



MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ÇİFT ETKİYE SAHİP POTANSİYEL  
ANTİOKSİDAN VE ANTİ-PARKİNSON  
İLAÇ AKTİF MADDELERİN *İN SİLİKO*  
TASARIMI**

PINAR ERZİNCAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
Kimya Anabilim Dalı  
Biyokimya Programı

**DANIŞMAN**  
Prof. Dr. Ayşe OGAN

**EŞ-DANIŞMAN**  
Prof. Dr. Safiye ERDEM

**İSTANBUL, 2016**



MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ÇİFT ETKİYE SAHİP POTANSİYEL  
ANTİOKSİDAN VE ANTİ-PARKİNSON  
İLAÇ AKTİF MADDELERİN *İN SİLİKO*  
TASARIMI**

PINAR ERZİNCAN

520613002

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

**DANIŞMAN**

Prof. Dr. Ayşe OGAN

**EŞ-DANIŞMAN**

Prof. Dr. Safiye ERDEM

İSTANBUL, 2016



MARMARA UNIVERSITY



INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES  
IN PURE AND APPLIED SCIENCES

IN SILICO DESIGN OF POTENTIAL DRUG  
ACTIVE COMPOUNDS POSSESSING  
ANTIOXIDANTS AND ANTI-PARKINSON DUAL  
EFFECT

---

---

PINAR ERZİNCAN

520613002

**MASTER THESIS**

Department of Chemistry

**Thesis Supervisor**

Prof. Dr. Ayşe OGAN

**Thesis CO- Supervisor**

Prof. Dr. Safiye ERDEM

ISTANBUL, 2016

---

---

# MARMARA ÜNİVERSİTESİ

## FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Pınar ERZİNCAN'ın "ÇİFT ETKİYE SAHİP POTANSİYEL ANTIOKSİDAN VE ANTI-PARKİNSON İLAÇ AKTİF MADDELERİN *İN SİLİKO* TASARIMI" başlıklı tez çalışması, 27 Haziran 2016 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

### Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ayşe OGAN	(Danışman)
Marmara Üniversitesi	
Prof. Dr. Melek TÜRKER SAÇAN	(Üye)
Boğaziçi Üniversitesi	
Doç. Dr. Serap DEMİR	(Üye)
Marmara Üniversitesi	

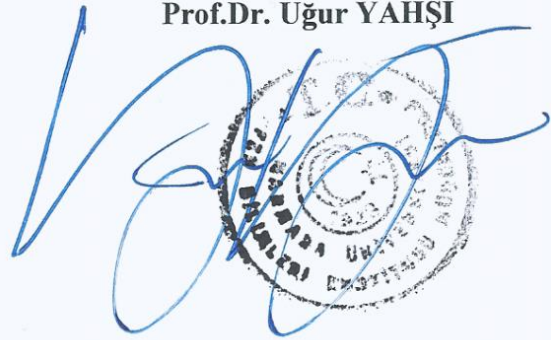


### ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun <sup>18.07.2016</sup> ..... tarih ve 016/17-02 sayılı kararı ile Pınar ERZİNCAN'ın Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof.Dr. Uğur YAŞI



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerini esirgemeyerek maddi ve manevi her konuda yanımda olan sevgili danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Safiye ERDEM'e ve Sayın Prof. Dr. Ayşe OGAN'a,

Tez çalışmalarımın KYAİ bölümünde büyük katkıları olan ve her konuda değerli fikirleri ile bana yol gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Melek TÜRKER SAÇAN'a,

Tez çalışmasında kullanılan bileşiklerin deneysel sentez, antioksidan aktivite ve MAO inhibisyon ölçümlerini yapan Doç. Dr. Serap GÜRBÜZ-DEMİR, Doç. Dr. Özkan DANIŞ, Yrd. Doç. Dr. Başak YÜCE-DURSUN, Dr. Cihan GÜNDÜZ, Yrd. Doç. Dr. Selçuk ALTUN ve Mustafa Muhlis ALPARSLAN'a

QSARINS yazılımının kullanım lisansını bize sağlayan Prof. Dr. Paola GRAMATICA'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü anımda yanımda olan ve desteğini benden esirgemeyen sevgili arkadaşım Dilek DÖNGEZ başta olmak üzere Kübra ÇAKIR ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü desteğiyle daima yanımda olan, umutsuzluğa kapılmadan karşıma çıkan tüm engelleri aşmamda bana güç veren canım aileme,

FEN-C-YLP-130515-0186 nolu proje kapsamında BAPKO'ya,

TÜBİTAK BİDEB 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında bana maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Haziran, 2016**

**Pınar ERZİNCAN**

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vi
YENİLİK BEYANI .....	vii
SEMBOLLER.....	viii
KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ .....	xi
TABLO LİSTESİ.....	xiii
1.1. Giriş ve Amaç .....	1
1.2. Genel Bilgiler.....	5
1.2.1. Enzimler .....	5
1.2.1.1. Flavin Koenzimleri .....	6
1.2.2. Enzim İnhibisyonu .....	7
1.2.2.1. Geri Dönüşümsüz (Irreversibl) Enzim İnhibisyonu .....	8
1.2.3. Monoamin Oksidaz (MAO) .....	10
1.2.3.1 Monoamin Oksidaz A ve B İzoenzimlerinin İşlevleri ve Karakteristik Özellikleri .....	11
1.2.3.2 Aromatik Kafes.....	13
1.2.3.3. Monoamin Oksidaz İnhibitörleri .....	15
1.2.3.3.1. Geri Dönüşümsüz MAO İnhibitörleri.....	16
1.2.3.3.2. Geri Dönüşümlü MAO İnhibitörleri.....	17
1.2.4. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres .....	18
1.2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri .....	19
1.2.6. Kumarinler .....	20
1.2.6.1. Kumarinlerin Antioksidan Özellikleri .....	21
1.2.6.2. Kumarinlerin Nörodejeneratif Özellikleri .....	23
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>26</b>
2.1. Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkisi (KYAİ) analizleri.....	26

2.1.1. Veri Setini Oluşturan Yapıların Elde Edilmesi ve Antioksidan Aktivite Çalışmaları .....	30
2.1.2. Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Kapasite (FRAP) Yöntemi ile Antioksidan Aktivitelerinin Ölçülmesi .....	31
2.1.3. Yapıların Optimizasyonu .....	35
2.1.4. Tanımlayıcı Hesabı .....	35
2.2.4.1 SPARTAN Tanımlayıcılarının Hesaplanması .....	35
2.1.4.2. DRAGON Tanımlayıcılarının Hesaplanması .....	36
2.1.5. Model Geliştirme .....	37
2.1.6. Modellerin Validasyonu .....	39
2.1.6.1. İç Validasyon .....	39
2.1.6.2. Dış Validasyon .....	41
2.1.7. Uygulama Alanının Belirlenmesi .....	43
2.2. Moleküler Doking (Moleküler Yerleştirme) .....	47
2.2.1. Enzim dosyalarının hazırlanması .....	48
2.2.2. Ligand bileşiklerinin hazırlanması .....	49
2.2.3. Konfigürasyon (Config) dosyasının hazırlanması .....	50
2.2.4. Doking İşlemi .....	51
2.2.5. Doking Sonuçlarının Görüntülenmesi .....	52
<b>3. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>53</b>
3.1. KYAİ Modelleri .....	53
3.1.1. Tanımlayıcıların Rolü .....	60
3.1.2. Modelin Uygulama Alanının Tanımlanması .....	61
3.1.3. Tasarlanan Bileşiklerin Antioksidan Aktivitelerinin Tahmin Edilmesi .....	62
3.2. Moleküler Doking Çalışmaları .....	65
3.2.1. Rijid Doking Sonuçları .....	66
3.2.2. Esnek Doking Sonuçları .....	68
3.2.3. Rijid ve Esnek Doking Sonuçlarının Karşılaştırılması .....	68
3.2.4. MAO İnhibisyon Çalışmaları .....	79
3.2.5. Tasarlanan Bileşiklerin Doking Sonuçları .....	81
3.3. Çift-Etki Gösterme Potansiyeli Olan Bileşikler .....	83
3.3.1. Veri Setindeki Bileşikler .....	83

3.3.2. Tasarılan Bileşikler.....	87
<b>4. GENEL DEĞERLENDİRME VE SONUÇ .....</b>	<b>90</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>92</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>103</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>118</b>





## ÖZET

### ÇİFT ETKİYE SAHİP POTANSİYEL ANTIOKSİDAN VE ANTI-PARKİNSON İLAÇ AKTİF MADDELERİN *İN SİLİKO* TASARIMI

Enzimler, canlılarda gerçekleşen metabolik reaksiyonların pek çoğunu hızlandıran protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Biyolojik sistemlerde endojen ve ekzojen kaynaklı faktörler sebebiyle sürekli olarak serbest radikaller ve diğer oksijen kökenli türler üretildiğinden, canlılar bu faktörlerle mücadele edebilmek amacıyla enzimatik ve non-enzimatik antioksidan savunma sistemleri geliştirmiştir. Vücudumuzda süperoksit üreten sistemlerden bir tanesi de monoamin oksidaz enzimidir. Monoamin oksidaz (EC-1.4.3.4, MAO) mitokondri zarının dışında bulunan, biyolojik aminlerin oksidasyonundan sorumlu bir flavoenzimdir. MAO'nun, MAO-A ve MAO-B olmak üzere iki fonksiyonel izoenzimi bulunmaktadır. Bunlardan MAO-A seçici olarak epinefrin ve serotonin oksitlerken, MAO-B ise dopamini oksitler. Dolayısıyla MAO-A ve MAO-B'nin inhibisyonu bu aminlerin yıkımını engelleyerek antidepresan ve anti-Parkinson etki sağlar.

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında;

1. Yeni sentezlenmiş ve antioksidan aktiviteleri ölçülmüş 37 adet kumarin türevinden oluşan veri seti kullanılarak, sağlamlığı istatistiksel kriterlerle ispatlanmış matematiksel modeller geliştirilmiş ve kantitatif yapı-aktivite ilişkileri (KYAİ) tanımlanmış,
2. Aynı kumarin türevlerinin MAO enzimleri ile etkileşimleri doking metoduyla incelenerek seçicilik ve etkinlikleri araştırılmış,
3. Her iki çalışmadan elde edilen sonuçlar karşılaştırılıp değerlendirilerek, çift-etki gösterme potansiyeli olan bileşikler belirlenmiş ve
4. Oluşturulan KYAİ modelleri kullanılarak yeni çift-etkili kumarin türevleri tasarlanmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda veri seti olarak kullanılan kumarin türevlerinin ve yeni tasarlanan kumarin türevlerinin bir kısmının yüksek MAO inhibisyon ve antioksidan aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla da çift etkiye sahip olduğu düşünülen bu bileşikler gelecek çalışmalar için umut vaad etmektedir.

**Haziran, 2016**

**Pınar ERZİNCAN**

## **ABSTRACT**

### **IN SILICO DESIGN OF POTENTIAL DRUG ACTIVE COMPOUNDS POSSESSING ANTIOXIDANTS AND ANTI-PARKINSON DUAL EFFECT**

Enzymes are biological catalysts having protein structure that speed up most of the metabolic reactions occurring in living organisms. As free radicals and oxygen based species are continuously produced in the biological systems depending on endogenous and exogenous factors, living organisms have developed enzymatic and non-enzymatic antioxidant defence mechanisms. One of the systems in our body that produce superoxide is monoamine oxidase enzyme. Monoamine oxidase (EC-1.4.3.4, MAO) is a flavoenzyme that is present outside the mitochondria membrane and is responsible for oxidation of biogenic amines. There are two functional isoenzymes of MAO; MAO-A and MAO-B. MAO-A selectively oxidizes epinephrine and serotonin, whereas MAO-B oxidizes dopamine. Hence, inhibition of MAO-A and MAO-B exhibits antidepressant and anti-Parkinson effect by preventing degradation of those amines. In the light of these, in this thesis;

1. Mathematical models that are proved to be reliable by statistical criteria have been developed by using data set comprising of recently synthesized 37 coumarin derivatives with measured antioxidant activities. The quantitative structure-activity relationships (QSAR) are described.
2. MAO binding affinity of the same coumarin compounds have been studied by examining their interactions with MAO enzymes through docking method.
3. Molecules that potentially exhibit dual-effect are specified by comparing and assessing the results of both QSAR and docking studies.
4. New coumarin derivatives have been designed by using the validated QSAR models developed in this work.

It is confirmed that some of the coumarin derivatives that are used as data set and those that are newly designed exhibit both high MAO inhibition and antioxidant activities. Hence, those compounds are promising dual effect inhibitors for future studies.

**June, 2016**

**Pınar ERZİNCAN**

## **YENİLİK BEYANI**

Alzheimer ve Parkinson gibi çağımızın önemli hastalıkları nörodejeneratif bozukluklar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Nörodejenerasyon oldukça karmaşık bir süreç olduğundan, önlenmesi ve tedavisi için tek bir farmakolojik hedef yerine çift etkili inhibitörlerin tasarlanması büyük umut vaatmektedir. MAO, serotonin, adrenalin ve dopamin gibi önemli nörotransmitterlerin oksidasyonunda ve hücre içi konsantrasyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu nedenle, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde MAO önemli bir hedef enzimdir ve farmakolojik müdahale için MAO inhibitörleri kullanılır. Diğer yandan, MAO aktivitesinin aşırı artışı oksidatif stres ile ilişkilendirilen, doku ve nöronların dejenerasyonuna sebep olan hidrojen peroksit, amonyak gibi toksik metabolitlerin aşırı derecede oluşumunu da beraberinde getirir. Bu tez çalışmasında, aynı bileşiğin hem antioksidan hem de MAO inhibisyon aktivitesi göstererek çok daha etkili olabileceği fikri ilk kez ortaya atılmıştır.

Veri setinde kullanılan kumarin türevlerinin bazıları Biyokimya grubu tarafından sentezlenmiş ve aktiviteleri ölçülmüş yeni potansiyel bileşiklerdir. Ayrıca, bu tez kapsamında, çift etki (antioksidan ve MAO inhibisyonu) gösterebilecek bileşiklerin yapı-aktiflik ilişkileri ilk kez incelenmiş ve yeni potansiyel bileşikler tasarlanarak deneysel çalışmalar için önerilmiştir.

## SEMBOLLER

$IC_{50}$	: Biyolojik aktivite (Maksimum inhibisyon konsantrasyonunun yarısı)
$Log P$	: Partisyon Katsayısı
$E_{HOMO}$	: En yüksek dolu moleküler orbital enerjileri
$E_{LUMO}$	: En düşük boş moleküler orbital enerjileri
$\mu$	: Dipol moment
$E$	: Enerji
$E_{aq}$	: Sulu faz enerjisi
$\eta$	: Sertlik
$\sigma$	: Yumuşaklık
$\omega$	: Elektrofillik
$R^2$	: Korelasyon Katsayısı
$R^2_{cv}$	: Çapraz validasyon korelasyon katsayısı
$R^2_{adj}$	: Düzeltilmiş korelasyon katsayısı
$\Delta G$	: Reaksiyon serbest enerji değişimi
$Q^2$	: Çapraz validasyon
$s$	: Standart tahmin hatası
$RMSE$	: Ortalama standart hataların kareleri
$F$	: Fischer istatistiği
$Q^2_{F1}, Q^2_{F2}, Q^2_{F3}$	: Tahmini korelasyon katsayılarının kareleri
$CCC$	: Uyum korelasyon katsayısı
$h^*$	: Kritik şapka değeri

## KISALTMALAR

<b>MAO</b>	: Monoamin Oksidaz
<b>MAO-A</b>	: Monoamin Oksidaz-A
<b>MAO-B</b>	: Monoamin Oksidaz-B
<b>FAD</b>	: Flavin Adenin Dinükleotid
<b>FMN</b>	: Flavin Mono Nükleotid
<b>KYAİ</b>	: Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkisi
<b>MLR</b>	: Çoklu Lineer Regresyon
<b>FRAP</b>	: Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Kapasite
<b>TEAC</b>	: Troloks eşdeğer antioksidan kapasite
<b>PDB</b>	: Protein data bank
<b>PM6</b>	: Parametrik method 6
<b>K<sub>i</sub></b>	: İnhibisyon sabiti
<b>SI</b>	: Seçicilik indeksi
<b>OECD</b>	: Organisation for Economic Co-operation and Development/Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
<b>ROT</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>GST</b>	: Glutatyon-S-transferaz,
<b>GPx</b>	: Glutatyon peroksidaz
<b>GR</b>	: Glutatyon redüktaz
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>AH</b>	: Alzheimer hastalığı
<b>AChE</b>	: Asetilkolinesteraz
<b>Tyr</b>	: Tirozin

**Cys** : Sistein  
**Gln** : Glutamin  
**Gly** : Glisin  
**Phe** : Fenilalanin  
**Leu** : Lösin  
**Ile** : İzölösin  
**Thr** : Treonin  
**Lys** : Lizin  
**His** : Histidin  
**Val** : Valin  
**Asn** : Asparajin  
**Met** : Metiyonin

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	Riboflavin vitaminin yapısı.....	6
Şekil 1.2.	İndirgenmiş ve oksitlenmiş FAD ve FMN yapıları.....	7
Şekil 1.3.	(a) MAO-A (2Z5X) (b) MAO-B (2XFN) enzim kristal yapıları .....	11
Şekil 1.4.	(a) MAO-A ve (b) MAO-B'nin aktif bölge boşluklarındaki farklılıklar .....	12
Şekil 1.5.	MAO'nun aktif bölgesindeki FAD'ın yapı formülü .....	14
Şekil 1.6.	MAO-A ve MAO-B izozimlerinin aktif bölge boşlukları ve aromatik kafes .....	14
Şekil 1.7.	Benzen, $\alpha$ -piron, ve kumarin halkaları.....	20
Şekil 1.8.	Kumarin türevlerinin terapötik uygulamaları .....	21
Şekil 1.9.	Kumarin molekülünün numaralandırma sistemi .....	22
Şekil 2.1.	KYAİ modellerinin geliştirilmesi sürecinde izlenen akış diyagramı.....	29
Şekil 2.2.	Troloks .....	30
Şekil 2.3.	Veri setini oluşturan bileşiklerin iki boyutlu yapıları .....	32
Şekil 2.4.	Moleküler doking çalışmalarında izlenen akış diyagramı .....	48
Şekil 2.5.	(a) Rijid (b) Esnek doking hesaplamalarında kullanılan örnek konfigürasyon dosyaları.....	50
Şekil 2.6.	AutoDock Vina programının validasyonu için yapılan RMSD hesaplamalarında (a) Harmin (b) 2-(2-benzofuranil)-2-imidazolin inhibitörünün dok pozisyonları ile kristal yapı pozisyonlarının ile üst üste çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler.....	51
Şekil 3.1.	Elde edilen modellerin MCDM grafiği .....	56
Şekil 3.2.	Model 3 aracılığıyla ait tahmin edilen Log(antioksidan aktivite) değerlerine karşı gözlenen Log(antioksidan aktivite) değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafik .....	59
Şekil 3.3.	Model 3 için çizilen Williams Grafiği .....	61
Şekil 3.4.	Kumarin türevlerinin antioksidan aktivitesinin tahmini için kullanılan model 3'ün uygulama alanı analizini gösteren grafik. ....	63
Şekil 3.5.	5 numaralı bileşiğin (a) rijid (b) esnek doking sonucunu göre enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-A'nın aktif bölgesine yerleşme pozisyonu.....	71
Şekil 3.6.	16 numaralı bileşiğin (a) rijid (b) esnek doking sonucunu göre enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-A'nın aktif bölgesine yerleşme pozisyonu.....	72

<b>Şekil 3.7.</b> 23 numaralı bileşiğin (a) rijid (b) esnek doking sonucunu göre enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-A'nın aktif bölgesine yerleşme pozisyonu.....	73
<b>Şekil 3.8.</b> 29 numaralı bileşiğin (a) rijid (b) esnek doking sonucunu göre enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-A'nın aktif bölgesine yerleşme pozisyonu.....	74
<b>Şekil 3.9.</b> 13 numaralı bileşiğin (a) rijid (b) esnek doking sonucunu göre enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-B'nın aktif bölgesine yerleşme pozisyonu.....	75
<b>Şekil 3.10.</b> 15 numaralı bileşiğin (a) rijid (b) esnek doking sonucunu göre enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-B'nın aktif bölgesine yerleşme pozisyonu.....	76
<b>Şekil 3.11.</b> 36 numaralı bileşiğin (a) rijid (b) esnek doking sonucunu göre enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-B'nın aktif bölgesine yerleşme pozisyonu.....	77
<b>Şekil 3.12.</b> 37 numaralı bileşiğin (a) rijid (b) esnek doking sonucunu göre enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-B'nın aktif bölgesine yerleşme pozisyonu.....	78
<b>Şekil 3.13.</b> 7, 10, 12, 13, 14, 16 ve 23 numaralı 3-aril kumarin türevlerinde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı.....	85
<b>Şekil 3.14.</b> 5, 23 ve 29 numaralı numaralı 3-aril kumarin türevlerinde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı.....	85
<b>Şekil 3.15.</b> (a) 8 ve 21 numaralı kumarin türevlerinde (b) 9 ve 21 numaralı bileşiklerde ise ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı.....	86
<b>Şekil 3.16.</b> (a) 1, 5 ve 25 numaralı (b) 3, 5, 23 ve 29 numaralı 3-aril kumarin türevlerinde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı.....	87
<b>Şekil 3.17.</b> E-36, E-38 ve E-39 nolu kumarin türevlerinde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı.....	88
<b>Şekil 3.18.</b> (a) E-36, E-38 ve E-39 numaralı (b) E-35, E-36 ve E-57 numaralı kumarin türevlerinde gözlenen ortak fonksiyonel yapı.....	89



## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1.</b> Dört farklı yöntemle ölçülen antioksidan aktivite sonuçlarının Pearson's korelasyon katsayıları ( <i>r</i> ).....	30
<b>Tablo 2.2.</b> Veri setini oluşturan bileşiklerin kimyasal yapıları.....	33
<b>Tablo 2.3.</b> KYAİ hesaplamalarında kullanılan bileşiklerin biyolojik aktivite değerleri.....	34
<b>Tablo 2.4.</b> DRAGON 6.0.38 yazılımındaki tanımlayıcı grupları (Talete, 2011).....	37
<b>Tablo 2.5.</b> Yeni tasarlanan bileşiklerin kimyasal yapıları.....	46
<b>Tablo 2.6.</b> MAO-A ve MAO-B izozimlerinin aktif bölgesinde yer alan ve esnek olarak seçilen amino asitler .....	49
<b>Tablo 3.1.</b> Veri setindeki bileşiklerin kimyasal yapıları ve deneysel olarak ölçülen biyolojik aktivite değerleri.....	54
<b>Tablo 3.2.</b> Eğitim ve test seti oluşturan bileşiklerin numaraları .....	56
<b>Tablo 3.3.</b> 1-3 tanımlayıcı modellerin uygunluk ve iç validasyon parametreleri.....	57
<b>Tablo 3.4.</b> 1-3 tanımlayıcı modellerin dış validasyon parametreleri .....	57
<b>Tablo 3.5.</b> Geliştirilen KYAİ modellerinde yer alan tanımlayıcılar .....	60
<b>Tablo 3.6.</b> Model 3'e ait değişkenlerin minimum ve maksimum sınırları.....	62
<b>Tablo 3.7.</b> Yeni tasarlanan bileşiklerin kimyasal yapıları ve Model 3 ile tahmin edilen antioksidan aktiviteleri .....	64
<b>Tablo 3.8.</b> MAO-A ve MAO-B izoenzimlerinin kristal yapı rijid doking sonucu bağlanma enerjisi( $\Delta G$ ), inhibisyon sabiti( $K_i$ ) ve SI değerleri .....	67
<b>Tablo 3.9.</b> MAO-A ve MAO-B izoenzimlerinin kristal yapı esnek doking sonucu bağlanma enerjisi( $\Delta G$ ), inhibisyon sabiti( $K_i$ ) ve SI değerleri.....	69
<b>Tablo 3.10.</b> 5 numaralı bileşiğin rijid ve esnek doking sonucuna enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-A enzimi ile yaptığı etkileşimler .....	71
<b>Tablo 3.11.</b> 16 numaralı bileşiğin rijid ve esnek doking sonucuna enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-A enzimi ile yaptığı etkileşimler .....	72
<b>Tablo 3.12.</b> 23 numaralı bileşiğin rijid ve esnek doking sonucuna enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-A enzimi ile yaptığı etkileşimler .....	73
<b>Tablo 3.13.</b> 29 numaralı bileşiğin rijid ve esnek doking sonucuna enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-A enzimi ile yaptığı etkileşimler .....	74
<b>Tablo 3.14.</b> 13 numaralı bileşiğin rijid ve esnek doking sonucuna enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-B enzimi ile yaptığı etkileşimler .....	75

<b>Tablo 3.15.</b> 15 numaralı bileşiğin rijid ve esnek doking sonucuna enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-B enzimi ile yaptığı etkileşimler .....	76
<b>Tablo 3.16.</b> 36 numaralı bileşiğin rijid ve esnek doking sonucuna enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-B enzimi ile yaptığı etkileşimler .....	77
<b>Tablo 3.17.</b> 37 numaralı bileşiğin rijid ve esnek doking sonucuna enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-B enzimi ile yaptığı etkileşimler .....	78
<b>Tablo 3.18.</b> Kumarin türevlerinin MAO izoenzimleriyle deneysel inhibisyon, rijid ve esnek doking sonuçları .....	81
<b>Tablo 3.19.</b> Tasarlanan bileşiklerin kristal yapı rigid doking sonucu bağlanma enerjisi( $\Delta G$ ), inhibisyon sabiti ( $K_i$ ) ve SI değerleri .....	83
<b>Tablo 3.20.</b> Deneysel olarak ölçülen MAO-A inhibisyon aktivitesi ve antioksidan aktivitesi yüksek olan bileşiklere ait deneysel ve hesaplanmış veriler.....	84
<b>Tablo 3.21.</b> Deneysel olarak ölçülen MAO-B inhibisyon aktivitesi ve antioksidan aktivitesi yüksek olan bileşiklere ait veriler .....	86
<b>Tablo 3.22.</b> Çift etki ile antioksidan aktivite ve MAO-A inhibisyon aktivitesi gösteren yeni tasarlanmış bileşiklere ait teorik olarak tahmin edilen değerler .....	88
<b>Tablo 3.23.</b> Çift etki ile antioksidan aktivite ve MAO-B inhibisyon aktivitesi gösteren yeni tasarlanmış bileşiklere ait teorik olarak tahmin edilen değerler .....	89

# 1.GİRİŞ

## 1.1. Giriş ve Amaç

Enzimler, canlılarda gerçekleşen metabolik reaksiyonların pek çoğunu hızlandıran protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir (Nelson ve Cox, 2005). Biyolojik sistemlerde endojen ve ekzojen kaynaklı faktörler sebebiyle sürekli olarak serbest radikaller ve diğer oksijen kökenli türler üretildiğinden, canlılar bu faktörlere maruz kalmayı önlemek veya sınırlandırmak amacıyla kuvvetli, kompleks, enzimatik ve non-enzimatik antioksidan savunma sistemleri geliştirmiştir (Pektaş, 2009).

Aerobik organizmalarda, hem aerobik solunum hem de substrat oksidasyonu sonucunda meydana gelen Reaktif Oksijen Türleri (ROT), antioksidan enzim sistemleri aracılığıyla detoksifiye edilir. Süperoksit anyonları ( $O_2^-$ ), hidroksil radikalleri (HO.) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) bileşiğinin de dahil olduğu ROT, düşük miktarlarda aerobik organizmalarda iç ve dış uyarıcılara karşı sabit olarak üretilirler. Düşük konsantrasyonlarda ROT, hücre farklılaşmasında etkili olan hücre içi sinyal iletimi, hücre büyümesinin durması, apoptozis, gen ekspresyonu, iyon taşınması, bağışıklık sistemi ve mikroorganizmalara karşı anti-bakteriyel etki gibi pek çok önemli biyokimyasal işlemlerde rol oynar. Ancak yüksek konsantrasyonlarda ya da yetersiz detoksifikasyonlarında ROT, protein, lipid, RNA, DNA ve karbonhidratlar gibi birçok molekülün yapısını değiştirerek ciddi metabolik fonksiyon bozukluklarına ve biyolojik makromoleküllerin hasarına yol açan oksidatif strese neden olur. Biyolojik makromoleküllerde meydana gelen hasar ve oksidatif stres iyonik dengesizlik, mitokondriyal bozukluklar ve hücrenin ölümüyle sonuçlanır (Canbay ve ark., 2003; Kostova ve ark., 2011). Antioksidan savunma sistemlerinin en önemli özelliği, tüm bileşenlerinin ROT'a karşı bir sinerji oluşturacak şekilde görev almasıdır. Bu nedenle, antioksidan enzimler hücre dengesinin düzenlenmesinde hayati bir öneme sahiptirler (Alak ve ark., 2011).

Modern tıp hem hastalıkların tedavisinde yeni seçenekler araştırmakta hem de hastalıkları önleme aşamasında yoğun çalışmalar yapmaktadır. Bu doğrultuda serbest radikal oluşumunun ve bunu önlemek üzere geliştirilen ilaçların antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, hastalıklarla savaşmak ve hastalıklara yakalanma riskini azaltmak üzere antioksidan diyet uygulanması ve ilaç kullanımı açısından önemli olmaktadır.

Vücudumuzda süperoksit üreten sistemlerden bir tanesi de monoamin oksidaz enzimidir. Monoamin oksidaz (EC-1.4.3.4, MAO) mitokondri zarının dışında bulunan ve flavin-adenozin-dinükleotid (FAD) içeren, biyolojik aminlerin oksidatif deaminasyonunu katalizleyen bir enzimdir. MAO, 5-hidroksitiramin, (5-HT), norepinefrin (NE) ve dopamin (DA) gibi nörotransmitterlerin hem oksidasyonunda hem de hücre içi konsantrasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynar (Abdelhafez ve ark., 2013). MAO'nun, anahtar konumunda bulunan nörotransmitterlerin metabolizmasında yer alması, MAO'yu nörolojik bozuklukların tedavisinde farmakolojik müdahale için önemli bir hedef haline getirmiştir (Van den Berg ve ark., 2007). MAO'nun, bir MAO-A diğeri MAO-B olmak üzere iki fonksiyonel izoenzimi bulunmaktadır. Bunlardan MAO-A seçici olarak serotonin ve epinefrini oksitlerken, MAO-B dopamini oksitler (Shi ve ark., 2010).

MAO aktivitesinde meydana gelen aşırı artış oksidatif stres ile ilişkilendirilmektedir. MAO enziminin substratı ile etkileşimi doku ve nöronların dejenerasyonuna sebep olan amonyak, hidrojen peroksit gibi toksik metabolitlerin oluşumunu da beraberinde getirir (Chimenti ve ark., 2010). Bilindiği gibi hidrojen peroksit reaktif oksijen türüdür ve Fenton reaksiyonu yolu ile hidroksil radikali ( $\bullet\text{OH}$ ) oluşturabilir. ( $\bullet\text{OH}$ ) yüksek reaktivitesinden ötürü canlı hücreler için en tehlikeli radikal olup serebral iskemi, yaşlanma, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığında önemli bir rol oynamaktadır (Soto-Oteroai ve ark., 2001).

MAO-A ve MAO-B'nin inhibisyonu serotonin, epinefrin ve dopamin gibi aminlerin yıkımını engelleyerek anti-Parkinson ve anti-depresan etki sağlar (Shi ve ark., 2010). (R)-Deprenyl ve Rasagiline günümüzde kullanılan en etkin Parkinson ilaçları olup MAO-B'yi geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektedirler. Bu şekilde inhibe edildiğinde, MAO-B proteininin *de novo* sentezi birkaç haftayı bulmaktadır. Bu nedenle enzimin aktivitesinin hızla yeniden yerine gelmesini sağlayacak yeni geri dönüşümlü inhibitörlerin bulunması büyük önem kazanmaktadır (Legoabe ve ark., 2012). Nörotransmitterlerin biyolojik yarı ömrü, MAO inhibitörlerinin geliştirilmesi ile uzatılabilir. Dolayısıyla da tüm bu unsurlar göz önünde bulundurularak yeni MAO inhibitörlerinin bulunması için çok yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalar, doğal kumarinler ve kimyasal olarak sentezlenmiş olan kumarin analoglarının MAO inhibisyonunda güçlü aktivite gösterdiklerini ortaya koymuştur (Brühlmann ve ark., 2001; Matos ve ark., 2009). Kumarinler, benzopironlar sınıfında yer alan antioksidan aktivite de dahil pek çok farklı farmakolojik özellikler gösteren bileşiklerdir (Borges ve ark., 2005).

Günümüzde var olan ilaç moleküllerini daha spesifik hale getirme çalışmaları ve yeni ilaç etken madde tasarımları, ilaç etki mekanizmalarının da tanımlanmaya çalışıldığı mekanistik yöntemler kullanılarak yürütülmektedir. Bu doğrultuda kimyasal bileşiğin hedeflenen yapıyla etkileşmesi sonucunda ortaya çıkan biyolojik yanıtın temelini oluşturan farmakodinamik faktörlerin de etkili bir biçimde belirlenmesi gerekmektedir. Bu faktörlerin kimyasal bileşiğin özellikleri ile doğrudan ilişkili olduğu göz önünde bulundurularak bileşiğin yapısal nitelikleri ile biyolojik aktivitesi arasındaki ilişkilerin tanımlanması oldukça önemlidir. Bu bağlamda söz konusu ilişkilerin tespit edilerek tanımlanması Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkisi (KYAİ) analizleri aracılığıyla gerçekleştirilir. KYAİ kimyasal bileşiklerin nicel olarak belirlenen moleküler nitelikleri ile gözlenen biyolojik aktivite değerleri arasındaki ilişkilerin anlaşılmasına yardımcı olarak yeni bileşiklerin etkili bir biçimde tasarlanması ve/veya geliştirilmesine olanak tanır (Şener ve Yalçın, 2002). Yeni ilaç etken maddelerin tasarlanmasında kullanılacak bir diğer yöntemde dokingdir. Bir moleküler modelleme yöntemi olan doking, bir molekülün başka bir molekül ile kararlı bir kompleks oluşturması sonucunda, atomların uzayda tercih ettikleri pozisyonlarını tahmin etmek için kullanılır (Thiriot ve ark., 2008). Bu yöntem genellikle hedef moleküllere (enzim) ilaç olarak tasarlanan maddelerin (ligand) bağlanmalarının doğasını incelemek için kullanılır.

Bütün bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında;

1. Yeni sentezlenmiş ve antioksidan aktiviteleri ölçülmüş 37 adet kumarin türevinden oluşan veri setini kullanarak, sağlamlığı geçerli istatistiksel kriterlerle ispatlanmış matematiksel modeller geliştirmek ve kantitatif yapı-aktivite ilişkilerini (KYAİ) tanımlamak,
2. Aynı kumarin türevlerinin MAO enzimleri ile etkileşimlerini doking metoduyla inceleyerek seçicilik ve etkinliklerini araştırmak,
3. Her iki çalışmadan elde edilecek sonuçları karşılaştırıp değerlendirerek, çift-etki gösterme potansiyeli olan bileşikleri belirlemek,
4. Oluşturulan KYAİ modellerini kullanarak yeni çift-etkili kumarin türevleri tasarlamak amaçlanmıştır.

Geliştirilen modeller gelecekte yeni monoamin oksidaz inhibitörü olarak tasarlanabilecek bileşiklerin biyolojik aktivite değerlerinin tahmin edilmesinde kullanılacağından gerek sentez gerek deneysel çalışmalar öncesinde çok sayıda bileşik arasından rasyonel seçimler

yapılmasına olanak sağlayacaktır. Böylece geliştirilen KYAİ modelleri ve doking çalışmaları aracılığıyla deneysel aktivite ölçümleri sırasında ortaya çıkacak emek, zaman ve maddi kayıplar en aza indirilmiş olacaktır.



## 1.2. Genel Bilgiler

### 1.2.1. Enzimler

Enzimler canlılarda gerçekleşen biyolojik reaksiyonların pek çoğunu hızlandıran, katalitik ribonükleik asit (RNA) moleküllerinin küçük bir grubu hariç, protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Hücre içerisinde gerçekleşen binlerce reaksiyonun hızını ve özgülüğünü düzenleyen enzimler yalnızca canlılar tarafından doğal olarak sentezlenirler. Hücre solunumu, fotosentez, sindirim olayı, büyüme, sinirlerdeki iletim, kas kasılması gibi önemli fizyolojik olaylar ve çeşitli metabolik reaksiyonlar sonucunda oluşan organik maddelerin hücrelerdeki yapım ve yıkım reaksiyonları enzimlerin katalitik etkisi ile mümkün olmaktadır (Champe ve Harvey, 1997; Nelson ve Cox, 2005).

Biyolojik olarak uygun şartlarda, katalizlenmeyen tepkimeler yavaş gerçekleşme eğilimindedir. Enzimler ise aktivasyon enerjisini düşürmek suretiyle söz konusu reaksiyonları ılımlı koşullarda çok daha hızlı ve spesifik bir biçimde katalizlerler. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonlarının sağlamlığına bağlıdır. Eğer enzimler denatüre olur ve üçüncül yapılarını kaybederse enzimlerin katalitik aktiviteleri de yok olur (Nelson ve Cox, 2005).

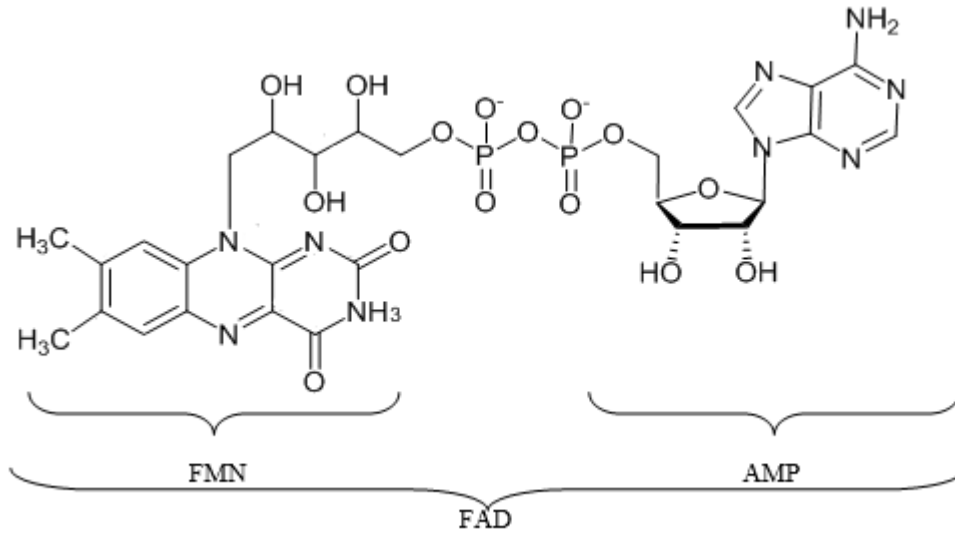
Substratlarına özgü olan enzimler genler tarafından şifrelenirler. Dolayısıyla da kendilerine özgü bir amino asit dizilimine sahiptirler. Bazı enzimler sadece proteinden oluşurlar ve aktivite gösterebilmek için sahip oldukları amino asit kalıntıları dışında başka kimyasal gruplara gereksinim duymazlar. Bazı enzimler ise aktivite gösterebilmek için  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  gibi kofaktör olarak adlandırılan bir veya birden fazla metal iyonuna ya da koenzim olarak adlandırılan kompleks organik ve metalloorganik moleküllere gereksinim duyarlar. Bazı enzimler ise hem koenzime hem de bir veya birden fazla metal iyonuna gereksinim duyarlar (Champe ve Harvey, 1997; Nelson ve Cox, 2005).

Metabolizmada gerçekleşen reaksiyonların çoğunda meydana gelen kimyasal değişiklikler enzimlerin sadece amino asit zincirlerindeki fonksiyonel gruplar tarafından yapılamaz. Bu tür reaksiyonların katalizlenmesinde enzimler, kofaktör veya koenzimlerle birlikte hareket etmek zorundadır. Koenzimler çoğunlukla vücut için gerekli organik besinlerden biri olan vitaminlerden türetilirler. Her biri hücre içinde özel bir fonksiyona sahip olan koenzimler enzimin işlevini yerine getirmesini sağlayan ve enzimde asıl iş yapan kısımdır (Champe ve Harvey, 1997; Bugg, 2004; Nelson ve Cox, 2005). Bu nedenle enzimlerin etki

mekanizmalarının anlaşılabilmesi için öncelikle enzimin, varsa enzim üzerindeki koenzim gibi yardımcı grupların ve substratların yapısal özelliklerinin incelenmesi gereklidir. Bu tez çalışmasında inhibisyon aktivitesi araştırılan monoamin oksidaz enzimi, koenzim olarak flavin halkasına sahiptir.

### 1.2.1.1. Flavin Koenzimleri

Flavoproteinler, birçok redoks ve monooksijenasyon tepkimelerini katalizleyen ve koenzim olarak flavin adenin dinükleotid (FAD) veya flavin mono nükleotid (FMN) kullanan enzimlerdir. Riboflavin (B<sub>2</sub> vitamini) türevi olan FAD ve FMN fonksiyonel olarak eş koenzimlerdir (Şekil 1.1). Buna rağmen bazı enzimler bu koenzimlerden sadece birini kullanırken bazı enzimler ise herhangi birini kullanırlar (Nelson ve Cox, 2005; Silverman ve Holladay, 2014).

