

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÜKÜRT İÇEREN ŞİKONİN OKSİM TÜREVLERİNİN MOLEKÜL
MODELLEME ÇALIŞMALARI VE YENİ TÜREVLERİN TASARIMI

Ezgi ÖZEN

KİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KÜKÜRT İÇEREN ŞİKONİN OKSİM TÜREVLERİNİN MOLEKÜL MODELLEME ÇALIŞMALARI VE YENİ TÜREVLERİN TASARIMI

Ezgi ÖZEN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Pervin ÜNAL CİVCİR

Şikonin türevleri, kanser önleyici özellikleri ve ilaç olarak kullanılabilmesi açısından önemli bileşik grubundadır. Günümüzde meme kanseri tedavilerinin birçok yan etkisi bulunmakla birlikte kısıtlı ilaç çeşitliliğine sahiptir. Bu tez çalışmasında, kükürt içeren şikonin oksim türevlendirilerek meme kanserinde ilaç öncüsü olabilecek yeni moleküllerin tasarlanması amaçlanmıştır. Amacımız çerçevesinde, öncelikle literatürde deneysel biyolojik aktiviteleri bilinen şikonin oksim türevlerinin, kuantum kimyasal yöntemlerle hesapladığımız moleküler tanımlayıcı verilerine, istatistiksel algoritmaların uygulanması ile kantitatif yapı-etki etkinlik ilişkilerini (QSAR) açıklayan modeller oluşturulmuştur. Oluşturduğumuz modellerle hesapladığımız aktiflikler arasındaki ilişki açıklanmıştır. Daha sonra, QSAR modeline uyabilecek, meme kanseri tedavisinde ilaç öncüsü olabileceğini düşündüğümüz sanal moleküller tasarlanmıştır. Deneysel biyolojik aktiflikleri bilinen moleküller ve tasarlanan moleküller meme kanseri tedavisinde kullanılan birçok ilacın çok iyi bağlandığı bilinen östrojen reseptörüne (ER) (PDB ID: 26OK) kenetlenmelerini açıklayan doking çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, doking çalışmalarını test etmek için meme kanseri tedavisinde kullanılan bir grup ilaç seçerek aynı reseptöre bağlanmaları da test edilmiştir. Çalışmalar, incelenen tüm moleküllerin biyoyararlanımları, fizikokimyasal özellikleri, farmakokinetikleri, sudaki çözünürlükleri, lipofilisiteyi, ilaç benzerlikleri gibi organizma içindeki absorpsiyon, dağılım, metabolize edilme ve atılım (ADME) özellikleri hesaplanarak devam etmiştir. Son olarak, meme kanserinde yeni bir ilaç türevi olarak kimya, tıp ve eczacılık alanlarına kazandırabilmek için QSAR, doking ve ADME çalışmaları sonuçları, molekülün sentezlenebilirliği ve başlangıç maddesinin bulunurluğu ve ekonomik olup olmadığı incelenerek türetilen modele en uygun ve yüksek biyolojik aktivite gösteren sanal molekül olarak benzil türevi sentezlenmiştir. Böylelikle ilaç tasarımında ligandın protein ile kenetlenmesi belirlenmiştir ve biyokimyasal sürecin aydınlatılmasında literatüre yeni bilgiler oluşturulmuştur.

Şubat 2023, 183 sayfa

Anahtar Kelimeler: Şikonin Türevleri, QSAR, Doking, Molekül Modelleme, ADME

ABSTRACT

Master Thesis

MOLECULAR MODELING STUDIES OF SULFUR-CONTAINING SHIKONIN OXIME DERIVATIVES AND DESIGN OF NEW DERIVATIVES

Ezgi ÖZEN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Pervin ÜNAL CİVCİR

Derivatives of shikonin are in the group of important compounds in terms of their anti-cancer properties and their use as drugs. Nowadays, breast cancer treatments have many side effects, but they have a limited variety of drugs. In this thesis, it is aimed to design new molecules that can be a drug precursor in breast cancer by derivatizing sulphur-containing shikonin oxime derivatives. Firstly, models explaining quantitative structure-effect-activity relationships (QSAR) were created by applying statistical algorithms to the molecular descriptor properties, calculated by quantum chemical methods, for shikonin oxime derivatives, whose experimental biological activities are known in the literature. The relationship between the the activities we calculated with the models and their experimental activities are explained. Then, virtual molecules that could fit the QSAR model and which we think could be drug precursors in the treatment of breast cancer were designed. Molecules with known experimental biological activities and designed molecules have been performed to explain their binding to the estrogen receptor (ER) (PDB ID: 26OK), which is known to bind very well to many drugs used in the treatment of breast cancer. In addition, to test the docking studies, a group of drugs used in the treatment of breast cancer were selected and their binding to the same receptor was performed. The studies continued by calculating the absorption, distribution, metabolization and excretion (ADME) properties within the organism, such as bioavailability, physicochemical properties, pharmacokinetics, water solubility, lipophilicity, drug similarity, of all the molecules studied. Finally, the results of QSAR docking and ADME studies, the synthesibility of the molecule and the availability of the starting material and whether it is economical or not, were examined in order to bring it to the fields of chemistry, medicine, and pharmacy as a new drug derivative in breast cancer, and the benzyl derivative, which is the most suitable and high biological activity virtual molecule for the derived model, was synthesized. Thus, ligand-protein docking has been determined in drug design and and a contribution to the literature was made in elucidating the biochemical process.

February 2023, 183 pages

Key Words: Shikonin derivatives, QSAR, Docking, Molecular modeling, ADME

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Akademik hayata başlamamda, devam edebilme azmi bulmamda ve nihayetinde bu tezin ortaya çıkmasında ayrıca hayatımın her alanında destek ve emeklerini esirgemeyen, zevk ve özveriyle çalıştığım, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım, beni yetiştiren Sayın hocam Prof. Dr. Pervin ÜNAL CİVCİR'e sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezimin ortaya çıkmasında pek çok kişinin değerli katkı ve destekleri var. Öncelikle ve özellikle; lisansüstü çalışmalarımda engin bilgilerini ve desteğini esirgemeyen QSAR çalışmalarımın istatistik hesaplamalarındaki emekleri için Sayın hocam Prof. Dr. İrfan CİVCİR'e (Ankara Üniversitesi Siyasal Bilgiler Fakültesi İktisat Bölümü) ve jürimde yer alan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Özgen ÖMÜR PEKEL'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı) sabrı, güler yüzü, yoğun mesaisi içerisinde sunduğu laboratuvar çalışmalarımındaki emekleri için minnet ve şükran borçluyum. Jürimde yer alarak değerli fikirlerini paylaşan Sayın hocam Prof. Dr. Canan ÜNALEROĞLU'na (Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı) teşekkür ederim.

Ankara Üniversitesi lisansüstü eğitimime başladığım günden itibaren her zaman yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen değerli ekip arkadaşlarım Can KARADENİZ, Zelal AGİN'e, destekleriyle her zaman yanımda olan Öğr. Gör. Hakan ESKİZENGİN'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı) ve ismini sayamadığım tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her anında benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, bugünlere yetiştiren, sonsuz sevgi ve destek veren canım annem Serpil, babam Halil, kardeşim Bekir ÖZEN'e ve halam Solmaz ÖZEN ÜLCAN'a çok teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde araştırmacı olarak görev aldığım tez projemizde, finansal destek sağlayan Ankara Üniversitesi BAP Koordinatörlüğüne (Proje No: 21L0430003) teşekkürlerimi sunarım.

Ezgi ÖZEN
Ankara, Şubat 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1 Şikonin Türevleri Hakkında Genel Bilgiler.....	9
2.1.1 Şikonin türevlerinin biyolojik önemleri.....	9
2.1.2 Kükürt içeren şikonin türevleri	11
2.1.3 Şikonin ve türevlerinin sentezi.....	12
2.2 Hesaplamalı Kimya ile İlgili Kuramsal Bilgiler	15
2.2.1 Molekül modelleme	17
2.2.2 Kantitatif yapı etki ilişkisi (QSAR)	17
2.2.3 Moleküler doking (kenetlenme).....	18
2.2.4 Absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım (ADME).....	20
3. DENEYSEL/TEORİK MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1 Teorik Materyal ve Yöntem	22
3.2 Deneysel Materyal.....	23
3.3 Deneysel Yöntem	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
4.1 Teorik Araştırma Bulguları	28
4.1.1 Yapı analizleri	28
4.1.1.1 Konformasyon analizi.....	28
4.1.1.2 Enerjiler	29
4.1.2 Kantitatif yapı aktivite ilişkisi (QSAR) bulguları	39
4.1.3 Moleküler doking (Kenetlenme) bulguları	51
4.1.4 ADME bulguları.....	58

4.2 Deneysel Araştırma Bulguları.....	69
5.SONUÇ.....	77
KAYNAKLAR	81
EKLER.....	84
EK 1 Sanal Moleküllerin Fizikokimyasal Özellikleri	87
EK 2 Çalışma Seti ile Tahmin Edilen Model ile İlgili Program Çıktısı	90
EK 3 Çalışma Seti ve Test Seti İçin Deneysel ve Hesaplanan pIC50 Grafiği.....	91
EK 4 Modelin Doğruluğunu Test Etmek için Çalışma Seti ile Yapılan Hesaplama Sonuçları.....	92
EK 5 Ligandların Uygun Bulunan Konformasyonların Doking Görüntüsü (A), Ligand ve Reseptörün Aktif Bölge Etkileşimleri (B)	100
EK 6 48 Numaralı Molekül 1,5-dimetoksinaftalinin 1H NMR Spektrumu.....	159
EK 7 49 Numaralı Molekül 1,5-dibromo-4,8-dimetoksinaftalinin 1H NMR Spektrumu	163
EK 8 50 Numaralı Molekül 1,4,5,8-tetrametoksinaftalinin 1H NMR Spektrumu.....	167
EK 9 38 Numaralı Molekül 1,4,5,8-Tetrametoksi-2-naftaldehitin 1H NMR Spektrumu.....	170
EK 10 51 Numaralı Molekül 4-metil-1-(1,4,5,8-tetrametoksi-2-naftalin-2-il) pent-3-en-1-olün 1H NMR Spektrumu	173
EK 11 52 Numaralı Molekül 4-metil-1-(1,4,5,8-tetrameoksinaftalin-2-il) pent-3-en-1-tiyolün 1H NMR Spektrumu	177
EK 12 53 Numaralı Molekül benzil (4-metil-1-(1,4,5,8-tetrametoksinaftalin-2-il) pent-3-en-1-il) sülfanın 1H NMR Spektrumu.....	181
ÖZGEÇMİŞ.....	183

SİMGELER DİZİNİ

°C	Celcius derecesi
μ	Dipol moment
A	Elektron ilgisi
χ	Elektronegatiflik
ω	Elektrofilik güç
I	İyonlaşma potansiyeli
CP	Kimyasal potansiyel
η	Kimyasal sertlik
S	Kimyasal yumuşaklık
N	Nükleofilik güç
E _T	Toplam enerji
MW	Molekül kütlesi

Kısaltmalar

B3LYP	Becke, üç parametrelili, Lee-Yang-Parr korelasyon fonksiyonu
CAN	Seryum (IV) amonyum nitrat
DFT	Yoğunluk Fonksiyonu Teorisi
ER	Östrojen reseptörü
IC ₅₀	Yarı maksimum inhibitör derişimi
IHN	İzoheksil naftazarin
LD ₅₀	Öldürücü derişimin yarısı
QSAR	Kantitatif yapı-aktivite ilişkisi
i	İkili
ii	İkilinin ikilisi
t	Tekli
ü	Üçlü
gt	Geniş Tekli
pç	Pik çokluğu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Kanser türlerinin sıklığı (Anonymous, 20218)	1
Şekil 1.2 Meme kanseri tedavi yöntemleri çeşitleri	2
Şekil 1.3 Hedeflenen şikonin oksim türevlerinin iskelet yapısı	5
Şekil 2.1 Şikonin bileşiğinin açık yapısı	9
Şekil 2.2 Şikoninin ve 1,4 naftakinon oksim türevinin açık yapısı	11
Şekil 2.3 Şikonin bileşiğinin ilk sentezi	13
Şekil 2.4 Prenil metal bromürün karbonil bileşikler ile reaksiyonu sonucu oluşan α ve γ ürünleri	14
Şekil 2.5 Şikonin sentezi	15
Şekil 3.1 Çıkış bileşiğinin genel sentezi	26
Şekil 3.2 Hedef bileşiğin genel sentezi	27
Şekil 4.1 Dönme açılarının genel gösterimi	29
Şekil 4.2 Östrojen reseptör (A) ve referans ligandın yapısı (B)	53
Şekil 4.3 Östrojen reseptör- referans ligand (IOK) etkileşimleri	55
Şekil 4.4 Referans alınan IOK ligandı ile redoking yapılan ligandın karşılaştırılması (Referans ligand (mavi renkli) ve redoking yapılan ligand (yeşil renkli)	55
Şekil 4.5 1,5-Dimetoksinaftalin sentezi	70
Şekil 4.6 1,5-Dibromo-4,8-dimetoksinaftalin sentezi	71
Şekil 4.7 1,4,5,8-Tetrametoksinaftalin sentezi	72
Şekil 4.8 1,4,5,8-Tetrametoksi-2-naftaldehit sentezi	73
Şekil 4.9 4-Metil-1-(1,4,5,8-tetrametoksinaftalin-2-il)pent-3-en-1-ol sentezi	74
Şekil 4.10 4-Metil-1-(1,4,5,8-tetrameoksinaftalin-2-il) pent-3-en-1-tiyol sentezi	75
Şekil 4.11 Benzil (4-metil-1-(1,4,5,8-tetrametoksinaftalin-2-il) pent-3-en-1-il) sülfan sentezi	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Meme kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlar ve çalışma mekanizmaları	3
Çizelge 1.2 Kükürt içeren şikonin oksim türevlerinin subsitüent (R) grupları, numaralandırılması ve IUPAC adlandırılması	5
Çizelge 4. 1 Moleküllerin enerjilerine ait hesaplama sonuçları	30
Çizelge 4.2 Moleküllerin HOMO ve LUMO enerjilerine, HOMO-LUMO enerji farklarına ve dipol momentlerine ait hesaplama sonuçları	32
Çizelge 4.3 Hedef moleküllerin iyonlaşma enerjileri, elektron ilgileri ve elektronegatiflikleri .	34
Çizelge 4.4 Çalışılan moleküllere ait kimyasal sertlik ve kimyasal yumuşaklık değerleri	36
Çizelge 4.5 Hedef moleküllerin hesaplanmış elektrofilik ve nükleofilik güçleri	38
Çizelge 4.6 Pearson korelasyon matrisi	41
Çizelge 4.7 Çalışma ve test setine ait molekül numaraları	43
Çizelge 4.8 Çalışma seti için bulunan ve kabul edilebilir bir QSAR model için istatistiksel olarak önerilen parametre değerleri.....	44
Çizelge 4.9 Çalışma seti için hesaplanan ve deneysel pIC_{50} değerleri ve aralarındaki fark	45
Çizelge 4.10 Test seti için hesaplanan ve deneysel pIC_{50} değerleri ve aralarındaki fark.....	46
Çizelge 4.11 Test seti için bulunan ve kabul edilebilir bir QSAR model için istatistiksel olarak önerilen parametre değerleri.....	46
Çizelge 4.12 Modelin doğruluğunu belirlemek için çeşitli yöntemlerle yapılan hesaplama sonuçları	46
Çizelge 4.13 Tasarlanan sanal moleküller	48
Çizelge 4.14 Sanal moleküllerin hesaplanan pIC_{50} değerleri.....	50
Çizelge 4. 15 Kükürt içeren şikonin oksim türevlerine referans alınan meme kanseri ilaçları ve numaralandırılması	52
Çizelge 4.16 Moleküllerin östrojen reseptörü ile kenetlenme sonuçları	56
Çizelge 4.17 Bileşiklerin fizikokimyasal özellikleri.....	58
Çizelge 4.18 Bileşiklerin ilaç benzerlikleri ve toksisite özellikleri.....	61
Çizelge 4.19 Bileşiklerin ADME özellikleri.....	64
Çizelge 5.1 Çalışılan tüm moleküller arasında en düşük bağlanma enerjisine sahip moleküller.....	78
Çizelge 5.2 Benzil türevinin sentez basamaklarının verimi.....	80

1. GİRİŞ

Kanser dünyada görülme sıklığı giderek artış gösteren bir sağlık sorunudur ve gelişmiş ülkelerin ölüm istatistiklerinde kadınlar arasında en çok görülüp ölüme neden olan kanser türlerinden biri meme kanseridir (Şekil 1.1). Erkeklerde de görülmekle beraber, kadın vakaları erkek vakalarından 100 kat fazladır (Anonymous, 20218).

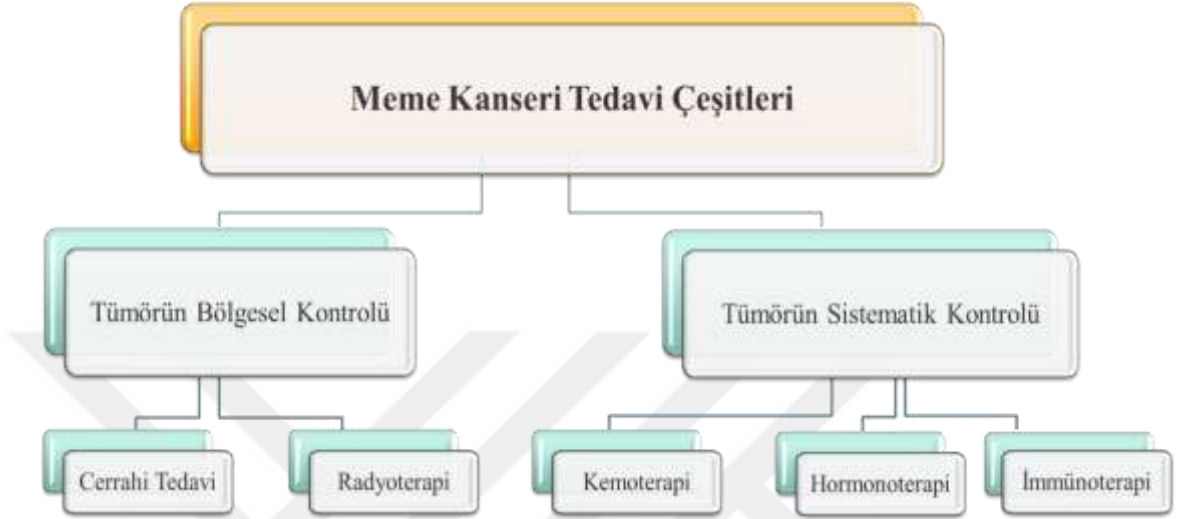
Meme kanseri, meme dokusunu oluşturan hücrelerdeki gruplardan birinin değişime uğrayarak kontrolsüz olarak çoğalması nedeniyle ortaya çıkan kanser türüdür. Kanserli doku, yakın çevresinden sonra, memeye yakın lenf bezlerine yayılmaktadır. Erken tanı edilmezse diğer organlara yayılarak tedavisi olanaksız bir evreye geçebilmektedir.



Şekil 1.1 Kanser türlerinin sıklığı (Anonymous, 20218)

Meme kanserinin farklı biyolojik alt tipleri bulunmaktadır ve tedavi seçimleri buna göre değişmektedir. Meme kanseri, östrojen veya progesteron reseptörleri (HR) ve insan epidermal büyüme faktörü 2 (ERBB2; eski adıyla HER2) için moleküler belirteçlerin varlığına veya yokluğuna göre 3 ana alt tipe ayrılır: HR+/HER2- (hastaların %70'i), HR+/HER2+ (%15-20) ve üçlü negatiftir (%13) (Burstein HJ vd., 2019). Meme kanserinin tedavisinde bölgesel ve sistematik yaklaşımlar yapılmaktadır. Uygulanan tedavi seçenekleri, kanserin evresi ve tedavi toksisitesi bedenin tüm sistemleri üzerine

bölgesel veya sistemik olarak etki etmektedir. Bu nedenle, meme kanseri tedavisindeki yaklaşımlar tümörün bölgesel ve sistematik kontrolü için ikiye ayrılmaktadırlar. Bunlar tedavi seçeneklerine göre alt başlıklara ayrılmaktadır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Meme kanseri tedavi yöntemleri çeşitleri

Günümüzde meme kanseri ile ilgili yapılan çalışmalar ile anti kanser ilaçların yan etkileri azaltılarak hastaların yaşam kalitesinin artırılması hedeflenmektedir.

Anti kanser ilaçların amacı; hastanın normal hücrelerine zarar vermeden tümör hücresinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya yok etmektir. Bu ilaçların kanser hücresine karşı seçicilikleri azdır. Kanser hücrelerini yok ettikleri gibi, hızlı bir biçimde çoğalmakta olan normal hücreleri de yok edebilirler.

Meme kanseri tedavisinde kullanılan anti kanser ajanların ilaç çalışma mekanizmaları antrasiklinler, antimikrotübüller, alkilleyici ajanlar ve hormon/hormon antagonistleri olarak 4 ana başlıkta incelenmektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1 Meme kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlar ve çalışma mekanizmaları

İLAÇ ÇALIŞMA MEKANİZMASI	SPESİFİK İLAÇ
ANTRASİKLİNLER Antrasiklinler, DNA ve RNA sentezine müdahale ederler. DNA ve RNA sentezini engellemeleri replikasyonu (ikileşme) önler ve böylece kanser hücrelerinin büyümesi durur.	Mitoksantron Doxorubicin (Adriamisin) Epirubicin (Ellence)
ANTİMİKROTÜBÜLLER Mikrotübüller hücre içi iskelet sisteminin yapısını oluştururlar, hücre bölünmesi sırasında kromozomların transferinde, dokudan dokuya değişen çeşitli kimyasallarla birlikte organellerin ve kimyasalların hücre içine ve hücre dışına taşınmasında kullanılır. Antimikrotübüller ile tümörlü hücrelerin bölünmesi ya da taşınması engellenmektedir.	Pactitaxel (Taxol) Docetaxel Abraxane
ALKİLLEYİCİ AJANLAR Bu ilaçlar kanser hücrelerinin DNA'sına zarar vererek kendilerini kopyalamalarını engeller.	Siklofosfamid Fluorourasil
HORMON VE HORMON ANTAGONİSTLERİ Östrojen ve progesteron pozitif meme kanseri hastalarının doku ve organlarında hücre sayısının hızlı artışını durdurmaktadır.	Faslodex Femara Tamoxifen

Bu tez çalışmasında, meme kanseri tedavisinde kullanılan anti kanser ilaçların yan etkilerinden oluşan sorunlar göz önünde bulundurularak yeni ilaçlar önerilmesi ve ilaç çeşitliliğinin artırılması amaçlanmıştır. Son yıllarda şikoninin yapısal değişimleri esas olarak naftazarin halkasına ve yan zincirinin hidroksil gruplarına odaklanmış ve şikonin

türevlerinin sentezi ve anti kanser aktiviteleri üzerine birçok araştırmalar yapılmıştır. Bu türevler, *in vitro* olarak ana bileşik şikonin ile karşılaştırılmış ve daha güçlü sitotoksik aktivite gösterirken, daha fazla toksisite ve normal ya da kanserli hücre fark etmeksizin hücre ölümü sebebiyle klinik öncesi ilaç adayı olarak gelişmede başarısız olmuştur. Bu çalışmada ise kükürt içeren şikonin oksim türevleri seçilmiştir. Yapısında kükürt içeren şikonin türevleri, oksijen içeren şikonin türevlerinden biyolojik olarak daha etkin olmasından dolayı kanserli hücrelere doğrudan etki ederek hücreyi öldürmeye ya da fonksiyonlarını durdurmayı hedeflemektedir (Dhar vd 1999).

Amacımız doğrultusunda, ilk olarak hedeflediğimiz kükürt içeren şikonin oksim türevlerinin deneysel olarak ölçülmüş MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı biyolojik aktivite (IC_{50} , yarı maksimum inhibitör derişimi) verilerinin, kuantum mekaniksel yöntemlerle hesaplayacağımız moleküler tanımlayıcı (descriptor) verilerine, bazı istatistik algoritmaların uygulanması ile QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships-Kantitatif Yapı Aktivite İlişkisi) modelleri oluşturmaktır. Elde ettiğimiz QSAR modelini kullanarak:

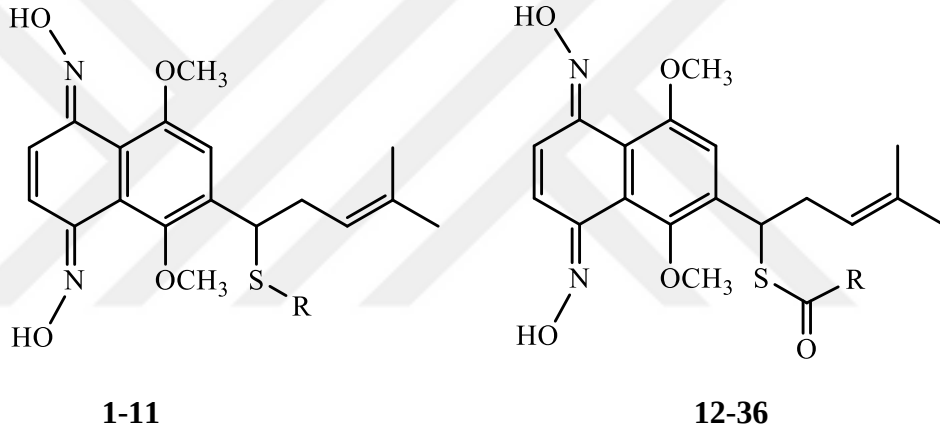
- a) Modeldeki moleküler tanımlayıcılar yorumlanacak, biyolojik etkinin hangi tanımlayıcılara bağlı olarak değiştiği açıklanacaktır,
- b) Tasarlanan sanal moleküllerin aktifliklerini (IC_{50}), QSAR modelleri ile kantitatif olarak belirleyip literatürdeki moleküller ile karşılaştırılarak ve tasarlanan moleküller üzerinde kimyasal çeşitleme yoluyla değişiklikler yapılarak maksimum biyolojik aktiviteyi veren sanal moleküller belirlenecektir.
- c) Biyolojik aktivitesi yüksek öncü ilaç adayı olarak tasarlanan sanal molekül sentezlenecektir.

Bir sonraki adımda, bütün moleküllerin uygun MCF-7 meme kanseri hücresi reseptörüne bağlanmalarını açıklayabilmek için doking (yerleştirme) çalışmaları yapılacaktır. Aynı işlemlerin tasarladığımız sanal moleküllere uygulanması ile sanal moleküllerin reseptöre bağlanmaları açıklanacaktır, referans alınan meme kanseri ilaçları ile kıyaslayarak açıklanacaktır.

Daha sonraki adım da ise moleküllerin öncü ilaç olabilmeleri için gerekli ADME (absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım) parametreleriyle organizma içindeki dağılımı, toksisiteleri açıklanacaktır.

Çalışmalarımızın son aşamasında tasarladığımız sanal moleküllerden sentezlenebilir ve ekonomik olan bir tanesinin sentezi amaçlanmıştır.

Çalışılması hedeflenen kükürt içeren şikonin türevleri moleküllerin, substitüent (R) grupları, numaralandırılması ve IUPAC adlandırılmaları şekil 1.3 ve çizelge 1.2’de verilmiştir



Şekil 1.3 Hedeflenen şikonin oksim türevlerinin iskelet yapısı

Çizelge 1.2 Kükürt içeren şikonin oksim türevlerinin substitüent (R) grupları, numaralandırılması ve IUPAC adlandırılması

Molekül No	Substitüent (R) grupları	IUPAC Adı
1		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-6-(1-(etiltiyo)-4-metilpent-3-en-1-il)- 5,8-dimetoksinaftalin-1,4-dion dioksim
2		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-6-(1-(bütiltiyo)-4-metilpent-3-en-1-il)- 5,8-dimetoksinaftalin-1,4-dion dioksim
3		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-6-(1-(izopentiltiyo)-4-metilpent-3-en-1-il)- 5,8-dimetoksinaftalin-1,4-dion dioksim

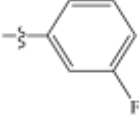
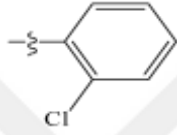
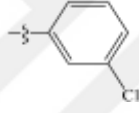
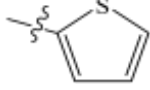
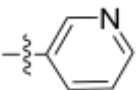
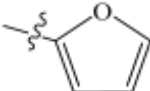
Çizelge 1.2 Kükürt içeren şikonin oksim türevlerinin substitüent (R) grupları, numaralandırılması ve IUPAC adlandırılması (devam)

Molekül No	Substitüent (R) grupları	IUPAC Adı
4		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5,8-dimetoksi-6-(4-metil-1-((3-metilbüt-2-en-1-il)tiyo)pent-3-en-1-il)naftalin-1,4-dion dioksim
5		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-6-(1-(heksiltiyo)-4-metilpent-3-en-1-il)-5,8-dimetoksinaftalin-1,4-dion dioksim
6		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-6-(1-(heptiltiyo)-4-metilpent-3-en-1-il)-5,8-dimetoksinaftalin-1,4-dion dioksim
7		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5,8-dimetoksi-6-(4-metil-1-(oktiltiyo)pent-3-en-1-il)naftalin-1,4-dion dioksim
8		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5,8-dimetoksi-6-(4-metil-1-(noniltiyo)pent-3-en-1-il)naftalin-1,4-dion dioksim
9		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-6-(1-(desiltiyo)-4-metilpent-3-en-1-il)-5,8-dimetoksinaftalin-1,4-dion dioksim
10		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-6-(1-(dodesiltiyo)-4-metilpent-3-en-1-il)-5,8-dimetoksinaftalin-1,4-dion dioksim
11		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5,8-dimetoksi-6-(4-metil-1-(((22,6 <i>E</i>)-3,7,11-trimetildodeka-2,6,10-trien-1-il)tiyo)pent-3-en-1-il)naftalin-1,4-dion dioksim
12		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) etantiyonat
13		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) propantiyonat
14		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 3-metilbütantiyonat
15		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 3-metilbüt-2-entiyonat
16		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) heksantiyonat
17		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) benzotiyonat

Çizelge 1.2 Kükürt içeren şikonin oksim türevlerinin substitüent (R) grupları, numaralandırılması ve IUPAC adlandırılması (devam)

Molekül No	Substitüent (R) grupları	IUPAC Adı
18		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 4-metilbenzotiyonat
19		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 4-(triflorometil)benzotiyonat
20		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 4-nitrobenzotiyonat
21		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 4-((ter-butoksikarbonil)amino)benzotiyonat
22		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 4-aminobenzotiyonat hidroklorür
23		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 3,4-dimetoksibenzotiyonat
24		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 3,4,5-trimetoksibenzotiyonat
25		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 2-metoksibenzotiyonat
26		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 3-metoksibenzotiyonat
27		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 4-metoksibenzotiyonat
28		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 2-florobenzotiyonat

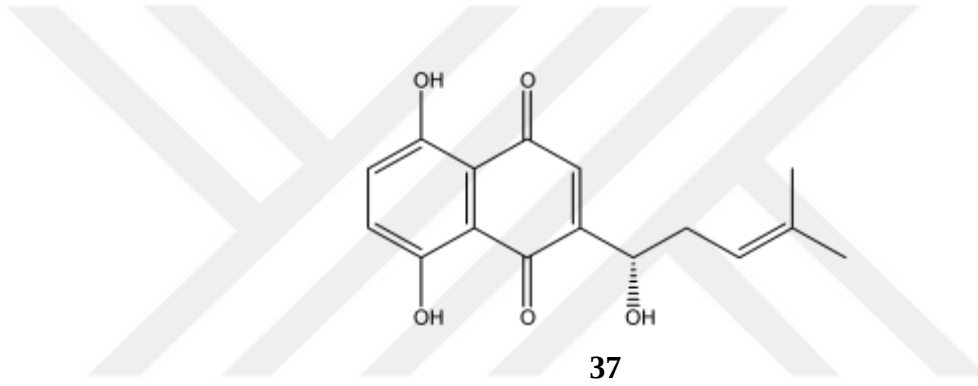
Çizelge 1.2 Kükürt içeren şikonin oksim türevlerinin subsitüent (R) grupları, numaralandırılması ve IUPAC adlandırılması (devam)

Molekül No	Substitüent (R) grupları	IUPAC Adı
29		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 3-florobenzotiyonat
30		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 4-florobenzotiyonat
31		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 2-klorobenzotiyonat
32		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 3-klorobenzotiyonat
33		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) 4-klorobenzotiyonat
34		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) tiyofen-2-karbotiyonat
35		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) piridin-3-karbotiyonat
36		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksiimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalen-2-il)-4-metilpent-3-en-1-il) furan-2-karbotiyonat

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Şikonin Türevleri Hakkında Genel Bilgiler

Lithospermum eritrohizonun bitki köklerinden izole edilen en önemli 1,4-naftakinonlardan biri olan şikonin (IUPAC adlandırması: 5,8-dihidroksi-2-((1S)-hidroksi-4-metilpent-3-en-1-il) naftalin-1,4-dion) (Şekil 2.1), büyük anti kanser aktivitesi nedeniyle önemli bir moleküldür (Andujar vd. 2013). Şikoninler, organik bir bileşik olan naftalinden türetilmiştir ve bu bileşikler 1,4-naftakinon türevleri olarak dünyada azoboyar madde olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.1 Şikonin bileşiğinin açık yapısı

Naftakinon türevli bileşikler kanser tedavisinde önemli etkiler göstermişler ve klinikte kullanılabilir türevlerinin sentezlenebilir olmasından dolayı da ilaç olarak kullanılmaktadır. Şikoninin yapısal değişimleri naftalin halkası ve yan zincirindeki hidroksil grubu üzerinden yapılmaktadır. Son yıllarda, anti kanser ilaç üretme çalışmalarının artmasıyla birlikte farklı şikonin türevlerinin sentezi üzerine de pek çok çalışma yapılmaktadır (Su vd. 2010).

2.1.1 Şikonin türevlerinin biyolojik önemleri

Şikonin, antimikrobiyal, antifungal, antikanser, anti-enflamatuar ve antitrombotik özellikleri ve önemli farmakolojik aktiviteleri sayesinde çok araştırılan sekonder bitki metabolitidir (Sut vd. 2017). Şikonin türevleri ise *Boraginaceae* ailesinin üyeleri arasında olan naftakinon pigmentleridir. Şikoninin kanser önleyici etkisi bulunmaktadır; bunlar

DNA düzenlenmesinde, replikasyon, rekombinasyon, transkripsiyon dâhil olmak üzere DNA topoizomerazların aktivitelerini inhibe edebilir ve ATP üretiminin ana kaynağını inhibe ederek kanser hücresinin büyümesini önleyebilmektedir. (Li vd. 2014).

Alkanin ve şikonin, hidroksinaftakinonların izohekzenilnaftazarin (IHN) türevleridir. Şikoninler lipofilik özelliklerinden dolayı farmakokinetik ve farmakodinamikte farklı fonksiyonel grupların moleküle dahil edilmesiyle ilaç geliştirmede önemli rol oynamaktadır. Bu durum ise üzerinde ilaç-hedef aktivite araştırması yapmak gerektiğiyle ilgili yol göstermektedir.

Şikonin bileşikleri ve türevleri ile ilgili kaynak taraması aşağıda verilmiştir:

Alkanin ve şikonin kiral grubu, başta yara iyileştirici, antikanser, antienflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan, radikal süpürücü ve antitrombotik aktiviteleri ile üzerinde pek çok çalışma yapılan potansiyel farmasötiklerdir (Papageorgiou vd. 2006).

Arnebia bitki türleri üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmalarında, köklerden izole edilen bazı naftakinonların antibakteriyel, antitümör, antifungal, özellikleri ortaya çıkarılmıştır (Sasaki vd. 2002).

Şikoninler, lipozomların *in vitro* sitotoksiteleri üç insan kanser hücre hattına (meme, glioma ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) karşı test edilmiştir ve büyüme inhibitör aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir (Kontogiannopoulos vd. 2011).

Lithospermum eritrohizonun'dan izole edilen şikoninin, MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Şikonin uygulanan hücrelerde apoptik DNA fragmentasyonu oranının doz bağımlı olarak arttığı gözlenmiştir (Hou vd. 2006).

Yao ve Zhou'ya ait çalışmada (2010), şikoninin antiöstrojenik aktivitesi meme kanseri hücreleri üzerinde incelenmiştir. Şikoninin, östrojen reseptörü α (ER- α) protein düzeyini

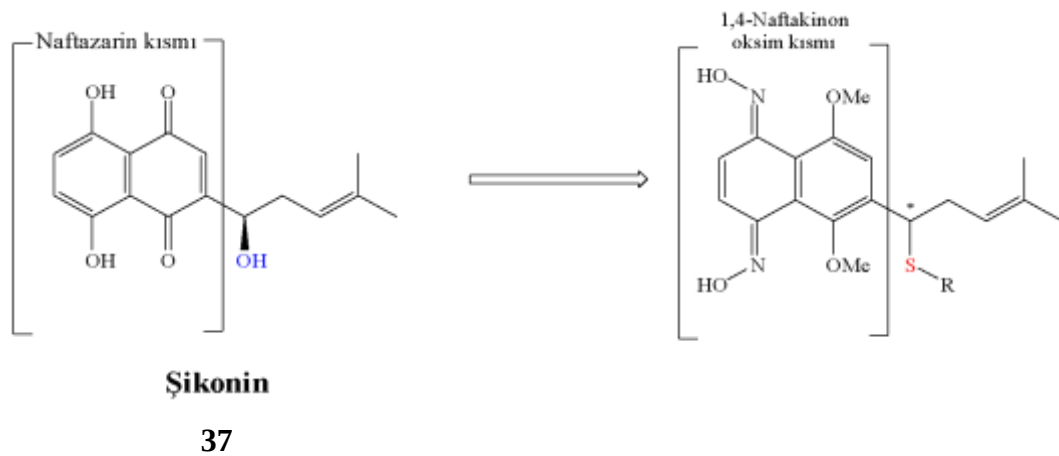
azalttığı bulunmuştur ve şikonin ER- α pozitif meme kanseri hücrelerinin hormon tedavisinde potansiyele sahip olduğu belirtilerek yeni ilaç gelişmeleri için bir hedef olarak önerilmiştir.

Zhou vd. (2010), şikoninden yola çıkarak 22 adet 5,8-dimetil açılşikonin türevi sentezlemişler ve sitotoksitelerini karşılaştırmışlardır ve bazılarının MCF-7 hücrelerinde seçici sitotoksite gösterdiklerini belirlemişlerdir.

2.1.2 Kükürt içeren şikonin türevleri

Kükürt içeren şikonin oksim türevleri, insanda kolon (HCT-15), mide (MGC-803), karaciğer (Bel7402), meme (MCF-7) kanser hücreleri ve insan derisinin fibroblast (HSF) hücrelerinde seçici olarak güçlü sitotoksik etki göstermiştir (Huang vd. 2018). Sitotoksik etki gösteren maddeler, hücreye toksik şekilde etki ederek hücreyi öldüren ya da fonksiyonunu durduran maddelerdir.

Dhar ve ark. 1999 yılında kükürt içeren 6-konumunda 5,8-O-dimetil-1,4-naftakinon türevlerinin, oksijen içerenlerden daha güçlü sitotoksik aktivite gösterdiğini ve benzerlerinden önemli ölçüde daha yüksek biyolojik aktivite gösterdiklerini açıklamışlar ve çalışmalarında şikonin türevlerinin sentezinde 1,4-naftakinonu (naftazarin) korurken yan zincirdeki hidroksil grubunu kükürt analogu ile değiştirmişlerdir (şekil 2.2).



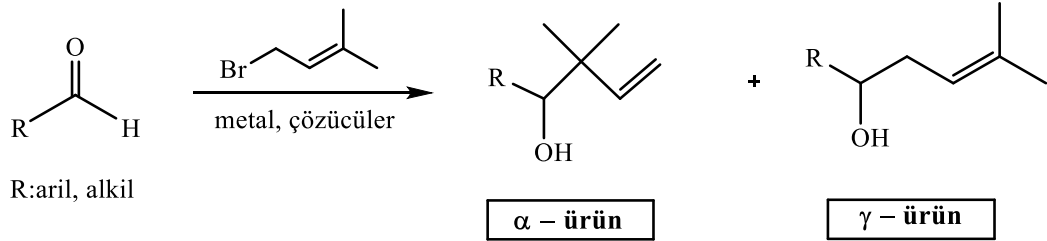
şekil 2.2 şikoninin ve 1,4 naftakinon oksim türevinin açık yapısı

2.1.3 Şikonin ve türevlerinin sentezi

Literatür araştırmalarına göre şikonin ve türevlerinin sentezi birçok yöntemle yapılmaktadır. Bu yöntemlerle ilgili bilgiler aşağıda verilmiştir:

Başarılı bir şikonin sentezi için öncelikle naftazarin kısmında koruma gruplarıyla çalışılması ardından korumanın kaldırılması gerekmektedir. Büyük ölçekte hazırlanabilen 38 numaralı 1,4,5,8-tetrametoksi-2-naftaldehit, tam korumalı bir naftazarin türevidir ve şikoninin yayınlanmış sentezlerinde başlangıç maddesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Terada ve ark. (1983) şikoninin ilk sentezini gerçekleştirmişlerdir (Şekil 2.3). Şekil 2.3 deki ara ürün 39, yüksek verimle Grignard reaktifinin [(2-(2-metil-1,3-dioksolan-2-il)etil) magnezyum bromür] 38'e eklenmesiyle elde edilmiştir. Bir sonraki basamakta hidroliz ve metilmagnezyum iyodür ilavesiyle, altı karbonlu yan zinciri oluşmuştur ve şikonin türevi 40 elde edilmiştir. Daha sonra iki aşamalı basamakda, amonyum seryum nitrat (CAN), AgO/HNO₃] ile 40'tan sırasıyla, %70 ve %27 verimlerle naftazarin elde edilerek 42 numaralı ürüne ulaşılmıştır. Molekül 42'nin piridin içinde asetik anhidrit ile tepkimesi seçici olarak triasetat içeren 43 numaralı bileşiği vermiştir. Daha sonra tiyonil klorür reaksiyonu ve eliminasyon ile 44 numaralı bileşik elde edilmiştir. Son basamakta, (±)-şikonin elde etmek için asetat gruplarının bazik hidrolizi ile yapılmıştır. Bu yaklaşımın toplam verimi çok düşük olmasına rağmen (sadece %2,1), daha sonraki yapılacak 37 numaralı (±)-şikoninin sentezi için yol gösterici olmuştur (Rubing vd. 2012).

Devamındaki yıllarda pek çok araştırmacı şikonin sentezinin verimi arttırmaya yönelik çalışmalar yapmıştır. Karbonil bileşiklerine prenıl bromür katılarak prenillenmesi, baskın bir ürün (α) ve küçük/hiç gözlenmeyen ürün (γ) seçiciliği ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.4) (Zhao vd 2008, 2011).



Şekil 2.4 Prenıl metal bromürün karbonil bileşikleri ile reaksiyonu sonucu oluşan α ve γ ürünleri

Zhao vd (2011), şikonin sentezini (şekil 2.5) iki adımlı yöntemle gerçekleştirmişler ve gama ürünü seçici olarak elde etmişlerdir. Şekil 2.5'teki 38 numaralı çıkış bileşiğinden, 45 numaralı [4-metil-1-(1,4,5,8-tetrametoksinaftalin-2-il)pent-3-enol] bileşiği elde etmek için çinko metali katalizörlüğünde prenıl bromür eklemişler ve burada gama ürünü baskın olarak elde etmişlerdir. Daha sonra heksametilfosforamid (HMPA) eklenmesi ve ısıtılması ile şekil 2.4'deki istenmeyen alfa ürünü, elde edilmek istenen gama ürüne dönüşmektedir. Şekil 2.5'te şikonin iskelet yapısını oluşturabilmek için halkadaki metoksi gruplarının tamamının hidroksil yapısına çevrilmemesini seryum amonyum nitrat reaktifi ile önce kinon yapısı 46'ya dönüştürerek sağlamışlardır. Sonrasında AgO/HNO₃ ile yapıdaki metoksi grubunu hidroksil grubuna yükseltgeyerek ($\pm$)-şikonin 37 elde etmişlerdir. Bu yöntem, ($\pm$)-şikoninin sentezi için en kısa yoldur, ancak genel verim (%15,4) koruma kaldırma adımında indirgenme basamağındaki bariz sınırlama nedeniyle hala orta düzeyde kalmıştır.

Kimyanın birçok alt dalı olmakla beraber bu tezin araştırma konusunu kapsayan hesaplamalı kimya dalı, teorik genellemeler geliştirerek kimya problemlerini çözmeye yardımcı olmak için bilgisayar simülasyonunu kullanmaktadır. Bu yöneme geçiş ise; hidrojen moleküler iyonunun ve kuantum çok gövdeli problemlerin analitik olarak çözülememesiyle başlamıştır. Normalde deneyler ile elde ettiğimiz verileri hesaplamalı kimya sayesinde destekleyebilirken, gözlemleyemediğimiz ya da hiç çalışılmamış kimyasal olayları da tahmin edebilmektedir. Bu teknik yeni ilaç grupları ve materyallerin tasarımında, biyomoleküllerde, polimerlerde, inorganik ve organik moleküllerin bilgisayar ortamında modellenmesi ve simülasyonu ile ilgilenen oldukça hızlı gelişmekte olan bir disiplindir. Hesaplamalı kimya, yeni teorik yöntemleri geliştirmeye dayalı değildir, doğrudan kimyasal problemlere uygun sonuç bulmayı hedeflemektedir.

Hesaplamalı kimya; tüm kimyasal yapılara ve tepkimelere moleküler düzeyde bakar ve moleküler yapının en kararlı olduğu geometrik parametreleri kullanarak molekülün yapısı, mutlak ve bağıl etkileşimli enerjileri, elektronun yük yoğunluğunun dağılımı, dipolü, titreşim frekanslarını, reaktivliğini, spektroskopik niceliklerini gibi çok sayıda örneklerin özelliklerini bulmayı amaçlar. Temel olarak algoritmalar temelindedir: Schrödinger eşitliğine çözüm aramaktadır.

Hesaplamalı kimya da kullanılan yöntemleri dört gruba ayırabiliriz:

- Moleküler Mekanik (MM)
- Kuantum Mekaniği (QM)

Yarı denel yöntemler

Ab initio yöntemler

Yoğunluk fonksiyonu teorisi (DFT)

- Moleküler Dinamik (MD)
- Hibrit Yöntemler (QM/MM veya QM/MD)

2.2.1 Molekül modelleme

Moleküler modelleme, hesaplamalı kimya ve çeşitli arayüz tasarımlarıyla moleküler yapıları, özellikleri araştırmak için kullanılan bir tekniktir. Moleküler modelleme tekniklerine ait yaklaşımlar üç temel sınıfa ayrılırlar, bunlar: moleküler dinamik, kuantum mekaniği ve moleküler mekaniktir.

Moleküler modelleme çalışması yapabilmek için önce moleküller arasında ve moleküller içindeki etkileşimleri açıklamak üzere bir model seçilir. Bu model en genel iki teknik olan kuantum mekaniği (QM) ve moleküler mekanik (MM) hesaplamalarıyla elde edilir. Modeller, hesaplanan sistemdeki moleküllerin enerjilerini bulmaya olanak sağlar ve molekül yapısındaki değişimlerde (bağ uzunluğu, bağ açısı veya dönme açısı) sistemin enerjisinin nasıl etkilendiğini açıklar.

2.2.2 Kantitatif yapı etki ilişkisi (QSAR)

Kantitatif yapı etki (aktivite) ilişkisi, QSAR, Corvin Hansch'ın 1962 yılında başlattığı çalışmalarla ortaya çıkan ve İngilizce "Quantitative Structure Activity Relationships" kelimelerinin baş harfleri kullanılarak oluşturulan bir terimdir.

Kantitatif yapı etki ilişkileri analizleri, kimyasal bileşiklerin moleküler özellikleri (fizikokimyasal/yapısal özellikleri) ile biyolojik aktiviteleri arasındaki ilişkiyi matematiksel yöntemlerle nicel olarak çözümleme çalışmalarıdır. Bu analizleri yürütebilmek için,

- Gözlenen biyolojik etkiyi aynı mekanizmada ortaya çıkaracak olan bir grup test serisi kimyasal bileşiğe,
- Bu seride yer alan kimyasal bileşiklerin veya substitüentlerin fizikokimyasal ya da yapısal özelliklerini nicel olarak tanımlayabilecek parametrik sabitlere,
- Bu test serisindeki bileşiklere ait biyolojik aktivitenin aynı koşullar altında nicel olarak saptanmasına,

- Moleküllerin parametrik değişkenlerle, gözlenen biyolojik aktivite arasındaki ilişkiyi çözümleyebilecek kemometrik tekniklere gereksinim duyulmaktadır.

Yaygın şekilde kullanılan QSAR analiz yöntemleri: Hansch Analiz metodu, Free-Wilson analiz metodu, Fujita-Ban analiz metodu, karışım analiz metodu ve bilineer analiz metodundan oluşmaktadır.

QSAR analizinin kullanım amacı:

- Kimyasal bileşiklerin organizma içerisindeki dağılımı, emilimi ve taşınmasında görev yapan farmakokinetik ilişkilerin tanımlanmasında,
- Bileşiklerin hedefle (reseptör, enzim) arasındaki etkileşimlerde rol oynayacak dinamiklerin belirlenmesinde,
- Bileşiklerin organizmada biyotransformasyonunu sağlayan enzimatik ilişkilerin tanımlanmasında,
- Kimyasal bileşiklerin istenmeyen ve/veya toksik etkilerden arındırılması gibi çözümlere ulaşılmasını sağlamaktır. İlaç etken maddesi olabilecek yeni bileşiklerin tasarlanmasında ve geliştirilmesinde yol açarak önermelerde bulunan bir tekniktir (Şener ve Yalçın 2003).

2.2.3 Moleküler doking (kenetlenme)

Moleküler modellemede doking (kenetlenme), bir molekülün (ligandın) protein hedefine kararlı bir kompleks oluşturmak için birbirine bağlanma konformasyonunu tahmin eden bir yöntemdir. Bu teknik farmakokinetiğe dayalı ilaç tasarımlarında en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bağlanma davranışının belirlenmesi, ilaçların rasyonel olarak tasarımlarının ve biyokimyasal süreçlerinin aydınlatılmasında, ilaç tasarlama sürecindeki gerekli maliyet ve zamandan tasarruf edilerek önemli rol almaktadır.

Günümüzde moleküler kenetlenme için birçok yazılım kullanılmaktadır. Bu yazılımlar kenetlenme türlerine göre üçe ayrılmaktadır (Fan vd. 2019):

1. Sabit kenetlenme

Kenetlenme esnasında ligandın konumu uzaysal şekil bozulmadan değiştirilmektedir. Makro molekülün üzerinde değişiklik yapılmamaktadır.

2. Esnek – sabit kenetlenme

Makro molekül içeren reseptörlerin yapısını bozmadan yapılan kenetlenme işlemidir. Küçük lidangların yapılarında hareketli bağlarda kimyasal etkiler gösterilmektedir. Doğruluk oranı sabit kenetlenmeye göre daha yüksektir.

3. Esnek kenetlenme

Kenetlenme esnasında hem reseptörler hem de ligand yapısı esnek olmaktadır. Molekülün sahip olduğu hareketli bağlar programda da hareketlidir ve daha gerçek sonuçlar alınmaktadır. Fakat diğer kenetlenme türlerine göre yazılım ve donanım gereksinimi daha fazla olmaktadır.

Bir molekülün protein yapısına etkisini görebilmek için *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların yapılması gerekmektedir. Doking sayesinde bu maliyetli süreçten çok büyük tasarruf sağlanmaktadır. Ayrıca molekülün bağlanma yerinin doğru tahmin ediliyor olması molekülün tasarlanmasında bir zemin hazırlar ve böylelikle muhtemel moleküllerin sentezleri (öncü ilaç) için de stratejik bir alt yapı oluşturulmasına elverişli hale getirmektedir. Kenetlenmenin ligand-reseptör, ligand-enzim arasındaki ilişki açıklanmakla birlikte antagonist ve agonist bileşiklerinin bulunmasında ve enzim inhibisyonu çalışmalarında önemli yeri bulunmaktadır.

Proteinin içine kenetlenmiş molekülün çözücü içerisinde hem enzimle hem de hedef molekülün etkileşimi içinde bulunmasından dolayı ve bağlandığı bölgede uzun süre kalamayacağı için doking işlemleri moleküler dinamik yöntemleriyle de desteklenmektedir.

2.2.4 Absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım (ADME)

ADME, İngilizcede “Absorption/administration, Distribution, Metabolism, Excretion” kelimelerinin baş harflerini alarak farmakokinetik ve farmakolojide “absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım” için kullanılan bir kısaltmadır ve farmasötik bir bileşiğin bir organizma içindeki dağılımını tanımlar. Dört kriterin tümü, ilaç seviyelerini ve dokularda ilaç kinetiğini etkiler, dolayısıyla bir ilaç olarak bileşiğin performansını ve farmakolojik aktivitesini belirlemektedir. Bazen, LADME (liberation, absorption, distribution, metabolism and excretion/ serbest kalma, absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım), ADMET (absorption, distribution, metabolism and excretion-toxicity/absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite) veya LADMET veren serbest bırakma ve/veya toksisite de dikkate alınır (Balani vd. 2005). Toksisiteyi karakterize etmek için kullanılan parametreler arasında medyan öldürücü doz (LD₅₀) ve terapötik indeksler bulunmaktadır.

Absorpsiyon/emilimde, bir bileşiğin bir dokuya ulaşması için, genellikle hedef hücreler tarafından alınmadan önce kan dolaşımına alınması gerekmektedir. Absorpsiyon, bileşiğin biyoyararlanımını kritik olarak belirler.

Dağılım, farmakolojide bileşiğin etki edeceği bölgeye genellikle kan dolaşımı yoluyla taşınması anlamına gelmektedir.

İlaçların, organizmada çeşitli enzimlerin etkisiyle kimyasal değişikliklere uğramasına metabolizma denilmektedir. Metabolizmada parçalanma meydana geldikçe, ilk bileşik, metabolitler adı verilen yeni bileşiklere dönüşmektedir. Metabolitler farmakolojik olarak inert olduğunda, metabolizma uygulanan ana ilaç dozunu devre dışı bırakır ve bu genellikle vücut üzerindeki etkileri azaltır. Metabolitler bazen ana ilaçtan daha fazla olmak üzere farmakolojik olarak da aktif olabilir.

Atılım, bileşiklerin ve metabolitlerin vücuttan atılması kısmıdır.

