

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KUMARİNLERİN KARBON KANALIZASYONUNUN ZORLUK
KONDAKARİNHİBİTÖR AKTİVİTELERİNİN QSAR
MODELEME**

Mehmet KIYTAK

F Z KANABİLİM DALI

ANLIURFA

2012

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KUMARİLERİN KARBON KANLI DRAZ CA-XII ZODİYAK
MİKROKARBON İZOTOP AKTİVİTELERİNİN QSAR
MODELLEMESİ**

Mehmet KIYTAK

F Z KANABİLİM DALI

ANLIURFA

2012

Yrd. Doç. Dr. Selami PALAZ danı manlı ında, Mehmet KIYTAK'ın hazırladı ı
“Kumarinlerin Karbonik Anhidraz CA-XII zo-enzimine Kar ı nhibitör Aktivitelerinin
QSAR modellemesi” konulu bu çalı ma 22/06/2012 tarihinde a a ıdaki jüri tarafından
Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi
olarak kabul edilmi tir.

Danı man: Yrd. Doç. Dr. Selami PALAZ

Üye: Yrd. Doç. Dr. Erol ERO LU

Üye: Yrd. Doç. Dr. Devrim TARHAN

**Bu Tezin Fizik Anabilim Dalında Yapıldı ını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendi ini
Onaylarım**

**Prof. Dr. Mehmet C C
Enstitü Müdürü**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve ba ka kaynaktan yapılan bildiri lerin, çizelge, ekil ve foto rafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Ç İNDEK İLER

Sayfa No

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TE EK KÜR.....	iii
Ç ZELGELER D Z N	iv
EK LLER D Z N	v
S MGELER D Z N	vi
1. G R	1
2. ÖNCEK ÇALI MALAR VE KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1. Karbonik Anhidraz.....	4
2.2. Karbonik Anhidraz nhibitörleri.....	8
2.3 Karbonik Anhidraz enzimi ile yapılmı QSAR çalı maları.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	12
3.1. Giri	12
3.2. Moleküllerin yapı ve fiziko-kimyasal özelliklerinin hesaplanması.....	13
3.3. Moleküler Schrödinger Denklemi.....	14
3.4. Born-Oppenheimer Yakla ıklı 1.....	15
3.5. Moleküler Orbitaler.....	18
3.6. Varyasyon lkesi.....	19
3.7. Ab initio Yöntemler.....	20
3.7.1. Hartree-Fock yöntemi.....	21
3.7.2. Yo unluk fonksiyonel teorisi.....	23
3.8. Baz Kümeleri.....	25
3.9. QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationship - Kantitatif Yapı-Etki Analizleri.....	27
4. ARA TIRMA BULGULARI VE TARTI MA.....	32
4.1. Giri	32
4.2. CA-XII inhibitörü Kumarinlerin QSAR modelleri.....	32
4.3. QSAR modellerin üzerine tartı ma.....	43
5. SONUÇLAR VE ÖNER LER.....	45
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇM	52
ÖZET.....	53
SUMMARY.....	55

ÖZ

Yüksek Lisans Tezi
**KUMARINLERİN KARBONİK ANHİDRAZ CA-XII İZOMERİNE KARŞI
BİYOKİMYASAL AKTİVİTELERİNİN QSAR MODELLEMESİ**

Mehmet KIYTAK

**Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Fizik Anabilim Dalı**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Selami PALAZ
Yıl:2012, Sayfa:56**

Bu tez çalışmasında 27 adet Kumarin türevi molekülün, Karbonik Anhidraz, CA-XII izo-enzimine karşı deneysel yolla ölçülmüş biyolojik aktivite değerleri kullanılarak, QSAR (Kantitatif Yapı-etki Analizi) çalışması yapıldı. Çalışmada Kumarinlerin üç boyutlu yapıları ve bir çok moleküler parametreleri Gaussian 03 yazılımı ile hesaplandı. Elde edilen bu yapılar CodessaPro yazılımına yüklenerek çok sayıda moleküler tanımlayıcı (descriptor) hesaplandı. Hesaplanan moleküler tanımlayıcılarla literatürden alınan deneysel yolla ölçülmüş biyolojik aktivite verileri Codessa yazılımı kullanılarak Çoklu Lineer Regresyon (CLR) ile ilişkilendirilerek bir çok QSAR denklemi elde edildi.

Elde edilen QSAR denklemleri arasında istatistik parametreleri en yüksek olan; $R^2 = 0.93$ ve $R^2_{CV} 0.90$ dır. Elde edilen QSAR modellerinin yorumuyla, biyolojik aktiviteye etki eden faktörler açıklanmaya çalışıldı.

ANAHTAR KELİMELER: Karbonik Anhidraz, Kumarin, QSAR, Çoklu Lineer Regresyon

ABSTRACT

MSc Thesis
QSAR STUDY OF COUMARIN DERIVATIVES AS CARBONIC ANHYDRASE CA-XII ISOZYME INHIBITORS

Mehmet KIYTAK

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Physics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Selami PALAZ
Year: 2012, Page:56

This study presents Quantitative Structure Activity Relationships (QSAR) study on a pool of 27 Coumarin compounds as Carbonic Anhydrase (CA-XII) isozyme inhibitors. 3D structure and many molecular properties of Coumarin compounds have been calculated by Gaussian 03 software. Several molecular descriptors have been calculated and QSAR models have been drawn up with the help these calculated descriptors and Carbonic Anhydrase (CA-XII) inhibitory data of the molecules by using the Multiple Linear Regression (MLR) technique which is implemented in CODESSA PRO software.

Among the obtained QSAR models presented in the study, statistically the most significant one is a four parameters linear equation with the squared correlation coefficient R^2 values of ca. 0.93 and the squared cross-validated correlation coefficient R^2_{CV} values of ca. 0.90. The results were discussed in the light of the main factors that influence the inhibitory activity of the Carbonic Anhydrase (CA-II) isozyme. The obtained models allowed us to reveal some structural factors, which are strongly correlated with the biological activity of the compounds.

KEY WORDS: Carbonic Anhydrase, QSAR, Coumarin, Multiple Linear Regression

TE EKKÜR

Bu tez çalı masının hazırlanması sırasında, sa ladı ı rahat çalı ma ortamı ile birlikte elinden gelen hiç bir yardımı esirgemeyen, danı manım Sayın Yrd. Doç. Dr. Selami PALAZ' a te ekkürü bir borç bilirim.

EK LLER D Z N

	Sayfa No
ekil 2.1 Karbonik Anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri.....	5
ekil 2.2 Karbonik anhidraz enziminin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunun kataliz mekanizmasının ematik gösterilisi.....	7
ekil 2.3. Karbonik Anhidraz inhibitörü ilaçların kimyasal yapısı.....	8
ekil 2.4 X-1 ınları çalı masına göre Kumarin'in <i>cis</i> -2-hydroxycinnamic aside dönü erek CA-II'nin aktif bölgesin a zına tutunmu hali.....	9
ekil 2.5 Literatürdeki QSAR çalı malarında kullanılan Karbonik Anhidraz inhibitörü sülfonamidlerin türevi moleküllerin yapıları.....	10
ekil 4.1. QSAR çalı masında kullanılan 27 adet Kumarin türevleri	33
ekil 4.2 I nolu QSAR modeline göre deneysel aktivitenin hesaplanmı aktiviteye kar ı grafı i.....	37
ekil 4.3 QSAR modelinin validasyonu: A+B training set (kare) ve C test set (üçgen).....	37
ekil 4.4 QSAR modelinin validasyonu: B+C training set (kare) ve A test set (üçgen).....	38
ekil 4.5 QSAR modelinin validasyonu: C+A training set (kare) ve B test set (üçgen).....	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. Baz kümeleri	27
Tablo 4.1 QSAR modellerinde yer alan moleküler tanımlayıcılar, Kumarin moleküllerinin deneysel LogKi, I, II ve III nolu modellerle hesaplanan Log-Ki biyolojik aktivite değerleri.....	39
Tablo 4.2 27 Kumarin türevlerinin CA-XII izo-enzimine karşı aktivitelerinin (Ki) Çoklu Lineer Regresyon QSAR modelleri.....	40
Tablo 4.3 QSAR modellerinin validasyonu.....	41
Tablo 4.4 QSAR modellerinde olan moleküler tanımlayıcıların inter-korrelasyonu.....	42

S İMGELER D Z N

AOÇB	Atomik Orbitallerin Çizgisel Birle imi
CA	Karbonik Anhidraz
HCA	Human Karbonik Anhidraz
YFT	Yo unluk Fonksiyonel Teori
HF	Hartree-Fock
MP	Moller-Plesset
MO	Moleküler orbital
STO	Slater tipi orbitaller
GTO	Gaussian tipi orbitaller
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationships
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
AM1	Austin Method 1

1.G R

1.1. Giri

Karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1) en basitinden en geli mi olana kadar do adaki tüm canlılarda var olan bir metalo-enzimdir. Bu enzimin do ada pek çok formu olmakla beraber, buldukları canlıya ba lı olarak be guruba (α -CA, β -CA, δ -CA, γ CA ve ε -CA) ayrılmı tır. Bu guruplardan α -Karbonik anhidraz memelilerde bulunur ve temel fonksiyonu kanda ve di er dokularda



reaksiyonunu katalize etmek vasıtası ile asit baz dengesini ayarlamak ve dokulardan karbondioksit transferini sa lamaktır. Karbonik anhidrazın bio-aktif bölgesinde Çinko (Zn^{+2}) atomu vardır. Bu enzimin inhibisyon ve aktivasyon mekanizması Zn^{+2} atomu üzerindedir. Zn^{+2} atomu enzim içerisinde üç farklı Histidin ile (örne in CAII izo-enziminde His94, His96 ve His119) tek ba ve su/hidroksil iyonu ile de dördüncü ba olmak üzere tetrahedral geometridedir. nhibasyon veya aktivasyon mekanizması genellikle inhibitör veya aktivatörün N atomu üzerinden enzimin aktif sitesindeki çinkodaki su/hidroksil iyonunun yerini alması ekinde gerçekleşir (SUPURAN ve W NUM, 2009).

u ana kadar insandan hücre içerisindeki lokalizasyonu farklı ve yapısal olarak bir birine benzer 15 farklı Karbonik Andidraz izo-enzim belirlenmi tir. Bunlardan CA IX, CA XII ve CA XIV izo-enzimlerinin lokalizasyonu trans memberan olup inhibasyonu anti kanser etki ile ili kilendirilmektedir. Bunlardan CA IX di er ikisiyle kıyaslandı ında dokuda en fazla miktarda bulunan izo-enzimdir. Bununla beraber, lokalizasyonu sitozol olan CA I, CA II, CA III, CA VII, CA VIII, CA X, CA XI, CA XIII ve di er lokalizasyonlarda olan (CA IV; plasma membranı, CA VA ve CA VB; mitokondri, CA VI; secreted milk/saliva) izo-enzimler içerisinde insanda en fazla olan izo-enzim CA II'dir. Hâlihazırda, CA II izo-enzimini inhibe etmekle etki gösteren, glokom ve düretik tedavisi ba ta olmak üzere birçok hastalı ın tedavisinde kullanılan sülfonamid tabanlı altı adet ticari ilaç vardır. Ancak bu ilaçların hepsinin sistematik yan etkileri mevcuttur. Yan etkilerin en önemli sebebi

bu ilaçların CA II dı nda di er izo-enzimleri de inhibe ediyor olmalarıdır (SUPURAN, 2004; CONWAY, 2004; SCOZZAFAVA, 2004).

Bu nedenle bir reseptör olarak Karbonik Anhidraz enziminin inhibasyonu ile etki eden ilaçların geli tirilmesinde istenilen etkinin yanında istenmeyen yan etkilerin ortadan kaldırılabilmesi için izo-enzim seçici inhibitörlerin dizayn edilmesi hayati önem ta ır. Son zamanlara kadar, geleneksel olarak sülfonamidler ba ta olmak üzere fenol, sulfamate bile ikleri inhibitör olarak çalı ılmı tır (SUPURAN, 2010). Son olarak Kumarin türevlerinin de Karbonik Anhidraz enzimine kar ı inhibitör etkisinin oldu u ke fedilmi tir. Bu ke fin en önemli tarafı di er gruplardaki inhibitörlerden çok farklı bir mekanizma ile çalı ıyor olmasıdır. Ayrıca Kumarin türevlerinin di er inhibitör gruplarına göre daha fazla izo-enzim seçicili i gözlenmi tir (SUPURAN ve ark., 2009; SUPURAN ve ark., 2010).

Yukarıda bahsedilen Kumarin türevi moleküllerin Sülfonamidlerden farklı bir mekanizma ile bu CA enzimini inhibe etti i ortaya çıktı. Sülfonamidler enzimin aktif bölgesindeki Zn atomu ile direkt ba yaparak etki gösterirken, Kumarinlerin Zn ile direkt ba yapmaksızın enzimin aktif sitesinin a zına bir kapak gibi yerle erek enzimik reaksiyonu inhibe etti i rapor edildi. Ayrıca bu yeni ke fedilen Kumarin türevi moleküllerin farklı CA izo-enzimlerini seçici ekilde inhibe etti i de gözlemlendi (SUPURAN ve ark., 2010). Geleneksel olarak inhibasyon ara tırmalarında en yo un ekilde çalı ılan sülfonamid tabanlı bile iklerin seçicili ine kıyasla Kumarin türevi moleküllerin daha seçici olması, çalı maların bu alana kaymasına sebep olaca ı dü ünülebilir. Burada bahsedilen CA izo-enzimlerinden bazılarının seçici inhibasyonu bazı hastalıkların tedavisinde kullanılacak ilaçların geli tirilmesinde temel bir yoldur. Bunlardan CA IX, CA XII ve CA XIV izo-enzimlerinin lokalizasyonu trans membran olup, bu izo-enzimlerin seçici inhibasyonu anti kanser ilaçlarının geli tirilmesinde hedef enzim olarak çalı ılmaktadır (SUPURAN, 2008).

Günümüzde QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship - Kantitatif Yapı-Etki Analizleri) etkisi yüksek ve yan-etkisi az ilaçların geli tirilmesi çalı malarında vazgeçilmez ve yaygın bir yöntemdir. QSAR metodunun temeli,

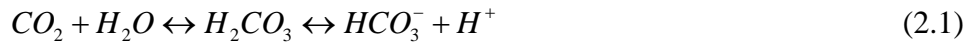
halihazırda biyolojik etkisi (ilaç etkisi) deneysel olarak ölçülmü bir grup molekülü kullanarak, bu moleküllerin biyolojik etkisine artırıcı yada azaltıcı yönde katkı yapan moleküler parametrelerin istatistiksel analiz metotları kullanılarak tespit edilmesi esasına dayanır. Biyolojik etkiyi artırıcı veya azaltıcı yönde etki eden moleküler parametreler bir kere belirlendikten sonra, istenildi i kadar sanal molekül bilgisayar ortamında olu turularak bu moleküllerin ilgili parametreleri hesaplanması yoluyla e er bu moleküller sentezlenecek olursa deneysel olarak gösterece i biyolojik aktiviteyi (etkiyi) önceden hesaplamamıza imkân vermektedir.

Bu tez çalışmasında, anti-tümör ilaç geliştirme çabalarına katkı yapmak amacıyla yapıları ve biyolojik etkileri literatürde (SUPURAN ve ark., 2009) yayınlanan 30 adet Kumarin bileşiminin CA-XII izo-enzimine karşı ölçülmü inhibasyon sabiti, (K_i) kullanarak QSAR modellemesi yapılmaktadır. QSAR modelleri, çalışılan moleküllerin Gaussian 03 yazılımını kullanarak bir kuantum kimyasal yöntemle (Yönlük Fonksiyonel Teori, DFT) elde edilen üç boyutlu yapılarından üretilen kuantum kimyasal, geometrik, topolojik tanımlayıcıların (descriptors), o moleküllere ait ölçülmü deneysel K_i değerleri, CodessaPRO yazılımı ile Çoklu Regresyon Analizi (ÇRA) kullanılarak elde edilmektedir. Elde edilen QSAR modelleri yardımı ile benzer bileşiklerin K_i değerleri sentezlemeden önce istatistiksel belirlendi i sınırlar içerisinde belirlenebilir. Buda sentez alanında çalışan kimyacıların neyi sentezleyip neyi sentezlememesi gerekti i konusunda oldukça aydınlatıcı olur.

2. ÖNCEK ÇALI MALAR VE KURAMSAL TEMELLER

2.1. Karbonik Anhidraz

Karbonik anhidraz, bütün organizmalarda bulunan Zn^{+2} iyonlu bir metaloenzimdir. İlk olarak, sırt eritrositlerinde kefedilen karbonik anhidraz, canlılarda denklem 2.1'de gösterildiği gibi CO_2 'in hidrasyonunu ve HCO_3^- 'nin dehidrasyonunu katalizleyen bir enzimdir (SUPURAN ve SCOZZAFAVA, 2001).



Karbonik anhidraz enzimi, genel olarak metabolik CO_2 transportunu sağlayan yanısıra, birçok dokularda H^+ ve HCO_3^- birikiminde de rol oynamaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza ve göz lensini sayabiliriz. Bunlardan başka histokimyasal metotlarla tükürük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da CA 'ya rastlanmıştır ve bunların bazıları saflaştırılarak biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Balıkların solungaç ve salgı organlarında bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında, alglerde ve bitkilerin fotosentetik hücre kloroplastlarında bu enzimin de iki rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır (SUPURAN ve W NUM, 2009). Karbonik anhidraz yukarıda gösterilen reaksiyon dışında daha az öneme sahip birçok reaksiyonu katalize etmektedir.

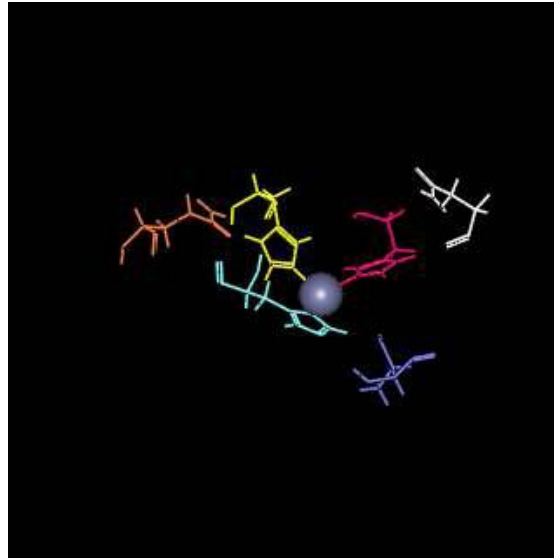
Karbonik Anhidraz'ın Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

İnsanda yedi farklı izo-enziminin gen yapısı belirlenmiştir ve bu izo-enzimlerin hayati fonksiyonlarının doku ve organlara göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Yukarıda da ifade edildiği gibi, bu dokuların çoğundan Karbonik anhidraz enzimi karakterize edilmiştir ve fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu yolla çeşitli doku ve organlarda elektrolit salgılanması, CO_2 ve pH dengesinin sağlanması, akciğer ve dokular arasındaki CO_2 / HCO_3^- transportu gibi fizyolojik olaylarda rol almalarının yanı sıra, kemik erimesi, kireçlenme, tümör oluşumu ve diğer patolojik ve fizyolojik süreçlerde de rol aldıkları açıklanmıştır (WARNOCK ve ark., 1986; SUGRUE, 1996; HEWETT-EMMETT, 2000). Karbonik anhidraz enziminin fizyolojik fonksiyonları, genel olarak insanda bulunan CA izo-enzimlerinin incelenmesi sonucu ortaya çıkarılmıştır. HCA-I izo-enzimi, insan eritrosit hücrelerinde bulunan bir

enzimdir ve insan kanından safla tırıldı ında 12 mg/g Hb olarak bulunan bir izo-enzimdir. Eritrositlerde HCA-I izo-enzimi yanında, HCA-II izo-enzimi de bulunmaktadır. Bu izo-enzimlerin en önemli fonksiyonları ise, doku kılcal damarlarından metabolizma ürünü olan CO_2 molekülünün, HCO_3 bile i ine, akci er pulmoner kapilerde ise HCO_3 'ın CO_2 ' a dönü mesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almaktadır.

Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapıları

Karbonik anhidraz izo-enzimlerinin 3 boyutlu yapılarında büyük farklılıklar gözlenmektedir. zo-enzimlerinin 3 boyutlu yapılarındaki farkın çok belirgin olmasına ra men, aktif bölgelerdeki katalitik grupların hemen hemen aynı olması dikkat çekicidir. ekil 2.1'de gösterildi i gibi, her bir izo-enzimin aktif bölgesi, yakla ık tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü ile koordine olmu Zn^{+2} iyonun kataliz olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup, uzakla tırılmasıyla elde edilen apo-CA enzimleri, tam anlamıyla aktiviteden yoksundurlar (SCHCER ve D ETSCH, 1984; L NDSKOG, 1997).

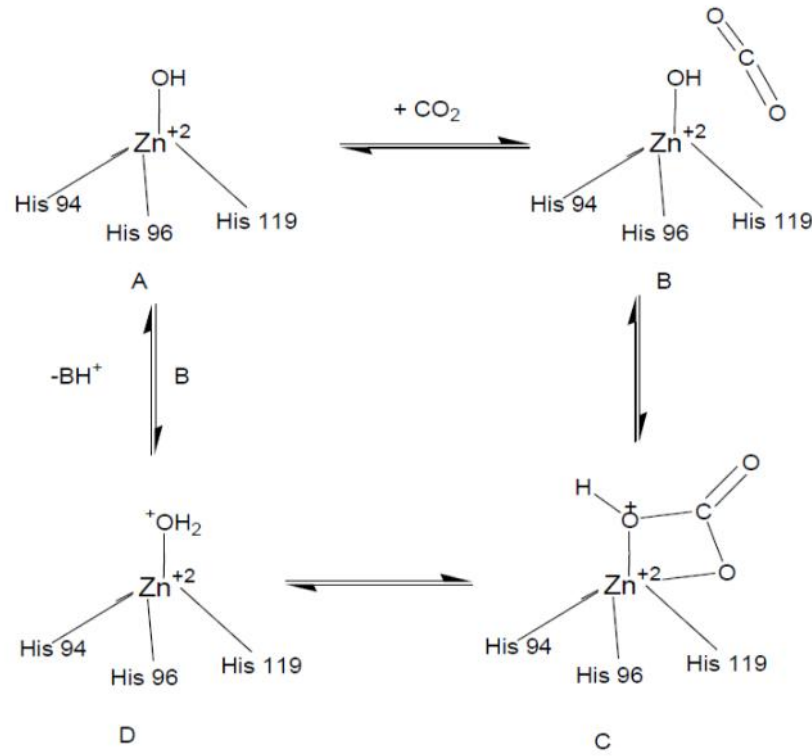


ekil 2.1. Karbonik Anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri

Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Karbonik anhidraz enziminin metabolizmada son derece önemli olması, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun artlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip oldu u anla ılmı tır. Aktif bölgesindeki Zn^{+2} iyonu ve ona ba lı bir hidroksil grubu ihtiva etmektedir. kinci

olarak da, aktif bölge yakınındaki amino asitler, proton verici ve proton gradienti olu turacak ekilde düzenlenmi lerdir (ÖZENSOY, 2006). Bu enzimin reaksiyonları katalizinde, Zn (II) iyonunun büyük önemi vardır. Yapılan X-ray kristalografi sonuçları, metal iyonunun bir H₂O veya OH⁻ iyonu ve üç histidin rezidüsü (His-94, His-96, His-119) tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki 15 Å derinli indeki bir yarı ın tabanında oldu unu göstermektedir. Ö. Özensoy (2006) yaptı ı doktora tezi çalı masında bu enzimin katalitik mekanizmasını ilgili referanslara dayandırarak u ekilde açıklamaktadır. Çinko ba lı H₂O, Glu-106' nın karboksilat grubuna sırayla köprü olu turan Thr-199' un hidroksil grubuyla, hidrojen ba ı etkile imleri sonucu tutunmaktadır. Bu etkile imler, çinko ba lı su molekülünün nükleofilitesini arttırmakta ve molekül nükleofilik atak için uygun bir yerdeki CO₂'e do ru hareket etmektedir (SUPURAN ve SCOZZAFAVA, 2001). Zn (II) iyonuna, hidroksil grubunun ba lanmasıyla enzimin aktif bir formu olu ur (ekil 2.2-A). Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla CO₂ molekülüne saldırır (ekil2.2-B). Bu da, Zn (II) iyonuna ba lanmı bikarbonat iyonunun olu masını sa lar (ekil 2.2-C). Daha sonra, HCO₃iyonu bir su molekülüyle yer de i tirir ve çözeltiye geçer. Bunu sonucunda, Zn⁺² iyonuna su molekülü ba lanır ve bu da ekil2.2-D'de görüldü ü gibi, enzimin asit formuna dönü mesini sa lar (CH R ST ANSON ve ark., 1998).



ekil 2.2 Karbonik anhidraz enziminin CO₂-hidratasyon reaksiyonunun kataliz mekanizmasınınematik gösterili i

Karbonik anhidraz IX ve XII izo-enzimleri (CA-IX ve CA-XII)

CA-IX membran ba lı izo-enzimi normal hücrelerde aktivite göstermeyip tümüyle kanserli hücrelerde ekspre olan tümör ili kili karbonik anhidraz izo-enzimidir. Bu özelli i ile potansiyel bir kanser biomarkırını olarak önem ta ır. Klasik karbonik anhidraz enzim aktivitesinin yanı sıra, hücre adezyon i leminin modülasyonu ve hypoxik çevredeki tümörün ilerleyip hücredeki artısının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (ÖZENSOY, 2006).

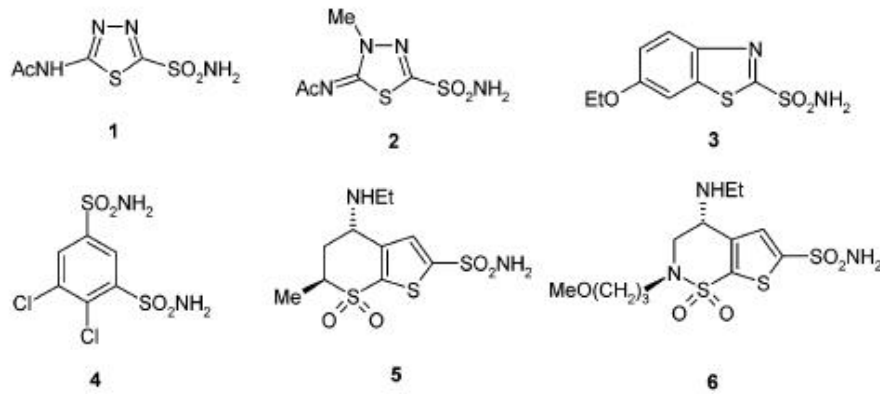
CA-IX membrana ba lı ve hücre yüzeyinde olan katı tümörlerde görüldü ü için özellikle böbrekle ilgili hücre karsinomlarında (RCC), servik, over, kolon, ba , boyun karsinomlarında ekspre olmaktadır. Hücre yüzeyinde aktivite göstermesi CO₂'in hidratasyon ve dehidratasyonu sonucunda klorür-anyon de i tiricisi olarak hücre membranında yer alması CA-IX'un HCO₃ anyonlarının tekrar sitoplazmaya ta ınmasında önemli bir rol üstlenmektedir. Bu membran ba lı tümör ili kili izo-enzimin eksrasellüler asiditeyi kontrol etti i ve böylelikle katepsin B ve matriks metaloproteaz B (MMP-9) gibi hücre yüzey proteazlarının aktivasyonuna etkimesi

bu enzimin sadece hypoxia için ayrıca kanser terapisi için de önemli olduğunu göstermektedir.

CA-IX izo-enzimden sonra ikinci olarak tümör ili kili izo-enzim olan CA-XII böbrek kanser hücrelerinde % 10 olarak ekspresyon edildiği ve Sly ve ark. tarafından kanıtlanmıştır (2001). Ivanov ve grubu tarafından klonlanan bu izo-enzim Sly ve grubu ile birlikte yeni von-Hippel-Lindau (VHL) hedefi olarak belirlenmiş ve ekspresyonunun VHL'nin doğal tipi tarafından RCC'de güçlüce inhibe edildiği ve ayrıca diğer tümör ili kili CA-IX gibi aynı regülasyona sahip olduğunu tespit edilmiştir (TÜREC ve ark., 2000; ÖZENSOY, 2006). CA-IX gibi hypoxia ile regüle edilme benzerliği olmasına karşın etkin oldukları biyokimyasal yolların farklı olduğunu anlamaktadır (SUPURAN ve ark., 2005; ÖZENSOY, 2006).

2.2. Karbonik Anhidraz inhibitörleri

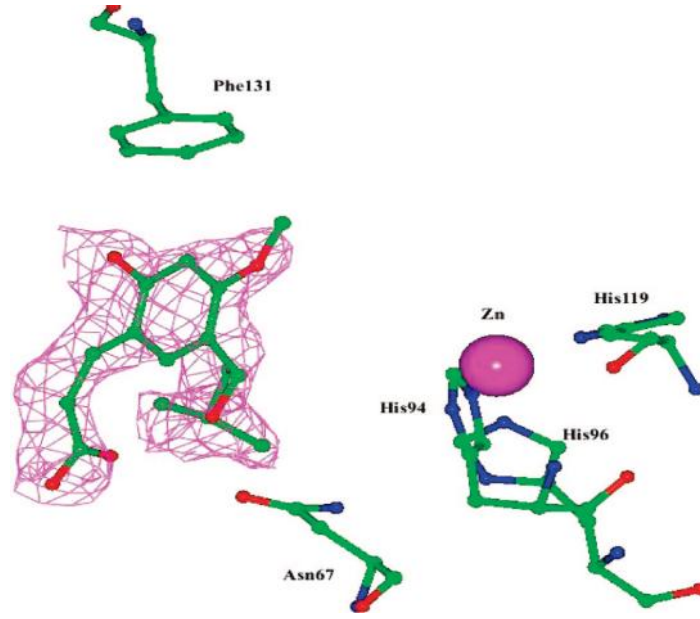
Karbonik Anhidraz inhibitörü çalışmalarını 1940' lı yıllarda başlamıştır. Hâlihazırda, CA II izo-enzimini inhibe etmekte etki gösteren, glokom ve diüretik tedavisi başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılan sülfonamid tabanlı altı adet ticari ilaç vardır. Bunlar ilaçların kimyasal yapıları ekil 3'de verilmektedir. Bunlar **1.** acetazolamide, **2.** methazolamide, **3.** ethoxzolamide, **4.** dichlorophenamide, **5.** dorzolamide, **6.** brinzolamide



ekil 2.3. Karbonik Anhidraz inhibitörü ilaçların kimyasal yapısı

Bu ilaçların inhibasyon mekanizmaları ortak olup, Karbonik Anhidraz enzimi aktif sitesinde bulunan Çinko atomu ile NH₂ grubundan bir protonun ayrılması neticesinde başlanması ile gerçekleşir. Giriş bölümünde de bahsedildiği gibi, ancak bu tez

çalı masına konu olan Kumarinlerin inhibe mekanizması sülfonamid tabanlı inhibitörlerden çok farklıdır. Maresca ve ark. (2009) kumarinlerin çinko atomu ile ba yaksızın aktif bölgenin a zını kapayarak kataliz i levini yaptı nı ortaya koydu. A. Maresca ve ark. yaptıkları, X-ı nı kırınımı çalı malarında ayrıca Kumarin'in hidralizasyon yoluyla halka yapılarının açılarak, ekil 2.4 gösterildi i gibi, *cis*-2-hydroxycinnamic aside dönü erek etki gösterdi ini belirledi.



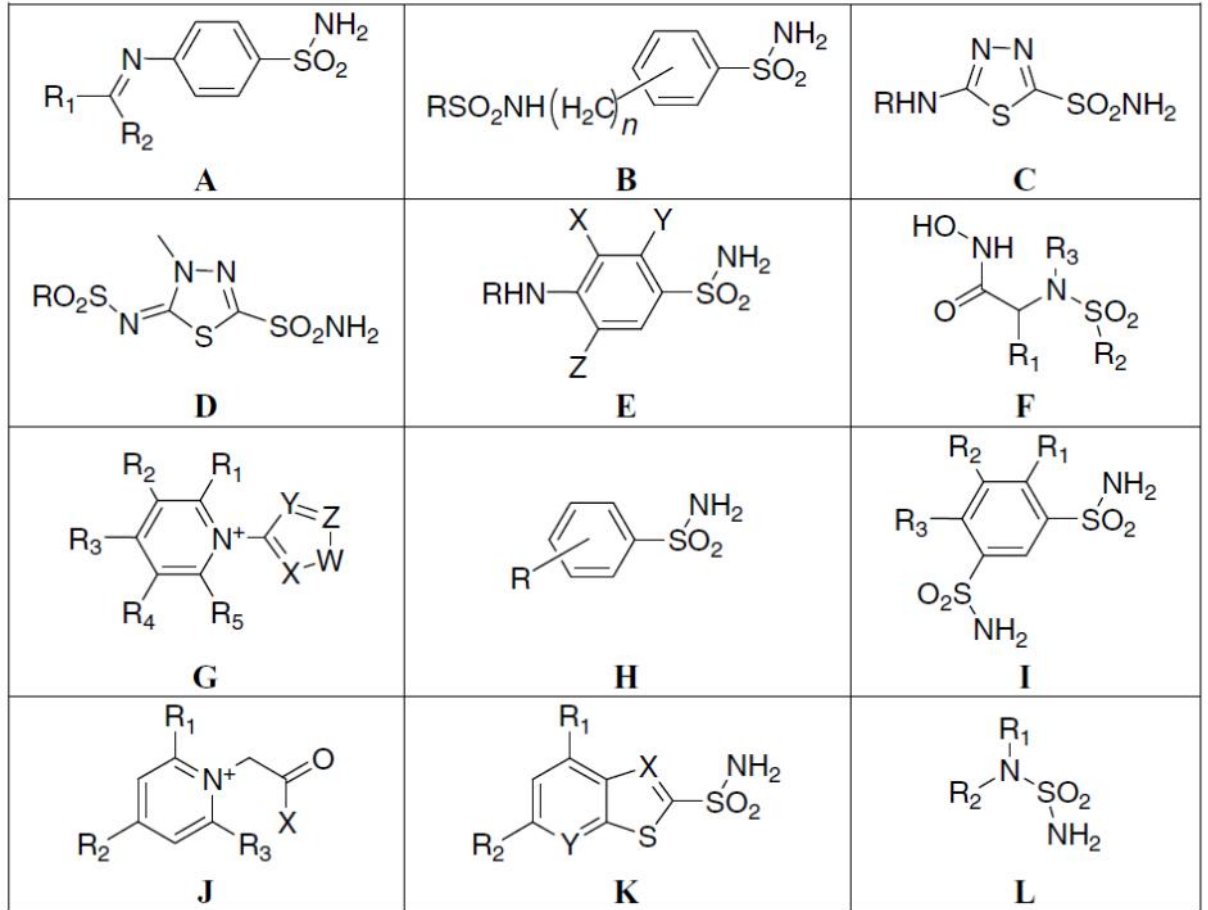
ekil 2.4 X-ı nları çalı masına göre Kumarin'in *cis*-2-hydroxycinnamic aside dönü erek CA-II'nin aktif bölgesin a zına tutunmu hali

Kumarinler

Kimyasal adı 4-hydroxycoumarin olan kumarin, ekil 2.6 da görüldü ü gibi benzopyrone kimyasal sınıfına ait bir fragment olup do ada ba ta Tonka fasulyesi (*Dipteryx odorata*) olmak üzere birçok bitkide bulunur. smini Tonka fasulyesinin Fransızcası olan “coumarou” dan alır ve güzel kokusu nedeniyle 1882’ den bu yana parfüm yapımında kullanılan bir kimyasaldır. Ayrıca alkollü içecekler ve tütünde de güzel aroması nedeniyle katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Kumarin ayrıca ilaç endüstrinde birçok ilaç yapımında ba langıç maddesi olarak kullanılmaktadır. Bunlardan bir tanesi ticari ismi Warfarin olan antikogulandır. Bunun dı nda brodifacoum, bromadiolone, coumafuryl, difenacoum, auraptene, ensaculin, phenprocoumon ve Scopoletin kumarin türevi kimyasallardır. Kumarin laboratuvar ortamında Perkin reaksiyonu ile salicyladehyde ve acetic anhydride dan elde edilebilmektedir.