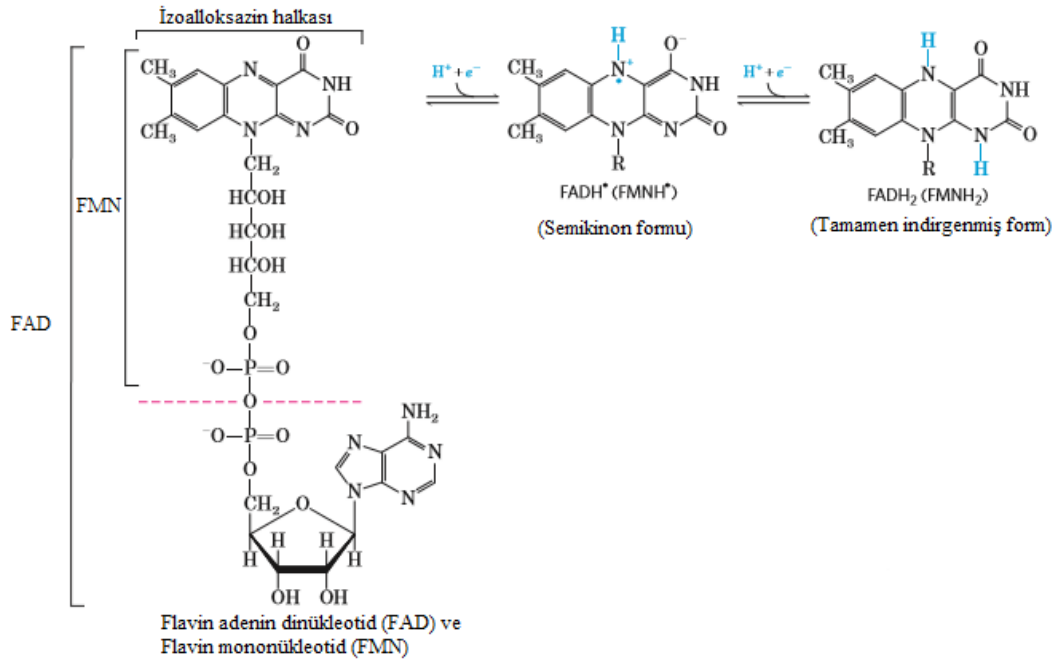


Şekil 1.1 Riboflavin vitamininin yapısı

Flavinlerin yapısında yer alan ve oldukça konjuge olan izoalloksazin trisiklik halka sistemi mükemmel bir elektron alıcısıdır. Bu yapı flavinlerin güçlü redoks özelliklerinden sorumludur (Silverman ve Holladay, 2014). Katalitik fonksiyonel bölge olan izoalloksazin halkası, tersinir redüksiyona uğramakla birlikte, indirgenmiş substrattan bir veya iki hidrojen atomu formunda bir veya iki elektron kabul etmektedir. Bu şekilde oluşan tamamen indirgenmiş formlar FADH<sub>2</sub> ve FMNH<sub>2</sub> olarak kısaltılmaktadır (Şekil 1.2). Tamamen oksitlenmiş flavin nükleotiti ise sadece bir elektron kabul eder. Böylece izoalloksazin halkasının semikinon formu oluşur ve bu yapı FADH ve FMNH olarak



kısaltılır. Flavoproteinler indirgendiklerinde ya da yüksetgendiklerinde ana absorpsiyon bandında bir değişiklik meydana gelir. Bu değişiklik flavoproteinlerin katıldığı tepkimelerin analizinde kullanılabilir. Flavoproteinler bir ya da iki elektron transferi yapabildikleri için, bu sınıf proteinler piridin nükleotidi bağlı dehidrojenazlara göre çok daha çeşitli tepkimelere katılırlar (Nelson ve Cox, 2005).



Şekil 1.2. İndirgenmiş ve oksitlenmiş FAD ve FMN yapıları (Nelson ve Cox, 2005)

### 1.2.2. Enzim İnhibisyonu

Günümüzde karşılaşılan birçok hastalık, vücuttaki belli bir metabolitin eksikliği veya fazlalığından, yabancı bir organizmanın istilasından ya da anormal hücre büyümesinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, vücut için gerekli metabolitlerin seviyesi normal düzeye getirilebilir ve yabancı organizma girişinin ya da anormal hücre büyümesinin önüne geçilebilirse söz konusu hastalıklar da tedavi edilebilir (Silverman ve Holladay, 2014). Bugün kullanılmakta olan birçok ilaç ve toksik ajan enzim inhibisyonu yoluyla hastalıklara etki etmektedir (Stryer ve ark., 2012).

Katalitik enzim reaksiyonun yavaşlatan veya durduran moleküler ajanlara enzim inhibitörü, gerçekleşen bu olaya da enzim inhibisyonu denir. Enzimler hemen hemen bütün hücresel süreçleri katalizledikleri için enzim inhibitörleri bilinen en önemli farmakolojik ajanlardır (Nelson ve Cox, 2005). Enzimleri inaktivite etmek için kullanılan bu ajanların

vücutta gerçekleşen diğer enzimatik reaksiyonları etkilememesi ve organizma için zararlı yan ürünler oluşturmaması son derece önemlidir. Bu nedenle bazı metabolik yolların tanımlanmasında, enzim mekanizmasının aydınlatılmasında özellikle de katalizde kilit rol oynayan amino asitlerin tespit edilmesinde enzim inhibisyon çalışmaları önemli yer tutar (Nelson ve Cox, 2005; Stryer ve ark., 2012).

Enzim inhibisyonu geri dönüşümlü inhibisyon ve geri dönüşümsüz inhibisyon olmak üzere ikiye ayrılır. (Stryer ve ark., 2012).

### **1.2.2.1. Geri Dönüşümsüz (Irreversibl) Enzim İnhibisyonu**

Geri dönüşümsüz inhibisyonda, inhibitörler enzime kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlerle çok sıkı bir şekilde bağlanarak genellikle enzimin aktivitesi için gerekli olan fonksiyonel grupla kararlı kompleksler oluştururlar (Nelson ve Cox, 2005; Stryer ve ark., 2012). Böylece enzimlerin substratla etkileşmesini engellerler.

İntihar inhibitörleri geri dönüşümsüz inhibitörlerin özel bir sınıfıdır. Bu bileşikler enzimin aktif bölgesine bağlanıncaya kadar göreceli olarak inaktiftirler. Genellikle normal enzim tepkimesinin ilk birkaç basamağını gerçekleştirmek üzere tasarlanan intihar inhibitörleri, normal ürüne dönüştürülmek yerine enzime geri-dönüşümsüz bağlanan çok reaktif bir bileşiğe dönüştürülürler (Nelson ve Cox, 2005).

Katalitik mekanizmada yer alabilen substrat analogları olan intihar inhibitörleri, katalitik merkeze kovalent bir bağla bağlanarak enzimi bloklar. Burada kovalent bağlanma enzimin kendisi tarafından başlatılıp sonlandırıldığı için bu bileşiklere intihar inhibitörleri denir. Bu bileşikler ayrıca enzimi inaktifleştirmek için normal enzim tepkime mekanizmalarını kullandıkları için mekanizma bazlı inaktivatörler olarak da isimlendirilirler (Stryer ve ark., 2012).

İntihar inhibitörleri, bilinen substratlar ve tepkime mekanizmalarından yola çıkılarak yeni farmakolojik ajanların elde edilmesinde önemli bir yere sahip olan rasyonel ilaç tasarımlarında merkezi bir rol oynar. Örneğin, monoamin oksidaz enzimi dopamin ve serotonin gibi nörotransmitter aminlerin deaminasyonunu katalizleyerek bu aminlerin beyindeki seviyelerinin düşürülmesini sağlar. Parkinson hastalığı beyindeki dopamin seviyesi, depresyon ise beyindeki serotonin seviyesi ile ilişkili olan bir rahatsızlıktır. İşte Parkinson hastalığı ve depresyonun tedavisinde kullanılan bir ilaç olan (-) deprenil, monoamin oksidazın intihar inhibitörüdür (Nelson ve Cox, 2005; Stryer ve ark., 2012).

İyi tasarlanmış bir intihar inhibitörü tek bir enzime özgüdür ve enzimin aktif bölgesi içinde yer alana kadar da reaktif değildir. Bu nedenle, bu yaklaşımı temel alarak tasarlanan ilaçlar diğer ilaçlara göre daha az yan etki gösterme üstünlüğüne sahip olabilirler (Nelson ve Cox, 2005).

#### **1.2.2.2. Geri Dönüşümlü (Reversibl) Enzim İnhibisyonu**

Geri dönüşümlü enzim inhibisyonunda, inhibitör enzime genellikle kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanır. Bu nedenle oluşan enzim-inhibitör kompleksinin ayrılması daha hızlı gerçekleşir ve enzim inhibitörün özelliklerine bağlı olarak zamanla yeniden aktivitesini kazanır (Stryer ve ark., 2012; Silverman ve Holladay, 2014).

Geri dönüşümlü enzim inhibisyonu; enzim aktivitesine olan etkileri, mekanizmaları ve reaksiyon kinetiği açısından “yarışmalı”, “yarı yarışmalı”, “yarışmasız” ve “karışık” olmak üzere dörde ayrılır.

Yarışmalı (Kompetitif) inhibisyonda, substratla benzer kimyasal yapıya sahip olan inhibitör serbest enzimin aktif bölgesine bağlanarak enzimi inhibe eder ve substratın enzime bağlanmasını engeller. Bu tür inhibisyonda, inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanmak için substratla yarış halindedir. Bu nedenle inhibisyonda belirleyici olan ortamdaki substrat ve inhibitör konsantrasyonudur. İnhibitör enzime geri dönüşümlü bağlandığı için, yarış daha fazla substrat eklemek suretiyle substrat lehine kaydırılabilir ve inhibisyon oranı azaltılabilir. Yarışmalı inhibitörler genellikle ilaç olarak kullanılırlar (Stryer ve ark., 2012; Silverman ve Holladay, 2014).

Yarı yarışmalı (Un-kompetitif) inhibisyonda, inhibitör sadece enzim-substrat kompleksine bağlanarak enzim kataliz reaksiyonu inaktive eder. Bu tür inhibisyonda inhibitör ya substratın bağlanması ile yapısal değişime uğrayan enzimde ortaya çıkan bir bölgeye bağlanır ya da enzime bağlanmış substrata doğrudan bağlanarak aktiviteyi engeller (Stryer ve ark., 2012).

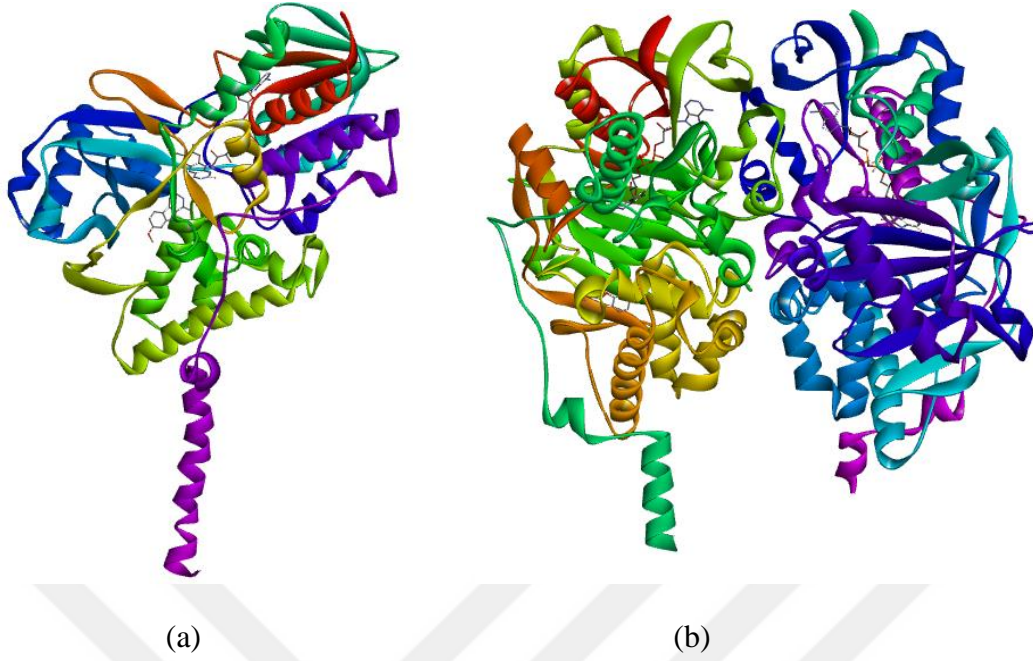
Yarışmasız (Non-kompetitif) inhibisyonda, inhibitör serbest enzime ya da enzim-substrat kompleksine enzimin aktif bölgesi dışındaki başka bir bölgesinden bağlanarak enzimi inaktive eder. Yarışmasız inhibisyon, yarışmalı inhibisyonda olduğu gibi substrat konsantrasyonu arttırılarak önlenemez (Stryer ve ark., 2012).

Bazen inhibitör hem serbest enzime hem de enzim-substrat kompleksine aynı anda bağlanır. Bu durumda elde edilen kinetik veriler yarışmalı veya yarışmasız olarak net bir şekilde kategorize edilemeyebilir. Bu tür inhibisyona “karışık inhibisyon” adı verilir. Bu durum ile enzim substrat inhibitör kompleksi kataliz işlemine çok yavaş giriyorsa veya inhibitör hem turnover katsayısını ( $k_{cat}$ ) ve hem de Michaelis sabitinin ( $K_m$ ) her ikisini birden değiştiriyor ise karşılaşılr (Biswanger, 2008).

### **1.2.3. Monoamin Oksidaz (MAO)**

Monoamin oksidaz (EC-1.4.3.4, MAO) flavin-adenozin-dinükleotid (FAD) içeren, nöronal, glial ve pek çok farklı hücrenin mitokondri zarının dışında yer alan bir enzimdir (Abdelhafez ve ark., 2013). MAO, serotonin (5-hidroksitiramin, 5-HT), dopamin (DA), adrenalin (A), noradrenalin (NA) ve norepinefrin (NE) gibi nörotransmitterlerin oksidasyonunda ve hücre içi konsantrasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Matos ve ark., 2012; Abdelhafez ve ark., 2013). Ayrıca hormonların, diyet aminlerin (p-tiramin) ve 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) gibi potansiyel olarak toksik eksojen aminlerin metabolizmasında da yer alır (Carradori ve ark., 2014).

MAO'nun oksidatif deaminasyonundan sorumlu olduğu biyolojik aminlerin, metabolizmada canlılık, sıcaklık düzeni, yeme davranışları, saldırganlık, cinsellik, uyku ve hipofizin düzenlenmesi gibi temel işlevleri bulunmaktadır. MAO enzimi MAO-A ve MAO-B olarak adlandırılan, farklı genlerden sentezlenen ve yaklaşık olarak % 70 oranında benzer amino asit dizilimine sahip olan iki fonksiyonel izoenzime sahiptir. (Edmondson ve ark., 2009). Bu izoenzimlerden MAO-A daha çok plesanta, karaciğer ve bağırsak çeperlerinde yer alır. MAO-B ise insan beyninde ve trombositlerde baskın olan izoformdur (Helguera ve ark., 2012; Pisani ve ark., 2013).



**Şekil 1.3.** (a) MAO-A (2Z5X) (b) MAO-B (2XFN) enzim kristal yapıları (Enzimlere ait görüntüler Discovery Studio 4.1 programı kullanılarak elde edilmiştir.)

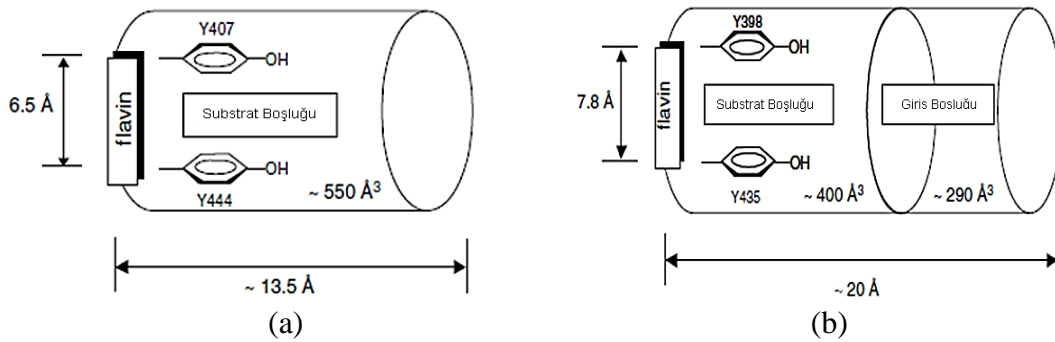
### 1.2.3.1 Monoamin Oksidaz A ve B İzoenzimlerinin İşlevleri ve Karakteristik Özellikleri

MAO'nun fonksiyonel izoenzimleri olan MAO-A ve MAO-B amino asit dizilimleri, dokulardaki dağılımları, immünolojik özellikleri, substrat tercihleri ve inhibitör seçiciliklerindeki farklılıklar ile birbirinden ayrılırlar (Abdelhafez ve ark., 2013). Bu izozimlerden MAO-A seçici olarak serotonin, epinefrin ve norepinefrini oksitler ve selektif olarak klorgilin tarafından inhibe edilir. MAO-B ise seçici olarak benzilamin ve  $\beta$ -fenetilamini metabolize eder ve selektif olarak selejilin ve rasajilin tarafından inhibe edilir (Matos ve ark., 2012; Abdelhafez ve ark., 2013). Dopamin ve tiramin ise her iki izoenzim için ortak substrattır. Fakat insan beyindeki dopamin tercihen MAO-B tarafından oksitlenir (Matos ve ark., 2012; Naoi ve ark., 2016). Depresyon durumunda beyindeki noradrenalin ve serotonin miktarı önemli derecede azalır. Parkinson hastalığında ise beyindeki dopamin miktarı önemli derecede azalır. Bu nedenle MAO-A ve MAO-B'nin inhibisyonu bu aminlerin yıkımını engelleyerek anti-depresan ve anti-Parkinson etki sağlar (Shi ve ark., 2010).

MAO-A ve MAO-B izozimleri kristal yapıları bakımından da farklılıklar gösterirler. İnsan MAO-B'si ve sıçan MAO-A'sı dimer olarak kristallenirken, insan MAO-A'sı monomer olarak kristallenir (Şekil 1.3). Kristal yapılarda görülen bu farklılık, sıçan MAO-A'sının

151 nolu pozisyonunda yer alan glutamik asitin yerine insan MAO-A'sında lizin amino asidinin bulunmasından kaynaklanır. İnsan MAO-B'si ve sıçan MAO-A'sının dimer ara yüzeyinde yer alan glutamik asitin yerine insan MAO-A'sında lizin amino asidinin bulunması insan MAO-A'sının monomer halinde kristallenmesiyle sonuçlanmıştır (Youdim ve ark., 2006). Yaklaşık olarak % 92 oranında benzer amino asit dizilimine sahip olan insan ve sıçan MAO-A'sının aktif bölge yapısı konformasyon ve hacim açısından farklılıklar gösterir (Edmonson ve ark., 2004; De Colibus ve ark., 2005). Oldukça hidrofobik tek bir substrat bağlanma bölgesi içeren MAO-A'nın aktif bölgesinin hacmi, sıçan MAO-A'sında  $450 \text{ \AA}^3$  iken insan MAO-A'sında  $550 \text{ \AA}^3$ 'tür.  $550 \text{ \AA}^3$ 'lük hacme sahip olan insan MAO-A'sının aktif bölgesi kısa ve geniş bir substrat boşluğuna sahiptir. Yaklaşık olarak  $700 \text{ \AA}^3$ 'lük bir hacme sahip olan insan MAO B'sinin aktif bölgesi ise dar ve uzun bir substrat boşluğuna sahiptir (Youdim vd., 2006). Aktif bölge üzerinde yapılan çalışmalar substratın MAO-A'nın aktif bölgesinde MAO-B'nin aktif bölgesine kıyasla daha rahat dönebildiğini göstermiştir (Edmondson ve ark., 2007). Dolayısıyla da bu farklılığın MAO-A ve MAO-B'nin substrat ve inhibitör seçiminde de etkili olduğu düşünülmektedir.

İnsan MAO-A ve MAO-B'sinin aktif bölgesinde 20 adet amino asit bulunmaktadır. MAO-A'nın aktif bölgesinde yer alan amino asitler Tyr-69, Gln-74, Val-91, Val-93, Leu-97, Ile-180, Asn-181, Ile-207, Phe-208, Ser-209, Val-210, Glu-216, Cys-323, Ile-325, Ile-335, Leu-337, Met-350, Phe-352, Tyr-407, Tyr-444'tür. MAO-B'nin aktif bölgesinde yer alan amino asitler ise Tyr-60, Gln-65, Val-82, Glu-84, Leu-88, Leu-171, Cys-172, Ile-198, Ile-199, Ser-200, Thr-201, Glu-207, Thr-314, Ile-316, Tyr-326, Leu-328, Met-341, Phe-343, Tyr-398 ve Tyr-435'tir. Her iki izoenzimde aktif bölgeyi oluşturan bu amino asitlerden sadece 7 tanesi farklılık göstermektedir (Edmonson ve ark., 2004).

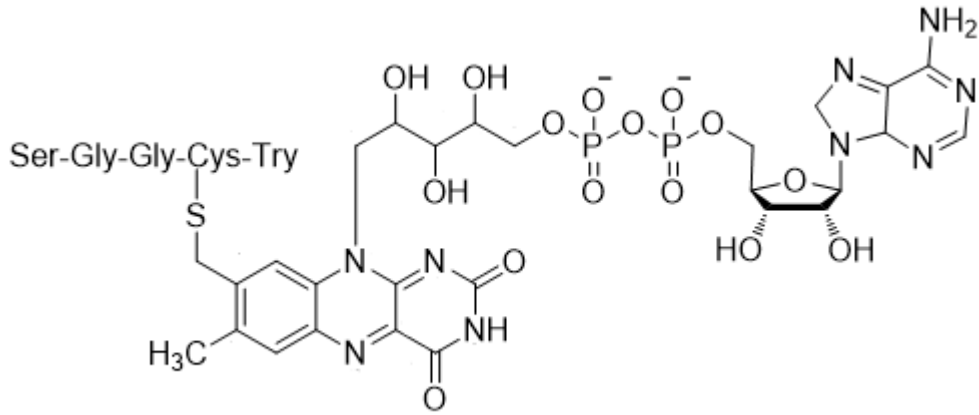


**Şekil 1.4.** (a) MAO-A ve (b) MAO-B'nin aktif bölge boşluklarındaki farklılıklar (Türkkan, 2013)

İnsan MAO-A'sının hidrofobik aktif bölgesi tek bir boşluktan oluşurken; insan MAO-B'sinin aktif bölgesi birbirine komşu yaklaşık 300 Å<sup>3</sup>'lük bir giriş boşluğu ile yaklaşık 400 Å<sup>3</sup>'lük substrat boşluğu olmak üzere iki ayrı boşluktan oluşmaktadır. Flavin koenziminin önünde yer alan substrat boşluğu (substrat bağlama bölgesi) MAO-A'da olduğu gibi giriş boşluğuna zıt yöndedir. Düz bir yapıya sahip olan substrat boşluğu bu bölgede yer alan Lizin 171 (Lys-171), Tirozin 188 (Tyr-188), Tirozin 326 (Tyr-326) ve Fenilalanin 343 (Phe-343) gibi aromatik ve alifatik amino asitlerden dolayı hidrofobik özelliktedir. Giriş boşluğu da bu bölge de yer alan amino asitler nedeniyle hidrofobik özellik gösterir (Şekil 1.4). Substrat boşluğu ile giriş boşluğu arasında İzolösin 199 amino asidi (Ile-199) yer alır. Ile-199 bu iki boşluk arasında kapı görevi görür ve gelen substrat ya da inhibitöre göre bu kapı açılır ve kapanır. İnsan MAO-A'sında Ile-199'a karşılık gelen amino asit Phe-208 olup söz konusu amino asidin böyle bir işlevi yoktur. Bu nedenle kapı görevi gören Ile-199, MAO-B'nin inhibitör seçiciliğinde önemli bir yere sahiptir (Hubalek ve ark., 2005). MAO-A ve MAO-B izozimleri arasında görülen bir diğer önemli farklılık da MAO-B'nin aktif bölgesinde yer alan Tyr-326 amino asididir. MAO-B'deki aktif bölgenin ikiye ayrılmasından dolayı olarak sorumlu olan Tyr-326 amino asidi, MAO-A'da aynı pozisyona karşılık gelen Ile-335 amino asidine göre yapısı nedeniyle daha sınırlayıcı bir etki gösterir. Dolayısıyla da bütün bu faktörler göz önüne alındığında MAO-A da yer alan Phe-208/Ile-335 amino asit çifti ile MAO-B de yer alan Ile-199/Tyr-326 amino asit çiftinin bu iki izoenzimin inhibitör ve substrat seçimleri arasındaki farklılıkta temel belirleyici neden olduğu görülmektedir (Binda ve ark., 2003; Edmonson ve ark., 2009).

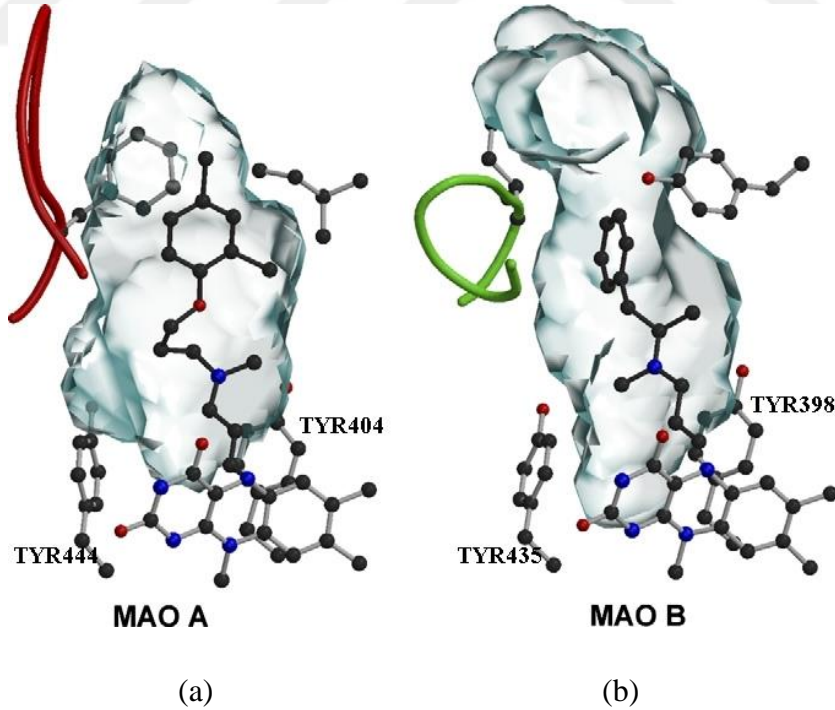
### 1.2.3.2 Aromatik Kafes

MAO' nun aktif bölgesinde yer alan ve enzime kovalent bağla bağlı olan FAD (Flavin Adenin Dinükleotid) oksidasyon reaksiyonunun gerçekleşmesini sağlayan koenzimdir (Şekil 1.5). Her iki izoenzimde FAD, 8- $\alpha$  pozisyonundan enzimin yan gruplarına bağlıdır. Bu yan gruplar MAO-A enziminde Cys-406, MAO-B enziminde ise Cys-397' dir (Edmonson ve ark., 2004).



**Şekil 1.5.** MAO'nun aktif bölgesindeki FAD'ın yapı formülü

Her iki enzimde de substratın flavine yaklaştığı ön bölgede birbirine yaklaşık olarak paralel ve flavininin re yüzüne yaklaşık olarak dik pozisyonda bulunan iki tirozin halkası bulunmaktadır. Aralarında yaklaşık olarak 7.8Å mesafe bulunan iki tirozin amino asidi tarafından oluşturulan bu yapı aromatik kafes olarak adlandırılır (Şekil 1.6). MAO-A da aromatik kafesi oluşturan amino asitler Tyr-407/Tyr-444, MAO-B de aromatik kafesi oluşturan amino asitler Tyr-398/Tyr435'dir (Youdim ve ark., 2006).



**Şekil 1.6.** MAO-A ve MAO-B izozimlerinin aktif bölge boşlukları ve aromatik kafes (Edmondson ve ark., 2007)



Aromatik kafes, MAO tarafından gerçekleştirilen oksidasyon reaksiyonlarında önemli bir rol oynar. Çünkü substrat ve inhibitörler flavin halkasına ulaşabilmek için bu iki fenolik tirozin halkasının arasından geçmek zorundadır (Edmonson ve ark., 2004). Aromatik kafesin fonksiyonu belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda aromatik kafesin amin substratını polarize hale getirerek polar nükleofilik mekanizma için daha etkili bir nükleofile dönüştürdüğü ileri sürülmektedir. Ayrıca aromatik kafesin amin substratının, flavin halkasında reaksiyona gireceği pozisyona kadar reaksiyon yolunun belirlenmesinde de rol oynadığı literatürdeki çalışma sonuçları arasındadır (Edmonson ve ark., 2007; Erdem ve ark., 2001, 2006, 2011; Akyüz ve ark., 2007).

### 1.2.3.3. Monoamin Oksidaz İnhibitörleri

Monoamin oksidaz (MAO) hormonların, nörotransmitter aminlerin, diyet aminlerin ve toksik eksojen aminlerin oksidasyonunda ve hücre içi konsantrasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir enzimdir (Matos ve ark., 2012; Abdelhafez ve ark., 2013; Carradori ve ark., 2014). MAO'nun, özellikle anahtar konumundaki nörotransmitterlerin metabolizmasında yer alması, MAO'yu nörolojik bozuklukların tedavisinde farmakolojik müdahale için önemli bir hedef haline getirmiştir (Van den Berg ve ark., 2007).

1950'li yıllarda monoamin oksidaz inhibitörlerinin antioksidan özelliklerinin keşfedilmesi depresyon tedavisinde umut verici bir gelişme olmuştur. Ancak klinik olarak uygulamaya sokulan MAO inhibitörlerinin hepatoksisite, ortostatik hipotansiyon ve “peynir etkisi” olarak adlandırılan ve tiramin içeren yiyeceklerle birlikte alındığında ortaya çıkan hipertansif kriz gibi yan etkilere sahip oldukları görülmüştür. Seçici olmayan ve geri dönüşümsüz enzim inhibisyonu ile ilişkili olduğu düşünülen bu durum yeni monoamin oksidaz inhibitörlerinin bulunmasını gerekli kılmıştır (Abdelhafez ve ark., 2013). Buna ilaveten günümüzde en etkin Parkinson ilaçları olarak kullanılan (R)-deprenil ve rasajilin de MAO-B'yi geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektedirler. Bu şekilde inhibe edildiğinde, MAO-B proteininin *de novo* sentezi birkaç haftayı bulmaktadır. Bu nedenle inhibitör seviyesi azaldığında enzimin aktivitesinin hızla tekrar yerine gelmesini sağlayacak yeni geri dönüşümlü inhibitörlerin bulunması büyük önem kazanmaktadır (Legoabe ve ark., 2012). Bütün bu unsurlar göz önünde alınarak hem seçici hem de geri dönüşümlü inhibisyon yapan yeni MAO inhibitörlerinin bulunması için çok yoğun araştırmalar yapılmaktadır.

Günümüzde kullanılan MAO inhibitörleri enzimle etkileşim şekillerine göre geri dönüşümlü (reversible) ve geri dönüşümsüz (irreversible) MAO inhibitörleri olmak üzere iki grupta incelenebilirler.

#### 1.2.3.3.1. Geri Dönüşümsüz MAO İnhibitörleri

Geri dönüşümsüz MAO inhibitörleri, substrat gibi davranarak enzimin yapısında yer alan flavin koenziminin N5 atomuna bağlanır. İnhibisyon reaksiyonunun ilk aşamasında inhibitör enzim oksidasyon reaksiyonunun bir sonucu olarak ara ürüne dönüştürülür. Oluşan reaktif ara ürün flavin grubuna kovalent olarak bağlanır ve yapısındaki amin grubunu serbest azot içeren bir metabolit olarak serbest bırakır (Finberg, 2014).

Geri dönüşümsüz inhibisyonda düşük dozdaki inhibitör bile enzimi tamamiyle inhibe edebilir. Buna bağlı olarak enzim aktivitesini zamana bağlı olarak çok yavaş bir şekilde geri kazanır. Bu nedenle geri dönüşümsüz inhibisyonun doğası gereği katalitik aktivitenin geri kazanılması enzimin tekrar *in vivo* sentezlenmesine bağlıdır (Finberg, 2014).

Geri dönüşümsüz MAO inhibitörleri 4 ana kimyasal grupta incelenebilir. Bunlar;

1. Hidrazin Türevleri: Fenelzin ( $\beta$ -feniletihidrazin)
2. Siklopropilamin Türevleri: Tranilkipromin
3. Proparjilamin Türevleri: Klorjilin, rasajilin, selejilin
4. Allilamin Türevleridir

Hidrazin türevi MAO inhibitörleri bilinen ilk MAO inhibitörleridir. Bu sınıfta yer alan ve anti-tüberküloz ilacı olarak kullanılan izoniazidin kimyasal modifikasyonu sonucunda tesadüfen keşfedilen iproniazid tedavide kullanılan ilk modern antidepresan ilaçtır. Daha sonra bu yapıyı taşıyan fenelzin (Nardil), Isokarboksazid (Marplan) ve Nialamid (Niamid) gibi çeşitli antidepresanlar geliştirilmiştir. Fakat geliştirilen bu antidepresanların MAO izozimlerine karşı çok az seçici oldukları ya da hiç seçici olmadıkları görülmüştür. Ayrıca söz konusu antidepresanların, tiramin gibi diyet aminlerin kan basıncını arttırıcı etkisini güçlendirme ve karaciğer hasarı gibi yan etkilere sebep oldukları görülmüş ve bu nedenle kullanımları kısıtlanmıştır. Bununla birlikte seçici, yan etkileri azaltılmış ve etkinlikleri kesin olarak bilinen tedavi edici nitelikte yeni öncü bileşiklerin tasarlanabileceği düşünüldüğü için hidrazin türevleri üzerindeki çalışmalar devam etmektedir (Cesura ve Pletscher, 1992; Finberg, 2014).

Depresyonun klinik tedavisinde kullanılmak üzere MAO inhibitörü olarak geliştirilen ve günümüzde kullanımda olan tek siklopropilamin türevi inhibitör tranilkipromindir. Tranilkipromin her iki MAO izoformu için de oldukça hızlı aktivite gösteren son derece etkili geri dönüşümü olmayan bir inhibitördür. Fakat seçici olmaması ve “peynir etkisi” olarak adlandırılan ve tiramin içeren yiyeceklerle birlikte alındığında ortaya çıkan hipertansif krize neden olması nedeniyle bugün çoğunlukla kullanılmamaktadır (Finberg, 2014).

Proparjilamin (asetilenik) türevleri, en yaygın olarak çalışılan geri dönüşümsüz MAO inhibitörleridir. Geliştirilen ilk proparjilamin (asetilenik) türevi bileşik olan parjilin (N-benzil-N-metil-proparjilamin) zayıf antidepresan etkiye sahip olup tercihen MAO-B’ yi inhibe etmektedir. Bir süre antihipertansif ilaç olarak da kullanılan parjilin artık günümüzde kullanılmamaktadır. Parjilinin ardından geliştirilen diğer proparjilamin (asetilenik) türevi bileşikler klorjilin, rasajilin ve selejilindir. Antidepresan ve antianksiyetik etkiye sahip klorjilin [N-metil-N-proparjil-3-(2,4-diklorofenoksi)-propilamin] geliştirilen ilk seçici ve geri dönüşümsüz MAO-A inhibitörüdür. Rasajilin ve selejilin (L-deprenil) ise anti-Parkinson etkiye sahip seçici ve geri dönüşümsüz MAO-B inhibitörleridir. MAO enzimini seçici olarak inhibe etme yeteneğine sahip olmalarına rağmen bu ilaçların serotonin sendromu, baş dönmesi, bulanık görme, sersemlik gibi santral sinir sistemi yan etkilerinin olması, enzimin aktif bölgesine kovalent olarak bağlanarak geri dönüşümsüz inhibisyon yapması, yüksek dozlarda ve tekrar eden uygulamalarda selektivite kayıpları gibi nedenler tedavideki kullanımlarında önemli kısıtlamalara neden olmuştur (Cesura ve Pletscher, 1992; Finberg, 2014).

#### **1.2.3.3.2. Geri Dönüşümlü MAO İnhibitörleri**

Geri dönüşümsüz MAO inhibitörlerinin çeşitli yan etkilere sahip olması araştırmacıları yeni, seçici ve geri dönüşümlü MAO inhibitörleri geliştirmeye yöneltmiştir. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar sonucunda geliştirilen geri dönüşümlü inhibitörlerde, geri dönüşümsüz inhibitörlerde gözlenen, tiramin potansiyalizasyonu (etki güçlenmesi), “peynir etkisi” adı verilen ve inhibitörlerle birlikte alınan peynir gibi fermante yiyeceklerin MAO inhibitörleriyle etkileşip hipertansiyona neden olan kümülatif etki ve tekrar eden uygulamalarda gözlenen selektivite kayıpları gibi yan etkilerin önlenemediği gözlenmiştir. Dolayısıyla geri dönüşümlü MAO inhibitörleri son yıllarda yeni jenerasyon MAO inhibitörleri olarak önem kazanmıştır (Aydın, 2011).

Geri dönüşümlü MAO inhibitörleri, enzime genellikle kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanır. Böylece oluşan enzim-inhibitör kompleksinin ayrılması daha hızlı gerçekleşir ve enzim inhibitörün özelliklerine bağlı olarak aktivitesini zamanla yeniden kazanır. Günümüzde seçici ve geri dönüşümlü olarak MAO-A'yı inhibe ettiği bilinen bileşikler moklobemid, simoksaton, brofaromin ve befloksaton; seçici ve geri dönüşümlü olarak MAO-B'yi inhibe ettiği bilinen bileşikler ise safinamid ve lazabemiddir (Cesura ve Pletscher, 1992; Bolasco ve ark, 2010; Finberg, 2014).

#### **1.2.4. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres**

Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri, insan vücudunda normal hücrel metabolik süreçler sırasında ya da çeşitli dış etkenler aracılığı ile sürekli olarak meydana gelmektedir. Serbest radikaller bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektrona sahip atom, molekül veya iyon halinde bulunabilen, diğer moleküllere ve kimyasal reaksiyonlara karşı oldukça reaktif taneciklerdir. Biyolojik sistemlerdeki serbest radikaller genellikle oksijen, azot ve kükürt içeren moleküllerden üretilirler. Bu şekilde üretilen serbest radikaller, reaktif oksijen türleri (ROT), reaktif azot türleri (RNT) ve reaktif kükürt türleri (RST) olarak adlandırılan molekül gruplarına ayrılırlar. Reaktif oksijen türleri (ROT), süper oksit anyonu, hidroksil radikali, perhidroksil radikali, singlet oksijen, nitrik oksit, peroksinitrit ve hipokloröz asit gibi taneciklerden meydana gelir. Reaktif azot türleri (RNT) nitrik oksitten türetilir. Reaktif kükürt türleri (RST) ise reaktif oksijen türlerinin (ROT) gerçekleştirdiği reaksiyonlar aracılığıyla tiollerden üretilirler (Kostova ve ark., 2011).

Düşük konsantrasyonlarda ROT, hücre farklılaşmasında etkili olan hücre içi sinyal iletimi, hücre büyümesinin durması, apoptozis, gen ekspresyonu, iyon taşınması, bağışıklık sistemi faaliyetleri ve mikroorganizmalara karşı antibakteriyel etki gibi pek çok önemli biyokimyasal işlemde rol oynar. Ancak yüksek konsantrasyonlarda olması ya da yetersiz detoksifikasyona uğraması sonucunda ROT; DNA, RNA, protein, lipid ve karbonhidrat gibi birçok molekülün yapısını değiştirerek ciddi metabolik fonksiyon bozukluklarına ve biyolojik makromoleküllerin hasarına yol açan oksidatif strese neden olur. Metabolik fonksiyon bozuklukları ve oksidatif stres iyonik dengesizliklere, mitokondriyal bozukluklara ve en sonunda hücrenin ölümüne yol açar (Canbay ve ark., 2003; Kostova ve ark., 2011).

Organizmada serbest radikallerin ve ROT'un oluşum hızı ile bu maddelerin metabolize edilme hızı bir denge içerisinde. Bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif

denge sağlandığı müddetçe organizma, serbest radikallerden ve ROT'tan etkilenmemektedir. Ancak serbest radikallerin ve ROT'un oluşum hızında meydana gelen artma ya da ortadan kaldırılma hızında meydana gelen düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. "Oksidatif stres" olarak isimlendirilen bu durum serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki mevcut dengenin kaybını ifade eder ve doku hasarı ile sonuçlanır (Altan ve ark., 2006).

Serbest radikallerin ve ROT'un üretilmesi ile süpürülmesi arasındaki denge ağır metaller, radyasyon, aşırı ısı, besin yetersizliği, hava kirliliği, tuzluluk, kuraklık, patojen saldırılar gibi çok çeşitli biyotik ve abiyotik faktörlerden etkilenir. Bu faktörlere ilaveten yaşlanmayla birlikte hücrel homeostatik sistem de giderek artan bir şekilde etkinliğini kaybeder. Bu durum da hücreleri oksidatif hasara karşı daha savunmasız hale getirerek canlılar için hayati önemi olan makromoleküllerde geri dönüşüm olan veya geri dönüşümü olmayan hasarlara yol açar (Gill ve Tuteja, 2010; Valle, 2011). ROT'un bir dayatması sonucunda oluşan oksidatif stres kalp-damar hastalıkları, hipertansiyon, thrombosis, kanser, diyabet, yaşlanma, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi birçok kronik ve nörodejeneratif hastalığa neden olur (Fu ve ark., 2011, Mladenović ve ark., 2011).

#### **1.2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri**

ROT'ların üretimini ve bunların hücrelerde meydana getirdiği hasarı önlemek amacıyla vücutta "antioksidan savunma sistemleri" olarak bilinen çeşitli savunma mekanizmaları geliştirilmiştir (Altan ve ark., 2006).

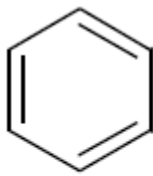
Antioksidan savunma sistemlerinde yer alan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oksidan moleküllerin sebep olduğu hasarı gerek hücre içi gerek de hücre dışı savunma mekanizmalarıyla etkisiz hale getirirler (Altan ve ark., 2006). Antioksidanlar, enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki ana grup altında toplanırlar. Enzimler ve enzim kofaktörleri gibi bazı antioksidanlar vücutta üretilirken, enzimatik olmayan antioksidanların birçoğu besinler aracılığıyla dışarıdan alınır. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT) ve sitokrom oksidaz gibi enzimler enzimatik antioksidanlara örnek olarak verilebilir. Çinko, bakır ve selenyum gibi çeşitli elementler de bu enzimlerin fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için gereklidir. Enzimatik olmayan eksojen kaynaklı antioksidanlara örnek olarak flavonoidler ve fenolik asitlerin yer

aldığı polifenoller, vitaminler, mineraller, karotenoidler ve organosülfür bileşikleri verilebilir (Altan ve ark., 2006; Ratnam ve ark., 2006).