ADME parametrelerinin kabul kriterleri ve kuralları bulunmaktadır. Bunlardan biri de literatürün kabul gördüğü ilaçların oral olarak alınan aktif bileşiklerin doğrudan ilişkili olduğu Lipinski'nin beş kuralı, ilaç benzeri özellik taşıyan moleküllerin uygunluğunu tanımlayan pratik bir kuraldır. Bu kural, biyolojik olarak aktif bir kimyasalın oral yolla biyolojik olarak elde edilebilir olması için gerekli kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip olup olmadığının belirlenmesine yardımcı olur. Lipinski kuralları 1997 yılında yaklaşık 2500 civarı ilaç veya klinik çalışma aşamasındaki bileşiklerle ilgili veriler göz önünde bulundurularak, oral yolla alınan ilaçlardaki biyoyararlanımı tahmin etmek için yayınlanmıştır (Lipinski vd. 1997). Lipinski'nin beş kuralına göre, ilaç benzeri bir molekülün özellikleri şöyle olmalıdır:

- Maddenin molekül kütlesi ≤ 500 g/mol
- Oktanol-su dağılım katsayısı ($MlogP$) ≤ 4.15
- Toplam hidrojen bağ verme sayısı (azot-hidrojen ve oksijen-hidrojen bağlarının toplam sayısı) ≤ 5
- Toplam hidrojen bağ alma sayısı (yapıdaki bütün azot veya oksijen atomları) ≤ 10
- Topolojik yüzey alanı (TPSA) değeri $<140 \text{ \AA}^2$ olmalıdır.

Bu özellikleri taşıyan moleküllerin ilaç adayı olarak görülmesi için gerekli koşulları sağlamış olduğunu gösterir fakat başarılı bir ilaç olarak kabul görmesi için yeterli olmamaktadır (Lipinski vd. 1997).

3. DENEYSEL/TEORİK MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde, tez çalışmasının amacına ulaşmasında kullanılan deneysel/teorik teknikler, cihazlar, kimyasal maddeler ve yöntemler hakkında bilgiler verilmiştir.

3.1 Teorik Materyal ve Yöntem

Bu aşamada tez çalışması süresince moleküllerin yapısal, elektronik ve fiziksel özellikleri çeşitli modelleme programları aracılığıyla belirlenmiştir.

Hesapsal çalışmalarımızın ilk adımında tüm moleküllerin konformasyon analizi ile yapıdaki tekli bağların etrafında serbest dönmesi sonucu oluşan en düşük enerjili konformasyonları yani en kararlı yapıları belirlenmiştir. Hesapsal çalışmaların bu aşamasında Gaussian 09W programı ve moleküllerin görselleştirilmesinde GaussView 5.0 programı kullanılmıştır. Belirlenen en kararlı konformerlerin geometri optimizasyonlarında, moleküllerin gaz fazında ve temel halde olduğu varsayılarak PM6 yöntemi ve DFT (Density Functional Theory) yönteminden üç parametrelili hibrit-Becke değişim fonksiyonu ile Lee-Yang-Parr korelasyon fonksiyonlarının birleşimi olan B3LYP fonksiyonu (Becke, 1988 ve Lee vd. 1988) ve 6-37(d,p) temel kümesi (Ditchfield vd. 1971) kullanılmıştır. Çalışılan tüm moleküllerin geometri optimizasyonu ile yapısal özellikleri (bağ uzunlukları, bağ açıları ve dihedral açıları) ve enerjileri (toplam enerji, sıfır noktası titreşim enerjileri, HOMO ve LUMO enerjileri, HOMO-LUMO enerji farkları) elde edilmiştir. Bu veriler, moleküllerin, yapı-aktivite ilişkilerinin açıklanmasında ve fizikokimyasal parametrelerin belirlenmesinde kullanılmıştır. Hesaplanan fizikokimyasal parametreler, elektrofilik güç (ω) ve nükleofilik (N) güç, kimyasal potansiyelleri (μ), kimyasal yumuşaklık (S), kimyasal sertlik (η), iyonlaşma potansiyelleri (I), elektron ilgisi (A), elektronegatifliktir (χ).

Moleküllerin fizikokimyasal özellikleri belirlendikten sonra yapı-aktivite ilişkilerini belirlemek üzere QSAR çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda, istatistiksel hesaplama algoritmalarından R-Studio programı kullanılarak kantitatif yapı aktivite ilişkisinin

modellenmesi ve modelin doğrulanması sağlanmıştır. Kimyasal çeşitleme yoluyla sanal moleküller türetilerek en yüksek aktiviteli molekül belirlenmiştir.

Moleküler doking işlemlerinde, proteinin ligandla yapabileceği bağlanma etkileşiminin 3 boyutlu tahminleri AutoDock 4.2.6 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir (Morris vd. 2009). AutoDock 4.2.6 yazılımı tarama yöntemi olarak Lamarckian genetik algoritmasını kullanmaktadır. Genetik algoritmada, her nesile uygun molekülün uyumluluk parametreleri değiştirilerek en düşük enerjiye sahip konformerin bağlanma enerjisi hesaplanmaktadır. Lamarckian algoritması, genetik algoritmayla aynı algoritmada çalışmakla beraber ek olarak her nesilde konformerin liganda bağlanma denemeleri yapılmış makro moleküllerden daha düşük bağlanma enerjisine sahip olanlar elimine edilerek daha hızlı ve verimli olmasıyla bilinmektedir (Garrett vd. 1999). AutoDock programı, esnek- sabit kenetlenme yazılımından dolayı daha gerçekçi sonuçlar vermektedir. Bunun yanı sıra daha az sistem gereksinimi vardır ve işlemciyi daha az yormaktadır. Bu sebeple kenetlenme çalışmalarımızda tercih ettiğimiz açık kaynak kodlu bir doking programı olmuştur. Ligand ve reseptör etkileşimlerinin açıklanmasındaki küçük ve makro molekül sistemlerini görselleştirmek için Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20298 programı kullanılmıştır.

ADME parametrelerinin tahmin edilmesinde SwissADME, PreADMET ve Molinspiration web sunucuları kullanılmıştır. Bileşiklerin iki boyutlu yapıları çizilerek SMILES kodları elde edilmiştir. Bu SMILES kodlar web sunucularına girilerek biyoyararlanımları, fizikokimyasal özellikleri, farmakokinetikleri, sudaki çözünürlükleri, lipofilisiteleri, ilaç benzerlikleri gibi ADME özellikleri hesaplanmıştır.

3.2 Deneysel Materyal

Tez kapsamında yürütülen deneylerde ve/veya kromatografik saflaştırma işlemlerinde çözücü olarak; etanol (Merck), metanol (Merck), dietil eter (Merck), etil asetat (Merck), kloroform (Isolab), tetrahidrofuran (Merck), heksan (Isolab), diklormetan (Isolab), asetonitril (Merck), dimetilsülfat (Merck), dimetil formamit (Sigma-Aldrich),

heksametilformamit (Sigma-Aldrich), hidrobromik asit %48 (Sigma Aldrich) kullanılmıştır.

Hedeflenen ürünlerin saflaştırılması, yan ürünlerin ortamdan uzaklaştırılması için kolon kromatografisi ya da flaş kromatografisi teknikleri kullanılmıştır. Bu amaç için, silika jel (SiO_2) (Merck, Silica Gel 60, 70-230 mesh ASTM) sabit faz olarak kullanılmıştır.

Kullanılan reaktifler ve kimyasal maddeler; tetrabütilamonyumbromür (Alfa Aesar), potasyum iyodür (Alfa Aesar), benzil bromür (Sigma-Aldrich), prenil bromür (Sigma-Aldrich), çinko (Sigma-Aldrich), seryum amonyum nitrat (Sigma-Aldrich), tiyoüre (Sigma-Aldrich), magnezyum sülfat (Sigma-Aldrich), hidroksilamin hidroklorür (Sigma-Aldrich), piridin Sigma-Aldrich), sodyum ditiyonit (Sigma-Aldrich), 1,5-dihidroksinaftalin (Sigma-Aldrich), N-bromosüksinimit (Sigma-Aldrich), bakır iyodür (Sigma-Aldrich), fosforil klorür (Sigma-Aldrich) ve sodyum hidroksit (Sigma-Aldrich) firmadan temin edildiği şekilde doğrudan kullanılmıştır.

Tez kapsamında sentezi yapılan ürünlerin spektral analizlerinde erime noktası, Electrothermal Model No: 9300 Erime Noktası Tayin Cihazı kullanılarak belirlenmiştir (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü).

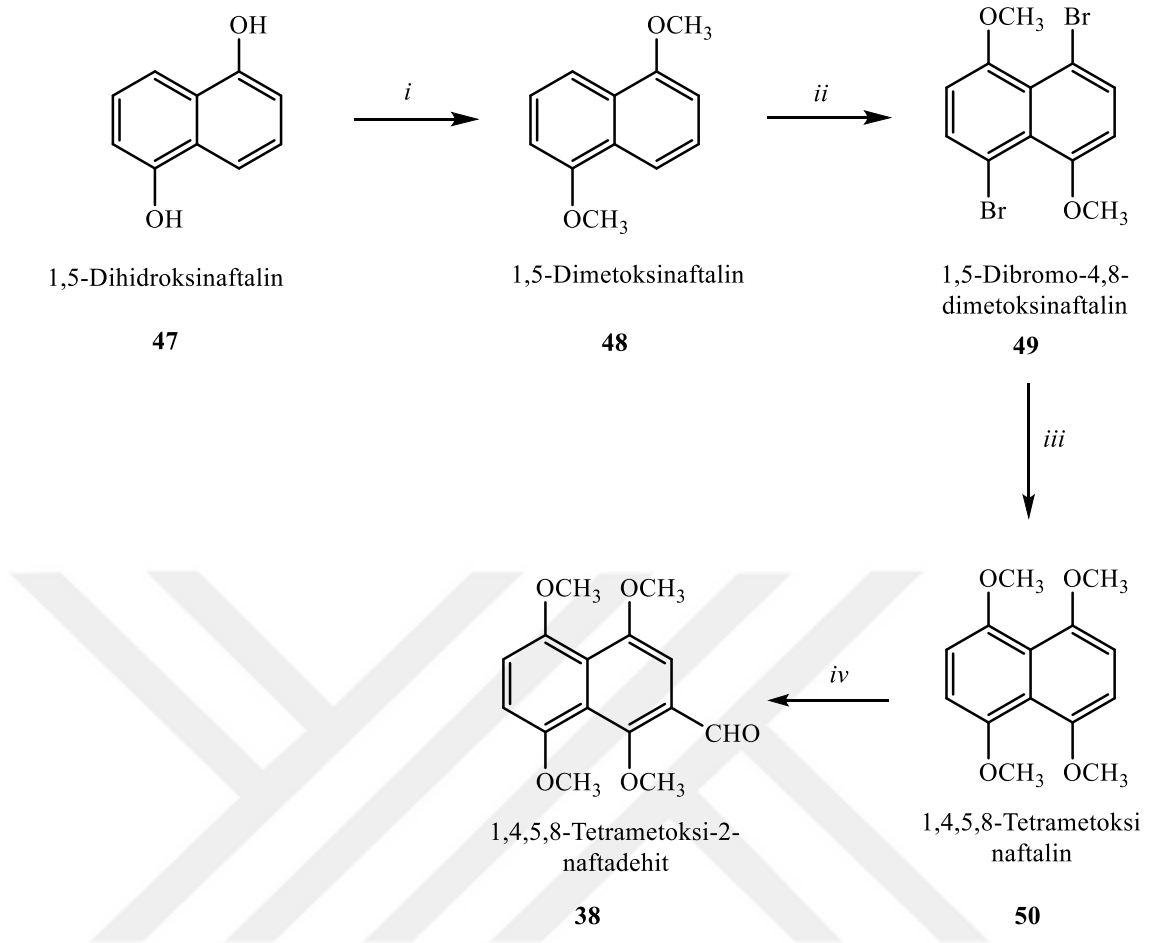
^1H NMR spektrumları, Varian Mercury (Agilent) 400 MHz (Palo Alto, CA, USA) ve Bruker Avance Neo 500 MHz (Germany) cihazları ile dötöro kloroform (CDCl_3) içerisinde alınmıştır. Kimyasal kayma değerleri (δ) iç standart olarak kullanılan tetrametilsilana (TMS) (0.00 ppm) karşı verilmiştir (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı).

İnce tabaka kromatografisi (TLC), deney sırasında ürün oluşumunu gözlemleyebilmek için kullanılmıştır. Silika jel TLC levha (Merck, 20x20, Silica Gel 60, F₂₅₄) kullanılmıştır.

3.3 Deneysel Yöntem

Tez çalışmasının bu kısmında kuantum kimyasal yöntemleri kullanarak yeni ilaç adayı molekül tasarımını öngördüğümüz teorik olarak yüksek aktiviteye sahip kükürt içeren şikonin oksim türevi sanal molekül sentezi incelenmiştir.

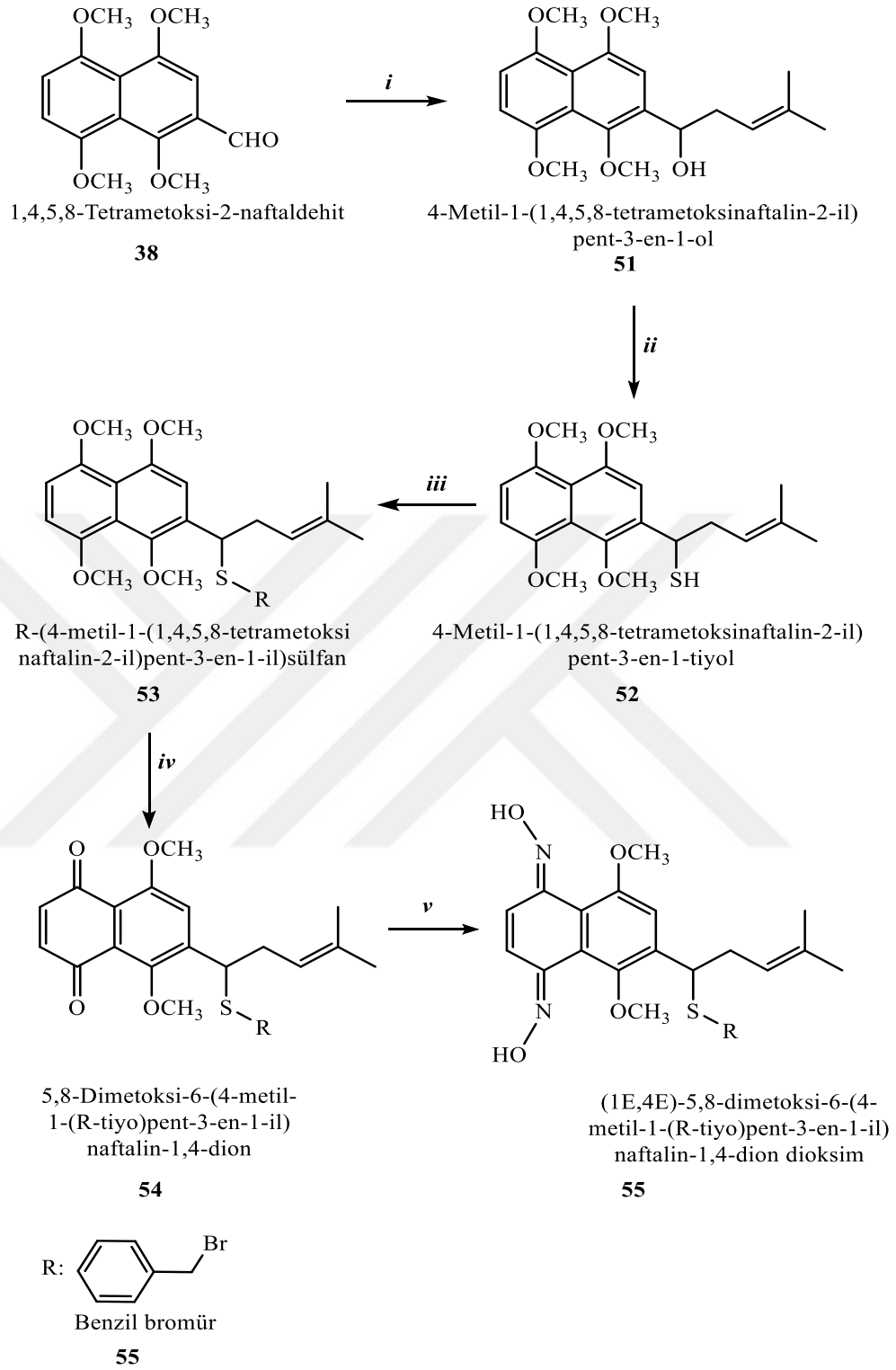
Sanal molekül, (1*E*,4*E*)-6-(1-(benziltiyo)-4-metilpent-3-en-1-il)-5,8-dimetoksi-5a,8a-dihidronaftalin-1,4-dion dioksimin sentez aşamaları birbirlerine bağımlı şekilde yürümekte ve toplamda 9 basamaktan oluşmaktadır. Şekil 3.1’de 4 basamaktan oluşan çıkış bileşiği olarak piyasada ticari satılmayan 1,4,5,8-tetrametoksi-2-naftaldehit sentezi gösterilmiştir. Elde edilen çıkış bileşiği şikonin oksim türevlerinin sentezlenmesinde temel basamaktır. Şekil 3.1’e göre, 47 numaralı bileşiğe metoksi grupları eklemek için dimetil sülfat aracılığıyla S_N2 nükleofilik süstitüsyon tepkimesi gerçekleştirilmiştir ve 48 numaralı bileşik elde edilmiştir. Metoksi grupları bağlanan naftalin bileşiğine 48, elektrofilik aromatik bromlama yapılarak 49 numaralı bileşik elde edilmiştir. Bromlanan naftalin bileşiği metoksi gruplarının katılarak tetrametoksi gruplu naftalin 50 oluşturulmuştur. Tetrametoksi naftalin 50, elektrofilik aromatik süstitüsyon (S_EAr) ile formilleme yapılarak çıkış bileşiği 38 elde edilmiştir.



i: $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, NaOH, $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{BrN}$, THF- H_2O , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$; **ii:** NBS, CH_3CN ; **iii:** CH_3ONa , CuI, DMF- CH_3OH ; **iv:** DMF, POCl_3 , CH_2Cl_2

Şekil 3.1 Çıkış bileşiğinin genel sentezi

Son aşamada ise çıkış bileşiği olarak sentezlenen 1,4,5,8-tetrametoksi-2-naftaldehitten (38) kükürt içeren şikonin oksim türevi olan sanal molekül bileşiği sentezlenmiştir (Şekil 3.2). Bu sentez aşamasında ilk olarak çıkış bileşiğinde bulunan aldehit grubuna, nükleofilik katılma ile prenil grubu eklenmiştir (51). Prenil grubundaki OH (hidroksi) grubu, çeşitli reaktif ve çözücülerle tiyol grubu olan 52 numaralı bileşiğe dönüştürülmüş ve sonraki aşamada substitüent grubu içeren tiyoeter bileşiği, 53 sentezlenmiştir. Devam eden çalışmalarımızda; 53 numaralı bileşik, seryum (IV) amonyum nitrat (CAN) ile önce yükseltgenerek 54 numaralı yapı elde edilecek, ardından hidroksil amin hidroklorür ile kondenzasyonu sonucunda hedef bileşik olan kükürt içeren şikonin oksim türevi 55 eldesi gerçekleştirilecektir. Hedef bileşiğin genel sentez şeması Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



i: Prenil bromür, Zn, HMPA; *ii*: Tiyoüre, %48 HBr, NaOH, HCl, DCM; *iii*: RBr, EtOH, KI, NaOH; *iv*: CAN, Asetonitril, H₂O; *v*: NH₂OH.HCl, EtOH, piridin

Şekil 3.2 Hedef bileşiğin genel sentezi

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Teorik Araştırma Bulguları

Bu bölümde, hedeflenen moleküllerin kuantum kimyasal yöntemler ile yapılan hesaplamaları sonucu elde edilen bulgulara yer verilmiştir. Teorik araştırması yapılan moleküllerin açık yapıları ve IUPAC adlandırılması giriş bölümünde verilen şekil 1.3 ve çizelge 1.2'deki gibidir. Bu bölümde hedef moleküller için yapılan bütün hesaplamalar ve tartışmalar, öncü ilaç bileşikleri olarak hedeflediğimiz sanal moleküllere de uygulanmıştır. Sanal moleküller için yapı aktivite ilişkileri kısmında fizikokimyasal parametrelere gereksinim duyulduğu için sonuçları ekler kısmında (EK-1) verilmiştir.

4.1.1 Yapı analizleri

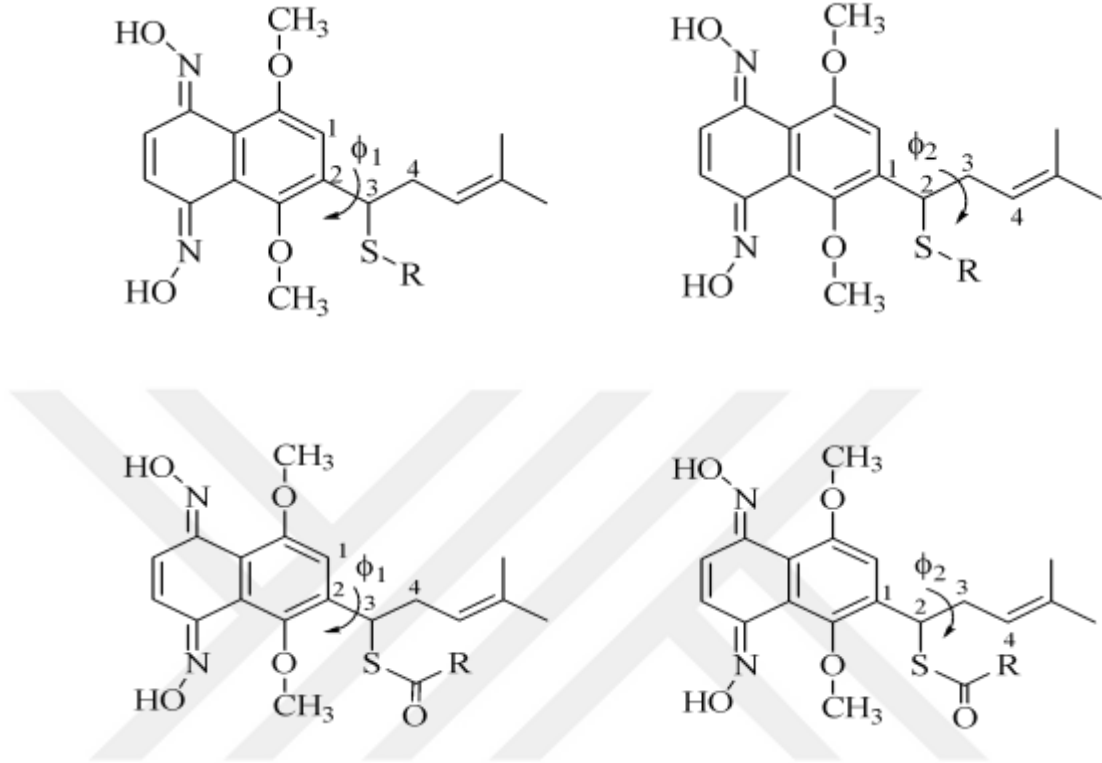
Bu bölümde moleküllerin konformasyon analizleri, fizikokimyasal tanımlayıcıları ile ilgili hesaplar yapılmış ve hesaplama sonuçları tartışılmıştır.

4.1.1.1 Konformasyon analizi

İlk olarak, moleküllerin en düşük enerjili yani en kararlı yapılarının belirlenmesi için konformasyon analizi yapılmıştır. Bu işlem, molekülün başlangıçta programa tanıtılan geometrisini serbest bırakarak programın molekülün en kararlı halini gelmesi ve en düşük enerjili konformasyonu bulması sağlanmıştır.

Moleküllerin konformasyon analizleri karbon-karbon arasındaki tekli bağların etrafında 0°'den 360°'ye kadar 30 °'lik açılar ile döndürülerek yapılmıştır. Şekil 1.3 ve çizelge 1.2'de açık yapıları verilen tüm moleküllerin dönme açılarının genel gösterimi şekil 4.1'de verilmiştir. Şekil 4.1'de gösterilen Φ_1 , Φ_2 açıları dihedral açılara karşılık gelmektedir ve her iki yapı da dihedral açılar, 1, 2, 3 ve 4 karbonları arasındaki dönmeye karşılık gelmektedir. Konformasyon analizinde moleküllerin büyüklüğü dolayısıyla hesaplamalarda maliyeti azaltmak açısından yarı-deneysel PM6 yöntemi kullanılmıştır.

Bu hesaplamalar sonucunda, en düşük enerjili konformer saptanarak bundan sonraki yapılacak olan hesaplamalarda başlangıç yapısı olarak alınmıştır.



Şekil 4.1 Dönme açılarının genel gösterimi

4.1.1.2 Enerjiler

En düşük enerjili konformore sahip moleküllerin enerjileri PM6 ve B3LYP/6-37(d,p) yöntemleri ile hesaplanmıştır. Bu yöntemler ile moleküllerin temel halde ve gaz fazında geometri optimizasyonu yapılarak toplam enerjiler bulunmuştur. Geometri optimizasyonunda, moleküllerin sanal frekanslarının pozitif olup olmadığı kontrolü yapılmıştır. Her molekülün toplam enerjisi ve sıfır noktası titreşim enerjisi (E_{ZPVE}) bulunmuştur. Toplam enerji, elektronik enerjinin ve sıfır noktası titreşim enerjisinin toplanmasıyla oluşmaktadır.

$$E_{\text{Toplam}} = E \text{ (elektronik enerji)} + E_{ZPVE} \text{ (sıfır noktası titreşim enerjisi)}$$

Sıfır noktası titreşim enerjileri B3LYP/6-37(d,p) yönteminde 0,961, PM6 seviyesinde 1,062 önceden hesaplanmış olan (Anonymous, 20219) düzeltme faktörü ile çarpılarak sonuç belirlenmiştir. Moleküllerin PM6 yöntemi ve B3LYP/6-37(d,p) seviyesinde hesaplanan enerji sonuçları çizelge 4.1’de verilmiştir. Çizelge 4.1’deki moleküllerin açık yapıları çizelge 1.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Moleküllerin enerjilerine ait hesaplama sonuçları

Molekül numarası	PM6	B3LYP	PM6	B3LYP	PM6	B3LYP
	Toplam Enerji (E _T) (kcal mol ⁻¹)		E elektronik (kcal mol ⁻¹)		ZPVE* (kcal mol ⁻¹)	
1	221,79	-995117,02	-41,86	-995378,16	263,65	261,14
2	246,94	-1044425,82	-51,81	-1044721,37	298,75	295,55
3	256,94	-1069079,45	-58,97	-1069392,17	315,91	312,72
4	256,94	-1069079,45	-58,97	-1069392,17	315,91	312,72
5	272,12	-1093733,81	-61,90	-1094064,03	334,02	330,23
6	283,77	-1118387,49	-67,86	-1118734,74	351,63	347,25
7	297,44	-1143042,50	-71,87	-1143406,81	369,31	364,31
8	308,95	-1167697,75	-77,64	-1168079,45	386,59	381,70
9	322,73	-1192349,73	-81,71	-1192748,64	404,44	398,91
10	347,793	-1241658,24	-91,72	-1242091,64	431,851	433,40
11	396,32	-1313346,31	-51,00	-1313787,08	447,32	440,77
12	171,37	-2083161,50	-81,40	-2083661,91	252,77	500,41
13	186,90	-1041577,09	-83,39	-1041826,90	270,29	249,81
14	208,44	-1115540,90	-96,47	-1115842,23	304,90	301,33
15	214,06	-1114783,50	-76,31	-1115070,41	290,37	286,91
16	222,79	-1140194,63	-100,07	-1140513,41	322,87	318,78
17	241,98	-1161865,02	-45,09	-1162147,05	287,06	282,03
18	248,39	-1186522,97	-55,21	-1186821,64	303,60	298,67
19	85,13	-1373353,82	-205,74	-1373638,62	290,87	284,80
20	241,19	-1290186,96	-48,10	-1290470,39	289,29	283,43
21	211,91	-1413538,61	-161,42	-1413907,60	373,33	369,00
22	211,91	-1413538,61	-161,42	-1413907,60	373,33	369,00
23	204,10	-1305553,45	-120,99	-1305874,54	325,09	321,09
24	188,45	-1377396,42	-155,58	-1377737,00	344,03	340,58
25	216,22	-1233708,34	-89,98	-1234010,15	306,19	301,80
26	221,24	-1233710,57	-84,84	-1234012,29	306,08	301,72
27	218,79	-1233712,25	-87,47	-1234014,02	306,26	301,77
28	189,87	-1224136,62	-92,61	-1224413,74	282,47	277,13

Çizelge 4.1 Moleküllerin enerjilerine ait hesaplama sonuçları (devam)

Molekül numarası	PM6	B3LYP	PM6	B3LYP	PM6	B3LYP
	Toplam Enerji (E_T) (kcal mol ⁻¹)		$E_{\text{elektronik}}$ (kcal mol ⁻¹)		ZPVE* (kcal mol ⁻¹)	
29	190,31	-1224138.16	-92,04	-1224415,29	282,35	277,14
30	188,71	-1224139.13	-93,73	-1224416,29	282,44	277,16
31	227,55	-1447776.00	-53,95	-1450541,08	281,50	276,08
32	226,70	-1450270.13	-54,75	-1450546,35	281,44	276,22
33	226,12	-1450270.61	-55,37	-1450546,82	281,49	276,22
34	196,07	-1160483.32	-72,00	-1160747,12	268,08	263,79
35	226,64	-1363160.10	-39,72	-1363421,90	266,36	261,80
36	244,05	-1171933.01	-35,54	-1172207,90	279,59	274,89

ZPVE* : Düzeltme faktörleri eklenmiştir.

Çizelge 4.1’den açıkça görüleceği gibi moleküllerin enerjileri birbirlerine çok yakın olarak bulunmuştur, ancak hesaplamalarda deneysel parametreler kullanan ve elektronik enerjiyi hesaplamalara dahil etmeyen yarı-deneysel PM6 yöntemi ile hesaplama sonuçları, yoğunluk fonksiyoneli teorisini (DFT) kullanan ve elektron korelasyonunu hesaplamalara dahil eden B3LYP ile yapılan hesaplama sonuçlarına göre daha yüksek değerler olarak bulunmuştur.

Kantitatif yapı aktivite ilişkisinde hedef moleküllerin fizikokimyasal özellikleri için en düşük enerjili konformore sahip moleküllerin dipol momenti, en yüksek dolu moleküler orbitalleri (HOMO) ve en düşük boş moleküler orbitalleri (LUMO) için PM6 yöntemi ve B3LYP/6-37(d,p) seviyesinde enerjileri hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Çizelge 4.2’deki moleküllerin açık yapıları çizelge 1.2’de verilmiştir.

HOMO – LUMO enerji farkı (ΔE) iletkenliğin bir ölçüsüdür.

$$\Delta E = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$$

Çizelge 4.2 Moleküllerin HOMO ve LUMO enerjilerine, HOMO-LUMO enerji farklarına ve dipol momentlerine ait hesaplama sonuçları

Molekül numarası	PM6	B3LYP	PM6	B3LYP	PM6	B3LYP	PM6	B3LYP
	E_{HOMO} (eV)		E_{LUMO} (eV)		ΔE ($E_{\text{LUMO}}-E_{\text{HOMO}}$)		Dipol Moment (μ)	
1	-8,543	-5,707	-0,036	-2,118	7,553	3,589	2,024	2,659
2	-8,554	-5,698	-0,036	-2,112	7,561	3,586	1,817	2,604
3	-8,587	-5,634	-0,034	-2,101	7,665	3,533	1,157	2,226
4	-8,587	-5,634	-0,034	-2,101	7,665	3,533	1,157	2,226
5	-8,577	-5,663	-0,036	-2,119	7,589	3,544	1,848	3,335
6	-8,611	-5,625	-0,035	-2,105	7,650	3,520	0,849	2,848
7	-8,623	-5,654	-0,039	-2,173	7,570	3,482	4,348	3,493
8	-8,565	-5,716	-0,037	-2,142	7,557	3,574	0,678	2,780
9	-8,590	-5,699	-0,037	-2,158	7,587	3,541	2,183	3,003
10	-8,593	-5,701	-1,004	-2,150	7,589	3,552	2,236	2,958
11	-8,579	-5,650	-0,036	-2,156	7,607	3,494	2,820	3,211
12	-8,772	-5,602	-0,040	-2,207	7,695	3,395	4,814	3,966
13	-8,684	-5,597	-0,039	-2,176	7,612	3,420	4,260	3,377
14	-8,735	-5,583	-0,039	-2,169	7,678	3,414	4,431	3,434
15	-8,823	-5,842	-0,041	-2,243	7,705	3,598	2,111	3,793
16	-8,751	-5,581	-0,039	-2,176	7,683	3,405	4,316	3,290
17	-8,778	-5,579	-0,040	-2,164	7,687	3,415	4,363	2,796
18	-8,687	-5,557	-0,039	-2,146	7,629	3,410	3,326	2,305
19	-8,905	-5,633	-0,045	-2,223	7,685	3,411	8,107	5,458
20	-9,001	-5,711	-0,053	-2,777	7,549	2,934	10,511	7,871
21	-8,756	-5,581	-0,040	-2,154	7,665	3,427	5,062	2,629
22	-8,756	-5,581	-0,040	-2,154	7,665	3,427	5,062	2,629
23	-8,427	-5,535	-0,039	-2,132	7,367	3,402	2,655	2,638
24	-8,136	-5,580	-0,042	-2,172	7,001	3,408	5,898	3,458
25	-8,629	-5,653	-0,039	-2,182	7,556	3,471	3,462	2,786
26	-8,761	-5,550	-0,040	-2,143	7,680	3,407	3,251	1,861
27	-8,717	-5,526	-0,038	-2,121	7,675	3,405	3,501	2,785
28	-8,767	-5,550	-0,039	-2,135	7,701	3,415	3,537	2,785
29	-8,848	-5,623	-0,042	-2,194	7,711	3,429	5,272	4,024
30	-8,853	-5,619	-0,042	-2,196	7,704	3,423	6,015	3,998
31	-8,814	-5,623	-0,041	-2,198	7,691	3,424	4,134	3,322
32	-8,874	-5,650	-0,043	-2,226	7,705	3,424	5,922	4,147
33	-8,866	-5,645	-0,043	-2,218	7,706	3,427	6,306	4,652
34	-8,790	-5,494	-0,042	-2,105	7,637	3,374	4,743	1,867
35	-8,735	-5,494	-0,041	-2,118	7,620	3,376	3,724	2,011
36	-8,888	-5,658	-0,043	-2,230	7,706	3,428	6,204	4,334

HOMO ve LUMO enerjilerinin hesaplama sonuçları incelendiğinde moleküllerin B3LYP hesaplama sonuçlarına göre PM6 yöntemiyle bulunan HOMO enerjilerinin daha düşük ve LUMO enerjilerinin ise daha büyük olduğu gözlenmiştir. Tüm moleküller için HOMO-LUMO bant aralığı B3LYP ile 2,9-3,5 eV arasında ve PM6 yöntemi ile 7,0 -7,7 eV arasında bulunmuştur. Bu sonuç, PM6 yöntemi ile bulunan bant aralığı değerlerinin B3LYP ile bulunanlardan daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ancak, hesaplama sonuçları moleküllerin tümünde enerji farkının birbirleri arasında uyumlu ve moleküllerin çok iyi iletken olmadığını göstermektedir.

Dipol moment sonuçları incelendiğinde moleküllerin dipol momentleri B3LYP hesaplama sonuçlarına göre 0,678 – 10,511 arasında, PM6 yöntemiyle 1,861 – 7,871 arasında bulunmuştur. En yüksek dipol moment, PM6 yönteminde ve B3LYP/6-37(d,p) seviyesinde “20” substitüentindedir. En düşük dipol moment iki hesaplama arasında farklılık göstermektedir. En düşük dipol momente sahip olan molekül, PM6 yönteminde 8 numaralı, B3LYP/6-37(d,p) seviyesinde ise 26 numaralı bileşiktir.

Enerji hesapları yapılan tüm moleküllere ait iyonlaşma enerjisi, elektron ilgisi, elektronegatiflikleri, kimyasal sertlik ve kimyasal yumuşaklığı, elektrofilik ve nükleofilik özellikleri gibi tanımlayıcıları da kantitatif yapı aktivite ilişkilerini tanımlamada ve fizikokimyasal özellikleri hakkında bilgi sahibi olabilmek için PM6 ve B3LYP/6-37(d,p) ile hesaplanmıştır.

Koopman teoremine göre; HOMO enerjisi iyonlaşma potansiyeli ile LUMO enerjisi de elektron ilgisiyle ilişkilendirilmektedir (Stein vd. 2012).

İyonlaşma potansiyeli (I) $\approx -E_{\text{HOMO}}$

Elektron ilgisi (A) $\approx -E_{\text{LUMO}}$

Parr ve ark. (1978) göre elektronegatiflik, kimyasal potansiyel enerjinin negatif değeri olarak tanımlanmaktadır.

$$\mu = -\chi = \left(\frac{\Delta E}{\Delta N} \right)_{V(r)} = -(I+A) / 2 = E_{\text{HOMO}} + E_{\text{LUMO}} / 2$$

Hedef moleküllerin PM6 ve B3LYP/6-37(d,p) ile hesaplanmış iyonlaşma enerjileri, elektron ilgileri ve elektronegatiflikleri aşağıdaki çizelge 4.3'te verilmiştir. Çizelge 4.3'deki moleküllerin açık yapıları çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Hedef moleküllerin iyonlaşma enerjileri, elektron ilgileri ve elektronegatiflikleri

Molekül numarası	PM6	B3LYP	PM6	B3LYP	PM6	B3LYP
	İyonlaşma Enerjisi (I) eV		Elektron İlgisi (A) eV		Elektronegatiflik (χ) eV	
1	8,543	5,707	0,989	2,118	4,766	3,912
2	8,554	5,698	0,993	2,112	4,773	3,905
3	8,587	5,634	0,921	2,101	4,754	3,867
4	8,587	5,634	0,921	2,101	4,754	3,867
5	8,577	5,663	0,987	2,119	4,782	3,891
6	8,611	5,625	0,961	2,105	4,786	3,865
7	8,623	5,654	1,053	2,173	4,838	3,914
8	8,565	5,716	1,008	2,142	4,786	3,929
9	8,590	5,699	1,003	2,158	4,796	3,928
10	8,593	5,701	1,004	2,150	4,798	3,926
11	8,579	5,650	0,972	2,156	4,775	3,903
12	8,772	5,602	1,077	2,207	4,924	3,904
13	8,684	5,597	1,072	2,176	4,878	3,887
14	8,735	5,583	1,057	2,169	4,896	3,876
15	8,823	5,842	1,118	2,243	4,971	4,042
16	8,751	5,581	1,068	2,176	4,910	3,878
17	8,778	5,579	1,091	2,164	4,935	3,872
18	8,687	5,557	1,058	2,146	4,873	3,852
19	8,905	5,633	1,220	2,223	5,063	3,928
20	9,001	5,711	1,453	2,777	5,227	4,244
21	8,756	5,581	1,091	2,154	4,924	3,868
22	8,756	5,581	1,091	2,154	4,924	3,868
23	8,427	5,535	1,060	2,132	4,744	3,833
24	8,136	5,580	1,135	2,172	4,636	3,876
25	8,629	5,653	1,073	2,182	4,851	3,917
26	8,761	5,550	1,081	2,143	4,921	3,847

Çizelge 4.3 Hedef moleküllerin iyonlaşma enerjileri, elektron ilgileri ve elektronegatiflikleri (devam)

Molekül numarası	PM6	B3LYP	PM6	B3LYP	PM6	B3LYP
	İyonlaşma Enerjisi (I) eV		Elektron İlgisi (A) eV		Elektronegatiflik (χ) eV	
27	8,717	5,526	1,042	2,121	4,879	3,824
28	8,767	5,550	1,066	2,135	4,916	3,843
29	8,848	5,623	1,137	2,194	4,992	3,908
30	8,853	5,619	1,149	2,196	5,001	3,908
31	8,814	5,623	1,124	2,198	4,969	3,910
32	8,874	5,650	1,168	2,226	5,021	3,938
33	8,866	5,645	1,160	2,218	5,013	3,931
34	8,735	5,701	1,153	2,118	4,925	3,806
35	8,888	5,658	1,182	2,230	5,035	3,944
36	8,790	5,479	1,153	2,105	4,972	3,792

Sonuçlar incelendiğinde, HOMO'dan elektron çıkarmak için gerekli olan iyonlaşma enerjisi hedef moleküler arasında neredeyse aynı büyüklükte olduğu ve iki yöntem arasında farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir. Elektron yoğunluğunu hesaplamalara dahil eden B3LYP fonksiyoneli ile yapılan hesaplama sonuçları daha anlamlıdır. LUMO enerjileri ve elektronegatiflik değerleri içinde benzer sonuçlar gözlenmiştir.

Berkowitz ve arkadaşlarına göre (1988) kimyasal sertlik ve yumuşaklık, kimyasal reaktivliğin bir ölçüsüdür. İki değer birbirinin negatiftir.

$$S = \frac{1}{\eta} \quad (\text{Kimyasal yumuşaklık})$$

$$\eta = \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta^2 E}{\Delta N^2} \right)_v = \mu = \left(\frac{\Delta E}{\Delta N} \right)_v = I - A \quad (\text{Kimyasal sertlik})$$

Kimyasal sertlik arttıkça moleküllerin HOMO-LUMO enerji farkı yani bant aralığı artmaktadır. Bu aralık azaldıkça molekülü uyarmak için gerekli olan enerji de azalacaktır. Kimyasal anlamda yumuşak olarak nitelendirilen moleküllerin bant aralıkları daha düşüktür. Kimyasal sertliği yüksek olan moleküllere kıyasla daha kolay

polarlanabilmektedir. Polarlık, yumuşak asit ve bazlarda karakteristik bir özellik olmasından dolayı düşük bant aralıkları ve sertliğin azlığı moleküler bağlanmada önemli bir konudur. Çalışılan moleküllere ait kimyasal sertlik ve kimyasal yumuşaklık değerleri aşağıdaki çizelge 4.4'te verilmiştir. Çizelge 4.4'deki moleküllerin açık yapıları çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.4 Çalışılan moleküllere ait kimyasal sertlik ve kimyasal yumuşaklık değerleri

Molekül numarası	PM6	B3LYP	PM6	B3LYP
	Kimyasal Sertlik (η) eV		Kimyasal Yumuşaklık (S) ev	
1	3,777	1,795	0,265	0,557
2	3,781	1,793	0,265	0,558
3	3,833	1,767	0,261	0,566
4	3,833	1,767	0,261	0,566
5	3,795	1,772	0,264	0,564
6	3,825	1,760	0,261	0,568
7	3,785	1,741	0,264	0,574
8	3,779	1,787	0,265	0,560
9	3,794	1,771	0,264	0,565
10	3,794	1,778	0,264	0,563
11	3,803	1,747	0,263	0,572
12	3,848	1,698	0,260	0,589
13	3,806	1,710	0,263	0,585
14	3,839	1,707	0,260	0,586
15	3,852	1,799	0,260	0,556
16	3,842	1,703	0,260	0,587
17	3,844	1,708	0,260	0,586
18	3,814	1,705	0,262	0,586
19	3,843	1,705	0,260	0,586
20	3,774	1,467	0,265	0,682
21	3,832	1,713	0,261	0,584
22	3,832	1,713	0,261	0,584
23	3,683	1,701	0,271	0,588
24	3,501	1,704	0,286	0,587
25	3,778	1,736	0,265	0,576
26	3,840	1,703	0,260	0,587
27	3,838	1,703	0,261	0,587
28	3,851	1,708	0,260	0,586
29	3,855	1,714	0,259	0,583
30	3,852	1,711	0,260	0,584

Çizelge 4.4 Çalışılan moleküllere ait kimyasal sertlik ve kimyasal yumuşaklık değerleri (devam)

Molekül numarası	PM6	B3LYP	PM6	B3LYP
	Kimyasal Sertlik (η) eV		Kimyasal Yumuşaklık (S) ev	
31	3,845	1,712	0,260	0,584
32	3,853	1,712	0,260	0,584
33	3,853	1,714	0,260	0,584
34	3,810	1,688	0,262	0,592
35	3,853	1,714	0,260	0,583
36	3,819	1,687	0,262	0,593

Hesaplama sonuçlarına göre hedef moleküllerin tamamı kimyasal olarak yumuşak moleküllerdir. Beklendiği gibi yöntemler arasında farklılıklar vardır.

Elektrofilik ve nükleofilik özellikler, moleküllerin seçiciliğini, reaktifliğini ve süstitüent etkileşimlerini açıklamak için kullanılan kavramlardır. Parr vd (1999), moleküler sistemlerin seçiciliklerini yoğunluk fonksiyonu teorisiyle açıklamışlar ve elektrofilik gücü aşağıdaki verilen eşitlikteki gibi tanımlamışlardır.

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} = \frac{\chi^2}{2\eta}$$

Nükleofilik güç ise, (N) aşağıdaki eşitliğe göre, nükleofilin HOMO enerji değeri ile tetrasiyanoetilenin (TCE) HOMO enerji değeri farkı olarak bilinmektedir. (Domingo ve Perez 2011).

$$N = E_{\text{HOMO}}(\text{Nu}) - E_{\text{HOMO}}(\text{TCE}) \text{ (eV)}$$

Tetrasiyanoetilen, birçok molekül grubu içerisinde en düşük HOMO enerjisine sahip molekül olduğu için teorik hesaplamalarda nükleofilik güç, TCE'ye göre verilmektedir. N, moleküler orbital teori çerçevesinde hesaplanan iyonlaşma potansiyelinin negatfidir. Bu şekilde elde edildiğinde değerler pozitif olduğu için çalışılması kolaylaşmaktadır.

Elektrofilik güç, organik molekülleri $\omega > 1,5$ eV güçlü, $0,8 < \omega < 1,5$ eV orta ve $\omega < 0,8$ eV zayıf elektrofil olarak sınıflandırılmaktadır. Substitüe alkenler, aromatik bileşikler ve basit nükleofilik moleküllerin büyük bir kısmını içine alan bir çalışma, nükleofilik güç N ölçeğinin doğruluğu ve geçerliliğini göstermektedir. Nükleofilik ölçeğe göre organik moleküller; $N > 3,0$ eV ise güçlü nükleofil, $2,0 < N < 3,0$ eV ise orta nükleofil ve $N < 2,0$ eV ise zayıf nükleofil olarak sınıflandırılmaktadır (Domingo vd. 2002). Çalışılan moleküllerin elektrofilik ve nükleofilik özellikleri, çizelge 4.5'te verilmiştir. Çizelge 4.5'deki moleküllerin açık yapıları çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.5 Hedef moleküllerin hesaplanmış elektrofilik ve nükleofilik güçleri

Molekül numarası	PM6	B3LYP	PM6	B3LYP
	Elektrofilik güç (ω) eV		Nükleofilik güç (N) eV	
1	3,007	4,265	11,199	10,070
2	3,013	4,253	11,195	10,076
3	2,948	4,234	11,267	10,087
4	2,948	4,234	11,267	10,087
5	3,013	4,272	11,201	10,069
6	2,994	4,244	11,227	10,083
7	3,092	4,399	11,135	10,015
8	3,031	4,319	11,180	10,046
9	3,032	4,357	11,185	10,030
10	3,034	4,340	11,184	10,038
11	2,998	4,360	11,216	10,032
12	3,151	4,489	11,111	9,981
13	3,126	4,416	11,116	10,012
14	3,122	4,401	11,131	10,019
15	3,207	4,541	11,070	9,945
16	3,137	4,417	11,120	10,012
17	3,168	4,389	11,097	10,024
18	3,112	4,350	11,130	10,042
19	3,335	4,524	10,968	9,965
20	3,619	6,138	10,735	9,411
21	3,163	4,365	11,097	10,034
22	3,163	4,365	11,097	10,034

Çizelge 4.5 Hedef moleküllerin hesaplanmış elektrofilik ve nükleofilik güçleri (devam)

Molekül numarası	PM6	B3LYP	PM6	B3LYP
	Elektrofilik güç (ω) eV		Nükleofilik güç (N) eV	
23	3,055	4,319	11,128	10,056
24	3,069	4,408	11,053	10,016
25	3,115	4,421	11,115	10,006
26	3,154	4,343	11,107	10,045
27	3,102	4,294	11,146	10,067
28	3,139	4,324	11,122	10,053
29	3,232	4,455	11,051	9,994
30	3,247	4,462	11,039	9,992
31	3,211	4,466	11,064	9,990
32	3,272	4,529	11,020	9,962
33	3,261	4,509	11,028	9,970
34	3,183	4,290	11,073	10,070
35	3,290	4,537	11,006	9,958
36	3,236	4,263	11,035	10,083

Hesaplama sonuçlarına göre, PM6 yönteminde ve B3LYP ile moleküllerin elektrofilik ve nükleofilik güçleri nispeten birbirlerine yakın değerler bulunmuştur. Her iki yöntem içinde moleküller, güçlü elektrofıl grubunda yer almaktadır. Çizelge 4.5'in nükleofilik kısmında ise hem PM6 hem de B3LYP'de hedef molekül grubunun tamamı 3'ten büyük ve güçlü nükleofilik özellik taşımaktadır.

4.1.2 Kantitatif yapı aktivite ilişkisi (QSAR) bulguları

Bu bölümde toplamda 36 tane şikonin oksim türevinin literatürden alınan deneysel biyolojik aktivite verilerinin (IC_{50}), Gaussian 09W programında PM6 yöntemi ile hesapladığımız moleküler tanımlayıcı (descriptor) verilerine R-Studio algoritması kullanarak yapı aktivite ilişkisi belirlenmiştir.

Yapı aktivite ilişkileri incelenecek 36 örnek için bölüm 4.1'de hesapladığımız 17 fizikokimyasal özellik kullanılmıştır. Bu fizikokimyasal özellikler; iyonlaşma potansiyelleri (I), elektron ilgisi (A), elektronegatiflik (χ), kimyasal potansiyel (CP),

kimyasal sertlik (η), kimyasal yumuşaklık (S), elektrofilik güç (ω), nükleofilik güç (N), molekül kütlesi (MW), ve enerjileri (toplam enerji (E_T), sıfır noktası titreşim enerjileri (ZPVE), HOMO-LUMO enerjileri (E_{HOMO} , E_{LUMO}), HOMO-LUMO enerji farkları (E_{gap}), dipol momenti (μ), polarlanabilirlik (IP) ve logP değerleridir. Bağımlı değişken olan IC_{50} değerleri deneysel olarak ölçülmüş (G. Huang vd. 2018) literatürden edinilmiş bilgilerdir.

Fizikokimyasal özelliklerin (bağımsız değişkenler) biyolojik aktivite verilerine (pIC_{50} , bağımlı değişken) etkisini incelemek üzere ilk olarak moleküllerin deneysel yolla ölçülmüş biyolojik aktivite verilerine karşı bütün fizikokimyasal parametrelerin korelasyon grafiği oluşturularak etkinliğe etkisi hakkında ön tahminlerde bulunup denkleme hangi parametrelerin dahil edileceği bu aşamada öngörülmüştür (Çizelge 4.6).

Pearson Korelasyon Matrisi

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).
 **. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Çizelge 4.6’da pIC_{50} ile tablodaki *significant* (önemlilik) değeri %10 ve altındaki doğrudan ilişkili parametreler koyu sarı renk ile işaretlenmiştir. Bu parametreler I, X, CP, η , S, ω , E_{gap} ve IP’dir. Fizikokimyasal parametrelerin kendi aralarındaki korelasyonlarında açık sarı renkli olanlar %10 anlamlı, mavi renkli olanlar %5 daha hassas anlamlılık düzeyindedir. Korelasyon matrisinde bağımsız değişkenlerin her biri arasındaki korelasyon katsayıları -1 ile 1 aralığında değerler almaktadır. Pozitif ve 1’e yakın olanlar güçlü korelasyon, negatif ve daha küçük değerler zayıf korelasyonu göstermektedir. Korelasyon matrisinden de görüldüğü gibi aşağıdaki eşitlikte yer alan bağımsız değişkenler birbirinin negatifi olduğu için kendi aralarında ilişkili değildir.

İyonlaşma potansiyeli (I) = - E_{HOMO}

Elektron ilgisi (A) = - E_{LUMO}

Kimyasal potansiyel enerji (CP) = - χ (elektronegatiflik)

Bu parametreleri (E_{HOMO}, E_{LUMO}, χ) aynı anda modele eklemek istatistik hesaplamalarda olumsuz etkiler yaratabilmektedir. Aynı şekilde 10 ve 41 moleküllerinin de deneysel ölçülmüş IC₅₀ değeri >50 olduğu için veri setinden çıkarılmış ve geriye 34 tane molekül kalmıştır. Veri seti çok büyük olmadığı için yine de birbiri ile ilişkili olarak görülen bağımsız değişkenlerin tamamı denkleme eklenip, her denklemde %10 anlamlılık düzeyini aşanlar çıkarılarak model oluşturulmuştur. Korelasyon matrisine bağlı kalınıp sadece pIC_{50} ile ilişkili olanlar dahil edilerek devam edilmemiş bütün model kombinasyonlarında çalışılmıştır.

Hedef moleküllerin bağımlı değişkenine karşı incelenecek olan bağımsız değişkenlerinden oluşturulan modelde doğruluğu görebilmek için elimizdeki moleküller kendi içlerinde %80 çalışma ve %20 test seti (30:4) olacak şekilde rastgele ayrılmıştır (çizelge 4.7). Çizelge 4.7’deki moleküllerin açık yapıları çizelge 1.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Çalışma ve test setine ait molekül numaraları

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

Çalışma ve test seti olarak ayırdığımız moleküllerin bir bağımlı değişken (pIC_{50}) karşısında, bağımsız değişkenlere karşı nasıl değiştiği yani, biyolojik aktiviteyi tanımlayıcılara bağlı olarak açıklayabilmek için R-Studio programı ile istatistiksel modeller oluşturulmuştur. Çalışma seti için belirlenen modellerden bulunan ve en anlamlı denklem ve istatistik analiz sonucu, katsayılar da dikkate alınarak aşağıda verildiği gibidir (modele ait program çıktıları eklerde (EK-2) verilmiştir).

$$pIC_{50} = -0,15871 * S - 0,09521 * Egap - 0,08323 * Dipole - 0,04454 * A + 4,60394$$

Fizikokimyasal tanımlayıcıların tamamı eklenip, %10'un üstünde anlamsız çıkanlarda elendiğinde son oluşturulan modelde 8 parametre (A, S, Dipole, Egap, MW, ET, Isopolarizability ve logP) kalmıştır. Yukarıda verilen denklemdeki değişkenlerden A (elektron ilgisi), S (kimyasal yumuşaklık), Dipol (dipol moment, μ), Egap (HOMO-LUMO enerji farkları) ve denklemin sabit değeri (intercept) için modelin anlamlı sonuç verdiği, ancak MW (molekül kütlesi), ET, (toplam enerji) isopolarizability (polarlanabilirlik) ve logP değerleri için anlamlı sonuçlar vermediği anlaşılmıştır. Bulunan modelin denklemin doğruluğu, çizelge 4.8'de verilen kriterlere göre belirlenmiştir.

Çizelge 4.8 Çalışma seti için bulunan ve kabul edilebilir bir QSAR model için istatistiksel olarak önerilen parametre değerleri

Sembol	Bulunan Model	Önerilen (Ravichandran vd. 2011)
R^2	0,6205	$\geq 0,6$
R^2_{adj}	0,4825	R^2 değerine yakın
$F_{değeri}$	4,496	Büyük değer
Error (Hata)	0,123	Çok küçük değer
p-değeri	0,0024	$<0,05$ anlamlılık

Bu kriterlerden R^2 , regresyon değeri 0,6 ve üzerinde kabul görmektedir. Bizim modelimizde 0,6205'tir. R^2_{adj} , anlamsız bağımsız değişkenleri hesaba almadan ve denkleme yeni bir değişken eklendiğinde değerde artış varsa, o değişkeni denkleme eklenmemesini gösteren bir parametredir. Bulunan modelde R^2 değerine yakın çıkmıştır. $F_{değeri}$, sıfır hipotezine göre F-dağılımı gösteren istatistiksel sınama şeklidir, modeldeki sonuç uyumludur. Error (hata) değeri, istatistikte gözlem değeri ile tahmin edilen değer arasındaki farktır, modeldeki hata payı 0,123'tür. p-Değeri, istatistikte bir istatistiksel modele bağlı olarak gözlemlenen örneklem sonuçlarının anlam kriterini (%10 ya da %5) ölçmek için kullanılan bir fonksiyondur. Modelimiz p değerine göre %5 hassas anlamlılık düzeyindedir.