2.3. Karbonik Anhidraz enzimi ile yapılmı QSAR çalı maları

Literatürde çok sayıda sulfonamid tabanlı Karbonik Anhidraz inhibitörü ligandlarla yapılmı QSAR çalı ması bulunmasına rağmen giriş bölümünde de bahsedildi i gibi Kumarin türevi moleküllerle yapılmı hiçbir QSAR çalı ması bulunmamaktadır. İmdiye kadar yapılan çalı maların tamamı sulfonamid türevleri ligandlarla yapılmı tır ve hedef izo-enzim olarak CA-I, CA-II ve CA-IX seçilmiştir. Bu çalı ma seçilen izo-enzim, CA-XII olması sebebiyle de literatür de bir ilk olacaktır. İmdiye kadar QSAR çalı malarında kullanılan ligandların genel yapısı ekil 2.5 deki gibidir.



ekil 2.5 Literatürdeki QSAR çalı malarında kullanılan Karbonik Anhidraz inhibitörü sulfonamidlerin türevi moleküllerin yapıları

Literatürdeki çalı malarda a ırlıklı olarak topolojik ve kuantum mekaniksel moleküler tanımlayıcılar kullanılmı tır (SUPURAN ve W NUM, 2009). Özellikle, topolojik moleküler tanımlayıcılar literatürde oldukça yo un ekilde kullanılmı tır

(GUPTA ve ark., 2003; SUPURAN ve ark., 2004; BAJAJA ve ark., 2004; BALABAN ve ark., 2004; JA SWAL ve ark., 2004; AGRAVAL ve ark., 2005; GUPTA ve ark., 2005; AGRAVAL ve ark., 2006; S NGH ve ark., 2006). Topolojik moleküler tanımlayıcılar arasında en sık kullanılanlar Kier, E-state, Randic, Balaban, Wiener ve Szeged indeksleridir. Kuantum mekaniksel moleküler tanımlayıcılarla yapılmı QSAR çalı malarında a ırlıklı olarak AM1 metodu ile hesaplama yapılmı tır. Birkaç çalı mada daha sofistike bir metot olan DFT (Yo unluk Fonksiyonel Teori) kullanılmı tır (CLARE ve ark., 2000;ERO LU ve ark., 2007). Milliken atomik yükleri, dipol moment, polarizabiliti tensörleri, frontier orbital enerjileri (örengin, **HOMO**; (**H**ighest **O**ccupied **M**olecular **O**rbital, **LUMO**; **L**owest **U**noccupied **M**olecular **O**rbital) sıklıkla kullanılan moleküler tanımlayıcılarıdır. Literatürdeki bazı çalı malarda molekölün topolojik moleküler tanımlayıcıların kuantum mekaniksel yolla hesaplandı ı görölmektedir (POPEL ER ve SM TH, 2006). Ayrıca popüler 3D QSAR metodu olan CoMFA ve CoMSIA teknikleri karbonik anhidraz inhibitörlerinin modellenmesinde de kullanılmı tır (H LLEBRECHT ve ark., 2006; WEBER ve ark., 2006; HUANG ve ark., 2007; H LLEBRECHT ve ark., 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Giri

Bilim insanları tarih boyunca doğaya ait fiziksel ve biyolojik özellikleri ölçmeye ve tanımlamaya başladıklarından bu yana, yaptıkları ölçümler arasında bir ilişki ortaya koymaya çalışılmışlardır. Ancak 1930'lu yıllara gelindiğinde atomik boyutta doğanın yapısı (moleküler yapı, büyüklük, elektronik özellik vs.) hakkında detaylı ölçümler ve hesaplamalar yapılabilmektedir. Hemen bunun akabinde, moleküllerin fiziksel yapılarına bağlı olarak kimyasal ve biyolojik proseslerin açıklanmasına çalışılmıştır. Bu süreçte, biyolojik çevrede bazı benzer moleküllerin ilaç ve toksik etkilerine dair pek çok benzer ölçümler yapılmış olmasına rağmen sadece birkaç çalışmada molekülün fiziksel özellikleri ile biyolojik aktivitesi arasında ilişki kurulmaya çalışılmıştır (AKI- ENER ve YALÇIN, 2003).

1960'lı yıllarda Hansch'ın (1964) geliştirdiği bir yöntemle moleküllerin fizikokimyasal özellikleri ile biyolojik aktiviteleri arasında bir ilişki olduğu ilk defa somut bir şekilde ortaya konuldu. Bundan sonra bilim adamları bir takım istatistiksel analiz yöntemleri (lineer ve kısmi kareler farkı regresyonu, küme, faktör ve temel bileşen analizi gibi) kullanarak molekülün elektronik, sterik ve hidrofobik vs. özellikleri ile biyolojik aktivitesi arasında ilişkiye dair çok sayıda çalışmalar yapmaya başladılar. Bu çalışmalara genel olarak QSAR (**Quantitative Structure-Activity Relationships**) çalışmaları denildi. Türkçe'de ise bu çalışmalar "Kantitatif Yapı-Etki Analizi" çalışmaları olarak adlandırıldı. Bu bölümde bu tez çalışmasında kullanılan moleküllerin, moleküler tanımlayıcılarının elde edilmesinde kullanılan kuantum kimyasal metodun teorik temelleri hakkında bilgi verildikten sonra, QSAR yöntemi ve sonuçlarını dördüncü bölümde vereceğimiz QSAR modellerinde yer alan moleküler tanımlayıcılar hakkında teorik temeller sunulacak ve kullanılan yazılımlar hakkında bilgi verilecek.

3.2. Moleküllerin yapı ve fiziko-kimyasal özelliklerinin hesaplanması

Atom ve moleküllerin yapılarının anlaşılması dolayısıyla bir sistemin moleküler özelliklerinin tayin edilebilmesi için kuantum mekaniğinin merkezinde bulunan Schrödinger denkleminin çözülmesi gerekir. Ancak çok az sayıda sistem (Hidrojen Atomu, Harmonik Osilatör, Kutudaki Parçacık) için Schrödinger denkleminin analitik bir çözümü mümkündür. Çok parçacıklı sistemlerde analitik çözümün mümkün olmamasının temel nedeni, elektron-elektron ve elektron çekirdek etkilemelerinin formülasyonunun tam olarak yapılamamasında yatar. Bir sistemin fiziksel ve kimyasal özellikleri bu etkilemelerle direkt ilişkilidir. Bu nedenle belirtilen etkilemelerin modellenmesinde yaklaşımların yöntemlere ihtiyaç duyulur. Yaklaşım çözüm yöntemlerinin geliştirilmesinde 1950'li yıllar hızlı bir ilerlemeye sahne olmuştur. Born-Oppenheimer (1927)'in, çok parçacıklı sistemler için toplam dalga fonksiyonunun çekirdek dalga fonksiyonuna parametrik olarak bağımlı elektronik dalga fonksiyonu biçiminde yazılabilir olduğunu ön görmesiyle birlikte yaklaşım çözüm yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır (BORN ve OPPENHEIMER, 1927). Born-Oppenheimer ayırımından sonra, çok parçacıklı sistemler için toplam enerjinin ve enerjiye bağlı olan pek çok fiziksel ve kimyasal niceliğin, Schrödinger denkleminin yaklaşım çözümüyle elde edilmesi, Hartree-Fock (1957) teorisinin geliştirilmesiyle mümkün hale gelmiştir (HARTREE ve FOCK, 1957). Bu alandaki bir sonraki adım, Moller-Plesset (MP) pertürbasyon teorisinin (1934) Hartree-Fock (HF) teorisinde kullanılması ile korelasyon etkisinin hesaba katılması ile atılmıştır (MOLLER ve PLESSET, 1934). Hohenberg ve Kohn (1964), Yoğunluk Fonksiyonel Teori (YFT) ile o güne kadar ki geleneksel yöntemlerin yapması olduğu, sistemin çok elektronlu dalga fonksiyonunu kullanarak hesaplama yapmak yerine, yer ve zamanın bir fonksiyonu olan elektron yoğunluğunu kullanarak hesaplama yapma yöntemini geliştirmiştir (KOHN ve SHAM, 1965). Bahsedilen HF ve MP *ab initio* yöntemler ve YFT ile birlikte tamamına ise first principle yöntemler olarak adlandırılmaktadırlar. *Ab-initio* yöntemlere paralel bir seyir izleyen ve yarı-deneysel yöntemler olarak isimlendirilen yaklaşım yöntemleri de vardır. Yarı-deneysel yöntemler Hückel yöntemine ve bunun geliştirilmesine dayanır.

Yaklaşım yöntemleri sonucu elde edilen çözüm, sistemin enerjisinin ve buna bağlı fiziksel niceliklerinin (dipol moment, iyonizasyon enerjisi, durumlar arasında

geçi ihtimali vb.) hesaplanmasını olanaklı kılar. Yapılan hesaplamalar sonucu elde edilen kuantum sisteminin atomik boyuttaki parametreleri ile makroskobik hacimsel (bulk) parametreleri arasında direkt ilişki mevcuttur. Bir çok nedenden dolayı *ab initio* hesaplama yapılır. Bunların başlıcaları; Kimyasal reaksiyonlarda, reaksiyon mekanizmasının anlaşılması; Bir kimyasal reaksiyon sürecinde, ara ürünlerin belirlenmesi ve bunların geçici yapılarının tayini; Molekülün geometrik yapısının ve moleküldeki yük dağılımının belirlenmesi; Molekülün optik spektrumlarının (NMR, IR, UV, Raman, ESR, vb.) belirlenmesi ve QSAR çalışması için moleküler tanımlayıcıların hesaplanması. Bu bölümde öncelikle bir molekülün Schrödinger denkleminin yaklaşık olarak çözülebilmesi için gerekli teorik temeller verilecek daha sonra QSAR'ın teorik altyapısı sunulacaktır.

3.3. Moleküler Schrödinger Denklemi

Bir molekül için zamandan bağımsız Schrödinger denklemi,

$$H\psi(r, R) = \sum_{I=1}^N -\frac{\hbar^2}{2M_I} \nabla_I^2 \psi(r, R) - \frac{\hbar^2}{2m} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 \psi(r, R) - \sum_{i=1}^n \sum_{I=1}^N \frac{e^2 Z_I}{r_{iI}} \psi(r, R) + \sum_{i=1}^n \sum_{j<i} \frac{e^2}{r_{ij}} \psi(r, R) + \sum_{I=1}^N \frac{Z_I Z_J e^2}{R_{IJ}} \psi(r, R) \quad (3.1)$$

biçimindedir. Burada $\psi(r, R)$, molekülün toplam dalga fonksiyonunu; r , elektron koordinatlarını; R , çekirdek koordinatlarını; m , elektron kütesini; M_I , I çekirdeğinin kütesini; Z_I ve Z_J sırasıyla I ve J çekirdeklerinin atom numaralarını ifade etmektedir. Denklem 3.1'i atomik birimler olarak adlandırılan yeni birimlerle tanımlamak denklemi daha sade hale getirecektir. Atomik birimlerde kütle birimi olarak elektron kütesi (m_e), yük birimi olarak elektron yükü (e), uzunluk birimi olarak Bohr yarıçapı (a_0) alınır. Ayrıca atomik birimlerde Planck sabiti $\hbar = 2\pi$ alındığından $\hbar = 1$ kabul edilir. Atomik birimlerle 3.1 denklemi tekrar yazılırsa,

$$\begin{aligned}
H\mathbb{E}(r, R) = & \sum_{I=1}^N -\frac{1}{2M_I} \nabla_I^2 \mathbb{E}(r, R) - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 \mathbb{E}(r, R) - \\
& \sum_{i=1}^n \sum_{I=1}^N \frac{Z_I}{r_{iI}} \mathbb{E}(r, R) + \sum_{i=1}^n \sum_{j<i} \frac{1}{r_{ij}} \mathbb{E}(r, R) + \sum_{I=1}^N \frac{Z_I Z_J}{R_{IJ}} \mathbb{E}(r, R) \quad (3.2)
\end{aligned}$$

haline gelir. Bu denklemin ilk terimi çekirdeklerin kinetik enerjisini, ikinci terimi elektronların kinetik enerjisini, üçüncü terimi elektron-çekirdek etkileşim enerjisini, dördüncü terimi elektron-elektron etkileşim enerjisini, son terimi ise çekirdek-çekirdek etkileşim enerjisini ifade etmektedir. Schrödinger denkleminin bu hali ile analitik çözümü mümkün değildir.

3.4. Born-Oppenheimer Yaklaşımı

Schrödinger denkleminin çözümü için kullanılan pek çok yaklaşımdan ilkidir. Born-Oppenheimer (1927) yaklaşımı, elektronik hareketi ve çekirdek hareketini ayırarak moleküler problemleri kolaylaştırır. Bu mümkündür, çünkü bir çekirdeğin kütlesi bir elektronun kütlesinden çok çok büyük olduğundan çekirdek elektronlardan çok daha yavaş hareket eder. Moleküler bir sistemdeki elektronlar çekirdek konumlarındaki değişikliklere göre hemen kendi konumlarını ayarlarlar, yani elektron dağınıklığı çekirdeğin hareketine bağlıdır. Ancak onların hızına bağlı değildir. Başka bir deyişle çekirdek, elektronlara sabitmiş gibi görünür ve elektronik hareket sabit çekirdek alanında oluyor gibi tanımlanır.

$\mathbb{E}(r, R)$ moleküler dalga fonksiyonu, $\mathbb{E}_e(r, R)$ elektronik dalga fonksiyonu ve $\mathbb{E}_c(R)$ çekirdek dalga fonksiyonu olmak üzere;

$$\mathbb{E}(r, R) = \mathbb{E}_c(R) \mathbb{E}_e(r, R) \quad (3.3)$$

şeklinde yazılır. Bu dalga fonksiyonu denklemin 3.2' de yazılıp yeniden düzenlenirse,

$$H\mathbb{E}(r, R) = E\mathbb{E}(r, R) \quad (3.4)$$

$$\left[-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{l=1}^n \frac{Z_l}{r_{il}} + \sum_{i=1}^n \sum_{j<i}^n \frac{1}{r_{ij}} \right] \mathbb{E}_\zeta(R) \mathbb{E}_e(r, R) \\ + \left[-\sum_{l=1}^N \frac{1}{2M_l} \nabla_l^2 + \sum_{l=1}^N \sum_{j<l}^N \frac{Z_l Z_j}{R_{lj}} \right] \mathbb{E}_\zeta(R) \mathbb{E}_e(r, R) = E \mathbb{E}_\zeta(R) \mathbb{E}_e(r, R) \quad (3.5)$$

ifadesine ula ılır. ∇_i sadece elektron koordinatları (r) üzerine, ∇_l sadece çekirdek koordinatları üzerine etkir. Bu nedenle,

$$\nabla_i^2 \mathbb{E}_\zeta(R) \mathbb{E}_e(r, R) = \mathbb{E}_\zeta(R) \nabla_i^2 \mathbb{E}_e(r, R) \quad (3.6)$$

$$\nabla_i^2 \mathbb{E}_\zeta(R) \mathbb{E}_e(r, R) = \mathbb{E}_e(r, R) \nabla_l^2 \mathbb{E}_\zeta(R) + 2 \nabla_l \mathbb{E}_\zeta(R) \mathbb{E}_e(r, R) \\ + \mathbb{E}_\zeta(R) \nabla_l^2 \mathbb{E}_e(r, R) \quad (3.7)$$

denklemleri elde edilir. Denklem 3.6 denklem 3.5' te kullanılırsa,

$$\mathbb{E}_\zeta(R) \left[-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{l=1}^n \frac{Z_l}{r_{il}} + \sum_{i=1}^n \sum_{j<i}^n \frac{1}{r_{ij}} \right] \mathbb{E}_e(r, R) \\ + \mathbb{E}_e(r, R) \left[-\frac{1}{2M} \sum_{l=1}^N \nabla_l^2 - \sum_{l=1}^N \sum_{j<l}^N \frac{Z_l Z_j}{R_{lj}} \right] \mathbb{E}_\zeta(R) \quad (3.8) \\ + \left\{ -\sum_{l=1}^N \frac{1}{M_l} \nabla_l \mathbb{E}_e(r, R) \nabla_l \mathbb{E}_\zeta(R) - \mathbb{E}_\zeta(R) \sum_{l=1}^N \nabla_l^2 \right\} \mathbb{E}_e(r, R) \\ = E \mathbb{E}_\zeta(R) \mathbb{E}_e(r, R)$$

elde edilir.

Çekirde in elektronlara göre çok a ır hareket etti i ve aynı zamanda çekirdekler arası mesafenin yakla ık olarak sabit oldu u kabul edilebilir. Bu nedenle 3.8 denklemindeki küme parantezi içindeki terimler ihmal edilebilir. Burada kullanılan bu yakla ıklı a *Born-Oppenheimer yakla ıklı ı* ya da *ayrımı* denir. Born-Oppenheimer yakla ıklı ı moleküller uyarılmı durumlarda olmadı ı ve elektronik enerji seviyeleri birbirine çok yakın olmadı ı zaman geçerlidir (Born ve Huang,

1954). Kullanılan yaklaşımdan sonra geriye,

$$\begin{aligned} & \mathbb{E}_\zeta(R) \left[-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{I=1}^N \frac{Z_I}{r_{iI}} + \sum_{i=1}^n \sum_{j<i} \frac{1}{r_{ij}} \right] \mathbb{E}_e(r, R) \\ & + \mathbb{E}_e(r, R) \left[-\frac{1}{2M} \sum_{I=1}^N \nabla_I^2 - \sum_{I=1}^N \sum_{j<I} \frac{Z_I Z_J}{R_{IJ}} \right] \mathbb{E}_\zeta(R) \\ & = (E_\zeta + E_e) \mathbb{E}_\zeta(R) \mathbb{E}_e(r, R) \end{aligned} \quad (3.9)$$

denklemi kalır. Burada molekülün toplam enerjisi,

$$E = E_\zeta + E_e \quad (3.10)$$

ekilde elektronik enerjinin (E_e) ve çekirdek enerjisinin (E_ζ) toplamı olarak yazılır. 3.9 denkleminin her iki tarafı $\mathbb{E}_\zeta(R) \mathbb{E}_e(r, R)$ ile bölünür ve denklem tekrar düzenlenirse,

$$\begin{aligned} & \frac{1}{\mathbb{E}_e(r, R)} \left[-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{I=1}^N \frac{Z_I}{r_{iI}} + \sum_{i=1}^n \sum_{j<i} \frac{1}{r_{ij}} \right] \mathbb{E}_e(r, R) - E_e = \\ & \frac{1}{\mathbb{E}_\zeta(R)} \left[-\frac{1}{2M} \sum_{I=1}^N \nabla_I^2 + \sum_{I=1}^N \sum_{j<I} \frac{Z_I Z_J}{R_{IJ}} \right] \mathbb{E}_\zeta(R) + E_\zeta \end{aligned} \quad (3.11)$$

elde edilir. Bu denklem,

$$\left[-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{I=1}^N \frac{Z_I}{r_{iI}} + \sum_{i=1}^n \sum_{j<i} \frac{1}{r_{ij}} \right] \mathbb{E}_e(r, R) = E_e \mathbb{E}_e(r, R) \quad (3.12)$$

ve

$$\left[-\frac{1}{2M} \sum_{I=1}^N \nabla_I^2 + \sum_{I=1}^N \sum_{j<I} \frac{Z_I Z_J}{R_{IJ}} \right] \mathbb{E}_\zeta(R) = E_\zeta \mathbb{E}_\zeta(R) \quad (3.13)$$

olacak şekilde iki parçaya ayrılabilir.

Artık molekülün elektronik enerjisine, Denklem 3.12'nin çözümü ile ulaşılabılır. Ancak 3.12 denkleminin çözülebilmesi için yaklaşık bir moleküler dalga fonksiyonuna ihtiyaç vardır. Molekülün toplam dalga fonksiyonu ise moleküler orbitallerin dalga fonksiyonlarından oluşur.

