. Nowadays, Glycoprotein VI (GPVI), platelet major collagen receptor, is a target for potent and safe antithrombotic therapy because of only being expressed in platelets and their precursors, megakaryocytes, and significantly reducing formation of pathological thrombus without causing major bleeding complications. In discovery and development of new drugs, the compounds from (i) FDA approved drugs, aiming drug repurposing, a strategy of finding the secondary effect of approved drugs for use, and (ii) Molport database that is ready to order millions of compounds making a giant library for virtual screening were chosen by a combined virtual screening method based on GPVI receptor antagonists. Inhibitory activities of selected compounds on platelet aggregation-induced by GPVI agonists (collagen 3µg/ml, convulxin 50 ng/ml) and by the strongest platelet agonist (thrombin 0.1 U/ml) in washed platelets (2×10^8 platelet/ml) were studied. The compounds that may be potent platelet aggregation inhibitors and GPVI inhibitors were determined. The results may clarify to develop potent and safe antithrombotic compounds.

Science Code : 1010.1

Key Words : Platelet Aggregation, GPVI, Antiplatelet Effect, Virtual Screening

Page Number : 154

Advisor : Prof. Dr. Yeşim ÖZKAN

TEŞEKKÜR

Tez süresince bana çok yardımcı olan, tecrübelerini yansıtan ve katkıda bulunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Yeşim ÖZKAN'a, "Birmingham Üniversitesi Kardiyovasküler Bilimler Enstitüsü"nde çalışmama olanak sağlayan, engin tecrübelerini bana aktaran ve her alanda örnek aldığım Prof. Dr. Steve P. WATSON'a, desteklerinden ve yardımlarından dolayı "Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı" öğretim üyeleri ve elemanlarına, deneylerim için gerekli olan taze kanı sağlayan gönüllü donörlerime, "Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi" lisans öğrencilerime, yorulmadan her gün benim için donörlerden kan alan hemşireye ve emeği geçen herkese çok teşekkür ederim.

Ayrıca, anneme, babama, aileme ve arkadaşlarıma bu zor süreçte yanımda oldukları için teşekkür ederim. Son olarak, gece gündüz demeden, yorulmadan, her alanda beni destekleyen, arkamda olan ve bana hep moral veren düşünceli canım eşim Dr. Ecz. Abdurrahman OLĞAÇ'a çok teşekkür ederim.

Bu tez, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 216S637 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Platelet Fizyolojisi	5
2.1.1. Platelet	5
2.1.2. Platelet yapısı.....	6
2.1.3. Platelet granülleri.....	7
2.1.4. Platelet fonksiyonları.....	10
2.1.5. Platelet reseptörleri.....	15
2.1.6. Platelet inhibisyonu	26
2.2. Antiplatelet İlaçlar	28
2.2.1. Siklooksijenaz-1 (COX-1) ve tromboksan sentaz inhibitörleri ile tromboksan-prostanoid (TP) reseptör antagonistleri	30
2.2.2. P2Y ₁₂ ADP reseptör antagonistleri.....	31
2.2.3. Glikoprotein IIb/IIIa (integrin α IIb β 3) reseptör antagonistleri.....	33
2.2.4. Trombin proteaz ile aktive olan reseptör antagonistleri	36

	Sayfa
2.2.5. Fosfodiesteraz inhibitörleri.....	36
2.2.6. GPIb-IX-V kompleksi antagonistleri	37
2.2.7. GPVI reseptör antagonistleri	38
2.3. Bilgisayar Destekli İlaç Keşfi	40
2.3.1. İlaç keşfinde bazı yaklaşımlar	40
2.3.2. Hit bileşiklerin tespitine yönelik strateji.....	41
2.3.3. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı.....	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
3.1. Sanal Tarama	48
3.2. <i>In Vitro</i> Antiplatelet Çalışmaları.....	50
3.2.1. Plateletlerin hazırlanması	50
3.2.2. Platelet Agregasyonu.....	52
4. BULGULAR	55
5. TARTIŞMA.....	121
6. SONUÇ.....	133
KAYNAKLAR	135
EKLER.....	149
EK-1. Etik kurul onayı	150
ÖZGEÇMİŞ	152

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge		Sayfa
Çizelge 2.1.	Platelet α - ve dens granüllerinin içerikleri	9
Çizelge 2.2.	Platelet lizozomun içeriği	10
Çizelge 2.3.	Başlıca platelet aktivasyon ve adezyon reseptörleri.....	16
Çizelge 2.4.	Majör platelet inhibitör mekanizmaları.....	26
Çizelge 4.1.	<i>In vitro</i> aktivite çalışması için seçilen bileşiklerin listesi.....	55
Çizelge 4.2.	FDA onaylı bileşiklerin 1 mM ve 100 μ M konsantrasyonlardaki % inhibisyon değerleri	59
Çizelge 4.3.	Molport veri tabanından seçilen bileşiklerin 1 mM ve 100 μ M konsantrasyonlardaki % inhibisyon değerleri	74
Çizelge 4.4.	FDA onaylı ilaçların IC ₅₀ değerleri.....	113
Çizelge 4.5.	Kimyasal veri tabanı Molport bileşiklerinin IC ₅₀ değerleri	115

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Hematopoetik öncü hücrelerin değişimi	6
Şekil 2.2. Platelet Yapısı.....	7
Şekil 2.3. Platelet aktivasyonu	11
Şekil 2.4. Primer hemostaz (platelet tıkaç oluşumu)	12
Şekil 2.5. Dinlenme ve aktif haldeki plateletler	13
Şekil 2.6. Sekonder hemostaz (fibrin oluşumu).....	15
Şekil 2.7. Glikoprotein VI / Fc reseptör γ -zinciri kompleksinin yapısı	19
Şekil 2.8. GPVI sinyal kaskadı	20
Şekil 2.9. NO ve PGI ₂ 'nin sentezi, NO ve PGI ₂ 'nin inhibisyon mekanizmaları	27
Şekil 2.10. Antiplatelet ilaç hedefleri.....	28
Şekil 2.11. Mevcut onaylı antiplatelet ilaçlar ve etki bölgeleri	29
Şekil 2.12. Revasept'in inhibisyon mekanizması	39
Şekil 3.1. İnsan plateleti GPVI'nın kristal yapısı	48
Şekil 3.2. Ono ve ark. tarafından ilgili makalede rapor edilmiş olan losartan bileşiğine ait bağlanma modu	49
Şekil 3.3. Sanal tarama iş akışı.....	50
Şekil 3.4. Platelet yıkama yöntemi şeması.....	52
Şekil 3.5. A) Platelet agregasyon eğrisi B) İnhibitör varlığında platelet agregasyon eğrisi	53
Şekil 4.1. A) Losartan potasyum bileşiğinin kimyasal yapısı. B) Losartan molekülü baz alınarak oluşturulan farmakofor model*. C) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Losartan molekülünün gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	57
Şekil 4.2. A) 2,3-disüstitüe tetrahidropirido(3,4-b)indol bileşiğinin kimyasal yapısı. B) 2,3-disüstitüe tetrahidropirido(3,4-b)indol bileşiği baz alınarak oluşturulan farmakofor model*. C) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile 2,3-disüstitüe tetrahidropirido(3,4-b)indol bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	58

Şekil	Sayfa
Şekil 4.3. Losartan'ın agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri	60
Şekil 4.4. A) Pemirolast potasyum bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Pemirolast ilacının gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	62
Şekil 4.5. Pemirolast'ın agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	63
Şekil 4.6. A) Zolmitriptan bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Zolmitriptan ilacının gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	64
Şekil 4.7. Zolmitriptan'ın agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	65
Şekil 4.8. A) Brinzolamid bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Brinzolamid ilacının gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	66
Şekil 4.9. Brinzolamid'in agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafiği.....	67
Şekil 4.10. A) Triklormetiyazid bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Triklormetiyazid ilacının gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	68
Şekil 4.11. Triklormetiyazid'in agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	69
Şekil 4.12. A) Okskarbazepin bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Okskarbazepin ilacının gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	70
Şekil 4.13. Okskarbazepin'in agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	71
Şekil 4.14. A) Aminofilin bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Aminofilin ilacının gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	72
Şekil 4.15. Aminofilin'in agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	73
Şekil 4.16. A) Z16043060 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Z16043060 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	76

Şekil	Sayfa
Şekil 4.17. Z16043060 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	77
Şekil 4.18. A) AE641/05538014 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile AE641/05538014 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	79
Şekil 4.19. AE641/05538014 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	80
Şekil 4.20. A) STK763609 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile STK763609 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	82
Şekil 4.21. STK763609 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	83
Şekil 4.22. A) 1692506 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile 1692506 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	84
Şekil 4.23. 1692506 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	85
Şekil 4.24. A) Z851137174 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Z851137174 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	87
Şekil 4.25. Z851137174 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	88
Şekil 4.26. A) STK685501 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile STK685501 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	89
Şekil 4.27. STK685501 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	90
Şekil 4.28. A) Z232636338 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Z232636338 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	91
Şekil 4.29. Z232636338 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafiği.....	92
Şekil 4.30. A) AK778/43464987 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile AK778/43464987 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	93

Şekil	Sayfa
Şekil 4.31. AK778/43464987 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	94
Şekil 4.32. A) 80378510 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile 80378510 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	96
Şekil 4.33. 80378510 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	97
Şekil 4.34. A) STK206687 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile STK206687 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	98
Şekil 4.35. STK206687 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	99
Şekil 4.36. A) 1303833 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile 1303833 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	101
Şekil 4.37. 1303833 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	102
Şekil 4.38. A) STK908290 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile STK908290 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	104
Şekil 4.39. STK908290 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	105
Şekil 4.40. A) STK633709 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile STK633709 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	107
Şekil 4.41. STK633709 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafiği	108
Şekil 4.42. A) Z54670628 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Z54670628 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	109
Şekil 4.43. Z54670628 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	110
Şekil 4.44. A) 3F-042 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile 3F-042 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	112

Şekil	Sayfa
Şekil 4.45. 3F-042 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafiği.....	113
Şekil 4.46. A) 1591532 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile 1591532 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler.....	114
Şekil 4.47. 1591532 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri.....	115
Şekil 4.48. FDA onaylı ilaçların IC ₅₀ grafikleri.....	116
Şekil 4.49. Kimyasal veri tabanı Molport bileşiklerinin IC ₅₀ grafikleri.....	119

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
IC₅₀	%50 İnhibisyonla Sonuçlanan İnhibitör Konsantrasyon
nM	Nanomolar
μM	Mikromolar
Kısaltmalar	Açıklamalar
ACD	Asit Sitrat Dekstroz
ADME	Absorpsiyon – Dağılım – Metabolizma – Eliminasyon
ADP	Adenozin Difosfat
ALA (A)	Alanin
ARG (R)	Arjinin
ASN (N)	Asparajin
ATP	Adenozin Trifosfat
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CEACAM-1	Karsinoembriyonik Antijen-ilişkili Hücre Adezyon Molekülü-1
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
CLEC-2	C-tipi Lektin-Benzeri Reseptör 2
COX	Siklooksijenaz

Kısaltmalar	Açıklamalar
CRP	Kollajen-iliskili Peptid
ÇP	Çözünürlük Problemi
DAG	1,2-Diaçilgliserol
DMSO	Dimetil Sülfoksit
FV	Faktör V
FVII	Faktör VII
FX	Faktör X
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
Gads	GRB2-İlişkili Adaptör Protein 2
GDP	Guanozin Difosfat
GLU (E)	Glutamin
GLY (G)	Glisin
GP	Glikoprotein
GPCR	G Protein–kenetlenmiş Reseptörler
GPO	Glisin-Prolin-Hidroksiprolin
GPVI	Glikoprotein VI
GTP	Guanozin Trifosfat
HBV	Hidrojen Bağı Verici
HBA	Hidrojen Bağı Alıcı
HIS (H)	Histidin
HSC	Hematopoetik Kök Hücresi
IgG	İmmünglobulin-G
IP₃	İnozitol 1,4,5-trisfosfat
ITAM	İmmünreseptör Tirozin-Bazlı Aktivasyon Motifi

Kısaltmalar	Açıklamalar
ITIM	İmmünreseptör Tirozin-bazlı İnhibisyon Motif
LAT	T Hücrelerin Aktivasyonu İçin Bağlayıcı Protein
LT-HSC	Uzun Sürede Kendini Yenileyen Hematopoetik Kök Hücresi
LYS (K)	Lizin
MET (M)	Metiyonin
MPP	Multipotent Progenitör
MPR 4	Multi İlaç Rezistans Protein 4
NK	Doğal Öldürücü
NO	Nitrik Oksit
PAF	Platelet Aktive Edici Faktör
PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1
PAR	Trombin Proteaz ile Aktive Olan Reseptör
PC	Fosfatidilkolin
PCG	Perkütan Koroner Girişim
PE	Fosfatidiletanolamin
PECAM-1	Platelet Endotelyal Hücre Adezyon Molekülü-1
PGH₂	Prostaglandin H ₂
PGI₂	Prostaglandin I ₂
PHE (F)	Fenilalanin
PI	Fosfatidilinozitol
PI 3-Kinaz	Fosfatidilinozitol 3-Kinaz
PKA	Protein Kinaz A
PKC	Protein Kinaz C

Kısaltmalar	Açıklamalar
PKG	Protein Kinaz G
PLC	Fosfolipaz C
PRO (P)	Prolin
PRP	Plateletce Zengin Plazma
PS	Fosfatidilserin
PSI	Pleksin-Semaforin-İntegrin
PYA	Polar Yüzey Alanı
SER (S)	Serin
SFK	Src Ailesi Protein Tirozin Kinazlar
SLP-76	Lenfosit Sitozolik Protein 2
SphM	Sfingomiyelin
ST-HSC	Kısa Sürede Kendini Yenileyen Hematopoetik Kök Hücresi
STEMI	ST Yükselmeli Miyokard Enfarktüsü
TF	Doku Faktörü
THR (T)	Treonin
TIA	Geçici İskemik Atak
TLT-1	TREM-benzeri Transkript-1
TP	Tromboksan A ₂ Reseptörü
TRP (W)	Triptofan
TxA₂	Tromboksan A ₂
TYR (Y)	Tirozin
VAL (V)	Valin
vWF	von Willebrand Faktörü

1. GİRİŞ

Platelet bulgusu ilk olarak onsekizinci yüzyılın sonuna doğru Hewson tarafından kanda bulunan çok küçük partikül tanımı ile ortaya çıkmıştır [1]. 1842 yılında ise Donne tarafından plazmadan türemiş küçük yuvarlaklar olarak tarif edilmiştir [2]. Kanın üçüncü selüler komponenti olarak 1882 yılında tanımlayan Bizzozzero, plateletlerin sadece fizyolojik hemostazda değil, aynı zamanda trombozda da rol oynadığını bulmuştur [3]. Ardından hemostatik tıkaç oluşumunda plateletlerin primer rolleri olduğu görülmüş ve bu hemostatik oluşum ile ilgili temel bilgiler oluşturulurken, ilerleyen yıllarda platelet fonksiyonlarına dair oldukça detaylı bilgi elde edilmiştir.

Çekirdeksiz hücreler olan plateletler, normal koşullar altında kan dolaşımında serbestçe sirküle olmakta, ayrıca birbirlerine ya da damar duvarına yapışmamaktadırlar. Asıl rolleri primer hemostazı sağlamak, yani kan damar bütünlüğünü korumak ve bir vasküler hasar durumunda kanamayı hızlı bir şekilde durdurmayı sağlamaktır. Vasküler hasar esnasında subendotelyal ekstraselüler matriksin açığa çıkmasıyla plateletlerin aktivasyonu, fazla kan kaybını önleyen hemostatik tıkaç oluşumuna yol açmaktadır. Bu durum, hemostaz için önemli olsa da, fazla ve kontrol edilemeyen platelet aktivasyonu ve agregasyonu insan sağlığına zararlıdır. Kontrol edilemeyen trombozun olduğu aterosklerotik plakların ruptür bölgelerinde plateletler aktive olduğunda da aynı mekanizma devreye girerek damar oklüzyonuna ve miyokard enfarktüs, inme veya periferik arter hastalıkları gibi iskemik komplikasyonlara yol açmaktadır [4]. Dolayısıyla, dengeli olarak ve dikkatli bir şekilde platelet fonksiyonunun düzenlenmesi gerekmektedir.

Dünyada ölüm nedenleri arasında birinci sırada yer alan kardiyovasküler hastalıkların merkezinde plateletlerin önemli bir rol oynaması sebebiyle ve bu akut iskemik hastalıklar ile ilişkili ölüm oranını azaltmak amacıyla, anti-trombotik ilaçlar için plateletler ana hedef olmuşlardır. Platelet agregasyonunu etkin bir şekilde inhibe etmek için piyasada var olan antiplatelet ilaçlar klinik olarak yarar sağlamakta, ancak kontrol edilemeyen kanama riskini arttırıcı ve primer hemostazı bozan yan etkilerinden dolayı kullanımları kısıtlanmaktadır. Bu nedenle, hemostaz üzerine minimal etkisi olan, etkili ve güvenli bir şekilde platelet inhibisyonunu sağlayan yeni farmakolojik hedefin tanımı, hayati kan damarlarında oklüsif

trombüs oluşumunu önlemek için acil ihtiyaç duyulmaktadır. Bu, kardiyovasküler araştırmalar için oldukça önemli bir amaçtır.

Platelet kollajen reseptörü Glikoprotein VI (GPVI) son zamanlarda umut vaat edici antitrombotik bir hedef haline gelmiştir. GPVI reseptörünün sadece plateletlerde ve prekürsörleri olan megakaryositlerde eksprese olması, deneysel hayvan modellerinde GPVI'nın deneysel olarak blokajı, antikor-indüklü downregülasyonu veya genetik olarak eksikliği majör kanama komplikasyonlarına sebebiyet vermeden önemli ölçüde azalmış patolojik trombüs oluşumu ile sonuçlanması ve GPVI reseptörünün, platelete bağlı enflamatuvar proseslerin anahtar regülatörü olduğunun farkına varılması gibi sebepler dolayısıyla GPVI güçlü ve güvenli antitrombotik tedavi için hedef olmuştur [5]. Ancak, henüz yetkili otoriteler tarafından piyasaya çıkması için onaylanmış GPVI antagonisti olan bir ilaç bulunmamaktadır.

Yeni ilaç keşfi ve geliştirilmesinde, ilaç yeniden konumlandırması (repositioning) ile piyasadaki ilaçların yeni etki profillerinin bulunmasına yönelik strateji giderek önem kazanmıştır. İlacın insanlardaki güvenliği ve farmakokinetik etkileri klinik olarak doğrulanıp kullanımı için uygunluğu onaylanmış olduğu için sekonder etkilerine bağlı olarak yeni endikasyonlarda kullanımları zaman ve ekonomik olarak kolaylık sağlamaktadır. Öte yandan, ilaç keşfi için satışa hazır milyonlarca bileşiği (ör;ZINC [6], Molport [7]) stokta bulunduran, periyodik olarak bileşik listesinin güncellenmesiyle sayısı artan kimyasal bileşik veri tabanları, sanal tarama için oldukça zengin bir kütüphane oluşturmakla birlikte, birçok satıcı firmanın tek bir yerde toplanmasıyla işi kolaylaştırması sebebiyle bu kimyasal bileşik veri tabanlarının tercih edilme yüzdesi artmaktadır.

GPVI antagonisti keşfine yönelik tez kapsamında, GPVI reseptörü antagonistleri baz alınarak; (i) Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ilaçların yeniden konumlandırılması amacıyla FDA onaylı ilaçlardan ve (ii) bazı filtrelemelerin ardından Molport kimyasal bileşik kütüphanesinden sanal tarama çalışması sonucu seçilen yeni hit bileşiklerin *in vitro* GPVI reseptörü agonistleri ve güçlü platelet agregasyon agonistleriyle oluşturulan platelet agregasyonu üzerine olan inhibitör etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, bileşikleri filtrelemek için GPVI antagonisti olduğu belirlenmiş (i) losartana göre, (ii) tez çalışması yürütülürken yayımlanan sentetik GPVI antagonist bileşiği olan 2,3-disübstitüe tetrahidropirido(3,4-b)indole göre dizayn edilmiş e-farmakofor modeller ile kıyaslanarak benzer farmakofor özellikler, yüksek docking skoru ve bileşiklerin benzer etkileşim gösterme durumları değerlendirilerek FDA ilacı ve Molport kimyasal veri tabanından bileşik seçiminin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu bileşiklerin, antiplatelet aktivite çalışmaları kapsamında sağlıklı gönüllülerden alınmış taze kandan elde edilen yıkanmış plateletce zengin plazmada (PRP) çeşitli platelet agonistleriyle indüklenen platelet agregasyonu üzerine inhibitör etkilerinin ve reseptör spesifikliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

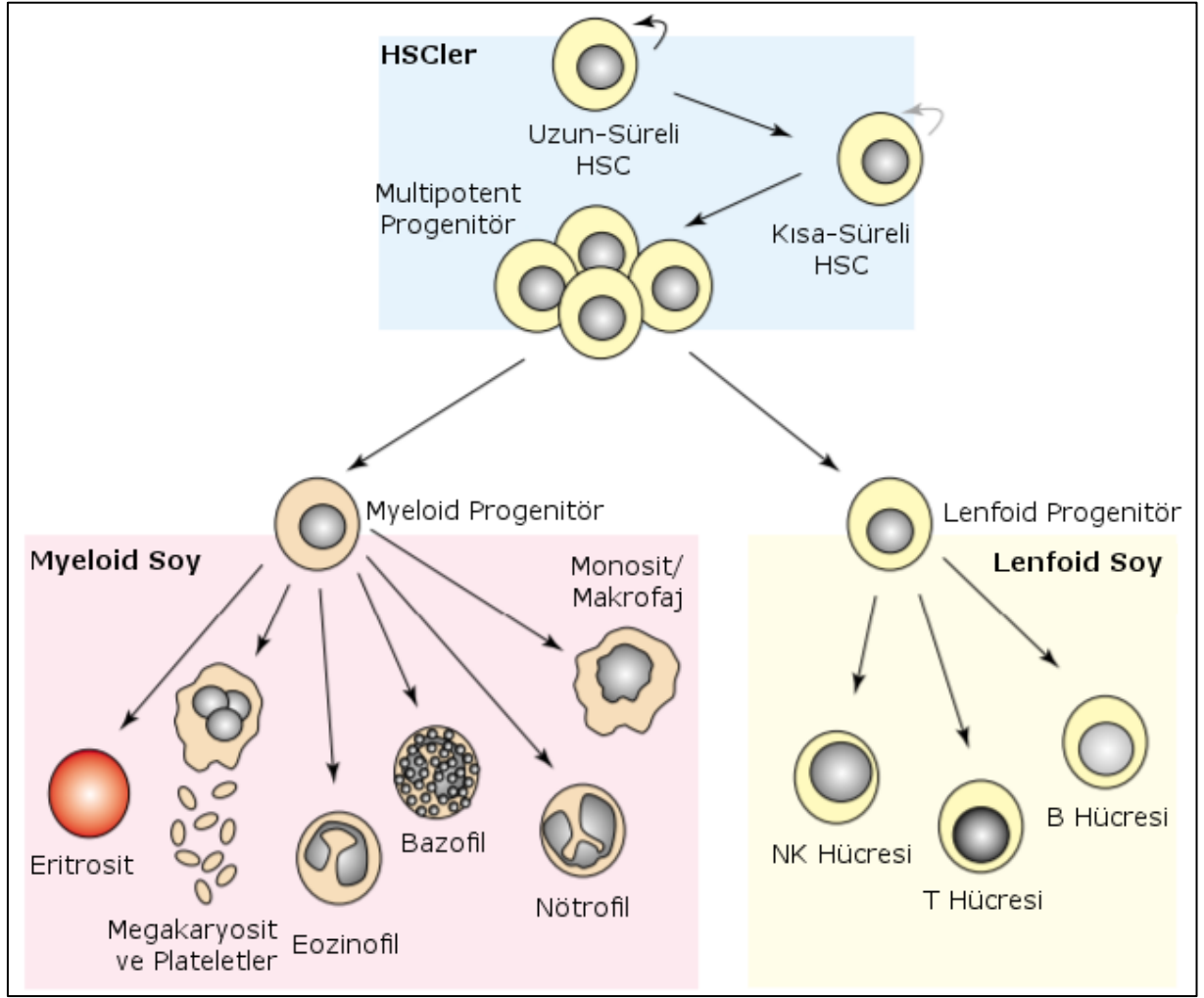
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Platelet Fizyolojisi

2.1.1. Platelet

Hemostazın, enflamasyonun, tümör metastazının ve yara iyileşmesinin fizyolojik ve patolojik süreçlerinde anahtar rolü olan plateletler, özelleşmiş kan hücreleridir. Plateletler, normal hemostazda kan akışını sağlayarak, vasküler hasarda ise pıhtı oluşumunu gerçekleştirerek hemostaz ve tromboz süreçlerinde dengeyi sağlamaktadırlar [8].

Bütün kan hücrelerinin orijini, yetişkin kemik iliğindeki hematopoetik kök hücresidir (HSC). HSC'lerin, uzun sürede kendini yenileyen HSC'ler (LT-HSC'ler), kısa sürede kendini yenileyen HSC'ler (ST-HSC'ler) ve kendini yenilemeyen multipotent progenitörler (MPP'ler) olmak üzere üç çeşidi bulunmaktadır. LT-HSC'lerden ST-HSC'lere ve bunlardan da MPP'lere dönüşüm, mitotik aktivitenin artışı ile ilişkilidir. Bu proliferatif aktiviteden sonra, MPP'ler iki hematopoetik öncü hücre grubuna dönüşmektedir [9]. Bu iki hücre grubu; kan hücreleri makrofaj, nötrofil, bazofil, eozinofil, eritrosit ve plateletleri oluşturan miyeloid hücreler ile T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücreleri oluşturan lenfoid hücrelerden oluşmaktadır (Şekil 2.1). Çekirdeksiz hücreler olan plateletler, kemik iliğinin miyeloid hücreleri olan progenitör öncülleri megakaryositlerden meydana gelmektedirler [10].



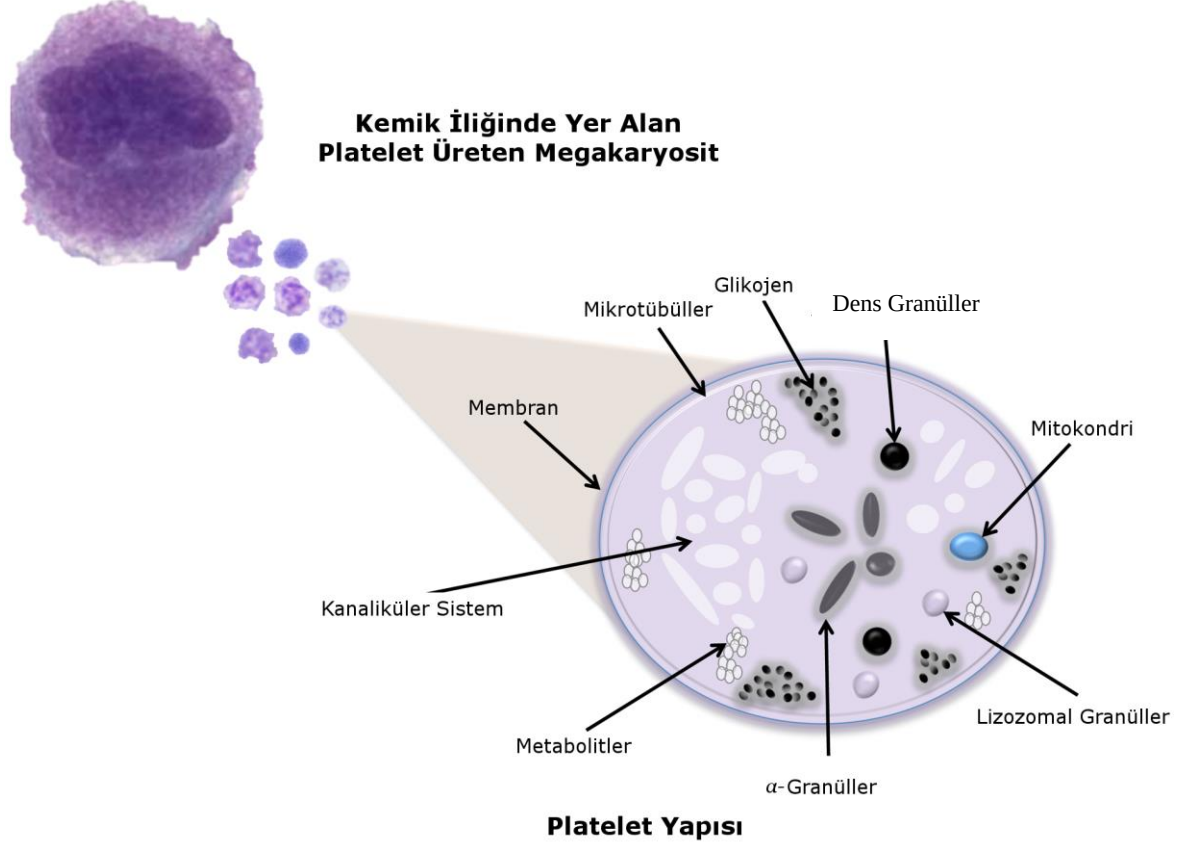
Şekil 2.1. Hematopoetik öncü hücrelerin değişimi [9]

2.1.2. Platelet yapısı

Megakaryositlerin alt fragmanları olarak bilinen plateletler sitoplazmada özgül platelet granülleri, mitokondri, endoplazmik retikulum ve lizozom gibi normal hücresel organeller içermektedirler (Şekil 2.2). En küçük kan hücreleri olan plateletler dinlenme durumlarında diskoidal şekle sahiptirler. Oluşumdan sonra periferik dolaşıma salınan dinlenme durumundaki normal insan plateletlerinin çapı yaklaşık olarak 2,0 – 5,0 μm arasında ve kalınlığı ise 0,5 μm büyüklüğündedir [11,12].

Platelet oluşumu trombopoetin hormonu tarafından regüle edilirken her megakaryositin, yaşamı süresince 5 000 – 10 000 arasında platelet ürettiği bilinmektedir. Sağlıklı bir yetişkin insanda, dolaşımdaki plateletlerin fizyolojik konsantrasyon aralığı litrede $150 - 400 \times 10^9$ 'dur. Plateletlerin yaşam ömürleri 7 ile 10 gün arasında değişmektedir. Yaşlı ve

kusurlu olan plateletler, karaciğer ve dalaktaki fagositler tarafından dolaşımdan uzaklaştırılmaktadırlar [11,13].



Şekil 2.2. Platelet Yapısı [14]

2.1.3. Platelet granülleri

Plateletler çekirdek içermedikleri için yeni protein eksprese etmeleri oldukça güçtür. Ancak, fizyolojik etkilerini gösterebilmeleri için ihtiyaç duydukları moleküllerle donatılmışlardır. Sitoplazmalarında, α -granüller, dens granüller ve lizozomlar olmak üzere plateletlere özgü üç çeşit granül bulunmaktadır [15].

α -Granüller, yaklaşık olarak 0,2 – 0,5 μm çapında, en büyük ve en çok bulunan platelet granülleridir (~80 α -granül/insan plateleti) [16]. Bu granüller hem primer hem de sekonder hemostatik mekanizmada rol oynayan, platelet ve ekstraselüler matriks arasında adezyonu sağlayacak fibrinojen, fibronektin ve von Willebrand faktörü (vWF) gibi matriks adezyon proteinlerini, GPIb-IX-V ve integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ gibi adezif reseptörleri, büyüme faktörlerini,

proteaz inhibitörlerini, plateletin yüzeyinde bulunan p-selektini ve ayrıca platelet membranına gömülü glikoprotein reseptörlerini içermektedirler [15] (Çizelge 2.1). α -Granüllerin içeriğinde, sekonder hemostazda görevli trombin ve fibrin oluşumuna neden olan protrombin, faktör V ve XI dahil koagülasyon faktörleri de yer almaktadır [17,18]. Plazmin-ilişkili fibrinolizi kısıtlayan plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) ve α 2-antiplazmin gibi inhibitör proteazlar da α -granüllerden salınmaktadır. Ayrıca, plateletler koagülasyon sürecini sınırlandıran birçok protein salgılayarak hemostatik dengeyi sağlamaktadırlar. α -Granüller intrinsik ve ekstrinsik yollardaki aktif pıhtılaşma faktörlerini inhibe eden antitrombini, faktör XIa ve faktör XIIa oluşumunu önleyen C1-inhibitörünü içermektedir. Ayrıca, bir serin proteaz olan plazmin ve onun inaktif prekürsörü plazminojen de yer almaktadır. α -Granüllerin yapısının oldukça heterojenik olması nedeniyle α -granüller hem anti-koagülan, hem de pro-koagülan etkiyi regüle edebilir özelliğe sahiptirler [18].

Dens granüller, plateletlerde α -granüllerden yaklaşık olarak 10 kat daha az bulunmaktadır. Normal insan plateletinde, bir platelet başına düşen dens granül sayısı 3 ile 8 arasında değişmektedir [19]. Ayrıca, dens granüllerin çapı yaklaşık olarak 0,2 μ m ile 0,3 μ m aralığında olmasıyla boyut olarak da α -granüllerden daha küçüklerdir. Platelet dens granülleri ADP, ATP, GDP, GTP gibi nükleotidleri, Ca^{2+} gibi divalent katyonları ve bir vazokonstriktör olan serotonin gibi hücre aktivasyonunda önemli rol oynayan düşük molekül ağırlıklı bileşikler yüksek konsantrasyonda içermektedir [15,19] (Çizelge 2.1).

Bir diğer platelet granülü olan lizozomun içeriğinde ise asit hidrolaz, katepsinler ve heparinaz gibi bazı hidrolitik enzimler bulunmaktadır [17] (Çizelge 2.2). Her ne kadar platelet lizozomlarının fonksiyonları tam olarak aydınlatılmamış olsa da, diğer çekirdekli hücreler gibi fagositik ve sitozolik komponentlerin sindiriminde rol oynamaktadırlar. Lizozomal içeriğin salınması; reseptör ayrılması, fibrinoliz, ekstraselüler matriks komponentlerin yıkımı ve damarların yeniden şekillenmesi gibi önemli ekstraselüler fonksiyonların gerçekleşmesinde rol oynayabilmektedir [20].

Platelet granül içeriğinin ekzositozu, hücre yüzey reseptörlerinin aktivasyonu ile başlatılmakta ve regüle edilmektedir. Ekzositoz sırasıyla; granülün bağlanması, kenetlenmesi ve plazma membranına füzyonundan ibarettir [20].

Ekzositozdan sonra salınan ADP gibi agonistler plateletlerdeki reseptörlerini stimüle etmekte ve dolaşımda bulunan daha fazla sayıdaki plateletlerin aktivasyonunu ve dolayısıyla hasarlı bölgeye toplanmalarını sağlamaktadır [19,20].

Çizelge 2.1. Platelet α - ve dens granüllerinin içerikleri [15]

α - Granüller	Dens granüller
Platelete özgü proteinler Platelet faktör 4 β -Tromboglobulin ailesi Multimerin Adezif glikoproteinler Fibrinojen von Willebrand faktör von Willebrand faktör propeptid Fibronektin Trombospondin-1 Vitronektin Koagülasyon faktörleri Faktör V Protein S Faktör XI Mitojenik faktörler Platelet-kaynaklı büyüme faktörü Dönüştürücü büyüme faktörü- β Endotelial hücre büyüme faktörü Epidermal büyüme faktörü İnsülin-benzeri büyüme faktörü I Anjiogenik faktörler Vasküler endotelial büyüme faktörü Platelet faktör 4 (inhibitör) Fibrinolitik inhibitörler α_2 -Plazmin inhibitör Plazminojen aktivatör inhibitör-I Albümin İmmüoglobulinler Granül membrana özgü proteinler P-selektin (CD62P) CD63 (LAMP-3) GMP 33	ADP ATP Kalsiyum Serotonin Pirofosfat GDP Magnezyum Proteaz neksin I Gas6 Amiloid β -protein prekürsör (proteaz neksin II) Doku faktörü yolu inhibitörü Faktör XIII α_1 -Proteaz inhibitörü Yüksek molekül ağırlıklı kininojen α_2 -Makroglobulin Vasküler permeabilite faktörü İnterlökin-1 β Histidinden zengin glikoproteinler Kemokinler Platelet faktör 4 İnterlökin-8

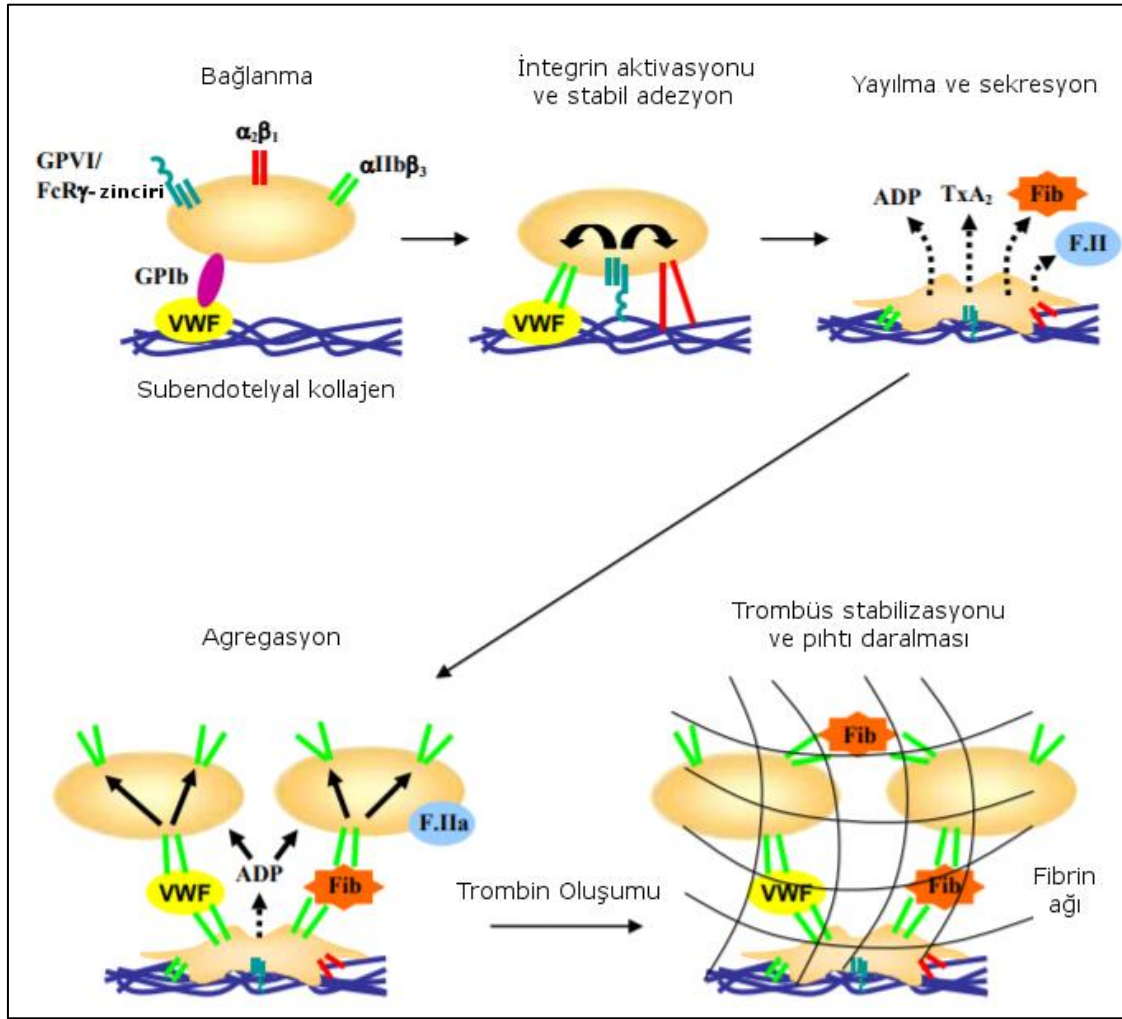
Çizelge 2.2. Platelet lizozomun içeriği [19]

Lizozomal granüller	
Katepsin D	α -L-arabinofuranosidaz
Katepsin E	α -D-galaktosidaz
Karboksiptidaz A	α -L-fukosidaz
Karboksiptidaz B	β -D-fukosidaz
Prolin karboksiptidaz	β -D- glukosidaz
β -N-asetil-D-heksoaminidaz	α -D-glukosidaz
β -D-glukuronidaz	Asit fosfataz
β -D-galaktosidaz	Arilsülfataz
α -D-mannosidaz	

2.1.4. Platelet fonksiyonları

Plateletlerin asıl fizyolojik fonksiyonu, zarar görmüş kan damarlarında oluşan boşlukları tıkayarak kan kaybını engellemektir. Ayrıca, plateletler anjiyogenezde, enflamasyonda ve immün sistemde de fonksiyon göstermektedirler [8].

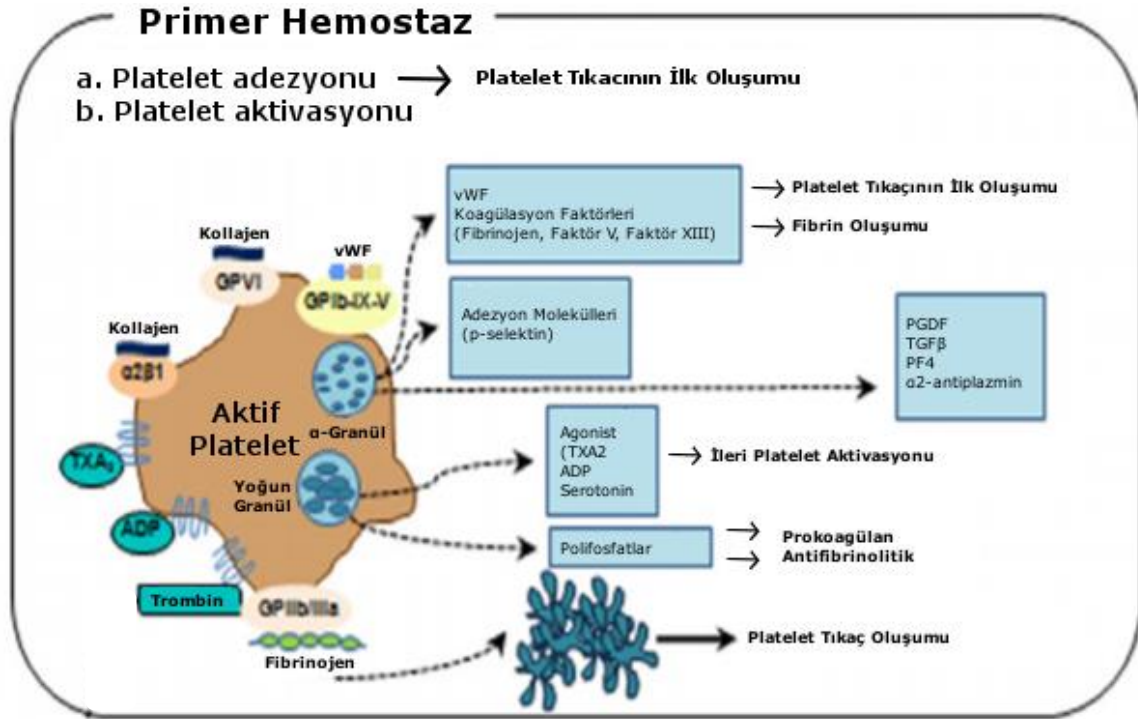
Platelet tıkaçı oluşma süreci birkaç basamakta meydana gelmektedir. Vasküler bir hasar meydana geldiğinde, platelet reseptörlerinin spesifik agonistleri ile etkileşmesiyle kompleks zincirleme sinyaller indüklenmektedir. Plateletler hemostatik pıhtı oluşturma amacıyla öncelikle, ekstraselüler matrikse hızlıca yapışmaktadırlar. Outside-in sinyalizasyonu denilen membrandan sitoplazmaya geçen sinyallerin etkisiyle, hasarlı bölgeye dolaşımdaki diğer plateletler göç ederken plateletlerin aktivasyonu gerçekleşmektedir. Aktive olan plateletlerin sitoplazmalarında homojen olarak bulunan granül içerikleri ekzositoz yolu ile salınmakta ve sekresyon sonrası platelet hücre iskeletinde şekil değişikliği meydana gelmektedir. Plateletlerin aktivasyonu, agregasyonda görevli GPIIb/IIIa (integrin α IIB β 3)'nın ligandı olan fibrinojen ile etkileşmesini tetiklemektedir. Bu birleşim, plateletler arası köprü oluşturarak güçlü bir agregasyon meydana getirmektedir. Primer hemostazın ardından, sekonder hemostazda ise platelet stimülasyonunun amplifikasyonu; prokoagülan aktiviteye, trombin oluşumuna ve stabil hale gelen platelet-fibrin agregatının oluşumuna yol açmaktadır [8] (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Platelet aktivasyonu [21]

- Adezyon

Plateletlerin subendotelial matrikse adezyonu, primer hemostaz mekanizmasının ilk basamağıdır. Plateletler, spesifik adeziv glikoproteinlerin (GP) üzerinden ekstraselüler matriks proteinler ile etkileşmektedirler (Şekil 2.4).



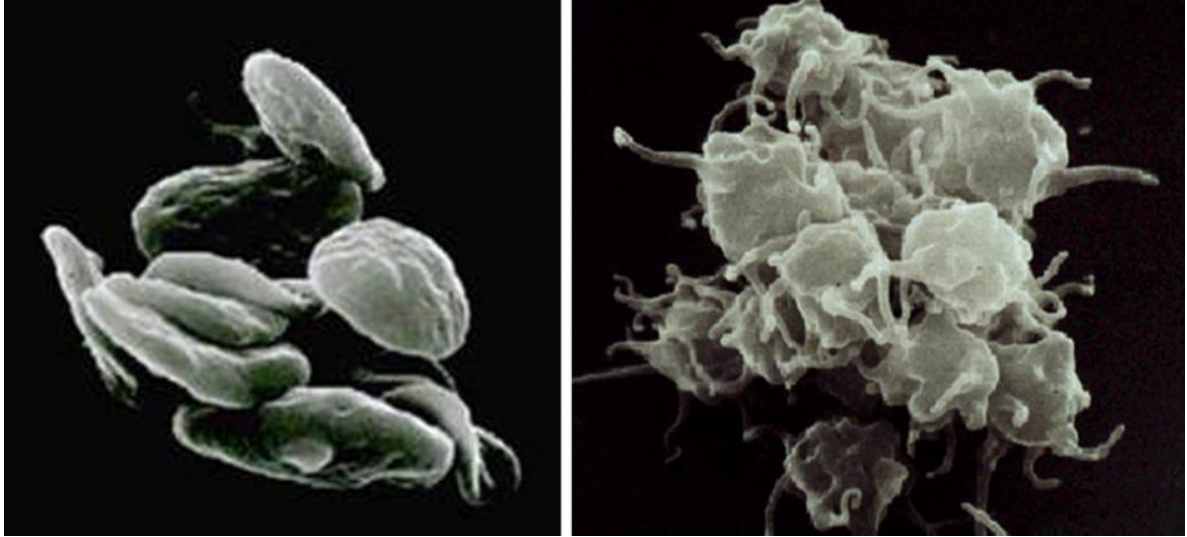
Şekil 2.4. Primer hemostaz (platelet tıkaç oluşumu) [22]

Yüksek basınç altında (>500/s), küçük arterlerde, arteriyollerde ve damar tıkanıklığında, plateletler ilk önce hasarlı bölgeyi kaplamaktadırlar. Hasarlı bölgede subendotel tabaka yüzeyindeki kollajene bağlanan multimerik plazma proteini vWF, platelet adezyonu için substrat görevi görmekte ve adezyon basamağı platelet yüzey reseptörü olan GPIb-IX-V kompleksi ve vWF'nin arasındaki etkileşim ile tetiklenmektedir [8,21]. Bu etkileşim, sıkı bağların oluşumuna ve plateletlerin tutunmasına yol açarak plateletlerde aktivatör sinyal oluşturmaktadır [8,23].

Düşük basınç altında (<500/s), büyük arterlerde ve damarlarda, plateletler subendotelyumdaki kollajene yapışmaktadırlar. Bu şartlar altında plateletler, integrin reseptörü α2β1 (GPIa/IIa) ve GPVI reseptörü aracılığı ile direkt kollajene bağlanmakta ve böylelikle plateletler aktive olmaktadır. Adezyon sonucu plateletlerin stimülasyonu; granül sekresyonuna, yayılmaya ve sonrasında GPIIb/IIIa (αIIbβ3) integrin reseptörünün aktivasyonuna sebep olmaktadır [8,11].

Platelet aktivasyonu, hücre iskeletinin yeniden şekillenmesini sağlayacak platelet morfolojik değişikliklerini indüklemektedir. Sıkıca yapışmış ve aktive olmuş plateletler, daha sonra 'lamellipodia' ile doldurulacak olan 'filopodia' denen uzun parmak gibi çıkıntı

yaparak uzamaktadırlar (Şekil 2.5). Filopodia, plateletlerin hasarlı yüzeye daha sıkı yapışmasını ve kan dolaşımında bulunan plateletlerin daha rahat yakalanmasını sağlamaktadır. Böylelikle, yayılma ile plateletler vasküler lezyonda daha geniş ve büyük bir alan kaplayabilmektedirler [11,23].



Şekil 2.5. Dinlenme durumundaki ve aktif haldeki plateletler [11]

- Sekresyon

Aktif plateletler; ADP ve tromboksan A₂ (TxA₂) gibi güçlü agonistler içeren granül içeriğini salgılayarak diğer plateletlerin, kanın ve hasarlı hücrelerin fonksiyonlarını etkilemektedirler. Aktif plateletler tarafından salınan ADP ve TxA₂, sinerjistik olarak maksimum platelet aktivasyonunu indüklemek ve ayrıca büyüyen platelet tıkaçına daha çok platelet toplamak amacıyla fonksiyon göstermektedirler. Fibrinogen ve vWF gibi adezyon proteinlerinin salınımı da trombüsün oluşumuna ve büyümesine neden olmaktadır. Salınan pıhtılaşma faktörleri ise (faktör V, XIII ve protrombin) lokal trombin oluşumunu hızlandırmaktadır [8,18,20].

- Agregasyon

Plazma- ve platelet-kaynaklı fibrinojen ve vWF, platelet agregasyonuna aracılık etmektedir. Agregasyonda ana platelet reseptörü integrin α IIb β 3 (GPIIb/IIIa)'tür. Hızlı trombüs büyümesine yol açan yüksek afiniteli etkileşimler α IIb β 3 ve fibrinojen, α IIb β 3 ve vWF arasında meydana gelmektedir. Aktive olmuş platelet üzerindeki immobilize

fibrinojen, $\alpha\text{IIb}\beta 3$ reseptörü aracılığı ile primer agregasyonu arttırmakta ve “inside-out signaling” denen sinyalizasyonu tetiklemektedir. Ayrıca meydana gelen konformasyonel değişikliklerle sıkı bir bağlanma elde edilmektedir [8,24].

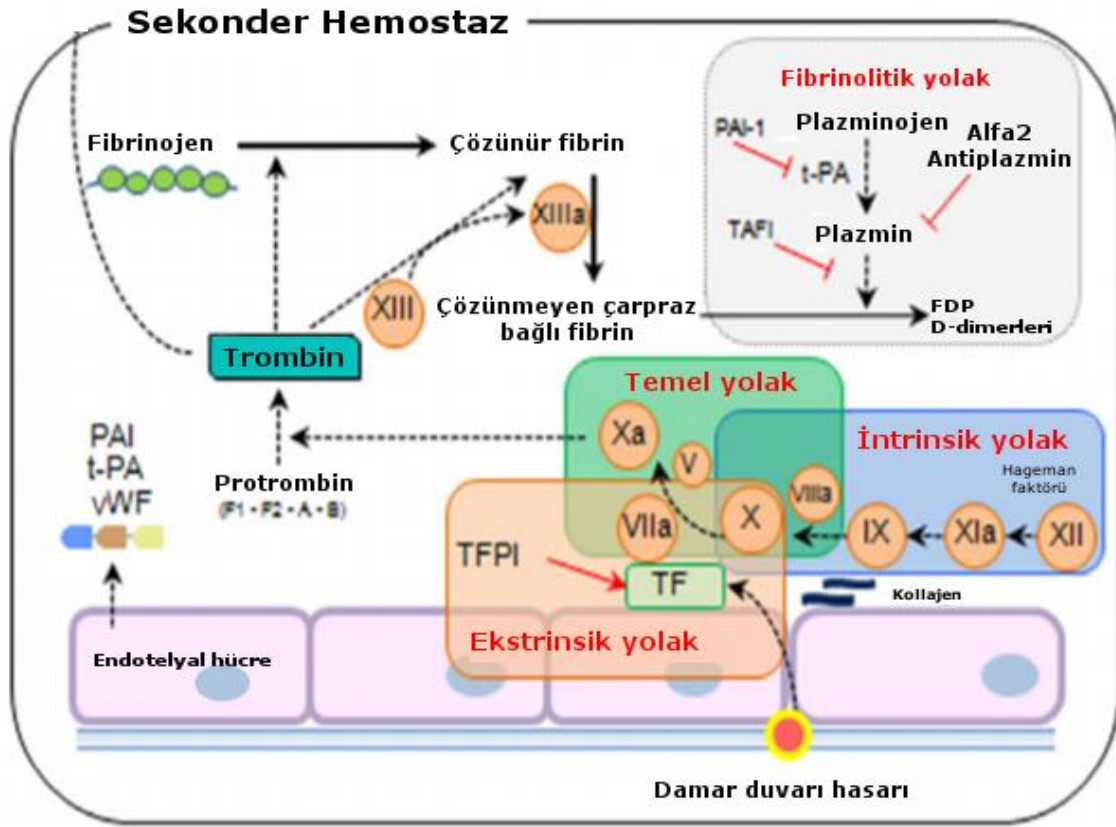
- Trombüs stabilizasyonu

Sekonder hemostaz esnasında stabil platelet agregat oluşumu, fibrinojenin trombin aracılığıyla fibrine dönüşmesiyle sağlanmaktadır. Trombin vasküler hücrelerin yüzeyinde oluşmakta ve platelet membranı sekonder hemostatik olayları başlatan ve değiştiren eden pıhtılaşma faktörleri için yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri olan reseptörleri içermektedir [8].

Plateletlerin plazma membranlarında çoğunlukla fosfolipidler, kolesterol ve glikolipidler bulunmaktadır. Temel fosfolipidler; fosfatidilkolin (PC), sfingomiyelin (SphM), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilserin (PS) ve fosfatidilinozitol (PI). SphM ve PC dış tarafta, PE ve PS ise iç tarafta olmak üzere, bu fosfolipidler plazma membranında asimetric olarak konumlanmaktadır [25]. Platelet aktivasyonu, anyonik fosfolipidlerin yer değiştirmesi ile ilişkilidir; örneğin iç taraftaki PS'nin dış tarafa çıkmasıyla fosfolipid içeriğinde % 2'den 12'ye PS artışı gözlemlenmektedir [8]. PS'nin varlığı, hasarlı bölgede trombin oluşumunu mümkün kılarak prokoagulan olaylar için katalitik yüzey sağlamaktadır [25].

Proinflatuar uyarılar doku faktörünün (TF) ekspresyonunu indüklemektedir. Pıhtılaşmada zimojen protrombinden trombin oluşumunu başlatan faktör III veya tromboplastin de denilen TF, fosfolipid maruziyetinde prokoagulan aktivite göstermekte ve trombüs büyümesine zemin hazırlamaktadır [26]. TF'nin yüzeyinde az miktarda oluşan trombin, stabil fibrin pıhtısı yaratmaya yetmez, ancak plateletleri aktive etmek için yeterlidir [8]. Aktive olmuş plateletler, sonra kalsiyum iyonu ve spesifik reseptörler aracılığı ile koagülasyon faktörlerine ve kofaktörlere bağlanabilmektedir. Sekonder hemostaz olarak kan koagülasyon yolağı intrinsik ve ekstrinsik yolakları olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Ekstrinsik yolak TF ile tetiklenmekte ve TF, faktör VII'yi (FVII), FVII ise faktör X'u (FX), o da faktör V'i (FV) aktive etmektedir. İntrinsik yolak ise subendotelial kollajen tarafından tetiklenmekte ve sırasıyla faktör XII, faktör XI, faktör IX, faktör VIII, FX ve FV birbirlerini aktive etmektedir. Aktive olmuş FV, protrombini trombine

dönüştürmekte ve trombin de fibrinojeni fibrine çevirmektedir. Endotelial hücrelerden proinflatuar uyarılara cevaben salınan vWF ve o hücrelerde eksprese olan PAI-1 de hasarlı bölgede platelet aktivasyonunu, agregasyonunu ve fibrin oluşumunu desteklemektedir. Böylelikle, fibrin pıhtısı stabil hale gelmektedir [8,22,26] (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Sekonder hemostaz (fibrin oluşumu) [22]

Trombüs, $\alpha\text{IIb}\beta 3$ aracılığı ile platelet-fibrinojen/fibrin agregatının sıkışması ile stabilize olmaktadır. Plateletlerin eksprese ettiği kas dışı miyozin II (non-muscle myosin II), komşu plateletlerin sitoskeletonlarının kenetlenmesi için gerekli olan kasılma gücünü sağlamakta ve böylelikle pıhtı daralması gerçekleşmektedir [21,27].