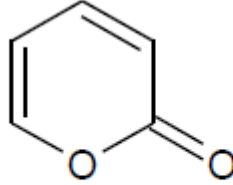
Kumarinler geniş bir biyolojik aktivite alanına sahip lakton türevi bileşiklerdir. Kumarinler de birer antioksidan gibi davranarak canlı hücrelerde hem reaktif oksijen türlerinin oluşumunun kontrol altına alınmasında hem de oluşan reaktif oksijen türlerinin süpürülmesinde rol alarak serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hasarı kontrol altına alırlar (Traykova ve Kostova, 2005; Wu ve ark., 2007).

### 1.2.6. Kumarinler

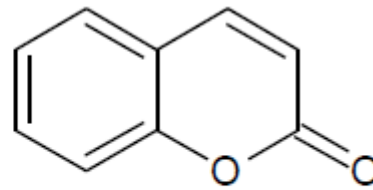
Kumarinler (1,2-benzopironlar), piron halkası ile benzen halkasının kaynaşması sonucunda oluşan (Şekil 1.7) heterosiklik yapıya sahip düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşiklerdir (Kostova ve ark., 2011).



**Benzen**



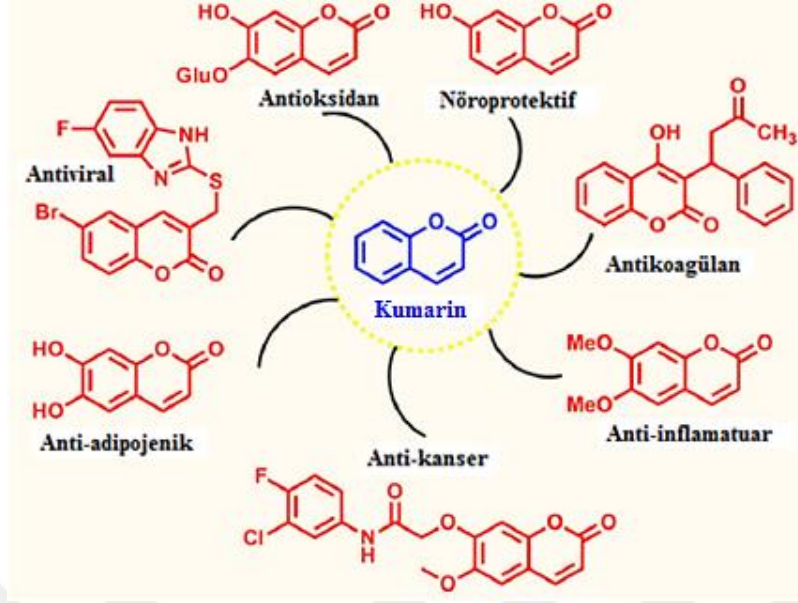
**$\alpha$ -Piron**



**Kumarin**

**Şekil 1.7.** Benzen,  $\alpha$ -piron, ve kumarin halkaları

Kumarinler bitkilerin, özellikle de yeşil bitkilerin ve uçucu yağların yapısında yer almaktadır. Tonka fasülyesi, yeşil çay, akasya, lavanta, yaban mersini, kayısı, çilek, kiraz ve tarçını kapsayan pek çok bitkinin meyve, kabuk, gövde ve yapraklarında doğal olarak bulunurlar. Doğal kaynaklardan izole edilen yaklaşık olarak 1300 kadar kumarin türevinin yanı sıra laboratuvar koşullarında sentetik veya yarı sentetik olarak sentezlenmiş kumarin türevleri de bulunmaktadır (Lacy ve O'kenney, 2004; Bilgin ve ark., 2011; Vardar, 2012; Figueroa-Guiñez ve ark., 2015).



**Şekil 1.8.** Kumarin türevlerinin terapötik uygulamaları (Jameel ve ark., 2016)

Kumarinler enzim inhibitörü olarak davranma, antioksidan gibi hareket ederek reaktif oksijen türlerini süpürme ve toksik maddeleri önleme gibi pek çok önemli biyokimyasal etkiye sahiptir. Ayrıca kumarin türevleri sahip oldukları fonksiyonel yapıları sayesinde antitümör, antialerjik, antiastım, analjezik, antidiyabetik, antihipertansif, antiviral, antifungal, antimikrobiyal, anti-koagulan, anti-adipojenik, anti-inflamatuar, anti-kanser ve antidepresan etki (Şekil 1.8) gibi çok geniş bir alanda biyolojik aktivite gösterebilmektedirler (Vardar, 2012; Patil ve ark., 2013; Figueroa-Guiñez ve ark., 2015, Jameel ve ark., 2016). Dolayısıyla da sahip oldukları bu geniş biyolojik aktivite alanı kumarin türevlerini farmakolojik araştırmaların odağı haline getirmiş ve ilaç endüstrisinin önemli bir parçası yapmıştır.

Kumarin türevleri ayrıca ilaç endüstrisinin yanı sıra; optik beyazlatıcı reaktif olarak floresans ve lazer boyar madde yapısında, tatlandırıcı olarak gıdalarda, hoş kokuları nedeniyle parfümlerde, sabunlarda ve temizlik ürünlerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar (Lacy ve O'kenedy, 2004; Vardar, 2012; Figueroa-Guiñez ve ark., 2015).

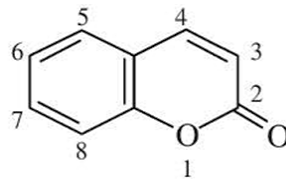
### 1.2.6.1. Kumarinlerin Antioksidan Özellikleri

Geniş bir biyolojik aktivite alanına sahip olmaları nedeniyle kumarinlerin günden güne önemi artmaktadır. Kumarinler canlı hücrelerde hem reaktif oksijen türlerinin oluşumunun kontrol altına alınmasında hem de oluşan reaktif oksijen türlerinin süpürülmesinde rol alarak serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hasarı kontrol altına alırlar. Ayrıca

kumarinler DNA onarımında, hasar görmüş süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesinde, immün savunmada yer alan kinon oksiredüktaz, glutatyon sentetaz, glutatyon-S-transferaz gibi enzimlerin aktivitesinin artırılmasında ve ksantin oksidaz enziminin aktivitesinin azaltılmasında rol oynarlar (Traykova ve Kostova, 2005; Wu ve ark., 2007).

İskelet yapılarına göre kumarin türevlerinin gösterdikleri antioksidan aktivite de değişkenlik gösterir. Flavonoid halkasında yer alan -OH grupları antioksidan aktiviteyi artırırken, -OCH<sub>3</sub> grupları antioksidan aktiviteyi azaltır. (Traykova ve Kostova, 2005). Bununla birlikte hidroksumarin gibi fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi bileşikte yer alan -OH gruplarının konumuna, halkadaki konjugasyon ve rezonans etkisine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu tür fenolik bileşikler, ortamdaki eşleşmemiş elektrona sahip serbest radikale kendi hidrojen atomunu (H•) aktararak, serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırırlar (Rodriguez ve ark., 2011).

Dihidroksikumarinler, monohidroksikumarinlere göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerdir. Dihidroksikumarinlerin yapısında yer alan -OH gruplarının pozisyonu dihidroksikumarinin göstereceği antioksidan aktivitede önemli bir role sahiptir. Genel olarak 6,7-dihidroksikumarinler 7,8-dihidroksikumarinlere göre, 7,8-dihidroksikumarinlerde 5,7-dihidroksi kumarinlere (Şekil 1.9) göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterirler (Danis ve ark., 2016). Örneğin, mantar kaynaklı tirozinaz enzimi ile yapılan bir çalışmada dihidroksikumarinin yapısında bulunan -OH gruplarının kumarinin iskeletinde C6 ve C7 nolu pozisyonda yer almasının söz konusu kumarinin tirozinaz enzimini inhibe etmesinde önemli bir role sahip olduğu görülmüştür. Buna paralel olarak 6,7-dihidroksi-4-metilkumarin bileşiğinin de oldukça etkili bir radikal süpürücü olarak davrandığı belirlenmiştir (Traykova ve Kostova, 2005). Ayrıca dihidroksikumarinde bulunan iki -OH grubunun orto pozisyonunda yer almasının o kumarinin O<sub>2</sub>•- ve ROO• radikallerini süpürmek suretiyle lipid peroksidasyonunu engellediği belirlenirken, buna ilaveten Fe<sup>3+</sup> iyonunun varlığında da bu bileşiğin OH• üretimine yardım ederek bir prooksidan gibi davrandığı gözlenmiştir (Traykova ve Kostova, 2005).



**Şekil 1.9.** Kumarin molekülünün numaralandırma sistemi



Polihidroksikumarinler de biyolojik sistemlerde güçlü birer metal şelatlayıcı ve radikal süpürücü olarak rol oynayan bileşiklerdir. Bu bileşiklerin o-dihidroksi ve o-diasetoksi substitüentli türevleri de oldukça etkili birer radikal süpürücü olarak davranırlar. Ayrıca tionilkumarinlerin hidroksi ve diasetoksi türevleri de güçlü antioksidan özelliğe sahip bileşiklerdir (Lin ve ark., 2011; Traykova ve Kostova, 2005).

### **1.2.6.2. Kumarinlerin Nörodejeneratif Özellikleri**

Nörodejeneratif hastalıklar merkezi sinir sistemindeki bozulmaya bağlı olarak gelişen çoğunlukla geri dönülemez, ilerleyici ve en son aşamada da ölümle sonuçlanan hastalıklardır. Amyotrofik lateral skleroz (ALS), Alzheimer (AH), Parkinson (PH) ve Huntington hastalığı en yaygın görülen nörodejeneratif hastalıklardır. Bu hastalıkların tümünün farklı nedenleri ve farklı patolojik karakteristikleri olmasına rağmen neredeyse hepsinde ortak olarak gözlenen durum agregasyona yatkın proteinlerin birikimiyle meydana gelen sinir hücrelerindeki dejenerasyondur. Bu hastalıklardan Alzheimer ve Parkinson genellikle yaşlılarda görülen ve yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltan hastalıklardır. Etkin tedavileri ve oluşum mekanizmaları tam anlamıyla bulunamamış olan bu kronik ve ilerleyici seyir gösteren nörodejeneratif hastalıklar, modern tıbbın çözmeye çalıştığı en önemli problemlerden biridir (Peng ve ark., 2013; Pavlin ve ark., 2015; Jameel ve ark., 2016) Bu amaçla yapılan bazı çalışmalarda kumarin türevlerinin Alzheimer ve Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılabilecek önemli ajanlar olduğu ortaya konulmuştur (Peng ve ark., 2013; Pavlin ve ark., 2015; Jameel ve ark., 2016).

Kumarinler  $\alpha$ -piron ile benzen halkasının kaynaşması sonucunda oluşan, zengin elektron ve yük taşıma özelliklerine sahip  $\pi$ - $\pi$  konjuge sistemini içeren, lakton türevi bileşiklerin oldukça önemli bir sınıfıdır. Kumarin türevleri canlıların yapısındaki çeşitli enzimlerin aktif bölgelerine kovalent olmayan etkileşimlerle (hidrofobik etkileşimler,  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri, elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, metal koordinasyon, Van der Waals vs.) bağlanarak oldukça geniş bir alanda biyolojik aktivite gösterirler. Bu özellikleri sayesinde kumarin türevlerinin nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde potansiyel bir ilaç olarak kullanımlarına ilişkin çalışmalar ve araştırmalar giderek önem kazanmaktadır (Peng ve ark., 2013).

Alzheimer Hastalığı (AH), bilişsel yetenek kayıpları ve ağır davranış bozuklukları şeklinde ortaya çıkan, sanayileşmiş ülkelerde özellikle de yaşlılarda görülen kronik nörodejeneratif bir beyin hastalığıdır (Peng ve ark., 2013; Xie ve ark., 2013). AH'nın nedeni tam olarak

bilinmemekle birlikte hastalığa yol açtığı düşünülen üç nöropatolojik bulgu tespit edilmiştir. Bunlar; nörofibriler yumaklar, amiloid  $\beta$ -peptit ( $A\beta$ ) plaklar ve sinaptik kayıplardır. Alzheimer hastalığında, belirgin sinaps ve nöron kayıplarını içeren önemli patolojik değişiklikler ve dopamin, serotonin, nöradrenalin, glutamat ve asetilkolin (ACh) gibi nörotransmitter maddelerin seviyelerinde önemli oranda azalmalar meydana gelmektedir. Yapılan klinik çalışmalar, bu nörotransmitter maddeler arasında AH'nın patogenezinde en önemli rol oynayanın ACh olduğunu göstermiştir (Bartus, 2000). Bu nedenle ACh'in hidrolizinden başlıca sorumlu enzim olan asetilkolinesterazın (AChE) inhibe etmek suretiyle ACh'in beyindeki sinaptik düzeylerini arttırmak AH'nın tedavisinde en umut verici yaklaşımdır (McGeer ve McGeer, 2003). AChE enzimi ile yapılan çalışmalar kumarin ve türevlerinin enzimin periferik anyonik bölgesine geri dönüşümlü olarak bağlanarak AChE'ı inhibe etme özelliğine sahip olduklarını göstermiştir. Bu da araştırmacılara kumarin türevleri üzerinde yapılacak modifikasyonlar aracılığıyla AH tedavisinde kullanılabilir potansiyel AChE inhibitörlerinin sentezi için yol göstermektedir (Anand ve ark., 2012). Ayrıca AH'nın patogenezinde rol oynadığı düşünülen nörotransmitterlerden biri olan dopamin ise MAO-B enzimi tarafından metabolize edilmektedir. Dolayısıyla MAO-B enziminin inhibe edilmesi de AH'nın tedavisinde kullanılabilir yaklaşımlardan biridir (Cai, 2014). Bu konuda MAO enzimi ile yapılan çalışmalar da kumarin ve türevlerinin AH'nın tedavisinde kullanılabilir etkili ajanlar olduğunu göstermiştir (Matos ve ark., 2012; Patil ve ark., 2013).

Parkinson hastalığı titremeli felç olarak da isimlendirilen, genellikle yaşlılarda görülen kronik ve ilerleyici nörodejeneratif hastalıktır. Parkinson hastalığının başlıca klinik belirtileri hareketlerde yavaşlama (bradikinezi), katılık (rijidite), titreme, bilinç kaybı ve hafıza bozukluğudur. Parkinson hastalığının hücresel düzeyde, reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı üretimi, mitokondriyal elektron taşıyıcı zincirinde modifikasyonlar ve katekolamin metabolizmasında değişiklikler ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan normal hücresel süreçlerdeki yetmezlik ve buna paralel olarak dopaminerjik nöronların savunmasız kalmasının da Parkinson hastalığında etkili olduğuna inanılmaktadır. Parkinson hastalığı ile ilişkili olduğu düşünülen ROT'un oluşum mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte dopaminerjik nöronlar tarafından üretilen oksidatif stresin ana kaynaklarının; dopamin metabolizması, mitokondriyal fonksiyon bozuklukları ve nöroinflamasyon olduğu belirlenmiştir. Bunlardan dopamin metabolizması sonucunda, Parkinson hastalığında da etkili olduğuna inanılan ve lipid

membranlarının peroksidasyonu yoluyla sitotoksositeye yol açan hidrojen peroksit ve oksijen radikalleri üretilir (Matos ve ark., 2015). İnsan beyinde dopamin metabolizması MAO-B tarafından gerçekleştirilir. Dolayısıyla MAO-B'nin inhibisyonu bu aminin yıkımını engelleyerek anti-Parkinson etki sağlar (Shi ve ark., 2010). Yapılan çalışmalar, doğal kumarin ve kimyasal olarak sentezlenmiş olan kumarin analoglarının MAO inhibisyonunda güçlü aktivite gösterdiklerini ortaya çıkarmıştır (Brühlmann ve ark., 2001; Matos ve ark., 2009; Abdelhafez ve ark., 2013). Bu da araştırmacılara kumarin türevlerinden yola çıkılarak Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılabilir potansiyel MAO inhibitörlerinin sentezi için yol göstermektedir.



## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı belirli bir biyolojik aktiviteye sahip ya da sahip olduğu düşünülen bileşiklerin tasarlanması, optimizasyonu ve yapı-aktivite ilişkilerinden yola çıkarak farmakolojik aktivitesini tahmin etme sürecidir. Yeni bir ilaç geliştirme sürecindeki temel amaç; bilinen ilaçlardan daha etkili, daha az toksik etkiye sahip, mevcut yan etkileri minimuma indirilmiş biyoalıcısına özgü bileşikler geliştirmektir.

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı; ligand-temelli (ligand-based) ilaç tasarımı ve yapı-temelli (structure-based) ilaç tasarımı olmak üzere iki temel başlığa ayrılır. İlaç olarak tasarlanan bileşiklerin etkileşmesi beklenen hedef proteinin üç boyutlu yapısı biliniyorsa protein-ligand etkileşimini temel alan yapı-temelli ilaç tasarım yöntemleri kullanılır. Bu yöntemlere örnek olarak moleküler dinamik (MD) simülasyon ve doking verilebilir. Eğer ilaç olarak tasarlanan bileşiklerin etkileşmesi beklenen hedef proteinin üç boyutlu yapısı bilinmiyorsa bu durumda ligand-temelli ilaç tasarım yöntemleri tercih edilir. Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkisi (KYAI) analizi ligand-temelli ilaç tasarımı kapsamında kullanılan bir yöntemdir (Yılmaz, 2012).

Bu tez çalışmasında, yeni sentezlenmiş ve antioksidan aktiviteleri ölçülmüş 37 adet kumarin türevinden oluşan veri setini kullanılarak, sağlamlığı istatistiksel kriterlerle ispatlanmış matematiksel modeller geliştirmek ve kantitatif yapı-aktivite ilişkileri (KYAI) tanımlamak, aynı kumarin türevlerinin MAO enzimleri ile etkileşimlerini doking metoduyla inceleyerek seçicilik ve etkinliklerini araştırmak amaçlanmıştır. Her iki çalışmadan elde edilecek sonuçlar karşılaştırıp değerlendirerek, çift-etki gösterme potansiyeli olan bileşikler tespit edilmiştir. Bu amaçla tez çalışmasında aşağıda belirtilen yöntemler kullanılmıştır;

- 1) Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkisi (KYAI) analizleri
- 2) Moleküler Doking (Moleküler Yerleştirme)

### 2.1. Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkisi (KYAI) analizleri

Günümüzde var olan ilaç moleküllerini daha spesifik hale getirme çalışmaları ve yeni ilaç etken madde tasarımları, ilaç etki mekanizmalarının da tanımlanmaya çalışıldığı mekanistik yöntemler kullanılarak yürütülmektedir. Bu doğrultuda kimyasal bileşiğin hedeflenen yapıyla etkileşmesi sonucunda ortaya çıkan biyolojik yanıtın temelini oluşturan farmakodinamik faktörlerin de etkili bir biçimde belirlenmesi gerekmektedir. Bu

faktörlerin kimyasal bileşimin özellikleri ile doğrudan ilişkili olduğu göz önünde bulundurularak bileşimin yapısal nitelikleri ile biyolojik aktivitesi arasındaki ilişkilerin tanımlanması oldukça önemlidir. Bu bağlamda söz konusu ilişkilerin tespit edilerek tanımlanması Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkisi (KYAI) analizleri aracılığıyla gerçekleştirilir. KYAI kimyasal bileşiklerin nicel olarak belirlenen moleküler nitelikleri ile gözlenen biyolojik aktivite değerleri arasındaki ilişkilerin anlaşılmasına yardımcı olarak yeni bileşiklerin etkili bir biçimde tasarlanmasına ve geliştirilmesine olanak tanır (Şener ve Yalçın, 2002).

Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkisi (KYAI) analizleri aracılığıyla kimyasal bileşiklerin deneysel olarak ölçülen biyolojik aktiviteleri ile çeşitli yazılımlar kullanılarak belirlenen moleküler tanımlayıcıları (bileşiklerin fizikokimyasal/yapısal/topolojik özelliklerini ifade eden değişken parametreler) arasındaki ilişkiler matematiksel ve istatistiksel yöntemlerle nicel olarak çözümlenir. Çözümleme sonucunda, veri setinde yer alan bir grup molekülün biyolojik aktivitesine, moleküllerdeki hangi fizikokimyasal ya da yapısal özelliklerin katkıda bulunduğunu moleküler tanımlayıcılar aracılığıyla ifade eden bir matematiksel denklem elde edilir (Şener ve Yalçın, 2002). Bu matematiksel denklem (Denklem 2.1) genel olarak şöyle ifade edilebilir;

$$\log(C) = k_1 * x + k_2 * y + k_3 * z + \dots \quad (2.1)$$

Denkleminde yer alan C ifadesi veri setindeki moleküller için deneysel olarak ölçülmüş biyolojik aktivite ( $K_i$ ,  $IC_{50}$ ,  $LD_{50}$ ...) değerlerini;  $k_1$ ,  $k_2$  ve  $k_3$  nümerik katsayı sabitlerini; x, y ve z ise hesaplanmış moleküler tanımlayıcıları belirtir.

Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkisi (KYAI) analizleri aracılığıyla matematiksel modeller geliştirilebilmesi için

- Gözlenen biyolojik aktiviteyi aynı mekanizmaya dayalı olarak ortaya çıkaran kimyasal bileşiklerden oluşan bir veri setine,
- Bu veri setindeki kimyasal bileşiklere ait biyolojik aktivitenin aynı ortamda ve aynı koşullarda nicel olarak saptanmasına,
- Bu veri setinde yer alan kimyasal bileşiklerin ya da bu bileşiklere bağlı substitüentlerin moleküler niteliklerini nicel olarak tanımlayan değişken parametrelere (tanımlayıcılar) ve

- Gözlenen biyolojik aktiviteyi belirten değerler ile moleküler özellikleri tanımlayan parametrik değişkenler arasındaki ilişkiyi çözümlenecek istatistikler yöntemlere (matematiksel işlemlere) gereksinim duyulur (Şener ve Yalçın, 2002).

Yukarıda belirtilen faktörler göz önüne alınarak yapılan KYAİ analizleri sonucunda daha iyi sonuçların elde edilebilmesi için her bir basamağın kendi içinde bazı kriterleri sağlaması gereklidir. Bu doğrultuda geliştirilen KYAİ modellerinin valide edilme ve değerlendirilme aşamalarında bir standart oluşturulabilmesi amacıyla OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development; Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü) tarafından bazı kriterler getirilmiştir (OECD, 2007). OECD'e göre KYAİ validasyonlarında güvenilir modeller elde edilebilmesi için aşağıda verilen beş temel prensibin göz önünde bulundurulması gereklidir. Bu prensipler kısaca şöyledir;

1. Tanımlanmış bir sonuç değeri: KYAİ çalışmasında deneysel olarak ölçülen ve modellenmesi hedeflenen biyolojik, fizikokimyasal ya da çevresel faktörün, deneysel ölçümün yapıldığı koşullarla birlikte detaylı olarak tanımlanması gerekir. Çünkü aynı bileşik için farklı koşullar ve yöntemlerle elde edilen veriler birbirinden farklılık gösterir. Bu nedenle deneysel ölçümlerin gerçekleştirildiği koşulların belirtilmesi gerekir. Ayrıca daha sağlıklı ve güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi için, KYAİ modelleri oluşturmak amacıyla kullanılacak ölçülmüş değerlerin doğruluğu ve hata payı aralığı da önemlidir.

2. Kesin bir algoritma: KYAİ modellerinin oluşturulmasında kullanılacak olan matematiksel yöntemler, istatistiksel parametreler ve oluşturulan modellerde yer alacak moleküler tanımlayıcılar iyi tanımlanmış, tekrarlanabilir ve kullanılacak yeni veri setlerine uygulanabilir olmalıdır.

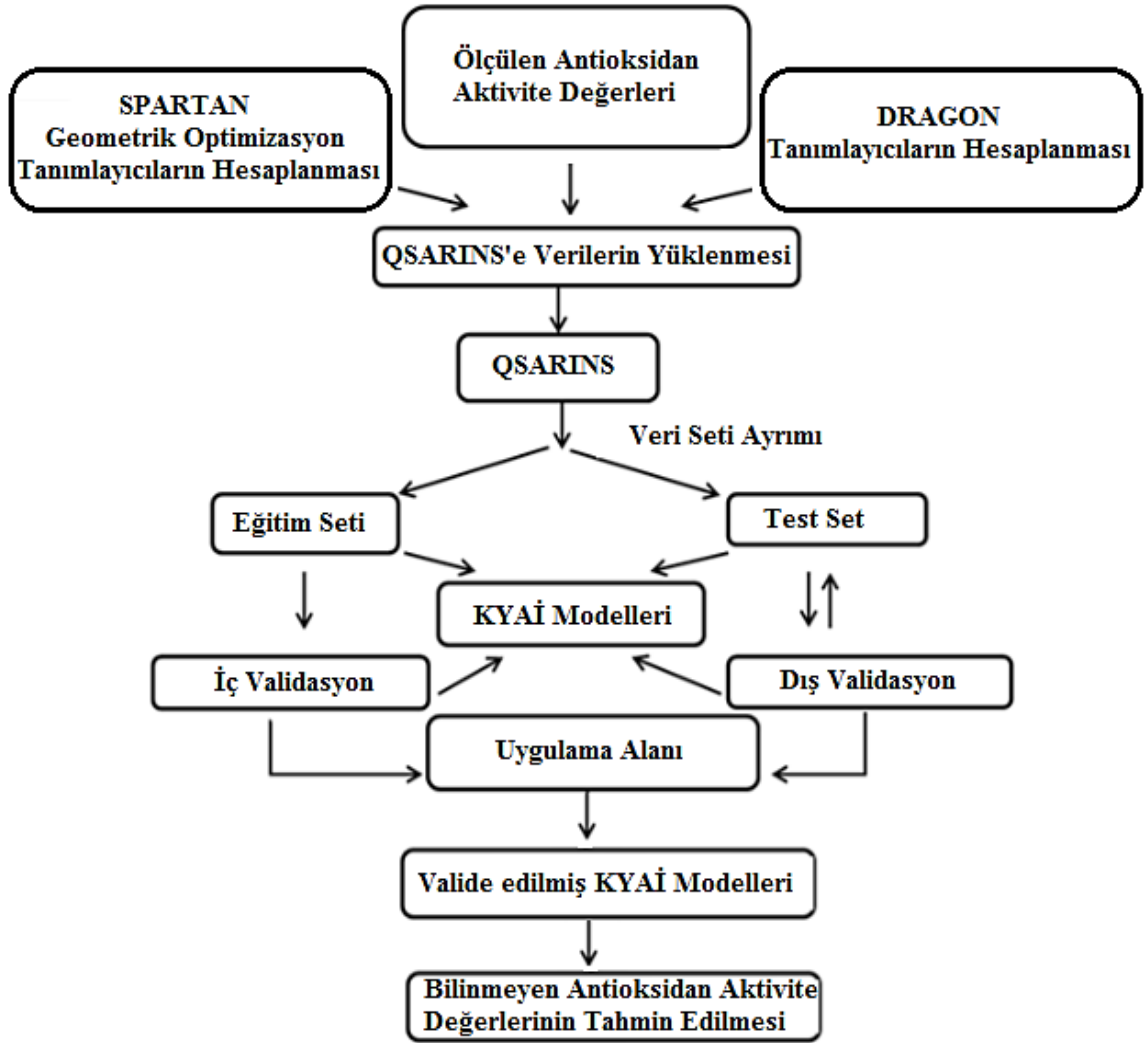
3. Uygulanabilirlik alanının tanımlanması: Geliştirilen bir KYAİ modelinin bütün kimyasal bileşiklerin aktivitesini güvenilir bir şekilde tahmin etmesi beklenemez. Çünkü veri setinde yer alan bileşiklerin kimyasal yapıları, fizikokimyasal özellikleri ve etki mekanizmalarındaki farklılık geliştirilen bir modelin güvenilir tahmin yapmasını etkiler. Bu nedenle geliştirilen modellerin uygulanabilirlik alanının tanımlanması gereklidir.

4. Uyum derecesi, sağlamlık ve tahmin gücü: Bu prensip oluşturulan KYAİ modellerinin valide edilmesi aşamasında yapılması gereken istatistiksel çalışmalar hakkında bilgi verir. Bu doğrultuda veri setindeki bileşikler eğitim seti ve test seti olmak üzere ikiye ayrılır. Çeşitli istatistiksel parametreler kullanılarak eğitim seti aracılığıyla elde edilen modelin

uyum derecesini ve sağlamlığı (modelin iç performansı); test seti kullanarak da elde edilen modelin tahmin gücü (dış validasyon) test edilmelidir.

5. Eğer mümkün ise mekanistik yorum: Bu prensip tahmin edilen biyolojik aktivite ile modelde yer alan tanımlayıcılar arasındaki mekanistik bağın ortaya konulmasını ifade eder. Bir KYAİ modelinin mekanistik açıklamasının yapılması, modelin karmaşık biyolojik ya da fizikokimyasal mekanizmanın bir sonucu olarak ortaya çıktığı göz önüne alındığında, her zaman mümkün olamamaktadır (OECD, 2007).

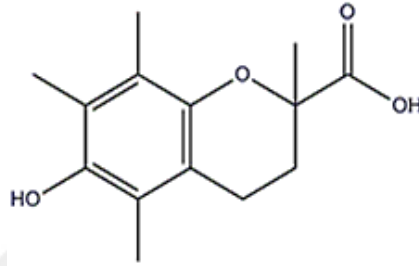
Bu tez çalışmasında belirtilen OECD prensipleri dikkate alınarak KYAİ modelleri geliştirilmiştir. KYAİ çalışmaları sırasında takip edilen basamakları gösteren akış diyagramı Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1. KYAİ modellerinin geliştirilmesi sürecinde izlenen akış diyagramı

### 2.1.1. Veri Setini Oluşturan Yapıların Elde Edilmesi ve Antioksidan Aktivite Çalışmaları

Veri setini Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Organik Kimya ve Biyokimya Anabilim Dallarının laboratuvarlarında sentezlenmiş 37 adet kumarin türevi ve standart olarak kullanılan troloks bileşiği oluşturmaktadır. Troloks bileşiğinin iki boyutlu yapısı Şekil 2.2'de ve veri setini oluşturan kumarin türevlerinin iskelet yapıları Şekil 2.3'de verilmiştir. Veri setini oluşturan kumarin türevlerinin kimyasal yapıları ise Tablo 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Troloks

Veri setinde yer alan bileşiklerin antioksidan aktiviteleri dört farklı yöntem kullanılarak ölçülmüştür. Bu yöntemler; bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemi, demir (III) indirgeyici antioksidan kapasite (FRAP) yöntemi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme aktivitesi yöntemi ve metal şelatlama aktivitesi (MCA) yöntemidir (Erzincan ve ark., 2015, Danis ve ark., 2016). Bu dört çalışmadan elde edilen antioksidan aktivite ölçüm sonuçları arasındaki korelasyon, SPSS 21.0 programı aracılığıyla Pearson's korelasyon katsayısı ( $r$ ) kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Tablo.3'de verilmiştir (SPSS Inc., 2014). En yüksek pozitif korelasyon FRAP ve CUPRAC yöntemlerinin kullanılmasıyla elde edilen antioksidan aktivite sonuçları arasında bulunmuştur ( $r = 0.963$ ; Tablo 2.1).

**Tablo 2.1.** Dört farklı yöntemle ölçülen antioksidan aktivite sonuçlarının Pearson's korelasyon katsayıları ( $r$ )

	<i>CUPRAC</i>	<i>FRAP</i>	<i>DPPH</i>	<i>MCA</i>
<b>CUPRAC</b>	1			
<b>FRAP</b>	0.963**	1		
<b>DPPH</b>	-0.183	0.156	1	
<b>MCA</b>	-0.723**	-0.676**	0.447**	1

\*\* Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlıdır.

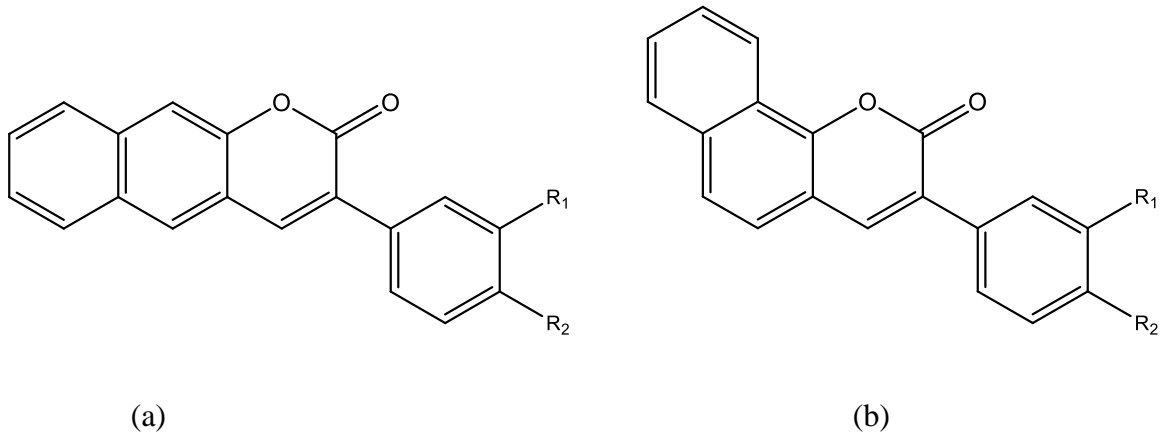
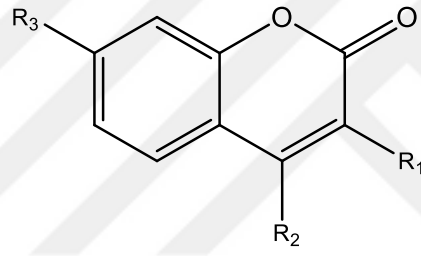
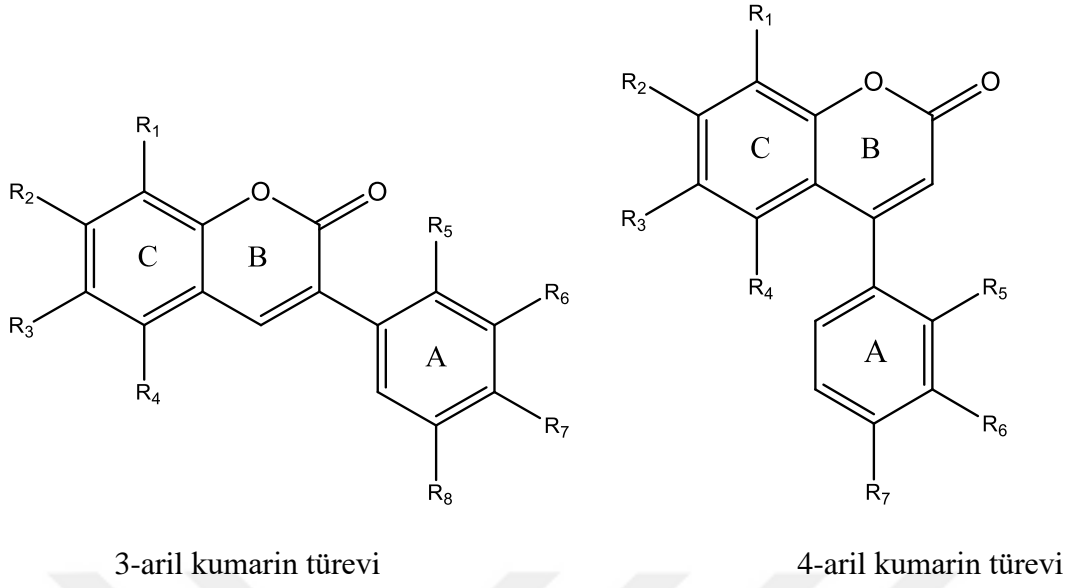


FRAP yöntemi antioksidan aktivite tayininde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Dolayısıyla da elde edilen antioksidan aktivite sonuçlarını bu yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiş diğer çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırmak daha kolaydır. Bu nedenle bu tez çalışmasında FRAP yöntemi ile elde edilen antioksidan aktivite sonuçları kullanılarak KYAİ modelleri geliştirilmiştir.

### **2.1.2. Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Kapasite (FRAP) Yöntemi ile Antioksidan Aktivitelerinin Ölçülmesi**

FRAP yönteminde kumarin türevlerinin demir iyonu ( $Fe^{3+}$ ) indirgeme kapasiteleri Oyaizu metoduna göre tayin edilmiştir (Oyaizu, 1986). Bu metoda göre her bir kumarin çözeltisinden 100  $\mu$ L'lik örnek (5  $\mu$ L DMSO içeren ve pH'ı 6.6 olan 50 $\mu$ M fosfat tamponunda çözülmüş) alınarak deney tüplerine konulmuştur. Daha sonra her birinin üzerine 200  $\mu$ L 50 $\mu$ M fosfat tamponu (pH:6,6) ve 200  $\mu$ L %1'lik potasyum ferrisiyanür [ $K_3Fe(CN)_6$ ] ilave edilmiştir. Elde edilen karışımlar 50°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından karışımlara 250  $\mu$ L %10'luk trikloroasetikasit (TCA) ilave edilmiş ve 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantlardan 700  $\mu$ L alınarak 150  $\mu$ L % 0,1'lik  $FeCl_3$  çözeltisi ile karıştırılmıştır. 700 nm'de örneklerin absorbansları okunmuştur. Pozitif kontrol olarak troloks kullanılmıştır. Sonuçlar troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) olarak ifade edilmiştir (Elde edilen sonuçlar, 1.0 mM'a eşdeğer antioksidan kapasiteye sahip Troloks çözeltisinin konsantrasyonu temel alınarak hesaplanmış ve mM biriminde verilmiştir.) (Apak ve ark., 2004). Yüksek TEAC değerleri söz konusu bileşiklerin yüksek indirgeme potansiyeline sahip olduğunu gösterir. Sentezlenen kumarin türevlerinin yaklaşık olarak yarısı referans olarak alınan troloks bileşiğinden daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir.

Veri setini oluşturan bileşikler için ölçülen antioksidan aktivite değerleri 0.01 ile 3.61 milimolar (mM) arasında değişmektedir. KYAİ modelleri logaritmik skaladaki TEAC değerleri kullanılarak geliştirilmiştir. Logaritmik olarak hesaplanan biyolojik aktivite değerleri -2.00 ile 0.56 mM aralığında değişmektedir. Ölçülmüş olan biyolojik aktivite değerleri Tablo 2.3'te verilmiştir.



Bitişik benzen halkalı 3-aril kumarin türevleri

**Şekil 2.3.** Veri setini oluşturan bileşiklerin iki boyutlu yapıları

**Tablo 2.2.** Veri setini oluşturan bileşiklerin kimyasal yapıları

3-Aril kumarin türevleri								
Bileşik No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>
1	-H	-OH	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H
2	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OAc*	-OAc	-H	-H
3	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH	-OH	-H	-H
4	-H	-OAc	-OAc	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H
5	-H	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-H
6	-H	-OAc	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H
10	-OH	-OH	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H
11	-OAc	-OAc	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H
12	-OH	-OH	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-H
13	-OH	-OH	-H	-H	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-H
14	-OH	-OH	-H	-H	-H	-H	-H	-H
16	-OH	-OH	-H	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-H
23	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H	-H
24	-H	-OH	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H
25	-H	-OH	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H
26	-H	-OAc	-H	-OAc	-OAc	-OAc	-H	-H
27	-H	-OAc	-OAc	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H
28	-H	-OAc	-H	-OAc	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H
29	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-H	-H

4-Aril kumarin türevleri							
Bileşik No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
7	-OH	-OH	-H	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>
8	-H	-OH	-OH	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>
9	-OH	-OH	-H	-H	-H	-OH	-OH
18	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H
21	-H	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH
22	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>

Kumarin iskeletinden türeyen bileşikler			
Bileşik No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
15	-N=N-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-OH	-H
17	-H	-H	-OH
19	-NH <sub>2</sub>	-OH	-H
20	-H	-OH	-H

Bitişik benzen halkalı 3-aril kumarin türevleri					
(a)			(b)		
Bileşik No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Bileşik No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
30	-OAc*	-OAc	33	-OAc	-OAc
31	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	34	-H	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
32	-H	-OCH <sub>3</sub>	36	-H	-OCH <sub>3</sub>
35	-H	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	37	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>

\*Ac= CH<sub>3</sub>CO

**Tablo 2.3.** KYAİ hesaplamalarında kullanılan bileşiklerin biyolojik aktivite değerleri

<b>Bileşik No</b>	<b>Antioksidan Aktivitesi (mM)</b>	<b>log(Antioksidan Aktivitesi) (mM)</b>
1	2.27	0.355
2	0.17	-0.778
3	1.94	0.287
4	0.44	-0.360
5	3.35	0.525
6	0.16	-0.787
7	1.83	0.261
8	2.38	0.377
9	2.66	0.425
10	2.11	0.325
11	0.33	-0.486
12	2.06	0.313
13	3.61	0.557
14	2.28	0.358
15	0.17	-0.778
16	2.01	0.303
17	0.05	-1.331
18	1.22	0.086
19	0.11	-0.972
20	0.02	-1.778
21	2.94	0.468
22	0.03	-1.574
23	2.72	0.435
24	1.22	0.085
25	2.16	0.334
26	0.22	-0.664
27	0.33	-0.486
28	0.16	-0.796
29	2.24	0.351
30	0.14	-0.854
31	0.07	-1.154
32	0.10	-1.000
33	0.14	-0.853
34	0.01	-2.000
35	0.01	-2.000
36	0.10	-1.000
37	0.08	-1.097
<b>Troloks</b>	1	0

### 2.1.3. Yapıların Optimizasyonu

Veri setindeki her bir bileşiğin SPARTAN'10 programı ile üç boyutlu yapısı çizildi (Wavefunction Inc., 2010). Yarı-deneysel yöntem olan PM6 metoduyla konformasyon taraması yapılarak her bir bileşik için sulu fazdaki en kararlı konformasyon seçildi (Stewart, 2007). Seçilen en kararlı konformasyonların PM6 yöntemi ile geometri optimizasyonu yapıldı ve optimize edilen yapılar mol2 formatında kaydedildi.

### 2.1.4. Tanımlayıcı Hesabı

Moleküler tanımlayıcı hesabı SPARTAN'10 ve DRAGON 6.0.38 yazılımları kullanılarak yapıldı (Wavefunction Inc., 2010; DRAGON, 2013).