Geliştirilmiş bir QSAR modeli, çizelge 4.8'deki kabul kriterlerini karşılayabildiğinde, genel olarak QSAR (MLR (çoklu lineer regresyon)) çalışmalarında kabul edilebilmektedir.

Literatürde μM cinsinden ifade edilen bileşiklerin (IC_{50}) inhibitör aktivitesi, bileşiklerin aktivite değerlerinde lineerliği arttırmak ve istatistikte veri dağılımını azaltmak için pIC_{50} 'ye [$pIC_{50} = -\log (IC_{50} \times 10^{-6})$] dönüştürülmüştür (Çizelge 4.9).

Bulunan modeldeki katsayılar her molekül için yerine konulduğunda eşitliği sağlayan pIC_{50} değeri çalışma ve test seti için hesaplanan ve deneysel pIC_{50} değerleri arasındaki farkı görmemizi sağlamaktadır (Çizelge 4.9). Çizelge 4.9'daki moleküllerin açık yapıları çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.9 Çalışma seti için hesaplanan ve deneysel pIC₅₀ değerleri ve aralarındaki fark

M/No	IC ₅₀	pIC ₅₀ (Deneysel)	pIC ₅₀ (Hesaplanan)	Fark
1	44,25	4,354	4,482	-0,128
2	35,98	4,444	4,475	-0,031
3	27,17	4,566	4,414	0,152
4	33,73	4,472	4,395	0,077
5	34,58	4,461	4,440	0,021
6	30,63	4,514	4,426	0,088
8	37,84	4,422	4,511	-0,089
9	48,34	4,316	4,396	-0,080
12	23,47	4,629	4,602	0,027
13	26,11	4,583	4,696	-0,113
14	16,32	4,787	4,647	0,140
15	45,73	4,340	4,465	-0,125
16	17,37	4,760	4,643	0,117
17	15,81	4,801	4,761	0,040
18	30,54	4,515	4,528	-0,013
19	44,67	4,350	4,352	-0,002
20	32,35	4,490	4,541	-0,051
21	19,36	4,713	4,699	0,015
22	9,23	5,035	4,966	0,069
23	19,83	4,703	4,710	-0,007
24	35,19	4,454	4,669	-0,215
25	17,05	4,768	4,692	0,076
26	23,02	4,638	4,507	0,131
27	38,91	4,410	4,594	-0,184
28	20,48	4,689	4,570	0,119
29	19,15	4,718	4,625	0,093
30	42,86	4,368	4,539	-0,171
31	20,35	4,691	4,531	0,161
32	28,29	4,548	4,570	-0,022
33	23,82	4,623	4,728	-0,105

Çizelge 4.9'daki sonuçlar incelendiğinde deneysel ve hesaplanan pIC₅₀ değerleri oldukça uyumludur. Çalışma seti ve test seti için deneysel ve hesaplanan pIC₅₀ verileri grafiğe geçirilip karşılaştırıldığında bu durum daha net olarak görülmektedir (EK-3).

Modelde, test seti için yapılan hesaplamalar sonucu Çizelge 4.10'da ve hesaplanan R² (R kare katsayısı, R squared), RMSE (ortalama karekök hata, Root mean square error) ve MAE (ortalama mutlak hata, Mean absolute error) sonuçları da çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.10 Test seti için hesaplanan ve deneysel pIC₅₀ değerleri ve aralarındaki fark

M/No	IC ₅₀	pIC ₅₀ (Deneysel)	pIC ₅₀ (Hesaplanan)	Fark
7	25,71	4,590	4,355	0,235
11	37,43	4,427	4,309	0,117
15	29,92	4,524	4,684	-0,160
23	14,90	4,827	6,201	-1,374

Çizelge 4.10'daki sonuçlar incelendiğinde test setindeki 23 numaralı molekül hariç, deneysel ve hesaplanan pIC₅₀ değerleri oldukça uygundur ve istatistik analiz sonuçları bulunan modeli desteklemektedir.

Çizelge 4.11 Test seti için bulunan ve kabul edilebilir bir QSAR model için istatistiksel olarak önerilen parametre değerleri

Sembol	Bulunan Model	Önerilen
R ²	0,845301	≥ 0,6
RMSE	0,7038932	Sıfıra yakın
MAE	0,4715548	Sıfıra yakın olması anlamlı

Bulunan denklemin doğruluğu (validasyonu), her yönetime göre kendi içinde korelasyon sağlanarak çalışma seti için 6 farklı istatistiksel yöntemle (Anonymous, 2021), test seti için 3 farklı yöntemle yapılmıştır (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12 Modelin doğruluğunu belirlemek için çeşitli yöntemlerle yapılan hesaplama sonuçları

Çalışma seti				
RMSE	R ²	MAE	Korelasyon	Yöntem
0,331409	0,088785	0,185386		Leave one out cross validation
0,194050	0,862980	0,163201		K-fold cross-validation
0,217835	0,866271	0,179225		Repeated K-fold cross-validation
0,070218			0,949888	Random Forest
0,182100	0,971874	0,163584	0,999979	eXtreme Gradient Boosting
0,140469			0,573226	K-Nearest Neighbors
Test seti				
RMSE	Korelasyon	Yöntem		
0,1429601	0,573154	Random Forest		
0,1487364	0,720962	eXtreme Gradient Boosting		
0,1234029	0,563671	K-Nearest Neighbors		

Bir tane veri dışarıda bırakılarak yapılan çapraz doğrulama (leave one out cross validation) yöntemi, küçük olan veri setlerine uygulanan bir çapraz doğrulama yöntemidir. Veri setindeki moleküllerden bir tanesi veri setinin dışına çıkarılarak, kalan moleküller için QSAR modelinde bulunan bağımsız değişkenler ile yeni bir model oluşturulmuştur. Modelde tekrar yerine koyarak hesaplanan IC_{50} değeri ile deneysel ölçülmüş IC_{50} arasındaki fark yorumlanmıştır. Ortama mutlak hata değeri sıfıra yakın olmasına rağmen çok iyi korelasyon göstermemiştir. K-katlı çapraz doğrulama (k-fold cross-validation) ve tekrarlanan k-katlı çapraz doğrulama (repeated K-fold cross-validation) yönteminde model %86 doğruluk göstermiştir. Veri madenciliğinde rastgele orman (random forest) yöntemi ortalama değerler ile değil korelasyonla ilgilenmektedir, RMSE değeri sıfıra çok yakın korelasyon ise yaklaşık %95 oranda model ile ilişkilidir.

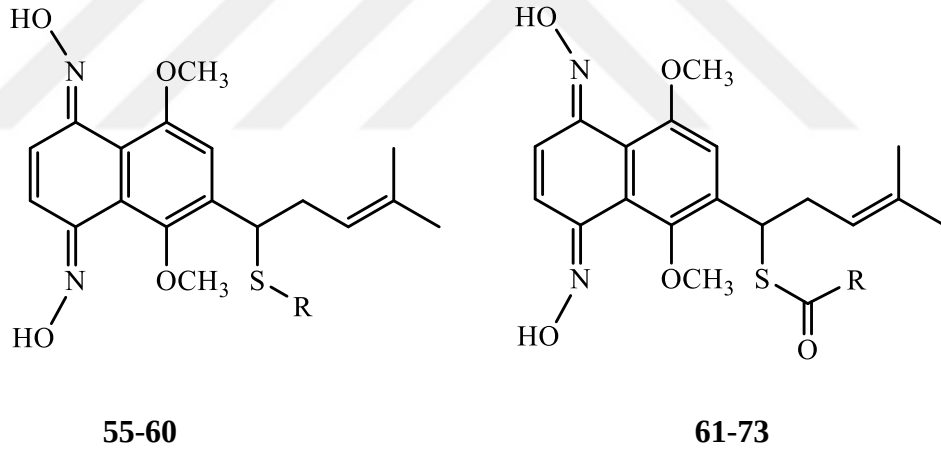
Gradyan arttırma yöntemi (eXtreme Gradient Boosting) ile yapılan validasyonda, moleküllerin bağımlı değişkene karşı bağımsız değişkeni ile korelasyonu lineer şekilde %99 çıkmıştır.

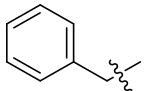
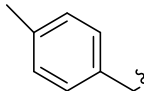
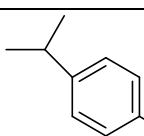
k-En yakın komşular yönteminde (k-nearest neighbors), verilerin hangi sınıfa dahil olacağını belirlemek için kendisine en yakın olan kaç komşu kullanılacağına dair bir sayı belirlenerek yapılan en yaygın kullanılan doğrulama yöntemidir. Modelimizin son halini oluştururken kalan 8 fizikokimyasal parametreden 1 çıkarıldığında (k-1) k sayısı modelde son değer 7 olarak belirlenmiş, en küçük değeri kullanarak en uygun modeli seçmek için RMSE kullanılmıştır. Model, denklem ile %57 korelasyon içerindedir.

Çalışma seti için korelasyon değerleri 1'e oldukça yakın bulunmasına karşın test seti için yapılan 3 farklı istatistik yöntemde değerler nispeten daha düşüktür. Bu durum, test setinde yer alan moleküllerin sayısının az olmasından kaynaklanmaktadır. Veri setinin arttırılabilmesi için deneysel IC_{50} değerlerinin aynı deney ortamında farklı moleküllerde elde edilmesi gerekmektedir. Ayrıca çalışma ve test seti seçiminde %80 : %20 kuralına bağlı kalınması gerekmektedir. Doğrulama yöntemlerine ait program çıktıları, çalışma ve test seti için ekler kısmında verilmiştir.

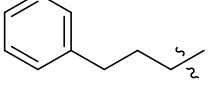
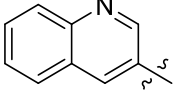
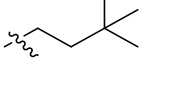
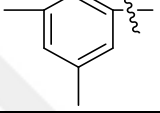
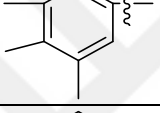
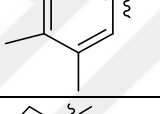
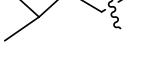
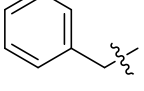
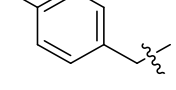
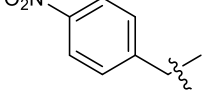
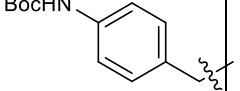
Veri setinin doğruluğunu kendi içinde ve test setinde sağladıktan sonra kabul kriterlerine uygun çıkan QSAR modeline uyabilecek, meme kanseri tedavisinde ilaç öncüsü olabileceğini düşündüğümüz sanal moleküller tasarladık. Hedef molekül iskeletine (şekil 1.3) yeni süstitüent (1.grup için 55-60 ve 2.grup için 61-73) eklenerek tasarlanan sanal moleküllerin (çizelge 4.13) yapıları, numaraları ve IUPAC adları çizelge 4.13’de verilmiştir. Sanal moleküllerin en kararlı yapıları ve fizikokimyasal özelliklerini, hedef moleküllerde uyguladığımız konformasyon analizi ve geometri optimizasyonundaki yöntemleri kullanarak belirledik. Daha sonra sanal moleküllerin fizikokimyasal parametreleri denklemde yerine konulup teorik pIC₅₀ değerleri elde edilmiştir (çizelge 4.14). Teorik olarak hesaplanan en yüksek pIC₅₀ değerine sahip “12” sanal molekülü (IUPAC adlandırması: (1*E*,4*E*)-6-(1-(benziltiyo)-4-metilpent-3-en-1-il)-5,8-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-1,4-dion dioksim) olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.13 Tasarlanan sanal moleküller

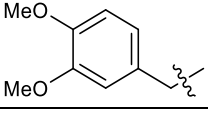
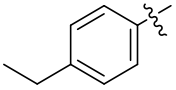
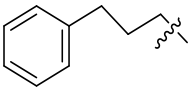


Molekül No	Substitüent (R) grupları	IUPAC Adı
55		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-6-(1-(benziltiyo)-4-metilpent-3-en-1-il)-5,8-dimetoksi-43,8a-dihidronaftalin-1,4-dion dioksim
56		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-6-(1-((4-metilbenzil)tiyo)-4-metilpent-3-en-1-il)-5,8-dimetoksi-43,8a-dihidronaftalin-1,4-dion dioksim
57		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-6-(1-((4-izopropilbenzil)tiyo)-4-metilpent-3-en-1-il)-5,8-dimetoksi-43,8a-dihidronaftalin-1,4-dion dioksim

Çizelge 4.13 Tasarlanan sanal moleküller (devam)

Molekül No	Substitüent (R) grupları	IUPAC Adı
58		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-6-(1-((4-metil-1-((3-fenilpropil)tiyo)-4-metilpent-3-en-1-il)-5,8-dimetoksi-4,3,8a-dihidronaftalin-1,4-dion dioksim
59		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5,8-dimethoxy-6-(4-methyl-1-(quinolin-3-ylthio)pent-3-en-1-yl)naphthalene-1,4-dione dioxime
60		(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-6-(1-((3,3-dimetilbütıl)tiyo)-4-metilpent-3-en-1-il)-5,8-dimetoksi-4,3,8a-dihidronaftalin-1,4-dion dioksim
61		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-methylpent-3-en-1-il) 3,5-dimetilbenzotiyoat
62		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-methylpent-3-en-1-il) 3,4,5-dimetilbenzotiyoat
63		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-methylpent-3-en-1-il) kinolin-4-karbotiyoat
64		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-methylpent-3-en-1-il) bütantiyoat
65		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-methylpent-3-en-1-il) 4-metilpentantiyoat
66		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-methylpent-3-en-1-il) heptantiyoat
67		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-methylpent-3-en-1-il) 2-feniletantiyoat
68		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-methylpent-3-en-1-il) 2-(p-tolil) etantiyoat
69		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-methylpent-3-en-1-il) 2-(4-nitrofenil)etantiyoat
70		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-methylpent-3-en-1-il) 2-(4-((ter-bütoksikarbonil) amino) fenil) etantiyoat

Çizelge 4.13 Tasarlanan sanal moleküller (devam)

Molekül No	Substitüent (R) grupları	IUPAC Adı
71		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-methylpent-3-en-1-il) 2-(3,4-dimetoksifenil)etantiyoat
72		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-methylpent-3-en-1-il) 4-etilbenzotiyoat
73		S-(1-((5 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,8-bis(hidroksimino)-1,4-dimetoksi-5,8-dihidronaftalin-2-il)-4-methylpent-3-en-1-il) 4-fenilbütan tiyoat

Çizelge 4.14 Sanal moleküllerin hesaplanan pIC₅₀ değerleri

Sanal molekül No	pIC ₅₀ (hesaplanan)
55	3,73
56	3,60
57	3,56
58	3,64
59	3,65
60	3,66
61	3,47
62	3,55
63	3,56
64	3,56
65	3,56
66	3,60
67	3,56
68	3,51
69	3,13
70	3,59
71	3,45
72	3,59
73	3,56

4.1.3 Moleküler doking (Kenetlenme) bulguları

Moleküler modellemede doking (kenetlenme), bir molekülün (ligandın) protein hedefine kararlı bir kompleks oluşturmak için birbirine bağlanma konformasyonunu tahmin eden bir yöntemdir. Bağlanma davranışının belirlenmesi, ilaçların rasyonel olarak tasarımlarının ve biyokimyasal süreçlerinin aydınlatılmasında, ilaç tasarlama sürecindeki gerekli maliyet ve zamandan tasarruf edilmesinde önemli rol almaktadır.

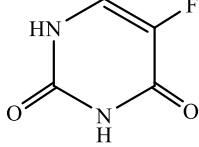
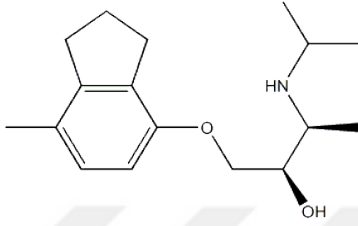
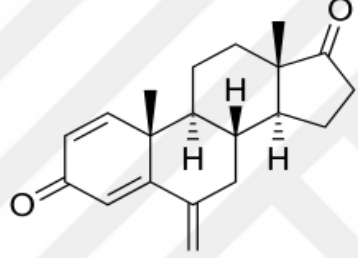
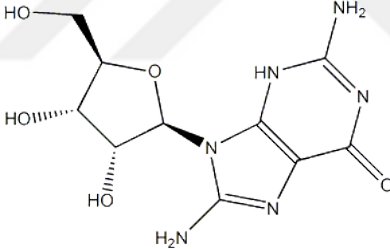
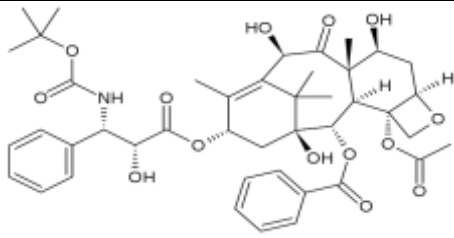
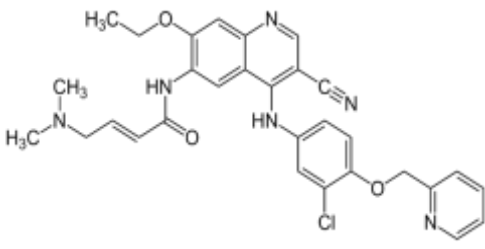
Çalışmanın bu ayağında, reseptör ile ligandlar (hedef moleküller) arasındaki etkileşimi tahmin etmek için doking tekniği kullanılmıştır. Çalışılan moleküllerin doking sonuçlarını karşılaştırmak amacıyla meme kanserinde kullanılan FDA onaylı ilaçlardan bir grup seçilmiş ve yapıları çizelge 4.15’de verilmiştir.

Meme kanseri tedavisinde kullanılan birçok ilacın çok iyi bağlandığı östrojen reseptörü (ER) (PDB ID: 26OK) seçilmiştir.

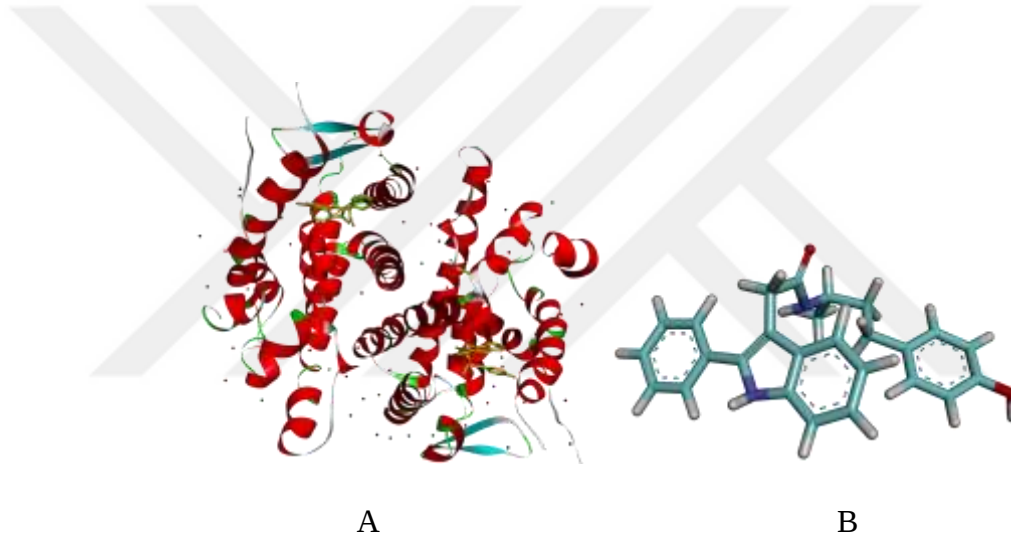
Doking işleminde kullandığımız ligandlar şu şekildedir:

- Hedef moleküller (1-11 ve 12-36) (şekil 1.3, çizelge 1.2),
- Hedef molekül iskeletine (şekil 1.3) yeni süstitüent (1.grup için 55-60) eklenerek tasarlanan sanal moleküller (çizelge 4.13),
- Hedef molekül iskeletine (şekil 1.3) yeni süstitüent (2.grup için 61-73) eklenerek tasarlanan yeni sanal moleküller (çizelge 4.13),
- Referans ilaçlar (74-79) (çizelge 4.15)

Çizelge 4.15 Kükürt içeren şikonin oksim türevlerine referans alınan meme kanseri ilaçları ve numaralandırılması

Molekül No	Molekülün Açık Yapısı	İlacın Ticari Adı
74		5-Floro urasil
75		Pertuzumab
76		Exemestane
77		Trastuzumab
78		Docetaxel
79		Neratinib

Ligandların proteine bağlanmalarını açıklayan doking çalışmalarında, AutoDock 4.2 program paketi kullanılmıştır. Bileşiklerin üç boyutlu yapılarının elde edilmesi ve geometri optimizasyonlarında Gaussian 09, GaussView 5.0 ve Discovery Studio Visualizer paket programları kullanılmıştır. Ligandların doking işleminin gerçekleştirileceği hedef östrojen reseptörü RCSB protein veri bankasından (<http://www.rcsb.org>) alınmış ve 3-boyutlu yapısı Şekil 4.2’de verilmiştir. RCSB Protein Data Bank veri tabanından indirilen östrojen reseptörde gömülü olan ligand, 2-arilindol türevidir, (N-[(1R)-3-(4-hidroksifenil)-1-metilpropil]-2-(2-fenil-8-indol-3-il)) asetamid) ve 3 boyutlu yapısı, PubChem veri tabanından (PubChem ID:16750040) alınmış ve yapısı Şekil 4.2’de verilmiştir.



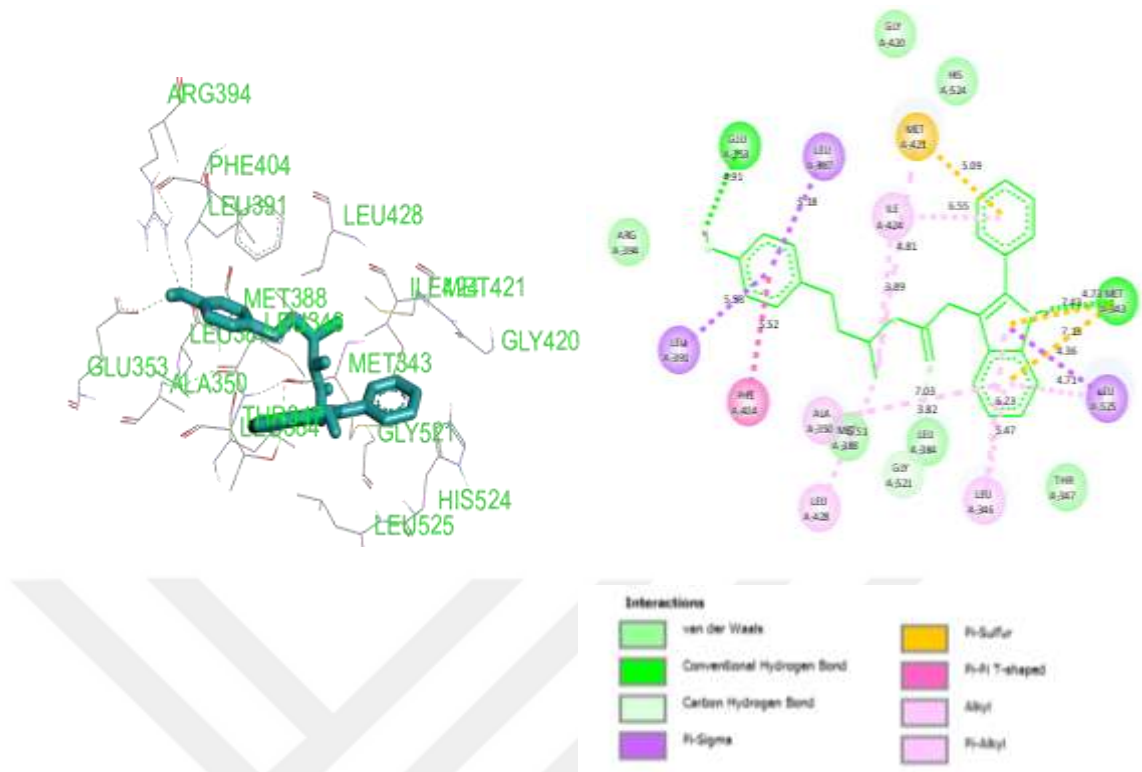
Şekil 4.2 Östrojen reseptör (A) ve referans ligandın yapısı (B)

Östrojen reseptörünün PDB kodu 2IOK ve çözünürlüğü 2,40 Å’dur. 2IOK’nin X-Ray yapısına göre aktif bölgesi Leu346, Ala350, Glu353, Leu384, Leu387, Phe404 ve Leu525 amino asitlerinden oluşmaktadır (Dykstra vd. 2007).

Östrojen reseptöründe, ligand gömülü şekilde bulunmaktadır, A ve B zincirlerinden oluşan dimer yapıya sahiptir. Çalışmada bu zincirlerden biri çıkarılmıştır ve docking işlemleri için .pdb formatında kaydedilmiştir. Östrojen reseptörün .pdb formatındaki yapısına, AutoDock Tools programında hidrojen ve yüklerin eklenmesi, su ve ligand molekülün uzaklaştırılmasından sonra .pdbqt uzantılı dosyalara dönüştürülmüştür.

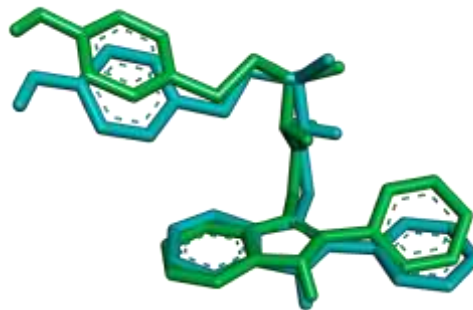
Reseptörün aktif bölgesi, gömülü bulunan ligand bağlanma bölgesine göre seçilmiştir. AutoDock 4.2'nin genetik algoritmasında ligandın dönme açlarına göre konformasyon taraması için dönme açlarının sayısı, popülasyon büyüklüğü, maksimum değerlendirme sayısı ve nesil sayısı sırasıyla 50, 300, 2500000 ve 27000 olarak ayarlanmıştır. 0,375 Å aralıklı x-, y- ve z eksenleri boyunca $60 \times 60 \times 60$ boyutlarındaki ızgara kutusu (grid box), ligandın etkileşime girebileceği enzimin aktif bölgesine göre ayarlanmıştır. En iyi yerleştirme konformasyonları elde etmek için otomatik ızgaraya ek olarak Lamarckian genetik algoritması kullanılmıştır. Her ligand için toplam 50 konformasyon seçilmiş, protein-ligand etkileşimlerini belirlemek ve görselleştirmek için Discovery Studio Visualizer yazılımı kullanılmış ve en yüksek negatif en iyi bağlanma enerjisine sahip konformasyonlar görselleştirilmiştir (2D ve 3D).

Enzim-ligand yerleştirme çalışmalarına başlamadan önce yerleştirme algoritmasının doğrulaması, ligandın AutoDock 4.2 algoritması kullanılarak reseptörün aktif bölgesine yeniden yerleştirilmesiyle (redoking) sağlanmıştır. Östrojen reseptörde gömülü ligand IOK için RMSD değeri 0,98 Å olarak bulunmuştur. Aynı işlemin PubChem veri tabanından alınan IOK ligandın östrojen receptor ile docking işlemi sonucunda, ligandın bağlanma enerjisi, -13,01 kcal/mol ve RMSD değeri 0,98 Å olarak bulunmuştur. Redoking işleminden sonra uygun bulunan konformasyonun doking görüntüsü şekil 4.3'te verilmiştir. Redoking işlemi sonrasında bulunan aktif bölgedeki amino asitler; Met343, Leu346, Thr347, Ala 350, Glu353, Leu384, LEU387, Met388, Leu391, Arg394, Phe404, Gly420, Met421, LEU428, Gly521, His524, Leu525, MET528 olarak belirlenmiştir. Konformasyonun, aktif bölge cebine tam olarak yerleştiği ve Glu353 ve Arg 394 aminoasitleri ile 2,01 ve 2,15 Å uzunluğunda 2 adet hidrojen bağı yaptığı ve ayrıca birçok hidrofobik etkileşim de gözlemlenmiştir.



Şekil 4.3 Östrojen reseptör- referans ligand (IOK) etkileşimleri

Literatüre göre seçilen docking algoritmasının geçerliliği, redocking yapılan ligand ile deneysel ligand-reseptör arasındaki etkileşimin ortalama karekök sapma RMSD değeri karşılaştırılarak yapılır. RMSD değeri $< 2,0 \text{ Å}$ ise kullanılan algoritma doking çalışmaları için uygun görülmektedir. Bulunan RMSD değeri 2 Å 'den küçüktür ve docking algoritması sonraki çalışmalarımız için uygundur. Referans alınan ligand ile redocking yapılan ligand arasındaki karşılaştırma şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4 Referans alınan IOK ligandı ile redocking yapılan ligandın karşılaştırılması (Referans ligand (mavi renkli) ve redocking yapılan ligand (yeşil renkli)

Son olarak, ligand olarak kullanılacak şikonin oksim türevleri Gaussian09 programı kullanılarak DFT/B3LYP 6-37 (d,p) teori seviyesinde önceden optimize edilmiş ve en düşük enerjili yapılar elde edilmiştir. En kararlı konformerlerin yapısı. pdb formatıyla kaydedilerek doking için hazırlanmıştır. Sonraki çalışmalarda ise hedeflenen şikonin oksim türevleri, tasarlanan ilaç öncü moleküller ve seçilen ilaçlar ligand olarak kullanılarak östrojen reseptörüne doking çalışmaları yapılmıştır. Docking sonuçları Çizelge 4.16’da, doking sonrasında aktif bölge etkileşimleri ve uygun konformasyonun doking görüntüleri EK-5’te verilmiştir. İlaçlarda enzim-ligand bağlanma enerjisinin en az -6,5 kcal/mol olması gerekmektedir. Çalışılan moleküllerin tamamında bağlanma enerjileri oldukça uygun olmakla beraber en düşük bağlanma enerjisine (-12,06 kcal/mol) sahip olan molekül, 22 ligandıdır. Bu ligand, ARG394 amino asidi ile 6,24 Å, GLU353 ile 4,79 Å ve THR347 ile 3,31 Å uzunluğunda hidrojen bağları yapmış ve diğer birçok hidrofobik etkileşim de gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.16 Moleküllerin östrojen reseptörü ile kenetlenme sonuçları

Bileşik	Bağlanma enerjisi (Kcal/mol)	RMSD	İnhibisyon Sabiti (K _i) nM	Hidrojen Bağı(ilac-enzim)
1	-8,34	1,07	765,01	LEU346
2	-8,59	1,90	500,96	LEU346
3	-9,67	1,08	81,50	ARG394
4	-9,93	0,98	52,68	ARG394
5	-8,20	1,43	977,28	GLU353
6	-9,61	1,00	90,01	ARG394
7	-9,65	0,92	84,01	GLU353
8	-8,97	1,80	266,67	MET343/8-ASP351
9	-8,89	1,67	305,71	MET343
10	-8,66	1,96	445,68	MET343/MET528
11	-10,26	1,57	29,91	MET528
12	-9,25	1,37	164,44	ARG394
13	-9,03	1,44	240,76	LEU346/GLU353/ARG394
14	-10,34	0,93	26,43	ARG394
15	-9,81	1,48	64,12	ARG394
16	-8,67	1,77	442,98	GLU353/ARG394
17	-9,24	1,48	167,94	GLU353/ARG394
18	-10,84	1,39	11,35	GLU353/ARG394
19	-10,3	1,49	28,34	LEU346/ARG394/LEU387
20	-10,25	1,48	30,56	GLU419/GLU353/ARG394
21	-9,20	1,82	179,12	ASP351
22	-12,06	1,21	1,45	THR347/GLU353/ARG394
23	-9,70	1,99	77,86	-
24	-9,62	1,56	88,90	GLU353/ARG394
25	-10,34	1,75	26,26	GLU353

Çizelge 4.16 Moleküllerin östrojen reseptörü ile kenetlenme sonuçları (devam)

Bileşik	Bağlanma enerjisi (Kcal/mol)	RMSD	İnhibisyon Sabiti (K _i) nM	Hidrojen Bağı(ilaç-enzim)
26	-9,79	1,02	66,27	GLU353/ARG394
27	-10,46	0,94	21,38	GLU353/ARG394
28	-11,07	1,35	7,72	GLU353/ARG394
29	-11,36	1,52	4,71	GLU353/ARG394
30	-10,85	1,09	11,07	GLU353/ARG394
31	-11,57	1,7	3,30	-
32	-11,32	1,51	5,03	GLU353/ARG394
33	-11,37	0,45	5,49	GLU353/ARG394
34	-8,74	1,35	395,22	GLU353
35	-9,70	1,58	77,39	ARG394
36	-10,1	1,26	39,35	GLU353/ARG394
55	-11,43	0,92	4,16	ARG394
56	-10,87	1,29	10,79	LEU346/GLU353
57	-11,53	1,15	3,56	ARG394
58	-11,03	1,89	8,25	ARG394/LEU387
59	-11,93	0,96	1,79	GLU353/ARG394/LEU387
60	-10,41	0,82	23,37	ARG394
61	-11,94	1,31	1,76	ARG394
62	-10,34	1,58	26,26	0
63	-10,86	1,16	11,01	ASP351/LEU346/GLU353/ARG394
64	-9,86	1,7	59,27	ARG394
65	-10,13	0,89	37,53	ARG394
66	-8,86	1,66	318,77	THR347
67	-10,30	1,82	28,08	THR347/ARG394
68	-10,78	1,95	12,46	ARG394
69	-9,56	1,42	98,69	ARG394
70	-9,94	1,91	51,43	ARG394/GLU353
71	-9,99	1,53	47,84	ARG394
72	-10,53	0,73	18,81	ARG394
73	-9,99	1,4	47,5	ARG394
74	-4,22	0,06	805,29	LEU346
75	-7,48	1,13	3,32	-
76	-10,10	0,02	39,23	-
77	-8,67	0,19	438,41	ARG394/GLU353/GLU323/LYS449/LEU327/GLU390
78	Hesaplama hatası	-	-	-
79	-10,88	0,73	10,59	LEU346

Tasarlanan 55-60 ve 61-73 sanal molekülleri için bulunan bağlanma enerjileri, ilaçlar için gereken limit değerin üzerindedir ve 74 hariç referans aldığımız meme kanseri ilaçları ile oldukça uyumludur. Tasarlanan sanal moleküllerin kanser hücrelerinin tedavilerinde potansiyel yeni ajanlar olarak kullanılabileceği sonucuna varılabilir. Bütün bileşiklerin doğal ligandla hidrojen bağları ve ayrıca kovalent olmayan moleküler etkileşimler yaptığı gözlemlenmiştir. Çalışılan tüm moleküllerin en uygun bulunan konformasyonların doking görüntüsü, ligand ve reseptörün aktif bölge etkileşimleri ekler (EK-5) kısmında verilmiştir.

4.1.4 ADME bulguları

Fonksiyonlu gruplar taşıyan şikonin oksim türevlerinin ADME, ilaç benzerliği, fizikokimyasal özellikleri ve toksisite tahmini çevrim içi olarak erişilebilen SwissADME, PreADMET ve Molinspiration yazılımı tarafından yapılmıştır (Daina vd, 2017; Lee ve ark., 2017; Molinspiration, 2011).

Çalıştığımız moleküllerin biyoyararlanımları hakkında tahminde bulunmak için hesapladığımız fizikokimyasal özellikler şöyledir; HBA: hidrojen bağı alıcılarının sayısı (number of hydrogen bond acceptors); HBD: hidrojen bağı verenlerin sayısı (number of hydrogen bond donors); MW: molekül ağırlığı (molecular weight); nROTB: dönebilen bağ sayısı (number of rotatable bonds); TPSA: topolojik polar yüzey alanı (topological polar surface area); miLog: n-oktanol ve su arasındaki bileşik dağılım katsayısının logaritmasıdır (logarithm of coefficient) ve çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4.17 Bileşiklerin fizikokimyasal özellikleri

Bileşik No	MW (g/mol)	HBA	HBD	nROTB	TPSA (Å²)	MLog P	Saf suda çözünürlük (mg/L)	Çözülme için gerekli enerji (kJ/mol)
1	390,50	6	2	7	83,65	2,17	0,042621	-10,02
2	418,56	6	2	9	83,65	2,62	0,005371	-9,38
3	432,59	6	2	9	83,65	2,62	0,002349	-8,70
4	430,56	6	2	8	83,65	2,62	0,002789	-8,83

Çizelge 4.17 Bileşiklerin fizikokimyasal özellikleri (devam)

Bileşik No	MW (g/mol)	HBA	HBD	nROTB	TPSA (Å²)	MLog P	Saf suda çözünürlük (mg/L)	Çözülme için gerekli enerji (kJ/mol)
5	446,61	6	2	11	83,65	3,04	0,000962	-9,06
6	460,64	6	2	12	83,65	3,25	0,000406	-8,90
7	474,67	6	2	13	83,65	3,45	0,000171	-8,74
8	488,69	6	2	14	83,65	3,65	0,000072	-8,58
9	502,72	6	2	15	83,65	3,85	0,000030	-8,42
10	530,72	6	2	17	83,65	4,24	0,000005	-8,10
11	566,81	6	2	14	83,65	4,24	0,000003	-7,73
12	404,48	7	2	7	100,72	4,24	0,151652	-11,79
13	418,51	7	2	8	100,72	1,52	0,0417631	-11,50
14	446,19	7	2	9	100,72	1,52	0,0077245	-10,66
15	444,55	7	2	8	100,72	1,52	0,007890	-11,17
16	460,59	7	2	11	100,72	2,16	0,003159	-11,02
17	466,55	7	2	8	100,72	2,16	0,003886	-14,17
18	480,58	7	2	8	100,72	2,16	0,001132	-13,70
19	534,14	10	2	9	100,72	2,16	0,000661	-13,94
20	511,55	9	2	9	146,55	2,16	0,000871	-17,26
21	581,68	10	3	11	139,06	2,16	0,000257	-18,92
22	517,14	8	4	8	126,75	2,16	0,416165	-19,88
23	526,60	9	3	11	118,85	2,16	0,001772	-17,01
24	556,63	10	3	12	128,09	2,16	0,001631	-18,43
25	496,58	8	2	9	109,96	2,16	0,003575	-15,59
26	496,58	8	2	9	109,96	2,16	0,002697	-15,59
27	496,58	8	2	9	109,96	2,16	0,002563	-15,59
28	484,55	8	2	8	100,72	2,16	0,002545	-16,79
29	484,55	8	2	8	100,72	2,16	0,001920	-16,79
30	484,55	8	2	8	100,72	2,16	0,001920	-16,79
31	501,00	7	2	8	100,72	2,16	0,000537	-14,45
32	501,00	7	2	8	100,72	2,16	0,000566	-14,45
33	501,00	7	2	8	100,72	2,16	0,000537	-14,45
34	472,59	7	2	8	100,72	2,16	0,007179	-12,10
35	467,55	8	2	8	113,61	2,16	0,067630	-17,66
36	456,52	8	2	8	11,386	2,16	0,013446	-11,25
55	452,58	6	2	8	83,65	2,16	0,00137576	-11,83
56	466,60	6	2	8	83,65	2,16	0,00040106	-11,36
57	494,66	6	2	9	83,65	2,16	0,000057	-10,52
58	480,63	6	2	10	83,65	2,16	0,000974	-12,15
59	489,60	7	2	7	96,54	2,16	0,000638	-16,94
60	446,61	6	2	9	83,65	2,16	0,001411	-7,83
61	494,61	7	2	8	100,72	2,16	0,000384	-13,23

Çizelge 4.17 Bileşiklerin fizikokimyasal özellikleri (devam)

Bileşik No	MW (g/mol)	HBA	HBD	nROTB	TPSA (Å ²)	MLog P	Saf suda çözünürlük (mg/L)	Çözülme için gerekli enerji (kJ/mol)
62	508,64	7	2	8	100,72	2,16	0,000289	-12,76
63	517,61	8	2	8	113,61	2,16	0,000699	-19,31
64	432,54	7	2	9	100,72	1,52	0,0176807	-11,34
65	460,60	7	2	10	100,72	1,52	0,00326356	-10,5
66	474,62	7	2	12	100,72	2,16	0,00133349	-10,86
67	480,59	7	2	9	100,72	2,16	0,00757519	-14,27
68	494,60	7	2	9	100,72	2,16	0,00220444	-13,8
69	525,58	9	2	10	146,55	2,16	0,00169299	-17,36
70	595,72	10	3	12	139,06	2,16	0,00049853	-19,02
71	540,64	9	2	11	119,19	2,16	0,00344326	-17,11
72	494,60	6	2	8	83,65	2,16	0,00042709	-13,54
73	508,64	7	2	11	100,72	2,16	0,00134528	-13,95
74	130,08	3	2	0	65,72	-0,73	2307,78	-13,12
75	277,40	3	2	6	41,49	2,42	289,152	-9,35
76	296,40	2	0	0	34,14	3,55	17,748	-9,03
77	298,26	7	6	2	185,54	-2,04	1160,28	-28,93
78	807,88	14	5	14	224,45	1,06	0,0113796	-27,94
79	557,04	7	2	12	112,40	1,64	0,0758832	-37,7

Çalışılan fizikokimyasal özellikler Lipinski'nin 5 kuralı temelinde değerlendirildiğinde; 9, 10, 11, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 31, 32, 33, 62, 63, 69, 70, 71, 73, 78, 79 bileşikleri dışında molekül kütleleri 500 g/mol 'den azdır, 78 molekülü dışında bütün moleküllerin toplam hidrojen bağı alma sayısı 10'dan, toplam hidrojen bağı verme sayısı 5'ten küçüktür. Ayrıca, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 16, 21, 23, 34, 66, 71, 73 molekülleri hariç moleküllerin döneabilen bağ sayıları 10'dan küçüktür. 5, 20, 69, 77 ve 78 hariç tüm bileşiklerin topolojik polar yüzey alanı 140 Å²'den küçüktür, bu nedenle bileşiklerin hücrelere kolayca nüfuz edebildiği söylenebilir. 10, 11, 12 molekülleri hariç MLogP değeri 4.15'ten küçüktür. Bileşiklerin daha düşük Log P değerleri, daha güçlü lipofiliklik değerlere sahip olduğunu gösterir. Lipinski kurallarını ihlal eden moleküller çizelge 4.18'de verilmiştir. Tasarlanan sanal moleküller Lipinski'nin kabul kriterlerini sağlamıştır. Bir diğer faktör olan suda çözünürlük, ilaç kimyasında önemli bir fizikokimyasal özelliktir, çünkü molekülün suda çözünebilmesi ve organizmada dağılması için oldukça önemlidir. İlaç benzeri çalışılan

moleküllerin emilim yerlerine göre çözünmeleri saf suda 0,000003 - 2307,78 mg/L arasında, çalışılan moleküllerin sudaki çözünürlüklerin orta derecede olduğu ve vücut tarafından kolaylıkla emilebileceği söylenebilir. Sistemik dolaşımdaki ilaç dozunun metabolizma ve atılım yoluyla suda çözünmesi için gerekli enerjilerinin tahminleri ise -37,7 ile -7,73 kJ/mol arasındadır. Lipinski'nin kurallarını ihlal etmeyen moleküller, ilaç adayı olabilmeleri için gerekli koşulları taşımaktadır fakat başarılı bir ilaç olarak kabul görmesi için yeterli olmamaktadır. Bu sebeple ilaç benzeri moleküllerin kabul kriterleri arasına sentez kolaylığı sentetik olarak erişilebilirliği, biyoyararlanım puanı, kanserli fare ve sıçanlardaki etkisinin tahmin edilmesi öngörülmüştür. SwissAdme algoritmasında molekülün farelerde biyoyararlanım puanı (F) yani ilaç benzeri olarak değerlendirdiğimiz moleküllerin absorpsiyon hızı ve derecesinin göstergesi %10'dan büyük olmalıdır, çizelge 4.18'de çalışılan bütün moleküllerin biyoyararlanım puanı %10 kriterini karşılamaktadır. Genel olarak, kanser sıçanlara göre kanser farelerde moleküller daha fazla pozitif sonuç vermiştir.

İlaç benzeri moleküllerin sentez kolaylığını (sentetik erişilebilirlik) tahmin eden bu yöntem, erişilebilirliğini 1 (sentezi kolay) ile 10 (sentezi çok zor) arasında bir puan olarak kabul etmektedir. Çalıştığımız moleküllerin sentez tahminleri çizelge 4.18'deki bulgulara göre orta zorluktur.

Çizelge 4.18 Bileşiklerin ilaç benzerlikleri ve toksisite özellikleri

Molekül No	Lipinski Kurallarını Sağlama	Biyoyararlanım Puanı	Sentetik Erişilebilirlik	Kanser Farelerde	Kanser Sıçanlarda
1	Evet	0,55	4,53	Pozitif	Negatif
2	Evet	0,55	4,75	Pozitif	Negatif
3	Evet	0,55	4,75	Pozitif	Negatif
4	Evet	0,55	4,75	Pozitif	Negatif
5	Evet	0,55	4,97	Pozitif	Negatif
6	Evet	0,55	5,09	Pozitif	Negatif
7	Evet	0,55	5,21	Pozitif	Negatif
8	Evet	0,55	5,33	Pozitif	Negatif
9	Hayır	0,55	5,45	Pozitif	Negatif
10	Hayır	0,17	5,7	Pozitif	Negatif
11	Hayır	0,17	5,7	Pozitif	Negatif

Çizelge 4.18 Bileşiklerin ilaç benzerlikleri ve toksisite özellikleri (devam)

Molekül No	Lipinski Kurallarını Sağlama	Biyoyararlanım Puanı	Sentetik Erişilebilirlik	Kanser Farelerde	Kanser Sıçanlarda
12	Evet	0,55	4,5	Pozitif	Negatif
13	Evet	0,55	4,6	Pozitif	Negatif
14	Evet	0,55	4,6	Pozitif	Negatif
15	Evet	0,55	4,6	Pozitif	Negatif
16	Evet	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
17	Evet	0,55	4,91	Negatif	Negatif
18	Evet	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
19	Hayır	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
20	Hayır	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
21	Hayır	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
22	Evet	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
23	Hayır	0,55	4,91	Negatif	Negatif
24	Hayır	0,55	4,91	Negatif	Pozitif
25	Evet	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
26	Evet	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
27	Evet	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
28	Evet	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
29	Evet	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
30	Evet	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
31	Hayır	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
32	Hayır	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
33	Hayır	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
34	Evet	0,55	4,91	Negatif	Negatif
35	Evet	0,55	4,91	Negatif	Negatif
36	Evet	0,55	4,91	Negatif	Negatif
55	Evet	0,55	4,91	Negatif	Negatif
56	Evet	0,55	4,91	Negatif	Negatif
57	Evet	0,55	4,91	Negatif	Negatif
58	Evet	0,55	4,91	Negatif	Negatif
59	Evet	0,55	4,91	Negatif	Negatif
60	Evet	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
61	Evet	0,55	4,91	Negatif	Negatif
62	Evet	0,55	4,91	Negatif	Negatif
63	Evet	0,55	4,91	Negatif	Negatif
64	Evet	0,55	4,60	Pozitif	Negatif
65	Evet	0,55	4,60	Pozitif	Negatif
66	Evet	0,55	4,91	Pozitif	Negatif

Çizelge 4.18 Bileşiklerin ilaç benzerlikleri ve toksisite özellikleri (devam)

Molekül No	Lipinski Kurallarını Sağlama	Biyoyararlanım Puanı	Sentetik Erişilebilirlik	Kanser Farelerde	Kanser Sıçanlarda
67	Evet	0,55	4,91	Negatif	Negatif
68	Evet	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
69	Evet	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
70	Evet	0,55	4,91	Pozitif	Negatif
71	Evet	0,55	4,91	Negatif	Negatif
72	Evet	0,55	4,91	Negatif	Negatif
73	Evet	0,55	4,91	Negatif	Negatif
74	Evet	0,55	1,52	Pozitif	Pozitif
75	Evet	0,55	3,54	Pozitif	Negatif
76	Evet	0,55	5,03	Negatif	Pozitif
77	Hayır	0,17	3,99	Negatif	Pozitif
78	Hayır	0,17	8,39	Pozitif	Pozitif
79	Evet	0,55	4,08	Pozitif	Negatif

Fizikokimyasal özellikleri hesaplanan bileşiklerin ADME özellikleri preADMET algoritmasıyla tahmin edilmiştir. Bu özellikler; CaCo-2: Hücre geçirgenliğinin tahmini (nm/saniye), %HIA: insan bağırsak emiliminin tahmini (Human Intestinal Absorption), BBB: kan beyin bariyerini geçme yeteneği (Blood-Brain Barrier), Pgp Inhibition: P-glikoprotein inhibisyonu (P-glycoprotein Inhibition), hERG Inhibition: ilişkili gen (hERG) potasyum kanalının inhibisyonu, MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) hücre hattı, küçük moleküllerin bağırsaktan ilaç emilimi göstergesi, PPB: plazmadaki protein bağlayıcısı (in vivo plasma protein binding), skin permeability: cilt geçirgenliğidir (çizelge 4.19).

Çizelge 4.19 Bileşiklerin ADME özellikleri

Molekül No	CaCo2 (nm/sn)	HIA (%)	BBB C _{beyin} /C _{kan}	Pgp inhibisyonu	hERG inhibisyonu	MDCK (nm/s)	PPB (%)	Cilt Geçirgenliği (Log Kp) (cm/saat)
1	25,30	94,64	0,58	İnhibitör	Belirsiz	4,62	92,44	-1,00
2	32,01	94,75	1,39	İnhibitör	Belirsiz	0,44	92,27	-2,12
3	35,44	94,78	1,68	İnhibitör	Belirsiz	0,08	92,01	-2,03
4	34,86	94,82	1,62	İnhibitör	Orta Risk	0,07	92,58	-2,03
5	38,75	94,81	3,41	İnhibitör	Belirsiz	0,06	94,24	-1,90
6	41,02	94,84	4,40	İnhibitör	Belirsiz	0,07	94,13	-1,79
7	39,45	94,88	5,31	İnhibitör	Belirsiz	0,11	94,03	-1,69
8	40,78	94,94	6,03	İnhibitör	Belirsiz	0,28	93,94	-1,60
9	41,68	95,01	6,75	İnhibitör	Belirsiz	1,03	93,86	-1,50
10	42,62	95,20	7,92	İnhibitör	Düşük Risk	13,06	93,74	-1,31
11	45,79	96,06	8,12	İnhibitör	Orta Risk	0,10	94,98	-1,20
12	5,29	94,23	0,09	İnhibitör	Düşük Risk	7,08	91,16	-2,73
13	7,87	94,65	0,20	İnhibitör	Düşük Risk	0,97	91,63	-2,53
14	14,01	95,21	0,47	İnhibitör	Düşük Risk	0,08	91,37	-2,29
15	13,46	95,42	0,61	İnhibitör	Orta Risk	0,08	91,71	-2,28
16	17,73	95,38	1,33	İnhibitör	Düşük Risk	0,05	93,23	-2,14
17	13,89	95,51	0,28	İnhibitör	Yüksek Risk	0,06	96,26	-2,14
18	17,75	95,48	0,62	İnhibitör	Orta Risk	0,04	95,35	-2,10
19	18,50	91E,4E	1,11	İnhibitör	Orta Risk	0,04	92,10	-1,78
20	0,75	90,69	0,02	İnhibitör	Yüksek Risk	0,04	95,03	-2,29
21	25,78	93,93	0,53	İnhibitör	Orta Risk	0,04	94,61	-2,09

Çizelge 4.19 Bileşiklerin ADME özellikleri (devam)

Molekül No	CaCo2 (nm/sn)	HIA (%)	BBB C_{beyin}/C_{kan}	Pgp inhibisyonu	hERG inhibisyonu	MDCK (nm/s)	PPB (%)	Cilt Geçirgenliği (Log Kp) (cm/saat)
22	20,58	91,08	0,03	İnhibitör	Yüksek Risk	0,69	73,84	-3,16
23	19,57	96,19	0,07	İnhibitör değil	Orta Risk	0,04	96,61	-2,28
24	19,57	96,20	0,07	İnhibitör	Orta Risk	0,04	96,61	-2,28
25	21,57	96,13	0,04	İnhibitör	Orta Risk	0,04	96,01	-2,36
26	17,36	95,94	0,13	İnhibitör	Yüksek Risk	0,05	97,61	-2,19
27	16,75	95,94	0,13	İnhibitör	Orta Risk	0,04	98,42	-2,20
28	17,13	95,94	0,15	İnhibitör	Orta Risk	0,05	95,98	-2,21
29	14,20	95,51	0,34	İnhibitör	Orta Risk	0,05	94,02	-2,29
30	13,10	95,51	0,39	İnhibitör	Orta Risk	0,05	98,35	-2,32
31	13,10	95,51	0,39	İnhibitör	Orta Risk	0,05	98,35	-2,32
32	19,09	95,43	0,81	İnhibitör	Orta Risk	0,04	91,98	-2,16
33	17,58	95,43	0,74	İnhibitör	Orta Risk	0,05	93,38	-2,15
34	19,09	95,43	0,81	İnhibitör	Orta Risk	0,04	91,98	-2,16
35	6,01	95,90	0,04	İnhibitör	Orta Risk	0,13	89,21	-2,44
36	7,91	95,83	0,03	İnhibitör	Orta Risk	0,07	97,52	-2,62
55	7,04	95,12	0,05	İnhibitör	Orta Risk	0,46	91,53	-2,51
56	34,63	95,08	1,09	İnhibitör	Yüksek Risk	0,07	97,66	-2,05
57	37,63	95,18	1,93	İnhibitör	Orta Risk	0,04	96,50	-1,95
58	43,14	95,41	3,40	İnhibitör	Orta Risk	0,05	96,10	-1,80

Çizelge 4.19 Bileşiklerin ADME özellikleri (devam)

Molekül No	CaCo2 (nm/sn)	HIA (%)	BBB C_{beyin}/C_{kan}	Pgp İnhibisyonu	hERG İnhibisyonu	MDCK (nm/s)	PPB (%)	Cilt Geçirgenliği (Log Kp) (cm/saat)
59	41,95	95,29	2,48	İnhibitör	Belirsiz	0,05	99,46	-1,88
60	23,08	95,60	0,12	İnhibitör	Yüksek Risk	0,05	94,07	-2,37
61	39,50	94,81	1,92	İnhibitör	Belirsiz	0,05	91,75	-1,62
62	21,83	95,44	1,19	İnhibitör	Orta Risk	0,04	97,78	-2,08
63	25,72	95,42	2,01	İnhibitör	Orta Risk	0,04	96,52	-2,05
64	14,81	95,74	0,04	İnhibitör	Yüksek Risk	0,04	99,93	-2,23
65	10,96	94,97	0,36	İnhibitör	Düşük Risk	0,33	91,55	-2,38
66	17,94	95,38	1,10	İnhibitör	Düşük Risk	0,05	94,66	-2,17
67	20,26	95,48	2,09	İnhibitör	Düşük Risk	0,06	93,30	-2,03
68	17,88	95,48	0,31	İnhibitör	Yüksek Risk	0,05	98,57	-2,07
69	21,61	95,44	0,66	İnhibitör	Orta Risk	0,04	97,46	-2,01
70	1,55	91,66	0,02	İnhibitör	Yüksek Risk	0,04	97,95	-2,36
71	12,36	94,03	0,61	İnhibitör	Yüksek Risk	0,04	95,07	-2,19
72	20,23	96,27	0,09	İnhibitör	Orta Risk	0,04	94,79	-2,16
73	21,14	95,44	1,12	İnhibitör	Orta Risk	0,05	95,31	-2,00
74	20,99	95,42	1,17	İnhibitör	Yüksek Risk	0,06	96,17	-1,90
75	17,25	75,93	0,20	İnhibitör	Orta Risk	0,68	88,31	-5,02
76	24,14	99,06	0,65	İnhibitör değil	Orta Risk	203,64	98,19	-1,74
77	49,33	92,38	4,95	İnhibitör	Düşük Risk	70,59	72,06	-2,18
78	24,14	99,06	0,65	İnhibitör	Orta Risk	203,64	98,19	-1,74
79	7,46	12,85	0,44	İnhibitör	Orta Risk	0,53	95,89	-5,23

İlaç adaylarının bağırsak emilimini değerlendirmek için ilaç seçim sürecinde çok sayıda *in vitro* yöntem kullanılmıştır. Bunlar arasında CaCo-2 hücre modeli ve MDCK hücre modeli, oral ilaç absorpsiyonunun tahmini için güvenilir bir *in vitro* model olarak önerilmiştir (Yamashita vd. 2000). Caco-2 hücreleri, insan ince bağırsak epiteli boyunca çoklu ilaç taşıma yollarına sahiptir. Bileşiklere veya metabolizmalarına göre deneysel değerlerde bazı farklılıklar olsa da aşağıdaki gibi genel kategorilere ayırabiliriz. P_{Caco-2} (nm/sn), 4'ten az ise düşük geçirgenlik, 4-70 arasında ise orta geçirgenlik, 70'den fazla ise yüksek geçirgenlik göstermektedir. Çizelge 4.19'daki Caco-2 değerlerine bakıldığında, 20 ve 69 molekülü hariç bütün moleküller oral ilaç absorpsiyonunun tahmini için orta geçirgenliktedir.