2.1.5. Platelet reseptörleri

Plateletler, bütün fonksiyonlarını düzenleyen çok çeşitli yüzey reseptörlerine sahiptirler. Platelet reseptörleri, sinyalizasyon yollarına göre reseptör tirozin kinazlar ve G protein-kenetli reseptörler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Başlıca platelet aktivasyon ve adezyon reseptörleri [28]

Reseptör	Agonistler	Reseptör Tipi	Sinyalizasyon Yolu
GPVI	Kollajen (fizyolojik) Laminin (fizyolojik) CRP (kollajen ilişkili peptid) (sentetik) Konvalksin (yılan zehri) JAQ1 (antikor)	Ig	Tirozin kinaz
$\alpha_2\beta_1$	Kollajen (fizyolojik)	İntegrin	Tirozin kinaz (zayıf)
$\alpha_6\beta_1$	Laminin (fizyolojik)	İntegrin	
GPIb-IX-V	vWF (fizyolojik) Ristosetin (yılan zehri)	Lösinden zengin	Tirozin kinaz
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinojen (fizyolojik) vWF (fizyolojik)	İntegrin	Tirozin kinaz
P2Y ₁	ADP (fizyolojik)	GPCR	G α_q
P2Y ₁₂	ADP (fizyolojik)	GPCR	G α_i
P2X ₁	ATP (fizyolojik)	Ca ²⁺ kanalı	
TP	TxA ₂ (fizyolojik) U46619 (sentetik)	GPCR	G α_q , G $\alpha_{12/13}$
PAR1	Trombin (fizyolojik) PAR1 peptid (sentetik)	GPCR	G α_q , G $\alpha_{12/13}$
PAR4	Trombin (fizyolojik) PAR4 peptid (sentetik)	GPCR	G α_q , G $\alpha_{12/13}$

Reseptör Tirozin Kinazlar

Reseptör tirozin kinazlar, tirozin fosforilasyonu üzerinden özel hücresel cevaplar oluşturmaktadırlar. Plateletlerde en önemli ve iyi tanımlanmış reseptör tirozin kinazlar; vWF reseptörü GPIb-IX-V, kollajen aktivasyon reseptörü GPVI / Fc reseptör (FcR) γ -zincir kompleksi, kollajen adezyon reseptörü integrin $\alpha 2\beta 1$, C-tipi lektin-benzeri reseptör 2 (CLEC-2) ve fibrinojen reseptörü integrin $\alpha IIb\beta 3$ 'tür.

Kollajen Reseptörleri

Kollajen hayvanlarda en çok bulunan proteindir. Damar duvarında yer alan bu fibröz yapılı protein, ekstraselüler matriksin ana bileşinidir. Kollajen yapısal olarak üçlü heliks peptid zincirlerinden oluşmaktadır. Bu zincirler prolince ve hidroksiprolince zengin ve her üç rezidüde bir glisin tekrarı olan GPO (glisin-prolin-hidroksiprolin) amino asit sekansı içermektedirler. Kan, damar hasarını takiben kollajen ile temasa geçmektedir [29]. Plateletlerin kollajen için, immünreseptör GPVI ve integrin $\alpha 2\beta 1$ olmak üzere iki reseptörü bulunmaktadır [30]. GPVI ve $\alpha 2\beta 1$, kollajen fibrillerinin farklı bölgelerine bağlanmaktadır. GPO, GPVI'yı aktive eden spesifik sekanstır [31]. GPVI düşük afinite ile GPO tekrarına, $\alpha 2\beta 1$ ise yüksek afinite ile GFOGER tekrarına bağlanmaktadır. GPVI öncelikli olarak hızlı ve süregelen sinyal üzerinden platelet aktivasyonunu, $\alpha 2\beta 1$ ise öncelikli olarak sıkı adezyonu sağlamaktadır. Dolayısıyla, bu iki reseptörün kollajen indüklü platelet adezyonunu ve trombüs oluşumunu düzenlemede farklı fonksiyonları bulunmaktadır [32–36].

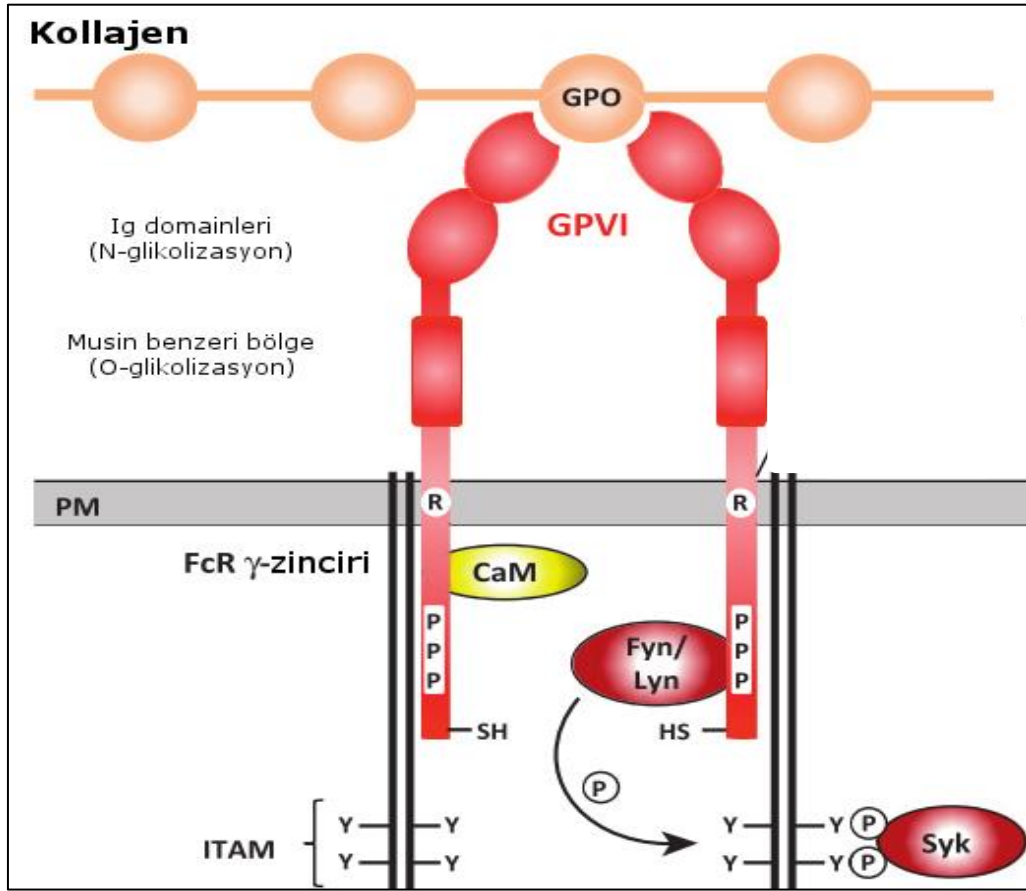
GPVI / FcR γ -zinciri kompleksi

GPVI ekstraselüler bölgesinde iki immünglobulin (IgG)–benzeri bölge, musin-benzeri kısım, transmembran bölge ve 51 amino asitlik kısa bir sitoplazmik uçtan oluşan 58 kDa ağırlığında tip I transmembran reseptörüdür (Şekil 2.7). Dinlenme halindeki insan plateletleri, yüzeylerinde yaklaşık olarak 4 000 – 6 000 adet GPVI kopyası içermekte ve bu reseptörler sadece plateletlerde ve megakaryositlerde eksprese olmaktadır. GPVI, plateletlerde kollajen agonisti için ana sinyalizasyon reseptörüdür. GPVI'nın transmembran bölgesindeki pozitif yüklü arjinin, FcR γ -zinciri ile nonkovalent etkileşim sağlamaktadır. GPVI ile γ -zincirinin birleşmesi, platelet yüzeyinde GPVI ekspresyonu için önemli ve ayrıca sinyalizasyon için de ihtiyaç duyulan bir durumdur [37]. GPVI, dinlenme

halindeki plateletlerin yüzeyinde kısmen dimer olarak bulunmakta ve ligand ile birlikte kümelenmeyi, sinyalizasyonu teşvik etmektedir [38,39]. GPVI'nın fizyolojik ligandları arasında kollajen ve diğer ekstraselüler matriks komponentlerinden biri olan laminin yer alırken [40], GPVI-spesifik kollajen-ilişkili sentetik peptid olan kollajen-ilişkili peptid (CRP) [41], yılan toksini konvalksin [42] ve GPVI'nın ekstraselüler bölgesine bağlanarak sinyalizasyonu tetikleyen monoklonal antikör JAQ1 ise fizyolojik olmayan ligandlarıdır [43]. Tüm bunlara ek olarak, hem insan, hem fare plateletlerinde GPVI'yı stimüle ettiği bildirilen, GPVI'nın yeni keşfedilmiş ligandı fibrindir [44].

GPVI agonisti CRP, tekrarlı GPO dizisinden oluşmakta ve en az kollajen-indüklü platelet aktivasyonu kadar güçlü plateletleri aktive etmektedir. Tekrarlı GPO motiflerinin varlığından ve ligandın çapraz bağlanmasından dolayı, CRP güçlü bir agonist olma potansiyeline sahiptir [45,46].

Güney Amerika çingiraklı yılanından (*Crotalus durissus terrificus*) üretilen yılan C-tipi lektin proteini konvalksin, GPVI'nın saflaştırılmasında ve klonlanmasında kullanılmıştır ve GPVI'ya spesifik olarak bağlanmaktadır. Konvalksin, yapı olarak α - ve β - subünitelerini içeren tetramerik bir proteindir [47]. Güçlü bir agonist olan konvalksin, multimerik etkileşimler aracılığı ile birkaç GPVI molekülünü kümelendirerek plateletleri aktive etmektedir.

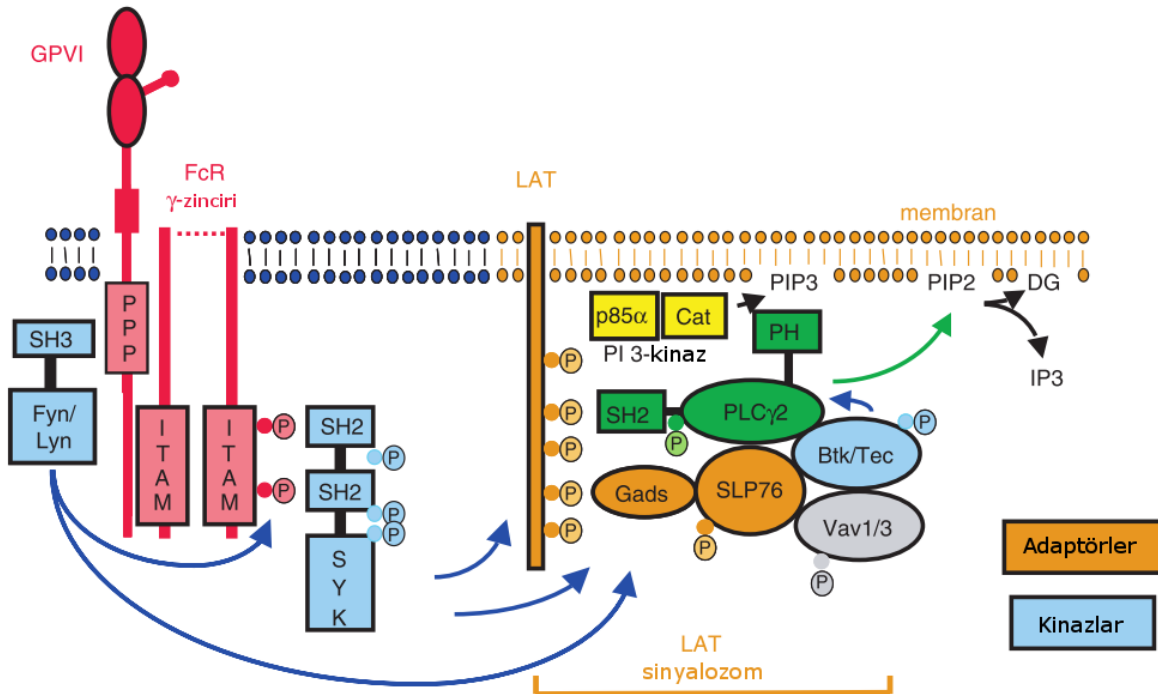


Şekil 2.7. Glikoprotein VI / Fc reseptör γ -zinciri kompleksinin yapısı [5]

GPVI Sinyal Yolağı

T ve B hücre reseptörü sinyal yollarındaki birçok sinyal moleküllerini kullanması dolayısıyla GPVI sinyal yolağı aslında, bu sinyal yollarının karışımından oluşmaktadır. Önemli olan ve erken safhada meydana gelen GPVI sinyalizasyonu, FcR γ -zincirindeki immünreseptör tirozin-bazlı aktivasyon motifin (ITAM) fosforilasyonudur ve her FcR γ zinciri, bir ITAM kopyası içermektedir. FcR γ fosforilasyonunu sağlayan ana Src kinazları; Fyn ve Lyn'dir. ITAM fosforilasyonu, GPVI'nın sitoplazmik ucundaki prolince zengin bölgeyle ilişkili olan Fyn ve Lyn'in SH3 domainleri aracılığıyla gerçekleşmektedir [48] (Şekil 2.8). Genetik olarak, Fyn ve Lyn'in tek tek veya birlikte eksik olduğu farelerde yapılan çalışmalarda, Fyn'in pozitif olarak GPVI sinyalizasyonunu, Lyn'in ise hem pozitif, hem de negatif olarak GPVI sinyalizasyonunu regüle ettiği ve Fyn ve Lyn'in beraber eksikliğinde ise diğer Src ailesi protein tirozin kinazları (SFK) tarafından kompanse

edildiğinden [49], eksiklik olsa da fosforillenen FcR γ -zinciri ITAM'a bağlandığı ve SFK'lar tarafından oto-fosforilasyona uğradığı saptanmıştır. Aktif Syk, lipid yığınlarında sinyali arttırmakta ve downstream hedef olan adaptör proteinlerinden; 'T hücrelerin aktivasyonu için bağlayıcı protein (linker for activation of T-cells, LAT), lenfosit sitozolik protein 2 (lymphocyte cytosolic protein 2, SLP-76), GRB2-ilişkili adaptör protein 2 (GRB2-related adaptor protein 2, Gads), Vav proteinleri (küçük GTPazlar); Tec ailesi protein tirozin kinaz, efektör proteinler olan fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI 3-kinaz) ve fosfolipaz C γ 2'den (PLC γ 2) oluşan 'LAT sinyalozum'a dahil olmaktadır [48]. PLC γ 2, ikincil haberciler olan 1,2-diaçilgliserol (DAG) ve inozitol 1,4,5-trisfosfat (IP₃) oluşumunu indüklemektedir. DAG, protein kinaz C'yi (PKC) aktive etmekte ve IP₃ de intraselüler depodan Ca²⁺ salınımını ve sonra Ca²⁺ girişini indüklemektedir. GPVI sinyalizasyonu sonucunda; hızlı integrin aktivasyonu, α -granül ve dens granüllerin içeriklerinin sekresyonu, ADP ve TxA₂ gibi sekonder mediyatörlerin salınımı gerçekleşmekte ve tüm bunlar primer uyarıcı sinyali çoğaltmak ve trombüsün büyümesi için önem arz etmektedir [50].



Şekil 2.8. GPVI sinyal kaskadı [48]

Integrin $\alpha 2\beta 1$

GPIa/IIa olarak da bilinen integrin $\alpha 2\beta 1$ reseptörü, plateletlerde tanımlanan ilk kollajen reseptörü olup ana adezyon reseptörü olarak görev yapmaktadır [51]. Genellikle, yüksek afiniteyle kollajen çeşitleri (I – V)’e bağlanmaktadır [34]. Bireylere göre değişkenlik gösterse de, dinlenme halindeki insan plateletinin her birinde yaklaşık olarak 900 – 4 000 adet integrin $\alpha 2\beta 1$ reseptörü bulunmaktadır [51]. Platelet aktivasyonunda reseptörün ekspresyon düzeyi değişmemektedir. Integrin $\alpha 2\beta 1$ genelde, dinlenme halindeki plateletin yüzeyinde ve düşük afiniteli durumda bulunmaktadır. Adezyonu sağlayan agonist-indüklü ‘inside-out’ sinyalizasyonuna cevaben $\alpha 2\beta 1$, konformasyonel değişikliğe uğrayarak yüksek afiniteli duruma geçmektedir [52]. GPVI’nın agonistiyle indüklenmesi, aynı zamanda $\alpha 2\beta 1$ aktivasyonuna yardımcı olduğu gibi, kollajenin $\alpha 2\beta 1$ ’e bağlanması, düşük afiniteli GPVI-kollajen etkileşimini kuvvetlendirmekte ve platelet aktivasyonu amacıyla zayıf ‘outside-in’ sinyalizasyonunu desteklemektedir. Dolayısıyla, GPVI ve $\alpha 2\beta 1$ birbirlerinin görevlerini arttırmak için kooperatif etkiyle çalışmaktadır. Ancak, $\alpha 2\beta 1$ sinyalizasyon yolağı GPVI sinyalizasyon yolağındaki Src, Syk, SLP-76 ve PLC γ 2 gibi pek çok aynı sinyal molekülleri içermesine rağmen, $\alpha 2\beta 1$ sinyalizasyonu GPVI sinyalizasyonundan daha zayıf olduğu gibi trombüs oluşumunda da daha az rolü bulunmaktadır [52,53].

CLEC-2

C-tipi lektin-benzeri (CLEC)-2 reseptörü, insan ve fare plateletlerinde eksprese olmaktadır. CLEC-2’nin endojen ligandı tip I transmembran glikoproteini olan ve ilk olarak immün hücrelerde tanımlanan podoplanin, platelet agregasyonunu güçlü bir şekilde indüklemektedir [54]. CLEC-2 sinyal yolunun aydınlatılmasıyla ve son yıllarda özellikle tümör metastazındaki rolünün keşfedilmesi nedeniyle dikkat çekmektedir. Tümör hücre yüzeyindeki podoplaninin, CLEC-2 reseptörüyle bağlanarak tümör hücreleriyle indüklenen platelet agregasyonunda ve kanser metastazında rol oynamaktadır [55].

Fibrinojen reseptörü – integrin $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIb/IIIa)

GPIIb/IIIa olarak da bilinen integrin $\alpha IIb\beta 3$ reseptörü, platelet yüzeyinde en çok bulunan glikoproteindir. Dinlenme halindeki insan plateletinin her birinde yaklaşık olarak 60 000 – 80 000 adet integrin $\alpha IIb\beta 3$ eksprese olmaktadır. Bu, α -granüllerde olan $\alpha IIb\beta 3$

reseptörünün platelet yüzeyine taşınması ile % 30-50 oranında artmaktadır [56,57]. α Ib alt ünitesi sadece megakaryosit ve plateletlerde bulunurken, β 3 alt ünitesi ise diğer α alt ünitelerle etkileşim halinde farklı hücre tiplerinde eksprese olmaktadır. İntegrin α Ib β 3 reseptörü fibrinojen, fibronektin ve vWF'ü içeren birçok ligandla bağlanmaktadır. Dinlenme halindeki plateletlerde α Ib β 3, genelde düşük afiniteli halde bulunmakta ve agonist-indüklü 'inside-out' sinyalizasyonuna cevaben konformasyonel değişikliğe uğrayarak yüksek afiniteli duruma geçmektedir [57]. Ligand-ilişkili α Ib β 3'ün kümelenmesi, 'outside-in' sinyalizasyonu yolu ile, filopodia ve lamellipodia oluşumunu, sekresyon ve pıhtının daralmasını tetiklemektedir. α Ib β 3, vasküler hasarda adezyon ve agregat oluşumu için önemlidir [56,57].

α Ib β 3 ve GPVI reseptörlerinin outside-in sinyal yolları arasında bazı benzerlikler bulunmaktadır. GPVI reseptörünün sinyalizasyonuna benzer olarak, fibrinojen-ilişkili α Ib β 3 reseptörünün kümelenmesi SFK'ların birbirini izleyen aktivasyonuna, SLP-76 gibi adaptör proteinlerin toplanmasına ve PLC γ 2, PI 3-kinaz ve Vav küçük GTPazları içeren downstream efektör enzimlerin aktivasyonuna yol açmaktadır. α Ib β 3 ve GPVI reseptörlerinin bulundukları yer ve sinyalizasyon mekanizması arasındaki iki önemli fark vardır. GPVI lipid yığınlarında yer alırken, α Ib β 3 ise yer almamaktadır. Transmembran adaptör protein LAT, GPVI sinyalizasyonu açısından önemliyken, α Ib β 3 sinyalizasyonu içinse bir değer taşımamaktadır [58].

vWF reseptörü – GPIb-IX-V kompleksi

Her platelette yaklaşık olarak 25 000 adet bulunan GPIb-IX-V, yapısal olarak reseptör kompleksidir ve sadece platelet ve megakaryositlerde eksprese olmaktadır. Lösinden zengin tekrarlı protein süperailisine ait GPIb α - ve β -alt üniteleri, GPIX ve GPV'den oluşan reseptör kompleksi, dört farklı gen tarafından kodlanmaktadır [59].

GPIb-IX-V reseptörünün asıl fonksiyonu, hasarlı bölgedeki plateletlerin başka, daha yüksek afiniteli reseptörlerle etkileşimini kolaylaştırmak için plateletlerin hızlarını düşürerek bu bölgeye plateletleri toplamaktır. Yüksek basınçta, aktive olmuş plateletlerin yüzeyinde veya immobilize olmuş kollajenin üzerinde GPIb α ve vWF arasındaki etkileşim, sürüklenen plateletlerin ilk bağlanması için oldukça önemlidir. Ancak bu etkileşimin tek

başına, stabil adezyonu sağlamak için yetersiz olması nedeniyle adezyonu stabil hale getirmek için integrinlerin aktivasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır [60].

GPIb-IX-V / vWF etkileşiminin, sadece fiziksel etkileşim olan plateletlerin subendotelial matrikse tutunmalarını sağladığı ve intraselüler aktivasyon sinyalleri oluşturan kollajen reseptörleriyle kollajenin birleşmesi için gerekli zamanı sağlamakta rolü olduğu düşünülmektedir. Buna karşın GPIb-IX-V, Src ailesi kinazı ve PLC γ 2-ilişkili yollar üzerinden platelet aktivasyonuna ve α IIB β 3-aracılı agregat oluşumuna yol açan intraselüler sinyalizasyonu başlattığı bilinmektedir. GPIb-IX-V ve vWF arasındaki etkileşim, PI 3-kinaz ve Src arasındaki bağlanmayı indüklemekte ve bu da sonrasında downstream sinyalleri tetikleyerek PLC γ 2 aktivasyonuna yol açmaktadır [61].

G protein–kenetlenmiş reseptörler (GPCR)

Platelet hücreleri, platelet aktivasyonunu ve inhibisyonunu düzenlemede görev alan GPCR'ler eksprese etmektedirler. GPCR'ler, reseptör tirozin kinazlara göre farklı sinyal iletim yolunu izlemektedirler. Bu sinyal iletim yolunu kullanarak etki eden önemli platelet aktivasyon reseptörleri; 1) trombin proteaz ile aktive olan reseptörler (PAR-1 ve PAR-4), 2) ADP reseptörleri (P2Y₁ ve P2Y₁₂), 3) TxA₂ reseptörü (TP)'dür. [50].

Trombin proteaz ile aktive olan reseptörler (PAR)

Pıhtılaşma faktörü IIa olarak da bilinen trombin, aktive olmuş plateletlerin yüzeyinde gerçekleşen koagülasyon kaskadı denen enzimatik reaksiyonlar serisi sonucunda oluşan çözünebilir bir plazma serin proteazdır [62]. İnaktif zimojen protrombin aktif trombine dönüşmekte ve trombin çözünebilir fibrinojeni çözünmeyen fibrin polimerine çevirmektedir (Şekil 2.6). Trombin aynı zamanda çok güçlü bir platelet agonistidir ve bağlayıcı ligand olarak bilinen kısa aktivatör peptid sekansın açığa çıkması için PAR-1 ve PAR-4'ü parçalayarak platelet aktivasyonunu tetiklemektedir [63]. İnsan plateletleri yaklaşık olarak 500 – 2 000 adet PAR-1 eksprese etmektedirler [64]. PAR-1 ve PAR-4 heterotrimerik G proteinlerle kenetlenmektedir. İnsan plateletleri PAR-1 ve PAR-4'ü eksprese ederken, fare plateletleri ise PAR-3 ve PAR-4'ü eksprese etmektedirler. PAR-1 ve PAR-4, G protein α -alt birimleri olan G_q, G_{12/13} ve G_i'yi aktive edebilmektedir. G_q yolağı, ana PAR-1 ve PAR-4'ün aktivasyon yolağı olmakla birlikte, PLC β 'nın

aktivasyonuna, IP_3 'ün ve DAG'ın oluşumuna yol açmakta ve sonucunda, sırasıyla PKC'yi ve Ca^{2+} mobilizasyonunu aktive etmektedir. $G_{12/13}$ yolağı ise, Rho kinaz aktivasyonuna ve sitoskeletal düzenlemelere öncülük ederken, G_i yolağı da platelet aktivasyonuna sebep olan adenilat siklazı inhibe etmektedir [63]. Trombin reseptörlerinin sinyalizasyonu G protein-kenetli reseptör yolağı üzerinden olmasına rağmen, downstream sinyalizasyon yolağında Src kinaz komponentinin küçük bir rolü bulunmaktadır [65]. PAR-3 transmembran sinyalizasyonu sağlamazken, fare plateletlerinde PAR-4 reseptörünün parçalanmasını ve aktivasyonunu destekleyerek kofaktör olarak fonksiyon göstermektedir [63].

ADP reseptörleri - $P2Y_1$ ve $P2Y_{12}$

Aktivasyon esnasında dens granüllerden salınan bir platelet agonisti olan ADP, aynı zamanda vasküler hasarlı bölgedeki zarar görmüş endotel hücrelerden de salınmaktadır. ADP'nin fizyolojik fonksiyonu, pozitif feedback mekanizma ile platelet aktivasyonunu attırmaktır ve bu, büyüyen trombüse plateletlerin toplanmasını şiddetlendirmek açısından önemlidir [50]. Plateletler $P2Y_1$ ve $P2Y_{12}$ olmak üzere iki adet ADP reseptörü eksprese etmektedirler. İnsan plateletlerinde, $P2Y_{12}$ 'den yaklaşık 10 kat fazla olarak 150 kopya $P2Y_1$ bulunmakta ve iki reseptör birlikte hızlı ve güçlü bir şekilde platelet aktivasyonunu indüklemektedir [4]. $P2Y_1$ G_q heterotrimerik G protein α -subünitesine bağlanırken, $P2Y_{12}$ ise G_i 'ye bağlanmaktadır [50]. $P2Y_1$ reseptörü, ADP'ye cevaben Ca^{2+} mobilizasyonunu, platelet şekil değişikliğini, zayıf ve geçici agregasyonu tetiklemektedir. $P2Y_{12}$, adenilat siklazı inhibe etmekte ve bu, intraselüler cAMP düzeyinde düşmeye sebep olurken, aynı zamanda PI 3-kinazı da aktive etmektedir. $P2Y_{12}$ aktivasyonu; kollajen, TxA_2 ve integrin $\alpha IIb\beta 3$ gibi diğer uyarıcılar tarafından başlatılan platelet agregasyonunun ve amplifikasyonunun sinyallerini desteklemektedir [4]. $P2Y_1$ ve $P2Y_{12}$ reseptörleri sinyalizasyonlarını farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleştirirler de, Src kinazın her iki reseptörün downstream yolağında aktive olduğu bildirilmiştir [66]. Bu iki reseptörlerden birinin inhibisyonuyla bile, platelet agregasyonunda belirgin bir düşüş gözlemlenmesinden dolayı, $P2Y_1$ ve $P2Y_{12}$ 'nin koaktivasyonu normal ADP-indüklü platelet aktivasyonu için önemlidir [4].

Tromboksan A₂ reseptörü – TP

TxA₂, aktivasyon sinyallerini çoğaltmak ve trombüs oluşum bölgesine ek plateletleri toplamak için aktive olmuş plateletler tarafından sentezlenen kısa ömürlü bir lipid mediyatörüdür. Aynı zamanda güçlü bir vazokonstriktör olan TxA₂, aktive olan plateletlerde tromboksan-A sentaz enzimi tarafından prostaglandin H₂'den (PGH₂) meydana gelmektedir. TP reseptörü üzerinden sinyalizasyon, platelet agregasyonuna yol açan platelet aktivasyonunu ve sekresyonunu indükleyerek gerçekleşmektedir. Trombin reseptörlerinden PAR-1 ve PAR-4, ADP reseptörlerinden P2Y₁ gibi, plateletlerde aktive olmuş TP reseptörü G_q ve G_{12/13} üzerinden etkisini göstermektedir [50].

TxA₂ ve ADP sinerjistik etkiyle çalışmaktadır. Bu sinerjistik etkiyle, platelet aktivasyon sinyalini şiddetlendirmekteler ve daha güçlü platelet agregasyonu sağlamaktadırlar [50].

ITIM reseptörleri

Plateletler; platelet endotelyal hücre adezyon molekülü-1 (PECAM-1, CD31), TREM-benzeri transkript-1 (TLT-1), G6b-B protein ve karsinoembriyonik antijen-ilişkili hücre adezyon molekülü-1 (CEACAM-1) gibi birkaç immünreseptör tirozin-bazlı inhibisyon motif (ITIM) - içeren reseptörler / reseptör-benzeri proteinler eksprese etmektedirler. ITIM-içeren reseptörler, ITAM reseptörlerinin sinyalizasyonunu inhibe etme özellikleriyle tanımlanmışlardır [67].

Plateletlerde tanımlanan ilk ITIM-içeren reseptör olan PECAM-1, dinlenme halindeki plateletlerde yaklaşık olarak 10 000 adet ve endotelyal hücrelerde ise 1 000 000 adet eksprese olmaktadır [67]. PECAM-1'in fizyolojik fonksiyonu, sağlıklı bireylerin dolaşımında bulunan inaktif durumdaki plateletleri korumak ve hasarlı bölgede trombüs boyutunu sınırlandırmaktır. Yapılan PECAM-1 - eksik fare çalışmaları bu modeli desteklemektedir [68]. Ayrıca, PECAM-1'in çapraz bağlanması; ITAM-içeren kollajen reseptörü GPVI / FcR γ -zinciri, G protein-kenetli reseptör ailesinden olan trombin reseptörü PAR-4 ve vWF reseptörü GPIb-IX-V sinyalizasyonunu inhibe etmektedir. Plateletlerdeki diğer ITIM-içeren reseptörler hem aktivatör, hem de inhibitör reseptör olarak görev yapmakta ve ayrıca GPCR-ilişkili cevabı düzenlemektedirler [69].

2.1.6. Platelet inhibisyonu

Periferik dolaşımda bulunan plateletler, istenmeyen trombüs oluşumunu önlemek için aktive olmadan dinlenme konumunda bulunmalıdırlar. Plateletlerin dinlenme konumunda tutan üç farklı inhibitör mekanizma bulunmaktadır. Bunlar, platelet aktivasyonunun azalmasına yol açan ITIM reseptörlerinin aktivasyonu, endotel hücrelerden salınan prostaglandin I₂ (PGI₂)'nin ve nitrik oksit (NO)'in varlığı şeklinde sıralanmaktadır (Çizelge 2.4) [67].

Çizelge 2.4. Majör platelet inhibitör mekanizmaları [28]

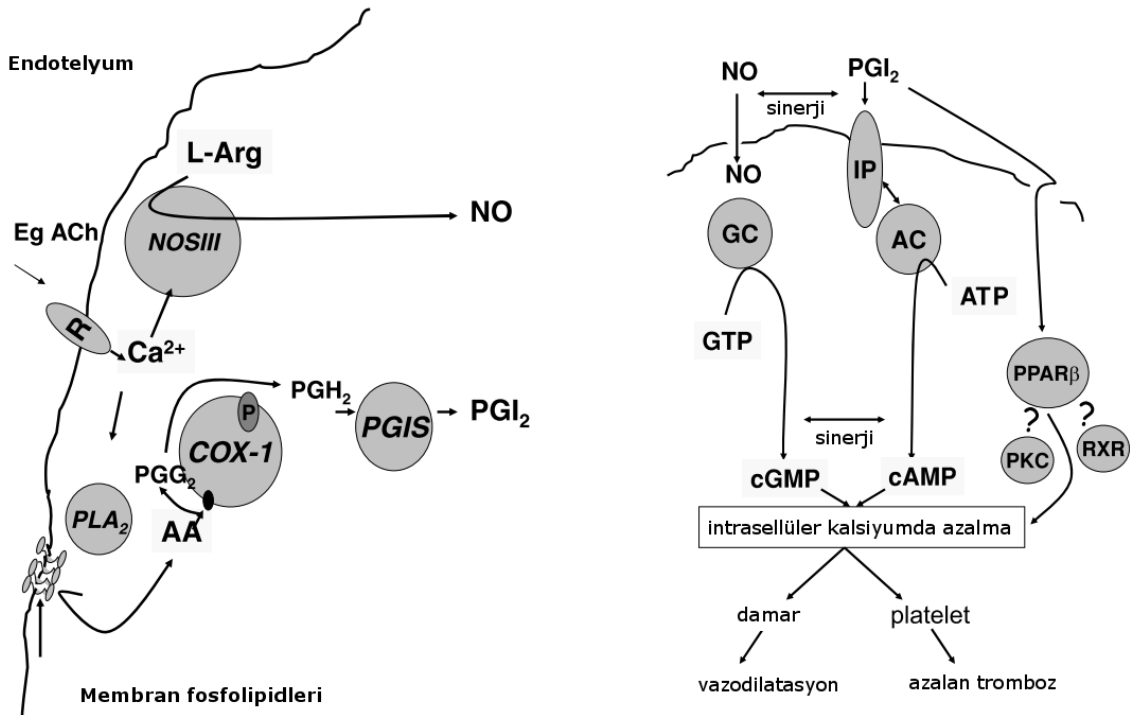
Reseptör	Agonistler	Reseptör Tipi	Sinyalizasyon Yolu
-	Nitrik oksit	-	cGMP
IP	PGI ₂	GPCR	Gα _s
CD39	ATP ADP	-	
G6b	Unknown	Ig	
PECAM- 1	PECAM- 1	Ig	
CEACAM- 1	CEACAM- 1	Ig	
TLT- 1	Unknown	Ig	Unknown

Prostaglandin I₂

Prostasiklin olarak da adlandırılan PGI₂; platelet aktivasyonunun, adezyonunun, agregasyonunun ve sekresyonunun güçlü bir inhibitörüdür. PGI₂, endotelial hücrelerde prostasiklin sentaz enzimi tarafından PGH₂'den sentezlenmekte (Şekil 2.9) ve ardından düşük konsantrasyonlarda dolaşıma salınmaktadır. PGI₂, kısa yarılanma ömrüne sahiptir ve plateletler üzerindeki etkisini damar duvarına yakın bir bölgede göstermektedir [70,71]. PGI₂, G_s-kenetli reseptöre bağlanmakta ve bu reseptör üzerinden sinyalizasyonunu gerçekleştirmektedir. PGI₂ bağlandığında aktiveleşen G_s, adenilat siklazı cAMP'yi meydana getirmek üzere uyarmaktadır. Oluşan cAMP, protein kinaz A'yı (PKA) aktive etmektedir (Şekil 2.9). PKA, plateletlerde bulunan birçok proteini fosforilleyerek inhibitör etkisini göstermektedir [70].

Nitrik Oksit

NO, platelet aktivasyonunu ve agregasyonunu önlemede oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Endotelial hücrelerde nitrik oksit sentaz enzimi tarafından L-argininden üretilen (Şekil 2.9) ve salınan NO, plateletlerin dinlenme durumlarını sağlamakta ve sürdürmektedir. Kısa yarılanma ömrüne sahip NO, damar duvarına yakın bölgede yüksek konsantrasyonlarda lokalize olurken duvardan uzaklaştıkça konsantrasyonu da azalmaktadır. NO kolayca platelet plazma membranını geçerek platelet fonksiyonu üzerine etkisini göstereceği sitozole girmektedir. NO'nun inhibitör etkisi, cGMP oluşumu ile sonuçlanan çözünür guanilat siklaz aktivasyonu ile olmaktadır. Artan intraselüler cGMP düzeyi, protein kinaz G'yi (PKG) aktive etmektedir [70] (Şekil 2.9). Ayrıca, PKG'nin aktivasyonu intraselüler kalsiyum düzeyinin artışı, integrin aktivasyonunu, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini ve platelet granül sekresyonunu içeren hemen hemen tüm agonist-indüklü olayları inhibe etmektedir [72].

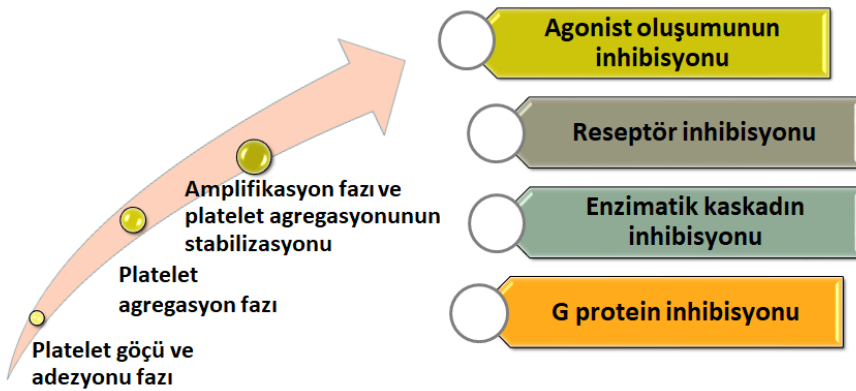


Şekil 2.9. NO ve PGI₂'nin sentezi, NO ve PGI₂'nin inhibisyon mekanizmaları [70]

2.2. Antiplatelet İlaçlar

Antiplatelet ilaçlar, morbidite ve mortalite nedenleri arasında ilk sıralarda yer alan kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılan en önemli ilaç grubudur. Bu ilaçlar, koroner arter hastalıkları, akut koroner sendrom, periferik arteriyel hastalıklar ve serebrovasküler felç gibi aterotrombotik risk taşıyan pek çok hastalıkta, plak rüptürü ve erozyonunu takiben veya cerrahi girişimler sonrası gelişen arteriyel trombozun önlenmesinde en önemli tedavi seçeneğini oluşturmaktadırlar.

Günümüzde klinik kullanımda olan veya prelinik aşamada olup kliniğe geçmek üzere geliştirilmekte olan pek çok antiplatelet ilaç grubu bulunmaktadır. Bu ilaçlar; çoklu transmembran sinyal yollarının sürece katıldığı kompleks bir mekanizmayı içeren platelet aktivasyonunda, agregasyonunda ve agregasyonun stabilizasyonunda rol oynayan hedeflere yöneliktir. Bu hedefler; platelet reseptörleri ve bu reseptörlerin ligandları, sinyal proteinleri veya platelet fonksiyonunun çözünür mediyatörleridir (Şekil 2.10).



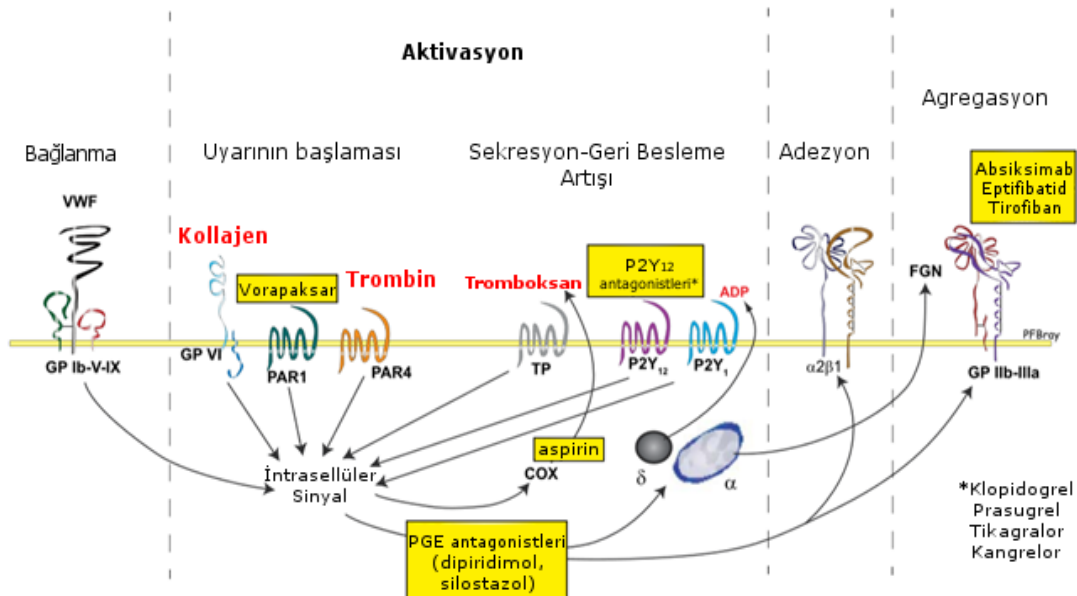
Şekil 2.10. Antiplatelet ilaç hedefleri

Mevcut antiplatelet ilaçların klinik kullanımıyla ilgili henüz çözüme ulaştırılmamış en önemli problemlerden biri bu tedavinin uygulandığı bireylerde hayatı tehdit edebilecek kanama riskinin hala mevcut olmasıdır. Klinikte yaygın olarak kullanılan antiplatelet ilaçlar ya aterotrombotik riski olan hastalarda kronik olarak ya da cerrahi girişim esnasında trombüs gelişiminin önlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Vasküler hasara karşı cevap olarak oluşan ve patolojik trombüs oluşumuna neden olan platelet aktivasyonu ve agregasyonu aynı zamanda normal hemostaz için önemli bir fizyolojik koruyucu mekanizmadır ve platelet fonksiyonunun bloke edilmesi dolayısıyla kanama riskini

arttırmaktadır. Her ne kadar antiplatelet ilaçlar ölümcül ve ölümcül olmayan vasküler hastalıkları azaltmada etkili olsalar da ana güvenlik sorunu yüksek kanama riskidir. İdeal antiplatelet ilaç; vasküler hastalıklarda trombojenik platelet kaynaklı mekanizmaları spesifik olarak inhibe ederken plateletlerin hemostaz ve yara iyileşmesindeki normal fonksiyonlarını engellememelidir.

Günümüzde antiplatelet tedaviye yönelik hala tam olarak çözülmemiş diğer problemler; etkinlik ve güvenilirlik, optimal doz, uygulama şekli, kombine tedavi, klinik değerlendirme ve ilaç direnci gibi sorunlardır. Bireyler arasındaki platelet fenotip veya genotip farklılığına bağlı olarak diğer aterotrombotik risk faktörleriyle de birleştiğinde bireylerde platelet reaktivitesi ve trombotik yatkınlık da değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle antiplatelet tedavide pratik bir klinik klavuz, doz ve izlem için bir standart belirlemek zor olmaktadır.

Günümüzde FDA tarafından onaylanmış 4 ana ilaç grubu tek başına veya kombine olarak antiplatelet tedavide kullanılmaktadır: Siklooksijenaz-1 inhibitörleri (aspirin), ADP P2Y₁₂ reseptör antagonistleri (kangrelor, klopidoğrel, prasugrel ve tikagrelor), PAR1 antagonistleri (vorapaxar) ve GPIIb/IIIa antagonistleri (abciximab, eptifibatid, ve tirofiban) (Şekil 2.11) [73].



Şekil 2.11. Mevcut onaylı antiplatelet ilaçlar ve etki bölgeleri [74]

2.2.1. Siklooksijenaz-1 (COX-1) ve tromboksan sentaz inhibitörleri ile tromboksan-prostanoid (TP) reseptör antagonistleri

Kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklara antitrombotik tedavi yaklaşımında uzun yıllardır kullanılan en önemli ilaçlardan biri olan Aspirin selektif olmayan irreversible siklooksijenaz (COX) inhibitörüdür. İlk antiplatelet ilaç olan aspirin, kardiyovasküler hastalıkların primer ve sekonder tedavisinde önemli rol oynamakta ve bu hastalıklar sonucu oluşan ölüm oranını düşürmektedir. Aspirinin plazma yarılanma ömrü sadece 15-20 dakika iken, COX-1'in geri dönüşümsüz inaktivasyonundan dolayı aspirinin platelet inhibitör etkisi plateletlerin yaşamı süresince devam etmektedir [75]. Aspirin COX-1 enzimini asetilleyerek geri dönüşümsüz olarak inhibe etmekte ve platelet aktivasyonunun feedback amplifikasyonunda önemli bir agonist olan TxA_2 oluşumunu önlemektedir. Uyarıya bağlı olarak plateletlerde araşidonik asitten COX-1 enzimi aracılığıyla sentezlenen ve salınan TxA_2 , TP reseptörleri aracılığıyla fosfolipaz C aktivasyonuna ve böylece platelet agregasyonuna yol açmaktadır. TxA_2 diğer platelet agregasyon agonistleri için de amplifiye edici bir sinyal olduğundan COX-1 inhibisyonu, platelet aktivasyonundaki birçok yolağı etkilemektedir [76]. Kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkların önlenmesinde yarar sağlamakla birlikte, aspirin ve diğer non-steroidal antiinflatuvar ilaçların kullanımı kanama riskini arttırmaktadır. Birçok dokuda bulunan COX-1'den oluşan prostaglandinler gastrik mukozayı korurken, enflamasyonda görevli COX-2'den oluşan prostaglandinler ağrı kesici, ateş düşürücü fonksiyonları gerçekleştirmektedir. Dolayısıyla, aspirinin kanama riski oluşturan etkisi hem antiplatelet etkisi, hem de koruyucu prostaglandinlerin gastrointestinal üretiminin inhibisyonu ile ilişkilidir. Bu nedenle plateletler üzerindeki etkisinden bağımsız olarak aspirinin kanama oluşturma riski doz arttıkça artmaktadır. Ayrıca, platelet dışı dokularda da prostanoid sentezini inhibe ettiği için kanamaya neden olmaktadır [77,78]. Akut koroner sendromlu, stabil koroner arter hastalığı, iskemik inme veya periferik vasküler hastalığı olan hastalarda aspirinin tek başına veya P2Y_{12} reseptör antagonisti ile birlikte verildiği dual antiplatelet tedavilerde, yıllık gastrointestinal kanama insidansı % 2-4 ve intrakraniyal kanama insidansı ise % 0,5 olarak bildirilmiştir [79].

Aspirin, koroner arter hastalığı gelişme riski yüksek olan bireylerde hastalığın önlenmesinde, koroner arter hastalığı olanlarda ise advers etkilerin veya tekrarlayan iskemik atakların önlenmesinde etkin olmasına rağmen hastaların % 5 - 60'ında aspirin

direncine bağılı yetersiz antiplatelet etki elde edilmektedir [76,80]. Aspirin direnci; genetik nedenler, bazı hastalıklar, ilaç etkileşimleri ve aspirinin uygun olmayan dozda kullanımı gibi birçok faktörden etkilenmektedir [73]. Aspirin direncinin, aspirinin hücre içi konsantrasyonunu regüle eden multi ilaç rezistans protein 4 (MPR 4) ekspresyonunun aspirin tarafından arttırılmasından veya COX enzimi polimorfizminden kaynaklanabileceği bilinmektedir [73,81].

Yeni antiplatelet ilaç geliştirmeye yönelik çalışmalarda; TP reseptörlerinin blokasyonu hedeflenmiş, böylece TxA_2 'nin plateletlerle etkileşiminin yanı sıra diğer hücrelerden gelen endoperoksit ara ürünlerinin de plateletlerle etkileşiminin engellenmesi amaçlanmıştır. TP reseptörlerinin bloke edilmesi teorik olarak daha etkili bir yaklaşım olarak düşünülerek hem TP reseptörü, hem de tromboksan sentaz inhibitörü olan dual etkili birçok aday ilaç geliştirilmeye çalışılmıştır. Bunlardan oral olarak aktif, selektif ve reversibl antagonist olan terutroban, periferel arter hastalığı olanlarda doz bağımlı antiplatelet etki göstermiş, ancak yapılan Faz III çalışmasında aspirine bir üstünlüğü bulunmamıştır [76,82]. Diğer bir dual TxA_2 ve TP reseptör antagonisti olan pikotamidin de majör advers kardiyovasküler olaylarının oranını azaltmada aspirine kıyasla bir üstünlüğünün olmadığı görülmüştür [83]. Plateletlerde doğrudan COX-2'yi irreversibl ve selektif olarak COX-1'i inhibe eden Triflusal ise Avrupa, Asya ve Güney Amerika'da kullanılmaktadır [74].

2.2.2. P2Y₁₂ ADP reseptör antagonistleri

Platelet dens granülleri yüksek konsantrasyonda adenosin nükleotidleri (ADP, ATP, adenosin polifosfat) içermektedir ve fizyolojik agonistlere cevap olarak salınan bu nükleotidler platelet aktivasyon sürecini otokrin olarak hızlandırmaktadır. Salınan ADP'nin P2Y₁ ile etkileşimi Ca^{2+} mobilizasyonunun, platelet şekil değişikliğinin ve agregasyonunun başlamasına neden olurken, P2Y₁₂ reseptörüyle etkileşimi daha büyük ve stabil platelet agregatlarının oluşmasına neden olmaktadır. P2Y₁₂ reseptörü, sinyal yolu aracılığı ile platelet adezyon reseptörü olan GPIIb/IIIa'nın aktivasyonuna ve bu reseptörün aktif konformasyonunun sürdürülmesine önemli katkıda bulunarak trombüs stabilizasyonuna neden olmaktadır [76]. Bu nedenle P2Y₁₂ reseptörleri antiplatelet tedavide hedef reseptörlerdir. P2Y₁₂ reseptör antagonistleri iki ana ilaç sınıfından oluşmaktadır. Bunlar; tiyepiridinler (tiklopidin, klopidoğrel, prasugrel) ve nükleozid-nükleotid türevleri (tikagrelor ve kangrelor)'dir.

Bütün tiyenopiridinler oral olarak kullanılan ön ilaç formunda bileşiklerdir ve plazma esterazları veya hepatik sitokrom P450 enzimleriyle aktif metabolitlerine dönüşmektedirler. Bu aktif metabolitler P2Y₁₂ reseptörünü irreversibl olarak inhibe etmektedir. Tiyenopiridin türevi antiplatelet ilaçlar inme, miyokard enfarktüsü ve koroner girişim sonrası stent trombozunun önlenmesinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. FDA tarafından onaylanan ilk tiyenopiridin türevi P2Y₁₂ antagonisti tiklopidindir [84,85], ancak tiklopidinin kullanımı, nötropeni gibi yan etkiler oluşturması nedeniyle oldukça kısıtlanmaktadır. Yaşamı tehdit eden hematolojik hastalıklara sebebiyet vermesi nedeniyle pratikte klinik olarak tiklopidinin yerine klopidoğrel kullanılmaktadır [86].

Klopidoğrel, en yaygın kullanılan P2Y₁₂ reseptör antagonisti olup, aynı zamanda dual antiplatelet tedavide aspirinle birlikte kullanılmaktadır. NSTEMI, STEMI, perkütan koroner girişim, yakın zamanda inme geçirenlerde ve periferel arteriyel hastalığı olanlarda kullanılan antiplatelet ilaçtır [74]. Ancak, tüm bunlara rağmen aspirin ve/veya klopidoğrel tedavisi uygulanan hastalarda platelet agregasyonunun inhibisyonunda yeterli cevap alınamaması söz konusu olabileceği gibi aspirin veya klopidoğrel direnci gelişimi de gözlenebilmektedir [87,88]. Bu direnç, sitokrom P450 enziminin CYP2C19*2 gen lokusundaki mutasyonun ilacın metabolizmasını azaltmasıyla meydana gelmektedir [89]. Karşılaşılan bir diğer sorun ise, aspirin ve klopidoğrel dual tedavisinin kanıtlanmış etkisine rağmen, birçok hastada trombotik olaylar tekrarlamaya devam etmektedir [86].

Üçüncü jenerasyon tiyenopiridin türevi ön ilaç olan prasugrelin metabolik dönüşümü daha etkili olup *in vivo* olarak daha güçlü antiplatelet etki göstermektedir. Prasugrelin antiplatelet etkisinin klopidoğrelin antiplatelet etkisinden en az 10 kat daha fazla olduğu bildirilmektedir, ancak prasugrel tedavisinde önemli ölçüde hayatı tehdit edici ve hatta öldürücü kanama komplikasyonları yüksek oranda görülebilmektedir. Yine de, perkütan koroner girişim uygulanacak hastalarda kullanımı tercih edilebilmektedir [74,90].

Nükleozid-nükleotid türevi antagonistleri, oral uygulanan tikagrelor ve intravenöz uygulanan kangrelor hepatik biyotransformasyona gerek olmaksızın doğrudan reseptöre bağlanan, reversibl P2Y₁₂ antagonistleridir [84,91]. Tikagrelor tedavisi esnasında gözlemlenen dispne, ventriküler aritmi, artmış serum kreatinin ve ürik asit düzeyi gibi yan etkiler, genelde kişiye göre değişen kısıtlamalar olsa da, klopidoğrele göre tikagrelorun tercih edilmemesine neden olan bir etken olmuştur [86].

Daha sonra keşfedilen P2Y₁₂ antagonisti olan kangrelor, metabolize olmadan, direkt ve tersinir bir şekilde P2Y₁₂ reseptörüne bağlanan ATP analogudur. Faz çalışmaları bitmiş olup 2015 yılında FDA tarafından onaylanmıştır [86]. Yukarıda bahsedilen P2Y₁₂ antagonistlerinin aksine, kangrelor intravenöz olarak verilmekte ve infüzyon sonrası etkisi hızla tersine dönmektedir. Prasugrel ve tikagrelor gibi, kangrelor da hızlı etki etmekte, klopidoğreliden daha iyi platelet inhibisyonu gerçekleştirmekte ve klopidoğrel ile karşılaştırıldığında majör kanamada önemli bir artış görülmemektedir [75].

2.2.3. Glikoprotein IIb/IIIa (integrin α IIb β 3) reseptör antagonistleri

Glikoprotein IIb/IIIa antagonistlerinin geliştirilmesi, plateletleri GPIIb/IIIa reseptörlerinden yoksun olan kişilerde Glanzmann trombositopenisi olarak bilinen otozomal resesif kanama bozukluğunun anlaşılmasıyla başlamıştır [92]. Bu kişilerde reseptörün olmayışına bağlı olarak agonistlerle plateletler uyarıldığında fibrinojenle bağlanamadığından platelet-platelet etkileşimi ve agregasyon gerçekleşmemekte ve kanama zamanı uzamaktadır [93]. Bu reseptörler antiplatelet tedavide en ilgi çekici reseptörler olmuştur. İlaç hedefi olarak bu reseptörlerin avantajları; a) fibrinojen/fibrin bağlanması ile tetiklenen platelet-platelet etkileşiminde ve trombüs oluşumunda merkezi role sahip reseptör olması nedeniyle, reseptör inhibisyonu ile platelet agregasyonunu ve pıhtı oluşumunu etkin bir şekilde inhibe etmesi, b) bu reseptörlerin sadece megakaryositlerde ve plateletlerde eksprese edilmesinden dolayı hedef dışı etkiden kaçınılması, c) plateletler aktive olduğunda reseptör konformasyonel değişikliğe uğradığından, sadece aktif plateletlerin inhibisyonuna ve hemostazın bozulmamasına imkan sağlaması olarak sıralanabilmektedir. Ancak bu avantajlarına rağmen ilaç araştırmalarında bu reseptörler üzerinden gerçekleştirilecek tedavi seçeneklerinin dezavantajları ortaya çıkmıştır: a) Plateletlerde GPIIb/IIIa reseptörleri 60 000 – 80 000 arasında bulunduğu kan dolaşımında bulunan plateletlerdeki tüm reseptörlerinin inhibisyonunu sağlamak pek olası değildir ve yüksek plazma konsantrasyonunun sağlanmasını gerektirmektedir [91]. Bu ilaçlarla, platelet agregasyonunun tamamen inhibe olması için, tedavi edilen hastalarda reseptör blokaj oranının % 80'nin üzerinde olması gerekmektedir [94] b) Ligand-mimetik GPIIb/IIIa antagonistlerinin reseptöre bağlanmasının, reseptörün fibrinojene bağlanmasını indükleyerek paradoksik platelet agregasyonuna neden olduğu görülmüş ve klinik denemeleri başarısızlıkla sonuçlanmıştır

[91,95]. c) GPIIb/IIIa aktivasyonundan bağımsız olarak hemostazı etkileyip kanamaya neden oldukları gözlenmiştir.