#### 2.2.4.1 SPARTAN Tanımlayıcılarının Hesaplanması

SPARTAN'10 programı kullanılarak yapılan geometrik optimizasyon sonucunda aşağıda verilen 18 adet tanımlayıcı elde edilmiş ve bu tanımlayıcılar tanımlayıcı havuzuna eklenmiştir;

- En yüksek dolu moleküler orbital enerjileri ( $E_{HOMO}$ ),
- En düşük boş moleküler orbital enerjileri ( $E_{LUMO}$ ),
- Dipol Moment ( $\mu$ ),
- Alan,
- Hacim,
- Ayrılma Katsayısı (LogP),
- Sulu faz enerjisi ( $E_{aq}$ )
- Polarizabilite
- Hidrojen bağı verici (HBD Count)
- Hidrojen bağı alıcı (HBA Count)
- Moleküler Ağırlık (amu)

Bu tanımlayıcıların yanı sıra;

- $E_{HOMO}-E_{LUMO}$  aralığı,
- Sertlik (Hardness),
- Yumuşaklık 1 (Softness 1),
- Yumuşaklık 2 (Softness 2),
- Elektronegatiflik,

- Elektrofillik,
- Hacim/Alan oranı

gibi tanımlayıcılar hesaplanmıştır. Yukarıda verilen SPARTAN tanımlayıcılarını elde etmek için kullanılan matematiksel eşitlikler aşağıda verilmiştir (LoPachin ve ark., 2007) .

$$E_{\text{HOMO}}-E_{\text{LUMO}} \text{ aralığı} = E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$$

$$\text{Sertlik } (\eta) = (E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}) / 2$$

$$\text{Yumuşaklık 1 } (\sigma_1) = 1 / (E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}})$$

$$\text{Yumuşaklık 2 } (\sigma_2) = 1 / \eta$$

$$\text{Elektrofillik } (\omega) = \mu^2 / 2 \eta \quad (\mu: \text{Dipol moment})$$

#### **2.1.4.2. DRAGON Tanımlayıcılarının Hesaplanması**

SPARTAN'10 programı ile optimize edilen bileşiklerin mol2 formatındaki en kararlı konformasyonları DRAGON 6.0.38 yazılımına yüklenerek Dragon tanımlayıcıları hesaplanmıştır (DRAGON, 2013).

DRAGON 6.0.38 yazılımı 29 tanımlayıcı grup içerisinde yapıların farklı özellikleri ile ilişkili toplamda 4885 tane tanımlayıcı hesaplayabilmektedir. Dragon tanımlayıcı gruplarının detayları ve her bir gruptaki tanımlayıcı sayıları Tablo 2.4'te verilmiştir.

**Tablo 2.4.** DRAGON 6.0.38 yazılımındaki tanımlayıcı grupları

Tanımlayıcı No	Tanımlayıcı Grubu	Tanımlayıcı Sayısı
1	Yapısal tanımlayıcılar	43
2	Halka tanımlayıcıları	32
3	Topolojik indeksler	75
4	Hareket ve yol sayıları	46
5	Bağlantı indeksleri	37
6	Bilgi indeksleri	48
7	2D matriks temelli tanımlayıcılar	550
8	2D otokorelasyon	213
9	Burden özdeğerler	96
10	P_VSA-benzeri tanımlayıcılar	45
14	3D matriks temelli tanımlayıcılar	90
15	3D otokorelasyon	80
16	RDF tanımlayıcıları	210
17	3D-MoRSE tanımlayıcıları	224
18	WHIM tanımlayıcıları	114
19	GETAWAY tanımlayıcıları	273
20	Randic moleküler profiller	41
21	Fonksiyonel grup sayıları	154
22	Atom-merkezli parçalar	115
23	Atom-tipi E-durum indeksleri	170
24	CATS 2D	150
25	2D Atom Çiftleri	1596
26	3D Atom Çiftleri	36
27	Yük tanımlayıcıları	15
28	Moleküler özellikler	20
29	İlaç benzeri indeksler	27

### 2.1.5. Model Geliştirme

SPARTAN'10 ve DRAGON 6.0.38 programları kullanılarak elde edilen toplam 2717 tanımlayıcıdan oluşan tanımlayıcı havuzu KYAİ modelleri geliştirmek üzere QSARINS 2.2.1 programına yüklendi (Gramatica ve ark., 2013, 2014; QSARINS 2.2.1, 2015). QSARINS programındaki “excluding semi-constant descriptors (> 80%) ve highly

intercorrelated descriptors (>95%)” seçeneği seçilerek yapılan tanımlayıcı filtrasyonunun ardından kalan 717 tanımlayıcı kullanılarak KYAİ modelleri geliştirildi.

KYAİ modelleri oluşturulurken bağımlı değişken olarak log (antioksidan aktivite) değerleri, bağımsız değişken olarak ise tanımlayıcılar seçildi. Bağımlı değişken olan log (Antioksidan Aktivite) değerlerinin normal dağılıma uygunluğu SPSS 21.0 programındaki Kolmogorov-Smirnov testi ( $p>0.05$ ) kullanılarak test edildi (SPSS Inc., 2014). Log (antioksidan aktivite) değerlerinin normal dağılıma uyduğu görüldü.

Model geliştirme ve validasyon çalışmaları için veri setini oluşturan bileşikler 80/20 oranında eğitim (30 adet) ve test set (8 adet) olmak üzere ikiye bölündü. Farklı eğitim-test set ayrımları SPSS 21.0 programındaki hiyerarşik küme analizi kullanılarak gerçekleştirildi. Kümeler, SPSS 21.0 yazılımındaki “between group linkage” ve “squared Euclidean distance” metodu kullanılarak oluşturuldu (SPSS Inc., 2014). Bu şekilde elde edilen kümeler dikkate alınarak eğitim-test set ayrımları yapılırken, deneysel olarak en düşük ve en yüksek antioksidan aktivite değerine sahip yapıların eğitim setinde yer almasına, biyolojik aktivitenin seçilen yapılar tarafından temsil edilebilir nitelikte olacak şekilde homojen eğitim-test dağılımlarının oluşturulmasına dikkat edildi.

KYAİ modelleri çoklu lineer regresyon (MLR) analizi kullanılarak geliştirildi. Çoklu lineer regresyon analizi (MLR), tek bir bağımlı değişken ile birden fazla bağımsız değişken arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında MLR modelleri QSARINS 2.2.1 yazılımındaki “All Subset and Genetic Algorithm” seçeneği kullanılarak oluşturuldu (Gramatica ve ark., 2013, 2014; QSARINS 2.2.1, 2015).

Elde edilen modeller QSARINS 2.2.1 yazılımındaki Çok Kriterli Karar Verme (Multicriteria Decision Making, MCDM) grafikleri kullanılarak sıralandı. Model seçme aşamasında iç ve dış validasyon kriterlerinin yanı sıra MCDM grafiklerinden de faydalanıldı. MCDM grafikleri iç ve dış validasyon ile ilgili belirli sayıdaki kriterin performansının bir özetidir. MCDM grafiklerinde; her bir model için çapraz validasyon, dış validasyon ve uygunluk kriterleri ayrı ayrı veya birlikte değerlendirilir ve elde edilen değerlendirme sonuçlarına göre modeller sıralanır (Gramatica ve ark., 2013; QSARINS 2.2.1, 2015).



## 2.1.6. Modellerin Validasyonu

Elde edilen KYAİ modellerinin tahmin gücü, sağlamlığı ve güvenilirliği literatürde kabul edilen validasyon kriterleri kullanılarak değerlendirildi.

### 2.1.6.1. İç Validasyon

MLR modellerinin iç tahmin gücü, güvenilirliği ve istatistiksel kalitesi; belirleme katsayısı ( $R^2$ ), düzeltilmiş belirleme katsayısı ( $R^2_{adj}$ ), bir molekülü dışarıda bırakarak yapılan çapraz validasyon ( $Q^2_{LOO}$ ), birden fazla molekülü dışarıda bırakarak yapılan çapraz validasyon ( $Q^2_{LMO}$ ), standart tahmin hatası (s), eğitim ve test set için ortalama standart hataların kareleri ( $RMSE_{tr}$  ve  $RMSE_{test}$ ) gibi istatistiksel parametreler kullanılarak belirlenmiştir.

Belirleme katsayısı ( $R^2$ ), deneysel değerler ile geliştirilen model aracılığıyla tahmin edilen değerler arasındaki uyumun derecesi hakkında bilgi veren bir istatistiksel parametredir. Ancak bu parametre geliştirilen modelin tahmin gücü hakkında bilgi vermez.  $y_i$  deneysel biyolojik aktivite değeri,  $\hat{y}_i$  tahmin edilen biyolojik aktivite değeri ve  $\bar{y}$  deneysel biyolojik aktivite değerlerinin ortalaması olmak üzere;  $R^2$  değerini hesaplamak için kullanılan matematiksel eşitlik Denklem 2.2 'de verilmiştir (Chirico ve Gramatica, 2011).

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (2.2)$$

$R^2$  değeri modele eklenen tanımlayıcı sayısına paralel olarak artış gösterir. Eklenen tanımlayıcının biyolojik aktivitenin açıklanmasına anlamlı bir katkıda bulunmaması durumunda dahi  $R^2$  değerinde artış meydana gelir. Bu durum fazla-uyum (overfitting) problemi yaratır. Bu nedenle artan tanımlayıcı sayısına bağlı olarak  $R^2$  değerinde meydana gelen artış dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir. MLR çalışmalarındaki fazla-uyum problemi validasyon aşamasında,  $R^2$  değerinin yanısıra düzeltilmiş belirleme katsayısının ( $R^2_{adj}$ ) da dikkate alınması suretiyle aşılabılır. Model geliştirme çalışmalarında dikkate alınması gereken en önemli parametrelerden biri de Topliss oranıdır. Eğitim setindeki bileşik sayısının tanımlayıcı sayısına oranı olarak tanımlanan Topliss oranının en az 5 olması istenir. Bu oranın 5 veya daha fazla olması model geliştirme çalışmalarında

interkorelasyon nedeniyle ortaya çıkabilecek fazla-uyum problemini de engelleyebilir (Dearden ve ark., 2009; Chirico ve Gramatica, 2011; Gramatica ve ark., 2013).

Geliştirilen modellerin tahmin gücünü değerlendirmede kullanılan metodlardan biri de çapraz validasyondur ( $Q^2$ ). Bu metotta, eğitim setinden bir veya daha fazla sayıda bileşik kademeli bir şekilde uzaklaştırılarak korelasyon katsayısı hesaplanır. Hesaplanan bu değer modelin iç tahmin gücü ve istatistiksel kalitesi hakkında bilgi verir. Çapraz validasyon eğitim setinden sistematik olarak bir tane verinin dışarıya atılması ile hesaplanan  $Q^2_{LOO}$  (leave-one-out cross-validation) ve eğitim setinden sistematik olarak birden fazla sayıda verinin dışarıya atılması ile hesaplanan  $Q^2_{LMO}$  (leave-many-out cross-validation) olmak üzere iki şekilde yapılabilir.  $Q^2_{LOO}$ , KYAİ çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan metottur.  $y_i$  deneysel biyolojik aktivite değeri,  $\hat{y}_{i/i}$  i bileşiği uzaklaştırıldıktan sonra model aracılığıyla tahmin edilen biyolojik aktivite değeri ve  $\bar{y}$  deneysel biyolojik aktivite değerlerinin ortalaması olmak üzere  $Q^2_{LOO}$  değerini hesaplamak için kullanılan matematiksel eşitlik Denklem 2.3'de aşağıda verilmiştir (Gramatica, 2007; Chirico ve Gramatica, 2011).

$$Q^2_{LOO} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_{i/i} - y_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (2.3)$$

Ortalama standart hataların kareleri ( $RMSE$ ), geliştirilen model yardımıyla tahmin edilen biyolojik aktivite değerlerinin deneysel biyolojik aktivite değerinden ortalama olarak ne kadar saptığı hakkında bilgi veren bir istatistiksel parametredir (Chirico ve Gramatica, 2011). Hem eğitim setinin iç validasyonunda ( $RMSE_{tr}$ ), hem de test setin dış validasyonunda ( $RMSE_{test}$ ) kullanılan bir istatistiksel parametre olan  $RMSE$  değerinin tahmin gücü yüksek bir model için düşük olması beklenir.  $RMSE$  Denklem 2.4'de verilen matematiksel eşitlik yardımıyla hesaplanır.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y})^2}{n}} \quad (2.4)$$

Tanımlayıcılar arasındaki interkorelasyon QUIK kuralı aracılığıyla test edilebilir. Bu amaçla tez çalışmasında model hesaplamaları öncesinde QSARINS programındaki "QUIK

rule” bölümü 0.05 seçilerek tanımlayıcılar arasındaki interkorelasyon minimize edilmiş ve modelin güvenilirliği artırılmıştır (Gramatica ve ark., 2013).

Elde edilen MLR modellerinin güvenilirliği ayrıca Y-karıştırma (Y-scrambling) yöntemi ile de test edilmiştir. Bu yöntemde eğitim setindeki bileşiklere ait biyolojik aktivite değerleri [log (antioksidan aktivite)] rastgele karıştırılır ve bu işlem defalarca tekrarlanır. Bu işlem sonunda deneysel olarak ölçülen biyolojik aktivite değerinden farklı bir biyolojik aktivite değeriyle eşleşmiş olan eğitim seti bileşikleri için yeni bir korelasyon katsayısı hesaplanır. Bu işlemin amacı modelin şans korelasyonu ile elde edilip edilmediğini ortaya çıkarmaktır. Hesaplanan yeni korelasyon katsayısının düşük çıkması modelin şans korelasyonu ile elde edilmediğini gösterir (Gramatica, 2007).

Fischer ( $F$ ) istatistiği, geliştirilen modellerin istatistiksel yönden geçerliliği hakkında bilgi veren parametrelerden birisidir.  $F$  değerinin yüksek olması elde edilen modelin geçerliliğini artırır (Aydın, 2011).

#### 2.1.6.2. Dış Validasyon

Geliştirilen modellerin tahmin gücü, test set için hesaplanan belirleme katsayısı ( $R^2_{test}$ ), tahmini korelasyon katsayılarının kareleri ( $Q^2_{F1}$ ,  $Q^2_{F2}$ ,  $Q^2_{F3}$ ), uyum korelasyon katsayısı ( $CCC_{test}$ ),  $r^2_m$  ve  $\Delta r^2_m$  gibi istatistiksel parametreler kullanılarak test edilmiştir.

Tahmini korelasyon katsayılarının kareleri ( $Q^2_{F1}$ ,  $Q^2_{F2}$ ,  $Q^2_{F3}$ ), geliştirilen modellerin performansını değerlendirmede kullanılan istatistiksel parametrelerden biridir. Bu parametre, test set için elde edilen modeller aracılığıyla tahmin edilen biyolojik aktivite değerleri ile deneysel olarak ölçülen biyolojik aktivite değerleri arasındaki farkı, eğitim seti değerlerinin ortalamasını da dikkate alarak hesaplar.  $y_i$  test set bileşiklerinin deneysel biyolojik aktivite değerleri,  $\hat{y}_i$  test set bileşiklerinin tahmin edilen biyolojik aktivite değerleri,  $\bar{y}$  eğitim setinin biyolojik aktivite değerlerinin ortalaması,  $n_{TR}$  eğitim setindeki bileşik sayısı ve  $n_{EXT}$  test setteki bileşik sayısı olmak üzere;  $Q^2_{F1}$ ,  $Q^2_{F2}$  ve  $Q^2_{F3}$  değerlerini hesaplamak için kullanılan matematiksel eşitlikler Denklem 2.5-2.7’de verilmiştir (Shi ve ark., 2001; Schüürmann ve ark., 2008; Consonni ve ark., 2009, 2010; Chirico ve Gramatica, 2011).

$$Q_{F1}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n_{EXT}} (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^{n_{EXT}} (y_i - \bar{y}_{TR})^2} \quad (2.5)$$

$$Q_{F2}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n_{EXT}} (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^{n_{EXT}} (y_i - \bar{y}_{EXT})^2} \quad (2.6)$$

$$Q_{F3}^2 = 1 - \frac{[\sum_{i=1}^{n_{EXT}} (\hat{y}_i - y_i)^2] / n_{EXT}}{[\sum_{i=1}^{n_{TR}} (y_i - \bar{y}_{TR})^2] / n_{TR}} \quad (2.7)$$

Uyum korelasyon katsayısı ( $CCC$  veya  $\hat{p}_c$ ), deneysel değerler ile geliştirilen model aracılığıyla tahmin edilen değerler arasındaki uyumu ölçmek için kullanılan bir parametredir. Hem eğitim setinin ( $CCC_{tr}$ ) hemde test setin ( $CCC_{test}$ ) validasyonlarında kullanılabilen bir parametre olan uyum korelasyon katsayısı; Lin tarafından önerilen ve Chirico ve Gramatica tarafından yeniden modifiye edilen bir matematiksel eşitlik yardımıyla (Denklem 2.8) hesaplanır. Bu eşitlikte yer alan  $x$  ve  $y$  değerleri sırasıyla deneysel verilere karşı model yardımıyla tahmin edilen değerler alınarak çizilen grafikteki apsis ve ordinat değerlerini,  $n$  bileşik sayısını,  $\bar{x}$  ve  $\bar{y}$  sırasıyla apsis ve ordinat değerlerinin ortalamasını ifade eder (Lin, 1989, 1992; Chirico ve Gramatica, 2011).

$$\hat{p}_c = \frac{2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 + \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 + n(\bar{x} - \bar{y})^2} \quad (2.8)$$

Bu tez çalışmasında geliştirilen modellerin güvenilirliğini test etmek için kullanılan parametrelerden biri de Golbraikh ve Tropsha kriterleridir. Golbraikh ve Tropsha kriterlerini sağlayan modeller güvenilir ve kabul edilebilir modeller olarak değerlendirilmektedir (Golbraikh ve Tropsha, 2002). Bu kriterler şöyledir;

- I.  $R^2 > 0.6$
- II.  $(R^2 - R_0^2) / R^2 < 0.1$  ve  $0.85 \leq k \leq 1.15$  veya

$$(R^2 - R'^2) / R^2 < 0.1 \text{ ve } 0.85 \leq k' \leq 1.15$$

$$\text{III. } |R^2 - R'^2| < 0.3$$

Yukarıdaki denklemlerde yer alan  $R^2$  değeri tahmin edilen biyolojik aktivite değerlerine karşı deneysel olarak ölçülen değerlerin,  $R'^2$  ise ölçülen biyolojik aktivite değerlerine karşı tahmin edilen değerlerin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen eğrilerin korelasyon katsayılarına;  $k$  ve  $k'$  ise sırasıyla bu eğrilerin eğimlerine karşılık gelmektedir.  $R^2_0$  ve  $R'^2_0$  ise çizilen grafiklerdeki eğrilerin x ve y eksenlerinin kesiştiği noktadan başlatılmasıyla elde edilen korelasyon katsayılarına denk gelmektedir (Golbraikh ve Tropsha, 2002).

$r^2_m$  ve  $\Delta r^2_m$  parametreleri, tüm veri setindeki bileşiklerin ölçülen aktivite değerleri ile tahmin edilen aktivite değerleri arasındaki ilişkiden yola çıkılarak hesaplanan ve geliştirilen modellerin tahmin gücünü ve sağlamlığını değerlendirmede kullanılan parametrelerdir.  $\Delta r^2_m$  değeri 0.2'den küçük olan ve  $r^2_m$  değeri 0.5'ten büyük olan bir model güvenilir ve kabul edilir olarak nitelendirilmektedir.  $r^2$  ve  $r^2_0$  Golbraikh ve Tropsha kriterlerinde yer alan  $R^2$  ve  $R^2_0$  değerlerine karşılık gelmek üzere  $r^2_m$  Denklem 2.9'de verilen eşitlik yardımıyla hesaplanır (Ojha ve ark., 2011).

$$r^2_m = r^2 \times \left(1 - \sqrt{r^2 - r^2_0}\right)$$

(2.9)

### 2.1.7. Uygulama Alanının Belirlenmesi

Geliştirilen bir KYAİ modelinin bütün kimyasal bileşiklerin aktivitesini güvenilir bir şekilde tahmin etmesi beklenemez. Çünkü moleküler tanımlayıcılar ve bu tanımlayıcılara bağlı olarak elde edilen modeller; veri setinde bulunan bileşiklerin kimyasal yapıları, fizikokimyasal özellikleri ve etki mekanizmaları gibi faktörlere bağlı olarak ortaya çıkar. Dolayısıyla da veri setindeki bileşiklerden farklı kimyasal yapılara, fizikokimyasal özelliklere ve etki mekanizmalarına sahip bileşiklerin kullanılması geliştirilen modelin güvenilir tahmin yapmasını etkiler. Bu nedenle geliştirilen modellerin uygulanabilirlik alanının tanımlanması gereklidir.

Geliştirilen modellerde uygulama alanının dışında kalan ve aykırı değer olarak isimlendirilen bileşikler modelin tahmin gücünü önemli ölçüde değiştirmektedir. Bu nedenle geliştirilen modeller için aykırı değer analizi yapılmalıdır. Bu tez çalışmasında aykırı değer analizi ve uygulama alanının tespiti her bir model için QSARINS programı aracılığıyla çizilen Williams grafiği kullanılarak yapıldı. Williams grafiği, bileşiklerin

standart artık değerlerine karşı şapka değerlerinin ( $h$ ) değişimini gösteren iki boyutlu bir grafikdir. Bu grafikte yer alan standart artık ve şapka değerleri uygulama alanının belirlenmesinde ve aykırı değer analizinde kullanılan iki önemli parametredir.

Çeşitli regresyon temelli metotlar aracılığıyla hesaplanabilen standart artık, aykırı değer analizinde kullanılan parametrelerden birisidir. Çalışmamız için standart artık  $\pm 3$  olarak belirlenmiş ve bu değer dışında kalan yapılar yanıt-aykırı değer (response outlier) olarak tanımlanmıştır.

Aykırı değer analizinde kullanılan bir diğer parametrede kritik şapka değeridir.  $X_i$  dikkate alınan bileşiğin tanımlayıcı vektörü,  $X$  eğitim seti tanımlayıcılarından elde edilen tanımlayıcı matris ve  $X^T$  onun transpoze matrisi olmak üzere; bileşiklerin şapka değerleri Denklem 2.10'da verilen formülle hesaplanır (Gramatica, 2007).

$$h_i = X_i^T (X^T X) X_i \quad (2.10)$$

Uygulama alanının sınırlarını çizen en önemli parametrelerden biri olan kritik şapka değeri ( $h^*$ ) ise Denklem 2.10'da verilen formülle belirlenir. Bu formüldeki  $n$  eğitim setindeki bileşik sayısını,  $p$  ise modeldeki tanımlayıcı sayısını gösterir (Gramatica, 2007).

$$h^* = 3(p+1)/n \quad (2.11)$$

Kritik şapka değerinin üstünde kalan yapılar genellikle yapısal olarak veri setinin genel dağılımına uymayan moleküllerdir ve yapısal aykırı değer (structural outlier) olarak tanımlanırlar. Veri setini oluşturan kimyasalların yapısı, kaldıraç etkisi yaratarak model parametrelerinin belirlenmesinde etkili olan en önemli faktörlerden birisidir. Kaldıraç, bir molekülün geliştirilen modelin deneysel alanına (yani eğitim setinin yapısal merkezine) olan uzaklığını ifade eder ve söz konusu molekülün kimyasal yapısının model üzerindeki etkisi hakkında bilgi verir. Yüksek kaldıraç değerine sahip moleküllerden tahmin edilen biyolojik aktivite değerleri deneysel biyolojik aktivite değerlerine yakın olan moleküllerin eğitim setinde olması geliştirilen modeli güçlendirir ve bu durum iyi kaldıraç olarak ifade edilir. (Gramatica, 2007).

### 2.1.8. Yeni Kumarin Türevi Bileşiklerin Tasarlanması

Veri setinde yer alan ve deneysel olarak ölçülen antioksidan aktivite değerleri yüksek olan bileşiklerden yola çıkılarak 31 adet yeni kumarin türevi bileşikler tasarlandı. Yeni

tasarlanan bileşiklerin iki boyutlu yapıları Şekil 2.3’de, kimyasal yapıları Tablo 2.5’de verilmiştir. Bu bileşiklerin antioksidan aktivite değerleri, veri seti için geliştirilen ve istatistiksel açıdan en iyi model olarak seçilen KYAİ modeline ait eşitlikten faydalanılarak tahmin edildi. Ayrıca tasarlanan bileşiklerin moleküler doking yöntemiyle MAO inhibisyon aktiviteleri belirlendi.

KYAİ çalışmaları kapsamında tasarlanan bileşiklerin SPARTAN’10 programı ile üç boyutlu yapısı çizildi ve yarı-deneysel yöntem olan PM6 metoduyla konformasyon taraması yapıldı (Stewart, 2007; Wavefunction Inc., 2010). Bulunan konformerler sulu fazdaki enerji değerlerine göre sıralanarak en düşük enerjiye sahip konformasyon en kararlı konformasyon olarak seçildi. Seçilen en kararlı konformasyonların PM6 yöntemi ile geometrik optimizasyonu yapılarak SPARTAN tanımlayıcıları ve DRAGON tanımlayıcıları hesaplandı. Veri seti için geliştirilen ve istatistiksel açıdan en iyi model olarak seçilen KYAİ modeline ait eşitlikten faydalanılarak tasarlanan bileşiklerin antioksidan aktivite değerleri tahmin edildi.

Moleküler doking çalışmaları kapsamında tasarlanan bileşiklerin üç boyutlu yapıları SPARTAN’10 programı kullanılarak çizildi (Wavefunction Inc., 2010). SPARTAN’10 programındaki yarı-deneysel PM6 metoduyla yapılan konformasyon taramasının ardından her bir bileşik için gaz fazındaki en kararlı konformasyon seçilerek yapılar optimize edildi (Stewart, 2007). Optimize olmuş bileşik yapıları pdb formatında kaydedildi. Aktif bölgesi boş pdb formatındaki enzim dosyaları ve pdb formatındaki ligand dosyaları rijid doking işlemi için AutodockTools 1.5.6 programında açılarak doking işlemine hazır hale getirildi ve pdbqt formatına dönüştürüldü (Morris ve ark., 2009). İzoenzimlerin yapısında bulunan FAD’ın N5 atomu merkezde olmak üzere x, y, z boyutları 40x40x40 Å olacak şekilde bir küp seçilerek bir grid oluşturuldu. Ligandların bu küp içerisinde enzime bağlanması sağlandı. Dokingler AutodockVina programı kullanılarak yapıldı ve her bileşik için doking hesaplamaları 10 kez tekrarlandı (Trott ve Olson, 2010).

**Tablo 2.5.** Yeni tasarlanan bileşiklerin kimyasal yapıları

3-Aril Kumarin Türevleri								
Bileşik No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>
E-32	-H	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H
E-33	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H
E-34	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H
E-35	-H	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>
E-36	-H	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-NO <sub>2</sub>	-H
E-37	-H	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-NO <sub>2</sub>	-H
E-38	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H	-NO <sub>2</sub>	-H
E-39	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-H	-NO <sub>2</sub>	-H
E-40	-H	-OH	-OH	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-OAc <sup>Δ</sup>	-H
E-56	-OH	-OH	-H	-H	-H	-OH	-NO <sub>2</sub>	-H
E-57	-H	-OH	-OH	-H	-H	-OAc	-OAc	-H
E-60	-H	-OH	-OH	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-NO <sub>2</sub>	-H
E-62	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H
E-63	-H	-OH	-OH	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H
4-Aril Kumarin Türevleri								
Bileşik No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	
E-41	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH	-OH	-H	
E-42	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH	-H	-OH	
E-43	-OH	-OH	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-OH	-H	
E-44	-OH	-H	-OH	-H	-CH <sub>3</sub>	-OH	-H	
E-45	-H	-OH	-OH	-H	-OH	-NO <sub>2</sub>	-H	
E-46	-OH	-H	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	
E-47	-OH	-H	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	
E-48	-H	-OH	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	
E-58	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-OH	-OH	
E-59	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-CH <sub>3</sub>	-H	
E-64	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-OH	-OH	-H	
Bitişik benzen halkalı 3-hidroksi kumarin türevleri								
(a)			(b)					
Bileşik No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Bileşik No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>			
E-65	-OAc*	-OCH <sub>3</sub>	E-68	-OAc	-OCH <sub>3</sub>			
E-66	-OCH <sub>3</sub>	-OH	E-69	-OCH <sub>3</sub>	-OH			
E-67	-OH	-OH	E-70	-OH	-OH			

\*Ac= CH<sub>3</sub>CO



## 2.2. Moleküler Doking (Moleküler Yerleştirme)

Bir moleküler modelleme yöntemi olan doking, bir molekülün başka bir moleküle nonkovalent etkileşimlerle bağlanarak kararlı bir kompleks oluşturması sonucunda, moleküllerin uzayda tercih ettikleri pozisyonları ve bağlanma afinitelerini tahmin etmede kullanılan bir yöntemdir (Thiriot ve ark., 2008; Trott ve Olson, 2010). Bu yöntem genellikle hedef moleküllere (reseptör) ilaç olarak tasarlanan maddelerin (ligand) bağlanmalarının doğasını incelemek için kullanılır.

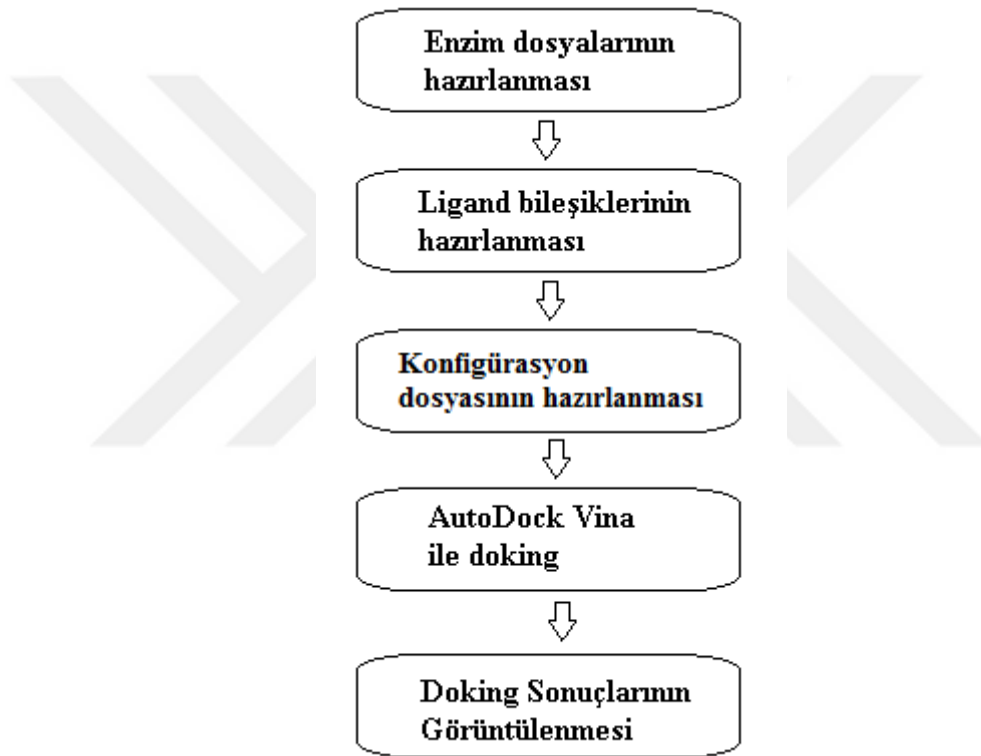
Ligand-reseptör ve reseptör-reseptör dokingi olmak üzere iki türde uygulaması olan doking yönteminde, reseptör olarak proteinler, nükleik asitler (DNA, RNA) gibi büyük ve biyolojik öneme sahip makromoleküller kullanılır. Doking çalışmalarında reseptör olarak ele alınan moleküllerin yapılarının tanımlanmasında X-ışınları kristallografisi veya nükleer manyetik rezonans (NMR) teknikleri kullanılmaktadır. Ligand-protein dokingi; ligandı esnek (flexible) proteini sabit (rijid) ya da hem ligandı hem de proteini esnek seçmek suretiyle gerçekleştirilmektedir. Protein-protein dokingi ise bilgisayar programları aracılığıyla simülasyonu yapılmış iki adet protein molekülünün birbiriyle etkileşimini içermektedir. Protein-protein dokingindeki etkileşimler ligand-protein dokingindeki etkileşimlere kıyasla daha rijiddir (Dias ve Filgueira de Azevedo Jr, 2008).

Moleküler doking çalışmaları, ilaç ya da ilaç adayları olarak tasarlanan taneciklerin hedef enzim, protein ya da nükleik asit molekülünün aktif bölgesine hangi konformasyonlarda hangi etkileşimlerle bağlandığı, bu bağlanmada etkili olan amino asit ya da nükleotid türleri ve bağlanma afinitesinin tahmini ile ilgili önemli bilgiler sunmaktadır. Bu bilgiler hedeflenen makromoleküllere daha uygun bileşiklerin tasarlanması aşamasında yol gösterici olmaktadır. Bu tez çalışmasında Scripps Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilmiş açık lisanslı bir doking programı olan AutoDock Vina kullanılarak rijid ve esnek protein-ligand dokingleri yapılmıştır (Trott ve Olson, 2010).

AutoDock Vina, AutoDock ile aynı laboratuvarında (The Molecular Graphics Lab, Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, California) geliştirilmiş bir doking programıdır. AutoDock Vina ve AutoDock programının performansı 190 tane protein-ligand kompleksinden oluşan bir deneme seti kullanılarak karşılaştırılmış ve AutoDock Vina programının daha hızlı ve güvenilir tahminler verdiği görülmüştür.

Autodock Vina programında kullanılan genetik algoritma birçok global ve yerel optimizasyon yaklaşımının bir kombinasyonudur (Trott ve Olson, 2010). Programın kendine özgü bir grafik ara yüzü bulunmamakla birlikte; hedef molekülü ve ligandı doking işlemine hazırlamak ve grid parametrelerini belirlemek amacıyla AutoDock programı için geliştirilmiş olan AutoDockTools (ADT) grafik ara yüzü kullanılabilir (Morris ve ark., 2009).

Tez çalışmasında izlenen moleküler doking basamaklarını gösteren akış diyagramı Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4. Moleküler doking çalışmalarında izlenen akış diyagramı

### 2.2.1. Enzim dosyalarının hazırlanması

MAO-A için 2.2 Å çözünürlüğe sahip 2Z5X x-ışını kristal yapısı, MAO-B için 1.6 Å çözünürlüğe sahip olan 2XFN x-ışını kristal yapısı protein veri bankasından pdb formatında indirilmiştir. Dimer halinde bulunan MAO-B enzimidaki zincirlerden biri silinerek monomerik yapı elde edilmiştir. Her bir enzim için kristal yapısında enzime bağlı olan inhibitör, deterjan ve su molekülleri yapıdan silinip gerekli diğer düzeltmeler yapıldıktan sonra aktif bölgesi boş enzim pdb formatında kaydedilmiştir. Bu şekilde elde

edilen enzim dosyaları rijid doking işlemi için AutodockTools 1.5.6 programında açılarak doking işlemine hazır hale getirilmiş ve pdbqt formatına dönüştürülmüştür.

Esnek doking işleminde ise öncelikle esnek olarak seçilecek amino asitler belirlenmiştir. MAO-A ve MAO-B enziminin aktif bölgesinde yer alan ve esnek olarak seçilen 11 adet amino asit Tablo 2.6'da verilmiştir. pdb formatında kaydedilen aktif bölgesi boş enzim dosyaları AutodockTools 1.5.6 programında açılarak belirlenen 11 adet aktif bölge amino asidi doking işlemi sırasında esnek olarak seçilmiş ve dönebilen bağ sayıları tanımlandıktan sonra pdbqt dosya formatında kaydedilmiştir.

**Tablo 2.6.** MAO-A ve MAO-B izozimlerinin aktif bölgesinde yer alan ve esnek olarak seçilen amino asitler

<b>MAO-A enzimi için esnek seçilen amino asitler</b>	<b>MAO-B enzimi için esnek seçilen amino asitler</b>
Tyr-69	Tyr-60
Asn-181	Cys-172
Ile-207	Ile-198
Phe-208	Ile-199
Gln-215	Gln-206
Lys-305	Lys-296
Ile-335	Tyr-326
Phe-352	Phe-343
Cys-406	Cys-397
Tyr-407	Tyr-398
Tyr-444	Tyr-435

### **2.2.2. Ligand bileşiklerinin hazırlanması**

MAO inhibitör özellikleri araştırılacak olan kumarin türevleri ile MAO-A ve MAO-B izozimlerinin x ışını kristal yapılarında bulunan ligandların üç boyutlu yapıları SPARTAN'10 programı kullanılarak çizildi (Wavefunction Inc., 2010). Spartan'10

programındaki yarı-deneysel PM6 metoduyla yapılan konformasyon taramasının ardından her bir bileşik için en kararlı konformasyon seçilerek optimize edildi (Stewart, 2007). Optimize olmuş bileşik yapıları pdb formatında kaydedildi. AutodockTools programı kullanılarak her bir ligand yapısı doking işlemine hazır hale getirilmek üzere pdbqt formatına dönüştürüldü. Veri setini oluşturan bileşiklerin iki boyutlu yapıları Şekil 2.3'te verilmiştir. Veri setini oluşturan bileşiklerin kimyasal yapıları Tablo 2.2'de verilmiştir.

### 2.2.3. Konfigürasyon (Config) dosyasının hazırlanması

Protein ve ligand molekülleri doking işlemine hazırlandıktan sonra komut isteminin çalıştırılarak doking hesaplamasının yapılabilmesi için öncelikle konfigürasyon dosyasının hazırlanması gerekir.

Bir konfigürasyon dosyasında; ligand ve protein molekülün adı, proteinin aktif bölgesi üzerinde bağlanmanın gerçekleşeceği atomun kartezyen koordinatları ve bağlanmanın gerçekleşeceği atom merkez alınarak oluşturulan küpün boyutlarını tanımlayan parametreler yer alır. Proteinin aktif bölgesi ve bu bölge üzerindeki bağlanmanın gerçekleşeceği atomun koordinatları kullanılacak proteine göre farklılık gösterir. Ayrıca bağlanmanın gerçekleşeceği atom merkez alınarak oluşturulan küpün boyutları da proteinin aktif bölgesi ve kullanılacak ligand moleküllerinin boyutuna göre farklılık gösterir.

AutoDock Vina programı kullanılarak gerçekleştirilen rijid ve esnek doking hesaplamaları için hazırlanan örnek konfigürasyon dosyaları Şekil 2.5'de verilmiştir.

<pre>receptor = protein.pdbqt ligand = ligand.pdbqt  center_x = 34.176 center_y = 31.342 center_z = -14.785  size_x = 40 size_y = 40 size_z = 40</pre>	<pre>receptor = rigid.pdbqt flex = flex.pdbqt ligand = ligand.pdbqt  center_x = 34.176 center_y = 31.342 center_z = -14.785  size_x = 40 size_y = 40 size_z = 40</pre>
(a)	(b)

Şekil 2.5. (a) Rijid (b) Esnek doking hesaplamalarında kullanılan örnek konfigürasyon dosyaları

#### 2.2.4. Doking İşlemi

MAO izoenzimlerin yapısında bulunan FAD'ın N5 atomu merkezde olmak üzere x, y, z boyutları 40x40x40 Å olacak şekilde bir küp seçilerek bir grid oluşturulmuştur. Ligandların bu küp içerisinde enzime bağlanması sağlanmıştır. MAO-A izoenzimi için N5 atomunun x, y, z koordinatları 34.176; 31.342; -14.785 olarak, MAO-B izoenzimi için N5 atomunun x, y, z koordinatları ise 55.199; 150.457; 21.281 olarak belirlenmiştir. AutodockVina programı ile enzim ve ligandın pdbqt dosyaları açılarak doking işlemi yapılmıştır. Konfigirasyon dosyasının hazırlanmasının ardından da komut istemi çalıştırılmıştır. Hesaplama sonucunda ligandın enzime bağlanabileceği farklı konformasyonlar ve her birine ait bağlanma enerjileri elde edilmiştir. Her bileşik için doking hesaplaması 10 kez tekrarlanmıştır.

AutoDock Vina programının validasyonu, enzimin kristal yapısındaki inhibitörün enzime doklanması ile elde edilen konformasyonların, X-ray yapısından sapması (Root Mean Square Deviation, RMSD) incelenerek gerçekleştirilir. Bu amaçla önce kullanılan kristal yapıların inhibitörleri harmin ve 2-(2-benzofuranil)-2-imidazolin sırasıyla MAO-A ve MAO-B'ye dok edilmiştir. Dok pozisyonları kristal yapı pozisyonları ile üst üste karşılaştırılarak (Şekil 2.6) hata payının RMSD < 2 kriterini sağlayıp sağlamasına bakılmıştır (Trott ve Olson, 2010). RMSD değerlerinin hesabı için Discovery Studio 4.1 programı kullanılmıştır (Accelrys Software Inc., 2013). Bu doğrultuda RMSD değerleri harmin için 1.408, 2-(2-benzofuranil)-2-imidazolin için ise 1.598 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar bize kullanılan yöntemin doğru olduğunu gösterir.



**Şekil 2.6.** AutoDock Vina programının validasyonu için yapılan RMSD hesaplamalarında (a) Harmin (b) 2-(2-benzofuranil)-2-imidazolin inhibitörünün dok pozisyonları ile kristal yapı pozisyonlarının ile üst üste karşılaştırılmasıyla elde edilen görüntüler

### 2.2.5. Doking Sonuçlarının Görüntülenmesi

Doking işleminin ardından komut isteminin çalıştırılmasıyla program tarafından yapılan hesaplamalar sonucunda rijid dokingde ligandın enzime bağlanabileceği farklı konformasyonlar ile her birine ait bağlanma enerjilerini içeren pdbqt formatında out dosyası ve sadece bağlanma enerjilerini ve bu enerjilerin karşılaştırmasını içeren txt formatında bir log dosyası elde edilmiştir. Esnek dokingde ise bu iki dosyaya ilaveten doking işlemi sırasında, birbirinin komplementeri olan pdbqt formatında esnek seçilen amino asitlerin bulunduğu flexible.pdbqt dosyası ve esnek seçilen amino asitlerin dışında kalan diğer amino asitlerin bulunduğu rigid.pdbqt dosyaları oluşmuştur. Ayrıca esnek dokingde elde edilen out dosyası ligandın yanısıra esnek seçilen amino asitlerin de konformasyonlarını içermektedir. Bu şekilde elde edilen sonuçlar AutoDock Tools kullanılarak görüntüledikten sonra her bir ligand için en iyi bağlanan konformasyonlar seçilerek Discovery Studio görüntüleme yazılımı ile enzim-ligand etkileşimleri incelenmiştir (Accelrys Software Inc., 2013).