%HIA, insan bağırsak emilim verileri, idrar, safra ve dışkıdaki atılım veya birikmiş atılım oranından değerlendirilen biyoyararlanım ve emilimin toplamıdır. Bileşiklere veya metabolizmalarına göre deneysel değerlerde bazı farklılıklar olsa da % 0-20 iyi emilmeyen bileşikler, %20 - %70 orta derece emilen bileşikler, %70 - %100 iyi emilen bileşikler olarak genel kategorilere ayırabiliriz (Yee, 1997). Çizelge 4.19'daki %HIA değerlerine bakıldığında bütün moleküllerin bağırsaktaki emilimleri iyi derecede sonuç vermiştir.

Kan-beyin bariyeri (BBB), çoğu ilacın beyin tarafından alınmasını engeller. Bu özellik, beyin kılcal damar endoteli içindeki epitel benzeri sıkı bağlantılardan kaynaklanmaktadır. Kan beyin bariyeri geçirgenliğini tahmin etmek, farmasötik alanda merkezi sinir sistemindeki (MSS) yan etkilerden kaçınmak için çok önemlidir. MSS'de aktif olan bileşiklerin $(C_{beyin}/C_{kan}) > 0,40$ kan beyin bariyerini geçemeyeceği, MSS-inaktif bileşiklerin $(C_{beyin}/C_{kan}) < 0,40$ kan beyin bariyerini geçmesi beklenmektedir (Lobell vd. 2003). Çizelge 4.19'daki kan beyin bariyeri geçirgenliği değerlerine göre, 12, 13, 17, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 34, 35, 36, 59, 63, 64, 67, 69, 71, 74, 78, 79 moleküllerinin merkezi sinir sisteminde inaktif olduğu ve tahmin edilen beyin/kan konsantrasyonuna göre kan beyin bariyerini geçebileceği düşünülmektedir.

P-glikoproteini, ilaçların emilimini, geçirgenliğini ve tutulmasını engelleyerek onları hücrelerden dışarı çıkarmaktadır. Anti-tümör tedavileri sırasında kanser hücreleri

tarafından direnç geliştirmektedir. Çizelge 4.19'da çalışılan moleküller arasında 22 ve 74 harici bütün moleküller P-glikoproteinine dirence karşı azaltıcı etki göstermektedir.

hERG kanallarının inhibisyonu, kalp ritmini kontrol etmeye çalışan potasyum kanallarının alt birimindeki genler ile ilişki kurmada görevli bir proteindir. Kalp sorunları ile ilgili yan etkileri yok edilmesinde ilaç etken bileşiklerin geliştirilmesi aşamasında göz önünde bulundurulması gereken bir parametredir. Çizelge 4.19'da hERG inhibisyonu riski her molekül için tahmin edilmiştir.

MDCK hücre hattı, küçük moleküllerin insan bağırsak geçirgenliği ile ilişkilidir ve ilaç emilimini sağlamaktadır. MDCK değerlerinin 25 nm/s'den düşüklüğü, düşük geçirgenlik, 25 ila 500 nm/s arası değerler orta ve 500 nm/s'den yüksek değerler yüksektir. Çizelge 4.19' da, 75 ve 76 molekülleri hariç diğer bütün moleküllerin insan bağırsağındaki MDCK hücre hattında emiliminin olmadığı tahmin edilmiştir.

Bir ilacın plazma proteinlerine bağlanma derecesi (%PPB), yalnızca ilacın etkisini değil, aynı zamanda düzenini ve etkinliğini de etkilemektedir. Güçlü kimyasal etkileşimi olan moleküllerin %90'dan fazlasının, zayıf kimyasal etkileşimi olan moleküllerin %90'dan fazlasının plazma proteinine bağlanması beklenmektedir. Çizelge 4.19'daki moleküllerin plazma proteinlerine bağlanma derecesi %72 ile %99 arasındadır.

Farmasötik ve kozmetik alanlarda, ilaçların deriden iletimi için cilt geçirgenlik oranını tahmin etmek ve kazara veya tasarım yoluyla ciltle temas eden tüm kimyasalların risk değerlendirmesi için önemlidir. Çizelge 4.19'da log K_p değeri > -2,5 olan moleküller düşük cilt geçirgenliği göstermektedir.

Tez konusu amacı doğrultusunda tasarladığımız teorik olarak en yüksek biyolojik aktivite gösteren, Lipinski kuralını ve ADME parametrelerinin çoğunu sağlayan, sudaki çözünürlüğü orta derecede ekonomik ve sentetik erişebilirliği orta seviyede olan ve laboratuvarımızda da bulunan sanal moleküllerden benzil türevi, 55 sentezlenmek üzere seçilmiştir. Bu türevin reseptöre bağlanma enerjisinin -11,43 kkal/mol olması, ARG394

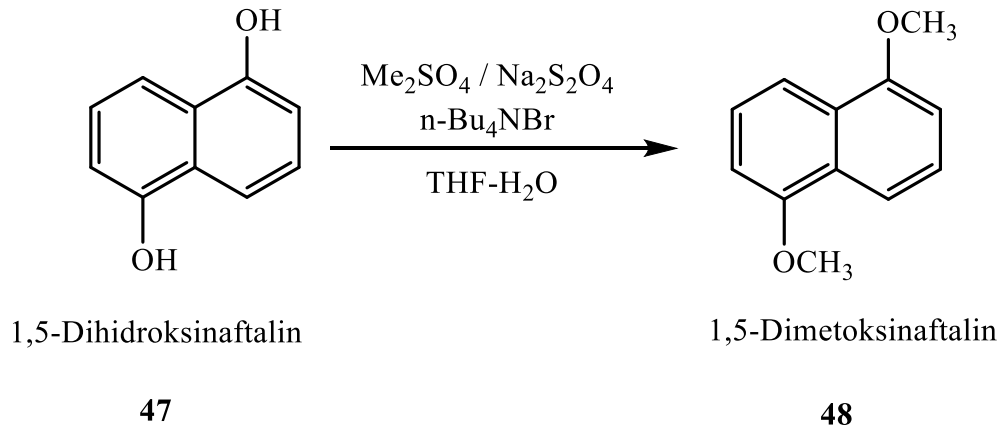
ile 2,32 Å uzunluğunda H-bağı yapmış olması ve başka moleküler etkileşimlerinin olması da seçimimizde önemli olmuştur. Bundan sonraki bölümde deneysel çalışmalarımız ve sonuçları ile ilgili bilgiler verilecektir.

4.2 Deneysel Araştırma Bulguları

Teorik olarak çalıştığımız en yüksek biyolojik aktivite gösteren sanal moleküllerden birisi olan 55 numaralı (1*E*,4*E*)-6-(1-(benziltiyo)-4-metilpent-3-en-1-il)- 5,8-dimetoksi-4a,8a-dihidronaftalin-1,4-dion dioksimin sentezine bu kısımda yer verilmiştir. 9 Basamakta sentezi gerçekleştirilen sanal molekülün genel sentez yöntemi 3.bölümdeki şekil 3.1 ve 3.2’de gösterildiği gibidir. Elde edilen moleküller ¹H NMR spektrumları ile karakterize edilmiştir. Öncelikle, kükürt içeren şikonin oksim türevlerini sentezleyebilmek için çıkış maddesi olarak kullanılacak olan piyasada ticari olarak satılmayan 1,4,5,8-tetrametoksi-2-naftaldehit (38) elde edilmiştir. Naftaldehit sentezine 1,5-dihidroksi naftalinden başlanmış, önce 1,5-dimetoksinaftaline, sonra 1,5-dibromo-4,8-dimetoksinaftaline ve ardından, 1,5-dibromo-4,8-dimetoksinaftaline çevrilmiş son olarakda aldehit türevine dönüştürülmüştür. Daha sonraki aşamalarda hedeflenen sanal molekül şikonin oksim türevinin sentezi gerçekleştirilmiştir.

1,5-Dimetoksinaftalinin sentezi (48)

Şekil 4.5’te gösterilen 1,5-dimetoksinaftalinin sentezinde O-metilleme yapmak için tetrabütülamonyum bromür (1g, 5 mmol), sodyum ditiyonit (1g, 5 mmol) ve (7,2 g, 180 mmol) sodyum hidroksit azot ortamındaki, 1,5-dihidroksinaftalinin (12g, 75 mmol) 150 mL (2:1) THF-H₂O çözeltisine eklenmiştir. Daha sonra dimetil sülfat (14,3 mL, 150 mmol), sıcaklık 30°C’nin altında olacak şekilde reaksiyon ortamına damla damla eklenmiştir. 4 Saat sonra tepkime sonlandırılıp oluşan katı süzme yardımıyla toplanmıştır. Azot atmosferinde sonlandırılan reaksiyonda sarı-siyah renkli katı oluşmuş, THF’den kristallendirilmiş ve sarı parlak renkli kristaller edilmiştir. Ürün miktarı 13,8 gramdır.



Şekil 4.5 1,5-Dimetoksinaftalin sentezi

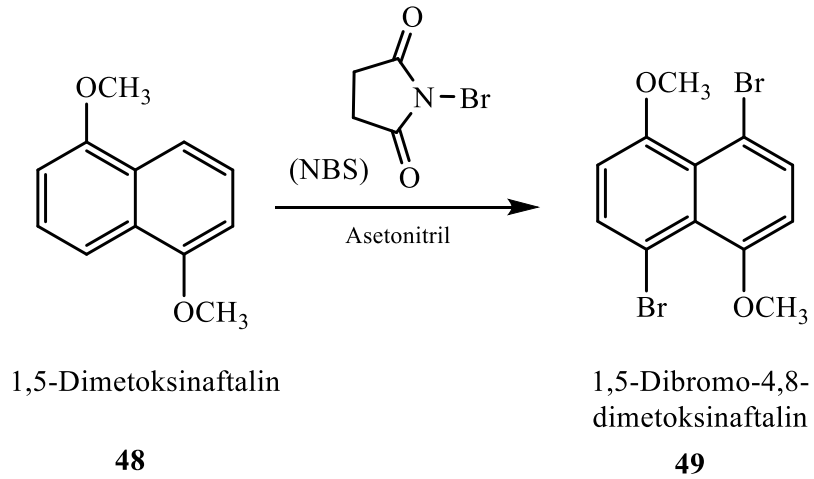
Verim: %98

Erime noktası: 183-184°C (Lit. 183-185°C, Wang, 2010)

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃), δ_H/ppm: 7,88 (i, J=8,53 Hz, 2H, ArH), 7,42 (ü, J=6,2 Hz 2H, ArH), 6,88 (i, J=8,08 Hz, 2H, ArH), 4,03 (t, 6H, OCH₃) (EK-6'da ayrıntılı spektrum verilmiştir).

1,5-Dibromo-4,8-dimetoksinaftalin sentezi (49)

Şekil 4.6'da gösterilen 1,5-dibromo-4,8-dimetoksinaftalin sentezinde bir önceki aşamada elde edilen 1,5-dimetoksinaftalinin (9,4g, 50 mmol) asetonitril içindeki (100 mL) süspansiyonu tuz-buz banyosunda soğutulan balona alınmıştır. Azot ortamında 1,5-dimetoksinaftalin karıştırılırken, ayrı ortamda N-bromsüksinimit (NBS) (22,2g, 125 mmol) – asetonitril (150 mL) içinde çözülerek reaksiyon karışımına damla damla eklenmiştir. Oluşan karışım azot ortamında, 10°C sıcaklığı geçmeyecek şekilde 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Elde edilen ürün (grimsi-yeşil katı) süzme yardımıyla toplanarak önce, metanol ile daha sonra petrol eteri ile yıkanmıştır. Açık yeşil renkli pudra şeklinde ürün elde edilmiştir. Ürün miktarı 15,2 gramdır.



Şekil 4.6 1,5-Dibromo-4,8-dimetoksinaftalin sentezi

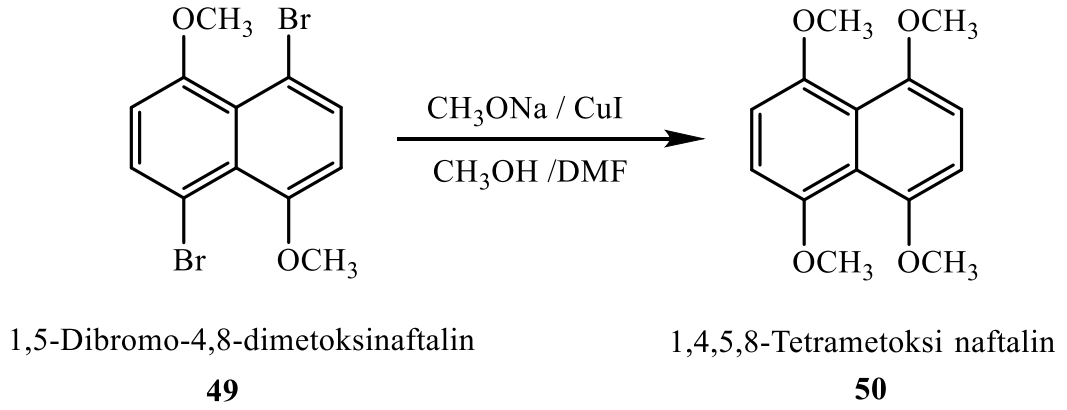
Verim: %88

Erime noktası: 183-185°C (Lit.185-187°C , Wang, 2010)

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃, δ_H/ppm: 7,72 (i, J=8,53 Hz, 2H, ArH), 6,76 (i, J=8,52 Hz, 2H, ArH), 3,94 (t, 6H, OCH₃) (EK-7’de ayrıntılı spektrum verilmiştir).

1,4,5,8-Tetrametoksinaftalin sentezi (50)

Şekil 4.7’de gösterilen 1,4,5,8-tetrametoksinaftalin sentezinde 1,5-dibromo-4,8-dimetoksinaftalin (11g, 32 mmol), bakır(I)iyodür (20g, 106 mmol), sodyum metoksit (5.7g, 106 mmol), 150 mL metanol ve 150 mL DMF reaksiyon balonuna alınarak 36 saat boyunca geri soğutucu altında karıştırılmıştır. Daha sonra reaksiyon karışımında ürün sıcakken süzülmüştür. Süzüntü buzlu su ile muamele edilerek ürünün çökmesi sağlanmıştır. Daha sonra çöken katılar süzülüş ve etil asetatla yeniden kristallendirilmiştir. Ürün parlak pembe-beyaz renkli katı olarak elde edilmiştir. Ürün miktarı 6,78 gramdır.



Şekil 4.7 1,4,5,8-Tetrametoksinaftalin sentezi

Verim: % 86

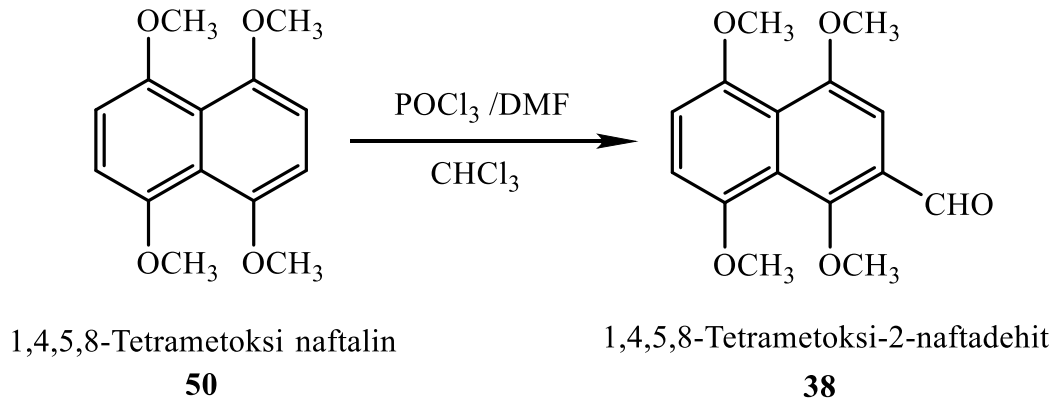
Erime noktası: 166-167°C (Lit. 167-168°C , Wang, 2010)

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃), δ_H/ppm: 6,84 (t, 4H, ArH x 4), 3,90 (t, 12H, OCH₃)

(EK-8’de ayrıntılı spektrum verilmiştir).

1,4,5,8-Tetrametoksi-2-naftaldehit sentezi (38)

Şekil 4.8’de gösterilen 1,4,5,8-tetrametoksi-2-naftaldehit sentezinde elektrofilik aromatik süstitüsyon ile formilleme yapılmıştır. DMF (8,8 g, 120,8 mmol) buz banyosunda soğutulmuş ve üzerine geri soğutucu altında N₂ atmosferinde POCl₃ (18,2 g, 120,8 mmol) eklenmiştir. 1,4,5,8-Tetrametoksinaftalinin (6g, 24,3 mmol) kloroformdaki (40 mL) çözeltisi balona yavaşça damla damla eklenmiştir. 6 Saat boyunca geri soğutucu altında karıştırılmıştır. Süre sonlandıktan sonra oda sıcaklığına getirilen balondaki reaksiyon karışımına yavaş yavaş buzlu su eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 saat karıştırılmıştır. Elde edilen katı madde heksandan kristallendirilmiştir ve parlak neon sarı renkli ürün elde edilmiştir. Ürün miktarı 6,63 gramdır.



Şekil 4.8 1,4,5,8-Tetrametoksi-2-naftaldehit sentezi

Verim: % 99

Erime noktası: 124-125 °C (Lit. 124-125.5°C , Terada, 1987)

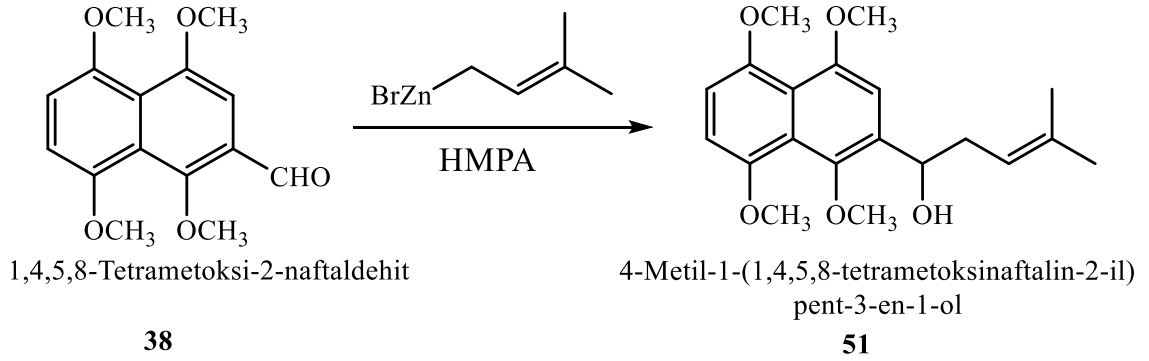
¹H NMR Spektrumu (CDCl₃), δ_H/ppm: δ 10,56 (t, 1H, ArCHO), 7,26 (t, 1H, ArH), 7,05 (i, J= 7,8, 1H, ArH), 6,94 (i, J=7,4, 1H, ArH), 3,99 (t, 3H, OCH₃), 3,98 (t, 3H, OCH₃), 3,90 (t, 3H, OCH₃), 3,91 (s, 3H, OCH₃) (EK-9’da ayrıntılı spektrum verilmiştir).

Sentez çalışmalarının bundan sonraki aşamasında tasarlanan sanal molekül şikonin oksim türevinin sentezi ile ilgili bulgular açıklanmıştır.

4-Metil-1-(1,4,5,8-tetrametoksinaftalin-2-il)pent-3-en-1-ol sentezi (51)

İlk olarak şekil 4.9’da gösterilen reaksiyon ile yapıya prenil grubu eklenmiştir. 4-Metil-1-(1,4,5,8-tetrameoksinaftalin-2-il)pent-3-en-1-ol sentezinde susuz THF (150 mL) içindeki çinko (10 g, 1,54 mol) süspansiyonuna prenil bromür (4-bromo-2-metil-2-büten (8 ml, 0,07 mol)) eklenip oda sıcaklığında azot atmosferinde 2 saat karıştırılmıştır. Oluşturulan prenil çinko bromüre, 1,4,5,8-tetrametoksi- 2-naftaldehit (2,76 g, 10 mmol), susuz THF (40 mL) eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 saat karıştırılmıştır. 1 Saatin sonucunda bulanık sarı renkli çözelti elde edilmiştir. HMPA (20 mL) eklenmesiyle reaksiyon karışımı berrak sarı olmuş ve THF damıtılmıştır. Reaksiyon karışımı 130 °C’de 8 saat karıştırılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığına getirilen çözelti amonyum klorür çözeltisi ile hidroliz edilmiştir. Etil asetat ile ekstraksiyonu yapılmıştır ve ardından tuzlu su ile yıkanmıştır. Çözücü uçurulduktan sonra sarı-kahverengi madde elde edilmiştir. Saf madde flaş kolon kromatografisiyle hekzan: etilasetat (1:2) çözücü karışımında

ayrılmıştır ve açık kahve renkli yağmsı madde elde edilmiştir. Ürün miktarı 2,91 gramdır.



Şekil 4.9 4-Metil-1-(1,4,5,8-tetrametoksinaftalin-2-il)pent-3-en-1-ol sentezi

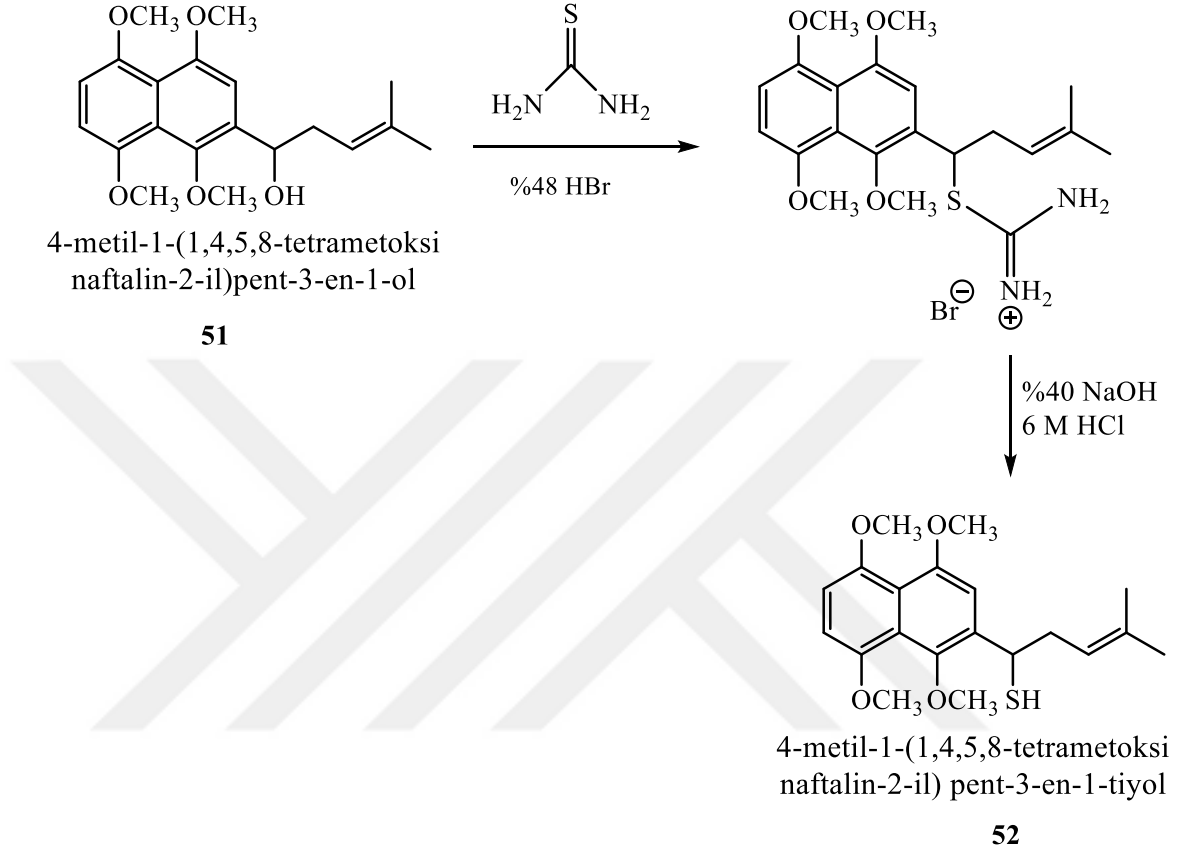
Verim: % 84

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃), δ_H/ppm: 7,28 (t, 1H, OH), 7,04 (t, 1H, ArH), 6,82 (t, 2H, ArH), 5,28 (gt, 2H, ArCH₂CH₂ ve CH₂CH=C), 3,97 (t, 3H, OCH₃), 3,95 (t, 3H, OCH₃), 3,91 (t, 3H, OCH₃), 3,78 (t, 3H, OCH₃), 2,53 (gt, 2H, CHCH₂CH=C), 1,74 (t, 3H, =C-CH₃), 1,67 (t, 3H, =C-CH₃) (EK-10'da ayrıntılı spektrum verilmiştir).

4-Metil-1-(1,4,5,8-tetrameoksinaftalin-2-il) pent-3-en-1-tiyol sentezi (52)

Daha sonra şekil 4.10'da gösterilen 4-metil-1-(1,4,5,8-tetrameoksinaftalin-2-il) pent-3-en-1-tiyol sentezinde prenil grubundaki -OH grubu, tiyoüre tuzuna dönüştürülür. Ardından önce bazik sonra asidik hidroliz ile tiyol grubu oluşturulur. Bu deneyin yapılışında 4-metil-1-(1,4,5,8-tetrameoksinaftalin-2-il)pent-3-en-1-ol (0,87 g, 0,0025 mol), tiyoüre (0,38 g, 0,005 mol) ve etanol (30 mL) balona alınmış ve üzerine damla damla %48 HBr (0,56 mL) eklenmiştir. Geri soğutucu altında 1,5 saat ısıtılarak karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığına geldikten sonra dietil eter ve su eklenmiştir. Sulu faz %40 NaOH çözeltisi ile (yaklaşık 10 mL) bazikleştirilmiş ve azot atmosferi altında geri soğutucuda 2 saat ısıtılmıştır. Reaksiyon karışımı soğutularak, 6M HCl ile asitlendirilmiştir. Diklorometan ile (3 x 15 mL) ekstrakte edilip, MgSO₄ üzerinden kurutulmuştur. Çözücü uzaklaştırıldıktan sonra kahverengi yağmsı madde elde edilmiştir. Saf madde flaş kolon kromatografisiyle heksan:etilasetat (5:1) çözücü

karışımında ayrılmıştır. Kahverengi-sarı yağ formunda madde elde edilmiştir. Ürün miktarı 0,79 gramdır.



Şekil 4.10 4-Metil-1-(1,4,5,8-tetrameoksinaftalin-2-il) pent-3-en-1-tiyol sentezi

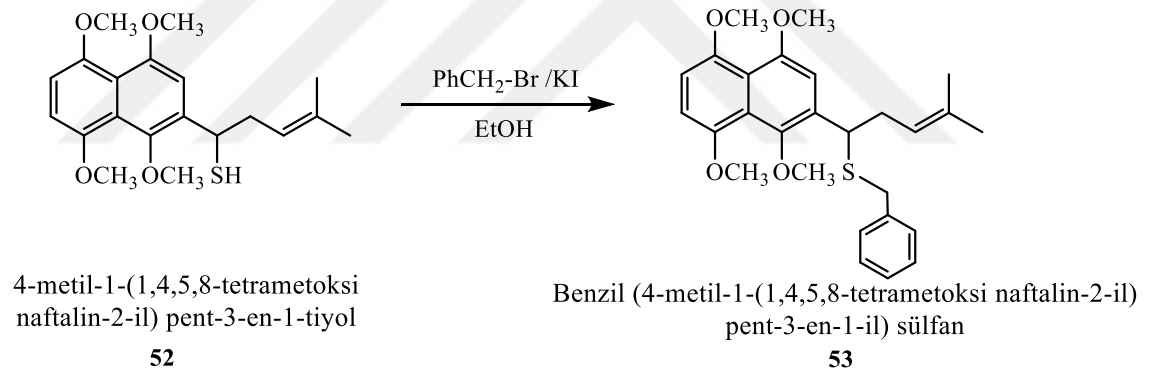
Verim: % 87

^1H NMR Spektrumu (CDCl_3), δ_{H} /ppm: 6,99 (t, 8, ArH), 6,84 (gt, 2H, ArH), 5,14 (gt, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}$), 4,84 (gt, 1H, ArCHCH_2), 3,98 (t, 3H), 3,95 (t, 3H), 3,91 (t, 3H), 3,80 (t, 3H), 2,67 (gt, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}$), 2,08-2,66 (pç, SH), 1,70 (t, 3H, $=\text{C}-\text{CH}_3$), 1,65 (t, 3H, $=\text{C}-\text{CH}_3$) (EK-11’de ayrıntılı spektrum verilmiştir).

Benzil (4-metil-1-(1,4,5,8-tetrametoksinaftalin-2-il) pent-3-en-1-il) sülfan sentezi (53)

Bu aşamada, hesapsal yöntemlerle belirlenmiş olan sanal molekül substitüenti benzil grubu kükürt atomundan bağlanmıştır. Şekil 4.11’de gösterilen benzil (4-metil-1-(1,4,5,8- tetrametoksinaftalin -2- il) pent-3-en-1-il) sülfan sentezlenmiştir (Şekil 4.11).

4-Metil-1- (1,4,5,8-tetrametoksinaftalin-2-il) pent-3-en-1-tiyolün (0,50 mmol), etanol (10 mL) çözeltisine benzil bromür (0,6 mmol) ve KI (0,05 mmol) eklenmiştir. Ardından balona %40 NaOH (0,5 mL) eklenmiştir. Reaksiyon karışımı, azot atmosferinde geri soğutucu altında 5 saat ısıtılmıştır. 5 Saat sonunda oda sıcaklığına gelen reaksiyon karışımı kloroform ile ekstrakte edilerek, MgSO₄ üzerinde kurutulmuş, kloroform ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra kahverengi yağmsı madde elde edilmiştir. Madde flaş kolon kromatografisiyle silika jel üzerinde hekzan:eter çözücü karışımında ayrılmıştır. Kahverengi yağ formunda madde elde edilmiştir. Ürün miktarı 0.16 gramdır.



Şekil 4.11 Benzil (4-metil-1-(1,4,5,8-tetrametoksinaftalin-2-il) pent-3-en-1-il) sülfan sentezi

Verim: % 71

¹H NMR Spektrumu (CDCl₃), δ_H/ppm: 7,32 (i, J=6,70, 2H, ArH), 7,31 (ii, J=7,83, J=7,73, 2H, ArH), 7,20 (t, 1H, ArH), 7,12 (t, 1H, ArH), 6,87 (gt, 2H, ArH), 5,14 (gt, 1H, CH₂CH=C), 4,71-4,68 (ü, 1H, J=6,27, J=6,26 Hz, ArCHS), 4,54 (t, 1H, SCH₂Ar), 3,98 (t, 3H, OCH₃), 3,96 (t, 3H, OCH₃), 3,94 (t, 3H, OCH₃), 3,92 (t, 3H, OCH₃), 3,74 (i, J=6,8 Hz, 1H, SCH₂Ar), 3,59 (i, J=7,4 Hz, 1H, SCH₂Ar), 2,63 (gt, 1H, CH₂CH=C), 1,64 (t, 3H, =C-CH₃), 1,58 (t, 3H, =C-CH₃) (EK-12’de ayrıntılı spektrum verilmiştir).

5. SONUÇ

Tez kapsamında bütün çalışmalar, deneysel ve teorik olarak yapılmıştır. Teorik olarak yapılan çalışmalarda hedeflenen bütün moleküllerin PM6 yönteminde ve DFT yönteminden üç parametrelili hibrit-Becce değişim fonksiyonu ile Lee-Yang-Parr korelasyon fonksiyonlarının birleşimi olan B3LYP fonksiyonu ve 6-37(d,p) temel kümesi ile yapısal ve fizikokimyasal özellikleri hesaplanmıştır. En düşük enerjili konformore sahip moleküllerin toplam enerjisi ve sıfır noktası titreşim enerjisi (E_{ZPVE}), HOMO-LUMO enerjileri, dipol momentleri, iyonlaşma enerjisi, elektron ilgisi, elektronegatiflikleri, kimyasal sertlik ve kimyasal yumuşaklığı, elektrofilik ve nükleofilik özellikleri hesaplanmıştır ve kendi içlerinde uyumlu sonuçlar vermiştir. Bu fizikokimyasal özelliklerin tamamı QSAR analizinde bağımsız değişkenler olarak kullanılmıştır.

QSAR analizinde, %80 çalışma ve %20 test seti (30:4) olacak şekilde rastgele ayrılan molekül grubunun deneysel olarak literatürden alınan bağımlı değişken pIC_{50} ile bağımsız değişken olan hesapladığımız fizikokimyasal parametrelerin anlamlı denklem ve istatistik analiz sonucu şöyledir:

$$pIC_{50} = -0,15871 * S - 0,09521 * E_{gap} - 0,08323 * Dipole - 0,04454 * A + 4,60394$$

İstatistiksel modele bağlı olarak gözlemlenen örneklem sonuçlarının anlam kriteri %5 düzeyinde, R^2 değeri ise % 62'dir. Teorik olarak tahmin edilen IC_{50} değeri ile literatürden alınan deneysel olarak ölçülmüş IC_{50} değerinin farkının doğrulanmasında veri seti ve test seti için validasyon yapılmıştır. Çalışma seti için en uygun validasyon yöntemi model ile %99 korelasyonda, %97 R^2 değerinde “eXtreme Gradient Boosting” yöntemi olmuştur. Çalışma seti için korelasyon değerleri 1'e oldukça yakın bulunmasına karşın test seti için bulunan değerler nispeten daha düşüktür. Bu durum, test setinde yer alan moleküllerin sayısının az olmasından kaynaklanmaktadır.

Kimyasal çeşitleme yoluyla oluşturulan sanal moleküllerin IC₅₀ değerinin tahmin edilmesinde aynı denklem kullanılmıştır. İçlerinde en yüksek IC₅₀ değerine sahip “55” sanal molekülü olmuştur.

Hedef moleküllerin (ligandların), meme kanseri tedavisinde birçok ilacın çok iyi bağlandığı östrojen reseptörü (ER) (PDB ID: 26OK) ile etkileşimi tahmin etmek için doking tekniği kullanılmıştır. En düşük bağlanma enerjisine sahip moleküller çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1 Çalışılan tüm moleküller arasında en düşük bağlanma enerjisine sahip moleküller

Bileşik	Bağlanma enerjisi (Kcal/mol)	RMSD	İnhibisyon Sabiti (Ki) nM	Hidrojen Bağı(ilac-enzim)
11	-10,26	1,57	29,91	MET528
22	-12,06	1,21	1,45	ASP3519/GLU353/ARG394
59	-11,93	0,96	1,79	GLU353/ARG394/LEU387
61	-11,94	1,31	1,76	ARG394

Çizelge 5.1’den görüldüğü gibi çalışılan moleküllerin tamamında bağlanma enerjileri oldukça uygun olmakla beraber en düşük bağlanma enerjisine (-12,06 kcal/mol) sahip olan molekül, 22 ligandır. Bu ligand, ARG394 amino asidi ile 6,24 Å, GLU353 ile 4,79 Å ve THR347 ile 3,31 Å uzunluğunda hidrojen bağları yapmış ve diğer birçok hidrofobik etkileşim de gözlemlenmiştir. Sanal moleküller için bulunan sonuçlar, referans aldığımız meme kanseri ilaçları ile oldukça uyumludur. Tasarlanan sanal moleküllerin kanser hücrelerinin tedavilerinde potansiyel yeni ajanlar olarak kullanılabileceği sonucuna varılabilir.

Çalıştığımız moleküllerin yeni ilaç keşfinde öncülük etmesinin tahminleri için ADME ve toksisite özellikleri incelenmiştir. Literatürün kabul gördüğü ilaçların oral olarak alınan aktif bileşiklerin doğrudan ilişkili olduğu Lipinski’nin beş kuralını ihlal etmeyen moleküller: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 35, 36 ve sanal moleküllerin

tamamıdır. Bu moleküller, ilaç adayı olarak görülmesi için gerekli koşulları taşımaktadır fakat başarılı bir ilaç olarak kabul görmesi için yeterli olmamaktadır. Bu sebeple ilaç benzeri moleküllerin kabul kriterleri arasına sentetik olarak erişebilirliği, biyoyararlanım puanı, kanserli fare ve sıçanlardaki etkisinin tahmini yapılmıştır; bütün moleküllerin biyoyararlanım puanı %10 kriterini karşılamaktadır. Kanser sıçanlara göre kanser farelerde moleküller pozitif sonuç vermiştir. Moleküllerin sentetik erişebilirlikleri yapılan tahminlere göre orta zorluk seviyesindedir.

ADME parametrelerine göre, Caco-2 hücre modelinde 20 ve 69 molekülleri hariç çalışılan bütün moleküllerin oral ilaç absorpsiyon tahmininin orta geçirgenlikte olduğu, %HIA değerlerine bakıldığında bütün moleküllerin bağırsaktaki emilimleri iyi derecede olduğu, kan beyin bariyeri geçirgenliğinde moleküllerin merkezi sinir sistemine yan etki yapabileceği, 22 ve 74 harici bütün moleküllerin P-glikoproteinine dirence karşı azaltıcı etki göstereceği, moleküllerin plazma proteinlerine bağlanma derecesi %72 ile %99 arasında olduğu tahmin edilmiştir.

Son olarak tezin amacı doğrultusunda tasarladığımız teorik olarak en yüksek biyolojik aktivite gösteren, ekonomik ve sentetik erişebilirliği orta seviyede olan, sanal moleküllerden kükürt içeren şikonin oksim benzil türevi 55 numaralı ((1*E*,4*E*)-6-(1-(benziltiyo)-4-metilpent-3-en-1-il)-5,8-dimetoksi-4a,8a-dihidronaftalin-1,4-dion dioksim) sentezinin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir, ancak 7.basamaktaki 77 numaralı benzil (4-metil-1-(1,4,5,8-tetrametoksinaftalin-2-il) pent-3-en-1-il) kısmına kadar sentezi yapılmıştır. 7 Basamakta sentezi gerçekleştirilen sanal molekülün sentezinin her basamağında elde edilen bileşikler ¹H NMR spektrumları ile karakterize edilmiştir. Her basamak için %verim çizelge 5.2’de verilmiştir.

Çizelge 5.2 Benzil türevinin sentez basamaklarının verimi

Sentez Basamakları	Sentezlenen Molekülün IUPAC Adı	Verim, %
1	1,5-Dimetoksinaftalin (48)	98
2	1,5-Dibromo-4,8-dimetoksinaftalin (49)	88
3	1,4,5,8-tetrametoksinaftalin (50)	86
4	1,4,5,8-tetrametoksi-2-naftaldehit (38)	99
5	4-metil-1-(1,4,5,8-tetrametoksinaftalin-2-il) pent-3-en-1-ol (51)	84
6	4-metil-1-(1,4,5,8-tetrameoksinaftalin-2-il) pent-3-en-1-tiyol (52)	87
7	Benzil(4-metil-1-(1,4,5,8-etrametoksinaftalin-2-il)pent-3-en-1-il) (53)	71

KAYNAKLAR

- Andujar, I., Recio, M.C., Giner, R.M., Ríos, J.L. 2013. Traditional Chinese medicine remedy to jury: the pharmacological basis for the use of shikonin as an anticancer therapy. *Curr. Med. Chem.*, (20), 2892-2898.
- Anonymous. 20218. Web Sitesi: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html> Erişim Tarihi: 26.11.2022
- Anonymous. 20219. Web Sitesi: <https://cccbdb.nist.gov/Intro.asp> Erişim Tarihi: 21.06.2019
- Anonymous. 2021. Web Sitesi: <http://www.sthda.com/english/articles/38-regression-model-validation/157-cross-validation-essentials-in-r> Erişim tarihi: 22.11.2021
- Balani, S.K., Miwa, G.T., Gan, L.S., Wu, J.T., Lee, F.W. 2005. Strategy of utilizing in vitro and in vivo ADME tools for lead optimization and drug candidate selection. *Cur. Top. Med. Chem.*, 5(11), 1033–1038.
- Becke, A. D. 1988. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic-behavior. *Phy. Rev. A*, (38), 3098–3100.
- Berkowitz, M. and Parr, R.G. 1988. Molecular hardness and softness, local hardness and softness, hardness and softness kernels, and relations among these quantities. *J. Chem. Phys.*, (88), 2554.
- Burstein, H.J., Lacchetti, C., Anderson, H., Buchholz, T.A., Davidson, N.E., Gelmon, K.A. 2019. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-pozitif breast cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol.*, 37(5), 423-438.
- Daina, A., Michielin, O. and Zoete, V. 2017. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *scientific reports*, (7), Article No. 42717. <http://www.swissadme.ch/> <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Dhar, A., Liu, S.Q., Klucik, J., Berlin, K.D., Madler, M.M., Lu, S.N., Ivey, R.T., Zacheis, D., Brown, C.W., Nelson, E.C., Brickbichler, P.J. ve Benbrook, D.M. 1999. Synthesis, structure-activity relationships, and RARgamma-ligand interactions of nitrogen heteroarotinooids *J. Med.Chem.*, (42), 3602-3614.
- Ditchfield, R., Hehre, W.J., Pople, J.A. 1971. Self-consistent molecular-orbital methods. IX. An extended Gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules. *J. Chem. Phys.*, (54), 724–728.
- Domingo, L.R. and Pérez, P. and Contreas, R. 2002. Quantitative characterization of the local electrophilicity of organic molecules. *J. Phys. Chem. A*, 106(29), 6871-6875.
- Domingo, L.R. and Pérez, P. 2011. The nucleophilicity N index in organic chemistry. *Org. Biomol. Chem.*, (9), 7168-7175.
- Dykstra, K.D., Guo, L., Birzin, E.T., Chan, W., Yang, Y.T., Hayes, E.C., DaSilva, C.A., Pai, L.-Y., Mosley, R.T., Kraker, B., Fitzgerald, P.M.D., DiNinno, F., Rohrer, S.P., Schaeffer, J.M., Hammond, M.L. 2007. Estrogen receptor ligands. Part 16: 2-Aryl

- indoles as highly subtype selective ligands for Eralpha, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (17), 2322-2328.
- Fan, J., Fu, A. and Zhang, L. 2019. Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7(2), 85.
- Garrett, M.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J. 1999. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.*, 19(14), 1639-1662.
- Hou, Y., Guo, T., Wu, C., He, X., Zhao, M. 2006. Effect of shikonin on human breast cancer cells proliferation and apoptosis in vitro. *Pharm. Soc. Japan*, 126(12), 1383-1386.
- Huang, G., Zhao, H.R., Meng, Q.Q., Zhang, Q.J., Dong, J.Y., Zhu, B.Q., Li, B.Q. 2018. Synthesis and biological evaluation of sulfur-containing shikonin oxime derivatives as potential antineoplastic agents. *Eur. J. Med. Chem.*, (143), 166-181.
- Kontogiannopoulos, K.N., Assimopoulou, A.N., Dimas, K., Papageorgiou, V.P. 2011. Shikonin loaded liposomes as a new drug delivery system: Physicochemical characterization and in vitro cytotoxicity. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, (113), 1113-1123.
- Lee, C., Yang, W., Parr, R.G. 1988. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, (37), 785-789.
- Lee SK, Kang Y, Chang GS, Lee IH, Park SH, Park J, 2017. Bioinformatics and Molecular Design Research Center. Yonsei University, Seoul <https://preadmet.qsarhub.com/adme/>
- Li, W., Liu, J., Jackson, K., Shi, R., Zhao, Y. 2014. Sensitizing the therapeutic efficacy of taxol with shikonin in human breast cancer cells. *Plos One*, 4(9), e94079.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J. 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, (23), 3-25.
- Lobell, M., Molnár, L., Keserü, G.M. 2003. Recent advances in the prediction of blood-brain partitioning from molecular structure. *J. Pharm Sci.*, 92(2), 360-370.
- Molinspiration, C. 2011. Calculation of molecular properties and bioactivity score. <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>.
- 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. Comput. Chem.*, 30(16), 2785-2791.
- Papageorgiou, V.P., Assimopoulou, A.N., Samanidou, V.F., Papadoyannis, I. 2006. Analytical methods for the determination of alkanins and shikonins. *Curr. Org. Chem.*, 10(5), 583-622.
- Parr, R.G., Donnelly, R.A., Levy M. and Palke, W.E. 1978. Electronegativity: The density functional viewpoint. *J. Chem. Phys*, 68, 3801.
- Parr, R.G., Szentpály, L. and Liu, S. 1999. Electrophilicity Index. *J. Am. Chem. Soc.*, 121(9), 1922-1924.

- Ravichandran, V., Harish, R., Abhishek, J., Shalini, S., Christopher, P., Ram, K.A. 2011. Validation of QSAR models-strategies and importance. *Int J. Drug Design and Discovery*, (2), 511-519.
- Rubing, W., Runting, Y., Zhou, W., Defeng, X., Shaoshun, L. 2012. Shikonin and its derivatives: a patent review. *Expert Opin. Ther. Patents*, 22(9).
- Sasaki, K., Abe, H., Yoshizaki, F. 2002. In vitro antifungal activity of naphthoquinone derivatives. *Biol Pharm Bull.* 25(5), 669-670.
- Stein, T., Autschbach, J., Govind, N., Kronik, L., Baer R. 2012. Curvature and frontier orbital energies in density functional theory. *J. Phys. Chem. Lett.*, (3), 3740- 3744.
- Su, Y.H., Xie, J.S., Wang, Y.G., Hu, X., Lin, X.F. 2010. Synthesis and antitumor activity of new shikonin glycosides. *Eur. J. Med. Chem.*, (45), 2713-2718.
- Sut, S., Pavela, R. 2017. Identification of onosma visianii roots extract and purified shikonin derivatives as potential acaricidal agents against tetranychus urticae. *Molecules*, 22(6), 1002.
- Şener, E.A. ve Yalçın, İ. 2003. Farmasötik /Medisinal kimya'da ilaç etken madde tasarım yöntemleri-1: kantitatif yapı-etki ilişkileri analizleri (QSAR). Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 331, Ankara.
- Terada, A., Tanoue, Y., Hatada, A. 1983. Total synthesis of shikalkin. *J. Chem. Soc.*, (21), 987-988.
- Yamashita, S., Furubayashi, T., Kataoka, M., Sakane, T., Sezaki, H., Tokuda, H. 2000. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm.*, 10(3), 195-204.
- Yao, Y., Zhou, Q. 2010. A novel antiestrogen agent shikonin inhibits estrogen-dependent gene transcription in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.*, 121(1), 233-240.
- Yee, S. 1997. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. *Pharm. Res.*, 14(6), 763-766.
- Wang, R., Zheng, X., Zhou, W., Peng, Y., Zhu, M. and Li, S. 2010. An efficient synthesis of 2-formyl-1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene. *J. Chem. Res.*, 34(9), 520-521.
- Zhao, L.M., Xu, D.F., Zhou, W., Li, S. 2008. Concise formal synthesis of (±)-shikonin via a highly alpha-regioselective prenylation of 1, 4, 5,8 - tetramethoxynaphthalene -2- carbaldehyde. *Lett. Org. Chem.*, (5), 234-236.
- Zhao, L.M., Jin, H.S., Wan, L.J. 2011. General and highly alpha-regioselective zinc-mediated prenylation of aldehydes and ketones. *J. Org. Chem.*, (76), 1831-1837.
- Zhou, W., Peng, Y., Li, S.S. 2010. Semi-synthesis and anti-tumor activity of 5,8-O-dimethyl acylshikonin derivatives. *Eur J Med Chem.*, 45(12), 6005-6011.