GpIIb/IIIa reseptörünün fonksiyonunu inhibe etmeye yönelik geliştirilen stratejilerde antikorlar, peptidler ve ligand bağlanmasını inhibe eden RGD peptit (Arg-Gly-Asp) analogları kullanılmıştır [96]. Günümüzde, kimerik insan-fare moloklonal fab fragmanı olan Abciximab, sentetik disülfid bağlı siklik heptapeptid ligand mimetik Eptifibatid ve L-tirozin türevi olan tirofiban olmak üzere üç adet FDA-onaylı α Ib β 3 reseptör antagonisti ilaç bulunmaktadır.

1980'li yıllarda α Ib β 3 reseptörüne karşı birçok monoklonal antikor geliştirilmiş ve bunlardan bazılarının fibrinojenin plateletlere bağlanmasını ve platelet agregasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Bir monoklonal antikor ise klinik araştırma aşamasına geçmeye değer bulunmuştur. Abciximab, *ex vivo* ortamda platelet agregasyonunu inhibe etmede büyük başarı gösterdikten sonra, 1991 yılında perkütan koroner girişim (PCG) sonrası iskemik komplikasyon riski olan hastalarda kullanılmıştır. Neticesinde, miyokard enfarktüsü ve ölüm oranı azalmış, ancak kanama önemli ölçüde artmıştır. 1994 yılında PCG'de kullanımı için Abciximab, FDA onayı alan α Ib β 3 blokörü sınıfında klinik kullanımı olan ilk antagonistidir [91,97]. Abciximab kullanımının; yüksek maliyetli olması, etkisinin irrevesibl olması ve immün sistem üzerinde istenmeyen etkilere yol açması nedeniyle, başka α Ib β 3 reseptör blokörü olabilecek etken madde çalışmaları hız kazanmıştır [98].

1990'lı yılların ortalarında klinik çalışmalarına başlanılan Eptifibatid, 1998 yılında akut koroner sendrom riski olan hastaların tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır [97]. Yılan zehrinden izole edilen siklik peptid yapılı Eptifibatid, yapısında bulunan Lys-Gly-Asp (KGD) amino asit sekansı aracılığıyla α Ib β 3 reseptörü tarafından tanınıp reseptöre yarışmalı olarak bağlandığından α Ib β 3'ün fizyolojik ligandlarının reseptöre bağlanmasını bloke etmektedir [99]. Ilımlı kanama artışı göstermesinden dolayı Eptifibatid, FDA-onaylı α Ib β 3 antagonistleri içinde en çok kullanılan ilaçtır [97,100].

L-tirozin türevi olan Tirofiban, -Arg-Gly-Asp- (RGD) sekansını içeren küçük moleküldür. Yapısındaki RGD sekansı aracılığıyla α Ib β 3 reseptörü tarafından tanınan Tirofiban,

inhibitör özelliğini de bu sekans üzerinden gerçekleştirmektedir. Reseptöre bağlanma afinitesi Abciximab'dan daha düşük, Eptifibatid'den daha yüksektir [101,102].

Bu ilaçlar intravenöz yolla uygulanabilen ilaçlar olup platelet agregasyonunun tamamen inhibe olması için, tedavi edilen hastalarda reseptör blokaj oranının % 80'nin üzerinde olması gerekmektedir. Bu bileşikler her ne kadar antiplatelet aktiviteleri nedeniyle geliştirilmiş olsalar da, bu inhibitörlerin tek hedefinin plateletler olmadığı, düşük reseptör blokaj oranında trombüs gelişen bölgede platelet-lökosit agregatlarının oluşumunu arttırarak ve trombüsün stabilizasyonuna neden olarak uygun doz takibi yapılmadığında proenflamatuar ve protrombotik etki oluşturabilmektedirler [84,94]. Bu ilaçların onaylandıktan sonraki yıllarda yaygın kullanımlarına rağmen günümüzde sınırlı sayıda hastada kullanılmaktadır. Akut koroner sendrom sonrası perkütan koroner müdahale uygulanan hastalarda stent trombozunun önlenmesinde veya yüksek riskli hastalarda (örneğin primer anjiyoplastiye giren hastalarda) majör advers kardiyak olayların önlenmesinde kullanılmaktadırlar [94].

Birçok şirket tarafından oral GPIIb/IIIa antagonistleri geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmış, bu kapsamda üç faz III çalışması tamamlanmıştır. Ancak, mevcut tedavilere bir üstünlüklerinin görülmemesi ve yüksek kardiyovasküler mortalite riski nedeniyle başarı elde edilememiştir [84]. Mevcut GPIIb/IIIa antagonistlerinin istenmeyen etkilerini bertaraf edebilecek yeni aday bileşik geliştirmeye yönelik çalışmalar devam etmekte, bu amaçla geliştirilen RUC-4, α IIB β 3 reseptörünün yapısındaki β 3 altünitesinin metal iyon bağımlı adezyon bölgesine Mg^{2+} iyonunun bağlanmasını bozmaktadır. STEMI'lı PCG yapılacak hastalarda riski azaltma amacıyla kullanılan hayvan çalışmalarında olumlu sonuçlar elde edilmiş, ancak kanama riski açısından terapötik dozuyla ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [103]. Yeni yaklaşımlardan bir diğeri, pleksin-semaforin-integrin (PSI) domainini hedeflemiştir. Anti-PSI monoklonal antikorları kullanılarak integrin aktivasyonunun inhibe edildiği gösterilmiştir. Anti-PSI, kanama zamanını ve platelet sayısını etkilemeden *in vitro* olarak sıçan ve insan platelet agregasyonunu ve trombüs büyümesini engellemiştir [100,104]. Günümüzde GPIIb/IIIa reseptörü, halen antiplatelet tedavide ilgi çekici hedeftir.

2.2.4. Trombin proteaz ile aktive olan reseptör antagonistleri

Trombin sadece güçlü bir platelet agonisti değil, aynı zamanda koagülasyonda önemli rol oynayan bir proteazdır ve ilerlemiş aterosklerotik lezyonlarda oldukça aktiftir. Vasküler hasar veya plak rüptürü sonrası doku faktörlerinin veya aktive olmuş plateletlerin prokoagülan etkisiyle oluşan trombin, platelet aktivasyonunu PAR-1 ve PAR-4 reseptörleri aracılığı ile gerçekleştirmektedir. PAR-1'in trombine afinitesi PAR4'e göre oldukça yüksektir; nanomolar trombin konsantrasyonlarında PAR-1 aktive olurken, düşük afiniteli PAR-4 için daha yüksek trombin konsantrasyonları gerekmektedir. PAR-1 plateletlerde anahtar rol oynayan reseptörken, PAR-4 daha çok PAR-1 üzerinden elde edilen etkilerin devamlılığını sağlamaktadır [76,105]. Koagülasyondaki rolü ve ilerlemiş aterosklerotik lezyonlarda oldukça aktif olması nedeniyle dual antiplatelet tedaviye ek olarak trombinin blokasyonu potansiyel antitrombotik strateji olarak görülmüş ve PAR-1 hedefli antagonistler geliştirilmiştir [105].

PAR1'in güçlü, selektif ve kompetitif oral antagonisti olan Vorapaxar, miyokard enfarktüsü ve periferik arter hastalığı öyküsü olan hastalarda iskemik olayları azaltmak amacıyla 2014 yılında FDA tarafından onaylanmış ilk trombin reseptörü antagonistidir [106]. Ancak, standart antiplatelet ajanlara ilave olarak vorapaxar kullanımının akut koroner sendrom açısından bir yararının olmadığı görülmüştür. Ayrıca, klinik denemeler tedaviye vorapaxarın ilave edilmesinin kanama oranını (özellikle de intrakranyal kanama oranını) arttırdığını göstermiştir. Bu nedenle klinik kullanımı sınırlıdır ve inme, geçici iskemik atak, intrakranyal hemoraji öyküsü olan hastalarda kontrendikedir [84,92].

Vorapaxara kıyasla daha kısa yarılanma ömrüne sahip oral PAR1 antagonisti Atopaxar geliştirilmiş, ancak bu ilaçla da kanama riskinin arttığı gözlemlendiğinden Faz III çalışmasına geçilememiştir [107]. Günümüzde PAR-1 hedefli parmadulin prelinik çalışma aşamasında, PAR-4 hedefli ilk bileşik olan BMS-986120 ise Faz I klinik çalışma aşamasındadır [84,108,109].

2.2.5. Fosfodiesteraz inhibitörleri

Platelet aktivasyonunda inhibitör etki gösteren cAMP ve cGMP, fosfodiesterazlar tarafından hidroliz edilmektedir. Fosfodiesteraz tip 3 selektif inhibitörü Silostazol'un koroner kalp hastalığı olanlarda dual tedavide kullanımının sınırlı yarar sağladığı görülmüş

ve yan etkilerinden dolayı kullanımı sınırlandırılmıştır. Restenozu azaltmada etkili olsa da kardiyovasküler hastalıklara engel olamamıştır [110]. Çoğunlukla periferik iskemik hastalığı olanlarda kullanılan Silostazol, kan damarlarını genişletmekte ve ADP, kollajen ve araziidonik asit indüklü platelet agregasyonunu bloke etmektedir. Adenozin alımını engelleyerek cAMP düzeyini arttıran Dipiridamol'un, aspirinle dual kullanımının aspirinin tek başına kullanımına kıyasla inme ve ölüm riskini % 37 azalttığı görülmüş [111], FDA tarafından inmenin önlenmesinde kullanımı onaylanmıştır. Ancak klopidogrel aynı etkinlikte ve daha düşük kanama riski oluşturduğundan dipiridamol yerine klopidogrel tercih edilmektedir [74].

Fosfodiesteraz inhibitörlerinin trombüs oluşumunun düzenlenmesindeki rolü, yeni antitrombotik ajanların geliştirilmesinde fosfodiesteraz inhibitörlerini ilgi çekici hedef yapmıştır. Günümüzde izokersetin prelinik çalışmalarda kanama zamanını etkilemeksizin platelet trombüs oluşumunu önlediği gösterilmiştir ve Faz III çalışması devam etmektedir [84,112].

2.2.6. GPIb-IX-V kompleksi antagonistleri

Platelet GPIb-IX-V kompleksi, özellikle yüksek basınç altında, vasküler hasarın olduğu bölgede GPIb alt ünitesiyle vWF'e bağlanmaktadır. Bu ise plateletlerin subendotelyal dokuya tutunmasını sağlamakta, diğer adezyon ve aktivasyon yollarıyla bu süreç pekiştirilmektedir. vWF aynı zamanda GPIb-IX-V kompleksi aracılığıyla platelet agregatlarına da bağlanmakta, böylece diğer plateletlerin toplanmasına ve trombüsün büyümesine de aracılık etmektedir [92]. Son yıllarda, trombüs oluşumunun hem erken hem de geç fazında rol oynayan GPIb-vWF yolunu hedefleyen antiplatelet bileşikler geliştirilmeye çalışılmaktadır [84].

Bu amaçla geliştirilen insan "anti-vWF bivalan nano antikor" Kaplasizumab (ALX-0081) platelet adezyonunda ilk basamak olan vWF ile platelet GPIb reseptör kompleksi arasındaki etkileşimi spesifik olarak inhibe etmektedir [113]. GPIb-IX-V antagonisti olan Kaplasizumab'un yüksek riskli perkütan koroner girişim uygulanan hastalarda umut vaat eden antiplatelet etkisinin gözlemlendiği Faz III çalışması tamamlanmıştır [114].

Yılan venomundan izole edilen Anfibatid'in yapılan çalışmalarda kanama zamanını arttırmadan platelet adezyonunu, agregasyonunu ve trombüs oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir [115], Faz II çalışmalarında non-STEMI hastalarda hemostazı önemli ölçüde etkilemeksizin antiplatelet etkisi değerlendirilmiştir [116]. Ancak bu bileşiklerin hiçbiri henüz klinik kullanıma girmemiştir.

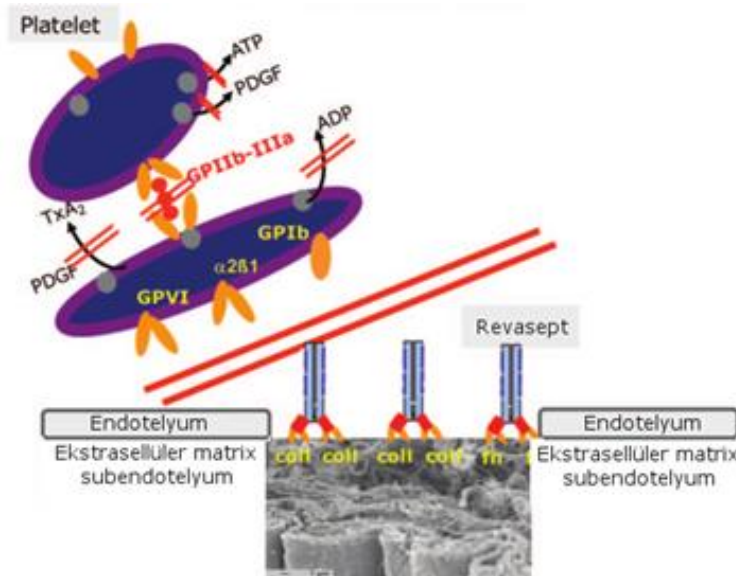
2.2.7. GPVI reseptör antagonistleri

İskemik inmenin patogeneğinde platelet GPVI reseptörünün rolü uzun yıllardır araştırılmaktadır [117,118]. Platelet adezyonu ve aktivasyonu, enflamatuvar yanıtı tetikleyerek enfarktüsün büyümesine yol açtığından [119,120], GPVI reseptörünün blokajının yaratacağı sonuç merak konusu haline gelmiş ve yapılan hayvan çalışmalarında anti-GPVI'nın tromboza, iskemi-reperfüzyon hasarına ve inmeye karşı etkili olduğu gösterilmiştir [121,122].

Deneysel hayvan modellerinde; GPVI'nın blokajı, antikor-indüklü downregülasyonu veya genetik olarak GPVI-eksik modellerde, majör kanama komplikasyonlarına sebebiyet vermeden patolojik trombüs oluşumunun önemli ölçüde azalması ve GPVI reseptörünün, platelete bağlı enflamatuvar süreçlerde anahtar regülatör olduğunun farkına varılması, GPVI reseptörünü ilgi çekici bir antiplatelet hedef haline getirmiştir. Sadece plateletlerde ve megakaryositlerde eksprese olması, diğer hücre tiplerinde anti-GPVI ajanların istenmeyen etkisinin oranını minimize etmekte, dolayısıyla reseptörün spesifik hedef olmasında oldukça fayda göstermektedir. Dolaşımdaki plateletlerin yüzeyinden reseptörün uzun süreli downregülasyonu ile sonuçlanan deneysel olarak blokajı veya immün-depleksiyon ile GPVI kolayca hedeflenebilmektedir. Ayrıca, GPVI ve kollajen arasındaki etkileşim, platelet aktivasyonunda erken gelişen bir durum olduğu için GPVI hedefli ilaçlarla güncel ilaçlara kıyasla tromboza daha erken müdahalede bulunulabilecek ve platelet reaktivitesinde ve prokoagülan aktivitesinde daha etkili bir azalma sağlanılabilecektir [37]. Tüm bu nedenlerden dolayı, GPVI güçlü ve güvenli bir antitrombotik tedavi için potansiyel farmakolojik bir hedef olmaktadır [5,118].

Kollajen-indüklü insan platelet agregasyonunu inhibe eden insan Fc füzyon proteini olan Revasept'in faz II çalışması karotis stenoz, geçici iskemik atak (TIA) ve inme hikayeleri olan hastaların üzerinde gerçekleştirilmekte ve bu faz II çalışması halen devam etmektedir [123,124].

GPVI antagonisti Revasept, insan GPVI reseptörünün ekstraselüler kısmını ve insan IgG1'in Fc kısmını içermektedir. Dolayısıyla, Revasept teknik olarak çözünabilir dimerik Glikoprotein VI-Fc'dir. En az diğer bilinen antiplatelet ilaçlar kadar etkili olan Revasept, yarışmalı olarak inhibisyon gerçekleştirmektedir [118,123]. Böylece, GPVI'ya agonisti olan kollajenin bağlanmasını engelleyerek Revasept antagonist etkisini göstermektedir. Endotelial lezyonlarda açığa çıkan kollajenin reseptöre bağlanmasını engellediği için akut vasküler hastalıkları çok erken basamakta engelleyebilmektedir. Bu aşamada, Revasept aterosklerotik plakta kollajen ve fibronektine bağlanmaktadır (Şekil 2.12). Bu bağlanmayla, vasküler hasar bölgesinde ilk basamaklardan olan kollajen-ilişkili platelet adezyonunu ve ardından trombüs oluşumunu önlemektedir [123].



Şekil 2.12. Revasept'in inhibisyon mekanizması [123]

Kollajene spesifik olan Revasept, trombin veya ADP indüklü insan plateleti agregasyonunu inhibe etmemekte, reseptörün downregülasyonunu indüklememekte ve ayrıca platelet sayısını azaltmamaktadır. Bir hayvan çalışmasında ise, Revasept'in lokal trombüs oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir [125]. Ayrıca, piyasada bulunan güncel antiplatelet ilaçların aksine, artan kanama riskine sebebiyet vermemektedir [123].

2.3. Bilgisayar Destekli İlaç Keşfi

İlaç keşfi ve gelişimi uzun yıllar süren ve yüksek bütçeler gerektiren oldukça meşakkatli bir süreçtir. Bu sürece rasyonel olarak katkıda bulunmak adına, akademi ve ilaç endüstrisinde bilgisayar destekli ilaç keşfi stratejileri kullanılmaktadır. Bilgisayar destekli ilaç keşfinde; biyolojik olarak aktif olabilecek bileşikleri tanımlamak ve dizayn etmek için çalışmalar yürütülmektedir. Ayrıca bu alan, rasyonel ilaç tasarımı ile keşif prosesine katkıda bulunulması için sinerjistik olarak farmakoloji, biyoloji veya sentetik kimya gibi diğer ilişkili farmasötik kimya alanları ile entegre edilebilmektedir [126,127].

2.3.1. İlaç keşfinde bazı yaklaşımlar

İlaç keşfinde birçok bilinmezlikler mevcutken istenilen hedefe ulaşabilmek için fayda sağlayabilecek kriterlerden yola çıkmak bir avantajdır. Genellikle bu kriterler çalışmalarda fikir verebilecek nitelikte olup fizikokimyasal parametrelere dayanmaktadır [128,129].

İlaç geliştirmede bir bileşiğin yüksek afinite ile hedefine bağlanması istenmektedir. Hedef dışı bağlanma, absorpsiyon – dağılım – metabolizma – eliminasyon (ADME) özellikleri, toksisite, biyoyararlanım gibi parametrelerden faydalanarak bu özelliklere göre bağlanma özelliğine sahip bileşikler bulunmalıdır [129]. “Ters farmakoloji” olarak da adlandırılan bu tasarım sürecinde ilacın hedefe bağlanmasına yönelik *in vitro* çalışmalarından önce, üzerinde çalışılacak biyolojik materyalin seçilme nedeni/etkisi,vb. gibi etkenler ilaç geliştirilmesinde fikir vermektedir [129,130].

Lipinski’nin 5 Kuralı

Piyasada bulunan ilaçların çoğunluğunun oral olarak kullanımı mevcuttur. Bu ilaçlar için 1997 yılında Christopher Lipinski, ligandların oral kullanıma uygun ilaç olabilirliğinin artırılması için 2245 adet etken maddelerin fizikokimyasal özelliklerini belirlediğinde dört farklı parametrenin ortak özellik gösterdiğini bulmuştur [131,132]. Bu parametrelere göre değerlendirilmeye alınan bileşiklerin; yaklaşık olarak % 90’ının, molekül ağırlığının 500 Da altında olduğu, oktanol/su partiyon katsayısının (logP) 5’in altında olduğu, toplam hidrojen bağı verici (HBV) grup sayısının 5’in altında olduğu, toplam hidrojen bağı alıcı (HBA) grup sayısının 10’un altında olduğu saptanmıştır. Tüm bu parametrelerin 5’in katı olması sebebiyle bu kriterlere Lipinski’nin 5 Kuralı denmektedir.

Oral kullanıma uygun ilaç olabilirliği belirleyen Lipinski'nin 5 kuralı, belirli farmakolojik veya biyolojik aktivitesi olan kimyasal bileşiklerin insanlarda oral olarak aktif ilaç olabilme özelliğine sahip olup olmadığına karar vermektedir [131,132]. Bu kural, insanlarda ilacın oral biyoyararlanımında moleküllerin fizikokimyasal özelliklerinin önemli olduğunu tanımlamaktadır. Ancak, bileşiğin farmakolojik olarak aktif olup olmadığını önceden öngörmeyle ilişkisi yoktur.

İlaç keşfi çalışmalarında, bileşiğin oral biyoyararlanımını arttırmak için Lipinski kuralı tarafından tanımlanan ilaç-benzeri fizikokimyasal özellikler ile, farmakolojik olarak aktif olabilecek ilaç adayının yapısının optimize edilmesinin yarar sağlayacağı düşünülmektedir [129].

2.3.2. Hit bileşiklerin tespitine yönelik strateji

Sanal Tarama

Sanal tarama, oldukça fazla sayıda ve birçok farklı sentezlenmiş / sentezlenmemiş bileşiğe sahip kimyasal veri bankasındaki ligandların spesifik bir biyolojik hedefe karşı aktif olabileceklerini bilgisayar ortamında belirleyebilmek için kullanılan bir tarama metodudur [127]. Hesaplamalar bu aşamada yapılarak seçilen hit bileşiklerin, daha sonra istenildiği takdirde *in vitro* olarak deneysel çalışmaları gerçekleştirilmektedir [133].

2.3.3. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı ligand temelli ve yapı temelli olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Ligand temelli ilaç tasarımı

Bir hedefe karşı etkinliği/aktivitesi bilinen bileşiklerin bilgisayar ortamında ligand bilgilerinin kaydedildiği veri tabanları, önceden bilinen bileşiklerin 'retrospektif' olarak etkilerinin nedenlerinin incelenmesinde ve yeni bileşiklerin keşif ve geliştirilmesine yönelik 'prospektif' olarak kullanılabilir [134]. Hedefe yönelik aktifliği bilinen bileşiklerden yola çıkılarak ligand bazlı model yaratılabilmektedir. Benzer topolojiye sahip

bileşiklerin benzer biyolojik aktiviteye sahip olmasından dolayı, ligand temelli ilaç tasarımı, bileşiklerin farmakofor bölgeleri gibi topoloji-bazlı deskriptörlerden yararlanmaktadır [126]. Aktifliği bilinen bileşikler ve potansiyel hit bileşikler kıyaslandığında, moleküler benzerliklerinin bilgisayar aracılığıyla bulunması matematiksel parametreleri içeren benzerlik algoritmalarının kullanımı ile sağlanmaktadır [135,136].

Farmakofor Modelleme

Farmakofor terimi, bir bileşiğin etkisinden sorumlu ve hedef ile uygun etkileşim gösteren grupları kastetmektedir. Farmakofor modelleme, ligandın hedefle (reseptörle) gerçekleştirdiği etkileşimleri göz önünde bulundurarak, taranacak bileşik kütüphanelerindeki aynı özellikleri içeren bileşikleri belirleyen bileşiğe ait oluşturulan farmakofor gruplarının üç boyutlu olarak gösterilen, hızlı ve yararlı bir filtreleme yöntemidir [127]. Bu model; bileşiklerin ortak yapısal özelliklerini, benzerliklerini ve farklılıklarını baz almaktadır [134]. Ligandlara ait bilgilerden yola çıkılabildiği gibi reseptörden hareketle de farmakofor model oluşturulabilmektedir. HBA, HBV, alifatik / aromatik halka, negatif yük ve pozitif yük gibi özellikler farmakofor modeli yaratırken belirlenebilmektedir [134].

Yapı Temelli İlaç Tasarımı

Biyolojik makromoleküllerin üç boyutlu yapılarının aydınlatılması genelde x-ray kristalografi ve NMR yöntemlerinin kullanılmasıyla mümkün kılınmakta ve bu veriler ilgili veri tabanlarında saklanmaktadır [137]. Taranan bileşiklerden aktif bölgeyle daha iyi etkileşim gösterenleri tanımlayabilmek için, bileşikler ve hedef (protein, reseptör) arasındaki afinitelerini ve bağlanma modlarını tahmin etmeye dayalı bir metot olan yapı temelli ilaç tasarımı, potansiyel biyoaktif bileşikleri bulma amacıyla ligand temelli ilaç tasarımı ile birlikte de uygulanabilmektedir. Yapı temelli ilaç tasarımı, hedef yapının bağlanma bölgesiyle etkileştiği düşünülen bileşikleri araştırmak için genellikle moleküler docking yöntemini kullanmaktadır [126].

Docking

Docking, ligandlar ile ligandların etkileşime girdikleri hedef bölge arasındaki moleküler etkileşim enerjisi söz konusu olarak bağlanma pozları tahmin edilerek üç boyutlu gösterimi

olan bilgisayar-destekli bir yöntemdir. Ligand ve hedefin etkileşimi için tanımlanan hedef yapının bağlanma bölgesinin yerinin doğru aydınlatılması oldukça önemli bir kriterdir. Bu aktif bölgede, ligand ile hedef arasındaki etkileşimler incelenmekte ve yaptıkları etkileşimlere göre docking skorları belirlenmektedir [126,138,139]. Enerji bakımından en çok tercih edilen konformasyonel bağlanma modunu bulma amacıyla makromolekülün (protein) aktif bölgesinde küçük molekülün (ligand) çevrilmesiyle, dönmesiyle ve bükülmesiyle docking, bir nevi tanıma prosesi gerçekleştirmekte ve bağlanma enerjisi olan protein-ligand afinitesi skorlama fonksiyonu olan algoritmayla hesaplanmaktadır [126]. Reseptörün sabit tutulduğu, ancak bağlanacak ligandın tercihe göre sabit tutularak veya sabit tutulmayarak gerçekleştirilen ‘rijit docking’, ligand ve reseptörün indüklenmiş uyum hipotezine göre en olabilecek bağlanma modunun gerçekleştiği ‘indüklenmiş uyum docking’ gibi çeşitli docking metotları mevcuttur [127].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Kaynak
NaCl	Merck
Na ₂ HPO ₄ dihidrat	Merck
KCl	Horasan
NaHCO ₃	Sigma
HEPES	Sigma
Glukoz	Sigma
MgCl ₂	Sigma
Sitrik asit monohidrat	Sigma
Sodyum sitrat tribazik dihidrat	Sigma
Prostasiklin	Cayman
DMSO	Labscan
Kollajen	Hart Biologicals
Konvalksin	Cayman
Trombin	Sigma
Losartan potasyum	Sigma
Pemirolast potasyum	Sigma
Zolmitriptan	Sigma
Brinzolamid	Sigma

Triklormetiyazid	Sigma
Aminofilin	Sigma
Okskarbazepin	Sigma
N'-{2-[(1-fenil-1H-1,2,4-triazol-3-il)oksi]etanimidoil}benzohidrazit	Bionet/Key Organics
1-[2-(4-metansülfonilfenil)pirimidin-4-il]pirolidin-3-ol	ChemBridge
13-[3-(piridin-3-il)-1H-pirazol-4-il]-1,8,10,12-tetraazatrisiklo[7.4.0.0 ^{2,7}]trideka-2,4,6,8,10-pentaen-11-amin	Enamine
6-amino-1-benzil-5-{2-[5-(4-florofenil)-2H-1,2,3,4-tetrazol-2-il]asetil}-3-metil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-2,4-dion	Enamine
3-[3-(benziloksi)-2-hidroksipropil]-3-metil-1-(4-sülfamoilfenil)üre	Enamine
2-[(1-amino-4-fenil-1H-imidazol-2-il)sülfanil]-N-(4-etoksifenil)asetamit	Enamine
3-(2-hidroksi-5-metilfenil)-5-(3-hidroksipropil)-4-(4-metoksifenil)-1H,4H,5H,6H-pirololo[3,4-c]pirazol-6-on	Otava
3-(2-hidroksi-3,5-dimetilfenil)-5-(3-hidroksipropil)-4-(3-metoksifenil)-1H,4H,5H,6H-pirololo[3,4-c]pirazol-6-on	Otava
8-(bütilamino)-7-(2-hidroksi-3-fenoksipropil)-3-metil-2,3,6,7-tetrahidro-1H-pürin-2,6-dion	Otava
1-(4-metilbensensülfonil)-1,2,3,4-tetrahidrokuinoksalin-2-karboksamit.....	Specs
3-{2-[5-(4-klorofenil)furan-2-il]-2-oksoetil}-3-hidroksi-2,3-dihidro-1H-indol-2-on.....	Specs

4-(3-bütoksifenil)-3-(2-hidroksifenil)-5-(3-hidroksipropil)- 1H,4H,5H,6H-pirololo[3,4-c]pirazol-6-on.....	Vitas-M
6-amino-4-(2,5-dimetoksifenil)-3-(metoksimetil)-1H,4H- pirano[2,3-c]pirazol-5-karbonitril	Vitas-M
13-[3-(4-metoksifenil)-1H-pirazol-4-il]-1,8,10,12- tetraazatrisiklo[7.4.0.0 ² , ⁷]trideka-2,4,6,8,10-pentaen-11-amin	Vitas-M
2-{8-oksatrisiklo[7.4.0.0 ² , ⁷]trideka-1(9),2(7),3,5,10,12-heksaen- 4-sülfonamido}-3-fenilpropanamit	Vitas-M
N-(4-asetilfenil)-2-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)benzamid	Vitas-M

Kullanılan Araç ve GereçlerKaynak

Yüksek performanslı hesaplama sunucusu (Chimera)	Dell
Su banyosu.....	GFL
Hassas terazi.....	Ohaus
pH metre.....	İnolab
Kan sayım cihazı.....	Swelab
Agregometre	Apact 4004
Vorteks.....	Firlabo
Magnetik karıştırıcı	Falc
Ultrasonik banyo	Bandelin
Santrifüj.....	Digicen
Derin dondurucu	Uğur

Otomatik pipetlerEppendorf

Ultra saf su cihazı.....Millipore

3.1. Sanal Tarama

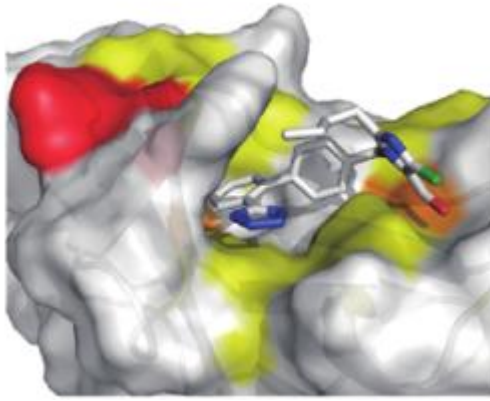
GPVI reseptörünün inhibisyonunu gerçekleştirecek yeni bileşiklerin tespiti amacıyla yapı temelli ve ligand temelli (kombine) sanal tarama çalışmaları yürütülmüştür. Yapılan çalışmalarda; hedef yapı olarak GPVI'nın kristal yapısından faydalanılmıştır (PDB kodu: 2GI7 [140]). Ligand temelli farmakofor model geliştirilmesinde ise, sekonder etki tespiti amacıyla FDA tarafından onaylanmış ve piyasada var olan ilaç etken maddelerinin GPVI inhibisyonuna yönelik yeniden konumlandırılması için bu bileşiklerin hedef yapıya olası bağlanma özellikleri değerlendirilmiştir. Ayrıca, yeni GPVI antagonisti bileşiklerin tespiti amacıyla yaklaşık 7 milyon stok kimyasal bileşiğe sahip Molport bileşik veri tabanı kullanılmıştır. Yüksek performanslı hesaplama süreçlerinin yürütülmesi ve bu işi oldukça hızlandırma amacıyla Chimera adlı sunucu kullanılmıştır.

Protein Data Bank'ta bulunan 2GI7 kodlu [140] GPVI'nın yüksek rezolüsyona sahip kristal yapısının docking için hazırlanmasında Schrödinger Suite 2015 Update 4 [141]'te yer alan *Protein Preparation Wizard* [142] programı ile hedef protein uygun hale getirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. İnsan plateleti GPVI'nın kristal yapısı [140]

GPVI'nın bağlanma bölgesini tespit edebilmek için yayınlanmış olan ilgili makalelerden de faydalanarak Schrodinger Suite 2015 Update 4'te yer alan *Sitemap* [143] uygulamasıyla birlikte aktif bölge tanımlanmıştır. Bu çalışma sonucunda, GPVI'nın aktif bölgesindeki amino asitler; lösin 39, lizin 41, lösin 53, fenilalanin 54, lösin 62, serin 44, tirozin 47, arjinin 46, tirozin 66, glutamin 48, glutamik asit 40 ve valin 52 olarak saptanmıştır. İlgili makalelerle [140,144,145] karşılaştırılarak docking protokolü oluşturulmuştur. Dolayısıyla, GPVI ile bağlandığı NMR ile doğrulanan [144] losartanın en iyi pozunu alınmıştır ve docking çalışmalarında kullanılan grid oluşturulmasında bu bilgilerden faydalanılmıştır (Şekil 3.2).



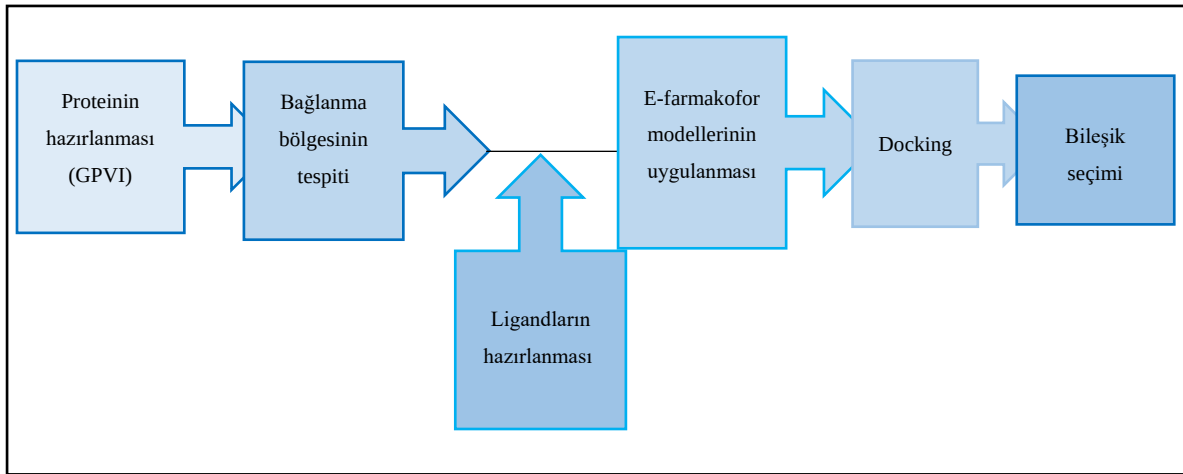
Şekil 3.2. Ono ve ark. tarafından ilgili makalede rapor edilmiş olan losartan bileşiğine ait bağlanma modu [144]

Ligand olarak sekonder etkisini araştırma amacıyla toksisite sorunu olmaması, güvenli, piyasada satışa hazır ve erişilebilirliği kolay olması sebepleriyle onaylanmış FDA ilaçları seçilmiştir. Ayrıca, daha geniş kapsamda ilaç keşfine yönelik tarama amaçlı milyonlarca stok bileşik içeren ve siparişe hazır ticari bir veri tabanı olan Molport da, GPVI inhibitör özellik gösterebilecek adayların sanal olarak taranması için kullanılmıştır. Bu bileşik kütüphanesinden dock edilecek bileşiklerin stereoizomerlerinin, protonasyon durumunun ve molekülün atom tiplerinin kuvvet alanı parametrelerine uygun olarak düzenleyebilmek için *LigPrep* [146] ile ligand hazırlığı yapılmıştır.

Bileşikleri filtrelemek için GPVI inhibitörü olduğu belirlenmiş (i) losartana göre, (ii) tez çalışması yürütülürken literatürde yayımlanan sentetik GPVI antagonist bileşiği olan 2,3-

disüstitüe tetrahidropirido(3,4-b)indole [147] göre dizayn edilmiş e-farmakofor modeller ile kıyaslanarak benzer farmakofor özelliklere sahip bileşiklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. E-farmakofor model oluşturulup benzer bileşiklerin bu veri tabanlarında varlığına bakılmıştır. H bağı akseptörü (A), H bağı donörü (D), hidrofobik gruplar (H), negatif yüklü grup (N), pozitif yüklü grup (P) ve aromatik halka (R) gibi farmakofor özellikler üç boyutlu gösterilerek ligandlar üzerinde işaretlenmiştir.

2GI7 [140] ile her bir ligandın en iyi pozunun tespiti için *Maestro* programında [148] bulunan *Glide* kullanılmıştır. Hesaplamalar *Single Precision Mode* (GlideScore SP)'ta yapılmıştır. Grid generasyonu ve tüm docking çalışması, *Glide*'ta seçili standart değerler ile yürütülmüştür [149]. Sonuçlar docking skorunun yüksekliğine ve ilaçların benzer etkileşim gösterme durumuna göre değerlendirilerek seçilmiştir. İş akışı Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Sanal tarama iş akışı

3.2. *In Vitro* Antiplatelet Çalışmaları

3.2.1. Plateletlerin hazırlanması

Antiplatelet aktivite çalışmaları, tam kandan elde edilen yıkanmış plateletce zengin plazmada (PRP) gerçekleştirilmiştir. Herhangi bir kronik inflamatuvar hastalığı ve zorunlu kronik ilaç kullanımı olmayan son 10 gün içerisinde herhangi bir ilaç almamış sağlıklı

gönüllülerden alınan taze kan, 1: 9 (v/v) % 3,2 sodyum sitrat içeren vakumlu kan tüplerine alınmıştır. Bu kan tüpleri 200xg'de 20 dakika santrifüj edilerek tam kandan PRP elde edilmiştir.

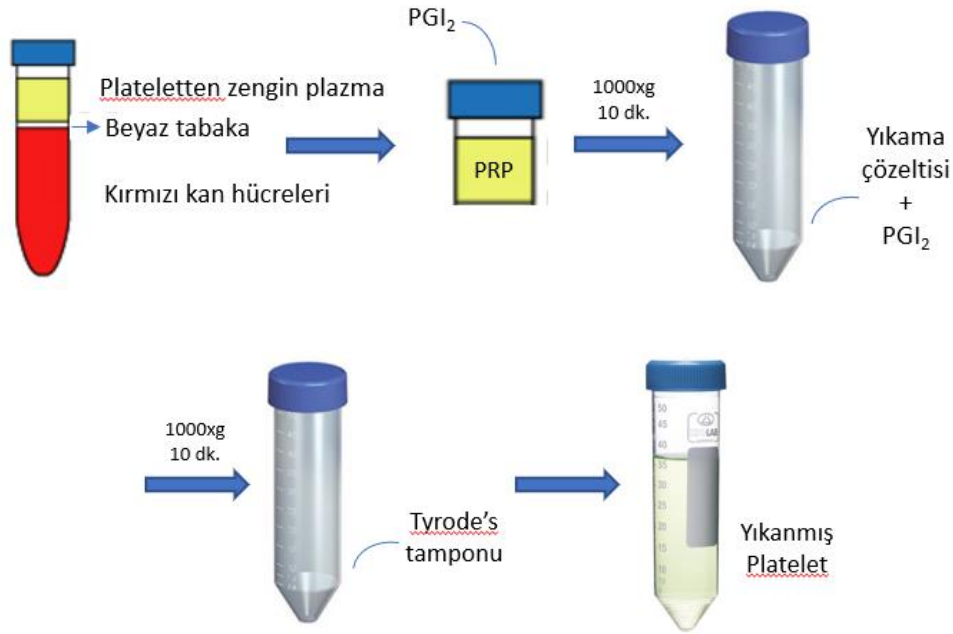
Platelet yıkama yöntemi

Final konsantrasyonu 0,1 µg/ml olacak şekilde PGI₂ (5 µl) ekledikten sonra, PRP 1000xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant pastör pipeti yardımıyla atılarak kalan platelet çökeleği yıkama çözeltisi içinde çözünür hale getirilmiştir. Bu yıkama çözeltisi 12,5 ml Tyrode's tamponundan ve 1,5 ml asit sitrat dekstrozu (ACD) tamponundan oluşmaktadır. Yıkama solüsyonlu platelet çözeltisine final konsantrasyonu 0,1 µg/ml olacak şekilde PGI₂ (5 µl) ilave ettikten sonra, bu çözelti 10 dakika 1000xg'de santrifüj edilmiştir. Yine süpernatant atılarak, kalan çökelti Tyrode's tamponu ile çözünür hale getirilmiştir. Plateletler, Swelab Alfa Kan Sayım cihazı ile sayılarak platelet agregasyon çalışmaları için Tyrode's tamponu yardımıyla 2×10^8 platelet/ml konsantrasyonuna ayarlanmıştır. Yıkanmış plateletler kullanım öncesi PGI₂'nin etkisinin azalması için en az 30 dakika dinlenmeye bırakılmıştır. Tüm bu platelet hazırlık aşamaları oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4).

PGI₂'nin hazırlanması: 1 mg PGI₂, pH'sı 9,1 olan 1 ml tris tamponunda çözölmüştür.

ACD tamponunun hazırlanması: 120 mM sodyum sitrat, 110 mM glukoz, 80 mM sitrik asitten oluşmaktadır. pH'sı 4,4'e ayarlanmıştır.

Tyrode's tamponunun hazırlanması: 1,34 M NaCl, 3,4 mM Na₂HPO₄, 29 mM KCl, 120 mM NaHCO₃, 200 mM HEPES ve 10 mM MgCl₂'den oluşan tampondan 2,5 ml alıp üzerine deney günü 22,5 mg. glukoz ve 22,5 ml distile su ilave edilerek pH'sı 7,3'e ayarlanmıştır.



Şekil 3.4. Platelet yıkama yöntemi şeması

3.2.2. Platelet Agregasyonu

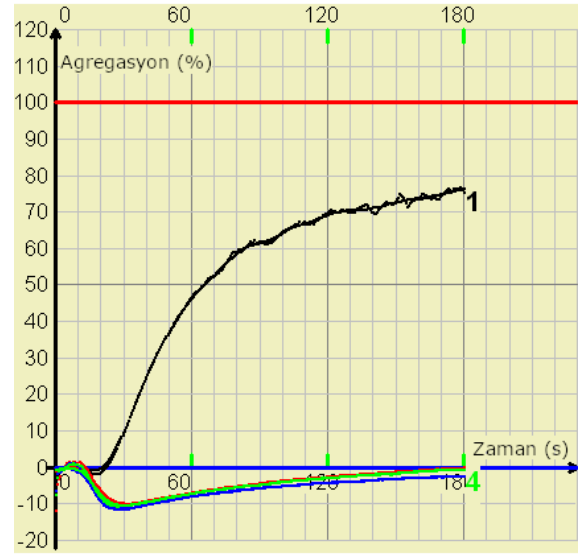
Antiplatelet aktivitesi tayin edilecek maddeler (0,5 μL), yıkanmış plateletlerin ($2 \times 10^8/\text{ml}$, 199 μL) üzerine eklenerek 37 °C’de 5 dakika inkübe edildikten sonra, indükleyici (10 μL) ilave edilerek (final konsantrasyonları 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kollajen, 0,1 U/ml trombin, 50 ng/ml konvalksin olacak şekilde) 37 °C 3 dakika içinde oluşan platelet agregasyonun yüzdesi, türbidimetrik Born Metodu’na [150] göre Apact 4004 agregometre cihazı ile saptanmıştır (Şekil 3.5). Her bir madde için tek deneyde en az üç ölçüm yapılarak ve bu deneyler birkaç kez tekrarlanarak test edilecek madde içermeyen kontrole kıyasla, maddelerin agregasyonda meydana gelen azalmadan % inhibisyon değerleri bulunmuştur. Bu inhibisyon değerleri aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanarak antiplatelet aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ayrıca, maddelerin IC₅₀ grafikleri oluşturularak IC₅₀ değerleri saptanmıştır. Solvent etkisini elimine etmek amacıyla DMSO final konsantrasyonu % <1’in altında tutulmuştur. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \left(1 - \frac{\text{PRP ile inkübe edilmiş test bileşiğinin maksimum agregasyonu}}{\text{PRP ile inkübe edilmiş DMSO'nun maksimum agregasyonu}} \right) \times 100$$

A)



B)



Şekil 3.5. A) Platelet agregasyon eğrisi B) İnhibitör varlığında platelet agregasyon eğrisi

4. BULGULAR

Moleküler modelleme sonucu docking skorunun yüksekliğine ve moleküllerin benzer etkileşim gösterme durumuna göre değerlendirilerek seçilen yedi FDA onaylı ilacın ve on altı Molport tedarikli bileşiğin *in vitro* olarak antiplatelet aktivitelerine bakılmıştır (Çizelge 4.1). Bu amaçla, yıkanmış plateletlerde kollajen, konvalksin ve trombin agonistleriyle oluşturulan platelet agregasyonu üzerine GPVI antagonist aday bileşiklerin etkileri değerlendirilerek bu bileşiklere ait inhibisyon değerleri bulunmuştur.

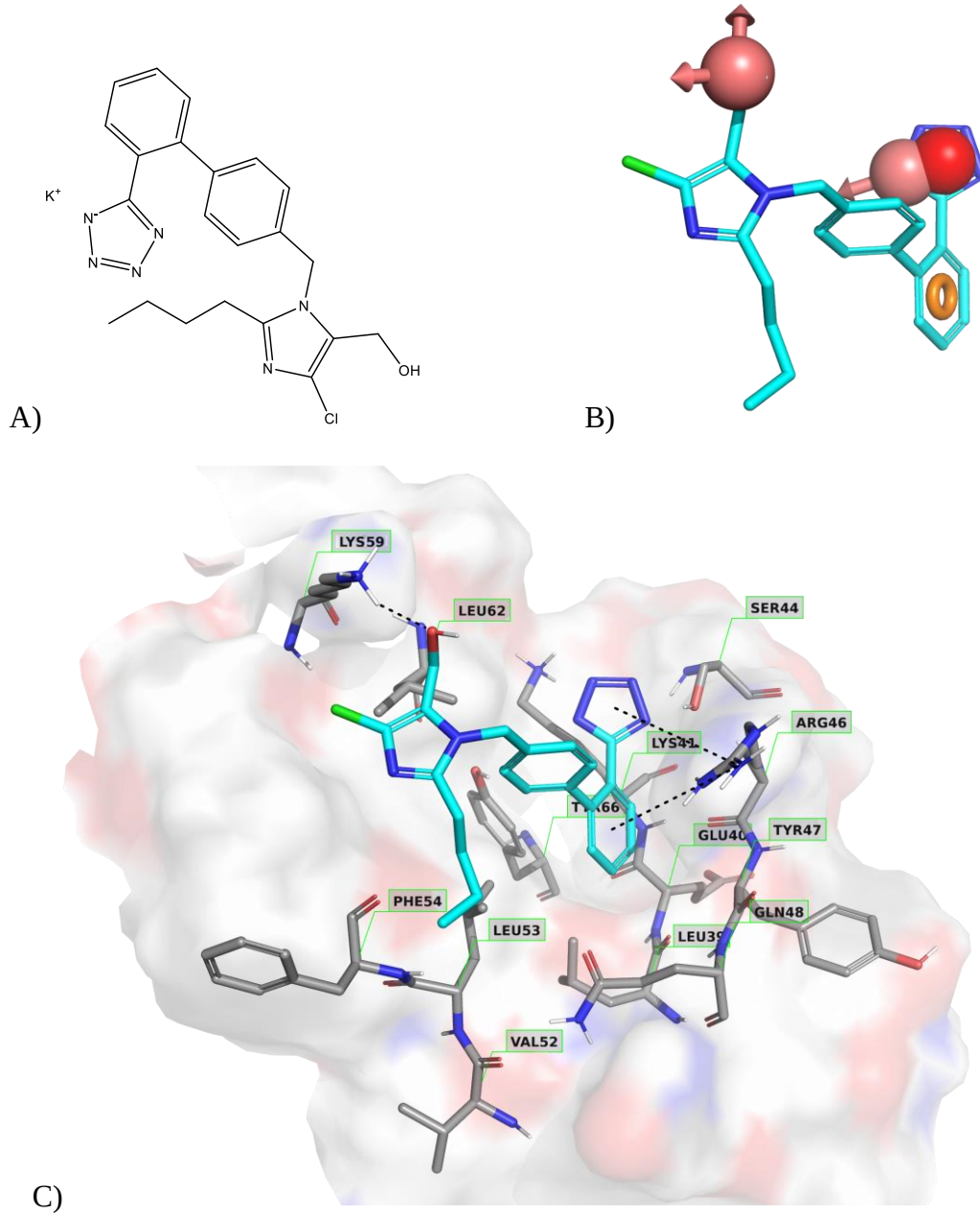
Çizelge 4.1. *In vitro* aktivite çalışması için seçilen bileşiklerin listesi

	Bileşikler	Kimyasal adları	Docking skoru
FDA onaylı bileşikler	Losartan	Potasyum 5-(4'-((2-bütil-4-kloro-5-(hidroksimetil)-1H-imidazol-1-il)metil)-[1,1'-bifenil]-2-il)tetrazol-1-ür	-4,839
	Pemirolast	Potasyum 5-(9-metil-4-okso-4H-pirido[1,2-a] pirimidin-3-il)tetrazol-1-ür	-4,909
	Zolmitriptan	(S)-4-((3-(2-(dimetilamino)etil)-1H-indol-5-il)metil) oksazolidin-2-on	-3,893
	Brinzolamid	(R)-4-(etilamino)-2-(3-metoksipropil)-3,4-dihidro-2H-tiyeno[3,2-e][1,2]tiyazin-6-sülfonamid 1,1-dioksit	-4,477
	Triklormetiyazid	6-kloro-3-(diklorometil)-3,4-dihidro-2H-benzo[e] [1,2,4]tiyadiazin-7-sülfonamid 1,1-dioksit	-4,969
	Aminofilin	1,3-dimetil-3,7-dihidro-1H-pürin-2,6-dion	-5,258
	Okskarbazepin	10-okso-10,11-dihidro-5H-dibenzo[b,f]azepin-5-karboksamit	-6,412
Molport bileşik veri tabanından seçilen moleküller	3F-042	N'-{2-[(1-fenil-1H-1,2,4-triazol-3-il)oksi]etanimidol} benzohidrazit	-4,102
	80378510	1-[2-(4-metansülfonilfenil)pirimidin-4-il]pirolidin-3-ol	-4,746
	Z232636338	13-[3-(piridin-3-il)-1H-pirazol-4-il]-1,8,10,12-tetraazatrisiklo[7.4.0.0 ^{2,7}]trideka-2,4,6,8,10-pentaen-11-amin	-3,944
	Z54670628	6-amino-1-benzil-5-{2-[5-(4-florofenil)-2H-1,2,3,4-tetrazol-2-il]asetil}-3-metil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin -2,4-dion	-4,948

Çizelge 4.1.(devam) *In vitro* aktivite çalışması için seçilen bileşiklerin listesi

Molport bileşik veri tabanından seçilen moleküller	Z851137174	3-[3-(benziloksi)-2-hidroksipropil]-3-metil-1-(4-sülfamoilfenil)üre	-4,002
	Z16043060	2-[(1-amino-4-fenil-1H-imidazol-2-il)sülfanil]-N-(4-etoksifenil)asetamit	-3,801
	1303833	3-(2-hidroksi-5-metilfenil)-5-(3-hidroksipropil)-4-(4-metoksifenil)-1H,4H,5H,6H-pirololo[3,4-c]pirazol-6-on	-4,352
	1692506	3-(2-hidroksi-3,5-dimetilfenil)-5-(3-hidroksipropil)-4-(3-metoksifenil)-1H,4H,5H,6H-pirololo[3,4-c]pirazol-6-on	-4,126
	1591532	8-(bütilamino)-7-(2-hidroksi-3-fenoksipropil)-3-metil-2,3,6,7-tetrahidro-1H-pürin-2,6-dion	-3,522
	AE641/05538014	1-(4-metilbenzensülfonil)-1,2,3,4-tetrahidrokinoksalin-2-karboksamit	-5,151
	AK778/43464987	3-{2-[5-(4-klorofenil)furan-2-il]-2-oksoetil}-3-hidroksi-2,3-dihidro-1H-indol-2-on	-3,904
	STK908290	4-(3-bütoksifenil)-3-(2-hidroksifenil)-5-(3-hidroksipropil)-1H,4H,5H,6H-pirololo[3,4-c]pirazol-6-on	-3,898
	STK763609	6-amino-4-(2,5-dimetoksifenil)-3-(metoksimetil)-1H, 4H-pirano[2,3-c]pirazol-5-karbonitril	-4,162
	STK685501	13-[3-(4-metoksifenil)-1H-pirazol-4-il]-1,8,10,12-tetraazatrisiklo[7.4.0.0 ² , ⁷]trideka-2,4,6,8,10-pentaen-11-amin	-4,211
	STK206687	2-{8-oksatrisiklo[7.4.0.0 ² , ⁷]trideka-1(9),2(7),3,5,10,12-heksaen-4-sülfonamido}-3-fenilpropanamit	-4,261
	STK633709	N-(4-asetilfenil)-2-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)benzamid	-5,123

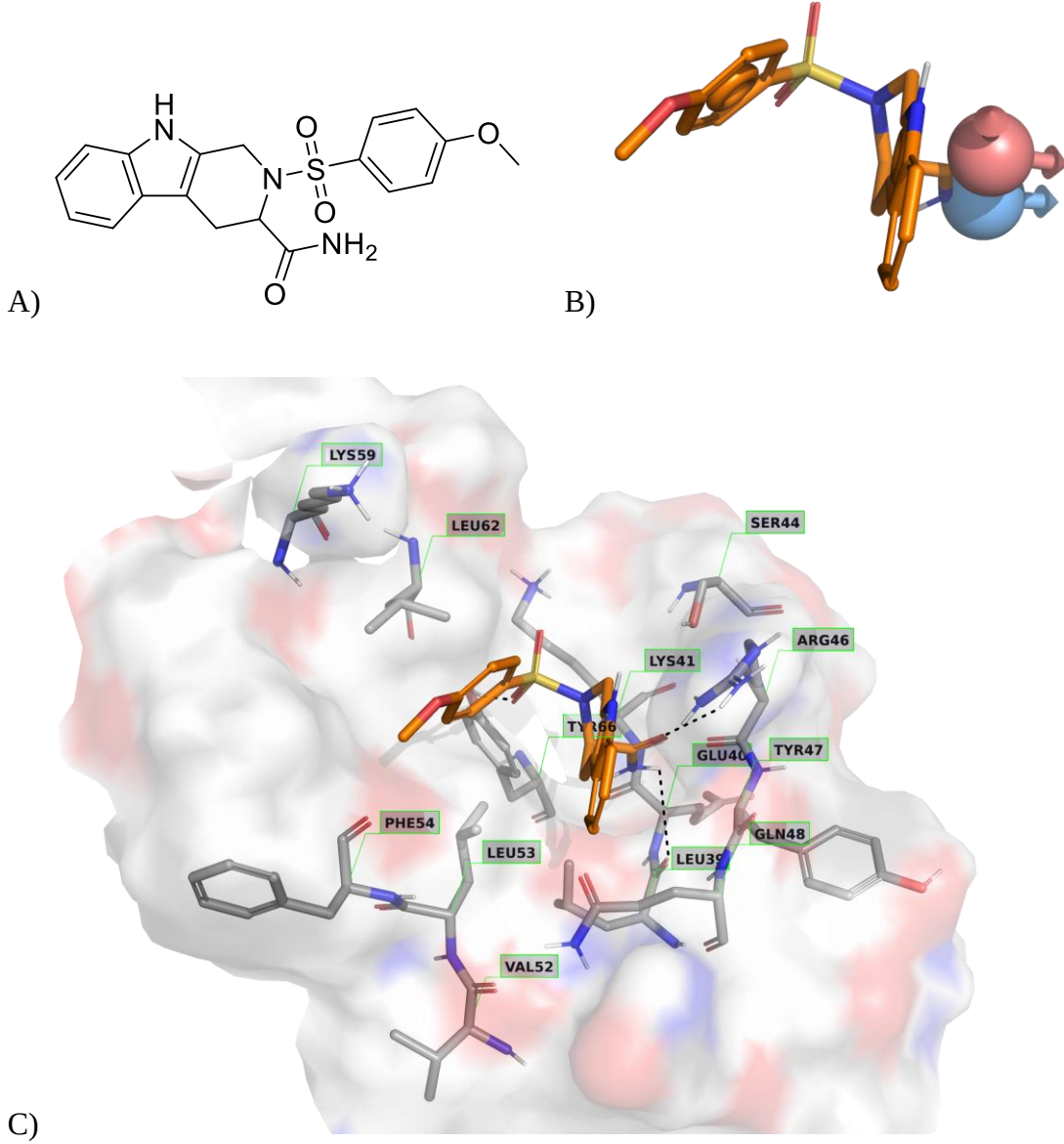
Losartan molekülünün kimyasal yapısı Şekil 4.1.A'da, bu yapıdan hareketle oluşturulan farmakafor model Şekil 4.1.B'de ve losartanın GPVI reseptörü ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.1.C'de verilmiştir.