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada yeni sentezlenmiş ve antioksidan aktiviteleri ölçülmüş 37 adet kumarin türevi ile standart olarak kullanılan troloks bileşiğinden oluşan veri seti kullanılarak sağlamlığı geçerli istatistiksel kriterlerle ispatlanmış kantitatif yapı-aktivite ilişkisi modelleri geliştirilmiştir. Aynı kumarin türevlerinin MAO enzimleri ile etkileşimleri doking metoduyla incelenerek seçicilik ve etkinliklerini araştırılmıştır. Her iki çalışmadan elde edilen sonuçlar karşılaştırıp değerlendirerek, çift-etki gösterme potansiyeli olan bileşikler belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak yeni kumarin türevleri tasarlanmıştır. Oluşturulan KYAİ modelleri kullanılarak tasarlanan bileşiklerin antioksidan aktiviteleri tahmin edilmiş ve doking metoduyla MAO inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir.

#### 3.1. KYAİ Modelleri

FRAP yöntemi kullanılarak yapılan antioksidan aktivite ölçüm sonuçlarına göre; veri setinde yer alan bitişik benzen halkalı 3-aril kumarin türevleri ile kumarin iskeletinden türeyen bileşiklerin referans olarak alınan troloks bileşiğinden daha düşük antioksidan aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Bununla birlikte veri setindeki 3-aril kumarin türevlerinin yaklaşık olarak %60'ının, 4-aril kumarin türevlerinin ise yaklaşık olarak %85'inin referans olarak alınan troloks bileşiğinden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür. Bu bileşiklerden 3- aril kumarin türevi olan 13 numaralı bileşik [3-(4-nitrofenil)-7,8-dihidroksikumarin] en yüksek antioksidan aktivite gösteren bileşiktir. Bu bileşik fonksiyonel grup olarak C ile simgelenen kumarin halkasında orto pozisyonunda bulunan –OH gruplarına ve A ile simgelenen benzen halkasında bulunan –NO<sub>2</sub> grubuna sahiptir. Veri setinde A halkasında fonksiyonel grup olarak –NO<sub>2</sub> grubu bulunduran tek bileşik 13 numaralı bileşiktir. Dolayısıyla da bu durum A halkasında aynı pozisyonunda –NO<sub>2</sub> grubu bulunduran bir bileşiğin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Deneysel çalışmaları yapılan kumarin türevlerinin bu bulgular doğrultusunda yapısal karakteristikleri göz önüne alınarak, antioksidan aktivitelerine bağlı yapı-aktivite ilişkilerini tanımlayan KYAİ modelleri geliştirilmiştir. Veri setini oluşturan bileşiklerin iki boyutlu yapıları Şekil 2.3'te, kimyasal yapıları ve deneysel olarak ölçülen biyolojik aktivite değerleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Veri setindeki bileşiklerin kimyasal yapıları ve deneysel olarak ölçülen biyolojik aktivite değerleri

Troloks								Antioksidan aktivitesi (Log(TEAC)) (Mm) = 0
3-Aril kumarin türevleri								
Bileşik No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	Antioksidan aktivitesi (Log(TEAC)) (mM)
1	-H	-OH	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	0.355*
2	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OAc <sup>Δ</sup>	-OAc	-H	-0.778
3	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH	-OH	-H	0.287*
4	-H	-OAc	-OAc	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-0.360
5	-H	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	0.525*
6	-H	-OAc	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-0.787
10	-OH	-OH	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	0.325*
11	-OAc	-OAc	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-0.486
12	-OH	-OH	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	0.313*
13	-OH	-OH	-H	-H	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	0.557*
14	-OH	-OH	-H	-H	-H	-H	-H	0.358*
16	-OH	-OH	-H	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	0.303*
23	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H	0.435*
24	-H	-OH	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	0.085*
25	-H	-OH	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	0.334*
26	-H	-OAc	-H	-OAc	-OAc	-OAc	-H	-0.664
27	-H	-OAc	-OAc	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-0.486
28	-H	-OAc	-H	-OAc	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-0.796
29	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-H	0.351*

\* Troloksa göre antioksidan aktivitesi yüksek olan bileşikler, <sup>Δ</sup>Ac= CH<sub>3</sub>CO



Tablo 3.1.'in devamı

4-Aril kumarin türevleri								
Bileşik No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	Antioksidan aktivitesi (Log(TEAC)) (mM)
7	-OH	-OH	-H	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	0.261*
8	-H	-OH	-OH	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	0.377*
9	-OH	-OH	-H	-H	-H	-OH	-OH	0.425*
18	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	0.085*
21	-H	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH	0.468*
22	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-1.574
Kumarin iskeletinden türeyen bileşikler								
Bileşik No	R <sub>1</sub>		R <sub>2</sub>		R <sub>3</sub>		Antioksidan aktivitesi (Log(TEAC)) (Mm)	
15	-N=N-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>		-OH		-H		-0.778	
17	-H		-H		-OH		-1.331	
19	-NH <sub>2</sub>		-OH		-H		-0.972	
20	-H		-OH		-H		-1.778	
Bitişik benzen halkalı 3-aril kumarin türevleri								
(a)				(b)				
Bileşik No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Antioksidan aktivitesi (Log(TEAC)) (Mm)	Bileşik No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Antioksidan aktivitesi (Log(TEAC)) (Mm)	
30	-OAc <sup>Δ</sup>	-OAc	-0.854	33	-OAc	-OAc	-0.853	
31	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-1.154	34	-H	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-2.000	
32	-H	-OCH <sub>3</sub>	-1.000	36	-H	-OCH <sub>3</sub>	-1.000	
35	-H	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-2.000	37	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-1.097	

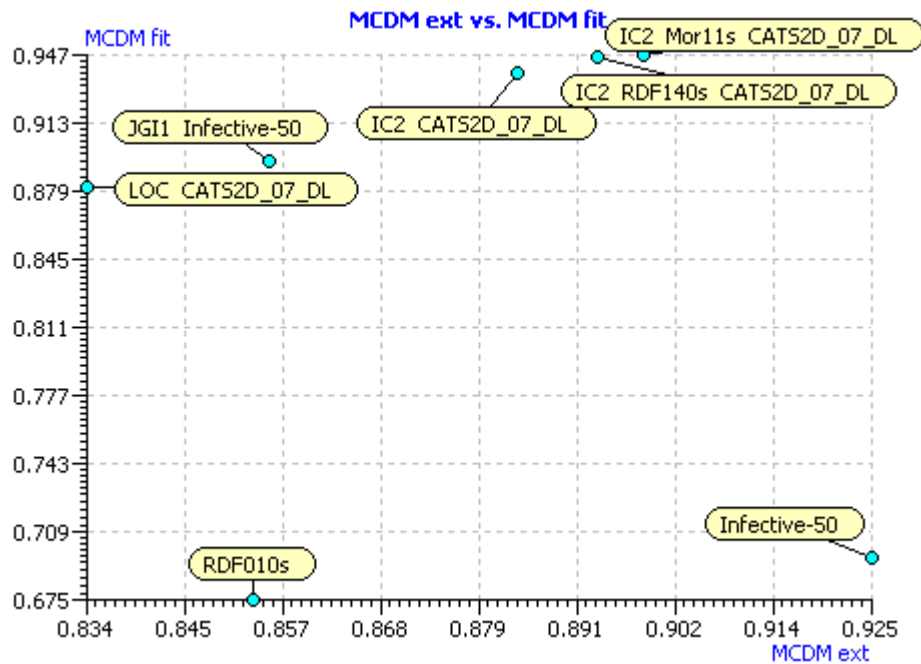
\* Troloksa göre antioksidan aktivitesi yüksek olan bileşikler, <sup>Δ</sup>Ac= CH<sub>3</sub>CO

37 adet kumarin türevi ve standart olarak kullanılan troloks bileşiği olmak üzere toplam 38 bileşikten oluşan bir veri seti kullanılarak yapılan model arama çalışmaları, geçerli ve güvenilir KYAİ modelleri bulmak amacıyla birbirinden farklı eğitim-test set ayrımları yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda yapılan denemeler sonucunda bulunan en iyi modeller Tablo 3.2’ de verilen eğitim-test ayrımlarıyla elde edilmiştir.

**Tablo 3.2.** Eğitim ve test seti oluşturan bileşiklerin numaraları

Test Set	Eğitim Seti
5, 8, 12, 17, 21, 24, 34, 38	1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37

Modeller QSARINS 2.2.1 yazılımındaki “All Subsets and Genetic Algorithm” seçenekleri kullanılarak oluşturulmuştur. Moleküler yapının farklı yönlerini yansıtan 1, 2 ve 3 tanımlayıcı MLR modelleri elde edilmiştir. Elde edilen modellerde SPARTAN tanımlayıcılarına rastlanmamıştır. Modellerde sadece DRAGON tanımlayıcıları gözlenmiştir. Dolayısıyla da DRAGON tanımlayıcıları SPARTAN tanımlayıcılarını ortmüştür. Geliştirilen modeller iç ve dış validasyon kriterleri ve bu kriterlerle ilişkili olan MCDM (Çok Kriterli Karar Verme) grafikleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1.). Bu doğrultuda elde edilen en iyi 1, 2 ve 3 tanımlayıcı modeller bu modellere ilişkin iç ve dış validasyon parametreleri ile birlikte Tablo 3.3 ve Tablo 3.4’de verilmiştir.



**Şekil 3.1.** Elde edilen modellerin MCDM grafiği

**Tablo 3.3.** 1-3 tanımlayıcı modellerin uygunluk ve iç validasyon parametreleri

Model No	Tanımlayıcı Sayısı	Tanımlayıcılar	$R^2$	$R^2_{adj}$	$RMSE_{tr}$	$CCC_{tr}$	$F$	$Q^2_{LOO}$	$RMSE_{cv}$	$CCC_{tr}$	$Q^2_{LMO}$	$R^2 Y_{scr}$	$Q^2 Y_{scr}$
1	3	IC2 Mor11s CATS2D_07_DL	0.935	0.928	0.196	0.967	124.926	0.915	0.223	0.967	0.908	0.106	-0.197
2	3	IC2 RDF140s CATS2D_07_DL	0.934	0.927	0.197	0.966	123.359	0.914	0.225	0.965	0.908	0.103	-0.204
<b>3</b>	<b>2</b>	<b>IC2 CATS2D_07_DL</b>	<b>0.924</b>	<b>0.918</b>	<b>0.213</b>	<b>0.960</b>	<b>162.924</b>	<b>0.906</b>	<b>0.236</b>	<b>0.960</b>	<b>0.901</b>	<b>0.069</b>	<b>-0.155</b>
4	2	JGI1 Infective-50	0.870	0.860	0.277	0.930	90.230	0.837	0.310	0.930	0.830	0.068	-0.154
5	2	LOC CATS2D_07_DL	0.854	0.843	0.294	0.921	78.963	0.818	0.328	0.895	0.808	0.068	-0.153
6	1	Infective-50	0.635	0.622	0.464	0.777	48.763	0.585	0.495	0.777	0.575	0.034	-0.109
7	1	RDF010s	0.612	0.598	0.479	0.759	44.101	0.557	0.511	0.759	0.541	0.036	-0.109

**Tablo 3.4.** 1-3 tanımlayıcı modellerin dış validasyon parametreleri

Model No	Tanımlayıcılar	$R^2_{test}$	$RMSE_{test}$	$Q^2_{F1}$	$Q^2_{F2}$	$Q^2_{F3}$	$CCC_{test}$	$r^2_m$ av.	$\Delta r^2_m$	$k'$	$k$	$\frac{R^2 - R^2_{0^2}}{R^2}$	$\frac{R^2_{-0^2}}{R^2}$
1	IC2 Mor11s CATS2D_07_DL	0.903	0.239	0.903	0.890	0.903	0.948	0.842	0.021	0.980	0.922	0.004	0.007
2	IC2 RDF140s CATS2D_07_DL	0.944	0.243	0.944	0.936	0.944	0.968	0.867	0.013	0.938	1.003	0.006	0.008
<b>3</b>	<b>IC2 CATS2D_07_DL</b>	<b>0.887</b>	<b>0.255</b>	<b>0.889</b>	<b>0.875</b>	<b>0.890</b>	<b>0.939</b>	<b>0.817</b>	<b>0.023</b>	<b>0.940</b>	<b>0.943</b>	<b>0.005</b>	<b>0.010</b>
4	JGI1 Infective-50	0.876	0.287	0.859	0.841	0.860	0.928	0.776	0.025	0.990	0.877	0.011	0.019
5	LOC CATS2D_07_DL	0.880	0.309	0.889	0.875	0.890	0.935	0.810	0.034	0.916	0.965	0.011	0.004
6	Infective-50	0.945	0.199	0.932	0.924	0.933	0.955	0.866	0.018	0.826	1.142	0.009	0.006
7	RDF010s	0.865	0.289	0.857	0.839	0.858	0.926	0.836	0.029	1.008	0.864	0.000	0.003

Uygunluk, iç ve dış validasyon parametreleri doğrultusunda elde edilen 2 ve 3 tanımlayıcı modellerin (1-5 arası modeller) tümü kabul edilebilir istatistiksel kalitededir. MCDM grafiği, validasyon parametreleri ve tasarlanan bileşiklerle yapılan biyolojik aktivite tahmini çalışmalarından yola çıkılarak güvenilir, geçerli ve tahmin gücü en yüksek model olarak iki tanımlayıcı bir model olan “model 3” seçilmiştir. Ayrıca Model 2’deki üçüncü tanımlayıcı olan RDF140s tanımlayıcısının istatistiksel parametrelerde önemli bir iyileşme sağlamadığı görüldüğünden daha az tanımlayıcı içeren Model 3 tercih edilmiştir.

Model 3’e ait matematiksel denklem ve istatistiksel değerler Denklem 3.1’de verilmiştir.

$$\text{Log (AA}_{\text{TEAC}} \text{ (mM))} = 6.401 (\pm 0.583) + 0.381 (\pm 0.024) \text{CATS2D\_07\_DL} \quad (3.1) \\ + 1.384 (\pm 0.150) \text{IC2}$$

$$n_{tr} = 30, R^2_{adj} = 0.924, RMSE_{tr} = 0.213, F = 162.924, CCC_{tr} = 0.960$$

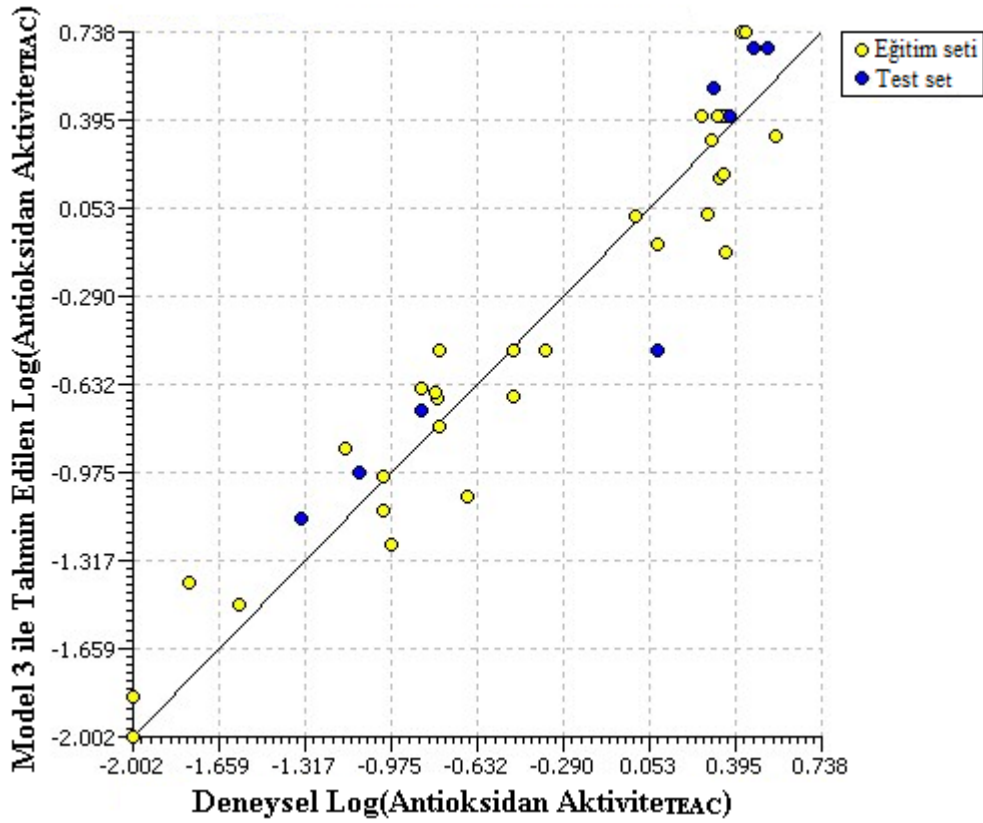
$$n_{test} = 8, R^2_{test} = 0.887, RMSE_{test} = 0.255, Q^2_{F1} = 0.889, Q^2_{F2} = 0.875, Q^2_{F3} = 0.878,$$

$$CCC_{test} = 0.939$$

Model 3 de yer alan moleküler tanımlayıcılar IC2 ve CATS2D\_07\_DL dir. Bu iki tanımlayıcı arasında dikkate değer bir korelasyon bulunmamaktadır ( $R=0.041$ ). Modelin  $R^2_{test}$  değeri 0.887,  $RMSE_{test}$  değeri 0.255 olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan  $R^2_{test}$  değerinin yüksek,  $RMSE_{test}$  değerinin düşük olması modelin tahmin gücünün yüksek olduğunu gösterir. İki önemli iç validasyon parametresi olan,  $Q^2_{LOO}$  ve  $Q^2_{LMO}$  değerleri sırasıyla 0.906 ve 0.901 dir. Bu iki validasyon parametresinin değerlerinin birbirine yakın, yüksek ve  $R^2_{adj}$  değeri (0.924) ile kıyaslanabilir olması modelin stabil olduğunu gösterir. Model 3’ün  $r^2_m$  değeri (0.817) Ojha ve arkadaşları tarafından tanımlanan  $r^2_m$  eşik değerinden (0.5) çok daha yüksek bulunmuştur (Ojha ve ark., 2011). Bu durum model 3’ün kabul edilebilir bir model olduğunu gösterir. Model 3’ün  $CCC_{test}$  değeri (0.939) yüksek,  $r^2_m$  (0.817) ve  $r^2_0$  (0.876) değerleri de birbirine yakın bulunmuştur. Bu nedenle model 3 yüksek tahmin gücüne sahiptir. Ayrıca dışsal korelasyon katsayıları olan  $Q^2_{F1}$  (0.889) ve  $Q^2_{F2}$  (0.875) için hesaplanan değerlerin birbirine yakın ve yeterli istatistiksel kaliteye sahip olması, KYAİ modeli geliştirmek için seçilen test setin biyolojik aktivite değerlerinin eğitim setinin biyolojik aktivite değerleri ile benzer

dağılıma sahip olduğunu gösterir. Buna ilaveten modelin  $Q^2_{F3}$  (0.890) değeri de yeterli istatistiksel kaliteye sahiptir. Dolayısıyla model için hesaplanan bütün kriterlerin kabul edilebilir değerlere sahip olması, modelin yüksek dış tahmin potansiyelinin yanı sıra yüksek iç tahmin gücüne ve istatistiksel güvenilirliğe sahip olduğunu gösterir.

Model 3 aracılığıyla tahmin edilen antioksidan aktivite değerleri ile ölçülen antioksidan aktivite değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafik Şekil 3.2’de verilmiştir. Çalışılan kumarin türevleri grafik üzerinde optimal çizgi boyunca dağılmışlardır. Veri setinin bu dağılımı tahmin edilen antioksidan aktivite değerleri ile deneysel olarak ölçülen antioksidan aktivite değerlerinin birbiriyle oldukça uyumlu olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.2. Model 3 aracılığıyla ait tahmin edilen Log(antioksidan aktivite) değerlerine karşı gözlenen Log(antioksidan aktivite) değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafik

Geliştirilen en iyi 1, 2 ve 3 tanımlayıcı modellerde yer alan ve antioksidan aktivitenin modellenmesinde önemli bir rolü olan DRAGON tanımlayıcıları ve bu tanımlayıcıların anlamları Tablo 3.5’de verilmiştir

**Tablo 3.5.** Geliştirilen KYAİ modellerinde yer alan tanımlayıcılar

Sembol	Sınıf	Tanım
IC2	Bilgi İndeksi	Bilgi İçerik İndeksi (2.dereceden komşuluk simetrisi)
Mor11s	3D-MorSE tanımlayıcıları	11.sinyalin iyonik duruma bağlı olarak ağırlıklandırılmış değeri
CATS2D_07_DL	CATS 2D	Donör ve lipofilik gruplar arasındaki topolojik mesafeleri tanımlayan indeks
RDF140s	RDF tanımlayıcıları	İyonik duruma bağlı olarak ağırlıklandırılmış radyal dağılım fonksiyonu
JGI1	2D otokorelasyonlar	1.dereceden ortalama topolojik yük indeksi
Infective-50	İlaç-benzeri İndisler	Ghose-Viswanadhan-Wendoloski %50 oranında anti-infektif ilaç benzeri indeks
LOC	Topolojik İndisler	Lopping merkezi indeksi
RDF010s	RDF tanımlayıcıları	İyonik duruma bağlı olarak ağırlıklandırılmış radyal dağılım fonksiyonu

### 3.1.1.Tanımlayıcıların Rolü

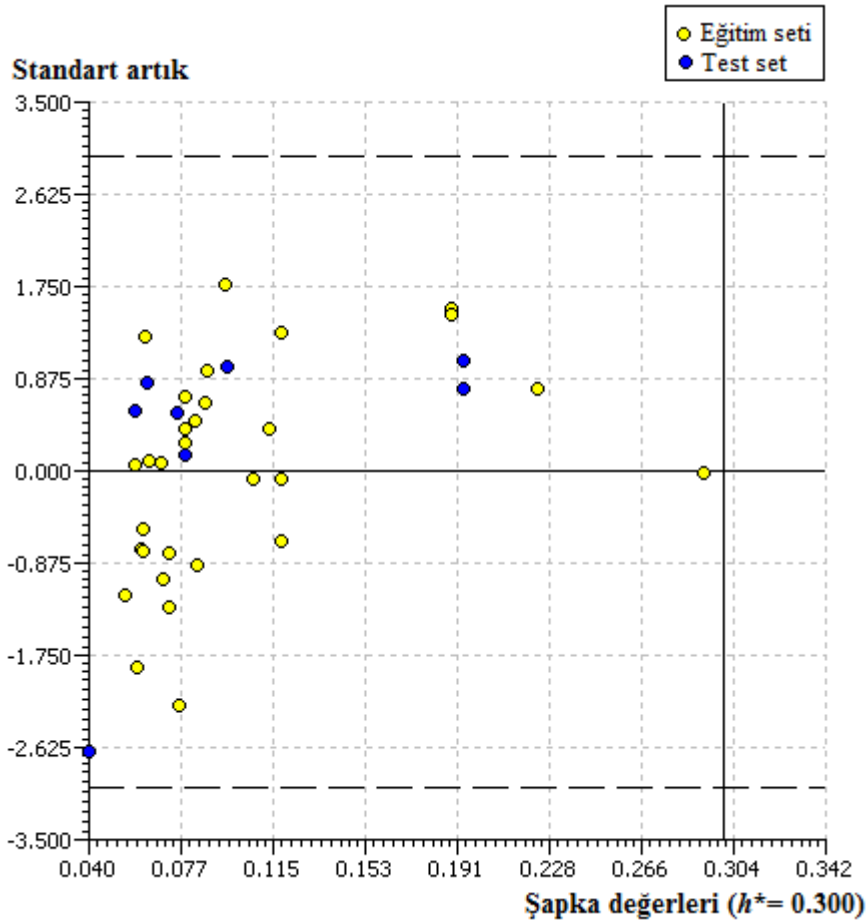
En iyi MLR modeli olarak seçilen 3 numaralı modelde yer alan tanımlayıcılar IC2 ve CATS2D\_07\_DL'dir. Bu tanımlayıcılar model için verilen matematiksel denklemdeki (Eşitlik 3.1) katsayılarına bağlı olarak biyolojik aktiviteye pozitif yönde katkı yapmaktadırlar. Dolayısıyla da söz konusu tanımlayıcıların değeri arttıkça hesaplanan biyolojik aktivite değeri de artar. Bu tanımlayıcılardan IC2 [Information Content index (neighborhood symmetry of 2-order)] bilgi indeksi tanımlayıcı sınıfında, CATS2D\_07\_DL (CATS2D Donor-Lipophilic at lag 07) ise CATS2D (Chemically Advanced Template Search 2D) tanımlayıcı sınıfında yer alır. CATS2D\_07\_DL tanımlayıcısında yer alan DL ifadesindeki D hidrojen bağı verici grupları, L ise lipofilik grupları ifade eder. CATS tanımlayıcıları, farmakafor noktalarındaki herhangi iki atom çifti arasındaki topolojik mesafe dikkate alınarak hesaplanır. Belirtilen farmakafor noktaları CATS2D\_07\_DL tanımlayıcısı aracılığıyla yansıtılan hidrojen bağı vericileri ve lipofilik atomlardır. Kumarin türevlerindeki farmakaforlar çoğunlukla -OH gruplarıdır ve bu gruplar hidrojen bağı vericisi olarak etki ederler. Dolayısıyla da kumarin türevlerindeki farmakafor gruplarının pozisyonları ve sayıları büyük ihtimalle antioksidan aktiviteyi etkilemektedir.

Model 3'te yer alan tanımlayıcılara literatürde yapılan KYAİ çalışmaları kapsamında geliştirilen modellerde de rastlanmıştır. Nitro-poliaromatik hidrokarbonların

mutajenesinin modellenmesi amacıyla yapılan KYAİ çalışmalarında bilgi içerik indeksi tanımlayıcısına rastlanmıştır (Chirico ve Gramatica, 2011). CATS tanımlayıcılarına ise fulleren türevlerinin anti-viral aktivitesinin ve yeni kalp T türü  $Ca^{2+}$  kanalını bloke edici ajanların  $IC_{50}$  değerlerinin tahmin edilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda rastlanmıştır (Schneider ve ark., 1999, Ahmed ve ark., 2013). Her iki çalışmada da CATS tanımlayıcısının biyolojik aktiviteye pozitif yönde katkıda bulunması bu çalışmada elde edilen bulgularla örtüşmektedir.

### 3.1.2. Modelin Uygulama Alanının Tanımlanması

En iyi MLR modeli olarak seçilen Model 3'ün uygulama alanı Williams grafiği kullanılarak belirlenmiştir. Model 3 için QSARINS yazılımı aracılığıyla çizilen Williams grafiği Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Model 3 için çizilen Williams Grafiği

Veri setindeki bütün bileşiklerin şapka değeri, kritik şapka değerinden ( $h^* = 0.300$ ) daha düşük bulunmuştur. Bu nedenle veri setinde yapısal aykırı değere rastlanmamıştır. Ayrıca veri setindeki bileşiklerin hiçbiri limit değer olarak alınan  $\pm 3$  standart sapma aralığının dışına çıkmamıştır. Bundan dolayı veri setinde yanıt-aykırı değere de rastlanmamıştır. Dolayısıyla veri setindeki tüm bileşiklerin antioksidan aktiviteleri Model 3 yardımıyla güvenilir bir şekilde tahmin edilmiştir.

Kumarin türevleri ve standart olarak kullanılan trolokstan oluşan veri seti için geliştirilmiş model 3'ün uygulama alanını gösteren, bağımlı ve bağımsız değişkenlere ait en düşük ve en yüksek değer aralıkları Tablo 3.6'da verilmiştir.

**Tablo 3.6.** Model 3'e ait değişkenlerin minimum ve maksimum sınırları

Parametre	Veri Seti	
	Minimum Değer	Maksimum Değer
Tahmin edilen Log(Antioksidan Aktivite)	-2.002	0.738
Tanımlayıcı	IC2	3.179
	CATS2D_07_DL	0
		4.255
		5

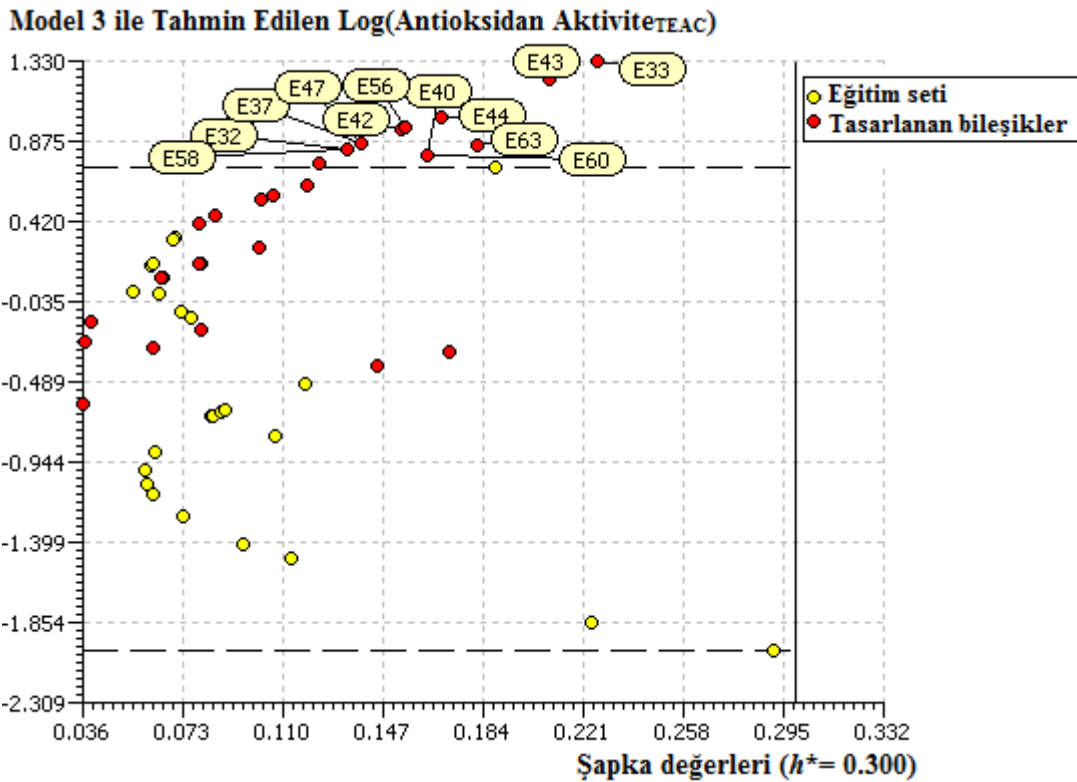
### 3.1.3. Tasarlanan Bileşiklerin Antioksidan Aktivitelerinin Tahmin Edilmesi

Kumarin türevlerinin antioksidan aktivitesi, kumarin halkasına bağlı grupların türü ve pozisyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu durum dikkate alınarak hidroksi, asetoksi, metoksi, nitro ve metil gibi çeşitli fonksiyonel gruplar kumarin iskeleti üzerinde farklı pozisyonlarda yerleştirilerek yeni kumarin türevleri tasarlanmıştır. Tasarlanan bileşiklerden 14 tanesi 3-aril kumarin türevi, 11 tanesi 4-aril kumarin türevi ve 6 tanesi de bitişik benzen halkalı 3-aril kumarin türevidir. Tasarlanan bileşiklerin iki boyutlu yapıları Şekil 2.3'te, kimyasal yapıları ve tahmin edilen antioksidan aktiviteleri Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tasarlanan bileşiklerin antioksidan aktivitesi model 3'e ait matematiksel denklem kullanılarak tahmin edilmiştir. Tasarlanan bileşikler için model 3 yardımıyla belirlenen, uygulama alanını gösteren ve QSARINS programı aracılığıyla elde edilen İnsubria grafiği Şekil 3.4'te verilmiştir. Bu grafiğe göre yeni tasarlanan tüm bileşiklerin şapka değeri, kritik şapka değerinin ( $h^* = 0.300$ ) altında kalmıştır. Bu bulgu tasarlanan tüm bileşiklerin model 3'ün yapısal alanı içinde kaldığını gösterir.



12 bileşiğin tahmin edilen antioksidan aktivitesi, veri seti için deneysel olarak ölçülen en yüksek antioksidan aktivite değerinden (0.738) daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte söz konusu bileşiklerin şapka değerleri kritik şapka değerinden daha düşük olduğu için bu bileşikler model 3'ün yapısal alanı içinde kalmaktadır. Antioksidan aktiviteleri tahmin edilen diğer 19 bileşik hem kritik şapka değerinden daha düşük şapka değerine sahip oldukları için hem de deneysel olarak ölçülen en yüksek antioksidan aktivite değerinden daha düşük antioksidan aktivite değerine sahip oldukları için model 3'ün uygulama alanı içinde kalmaktadır. Model 3'ün uygulama alanı içinde kalan bu bileşiklerden 12 tanesinin tahmin edilen antioksidan aktivitesi referans olarak alınan troloksun deneysel antioksidan aktivite değerinden daha yüksek bulunurken, 7 tanesinin antioksidan aktivitesi troloksun deneysel antioksidan aktivite değerinden daha düşük bulunmuştur. Dolayısıyla da hem model 3'ün uygulama alanı içinde kalan hem de tahmin edilen antioksidan aktivitesi troloksun daha yüksek olan 12 bileşik gelecekte yapılacak çalışmalar için umut vaat etmektedir. Bu bileşikler; E-34, E-35, E-36, E-38, E-39, E-41, E-45, E-46, E-48, E-57, E-59 ve E-64'tür.



**Şekil 3.4.** Kumarin türevlerinin antioksidan aktivitesinin tahmini için kullanılan model 3'ün uygulama alanı analizini gösteren grafik.

**Tablo 3.7.** Yeni tasarlanan bileşiklerin kimyasal yapıları ve model 3 ile tahmin edilen antioksidan aktiviteleri

(a) 3-Aril kumarin türevleri

3-Aril kumarin türevleri									Antioksidan
Bileşik No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	Aktivitesi (Log(TEAC)) (mM)
E-32	-H	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H	0.836
E-33	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H	1.329
E-34	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H	0.455*
E-35	-H	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	0.755*
E-36	-H	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	0.576*
E-37	-H	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-NO <sub>2</sub>	-H	0.871
E-38	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	0.576*
E-39	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	0.281*
E-40	-H	-OH	-OH	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-OAc <sup>△</sup>	-H	0.798
E-56	-OH	-OH	-H	-H	-H	-OH	-NO <sub>2</sub>	-H	0.957
E-57	-H	-OH	-OH	-H	-H	-OAc	-OAc	-H	0.634*
E-60	-H	-OH	-OH	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-NO <sub>2</sub>	-H	0.798
E-62	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-0.606
E-63	-H	-OH	-OH	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	0.855

\* Uygulama Alanı içinde kalan ve tahmin edilen antioksidan aktivitesi trolokstan büyük olan bileşikler  
<sup>△</sup>Ac= CH<sub>3</sub>CO

## (b) 4-Aril kumarin türevleri

4-Aril kumarin türevleri								Antioksidan
Bileşik No	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	Aktivitesi (Log(TEAC)) (mM)
E-41	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH	-OH	-H	0.186*
E-42	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH	-H	-OH	0.947
E-43	-OH	-OH	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-OH	-H	1.233
E-44	-OH	-H	-OH	-H	-CH <sub>3</sub>	-OH	-H	1.019
E-45	-H	-OH	-OH	-H	-OH	-NO <sub>2</sub>	-H	0.108*
E-46	-OH	-H	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	0.182*
E-47	-OH	-H	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	0.870
E-48	-H	-OH	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	0.414*
E-58	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-OH	-OH	0.836
E-59	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-CH <sub>3</sub>	-H	0.555*
E-64	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-OH	-OH	-H	0.104*

\* Uygulama Alanı içinde kalan ve tahmin edilen antioksidan aktivitesi trolokstan büyük olan bileşikler

## (c) Bitişik benzen halkalı 3-hidroksi kumarin türevleri

Bitişik benzen halkalı 3-hidroksi kumarin türevleri							
(a)				(b)			
Bileşik No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Antioksidan Aktivitesi (Log(TEAC)) (mM)	Bileşik No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Antioksidan Aktivitesi (Log(TEAC)) (mM)
E-65	-OAc <sup>Δ</sup>	-OCH <sub>3</sub>	-0.310	E-68	-OAc <sup>Δ</sup>	-OCH <sub>3</sub>	-0.398
E-66	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-0.188	E-69	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-0.288
E-67	-OH	-OH	-0.143	E-70	-OH	-OH	-0.251

<sup>Δ</sup>Ac= CH<sub>3</sub>CO

## 3.2. Moleküler Doking Çalışmaları

37 adet kumarin türevinden oluşan veri setinin MAO izoenzimleri ile etkileşimleri rijid ve esnek doking metodlarıyla incelenerek söz konusu kumarin türevlerinin MAO inhibisyon aktiviteleri ve seçicilikleri araştırılmıştır.

### 3.2.1. Rijid Doking Sonuçları

MAO-A ve MAO-B enzimleri ile yapılan rijid doking hesaplamaları her bileşik için 10 kez tekrarlanmıştır. Hesaplamalar sonucunda bileşiklerin enzim içindeki yönelimlerini gösteren farklı konformasyonlar ve bu konformasyonlara ait bağlanma enerjileri elde edilmiştir. Enzime en yüksek afinite (en düşük serbest bağlanma enerjisi;  $\Delta G$ ) ile bağlanan konformasyonların bağlanma enerjileri dikkate alınarak hazırlanan rijid doking sonuçları Tablo 3.8'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; 37 adet kumarin türevinden 19 tanesi MAO-A'nın aktif bölgesine, 35 tanesi ise MAO-B'nin aktif bölgesine bağlanmıştır. Dolayısıyla MAO-A enzimine kıyasla MAO-B enzimi ile daha fazla sayıda kumarin etkileşmiştir. 3-aril kumarin türevi olan 24 ve 26 numaralı bileşikler ise her iki izoenzimin de aktif bölgesine bağlanamamıştır.

Doking hesaplamaları sonucunda, kumarin türevlerinin birçoğunun izoenzimlere kristal yapıdaki inhibitörlerden (MAO-A'da harmin  $\Delta G = -8.8$  kcal/mol; MAO-B'de 2-(2-benzofuranil)-2-imidazolin  $\Delta G = -8.7$  kcal/mol) daha güçlü etkileşimlerle bağlandığı görülmüştür. Kumarin türevleri için hesaplanan serbest bağlanma afiniteleri ( $\Delta G$ ); MAO-A'da -5.8 ile -9.4 kcal/mol aralığında, MAO-B'de ise -7.3 ile -12.4 kcal/mol aralığında değişmektedir. MAO-A ve MAO-B izoenzimleri için elde edilen  $\Delta G$  değerlerinden yola çıkılarak hesaplanan  $K_i$  değerlerini birbirine oranlamak suretiyle her bir bileşik için seçicilik indeksi (SI) hesaplanmıştır (Tablo 3.8). Bu sonuçlara göre 6 bileşik (14, 15, 16, 19, 20 ve 29 numaralı bileşikler) MAO-A'ya; 29 bileşik (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, 22, 23, 25, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 ve 37 numaralı bileşikler) ise MAO-B'ye daha yüksek afinite ile bağlanmıştır.

**Tablo 3.8.** MAO-A ve MAO-B izoenzimlerinin kristal yapı rijid doking sonucu bağlanma enerjisi ( $\Delta G$ ), inhibisyon sabiti ( $K_i$ ) ve SI değerleri

Bileşik	MAO-A		MAO-B		SI $K_{iMAO-A} \setminus K_{iMAO-B}$
	$\Delta G$ (kcal/mol)	$K_i$ ( $\mu M$ )	$\Delta G$ (kcal/mol)	$K_i$ ( $\mu M$ )	
1	-5.8	55.993	-9.0	0.252	222.194
2	-	-	-9.2	0.180	-
3	-6.8	10.352	-8.6	0.496	20.870
4	-	-	-8.0	1.366	-
5	-7.9	1.617	-8.7	0.419	3.859
6	-	-	-8.1	1.154	-
7	-	-	-7.8	1.914	-
8	-	-	-7.8	1.914	-
9	-7.9	1.617	-8.2	0.974	1.660
10	-7.4	3.760	-9.1	0.213	17.652
11	-	-	-9.5	0.108	-
12	-8.7	0.419	-8.9	0.299	1.401
13	-8.5	0.587	-9.1	0.213	2.756
14	-9.4	0.128	-8.7	0.419	0.305
15	-9.2	0.180	-8.8	0.354	0.508
16	-9.4	0.128	-8.8	0.354	0.362
17	-7.7	2.266	-7.9	1.617	1.401
18	-7.8	1.914	-8.1	1.154	1.659
19	-8.3	0.823	-7.8	1.914	0.430
20	-8.0	1.366	-7.8	1.914	0.714
21	-7.5	3.176	-7.8	1.914	1.659
22	-	-	-9.1	0.213	-
23	-8.4	0.695	-8.7	0.419	1.658
24	-	-	-	-	-
25	-	-	-7.9	1.617	-
26	-	-	-	-	-
27	-	-	-7.3	4.452	-
28	-	-	-8.0	1.354	-
29	-8.2	0.974	-7.8	1.914	0.509
30	-	-	-11.6	0.0031	-
31	-	-	-11.5	0.0037	-
32	-7.6	2.682	-11.5	0.0037	724.865
33	-	-	-10.3	0.0279	-
34	-	-	-11.6	0.0031	-
35	-	-	-12.4	0.0008	-
36	-8.3	0.823	-10.4	0.0235	35.021
37	-	-	-10.3	0.0279	-

$$K_i = \exp((\Delta G * 1000) / (Rcal * TK))$$

### 3.2.2. Esnek Doking Sonuçları

MAO-A ve MAO-B enzimleri ile yapılan esnek doking hesaplamaları her bileşik için 10 kez tekrarlanmıştır. Enzime en yüksek afinite (en düşük serbest bağlanma enerjisi;  $\Delta G$ ) ile bağlanan konformasyonların bağlanma enerjileri dikkate alınarak hazırlanan esnek doking sonuçları Tablo 3.9' da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; 37 adet kumarin türevinden 30 tanesi MAO-A enziminin aktif bölgesine bağlanmıştır. MAO-B enziminde ise veri setindeki bileşiklerin tamamı aktif bölgeye bağlanmıştır. Dolayısıyla rijid doking sonuçlarına paralel olarak esnek dokingde de MAO-A enzime kıyasla MAO-B enzimi ile daha fazla sayıda kumarin etkileşmiştir.