3.5. Moleküler Orbitaler

Moleküler orbital (MO) teoriye göre atomlar, bir molekül olu turarak daha kararlı duruma geçtiklerinde elektronlar yepyeni bir dizili olu tururlar. Yani elektronlar moleküler orbitallere yerle irler. Moleküler orbitallerin sayısı, onları olu turmak üzere bir araya gelen atomik orbitallerin sayısına e ittir ve onları tanımlayan dalga fonksiyonu ise, Atomik Orbitallerin Çizgisel Birle imi yöntemi (AOÇB) ile elde edilir. ki atomik orbitalin çizgisel birle imi sonucu moleküler orbital olu turabilmesi için atomik orbital enerji düzeylerinin birbirine e it ya da çok yakın olması gerekmektedir. Elektronların moleküler orbitallere yerle meleri atomik orbitallerdekine benzer olarak Pauli ve Hund ilkeleri uyarınca gerçekleşir. Ayrıca bir molekül, moleküler orbitallerindeki elektronların spinlerine göre ikiye ayrılabilir. E er moleküler orbitallerdeki (+1/2) spinli elektron sayısı (-1/2) spinli elektron sayısına eitse molekül kapalı kabuklu, de ilse molekül açık kabukludur.

Molekülün toplam dalga fonksiyonu da, moleküler orbital dalga fonksiyonlarının bir araya gelmesinden olu ur.

Pauli ilkesi dikkate alındı nda molekülün elektronik enerji dalga fonksiyonu ;

$$\Psi_e = \mathbb{E}_1(1)\mathbb{E}_2(2)\mathbb{E}_3(3)\dots\dots\mathbb{E}_n(N) \quad (3.14)$$

biçiminde yazılabilir. Burada $\mathbb{E}_n(N)$ herhangi bir elektron için spin uzayı ve kartezyen koordinatlar üzerinden bir moleküler orbital dalga fonksiyonunu ifade etmektedir. Ancak Fermi-Dirac istatisti ine uyan parçacıklara ait dalga fonksiyonları antisimetri özelli ine sahiptir. Elektronlar fermiyondurlar (yarım spinli) ve Fermi-Dirac istatisti ine uyarlar. Bu nedenle toplam elektronik moleküler orbital dalga fonksiyonu iki elektronun yer de i tirmesi sonucu antisimetrikle melidir. Bu, iki elektronun yerde i tirmesi sonucu dalga fonksiyonunun i aret de i tirmesi gerekti i anlamına gelir. Ancak moleküler orbitallerin çarpımı olarak yazılan 3.3 denklemi bu ko ulu sa lamaz. Bu sorunun üstesinden gelmek için toplam moleküler orbital dalga fonksiyonu,

$$\Psi_e = \begin{vmatrix} \mathbb{E}_1(1)\mathbb{E}_1(2)\dots\dots\mathbb{E}_1(N) \\ \mathbb{E}_2(1)\mathbb{E}_2(2)\dots\dots\mathbb{E}_2(N) \\ \vdots \\ \vdots \\ \mathbb{E}_n(1)\mathbb{E}_n(2)\dots\dots\mathbb{E}_n(N) \end{vmatrix} \quad (3.15)$$

eklinde Slater determinanı adı verilen bir determinant olarak yazılır (Slater, 1929). Slater determinantının herhangi iki satırının yer de i tirmesi sonucu (her bir satır bir elektronu temsil eder) toplam moleküler orbital dalga fonksiyonu; determinantların özelli i gere i i aret de i tirir.

Daha önce bahsedilen atomik orbitallerin çizgisel birle imi yöntemi gözönüne alınarak her bir moleküler orbital için,

$$\mathbb{E}_n(N) = \sum_p c_p t_p \quad (3.16)$$

denklemi yazılır. Burada t_p , atomik orbital dalga fonksiyonunu; c_p ise bu atomik orbital dalga fonksiyonlarının katsayılarını ifade etmektedir. Bu durumda konunun ba nda belirtilen yakla ık bir dalga fonksiyonunu belirleme problemi, her bir moleküler orbital için uygun c_p katsayılarının belirlenmesi problemine dönü mü olur. Bu katsayıların belirlenmesi için varyasyon ilkesinden yararlanılır.

3.6. Varyasyon İkesi

Kuantum mekaniksel sisteminin herhangi bir Ψ_e öz durumunda Hamiltonyenin beklenen de eri için daima u e itlik yazılabilir;

$$E = \frac{\langle \Psi_e | H_e | \Psi_e \rangle}{\langle \Psi_e | \Psi_e \rangle} \geq E_0 \quad (3.17)$$

burada E_0 sistemin taban durumunun enerjisidir. Molekülün toplam elektronik dalga fonksiyonunun normalize oldu u kabul edilirse,

$$\langle \Psi_e | H_e | \Psi_e \rangle = \int \Psi_e^* H_e \Psi_e d\tau \quad (\mathbb{E}_n(N) = \sum_p c_p t_p) \quad (3.18)$$

elde edilir.

Herhangi bir t_p deneme fonksiyonuyla enerji hesaplanırsa, bulunacak enerji de eri daima taban durum enerjisinden (E_0 'dan) büyük ya da ona e it olacaktır. Buna varyasyon ilkesi denir.

H' in p. Enerji öz de eri E_p olmak üzere,

$$E = \frac{\sum_p |c_p|^2 E_p}{\sum_p |c_p|^2} \quad (3.19)$$

$$\sum_p |c_p|^2 = 1 \quad (3.20)$$

$$E = \sum_p |c_p|^2 E_p \quad (3.21)$$

$$E_0 \leq E_1 \leq E_2 \leq \dots \quad (3.22)$$

Bu durumda her Ψ_e öz durumu; E' nin bir ekstremumudur. Yani;

$$\delta E = 0 \quad (3.23)$$

olmalıdır. Bu denklemlerle bilinmeyen c_p atomik orbital katsayıları elde edilmeye çalışılır.

3.7. Ab initio Yöntemler

Ab initio Latince bir kelime olup temelden anlamındadır. Kuantum mekaniksel açıdan ise; bir atomik veya moleküler sistemde hiçbir deneysel veri ya da ba langıç geometrisi seçmeksizin sadece sistemdeki çekirdek ve elektronların sayısını hesaba katarak sistem için Schrödinger e itli ini yakla ık yöntemlerle çözümlenmesi lemidir. Genel olarak iki tür ab initio yöntemi vardır; Hartree-Fock yöntemi ve Yo unluk Fonksiyonel Teorisi.

Ab initio moleküler orbital yöntemleri kuantum mekaniksel temellere dayanır ve bu yöntemle moleküler yapı ve buna ba lı bir çok fizikokimyasal parametreler hesaplanabilir. Hesaplama süresi moleküler mekanik yöntemlere göre binlerce kat

daha fazladır. Hesaplama süresini azaltmak için geometrilerde ve kullanılan parametrelerde bazı basitleştirmeler yapılabilir. Ancak bu basitleştirmeler kesin olmayan sonuçların elde edilmesine neden olabilir.

3.7.1. Hartree-Fock yöntemi

Hartree-Fock yönteminde temel amaç, sistemin elektronik enerjisinin elde edilmesidir. Bu yapılırken Schrödinger denklemine, elektron-elektron etkileşimlerinin toplamı direkt olarak eklenmez, bunun yerine bir elektron üzerine öteki elektronların ortalama etkisi denkleme eklenir. Bu durumda, çok parçacıklı sistem için enerji operatörü (H) yazılabilir, ancak bu operatöre karşılık gelen dalga fonksiyonu bilinmemektedir. Bu yüzden sistemin gerçek dalga fonksiyonuna en yakın yaklaşım dalga fonksiyonu elde edilmeye çalışılır.

Molekülü en iyi tanımlayacak dalga fonksiyonunu bulabilmek için Hartree-Fock teorisinde atomik orbitallerin çizgisel birleşimi yönteminde ve varyasyon ilkesinden yararlanılır. İki elektronlu basit bir sistemin dalga fonksiyonuna ulaşmak amacıyla, 3.18 denklemi çözülürse,

$$\Psi_e = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{vmatrix} \phi_a(i)\phi_a(j) \\ \phi_b(i)\phi_b(j) \end{vmatrix} = \frac{1}{\sqrt{2}} [\phi_a(i)\phi_b(j) - \phi_a(j)\phi_b(i)] \quad (3.24)$$

olacaktır. Bu durumda elektronik enerji,

$$E = \frac{1}{2} \int [\phi_a(i)\phi_b(j) - \phi_a(j)\phi_b(i)] H_e [\phi_a(i)\phi_b(j) - s\phi_a(j)\phi_b(i)] d\tau \quad (3.25)$$

$$E = \frac{1}{2} \int [\phi_a(i)\phi_b(j) - \phi_a(j)\phi_b(i)] \sum_i^n h_i [\phi_a(i)\phi_b(j) - s\phi_a(j)\phi_b(i)] d\tau + \sum_{i=1}^n \sum_{j<i}^n \int [\phi_a(i)\phi_b(j) - \phi_a(j)\phi_b(i)] \frac{1}{r_{ij}} [\phi_a(i)\phi_b(j) - \phi_a(j)\phi_b(i)] d\tau \quad (3.26)$$

olacaktır. Burada,

$$J_{ij} = \iint \phi_a(i)\phi_b(j) \frac{1}{r_{ij}} \phi_a(i)\phi_b(j) \quad (3.27)$$

$$K_{ij} = \iint \mathbb{E}_a(i) \mathbb{E}_b(j) \frac{1}{r_{ij}} \mathbb{E}_a(j) \mathbb{E}_b(i) \quad (3.28)$$

olarak alınıp 3.26 denklemini düzenlenirse,

$$E = h_i + h_j + (J_{ij} - K_{ij}) \quad (3.29)$$

oldu u görülür. Burada J_{ij} , elektronlar arasındaki Coulomb etkileşim enerjisini ifade eder. K_{ij} ise de i -toku enerjisi olarak adlandırılır. i ki elektronlu sistem için toplam enerjinin; tek elektron enerjileri, elektronlar arası Coulomb itme enerjisi ve de i toku enerjisinin toplamı oldu u görülür. Çok elektronlu sistemler için bu enerji ifadesi genel olarak,

$$E\Psi_e(r, R) = \left\{ \sum_{i=1}^n h_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j<i}^n (J_{ij} - K_{ij}) \right\} \Psi_e(r, R) \quad (3.30)$$

başıntısı ile verilir. Burada küme parantezi içindeki kısım Fock operatörü (F) olarak bilinir. Kapalı kabuklu moleküllerde Fock operatörü gerekli ölçümlerden sonra,

$$F = \sum_{i=1}^n 2h_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j<i}^n (2J_{ij} - K_{ij}) \quad (3.31)$$

haline gelir (Roothan-Hall, 1951). Bu durumda 3.30 denklemini,

$$F\Psi_e(r, R) = E\Psi_e(r, R) \quad (3.32)$$

biçiminde bir özdeğer denklemi olarak yazılabilir.

Bu denkleme bakıldığında denklemin çözümünün dalga fonksiyonunun bilinmesine bağlı oldu u görülmektedir. Yani Fock denklemi aslında gerçek bir özdeğer denklemi değildir. Bu yüzden tahmini bir moleküler dalga fonksiyonu ile çözüme başlayarak iterasyon uygulanır. Başlangıç parametreleri varyasyon ilkesi nedeniyle daha düşük enerji verecek şekilde değiştirilerek yeni bir enerji değeri elde edilir. iterasyon iki enerji seviyesi arasındaki fark yakınsaklık limiti sağlanıncaya kadar sürdürülür. Bu sürece Öz Uyumlu Alan süreci adı verilir.

Hartree-Fock yönteminde elektronların temel fonksiyonları oluşturulurken bir elektron çiftinde, her bir elektronun uzaysal olarak simetrik konumlarda oldu u kabul edilir ve ortalama bir elektron-elektron mesafesi sabit alınır. Gerçekte ise elektron-elektron uzaklığı sabit değildir, elektronların birbirinden uzak olma hali

yakın olma halinden daha fazladır. Hartree-Fock teorisinin yetersiz olduğu bu noktada devreye, elektron korelasyon yöntemleri girer. Elektron korelasyon yöntemlerinden biri Moller-Plesset pertürbasyon teorisidir.

3.7.2. Yo unluk fonksiyonel teorisi

Yo unluk Fonksiyonel Teorisinin (YFT) temelleri Hohenberg ve Kohn (1965) tarafından atılmıştır. Hohenberg ile Kohn yapmış oldukları çalışmada, geleneksel yöntemlerle (Hartree-Fock ve Post Hartree-Fock) katı veya molekülün enerjisini hesaplamak için kullanılan çok cisimli dalga fonksiyonlarını $\Psi(r_1, r_2, \dots, r_N)$ temel olarak almanın, problemi oldukça güçleştirdiğini öne sürerek, dalga fonksiyonu yerine, yer ve zamanın bir fonksiyonu olan elektron yoğunluğu, temel olarak alınmalıdır. Yani yo unluk fonksiyonel teorisinde çok parçacıklı bir sistemin taban durum elektronik enerjisi sistemin elektron yoğunluğuyla belirlenebilir. Aslında temel amaç elektron yoğunluk fonksiyonları aracılığıyla elektron korelasyonunu modellemektir. Korelasyon enerjisi, gerçek toplam enerji ile Hartree-Fock enerjisi arasındaki farktır.

Elektronik bir sistemin herhangi bir durumundaki, birim hacim başına elektron sayısı, o durumun, elektron yoğunluğu verir (Parr ve Yang, 1989). Elektron yoğunluğu üç de i kene (x, y, z) ba lı, negatif olmayan, basit bir fonksiyondur. N elektronlu bir sistemin elektron yoğunluğu Ψ dalga fonksiyonuna ba lı olarak;

$$\rho(\vec{r}) = N \int \dots \int |\Psi(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N)|^2 d\vec{x}_1 d\vec{x}_2 \dots d\vec{x}_N \quad (3.33)$$

şeklinde ifade edilir. Moleküler bir sistemde bu yo unluk fonksiyonu a a ındaki iki koşulun sağlanması zorundadır.

$$\int \rho(\vec{r}) d\vec{r} = N \quad (3.34)$$

$$\rho(\vec{r} \rightarrow \infty) = 0 \quad (3.35)$$

Eğer bir kuantum sisteminin elektron yoğunluğu biliniyorsa, sistemin elektronik enerjisi hesaplanabilir. Yoğunluk fonksiyonel teoride enerji ifadesi aşağıdaki biçimle verilir;

$$E_{YFT}[\rho] = T[\rho] + E_{ne}[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (3.36)$$

Burada; $T[\rho]$: kinetik enerji, $E_{ne}[\rho]$: çekirdek elektron çekim enerjisi, $J[\rho]$: Coulomb (e-e) itme enerjisi, $E_{xc}[\rho]$: Değişken-korelasyon enerjisidir.

Yoğunluk fonksiyonel teorisinde temel problem, değişken-korelasyon enerjisi için uygun ve yararlı bir fonksiyonel biçim elde etmektir. Bu enerjinin fonksiyonel biçiminin seçimindeki farklılıklar, kısmi değişkenlikler içeren yöntemlerin doğasına neden olmuştur. Bu kısmi değişkenlikler dışında bütün yoğunluk fonksiyonel teorisi yöntemlerinin amacı, değişken-korelasyon enerjisi dışında diğer tüm enerji fonksiyonelleri elektron yoğunluğuna bağlı olduğundan, değişken-korelasyon enerjisi için de yoğunlukla bağlı bir fonksiyonel türetmektir. Böylece toplam elektronik enerji fonksiyoneli belirlenebilir ve belirlenen bu enerji varyasyon ilkesi gereğince, minimize edilerek üzerinde çalışılan sistemin taban durum elektronik enerjisi bulunabilir.

Yoğunluk fonksiyonel teorisi genellikle gradyent yaklaşımları, yerel yoğunluk yaklaşımları ve hibrid yöntemi olmak üzere üç türe ayrılır. Eğer korelasyon enerjisindeki fonksiyoneller yalnızca yoğunlukla bağlı ise yerel yoğunluk yaklaşımları, hem yoğunluk hem de yoğunluğun gradyentine bağlı ise genellikle gradyent yaklaşımları söz konusudur. Hartree-Fock değişken-korelasyon enerjisine yoğunluk fonksiyonel teori korelasyon terimleri ile getirilen düzeltmeler sonucunda da hibrid yöntemi ortaya çıkar.

3.8. Baz Kümeleri

Atomik orbitallerle hesaplama yapmanın zorluklarından dolayı alternatif fonksiyonlar önerilmiştir. Bu fonksiyonlara baz fonksiyonları denir. Slater tipi fonksiyonlar (Slater tipi orbitaller (STO)) ve Gaussian tipi fonksiyonlar (Gaussian tipi orbitaller (GTO)) olmak üzere iki tip baz fonksiyonu mevcuttur. Slater tipi orbitaller,

$$STO = r^{n-1} e^{-\zeta r} Y_{l,m}(\theta, \phi) \quad (3.37)$$

biçiminde tanımlanır. Ancak STO ile integralleri hesaplamak çok uzun sürdüğünden Slater tipi orbitaller Gaussian ilkeleri cinsinden tanımlanır. Gaussian tipi orbitaller ise,

$$GTO = x^l y^m z^n e^{-\zeta r^2} \quad (3.38)$$

denklemini formundadır. Buradaki l, m ve n üsleri kuantum sayılarını ifade etmez. Ancak bunların toplamı olan $L = l + m + n$ kuantum sayılarını belirlemede kullanılır. $L = 0$ 'a karşılık gelen durum s orbitallerini $L = 1$ 'e karşılık gelen durum p orbitallerini, $L = 2$ 'ye karşılık gelen durum d orbitallerini ve $L = 3$ 'e karşılık gelen durum f orbitallerini ifade eder.

Moleküler orbitalleri tanımlamak için, moleküldeki her bir atoma ait baz fonksiyonu grubu kullanılır. Bu baz fonksiyonları grubuna baz kümesi denir. Baz kümesi, moleküler orbital dalga fonksiyonları için kullanılan matematiksel fonksiyonlar kümesidir.

Büyük baz kümeleri elektronların yerini saptamada ki birkaç sınırlamayla, orbitalleri daha doğru tahmin eder. Genel olarak üç tür baz kümesi vardır:

- Minimal baz kümesi
- Yarılmı baz kümeleri
 - Double Zeta baz kümesi
 - Triple Zeta baz kümesi
- Geni letilmi baz kümeleri

- Polarizasyon fonksiyonu eklenmi
- Yayılma fonksiyonu eklenmi

Minimal baz kümesi; her bir atom için gereken minimum baz fonksiyonunu içerir. STO-nG olarak da gösterilir. Yani bir STO için n gaussian ilkeli kullanılır. Örneğin, STO-3G baz kümesi minimal bir baz kümesidir ve fonksiyon başına üç tane Gaussian ilkeli içerir.

Yarılmı baz kümesi; de erlik orbitallerinin iç ve dış orbitallere ayrıldığını dikkate alınarak oluşturulan baz kümesidir. 3-21G ve 6-31G en yaygın kullanılanlarıdır.