Şekil 4.1. A) Losartan potasyum bileşiğinin kimyasal yapısı. B) Losartan molekülü baz alınarak oluşturulan farmakafor model*. C) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Losartan molekülünün gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

*Pembe renkli kürecik hidrojen bağı alıcısını, kırmızı renkli kürecik negatif yüklü grup varlığını, turuncu renkli halka aromatik yan zincirleri ifade etmektedir.

2,3-disüstitüe tetrahidropirido(3,4-b)indol bileşğinin kimyasal yapısı Şekil 4.2.A'da, bu yapıdan hareketle oluşturulan farmakafor model Şekil 4.2.B'de ve bu bileşğın GPVI reseptörü ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.2.C'de verilmiştir.



Şekil 4.2. A) 2,3-disüstitüe tetrahidropirido(3,4-b)indol bileşğinin kimyasal yapısı. B) 2,3-disüstitüe tetrahidropirido(3,4-b)indol bileşği baz alınarak oluşturulan farmakafor model*. C) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile 2,3-disüstitüe tetrahidropirido(3,4-b)indol bileşğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

*Pembe renkli kürecik hidrojen bağı alıcısını, mavi renkli kürecik ise hidrojen bağı vericisini ifade etmektedir.

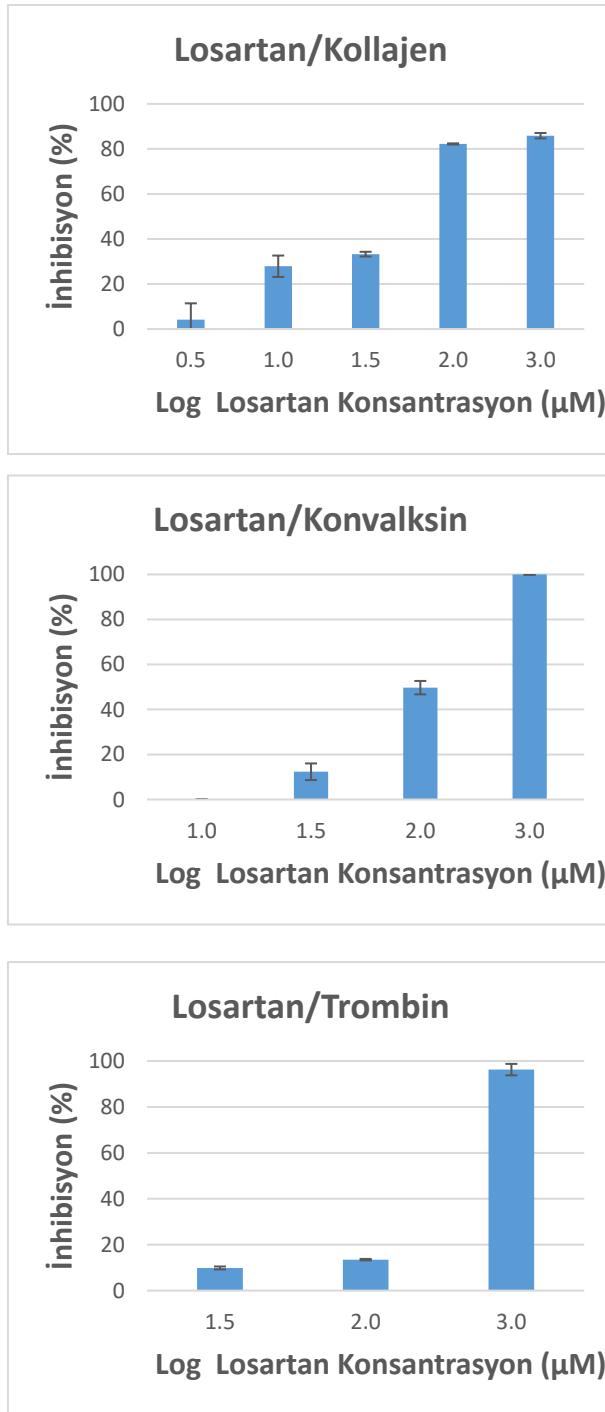
FDA bileşiklerinin deney koşullarında final konsantrasyonları 1 mM ve 100 μ M olacak şekilde kollajen (3 μ g/ml), konvalksin (50 ng/ml) ve trombin (0,1 U/ml) ile oluşturulan platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. FDA onaylı bileşiklerin 1 mM ve 100 μ M konsantrasyonlardaki % inhibisyon değerleri

	Kollajen (3 μ g/ml)		Konvalksin(50 ng/ml)		Trombin (0,1 U/ml)	
	1 mM	100 μ M	1 mM	100 μ M	1 mM	100 μ M
Losartan	85,86 $\pm$ 1,20	82,20 $\pm$ 0,27	100,0 $\pm$ 0,00	49,69 $\pm$ 2,99	96,26 $\pm$ 2,49	13,49 $\pm$ 0,32
Pemirolast	69,94 $\pm$ 2,29	14,93 $\pm$ 4,84	5,01 $\pm$ 3,43	3,61 $\pm$ 3,35	6,79 $\pm$ 2,85	0,41 $\pm$ 0,41
Zolmitriptan	16,91 $\pm$ 3,39	1,64 $\pm$ 2,50	2,27 $\pm$ 2,06	0,89 $\pm$ 1,54	6,01 $\pm$ 4,96	0,00 $\pm$ 0,00
Brinzolamid	93,26 $\pm$ 1,21	38,51 $\pm$ 4,32	0,25 $\pm$ 0,43	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Triklormetiyazid	72,04 $\pm$ 1,97	29,46 $\pm$ 5,52	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	10,36 $\pm$ 2,54	0,72 $\pm$ 0,76
Okskarbazepin	99,97 $\pm$ 0,06	56,25 $\pm$ 6,55	97,10 $\pm$ 0,27	3,01 $\pm$ 4,68	19,23 $\pm$ 1,91	4,09 $\pm$ 1,65
Aminofilin	57,07 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	6,57 $\pm$ 1,67	1,24 $\pm$ 1,13	2,64 $\pm$ 2,51	0,00 $\pm$ 0,00

Losartan

Şekil 4.1.A'da kimyasal yapısı ve Şekil 4.1.C'de GPVI ile yapısal etkileşimleri verilen Losartan ilacının kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3. Losartan'ın agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

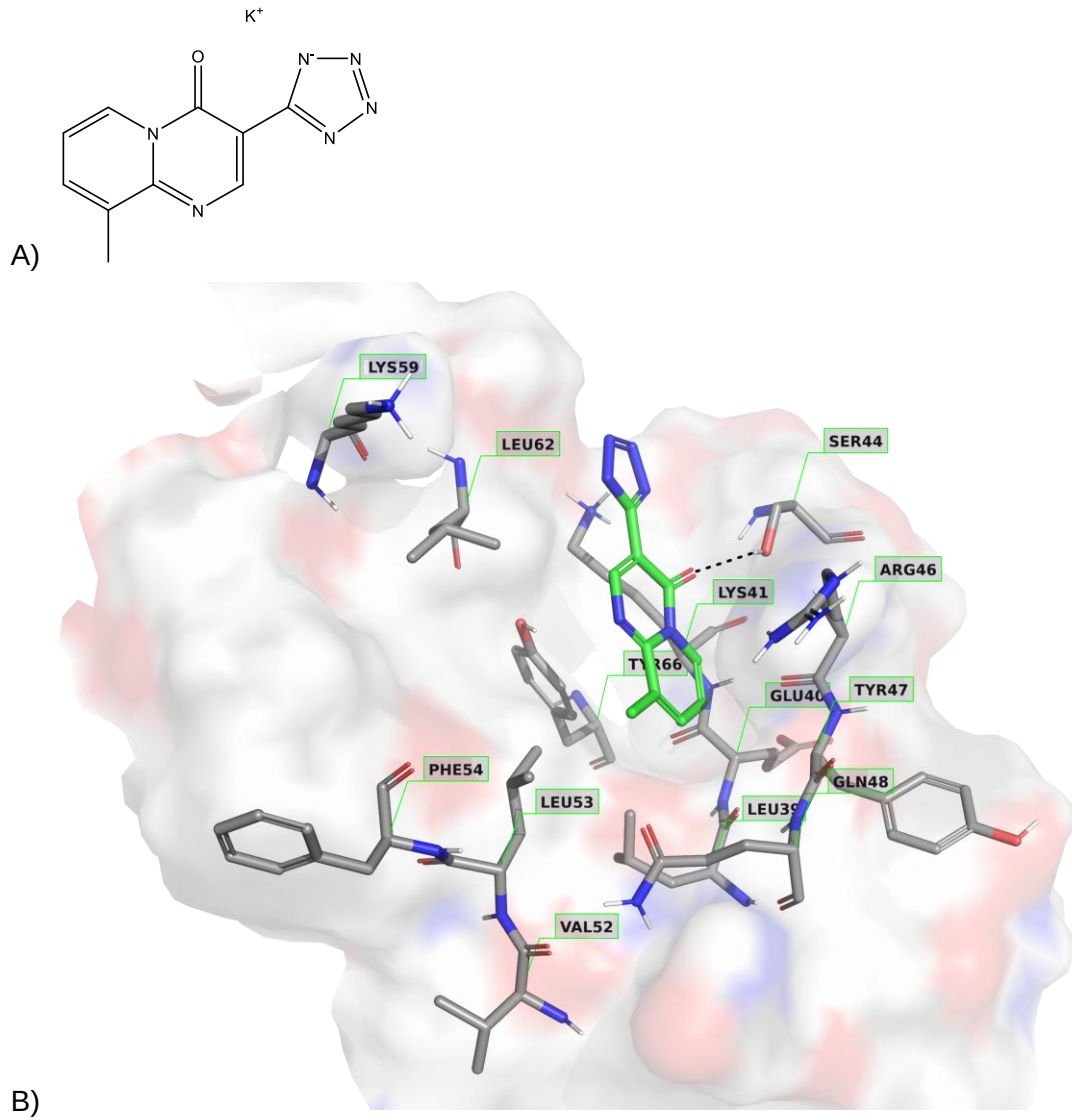
Losartan ilacı kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda, ortalama % 85,86 inhibisyon gösterirken, 100 μ M konsantrasyonda ortalama % 82,20 inhibisyon göstermiştir. 30 μ M konsantrasyonda ise ortalama % 33,26 inhibisyon verirken, 10 μ M konsantrasyonda ortalama % 27,90 inhibisyon ve 3 μ M konsantrasyonda % 4,18 inhibisyon göstermiştir.

Losartan ilacı konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda, ortalama % 100 inhibisyon göstermiştir. 100 μ M konsantrasyonda ortalama % 49,69 inhibisyon verirken, 30 μ M konsantrasyonda ise ortalama % 12,33 inhibisyon göstermiştir. Ancak, 10 μ M konsantrasyonda herhangi bir inhibisyon göstermemiştir.

Losartan ilacı trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda, ortalama % 96,26 inhibisyon gösterirken, 100 μ M konsantrasyonda ortalama % 13,49 ve 30 μ M konsantrasyonda ortalama % 9,86 inhibisyon göstermiştir.

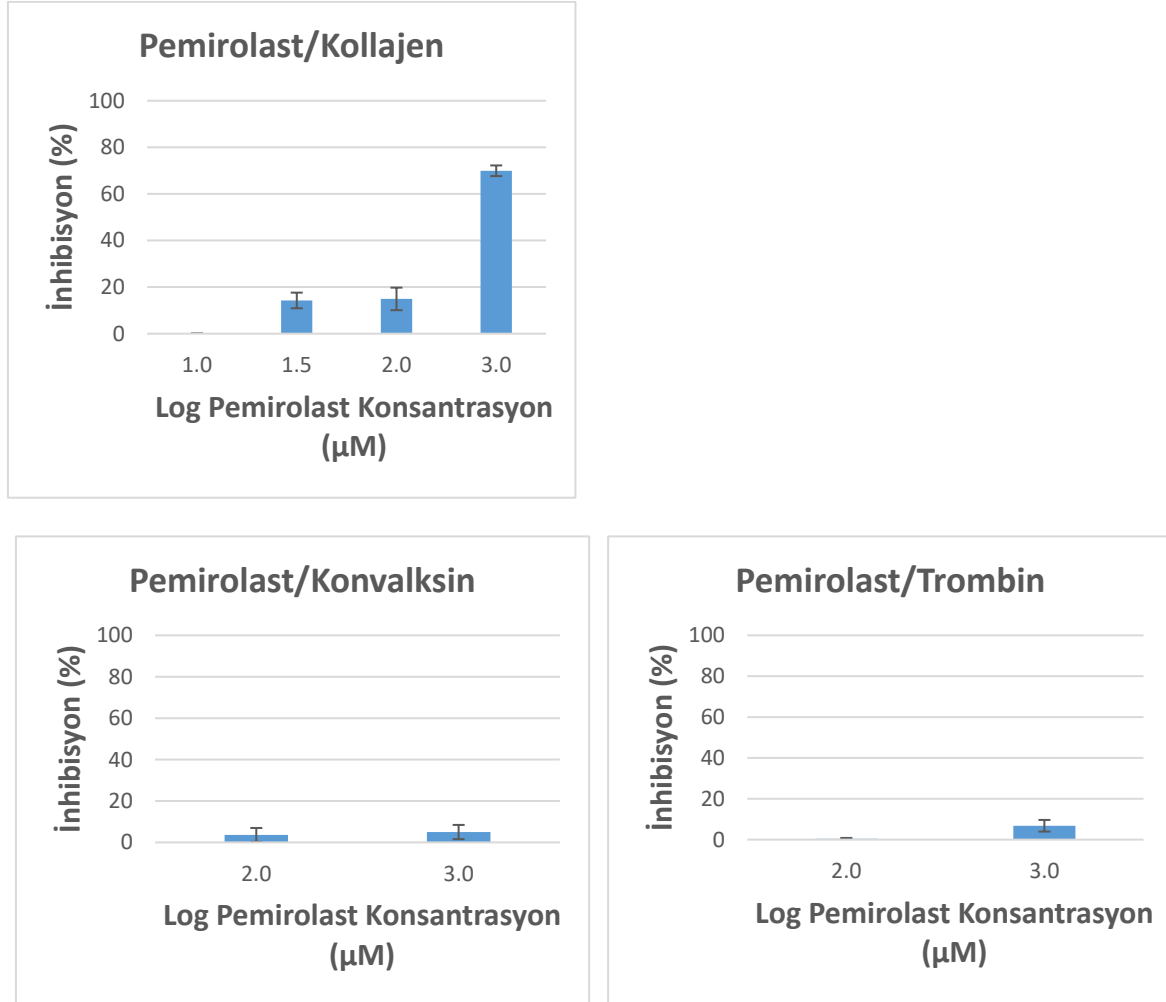
Pemirolast

Pemirolast'ın kimyasal yapısı Şekil 4.4.A'da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.4.B'de verilmiştir.



Şekil 4.4. A) Pemirolast potasyum bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Pemirolast ilacının gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

Pemirolast ilacının kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. Pemirolast'ın agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

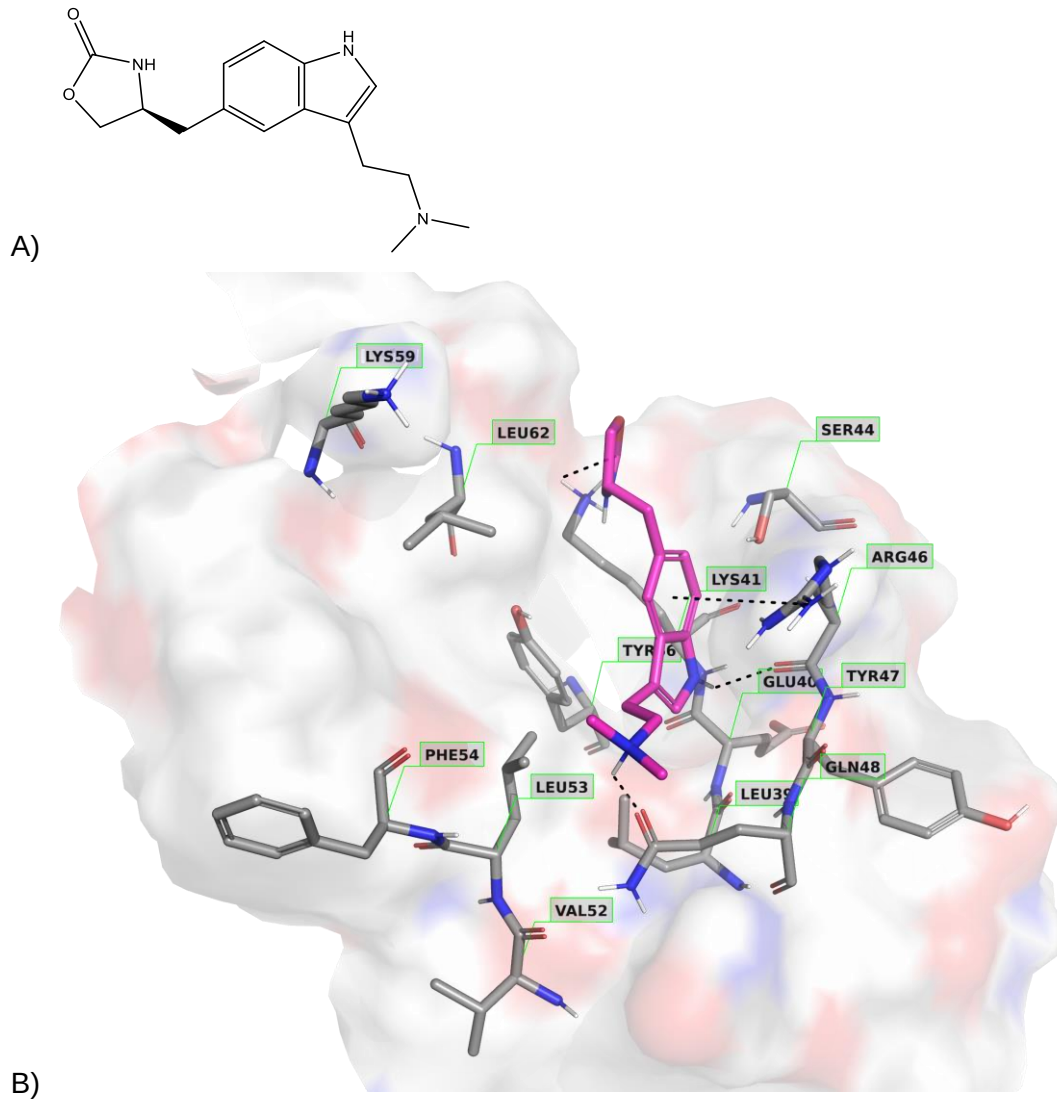
Pemirolast ilacı kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda, ortalama % 69,94 inhibisyon gösterirken, 100 μM konsantrasyonda ortalama % 14,93 inhibisyon göstermiştir. 30 μM konsantrasyonda ise ortalama % 14,26 inhibisyon verirken, 10 μM konsantrasyonda ise herhangi bir inhibisyon göstermemiştir. Pemirolast'ın 100 μM konsantrasyonda gösterdiği inhibisyon düşük olduğu için IC₅₀ çalışılmamıştır.

Pemirolast ilacı konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda, ortalama % 5,01 inhibisyon gösterirken, 100 μM konsantrasyonda ise ortalama % 3,61 inhibisyon göstermiştir.

Pemirolast ilacı trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 6,79 inhibisyon gösterirken, 100 μ M konsantrasyonda ise inhibisyon göstermemiştir (% 0,41 inhibisyon).

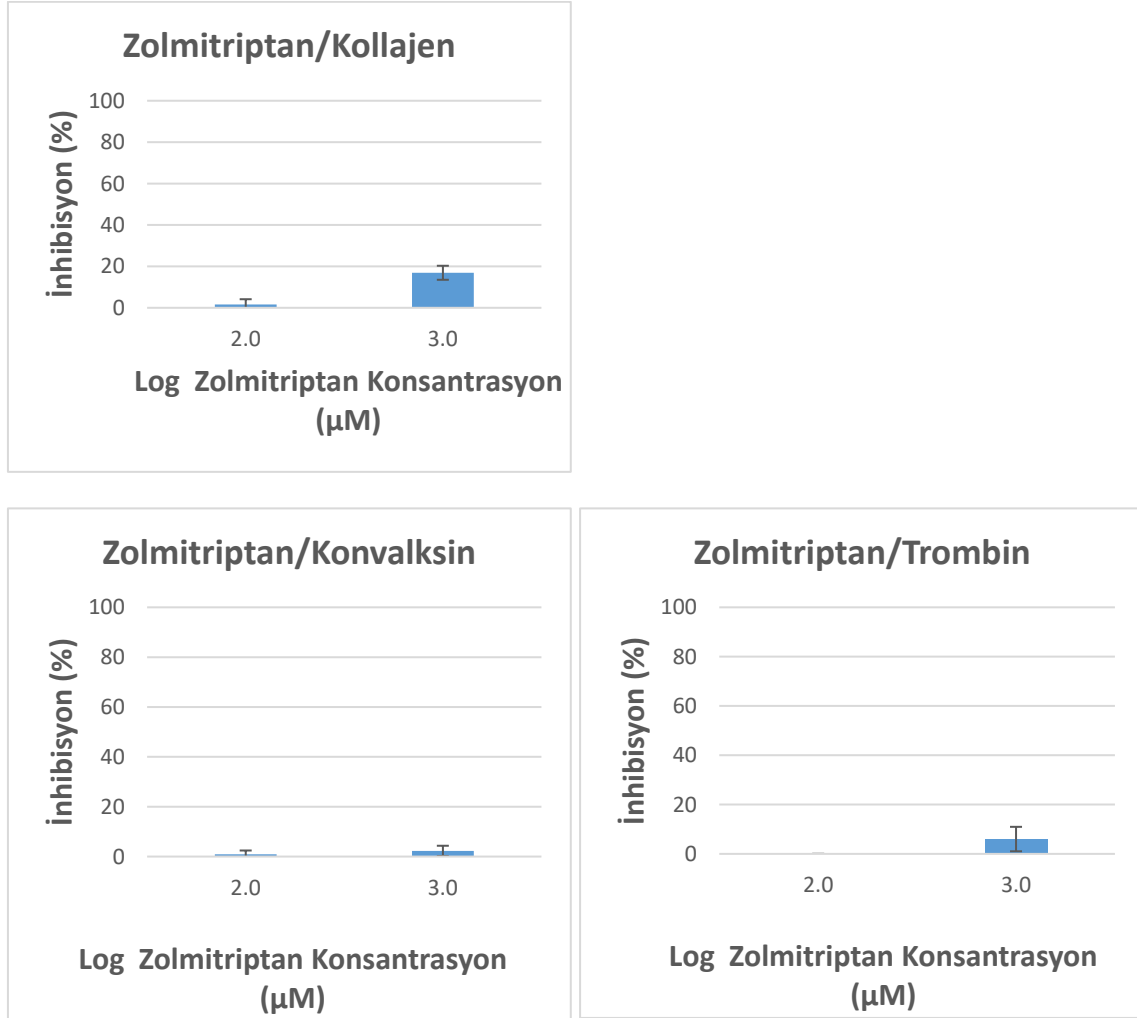
Zolmitriptan

Zolmitriptan'ın kimyasal yapısı Şekil 4.6.A'da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.6.B'de verilmiştir.



Şekil 4.6. A) Zolmitriptan bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Zolmitriptan ilacının gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

Zolmitriptan ilacının kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. Zolmitriptan’ın agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

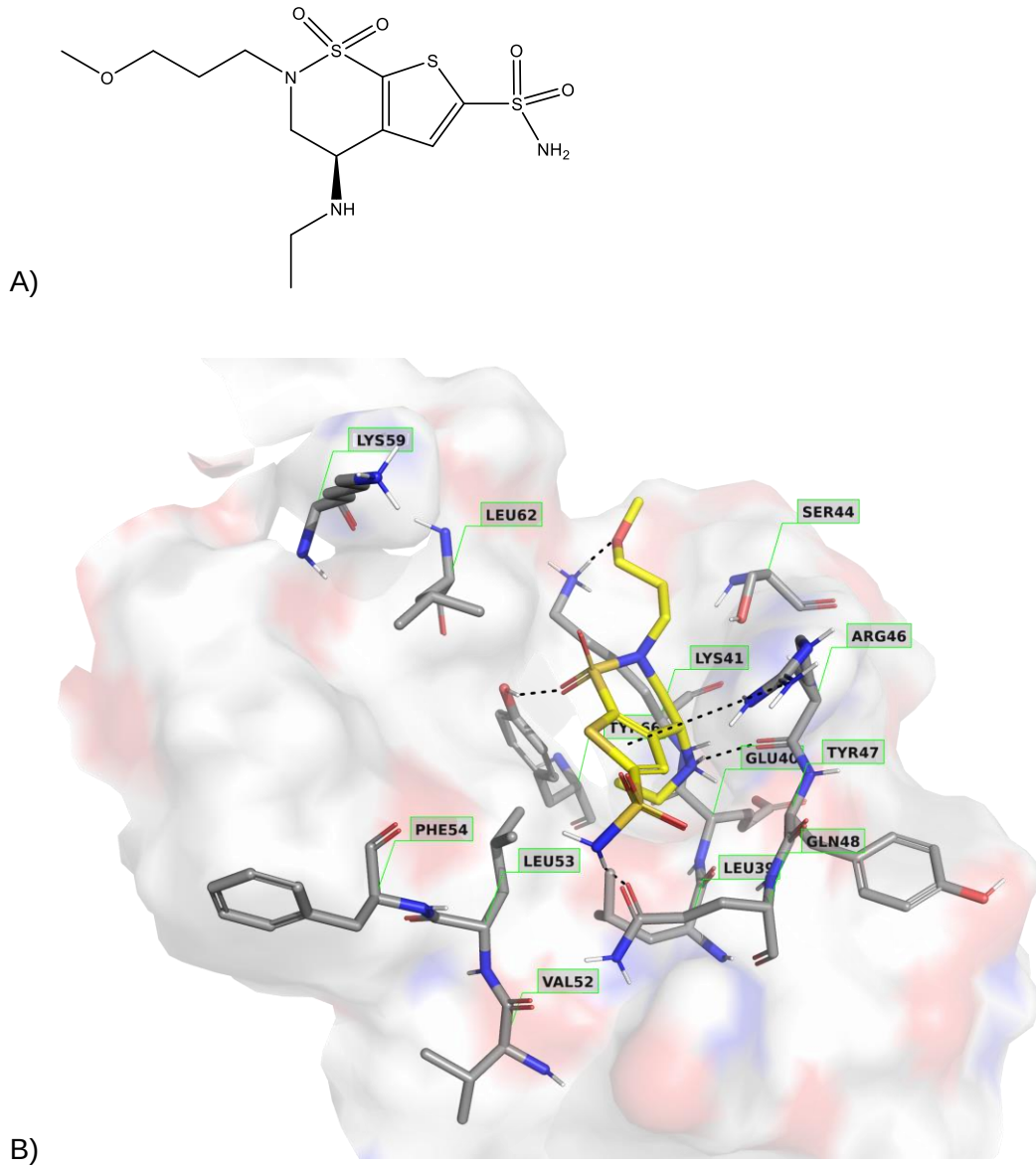
Zolmitriptan ilacı kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 16,91 inhibisyon gösterirken, 100 μM konsantrasyonda ortalama % 1,64 inhibisyon göstermiştir.

Zolmitriptan ilacı konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 2,27 inhibisyon ve 100 μM konsantrasyonda ise bir inhibisyon göstermemiştir (% 0,89 inhibisyon).

Zolmitriptan ilacı trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 6,01 inhibisyon gösterirken, 100 μ M konsantrasyonda ise hiçbir inhibisyon göstermemiştir.

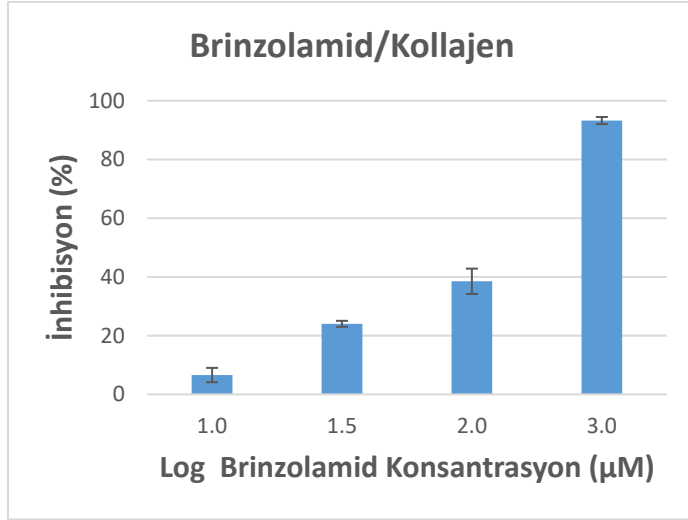
Brinzolamid

Brinzolamid'in kimyasal yapısı Şekil 4.8.A'da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.8.B'de verilmiştir.



Şekil 4.8. A) Brinzolamid bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Brinzolamid ilacının gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

Brinzolamid ilacının konvalksinle, trombinle ve Şekil 4.9’da verilen kollajenle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkisi incelenmiştir.



Şekil 4.9. Brinzolamid’in agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafiği

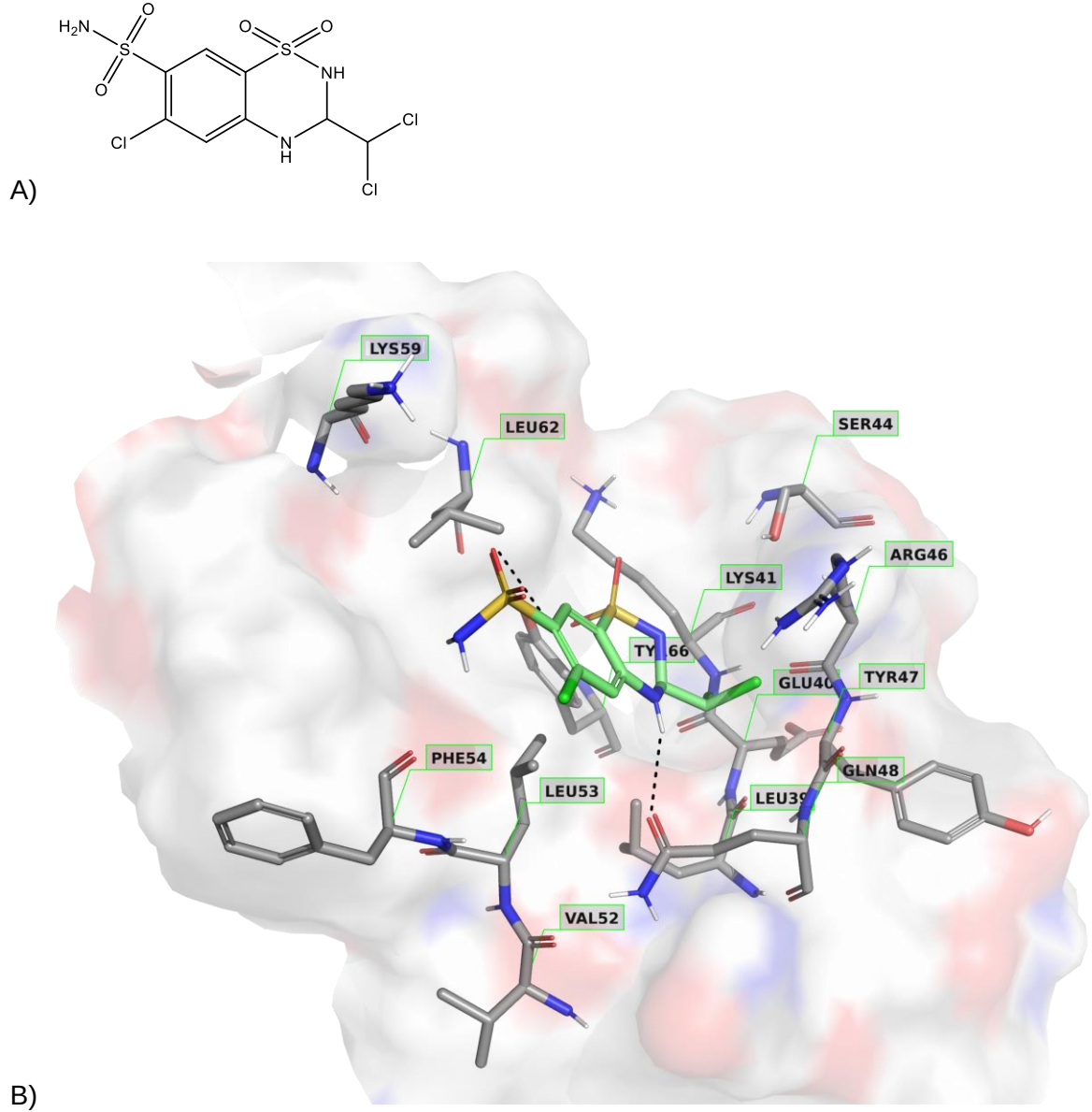
Brinzolamid ilacı kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 93,26 inhibisyon gösterirken, 100 µM konsantrasyonda ortalama % 38,51 inhibisyon göstermiştir. 30 µM konsantrasyonda ortalama % 24,02 inhibisyon verirken, 10 µM konsantrasyonda ise ortalama % 6,58 inhibisyon göstermiştir.

Brinzolamid ilacı konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda inhibisyon göstermezken (% 0,25 inhibisyon), 100 µM konsantrasyonda da hiçbir inhibisyon göstermemiştir.

Brinzolamid ilacı trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM ve 100 µM konsantrasyonlarda hiçbir inhibisyon göstermemiştir.

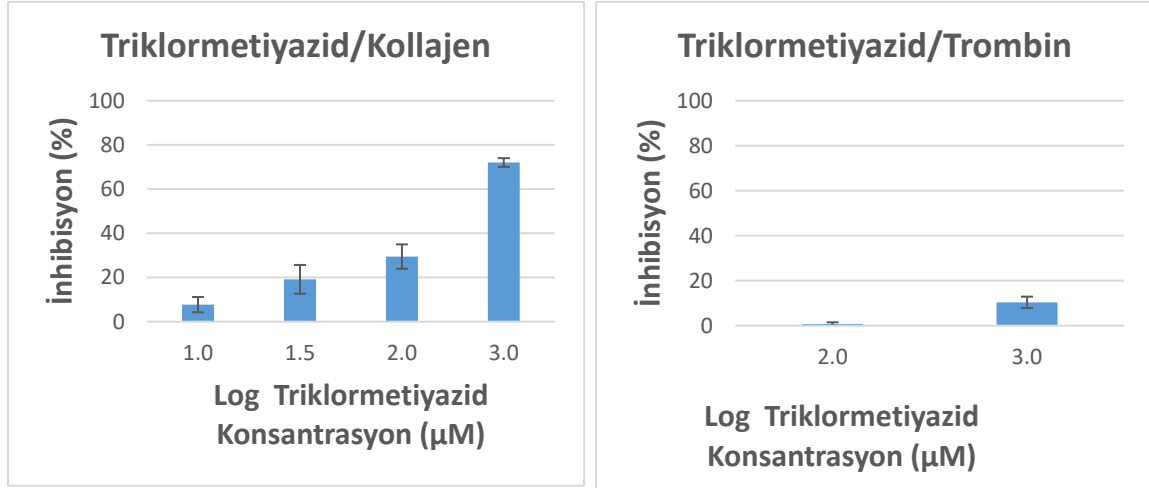
Triklormetiyazid

Triklormetiyazid'in kimyasal yapısı Şekil 4.10.A'da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.10.B'de verilmiştir.



Şekil 4.10. A) Triklormetiyazid bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Triklormetiyazid ilacının gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

Triklormetiyazid ilacının konvalksinle, Şekil 4.11’de verilen kollajenle ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiştir.



Şekil 4.11. Triklormetiyazid’in agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

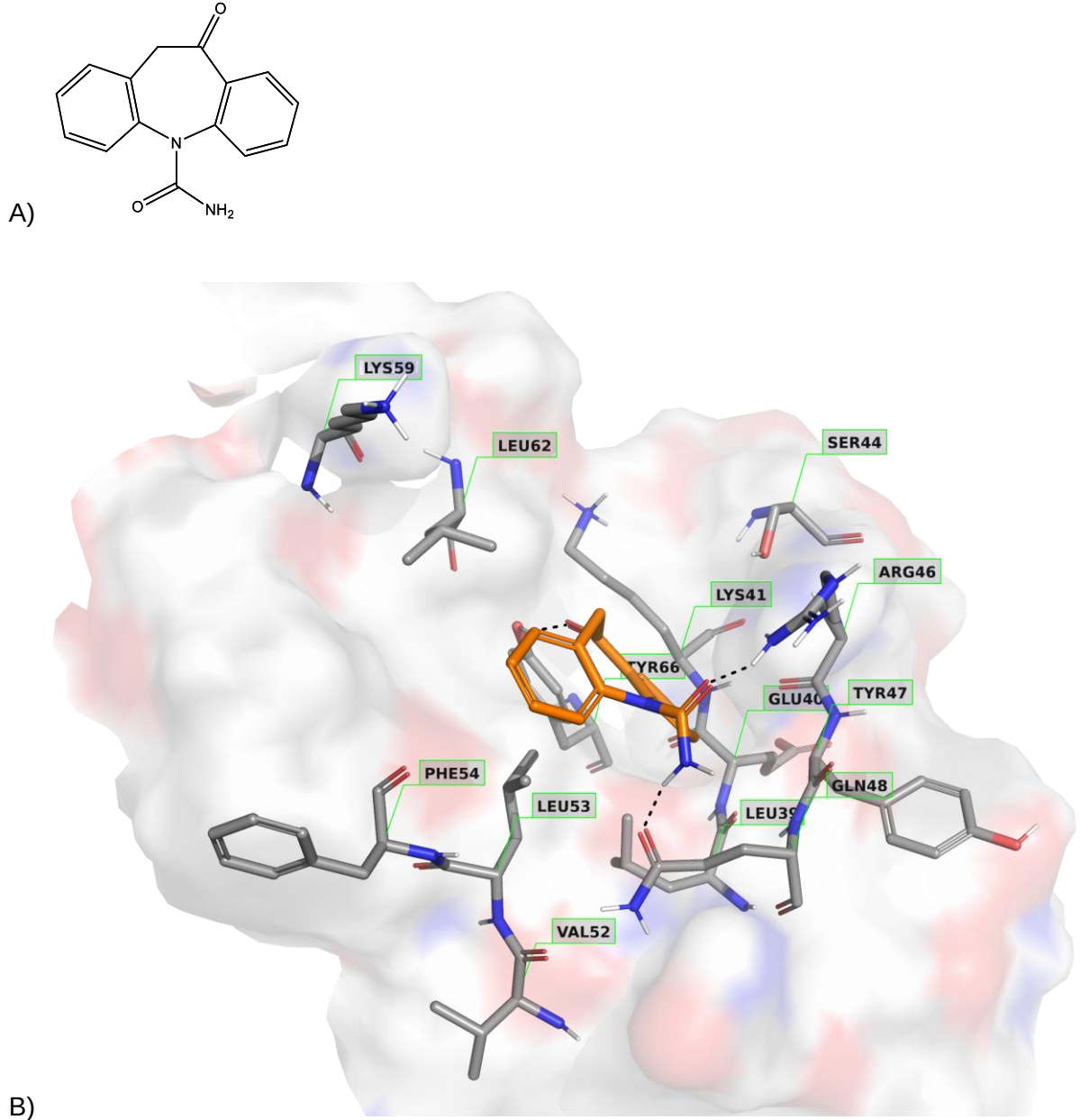
Triklormetiyazid ilacı kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 72,04 inhibisyon gösterirken, 100 µM konsantrasyonda ortalama % 29,46 inhibisyon göstermiştir. 30 µM konsantrasyonda ortalama % 19,17 inhibisyon verirken, 10 µM konsantrasyonda ise ortalama % 7,70 inhibisyon göstermiştir.

Triklormetiyazid ilacı konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM ve 100 µM konsantrasyonlarda hiçbir inhibisyon göstermemiştir.

Triklormetiyazid ilacı trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 10,36 inhibisyon gösterirken, 100 µM konsantrasyonda ise inhibisyon göstermemiştir (% 0,72 inhibisyon).

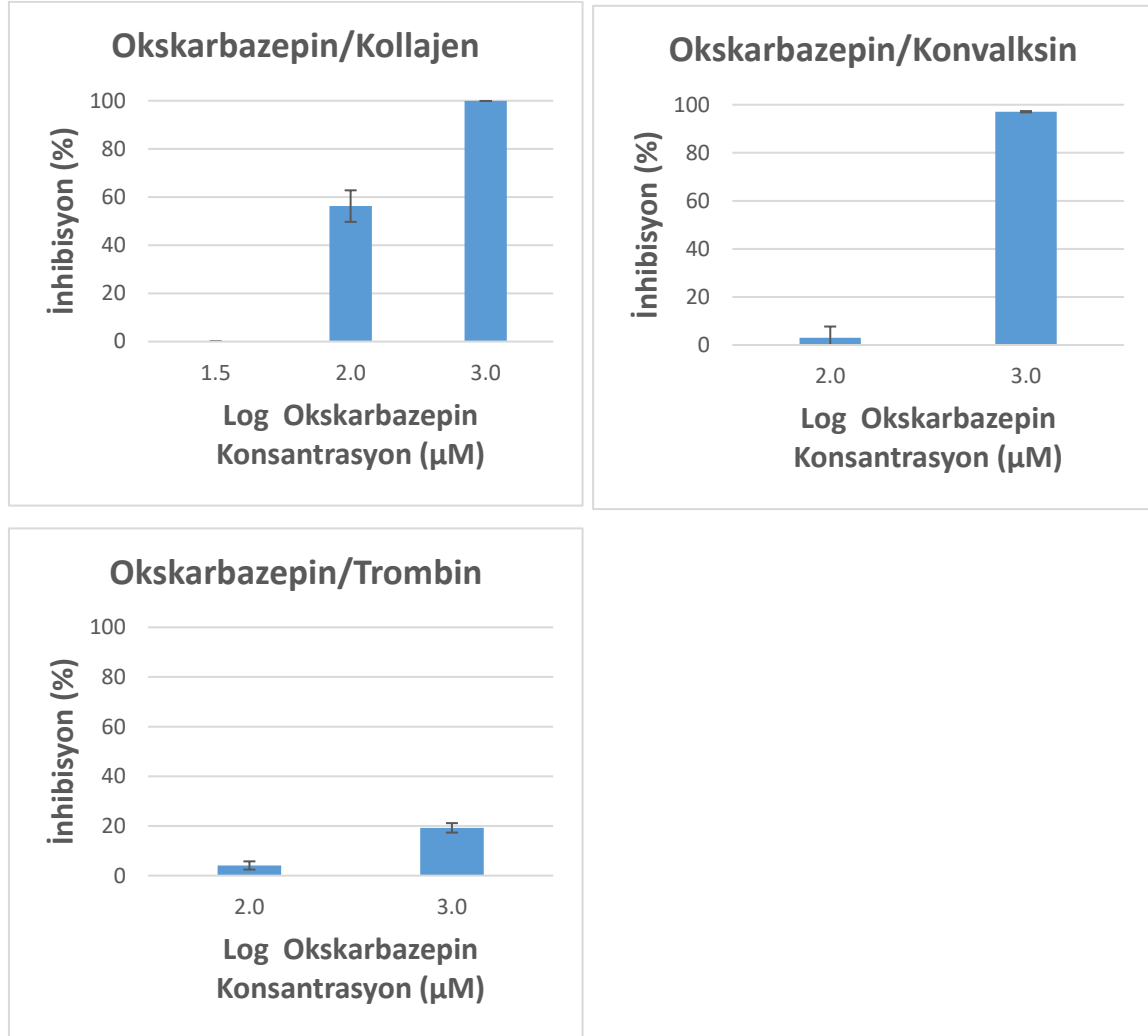
Okskarbazepin

Okskarbazepin'in kimyasal yapısı Şekil 4.12.A'da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.12.B'de verilmiştir.



Şekil 4.12. A) Okskarbazepin bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Okskarbazepin ilacının gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

Okskarbazepin ilacının kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.13'te verilmiştir.



Şekil 4.13. Okskarbazepin'in agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

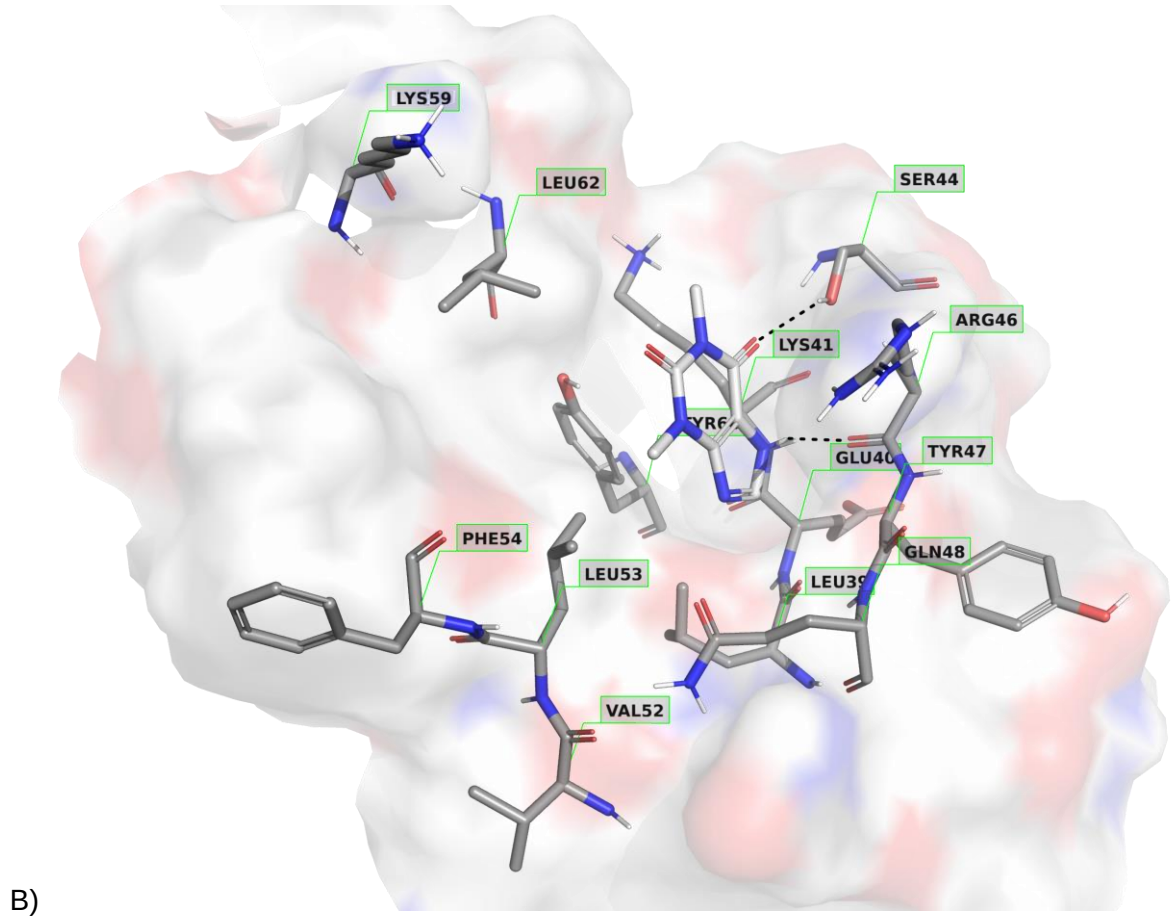
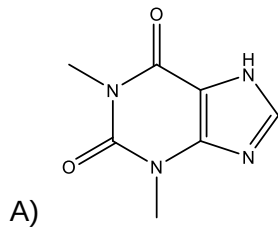
Okskarbazepin ilacı kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 99,97 inhibisyon gösterirken, 100 μM konsantrasyonda ortalama % 56,25 inhibisyon göstermiştir. Ancak, 30 μM konsantrasyonda herhangi bir inhibisyon göstermemiştir.

Okskarbazepin ilacı konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 97,10 inhibisyon gösterirken, 100 μM konsantrasyonda ortalama % 3,01 inhibisyon göstermiştir.

Okskarbazepin ilacı trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 19,23 inhibisyon gösterirken, 100 μ M konsantrasyonda ortalama % 4,09 inhibisyon göstermiştir.

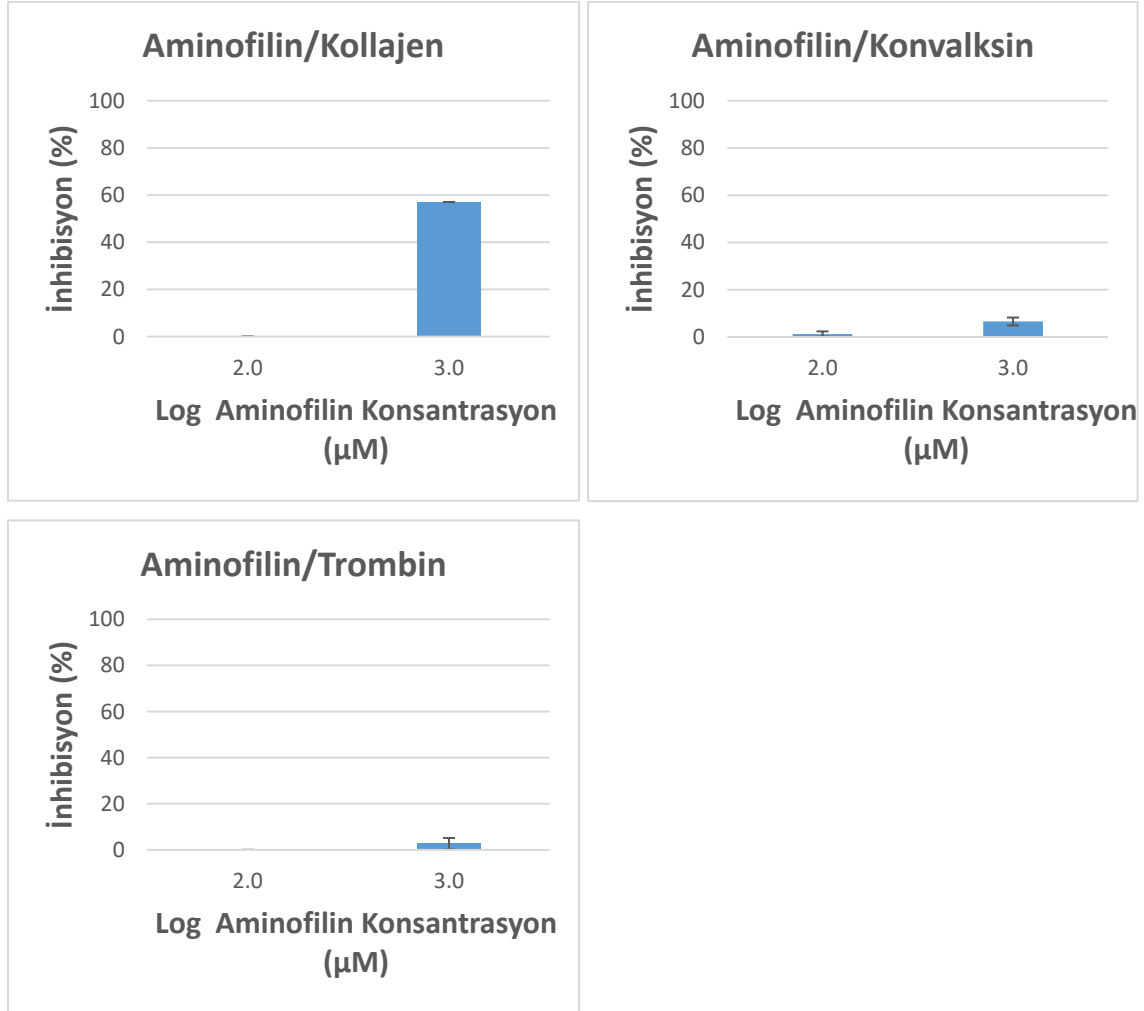
Aminofilin

Aminofilin'in kimyasal yapısı Şekil 4.14.A'da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.14.B'de verilmiştir.



Şekil 4.14. A) Aminofilin bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Aminofilin ilacının gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

Aminofilin ilacının kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.15. Aminofilin'in agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

Aminofilin ilacı kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 57,07 inhibisyon gösterirken, 100 μM konsantrasyonda bir inhibisyon göstermemiştir.

Aminofilin ilacı konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 6,57 inhibisyon gösterirken, 100 μM konsantrasyonda ortalama % 1,24 inhibisyon göstermiştir.

Aminofilin ilacı trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 2,64 inhibisyon gösterirken, 100 μ M konsantrasyonda hiçbir inhibisyon göstermemiştir.

Kimyasal bileşik veri tabanı Molport'ta yapılan tarama sonucu seçilen bileşiklerin deney koşullarında final konsantrasyonları 1 mM ve 100 μ M olacak şekilde kollajen (3 μ g/ml) , konvalksin (50 ng/ml) ve trombin (0,1 U/ml) ile oluşturulan platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir. Deney ortamında, 1 mM konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan bileşiklerin bazılarında başlangıç konsantrasyonu olan 420 mM konsantrasyonda çözünürlük problemi yaşandığından bu maddeler için agregasyon çalışması daha düşük konsantrasyonlarda yapılmıştır.