EKLER

EK 1 Sanal Moleküllerin Fizikokimyasal Özellikleri

EK 2 Çalışma Seti ile Tahmin Edilen Model ile İlgili Program Çıktısı

EK 3 Çalışma Seti ve Test Seti İçin Deneysel ve Hesaplanan pIC_{50} Grafiği

EK 4 Modelin Doğruluğunu Test Etmek için Çalışma Seti ile Yapılan Hesaplama Sonuçları

EK 5 Ligandların Uygun Bulunan Konformasyonların Doking Görüntüsü (A), Ligand ve Reseptörün Aktif Bölge Etkileşimleri (B)

EK 6 48 Numaralı Molekül 1,5-dimetoksinaftalinin 1H NMR Spektrumu

EK 7 49 Numaralı Molekül 1,5-dibromo-4,8-dimetoksinaftalinin 1H NMR Spektrumu

EK 8 50 Numaralı Molekül 1,4,5,8-tetrametoksinaftalinin 1H NMR Spektrumu

EK 9 38 Numaralı Molekül 1,4,5,8-Tetrametoksi-2-naftaldehitin 1H NMR Spektrumu

EK 10 51 Numaralı Molekül 4-metil-1-(1,4,5,8-tetrametoksi-2-naftalin-2-il) pent-3-en-1-olün 1H NMR Spektrumu

EK 11 52 Numaralı Molekül 4-metil-1-(1,4,5,8-tetrameoksinaftalin-2-il) pent-3-en-1-tiyolün 1H NMR Spektrumu

EK 12 53 Numaralı Molekül benzil (4-metil-1-(1,4,5,8-tetrametoksinaftalin-2-il)pent-3-en-1-il) sülfanın 1H NMR Spektrumu

EK 1 Sanal Moleküllerin Fizikokimyasal Özellikleri

Sanal moleküllerin fizikokimyasal özellikleri / PM6							
Molekül Numarası	Toplam Enerji (E_T) (kcal mol ⁻¹)	$E_{\text{elektronik}}$ (kcal mol ⁻¹)	ZPVE* (kcal mol ⁻¹)	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE ($E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$)	Dipol Moment (μ)
55	310,225	12,027	298,198	-8,612	-1,027	7,586	0,688
56	328,974	28,083	300,891	-7,543	-0,953	6,589	3,408
57	318,476	-30,684	349,160	-8,582	0,989	9,571	1,704
58	310,631	-22,423	333,054	-8,651	-0,961	7,690	1,815
59	322,132	18,904	303,228	-8,444	-1,119	7,325	1,952
60	267,865	-64,839	332,704	-8,446	-1,007	7,439	1,819
61	255,259	-64,807	320,066	-8,730	-1,063	7,667	3,735
62	265,170	-71,632	336,802	-8,687	-1,035	7,652	2,849
63	274,664	-64,864	339,529	-8,843	-1,063	7,780	2,613
64	184,728	-85,824	270,552	-8,815	-1,038	7,778	2,637
65	207,314	-97,717	305,031	-8,806	-1,030	7,776	2,589
66	222,314	-100,877	323,191	-8,815	-1,036	7,778	2,105
67	250,397	-54,182	304,579	-8,806	-1,056	7,750	2,640
68	254,243	-66,955	321,198	-8,731	-1,020	7,710	3,264
69	246,795	-59,919	306,714	-8,932	-1,223	7,709	7,698
70	216,933	-173,855	390,788	-8,501	-1,036	7,465	2,619
71	214,144	-128,401	342,545	-7,924	-1,121	6,803	4,960
72	257,571	-63,821	321,393	-8,726	-1,007	7,719	2,281
73	274,666	-64,864	339,530	-8,843	-1,063	7,780	2,611

Sanal moleküllerin fizikokimyasal özellikleri / PM6					
Molekül numarası	I (İyonizasyon Potansiyeli)	A (Elektron Afinitesi)	χ (Elektronegatiflik)	μ (Kimyasal Potansiyel)	η (Kimyasal Sertlik)
55	8,61	1,03	4,82	-4,82	3,79
56	7,54	0,95	4,25	-4,25	3,29
57	8,58	-0,99	3,80	-3,80	4,79
58	8,65	0,96	4,81	-4,81	3,84
59	8,44	1,12	4,78	-4,78	3,66
60	8,45	1,01	4,73	-4,73	3,72
61	8,73	1,06	4,90	-4,90	3,83
62	8,69	1,03	4,86	-4,86	3,83
63	8,84	1,06	4,95	-4,95	3,89
64	8,82	1,04	4,93	-4,93	3,89
65	8,81	1,03	4,92	-4,92	3,89
66	8,81	1,04	4,93	-4,93	3,89
67	8,81	1,06	4,93	-4,93	3,88
68	8,73	1,02	4,88	-4,88	3,86
69	8,93	1,22	5,08	-5,08	3,85
70	8,50	1,04	4,77	-4,77	3,73
71	7,92	1,12	4,52	-4,52	3,40
72	8,73	1,01	4,87	-4,87	3,86
73	8,84	1,06	4,95	-4,95	3,89

Sanal moleküllerin fizikokimyasal özellikleri / PM6					
Molekül numarası	S (Kimyasal Yumuşaklık)	ω (Elektrofilik Güç)	N (Nükleofilisite)	logP	MW (g/mol)
55	0,26	3,06	11,16	5,17	452,57
56	0,30	2,74	11,23	5,66	466,60
57	0,21	1,51	13,18	6,41	494,65
58	0,26	3,00	11,23	5,87	480,62
59	0,27	3,12	11,07	5,19	489,59
60	0,27	3,00	11,18	5,48	446,61
61	0,26	3,13	11,13	6,02	494,61
62	0,26	3,09	11,15	6,51	508,63
63	0,26	3,15	11,13	5,13	517,60
64	0,26	3,12	11,15	3,81	418,51
65	0,26	3,11	11,16	4,97	460,59
66	0,26	3,12	11,15	5,06	460,59
67	0,26	3,14	11,13	4,99	480,58
68	0,26	3,08	11,17	5,48	494,61
69	0,26	3,34	10,96	error	525,58
70	0,27	3,05	11,15	5,36	595,71
71	0,29	3,01	11,07	4,74	540,63
72	0,26	3,07	11,18	5,95	494,61
73	0,26	3,15	11,13	5,83	508,63

EK 2 Çalışma Seti ile Tahmin Edilen Model ile İlgili Program Çıktısı

Call:

```
lm(formula = pIC50 ~ ., data = REDUCED_DATA)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0,215011	-0,084684	0,009672	0,082471	0,160600

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	4,60394	0,04137	111,275	< 22-16 ***
A	-0,04454	0,02335	-1,907	0,06962 ,
S	-0,15871	0,04575	-3,469	0,00218 **
MW	-0,12771	0,09787	-1,305	0,20541
ET	-0,05584	0,04160	-1,342	0,19320
Egap	-0,09521	0,02770	-3,437	0,00236 **
Dipole	-0,08323	0,03274	-2,542	0,01857 *
Isopolarizability	0,25178	0,24221	1,039	0,30987
logP	0,07004	0,04839	1,447	0,16188

Signif. codes: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

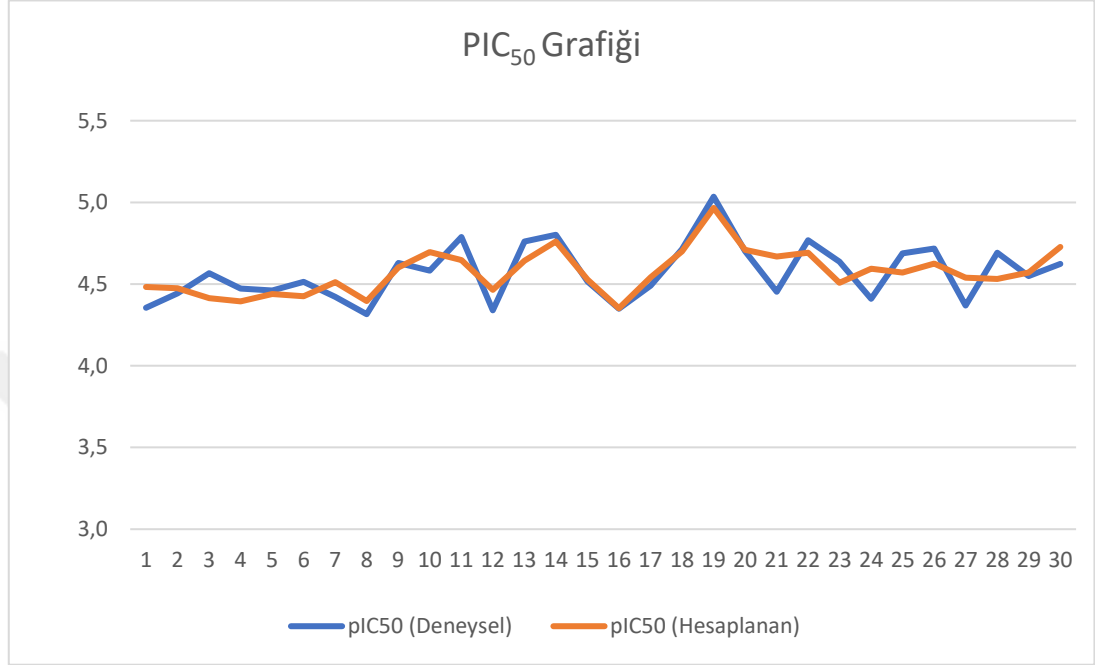
Residual standard error: 0,123 on 22 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0,6205, Adjusted R-squared: 0,4825

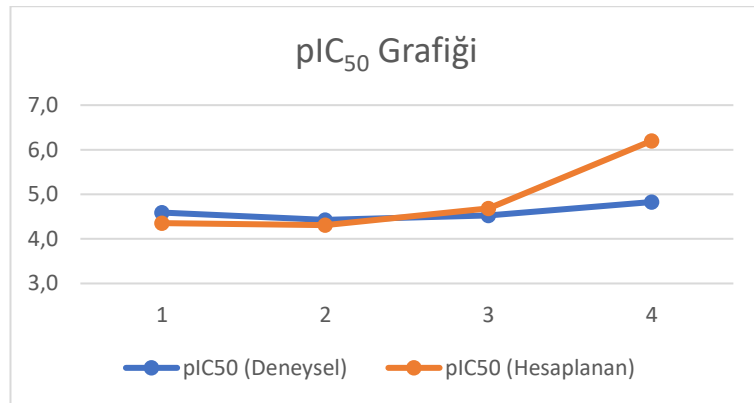
F-statistic: 4,496 on 8 and 22 DF, p-value: 0,002388

EK 3 Çalışma Seti ve Test Seti İçin Deneysel ve Hesaplanan pIC_{50} Grafiği

1. Çalışma seti için deneysel ve hesaplanan pIC_{50} grafiği



2. Test seti için deneysel ve hesaplanan pIC_{50} grafiği



EK 4 Modelin Doğruluğunu Test Etmek İçin Çalışma Seti ile Yapılan Hesaplama Sonuçları

1. Bir molekülü dışarıda bırakarak çapraz doğrulama (LOO) yöntemi

#Leave one out cross validation - Linear Regression

35 samples

8 predictor

No pre-processing

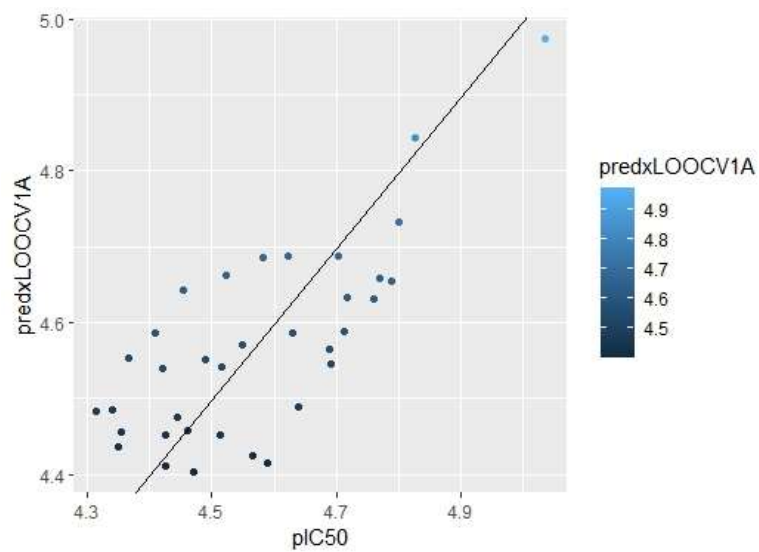
Resampling: Leave-One-Out Cross-Validation

Summary of sample sizes: 34, 34, 34, 34, 34, 34, ...

Resampling results:

RMSE	Rsquared	MAE
0,3314089	0,08878477	0,1853859

Tuning parameter 'intercept' was held constant at a value of TRUE



2. K-fold çapraz doğrulama yöntemi

K-fold cross-validation-Linear Regression

35 samples

8 predictor

No pre-processing

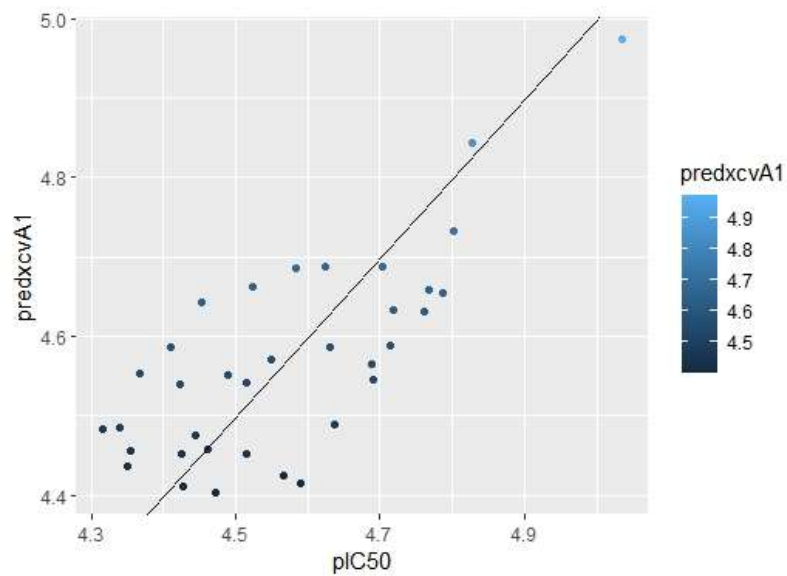
Resampling: Cross-Validated (15 fold)

Summary of sample sizes: 33, 32, 32, 33, 32, 33, ...

Resampling results:

RMSE	Rsquared	MAE
0,1940499	0,8629801	0,1632014

Tuning parameter 'intercept' was held constant at a value of TRUE



3. Tekrarlanan K-fold çapraz doğrulama yöntemi

Repeated K-fold cross-validation-Linear Regression

35 samples

8 predictor

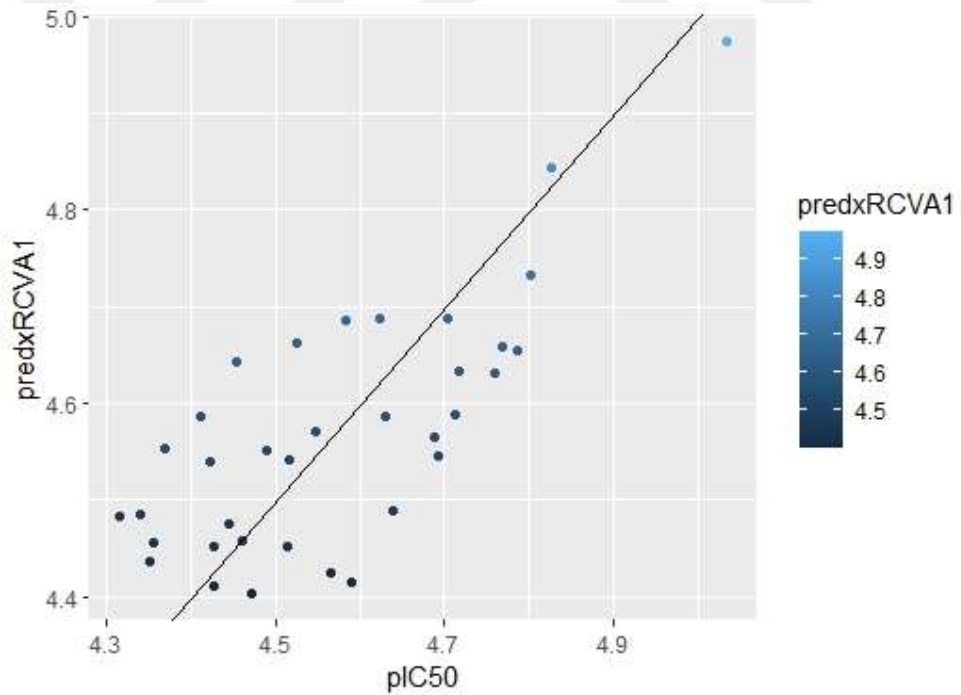
No pre-processing

Resampling: Cross-Validated (15 fold, repeated 3 times)

Summary of sample sizes: 32, 33, 33, 33, 33, 33, ...

Resampling results:

RMSE	Rsquared	MAE
0,2178345	0,8662709	0,1792253



4. Random Forest yöntemi

31 samples

8 predictor

No pre-processing

Resampling: Cross-Validated (15 fold, repeated 3 times)

Summary of sample sizes: 29, 29, 29, 29, 29, 29, ...

Resampling results across tuning parameters:

mtry	RMSE	Rsquared	MAE
1	0,1600547	0,9497769	0,1423944
2	0,1596637	0,9497025	0,1416162
3	0,1603439	0,9477813	0,1421129
4	0,1598890	0,9483814	0,1413188
5	0,1600317	0,9497827	0,1410998
6	0,1598741	0,9491322	0,1408194
7	0,1589478	0,9510591	0,1397078
8	0,1588479	0,9508279	0,1398266
9	0,1589179	0,9516660	0,1401907
10	0,1588231	0,9514535	0,1398674
11	0,1585657	0,9507758	0,1395830
12	0,1591294	0,9496091	0,1403191
13	0,1589173	0,9500039	0,1401639
14	0,1590223	0,9503638	0,1399288
15	0,1586926	0,9511213	0,1394326

RMSE was used to select the optimal model using the smallest value.

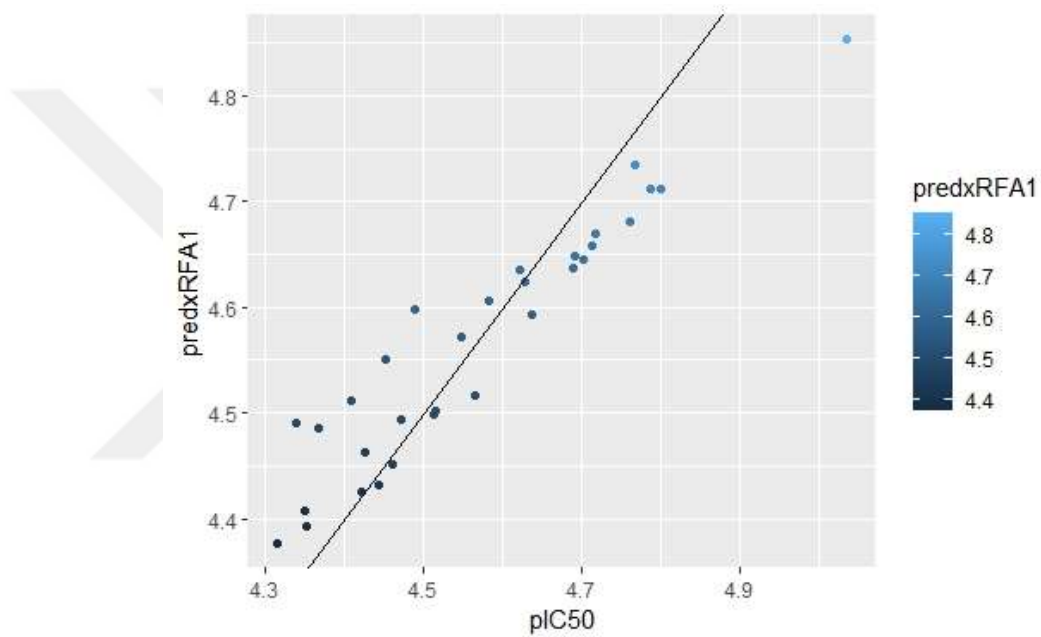
The final value used for the model was mtry = 11.

```
cor(REDUCED_DATATrain$pIC50, predxRFA1)
```

0.9498875

```
rmse(REDUCED_DATATrain$pIC50, predxRFA1)
```

0.07021778



5. Gradyan Artırma yöntemi

eXtreme Gradient Boosting

31 samples

8 predictor

No pre-processing

Resampling: Cross-Validated (15 fold, repeated 3 times)

Summary of sample sizes: 29, 29, 29, 29, 29, 29, ...

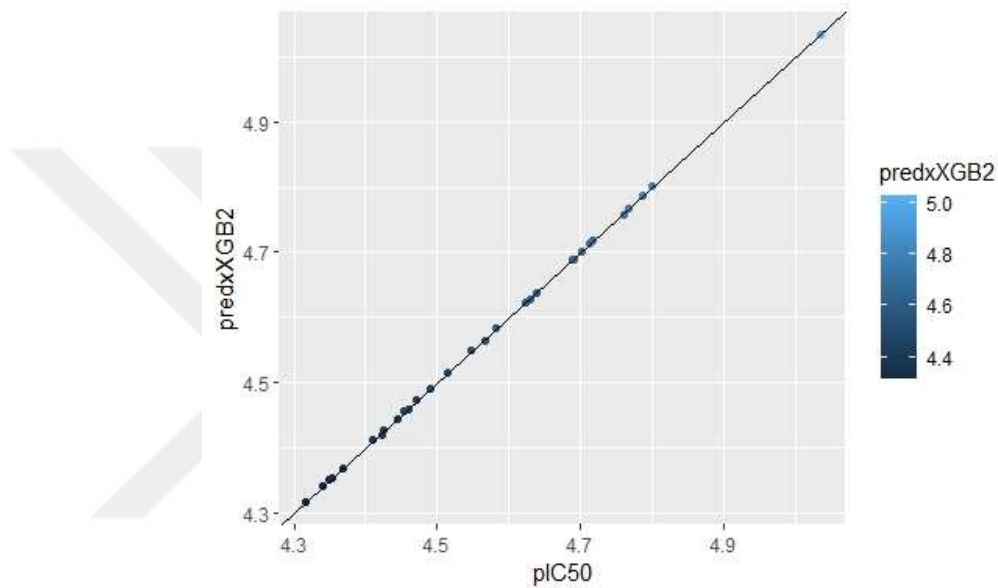
Resampling results:

RMSE Rsquared MAE

0,1820995 0,9718736 0,1635836

cor(REduced DATA Train\$pIC50, predxXGB2)

0.9999788



6. k-En Yakın Komşular yöntemi

k-Nearest Neighbors

31 samples

8 predictor

No pre-processing

Resampling: Cross-Validated (15 fold, repeated 3 times)

Summary of sample sizes: 29, 29, 29, 29, 29, 29, ...

Resampling results across tuning parameters:

k RMSE Rsquared MAE

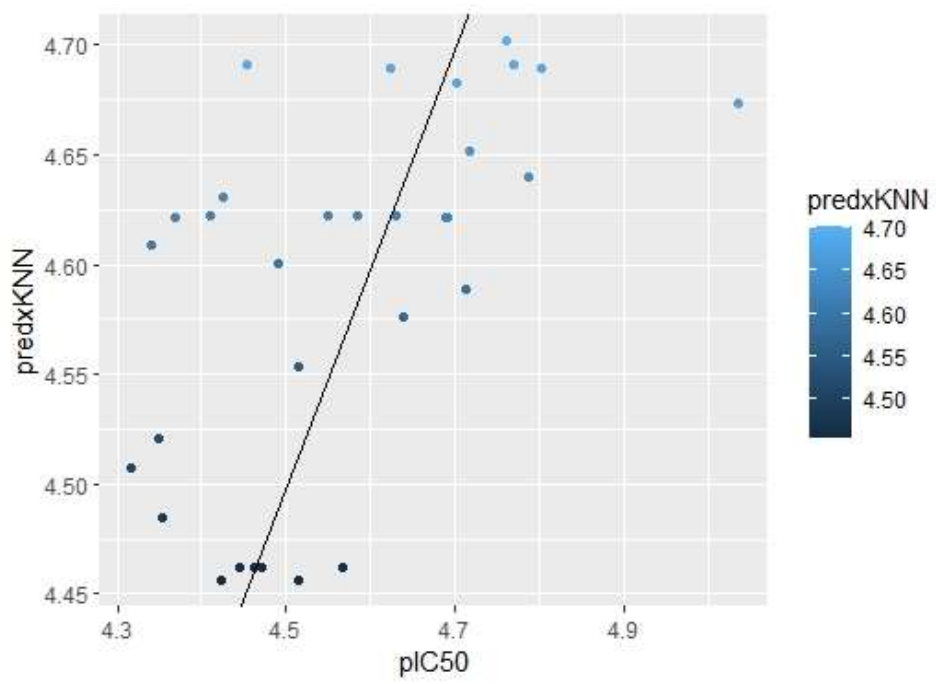
5	0,1479526	0,9896379	0,1319661
7	0,1462766	0,9929332	0,1321823
9	0,1514969	0,9825560	0,1363043
11	0,1500295	0,9979627	0,1340621
13	0,1529444	0,9889422	0,1375605
15	0,1569316	0,9912896	0,1424742
17	0,1560844	0,9857921	0,1416830
19	0,1552211	0,9757196	0,1411808
21	0,1558902	0,9860388	0,1416671
23	0,1588455	0,9913041	0,1444853
25	0,1578082	0,9789373	0,1438078
27	0,1593083	0,9944656	0,1452719
29	0,1586266	0,9821198	0,1443555
31	0,1586266	0,9821198	0,1443555
33	0,1586266	0,9821198	0,1443555
35	0,1586266	0,9821198	0,1443555
37	0,1586266	0,9821198	0,1443555
39	0,1586266	0,9821198	0,1443555
41	0,1586266	0,9821198	0,1443555
43	0,1586266	0,9821198	0,1443555

RMSE was used to select the optimal model using the smallest value.

The final value used for the model was $k = 7$.

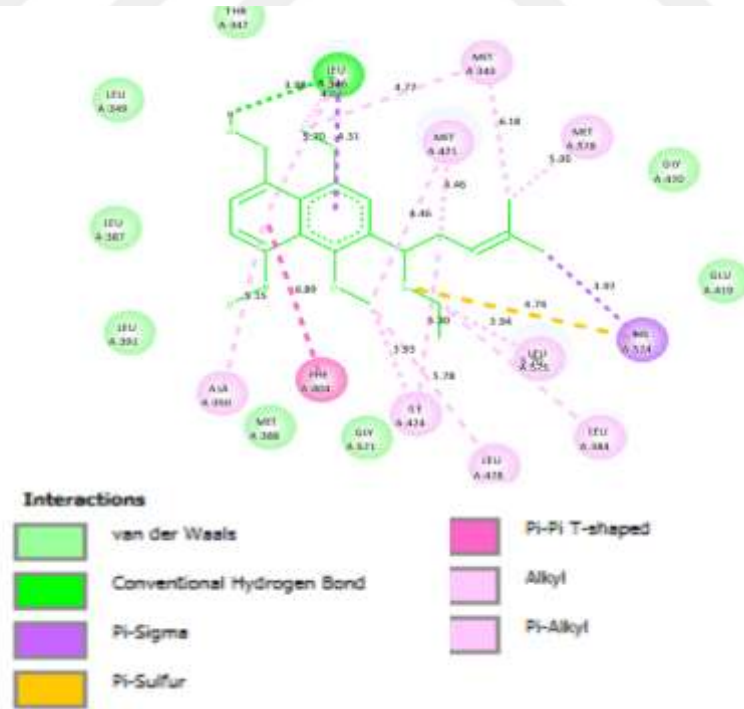
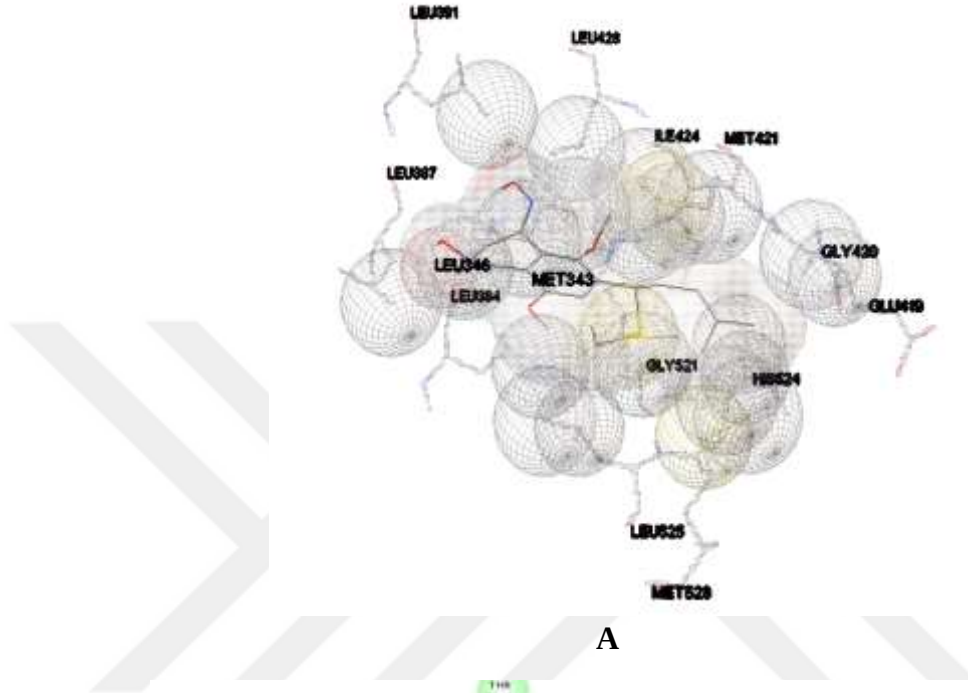
```
cor(REduced_DATATrain$IC50, predxKNN)
0.5732259
```