- 3-21G: 1s orbitali için 3 gaussian ilkeli, 2s,2p iç orbitalleri için 2 gaussian ilkeli, 2s,2p dış orbitalleri için 1 gaussian ilkeli
- 6-31G: 1s orbitali için 6 gaussian ilkeli, 2s,2p iç orbitalleri için 3 gaussian ilkeli, 2s,2p dış orbitalleri için 1 gaussian ilkeli

Polarizasyon fonksiyonu eklenmi geni letilmi baz kümeleri; atomik orbitallerin molekül içinde öteki çekirdeklerin etkisi ile gerçek ekillerinden bir miktar saptıklarını ve moleküler orbital dalga fonksiyonları tayin edilirken bu polarizasyon etkisinin hesaba katılması gerektiği göz önüne alınarak oluşturulmuştur. Baz kümesinin üzerinde * varsa polarizasyon dikkate alınmaktadır:

- 3-21G* ya da 3-21G(d)
- 6-31G** ya da 6-31G(d, p)

Yayılma fonksiyonu eklenmi geni letilmi baz kümesi; açık kabuklu moleküllerin, anyonların ve uyarılmış durumların hesaplamaları için geliştirilmiş bir baz kümesidir. Baz kümesi üzerinde + varsa bu, baz kümesine yayılma fonksiyonunun eklendiğini ifade eder:

- n-ijG+: p tipi
- n-ijkG++: d tipi
- 6-31G++

Baz kümeleri molekülleri oluşturulan atomlara ve atomların atom numaralarına göre der. Çizelge 3.1'de bazı atom numarası aralıkları için optimize baz

kümeleri verilmi tir (Frisch ve ark, 1996).

Çizelge 3.1. Baz kümeleri (Frisch ve ark., 1996)

Baz kümesi	Uygulama aralı ı
STO-3G	H-Xe
3-21G	H-Xe
4-31G	H-Ne
6-31G(d)	H-Cl
6-31G(d, p)	H-Cl
6-311G+(d, p)	H-Br
CEP121G	H-Rn
LANL2MB	H-Ba, La-Bi
LANL2DZ	H, Li-Ba, La-Bi

3.9. QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationship - Kantitatif Yapı-Etki Analizleri

QSAR, Corvin Hansch'ın 1964'de ba lattı ı çalı malar sonucunda ortaya çıkan ve ngilizce “Quantitative Structure Activity Relationships” olarak isimlendirilen ve tanımdaki kelimelerinin ba harflerinin bir araya getirilmesi ile olu turulan QSAR terimi, Kantatif Yapı-Etki ili kilerini belirtmek üzere dünyanın her yerinde kullanımı benimsenir duruma gelmi tir.

Kantatif Yapı-Etki ili kileri (QSAR) analizleri, kimyasal bile iklerin moleküler tanımlayıcıları (fizikokimyasal/yapısal özellikleri) ile biyolojik aktiviteleri arasındaki ili kileri matematiksel ve istatistiksel yöntemlerle nicel olarak çözümlene çalı malarıdır. Çözümlene sonucu bir grup molekülün biyolojik etkisine, moleküllerin hangi moleküler tanımlayıcıların katkıda bulundu u bir matematiksel denklemlerle ortaya konulur. Bu matematiksel e itlik genellikle lineer regresyon modellerinde a a ıdaki formattadır:

$$y_o = a + bx_1 + cx_2 + \dots \quad (3.39)$$

burada y_o , moleküller için deneysel ölçülmü biyolojik aktivite (K_i , IC_{50} , LD_{50} , vb.) de erleri, a , b ve c ise nümerik regresyon sabitleri, x_1 ve x_2 ise hesaplanmı moleküler tanımlayıcı de erleridir.

QSAR e itlikleri bir çok amaç için elde edilmeye çalı ılır ancak bunların ba lıcaları;

- Kimyasal bileşiklerin organizmadaki emilim, dağılım ve transportunda rol oynayan farmokinetik ilaçların tanımlanması,
- Kimyasal bileşiklerin hedefle (reseptör, enzim, vb.) arasındaki etkileşimlerde rol oynayan dinamiklerin belirlenmesi,
- Kimyasal bileşiklerin organizmada biyolojik dönüşümünü sağlayan enzimsel ilaçların tanımlanması,
- Kimyasal bileşiklerin istenmeyen veya toksik etkilerden arındırılmasıdır.

QSAR ilişkileri, ilaç etken maddesi olabilecek yeni önder bileşiklerin tasarım ve geliştirilmesine ilk tutacak önermelerin açığa çıkarılmasına yardımcı olur [55]. QSAR, bir molekülün bir kimyager tarafından sentezlenmeden önce o molekülün sentezlendiğinde biyolojik etkisinin ne olacağını önceden tahmin edilmesini sağlar. Bu ise muazzam bir para ve emek tasarrufu demektir.

Biyolojik aktivite

İlaç tasarımında, efektör ve hedef arasındaki ilaçların incelenirken efektör olarak organizmadaki doğal endojen bileşiklerden (ligantlardan) veya ilaç maddelerinden, hedef olarak da en çok organizmadaki reseptör, hormon, enzim ve nükleik asitlerden söz edilmektedir. Ligantlar, reseptörlerle etkileşen doğal endojen bileşikler olmalarına rağmen genel olarak literatürde ilaç etken maddeleri için de kullanılmaktadırlar. Terim olarak “reseptör” ilk kez 1913 yılında Ehrlich [61] tarafından ifade edilmiş ve ilaçların biyolojik etki gösterebilmesi için biyolojik bir makromolekül ile etkileşmesi gerektiği ileri sürülmüştür. Burada reseptör ve enzimlerin aktif bölgeleri, ilaçların tanımlanarak etkileşim bölgeleri olarak tanımlanmıştır. Reseptörlerle etkileşen ligantların (ilaç etken maddeleri) iki özelliği bulunmaktadır. Bunların birincisi, reseptörü tanıyarak bağlanmaları sonucunda biyolojik aktiviteyi oluşturmaları, ikincisi ise ligantların, efinitesi olarak adlandırılan G-protein kompleksleri ve iyon kanalları ile ilişkili transmembran transdüksiyon mekanizmalarını aktive ederek, hücresel süreçlerde değişikliklere neden olma özellikleridir (AKI- ENER ve YALÇIN, 2003).

Biyolojik aktivite çalışmanın amacına göre bir çok farklı biçimde tanımlanabilir. Bunlardan en sık kullanılanlar; K_i , IC_{50} ve LD_{50} değerleridir.

Biyolojik aktivite K_i veya K_d , ligantların reseptöre ilgisi olarak tanımlanır (inhibisyon sabitesi) ya da karılıklı birleşme sabitesi diye adlandırılır. Genellikle, bu değerler nanomolar (10^{-9} M) veya mikromolar (10^{-6} M) mertebesinde oldukları ve spektroskopik yolla reaksiyon kinetiği ölçümlerinden elde edilir.

Moleküler tanımlayıcı

Kimyasal bileşiklerin moleküler nitelikleri ile biyolojik etkileri arasındaki ilişkilerin nicel analizinde, o moleküle ait hesaplanmış ve/veya deneysel ölçülmüş fizikokimyasal sabitler (parametreler) kullanılır. Bu sabitler, moleküler tanımlayıcılar olarak adlandırılabilir. Fizikokimyasal moleküler tanımlayıcılar, ilk defa Hammett'in meta/para-aromatik süstitüentlerin elektronik etkilerini tamamlayan sigma (σ) süstitüent sabitini (HAMMET, 1940) ve Taft'ın süstitüentlerin sterik etkilerini gösteren E_s sabitininin (TAFT, 1956) etkisini ortaya atmasından bu yana hızla çoğalarak, son otuz yıl içerisinde yüzlerce değerli kimyasal parametre sayısına ulaşmışlardır. Bu moleküler tanımlayıcıların birçoğu arasında interkorelasyon mevcut olup ana hatlarıyla, molekülün hidrofobik (lipofilik), elektronik ve sterik etkileri tanımlayan fizikokimyasal tanımlayıcılar olarak sınıflandırılabilirler.

Günümüzde QSAR çalışmalarında kullanılan, molekülün lipofilik, elektronik ve sterik etkilerini tanımlayan yüzlerce moleküler tanımlayıcı vardır. Kabaca moleküler tanımlayıcılar; yapısal, topolojik, geometriksel, elektrostatik, kuantum-kimyasal, termodinamik tanımlayıcılar olmak üzere altı sınıfa ayrılabilir. Bunlar arasında kuantum mekaniksel yolla hesaplanmış olanlar önemli bir yer tutar. Molekülün geometrik yapısı da *ab initio* DFT yada AM1 gibi bir kuantum kimyasal yöntemle hesaplanabildiğinden diğer moleküler tanımlayıcılar da (topolojik, yapısal, vb.) elde edilen optimize geometriden türetilir.

QSAR için istatistik algoritmalar

Elde edilen QSAR ektisi neticede mutlak değerli istatistik analiz sonucu ulaşılan bir ektisidir ve istatistiksel olarak elde edilen ektisin geçerliliğinin ölçütü olan N , R^2 , R^2_{CV} , s^2 ve F gibi istatistiksel parametreler ile verilir. Bir QSAR denkleminde istatistiksel parametrelerin tanımlanması aşağıdaki gibidir.

N, Gözlem sayısı (Modeli oluşturulurken kullanılan molekül sayısı)

Qsar modeli oluşturulurken regresyon çalışmasına alınan molekül sayısıdır. Training ve Test kümeleri için ayrı ayrı değerlendirilir.

R^2 , Korelasyon belirleme katsayısı

statistikte, lineer regresyon modellerinde bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasında oluşan korelasyonun uyum mertebesini veren bir parametredir. 0-1 aralığında değişir. 0 bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasında hiç korelasyon yok anlamına gelirken, 1 mükemmel bir korelasyon olduğu anlamına gelir. Bir modelde, bağımsız değişkenler (moleküler tanımlayıcı) sayısı arttıkça R^2 değeri artar. Ancak buna paralel F değeri artmadıkça modelin istatistik seviyesinin artması anlamına gelmez. R^2 ağırlık ifadesiyle verilir

$$R^2 = 1 - \frac{\sum \Delta^2}{S_{yy}} \quad (3.40)$$

$$S_{yy} = \sum (y_{obs} - y_{mean})^2 = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \quad (3.41)$$

$$\sum \Delta^2 = SSQ = \sum (y_{obs} - y_{calc})^2 \quad (3.42)$$

burada, N , modeli oluşturulurken kullanılan molekül sayısı, y_{obs} , QSAR çalışmasına alınan her bir molekülün ölçülmüş deneysel biyolojik aktivite değeri, y_{mean} , molekülün ölçülmüş deneysel biyolojik aktivite değerlerinin ortama değeri ve y_{calc} ise elde edilen modelin hesapladığı biyolojik aktivite değeri.

 R^2_{CV} , Cross-Vaalidated Korelasyon belirleme katsayısı

$$R^2_{CV} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (3.43)$$

R^2_{CV} , Cross-Vaalidated korelasyon belirleme katsayısı elde edilen regresyon denklemin tahmin yapabilme kabiliyetinin bir ölçüsüdür. Yukarıdaki denklemde, y_i i .ci molekülün ölçülmüş deneysel biyolojik aktivite değeri, \bar{y} , molekülün ölçülmüş deneysel biyolojik aktivite değerlerinin ortalama değeri ve \hat{y}_i i .ci molekülün kümeden atıldığında kalan moleküllerle elde edilen regresyon denklemi ile i .ci molekülün tahmin edilmiş biyolojik aktivitesi. R^2_{CV} değeri ne kadar R^2 değerine yakınsa modelin bağımlı moleküllerin aktivitelerini tahmin yapabilme kabiliyeti o kadar yüksek demektir.

s^2 , Regresyon denkleminin standart deviasyonu

$$s^2 = \frac{\sum \Delta^2}{n-k-1} = \frac{(1-R^2)S_{yy}}{n-k-1} \quad (3.44)$$

Lineer regresyon denkleminin korelasyon mertebesini veren bir ba ka parametre de standart deviyasyondur. Bu parametre sadece hesaplanan ve deneysel biyolojik aktivite de erlerinin uyum derecesine ba lı de il aynı zamanda serbestlik derecesine ($DF=N-k-1$) ba lıdır. Burada DF , serbestlik derecesi, k , modeldeki moleküler tanımlayıcı sayısı ve N de modeli olu turan molekül sayısı. s^2 de eri ne kadar sıfıra yakın ise modelin istatistik de eri iyi oldu u anlamına gelir.

F , Fischer testi

$$F = \frac{R^2(n-k-1)}{k(1-R^2)} \quad (3.45)$$

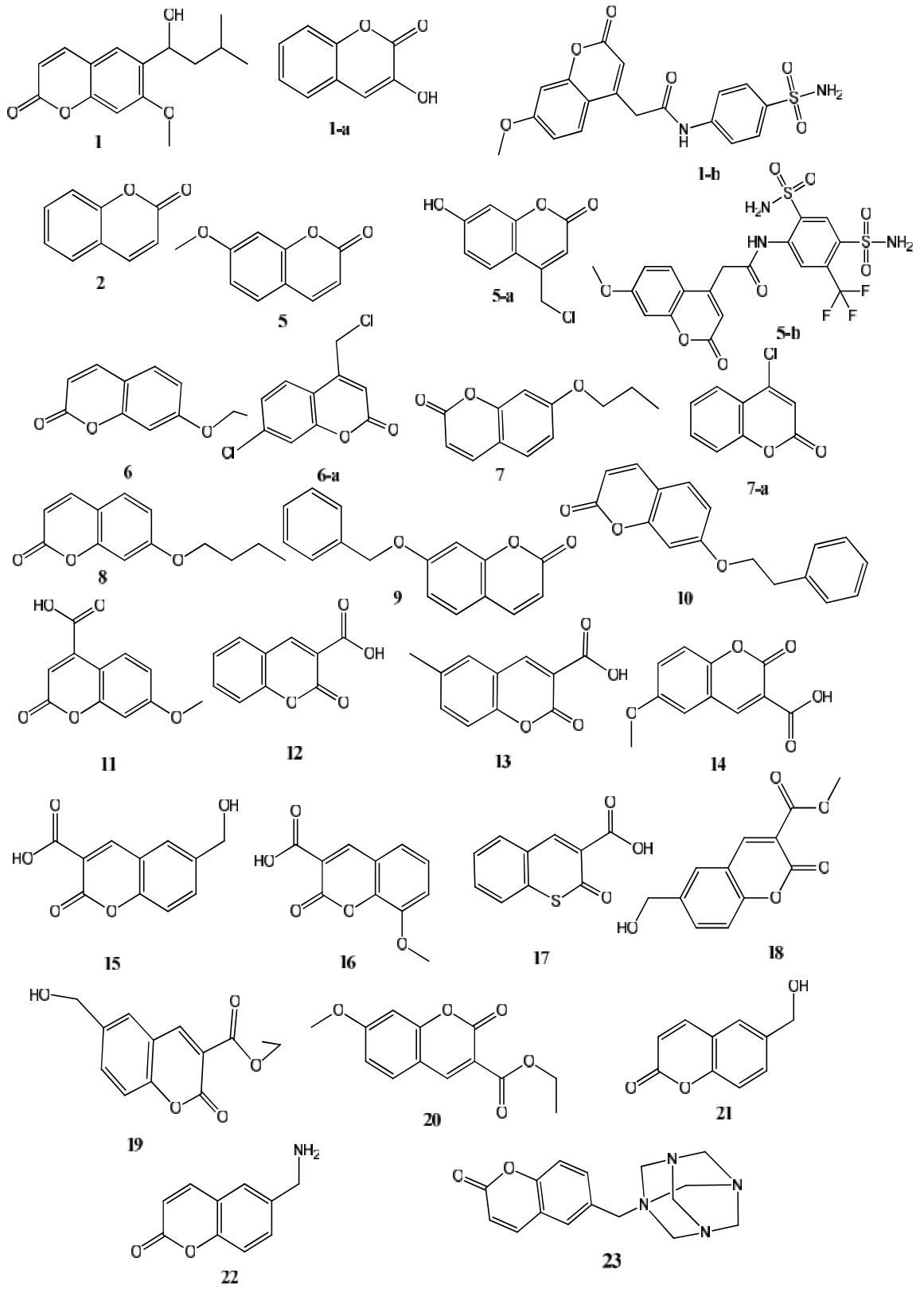
Bu test bir QSAR modelinde, model tarafından açıklanabilen varyans (de i iklik) ile açıklanamayan varyansın oranıdır. Bu oran büyüdükçe modelin önemi (significance) artar. F de erinin birden küçük olması modelin tamamen anlamsız oldu u bilgisini verir. Denkleme bakıldı ında k de erine ba lı oldu u görülür. k de eri arttı ında F de eri artmıyorsa eklenen yeni moleküler tanımlayıcıların modele artı bir katkısı yoktur demektir. Bir ba ka deyi le, farklı sayıda k lardan olu an modellerden hepsi aynı F de erini veriyorsa, en az k içeren model en iyisidir.

4. ARA TIRMA BULGULARI VE TARTI MA**4.1. Giri**

Bu bölümde, daha önceki bölümde bahsedilen Karbonik anhidraz enziminin CA-XII izo-enzimine karşı biyolojik etkisi (K_i , inhibasyon sabiti) deneysel olarak ölçülmüştür, ve literatürde yayınlanmış 27 adet Kumarin türevi molekülün çoklu regresyon işlemi ile elde edilen QSAR modelleri verilecektir. Moleküllerin alındığı kaynaklarda 7 adet daha aktivitesi ölçülmüştür. Moleküllerin DFT/B3LYP metodu ile optimizasyonu esnasında bazı yapılar bulunamaması nedeniyle kümeden çıkarılmak zorunda kalmıştır. Bu bölümde öncelikle QSAR modelinde kullanılan yapılar verildikten sonra, elde edilen QSAR denklemleri verilip, denkleme giren moleküller tanımlayıcılar konusunda detaylı bilgi sunulacaktır. Daha sonra modeller konusunda tartışılacak çalışmalardan bahsedilecek.