Çizelge 4.3. Molport veri tabanından seçilen bileşiklerin 1 mM ve 100 μ M konsantrasyonlardaki % inhibisyon değerleri (Ç.P.: Çözünürlük problemi)

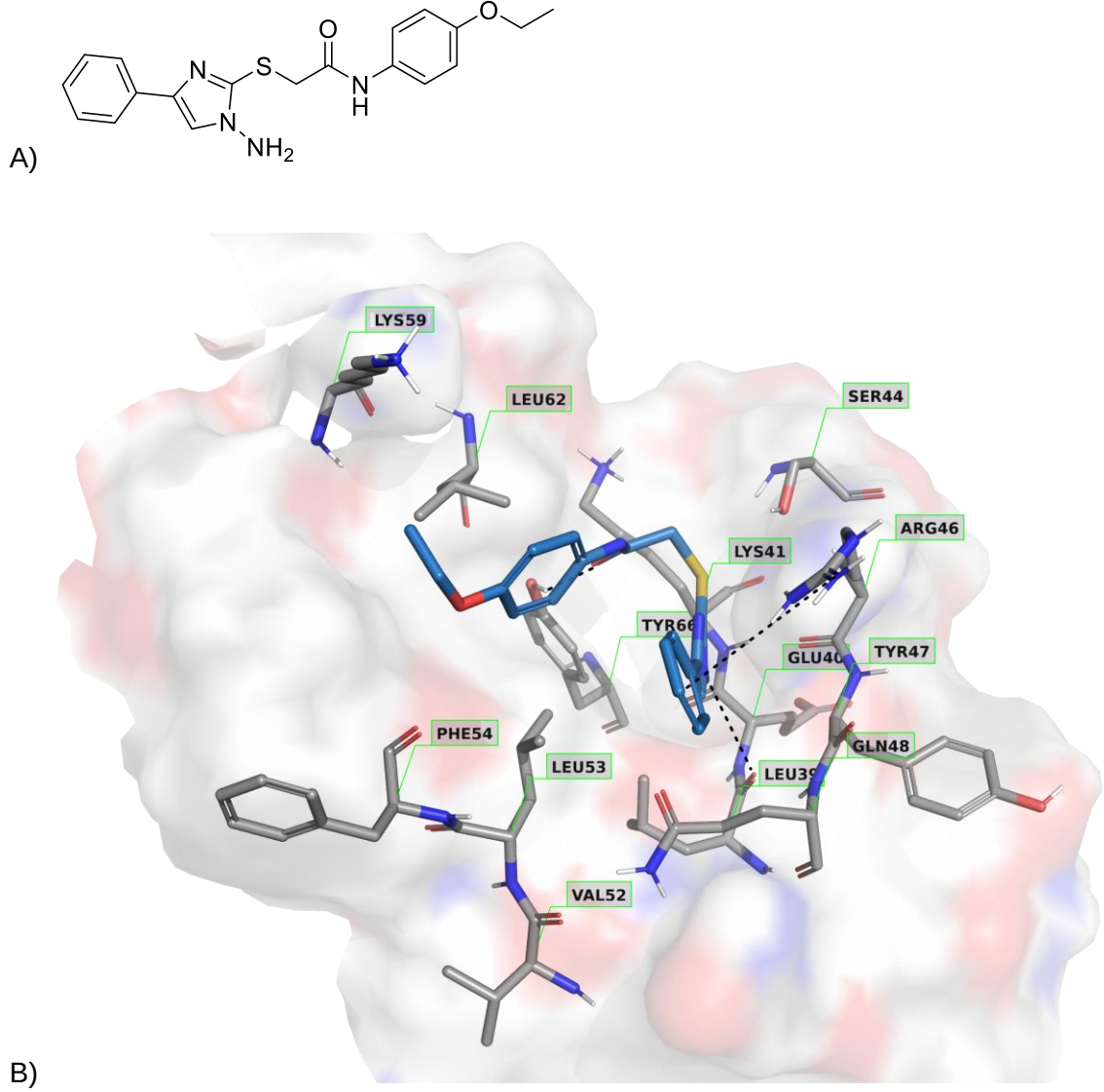
	Kollajen (3 μ g/ml)		Konvalksin(50 ng/ml)		Trombin (0,1 U/ml)	
	1 mM	100 μ M	1 mM	100 μ M	1 mM	100 μ M
Z16043060	98,06 $\pm$ 3,37	88,17 $\pm$ 1,78	87,97 $\pm$ 1,02	62,61 $\pm$ 2,28	43,20 $\pm$ 1,21	0,51 $\pm$ 0,89
AE641/05538014	98,89 $\pm$ 1,31	79,69 $\pm$ 2,78	94,68 $\pm$ 0,26	2,08 $\pm$ 2,98	92,63 $\pm$ 3,57	0,00 $\pm$ 0,00
STK763609	99,49 $\pm$ 0,40	76,12 $\pm$ 2,43	62,23 $\pm$ 1,92	0,41 $\pm$ 0,71	35,84 $\pm$ 1,67	6,79 $\pm$ 2,05
1692506	89,75 $\pm$ 3,09	75,03 $\pm$ 2,26	93,19 $\pm$ 2,30	74,41 $\pm$ 3,03	83,04 $\pm$ 2,53	78,04 $\pm$ 0,37
Z851137174	92,41 $\pm$ 4,79	64,37 $\pm$ 1,03	17,88 $\pm$ 3,13	0,45 $\pm$ 0,77	0,00 $\pm$ 0,00	1,09 $\pm$ 1,89
STK685501	76,94 $\pm$ 1,34	59,21 $\pm$ 0,51	32,15 $\pm$ 0,35	3,06 $\pm$ 4,32	16,72 $\pm$ 1,00	0,54 $\pm$ 0,94
Z232636338	Ç.P.	77,56 $\pm$ 2,10	Ç.P.	5,62 $\pm$ 1,82	Ç.P.	0,00 $\pm$ 0,00
AK778/43464987	Ç.P.	81,54 $\pm$ 1,02	Ç.P.	63,34 $\pm$ 1,16	Ç.P.	19,51 $\pm$ 3,60

Çizelge 4.3. (devam) Molport veri tabanından seçilen bileşiklerin 1 mM ve 100 µM konsantrasyonlardaki % inhibisyon değerleri (Ç.P.: Çözünürlük problemi)

80378510	63,31±2,50	23,01±4,21	62,45±1,21	4,93±3,17	82,80±1,22	2,52±2,62
STK206687	Ç.P.	91,04±1,49	Ç.P.	50,93±0,18	Ç.P.	7,61±2,52
1303833	Ç.P.	96,39±1,77	Ç.P.	97,60±0,48	Ç.P.	92,59±4,58
STK908290	Ç.P.	80,02±2,10	Ç.P.	32,69±3,41	Ç.P.	49,60±6,26
STK633709	Ç.P.	71,49±0,83	Ç.P.	2,52±2,52	Ç.P.	0,00±0,00
Z54670628	78,14±2,03	42,65±3,28	19,64±3,80	1,69±1,41	10,20±2,25	0,70±1,21
3F-042	Ç.P.	40,86±5,34	Ç.P.	4,39±1,66	Ç.P.	7,66±3,03
1591532	500 µM 81,60±2,00	48,65±5,08	Ç.P.	25,94±3,91	Ç.P.	0,99±1,71

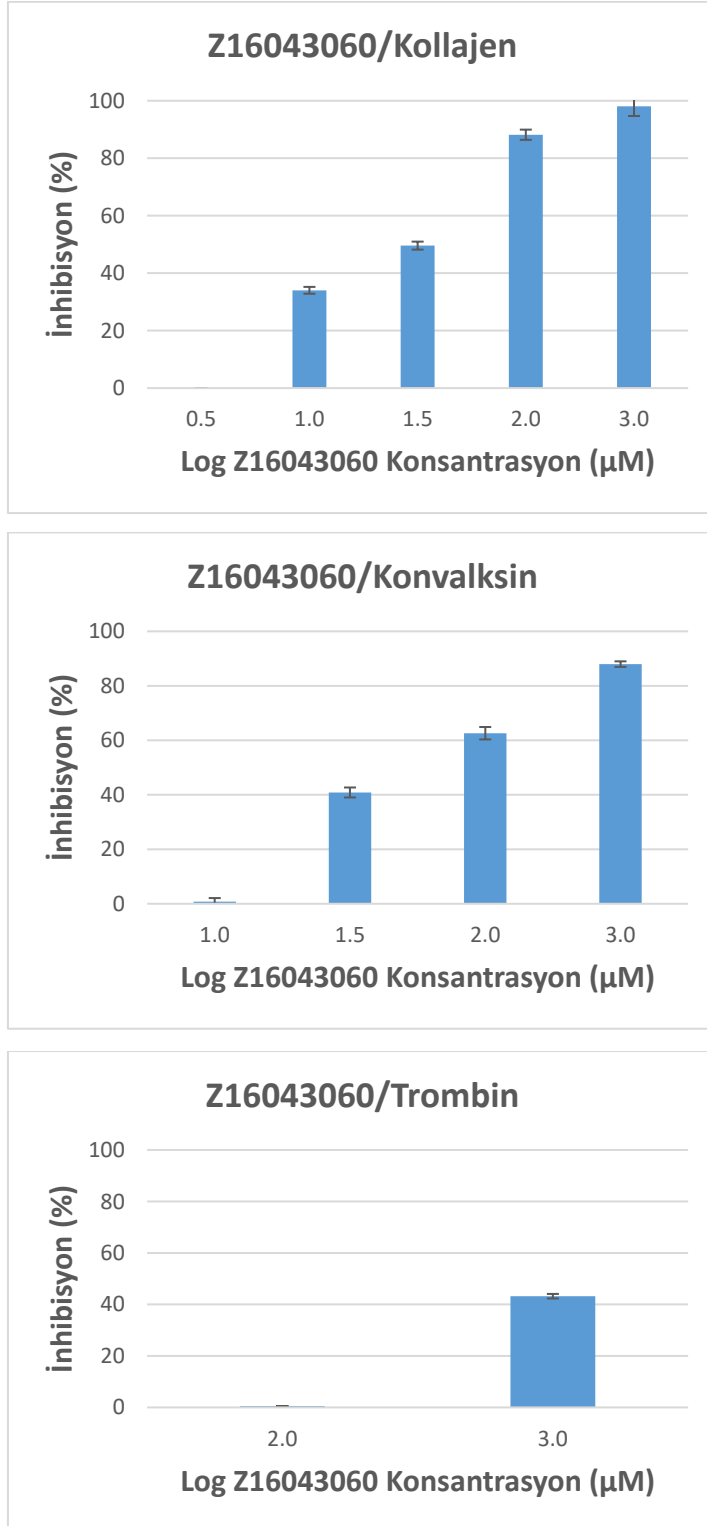
Z16043060

Z16043060 bileşiminin kimyasal yapısı Şekil 4.16.A’da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.16.B’de verilmiştir.



Şekil 4.16. A) Z16043060 bileşiminin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Z16043060 bileşiminin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

Z16043060 bileşiminin kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.17’de verilmiştir.



Şekil 4.17. Z16043060 bileşiminin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

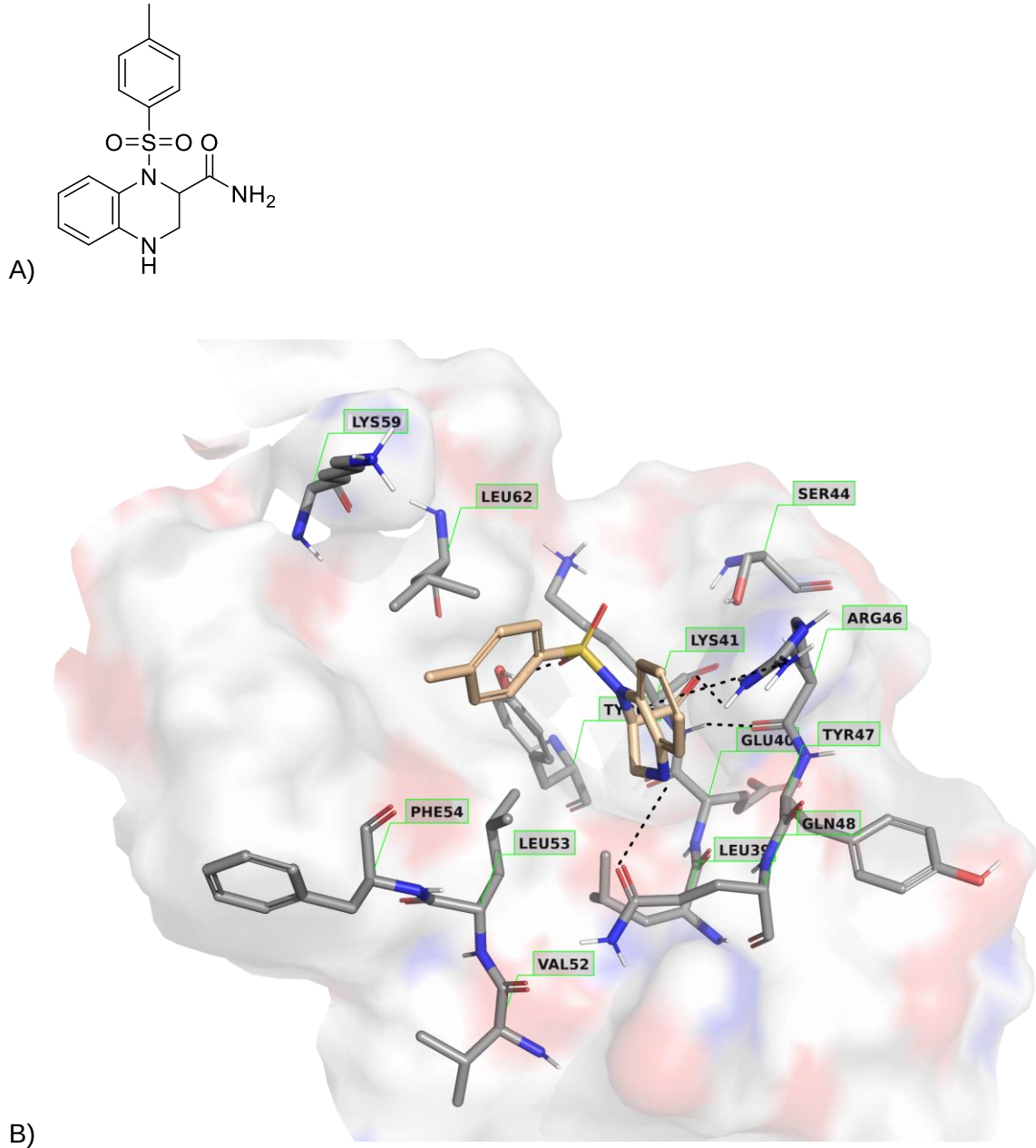
Z16043060 bileşiği kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 98,06 inhibisyon gösterirken, 100 μ M konsantrasyonda ortalama % 88,17 inhibisyon göstermiştir. 30 μ M konsantrasyonda ortalama % 49,58 inhibisyon verirken, 10 μ M konsantrasyonda ortalama % 34,03 inhibisyon göstermiştir. Ancak, 3 μ M konsantrasyonda herhangi bir inhibisyon göstermemiştir.

Z16043060 bileşiği konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 87,97 inhibisyon gösterirken, 100 μ M konsantrasyonda ortalama % 62,61 inhibisyon vermiştir. 30 μ M konsantrasyonda ortalama % 40,85 inhibisyon verirken, 10 μ M konsantrasyonda inhibisyon göstermemiştir (% 0,77 inhibisyon).

Z16043060 bileşiği trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 43,20 inhibisyon gösterirken, 100 μ M konsantrasyonda inhibisyon göstermemiştir (% 0,51 inhibisyon).

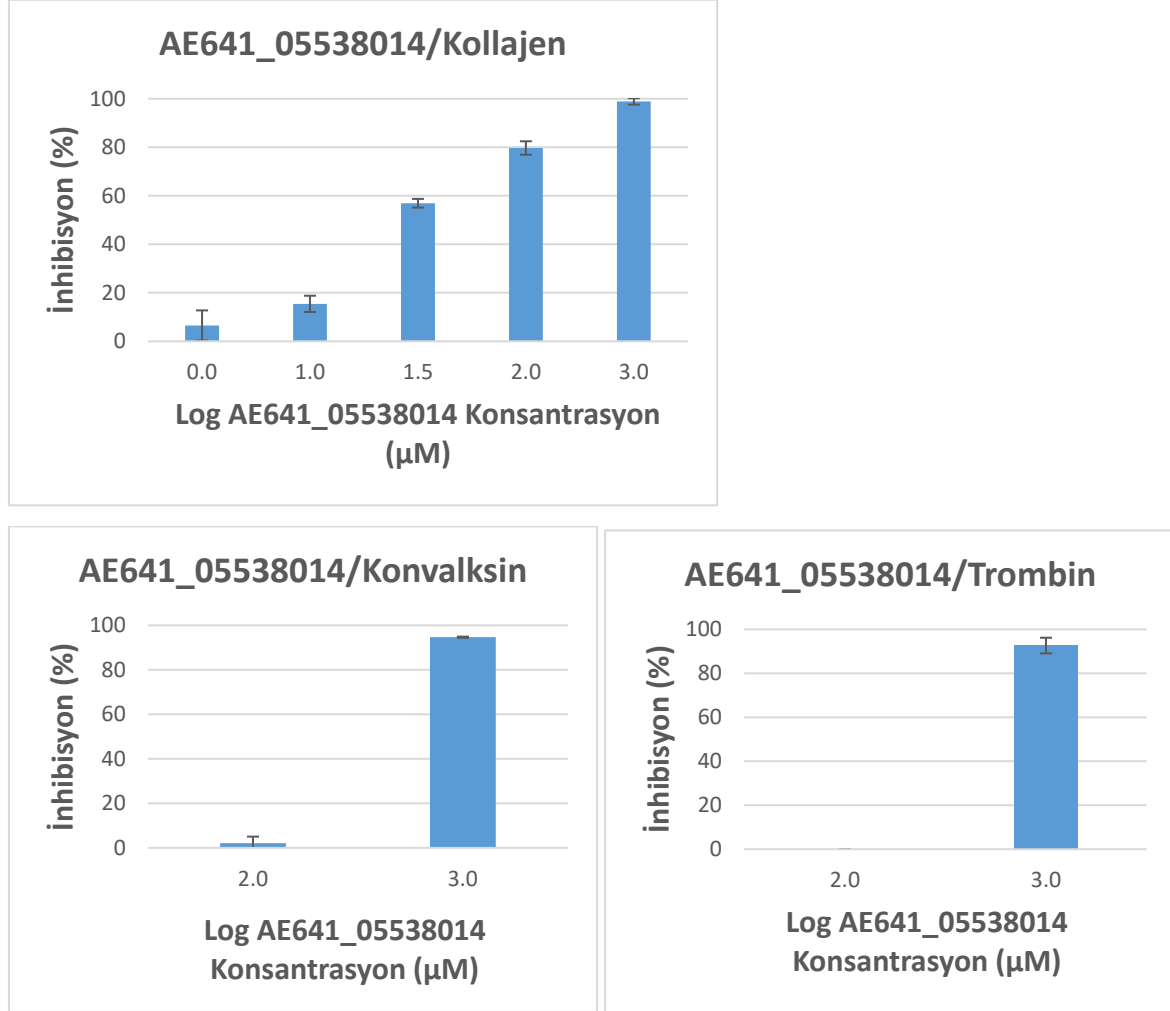
AE641/05538014

AE641/05538014 bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 4.18.A'da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.18.B'de verilmiştir.



Şekil 4.18. A) AE641/05538014 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile AE641/05538014 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

AE641/05538014 bileşiğinin kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.19’da verilmiştir.



Şekil 4.19. AE641/05538014 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

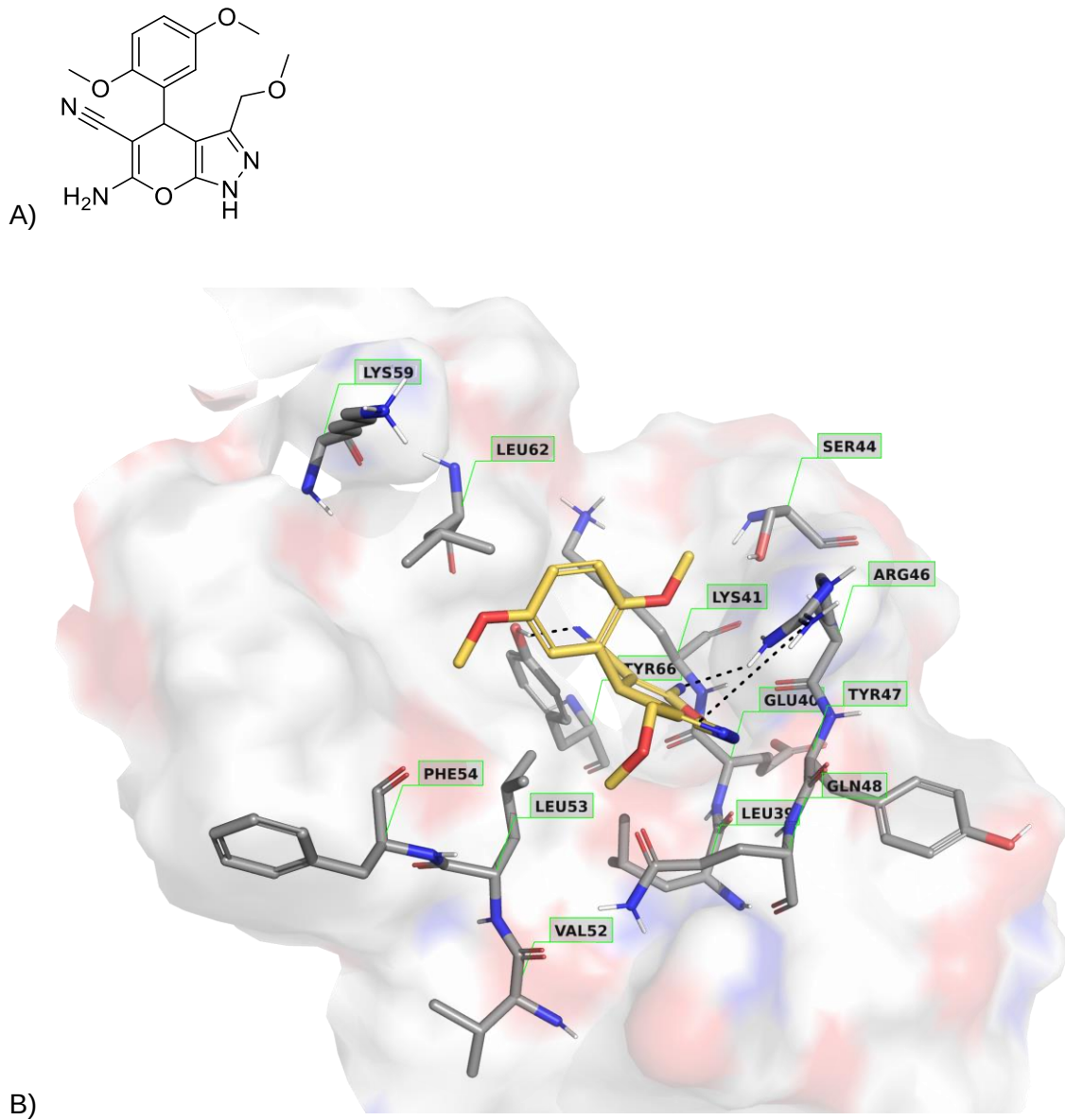
AE641/05538014 bileşiği kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 98,89 inhibisyon göstermiştir. 100 μM konsantrasyonda ise ortalama % 79,69 inhibisyon gösterirken, 30 μM konsantrasyonda ortalama % 56,92 inhibisyon, 10 μM konsantrasyonda % 15,43 inhibisyon, 1 μM konsantrasyonda % 6,52 inhibisyon göstermiştir.

AE641/05538014 bileşiği konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 94,68 inhibisyon gösterirken, 100 μM konsantrasyonda ortalama % 2,08 inhibisyon göstermiştir.

AE641/05538014 bileşiği trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 92,63 inhibisyon gösterirken, 100 µM konsantrasyonda hiçbir inhibisyon göstermemiştir.

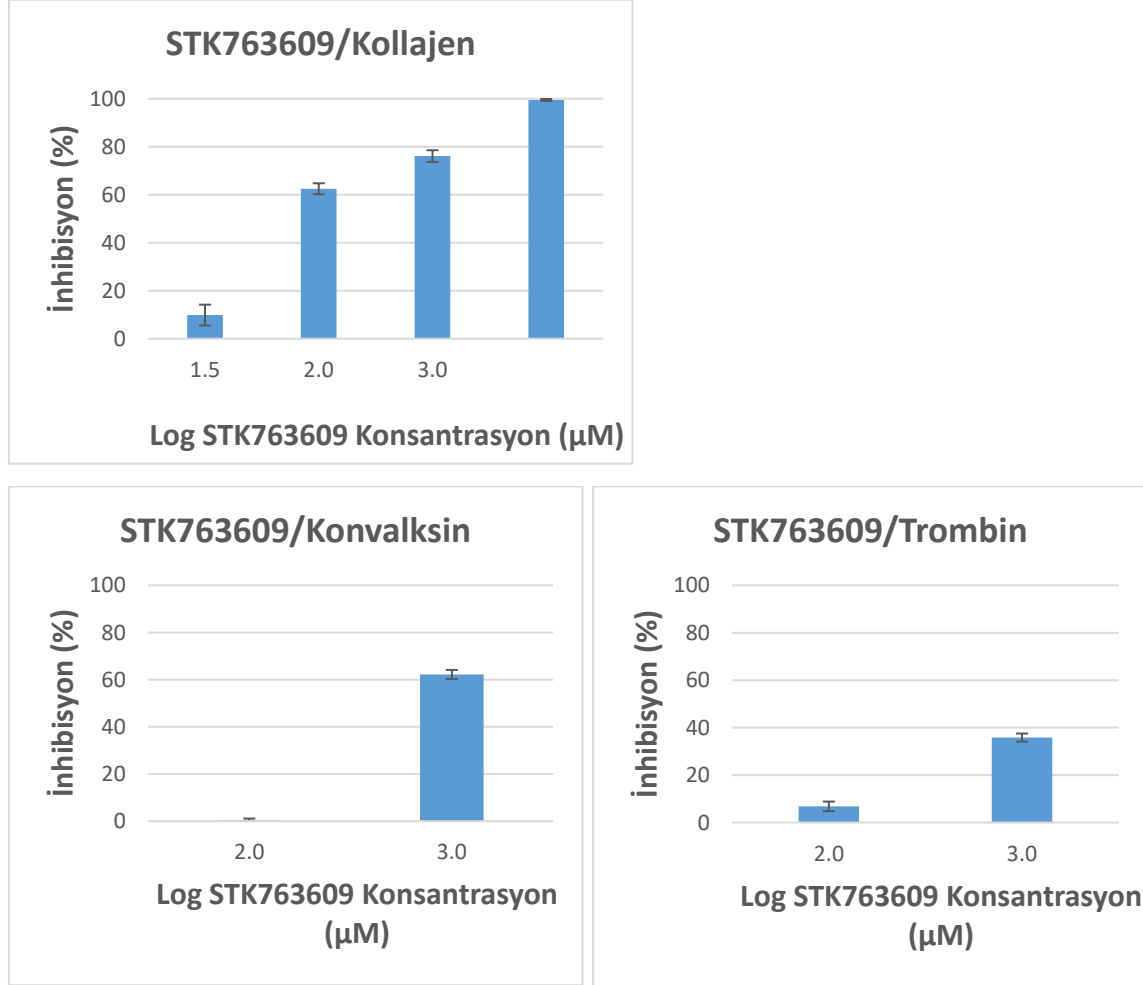
STK763609

STK763609 bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 4.20.A'da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.20.B'de verilmiştir.



Şekil 4.20. A) STK763609 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile STK763609 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

STK763609 bileşiğinin kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.21’de verilmiştir.



Şekil 4.21. STK763609 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

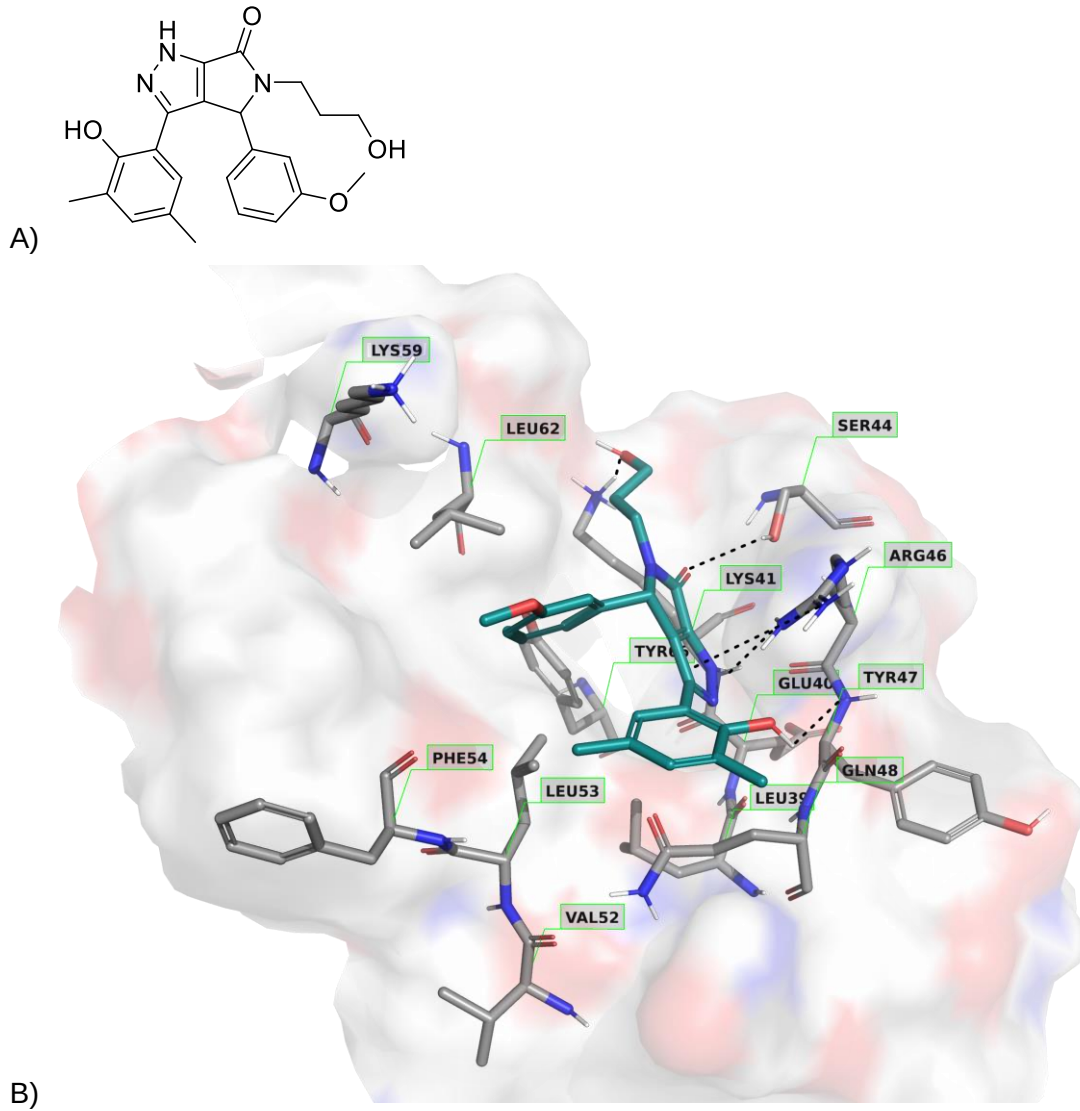
STK763609 bileşiği kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 99,49 inhibisyon gösterirken, 100 μM konsantrasyonda ortalama % 76,12 inhibisyon göstermiştir. 30 μM konsantrasyonda ortalama % 62,49 inhibisyon gösterirken, 10 μM konsantrasyonda ise ortalama % 9,86 inhibisyon göstermiştir.

STK763609 bileşiği konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 62,23 inhibisyon gösterirken, 100 μM konsantrasyonda inhibisyon göstermemiştir (% 0,41 inhibisyon).

STK763609 bileşiği trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 35,84 inhibisyon gösterirken, 100 μ M konsantrasyonda ortalama % 6,79 inhibisyon göstermiştir.

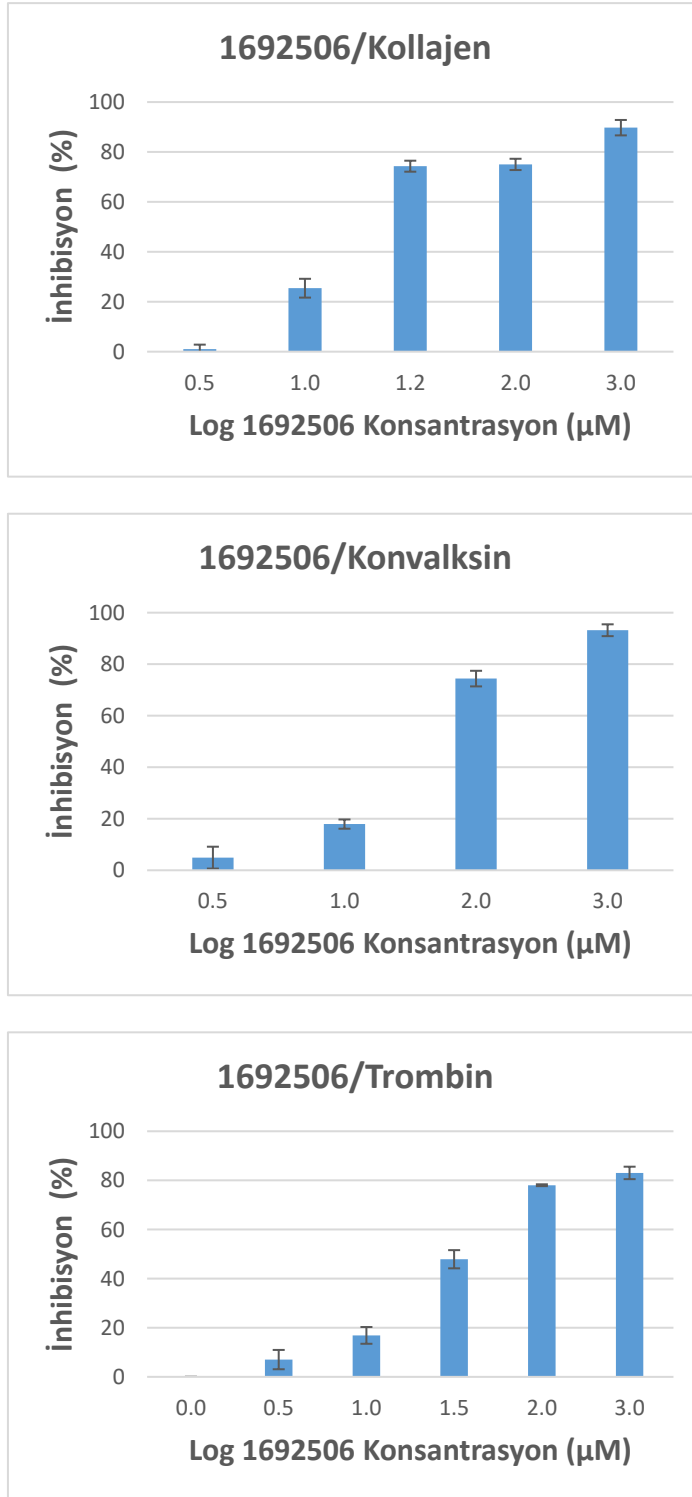
1692506

1692506 bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 4.22.A’da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.22.B’de verilmiştir.



Şekil 4.22. A) 1692506 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile 1692506 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

1692506 bileşiğinin kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.23'te verilmiştir.



Şekil 4.23. 1692506 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

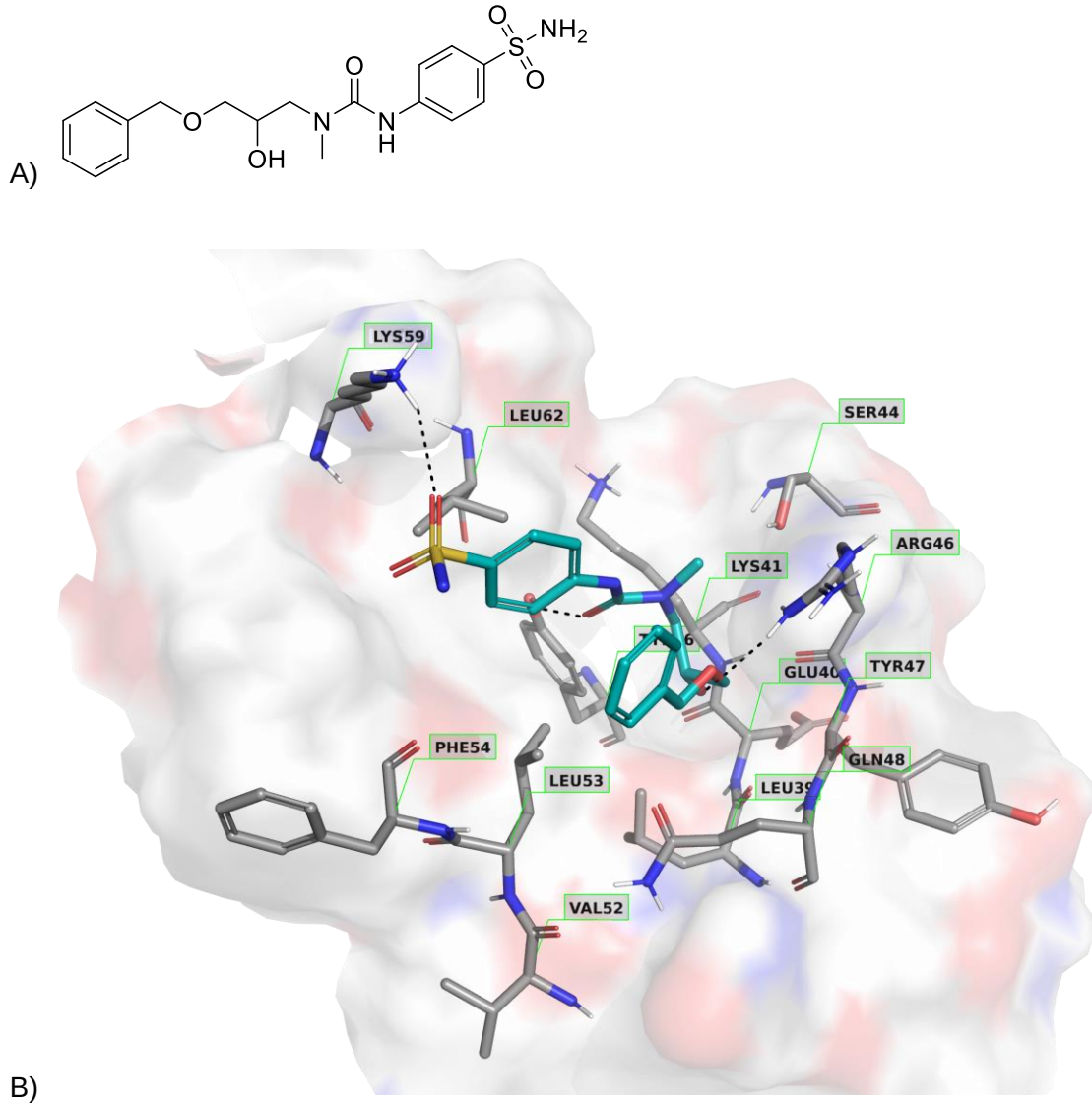
1692506 bileşigi kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 89,75 inhibisyon gösterirken, 100 μ M konsantrasyonda ortalama % 75,03 inhibisyon göstermiştir. 15 μ M konsantrasyonda ortalama % 74,31 inhibisyon verirken, 10 μ M konsantrasyonda ortalama % 25,43 inhibisyon ve 3 μ M konsantrasyonda ortalama % 1,03 inhibisyon göstermiştir.

1692506 bileşigi konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 93,19 inhibisyon gösterirken, 100 μ M konsantrasyonda ortalama % 74,41 inhibisyon, 10 μ M konsantrasyonda % 17,92 inhibisyon ve 3 μ M konsantrasyonda ise % 4,90 inhibisyon göstermiştir.

1692506 bileşigi trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 83,04 inhibisyon gösterirken, 100 μ M konsantrasyonda ortalama % 78,04 inhibisyon, 30 μ M konsantrasyonda % 47,90 inhibisyon ve 10 μ M konsantrasyonda ise % 16,88 inhibisyon göstermiştir. 3 μ M konsantrasyonda ortalama % 7,03 inhibisyon gösterirken, 1 μ M konsantrasyonda ise inhibisyon göstermemiştir.

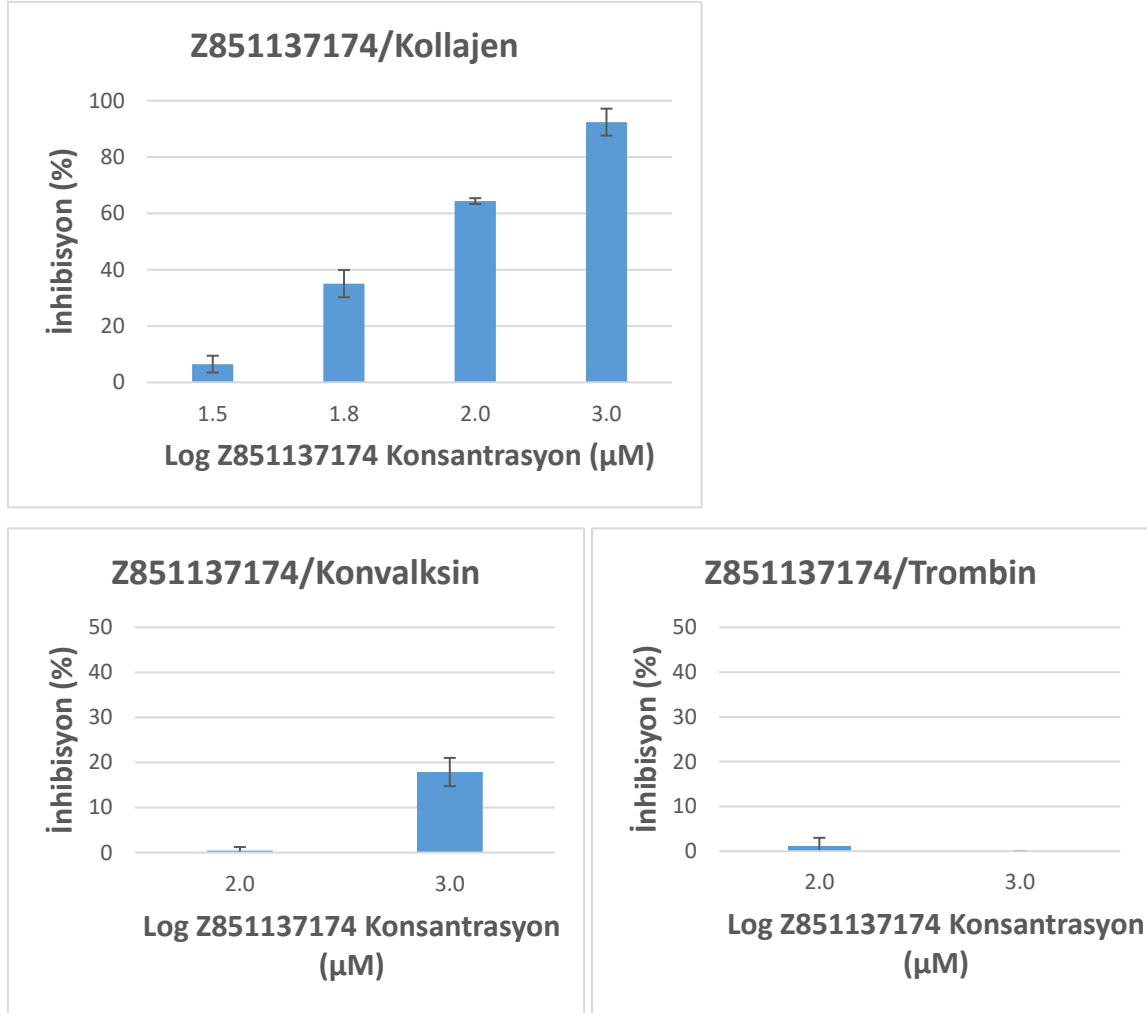
Z851137174

Z851137174 bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 4.24.A'da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.24.B'de verilmiştir.



Şekil 4.24. A) Z851137174 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Z851137174 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

Z851137174 bileşiğinin kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.25'te verilmiştir.



Şekil 4.25. Z851137174 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

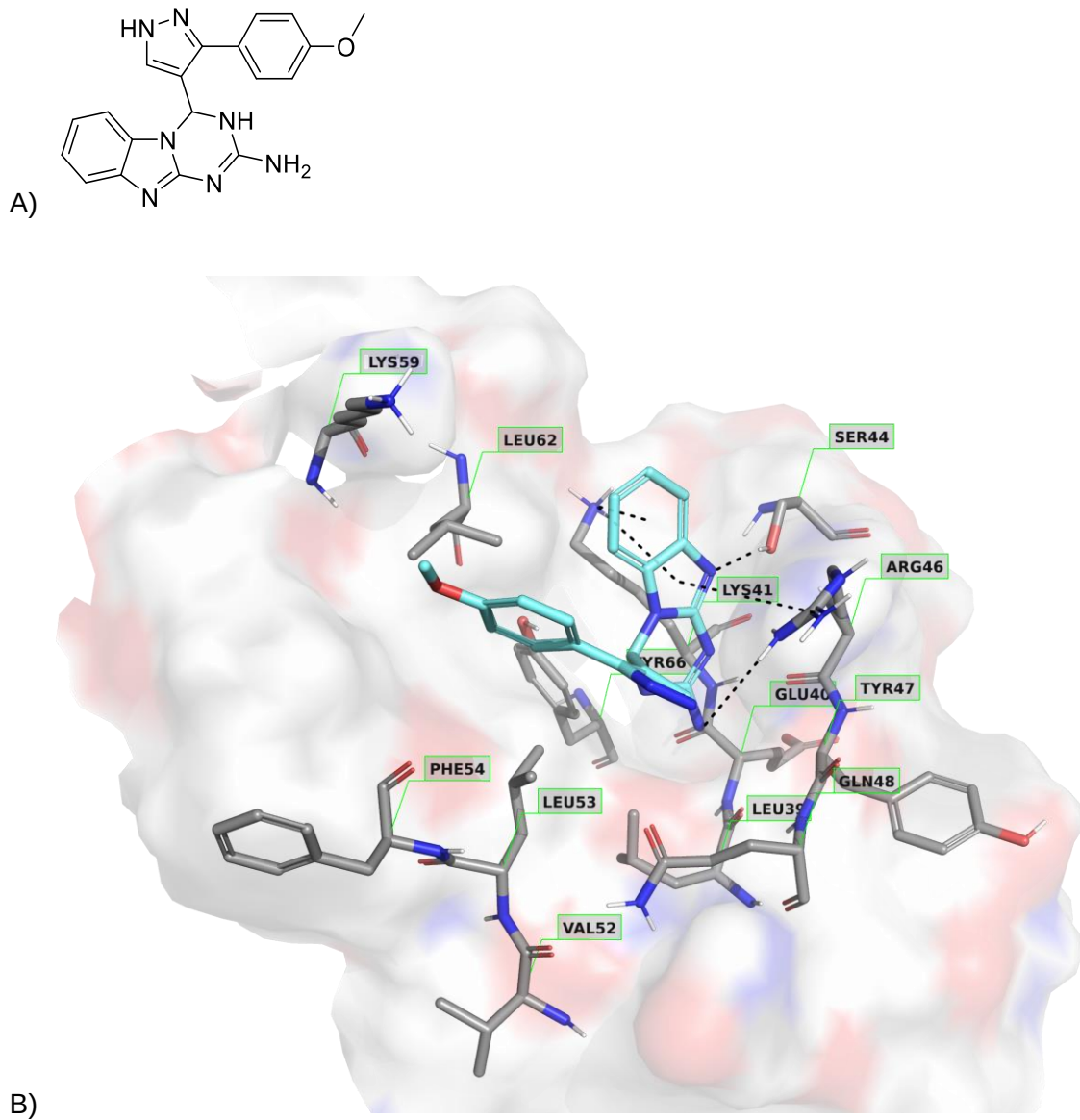
Z851137174 bileşiği kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 92,41 inhibisyon gösterirken, 100 μM konsantrasyonda ortalama % 64,37 inhibisyon göstermiştir. 70 μM konsantrasyonda ortalama % 35,05 inhibisyon verirken, 30 μM konsantrasyonda ise ortalama % 6,48 inhibisyon göstermiştir.

Z851137174 bileşiği konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 17,88 inhibisyon gösterirken, 100 μM konsantrasyonda inhibisyon göstermemiştir (% 0,45 inhibisyon).

Z851137174 bileşiği trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM ve 100 μ M (1,09) konsantrasyonlarda inhibisyon göstermemiştir.

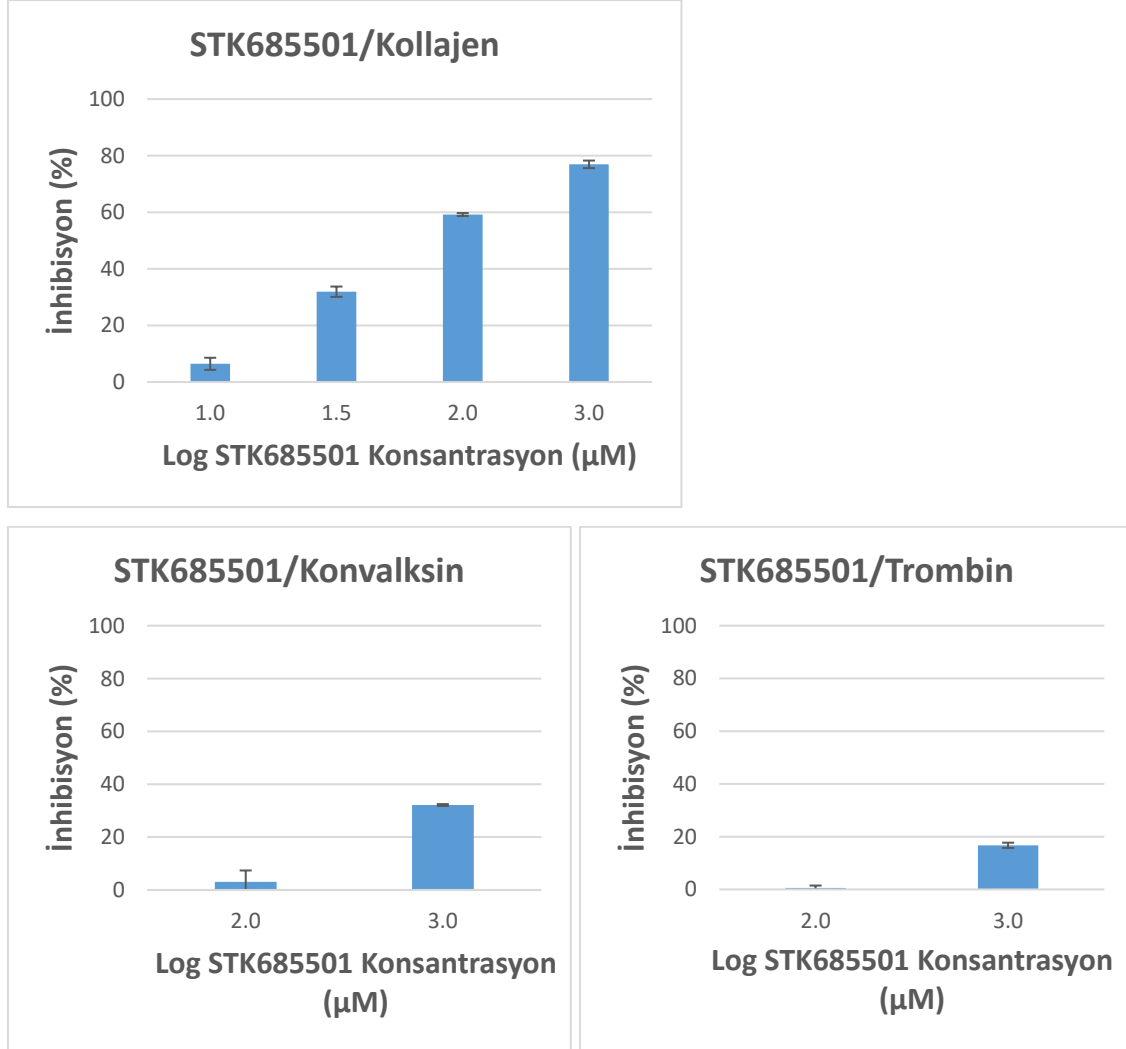
STK685501

STK685501 bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 4.26.A'da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.26.B'de verilmiştir.



Şekil 4.26. A) STK685501 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile STK685501 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

STK685501 bileşiğinin kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.27’de verilmiştir.



Şekil 4.27. STK685501 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

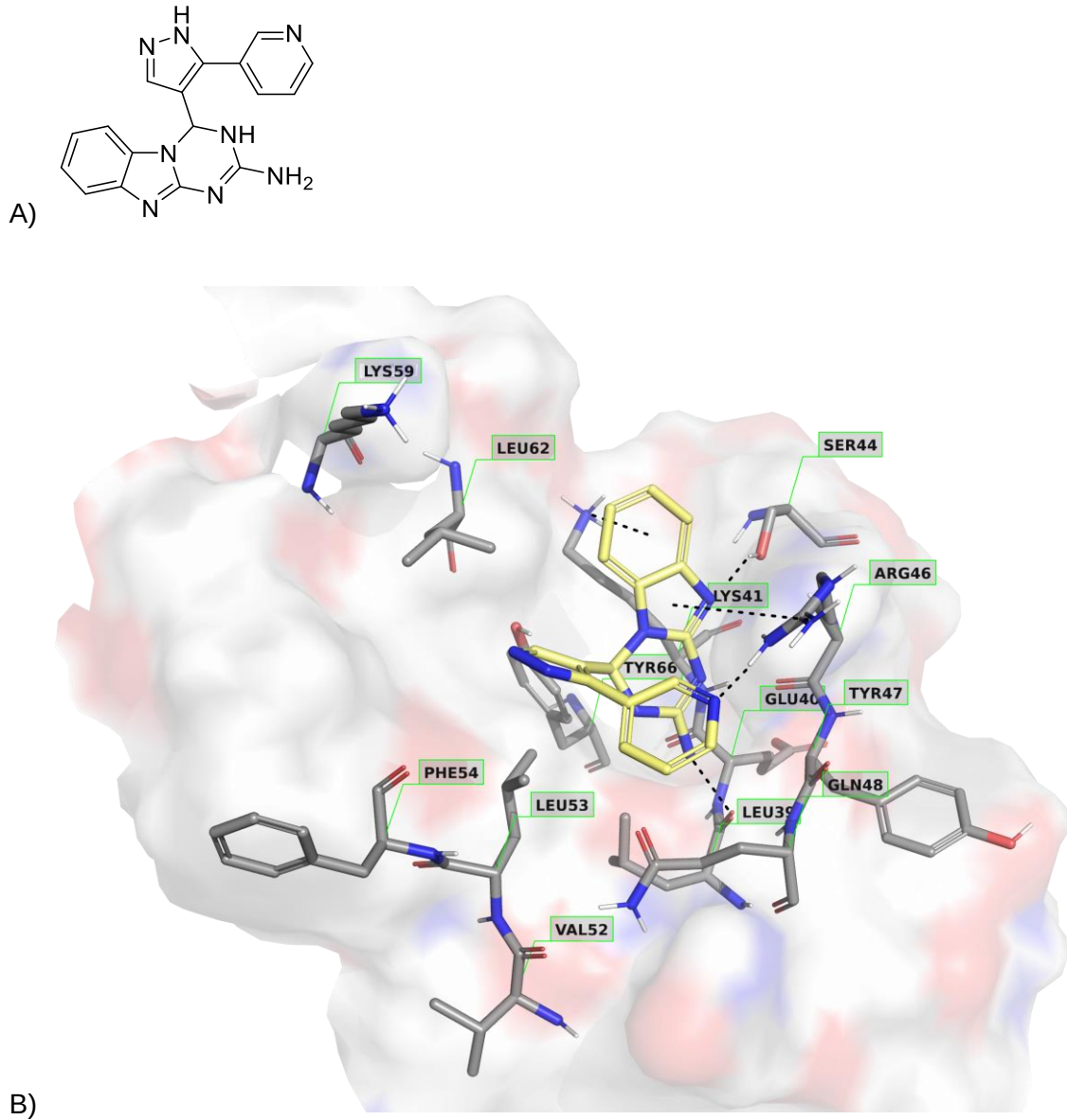
STK685501 bileşiği 1 mM konsantrasyonda kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı ortalama % 76,94 inhibisyon gösterirken, 100 μM konsantrasyonda ortalama % 59,21 inhibisyon göstermiştir. 30 μM konsantrasyonda ortalama % 31,93 inhibisyon verirken, 10 μM konsantrasyonda ortalama % 6,44 inhibisyon göstermiştir.

STK685501 bileşiği konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 32,15 inhibisyon gösterirken, 100 μM konsantrasyonunda ortalama % 3,06 inhibisyon göstermiştir.

STK685501 bileşiği trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 16,72 inhibisyon gösterirken, 100 μ M konsantrasyonda inhibisyon göstermemiştir (% 0,54 inhibisyon).

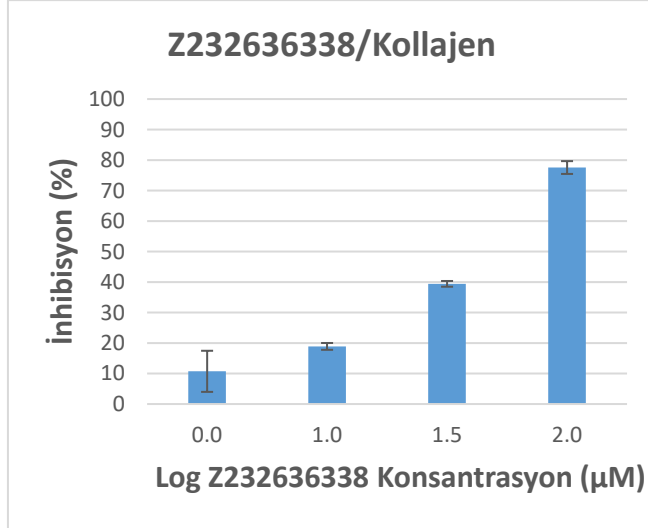
Z232636338

Z232636338 bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 4.28.A’da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.28.B’de verilmiştir.