Doking hesaplamaları sonucunda, kumarin türevlerinin birçoğunun izoenzimlere kristal yapıdaki inhibitörlerden (MAO-A'da harmin  $\Delta G = -12.3$  kcal/mol; MAO-B'de 2-(2-benzofuranil)-2-imidazolin  $\Delta G = -10.8$  kcal/mol) daha güçlü etkileşimlerle bağlandığı görülmüştür. Kumarin türevleri için hesaplanan serbest bağlanma afiniteleri ( $\Delta G$ ); MAO-A'da -5.0 ile -12.1 kcal/mol aralığında, MAO-B de ise -8.0 ile -13.7 aralığında değişmektedir. Elde edilen sonuçlara göre 20 bileşiğin (1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 23, 24, 25, 29 ve 36 numaralı bileşikler) MAO-A enzime; 16 bileşiğin (2, 4, 6, 11, 17, 20, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ve 37 numaralı bileşikler) ise MAO-B enzime daha yüksek afinite ile bağlandığı görülmüştür.

### 3.2.3. Rijid ve Esnek Doking Sonuçlarının Karşılaştırılması

Rijid ve esnek doking çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, esnek doking ile elde edilen bağlanma enerjisi değerlerinin rijid doking ile elde edilen bağlanma enerjisi değerlerinden çoğunlukla daha düşük çıktığı görülmüştür. Dolayısıyla da, beklenildiği gibi esnek doking sonucunda bağlanma enerjisi değerlerinde iyileşme meydana gelmiştir. Ayrıca rijid dokingde MAO izozimlerinin aktif bölgesine bağlanmayan bazı bileşiklerin esnek doking sonucunda izozimlerinin aktif bölgesine bağlandığı görülmüştür. Örneğin MAO-A'da 6, 7, 8, 11, 22, 24 ve 25 numaralı bileşikler, MAO-B de ise 24 ve 26 numaralı bileşikler esnek doking sonucunda enzimin aktif bölgesine bağlanmışlardır.

**Tablo 3.9.** MAO-A ve MAO-B izoenzimlerinin kristal yapı esnek doking sonucu bağlanma enerjisi ( $\Delta G$ ), inhibisyon sabiti ( $K_i$ ) ve SI değerleri

Bileşik	MAO-A		MAO-B		SI $K_{iMAO-A} \setminus K_{iMAO-B}$
	$\Delta G$ (kcal/mol)	$K_i$ ( $\mu M$ )	$\Delta G$ (kcal/mol)	$K_i$ ( $\mu M$ )	
1	-10.3	0.028	-8.9	0.299	0.094
2	-	-	-10.5	0.020	-
3	-10.0	0.047	-9.0	0.252	0.186
4	-	-	-10.4	0.023	-
5	-11.1	0.007	-8.5	0.587	0.012
6	-9.0	0.252	-9.5	0.108	2.333
7	-10.3	0.028	-9.5	0.108	0.259
8	-9.9	0.055	-8.4	0.695	0.079
9	-10.7	0.014	-9.5	0.108	0.129
10	-9.9	0.055	-9.0	0.252	0.218
11	-8.0	1.366	-9.9	0.055	24.836
12	-11.2	0.006	-10.9	0.006	1
13	-11.7	0.003	-9.0	0.252	0.012
14	-10.9	0.010	-10.7	0.014	0.714
15	-10.7	0.014	-10.3	0.028	0.5
16	-11.2	0.006	-9.0	0.252	0.024
17	-7.8	1.914	-8.0	1.366	1.401
18	-10.2	0.033	-9.8	0.065	0.508
19	-8.5	0.587	-8.5	0.587	1
20	-8.1	1.154	-8.2	0.974	1.185
21	-10.6	0.017	-9.5	0.108	0.157
22	-9.0	0.252	-9.0	0.252	1
23	-11.2	0.006	-8.7	0.419	0.014
24	-9.2	0.180	-8.8	0.353	0.509
25	-9.5	0.108	-8.7	0.419	0.258
26	-	-	-10.3	0.028	-
27	-	-	-10.2	0.033	-
28	-	-	-9.9	0.055	-
29	-10.9	0.010	-9.9	0.055	0.182
30	-6.2	28.503	-12.2	0.001	28503
31	-10.3	0.028	-11.5	0.004	7
32	-11.1	0.007	-11.4	0.005	1.4
33	-	-	-12.4	0.0008	-
34	-5.0	216.071	-12.9	0.0003	720236.7
35	-	-	-13.7	0.0001	-
36	-12.1	0.001	-11.0	0.009	0.111
37	-11.1	0.007	-11.2	0.006	1.167

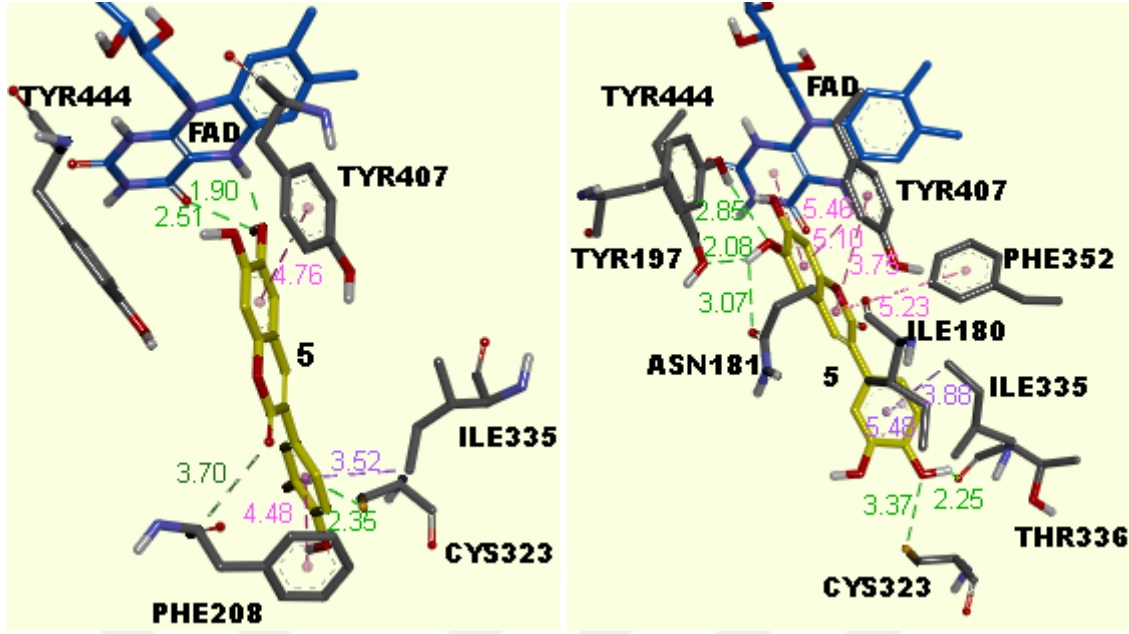
$$K_i = \exp((\Delta G * 1000) / (Rcal * TK))$$

Her iki doking çalışmasında da MAO-B enzimi ile daha fazla sayıda bileşiğin etkileştiği görülmüştür. Bununla birlikte yapılan rijid ve esnek doking çalışmalarında veri setindeki bazı bileşiklerin izoenzimlere olan ilgilerinde değişikliklerin meydana geldiği gözlenmiştir. Örneğin rijid doking de MAO-B enzimine daha yüksek afinite ile bağlanan bazı bileşiklerin (1, 3, 5 numaralı kumarinler gibi), esnek dokingde MAO-A enzimine daha yüksek afinite ile bağlandığı görülmüştür.

Rijid ve esnek doking çalışmaları sonucunda elde edilen enzim-ligand etkileşimleri Discovery Studio 4.1 programı kullanılarak incelenmiştir. Deneysel inhibisyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre; MAO-A'ya en iyi bağlanan dört bileşik olan 5, 16, 23 ve 29 numaralı kumarin türevleri ile MAO-B'ye en iyi bağlanan dört bileşik olan 13, 15, 36 ve 37 numaralı kumarin türevlerinin enzimlerle yaptıkları etkileşimleri gösteren görüntüler Şekil 3.5-3.12'de verilmiştir. Bu bileşiklerin enzimlerle yaptığı etkileşimler detaylı olarak Tablo 3.10-3.17'de verilmiştir. Tablolarda yer alan; Kum kumarin iskeletinin yapısında yer alan  $\alpha$ -piron halkasını; KumFenil kumarin iskeletinin yapısında yer alan benzen halkasını, Fenil kumarin halkasının yan zincirindeki benzen halkasını, BitişikFenil ise kumarin iskeletine bitişik benzen halkasını ifade eder.

Elde edilen etkileşim sonuçlarına göre; esnek dokingde enzimin aktif bölgesindeki amino asitlerin esnek seçilmesi amino asitlerin konformasyonlarında meydana gelen değişikliklere bağlı olarak, ligandların enzimin aktif bölgesine bu bölgedeki amino asitlerle rijid dokinge göre daha fazla sayıda etkileşim yaparak yerleşmesini sağlamıştır. Dolayısıyla da bu durum esnek dokingde hem ligandların enzimin aktif bölgesine daha yüksek afinite ile bağlanmasına hem de rijid dokingde enzimin aktif bölgesine giremeyen ligandların enzimin aktif bölgesine bağlanabilmesine neden olmuştur.





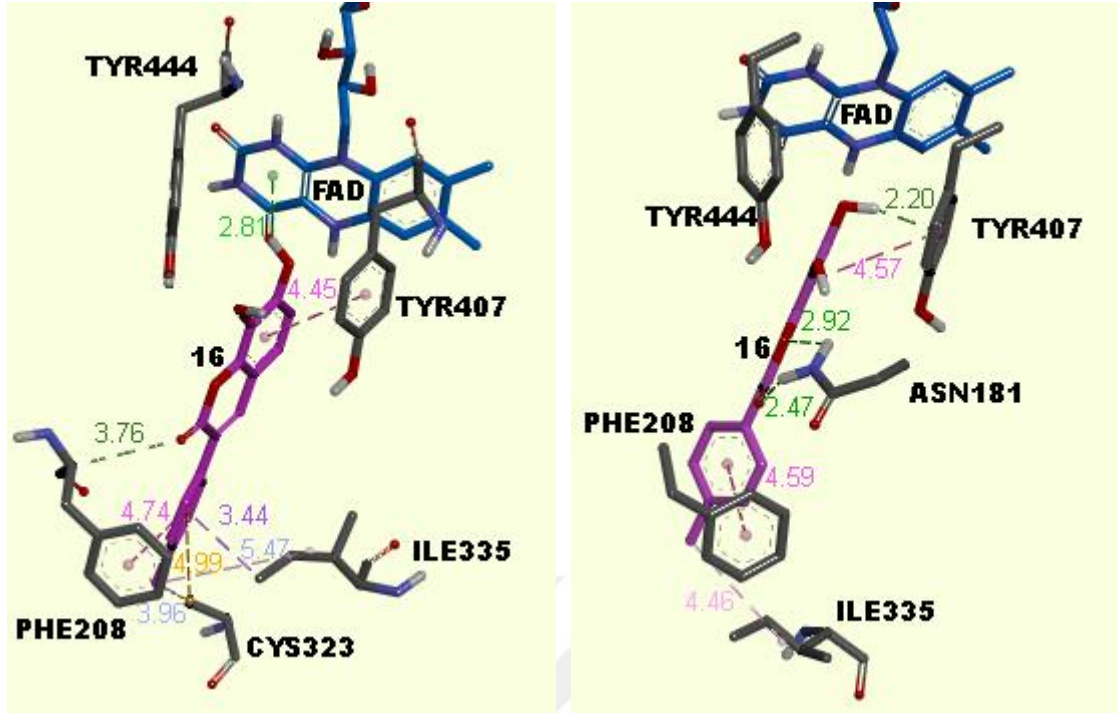
(a)

(b)

Şekil 3.5. 5 numaralı bileşiğin (a) rijid (b) esnek doking sonucunu göre enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-A'nın aktif bölgesine yerleşme pozisyonu. FAD koenzimi lacivert, ligand sarı, ligandın etkileştiği amino asitler ise gri renkte gösterilmiştir. Etkileşim uzaklığı Å cinsinden belirtilmiştir.

**Tablo 3.10.** 5 numaralı bileşiğin rijid ve esnek doking sonucuna enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-A enzimi ile yaptığı etkileşimler

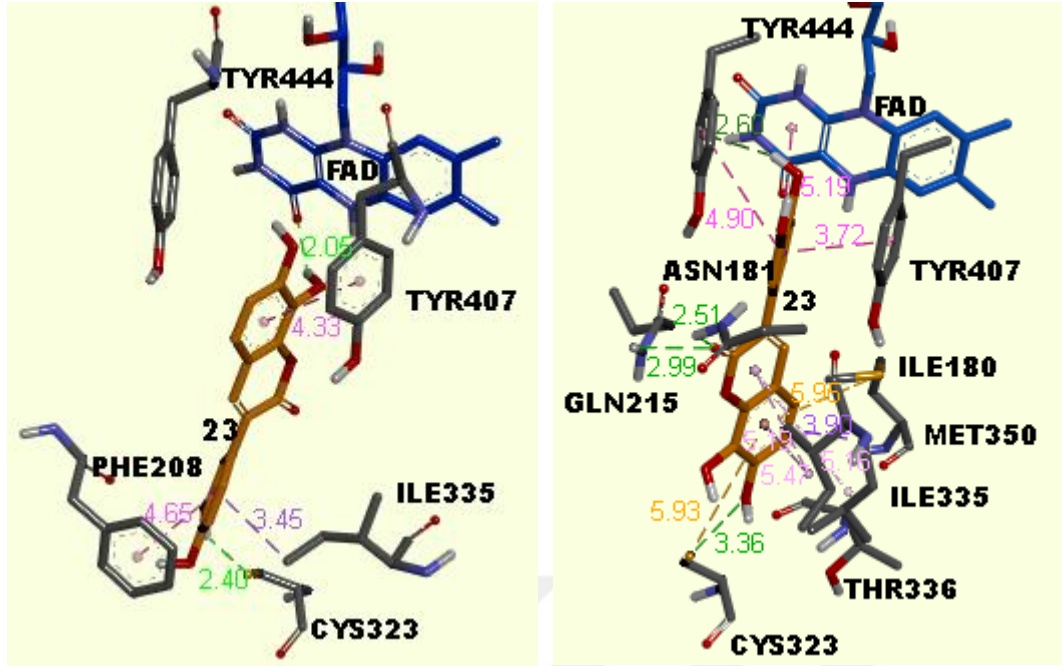
Bileşik	$\Delta G$ (kcal/mol)	Rijid Doking Etkileşimler	$\Delta G$ (kcal/mol)	Esnek Doking Etkileşimler
5	-7.9	KumFenil-OH(H)...FAD-C=O(O) (H bağı=2.51) KumFenil-OH(O)...FAD-NH(H) (H bağı=1.90) KumFenil...Tyr407( $\pi$ - $\pi$ stacked=4.76) Kum-C=O(O) ...Phe208(C)(C-H bağı=3.70) Fenil...Ile335 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.52) Fenil...Phe208 ( $\pi$ - $\pi$ T shaped =4.48) Fenil-OH(H)...Cys323-SH(S)(H bağı =2.35)	-11.1	KumFenil-OH(O)...Tyr197-OH(H) (H bağı=2.85) KumFenil-OH(H)...Tyr444-OH(O) (H bağı=2.08) KumFenil-OH(H)...Asn181- C=O(O) (H bağı=3.07) KumFenil...FAD( $\pi$ - $\pi$ T shaped =5.46) KumFenil...Tyr407( $\pi$ - $\pi$ stacked=3.75) Kum...Phe352 ( $\pi$ - $\pi$ T shaped =5.23) Fenil...Ile180 ( $\pi$ - Alkil =5.48) Fenil...Ile335( $\pi$ - $\sigma$ =3.88) Fenil-OH(O)... Cys323-SH(H) (H bağı=3.37) Fenil-OH(H)...Thr336-C=O(O) (H bağı=2.25)



**Şekil 3.6.** 16 numaralı bileşiğin (a) rijid (b) esnek doking sonucunu göre enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-A'nın aktif bölgesine yerleşme pozisyonu. Etkileşim uzaklığı Å cinsinden belirtilmiştir. FAD koenzimi lacivert, ligand pembe, ligandın etkileştiği amino asitler ise gri renkte gösterilmiştir.

**Tablo 3.11.** 16 numaralı bileşiğin rijid ve esnek doking sonucuna enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-A enzimi ile yaptığı etkileşimler

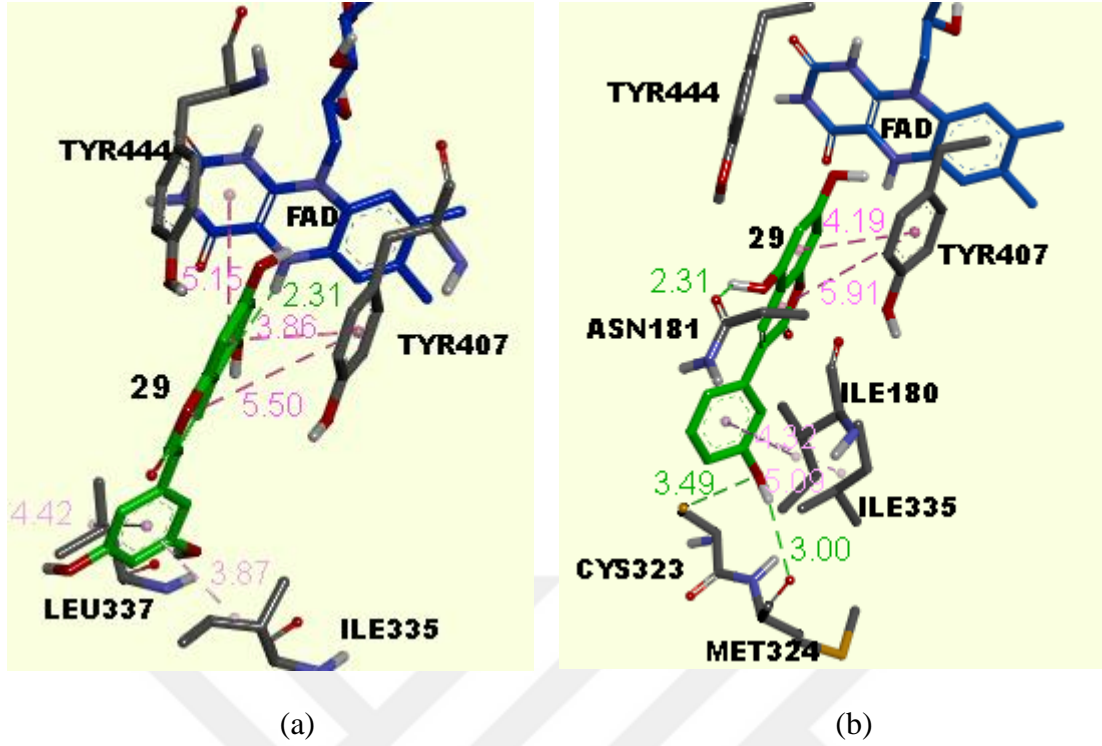
Bileşik	$\Delta G$ (kcal/ mol)	Rijid Doking Etkileşimler	$\Delta G$ (kcal/ mol)	Esnek Doking Etkileşimler
16	-9.4	KumFenil...FAD ( $\pi$ -Donor H bağı=2.81) KumFenil...Tyr407( $\pi$ - $\pi$ stacked=4.45) Kum- C=O(O)...Phe208(C)(C-H bağı=3.76) Fenil...Phe208 ( $\pi$ - $\pi$ T shaped =4.74) Fenil...Ile335 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.44) Fenil-CH <sub>3</sub> ...Ile335 (Alkil =5.47) Fenil-CH <sub>3</sub> ... Cys323(Alkil =3.96) Fenil...Cys323( $\pi$ -sülfür=4.99)	-11.2	KumFenil-OH(H)...Tyr407 ( $\pi$ Donor H bağı=2.20) KumFenil...Tyr407( $\pi$ - $\pi$ stacked=4.57) Kum-O...Asn181-NH <sub>2</sub> (H)(H bağı=2.92) Kum-C=O(O)... Asn181-NH <sub>2</sub> (H) (H bağı=2.47) Fenil...Phe208 ( $\pi$ - $\pi$ T shaped =4.59) Fenil-CH <sub>3</sub> ... Ile325 (Alkil =4.46)



**Şekil 3.7.** 23 numaralı bileşiğin (a) rijid (b) esnek doking sonucunu göre enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-A'nın aktif bölgesine yerleşme pozisyonu. Etkileşim uzaklığı Å cinsinden belirtilmiştir. FAD koenzimi lacivert, ligand turuncu, ligandın etkileştiği amino asitler ise gri renkte gösterilmiştir.

**Tablo 3.12.** 23 numaralı bileşiğin rijid ve esnek doking sonucuna enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-A enzimi ile yaptığı etkileşimler

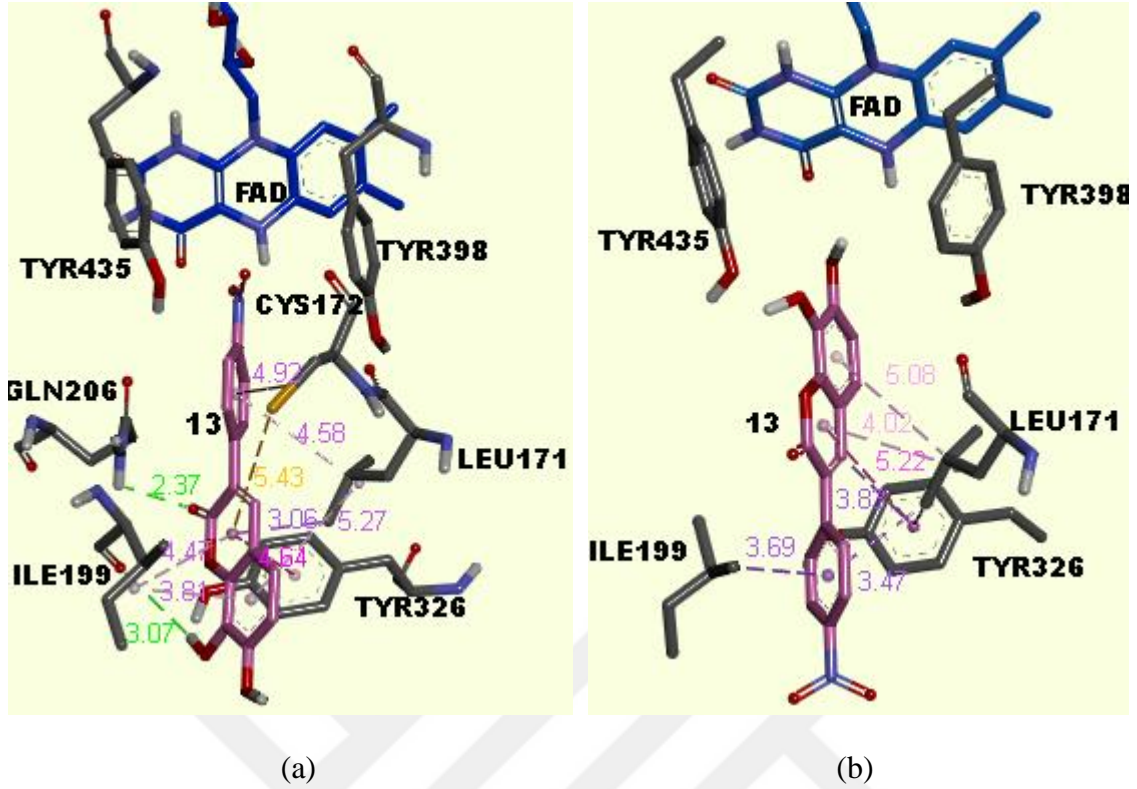
Bileşik	$\Delta G$ (kcal/mol)	Rijid Doking Etkileşimler	$\Delta G$ (kcal/mol)	Esnek Doking Etkileşimler
23	-8.4	KumFenil-OH(H)...FAD-C=O(O) (H bağı=2.05) KumFenil...Tyr407( $\pi$ - $\pi$ stacked=4.33) Fenil...Phe208 ( $\pi$ - $\pi$ T shaped =4.65) Fenil...Ile335 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.45) Fenil-OH(H)...Cys323-SH(S) (H bağı=2.40)	-11.2	Fenil-OH(H)...Tyr444 ( $\pi$ -Donor H bağı=2.60) Fenil...Tyr444( $\pi$ - $\pi$ stacked=4.90) Fenil...Tyr407( $\pi$ - $\pi$ stacked=3.72) Fenil...FAD( $\pi$ - $\pi$ T shaped =5.19) Kum-C=O(O)...Asn181-NH <sub>2</sub> (H) (H bağı=2.51) Kum-C=O(O)...Gln215-NH <sub>2</sub> (H) (H bağı=2.99) KumFenil...Cys323-SH( $\pi$ -Sülfür =5.93) KumFenil-OH(O)...Cys323-SH(H) (H bağı=3.36) KumFenil...Met350( $\pi$ -Sülfür =5.95) Kum...Ile180 ( $\pi$ - Alkil =5.19) KumFenil...Ile180 ( $\pi$ - Alkil =5.47) KumFenil...Ile335 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.90) Kum...Ile335 ( $\pi$ - Alkil =5.16)



Şekil 3.8. 29 numaralı bileşiğin (a) rijid (b) esnek doking sonucunu göre enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-A'nın aktif bölgesine yerleşme pozisyonu. Etkileşim uzaklığı Å cinsinden belirtilmiştir. FAD koenzimi lacivert, ligand yeşil, ligandın etkileştiği amino asitler ise gri renkte gösterilmiştir.

Tablo 3.13. 29 numaralı bileşiğin rijid ve esnek doking sonucuna enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-A enzimi ile yaptığı etkileşimler

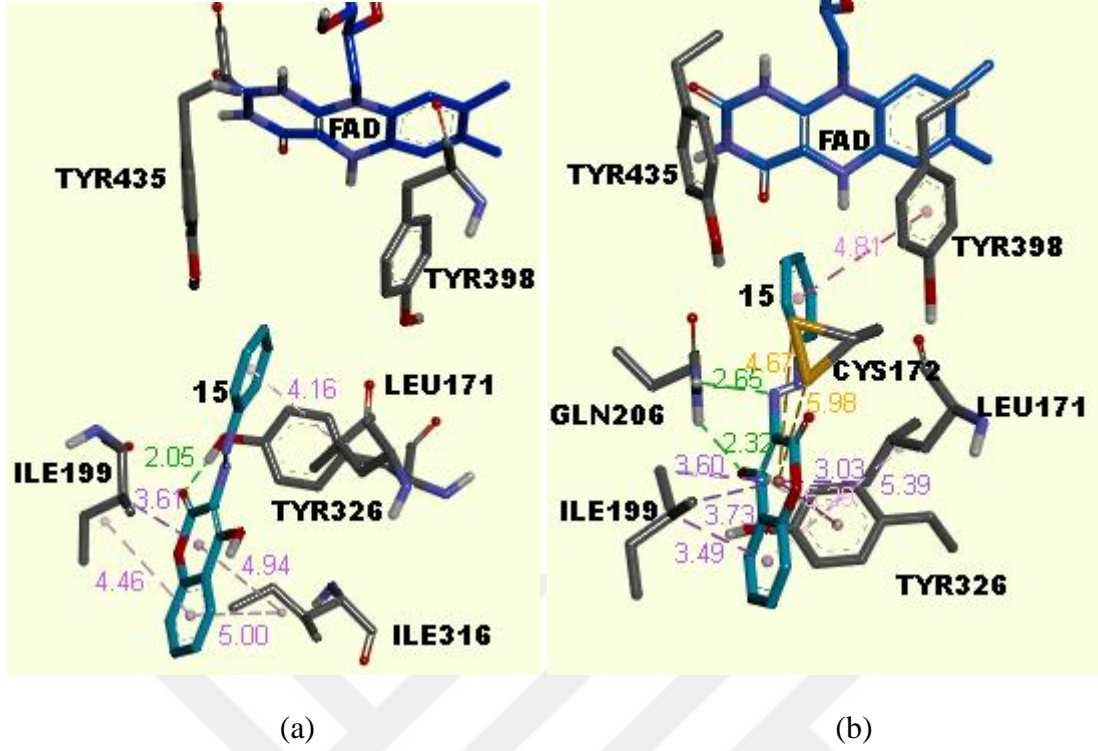
Bileşik	$\Delta G$ (kcal/ mol)	Rijid Doking Etkileşimler	$\Delta G$ (kcal/ mol)	Esnek Doking Etkileşimler
29	-8.2	KumFenil-OH (O)...FAD-NH(H) (H bağı=2.31) KumFenil...FAD( $\pi$ - $\pi$ T-Shaped =5.15) KumFenil...Tyr407( $\pi$ - $\pi$ Stacked =3.86) Kum...Tyr407( $\pi$ - $\pi$ Stacked=5.50) Fenil...Ile335 ( $\pi$ - Alkil =3.87) Fenil...Leu337 ( $\pi$ - Alkil =4.42)	-10.9	KumFenil...Tyr407( $\pi$ - $\pi$ stacked=4.19) Kum...Tyr407( $\pi$ - $\pi$ stacked=5.91) Fenil...Ile180 ( $\pi$ - Alkil =5.09) Fenil...Ile335( $\pi$ - Alkil =4.32) Fenil-OH(O)... Cys323-SH(H) (H bağı=3.49) Fenil-OH(H)... Met324- C=O(O) (H bağı=3.00) KumFenil-OH(H)...Asn181- C=O(O) (H bağı=2,31)



Şekil 3.9. 13 numaralı bileşiğin (a) rijid (b) esnek doking sonucunu göre enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-B'nin aktif bölgesine yerleşme pozisyonu. Etkileşim uzaklığı Å cinsinden belirtilmiştir. FAD koenzimi lacivert, ligand pembe, ligandın etkileştiği amino asitler ise gri renkte gösterilmiştir.

Tablo 3.14. 13 numaralı bileşiğin rijid ve esnek doking sonucuna enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-B enzimi ile yaptığı etkileşimler

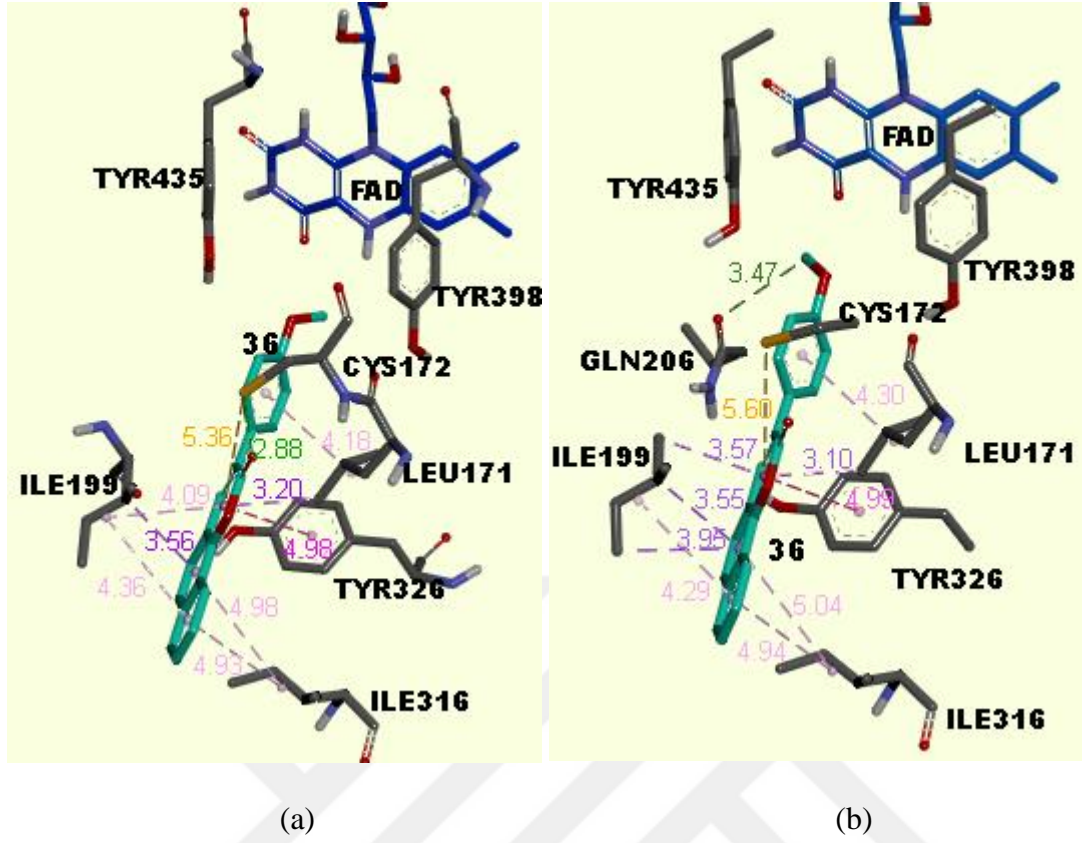
Bileşik	$\Delta G$ (kcal/mol)	Rijid Doking Etkileşimler	$\Delta G$ (kcal/mol)	Esnek Doking Etkileşimler
13	-9.1	Kum-C=O(O)...Gln206-NH(H) (H bağı=2.37)	-9.0	KumFenil...Leu171( $\pi$ -Alkil=5.08)
		Kum-OH(H)...Ile199-C=O(O) (H bağı=3.07)		Kum...Leu171( $\pi$ -Alkil=4.02)
		Kum...Leu171( $\pi$ - $\sigma$ =3.06)		Kum...Leu171( $\pi$ - $\sigma$ =3.47)
		Kum...Cys172 ( $\pi$ -Sülfür=5.43)		Kum...Tyr326 ( $\pi$ - $\pi$ T shaped =5.22)
		Kum...Tyr326 ( $\pi$ - $\pi$ T shaped =4.64)		Kum...Tyr326 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.83)
		KumFenil...Leu171( $\pi$ - Alkil=5.27)		Fenil...Ile199 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.69)
		KumFenil...Ile199 ( $\pi$ - Alkil =3.81)		
		Kum...Ile199 ( $\pi$ - Alkil =4.47)		
		Fenil...Leu171( $\pi$ - Alkil=4.58)		
		Fenil...Cys172 ( $\pi$ -Alkil =4.92)		



Şekil 3.10. 15 numaralı bileşiğin (a) rijid (b) esnek doking sonucunu göre enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-B'nin aktif bölgesine yerleşme pozisyonu. Etkileşim uzaklığı Å cinsinden belirtilmiştir. FAD koenzimi lacivert, ligand turkuaz, ligandın etkileştiği amino asitler ise gri renkte gösterilmiştir.

Tablo 3.15. 15 numaralı bileşiğin rijid ve esnek doking sonucuna enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-B enzimi ile yaptığı etkileşimler

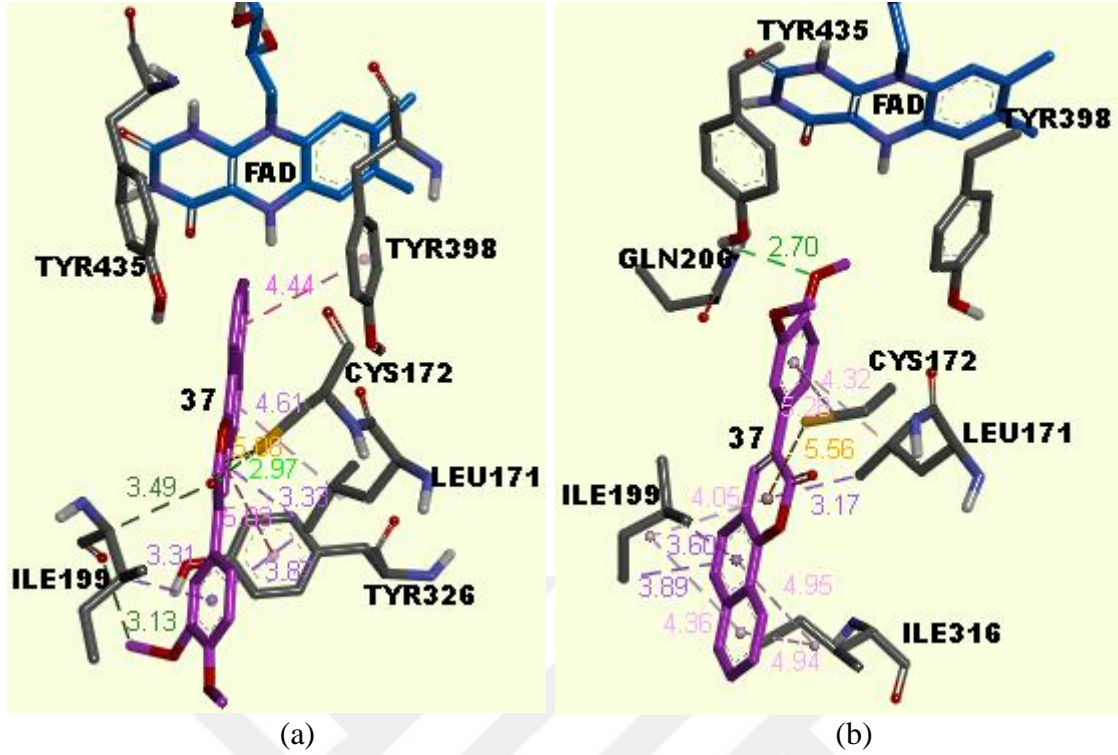
Bileşik	$\Delta G$ (kcal/ mol)	Rijid Doking Etkileşimler	$\Delta G$ (kcal/ mol)	Esnek Doking Etkileşimler
15	-8.8	Kum-C=O(O)...Tyr326-OH(H) (H bağı=2.05) Kum...Ile199 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.61) KumFenil...Ile199 ( $\pi$ - Alkil =4.46) KumFenil...Ile316 ( $\pi$ - Alkil =5.00) Kum...Ile316 ( $\pi$ - Alkil =4.94) Fenil...Leu171( $\pi$ - Alkil=4.16)	-10.3	Fenil...Tyr398( $\pi$ - $\pi$ stacked=4.81) Kum(N)...Gln206 (H bağı=2.65) Kum-OH(O)...Gln206-NH(H) (H bağı=2.37) Kum...Cys172 ( $\pi$ -Sülfür =5.98) Kum...Cys172 ( $\pi$ -Sülfür =4.67) KumFenil...Leu171( $\pi$ - Alkil=5.39) Kum...Leu171( $\pi$ - $\sigma$ =3.03) Kum...Tyr326 ( $\pi$ - $\pi$ T shaped =5.29) Kum-OH...Tyr326 ( $\pi$ -Donor H bağı=3.02) Kum...Ile199 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.60) Kum...Ile199 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.73) KumFenil...Ile199 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.49)



Şekil 3.11. 36 numaralı bileşiğin (a) rijid (b) esnek doking sonucunu göre enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-B'nin aktif bölgesine yerleşme pozisyonu. Etkileşim uzaklığı Å cinsinden belirtilmiştir. FAD koenzimi lacivert, ligand yeşil, ligandın etkileştiği amino asitler ise gri renkte gösterilmiştir.

Tablo 3.16. 36 numaralı bileşiğin rijid ve esnek doking sonucuna enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-B enzimi ile yaptığı etkileşimler

Bileşik	$\Delta G$ (kcal/mol)	Rijid Doking Etkileşimler	$\Delta G$ (kcal/mol)	Esnek Doking Etkileşimler
36	-10.4	Kum-C=O(O)...Cys172-SH(H) (H bağı=2.88)	-11.0	Fenil-OCH <sub>3</sub> ...Gln206 (C-H bağı=3.47)
		Kum...Leu171 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.20)		Fenil...Leu171 ( $\pi$ -Alkil =4.30)
		KumFenil...Ile199 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.56)		Kum...Cys172( $\pi$ -Sülfür =5.60)
		Kum...Cys172( $\pi$ -Sülfür =5.36)		Kum...Leu171 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.10)
		Kum...Tyr326 ( $\pi$ - $\pi$ T shaped =4.98)		Kum...Tyr326 ( $\pi$ - $\pi$ T shaped =4.99)
		BitişikFenil...Ile199 ( $\pi$ - Alkil=4.36)		Kum... Ile199 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.57)
		BitişikFenil...Ile316 ( $\pi$ - Alkil=4.93)		KumFenil... Ile199 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.55)
		KumFenil...Ile199 ( $\pi$ - Alkil=4.98)		KumFenil... Ile199 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.95)
		Kum...Ile199 ( $\pi$ - Alkil=4.09)		BitişikFenil...Ile199 ( $\pi$ - Alkil=4.29)
		Fenil...Leu171 ( $\pi$ -Alkil =4.18)		KumFenil...Ile316 ( $\pi$ - Alkil=5.04)
		BitişikFenil...Ile316 ( $\pi$ - Alkil=4.94)		



**Şekil 3.12.** 37 numaralı bileşiğin (a) rijid (b) esnek doking sonucunu göre enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-B'nin aktif bölgesine yerleşme pozisyonu. FAD koenzimi lacivert, ligand pembe, ligandın etkileştiği amino asitler ise gri renkte gösterilmiştir. Etkileşim uzaklığı Å cinsinden belirtilmiştir.