4.2. CA-XII inhibitörü Kumarinlerin QSAR modelleri

QSAR çalışmasına dahil edilen Kumarinler dört farklı makaleden toplanmış olup hepsinde aynı grup tarafından aynı yöntemle ölçülmüştür (Maresca ve ark., 2009; Maresca ve ark., 2010; Maresca ve Supuran, 2010; Maresca ve ark., 2010). Kumarinlerin moleküler yapıları ekil 4.1 de verilmektedir. ekil 4.1 de gösterilen moleküller Gaussian 03 programı ile optimize edildi. Optimizasyonu takiben enerji ve frekans hesaplaması yapılması sureti ile (hiçbir negatif frekans gözlenmediği için) elde edilen yapıların geçici durumlar olmayıp kararlı yapılar olduğu anlaşıldı. Tüm moleküllerin hesaplaması bittikten sonra, Gaussian 03 çıktı dosyaları CodessaPro yazılımına girilerek dosyaları verilerek moleküller tanımlayıcılar hesaplandı.



ekil 4.1 QSAR çalı masında kullanılan 27 adet Kumarin türevleri

CodessaPro yazılımı, birçok kuantum mekaniksel moleküler tanımlayıcıyı Gaussian 03 ün çıktı dosyasından direk olarak alabilirken, birçok topolojik, elektrostatik ve geometrik moleküler tanımlayıcıyı Gaussian 03 ün optimize ettiği üç boyutlu yapıdan hesaplayabilmektedir. ekil 4.1 de gösterilen her bir molekül için CodessaPro ile iki yüz den fazla moleküler tanımlayıcı hesaplandı. Sonra her bir molekülün biyolojik aktivite de erlerinin logaritması alınarak, Log-Ki olarak CodessaPro programına yüklendi. Moleküllerin Ki de erleri ile moleküler tanımlayıcılar Çoklu Lineer Regresyon (MLR; Multi Lineer Regression) i lemine tabi tutuldu. Elde edilen onlarca lineer QSAR e itli inden istatistiksel parametreleri göz önünde tutularak, en yüksek R^2 , R^2_{CV} , F ve en düşük s^2 de erine sahip, bir adet iki, iki adet dört ve iki adet de be moleküler tanımlayıcı denklemler model olarak seçildi. Tablo 4.1 de seçilen bu be QSAR modelinde yer alan moleküler tanımlayıcıların nümerik de erleri, moleküllerin logaritması alınmış Ki de erleri ve istatistiksel parametreleri en yüksek olan üç QSAR modeli ile hesaplanmış Log-Ki de erleri birlikte verilmektedir.

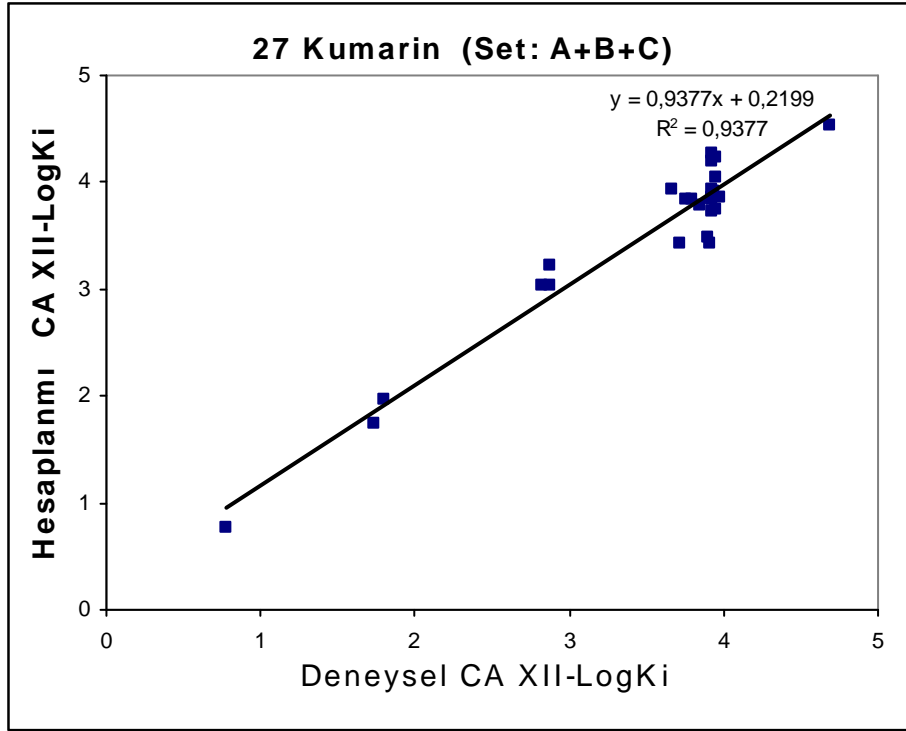
Tablo 4.1 yakından incelendi inde seçilen modellerde dokuz farklı moleküler tanımlayıcının olduğu görülmektedir. Bunlardan iki tanesi **ABIC(2)**, Ortama ba lanma bilgi indeksi (meritebe 2), **AIC(1)**, Ortama bilgi indeksi (meritebe1) topolojik, altı tanesi **DPSA-1**, CPSAs daki fark (PPSA1-PNSA1), **WNSA-1**, A ırlıklı PNSA ($PNSA1 * TMSA / 1000$), **MPCC** C atomu üzerindeki maksimum kısmi yük, **Qmax-Qmin.**, Polarite parametresi, **WNSA-3**, A ırlıklı PNSA ($PNSA3 * TMSA / 1000$) elektrostatik, bir tanesi **PMIA**, Eylemsizlik momenti A / atom sayısı, geometrik ve bir tanesi **RNR**, Rölative halka sayısı, yapısal moleküler tanımlayıcılardır. Bu sıralanan moleküler tanımlayıcıların olduğu seçilen QSAR modelleri Tablo 4.2 verilmektedir. **PMIA** ve **WNSA** moleküler tanımlayıcıları a ırlıklı olarak modellerde ortaya çıktığı gözlenmektedir. Tablo 4.2 verilen QSAR modellerinin tamamı istatistiki açıdan oldukça iyidir. Hatta model I ve II'ye çok iyi denebilir. QSAR çalı an bilim insanları arasında, bir modelin R^2_{CV} si 0,5 den büyük ise o modelin, modeli oluşturmada kullanılmayan yeni moleküllerin (yani test

moleküllerini) biyolojik aktivitelerini belirleme gücünün (predictive power) iyi oldu u genel kabul gören görü tür. Literatür incelendi inde pek çok çalı mada sadece modelin R^2_{CV} sine bakarak modellerin belirleme gücünün iyi oldu u belirtilmektedir. Bu açıdan bakıldı nda Tablo 4.2 verilen be QSAR modelin tamamının belirleme gücü oldukça yüksek oldu u görülmektedir. Ancak son yıllarda bu kanat, Golbraikh ve Tropsha (2002) de yazdı ı “Beware of q^2 !” adlı makale ile de i meye ba lamı tır. Bu makalede bahsedile q^2 bizim be tez notasyonumuzda ki R^2_{CV} oldu u hatırlanmalıdır. Golbraikh ve Tropsha makalelerinde R^2_{CV} tek ba ına belirleme gücünü tayin etmede yeterli olmadı nı, 0.5 den yüksel olmasının ön art olarak gerekli oldu unu ama bunun yetmeyece ini söyledi. Bir QSAR modelinin gerçekten belirleme gücünün oldu unun iddia edilebilmesi için training ve test set ayrı tırmasının mutlaka yapılması gerekti ini vurguladılar. Bu training ve test set ayrı tırmasının son yıllarda yapılan QSAR çalı malarında çok yaygınla mı ve genel kabul gören bir standart haline almı tır. Bu sebeple bizde yaptı ımız bu tez çalı masında 27 Kuarin türevini dokuzar taneli A, B ve C gibi üç alt gruba ayırdık. Hangi moleküllerin hangi alt gruba alındı ı Tablo 4.1 ve ekil 4.1 den görülebilir. Alt gruplara ayırdıktan sonra dönü ümlü olarak iki grup yani 18 molekül training, bir grup 9 molekülde test set seçilerek, Tablo 4.2 verilen modeller aynı moleküler tanımlayıcılar kullanılarak yeniden çoklu lineer regrasyon i lamine tabi tutuldu. Elde edilen QSAR modelleri ile modelle katılmayan, test set için ayrılan 9 molekülün aktiviteleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar her be QSAR modeli içinde Tablo 4.3 de verilmektedir. Tablo 4.3 incelendi inde tüm modellerin training ve test set ayrı tırması yapılması durumunda da çok iyi istatistiki de erler verdi ini göstermektedir. Buda olu an QSAR denklemlerinin tesadüfi de il, aktivite ile moleküler tanımlayıcılar arasındaki korelasyonun gerçekten var oldu unu destekleyen kanıtlardır.

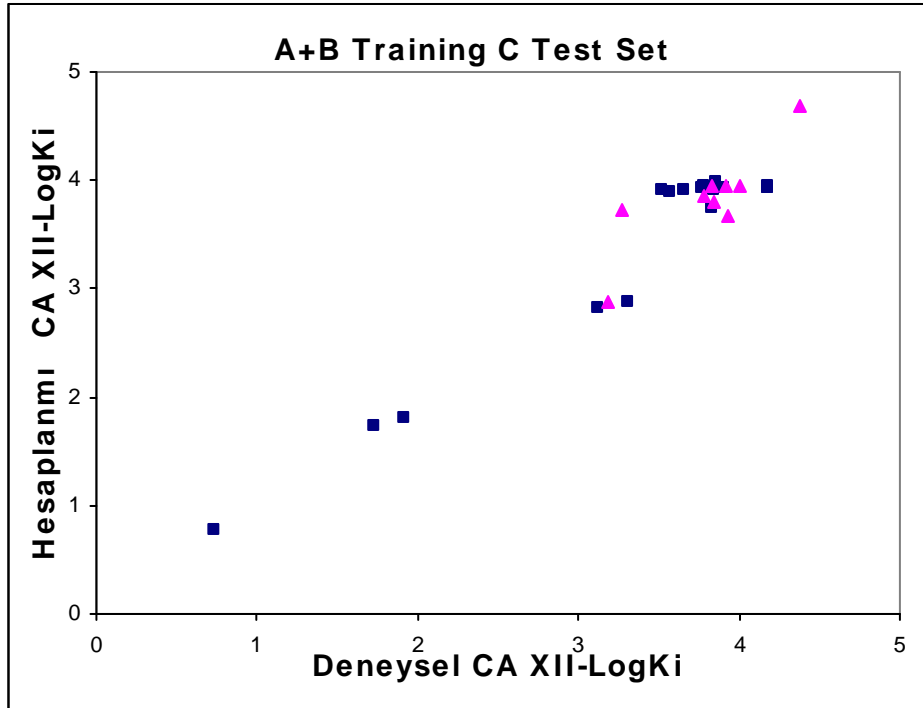
Moleküller için moleküler tanımlayıcılar hesaplandı nda bazı moleküler tanımlayıcıların bir biri ile çok yüksek seviyede korelasyona sahip oldu u gözlenir. Bir biri ile çok yüksek seviyede ($R = 0,9$) korelasyona sahip olan iki moleküler tanımlayıcının aynı QSAR modelinde olması bir takım sakıncalar do urabilir. Onun için Tablo 4.1 de verilen tüm moleküler tanımlayıcılar arasındaki korelasyon

katsayıları CodessaPro yazılımı ile hesaplandı. QSAR modellerinde bulunan moleküler tanımlayıcılar arasındaki korelasyon katsayıları Tablo 4.4 verilmektedir. Tablo 4.4 yakından incelendi inde, **WNSA-3** ün **WNSA-1** ve **MPCC** ile sırası ile -0,955 ve -0,955 lik korelasyon katsayılarına sahip oldu u gözlenmektedir. Bu bilgiler 1 1 nda Tablo 4.2 ye yeniden bakıldı nda, be QSAR modelinin hiç birisinde de **WNSA-3** ile **WNSA-1** in birlikte yer almadıkları görülmektedir. Dolayısı ile **WNSA-3** ile **WNSA-1** arasındaki korelasyonun QSAR modellerine bir etkisi yoktur. Ancak **WNSA-3** ile **MPCC** moleküler tanımlayıcıları Tablo 4.2 de II ve III no lu modellerde birlikte yer almaktadır. Bu modeller kullanılırken mutlaka bu korelasyona dikkat edilmelidir. IV nolu model **MPCC** yerine **Qmax-Qmin** konularak elde edilen bir model olup istatistik de erleri III no lu modele oldukça yakındır.

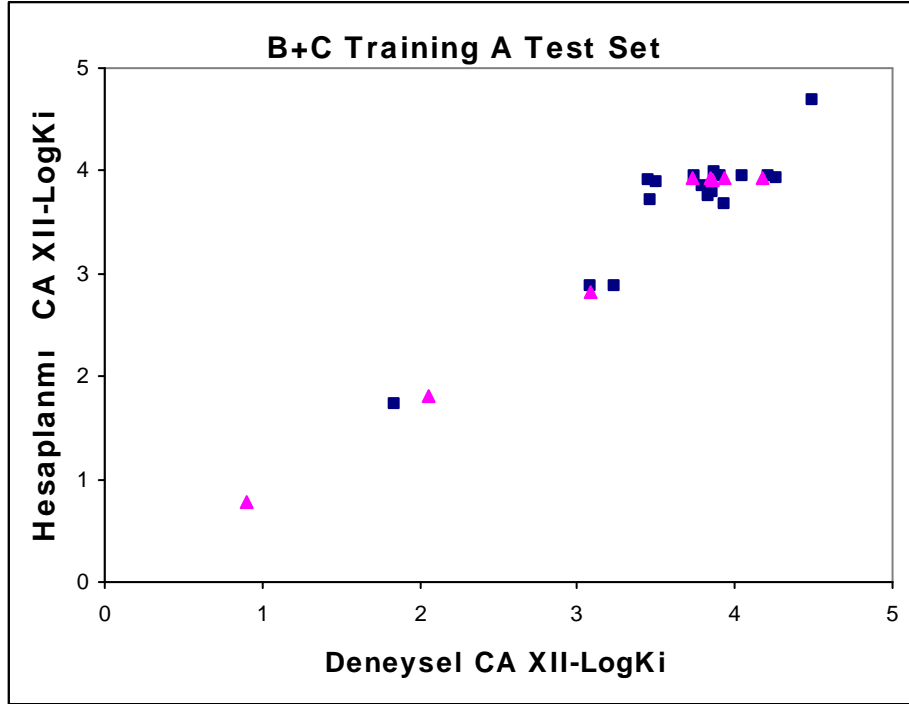
Elde edilen QSAR modellerinin korelasyon grafikleri ekil 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5 de verilmektedir. ekil 4.2, Tablo 4.2 verilen modeller arasında istatistik de erleri en yüksek model olan I no lu modelin deneysel aktivite verilere kar ı hesaplanmı aktivite de erlerini gösteren grafiktir. ekil 4.3, 4.4 ve 4.5 ise aynı moleküler tanımlayıcılarla 27 molekül training ve test set ayrı tırması yapıldı nda elde edilen QSAR modellerinin deneysel aktivite de erlerine kar ı modelin hesapladı ı aktivite de erlerini göstermektedir. ekil 4.3, 4.4 ve 4.5 de verilen grafiklerin istatistik de erleri Tablo 4.3 de model I de verilen de erlerdir.



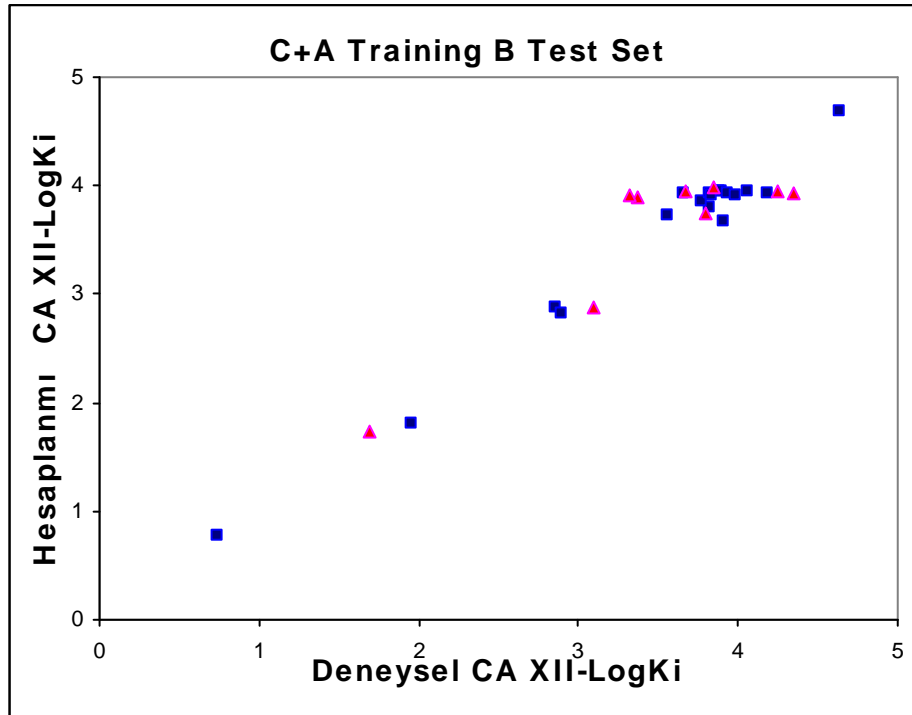
ekil 4.2 I nolu QSAR modeline göre deneysel aktivitenin hesaplanmı aktiviteye kar ı grafi i



ekil 4.3 QSAR modelinin validasyonu: A+B training set (kare) ve C test set (üçgen)



ekil 4.4 QSAR modelinin validasyonu: B+C training set (kare) ve A test set (üçgen)



ekil 4.5 QSAR modelinin validasyonu: C+A training set (kare) ve B test set (üçgen)

Tablo 4.1. QSAR modellerinde yer alan moleküler tanımlayıcılar, Kumarin moleküllerinin deneysel LogKi, I, II ve III nolu modellerle hesaplanan Log-Ki biyolojik aktivite değerleri.