Şekil 4.28. A) Z232636338 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Z232636338 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

Z232636338 bileşiğinin konvalksinle, trombinle ve Şekil 4.29’da verilen kollajenle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiştir.



Şekil 4.29. Z232636338 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafiği

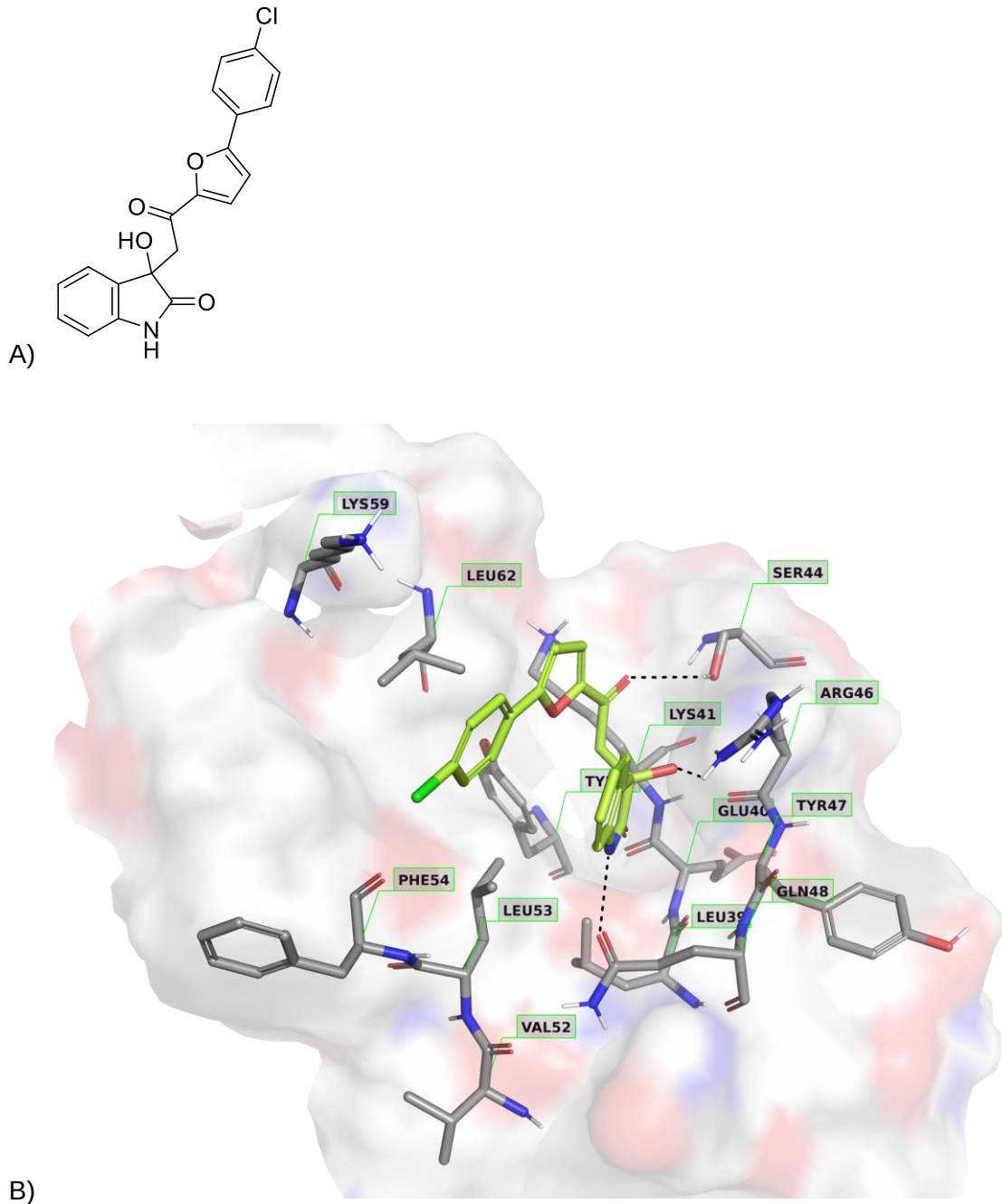
Z232636338 bileşiği kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konsantrasyonda ortalama olarak % 77,56 inhibisyon gösterirken, 30 µM konsantrasyonda ortalama % 39,42 inhibisyon, 10 µM konsantrasyonda % 18,90 inhibisyon ve 1 µM konsantrasyonda % 10,73 inhibisyon göstermiştir.

Z232636338 bileşiği konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konsantrasyonda ortalama % 5,62 inhibisyon göstermiştir.

Z232636338 bileşiği trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konsantrasyonda herhangi bir inhibisyon göstermemiştir.

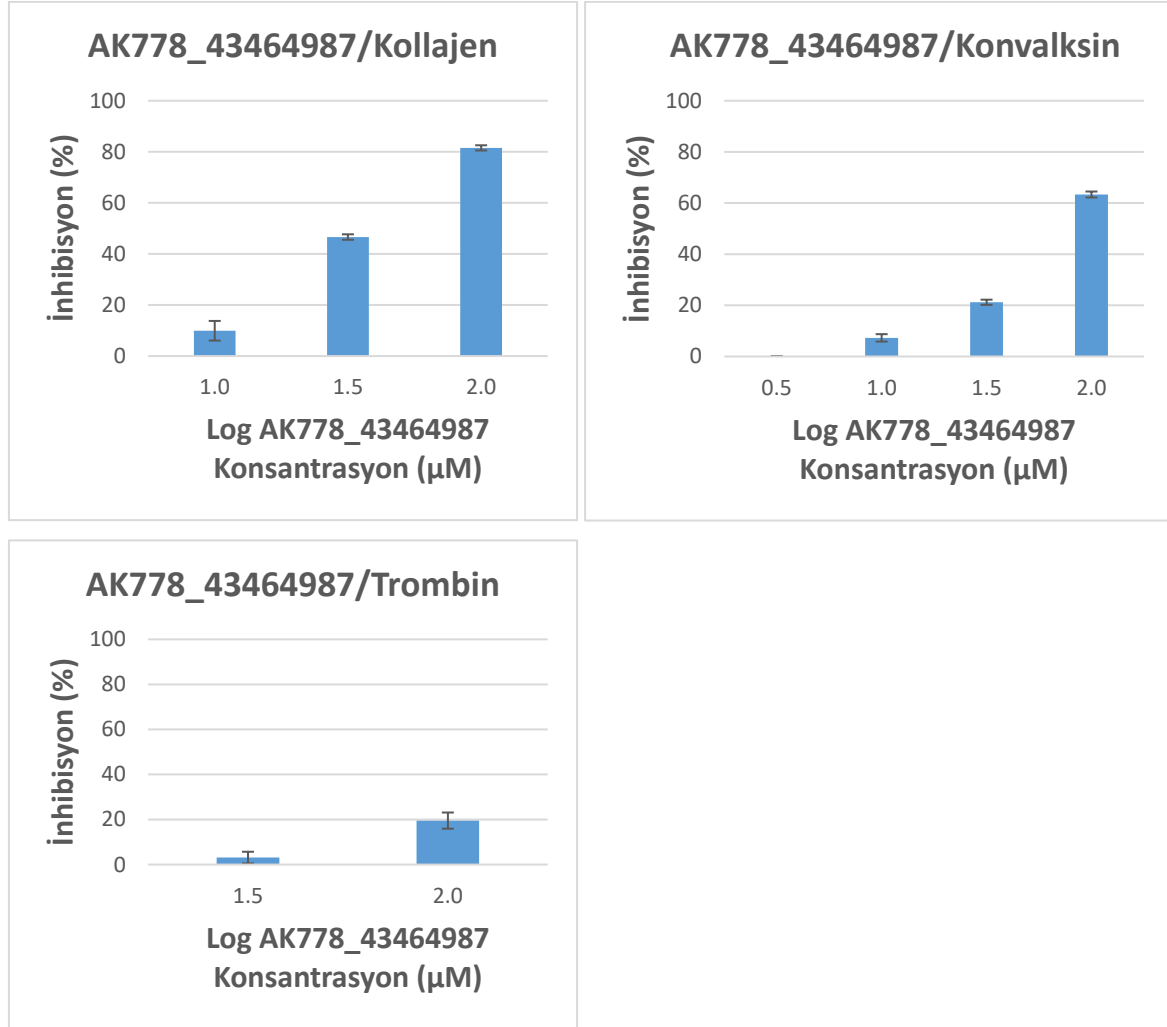
AK778/43464987

AK778/43464987 bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 4.30.A'da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.30.B'de verilmiştir.



Şekil 4.30. A) AK778/43464987 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile AK778/43464987 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

AK778/43464987 bileşiminin kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.31’de verilmiştir.



Şekil 4.31. AK778/43464987 bileşiminin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

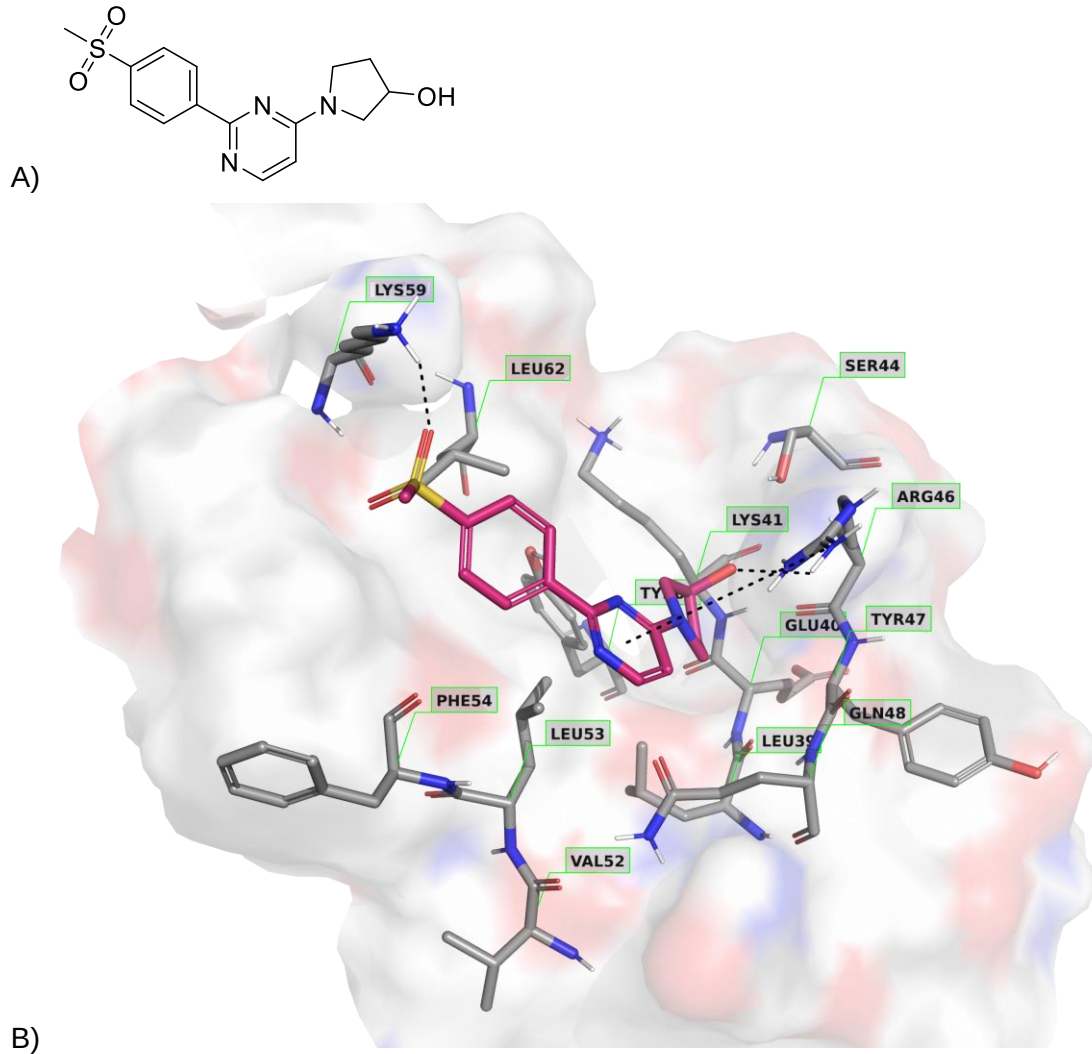
AK778/43464987 bileşiği kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konsantrasyonda ortalama % 81,54 inhibisyon gösterirken, 30 µM konsantrasyonda ortalama % 46,62 inhibisyon ve 10 µM konsantrasyonda % 9,92 inhibisyon göstermiştir.

AK778/43464987 bileşiği konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konsantrasyonda ortalama % 63,34 inhibisyon gösterirken, 30 µM konsantrasyonda ortalama % 21,20 inhibisyon, 10 µM konsantrasyonda % 7,28 inhibisyon göstermiştir. 3 µM konsantrasyonda ise herhangi bir inhibisyon göstermemiştir.

AK778/43464987 bileşiği trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 μ M konsantrasyonda ortalama % 19,51 inhibisyon ve 30 μ M konsantrasyonda ise % 3,10 inhibisyon göstermiştir.

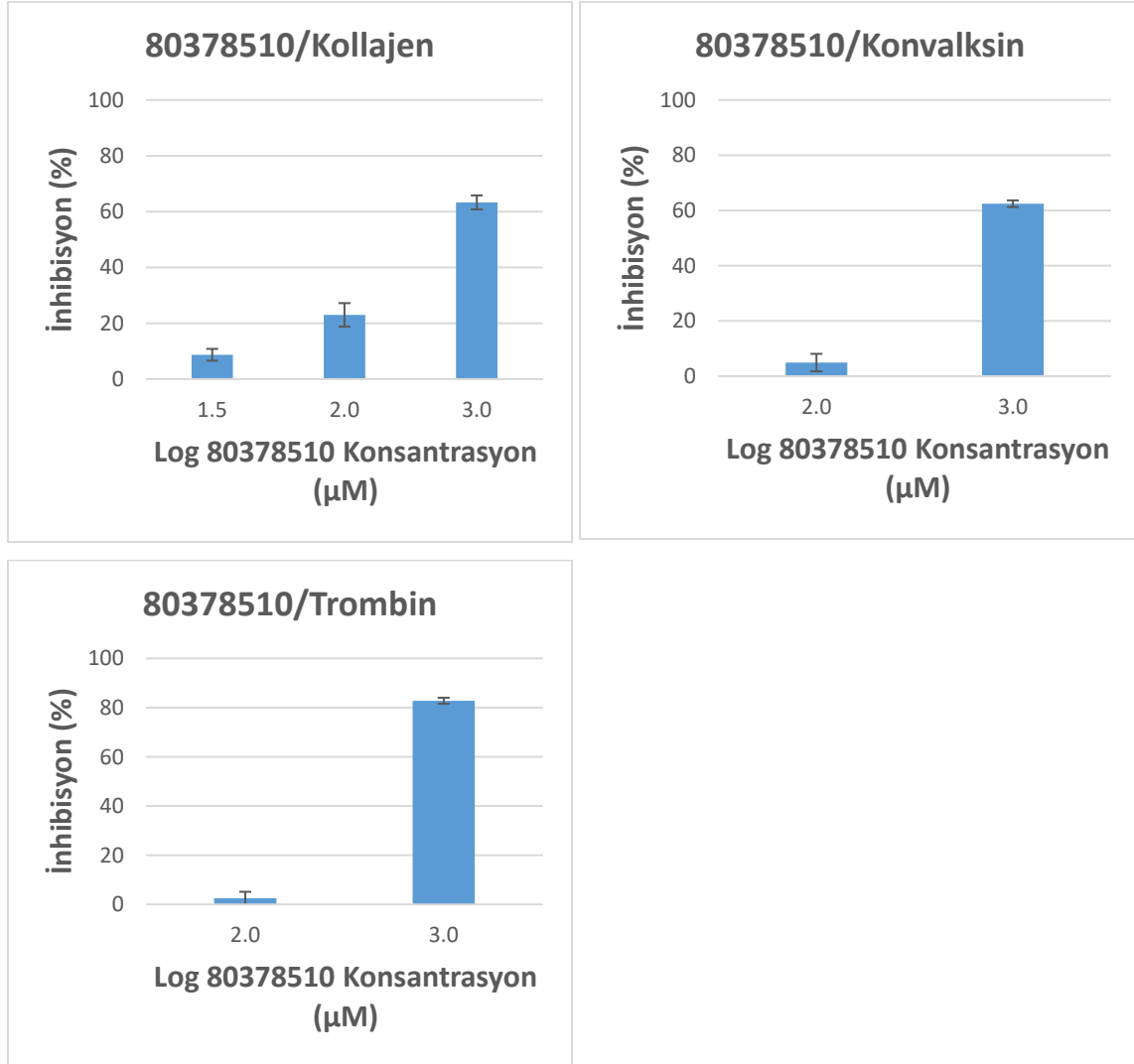
80378510

80378510 bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 4.32.A'da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.32.B'de verilmiştir.



Şekil 4.32. A) 80378510 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile 80378510 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

80378510 bileşiğinin kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.33'te verilmiştir.



Şekil 4.33. 80378510 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

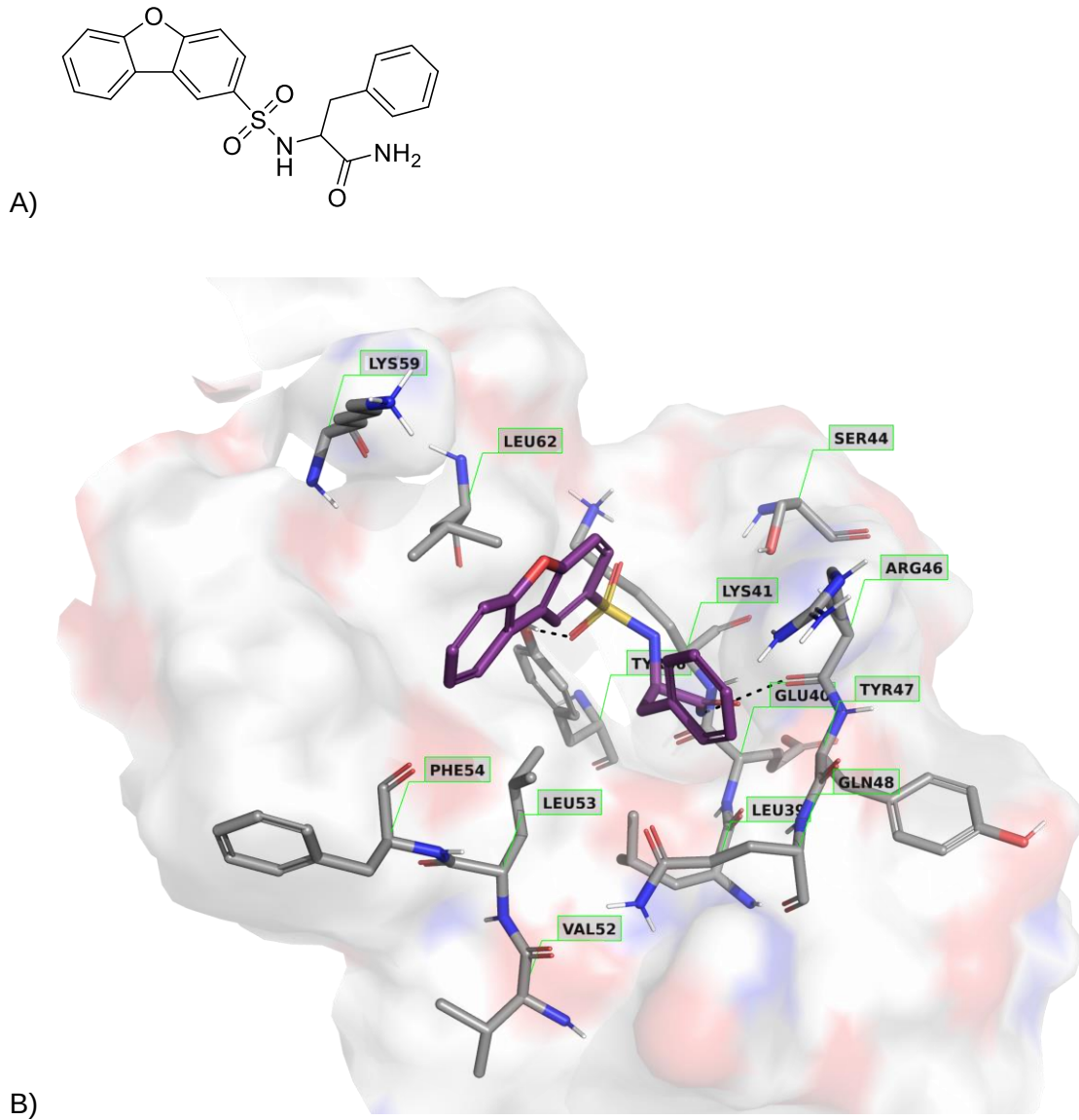
80378510 bileşiği kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 63,31 inhibisyon gösterirken, 100 µM konsantrasyonda ortalama % 23,01 inhibisyon ve 30 µM konsantrasyonda ise ortalama % 8,71 inhibisyon göstermiştir.

80378510 bileşiği konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 62,45 inhibisyon gösterirken, 100 µM konsantrasyonda ortalama % 4,93 inhibisyon göstermiştir.

80378510 bileşiği trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 82,80 inhibisyon gösterirken, 100 μ M konsantrasyonda ortalama % 2,52 inhibisyon göstermiştir.

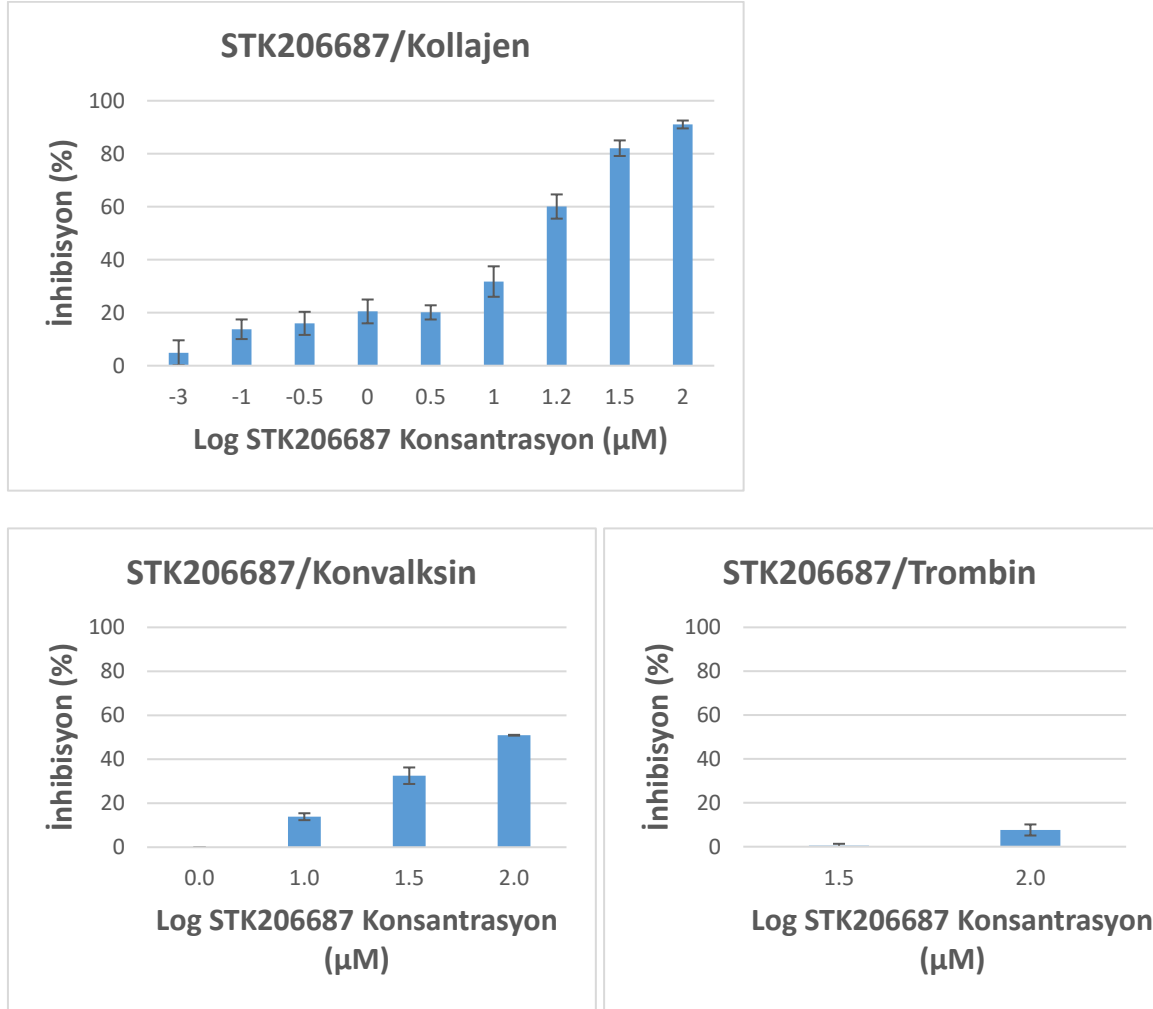
STK206687

STK206687 bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 4.34.A'da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.34.B'de verilmiştir.



Şekil 4.34. A) STK206687 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile STK206687 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

STK206687 bileşiğinin kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.35'te verilmiştir.



Şekil 4.35. STK206687 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

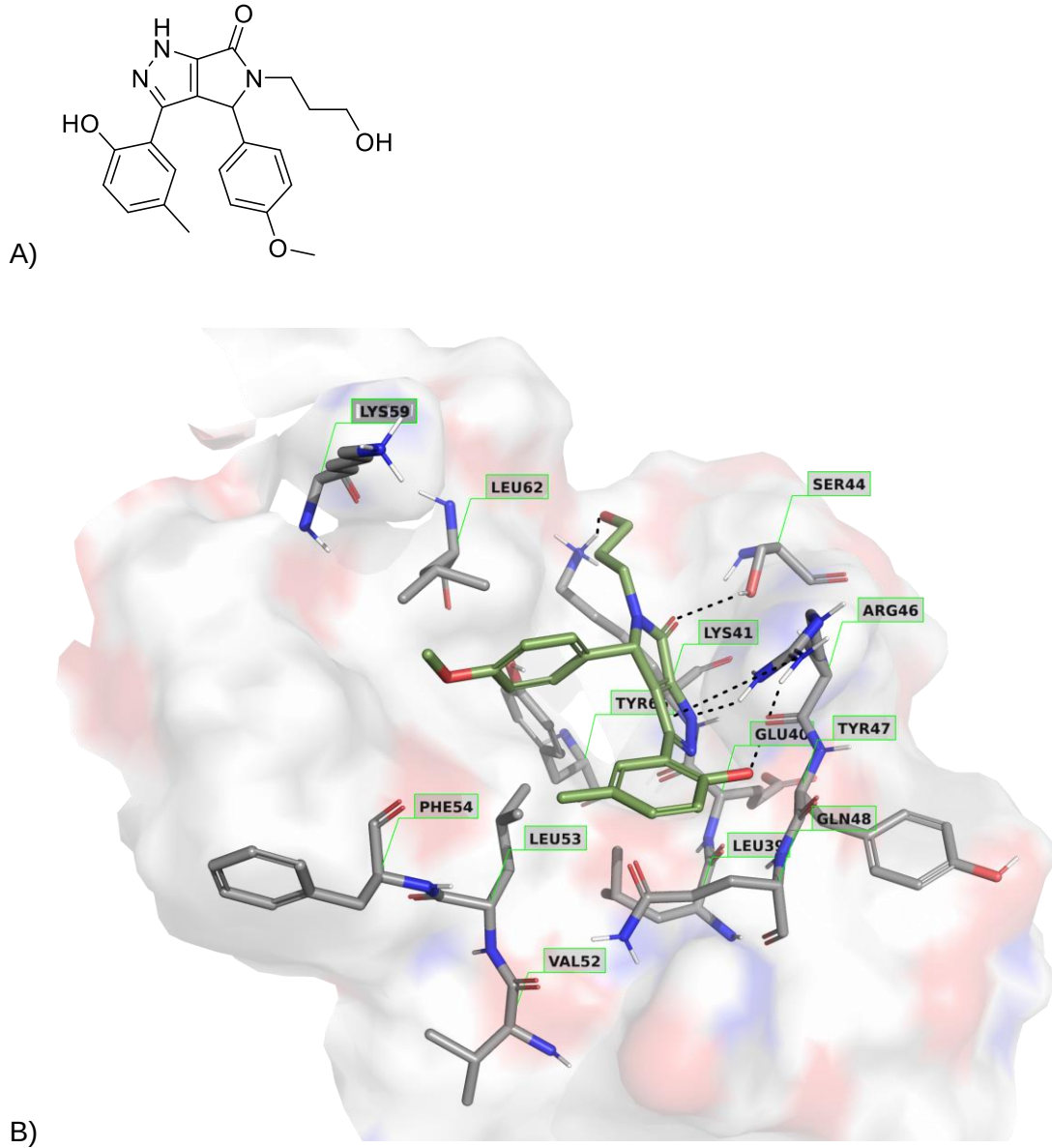
STK206687 bileşiği kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 μM konsantrasyonda ortalama % 91,04 inhibisyon gösterirken, 30 μM konsantrasyonda ortalama % 82,09 inhibisyon, 15 μM konsantrasyonda % 60,07 inhibisyon, 10 μM konsantrasyonda % 31,76 inhibisyon, 3 μM konsantrasyonda % 20,12 inhibisyon, 1 μM konsantrasyonda % 20,48 inhibisyon, 0,3 μM konsantrasyonda % 15,98 inhibisyon, 0,1 μM konsantrasyonda % 13,75 ve 0,001 μM konsantrasyonda ise % 4,87 inhibisyon göstermiştir.

STK206687 bileşiği konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konsantrasyonda ortalama % 50,93 inhibisyon, 30 µM konsantrasyonda % 32,52 inhibisyon ve 10 µM konsantrasyonda % 13,88 inhibisyon gösterirken, 1 µM konsantrasyonda herhangi bir inhibisyon göstermemiştir.

STK206687 bileşiği trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konsantrasyonda % 7,61 inhibisyon gösterirken, 30 µM konsantrasyonda ise inhibisyon göstermemiştir (% 0,48 inhibisyon).

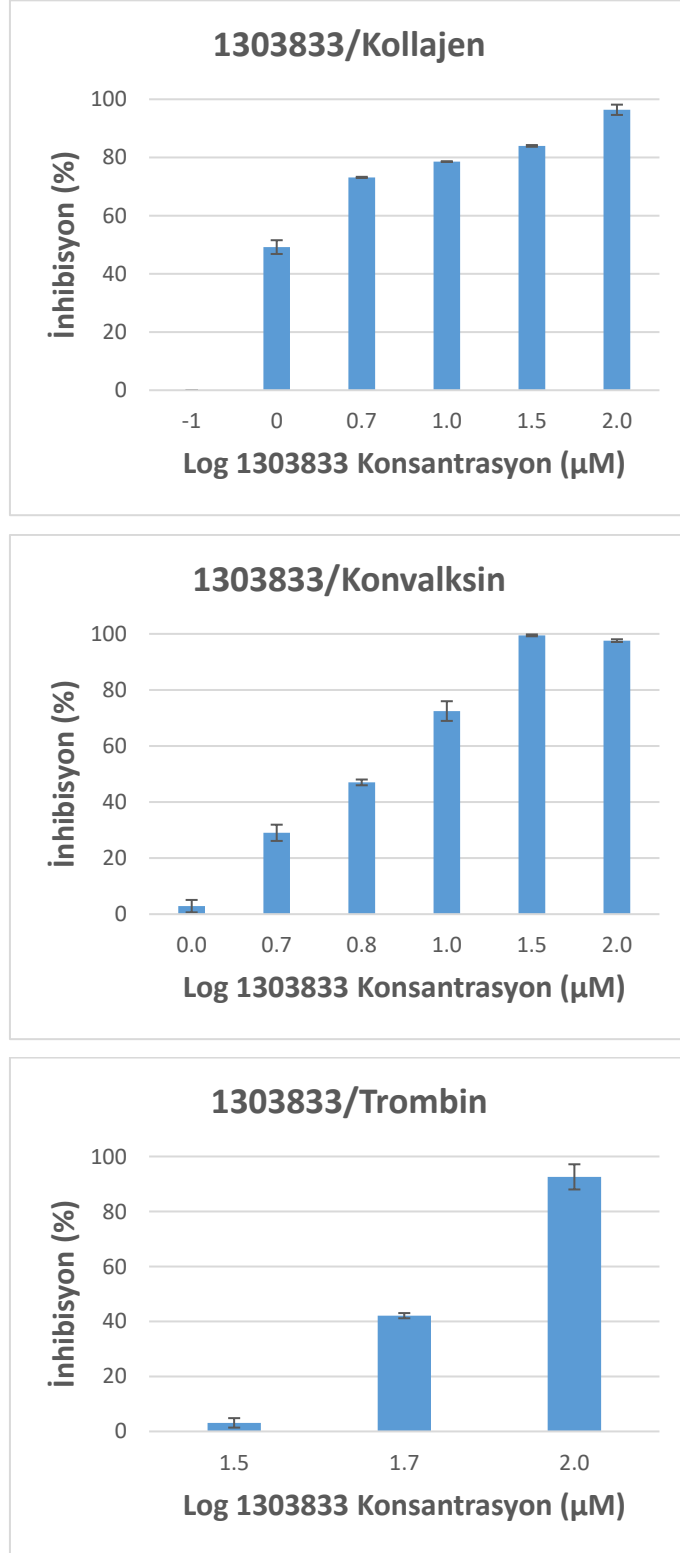
1303833

1303833 bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 4.36.A’da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.36.B’de verilmiştir.



Şekil 4.36. A) 1303833 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile 1303833 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

1303833 bileşiminin kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.37’de verilmiştir.



Şekil 4.37. 1303833 bileşiminin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

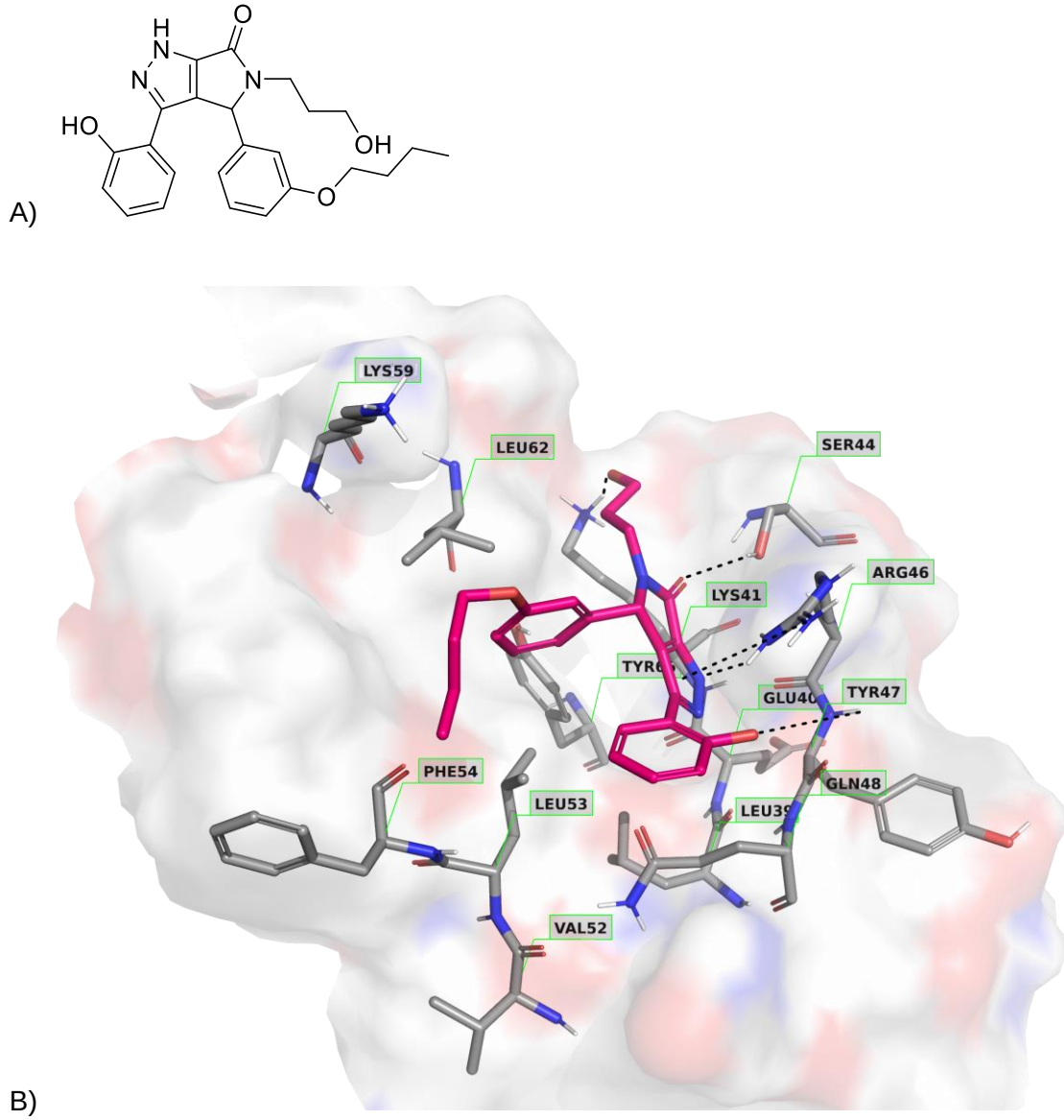
1303833 bileşiği kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 μ M konsantrasyonda ortalama % 96,39 inhibisyon gösterirken, 30 μ M konsantrasyonda ortalama % 83,98 inhibisyon, 10 μ M konsantrasyonda ortalama % 78,58 inhibisyon, 5 μ M konsantrasyonda % 73,15 inhibisyon ve 1 μ M konsantrasyonda ise % 49,20 göstermiştir. Ancak 0,1 μ M konsantrasyonda herhangi bir inhibisyon göstermemiştir.

1303833 bileşiği konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 μ M konsantrasyonda ortalama % 97,60 inhibisyon gösterirken, 30 μ M konsantrasyonda % 99,47 inhibisyon göstermiştir. 10 μ M konsantrasyonda ortalama % 72,47 inhibisyon verirken, 7 μ M konsantrasyonda ortalama % 47,02 inhibisyon, 5 μ M konsantrasyonda % 29,03 inhibisyon ve 1 μ M konsantrasyonda ise % 2,86 inhibisyon göstermiştir.

1303833 bileşiği trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 μ M konsantrasyonda ortalama % 92,59 inhibisyon gösterirken, 50 μ M konsantrasyonda % 42,11 ve 30 μ M konsantrasyonda % 3,11 inhibisyon göstermiştir.

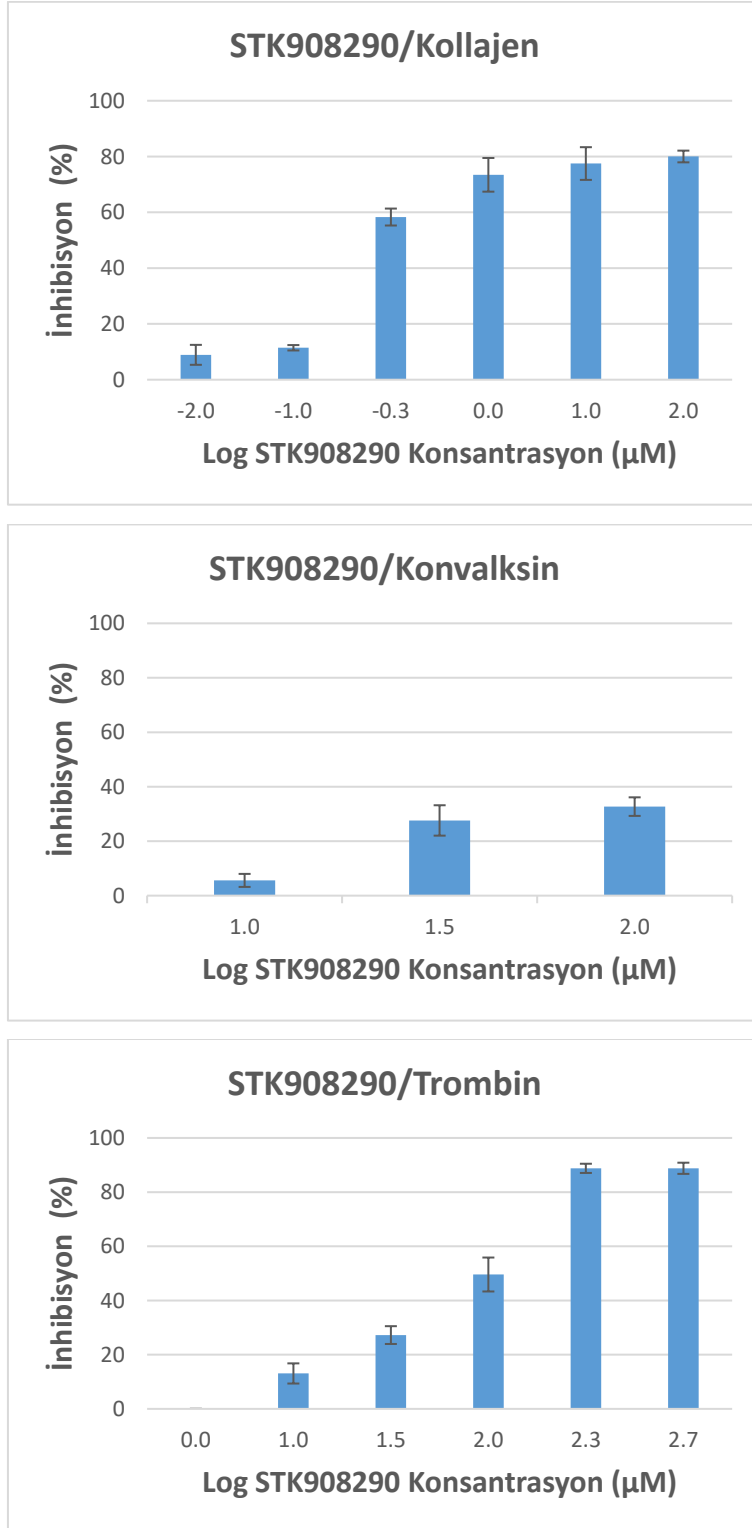
STK908290

STK908290 bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 4.38.A’da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.38.B’de verilmiştir.



Şekil 4.38. A) STK908290 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile STK908290 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

STK908290 bileşiğinin kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.39'da verilmiştir.



Şekil 4.39. STK908290 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

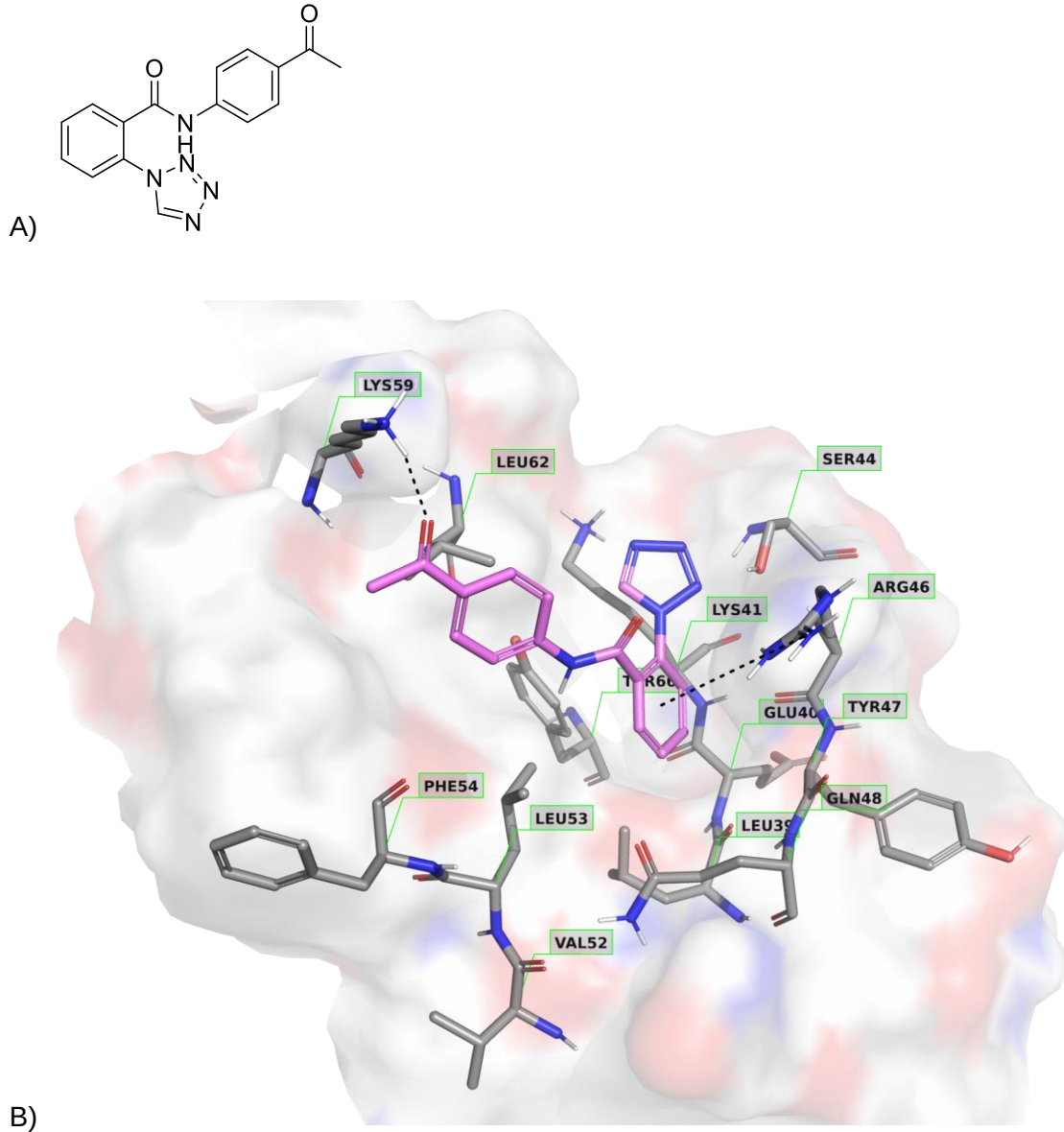
STK908290 bileşiği kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konsantrasyonda ortalama % 80,02 inhibisyon, 10 µM konsantrasyonda % 77,49 inhibisyon, 1 µM konsantrasyonda % 73,45 inhibisyon, 0,5 µM konsantrasyonda % 58,31 inhibisyon, 0,1 µM konsantrasyonda % 11,45 inhibisyon ve 0,01 µM konsantrasyonda ise % 8,91 inhibisyon göstermiştir.

STK908290 bileşiği konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konsantrasyonda ortalama % 32,69 inhibisyon verirken, 30 µM konsantrasyonda ortalama % 27,62 ve 10 µM konsantrasyonda ise % 5,59 inhibisyon göstermiştir.

STK908290 bileşiği trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 500 µM konsantrasyonda ortalama % 88,80 inhibisyon, 200 µM konsantrasyonda ortalama % 88,78 inhibisyon, 100 µM konsantrasyonda ortalama % 49,60 inhibisyon, 30 µM konsantrasyonda % 27,24 inhibisyon, 10 µM konsantrasyonda % 13,08 inhibisyon gösterirken, 1 µM konsantrasyonda hiçbir inhibisyon göstermemiştir.

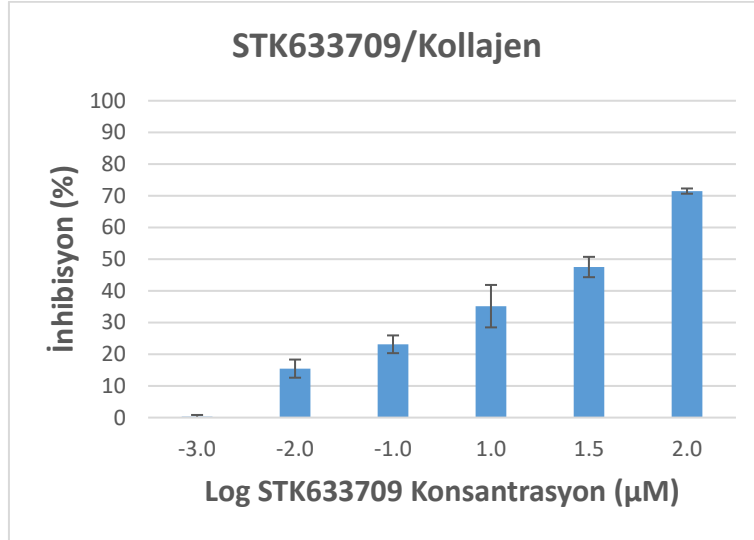
STK633709

STK633709 bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 4.40.A’da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.40.B’de verilmiştir.



Şekil 4.40. A) STK633709 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile STK633709 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

STK633709 bileşiminin konvalksinle, trombinle ve Şekil 4.41’de verilen kollajenle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiştir.



Şekil 4.41. STK633709 bileşiminin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafiği

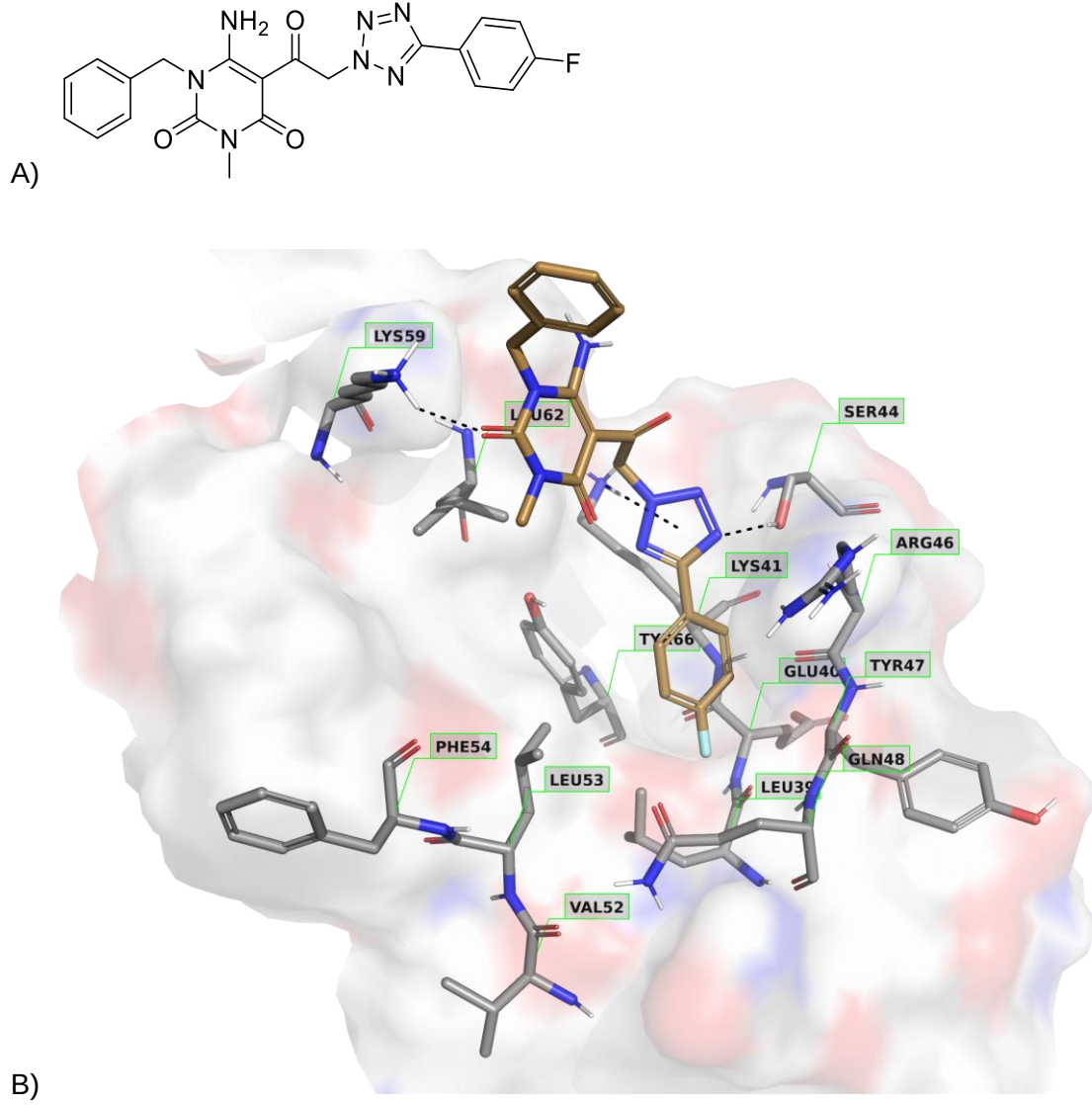
STK633709 bileşiği kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konsantrasyonda ortalama % 71,49 inhibisyon gösterirken, 30 µM konsantrasyonda ortalama % 47,52 inhibisyon, 10 µM konsantrasyonda % 35,17 inhibisyon, 0,1 µM konsantrasyonda % 23,13 inhibisyon, 0,01 µM konsantrasyonda % 15,45 inhibisyon ve 1 nM konsantrasyonda % 0,30 inhibisyon göstermiştir.

STK633709 bileşiği konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konsantrasyonda % 2,52 inhibisyon göstermiştir.

STK633709 bileşiği trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konsantrasyonlarda hiçbir inhibisyon göstermemiştir.

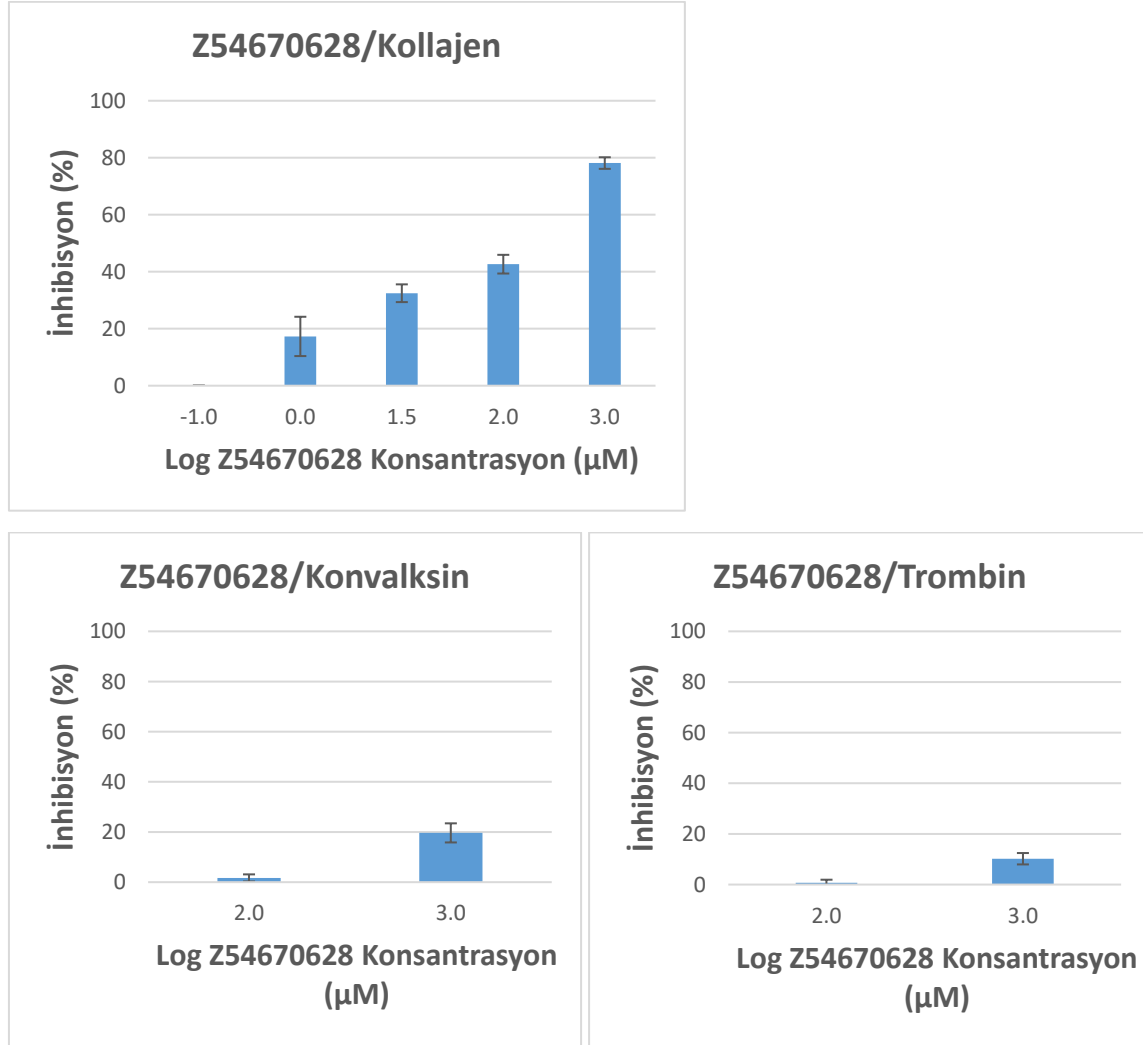
Z54670628

Z54670628 bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 4.42.A’da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.42.B’de verilmiştir.