**Tablo 3.17.** 37 numaralı bileşiğin rijid ve esnek doking sonucuna enzime en yüksek afinite ile bağlanan konformasyonunun MAO-B enzimi ile yaptığı etkileşimler

Bileşik	$\Delta G$ (kcal/ mol)	Rijid Doking Etkileşimler	$\Delta G$ (kcal/ mol)	Esnek Doking Etkileşimler
37	-10.3	Kum-C=O(O)...Cys172-SH(H) (H bağı=2.97)	-11.2	Fenil-OCH <sub>3</sub> (O)...Gln206-NH <sub>2</sub> (C-H bağı=2.70)
		Kum...Leu171 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.33)		Fenil...Cys172( $\pi$ -Alkil =5.28)
		Fenil...Leu171 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.87)		Fenil...Leu171 ( $\pi$ -Alkil =4.32)
		Fenil-OCH <sub>3</sub> (C)...Ile199(C-H Bağı=3.13)		Kum...Cys172( $\pi$ -Sülfür =5.56)
		KumC=O(O)...Ile199(C-H Bağı=3.49)		Kum...Leu171 ( $\pi$ -Sigma =3.17)
		Fenil...Ile199 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.31)		Kum...Ile199 ( $\pi$ - Alkil=4.05)
		Kum...Cys172 ( $\pi$ -Sülfür =5.06)		Kum... Ile199 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.60)
		BitişikFenil...Tyr398( $\pi$ - $\pi$ stacked =4.44)		Kum... Ile199 ( $\pi$ - $\sigma$ =3.89)
		Kum...Tyr326 ( $\pi$ - $\pi$ T shaped =5.03)		BitişikFenil...Ile199( $\pi$ -Alkil=4.36)
		KumFenil...Leu171( $\pi$ -Alkil =4.61)		BitişikFenil...Ile316( $\pi$ -Alkil=4.94)
				KumFenil...Ile316 ( $\pi$ -Alkil=4.95)



### 3.2.4. MAO İnhibisyon Çalışmaları

Doking çalışmalarının ardından kumarin türevlerinin MAO inhibisyon aktivitesi Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında deneysel olarak ölçülmüştür. Elde edilen ölçüm sonuçları rijid ve esnek doking sonuçlarıyla birlikte Tablo 3.18’de verilmiştir.

Deneysel ölçüm sonuçlarına göre MAO-A inhibisyon aktivitesi en yüksek olan bileşikler 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 21, 23, 25, 27 ve 29 (17 bileşik) numaralı bileşiklerdir. MAO-B inhibisyon aktivitesi en yüksek olan bileşikler 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 25, 27, 29, 31, 36 ve 37 (22 bileşik) numaralı bileşiklerdir. 19, 20, 34 ve 35 numaralı kumarin türevleri ise her iki izoenzim için de inhibisyon aktivitesi göstermemiştir (100 µM konsantrasyonda). Bunlardan 19 ve 20 numaralı bileşikler kumarin iskeletinden türeyen, 34 ve 35 numaralı bileşikler ise bitişik benzen halkalı 3-aril kumarin türevi bileşiklerdir.

İnhibisyon ölçümleri yapılan kumarin türevlerinden 15, 22, 31, 36 ve 37 numaralı bileşikler MAO-B enzimini yüksek seçicilikle inhibe etmektedir. Bu bileşiklerden 15 numaralı bileşik 3-aril kumarin türevi, 22 numaralı bileşik 4-aril kumarin türevi, 31, 36 ve 37 numaralı bileşikler ise bitişik benzen halkalı 3-aril kumarin türevi bileşiklerdir. Deneysel inhibisyon ölçümlerinde MAO-A enzimini yüksek seçicilikle inhibe eden bileşiklere rastlanmamıştır.

Deneysel inhibisyon çalışmaları öncesinde, kumarin türevlerinin MAO izozimlerine olan etkinliklerini ve seçiciliklerini araştırmak amacıyla rijid ve esnek doking çalışmaları yapılmıştır. Doking çalışmalarından elde edilen sonuçlar özellikle esnek doking sonuçları genel olarak deneysel sonuçlarla uyum içerisindedir ve veri setindeki bileşiklerin MAO izozimlerine karşı olan ilgileri hakkında genel bir fikir vermektedir. Bununla birlikte bazı doking sonuçları deneysel sonuçlarla örtüşmemektedir. Bu durumun kumarin türevlerinin yaptığı inhibisyon türüyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çünkü doking metodunda, ligandların enzime yarışmalı inhibisyon yaparak kovalent olmayan etkileşimlerle bağlandığı varsayılır. Eğer enzimle etkileşimleri deneysel olarak incelenen bileşikler, enzime yarışmalı inhibisyon dışında başka bir inhibisyon türüyle bağlanıyorsa bu durum deneysel sonuçların doking sonuçlarından daha farklı çıkmasına neden olacaktır. Bu çalışmada kumarin türevlerinin

MAO enzimine karışık inhibisyon yaparak bağlandığı saptanmıştır. Dolayısıyla bazı bileşikler için gözlenen deneysel ve doking sonuçları arasındaki farklılıklar söz konusu kumarin türevlerinin enzime yarışmalı inhibisyondan farklı bir inhibisyon türüyle bağlanıyor olmasından kaynaklanmaktadır.

Karışık inhibisyonda deneysel olarak belirlenen  $IC_{50}$  değerleri ile  $K_i$  değerleri arasında doğrudan bir ilişki kurulamamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada deneysel olarak belirlenen  $IC_{50}$  değerleri ile  $K_i$  değerleri karşılaştırılmamıştır.



**Tablo 3.18.** Kumarin türevlerinin MAO izoenzimleriyle deneysel inhibisyon, rijid ve esnek doking sonuçları

Bileşik No	Rijid Doking Sonuçları		Esnek Doking Sonuçları		Deneysel İnhibisyon Sonuçları	
	MAO-A	MAO-B	MAO-A	MAO-B	MAO-A	MAO-B
	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
1	55.993	0.252	0.028	0.299	2.04	2.43
2	-	0.180	-	0.020	14.03	10.14
3	10.352	0.496	0.047	0.252	1.97	2.56
4	-	1.366	-	0.023	12.17	8.24
5	1.617	0.419	0.007	0.587	1.79	2.34
6	-	1.154	0.252	0.108	182.12	61.29
7	-	1.914	0.028	0.108	2.61	3.40
8	-	1.914	0.055	0.695	8.12	11.31
9	1.617	0.974	0.014	0.108	2.08	2.66
10	3.760	0.213	0.055	0.252	1.94	2.54
11	-	0.108	1.366	0.055	6.43	8.14
12	0.419	0.299	0.006	0.006	1.95	2.50
13	0.587	0.213	0.0026	0.252	2.07	0.91
14	0.128	0.419	0.010	0.014	3.95	2.33
15	0.180	0.354	0.014	0.028	204.09	0.13
16	0.128	0.354	0.006	0.252	1.56	0.99
17	2.266	1.617	1.914	1.366	355.29	228.27
18	1.914	1.154	0.033	0.065	104.70	178.70
19	0.823	1.914	0.587	0.587	-	-
20	1.366	1.914	1.154	0.974	-	-
21	3.176	1.914	0.017	0.108	2.30	3.21
22	-	0.213	0.252	0.252	115.59	9.28
23	0.695	0.419	0.006	0.419	1.81	2.45
24	-	-	0.180	0.353	17.50	23.40
25	-	1.617	0.108	0.419	2.09	2.84
26	-	-	-	0.028	16.84	13.01
27	-	4.452	-	0.033	8.92	5.83
28	-	1.354	-	0.055	102.65	213.21
29	0.974	1.914	0.01	0.055	1.79	3.18
30	-	0.0031	28.503	0.0011	97.20	54.40
31	-	0.0037	0.028	0.0037	128.35	1.23
32	2.682	0.0037	0.007	0.0044	245.07	48.12
33	-	0.0279	-	0.0008	78.31	13.82
34	-	0.0031	216.071	0.0003	-	-
35	-	0.0008	-	0.0001	-	-
36	0.823	0.0235	0.00135	0.0086	290.91	0.0109
37	-	0.0279	0.007	0.006	194.35	0.235

### 3.2.5. Tasarlanan Bileşiklerin Doking Sonuçları

Yeni tasarlanan 31 adet kumarin türevinden 18 tanesi MAO-A'nın aktif bölgesine, 22 tanesi ise MAO-B'nin aktif bölgesine bağlanmıştır. Dolayısıyla MAO-A enzimine kıyasla MAO-B enzimi ile daha fazla sayıda kumarin etkileşmiştir. 6 bileşik ise her iki izoenzimin de aktif bölgesine bağlanamamıştır. Enzime en yüksek afinite (en düşük serbest bağlanma enerjisi;  $\Delta G$ ) ile bağlanan konformasyonların bağlanma enerjileri dikkate alınarak hazırlanan rijid doking sonuçları Tablo 3.19'da verilmiştir.

Doking hesaplamaları sonucunda, kumarin türevlerinin önemli bir bölümünün izoenzimlere kristal yapıdaki inhibitörlerden daha güçlü etkileşimlerle bağlandığı görülmüştür. Kumarin türevleri için hesaplanan serbest bağlanma afiniteleri ( $\Delta G$ ); MAO-A'da -6.6 ile -8.8 kcal/mol aralığında, MAO-B de ise -5.9 ile -11.8 kcal/mol aralığında değişmektedir.

MAO-A ve MAO-B izoenzimleri için elde edilen  $\Delta G$  değerlerinden yola çıkılarak hesaplanan  $K_i$  değerlerini birbirine oranlamak suretiyle her bir bileşik için seçicilik indeksi (SI) hesaplanmıştır (Tablo 3.19). Bu sonuçlara göre 4 bileşik (E-34, E-43, E-44 ve E-64) MAO-A'ya; 20 bileşik (E-32, E-33, E-35, E-36, E-37, E-38, E-39, E-40, E-56, E-57, E-58, E-60, E-62, E-63, E-65, E-66, E-67, E-68, E-69 ve E-70) ise MAO-B'ye daha yüksek afinite ile bağlanmıştır.

**Tablo 3.19.** Tasarlanan bileşiklerin kristal yapı rigid doking sonucu bağlanma enerjisi ( $\Delta G$ ), inhibisyon sabiti ( $K_i$ ) ve SI değerleri

Bileşik	MAO-A		MAO-B		SI
	$\Delta G$ (kcal/mol)	$K_i$ ( $\mu M$ )	$\Delta G$ (kcal/mol)	$K_i$ ( $\mu M$ )	$K_{iMAO-A} \setminus K_{iMAO-B}$
E-32	-7.7	2.266	-9.0	0.252	8.992
E-33	-8.0	1.366	-9.0	0.252	5.421
E-34	-8.6	0.496	-8.3	0.823	0.603
E-35	-7.3	4.452	-8.8	0.354	12.576
E-36	-8.3	0.823	-8.9	0.299	2.753
E-37	-7.8	1.914	-9.4	0.128	14.953
E-38	-7.9	1.617	-8.8	0.354	4.568
E-39	-8.4	0.695	-9.1	0.213	3.263
E-40	-7.2	5.270	-9.0	0.252	20.913
E-41	-	-	-	-	-
E-42	-	-	-	-	-
E-43	-6.9	8.744	-	-	-
E-44	-6.6	14.510	-	-	-
E-45	-	-	-	-	-
E-46	-	-	-	-	-
E-47	-	-	-	-	-
E-48	-	-	-	-	-
E-56	-8.2	0.974	-9.5	0.108	9.018
E-57	-	-	-9.2	0.180	-
E-58	-	-	-7.3	4.452	-
E-59	-	-	-5.9	47.296	-
E-60	-	-	-9.3	0.152	-
E-62	-	-	-9.0	0.252	-
E-63	-7.4	3.760	-8.7	0.419	8.974
E-64	-7.1	6.239	-	-	-
E-65	-	-	-11.8	0.002	-
E-66	-7.7	2.266	-11.4	0.004	566.5
E-67	-7.4	3.760	-11.3	0.005	752
E-68	-	-	-10.3	0.028	-
E-69	-7.8	1.914	-10.2	0.033	58
E-70	-8.8	0.354	-10.4	0.024	14.750

$$K_i = \exp((\Delta G * 1000) / (R * T))$$

### 3.3. Çift-Etki Gösterme Potansiyeli Olan Bileşikler

#### 3.3.1. Veri Setindeki Bileşikler

Bu çalışmada yeni sentezlenmiş ve antioksidan aktiviteleri ölçülmüş 37 adet kumarin türevinden oluşan veri seti kullanılarak sağlamlığı geçerli istatistiksel kriterlerle

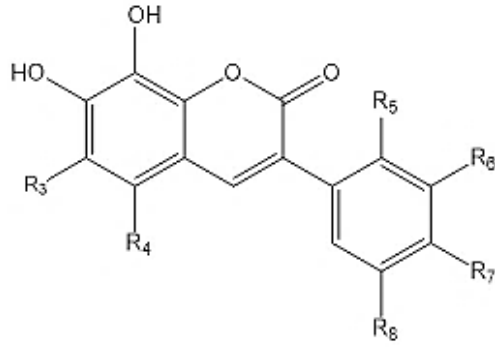
ispatlanmış KYAİ modelleri geliştirilmiş ve aynı kumarin türevlerinin MAO enzimleri ile etkileşimlerini doking metoduyla inceleyerek seçicilik ve etkinliklerini araştırılmıştır.

Deneysel inhibisyon ölçüm sonuçları da dikkate alınarak her iki çalışmadan elde edilen sonuçlar karşılaştırıp değerlendirilerek, çift-etki gösterme potansiyeli olan bileşikler belirlenmiştir. Deneysel olarak ölçülen MAO-A inhibisyon aktivitesi ve antioksidan aktivitesi yüksek olan bileşikler 1, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 21, 23 ve 29 numaralı bileşiklerdir (12 bileşik). Bu bileşiklerin deneysel antioksidan aktiviteleri, MAO-A inhibisyon ve doking sonuçları Tablo 3.20’de verilmiştir.

**Tablo 3.20.** Deneysel olarak ölçülen MAO-A inhibisyon aktivitesi ve antioksidan aktivitesi yüksek olan bileşiklere ait deneysel ve hesaplanmış veriler

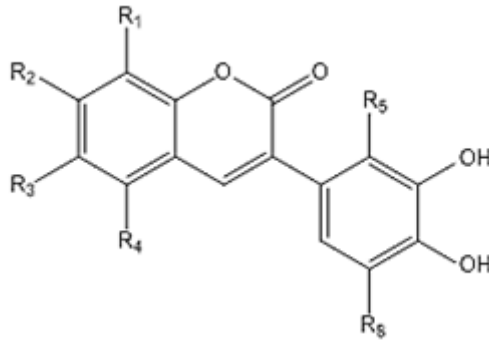
Bileşik No	Antioksidan Aktivitesi FRAP TEAC (mM)	Rijid Doking K <sub>i</sub> (µM)	Esnek Doking K <sub>i</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)
1	2.27	55.993	0.028	2.04
5	3.35	1.617	0.007	1.79
8	2.38	-	0.055	8.12
9	2.66	1.617	0.014	2.08
10	2.11	3.760	0.055	1.94
12	2.06	0.419	0.006	1.95
13	3.61	0.587	0.0026	2.07
14	2.28	0.128	0.010	3.95
16	2.01	0.128	0.006	1.56
21	2.94	3.176	0.017	2.3
23	2.72	0.695	0.006	1.81
29	2.24	0.974	0.010	1.79

Yüksek antioksidan aktivite ve MAO-A inhibisyon aktivitesi gösteren bileşiklerden 1, 5, 10, 12, 13, 14, 16, 23 ve 29 numaralı bileşikler 3-aril kumarin türevi; 8, 9 ve 21 numaralı bileşikler ise 4-aril kumarin türevi bileşiklerdir. Bu bileşiklerden 7, 10, 12, 13, 14, 16 ve 23 numaralı kumarin türevlerinde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı, kumarin halkasında R<sub>1</sub> ve R<sub>2</sub> konumlarında yer alan orto pozisyonundaki -OH gruplarıdır. Bu duruma ilişkin molekül yapısı Şekil 3.13’te verilmiştir.



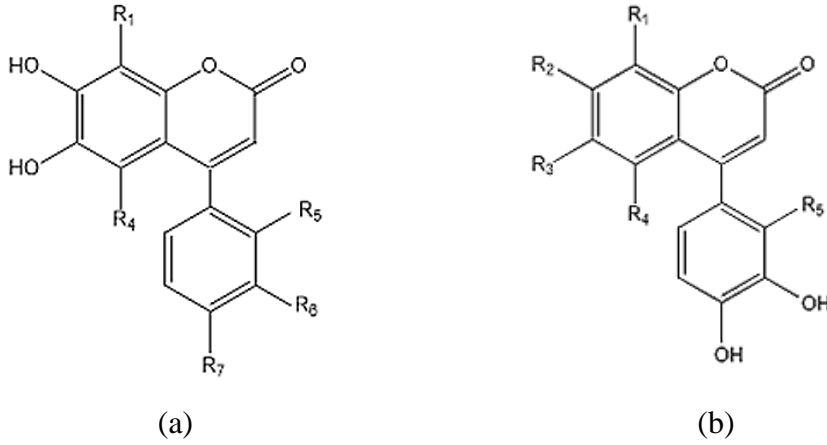
**Şekil 3.13.** 7, 10, 12, 13, 14, 16 ve 23 numaralı 3-aril kumarin türevlerinde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı.

5, 23 ve 29 numaralı numaralı 3-aril kumarin türevlerinde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı kumarin halkasında R<sub>6</sub> ve R<sub>7</sub> konumlarında yer alan orto pozisyonundaki –OH gruplarıdır. Bu duruma ilişkin molekül yapısı Şekil 3.14'te verilmiştir.



**Şekil 3.14.** 5, 23 ve 29 numaralı numaralı 3-aril kumarin türevlerinde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı.

8 ve 21 numaralı kumarin türevlerinde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı, kumarin halkasında R<sub>2</sub> ve R<sub>3</sub> konumlarında yer alan orto pozisyonundaki –OH gruplarıdır. Bu duruma ilişkin molekül yapısı Şekil 3.15 (a)'da verilmiştir. 9 ve 21 numaralı kumarin türevlerinde ise ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı yan zincirde yer alan benzen halkasındaki R<sub>6</sub> ve R<sub>7</sub> konumlarında yer alan orto pozisyonundaki –OH gruplarıdır. Bu duruma ilişkin molekül yapısı Şekil 3.15 (b)'de verilmiştir.



**Şekil 3.15.** (a) 8 ve 21 numaralı kumarin türevlerinde (b) 9 ve 21 numaralı bileşiklerde ise ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı.

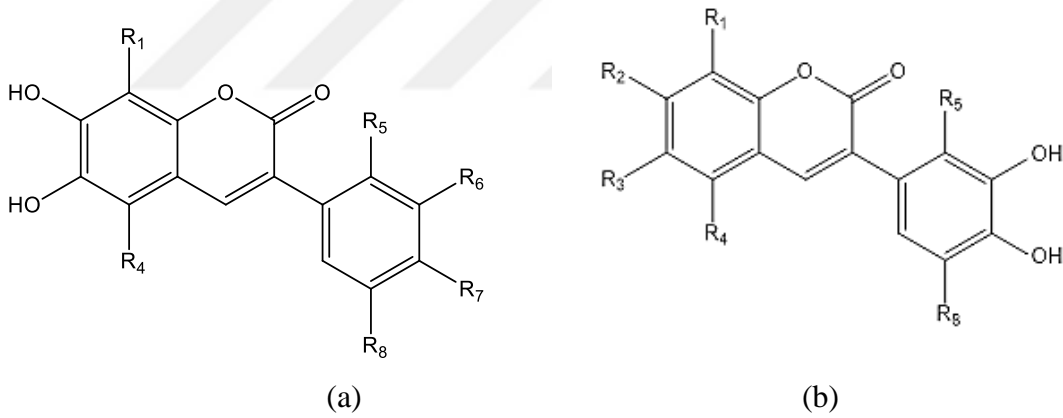
Deneysel olarak ölçülen MAO-B inhibisyon aktivitesi ve antioksidan aktivitesi yüksek olan bileşikler 1, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 21, 23, 25 ve 29 numaralı bileşiklerdir (14 bileşik). Bu bileşiklerin deneysel antioksidan aktiviteleri, inhibisyon değerleri ve doking sonuçları Tablo 3.21’de verilmiştir.

**Tablo 3.21.** Deneysel olarak ölçülen MAO-B inhibisyon aktivitesi ve antioksidan aktivitesi yüksek olan bileşiklere ait veriler

Bileşik No	Antioksidan Aktivitesi FRAP TEAC (mM)	Rijid Doking K <sub>i</sub> (µM)	Esnek Doking K <sub>i</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)
1	2.27	0.252	0.299	2.43
3	1.94	0.496	0.252	2.56
5	3.35	0.419	0.587	2.34
7	1.83	1.914	0.108	3.40
9	2.66	0.974	0.108	2.66
10	2.11	0.213	0.252	2.54
12	2.06	0.299	0.006	2.50
13	3.61	0.213	0.252	0.91
14	2.28	0.419	0.014	2.33
16	2.01	0.354	0.252	0.99
21	2.94	1.914	0.108	3.21
23	2.72	0.419	0.419	2.45
25	2.16	1.617	0.419	2.84
29	2.24	1.914	0.055	3.18



Yüksek antioksidan aktivite ve MAO-B inhibisyon aktivitesi gösteren bileşiklerden 1, 3, 5, 7, 10, 12, 13, 14, 16, 23, 25 ve 29 numaralı bileşikler 3-aril kumarin türevidir, 9 ve 21 numaralı bileşikler ise 4-aril kumarin türevidir. Bu bileşiklerden 7, 10, 12, 13, 14, 16 ve 23 nolu kumarin türevlerinde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı, kumarin halkasında R<sub>1</sub> ve R<sub>2</sub> konumlarında yer alan orto pozisyonundaki –OH gruplarıdır. Bu duruma ilişkin molekül yapısı Şekil 3.13’de verilmiştir. 1, 5 ve 25 numaralı 3-aril kumarin türevlerinde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı kumarin halkasında R<sub>2</sub> ve R<sub>3</sub> konumlarında yer alan orto pozisyonundaki –OH gruplarıdır. Bu duruma ilişkin molekül yapısı Şekil 3.16 (a)’da verilmiştir. 3, 5, 23 ve 29 numaralı 3-aril kumarin türevlerinde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı kumarin halkasında R<sub>6</sub> ve R<sub>7</sub> konumlarında yer alan orto pozisyonundaki –OH gruplarıdır. Bu duruma ilişkin molekül yapısı Şekil 3.16 (b)’de verilmiştir. 4-aril kumarin türevidir olan 9 ve 21 numaralı moleküllerde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı yan zincirde yer alan benzen halkasındaki R<sub>6</sub> ve R<sub>7</sub> konumlarında yer alan orto pozisyonundaki –OH gruplarıdır. Bu duruma ilişkin molekül yapısı Şekil 3.15 (b)’de verilmiştir.



**Şekil 3.16.** (a) 1, 5 ve 25 numaralı (b) 3, 5, 23 ve 29 numaralı 3-aril kumarin türevlerinde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı

### 3.3.2. Tasarlanan Bileşikler

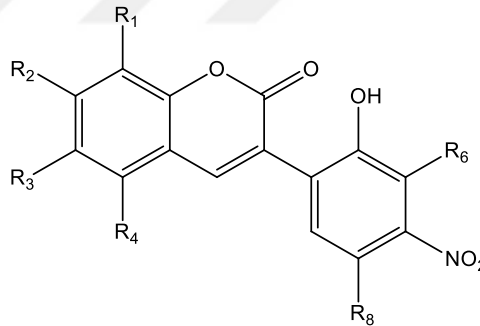
Tasarlanan bileşiklerden rijid doking metoduyla MAO-A’ya bağlanma afinitesi en fazla olan ve geliştirilen KYAİ modeliyle tahmin edilen antioksidan aktivitesi en yüksek olan bileşikler E-34, E-35, E-36, E-38, E-39 ve E-64 numaralı (6 bileşik) kumarin türevleridir. 4-aril kumarin türevidir olan E-64 ile 3 aril kumarin türevidir olan E-34, E-35, E-36, E-38, E-39 numaralı bileşiklerin tahmin edilen antioksidan aktiviteleri, rijid

doking sonucunda hesaplanan serbest bağlanma enerjileri ( $\Delta G$ ) ve  $K_i$  değerleri Tablo 3.22’de verilmiştir.

**Tablo 3.22.** Çift etki ile antioksidan aktivite ve MAO-A inhibisyon aktivitesi gösteren yeni tasarlanmış bileşiklere ait teorik olarak tahmin edilen değerler

Bileşik No	Tahmin Edilen Antioksidan Aktivitesi FRAP TEAC (mM)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$K_i$ ( $\mu M$ )
E-34	0.455	-8.6	0.496
E-35	0.755	-7.3	4.452
E-36	0.576	-8.3	0.823
E-38	0.576	-7.9	1.617
E-39	0.281	-8.4	0.695
E-64	0.104	-7.1	6.239

Bu moleküllerden E-36, E-38 ve E-39 nolu kumarin türevlerinde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı; yan zincirde yer alan benzen halkasındaki  $R_5$  pozisyonundaki  $-OH$  ve  $R_7$  pozisyonundaki  $-NO_2$  gruplarının konumudur. Bu duruma ilişkin molekül yapısı Şekil 3.17’de verilmiştir.



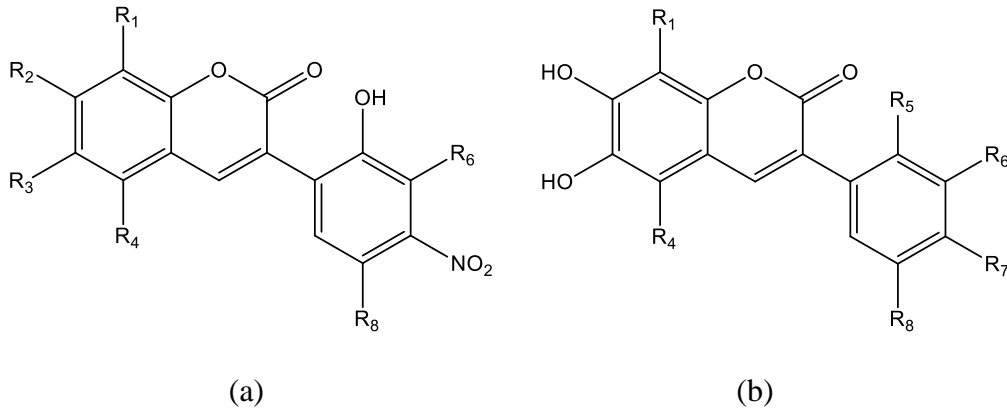
**Şekil 3.17.** E-36, E-38 ve E-39 nolu kumarin türevlerinde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı

Rijid doking metoduyla MAO-B’ye bağlanma afinitesi en fazla olan ve geliştirilen KYAİ modeliyle tahmin edilen antioksidan aktivitesi en yüksek olan bileşikler E-34, E-35, E-36, E-38, E-39 ve E-57 numaralı (6 bileşik) kumarin türevleridir. 3 aril kumarin türevi olan bu bileşiklerin tahmin edilen antioksidan aktiviteleri, rijid doking sonucunda hesaplanan serbest bağlanma enerjileri ( $\Delta G$ ) ve  $K_i$  değerleri Tablo 3.23’te verilmiştir.

**Tablo 3.23.** Çift etki ile antioksidan aktivite ve MAO-B inhibisyon aktivitesi gösteren yeni tasarlanmış bileşiklere ait teorik olarak tahmin edilen değerler

Bileşik No	Tahmin Edilen Antioksidan Aktivitesi FRAP TEAC (mM)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$K_i$ ( $\mu M$ )
E-34	0.455	-8.3	0.823
E-35	0.755	-8.8	0.354
E-36	0.576	-8.9	0.299
E-38	0.576	-8.8	0.354
E-39	0.281	-9.1	0.213
E-57	0.634	-9.2	0.180

Bu moleküllerden E-36, E-38 ve E-39 nolu kumarin türevlerinde ortak olarak gözlenen fonksiyonel yapı; yan zincirde yer alan benzen halkasındaki  $R_5$  pozisyonundaki  $-OH$  ve  $R_7$  pozisyonundaki  $-NO_2$  gruplarının konumudur. Bu duruma ilişkin molekül yapısı Şekil 3.18 (a)'da verilmiştir. E-35, E-36 ve E-57 nolu kumarin türevlerinde gözlenen ortak fonksiyonel yapı, kumarin halkasında  $R_2$  ve  $R_3$  konumlarında yer alan orto pozisyonundaki  $-OH$  gruplarıdır. Bu durumu gösteren molekül yapısı Şekil 3.18 (b)'de verilmiştir.



**Şekil 3.18.** (a) E-36, E-38 ve E-39 numaralı (b) E-35, E-36 ve E-57 numaralı kumarin türevlerinde gözlenen ortak fonksiyonel yapı

#### 4. GENEL DEĞERLENDİRME VE SONUÇ

Bu çalışmada yeni sentezlenmiş ve FRAP yöntemi ile antioksidan aktiviteleri ölçülmüş 37 adet kumarin türevi ile standart olarak kullanılan troloks bileşiğinden oluşan veri seti kullanılarak sağlamlığı geçerli istatistiksel kriterlerle ispatlanmış kantitatif yapı-aktivite ilişkisi modelleri geliştirilmiştir. Aynı kumarin türevlerinin MAO enzimleri ile etkileşimleri doking metoduyla incelenerek bağlanma mekanizmaları araştırılmıştır. Moleküler doking çalışmalarını takiben veri setindeki bileşiklerin MAO inhibisyon aktiviteleri Biyokimya Anabilim Dalı öğretim elemanları tarafından deneysel olarak ölçülmüştür. Her iki çalışmadan elde edilen sonuçlar deneysel inhibisyon çalışmaları da dikkate alınarak karşılaştırılıp değerlendirilmiş ve çift-etki gösterme potansiyeli olan bileşikler belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak yeni kumarin türevleri tasarlanmıştır. Oluşturulan KYAI modelleri kullanılarak tasarlanan bileşiklerin antioksidan aktiviteleri tahmin edilmiş ve doking metoduyla MAO inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir.

Veri setindeki bileşiklerden 12 tanesinin (1, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 21, 23 ve 29) deneysel ölçüm sonuçlarına göre yüksek MAO-A inhibisyon ve antioksidan aktivitesine; 14 tanesinin ise yüksek MAO-B inhibisyon ve antioksidan aktivitesine (1, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 21, 23, 25 ve 29) sahip olduğu görülmüştür. Çift etki gösteren bu bileşiklerin yapı-aktiflik ilişkileri araştırıldığında, R<sub>1</sub>-R<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>, R<sub>6</sub>-R<sub>7</sub> pozisyonlarındaki ikili -OH gruplarının söz konusu aktiviteden sorumlu olabileceği anlaşılmıştır.

Veri seti kullanılarak sağlamlığı geçerli istatistiksel kriterlerle ispatlanmış kantitatif yapı-aktivite ilişkisi modelleri geliştirilmiştir. Geliştirilen modeller arasından uygunluk, iç ve dış validasyon parametreleri doğrultusunda güvenilir, geçerli ve tahmin gücü en yüksek model olarak iki tanımlayıcı bir model olan "Model 3" seçilmiştir. Model 3 kullanılarak yeni tasarlanan 31 adet kumarin türevi bileşiğin antioksidan aktivitesi tahmin edilmiştir. Model 3'ün uygulama alanı içinde kalan bileşiklerden 12 tanesinin (E-34, E-35, E-36, E-38, E-39, E-41, E-45, E-46, E-48, E-57, E-59 ve E-64) tahmin edilen antioksidan aktivitesi standart olarak alınan troloksun antioksidan aktivitesinden daha yüksek çıkmıştır.

Geliştirilen KYAİ modeli yardımıyla yapılan antioksidan aktivite tahmin çalışmalarının ardından tasarlanan bileşiklerin MAO enzimleri ile etkileşimleri rijid doking metoduyla incelenerek bu bileşiklerin seçicilik ve etkinliklerini araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tasarlanan bileşiklerden 6 tanesinin (E-34, E-35, E-36, E-38, E-39 ve E-64) tahmin edilen antioksidan aktivitesinin ve MAO-A'ya bağlanma afinitesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Buna benzer şekilde 6 bileşiğin (E-34, E-35, E-36, E-38, E-39 ve E-57) daha tahmin edilen antioksidan aktivitesinin ve MAO-B'ye bağlanma afinitesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Çift etki gösteren bu bileşiklerin yapı-aktiflik ilişkileri araştırıldığında, R<sub>7</sub> pozisyonundaki –NO<sub>2</sub> ve birbirine komşu –OH gruplarının söz konusu aktiviteden sorumlu olabileceği görülmüştür.

Biyolojik sistemlerde endojen ve ekzojen kaynaklı faktörler sebebiyle sürekli olarak serbest radikaller ve diğer oksijen kökenli türler üretilmektedir. Canlılar bu faktörlerle mücadele edebilmek için antioksidan savunma sistemlerine ihtiyaç duymaktadırlar. Biyolojik aminlerin oksidasyonundan sorumlu monoamin oksidaz enzimi de vücudumuzda süperoksit üreten sistemlerden bir tanesidir. Monoamin oksidaz enziminin özellikle anahtar konumundaki nörotransmitterlerin metabolizmasında yer alması; bu enzimi depresyon ve Parkinson gibi nörolojik bozuklukların tedavisinde farmakolojik müdahale için önemli bir hedef haline getirmiştir. Bu çalışmada veri seti olarak kullanılan kumarin türevlerinin ve yeni tasarlanan kumarin türevlerinin bir kısmının yüksek MAO inhibisyon ve antioksidan aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla da çift etkiye sahip olduğu düşünülen bu bileşikler gelecek çalışmalar için umut vaad etmektedir.

## KAYNAKLAR

Abdelhafez, O.M., Amin, K.M., Ali, H.I., Abdalla, M.M., Batran, R.Z. (2013) Monoamine oxidase A and B inhibiting effect and molecular modeling of some synthesized coumarin derivatives. *Neurochem. Int.*, , 62, 198-209.

Accelrys Software Inc., (2013) Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0, San Diego.

Ahmed, L., Rasulev, B., Turabekova, M., Leszczynskab, D., Leszczynskia, J. (2013) Receptor- and ligand-based study of fullerene analogues: Comprehensive computational approach including quantum-chemical, QSAR and molecular docking simulations. *Org. Biomol. Chem.*, 11, 5798–5808.

Akyuz, M. A., Erdem, S. S., Edmondson, D. E. (2007) The aromatic cage in the active site of monoamine oxidase B: effect on the structural and electronic properties of bound benzylamine and p-nitrobenzylamine. *Journal Neu. Trans.*, 114, 693-698.

Alak, G., Sönmez, A. Y., Hisar, O. (2011) Bazı Pestisitlerin Balıkların Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 42(1), 91-93.

Altan, N., Dinçel, A.S., Koca, C. (2006) Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Turkish Journal of Biochemistry*, 31(2), 51-56.

Anand, P., Singh, B., Singh, N. (2012) A Review on Coumarins as Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 1175-1180.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. (2004) Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7970–7981.

Aydın, O., (2011) Hidrazon Türevi MAO İnhibitörleri İle Akılcı İlaç Tasarımına Yönelik QSAR Analizi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

Bartus, R.T. (2000) On Neurodegenerative Diseases, Models, and Treatment Strategies: Lessons Learned and Lessons Forgotten a Generation Following the Cholinergic Hypothesis. *Experimental Neurology*, 163(2), 495-529.

Bilgin, H.M., Atmaca, M., Obay, B.D., Özekinci, S., Taşdemir, E., Ketani, A. (2011) Protective Effects of Coumarin and Coumarin Derivatives Against Carbon Tetrachloride-induced Acute Hepatotoxicity in Rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63, 325–330.

Binda, C., Newton-Vinson, P., Hubalek, F., Li, M., Edmondson, D.E., Mattevi, A. (2002) Structure of Human Monoamine Oxidase B, A Drug Target for the Treatment of Neurological Disorders. *Nat. Struct. Biol.*, 9, 22-26.

Binda, C.; Li, M.; Hubalek, F.; Retselli, N.; Edmondson, D. E. and Mattevi, A. (2003) Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high resolution crystal structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 9750-9755.

Biswanger, H. (2008) *Enzyme Kinetics. Principles and Methods*. 2nd Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Bolasco, A., Carradori, S., Fioravanti, R. (2010) Focusing on new monoamine oxidase inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 20(7), 909-939.

Borges, F., Roleira, F.; Milhazes, N.; Santana, L. ve Uriarte, E. (2005) Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Curr. Med. Chem.*, 12, 887-916.

Brühlmann, C., Ooms, F., Carrupt, P., Testa, B., Catto, M.Ü., Leonetti, F., Altomare, C., Carotti, A. (2001) Coumarins Derivatives as Dual Inhibitors of Acetylcholinesterase and Monoamine Oxidase. *J. Med. Chem.*, 44, 3195-3198.

Bugg, T.D.H. (2004) Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, Second Edition Blackwell Publishing, UK

Cai, Z. (2014). Monoamine oxidase inhibitors: Promising therapeutic agents for Alzheimer's disease (Review). *Molecular Medicine Reports*, 9, 1533-1541.

Canbay, E., Çelik, K., Dökmetas, S., Karadayı, K., Turan, M., Kelestemur, F., Sen, M. (2003) Tiroid Kanseri Hastalarda Değişen Antioksidan Enzim Aktivitesi ve Lipid Peroksidasyonu. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 25(4),151–156.

Carradori, S., D'Ascenzio, M., Chimenti, P., Secci, D., Bolasco, A. (2014) Selective MAO-B inhibitors: a lesson from natural products. *Mol Divers*, 18, 219–243.

Cesura, M.A., Pletscher, A. (1992) The New Generation of Monoamine Oxidase Inhibitors. *Progress in Drug Research*, 38, 171-297.

Champe, P.C., Harvey, R.A. (1997) *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Türkiye, 47-58.

Chimenti, F., Bolasco, A., Secci, D., Chimenti, P., Granase, A., Carrodori, S., Yanez, M.; Orallo, F.; Ortuso, F., Alcaro, S. (2010) Investigations on the 2-thiazolyldrazone scaffold: Synthesis and molecular modeling of selective human monoamine oxidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 18, 5715-5723.

Chirico, N., Gramatica, P. (2011) Real external predictivity of QSAR models: How to evaluate it? Comparison of different validation criteria and proposal of using the concordance correlation coefficient. *J. Chem. Inf. Model.*, 51, 2320–2335.

Consonni, V., Ballabio, D., Todeschini, R., (2009) Comments on definition of Q2 parameter for QSAR validation. *J. Chem. Inf. Model.* 49, 1669–1678.

Consonni, V., Ballabio, D., Todeschini, R., (2010) Evaluation of model predictive ability by external validation techniques. *J. Chemom.*, 24, 194–201.



Danis, O., Demir, S., Gunduz, C., Alparslan, M. M., Altun, S., Yuce-Dursun, B. (2016) Synthesis of selected 3- and 4-arylcoumarin derivatives and evaluation as potent antioxidants. *Research Chemical Intermediates*, 42, 6061–6077.

Dearden, J.C., Cronin, M.T.D., Kaiser, K.L.E. (2009) How not to develop a quantitative structure–activity or structure–property relationship (QSAR/QSPR). *SAR and QSAR in Environmental Research*, Vol. 20, Nos. 3-4, 241-266.

De Colibus, L., Li, M., Binda, C., Lustig, A., Edmondson, D. E., Mattevi, A. (2005) Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): Relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 12684-12689.

Dias, R., Filgueira de Azevedo Jr. W. (2008) Molecular Docking Algorithms. *Current Drug Targets*, 9, 1040-1047.

DRAGON for Windows 6, (2013) Talete srl, Milan, <http://www.talete.mi.it/>

Edmondson, D. E., Binda, C., Mattevi, A. (2004) The FAD Binding Site of Human Monoamine Oxidase A and B. *NeuroToxicology*, 25, 63–72.

Edmondson, D.; Binda, C.; Mattevi, A. (2007) Structural Insights Into The Mechanism of Amine Oxidation by Monoamine Oxidase A and B. *Arch. Biochem. Biophys.*, 464, 269-276.

Edmondson, D.E., Binda, C., Wang, J., Upadhyay, A.K., Mattevi, A. (2009) Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases. *Biochemistry*, 48, 4220–4230.

Erdem, S. S., Büyükmenekşe, B. (2011) Computational investigation on the structure-activity relationship of the biradical mechanism for monoamine. *J Neural Transm*, 118, 1021-1029.

Erdem, S. S., Karahan, Ö., Yıldız, İ., Yelekçi, K. (2006) A computational study on the amine-oxidation mechanism of monoamine oxidase: Insight into the polar nucleophilic mechanism. *Org. Bio. Chem.*, 4, 646-658.

Erdem, S. S.; Yelekçi, K. (2001) Computer modeling of oxygen containing heptylamines as monoamine oxidase inactivators. *Theo Chem*, 572, 97-106.

Erzincan, P., Saçan, M.T., Yüce-Dursun, B., Danış, Ö., Demir, S., Erdem, S.S., Ogan, A. (2015) QSAR models for antioxidant activity of new coumarin derivatives, SAR and QSAR in *Environmental Research*, Vol. 26, Nos. 7–9, 721–737.

Figuroa-Guiñez, R., Matos, M. J., Vazquez-Rodriguez, S., Santana, L., Uriarte, E., Borges, F., Olea-Azar, C., Maya, J. D. (2015) Interest of Antioxidant Agents in Parasitic Diseases. The Case Study of Coumarins. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15, 850-856.

Finberg, J.P.M. (2014) Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: Focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacology & Therapeutics*, 143, 133–152.

Gill, S.S., Tuteja, N. (2010) Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.

Golbraikh, A., Tropsha, A. (2002) Beware of q<sup>2</sup>!. *J Mol. Graph. Model.*, 20, 269–276.

Gramatica, P. (2007) Principles of QSAR models validation: Internal and external. *QSAR & Comb. Sci.* 26(5), 694–701.

Gramatica, P., Cassani, S., Chirico, N., (2014) QSARINS-Chem: Insubria datasets and new QSAR/QSPR models for environmental pollutants in QSARINS. *J. Comput. Chem. Software news and updates, Early View*, DOI: 10.1002/jcc.23576.

Gramatica, P., Chirico, N., Papa, E., Cassani, S., Kovarich, S. (2013) QSARINS: A new software for the development, analysis, and validation of QSAR MLR Models. *J. Comput. Chem. Soft. News and Updates*, 34, 2121–2132.

Gramatica, P., Chirico, N., Papa, E., Cassani, S., Kovarich, S. (2013) QSARINS: A New Software for the Development, Analysis, and Validation of QSAR MLR Models. *Journal of Computational Chemistry*, 34, 2121–2132

Helguera, A.M., Pérez-Machado, G., Cordeiro, M.N.D.S., Borges, F. (2012) Discovery of MAO-B Inhibitors - Present Status and Future Directions Part I: Oxygen Heterocycles and Analogs. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12, 907-919.

Hubalek, F., Binda, C., Khalil, A., Li, M., Mattevi, A., Castagnoli, N., Edmondson, D. E. (2005) Demonstration of isoleucine 199 as a structural determinant for the selective inhibition of human monoamine oxidase B by specific reversible inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 280, 15761–15766.

Jameel, E., Umar, T., Kumar, J., Hoda, N., (2016) Coumarin: A Privileged Scaffold for the Design and Development of Antineurodegenerative Agents. *Chem Biol Drug Des*, 87, 21–38.