```
rmse(REduced_DATATrain$IC50, predxKNN)
0.140469
```

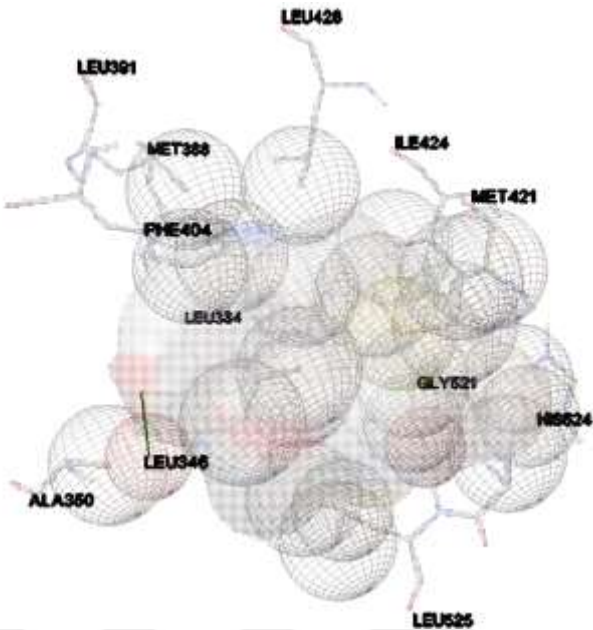


**EK 5 Ligandların Uygun Bulunan Konformasyonların Doking Görüntüsü (A),
Ligand ve Reseptörün Aktif Bölge Etkileşimleri (B)**

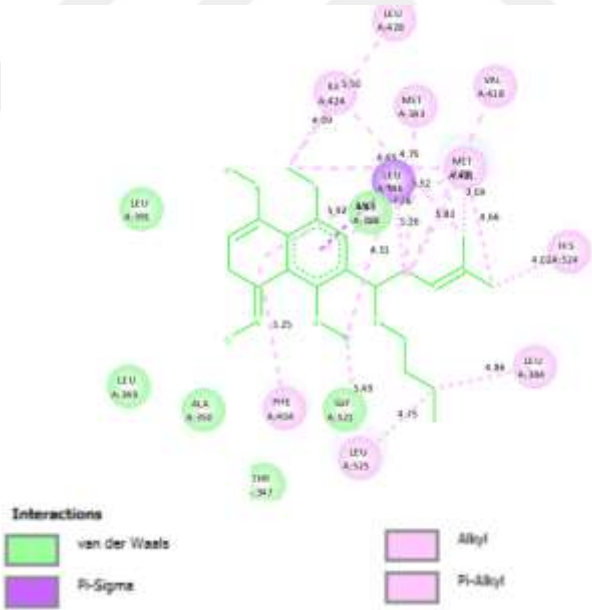
Ligand 1



Ligand 2

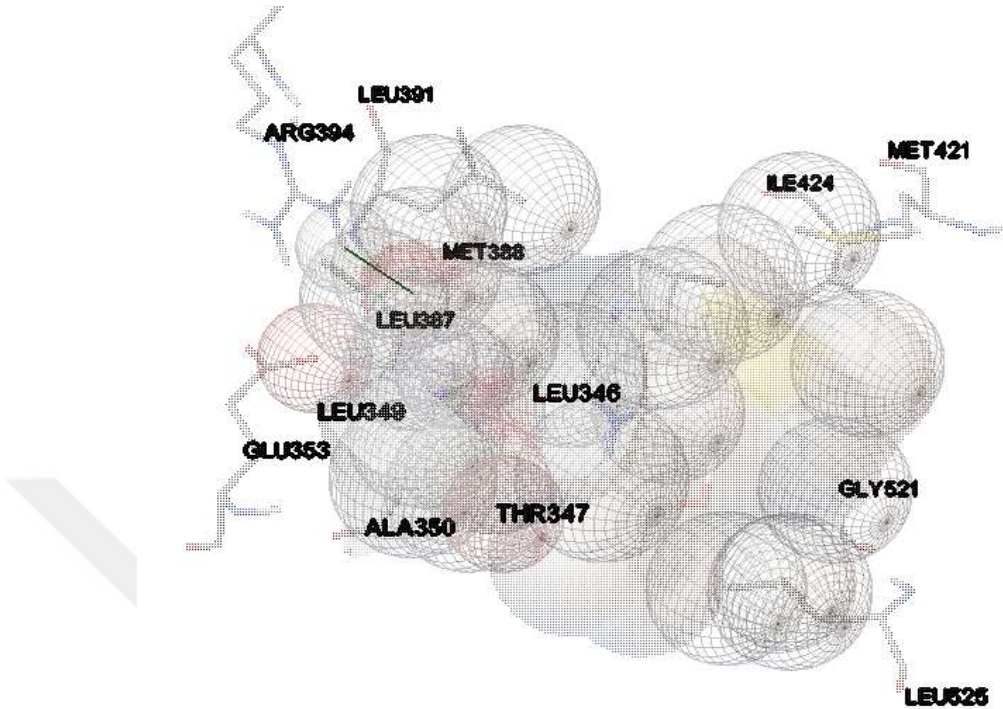


A

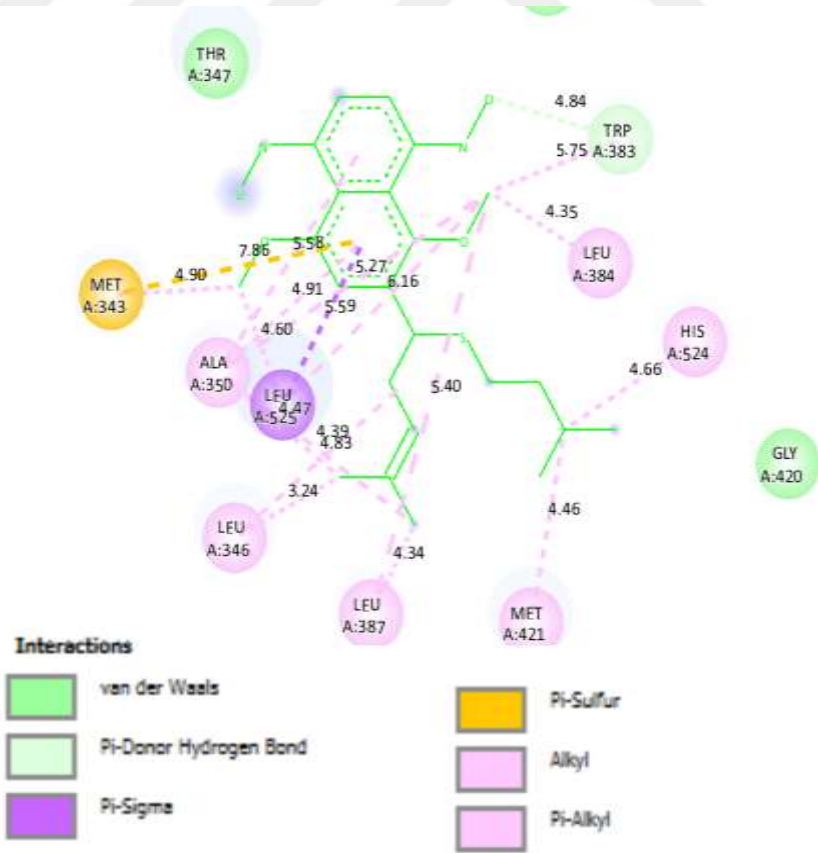


B

Ligand 3

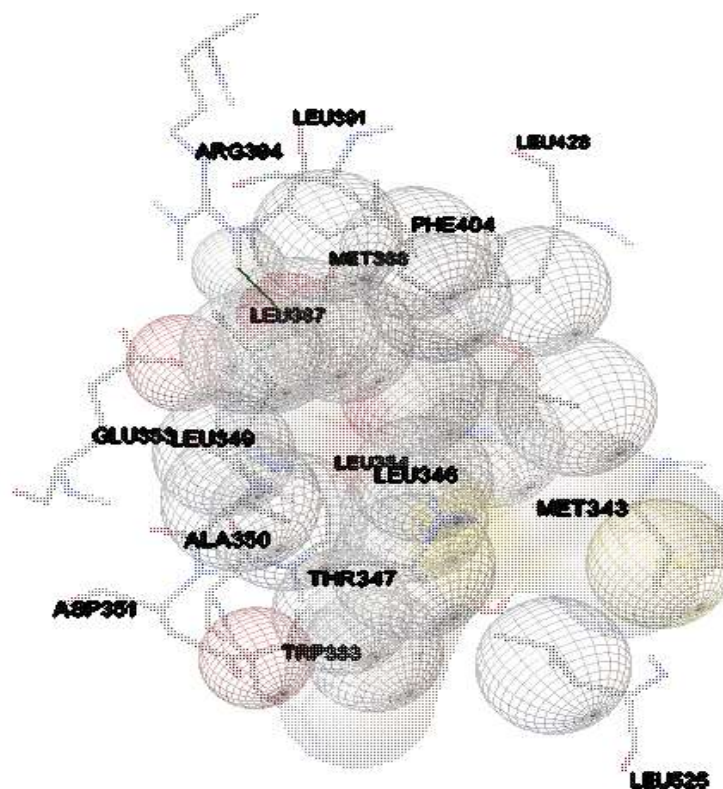


A

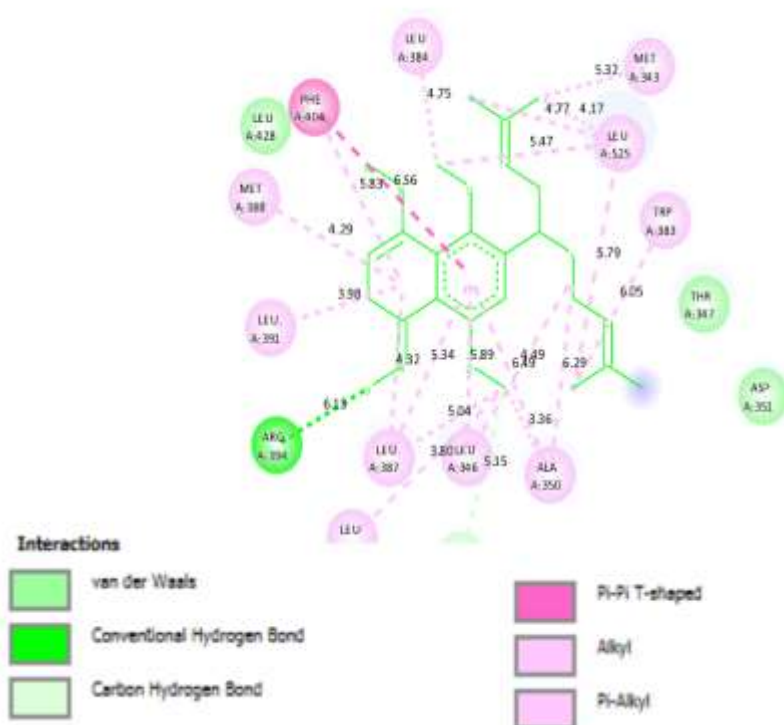


B

Ligand 4

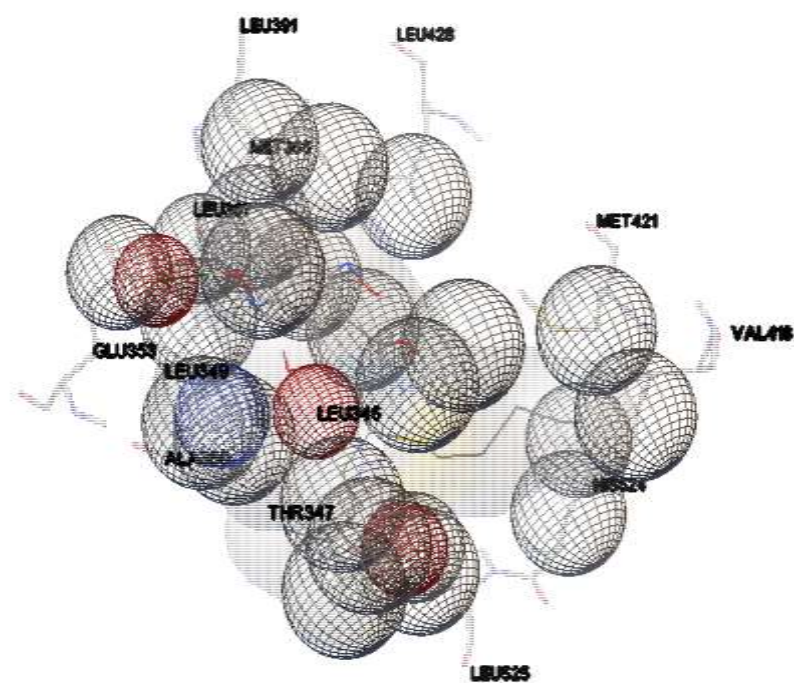


A

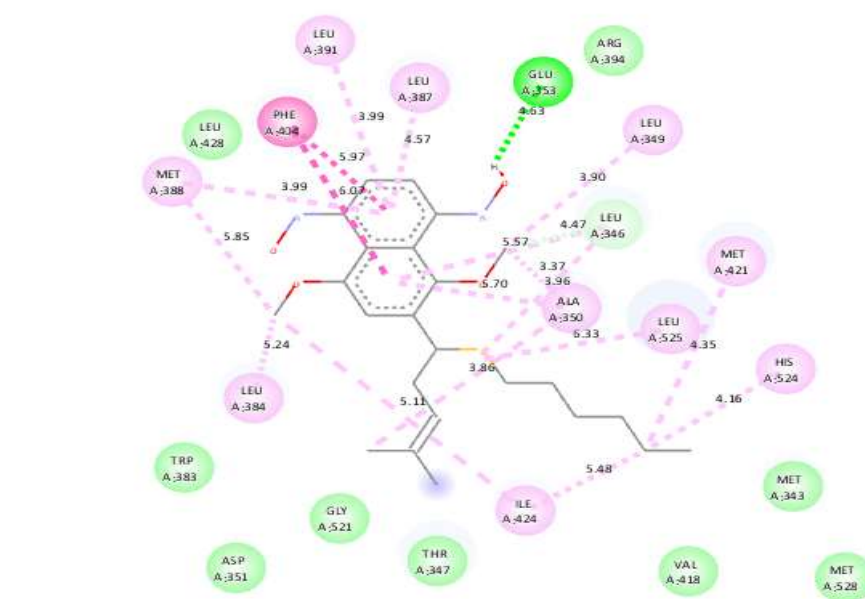


B

Ligand 5



A

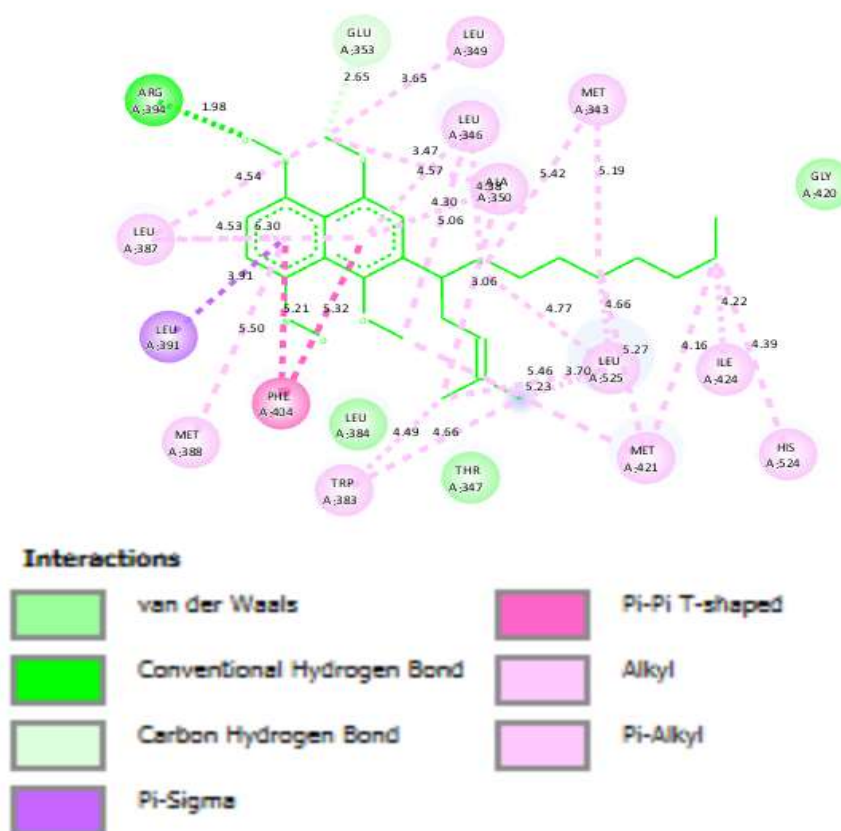
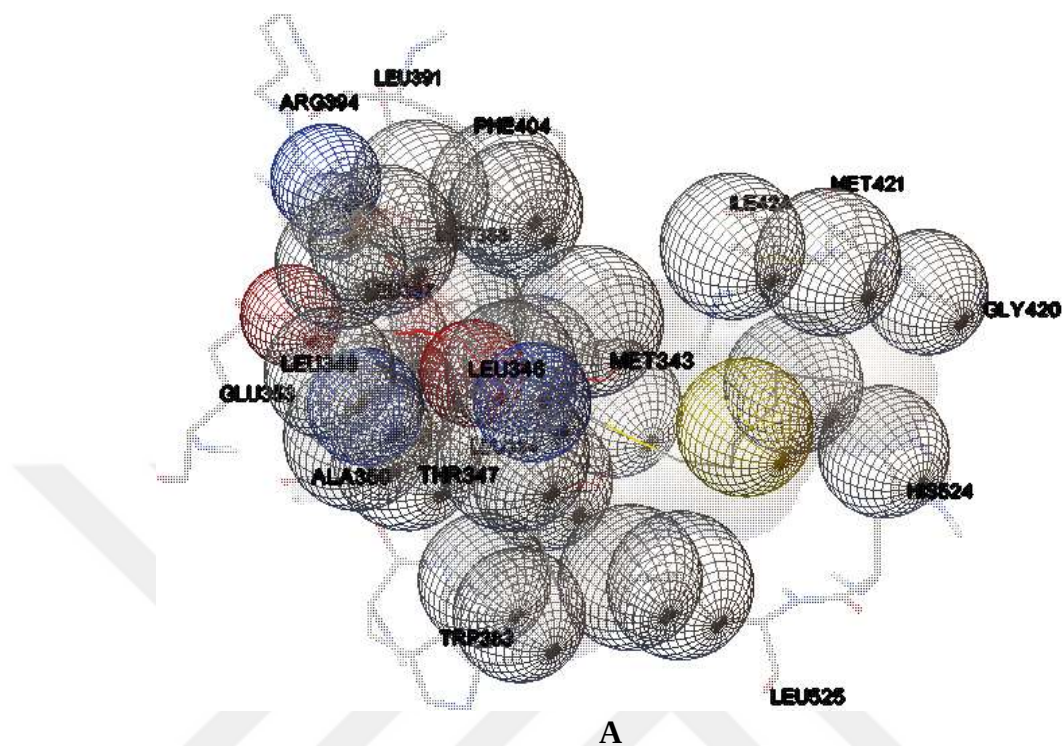


Interactions

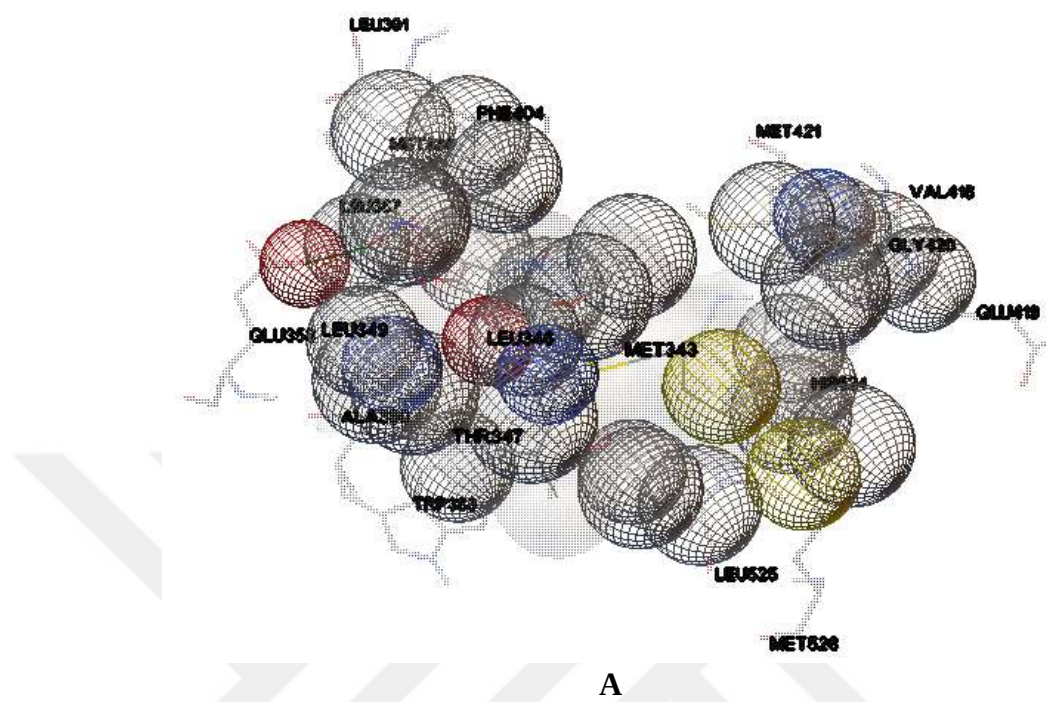
	van der Waals		Pi-Pi T-shaped
	Conventional Hydrogen Bond		Alkyl
	Carbon Hydrogen Bond		Pi-Alkyl

B

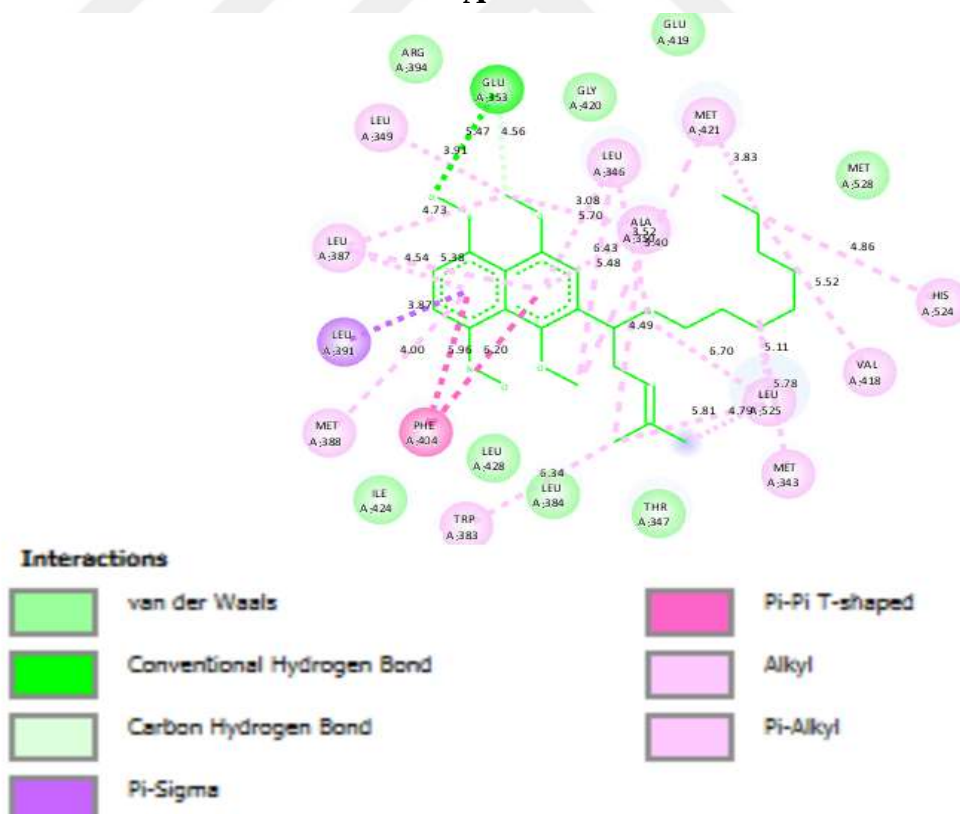
Ligand 6



Ligand 7

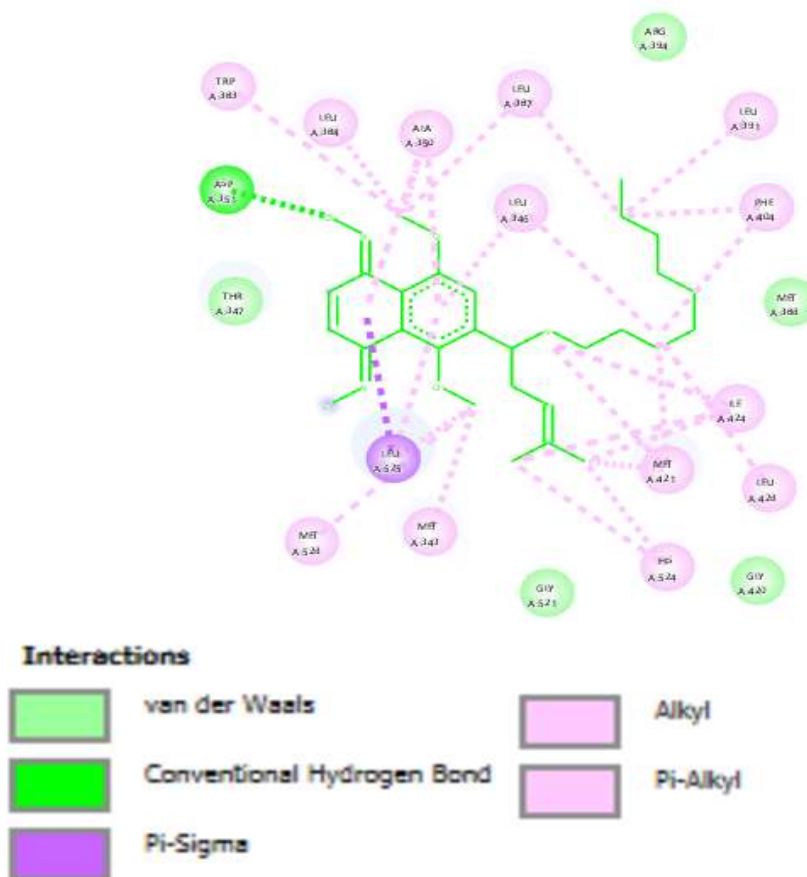
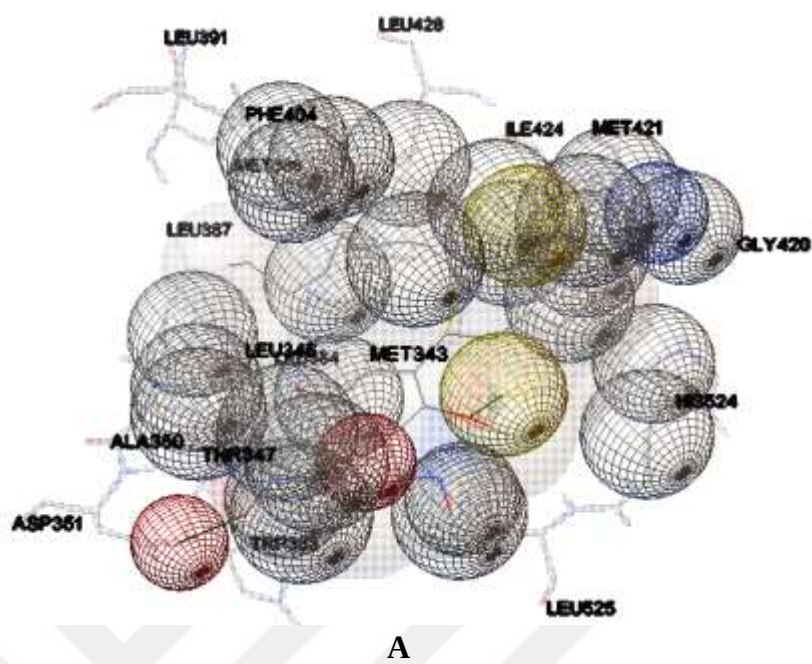


A

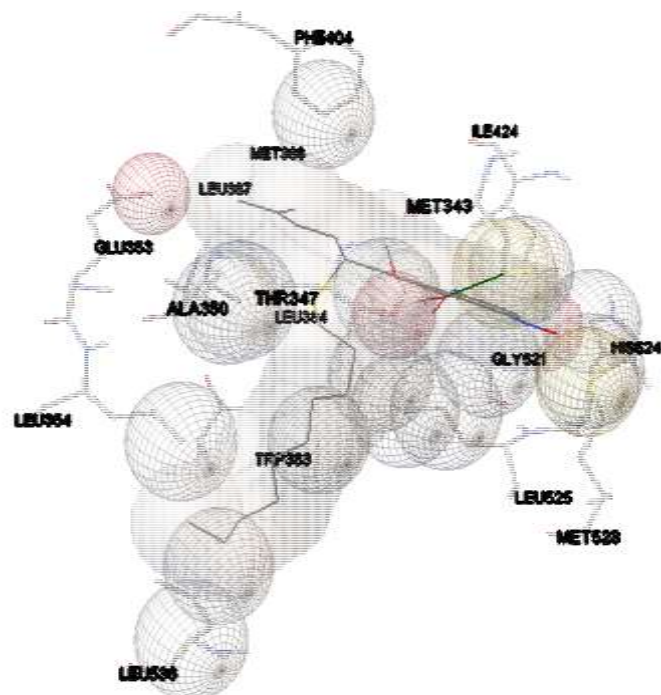


B

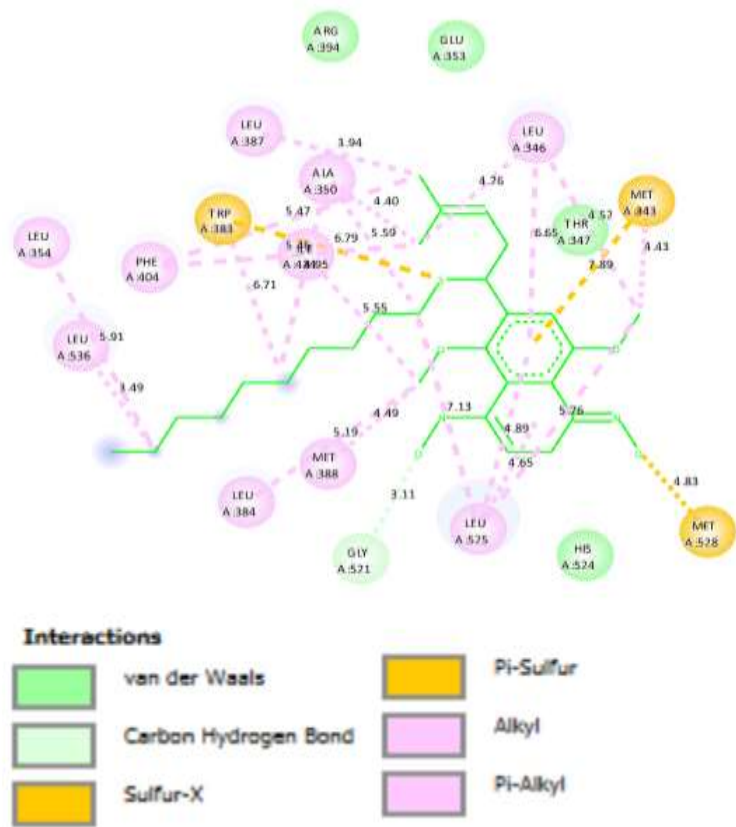
Ligand 8



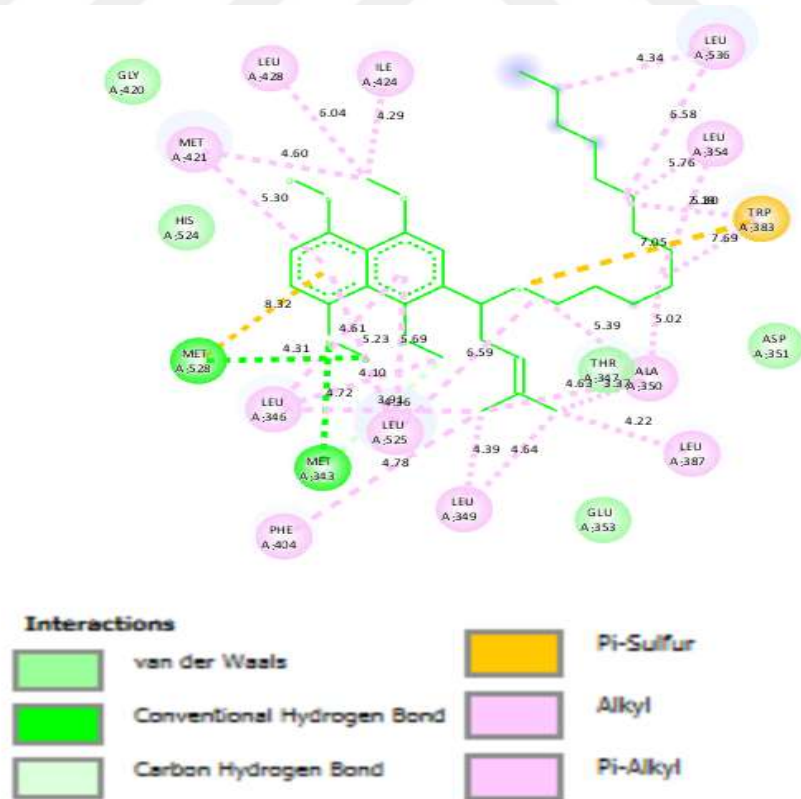
Ligand 9



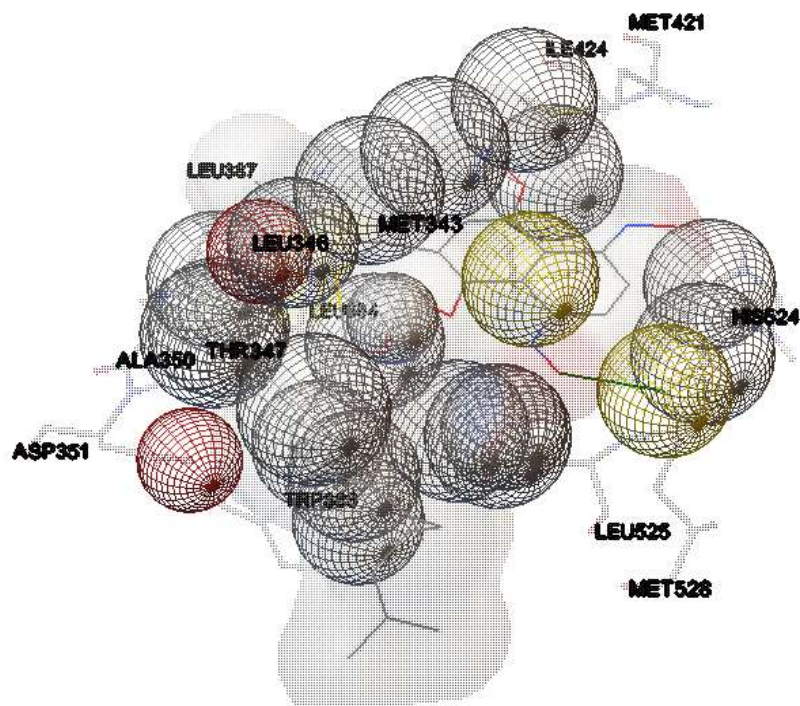
A



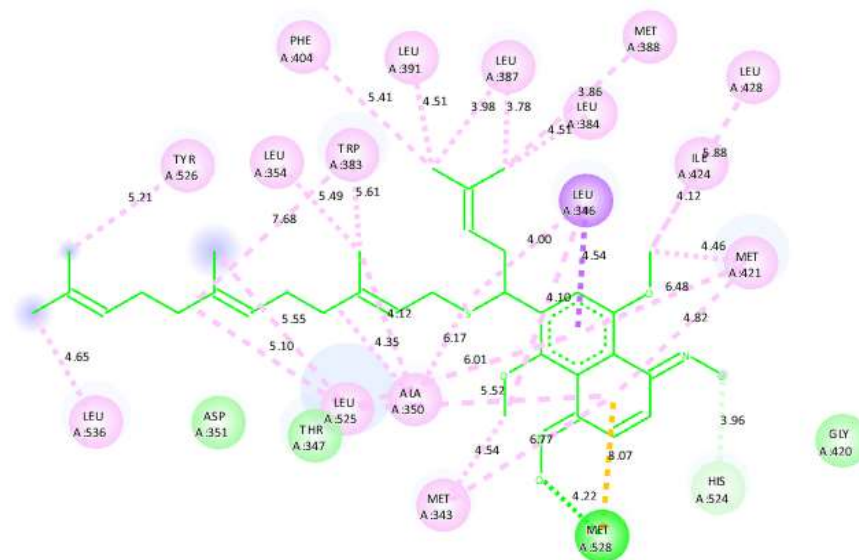
B

**B**

Ligand 11



A

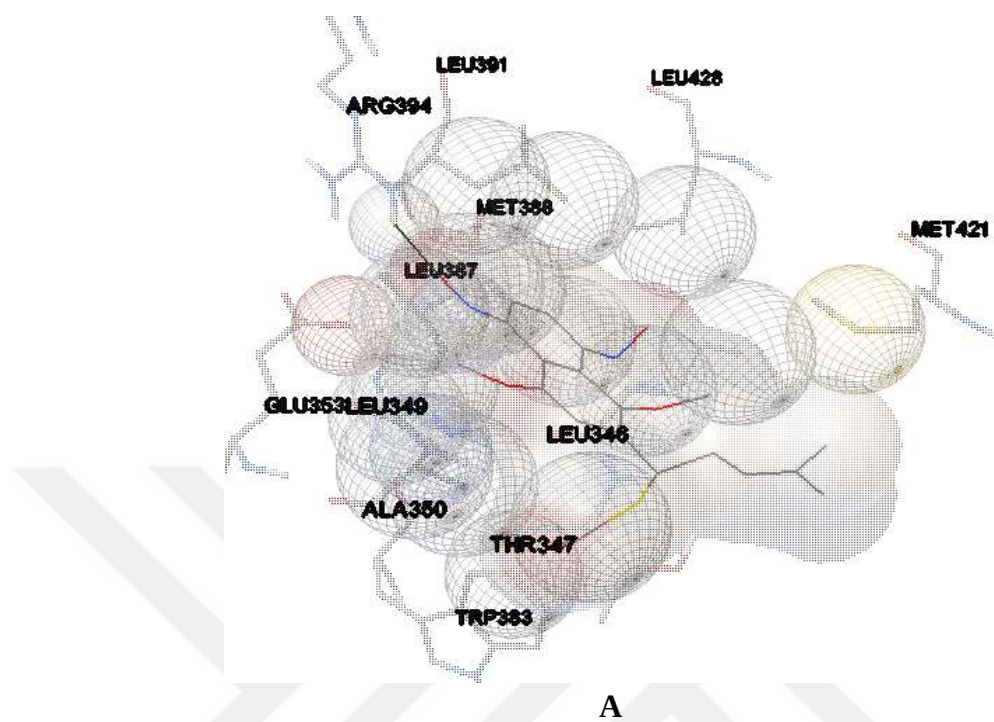


Interactions

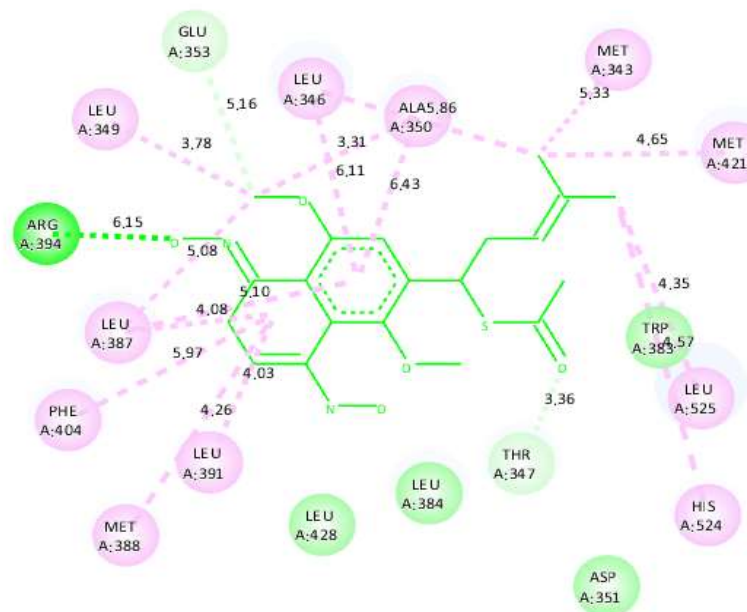
	van der Waals		Pi-Sulfur
	Conventional Hydrogen Bond		Alkyl
	Carbon Hydrogen Bond		Pi-Alkyl
	Pi-Sigma		

B

Ligand 12



A

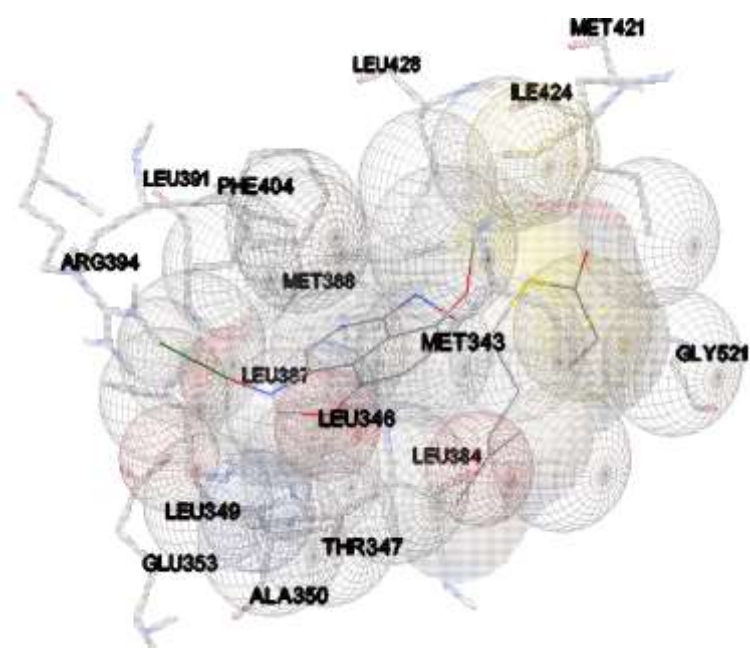


Interactions

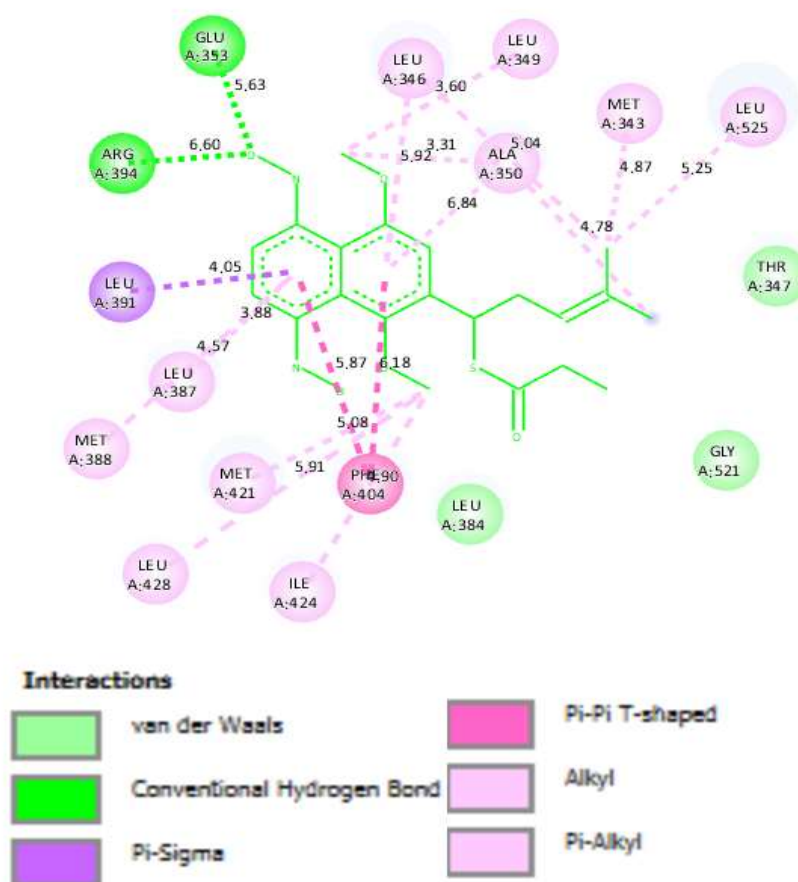
	van der Waals		Alkyl
	Conventional Hydrogen Bond		Pi-Alkyl
	Carbon Hydrogen Bond		

B

Ligand 13

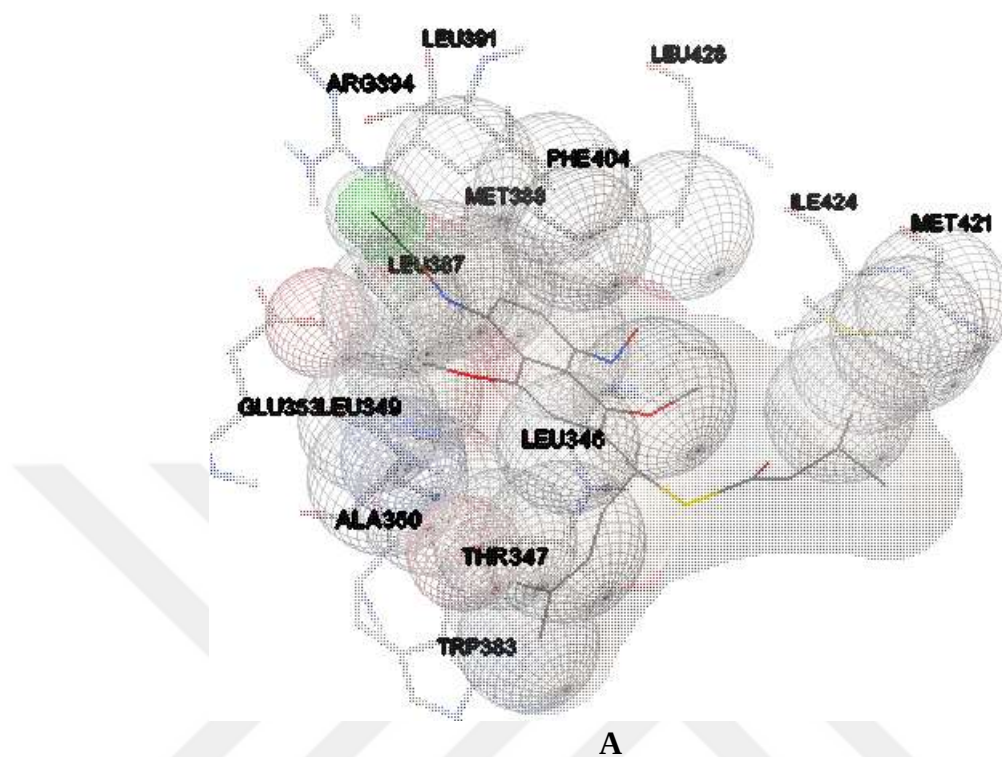


A

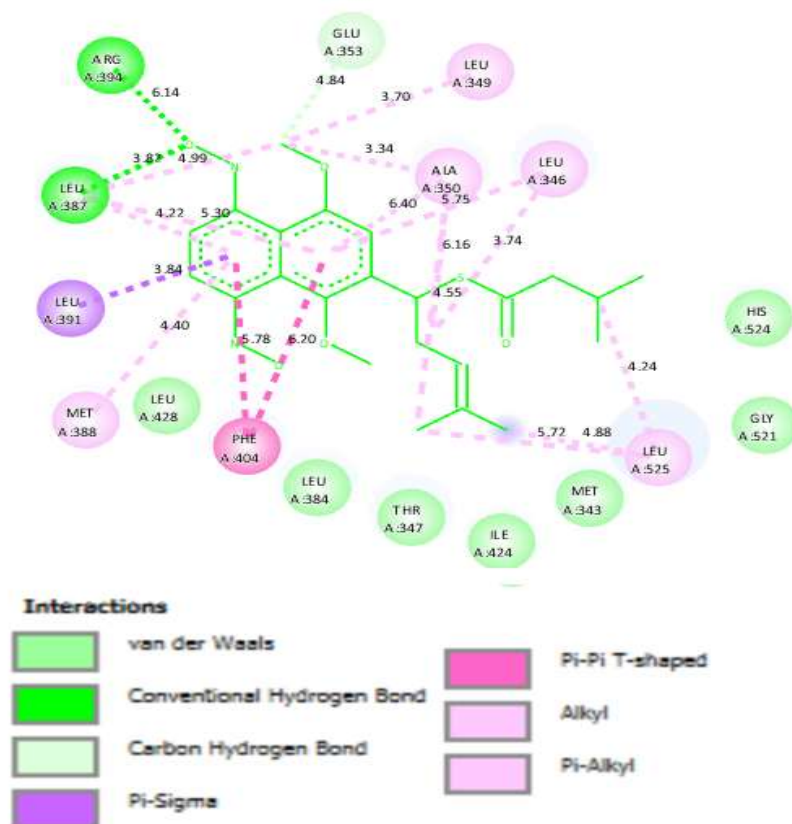


B

Ligand 14

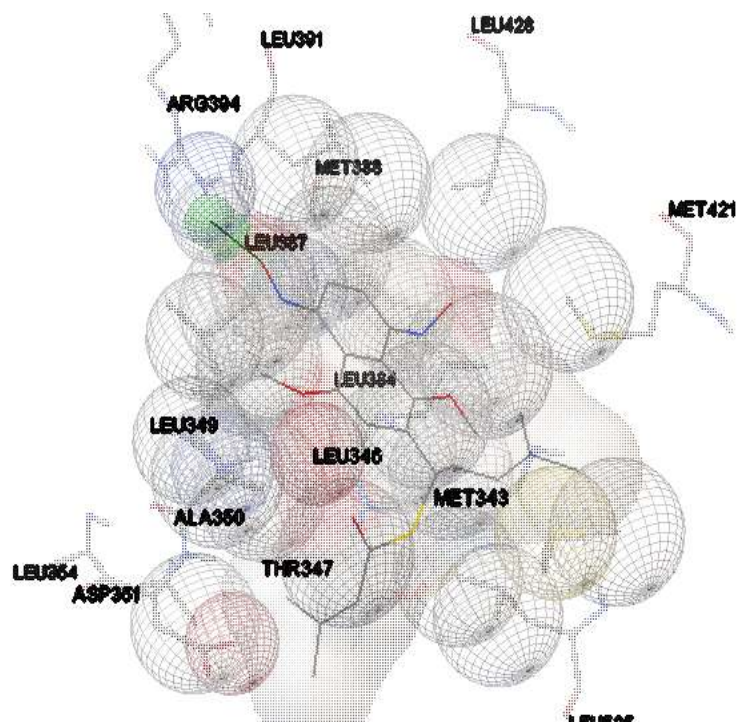


A

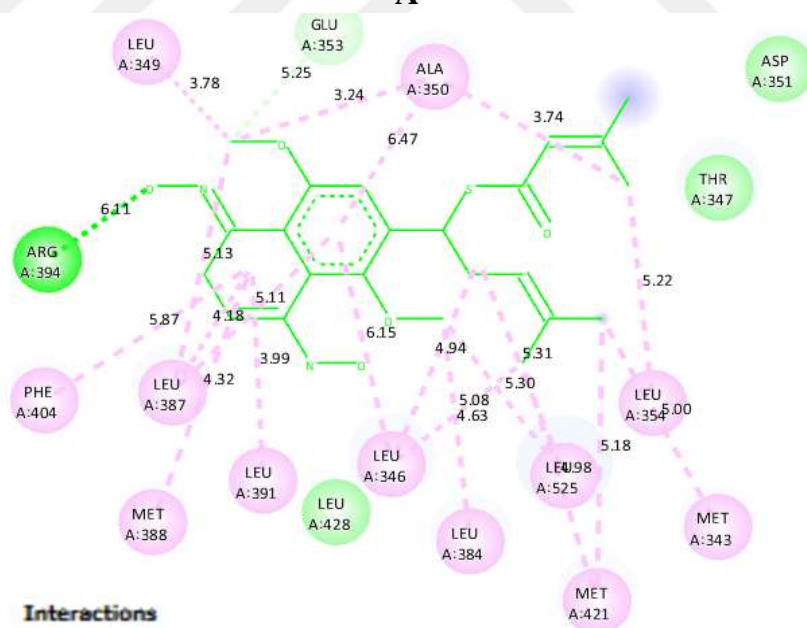


B

Ligand 15



A

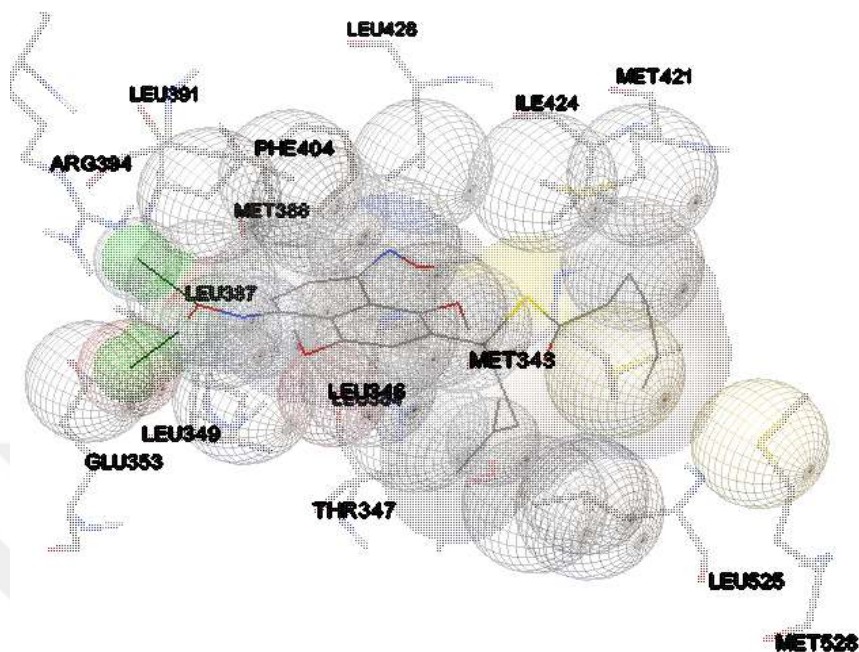


Interactions

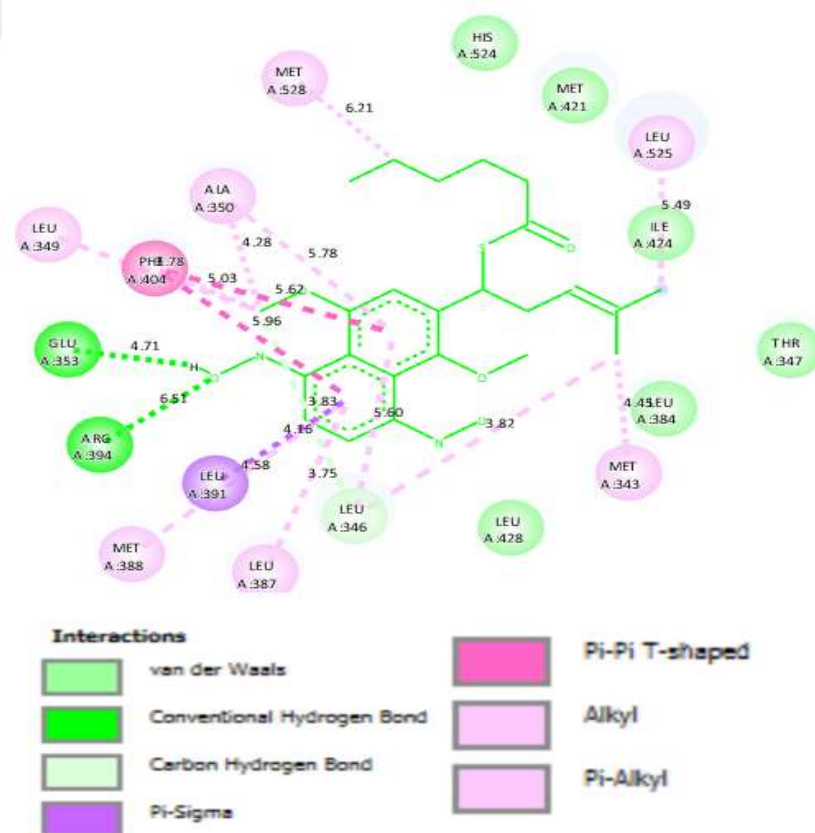
	van der Waals		Alkyl
	Conventional Hydrogen Bond		Pi-Alkyl
	Carbon Hydrogen Bond		