Şekil 4.42. A) Z54670628 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile Z54670628 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

Z54670628 bileşiğinin kollajen, konvalksin ve trombinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiş ve Şekil 4.43'te verilmiştir.



Şekil 4.43. Z54670628 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

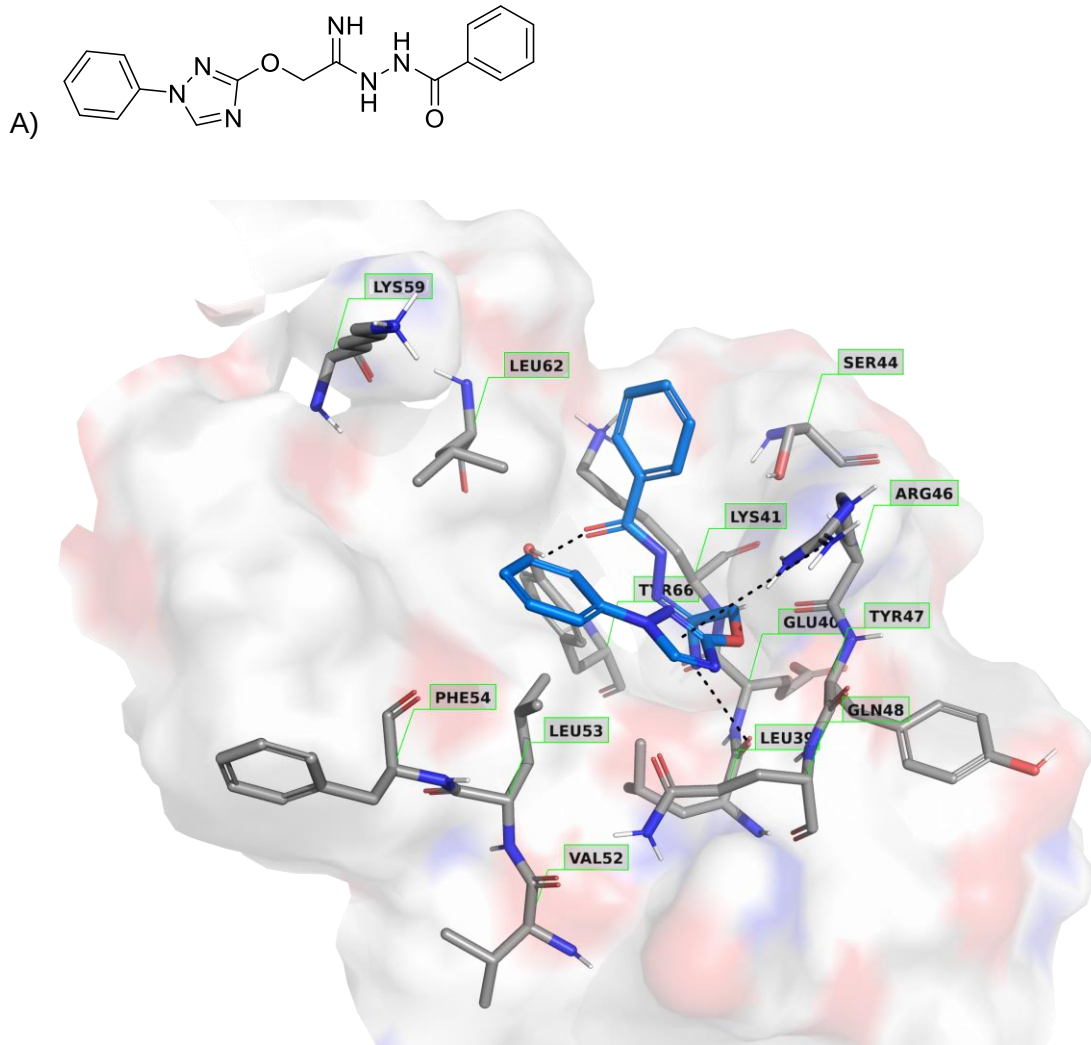
Z54670628 bileşiği kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 78,14 inhibisyon gösterirken, 100 μM konsantrasyonda ortalama % 42,65 inhibisyon göstermiştir. 30 μM konsantrasyonda ortalama % 32,45 inhibisyon verirken, 1 μM konsantrasyonda ise ortalama % 17,30 inhibisyon göstermiştir. Ancak 0,1 μM konsantrasyonda herhangi bir inhibisyon göstermemiştir.

Z54670628 bileşiği konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 19,64 inhibisyon ve 100 μM konsantrasyonda ise % 1,69 inhibisyon göstermiştir.

Z54670628 bileşiği trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda ortalama % 10,20 inhibisyon gösterirken, 100 μ M konsantrasyonda inhibisyon göstermemiştir (% 0,70 inhibisyon).

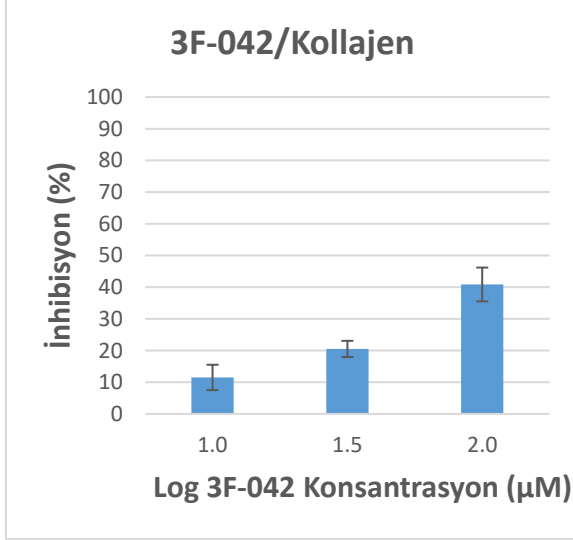
3F-042

3F-042 bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 4.44.A'da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.44.B'de verilmiştir.



Şekil 4.44. A) 3F-042 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile 3F-042 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

3F-042 bileşiğinin konvalksinle, trombinle ve Şekil 4.45'te verilen kollajenle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiştir.



Şekil 4.45. 3F-042 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafiği

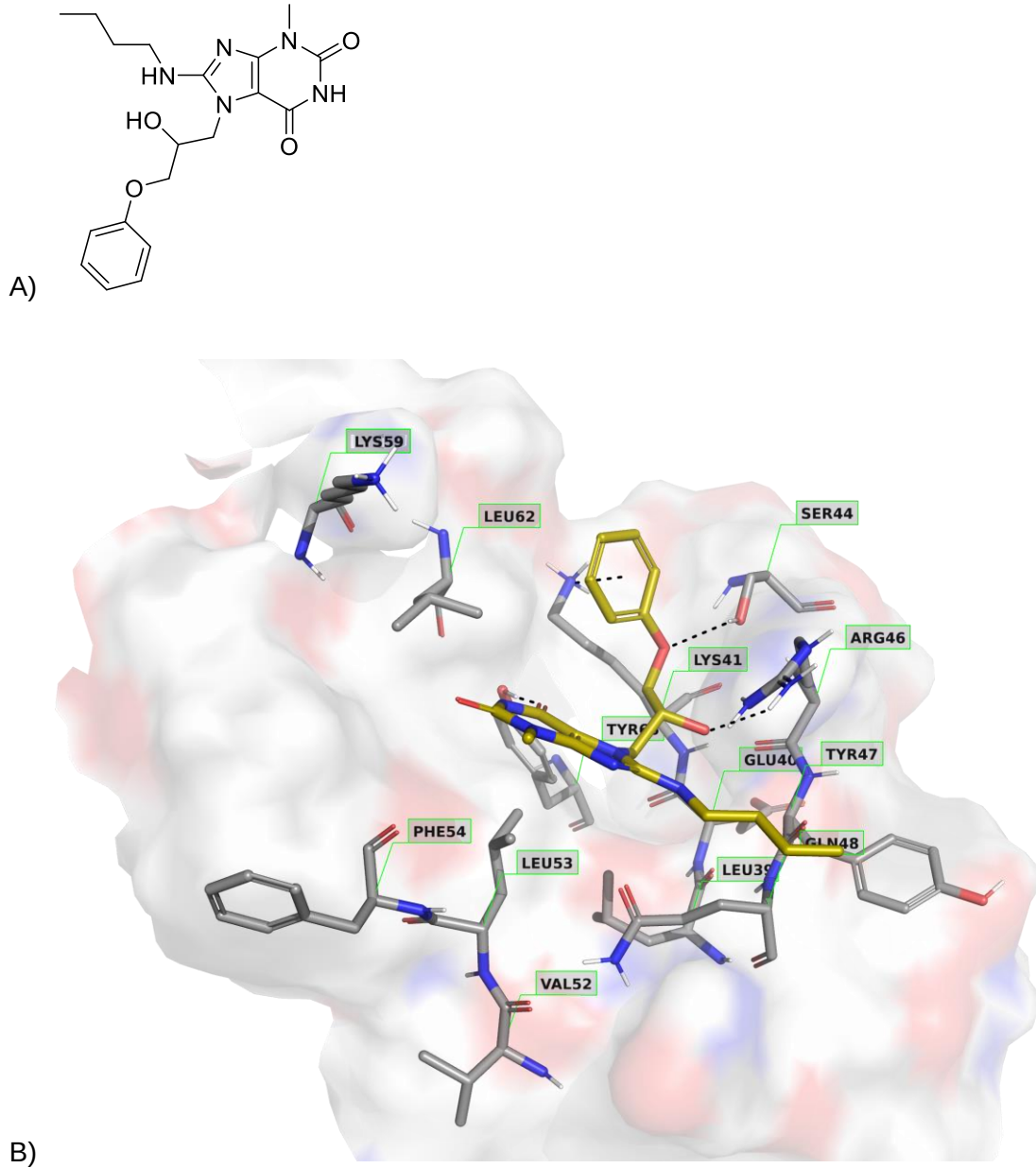
3F-042 bileşiği kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konstrasyonda ortalama % 40,86 inhibisyon gösterirken, 30 µM konstrasyonda ortalama % 20,52 inhibisyon ve 10 µM konstrasyonda ise ortalama % 11,51 inhibisyon göstermiştir.

3F-042 bileşiği konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konstrasyonda ortalama % 4,39 inhibisyon göstermiştir.

3F-042 bileşiği trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konstrasyonda ortalama % 7,66 inhibisyon göstermiştir.

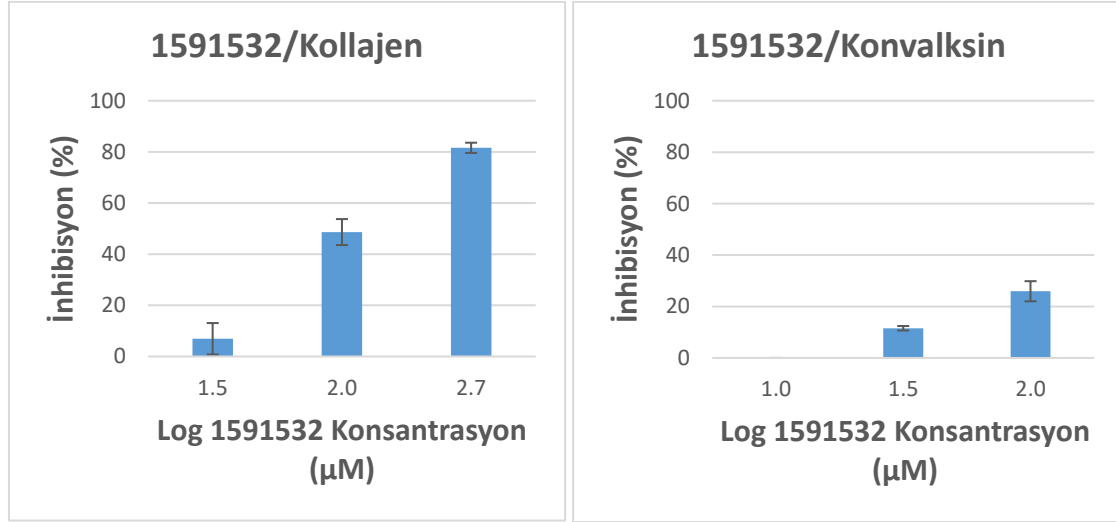
1591532

1591532 bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 4.46.A'da ve GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile yapısal etkileşimleri Şekil 4.46.B'de verilmiştir.



Şekil 4.46. A) 1591532 bileşiğinin kimyasal yapısı. B) GPVI reseptörünün bağlanma bölgesi ile 1591532 bileşiğinin gerçekleştirdiği yapısal etkileşimler

1591532 bileşiğinin trombinle, Şekil 4.47’de verilen kollajenle ve konvalksinle indüklenen platelet agregasyonu üzerine olan etkileri incelenmiştir.



Şekil 4.47. 1591532 bileşiğinin agonist indüklü platelet agregasyonuna karşı verdiği inhibisyon grafikleri

1591532 bileşiği kollajen indüklü platelet agregasyonuna karşı 500 µM konsantrasyonda ortalama % 81,60 inhibisyon gösterirken, 100 µM konsantrasyonda ortalama % 48,65 inhibisyon ve 30 µM konsantrasyonda % 6,93 inhibisyon göstermiştir.

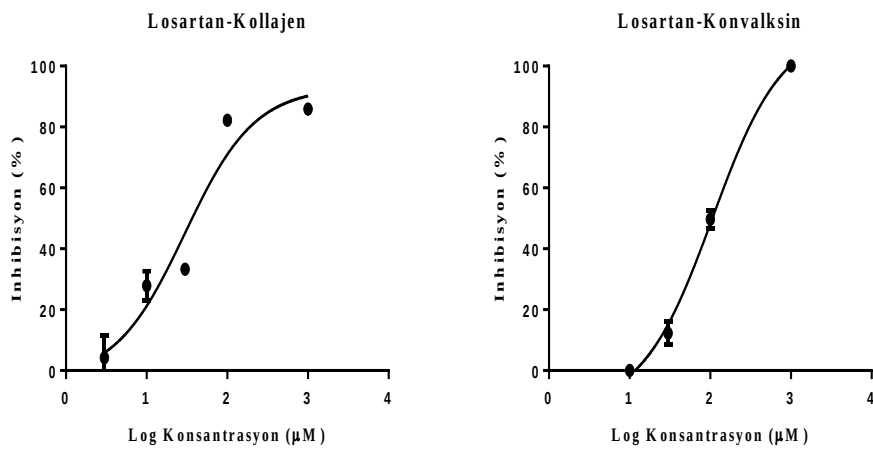
1591532 bileşiği konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konsantrasyonda ortalama % 25,94 inhibisyon gösterirken, 30 µM konsantrasyonda ortalama % 11,54 inhibisyon göstermiştir. Ancak, 10 µM konsantrasyonda herhangi bir inhibisyon göstermemiştir.

1591532 bileşiği trombin indüklü platelet agregasyonuna karşı 100 µM konsantrasyonda inhibisyon göstermemiştir (% 0,99 inhibisyon).

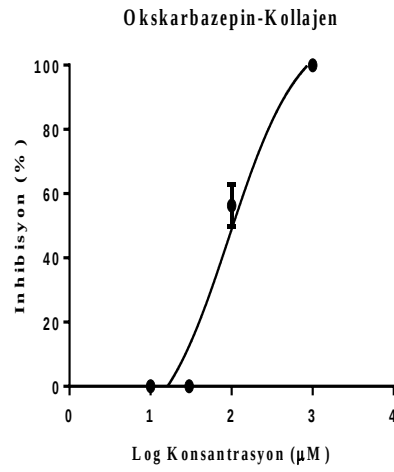
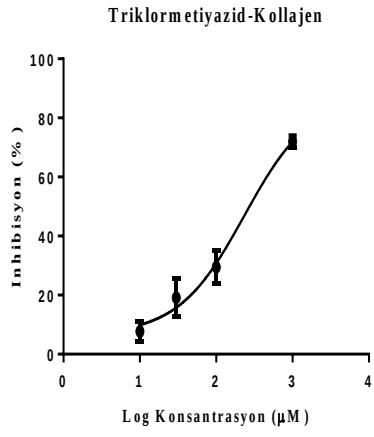
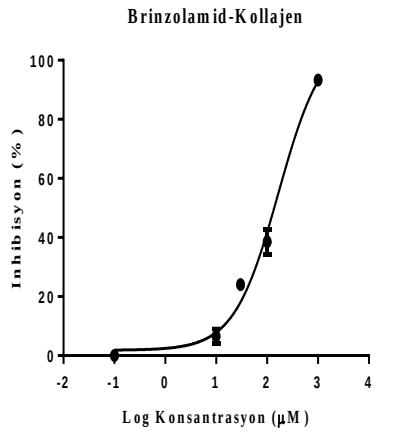
FDA onaylı ilaçlardan ve kimyasal veri tabanı Molport'dan seçilen ve kollajen, konvalksin ve trombin ile indüklenen platelet agregasyonu üzerine inhibitör etkileri değerlendirilen bileşiklerden 100 μM 'da güçlü inhibitör etkisi gözlenenlerin IC_{50} değerlerini belirlemek üzere yapılan çalışma sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.4'te ve Şekil 4.48.(devam) FDA onaylı ilaçların IC_{50} grafikleri Çizelge 4.5'te, grafikler ise Şekil 4.48'de ve Şekil 4.49'da verilmiştir.

Çizelge 4.4. FDA onaylı ilaçların IC_{50} değerleri

	IC_{50} değeri (μM)		
	Kollajen	Konvalksin	Trombin
Losartan	29,76	106,0	-
Brinzolamid	165,9	-	-
Triklormetiyazid	233,4	-	-
Okskarbazepin	93,61	-	-



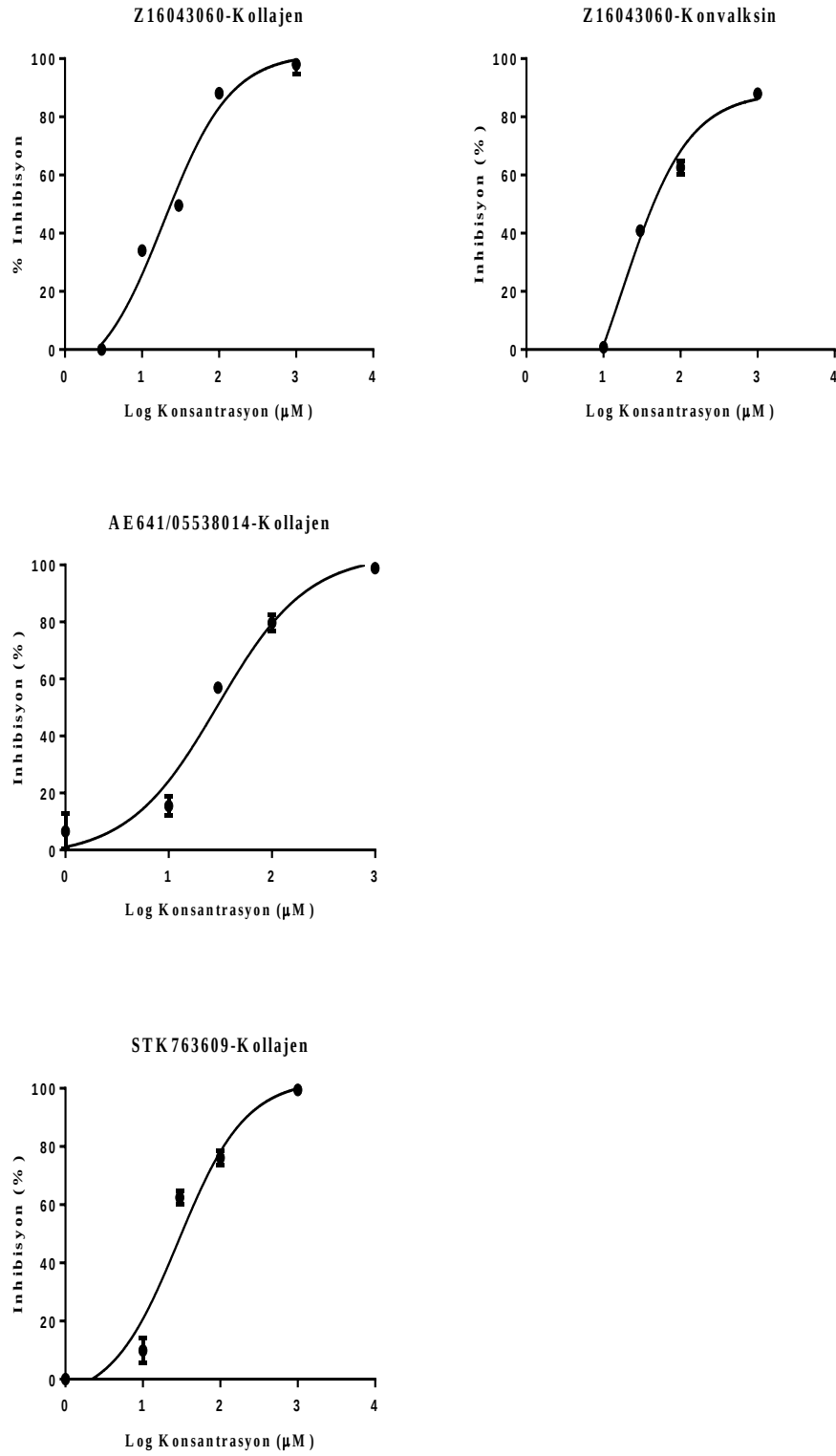
Şekil 4.48. FDA onaylı ilaçların IC_{50} grafikleri



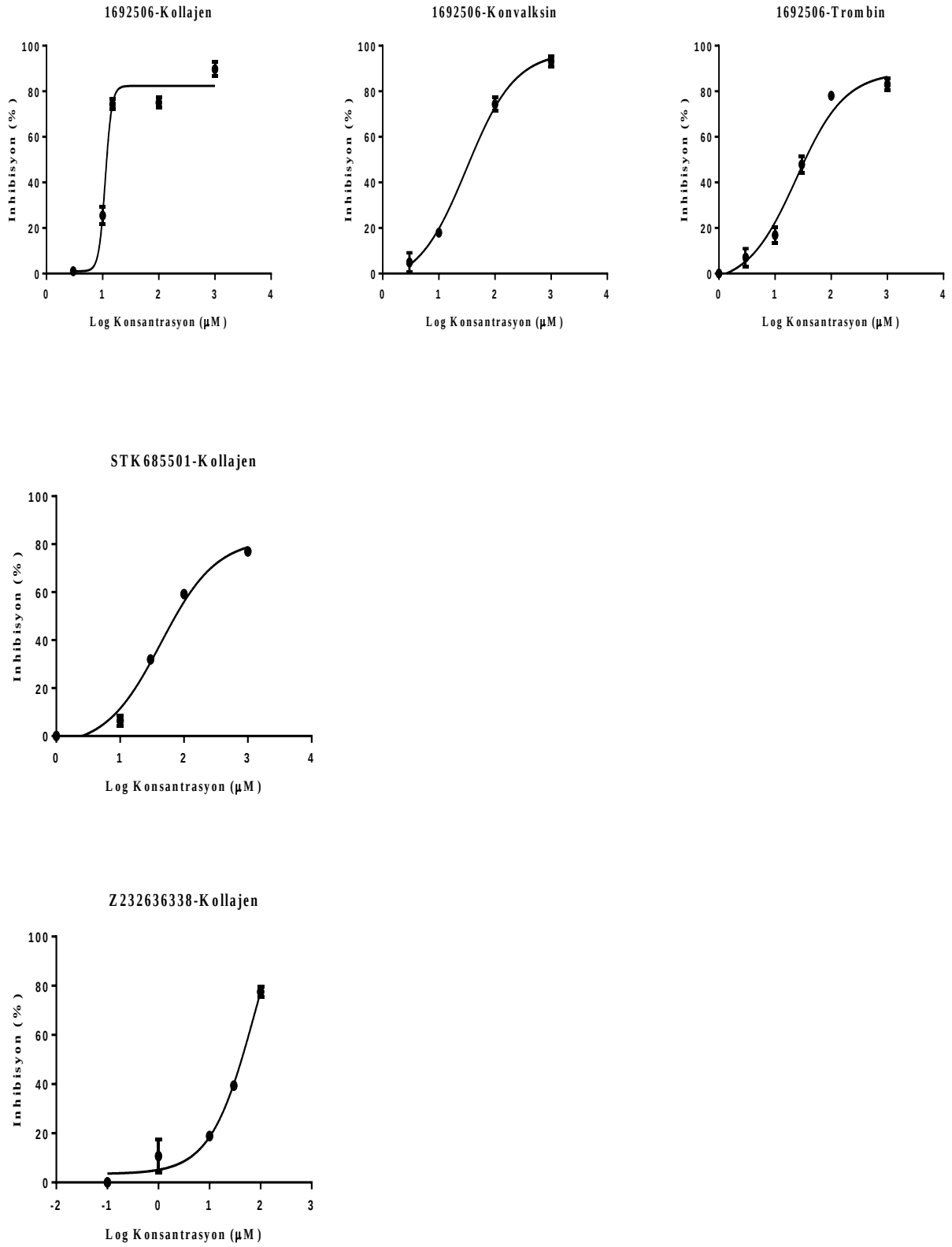
Şekil 4.48.(devam) FDA onaylı ilaçların IC_{50} grafikleri

Çizelge 4.5. Kimyasal veri tabanı Molport bileşiklerinin IC₅₀ değerleri

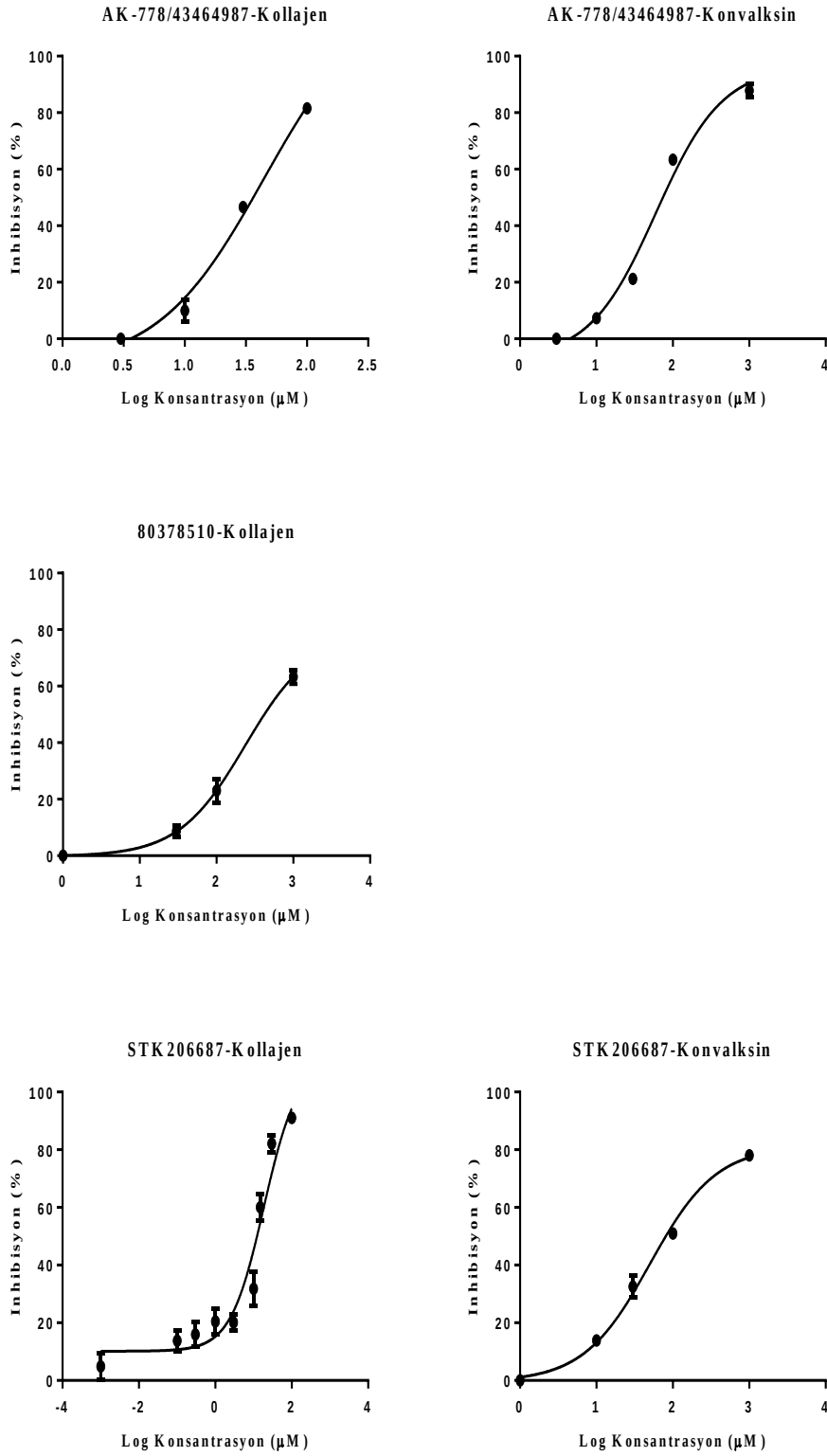
	IC ₅₀ değeri (µM)		
	Kollajen	Konvalksin	Trombin
Z16043060	19,38	17,18	-
AE641/05538014	29,86	-	-
STK763609	28,90	-	-
1692506	11,19	31,27	24,04
Z851137174	80,51	-	-
STK685501	43,55	-	-
Z232636338	77,19	-	-
AK778/43464987	44,15	60,14	-
80378510	236,6	-	-
STK206687	18,52	49,98	-
1303833	1,01	7,24	51,74
STK908290	0,35	195,2	81,38
STK633709	25,94	-	-
Z54670628	87,97	-	-
1591532	150,6	-	-



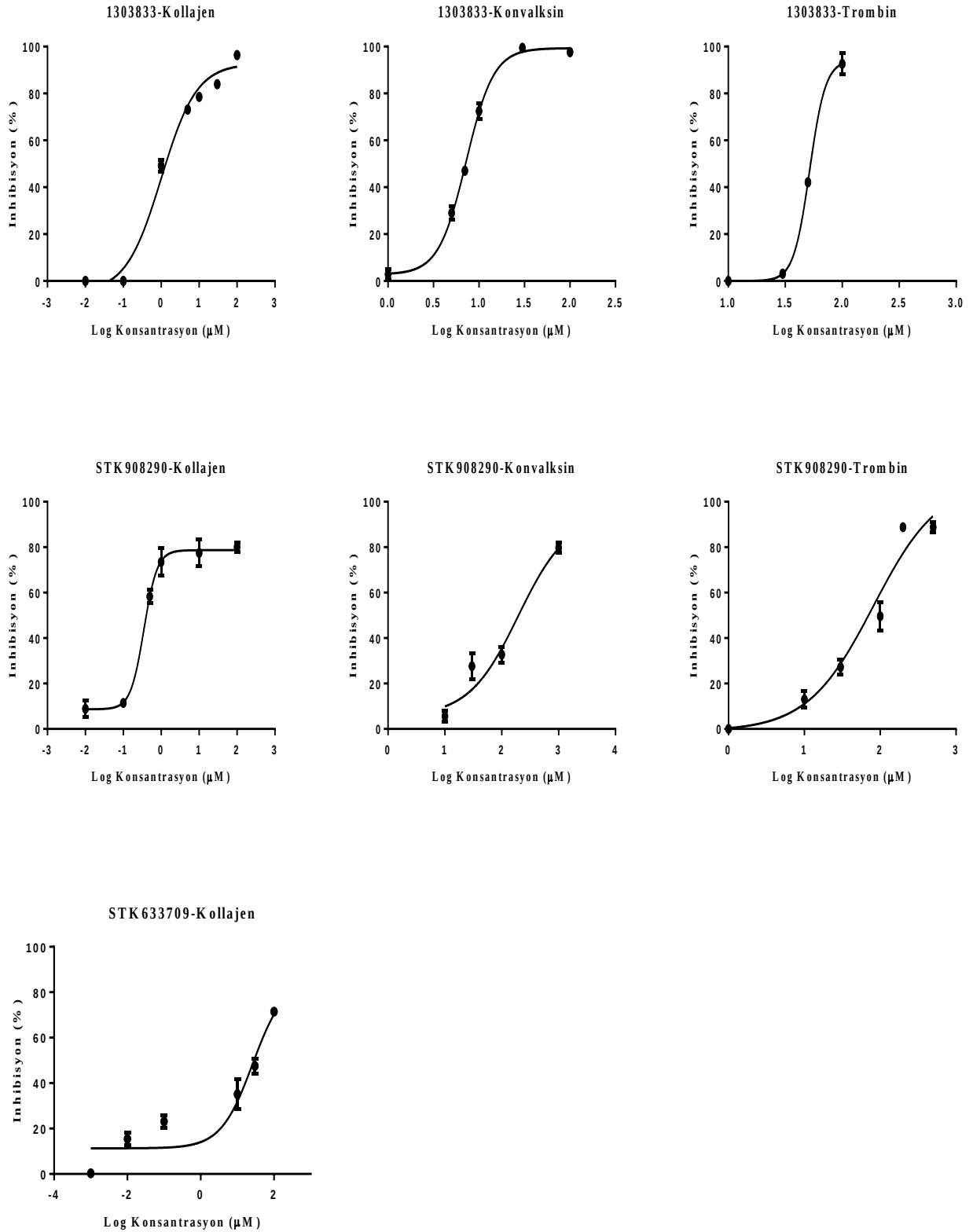
Şekil 4.49. Kimyasal veri tabanı Molport bileşiklerinin IC_{50} grafikleri



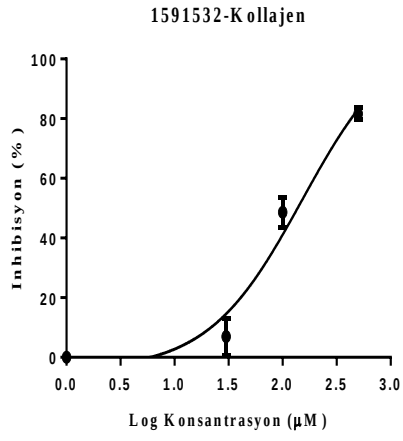
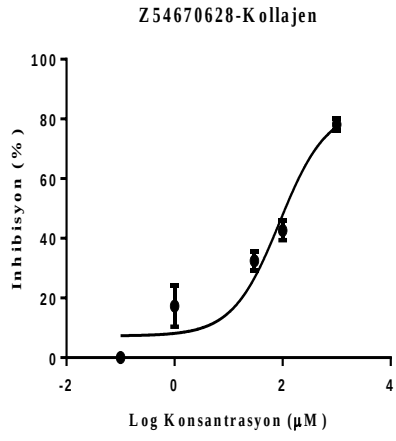
Şekil 4.49.(devam) Kimyasal veri tabanı Molport bileşiklerinin IC_{50} grafikleri



Şekil 4.49.(devam) Kimyasal veri tabanı Molport bileşiklerinin IC₅₀ grafikleri



Şekil 4.49.(devam) Kimyasal veri tabanı Molport bileşiklerinin IC_{50} grafikleri



Şekil 4.49.(devam) Kimyasal veri tabanı Molport bileşiklerinin IC_{50} grafikleri

5. TARTIŞMA

Plateletler hemostazı sağlamada ve tromboz oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Normal fizyolojik şartlarda plateletler hemostazı sürdürürken, aşırı platelet aktivasyonu pıhtı oluşumuna neden olarak yaşamı tehdit edebilmektedir. Bir vasküler hasar meydana geldiğinde, hasarlı bölgede oluşan kan kaybını durdurabilmek için tıkaç oluşturan plateletler kardiyovasküler hastalığı olan veya risk taşıyan bireylerde kan damarlarını kolayca tıkararak beyin, kalp gibi hayati öneme sahip organların enfarktüsüne veya iskemiye yol açabilmektedir. Bu nedenle fizyolojik hemostazı bozmayan iskemik kardiyovasküler hastalıkları kontrol altına alabilecek yeni etken maddelere ihtiyaç duyulmaktadır. İdeal antiplatelet ilaç; vasküler hastalıklarda trombojenik platelet kaynaklı mekanizmaları spesifik olarak inhibe ederken plateletlerin yara iyileşmesindeki normal fonksiyonlarını ve hemostazı engellememelidir.

Günümüzde antiplatelet tedavi amaçlı kullanılan ilaçlar, vasküler hastalıkları azaltmada etkili olmakla birlikte en önemli istenmeyen etkileri hayatı tehdit edebilecek kanama riski oluşturmalarıdır. Bu nedenle, trombüs büyümesini önleyen ve kanama riskini arttırmayan antiplatelet ajanları geliştirme çalışmaları halen devam etmektedir [151].

Platelet reseptörlerinden majör kollajen reseptörü olan GPVI'nın; sadece plateletlerde ve platelet prekürsörü megakaryositlerde eksprese olması, deneysel olarak GPVI'nın bloke edilmesinin veya genetik olarak eksikliğinin majör kanama komplikasyonlarına sebebiyet vermeksizin patolojik trombüs oluşumunu önemli ölçüde azaltması ve ayrıca GPVI reseptörünün plateletlere bağlı enflamatuvar süreçlerde önemli bir düzenleyici olması GPVI reseptörünü kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde güçlü ve güvenli bir antitrombotik hedef haline getirmiştir [5].

Plateletler, subendotelyal matrikse adezyon esnasında, spesifik adezif glikoproteinler üzerinden ekstraselüler matriks proteinleri ile etkileşmektedirler. GPVI ve kollajen etkileşimi, platelet adezyon ve aktivasyonunun ilk aşaması olduğu için güncel ilaçlara kıyasla GPVI hedefli ilaçlar ile tromboz oluşumuna daha erken safhada müdahale imkanı olabilecektir [37]. Tüm bu nedenlerden dolayı, yeni antiplatelet ajanlar geliştirme amacıyla GPVI reseptörü güçlü ve güvenli bir potansiyel farmakolojik hedef olmaktadır.

Son zamanlardaki çalışmalar, GPVI-kollajen etkileşimini engelleme amacı güden stratejilerin güçlendiğini göstermektedir. Günümüzde ilaç olarak piyasada mevcut bir GPVI reseptör antagonisti bulunmamaktadır. GPVI reseptörünü hedef alan ve Faz II çalışması devam eden tek aday bileşik; GPVI agonisti olan kollajenin bağlanmasını engelleyen Fc füzyon proteini olan Revasept'tir. En az diğer bilinen antiplatelet ilaçlar kadar etkili olan Revasept, endotelial lezyonlarda açığa çıkan kollajenin reseptöre bağlanmasını engellediği için akut vasküler hastalıkları çok erken basamakta engelleyebilmektedir [118,123,124].

Losartan ise GPVI inhibitörü olarak tanımlanan ilk küçük moleküldür [152]. Daha sonra, losartandan daha güçlü GPVI antagonistleri olarak sentetik 2,3-disüstitüe tetrahidropirido(3,4-b)indol bileşikler geliştirilmiştir [147].

Peptid olmayan anjiyotensin II tip 1 reseptör antagonisti olan losartan, birçok ülkede hipertansiyon tedavisi için kullanılmaktadır. Daha önceki çalışmalarda, kalp yetmezliği olan hastalara hem akut, hem de kronik dozda oral yolla verilen losartanın olumlu hemodinamik etkisi olduğu gösterilmiş ve ayrıca, ani kardiyak ölümleri azaltması oldukça dikkat çekmiştir [153]. Ani kardiyak ölümler genellikle mural trombüs denilen damar duvarına tutunan trombüs ile ilişkili olduğu için [154] araştırmacılar losartanın antiplatelet etkisine yönelmiştir. Buna yönelik yapılan bir çalışmada, losartanın TxA₂ reseptör antagonisti olduğu gösterilmiştir [155]. Daha sonra, losartanın platelet GPVI reseptörünü inhibe ederek platelet adezyonunu ve agregasyonunu engellediği [156] bulunmuş ve losartanın GPVI'ya bağlanması NMR spektroskopisi ve *in silico* yöntemlerle aydınlatılmıştır [144]. GPVI reseptörü üzerine olan inhibitör etkisinin TxA₂ reseptörüne olan inhibitör etkisinden daha güçlü olduğu [152] ve bu etkiyi GPVI kümelenmesini engelleyerek yaptığı [157] gösterilmiştir. Trombüs modeli oluşturulup losartan uygulanan fare çalışmasında antiplatelet aktivite değerlendirildiğinde, losartanın trombüse bağlı damar tıkanıklığını geciktirdiği bildirilmiştir [158]. Losartanın GPVI ile etkileşimlerine bakıldığında; yapısındaki 1) tetrazol halkasıyla GPVI reseptörünün arginin 46 amino asidi pi-pi etkileşimi yapmakta olduğu, 2) imidazol halkasına bağlı hidroksili ise, GPVI reseptörünün lizin 59 amino asidiyle H bağı kurmakta olduğu ve H bağ alıcısı görevi gördüğü anlaşılmaktadır. Bu etkileşimler nedeniyle, kollajen (IC₅₀ 29,76 µM) ve konvalksin (IC₅₀ 106,0 µM) indüklü platelet agregasyonuna karşı yüksek bir inhibisyon göstermiştir. Ayrıca, uygulanan metoda göre yayınlanmış makalelerde Losartan'ın

inhibisyon değerinin farklılık göstermesi; plazmada bulunan platelet sayısının çok daha altında bir konsantrasyonda plateletlerin deney ortamına verilmesi ve indükleyicilerin çok daha düşük bir final konsantrasyonda deney ortamında kullanılması gibi deney prosedürü farklılığından kaynaklanmaktadır [147,152].

GPVI reseptörü hedefli antagonist keşfine yönelik çalışmalardan yola çıkılarak sanal tarama yöntemi yardımıyla tasarlanıp sentezlenen 2,3-disüstitüe tetrahidropirido(3,4-b)indol bileşiği, kollajen ve diğer GPVI reseptörü agonistleri tarafından indüklenen platelet agregasyonunu inhibe etmektedir [147]. Bu yeni antagonistin de GPVI ile olan etkileşimlerine bakıldığında; yapısında bulunan 1) sülfürün bir oksijeni H bağı vericisi olarak davranarak GPVI reseptörünün tirozin 66 amino asidiyle H bağı kurmakta, 2) pirido-indol halkasına bağlı amino grubu da, H bağı vericisi olarak davranarak GPVI reseptörünün lösin 39 amino asidiyle H bağı kurmakta ve yine bu halkaya bağlı karbonil grubunun oksijeni GPVI reseptörünün arginin 46 amino asidiyle H bağı kurarak H bağı vericisi görevi görmektedir.

Tüm bu bilgiler çerçevesinde, bu tez kapsamında moleküler modelleme sonucu docking skorunun yüksekliğine ve moleküllerin benzer etkileşim gösterme durumuna göre değerlendirilerek seçilen yedi FDA onaylı ilaç ve Molport'tan seçilmiş onaltı bileşiğin kollajen, konvalksin ve trombin agonistleri ile ayrı ayrı indüklenen platelet agregasyonu üzerine inhibitör etkileri incelenmiştir. Fibröz kollajenin yanı sıra, GPVI fonksiyonunun çalışılmasında iki spesifik agonist kullanılmaktadır. Bunlardan sentetik üçlü helikal kollajen-ilişkili peptid olan CRP'nin sentezinin zaman alması ve maliyetinin yüksek olması nedeniyle tez kapsamında multimerik C-tipi lektin benzeri toksin olan konvalksin GPVI spesifik agonist olarak kullanılmıştır.

FDA onaylı bileşiklerden seçilen antialerjik ilaç Pemirolast'ın platelet aktive edici faktör (PAF) indüklü platelet agregasyonunu ve aynı zamanda PAF-indüklü bronkokonstriksiyonu inhibe ettiği daha önce bildirilmiştir [159]. Bir başka çalışmada ise, mediadan intimaya düz kas hücrelerin göçünü engelleyerek intimanın kalınlaşmasını önlediği gösterilmiştir [160]. Ayrıca, Pemirolast'ın muhtemelen neointimal hiperplaziyi inhibe etmesinden dolayı, stent yerleştirilmesinden sonra restenoza karşı önleyici bir etkisi bulunmaktadır [161]. Bu çalışmaların üzerine, bu ilacın GPVI reseptörü üzerinden platelet agregasyonuna olan etkisi araştırılmaya karar verilmiştir. Yapı-etkileşim durumuna

bakıldığında, Pemirolast'ın yapısında bulunan pirimidin halkasına bağlı karbonil grubu GPVI reseptörünün serin 44 amino asidi ile H bağı yaptığı görülmektedir. Bu tek etkileşim güçlü bir bağlanmayı sağlayamamış olabilir ve inhibisyon yaratmaya yeterli olamayıp platelet agonistlerine karşı düşük bir inhibisyon vermiştir.

Akut migren tedavisi görenlerde inme ve miyokard enfarktüs insidansının artmasından hareketle, migren tedavisinde kullanılan ilaçların eritrosit ve platelet reaktivitesi üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışmada triptan grubu ilaçların platelet reaktivitesini arttırmadığı bildirilmiştir [162]. Bu sebeple, FDA onaylı serotonin reseptör agonisti Zolmitriptan'ın GPVI reseptörü üzerinden platelet agregasyonuna olan etkisi açısından bakıldığında, ilacın oksazolidin halkasına bağlı karbonil grubunun GPVI reseptörünün serin 43 ve lizin 41 amino asitleriyle, amino grubunun glutamin 48 ile ve indol halkasındaki amin grubunun arginin 46 ile H bağı yaptığı, indoldeki benzenin arginin 46 ile katyon- π ve $\pi - \pi$ etkileşimleri görülmesine rağmen, *in vitro* ortamda GPVI reseptörüne bağlanmama veya anlık bağlanma ihtimalinden dolayı, platelet agonistlerine karşı düşük bir inhibisyon gözlemlenmiştir.

İntraoküler basıncı düşüren karbonik anhidraz inhibitörü Brinzolamid'in GPVI reseptörü üzerinden platelet agregasyonuna olan etkisi araştırıldığında ise, yapısındaki oksijen GPVI reseptörünün lizin 41 amino asidi ile, sülfürün oksijeni tirozin 66 ile, amino grubu arginin 46 ile ve sülfonamidin amino grubu glutamin 48 ile H bağı, tiyofen halkası arginin 46 ile katyon- π ve $\pi - \pi$ etkileşimleri yapmakta ve bu da kollajen agonisti indüklü platelet agregasyonuna karşı bir inhibisyonu sağlamaktadır (IC_{50} 165,9 μM). Kollajen ve konvalksinin reseptöre bağlanma bölgeleri her ne kadar örtüşen ve benzer rezidüleri içerse de kollajen ve konvalksinin bağlanma bölgelerinin farklı özellikler gösterebileceği [163] göz önünde bulundurulduğunda konvalksin indüklü platelet agregasyonuna karşı güçlü bir inhibisyon vermeyişinin nedenini açıklayabilir. Güçlü bir platelet agregasyon agonisti olan trombine karşı da bir inhibisyon göstermeyişi bu ilacın kollajen agonistine spesifik olabilme potansiyeli taşıdığını düşündürmektedir.

FDA onaylı olan diüretik ilaç Triklormetiyazid'in, hipertansif ratlarda kardiyak hipertrofiyi azalttığı bildirilmiştir [164]. GPVI reseptörüyle ilişkili platelet agregasyonuna etkisi incelendiğinde, etkileşim olarak yapısında bulunan tiyadiazin halkasındaki amin grubu GPVI reseptörünün glutamin 48 amino asidi ile ve bu halkadaki kükürde bağlı oksijen

tirozin 66 ile H bağı yapmaktadır. Etkileşimlerin azlığına ve yapının da küçük olmasına bağlı olarak ilacın GPVI'nın geniş bağlanma bölgesinde tutunamaması kollajen indüklü agregasyonu üzerinde çok güçlü olmayan bir inhibisyon oluşturmamasını açıklamaktadır (IC_{50} 233,4 μ M).

Epilepsi tedavilerinde kullanılan FDA onaylı Okskarbazepin ilacının GPVI reseptörü ile ilişkisine bakıldığında yapılan sanal taramada, ilacın yapısında bulunan azepine bağlı karboksamitteki oksijen GPVI reseptörünün arginin 46 amino asidi ile, karboksamitteki amino grubunun glutamin 48 ve yine azepine bağlı karbonil grubunun tirozin 66 ile H bağı yaptığı görülmektedir. Yeni antagonistle benzer etkileşimler gösteren Okskarbazepin bu etkileşimler sayesinde kollajen (IC_{50} 93,61 μ M) ve konvalksin agonistlerinin oluşturduğu platelet agregasyonuna karşı 1 mM konsantrasyonda güçlü bir inhibitör gibi davranıp doza bağımlı olarak etkisini göstermiştir. Güçlü platelet agonisti trombine karşı önemli bir inhibisyon göstermeyişi antiplatelet etkisini GPVI reseptörü üzerinden gösterdiğini doğrular niteliktedir.

Aminofilin astım gibi akciğer hastalıklarını tedavi etme amacıyla kullanılan bir bronkodilatör FDA ilacıdır. Nonselektif fosfodiesteraz inhibitörü ve adenosin reseptör antagonisti olan Aminofilin'in GPVI reseptörü üzerinden kollajen indüklü platelet agregasyonuna olan etkisi incelendiğinde, yapısında bulunan pürindeki amin grubu GPVI reseptörünün arginin 46 amino asidi ve pürine bağlı karbonil grubu serin 44 ile H bağı yapmaktadır. Ancak, bu ilaç küçük yapıda olduğu için GPVI bağlanma bölgesine muhtemelen güçlü bağlanmadığı için 1 mM konsantrasyonda kollajen indüklü platelet agregasyonu dışında diğer agonistlerin oluşturduğu agregasyona karşı önemli derecede bir inhibisyon göstermemiştir.

Z16043060 bileşiğinin yapısındaki benzen halkası GPVI reseptörünün arginin 46 amino asidi ile katyon- π etkileşimi, imidazol halkasına bağlı H bağ vericisi amino grubu ile GPVI reseptörünün lösin 39 amino asidi H bağı ve yapıdaki karbonil grubunun oksijeni H bağ vericisi olarak davranarak GPVI reseptörünün tirozin 66 amino asidi ile H bağı yapmaktadır. Bu bileşik yeni antagoniste benzer etkileşimler gösterdiği için GPVI reseptörü agonistlerine karşı inhibisyon oluşturmaktadır. Z16043060 bileşiği GPVI reseptörünün kollajen agonisti ile indüklenen agregasyona karşı anlamlı olarak yüksek bir

inhibisyon göstermiştir. IC_{50} 19,38 μM bulunmuştur. Kollajenin ve konvalksinin GPVI reseptörüne bağlanma bölgeleri çeşitli ortak özellikler göstermesi [147,163] sebebiyle GPVI reseptörünün spesifik agonisti konvalksin ile indüklenen agregasyona karşı anlamlı olarak yüksek bir inhibisyon göstermiştir. IC_{50} 17,18 μM bulunmuştur. Çok güçlü platelet agonisti olan trombine karşı ise ancak 1 mM gibi yüksek konsantrasyonda % 43,20 inhibisyon gösterirken, 100 μM gibi düşük konsantrasyonda etkili bir inhibitör olamamıştır. Dolayısıyla, tüm bunlar Z16043060 bileşiğinin kollajen ile yarışarak NMR yöntemiyle GPVI reseptörüne bağlandığı kanıtlanan losartan inhibitörü [144] ve indol türevi olan yeni GPVI antagonisti baz alınarak yapılmış sanal tarama hipotezini güçlendirerek platelet agregasyonuna karşı inhibitör etkisini öncelikle GPVI reseptörü üzerinden gerçekleştirdiğini doğrular niteliktedir.

AE641/05538014 bileşiğinin yapısında bulunan sülfürün bir oksijeni H bağı alıcısı olarak davranarak GPVI reseptörünün tirozin 66 amino asidiyle H bağı kurmakta, kinoksalin halkasındaki benzen de GPVI reseptörünün arginin 46 amino asidiyle katyon- π etkileşimi ve bu amino asit bileşiğin karboksamit yapısındaki oksijen ve amino grubu ile H bağı, son olarak da kinoksalindeki amin GPVI reseptörünün glutamin 48 amino asidiyle H bağı yapmaktadır. Bu etkileşimler sayesinde inhibisyon söz konusudur. AE641/05538014 bileşiği GPVI reseptörünün kollajen agonisti ile indüklenen agregasyona karşı anlamlı olarak yüksek bir inhibisyon göstermiştir. IC_{50} 29,86 μM bulunmuştur. GPVI agonistlerinin (kollajen, konvalksin, CRP) GPVI reseptörüne bağlanma bölgeleri çeşitli ortak özellikler içerdiği gibi, bu agonistlerin ligandlarla spesifik etkileşimleri için istenilen rezidüleri farklı da olabilmektedir [147,163]. GPVI reseptörünün diğer agonisti konvalksine karşı da 1 mM konsantrasyonunda oldukça yüksek (% 94,68) inhibisyon gösterirken doza bağımlı olarak etkisini sürdürmektedir. Bu veriler, AE641/05538014 bileşiğinin platelet agregasyonuna karşı inhibitör etkisinin öncelikli olarak kollajen ilişkili GPVI sinyalizasyonu üzerinden olduğunu gösteren niteliktedir.

STK763609 bileşiğinin yapısındaki H bağı alıcısı nitril ile GPVI reseptörünün tirozin 66 amino asidi arasında, pirazol halkasındaki H bağı vericisi amin ile GPVI reseptörünün tirozin 47 amino asidi arasında ve piran halkasına bağlı H bağı vericisi amino grubu ile GPVI reseptörünün arginin 46 amino asidi arasında H bağı, pirazol halkası ile GPVI reseptörünün arginin 46 amino asidi arasında ise katyon- π etkileşimi oluşmaktadır. Bu etkileşimler nedeniyle, STK763609 bileşiği GPVI agonisti kollajen ile indüklenen

agregasyona karşı anlamlı olarak yüksek bir inhibisyon göstermiştir. IC_{50} 28,90 μM bulunmuştur. Konvalksinle indüklenen platelet agregasyonuna karşı inhibitör etkisi kollajene kıyasla daha düşük bulunmuştur. Trombine karşı da 1 mM konsantrasyonda düşük bir inhibisyon göstermesi STK763609 bileşiğinin platelet agregasyonuna karşı inhibitör etkisinin öncelikli olarak kollajen ilişkili GPVI sinyalizasyonu üzerinden olduğunu doğrular niteliktedir.

1692506 bileşiğinin yapısında bulunan hidroksil ve pirazoldeki amin grubu GPVI reseptörünün arginin 46 amino asidi ile, karbonildeki oksijen serin 44 ile, yapıdaki bir diğer hidroksil ise serin 43, lizin 41 ve serin 61 amino asitleri ile H bağı yapmakta ve pirazol halkası da arginin 46 ile katyon- π etkileşimine girmektedir. Bu etkileşimler nedeniyle, 1692506 bileşiği kollajen (IC_{50} 11,19 μM), konvalksin (IC_{50} 31,27 μM) ve trombin (IC_{50} 24,04 μM) indükleyicilerinin oluşturduğu platelet agregasyonuna karşı güçlü bir inhibitör olarak davranmaktadır. GPVI ve PAR sinyal yollarının benzerliği; kollajen reseptörüne kollajenin bağlanması PLC γ yolunun, trombinin reseptörüne bağlanması ise PLC β yolunun aktivasyonuna neden olmasıdır. Bu iki yolun ortak noktası ise PKC aktivasyonu ve IP $_3$ üzerinden hücre içi kalsiyum düzeylerinin artmasıdır. Her üç platelet agregasyon agonistine karşı güçlü inhibitör etkinin gözlenmesi 1692506 bileşiğinin kollajen ve trombin sinyal yollarının alt basamaklarındaki bu ortak yolları etkiliyor olabileceğini göstermektedir.