Molekül		Moleküler Tanımlayıcı									CA XII-Log Ki (nM)			
Molekül No	Molekül grubu	RNR	ABIC(2)	DPSA-1	WNSA-1	AIC(1)	MPCC	Qmax-Qmin.	WNSA-3	PMIA	Deneysel LogKi	Model I ile Hesaplanmı	Model II ile Hesaplanmı	Model III ile Hesaplanmı
1	C	0.0541	0.8574	295.066	61.5935	3.5309	0.0846	0.2627	-5.3316	0.00065014	4.6900	4.5261	4.5997	4.4612
1-a	B	0.1111	0.8509	25.2054	56.4544	3.0805	0.0981	0.2583	-4.3704	0.0041914	3.9800	3.8633	3.6741	3.7877
1-b	A	0.0698	0.8424	93.2690	191.5291	3.8910	0.0855	0.2651	-14.9532	0.00039831	1.8000	1.9670	1.7983	1.8750
2	C	0.1111	0.8509	23.2579	57.6982	3.0805	0.0888	0.2559	-4.5402	0.0029714	3.8000	3.8451	3.7724	3.9586
5	B	0.0698	0.8593	113.2523	187.0174	3.8910	0.0855	0.2651	-14.6791	0.00037554	1.7400	1.7368	1.8987	1.9599
5-a	A	0.1111	0.8933	125.3959	40.4064	3.1497	0.0844	0.2583	-4.4441	0.0050850	2.8300	3.0250	3.0589	3.1362
5-b	C	0.1111	0.9195	36.7630	54.3733	3.1497	0.0845	0.2579	-4.9529	0.0043449	2.8800	3.0355	3.1346	3.2592
6	B	0.0952	0.9128	10.8073	78.7341	3.5945	0.0862	0.2579	-8.0898	0.0015543	3.9000	3.4869	3.4706	3.4045
6-a	A	0.0588	0.8427	-2.4183	284.966	4.2392	0.1788	0.3584	-26.3795	0.00013169	0.7800	0.7717	0.8205	0.9025
7	C	0.0833	0.8840	154.1752	55.9886	3.3360	0.0845	0.2638	-4.4164	0.0028269	3.6700	3.9369	3.9984	3.9452
7-a	B	0.1000	0.9071	-24.2481	92.3086	3.5842	0.0863	0.2351	-9.1447	0.0016161	2.8700	3.2138	3.0848	3.0891
8	A	0.0741	0.8850	200.6208	60.0346	3.3469	0.0845	0.2636	-4.8400	0.0025232	3.9300	3.9391	3.9654	3.9339
9	C	0.1176	0.8392	-40.2235	70.5620	2.9340	0.0896	0.2378	-5.0403	0.0020049	3.8500	3.7880	3.7960	4.1764
10	B	0.0667	0.8592	225.8134	65.6551	3.2771	0.0845	0.2635	-5.0593	0.0021364	3.9300	4.2774	3.9499	4.0091
11	A	0.0968	0.7727	120.1032	91.5146	2.9794	0.0845	0.2620	-5.2477	0.0011203	3.9200	3.8393	3.9283	4.3156
12	C	0.0882	0.7863	149.5245	108.7337	3.1104	0.0845	0.2631	-6.2026	0.0013995	3.7200	3.4361	3.6413	3.9493
13	B	0.1000	0.8474	4.0269	72.1083	3.1414	0.0957	0.2470	-5.5753	0.0026961	3.9500	4.2267	3.7529	3.9224
14	A	0.0870	0.8775	44.1287	74.0444	3.5884	0.0957	0.2470	-5.8256	0.0020324	3.9300	4.1942	4.3257	4.0871
15	C	0.0833	0.8661	147.9341	61.4377	3.6054	0.0958	0.2799	-7.3951	0.0016126	3.9500	4.0470	3.9525	3.7991
16	B	0.0833	0.9088	57.6203	80.5274	3.7202	0.0957	0.2784	-8.4768	0.0018207	3.9500	3.7422	3.6273	3.4202
17	A	0.0833	0.8840	120.0177	69.4201	3.6054	0.0967	0.2752	-6.4889	0.0013874	3.9300	3.8420	4.3574	4.1530
18	C	0.100	0.8701	-36.7872	85.6593	3.2414	0.0928	0.2457	-5.3653	0.0020482	3.9400	3.9167	4.0589	4.1439
19	B	0.0741	0.9004	118.2923	81.2810	3.7784	0.095	0.2737	-8.8552	0.0015467	3.7500	3.8300	3.6258	3.3931
20	A	0.0667	0.8996	161.2327	82.4747	3.7600	0.0950	0.2737	-8.6102	0.0012409	3.9200	3.8604	3.7916	3.5699
21	C	0.0667	0.8810	197.3717	79.1415	3.5484	0.0954	0.2749	-7.6409	0.0015769	3.9400	3.8840	3.8132	3.7327
22	B	0.0952	0.9128	63.8505	65.4074	3.5178	0.0841	0.2629	-5.2938	0.0039952	3.9100	3.4325	3.4832	3.2764
23	A	0.0909	0.8979	87.8086	62.3814	3.5338	0.0840	0.2357	-4.1468	0.0036194	3.9300	3.7263	4.0098	3.7291

RNR, Rölativ halka sayısı; **ABIC(2)**, Ortama ba lanma bilgi indeksi (mertebeye 2); **DPSA-1**, CPSAs daki fark (PPSA1-PNSA1) [Zefirov's PC]; **WNSA-1**, A ırlıklı PNSA (PNSA1*TMSA/1000) [Zefirov's PC]; **AIC(1)**, Ortama bilgi indeksi (mertebeye 1); **MPCC** C atomu üzerindeki maksimum kısmi yük [Zefirov's PC]; **Qmax-Qmin.**, Polarite parametresi; **WNSA-3**, A ırlıklı PNSA (PNSA3*TMSA/1000) [Zefirov's PC]; **PMIA**, Eylemsizlik momenti A / atom sayısı.

Tablo 4.2. 27 Kumarin türevlerinin CA-XII izo-enzimine kar ı aktivitelerinin (Ki) Çoklu Lineer Regresyon QSAR modelleri

<i>Model No</i>	<i>Moleküler Tanımlayıcı</i>	<i>Katsayı</i>	<i>t-test</i>
I	Intercept	21,200	10,646
	ABIC(2); Ortama ba lanma bilgi indeksi (mertebeye 2)	-11,574	-7,167
	WNSA-1; A ırlıklı PNSA (PNSA1*TMSA/1000) [Zefirov's PC]	-2,678x10⁻²	-14,778
	RNR; Rölativ halka sayısı	-52,032	-7,902
	DPSA-1; CPSAs daki fark (PPSA1-PNSA1) [Zefirov's PC] R²=0,937, R²_{cv}=0,909, F=82,86, s²=0,054, N=27	-7,754x10⁻³	-6,285
II	Intercept	9,1574x10⁻¹	1,0123
	WNSA-3; A ırlıklı PNSA (PNSA3*TMSA/1000) [Zefirov's PC]	3,3899 x10⁻¹	13,3106
	PMIA; Eylemsizlik momenti A / atom sayısı	-3,2919 x10²	-6,4569
	MPCC; C atomu üzerindeki maksimum kısmi yük [Zefirov's PC]	2,6429 x10¹	5,7735
	AIC(1); Ortama bilgi indeksi (mertebeye 1) R²=0,930, R²_{cv}=0,885, F=73,92, s²=0,060, N=27	9,8225 x10⁻¹	3,9420
III	Intercept	4,2482	10,3278
	WNSA-3; A ırlıklı PNSA (PNSA3*TMSA/1000) [Zefirov's PC]	2,8016x10⁻¹	10,6263
	PMIA; Eylemsizlik momenti A / atom sayısı	-3,5341x10²	-5,4658
	MPCC; C atomu üzerindeki maksimum kısmi yük [Zefirov's PC]	2,2877x10¹	3,9899
	R²=0,881, R²_{cv}=0,682, F=57,21, s²=0,098, N=27		
IV	Intercept	2,2649	2,0269
	WNSA-3 A ırlıklı PNSA (PNSA3*TMSA/1000) [Zefirov's PC]	2,5648x10⁻¹	9,7574
	PMIA; Eylemsizlik momenti A / atom sayısı	-2,9995x10²	-4,4116
	Qmax-Qmin; Polarite parametresi	1,4455x10¹	3,0608
	R²=0,857, R²_{cv}=0,789, F=46,29, s²=0,118, N=27		
V	Intercept	5,8318	20,5823
	WNSA-1; A ırlıklı PNSA (PNSA1*TMSA/1000) [Zefirov's PC]	-1,8678x10⁻²	-10,7418
	PMIA; Eylemsizlik momenti A / atom sayısı	-3,1233x10²	-4,3592
	R²=0,839, R²_{cv}=0,767, F=62,92 s²=0,1280 N=27		

Tablo 4.3. QSAR modellerinin validasyonu

<i>Training Set</i>	<i>N</i>	R^2	R^2_{cv}	<i>F</i>	s^2	<i>Test Set</i>	<i>N</i>	<i>RMSE</i>	$R^2_{ext.}$
Model I									
A+B	18	0.945	0.856	56.69	0.068	C	9	0.229	0.735
B+C	18	0.854	0.680	19.03	0.075	A	9	0.169	0.982
C+A	18	0.978	0.964	148.19	0.023	B	9	0.340	0.804
Model II									
A+B	18	0.935	0.861	46.73	0.081	C	9	0.193	0.844
B+C	18	0.896	0.793	28.25	0.053	A	9	0.466	0.893
C+A	18	0.973	0.890	120.25	0.029	B	9	0.386	0.876
Model III									
A+B	18	0.903	0.688	43.53	0.112	C	9	0.310	0.672
B+C	18	0.771	0.492	15.76	0.109	A	9	0.757	0.646
C+A	18	0.943	0.852	78.13	0.058	B	9	0.452	0.793
Model IV									
A+B	18	0.883	0.780	35.29	0.136	C	9	0.339	0.568
B+C	18	0.743	0.444	13.49	0.123	A	9	0.348	0.920
C+A	18	0.910	0.774	47.57	0.092	B	9	0.465	0.786
Model V									
A+B	18	0.866	0.752	48.46	0.145	C	9	0.348	0.364
B+C	18	0.695	0.424	17.12	0.136	A	9	0.426	0.909
C+A	18	0.917	0.866	83.61	0.079	B	9	0.523	0.481

Tablo 4.4. QSAR molellerinde olan moleküler tanımlayıcıların inter-korrelasyonu

	WNSA-1	DPSA-1	RNR	ABIC(2)	(Qmax-Qmin)	WNSA-3	PMIA	MPCC	AIC(1)
WNSA-1	1,000								
DPSA-1	-0,186	1,000							
RNR	-0,462	-0,654	1,000						
ABIC(2)	-0,313	-0,084	0,016	1,000					
(Qmax-Qmin)	0,667	0,133	-0,557	-0,107	1,000				
WNSA-3	-0,955	0,174	0,509	0,108	-0,770	1,000			
PMIA	-0,638	-0,177	0,091	-0,084	0,133	0,174	1,000		
MPCC	0,694	-0,638	0,655	-0,313	0,667	-0,955	-0,328	1,000	
AIC(1)	0,655	0,091	-0,717	0,016	-0,557	0,509	-0,572	0,512	1,000

4.3. QSAR modelleri üzerine tartı ma

Tablo 4.2 de verilen QSAR modellerinin tamamı istatistiki açıdan oldukça iyi durumdadır. Bir QSAR modelinin i e yarar olmasının ön artı istatistik parametrelerinin yeterli düzeyde olmasıdır. O yönden sunulan modellerin hiçbir sıkıntısı yoktur. QSAR modellerinde arzu edilen ikinci önemli kıstas, modellerin ‘mekanistik yorumlanabilir’ olmasıdır. Mekanistik yorumlanabilir ile kast edilen ey; modeli olu turan moleküler tanımlayıcılar incelenerek, biyolojik aktif bir molekülün farmakor grupları ile onların etkile im sonucu biyolojik yanıtı do uraca ı reseptör ya da enzim gibi makro-moleküllerle ne tür etkile imler olu abilece inin yorumlanabilir olmasıdır. Bu yorumlama modeli olu turan moleküler tanımlayıcıların do asına ba lıdır. Bu açıdan bakıldı ında kuantum mekaniksel moleküler tanımlayıcılar en kolay yorumlanabilir olanlardır. Biyolojik aktivite yaygın olarak, ligand molekül ile enzim arasında bir kompleks olu turma ekinde gerçeikle ti inde ve yük transferi söz konusu oldu u durumlarda; ligand molekülün polaritesi, öncül orbitallerinin enerjileri (HOMO, LUMO), polarlık tensörleri ve üzerinden kompleks olu an atomun kısmi yükleri gibi yaygın kuantum mekaniksel tanımlayıcıların modellerde sıklıkla rastlanır. Bu tür modellerin mekanistik yorumu rahatlıkla yapılabilir. Literatür özeti bölümünde verilen birçok model kuantum mekaniksel moleküler tanımlayıcılara dayanmaktadır. Biz bu çalı mada QSAR modellerini öncelikle kuantum mekaniksel moleküler tanımlayıcılara dayalı olu turmaya özellikle çalı tık ancak ba arılı bir sonuca ula amadık. Denedi imiz tüm kuantum mekaniksel moleküler tanımlayıcılar ile aktivite arasında korelasyon gözlenemedi. Bunun neden ba arısız oldu unun sebebi belki de Kumarinlerin inhibasyon mekanizmasında yatmaktadır. Daha giri bölümünde bahsedildi i dibi, bu çalı ma Kumarinleri Karbonik anhidraz enzimini inhibasyonu ile ilgili ilk çalı madır. Literatür özeti bölümünde verilen birçok kuantum mekaniksel moleküler tanımlayıcılara yapılan QSAR çalı malarında kullanılan inhibitörlerin tamamı Sülfonamit türevleri ile yapılmı tır ve hepsinin Karbonik anhidraz enzimine ba lanma mekanizması aynıdır. Sülfonamitlerin ba lanma mekanizmasında amin grubundaki azot üzerinden enzimin aktif sitesindeki çınko atomu ile kovalent ba olu umu söz konusudur. Buda Sülfonamit ligandlar ile enzim arasında bir yük transferi olma imkânını ortaya

koymaktadır. Yük transferinin oldu u durumlarda kuantum mekaniksel moleküler tanımlayıcılara korelasyon olması çok yüksek ihtimaldir. Ancak, Maresca ve ark. (2009) yaptı ı çalı ma gösteriyor ki Kumarinler enzimin aktif sitesindeki çinko atomu ile kovalent ba yapmaksızın, aktif bölgenin a zını bir kapak gibi kaplayarak ekti mekanizması olu turuyorlar. Bu durumda ligand ile enzim arasında bir yük transferi söz konusu olmadı ından kuantum mekaniksel moleküler tanımlayıcılara bir korelasyon olu turulamıyor. Tablo 4.2 deki modellere bakıldı ında moleküler tanımlayıcılara ekseriyetle molekülün elektrostatik do ası ile ilgilidir. Ancak orada bir tane geometrik moleküler tanımlayıcı var oda **PMIA**. Bu moleküler tanımlayıcı, molekül bir Kartezyen koordinata yerle tirildi inde molekülün kapladı ı en uzun eksen yönündeki eylemsizlik momentinin o moleküldeki atom sayısına bölümüne e ittir. Her aldı ı tüm QSAR modellerinde yüksek bir negatif katsayı ile bulunmaktadır. Bunun anlamı, **PMIA** arttıkça biyolojik aktivite azalmakta. Bu bize molekülün geometrisi ile aktivitesi arasında bir ili ki kurmamıza imkan sa lıyor. **Qmax-Qmin**, **WNSA-1**, **WNSA-3**, **DPSA-1** ve **MPCC** elektrostatik moleküler tanımlayıcılardır mekanistik yorumlaması oldukça zordur. QSAR modellerinde ayrıca iki adet topolojik moleküler tanımlayıcı, **ABIC(2)** ve **AIC(1)** yer almı tır. Bu moleküler tanımlayıcılarında mekanistik yorumlaması oldukça zordur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship - Kantitatif Yapı-Etki Analizleri) etkisi yüksek ve yan-etkisi az ilaçların geliştirilmesi için vazgeçilmez ve yaygın bir yöntemdir. QSAR metodunun temeli, halihazırda biyolojik etkisi (ilaç etkisi) deneysel olarak ölçülmüş bir grup molekülü kullanarak, bu moleküllerin biyolojik etkisine artırıcı yada azaltıcı yönde katkı yapan moleküller parametrelerin istatistiksel analiz metotları kullanarak tespit edilmesi mümkündür. Karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1) en basitinden en gelişmiş olana kadar doğadaki tüm canlılarda var olan bir metalo-enzimdir. Bu enzimin doğada pek çok formu olmakla beraber, buldukları canlıya bağlı olarak beş gruba (α -CA, β -CA, δ -CA, γ -CA ve ϵ -CA) ayrılmıştır. Doğaya kadar insandan hücre içerisindeki lokalizasyonu farklı ve yapısal olarak birbirine benzer 15 farklı Karbonik Anhidraz izo-enzim belirlenmiştir. Bunlardan CA IX, CA XII ve CA XIV izo-enzimlerinin lokalizasyonu trans membran olup inhibasyonu anti kanser etki ile ilişkilendirilmektedir.

Bizde bu tez çalışmasında Kumarinlerin ilaç olma potansiyelini araştırmak amacıyla, CA-XII izo-enzimine karşı deneysel yolla ölçülmüş biyolojik aktivite değerlerini kullanarak bir QSAR çalışması yaptık. Çalışmada 27 adet Kumarin türevi molekülün kullanıldı. Hesaplanan moleküller tanımlayıcılarla literatürden alınan deneysel yolla ölçülmüş biyolojik aktivite verileri Codessa yazılımı kullanılarak Çoklu Lineer Regresyon (ÇLR) ile modellenerek tabi tutularak birçok QSAR denklemi elde edildi. Elde edilen QSAR modellerinin istatistiksel düzeyi oldukça yüksek olmasına rağmen mekanistik yorumlanabilirlik kabiliyeti oldukça sınırlı. Ancak yine de elde edilen QSAR modelleri aktivitesi yüksek Kumarin türevlerinin dizaynında kullanılabilir.

Bu çalışmada 27 sayıda molekül kullanılması olması QSAR çalışması için yeterli bir sayı olmasına rağmen, diğer literatüre yeni sentezlenmiş ve aktiviteleri ölçülmüş Kumarinler katılırsa elde edilen moleküllerin tahmin gücü bunlarda sınanabilir. Ayrıca Kumarinlerin kovalent bağ yapmaksızın inhibasyon etkisi

gösteriyor olmasından dolayı bazı COMFA ve CoMSIA gibi mekanistik yorumlanabilir 3D QSAR tekniklerinin uygulanması Kumarinlerin biyolojik etki mekanizmalarının aydınlatılmasında çok etkili olabilir.

KAYNAKLAR

- AGRAWAL, V. K., BANERJ, M., GUPTA, M., S NGH, J., KHAD KAR, P. V., SUPURAN, C. T. 2005. QSAR study on carbonic anhydrase inhibitors. water-soluble sulfonamides incorporating betaalanyl moieties, possessing long lasting-intra ocular pressure lowering properties—a molecular connectivity approach. *Eur. J. Med. Chem.*, 40, 1002–1012.
- AGRAWAL, V. K., BANO, S., SUPURAN, C. T., KHAD KAR, P. V. 2004. QSAR study on carbonic anhydrase inhibitors. aromatic/heterocyclic sulfonamides containing 8-quinoline-sulfonyl moieties, with topical activity as antiglaucoma agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 39, 593–600.
- AGRAWAL, V. K., SHARMA, R., KHAD KAR, P. V. 2002. QSAR studies on carbonic anhydrase inhibitors. a case of ureido and thioureido derivatives of aromatic/heterocyclic sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem.*, 10, 2993–2999.
- AGRAWAL, V. K., S NGH, J., KHAD KAR, P. V., SUPURAN, C. T. 2006. QSAR study on topically acting sulfonamides incorporating GABA moieties. a molecular connectivity approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 2044–2051.
- AGRAWAL, V. K., SR VASTAVA, S., KHAD KAR, P. V., SUPURAN, C. T. 2003. Quantitative structure–activity relationship study on sulfanilamide Schiff’s bases. carbonic anhydrase (CA) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 5353–5362
- AKI- ENER, E. ve YALÇIN, ., 2003. Kantitatif Yapı-Etki li kileri Analizleri. Ankara Üni. Basım Evi, Ankara, 350s
- AK BA, T., ALPERN, R. J., EVELOFF, J., and WARNOCK, D. G., 1986. Electrogenic sodiumbicarbonate cotransport in rabbit renal cortical basolateral membrane vesicles. *J. Clin. Invest.*, 78, 1472
- BAJAJA, S., SAMB A, S. S., MADAN, A. K. 2004. Prediction of carbonic anhydrase activation by tri-/tetrasubstituted-pyridinium-azole compounds. a computational approach using novel topochemical descriptor. *QSAR Comb. Sci.*, 23, 506–514.
- BALABAN, A. T., BASAK, S. C., BETER NGHE, A., M LLS, D., SUPURAN, C.T. 2004. QSAR study using topological indices for inhibition of carbonic anhydrase II by sulfanilamides and Schiff bases. *Mol. Divers.*, 8, 401–412.
- BORN, M., and OPPENHEIMER, J. R., 1927. Zur Quantentheorie der Molekül, *Ann. Phys.* 84. 457-484.
- CLARE, B. W., SUPURAN, C. T. 1999. Carbonic anhydrase inhibitors. Part 61. Quantum chemical QSAR of a group of benzenedisulfonamides. *Eur. J. Med. Chem.*, 34, 463–474.
- CLARE, B. W., SUPURAN, C. T. 2000 Carbonic anhydrase inhibitors. Part 86. A QSAR study on some sulfonamide drugs which lower intra-ocular pressure, using the ACE non-linear statistical method. *Eur. J. Med. Chem.*, 35, 859–865.