Kostova, I., Bhatia, S., Grigorov, P., Balkansky, S., Parmar, V.S., Prasad, A.K., Saso, L. (2011) Coumarins as Antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 18, 3929-3951.

Lacy, A., O’Kennedy, R., (2004) Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Desing*, 10, 3797-3811.

Legoabe, L.J., Petzer, A., Petzer, J.P. (2012), Selected chromone derivatives as inhibitors of monoamine oxidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 5480-5848.

Lin, L.I., (1989) A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*, 31(45), 255–268.

Lin, L.I., (1992) Assay validation using the concordance correlation coefficient. *Biometrics*, 48, 599–604.

Lin, M.H., Chou Y.S., Tsai Y.J., Chou D.S. (2011) Antioxidant Properties of 5,7-Dihydroxycoumarin Derivatives in in vitro Cell-free and Cell-containing Systems. *J Exp Clin Med*, 3(3), 126-131.

LoPachin, R.M., Gavin, T., Geohagen, B.C., Das, S. (2007) Neurotoxic Mechanisms of Electrophilic Type-2 Alkenes: Soft-soft Interaction Described by Quantum Mechanical Parameters. *Toxicological Sciences*, 98, 561-570.

Matos, M. J., Rodriguez-Enriquez, F., Borges, F., Santana, L., Uriarte, E., Estrada, M., Rodriguez-Franco, M. I., Laguna, R., Vina, D. (2015) 3-Amidocoumarins as Potential Multifunctional Agents against Neurodegenerative Diseases. *ChemMedChem*, 10, 2071 – 2079.

Matos, M. J., Viña, D., Vazquez-Rodriguez, S., Uriarte, E., Santana, L. (2012) Focusing on New Monoamine Oxidase Inhibitors: Differently Substituted Coumarins As An Interesting Scaffold. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12, 2210-2239.

Matos, M.J., Vina, D., Picciau, C., Orallo, F., Santana, L. Ve Uriarte, E. (2009), Synthesis and evaluation of 6-methyl-3-phenylcoumarins as potent and selective MAO-B inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 5053-5055.

McGeer, E.G., McGeer, P.L., (2003) Clinically Tested Drugs for Alzheimer's Disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 12(7), 1143-1151.

Mladenović, M., Mihailović, M., Bogojević, D., Matić, S., Nićiforović, N., Mihailović, V., Vuković, N., Sukdolak, S., Solujić, S., (2011) In Vitro Antioxidant Activity of Selected 4-Hydroxy-chromene-2-one Derivatives-SAR, QSAR and DFT Studies. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 2822-2841.

Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S. and Olson, A.J. (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry*, 16, 2785-91.

Naoui, M., Riederer, P. Maruyama, W. (2016) Modulation of monoamine oxidase (MAO) expression in neuropsychiatric disorders: genetic and environmental factors involved in type A MAO expression. *J Neural Transm.* 123, 91–106.

Nelson, D.L., Cox, M.M. (2005) *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Çeviri Editörü Prof. Dr. Nedret Kılıç, Palme Yayıncılık.

OECD: Organization for Economic Co-operation and Development., (2007). Guidance document on validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] models. OECD Environment Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 69. Paris, France.

Ojha, P.K., Mitra, I., Das, R.N., Roy, K. (2011) Further exploring  $r^2_m$  metrics for validation of QSPR models, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 107 194–205.

Oyaizu, M. (1986), Studies on Product of Browning Reaction Prepared From Glucose Amine. *Japan Journal of Nutrition*, 44, 307-315

Patil, P. O., Bari, S. B., Firke, S. D., Deshmukh, P. K., Donda, S. T. , Patil, D. A. (2013) A comprehensive review on synthesis and designing aspects of coumarin derivatives as monoamine oxidase inhibitors for depression and Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 2434–2450.

Pavlin, M., Repič, M., R., Vianello, Mavri, J. (2015) The Chemistry of Neurodegeneration: Kinetic Data and Their Implications. *Mol Neurobiol*, DOI 10.1007/s12035-015-9284-1.

Pektaş, İ. (2009) Bitki Gelişim Düzenleyicilerinin Antioksidan Enzimler Üzerindeki Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, Türkiye.

Peng, X.M., Damu, G. L.V., Zhou, C.H. (2013) Current Developments of Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry, *Current Pharmaceutical Design*, 19, 3884-3930.

Pisani, L., Catto, M., Nicolotti, O., Grossi, G., Di Braccio, M., Soto-Otero, R., Mendez-Alvarez, E., Stefanachi, A., Gadaleta, D., Carotti, A. (2013) Fine molecular tuning at position 4 of 2H-chromen-2-one derivatives in the search of potent and selective monoamine oxidase B inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 723-739.

QSARINS 2.2.1. [www.qsar.it](http://www.qsar.it), (2015).

Rodríguez, S.A., Nazareno, M.A, Baumgartner, M.T. (2011) Effect of Different C3-Aryl Substituents on the Antioxidant Activity of 4-Hydroxycoumarin Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19, 6233–6238.

Schneider, G., Neidhart, W., Giller, T., Schmid, G. (1999) "Scaffold-Hopping" by topological pharmacophore search: A contribution to virtual screening. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 38, 2894–2896.

Schüürmann, G., Ebert, R., Chen, J., Wang, B., Kühne, R., (2008) External validation and prediction employing the predictive squared correlation coefficients test set activity mean vs training set activity mean. *J. Chem. Inf. Model.* 48, 2140–2145.

Shi, L., Yang, Y., Li, Z., Zhu, Z., Liu, C., Zhu, H. (2010) Design of novel nicotinamides as potent and selective monoamine oxidase a inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 18, 1659-1664.

Shi, L.; Yang, Y.; Li, Z.; Zhu, Z.; Liu, C. ve Zhu, H. (2010), Design of novel nicotinamides as potent and selective monoamine oxidase a inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 18, 1659-1664.

Shi, L.M., Fang, H., Tong, W., Wu, J., Perkins, R., Blair, R.M., Branham, W.S., Dial, S.L., Moland, C.L., Sheehan, D.M. (2001) QSAR models using a large diverse set of estrogens. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41, 186–195.

Silverman, R.B., Holladay, M.W. (2014) *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, 3rd Edition., Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Soto-Oteroai, R., Méndez-Álvarez, E., Hermida-Ameijeiras, Á., Sánchez-Sellero, I., Cruz-Landeira, A., López-Rivadulla Lamas, M. (2001) Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals Potential implications in relation to oxidative stress. *Life Sciences*, 69, 879–889.

SPARTAN 10, Wavefunction, Inc., Irvine, USA, <http://wavefun.com> , 2010.

SPSS Statistics 21.0 for Windows (Statistical Package for Social Scientists) SPSS, Inc., <http://www-01.ibm.com/software/analytics/spss/> , 2014.

Stewart, J.J.P. (2007) Optimization of Parameters for Semiempirical Methods V: Modification of NDDO Approximations and Application to 70 Elements. *Journal of Molecular Modeling*, 13(12), 1173–1213.

Streyer I. (1988) *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, Standford Univ., 3 Edition, New York, U.S.A.,

Şener, E.A., Yalçın, İ. (2002) *Farmasötik/Medisinal Kimyada İlaç Etken Madde Tasarım Yöntemleri-1 Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri (QSAR)*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, Türkiye 40-55.

Thiriote, E., Monard, G. (2008). Combining a genetic algorithm with linear scaling semiempirical method for protein-ligand docking. *J. Mol. Structure THEOCHEM* 12,

Traykova, M., Kostova, I. (2005) Coumarin Derivatives and Oxidative Stres. *International Journal of Pharmacology*, 1(1), 29-32.

Trott, O., Olson, A.J. (2010) Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J Comput Chem*, 31, 455–461.

Türkkan, S., (2013) *Monoamin Oksidaz (MAO) İnhibitör Etkili Yeni Pirazolin Türevleri ile Moleküler Dokıng*. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

Valle, L.G. (2011) Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans. *Biomedicine & Aging Pathology*, 1, 1–7.

Van den Berg, D., Zoellner, K.R., Ogunrombi, M.O., Malan, S. F., Terre'Blanche, G., Castagnoli, N., Bergh, J.J., Petzer, J.P. (2007) Inhibition of monoamine oxidase B by selected benzimidazole and caffeine analogues. *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 3692-3702.

Van den Berg, D., Zoellner, K.R., Ogunrombi, M.O., Malan, S. F., Terre'Blanche, G., Castagnoli, N., Bergh, J.J., Petzer, J.P. (2007) Inhibition of monoamine oxidase B by selected benzimidazole and caffeine analogues. *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 3692-3702.

Vardar, B. (2012) Bazı Kumarinlerin Sentezi ve Antioksidan Aktivitelerinin Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

Wu, C.R., Huang, M.Y., Lin, Y.T., Ju, H.Y., Ching, H. (2007) Antioxidant Properties of Cortex Fraxini and Its Simple Coumarins. *Food Chemistry*, 104, 1464–1471.

Xie, S.S., Wang, X.B., Li, J.Y., Yang, L., Kong, L.Y. (2013) Design, Synthesis and Evaluation of Novel Tacrine-Coumarin Hybrids as Multifunctional Cholinesterase Inhibitors Against Alzheimer's Disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 64, 540-53.

Yılmaz. H. (2012) MCET Metoduyla Tirozin Kinazın İnhibitörleri Olan Flavonoid Türevleri Üzerinde 4D QSAR İnceleme. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, Türkiye.

Youdim, M.B.H., Edmondson, D., Tipton, K. F. (2006) The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature reviews – Neuroscience*, 7, 295-309.



## EKLER

**Tablo Ek-1.** Yeni tasarlanan bileşiklerin model 3 ile tahmin edilen antioksidan aktiviteleri, model 3 için hesaplanan tanımlayıcı değerleri ve şapka değerleri

Bileşik No	Tahmin edilen antioksidan aktivitesi Log(TEAC) (mM)	Tanımlayıcılar		Şapka Değerleri ( $h^*$ )
		IC2	CATS2D_07_DL	
E-32	0.8365	4.128	4	0.1341
E-33	1.3299	4.209	5	0.2267
E-34	0.4552	4.128	3	0.0852
E-35	0.7549	4.069	4	0.1234
E-36	0.5756	4.215	3	0.1066
E-37	0.8711	4.153	4	0.1395
E-38	0.5756	4.215	3	0.1066
E-39	0.2814	4.278	2	0.1013
E-40	0.7983	4.376	3	0.1640
E-41	0.1859	4.209	2	0.0799
E-42	0.9486	4.209	4	0.1538
E-43	1.2331	4.139	5	0.2093
E-44	1.0192	4.260	4	0.1692
E-45	0.1085	4.153	2	0.0657
E-46	0.1818	4.206	2	0.0791
E-47	0.8697	4.152	4	0.1393
E-48	0.4137	4.098	3	0.0794
E-56	0.9569	4.215	4	0.1555
E-57	0.6337	4.257	3	0.1193
E-58	0.8365	4.128	4	0.1341
E-59	0.5548	4.200	3	0.1024
E-60	0.7983	4.376	3	0.1640
E-62	-0.6063	3.912	1	0.0360
E-63	0.8551	4.417	3	0.1823
E-64	0.1043	4.150	2	0.0651
E-65	-0.3097	4.402	0	0.1721
E-66	-0.1885	4.214	1	0.0803
E-67	-0.1434	3.971	2	0.0391
E-68	-0.3982	4.338	0	0.1451
E-69	-0.2881	4.142	1	0.0623
E-70	-0.2513	3.893	2	0.0368

**Tablo Ek-2.** Veri setindeki bileşiklerin ölçülen antioksidan aktiviteleri, model 3 ile tahmin edilen antioksidan aktiviteleri, model 3 için hesaplanan tanımlayıcı değerleri ve şapka değerleri

Bileşik No	Tahmin edilen antioksidan aktivitesi Log(TEAC) (mM)	Ölçülen antioksidan aktivitesi Log(TEAC) (mM)	Tanımlayıcılar		Şapka Değerleri ( $h^*$ )
			IC2	CATS2D_07_DL	
Troloks	0.0221	0.0000	3.815	3	0.0646
1	0.4137	0.3554	4.098	3	0.0794
2	-0.4992	-0.7782	4.265	0	0.1188
3	0.0324	0.2871	4.098	2	0.0546
4	-0.4992	-0.3598	4.265	0	0.1188
5	0.6824	0.5246	3.741	5	0.1938
6	-0.6819	-0.7869	4.133	0	0.0834
7	0.4137	0.2617	4.098	3	0.0794
8	0.4137	0.3772	4.098	3	0.0794
9	0.7377	0.4249	3.781	5	0.1889
10	0.4137	0.3250	4.098	3	0.0794
11	-0.4992	-0.4859	4.265	0	0.1188
12	0.5258	0.3132	4.179	3	0.0969
13	0.3362	0.5571	4.042	3	0.0708
14	-0.1176	0.3579	3.714	3	0.0767
15	-0.7923	-0.7782	3.502	2	0.1073
16	0.3210	0.3032	4.031	3	0.0694
17	-1.1495	-1.3310	3.795	0	0.0640
18	-0.0803	0.0852	3.741	3	0.0725
19	-1.2505	-0.9720	3.722	0	0.0733
20	-1.4000	-1.7782	3.614	0	0.0958
21	0.6824	0.4683	3.741	5	0.1938
22	-1.4871	-1.5740	3.551	0	0.1137
23	0.7377	0.4351	3.781	5	0.1889
24	-0.4970	0.0852	3.991	1	0.0397
25	0.1729	0.3338	3.924	3	0.0618
26	-1.0651	-0.6642	3.856	0	0.0600
27	-0.6763	-0.4859	4.137	0	0.0843
28	-0.6556	-0.7959	4.152	0	0.0876
29	0.1882	0.3509	3.935	3	0.0621
30	-0.6473	-0.8539	4.158	0	0.0889
31	-0.8783	-1.1549	3.991	0	0.0628
32	-0.9863	-1.0000	3.913	0	0.0592
33	-0.7331	-0.8539	4.096	0	0.0763
34	-2.0019	-2.0000	3.179	0	0.2922

Tablo Ek-2'nin devamı

Bileşik No	Tahmin edilen antioksidan aktivitesi Log(TEAC) (mM)	Ölçülen antioksidan aktivitesi Log(TEAC) (mM)	Tanımlayıcılar		Şapka Değerleri ( $h^*$ )
			IC2	CATS2D_07_DL	
35	-1.8441	-2.0000	3.293	0	0.2243
36	-1.1177	-1.0000	3.818	0	0.0621
37	-0.9710	-1.0969	3.924	0	0.0594

**Tablo Ek-3.** Veri setindeki her bileşik için MAO-A izoenzimi ile 10 defa tekrarlanan rijid doking hesaplamaları sonucunda her denemede enzimin aktif bölgesine en düşük serbest bağlanma enerjisi ile bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi ( $\Delta G$ ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı Bileşik No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-5.8	-	-	-	-	-	-	-5.8	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-6.7	-	-	-6.8	-	-	-	-	-6.8
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-7.9	-7.8	-7.9	-	-7.9	-	-7.9	-7.3	-7.9	-7.9
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-7.5	-7.9	-6.4	-	-7.8	-7.5	-6.5	-7.5	-6.8	-
10	-	-7.4	-	-	-6.7	-	-7.4	-7.0	-	-6.7
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-	-	-8.7	-7.6	-	-7.5
13	-8.5	-6.7	-7.9	-	-8.5	-7.0	-8.0	-7.9	-7.9	-7.1
14	-	-9.4	-9.4	-9.4	-9.4	-9.4	-9.4	-9.4	-9.4	-9.4
15	-9.2	-8.5	-7.1	-6.6	-9.2	-9.2	-9.2	-9.2	-8.5	-8.5
16	-9.4	-9.4	-9.4	-9.4	-	-9.4	-9.4	-9.4	-9.4	-9.4
17	-7.6	-7.7	-7.6	-7.7	-7.7	-7.6	-7.7	-7.7	-7.7	-7.7
18	-	-7.8	-	-	-7.8	-	-7.8	-5.8	-	-
19	-8.3	-	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3
20	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0
21	-7.5	-7.5	-	-	-7.5	-	-7.5	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-8.4	-8.4	-8.5	-7.7	-	-	-8.4	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-8.2	-7.7	-7.6	-	-8.2	-7.7	-6.5	-8.2	-8.1
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-7.6	-7.6	-	-	-7.4	-7.3	-7.3	-7.6	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-8.3	-	-7.3	-8.3	-	-	-8.3	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tablo Ek-4.** Veri setindeki her bileşik için MAO-B izoenzimi ile 10 defa tekrarlanan rijid doking hesaplamaları sonucunda her denemede enzimin aktif bölgesine en düşük serbest bağlanma enerjisi ile bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi ( $\Delta G$ ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı Bileşik No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-9.0	-9.0	-7.7	-9.0	-	-	-7.7	-8.0	-9.0	-9.0
2	-9.2	-	-8.2	-8.2	-8.2	-7.8	-8.2	-	-	-
3	-8.6	-	-7.7	-7.8	-8.6	-7.7	-	-7.8	-	-8.6
4	-8.0	-6.2	-8.0	-	-	-	-8.0	-8.0	-	-8.0
5	-8.7	-7.6	-8.7	-	-7.6	7.6	-7.7	-	-8.7	-
6	-8.1	-7.2	-7.6	-8.1	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-	-8.0
7	-7.8	-	-7.8	-	-7.4	-	-7.8	-	-7.4	-
8	-7.8	-7.7	-5.9	-	-7.8	-	-	-7.8	-7.5	-7.5
9	-7.1	-8.2	-	-	-7.1	-8.2	-	-8.2	-8.2	-8.2
10	-9.1	-8.4	-8.4	-7.8	-7.8	-9.1	-	-9.1	-9.0	-
11	-8.3	-9.4	-9.5	-7.4	-9.4	-9.4	-9.4	-	-7.5	-8.3
12	-8.9	-8.0	-8.9	-8.9	-8.5	-	-	-8.5	-8.1	-
13	-	-9.1	-8.2	-8.4	-8.4	-8.5	-9.1	-8.5	-9.1	-
14	-8.7	-8.7	-8.7	-8.3	-8.7	-8.7	-8.7	-	-8.7	-8.7
15	-8.8	-7.6	-8.6	-7.5	-8.8	-8.8	-8.8	-	-8.5	-8.6
16	-8.8	-8.8	-	-	-8.2	-8.7	-8.8	-8.4	-8.8	-8.4
17	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.0	-7.9	-7.9
18	-8.0	-6.8	-	-	-	-8.1	-6.3	-6.1	-6.3	-6.7
19	-7.8	-	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8	-6.8	-7.8	-7.8	-7.8
20	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8
21	-7.8	-7.8	-	-7.2	-6.2	-	-7.7	-7.2	-7.2	-7.8
22	-7.8	-9.1	-9.1	-7.8	-7.8	-9.0	-9.1	-	-7.6	-9.1
23	-8.7	-8.2	-8.2	-8.2	-	-8.7	-7.4	-8.7	-8.7	-8.7
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-7.9	-7.9	-7.9	-7.0	-6.9	-7.0	-7.9	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-7.3	-	-7.3	-	-	-	-	-7.3	-7.3	-
28	-7.9	-	-	-	-	-	-	-	-8.0	-
29	-7.8	-7.8	-	-	-7.6	-7.8	-7.6	-	-6.1	-
30	-11.6	-6.8	-11.6	-11.6	-10.0	-11.6	-11.6	-	-11.6	-11.6
31	-11.5	-7.2	-11.5	-11.5	-	-11.5	-11.5	-11.5	-	-11.5
32	-11.5	-11.5	-11.5	-11.5	-11.5	-11.5	-10.0	-11.5	-11.5	-11.5
33	-9.9	-9.8	-9.7	-9.7	-10.3	-10.3	-10.2	-9.9	-10.2	-10.3
34	-10.3	-	-10.2	-11.6	-10.3	-10.3	-	-11.6	-10.3	-11.5
35	-12.4	-12.3	-12.4	-	-12.4	-11.8	-12.4	-	-	-12.4
36	-10.4	-10.4	-	-9.6	-10.4	-	-9.6	-10.4	-10.4	-10.4
37	-10.0	-	-	-10.0	-10.3	-10.0	-10.0	-10.3	-10.1	-10.2

**Tablo Ek-5.** Veri setindeki her bileşik için MAO-A izoenzimi ile 10 defa tekrarlanan esnek doking hesaplamaları sonucunda her denemede enzimin aktif bölgesine en düşük serbest bağlanma enerjisi ile bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi ( $\Delta G$ ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı Bileşik No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-9.5	-	-10.3	-10.3	-9.7	-10.3	-10.3	-9.2	-10.3	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-9.9	-9.6	-10.0	-10.0	-9.9	-10.0	10.0	-10.0	-9.9	-10.0
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-10.3	-	-10.9	-	-11.1	-11.1	-11.1	-10.9	-	-11.0
6	-6.1	-9.0	-	-8.7	-5.9	-6.1	-	-8.7	-8.7	-5.7
7	-10.3	-9.0	-10.3	-9.4	-10.3	-10.3	-10.3	-10.3	-10.3	-10.3
8	-9.2	-	-9.9	-9.9	-9.1	-	-9.3	-9.9	-9.0	-9.2
9	-10.0	-10.0	-10.0	-10.7	-10.7	-10.7	-	-10.0	-10.0	-10.0
10	-9.7	-9.9	-9.7	-9.9	-	9.7	-9.8	-9.8	-9.7	-9.8
11	-6.3	-7.9	-	-6.2	-	-	-8.0	-7.8	-	-8.0
12	-11.2	-10.4	-11.1	-	-11.1	-11.2	-11.2	-10.4	-11.2	-11.1
13	-11.7	-11.7	-11.7	-	-10.1	-10.0	-10.2	-8.6	-10.1	-10.4
14	-10.9	-10.9	-10.9	-10.8	-10.9	-	-10.2	-10.2	-	-10.8
15	-10.7	-	-	-10.7	-10.7	-10.7	-9.9	-10.7	-10.7	-
16	-11.2	-10.7	-	-11.2	-10.6	-11.0	-10.7	-11.2	-11.2	-10.7
17	-	-7.8	-7.5	-7.7	-7.8	-7.8	-7.5	-7.8	-7.8	-7.8
18	-10.1	-9.6	-10.2	-10.1	-	-10.2	-10.1	-10.1	-	-10.1
19	-8.0	-8.3	-8.1	-8.5	-8.5	-8.0	-8.5	-8.1	-8.5	-8.5
20	-8.1	-7.6	-	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-
21	-10.6	-10.6	-10.6	-10.0	-	-10.0	-10.0	-9.9	-10.6	-10.6
22	-8.5	-8.8	-8.0	-8.9	-8.8	-8.1	-8.8	-5.9	-8.8	-9.0
23	-10.2	-10.2	-10.4	-10.2	-10.2	-10.2	-10.2	-11.2	-10.3	-10.2
24	-9.2	-9.1	-9.2	-9.2	-8.5	-9.2	-9.2	-8.6	-9.1	-9.2
25	-9.5	-6.4	-	-9.4	-9.4	-6.1	-6.2	-9.5	-	-9.5
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-10.4	-10.9	-10.5	-10.4	-10.9	-10.9	-10.9	-10.3	-	-10.9
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-6.2	-
31	-	-10.3	-10.3	-	-10.3	-10.3	-10.3	-10.2	-10.3	-10.3
32	-11.0	-11.0	-11.0	-11.0	-11.0	-11.1	-11.1	-11.0	-11.0	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-5.0	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-12.0	-11.2	-12.1	-11.4	-11.4	-11.2	-12.1	-11.1	-12.0	-8.9
37	-11.0	-10.2	-10.9	-10.0	-10.1	-11.1	-8.3	-9.7	-10.2	-11.1

**Tablo Ek-6.** Veri setindeki her bileşik için MAO-B izoenzimi ile 10 defa tekrarlanan esnek doking hesaplamaları sonucunda her denemede enzimin aktif bölgesine en düşük serbest bağlanma enerjisi ile bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi ( $\Delta G$ ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı Bileşik No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-8.4	-8.9	-8.4	-8.4	-8.2	-8.7	-8.4	-8.2	-8.8	-8.8
2	-9.1	-9.4	-	-9.1	-9.8	-10.5	-9.7	-9.7	-9.8	-10.4
3	-9.0	-8.3	-8.6	-8.8	-7.4	-8.5	-8.6	-8.9	-	8.6
4	-10.4	-8.4	-10.3	-9.7	-9.9	-9.8	-10.4	-8.1	-	-9.7
5	-8.5	-8.3	-7.6	-7.0	-7.8	-7.3	-8.6	-8.3	-8.4	-7.9
6	-9.5	-8.5	-9.1	-8.4	-	-8.4	-8.3	-8.5	-9.4	-8.3
7	-	-	-9.2	-	-9.2	-8.0	-9.3	-9.5	-	-8.0
8	-6.2	-6.3	-	-	-8.3	-6.3	-8.4	-	-8.3	6.4
9	-9.5	-	-9.5	-9.5	-9.5	-8.7	-7.5	-7.6	-7.6	-
10	-8.7	-8.9	-8.9	-	-9.0	-8.8	-8.9	-8.9	-8.9	-
11	-9.2	-9.9	-9.2	-9.7	-9.9	-9.8	-8.5	-9.9	-9.8	-9.7
12	-	-10.6	-10.3	-10.9	-10.4	-	9.1	-10.4	-10.9	-10.4
13	-9.0	-9.0	-8.9	-9.0	-9.0	-9.0	-8.9	-9.0	-	-9.0
14	-10.7	-10.6	-10.6	-10.4	-10.4	-10.6	-10.1	-10.2	-10.6	-
15	-10.2	-10.2	-9.2	-10.1	-10.1	-10.3	-9.7	-9.1	-9.0	-9.7
16	-9.0	-8.8	-9.0	-9.0	-8.8	-8.8	-9.0	-	-8.4	-8.9
17	-7.8	-7.9	-7.8	-7.9	-	-7.9	-	-7.9	-	-8.0
18	-	-9.7	-9.1	-9.3	-9.3	-9.1	-	-9.8	-9.6	-9.1
19	-8.0	-8.3	-8.1	-8.5	-8.5	-8.0	-8.5	-8.1	-8.5	-
20	-8.2	-8.2	-8.1	-	-6.9	-	-7.5	-8.2	-7.6	-
21	-9.5	-9.2	-9.0	-9.2	-9.2	-9.2	-6.4	-9.5	-	-9.1
22	-8.8	-5.7	-8.8	-8.6	-	-8.8	-8.8	-	-9.0	-8.8
23	-8.4	-8.4	-8.6	-8.2	-8.4	-8.7	-8.4	-8.6	-	-8.6
24	-8.8	-8.7	-8.8	-8.6	-8.7	-8.6	-8.8	-8.8	-8.8	-8.7
25	-8.4	-6.5	-8.7	-8.2	-8.4	-8.2	-8.7	-8.4	-8.3	-8.4
26	-	-9.2	-10.1	-9.8	-9.9	-10.2	-10.3	-9.8	-10.3	-9.1
27	-9.1	-9.4	-9.8	-5.7	-5.6	-9.6	-	-10.1	-	-10.2
28	-9.6	-	-9.9	-9.8	-	-	-	-8.1	-	-9.9
29	-7.8	-	-9.5	-9.5	-7.8	-9.5	-7.7	-9.9	-6.8	-7.7
30	-12.0	-12.2	-10.5	-12.1	-10.7	-12.2	-12.0	-10.8	-10.7	-12.2
31	-11.4	-11.4	-11.5	-11.4	-11.4	-11.4	-11.4	-11.4	-11.4	-
32	-11.4	-11.4	-11.3	-11.3	-11.4	-11.3	-11.3	-11.2	-11.4	-11.4
33	-11.2	-10.2	-10.4	-10.2	-11.1	-12.4	-11.9	-11.9	-10.6	-
34	-8.0	-12.9	-8.0	-8.0	-12.9	-	-	-12.2	-12.9	-12.2
35	-13.7	-13.6	-13.6	-13.6	-13.6	-13.6	-13.6	-13.6	-13.6	-13.6
36	-10.8	-9.5	-10.3	-9.5	-10.4	-10.4	-9.4	-9.5	-11.0	-10.8
37	-10.9	-10.9	-11.2	-10.9	-10.9	-11.0	-9.7	-10.9	-10.9	-10.9

**Tablo Ek-7.** Tasarlanan her bileşik için MAO-A izoenzimi ile 10 defa tekrarlanan rijid doking hesaplamaları sonucunda her denemede enzimin aktif bölgesine en düşük serbest bağlanma enerjisi ile bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi ( $\Delta G$ ; kcal/mol) değerleri

<b>Deneme Sayısı</b> <b>Bileşik No</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
E-32	-7.4	-7.5	-7.0	-7.5	-7.5	-7.7	-7.5	-7.5	-7.3	-
E-33	-7.7	-	-8.0	-	-8.0	-	-8.0	-7.3	-	-8.0
E-34	-7.4	-	-6.6	-7.4	-	-6.4	-7.0	-8.5	-8.6	-8.6
E-35	-7.3	-7.1	-	-7.1	-	-6.4	-7.2	-6.4	-6.4	-7.2
E-36	-	-	-6.4	-	8.2	-8.3	-6.6	-	-6.4	-8.3
E-37	-7.0	-7.8	-7.8	-7.7	-7.8	-	-	-6.6	-	-6.6
E-38	-	-	-7.9	-6.6	-6.6	-6.7	-6.7	-6.7	-7.0	-6.7
E-39	-	6.9	-	-8.3	-	-8.4	-	-6.2	-8.4	-
E-40	-7.2	-	-7.0	-7.2	-6.3	-6.5	-6.6	-	-	-
E-41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-43	-6.9	-6.9	-6.9	-6.9	-	-	-	-	-	-5.9
E-44	-6.6	-	-	-	-	-6.1	-	-6.1	-6.1	-6.1
E-45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-56	-7.0	-	-	-	-7.4	-8.2	-7.1	-8.2	-	-
E-57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-63	-7.2	-7.4	-7.4	-7.4	-7.4	-	-	-7.4	-	-
E-64	-7.1	-	-	-7.1	-	-	-	-	-7.1	-7.1
E-65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-66	-7.7	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6
E-67	-7.4	-7.4	-7.4	-7.4	-7.4	-	-7.4	-7.4	-7.4	-
E-68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-69	-7.0	-7.8	-7.8	-7.8	-	-	-	-	-7.0	-
E-70	-	-8.8	-	-7.8	-7.6	-7.6	-	-	-6.9	-



**Tablo Ek-8.** Tasarlanan her bileşik için MAO-B izoenzimi ile 10 defa tekrarlanan rijid doking hesaplamaları sonucunda her denemede enzimin aktif bölgesine en düşük serbest bağlanma enerjisi ile bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi ( $\Delta G$ ; kcal/mol) değerleri

<b>Deneme Sayısı</b> <b>Bileşik No</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>E-32</b>	-9.0	-9.0	-9.0	-9.0	-9.0	-7.9	-7.9	-7.9	-	-
<b>E-33</b>	-	-8.1	-9.0	-8.1	-9.0	-9.0	-8.1	-8.2	-9.0	-
<b>E-34</b>	-8.3	-8.1	-7.2	-8.2	-	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.2
<b>E-35</b>	-6.5	-6.6	-8.0	-8.8	-8.8	-8.0	-6.6	-	-	-8.8
<b>E-36</b>	-	-8.5	-7.1	-8.9	-7.6	-	-8.9	-8.5	-8.9	-8.9
<b>E-37</b>	-9.4	-8.6	-8.6	-8.6	-8.6	-8.6	-8.6	-8.6	-	-
<b>E-38</b>	-8.8	-8.8	-8.0	-8.8	-7.6	-8.1	-8.8	-7.6	-8.8	-8.8
<b>E-39</b>	-7.6	-	-6.3	-7.6	-9.0	-9.0	-9.1	-9.0	-7.6	-9.1
<b>E-40</b>	-9.0	-9.0	-9.0	-9.0	-9.0	-9.0	-9.0	-	-9.0	-
<b>E-41</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>E-42</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>E-43</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>E-44</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>E-45</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>E-46</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>E-47</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>E-48</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>E-56</b>	-9.5	-9.5	-9.4	-8.6	-8.6	-8.6	-8.4	-8.4	-8.6	-
<b>E-57</b>	-9.2	-	-8.5	-	-7.2	-8.4	-9.1	-8.6	-9.2	-9.2
<b>E-58</b>	-7.3	-7.3	-7.3	-7.3	-7.2	-6.7	-	-	-	-
<b>E-59</b>	-	-	-	-	-	-	-	-5.9	-	-5.9
<b>E-60</b>	-9.3	-9.3	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.0	-	7.6
<b>E-62</b>	-9.0	-8.9	-9.0	-9.0	-7.5	-7.5	-7.5	-	-	-
<b>E-63</b>	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.2	-8.2	-	-
<b>E-64</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>E-65</b>	-11.8	-11.8	-11.8	-11.7	-10.2	-10.2	-	-10.2	-	-8.7
<b>E-66</b>	-10.1	-11.4	-11.4	-11.4	-10.1	-11.4	-11.4	-	-10.1	-10.1
<b>E-67</b>	-9.9	-9.9	-11.3	-11.3	-11.3	-11.3	-11.3	-11.3	-	-11.3
<b>E-68</b>	-	-	-10.3	-9.8	-9.8	-9.8	-10.3	-	-10.3	-10.3
<b>E-69</b>	-10.2	-10.2	-10.2	-10.2	-10.2	-10.1	-9.1	-	-9.0	-
<b>E-70</b>	-10.4	-10.4	-10.4	-10.1	-10.1	-10.1	-10.1	-	-	-

### Şema.1. AutoDock Vina ile rijid doking adımları

AutoDockTools çalıştırılır.

#### Protein. pdbqt hazırlanması :

File → Read molecule → Çalışma Klasörü → Vina-tutorial → protein.pdb open



Edit → Hydrogens Bonds → Add → Polar only → OK



Dashboard → protein



Grid → Macromolecule → Choose → Protein → Select molecule



Çalışma Klasörü → Vina-tutorial → protein.pdbqt

#### Gridbox hazırlanması :

Grid → GridBox → Center Grid Box → x center ,y center, z center



Spacing (angstrom)=1.000 x-dimension, y-dimension, z-dimension



Close

#### Ligand .pdbqt hazırlanması :

Ligand → Input → Open → Çalışma Klasörü → Vina-tutorial → ligand.pdb

open ↓

Dashboard → ligand (-) , protein (+) (**Molekül gizleme**)



Ligand → torsion tree → choose torsion → green=rotatable, magenta= non-rotatable, red= un-rotatable (**Dönebilen bağların tanımlanması**)



Ligand → output → save as PDBQT → Çalışma Klasörü → Vina-tutorial

ligand.pdbqt



Quit

### Config dosyasının hazırlanması:

Çalışma klasörü → yeni text dosyası.txt → config.txt

```
receptor = protein.pdbqt  
ligand = ligand.pdbqt  
  
center_x = 11  
center_y = 90.5  
center_z = 57.5  
  
size_x = 40  
size_y = 40  
size_z = 40
```

### Komut isteminin (Command Prompt) çalıştırılması:

All programs  
↓  
Accessories  
↓  
Command prompt  
↓  
cd Desktop\Çalışma klasörü  
↓  
C:\Users\Desktop\Çalışma Klasörü>"\Program Files\The Scripps Research  
Institute\Vina\vina.exe" --config config.txt --log log.txt  
↓  
Enter

### Docking sonucunun incelenmesi ve görüntülenmesi:

AutoDockTools çalıştırılır.

File → Read molecule → Vina\_deneme → protein.pdbqt → Open



File → Read molecule → Vina\_deneme → ligand\_out.pdbqt → Open

## Şema.2. AutoDock Vina ile esnek doking adımları

AutoDockTools çalıştırılır.

### Flexible Docking with AutoDock Vina

#### Hazırlık aşaması

Çalışma klasörü oluşturulur. Protein ve enzim dosyası bu klasörün içine kaydedilir.

protein.pdb     protein dosyasının adı

ligand.pdb     ligand dosyasının adı

#### AutoDock Tools çalıştırılır.

File → Read molecule → Çalışma klasörü → protein.pdb → open  
↓  
Edit → Hydrogens → Add → All Hydrogens → noBondOrder → Yes →  
↓  
OK

Protein kapatılır. Bunun için;

Dashboard → L ↗ protein → ○

#### Ligand.pdbqt hazırlanması

Ligand → Input → Open → Çalışma klasörü → ligand.pdb → Open  
↓  
Ligand → Torsion Tree → Detect Root ...  
↓  
Ligand → Torsion Tree → Choose Torsions ... → Done  
↓  
Ligand → Torsion Tree → Set Number of Torsions... → *fewest atoms* →  
↓  
Dismiss

Ligand → Output → Save as PDBQT → Çalışma klasörü → ligand.pdbqt →  
↓  
Save

Ligand dosyası kapatılır, protein dosyası açılır. Bunun için;

Dashboard → L ↗ ligand → ○

↓  
Dashboard → L ↗ protein → ●

### **Protein.pdbqt hazırlanması**

Grid → Macromolecule → Choose → Protein → Select molecule →  
Training folder  
→ protein.pdbqt

### **Gridbox hazırlanması :**

Grid → GridBox → number of points in x-dimension, y-dimension, z-dimension  
↓  
Spacing (angstrom)  
↓  
Center Grid Box → x center, y center, z center  
↓  
File → Close saving current

### **Esnek ve rijid protein dosyalarının hazırlanması**

Grid → Set Map Types → Choose Ligand → ligand → Select Ligand  
↓  
Flexible Residues → Input → Choose Macromolecule... → protein →  
Select Molecule → OK  
↓  
Select → Select From String → Residue: ARG8(The name and number of  
amino acid)  
→ Add → Dismiss  
↓  
Flexible Residues → Choose Torsions in Currently Selected Residues... →  
↓  
Close

Flexible Residues → Output → Save Flexible PDBQT...

AutoFlex File: type-in; protein\_flex.pdbqt → Save



Flexible Residues → Output → Save Rigid PDBQT...

AutoFlex File: type-in; protein\_rigid.pdbqt → Save



Grid → Set Map Types → Choose FlexRes.... → Protein →

Select molecule providing flexible residues → Quit

### Config dosyasının hazırlanması:

Çalışma Klasörü → yeni text dosyası.txt → config.txt

```
receptor = protein.pdbqt  
flex = protein_flex.pdbqt  
ligand = ligand.pdbqt  
  
center_x = 23.058  
center_y = 31.766  
center_z = -14.398  
  
size_x = 40  
size_y = 40  
size_z = 40  
  
out = out.pdbqt (tercihen)
```

### Komut isteminin (Command Prompt) çalıştırılması:

Tüm programlar



Donatılar



Komut istemi



cd Desktop\Çalışma klasörü



C:\Users\Desktop\Çalışma Klasörü>"\Program Files\The Scripps Research

Institute\Vina\vina.exe" --config config.txt --log log.txt



Enter

### **Docking sonucunun incelenmesi ve görüntülenmesi:**

AutoDockTools çalıştırılır.

File → Read molecule → Çalışma Klasörü → protein.pdbqt → Open



File → Read molecule → Çalışma Klasörü → ligand\_out.pdbqt → Open

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Pınar ERZİNCAN

**Doğum Tarihi:** 11.09.1987

**İletişim:** [pinarerzincan@gmail.com](mailto:pinarerzincan@gmail.com)

### Eğitim Bilgileri

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (2013-2016)

Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümü (2005-2010)

### Yayınlar

1. Erzincan P., Saçan, M.T., Yüce Dursun B., Danış Ö. ,Demir, S., Erdem S., Ogan A. (2015) QSAR models for antioxidant activity of new coumarin derivatives. SAR and QSAR in Environmental Research. 26, 721-737.
2. Küçükgülzel, Ş.G., Koç D., Çıkla, S. P., Özsavcı D., Bingöl, Ö. Ö. , Mega, T.P., Orun, O., Erzincan, P., Erdem, S., Şahin, F. (2015) Synthesis of Tolmetin Hydrazide–Hydrazones and Discovery of a Potent Apoptosis Inducer in Colon Cancer Cells. Arch. Pharm. Chem. Life Sci., 348, 730-742.

### Sözlü Bildiri ve Poster Bildiri:

1. **Erzincan, P.**, Danış, Ö., Yüce-Dursun, B, Gürbüz, S., Erdem, S. S., Ogan, A., Molecular Docking of New Coumarin Derivatives As Selective Inhibitors of Monoamine Oxidase A and B, 2nd International Bau-Drug Design Symposium, 17-18-19 April 2014, Bahçeşehir University, Istanbul, Turkey (Poster Sunumu)
2. Erzincan, P., Danış, Ö., Yüce-Dursun, B, Gürbüz, S., **Erdem, S. S.**, Ogan, A., Monoamin Oksidaz A ve B İnhibitörü Olarak Tasarlanan Yeni Kumarin Türevleri İle Moleküler Doking, 3. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, 20-21-22 Mart 2015, Antalya, Türkiye (Sözlü Sunum)



3. **Kulabaş, N.**, Erzincan,P., Danış, Ö., Erdem, S. S., Ogan, A., Küçükgül, İ., Molecular Modeling Studies On Cox-1 And Cox-2 Inhibition Of Novel Amide Conjugates Of Some Nsaids With Antiinflammatory Activity, International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development, October 15-17, 2015, Eskişehir, Türkiye. (Poster Sunumu)
4. Erzincan, P., Saçan, M.T., Yüce Dursun B., Danış Ö. ,Demir S., **Erdem S.**, Ogan, A., Yüksek Antioksidan Aktiviteye Sahip Yeni Kumarin Türevlerinin İn Siliko Tasarımı, 4. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, 17-20 Mart 2016, Kuşadası, Türkiye. (Sözlü Sunum)
5. Erzincan P., **Erdem S.S.**, Saçan, M.T., Yüce Dursun B., Danış Ö. ,Demir, S., Ogan A., In Silico Approach to Monoamine Oxidase-A Inhibitory Potential of New Coumarine Derivatives, 17th International Conference on QSAR in Environmental and Health Sciences, June 13-17, 2016, Miami Beach, Florida USA. (Poster Sunumu)
6. **Erdem S.S.**, Saçan, M.T., Erzincan, P., Çomak, H., QSAR for Butyrylcholine Esterase (BuChE) Inhibition by Substituted Pyridylene-hydrazone Derivatives, 17th International Conference on QSAR in Environmental and Health Sciences, June 13-17, 2016, Miami Beach, Florida USA. (Poster Sunumu)