Z851137174 bileşiği yapısında bulunan sülfürün bir oksijeni GPVI reseptörünün lizin 59 amino asidiyle, karboksamidin oksijeni GPVI reseptörünün tirozin 66 ile ve yapıdaki hidroksil GPVI reseptörünün arginin 46 ile H bağı yapmaktadır. Bu etkileşimler sayesinde, Z851137174 bileşiği GPVI agonisti kollajen ile indüklenen agregasyona karşı anlamlı bir inhibisyon gösterirken (IC_{50} 80,51 μM), trombinle indüklenen platelet agregasyonunda bir inhibitör etkisi gözlenmemiştir. Bu veriler, Z851137174 bileşiğinin platelet agregasyonuna karşı inhibitör etkisinin öncelikli olarak kollajen ilişkili GPVI sinyalizasyonu üzerinden olduğunu doğrular niteliktedir.

Z232636338 bileşiği yapısında bulunan piridin halkasındaki azot GPVI reseptörünün arginin 46 amino asidi ile, imidazol halkasındaki azot GPVI reseptörünün serin 44 ile ve halkaya bağlı amino grubu GPVI reseptörünün lösin 39 ile H bağı, imidazol halkası GPVI

reseptörünün arginin 46 ve benzen halkası GPVI reseptörünün lizin 41 ile katyon- π etkileşimi yapmaktadır. Bu etkileşimler ile, Z232636338 bileşiği GPVI agonisti kollajen ile indüklenen agregasyona karşı inhibisyon göstermiştir. IC_{50} 77,19 μ M bulunmuştur. Trombinle indüklenen platelet agregasyonunda bir inhibitör etkisinin gözlenmemesi Z232636338 bileşiğinin platelet agregasyonuna karşı inhibitör etkisinin öncelikli olarak kollajen ilişkili GPVI sinyalizasyonu üzerinden olduğunu gösterir niteliktedir.

STK685501 bileşiği yapısında bulunan imidazol halkasındaki azot GPVI reseptörünün serin 44 amino asidi ile ve halkaya bağlı amino grubu GPVI reseptörünün arginin 46 ile H bağı, imidazol halkası GPVI reseptörünün arginin 46 ve lizin 41 ile ve benzen halkası GPVI reseptörünün lizin 41 ile katyon- π etkileşimi yapmaktadır. Bu bileşiğin kollajen ile indüklenen platelet agregasyonunda IC_{50} değeri 43,55 μ M olarak bulunmuştur. Ayrıca, Z232636338 bileşiğindeki piridin yerine STK685501 bileşiğinin yapısına bağlı p-metoksibenzen varlığı kollajen üzerinden GPVI-ilişkili sinyalizasyonunu inhibe etmesinde katkı sağladığı görülmüştür.

AK778/43464987 bileşiği yapısında bulunan karbonil grubu GPVI reseptörünün serin 44 amino asidiyle, indol halkasındaki azot GPVI reseptörünün glutamin 48 ile ve bu halkaya bağlı hidroksil GPVI reseptörünün arginin 46 ile H bağı yapmaktadır. Bu etkileşimler nedeniyle, AK778/43464987 bileşiği GPVI agonisti kollajen ile indüklenen agregasyona karşı anlamlı bir inhibisyon göstermiştir. IC_{50} 44,15 μ M bulunmuştur. Bu bileşik aynı zamanda GPVI spesifik agonisti konvalksin ile indüklenen agregasyona karşı da anlamlı bir inhibisyon göstermiştir ve IC_{50} 60,14 μ M bulunmuştur. Çok güçlü platelet agonisti olan trombine karşı ise bu bileşiğin 100 μ M'daki % inhibisyonu 19,51 olarak bulunmuştur. Her üç platelet agregasyon agonistine karşı inhibitör etkinin gözlenmesi AK778/43464987 bileşiğinin kollajen ve trombin sinyal yollarının alt basamaklarındaki ortak yolları etkiliyor olabileceğini göstermektedir.

80378510 bileşiğinin yapısında bulunan sülfürün bir oksijeni GPVI reseptörünün lizin 59 amino asidiyle ve pirol halkasına bağlı hidroksil GPVI reseptörünün arginin 46 ile H bağı oluştururken, pirimidin halkası GPVI reseptörünün arginin 46 amino asidiyle ise katyon- π etkileşimi yapmaktadır. 80378510 bileşiğinin kollajen için IC_{50} değeri 236,6 μ M olarak bulunmuştur. Kollajen, konvalksin ve trombin agonistlerine karşı inhibisyon göstermesi

kollajen ve trombin sinyal yollarının alt basamaklarındaki ortak yolları etkiliyor olabileceğini göstermektedir.

STK206687 bileşiğinin yapısında bulunan karboksamitteki amino grubu GPVI reseptörünün arginin 46 amino asidi ile ve sülfürün oksijeni tirozin 66 ile H bağları oluşturmaktadır. Bu bileşik GPVI reseptörünün kollajen agonisti ile indüklenen agregasyona karşı anlamlı bir inhibisyon göstermiştir. IC_{50} 18,52 μ M bulunmuştur. STK206687 bileşiği GPVI spesifik agonisti konvalksin ile indüklenen agregasyona karşı da anlamlı bir inhibisyon göstermiştir. IC_{50} 49,98 μ M bulunmuştur. Çok güçlü platelet agonisti olan trombine karşı ise 100 μ M'da çok düşük düzeyde (%7,61) inhibisyon göstermiştir. Bu bulgular STK206687 bileşiğinin, e-farmakofor modelleri geliştirilerek yapılmış sanal tarama hipotezini güçlendirerek platelet agregasyonuna karşı inhibitör etkisinin öncelikli olarak kollajen ilişkili GPVI sinyalizasyonu üzerinden olduğunu gösterir niteliktedir.

1303833 bileşiğinin yapısında bulunan benzene bağlı hidroksil ve pirazoldeki amin grubu GPVI reseptörünün arginin 46 amino asidi ile, pirole bağlı karbonil serin 44 ile, yapıdaki bir diğer hidroksil ise lizin 41 ve serin 61 amino asitleriyle H bağı yapmakta ve pirazol halkası da arginin 46 ile katyon- π etkileşimine girmektedir. 1303833 bileşiği kollajen (IC_{50} 1,01 μ M), konvalksin (IC_{50} 7,24 μ M) ve trombin (IC_{50} 51,74 μ M) indükleyicilerinin oluşturduğu platelet agregasyonuna karşı güçlü bir inhibitör olarak davranmaktadır. Her üç platelet agregasyon agonistine karşı güçlü inhibitör etkinin gözlenmesi 1303833 bileşiğinin kollajen ve trombin sinyal yollarının alt basamaklarındaki ortak yolları gerek downstream proteinler, gerekse sekonder mediyatörler aracılığıyla etkiliyor olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, 1692506 bileşiğine göre 1303833 bileşiğinin yapısında bir metil eksik olması ve metoksi grubunun para konumunda yer alması GPVI-ilişkili sinyalizasyonunu inhibe etmesinde katkı sağlarken, trombin-ilişkili sinyalizasyonunu inhibe etmesinde katkı sağlamamıştır.

STK908290 bileşiğinin yapısında bulunan hidroksil GPVI reseptörünün serin 61, lizin 41 ve serin 43 amino asitleriyle, piroz halkasına bağlı olan karbonil grubu serin 44 ile, pirazoldeki amin ve benzen halkasına bağlı hidroksil arginin 46 ile H bağı yapmakta ve pirazol halkası arginin 46 ile katyon- π etkileşimi yapmaktadır. STK908290 bileşiği

kollajen (IC_{50} 0,35 μM), konvalksin (IC_{50} 195,2 μM) ve trombin (IC_{50} 81,38 μM) indükleyicilerinin oluşturduğu platelet agregasyonuna karşı inhibitör etki göstermiştir.

STK633709 bileşiğinin yapısında bulunan benzen halkası GPVI reseptörünün arginin 46 amino asidi ile katyon- π etkileşimi ve yapıdaki karbonil grubu lizin 59 ile H bağı yapmaktadır. Bu etkileşimler nedeniyle, STK633709 bileşiği GPVI reseptörünün kollajen agonisti ile indüklenen agregasyona karşı anlamlı bir inhibisyon göstermiştir. IC_{50} değeri 25,94 μM bulunmuştur. Bileşik trombinle indüklenen platelet agregasyonuna karşı inhibitör etki göstermemiştir.

Z54670628 bileşiği yapısında bulunan pirimidin halkasına bağlı karbonil grubu GPVI reseptörünün lizin 59 amino asidiyle ve tetrazol halkasındaki azot GPVI reseptörünün serin 44 ile H bağı ve tetrazol halkası GPVI reseptörünün lizin 41 ile katyon- π etkileşimi yapmaktadır. Bu nedenle, Z54670628 bileşiği GPVI reseptörünün kollajen agonisti ile indüklenen agregasyona karşı inhibisyon göstermiştir. IC_{50} değeri 87,97 μM bulunmuştur. Trombinle oluşturulan platelet agregasyonuna karşı ise çok düşük düzeyde bir inhibitör etki göstermiştir.

3F-042 bileşiğinin yapısındaki amino grubu GPVI reseptörünün lösin 39 amino asidi ile, karboksamitteki karbonil grubu tirozin 66 ile H bağı ve halka yapısı arginin 46 ile katyon- π etkileşimi yapmaktadır. Muhtemelen GPVI ile zayıf etkileşim nedeniyle, bu bileşik platelet agonistleri olan kollajen, konvalksin ve trombinin oluşturduğu platelet agregasyonuna karşı zayıf bir inhibisyon göstermiştir.

1591532 bileşiğinin yapısında bulunan pürin halkasına bağlı karbonil GPVI reseptörünün tirozin 66 amino asidi ile, yapıdaki hidroksil arginin 46 ile ve oksijen serin 44 ile H bağı yaparken, benzen halkası lizin 41 ile katyon- π etkileşimi yapmaktadır. Bu nedenle, 1591532 bileşiği GPVI reseptörünün kollajen agonisti ile indüklenen agregasyona karşı inhibisyon göstermiştir. IC_{50} değeri 150,6 μM bulunmuştur. Konvalksin ile 100 μM 'da % 25,94 inhibisyon oluştururken, trombinle oluşturulan platelet agregasyonuna karşı bir inhibitör etki gözlenmemiştir.

GPVI reseptörüyle etkileşime giren bir bileşiğin PAR reseptörleriyle de etkileşmesi klinik açıdan önemlidir. GPVI/FcR sinyalizasyon kaskadında eksikliğe bağlı hemostatik ve

trombotik defekti yenmede trombinin oldukça önemli rolü olduğu çalışmalarla gösterilmiştir [165]. Bundan hareketle, trombozun tamamen önlenmesi için hem anti-GPVI, hem de antitrombin ajanların uygulanması istenmektedir. *In vivo* tromboz model çalışmalarında proteinlerin sinyalizasyonunun önem kazanması bu fikri desteklemiştir. GPVI downstream proteinleri yüzeysel hasarlı platelet trombozunda önemli rol oynarken, ciddi hasar durumunda trombin antagonistleri trombozu önemli ölçüde etkilemektedir. Dolayısıyla hem yüzeysel, hem de ciddi hasarda dual anti-GPVI ve antitrombin tedavisinin trombozu önleyeceği düşünülmektedir. Ayrıca, trombin ve GPVI agonistleri tarafından sinerjistik sinyalizasyon kaskadının harekete geçirilmesi, ayrıca Syk ve Src kinazların eksikliğinde trombinin durumu kompanse etmesi nedeniyle dual etkili bileşiklerin tedavide etkili olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ

GPVI antagonisti keşfine yönelik tez çalışmasında, bilinen selektif bir antagonisti olmaması nedeniyle selektif GPVI antagonist etki gösteren bileşiklerin bulunması, bu etkiden sorumlu yapısal gerekliliklerin moleküler modelleme teknikleriyle belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. GPVI reseptörü antagonistleri olarak losartan ve sentetik 2,3-disüstitüe tetrahidropirido(3,4-b)indol bileşikleri baz alınarak dizayn edilmiş farmakofor modeller temel alınarak; (i) FDA tarafından onaylanmış ilaçlardan seçilen yedi bileşiğin ve (ii) bazı filtrelemelerin ardından Molport kimyasal bileşik kütüphanesinden seçilen onaltı yeni hit bileşiklerin *in vitro* olarak antiplatelet aktivitelerini tespit etmek amacıyla GPVI reseptörü agonistleri kollajen ve konvalksin ile ve de güçlü agregasyon agonisti trombin ile indüklenen platelet agregasyonu üzerine inhibitör etkileri incelenmiştir.

Elde ettiğimiz bulgular sanal tarama hipotezini güçlendirmiştir. Klinikte kullanımda olan onaylanmış ilaçların endikasyon alanları dışında farklı yeni etki profillerinin belirlenmesine yönelik çalışmamızın ilk basamağında, docking skorları ve etkileşimleri yüksek olmakla birlikte kanser tedavisinde kullanılmaları nedeniyle çalışma dışı bırakılarak seçilen FDA onaylı ilaçlarda selektif ve güçlü bir inhibitör etki gözlenmemekle birlikte, bulgularımız kullanımı olan bu ilaçların platelet agregasyonu üzerine olan etkilerini aydınlatmaktadır. Bununla birlikte, molekül sayısının fazlalığı ve çeşitliliği nedeniyle ticari olarak mevcut Molport veri tabanına uygulanan sanal tarama sonucu, daha güçlü inhibitör bileşiklere ulaşılmıştır.

GPVI reseptörüyle etkileşime giren bir bileşiğin PAR reseptörleriyle de etkileşmesi klinik açıdan önemli bir faktördür. GPVI/FcR sinyalizasyon kaskadında eksikliğe bağlı hemostatik ve trombotik defekti yenmede trombinin oldukça önemli rolü olması nedeniyle trombozun tamamen önlenmesi için hem anti-GPVI, hem de antitrombin ajanların uygulanması avantaj sağlayacaktır. *In vivo* tromboz model çalışmalarında proteinlerin sinyalizasyonunun önem kazanması bu fikri desteklemektedir. GPVI downstream proteinleri yüzeysel hasarlı platelet trombozunda önemli rol oynarken, ciddi hasar durumunda trombin antagonistleri trombozu önemli ölçüde etkilemektedir. Dolayısıyla hem yüzeysel, hem de ciddi hasarda dual anti-GPVI ve antitrombin tedavi önem taşımaktadır. Elde edilen veriler yeni bileşiklerin geliştirilmesine ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Hewson W. (1771). *An experimental inquiry into the properties of the blood* (Second edition). London: T. Cadell.
2. Donne A. (1842). De l'origine des globules du sang, de leur mode de formation et de leur fin. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*. 14, 366–368.
3. Coller B.S. (1984). Bizzozzero and the Discovery of the Blood Platelet. *The Lancet*. 1(8380), 804.
4. Gachet C. (2006). Regulation of Platelet Functions by P2 receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 46, 277–300.
5. Dütting S., Bender M., Nieswandt B. (2012). Platelet GPVI: a target for antithrombotic therapy?! *Trends in pharmacological sciences*. 33(11), 583–90.
6. Irwin J.J., Shoichet B.K. (2005). ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 45(1), 177–182.
7. İnternet: Molport Database. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.molport.com%2Fshop%2Findex&date=2018-06-24>, Son Erişim Tarihi: 24.06.2018.
8. Jurk K., Kehrel B.E. (2005). Platelets : Physiology and Biochemistry. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 31(4), 381–392.
9. Cabrita G.J.M., Ferreira B.S., Lobato Da Silva C., Gonçalves R., Almeida-Porada G., Cabral J.M.S. (2003). Hematopoietic stem cells: From the bone to the bioreactor. *Trends in Biotechnology*. 21(5), 233–240.
10. Patel S., Hartwig J., Italiano J. (2005). The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *The Journal of Clinical Investigation*. 115(12), 3348–3354.
11. Michelson, A.D. (Editör) *Platelets*, USA: Academic Press.
12. George J.N. (2000). Platelets. *The Lancet*. 355(9214), 1531–1539.
13. Kuter D.J. (2013). The biology of thrombopoietin and thrombopoietin receptor agonists. *International Journal of Hematology*. 98(1), 10–23.
14. Zapata J.C., Cox D., Salvato M.S. (2014). The Role of Platelets in the Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 8(6), e2858.
15. Smyth S.S., McEver R.P., Weyrich A.S., Morrell C.N., Hoffman M.R., Arepally G.M., French P.A., Dauerman H.L. B.R.C.. 2009 P.C.P. (2009). Platelet functions

- beyond hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 7, 1759–1766.
16. Italiano J.E., Battinelli E.M. (2009). Selective sorting of alpha-granule proteins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 7(SUPPL. 1), 173–176.
 17. Harrison P., Cramer E.M. (1993). Platelet Alpha-Granules. *Blood Reviews*. 7(1), 52–62.
 18. Blair P., Flaumenhaft R. (2009). Platelet Alpha-granules: Basic biology and clinical correlates Price. *Blood reviews*. 23(4), 177–189.
 19. McNicol A., Israels S.J. (1999). Platelet dense granules: Structure, function and implications for haemostasis. *Thrombosis Research*. 95(1), 1–18.
 20. Heijnen H., van der Sluijs P. (2015). Platelet secretory behaviour: As diverse as the granules... or not? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 13(12), 2141–2151.
 21. Ellison S.M. (2009). *CD148: a positive regulator of GPVI and $\alpha IIb\beta 3$ proximal signalling in platelets*, Ph. D. Thesis, Institute of Biomedical Research The University of Birmingham, Birmingham.
 22. Repetto O., Re V. De. (2017). Coagulation and fibrinolysis in gastric cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1404(1), 27–48.
 23. Ruggeri Z.M. (2009). Platelet adhesion under flow. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*. 16(1), 58–83.
 24. Goggs R., Poole A.W. (2012). Platelet signaling – A primer. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 22(1), 5–29.
 25. Zwaal R.F.A., Alan J.S. (1997). Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood*. 89(4), 1121–1132.
 26. Okamoto T., Suzuki K. (2017). The Role of Gap Junction-Mediated Endothelial Cell – Cell Interaction in the Crosstalk between Inflammation and Blood Coagulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(11), E2254.
 27. Hartwig J.H. (2013). The Platelet Cytoskeleton. *Platelets*, 145–168.
 28. Hughes C.E. (2010). *Comparison of CLEC-2 and GPVI Signalling in Platelets: the Role of Adaptor Proteins*, Ph. D. Thesis, Institute of Biomedical Research The University of Birmingham, Birmingham.
 29. Matthew D. Shoulders and Ronald T. Raines. (2009). Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*. 78, 929–958.
 30. Nieswandt B., Watson S.P. (2003). Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 102(2), 449–61.
 31. Knight C.G., Morton L.F., Onley D.J., Peachey A.R., Ichinohe T., Okuma M., Farndale R.W., Barnes M.J. (1999). Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen.

Cardiovascular Research. 41(2), 450–457.

32. Auger J., Kuijpers M., Senis Y., Watson S., Heemskerk J. (2005). Adhesion of human and mouse platelets to collagen under shear: a unifying model. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 19(7), 825–827.
33. Chen H., Kahn M.L. (2003). Reciprocal Signaling by Integrin and Nonintegrin Receptors during Collagen Activation of Platelets. *Molecular and Cellular Biology*. 23(14), 4764–4777.
34. Holtkötter O., Nieswandt B., Smyth N., Mu W., Hafner M., Schulte V., Krieg T., Eckes B. (2002). Integrin Alpha2-Deficient Mice Develop Normally, Are Fertile, but Display Partially Defective Platelet Interaction with Collagen*. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(13), 10789–10794.
35. Massberg S., Gawaz M., Grüner S., Schulte V., Konrad I., Zöhlhörer D., Heinzmann U., Nieswandt B. (2003). A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 197(1), 41–49.
36. Sarratt K.L., Chen H., Zutter M.M., Santoro S.A., Hammer D.A., Kahn M.L. (2005). GPVI and Alpha2Beta1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. *Blood*. 106(4), 1268–1278.
37. Stegner D., Haining E.J., Nieswandt B. (2014). Targeting glycoprotein vi and the immunoreceptor tyrosine-based activation motif signaling pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 34, 1615–1620.
38. Herr A.B. (2009). Direct evidence of a native GPVI dimer at the platelet surface. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 7(8), 1344–1346.
39. Jung SM, Tsuji K M.M. (2009). Glycoprotein (GP) VI dimer as a major collagen-binding site of native platelets: direct evidence obtained with dimeric GPVI-specific Fabs. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 7(8), 1347–1355.
40. Inoue O., Suzuki-inoue K., Mccarty O.J.T., Moroi M., Ruggeri Z.M., Kunicki T.J., Ozaki Y., Watson S.P. (2006). Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood*. 107(4), 1405–1413.
41. Asselin J., Knight C.G., Farndale R.W., Barnes M.J., Watson S.P. (1999). Monomeric (glycine-proline-hydroxyproline)₁₀ repeat sequence is a partial agonist of the platelet collagen receptor glycoprotein VI. *Biochemical Journal*. 339(Pt 2), 413–418.
42. Kanaji S., Kanaji T., Furihata K., Kato K., Ware J.L., Kunicki T.J. (2003). Convulxin Binds to Native , Human Glycoprotein Ibalpha*. *Journal of Biological Chemistry*. 278(41), 39452–39460.

43. Nieswandt B., Bergmeier W., Schulte V., Rackebrandt K., Gessner J.E., Zirngibl H. (2000). Expression and Function of the Mouse Collagen Receptor Glycoprotein VI Is Strictly Dependent on Its Association with the FcR gamma Chain*. *Journal of Biological Chemistry*. 275(31), 23998–24002.
44. Alshehri O.M., Hughes C.E., Montague S., Watson S.K., Frampton J., Bender M., Watson S.P. (2015). Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood*. 126(13), 1601–1608.
45. Morton L.F., Hargreaves P.G., Farndale R.W., Young R.D., Barnes M.J. (1995). Integrin alpha 2 beta 1-independent activation of platelets by simple collagen-like peptides: collagen tertiary (triple-helical) and quaternary (polymeric) structures are sufficient alone for alpha 2 beta 1-independent platelet reactivity. *The Biochemical journal*. 306(Pt 2), 337–344.
46. Asselin J., Gibbins J.M., Achison M., Lee Y.H., Morton L.F., Farndale R.W., Barnes M.J., Watson S.P. (1997). A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C gamma2 in platelets independent of the integrin alpha2beta1. *Blood*. 89(4), 1235–42.
47. Batuwangala T., Leduc M., Gibbins J.M., Bon C., Jones E.Y. (2004). Structure of the snake-venom toxin convulxin. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 60(Pt 1), 46–53.
48. Watson SP, Auger JM, McCarty OJ P.A. (2005). GPVI and integrin alpha IIb beta 3 signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 3(8), 1752–1762.
49. Quek L.S., Pasquet J., Hers I., Cornall R., Knight G., Barnes M., Hibbs M.L., Dunn A.R., Lowell C.A., Watson S.P. (2000). Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor gamma chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway. *Blood*. 96(13), 4246–4254.
50. Offermanns S. (2006). Activation of Platelet Function Through G Protein – Coupled Receptors. *Circulation Research*. 99(12), 1293–1304.
51. Kauskot A., Hoylaerts M.F. (2012). Platelet Receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*. (210), 23–57.
52. Jung S.M., Moroi M. (2000). Activation of the platelet collagen receptor integrin alpha(2)beta(1): its mechanism and participation in the physiological functions of platelets. *Trends in cardiovascular medicine*. 10(7), 285–92.
53. Kuijpers M.J., Schulte V., Bergmeier W., Lindhout T., Brakebusch C., Offermanns S., Fässler R., Heemskerk, J.W. Nieswandt B. (2003). Complementary roles of platelet glycoprotein VI and integrin alpha2beta1 in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo. *FASEB Journal*. 17(6), 685–687.
54. Navarro-núñez L., Langan S.A., Nash G.B., Watson S.P. (2013). The physiological and pathophysiological roles of platelet. *Thrombosis and Haemostasis*. 109(6), 991–998.

55. Lowe K.L., Navarro-Nunez L., Watson S.P. (2012). Platelet CLEC-2 and podoplanin in cancer metastasis. *Thrombosis Research*. 129(SUPPL. 1), S30–S37.
56. Shattil S.J., Kashiwagi H., Pampori N. (1998). Integrin Signaling: The Platelet Paradigm. *Blood*. 91(8), 2645–2657.
57. Shattil S.J., Newman P.J. (2004). Integrins: Dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood*. 104(6), 1606–1615.
58. Kasirer-Friede A., Kahn M.L., Shattil S.J. (2007). Platelet integrins and immunoreceptors. *Immunological Reviews*. 218, 247–264.
59. Berndt M.C., Shen Y., Dopheide S.M., Gardiner E.E., Andrews R.K. (2001). The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thrombosis and Haemostasis*. 86(1), 178–188.
60. Savage B., Almus-Jacobs F., Ruggeri Z.M. (1998). Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*. 94(5), 657–666.
61. Mangin P., Yuan Y., Goncalves I., Eckly A., Freund M., Cazenave J.P., Gachet C., Jackson S.P., Lanza F. (2003). Signaling role for phospholipase C γ 2 in platelet glycoprotein Ib α calcium flux and cytoskeletal reorganization: Involvement of a pathway distinct from FcR γ chain and Fc γ RIIA. *Journal of Biological Chemistry*. 278(35), 32880–32891.
62. Chapin J.C., Hajjar K.A. (2015). Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews*. 29(1), 17–24.
63. Coughlin S.R. (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 407(6801), 258–264.
64. Ramström S., Vretenbrant K., Åkerström F., Enström C., Lindahl T.L. (2008). Platelet PAR1 receptor density — Correlation to platelet activation response and changes in exposure after platelet activation. *Thrombosis Research*. 121(5), 681–688.
65. Murugappan S., Shankar H., Bhamidipati S., Dorsam R.T., Jin J., Kunapuli S.P. (2005). Molecular mechanism and functional implications of thrombin-mediated tyrosine phosphorylation of PKC δ in platelets. *Blood*. 106(2), 550–558.
66. Shankar H., Kahner B.N., Prabhakar J., Lakhani P., Kim S., Kunapuli S.P. (2006). G-protein – gated inwardly rectifying potassium channels regulate ADP-induced cPLA 2 activity in platelets through Src family kinases. *Blood*. 108(9), 3027–3035.
67. Coxon CH, Geer MJ S.Y. (2017). ITIM receptors : more than just inhibitors of platelet activation. *Blood*. 129(26), 3407–3418.
68. Falati S., Patil S., Gross P.L., Stapleton M., Merrill-skoloff G., Barrett N.E., Pixton K.L., Weiler H., Cooley B., Newman D.K., Newman P.J., Furie B.C., Furie B.,

- Gibbins J.M. (2006). Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo. *Blood*. 107(2), 535–542.
69. Newman P.J., Newman D.K. (2003). Signal Transduction Pathways Mediated by PECAM-1 New Roles for an Old Molecule in Platelet and Vascular Cell Biology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 23(6), 953–965.
 70. Mitchell J.A., Ali F., Bailey L., Moreno L., Harrington L.S. (2008). Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Experimental Physiology*. 93(1), 141–147.
 71. Lucas F., Skrinska V., Chisolm G., Hesse B. (1986). Stability of prostacyclin in human and rabbit whole blood and plasma. *Thrombosis Research*. 43(4), 379–387.
 72. Gambaryan S., Tsikas D. (2015). A review and discussion of platelet nitric oxide and nitric oxide synthase: do blood platelets produce nitric oxide from l-arginine or nitrite? *Amino Acids*. 47(9), 1779–1793.
 73. Holinstat M., Yeung J. (2012). Newer agents in antiplatelet therapy: a review. *Journal of Blood Medicine*. 3, 33.
 74. Holinstat M., Bray P.F. (2016). Protease Receptor Antagonism to Target Blood Platelet Therapies. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 99(1), 72–81.
 75. Greenbaum A.B., Grines C.L., Bittl J. a, Becker R.C., Kereiakes D.J., Gilchrist I.C., Clegg J., Stankowski J.E., Grogan D.R., Harrington R. a, Emanuelsson H., Weaver W.D. (2006). Initial experience with an intravenous P2Y₁₂ platelet receptor antagonist in patients undergoing percutaneous coronary intervention: results from a 2-part, phase II, multicenter, randomized, placebo- and active-controlled trial. *American heart journal*. 151(3), 689.e1-689.e10.
 76. Swieringa F., Kuijpers M.J.E., Heemskerk J.W.M., Van der Meijden P.E.J. (2014). Targeting platelet receptor function in thrombus formation: The risk of bleeding. *Blood Reviews*. 28(1), 9–21.
 77. Angiolillo D., Capodanno D., Tamburino C. (2010). Update on novel P2Y₁₂ inhibitors: Focus on Prasugrel, Ticagrelor, Cangrelor and Elinogrel. *European Journal of Cardiology (E-Journal)*. 8(22).
 78. LAGARDE M, BYRON P, VARGAFTIG B D.M. (1978). Impairment of Platelet Thromboxane A , Generation and of the Platelet Release Reaction in Two Patients with Congenital Deficiency of Platelet Cyclo-oxygenase. *British Journal of Haematology*. 38(2), 251–266.
 79. Metharom P., Berndt M.C., Baker R.I., Andrews R.K. (2015). Current state and novel approaches of antiplatelet therapy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 35(6), 1327–1338.
 80. Floyd C.N., Ferro A. (2014). Mechanisms of aspirin resistance. *Pharmacology and Therapeutics*. 141(1), 69–78.

81. Massimi I., Guerriero R., Lotti L.V., Lulli V., Borgognone A., Romani F., Barillà F., Gaudio C., Gabbianelli M., Frati L., Pulcinelli F.M. (2014). Aspirin influences megakaryocytic gene expression leading to up-regulation of multidrug resistance protein-4 in human platelets. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 78(6), 1343–1353.
82. Capodanno D., Ferreiro J.L., Angiolillo D.J. (2013). Antiplatelet therapy: new pharmacological agents and changing paradigms. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 11(Suppl. 1), 316–329.
83. Katsanos K., Spiliopoulos S., Saha P., Diamantopoulos A., Karunanithy N., Krokidis M., Modarai B., Karnabatidis D. (2015). Comparative efficacy and safety of different antiplatelet agents for prevention of major cardiovascular events and leg amputations in patients with peripheral arterial disease: A systematic review and network meta-analysis. *PLoS ONE*. 10(8), 1–19.
84. McFadyen J.D., Schaff M., Peter K. (2018). Current and future antiplatelet therapies: Emphasis on preserving haemostasis. *Nature Reviews Cardiology*. 15(3), 181–191.
85. Michelson A.D. (2010). Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. 9(2), 154–169.
86. Franchi F., Angiolillo D.J. (2015). Novel antiplatelet agents in acute coronary syndrome. *Nature Reviews Cardiology*. 12(1), 30–47.
87. Cai G., Zhou W., Lu Y., Chen P., Lu Z., Fu Y. (2016). Aspirin resistance and other aspirin-related concerns. *Neurological Sciences*. 37(2), 181–189.
88. Floyd C.N., Ferro A. (2015). Antiplatelet drug resistance: Molecular insights and clinical implications. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 120, 21–27.
89. Oliphant C.S., Trevarrow B.J., Dobesh P.P. (2016). Clopidogrel Response Variability: Review of the Literature and Practical Considerations. *Journal of Pharmacy Practice*. 29(1), 26–34.
90. Sugidachi A., Ogawa T., Kurihara A., Hagihara K., Jakubowski J.A., Hashimoto M., Niitsu Y., Asai F. (2007). The greater in vivo antiplatelet effects of prasugrel as compared to clopidogrel reflect more efficient generation of its active metabolite with similar antiplatelet activity to that of clopidogrel's active metabolite. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 5(7), 1545–1551.
91. Jamasbi J., Ayabe K., Goto S., Nieswandt B., Peter K., Siess W. (2017). Platelet receptors as therapeutic targets: Past, present and future. *Thrombosis and Haemostasis*. 117(7), 1249–1257.
92. Gachet C. (2015). Antiplatelet drugs: which targets for which treatments? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 13, S313–S322.
93. King S., Short M., Harmon C. (2016). Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: The

- resurgence of tirofiban. *Vascular Pharmacology*. 78, 10–16.
94. Giordano A., Musumeci G., D'Angelillo A., Rossini R., Zoccai G.B., Messina S., Coscioni E., Romano S., Romano M.F. (2016). Effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists: Anti platelet aggregation and beyond. *Current Drug Metabolism*. 17(2), 194–203.
 95. Bassler N., Loeffler C., Mangin P., Yuan Y., Schwarz M., Hagemeyer C.E., Eisenhardt S.U., Ahrens I., Bode C., Jackson S.P., Peter K. (2007). A mechanistic model for paradoxical platelet activation by ligand-mimetic alphaIIb beta3 (GPIIb/IIIa) antagonists. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 27(3), e9–e15.
 96. Quinn M.J., Byzova T. V., Qin J., Topol E.J., Plow E.F. (2003). Integrin α IIb β 3 and its antagonism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 23(6), 945–952.
 97. Bledzka K., Smyth S.S., Plow E.F. (2013). Integrin α IIb β 3: from discovery to efficacious therapeutic target. *Circulation research*. 112(8), 1189–1200.
 98. Ahluwalia K., Bhanwra S. (2014). Antiplatelet therapy: present status and its future directions. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*. 3(2), 260–268.
 99. Phillips D.R., Scarborough R.M. (1997). Clinical pharmacology of eptifibatide. *American Journal of Cardiology*. 80(4 A), 11B–20B.
 100. Xu X.R., Carrim N., Neves M.A.D., McKeown T., Stratton T.W., Coelho R.M.P., Lei X., Chen P., Xu J., Dai X., Li B.X., Ni H. (2016). Platelets and platelet adhesion molecules: novel mechanisms of thrombosis and anti-thrombotic therapies. *Thrombosis Journal*. 14(29), 38–46.
 101. Topol E.J., Byzova T. V., Plow E.F. (1999). Platelet GPIIb-IIIa blockers. *Lancet*. 353(9148), 227–231.
 102. Herrmann, HC Swierkosz T., Kapoor S., Tardiff D., DiBattiste P., Hirshfeld J., Klugherz B., Kolansky D., Magness K., Valettas N., Wilensky R. (2002). Comparison of degree of platelet inhibition by abciximab versus tirofiban in patients with unstable angina pectoris and non-Q-wave myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention. *American Journal of Cardiology*. 89, 1293–1297.
 103. Li J., Vootukuri S., Shang Y., Negri A., Jiang J.K., Nedelman M., Diacovo T.G., Filizola M., Thomas C.J., Collier B.S. (2014). RUC-4, A novel α IIb β 3 antagonist for prehospital therapy of myocardial infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 34(10), 2321–2329.
 104. Zhu G., Zhang Q., Reddy E.C., Carrim N., Chen Y., Xu X.R., Xu M., Wang Y., Hou Y., Ma L., Li Y., Rui M., Petruzzello-Pellegrini T.N., Lavalley C., Stratton T.W., Lei X., Adili R., Chen P., Zhu C., *et al.* (2017). The integrin PSI domain has an endogenous thiol isomerase function and is a novel target for antiplatelet therapy. *Blood*. 129(13), 1840–1854.

105. Moschonas I.C., Goudevenos J.A., Tselepis A.D. (2015). Protease-activated receptor-1 antagonists in long-term antiplatelet therapy. Current state of evidence and future perspectives. *International Journal of Cardiology*. 185, 9–18.
106. Fala L. (2015). Zontivity (Vorapaxar), First-in-Class PAR-1 Antagonist, Receives FDA Approval for Risk Reduction of Heart Attack, Stroke, and Cardiovascular Death. *American Health & Drug Benefits*. 8(March), 148–151.
107. Gurbel P.A., Kuliopulos A., Tantry U.S. (2015). G-Protein – Coupled Receptors Signaling Pathways in New Antiplatelet Drug Development. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 35(3), 500–512.
108. İnternet: Squibb B-M. Multiple Ascending Dose Study to Evaluate the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of BMS-986120 in Healthy Subjects and the Effects of Co-Administration of Midazolam and BMS-986120. ClinicalTrials. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fclinicaltrials.gov%2Fct2%2Fshow%2FNCT02208882&date=2018-07-26> Son Erişim Tarihi 26.07.2018.
109. French S.L., Hamilton J.R. (2016). Protease-activated receptor 4 : from structure to function and back again. *British Journal of Pharmacology*. 173(20), 2952–2965.
110. Suh J.-W., Lee S.-P., Park K.-W., Lee H.-Y., Kang H.-J., Koo B.-K., Cho Y.-S., Youn T.-J., Chae I.-H., Choi D.-J., Rha S.-W., Bae J.-H., Kwon T.-G., Bae J.-W., Cho M.-C., Kim H.-S. (2011). Multicenter Randomized Trial Evaluating the Efficacy of Cilostazol on Ischemic Vascular Complications After Drug-Eluting Stent Implantation for Coronary Heart Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 57(3), 280–289.
111. Diener H.C., Cunha L., Forbes C., Sivenius J., Smets P., Lowenthal A. (1996). European stroke prevention study 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. *Journal of the Neurological Sciences*. 143(1–2), 1–13.
112. İnternet: Zwicker, J. Cancer Associated Thrombosis and Isoquercetin (CAT IQ) (CAT IQ). ClinicalTrials. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fclinicaltrials.gov%2Fct2%2Fshow%2FNCT02195232&date=2018-06-24>, Son Erişim Tarihi: 24.06.2018.
113. Bartunek J., Barbato E., Heyndrickx G., Vanderheyden M., Wijns W., Holz J.B. (2013). Novel antiplatelet agents: ALX-0081, a nanobody directed towards von Willebrand factor. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 6(3), 355–363.
114. İnternet: Ablynx. Phase III Trial With Caplacizumab in Patients With Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. ClinicalTrials. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fclinicaltrials.gov%2Fct2%2Fshow%2FNCT02553317&date=2018-06-24>, Son Erişim Tarihi: 24.06.2018.
115. Lei X., Reheman A., Hou Y., Zhou H., Wang Y., Marshall A.H., Liang C., Dai X., Li B.X., Vanhoorelbeke K., Ni H. (2013). Anfibatide, a novel GPIIb complex

- antagonist, inhibits platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo in murine models of thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 111(2), 279–289.
116. İnternet: Lee's Pharmaceutical Limited. Anfibatide Phase Ib-IIa Clinical Trial. ClinicalTrials. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fclinicaltrials.gov%2Fct2%2Fshow%2FNCT01585259&date=2018-06-24>, Son Erişim Tarihi: 24.06.2018.
 117. Bigalke, B; Stellos, K; Geisler, T; Kremmer, E; Seizer, P; May, A E; Lindemann, S; Melms, A; Luft, A; Gawaz M. (2010). Expression of platelet glycoprotein VI is associated with transient ischemic attack and stroke. *European Journal of Neurology*. 17(1), 111–117.
 118. Induruwa I., Jung S.M., Warburton E.A. (2016). Beyond antiplatelets: The role of glycoprotein VI in ischemic stroke. *International Journal of Stroke*. 11(6), 618–625.
 119. Kleinschnitz C., Pozgajova M., Pham M., Bendszus M., Nieswandt B., Stoll G. (2007). Targeting Platelets in Acute Experimental Stroke, Impact of Glycoprotein Ib , VI , and IIb / IIIa Blockade on Infarct Size , Functional Outcome , and Intracranial Bleeding. *Circulation*. 115(17), 2323–2331.
 120. Stoll G., Kleinschnitz C., Nieswandt B. (2010). Combating innate inflammation : a new paradigm for acute treatment of stroke ? *Annals of The New York Academy of Sciences*. 1207, 149–154.
 121. Pachel C., Mathes D., Arias-Loza A., Heitzmann W., Nordbeck P., Deppermann C., Lorenz V., Hofmann U., Nieswandt B. F.S. (2016). Inhibition of Platelet GPVI Protects Against Myocardial Ischemia–Reperfusion Injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 36(4), 629–635.
 122. Goebel S., Li Z., Vogelmann J., Holthoff H., Degen H. (2013). The GPVI-Fc Fusion Protein Revacept Improves Cerebral Infarct Volume and Functional Outcome in Stroke. *PloS one*. 8(7), e66960.
 123. Ungerer M., Rosport K., Bultmann A., Piechatzek R., Uhland K., Schlieper P., Gawaz M., Munch G. (2011). Novel Antiplatelet Drug Revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) Specifically and Efficiently Inhibited Collagen-Induced Platelet Aggregation Without Affecting General Hemostasis in Humans. *Circulation*. 123(17), 1891–1899.
 124. İnternet: Poppert, H. Revacept in Symptomatic Carotid Stenosis (Revacept/CS/02). ClinicalTrials. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fclinicaltrials.gov%2Fct2%2Fshow%2FNCT01645306&date=2018-06-24>, Son Erişim Tarihi: 24.06.2018.
 125. Massberg S., Konrad I., Bültmann A., Schulz C., Münch G., Peluso M., Lorenz M., Schneider S., Besta F., Müller I., Hu B., Langer H., Kremmer E., Rudelius M., Heinzmann U., Ungerer M. (2004). Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *FASEB Journal*. 18(2), 397–399.

126. Guedes R., Serra P., Salvador J., Guedes R. (2016). Computational Approaches for the Discovery of Human Proteasome Inhibitors: An Overview. *Molecules*. 21(7), 1–27.
127. Olgac A. (2017). *Sanal Tarama ve Farmakolojik Değerlendirme Yoluyla Yeni 5-Lipoksijenaz Aktive Edici Protein (FLAP) İnhibitörü Bileşiklerin Keşfi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
128. Hopkins A.L., Groom C.R., Alex A. (2004). Ligand efficiency: A useful metric for lead selection. *Drug Discovery Today*. 9(10), 430–431.
129. Oprea T.I., Davis A.M., Teague S.J., Leeson P.D. (2001). Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 41(5), 1308–1315.
130. Huggins D.J., Sherman W., Tidor B. (2012). Rational Approaches to Improve Selectivity in Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry*. 55, 1424–1444.
131. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. (1997). Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 23, 3–25.
132. Lipinski C.A. (2004). Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*. 1(4), 337–341.
133. Hughes J.P., Rees S.S., Kalindjian S.B., Philpott K.L. (2011). Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*. 162(6), 1239–1249.
134. Petterson I., Balle T., Liljefors T. (2010). Ligand Based Drug Design. In: *Textbook of Drug Design and Discovery*. , 43–57 (2010).
135. Koutsoukas A., Simms B., Kirchmair J., Bond P.J., Whitmore A. V., Zimmer S., Young M.P., Jenkins J.L., Glick M., Glen R.C., Bender A. (2011). From in silico target prediction to multi-target drug design: Current databases, methods and applications. *Journal of Proteomics*. 74(12), 2554–2574.
136. Tanimoto T.T. (1958). *An Elementary Mathematical Theory of Classification and Prediction*. New York: International Business Machines Corporation.
137. van der Kamp M.W., Shaw K.E., Woods C.J., Mulholland A.J. (2008). Biomolecular simulation and modelling: status, progress and prospects. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. 5 Suppl 3(July), S173--90.
138. Jhoti H., Leach A.R. (2007). Scoring Functions. In: *Structure-Based Drug Discovery*. Springer, 223–245 (2007).
139. Jorgensen F.S., Kastrop J.S. (2010). Biostructure Based Modeling. In: *Textbook of Drug Design and Discovery*. , 29–42 (2010).
140. Horii K., Kahn M.L., Herr A.B. (2006). Structural basis for platelet collagen

- responses by the immune-type receptor glycoprotein VI. *Blood*. 108(3), 936–942.
141. Small-Molecule Drug Discovery Suite 2017-1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
 142. Schrödinger Release 2017-1: Schrödinger Suite 2017-1 Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
 143. Schrödinger Release 2017-1: Sitemap, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
 144. Ono K., Ueda H., Yoshizawa Y., Akazawa D., Tanimura R., Shimada I., Takahashi H. (2010). Structural basis for platelet antiaggregation by angiotensin II type 1 receptor antagonist losartan (DuP-753) via glycoprotein VI. *Journal of medicinal chemistry*. 53(5), 2087–2093.
 145. Kato-Takagaki K., Mizukoshi Y., Yoshizawa Y., Akazawa D., Torii Y., Ono K., Tanimura R., Shimada I., Takahashi H. (2009). Structural and interaction analysis of glycoprotein VI-binding peptide selected from a phage display library. *Journal of Biological Chemistry*. 284(16), 10720–10727.
 146. Schrödinger Release 2017-1: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
 147. Bhunia S.S., Misra A., Khan I.A., Gaur S., Jain M., Singh S., Saxena A., Dikshit M., Saxena A.K. (2017). Novel Glycoprotein VI Antagonists as Antithrombotics: Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling Studies on 2,3-Disubstituted Tetrahydropyrido(3,4 - b)indoles. *Journal of Medical Chemistry*. 60(1), 322–337.
 148. Schrödinger Release 2017-1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
 149. Schrödinger Release 2017-1: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
 150. Born G.V.R., Cross M.J. (1963). The Aggregation of Blood Platelets. *The Journal of Physiology*. 168(1), 178–195.
 151. Jiang P., Jandrot-Perrus M. (2014). New advances in treating thrombotic diseases: GPVI as a platelet drug target. *Drug discovery today*. 19(9), 1471–1475.
 152. Taylor L., Vasudevan S.R., Jones C.I., Gibbins J.M., Churchill G.C., Campbell R.D., Coxon C.H. (2014). Discovery of novel GPVI receptor antagonists by structure-based repurposing. *PloS one*. 9(6), e101209.
 153. Pitt B., Segal R., Martinez F.A., Meurers G., Cowley A.J., Thomas I., Deedwania P.C., Ney D.E., Snively D.B., Chang P.I., Investigators S. (1997). Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of Losartan in the Elderly Study , ELITE). *The Lancet*. 349, 747–752.
 154. Hammon J.W., Oates J.A. (1986). Interaction of platelets with the vessel wall in the pathophysiology of sudden cardiac death. *Circulation*. 73(2), 224–227.
 155. Chlopicki S., Koda M., Chabielska E., Buczek W., Gryglewski R. (2000).

- Antiplatelet Action of Losartan Involves TXA₂ Receptor Antagonism But Not TXA₂ Synthase Inhibition. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 51(4), 715–722.
156. Grothusen C., Umbreen S., Konrad I., Stellos K., Schulz C., Schmidt B., Kremmer E., Teebken O., Massberg S., Luchtefeld M., Schieffer B., Gawaz M. (2007). EXP3179 Inhibits Collagen-Dependent Platelet Activation via Glycoprotein Receptor-VI Independent of AT₁-Receptor Antagonism Potential Impact on Atherothrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 27(5), 1184–1190.
 157. Jiang P., Loyau S., Tchitchinadze M., Ropers J., Jondeau G., Jandrot-Perrus M. (2015). Inhibition of Glycoprotein VI Clustering by Collagen as a Mechanism of Inhibiting Collagen-Induced Platelet Responses: The Example of Losartan. *PloS one*. 10(6), e0128744.
 158. Murad J.P., Espinosa E.V.P., Ting H.J., Khasawneh F.T. (2012). Characterization of the in vivo antiplatelet activity of the antihypertensive agent losartan. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 17(3), 308–14.
 159. Yanagihara Y., Kasai H., Matsui S., Kenji N. (1989). Immunopharmacological Studies on TBX, a New Antiallergic Drug (3) Inhibitory Effects on Histamine Release from Lung Fragments and Bronchoconstriction in Guinea Pigs. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 51(1), 83–92.
 160. Miyazawa N., Umemura K., Kondo K., Nakashima M. (1997). Effects of pemirolast and tranilast on intimal thickening after arterial injury in the rat. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 30(2), 157–162.
 161. Ohsawa H., Noike H., Kanai M., Hitsumoto T., Aoyagi K., Sakurai T., Sugiyama Y., Yoshinaga K., Kaku M., Matsumoto J., Iizuka T., Shimizu K., Takahashi M., Tomaru T., Sakuragawa H., Tokuhiko K. (2003). Preventive effect of an antiallergic drug, pemirolast potassium, on restenosis after stent placement: quantitative coronary angiography and intravascular ultrasound studies. *Journal of Cardiology*. 42(1), 13–22.
 162. Evers S., Heuel T., Frese A., Akova-Oztürk E., Husstedt I. (2006). The impact of different antimigraine compounds on platelet and erythrocyte aggregation. *Cephalalgia*. 26(8), 920–924.
 163. Lecut C., Arocas V., Ulrichs H., Elbaz A. (2004). Identification of residues within human GPVI involved in the binding to collagen: Evidence for the existence of distinct binding sites. *Journal of Biological Chemistry*. 33.
 164. Kim S., Hamaguchi A., Shinkawa T., Kato Y., Tsuchiya N., Miura K., Ohta K., Iwao H. (1996). Molecular effects of M17055, furosemide and thiazide on cardiac hypertrophy of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 279(2), 983–990.
 165. Hughan S.C., Hughes C.E., McCarty O.J.T., Schweighoffer E., Soultanova I., Ware

J., Tybulewicz V.L.J., Watson S.P. (2007). GPVI potentiation of platelet activation by thrombin and adhesion molecules independent of Src kinases and Syk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 27(2), 422–429.

EKLER

EK-1. Etik kurul onayı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU

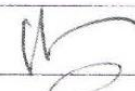
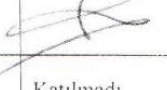
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara
	TELEFON	0312 202 69 58
	FAKS	0312 202 46 73
	E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Platelet Agregasyonunda Glikoprotein VI (GPVI) Yolağının Moleküler Etki Mekanizmasının Araştırılması			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Yeşim ÖZKAN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI /UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi			
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)				
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya,mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji kolleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene tetkik tahlil ve tedavi işlemleri sırasında (önceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar- Doktora Tezi			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

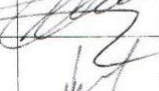
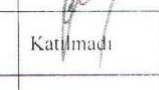
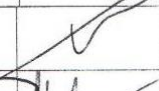
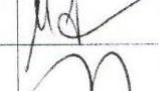
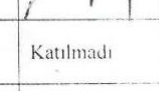
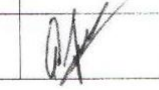
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Ver.No	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	29.01.2016	1	Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	29.01.2016	1	Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		☒		
	BİYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU		☐		
	DİĞER		☐		

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 69	Toplantı tarihi: 08.02.2016
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve "bütçesi dışında" uygun bulunmuş olup, araştırma dosyasında belirtilen merkez/merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, G.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi TÜBİTAK tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, TÜBİTAK kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.	

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik (13.04.2013), İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof.Dr.Sezai ŞAŞMAZ							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Sezai ŞAŞMAZ BAŞKAN	Deri ve Zührevi Hast. AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Zeki YILDIRIM BAŞKAN YARD.	Göğüs Hast. AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Tolga Reşat AYDOS RAPORTÖR	Tıbbi Farmakoloji A.D	B.Ü.T.F.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı

EK-1. (devam) Etik kurul onayı

Prof.Dr.İrfan KARAGÖZ ÜYE	Biyomedikal Kalibrasyon ve Araşt. Merkezi Müdürü	G.Ü.M.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Öznur Leman BOYUNAĞA ÜYE	Radyoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Rukiye Filiz KARADAĞ ÜYE	Psikiyatri AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Tarihi ve Etiği AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Mine Esin OCAKTAN ÜYE	Halk Sağlığı AD.	A.Ü.T.F.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Nuriye ÖZDEMİR ÜYE	İç Hast. AD, Tıbbi Onkoloji BD.	Y.B.Ü.T.F.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Murat AKIN ÜYE	Genel Cerrahi A.D	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Mustafa ARSLAN ÜYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Tugba HIRFANOĞLU ÜYE	Çocuk Sağlığı ve Hast.AD.Ç.Nör. BD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Av.Arzu BUZKIRAN KAYA ÜYE	Avukat	G.Ü.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Özlem BOĞOÇLU ÜYE	Sivil Temsilci	G.Ü	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

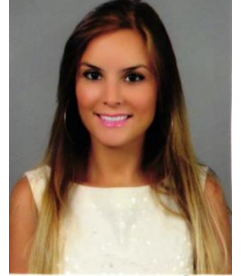
* :Araştırma ile İlişki

** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : OLĞAÇ, Simla
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 30/08/1987 - Edirne
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 05324543218
 Faks : 03129200271
 e-mail : csimla@gazi.edu.tr



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya ABD	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD	2011
Lisans	Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2008
Lise	Özel Bahçeşehir Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012-Devam ediyor	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	Araştırma Görevlisi
13.03.2017-12.04.2017	Birmingham Üniversitesi Kardiyovasküler Bilimler Enstitüsü	Araştırmacı
01.01.2015-30.06.2016	Evias İlaç Ar & Ge Yaz Dan Tic Ltd Şti	Araştırmacı (Yarı-zamanlı)

Yabancı Dil

İngilizce (İyi)

Burs

British Society for Haemostasis & Thrombosis (BSHT), 2017.

SCI-Makaleler

Yurttaş L, Abu Mohsen U, Ozkan Y, **Cobanoglu S**, Levent S, Kaplancikli ZA. Synthesis and biological evaluation of some dibenzofuran-piperazine derivatives. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2016; 31(6): 1177–1183.

Yamalı C, Gulcan HO, Kahya B, **Cobanoglu S**, Sukuroglu MK, Dogruer DS. Synthesis of some 3(2H)- pyridazinone and 1(2H)-phthalazinone derivatives incorporating aminothiazole moiety and investigation of their antioxidant, acetylcholinesterase, and butyrylcholinesterase inhibitory activities. Medicinal Chemistry Research, 2015; 24(3): 1210–1217.

Bildiriler

Olgac S, Olgac A, Ozkan Y. In Vitro Antiplatelet Studies on Virtually Discovered GPVI Drug Candidates, 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Türkiye, 2018. Sözlü bildiri.

Kucukboyaci N, Ozkan Y, **Olgac S**, Sener B. Antiplatelet Activity of Lignans from Taxus Baccata, 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Türkiye, 2018. Poster bildirisi.

Kucukboyaci N, Calis I, Ozkan Y, **Olgac S**. Antiplatelet Activity of Isolated Flavonols from Salsola Grandis Aerial Parts, 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Türkiye, 2018. Poster bildirisi.

Olgac S, Olgac A, Ozkan Y. Investigation of Novel Platelet Receptor GPVI Inhibitor Candidates, 2nd International Gazi Pharma Symposium Series, Ankara, Türkiye, 2017. Poster bildirisi.

Olgac S, Olgac A, Ozkan Y. Structure-based Virtual Screening to Discover Platelet GPVI Inhibitors, European Platelet Network, Bad Homburg, Almanya, 2016. Poster bildirisi.

Olgac S, Olgac A, Ozkan Y. Screening FDA Approved Drugs to Discover Potent GPVI Inhibitors, XXIV National Meeting in Medicinal Chemistry, Perugia, İtalya, 2016. Poster bildirisi.

Olgac A, Budak G, **Olgac S**, Nuti R, Carotti A, Banoglu E. Evias Web Services: Cloud-Based Drug Discovery Platform, 21st European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationship, Verona, İtalya, 2016. Sözlü bildiri.

Olgac A, Budak G, **Olgac S**, Nuti R, Carotti A, Banoglu E. Evias Cloud Based Drug Discovery Platform, High-Performance Modelling and Simulation for Big Data Applications - Management Committee & Working Group Meeting (EU-COST), Dublin, İrlanda, 2016. Davetli konuşmacı.

Vienna Summer School on Drug Design, Vienna, Austria, 2015.

Gazi Pharma Symposium Series, Antalya, Türkiye, 2015.

Altınay A, Tulmac M, **Cobanoglu S**, Kısa U, Simsek B, Ozkan Y. Homocysteine Thiolaconase and LDL Oxidation in Coronary Atherosclerosis, XXV. National Biochemistry Congress, İzmir, Türkiye, 2013. Poster bildirisi.

Araştırma Projeleri

Platelet Agregasyonunda Glikoprotein VI (GPVI) Yolağının Moleküler Etki Mekanizmasının Araştırılması, 2017, TÜBİTAK kodu 216S637. (Doktora Tezi)

Chrysophthalmum montanum (DC.) Boiss Bitkisinin Biyolojik Aktiviteleri Bakımından İncelenmesi, 2017, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje Kod No: 02/2017-11.

Bulutta Yüksek Performanslı İlaç Sanal Tarama Servisi, 2015, TÜBİTAK kodu 7141231.

Deneyisel Olarak Ateroskleroz Oluşturulmuş Sıçanlarda L-Argininin TAS, TOS ve Oksidatif Stres İndeksine Etkisi, 2011, TÜBAP tarafından desteklenmiştir (Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi). (Yüksek Lisans Tezi)

Seminerler

Virtual Screening Studies Against Glycoprotein VI, Birmingham Üniversitesi, Kardiyovasküler Bilimler Enstitüsü, Birmingham, UK, Nisan 2017.

GPVI'nın Trombozdaki Rolü, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye, Ocak 2017.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..