- CLARE, B.W., SUPURAN, C. T. 2005. Predictive flip regression. a technique for QSAR of derivatives of symmetric molecules. *J. Chem. Inf. Model.*, 45, 1385–1391.
- CLARE, B.W., SUPURAN, C. T. 2005. A physically interpretable quantum-theoretic QSAR for some carbonic anhydrase inhibitors with diverse aromatic rings, obtained by a new QSAR procedure. *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 2197–2211.
- CORWIN, H. TOSHIO, F. 1964. - - Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure, *J Am. Chem Soc* 86.1616–1626.
- EHRlich, P., 1913. Chemotherapeutics. Scientific Principles, Methods and Results, *Lancet* II, 445.
- EROGLU, E., TURKMEN, H. 2007. A DFT-based quantum theoretic QSAR study of aromatic and heterocyclic sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors against isozyme, CA-II. *J. Mol. Graph. Model.*, 26, 701–708.
- EROGLU, E., TURKMEN, H., GULER, S., PALAZ, S., OLTULU, O. 2007. A DFT-based QSARs study of acetazolamide/sulfanilamide derivatives with carbonic anhydrase (CA-II) isozyme inhibitory activity. *Int. J. Mol. Sci.*, 8, 145–155.
- GUPTA, S. P., KUMARAN, S. A. 2005. quantitative structure–activity relationship study on some aromatic/heterocyclic sulfonamides and their charged derivatives acting as carbonic anhydrase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 20, 251–259.
- GUPTA, S. P., MAHESWARAN, V., PANDE, V., KUMAR, D. A. 2003. comparative QSAR study on carbonic anhydrase and matrix metalloproteinase inhibition by sulfonylated amino acid hydroxamates. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2003, 18, 7–13.
- HAMMET, L. P., 1940. *Physical Organic Chemistry*, McGraw-Hill, Newyork
- HARTREE, D. R., and FOCK, V., 1957. Representation of The exchange Terms in Fock’s Equation by A Quasi-Potential, *Phys. Rev.* 107.1631-1639.
- HEWETT-EMMETT, D., 2000 In the Carbonic anhydrase New Horizons. Birkhauser Verlag. Basel, 29-78
- H LLEBRECHT, A., KLEBE, G. 2008. Use of 3D QSAR models for database screening. a feasibility study. *J. Chem. Inf. Model*, 48, 384–396.
- H LLEBRECHT, A., SUPURAN, C. T., KLEBE, G. 2006. Integrated approach using protein and ligand information to analyze selectivity- and affinity-determining features of carbonic anhydrase isozymes. *ChemMedChem*, 1, 839–853.
- HUANG, H., PAN, X., TAN, N., ZENG, G., J , C. 2007. 3D-QSAR study of sulfonamide inhibitors of human carbonic anhydrase II. *Eur. J. Med. Chem.*, 42, 365–372.
- JA SWAL, M., KHAD KAR, P. V., SUPURAN, C. T. 2004. QSAR study on CA inhibitory activity of disulfonamides. effect of halogen substitution. *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 2477-2482.
- JA SWAL, M., KHAD KAR, P. V., SUPURAN, C. T. 2004. Topological modeling of lipophilicity, diuretic activity, and carbonic inhibition activity of benzene sulfonamides. a molecular connectivity approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 5661–5666.

- JA SWAL, M., KHAD KAR, P.V., SCOZZAFAVA, A., SUPURAN, C. T. 2004. Carbonic anhydrase inhibitors. the first QSAR study on inhibition of tumor-associated isoenzyme IX with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 3283–3290.
- K. CH A, S. CWYKOFF, C., WATSON, P.H., HAN, C., LEEK, R. D., PASTOREK, J., GATHER, K.C., RATCLIFFE, P. and HARRIS, A. L., 2001. Prognostic Significance of a novel Hypoxia-Regulated Marker. Carbonic Anhydrase IX. in *Invasive Breast carcinoma*, *J.Clin.Oncology* vol 19, No 16, 3660-3668.
- KARHUMAA, P., PARKKILA, S., TÜREC, Ö. 2000. Identification of carbonic anhydrase XII as the membrane isozyme expressed in the normal human endometrial epithelium. *Mol. Hum. Reprod.*, 6, 68–74.
- KHAD KAR, P. V., DEEB, O., JABER, A., SINGH, J., AGRAWAL, V. K., SINGH, S., LAKHWAN, M. 2006. Development of quantitative structure–activity relationship for a set of carbonic anhydrase inhibitors. use of quantum and chemical descriptors. *Lett. Drug Des. Discov.*, 3, 622–635.
- KHAD KAR, P. V., SHARMA, V., KARMARKAR, S., SUPURAN, C. T. 2005. QSAR studies on benzene sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors. need of hydrophobic parameter for topological modeling of binding constants of sulfonamides to human CA-II. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 923–930.
- KOHN, W., and SHAM, L. J., 1965. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects, *Phys. Rev.* 140.1133.
- KUBINYI, H., 1993. *Hansch analysis and related approaches*, Weinheim, New York.
- LINDSKOG, S., 1997. Structure and mechanism of Carbonic anhydrase. *Pharmacol. Ther.*, 74, (1997), 1-20.
- MAREN, T. H., 1967. Carbonic anhydrase, chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.*, 47, 595.
- MARESCA, A., SCOZZAFAVA, A. and SUPURAN, C.T., 2010. 7,8-Disubstituted-but not 6,7-disubstituted coumarins selectively inhibit the transmembrane. tumor-associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII over the cytosolic ones I and II in the low nanomolar/subnanomolar range. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 7255-7258.
- MARESCA, A., TEMPERINI, C., VU, H., PHAM, N.B., POULSEN, S.A., SCOZZAFAVA, A., QUINN, R.J. and SUPURAN, C.T., 2009. Non-Zinc-Mediated Inhibition of Carbonic Anhydrases. Coumarins Are a New Class of Suicide Inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, 131 (8), 3057-3062.
- MARESCA, A. and SUPURAN, C.T., 2010. Coumarins incorporating hydroxy- and chloro-moieties selectively inhibit the transmembrane. tumor-associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII over the cytosolic ones I and II. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 4511-4514.
- MARESCA, A., TEMPERINI, C., POCHET, L., MASEREEL, B., SCOZZAFAVA, A. and SUPURAN, C.T., 2010. Deciphering the Mechanism of Carbonic Anhydrase Inhibition with Coumarins and Thiocoumarins. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 335-344.

- MELAGRAK, G., AFANTIS, A., SARMESE, H., IGGLESS-MARKOPOULOU, O., SUPURAN, C. T. 2006. QSAR study on para-substituted aromatic sulfonamides as carbonic anhydrase II inhibitors using topological information indices. *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 1108-1114.
- MOLLER, C. and PLESSET M. S., 1934. Not on an Approximation Treatment for Many Electron Systems, *Physical Reviews*, 46, 618.
- OLIVE, L. P., AQUINA-PARSONS, A., MACPHAIL, H.S., LAO, S.Y., RALEGH, J.A., LERMAN, I. M. and STANBRIDGE, J. E., 2001. Carbonic Anhydrase 9 as an Endogenous Marker for Hypoxic cells in cervical cancer. *Cancer Research*, 61, 8924-8929.
- ÖZENSOY, Ö., 2006. Kanser ile ilgili Karbon Anhidraz IX ve XII izoenzimlerinin (CA-IX, CA-XII) ekspresyonu, saflaştırılması ve bazı bileşenlere karşı inhibisyon etkilerinin araştırılması. T.C. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Doktora tezi, Balıkesir.
- POPELNER, P. L., SMITH, P. J. 2006. QSAR models based on quantum topological molecular similarity. *Eur. J. Med. Chem.*, 41, 862-873.
- PUCCELLI, L., FASOLIS, G., CECCHI, A., WANG, J.Y., GAMBER, A., MONTERO, J.L., SCOZZAFAVA, A. and SUPURAN, C.T. 2005. Carbonic anhydrase inhibitors. synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with sulfonamides incorporating thioureido-sulfanyl scaffolds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 15, Issue 9, 2359-2364
- SCHERER, A., and DETSCH, P., 1984. A 54,000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes in *Biology and Chemistry of the Carbonic anhydrase*. *Annals New York Acad.Sci.*, 429, 241.
- SINGH, J., SHAK, B., SINGH, S., AGRAWAL, V. K., KHADKAR, P. V., DEEB, O., SUPURAN, C. T. 2008. Comparative QSAR study on para-substituted aromatic sulphonamides as CAII inhibitors. information versus topological (distance-based and connectivity) indices. *Chem. Biol. Drug Des.*, 71, 244-259.
- SINGH, J., SINGH, S., THAKUR, S., LAKHWAN, M., KHADKAR, P.V., AGRAWAL, V. K., SUPURAN, C. T. 2006. QSAR study on murine recombinant isozyme mCAXIII. topological vs structural descriptors. *ARKIVOC*, 14, 103-118.
- STAMS, T., CHEN, Y., BARACK-SJODIN, P. A., HURT, J. D., LAO, J., MAY, J. A., DEAN, T., LAPS, P., and CHRISTIANSON, D. W., 1998. *Protein Sci.* 7, 556.
- SUGRUE, M. F., 1996. The preclinical pharmacology of dorzolamide Hydrochloride. a topical Carbonic anhydrase inhibitor. *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, 12, 363-376.
- SUPURAN, C. T., CLARE, B. W. 1998. Carbonic anhydrase inhibitors. Part 47. Quantum chemical quantitative structure-activity relationships for a group of sulfanilamide Schiff base inhibitors of carbonic anhydrase. *Eur. J. Med. Chem.*, 33, 489-500.

- SUPURAN, C. T., CLARE, B. W. 1999, Carbonic anhydrase inhibitors. Part 57. Quantum chemical QSAR of a group of 1,3,4-thiadiazole- and 1,3,4-thiadiazoline disulfonamides with carbonic anhydrase inhibitory properties. *Eur. J. Med. Chem.*, 34, 41–50
- SUPURAN, C. T., CLARE, B. W. 2004. Quantum theoretic QSAR of benzene derivatives. some enzyme inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 19, 237–248.
- SUPURAN, C.T. and W NUM, Jean-Yves., 2009. Drug Design of Zinc Enzyme Inhibitors. Functional, Structural, and Disease Applications. John Wiley & Sons, Inc.
- SUPURAN, C.T., 2008. Carbonic anhydrases. novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7, 168-181.
- SUPURAN, C.T., 2010 Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 20, 3467-3474
- SUPURAN, C.T., SCOZZAFAVA, A. and CONWAY, J., 2004. Carbonic Anhydrase. Its Inhibitors and Activators. CRC Press, 2004.
- SUPURAN, C.T., and SCOZZAFAVA, A., 2001. CarbonicAnhydraseInhibitors. *Curr. Med.Chem.*, 1, 61-97.
- TAFT, R. W., 1956. Jr., Steric Effects in Organic Chemistry, ed. M.S. Newman, Wiley, Newyork, 556s.
- THAKUR, A., THAKUR, M., KHAD KAR, P. V., SUPURAN, C. T., SUDELE, P.2004. QSAR study on benzenesulphonamide carbonic anhydrase inhibitors. topological approach using Balaban index. *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 789–793.
- WEBER, A., BOHM, M., SUPURAN, C. T., SCOZZAFAVA, A., SOTR FFER, C. A., KLEBE, G. 2006. 3DQSAR selectivity analyses of carbonic anhydrase inhibitors. insights for the design of isozyme selective inhibitors. *J. Chem. Inf. Model*, 46, 2737–2

ÖZGEÇM

1980 yılında, anlıurfa' da do du. İkokul, ortaokul ve liseyi anlıurfa' da okudu. 2008 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümünü bitirdi. 2009 yılında Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans yapmaya hak kazandı.

ÖZET

Karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1) en basitinden en gelişmiş olana kadar doğadaki tüm canlılarda var olan bir metalo-enzimdir. Bu enzimin doğada pek çok formu olmakla beraber, buldukları canlıya bağlı olarak beş gruba (α -CA, β -CA, δ -CA, γ CA ve ε -CA) ayrılmıştır. Bu guruplardan α -Karbonik anhidraz memelilerde bulunur ve temel fonksiyonu kanda ve diğer dokularda



reaksiyonunu katalize etmek vasıtasıyla asit baz dengesini ayarlamak ve dokulardan karbondioksit transferini sağlamaktır. Bu enzimin aktif bölgesinde Çinko (Zn^{+2}) atomu vardır, bu atom enzimin inhibisyonu esnasında genellikle inhibitör ile terahedral bir bağ yapısı gerçekleştirir. Ancak son birkaç yıl içerisinde Kumarin türevi moleküllerin farklı bir mekanizma ile bu enzimi inhibe ettiği ortaya çıktı. Ayrıca bu yeni keşfedilen Kumarin türevi moleküllerin farklı CA izo-enzimlerini seçici şekilde inhibe ettiği gözlemlendi. Geleneksel olarak inhibasyon araştırmalarında en yoğun şekilde çalışılan sulfonamide tabanlı bileşiklerin seçiciliğine kıyasla Kumarin türevi moleküllerin daha seçici olması, çalışmaların bu alana kaymasına sebep olacaktır. Burada bahsedilen CA izo-enzimlerinden bazılarının seçici inhibisyonu bazı hastalıkların tedavisinde kullanılacak ilaçların geliştirilmesinde temel bir yoldur.

Günümüzde QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship - Kantitatif Yapı-Etki Analizleri) etkisi yüksek ve yan-etkisi az ilaçların geliştirilmesi çalışmalarında vazgeçilmez ve yaygın bir yöntemdir. QSAR metodunun temeli, halihazırda biyolojik etkisi (ilaç etkisi) deneysel olarak ölçülmüş bir grup molekülü kullanarak, bu moleküllerin biyolojik etkisine artırıcı yada azaltıcı yönde katkı yapan moleküler parametrelerin istatistiksel analiz metotları kullanarak tespit edilmesi esasına dayanır.

Bu çalışmada 27 adet Kumarin türevi molekülün, Karbonik Anhidraz, CA-XII izo-enzimine karşı deneysel yolla ölçülmüş biyolojik aktivite değerleri kullanarak, QSAR (Kantitatif Yapı-etki Analizi) çalışması yapıldı. Çalışmada Kumarinlerin üç boyutlu yapıları ve bir çok moleküler parametreleri Gaussian 03 yazılımı ile

hesaplandı. Elde edilen bu yapılar CodessaPro yazılımına yüklenerek çok sayıda moleküler tanımlayıcı (descriptor) hesaplandı. Hesaplanan moleküler tanımlayıcılarla literatürden alınan deneysel yolla ölçülmü biyolojik aktivite verileri Codessa yazılımı kullanılarak Çoklu Lineer Regresyon (ÇLR) i lemine tabi tutularak birçok QSAR denklemi elde edildi. Elde edilen QSAR denklemleri arasında istatistik parametreleri en yüksek olan bir adet iki parametrelili, iki adet üç parametrelili, iki adet dört parametrelili olmak üzere toplam be adet QSAR denklemi modeli olarak seçildi ve ayrıntılı ekilde tartı ıldı. Bu be modelden istatistik de erleri en yüksek olan dört parametrelili bir model olup; $R^2 = 0.93$, $R^2_{CV} 0.90$, $F=82,86$, $s^2=0,054$, $N=27$ dir. Elde edilen QSAR modellerinin yorumuyla, biyolojik aktiviteye etki eden faktörler açıklanmaya çalı ıldı.

SUMMARY

The carbonic Anhydrase (CAs, EC 4.2.1.1) are ubiquitous metallo-enzymes, present in prokaryotes and eukaryotes, being encoded by five distinct groups which are (α -CA, β -CA, δ -CA, γ CA and ε -CA). In mammals, 16 different -CA isozymes have been defined with very different sub-cellular localizations and tissue distribution. These enzymes catalyze a very simple physiological reaction,



The inter-conversion between carbon dioxide and the bicarbonate ion and are thus involved in crucial physiological processes connected with such as respiration and transport of carbon dioxide between tissues/organs and regulation of pH in the tissues. In the inhibition process of CAs, inhibitors are coordinated to Zn^{+2} ions with a tetrahedral geometry. In recent years, it has been shown that those enzymes can be inhibited by Coumarin derivatives with a different mode of action. It has been also observed that Coumarin derivatives can inhibit CA isozymes selectively in comparison to traditional sulfonamide based inhibitors. Selectively inhibition of some of these CA isozymes is a way to develop drugs for treatment of many diseases such as cancer tumors.

QSAR is widely used method to preventing from side effects of existing drugs as well as seeking new lead molecules as drug candidates. The principles of the method are relying on the quantitatively correlate chemical structure with its biological activity using statistical analysis of data of a group of compounds. Once, the parameters, which play a role for the activity, and are determined then a QSAR model can be constructed to estimate the biological activity of virtual molecules.

This study presents Quantitative Structure Activity Relationships (QSAR) study on a pool of 27 Coumarin compounds as Carbonic Anhydrase (CA-XII) isozyme inhibitors. 3D structure and many molecular properties of Coumarin compounds have calculated by Gaussian 03 software. Several molecular descriptors have been calculated and QSAR models have been drawn up with the help these calculated descriptors and Carbonic Anhydrase (CA-XII) inhibitory data of the molecules by

using the Multiple Linear Regression (MLR) technique which is implemented in CODESSA PRO software.

Among the obtained QSAR equations, five of them with the highest statistical parameters have been selected as the models. The statistically the most significant selected model is a four parameters linear equation with the squared correlation coefficient R^2 values of ca. 0.93 and the squared cross-validated correlation coefficient R^2_{CV} values of ca. 0.90 and $F=82.8$, $s^2=0,054$ and $N=27$. The results were discussed in the light of the main factors that influence the inhibitory activity of the Carbonic Anhydrase (CA-II) isozyme. The obtained models allowed us to reveal some structural factors, which are strongly correlated with the biological activity of the compounds.