B

Ligand 16

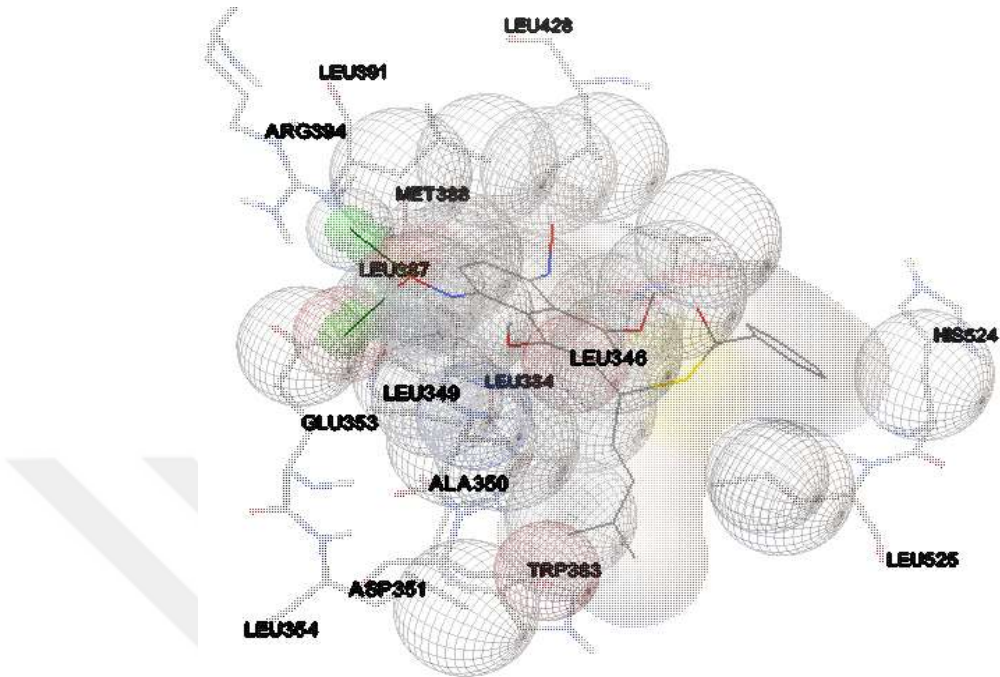


A

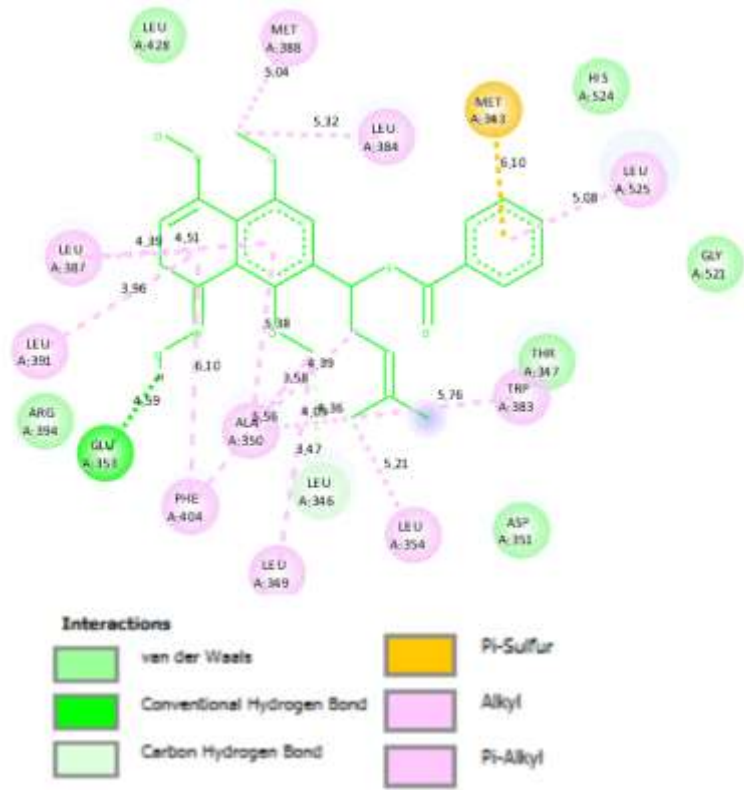


B

Ligand 17

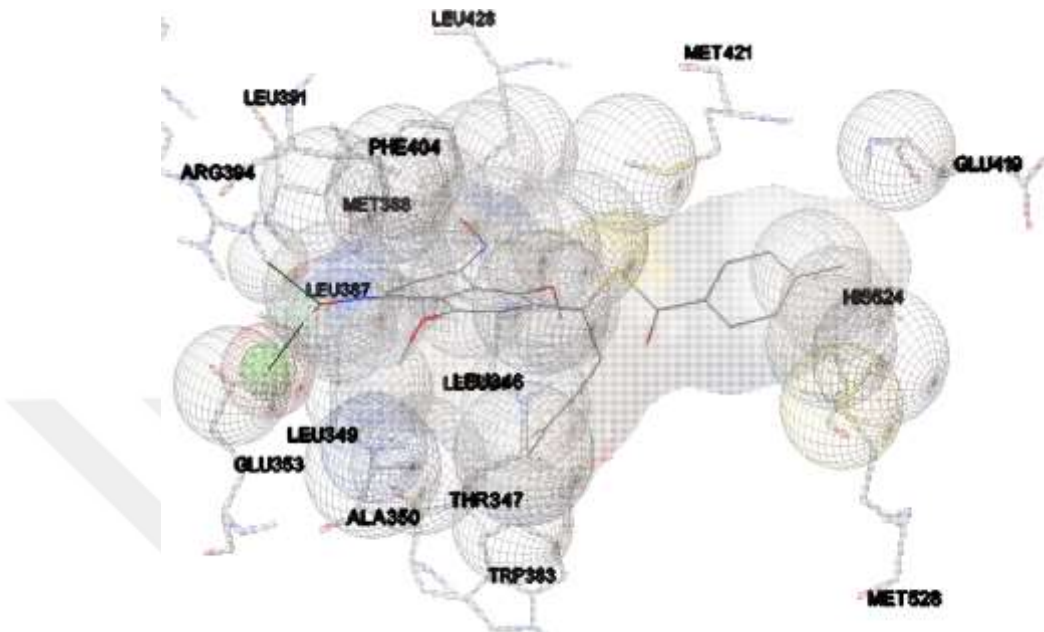


A

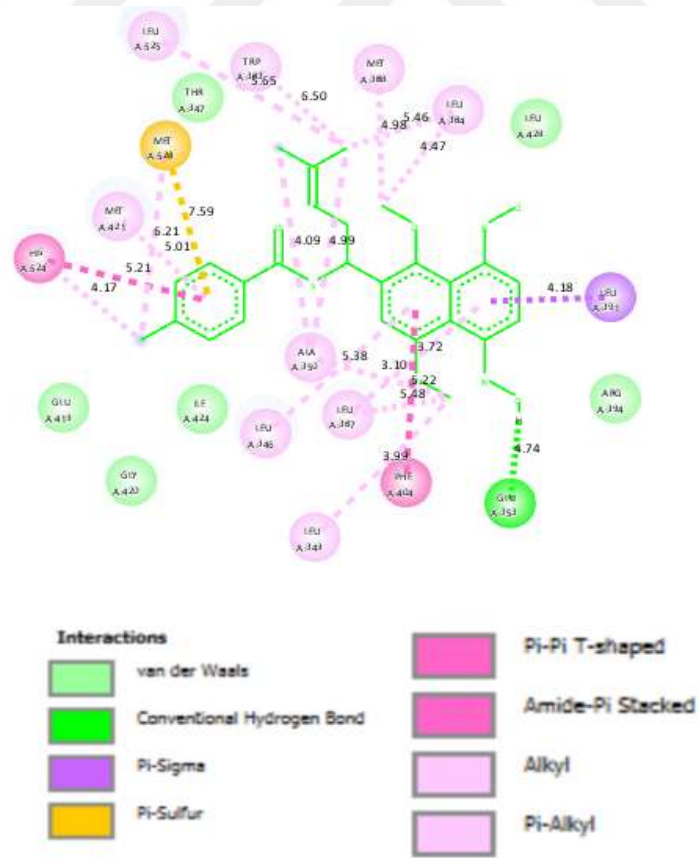


B

Ligand 18



A

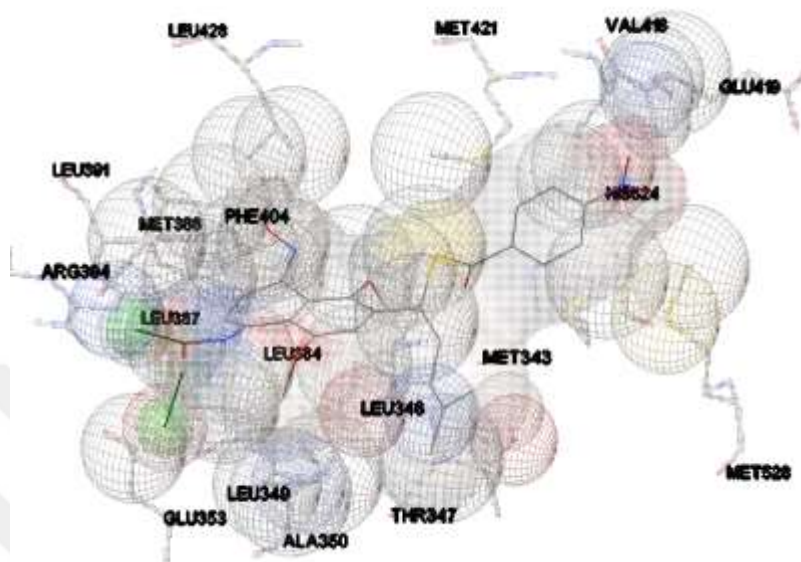


B

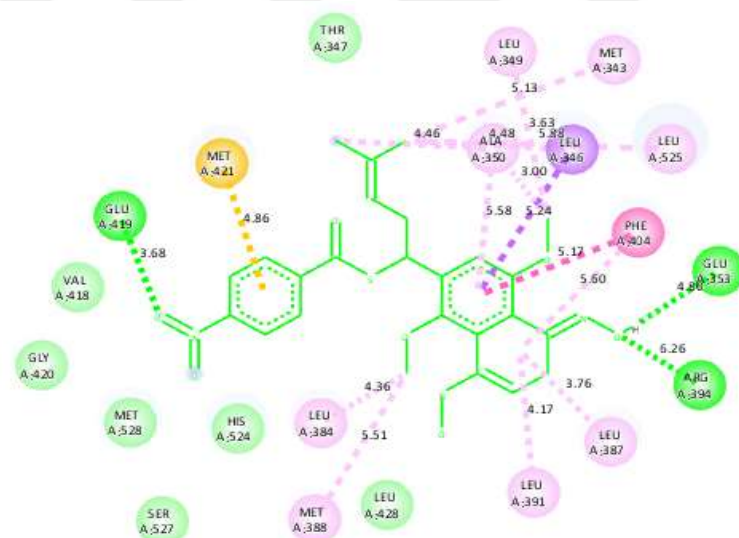
Ligand 19

Hata verdi

Ligand 20



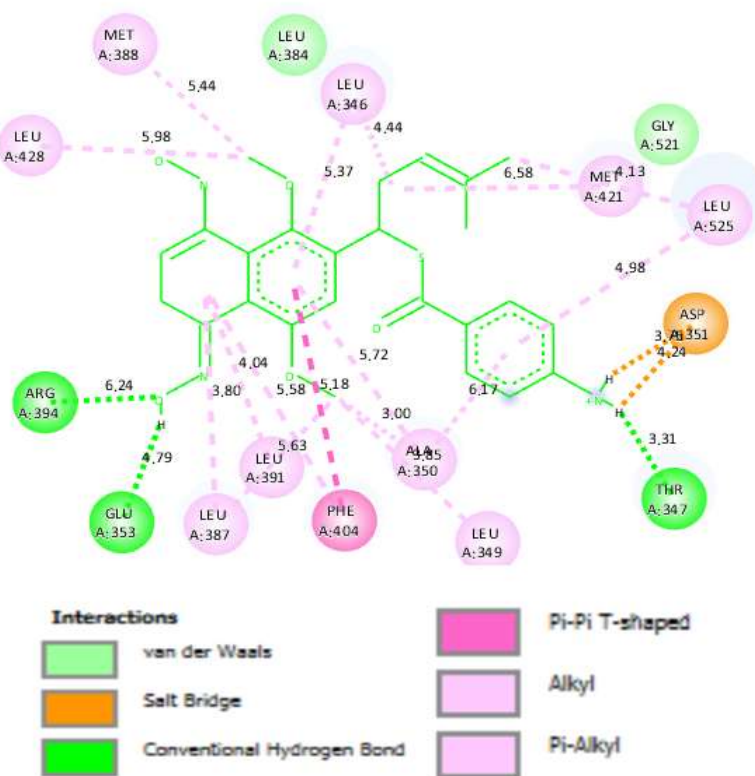
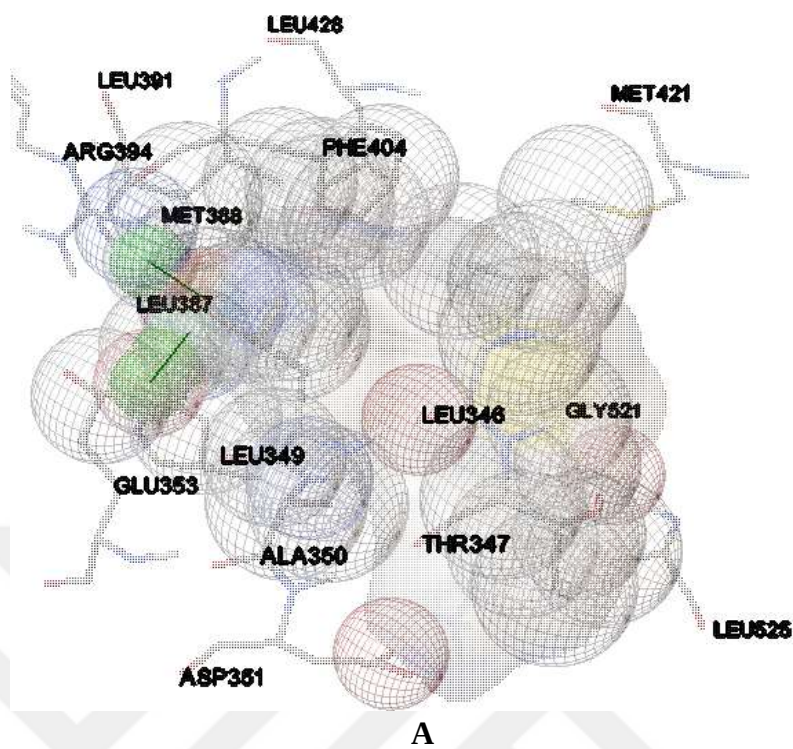
A



B

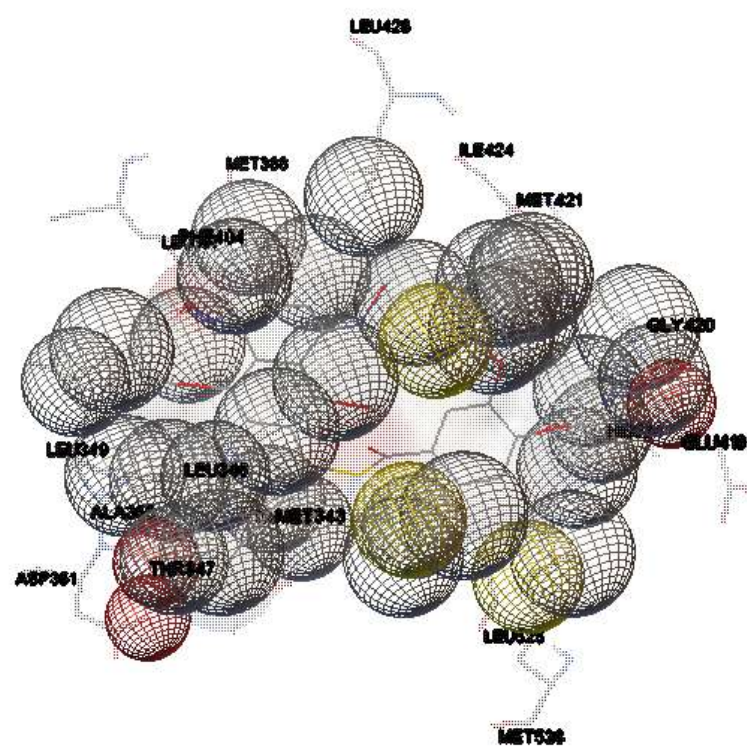


Ligand 22

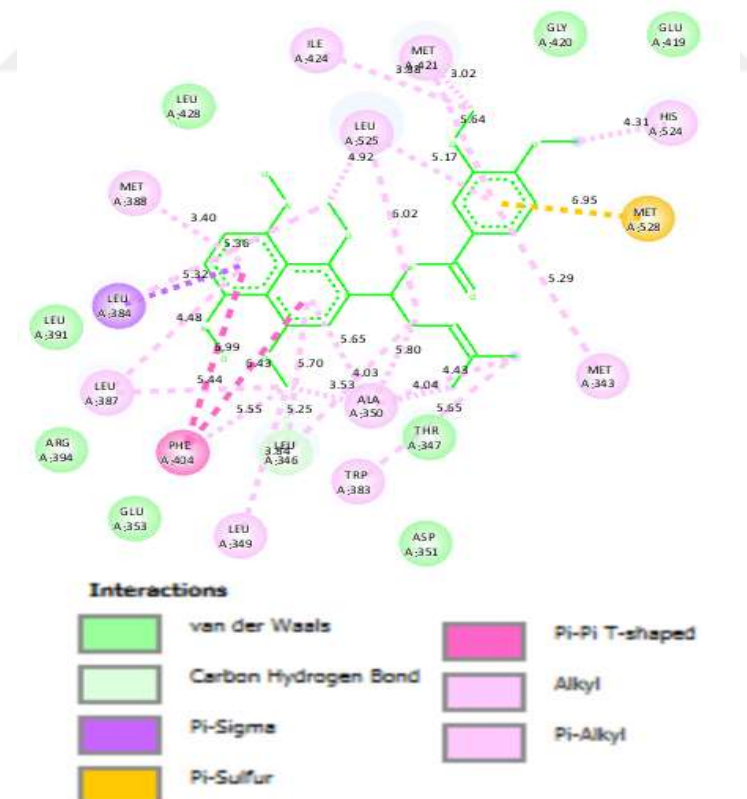


B

Ligand 23

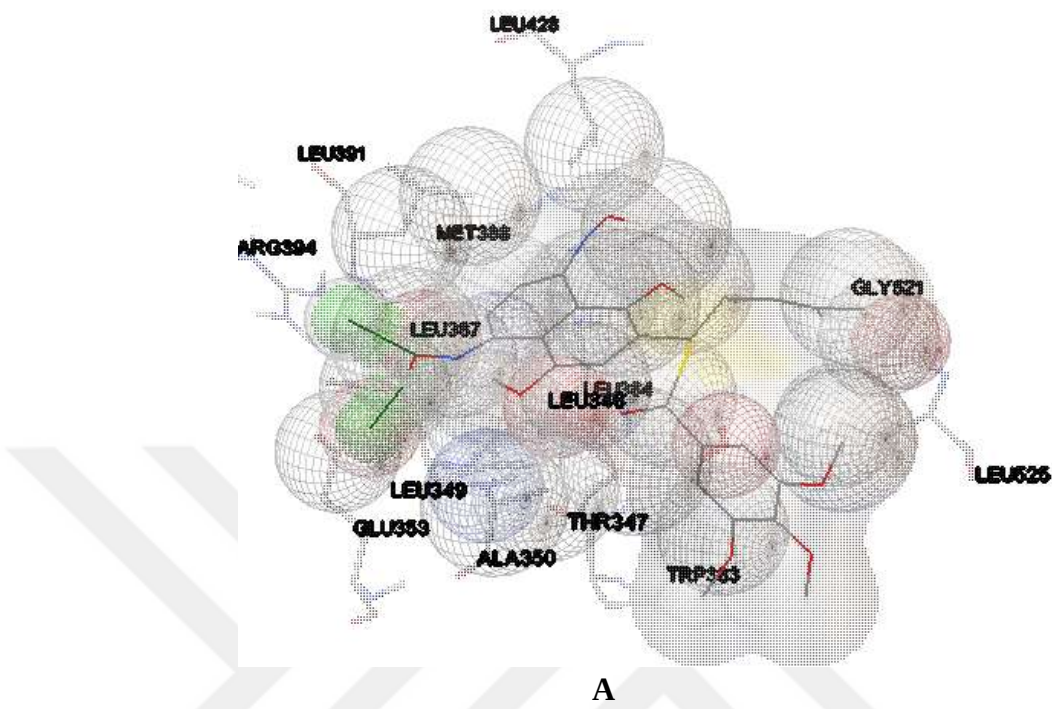


A

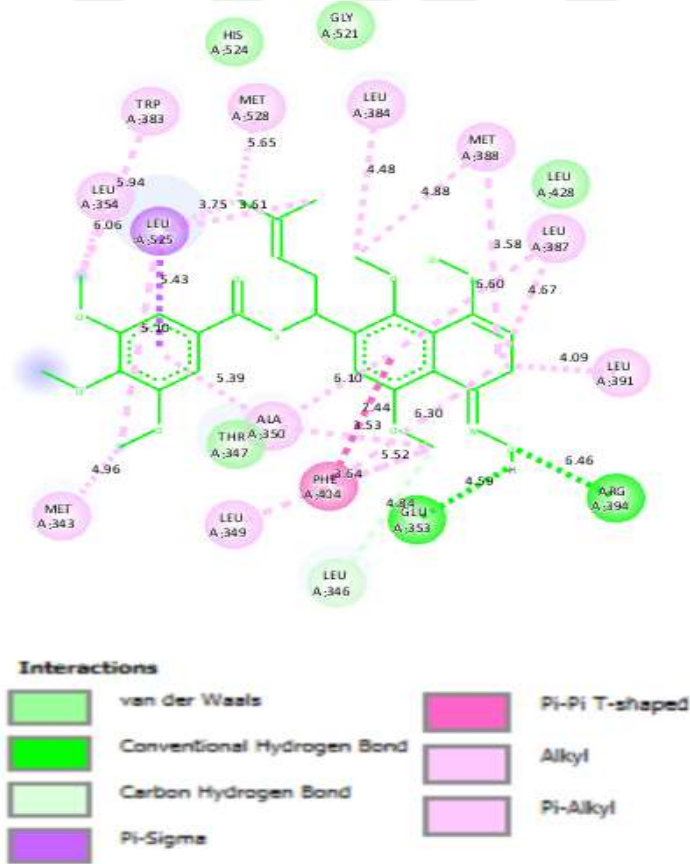


B

Ligand 24

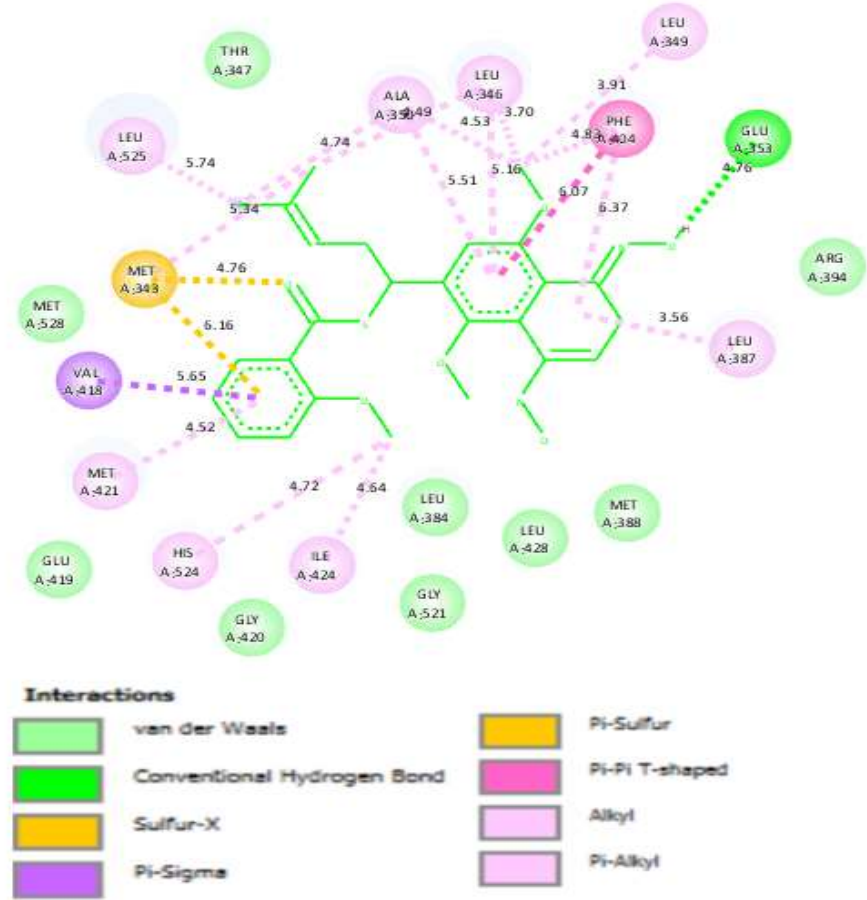
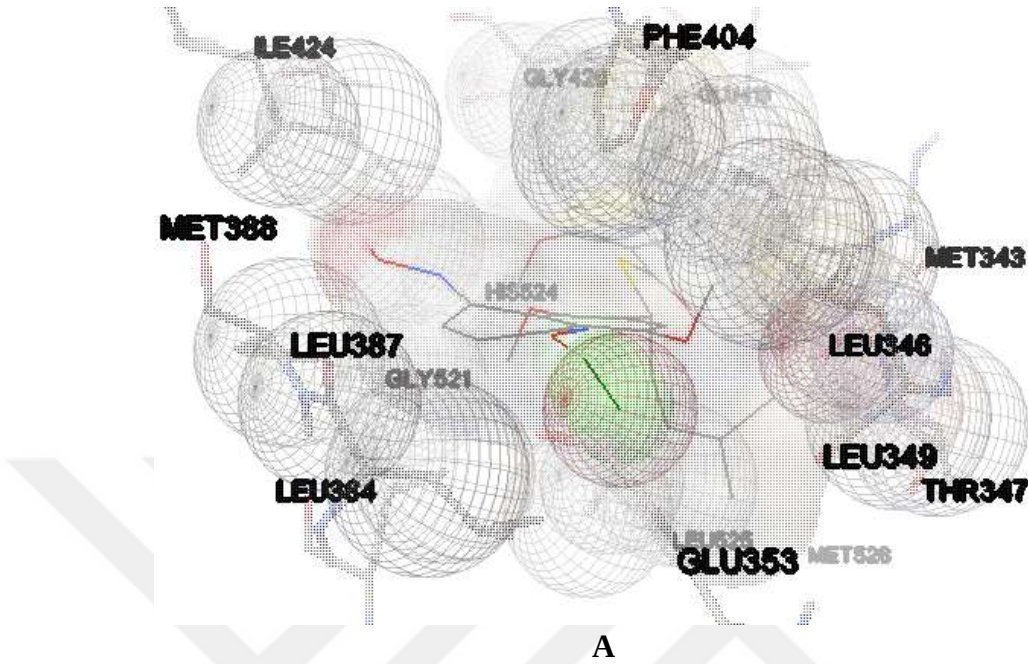


A



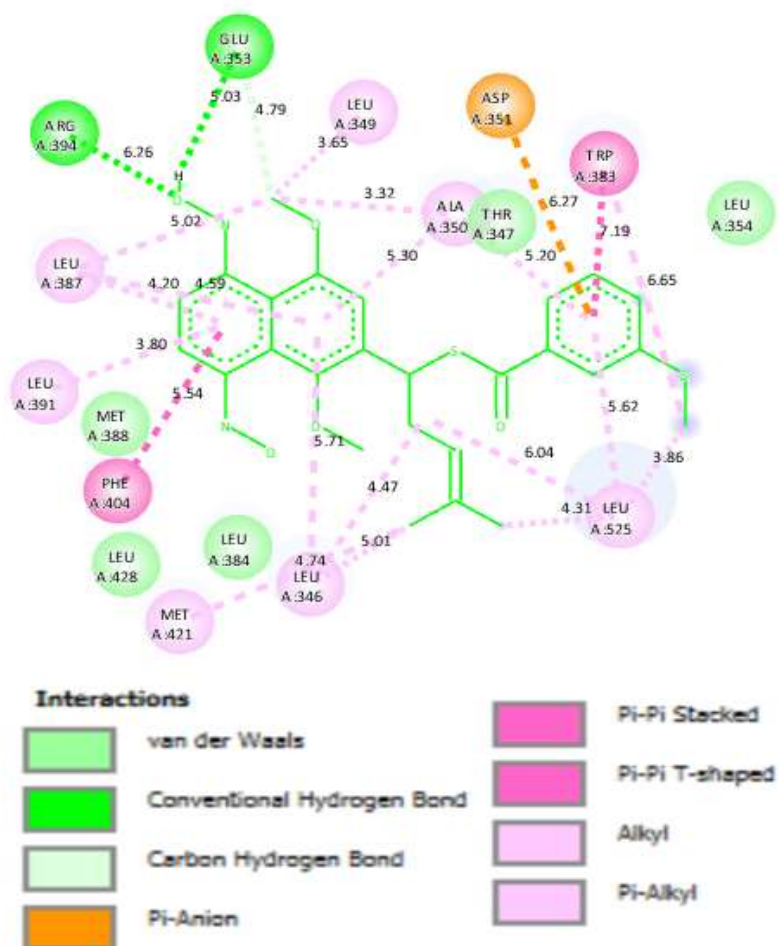
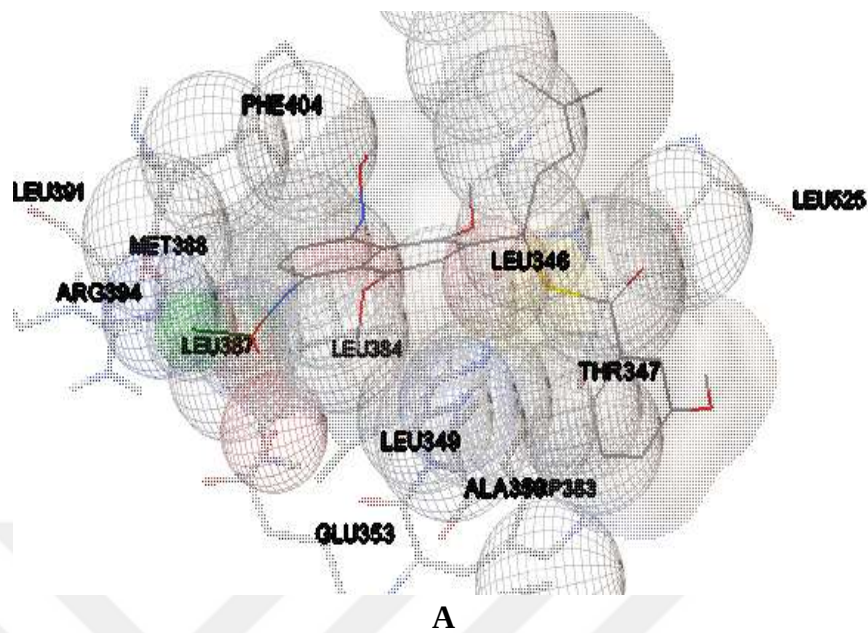
B

Ligand 25



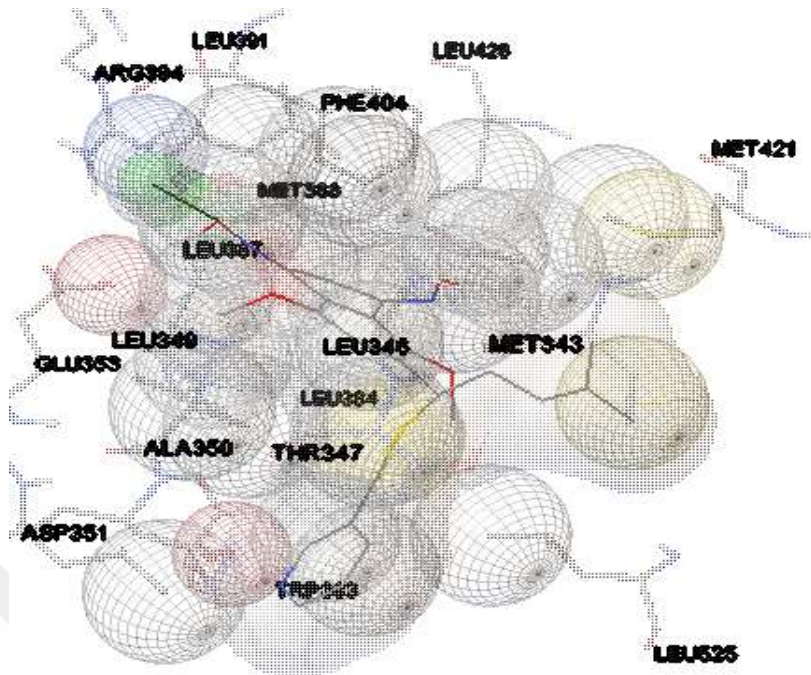
B

Ligand 26

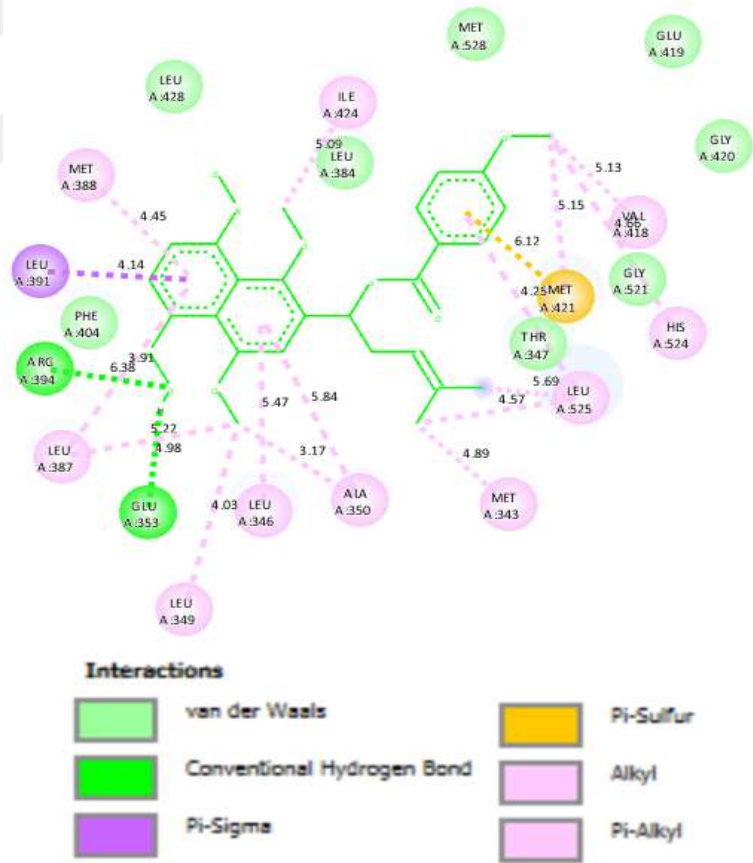


B

Ligand 27

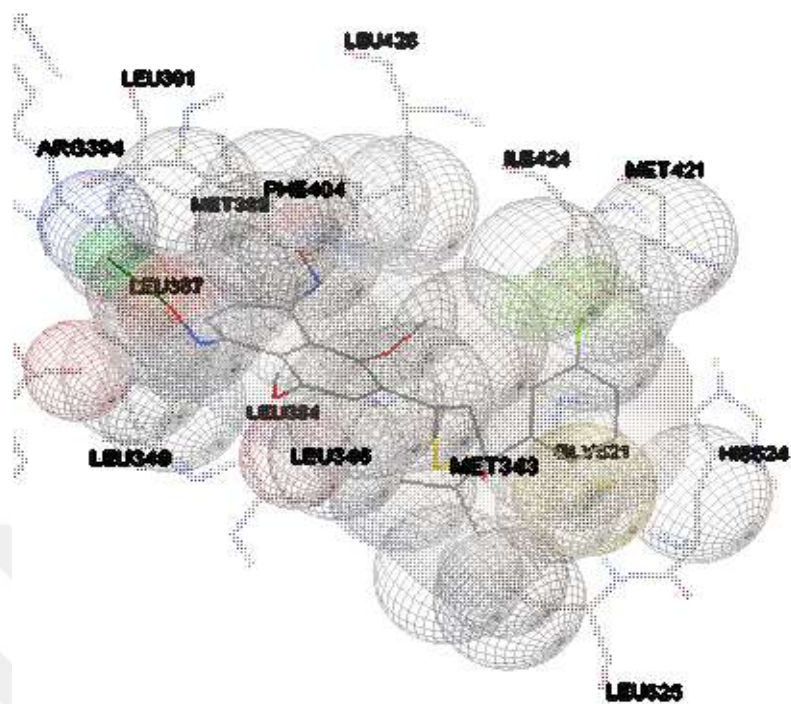


A

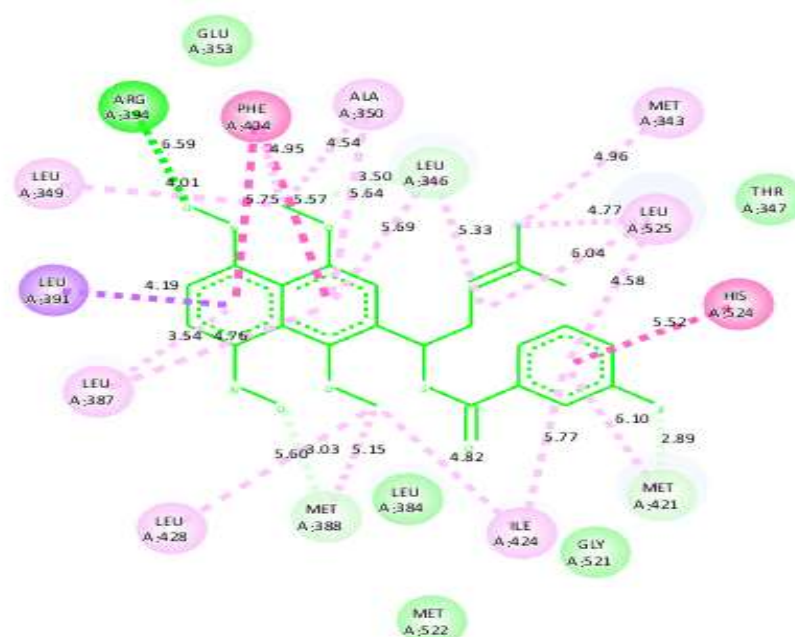


B

Ligand 29



A

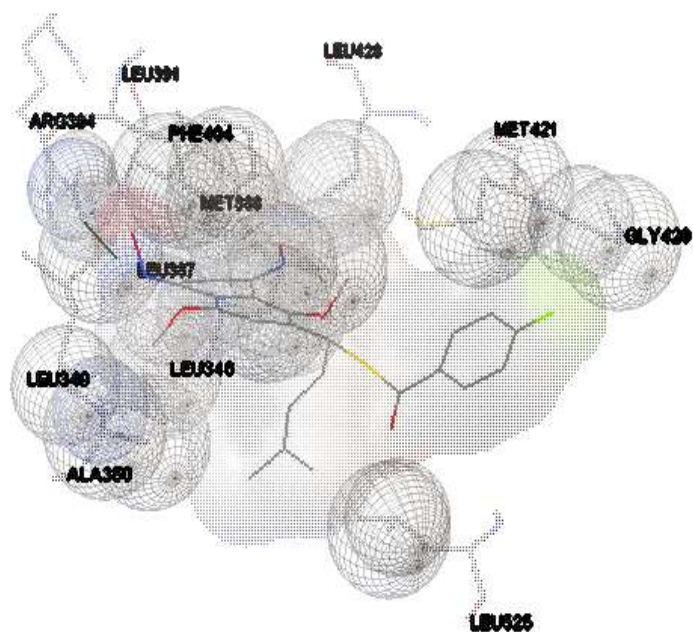


Interactions

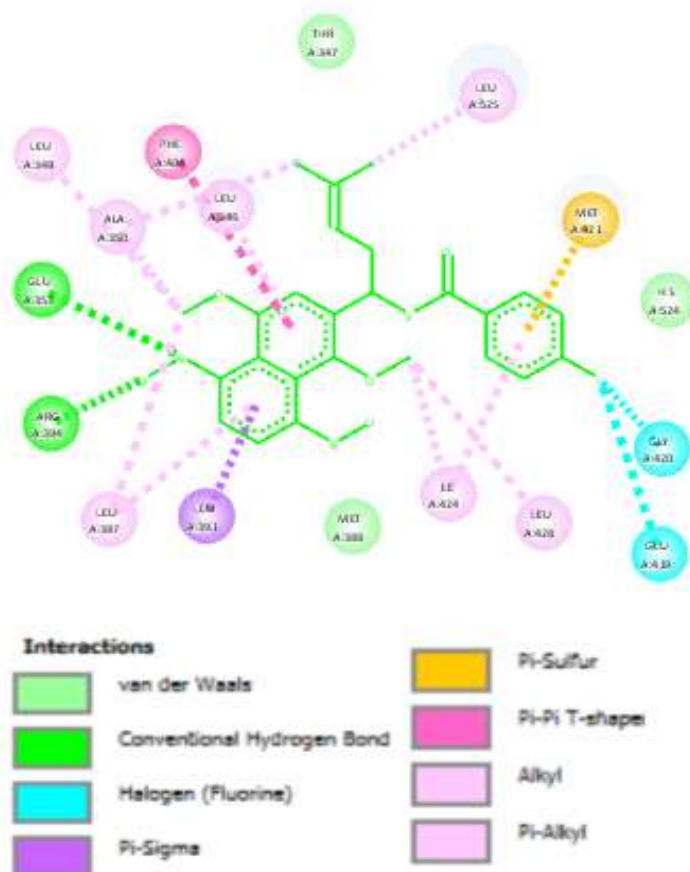
	van der Waals		Pi-Pi T-shaped
	Conventional Hydrogen Bond		Alkyl
	Carbon Hydrogen Bond		Pi-Alkyl
	Pi-Sigma		

B

Ligand 30

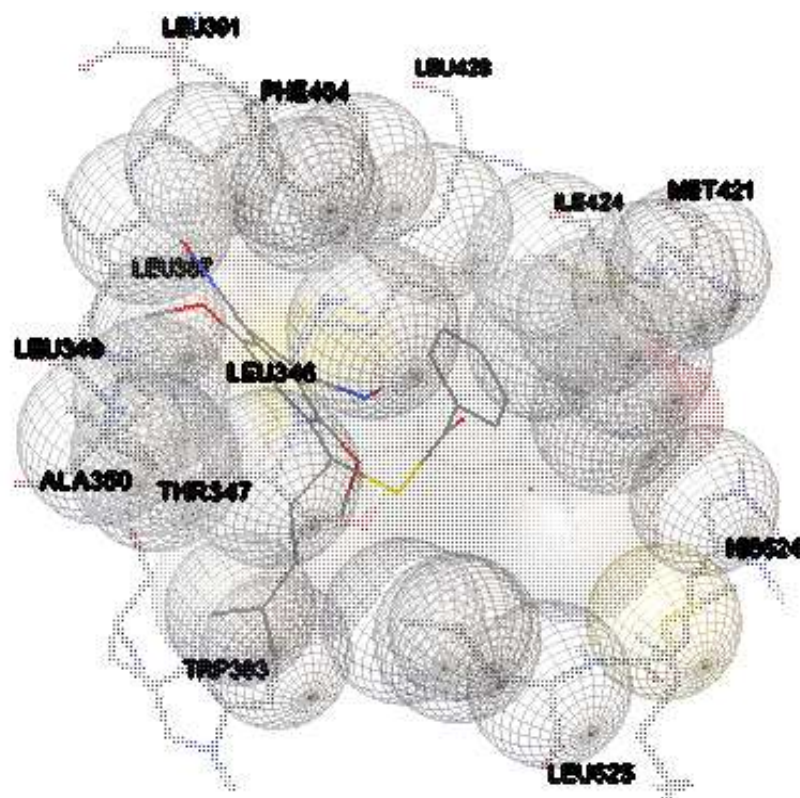


A

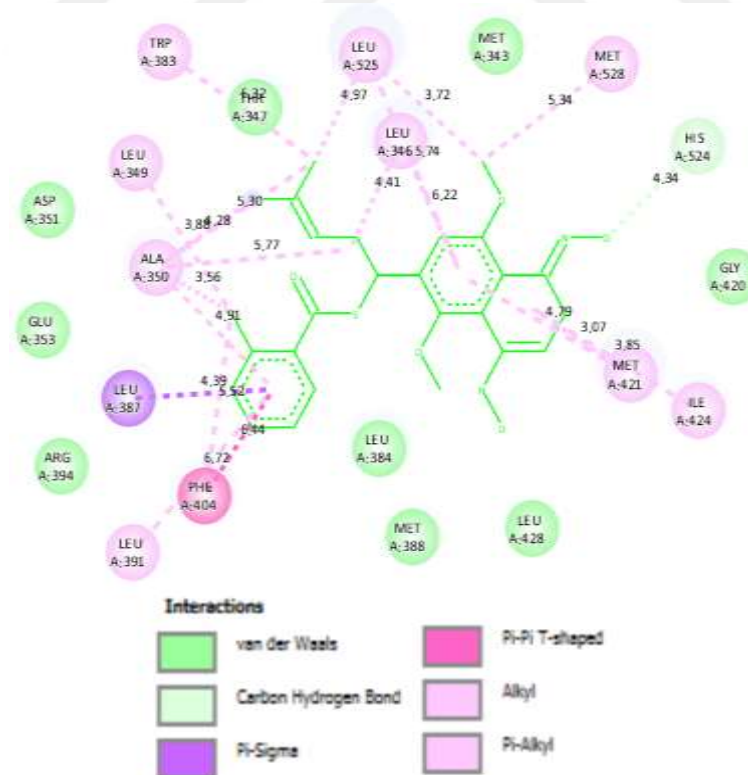


B

Ligand 31

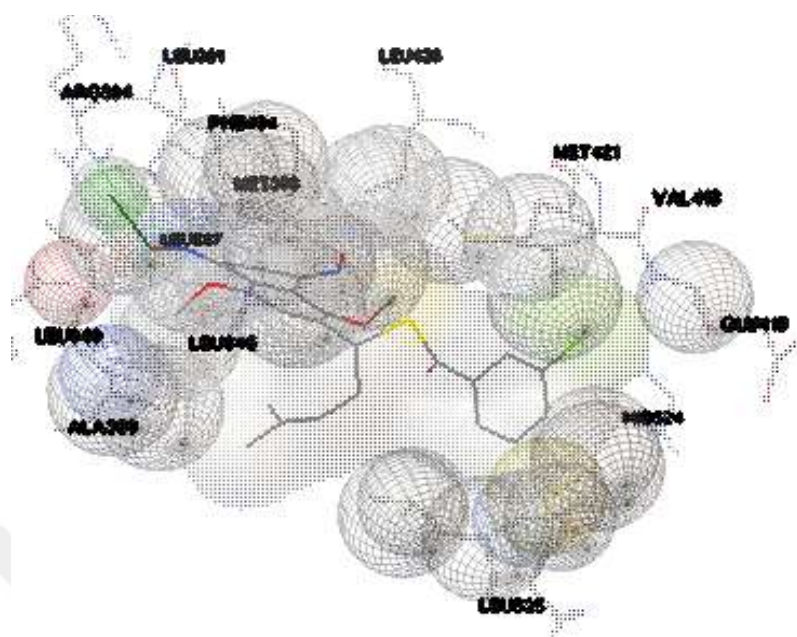


A

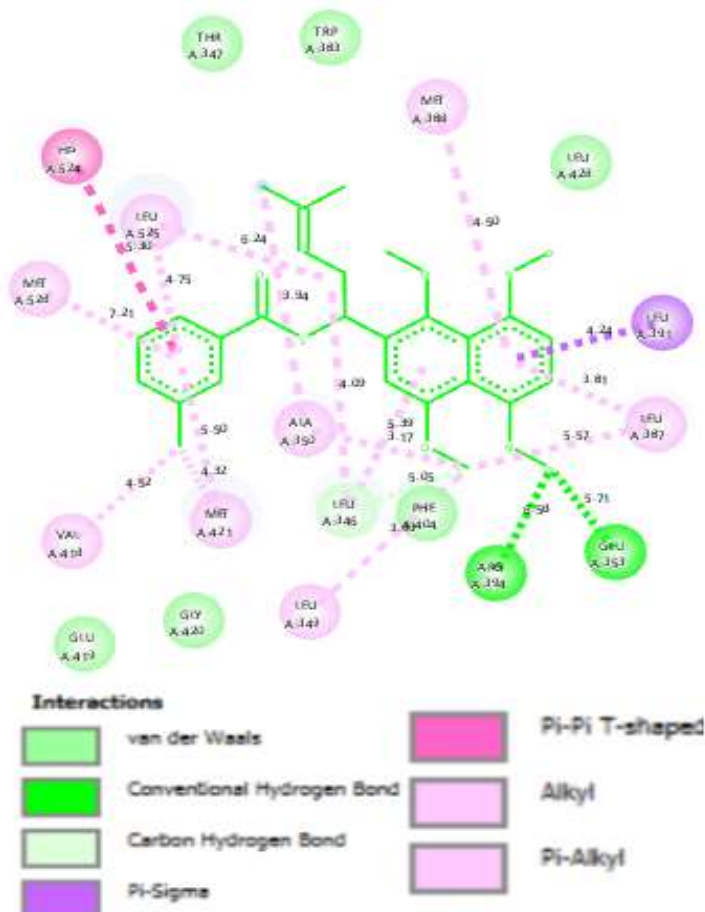


B

Ligand 32

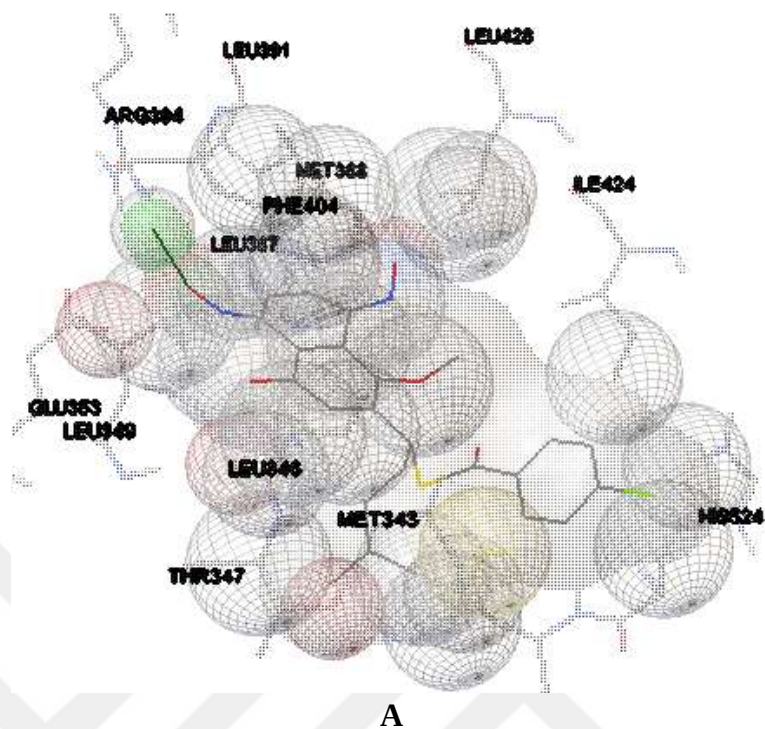


A

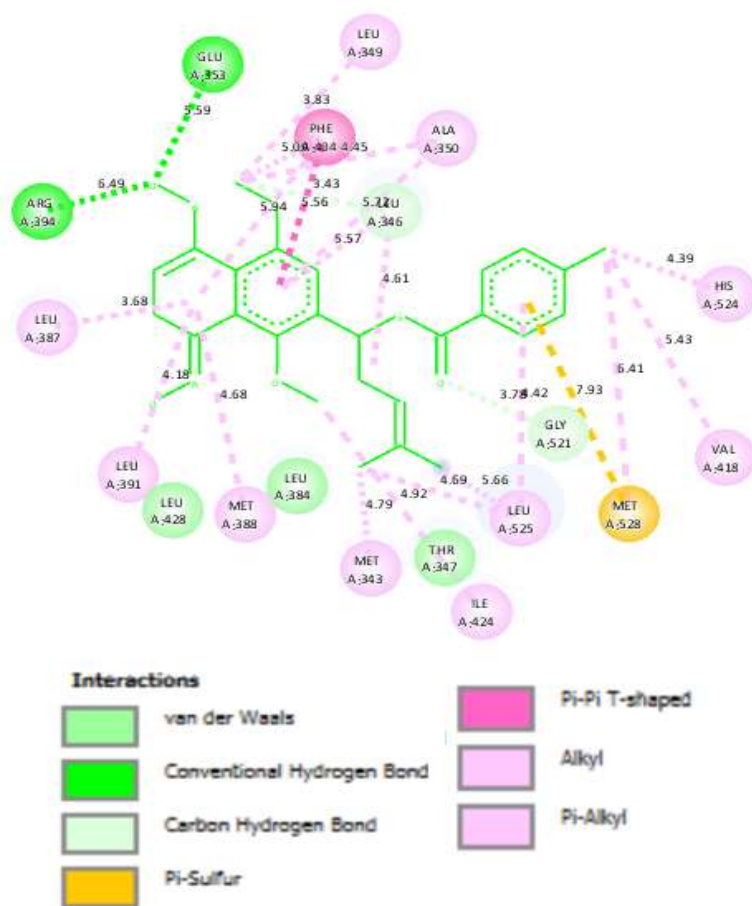


B

Ligand 33

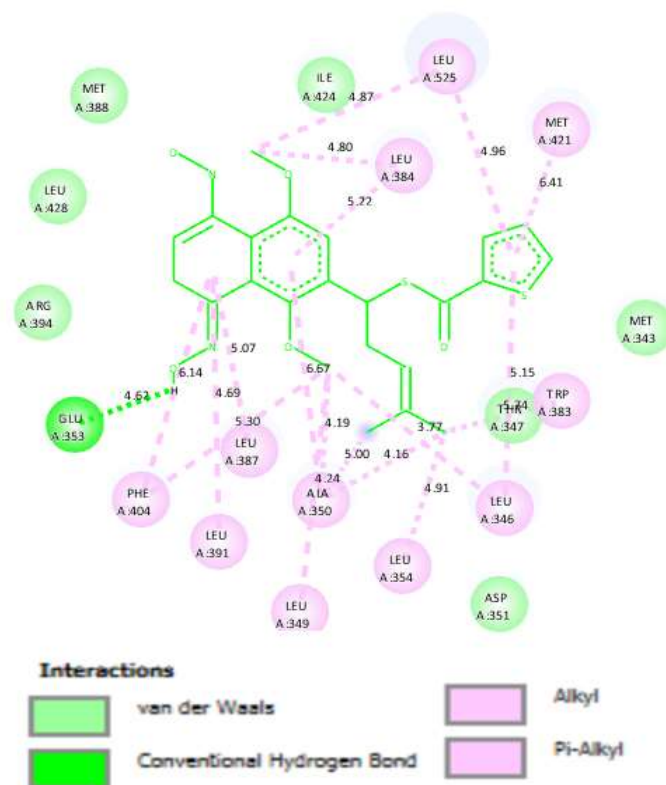
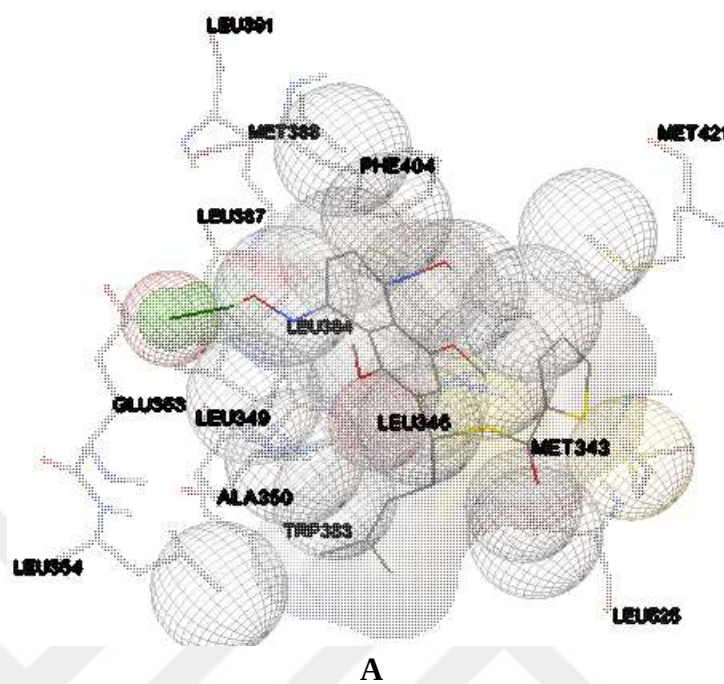


A



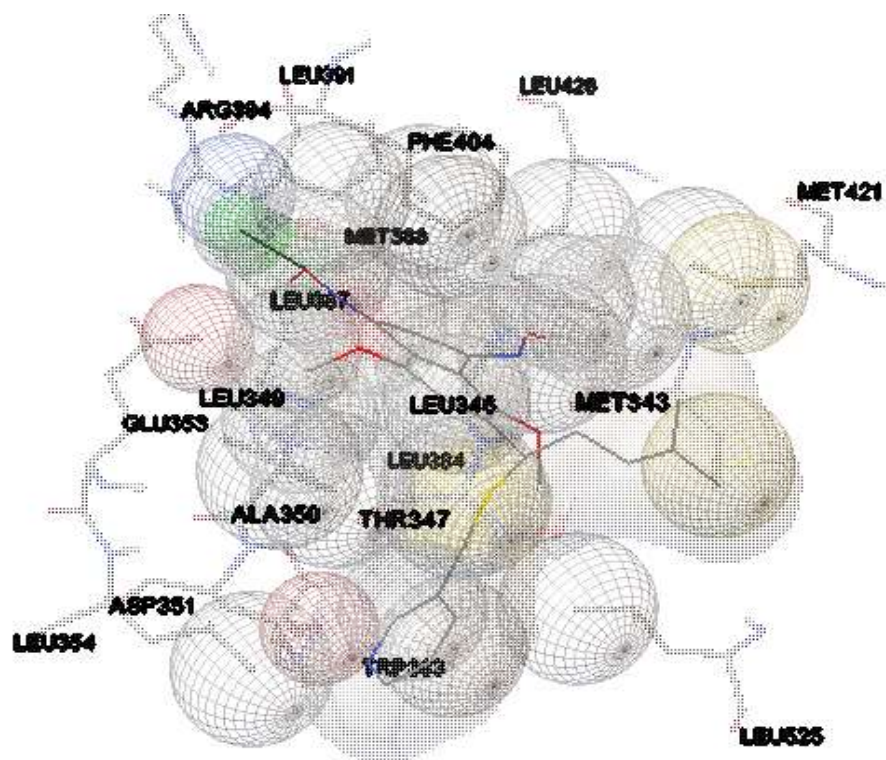
B

Ligand 34

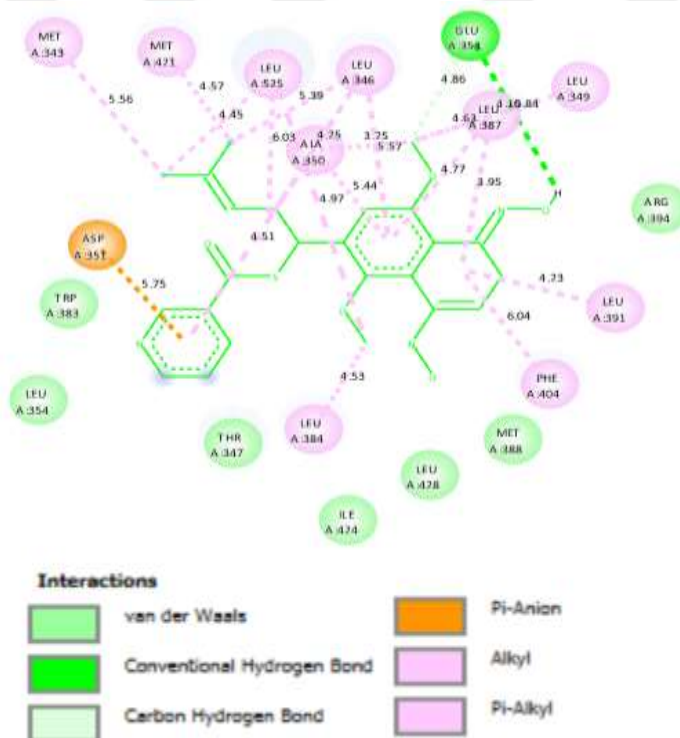


B

Ligand 35

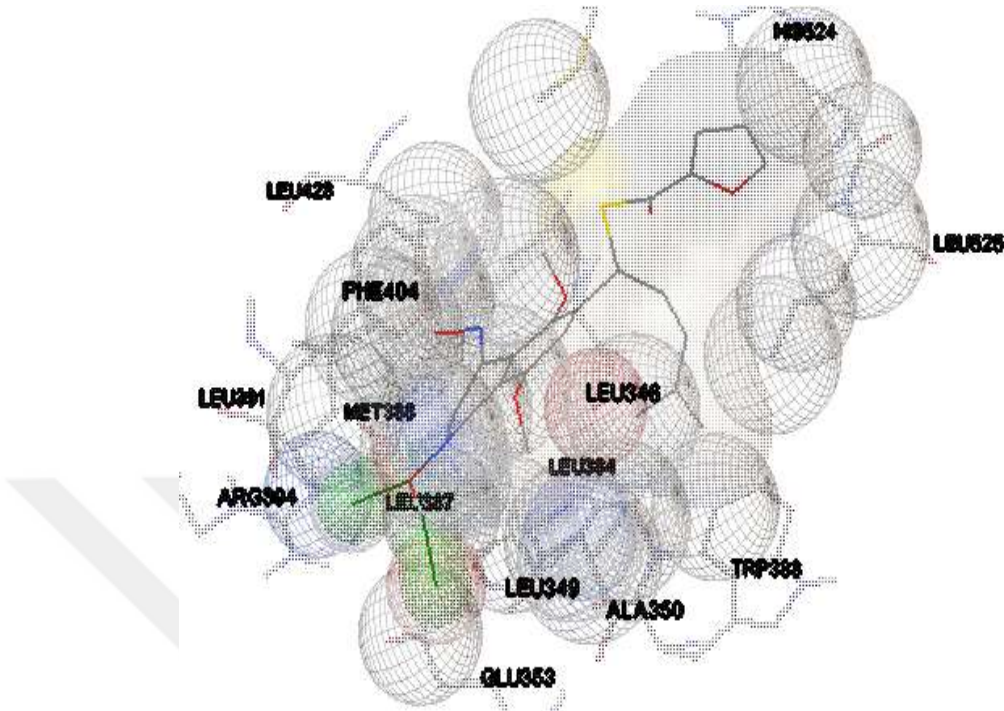


A

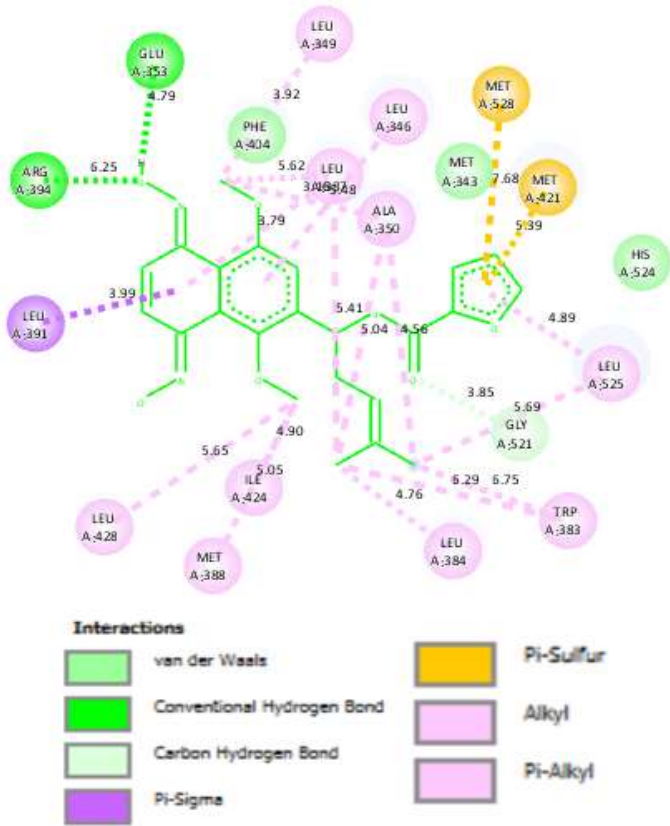


B

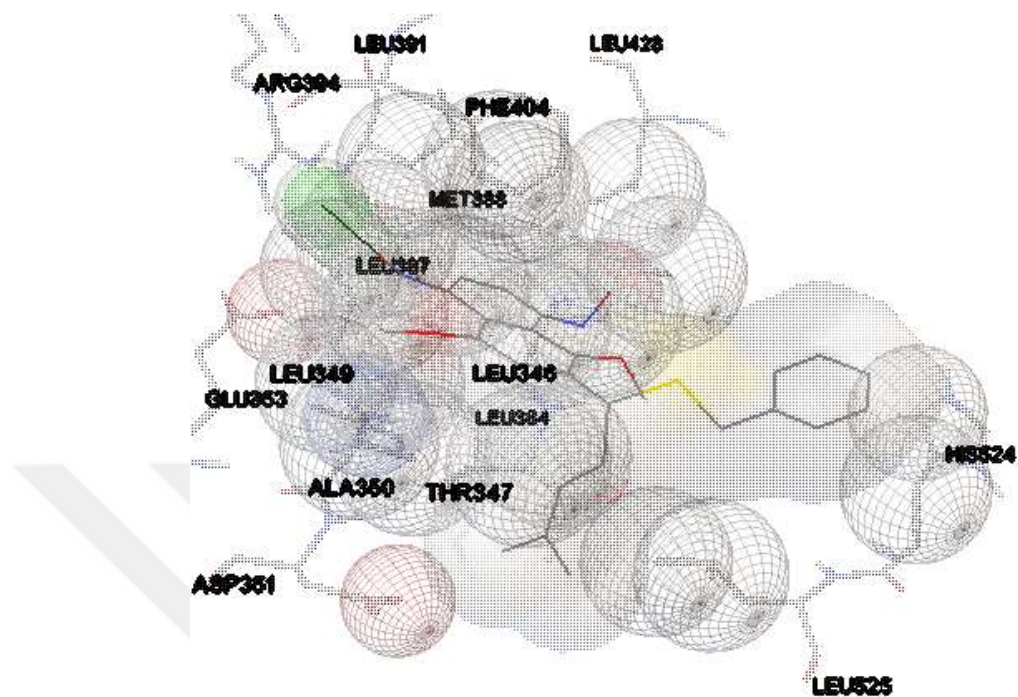
Ligand 36



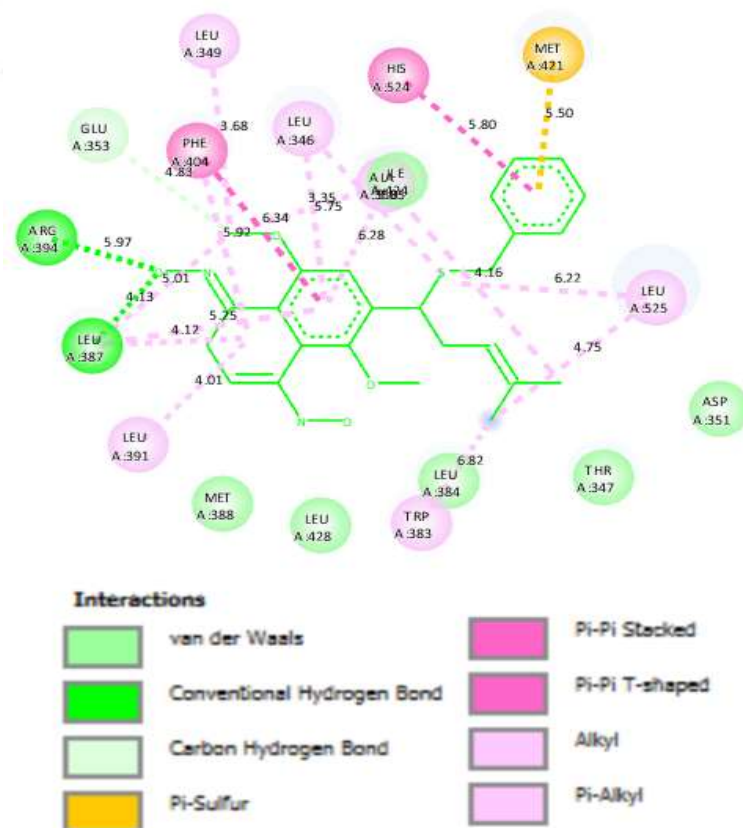
A



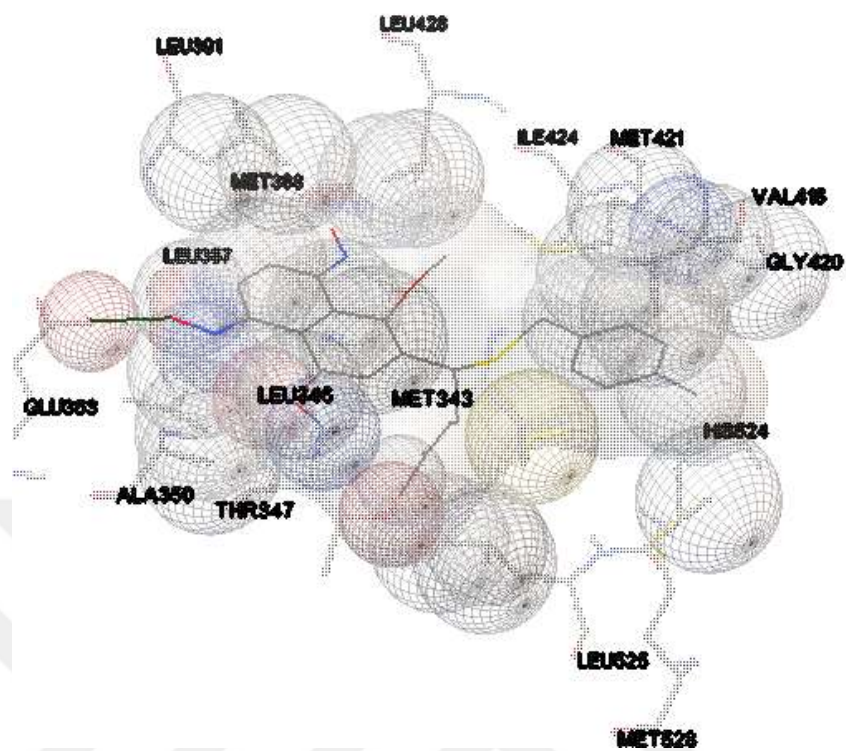
B



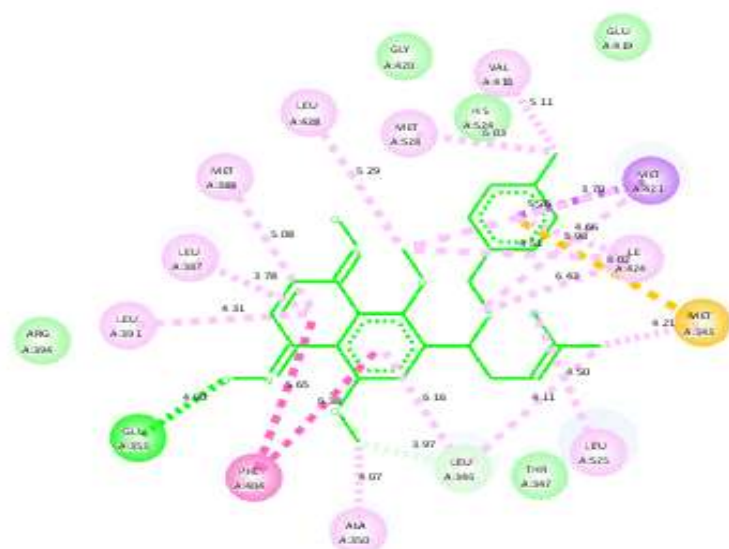
A



B



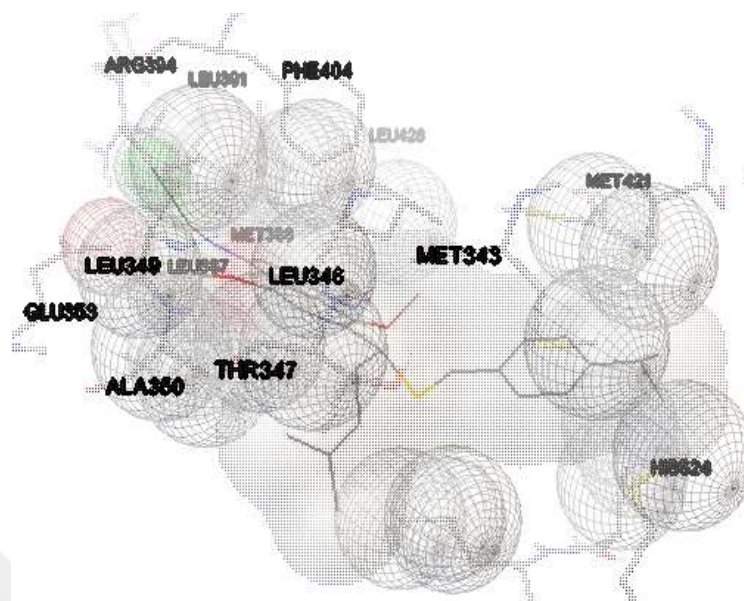
A



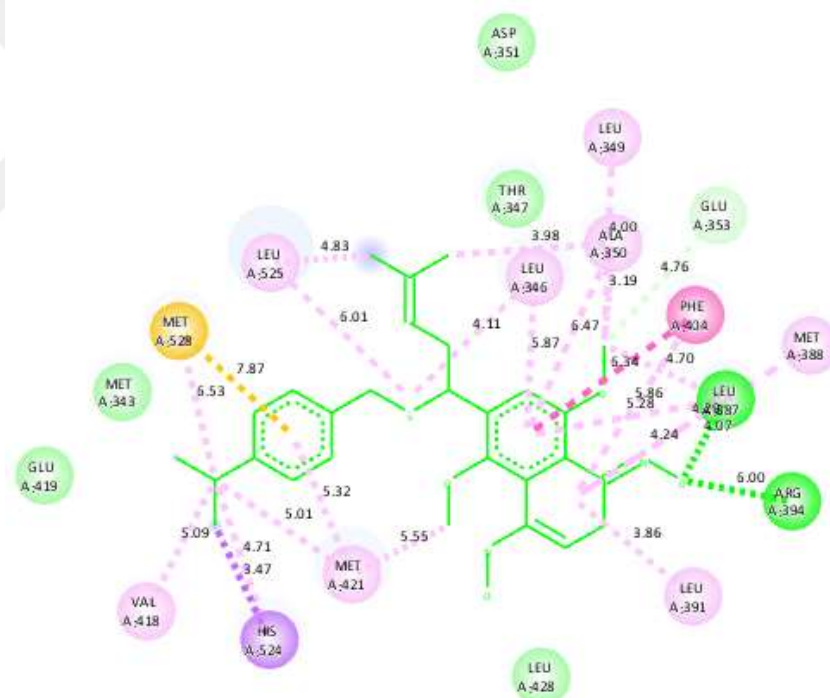
Interactions

	van der Waals		Pi-Sulfur
	Conventional Hydrogen Bond		Pi-Pi T-shaped
	Carbon Hydrogen Bond		Alkyl
	Pi-Sigma		Pi-Alkyl

B



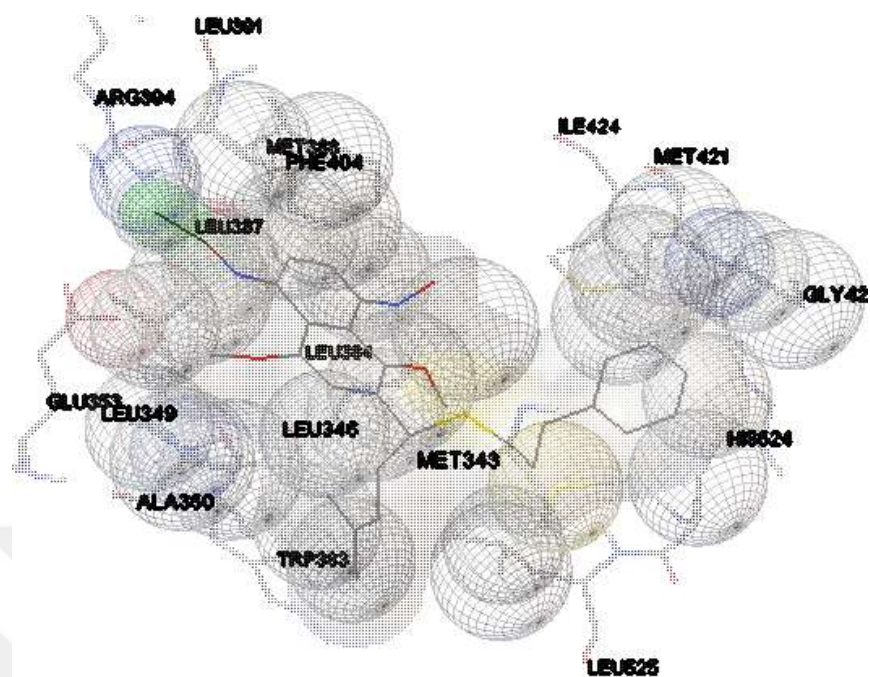
A



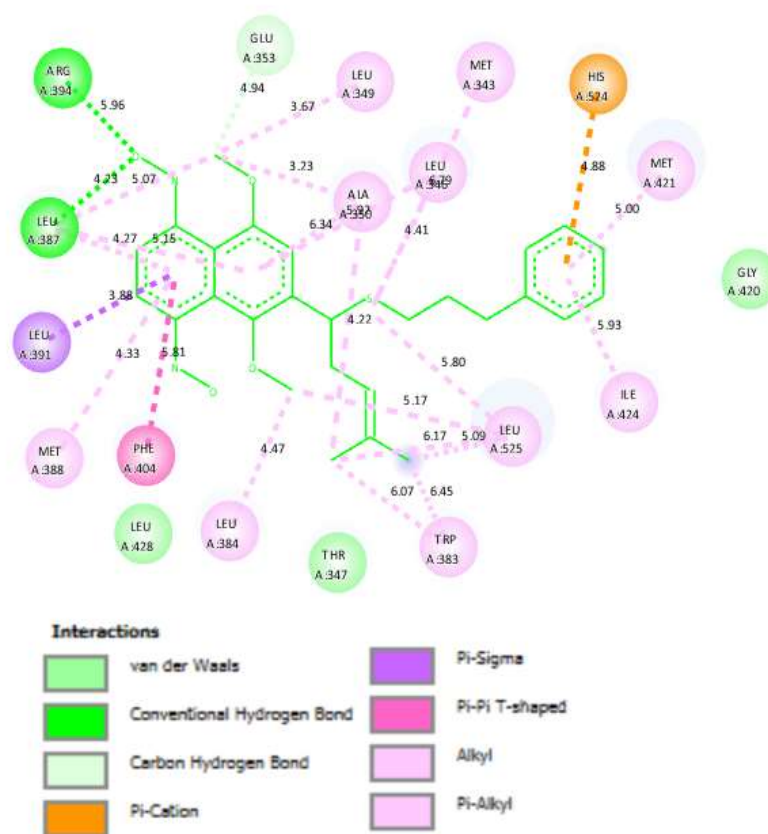
Interactions

	van der Waals		Pi-Sulfur
	Conventional Hydrogen Bond		Pi-Pi T-shaped
	Carbon Hydrogen Bond		Alkyl
	Pi-Sigma		Pi-Alkyl

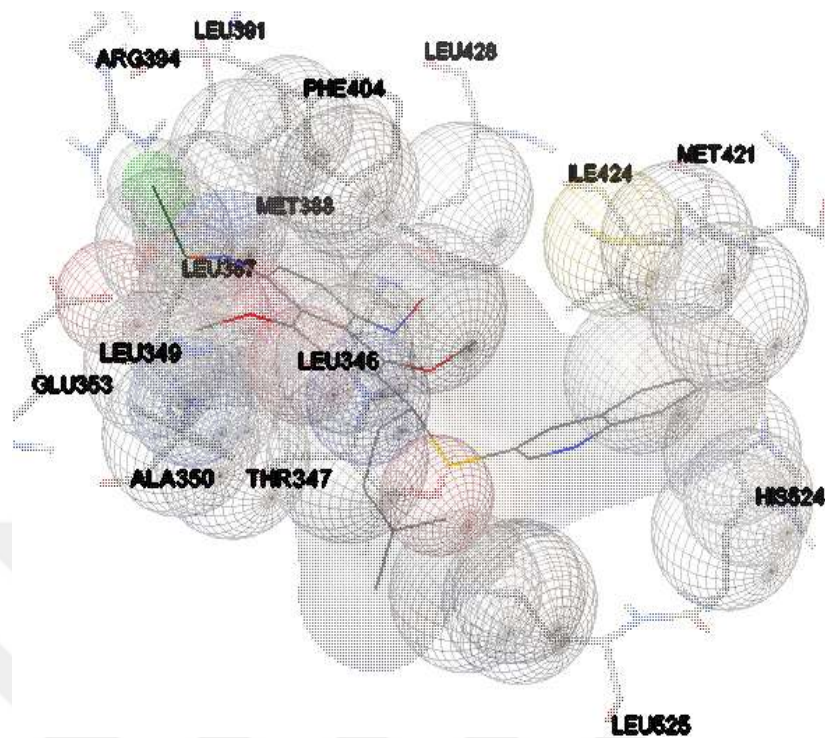
B



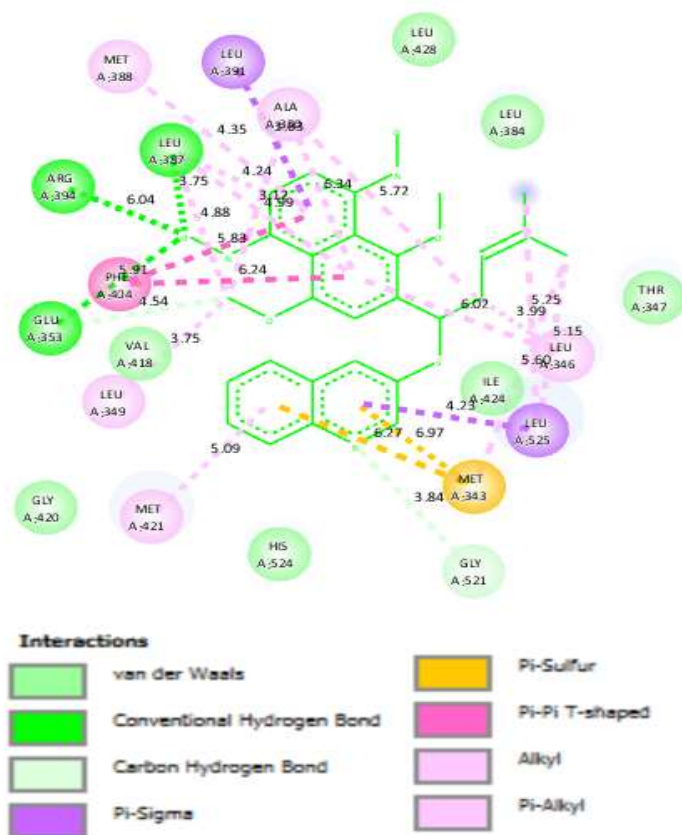
A



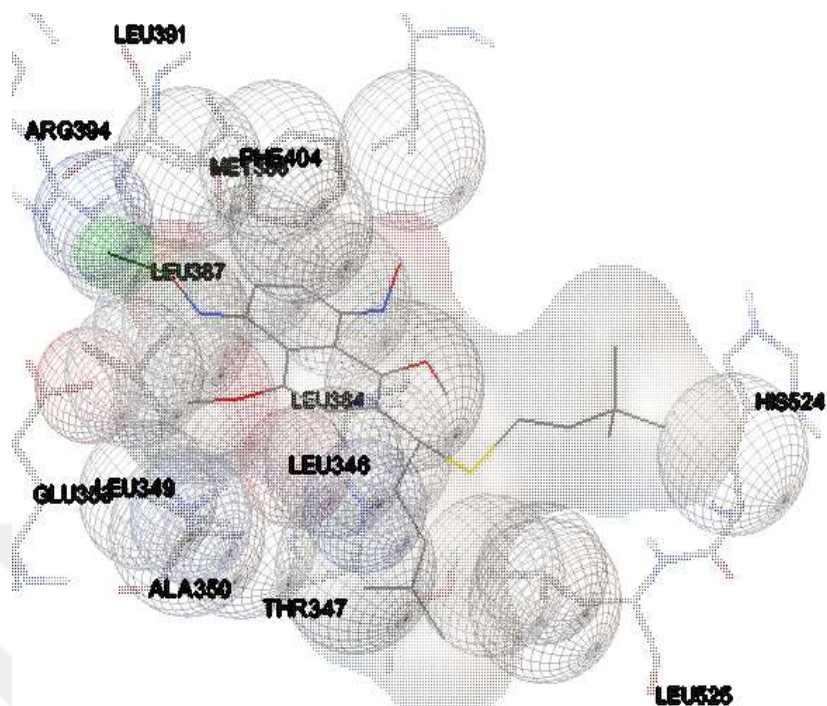
B



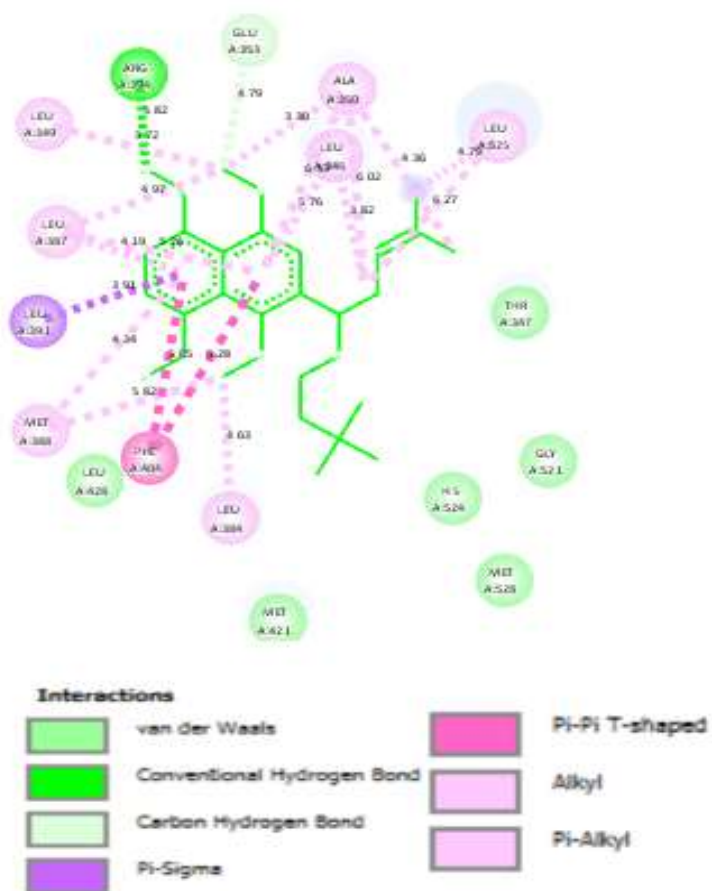
A



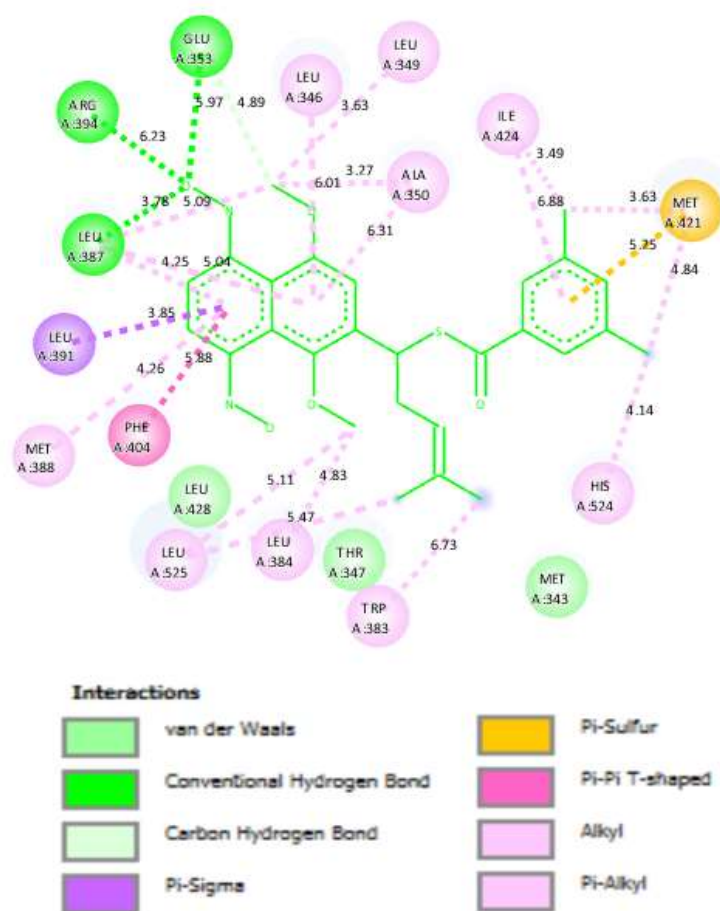
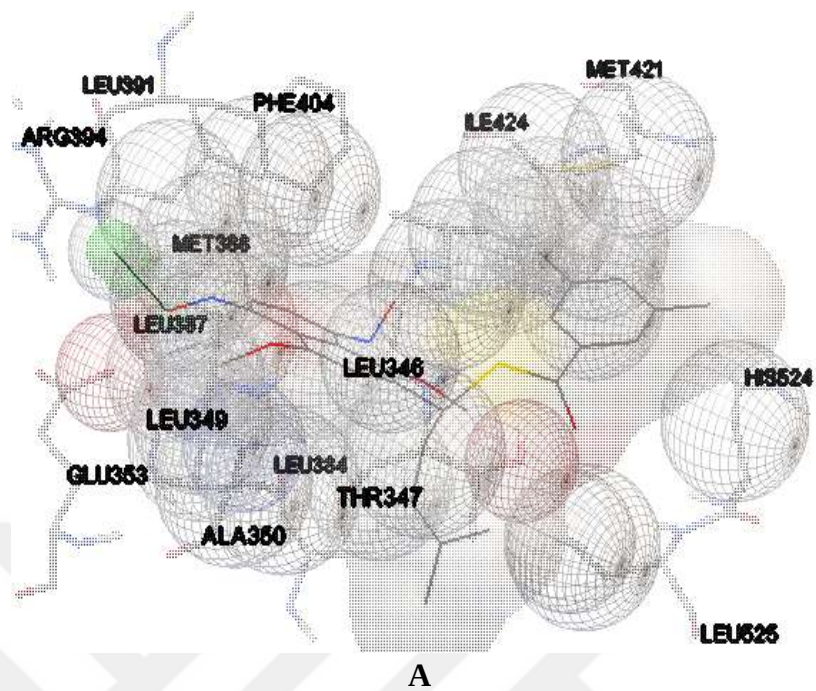
B

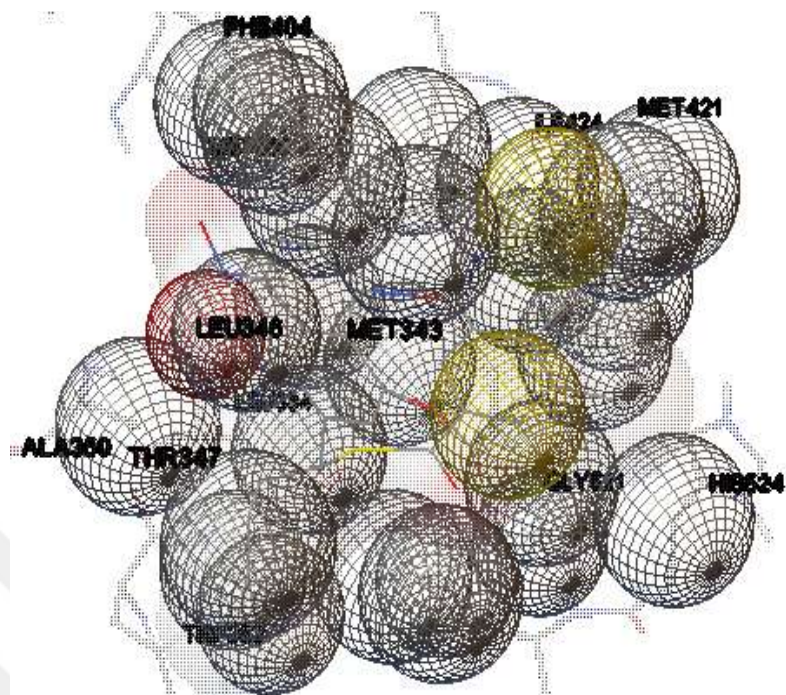


A

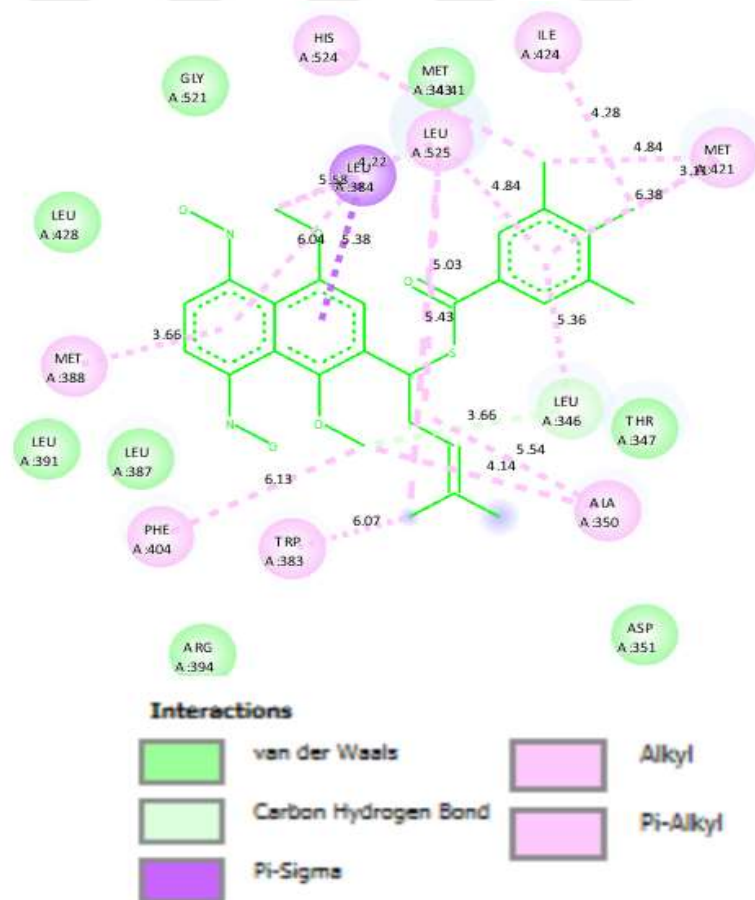


B

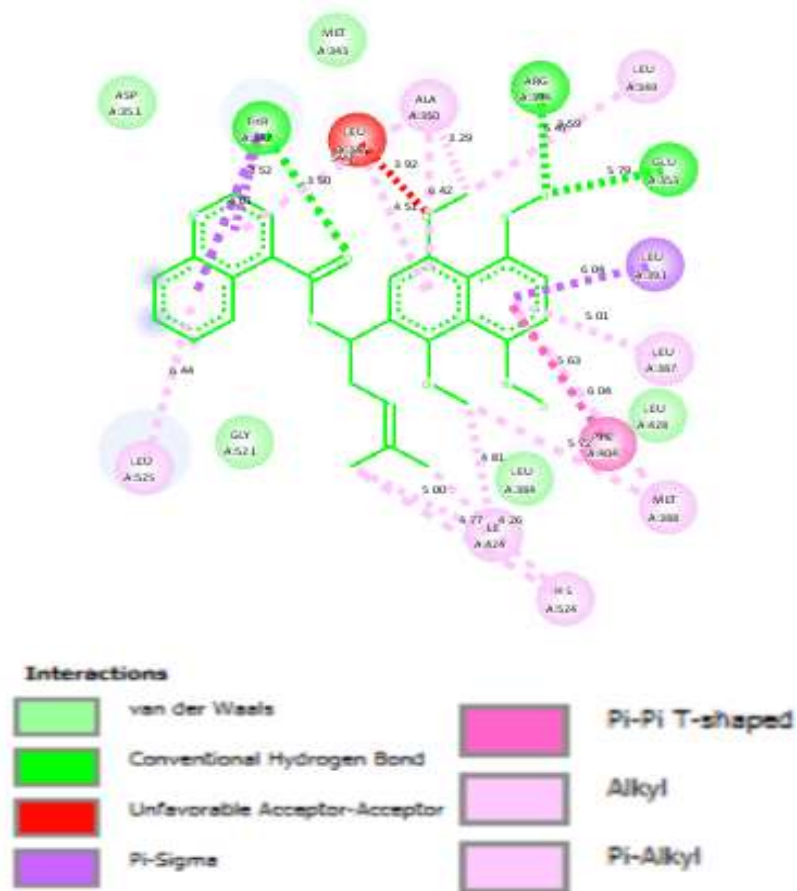
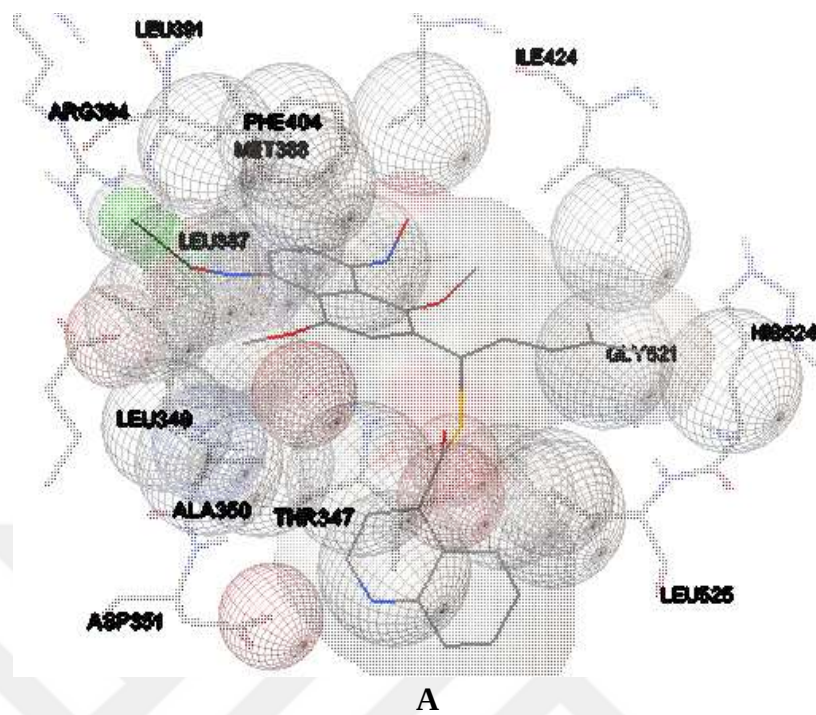


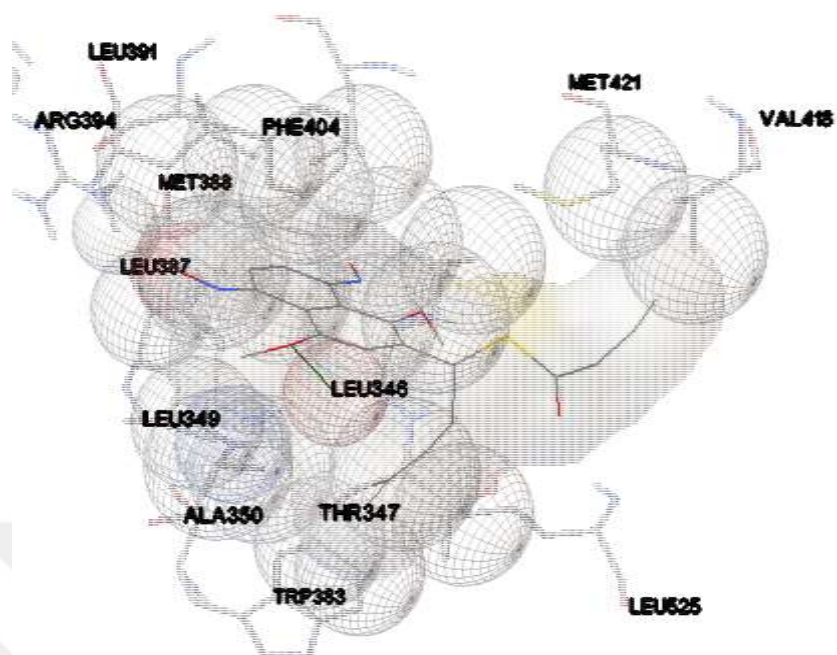


A

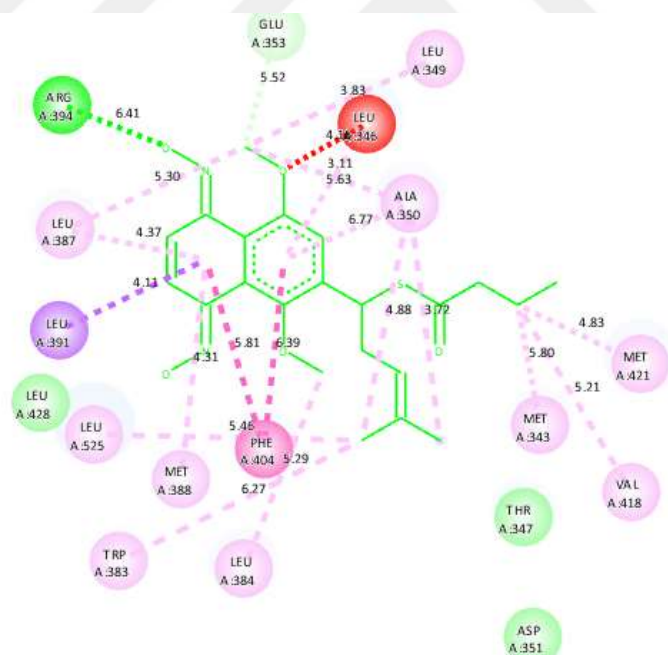


B





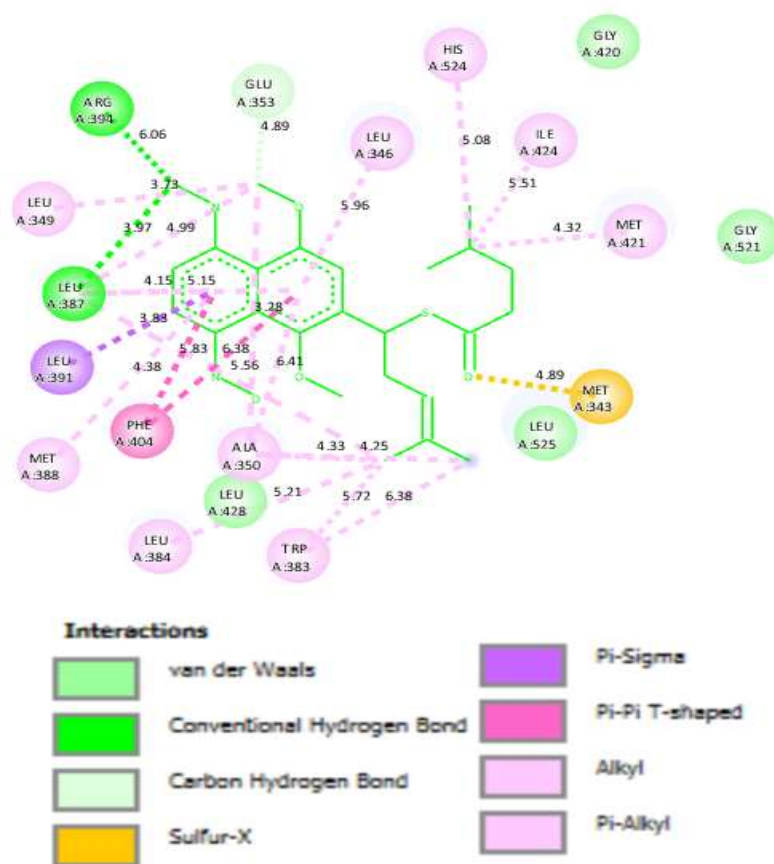
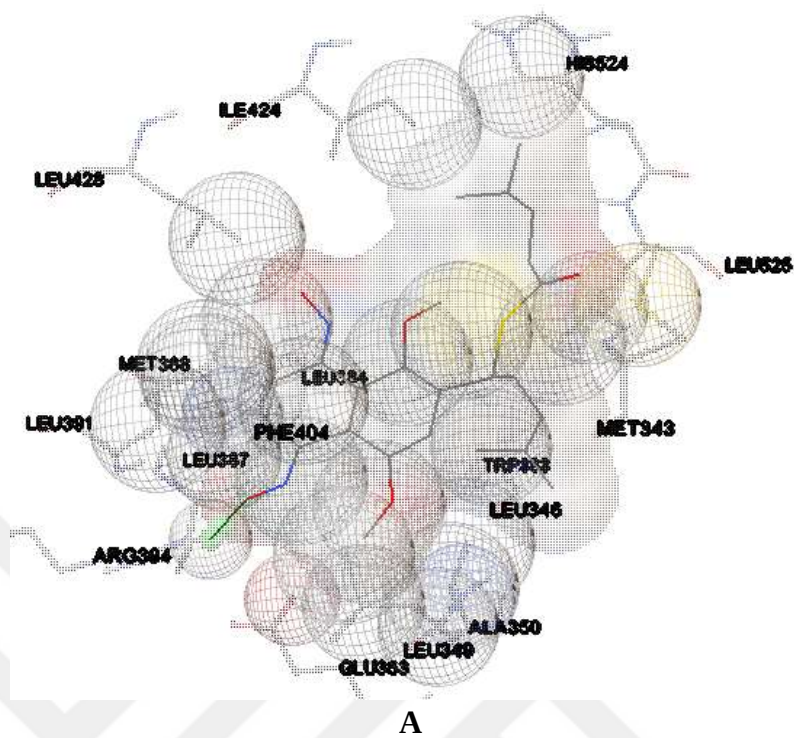
A

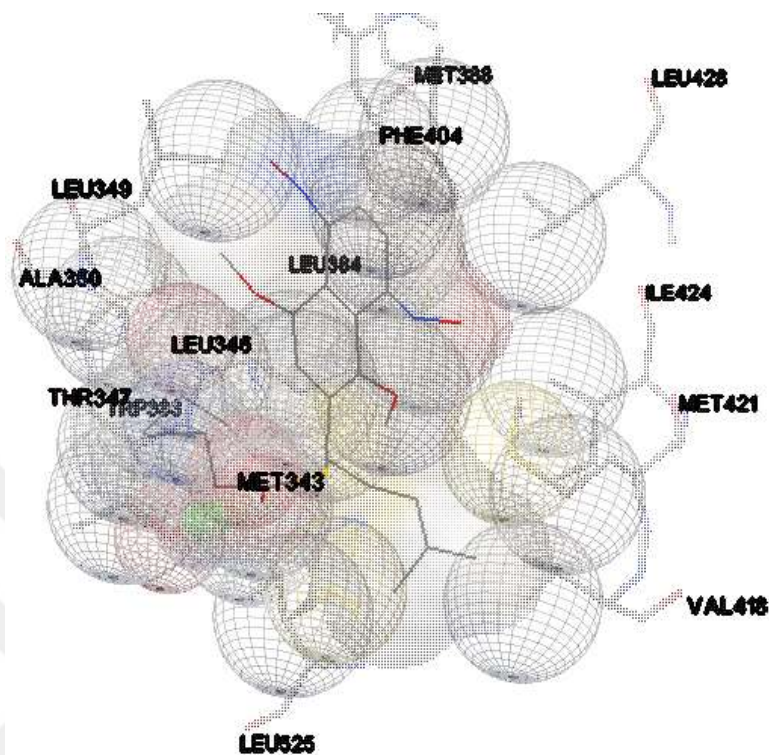


Interactions

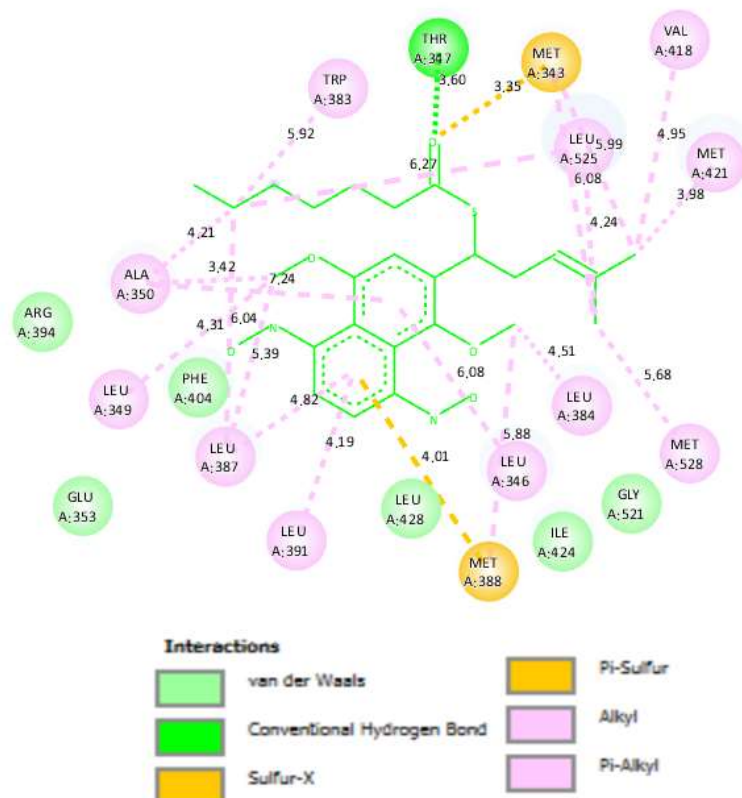
	van der Waals		Pi-Sigma
	Conventional Hydrogen Bond		Pi-Pi T-shaped
	Carbon Hydrogen Bond		Alkyl
	Unfavorable Acceptor-Acceptor		Pi-Alkyl

B

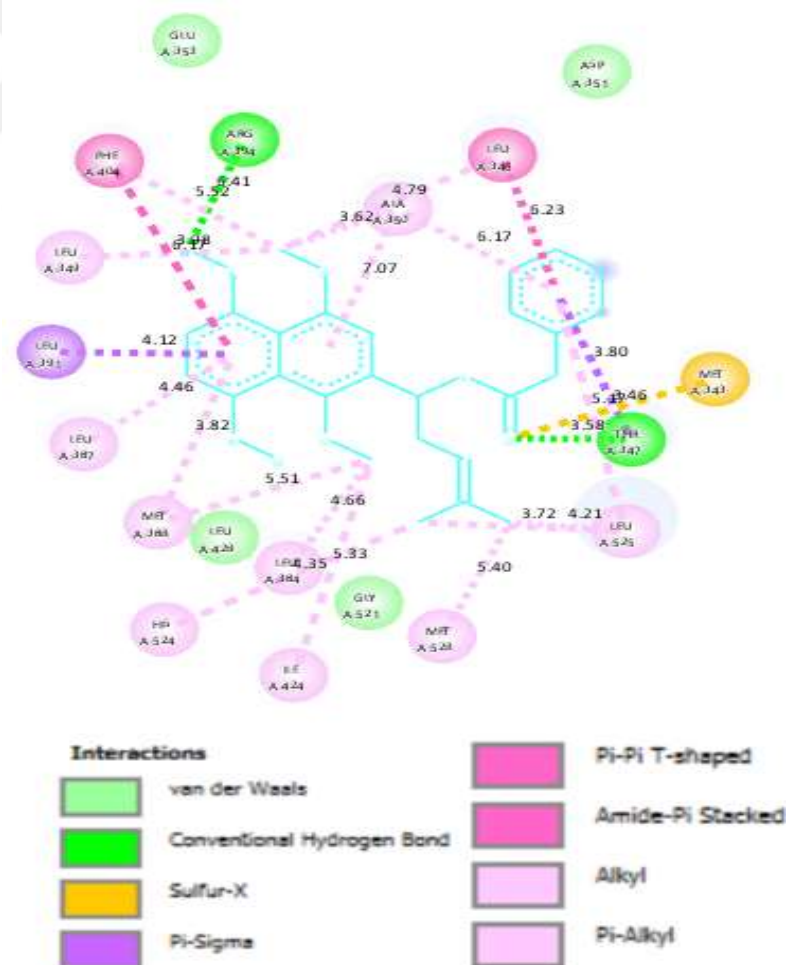
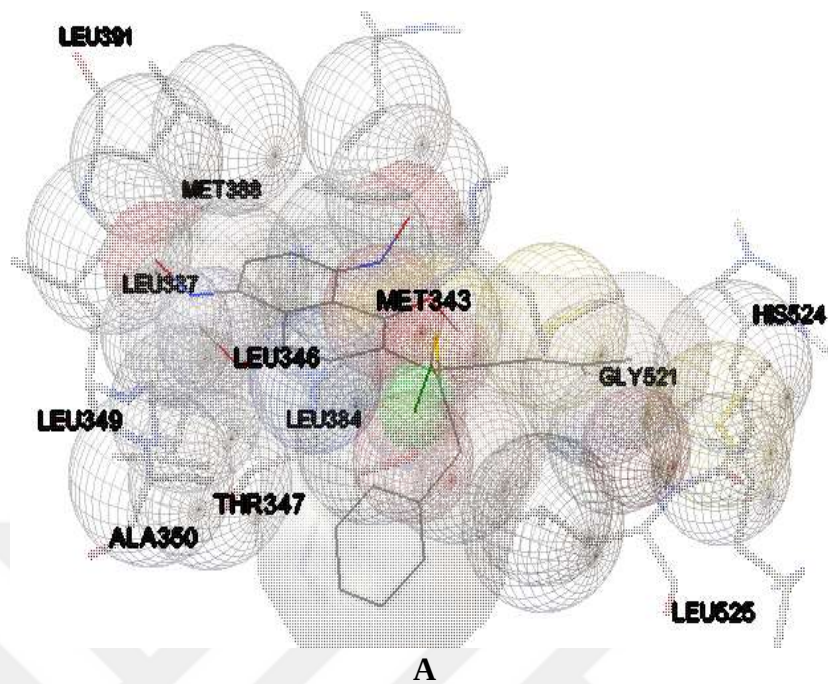




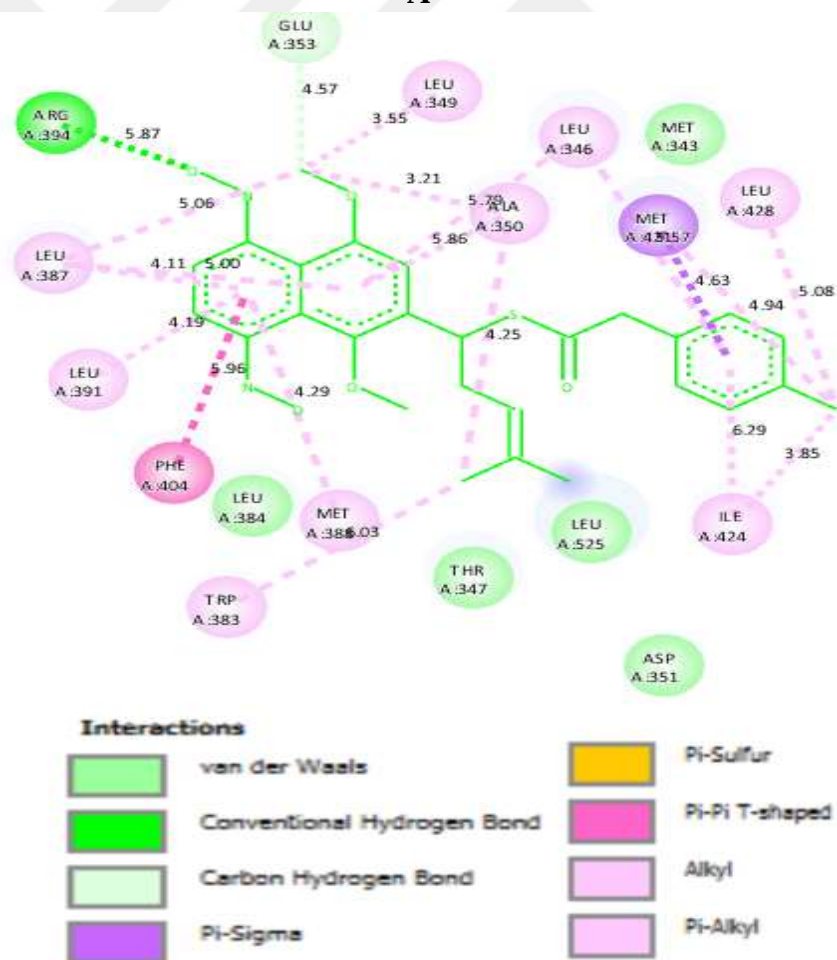
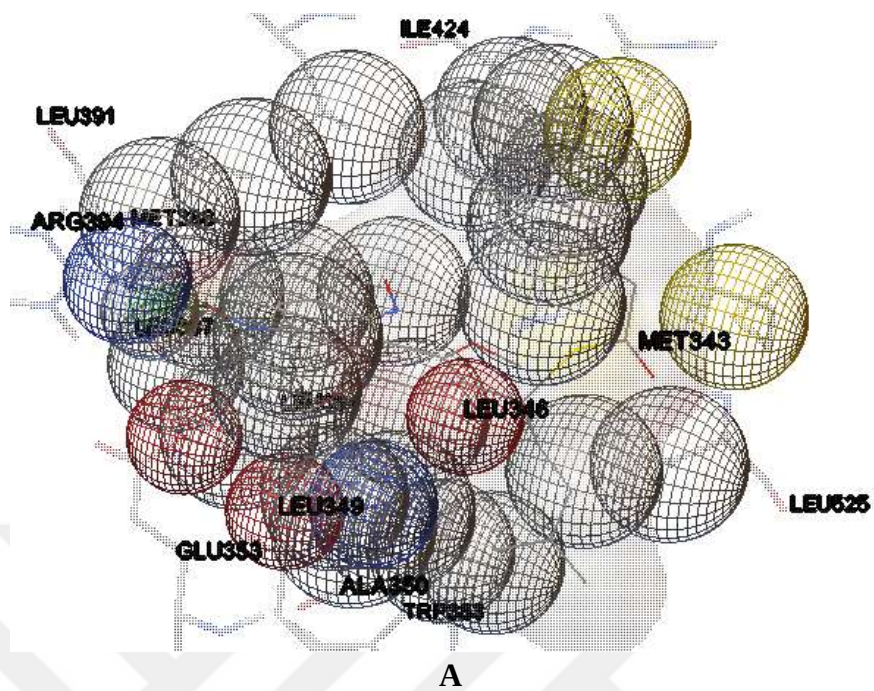
A



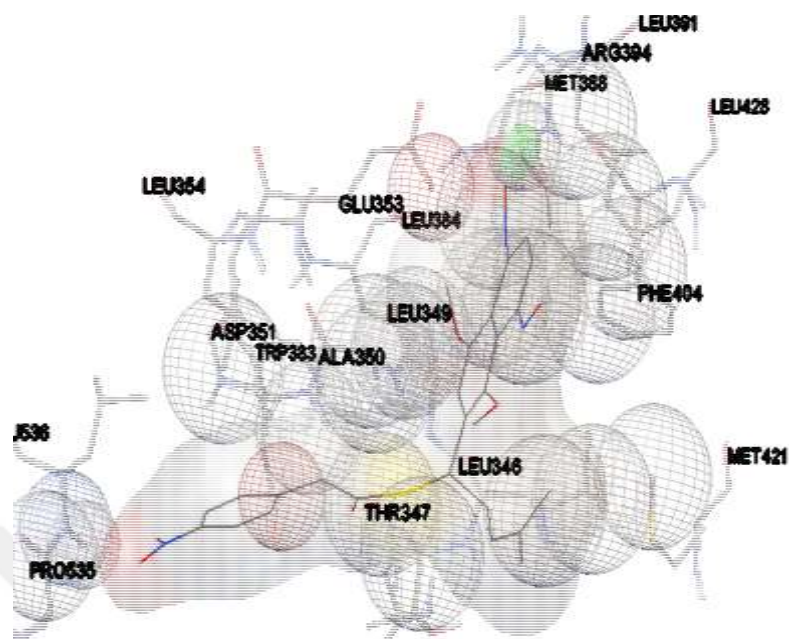
B



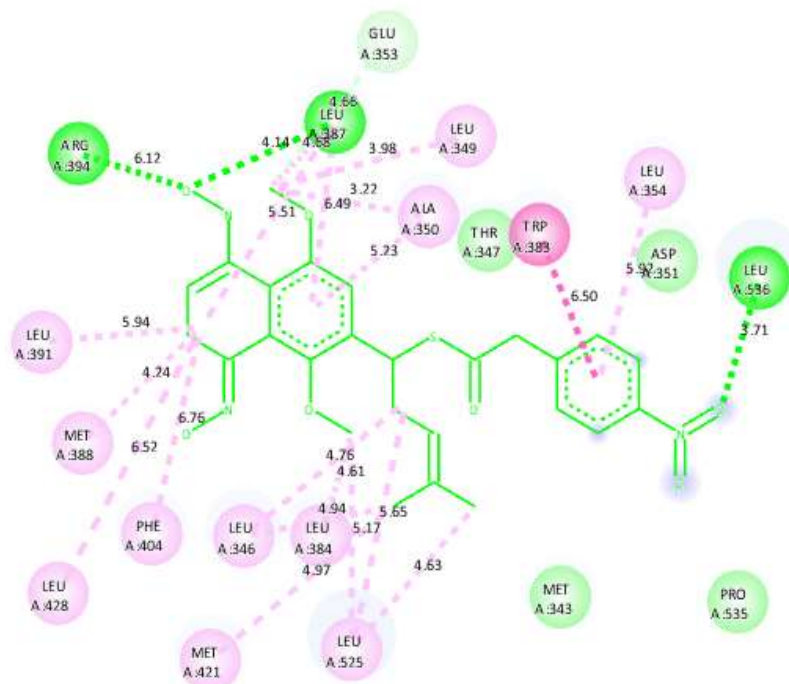
B



B



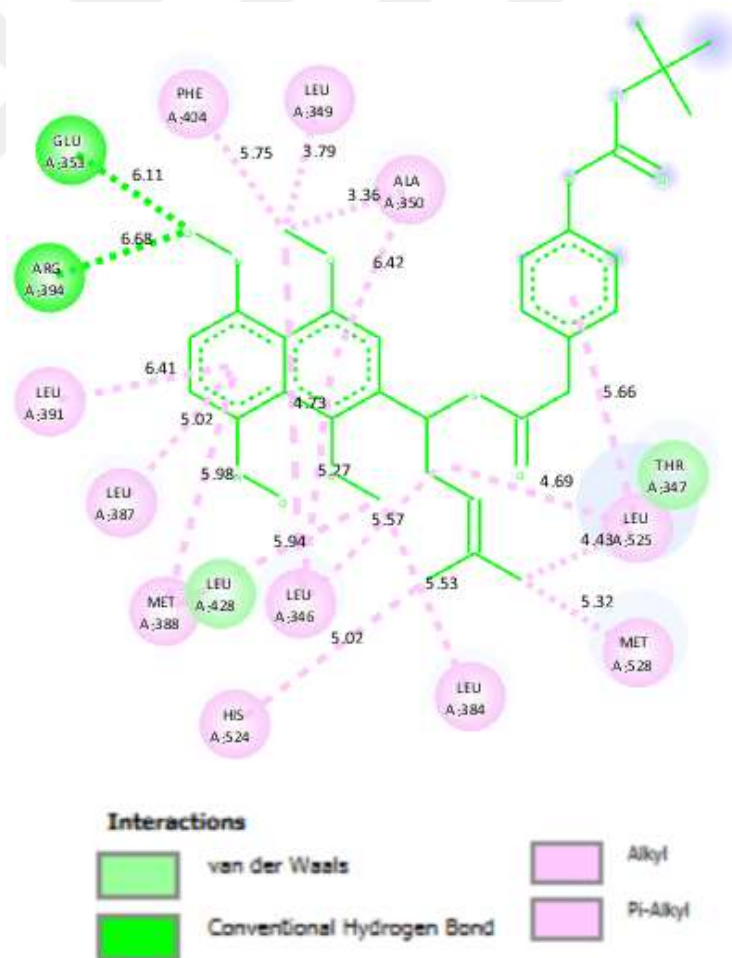
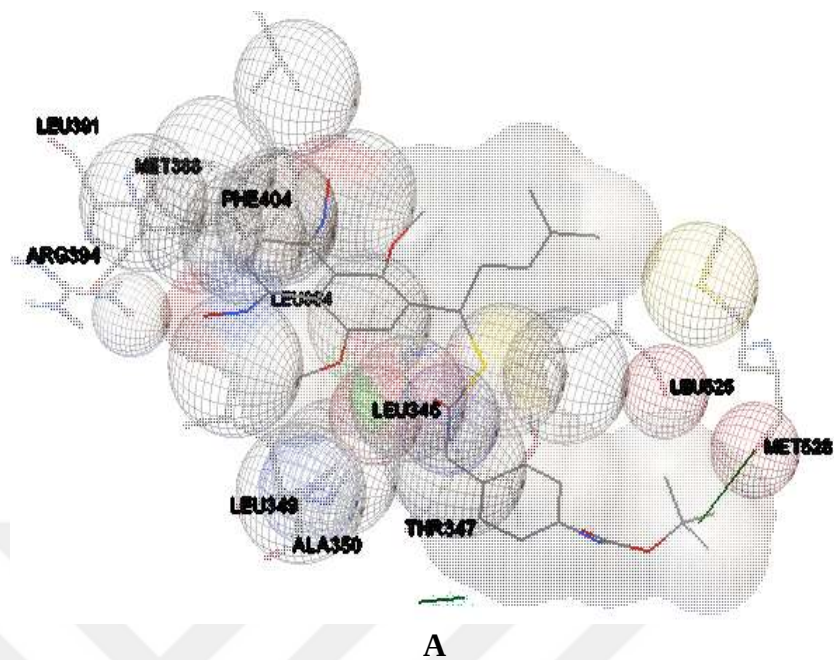
A



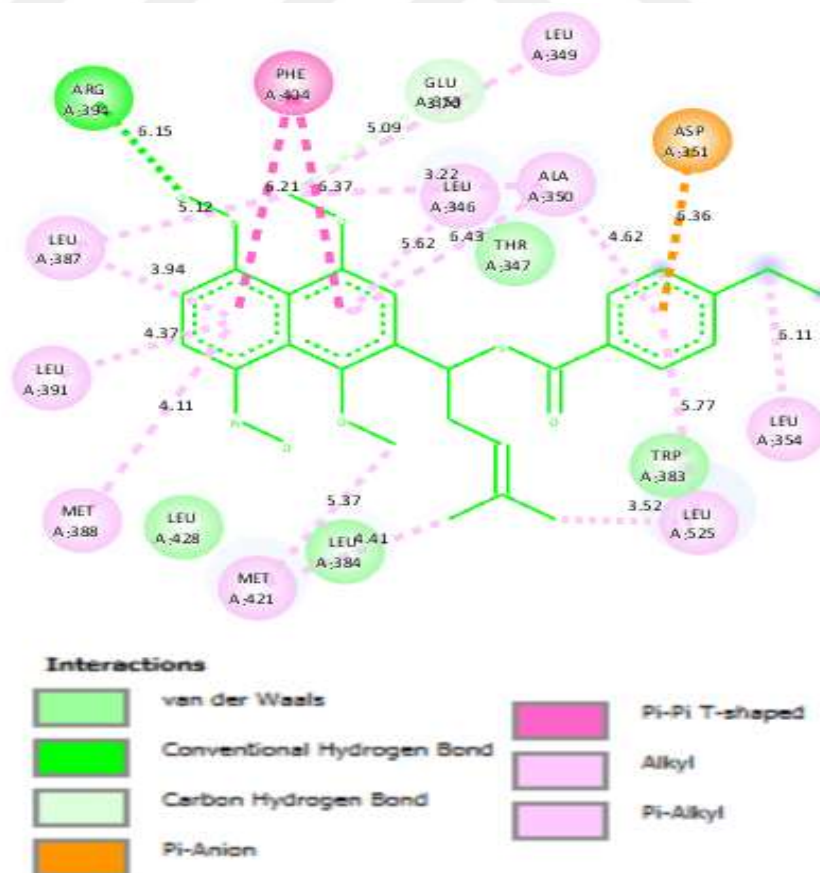
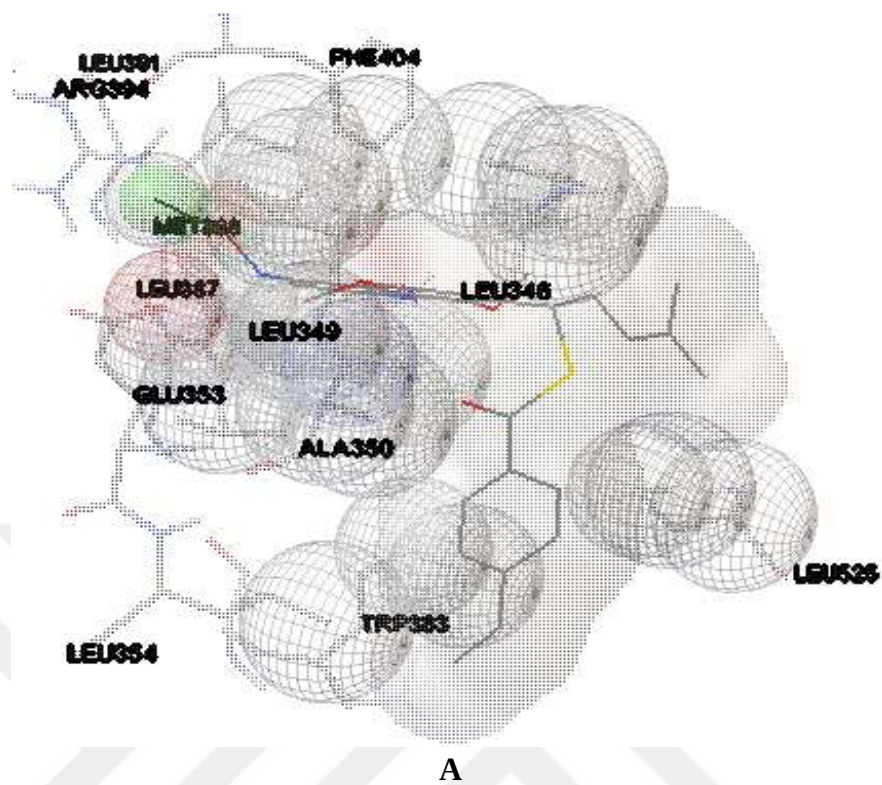
Interactions

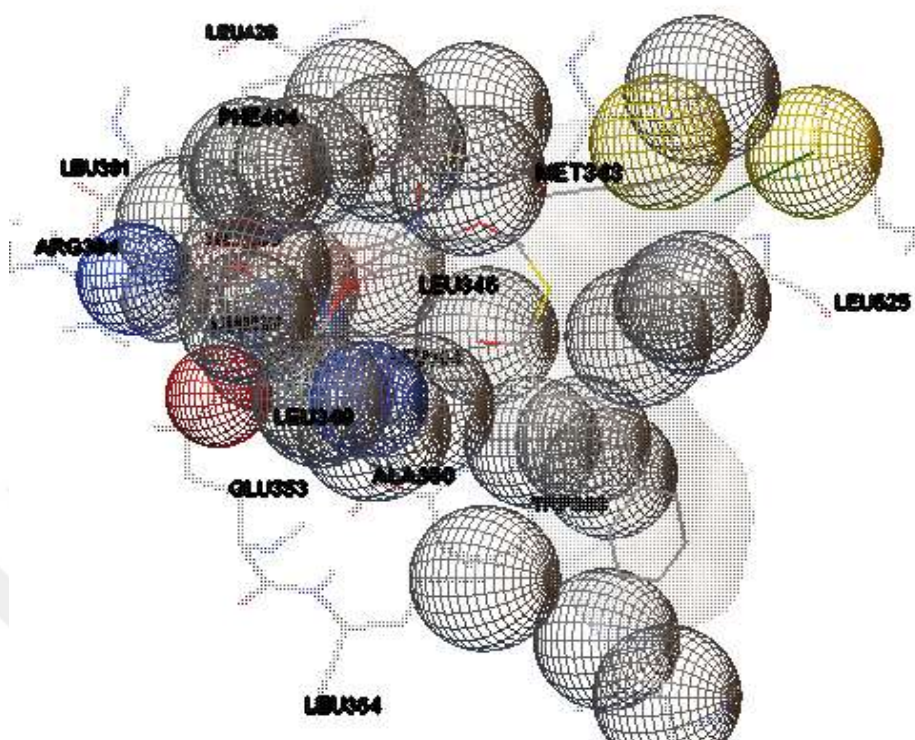
	van der Waals		Pi-Pi T-shaped
	Conventional Hydrogen Bond		Alkyl
	Carbon Hydrogen Bond		Pi-Alkyl

B

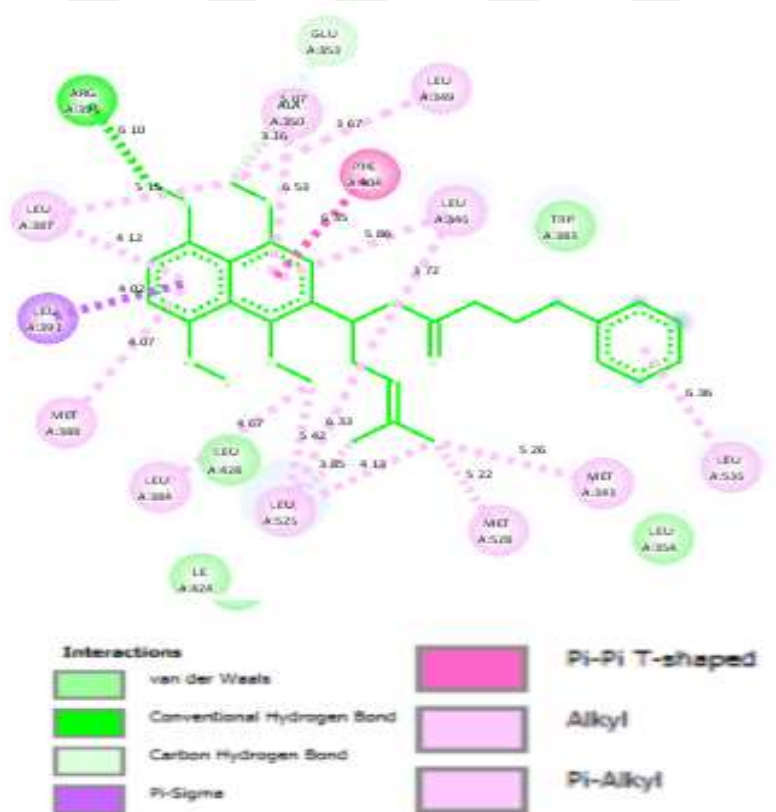


B





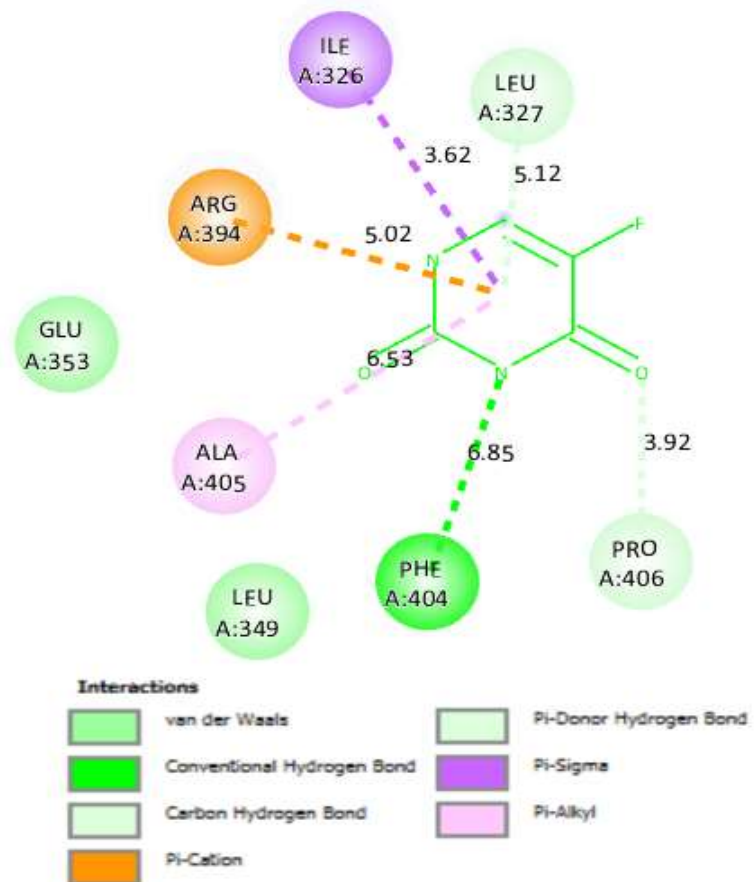
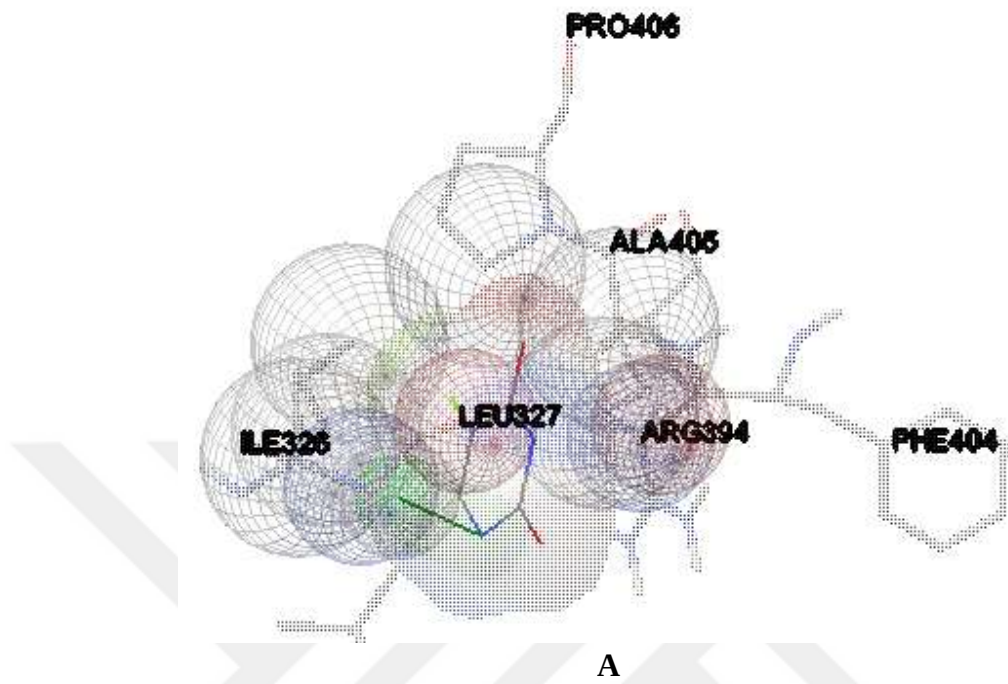
A



B

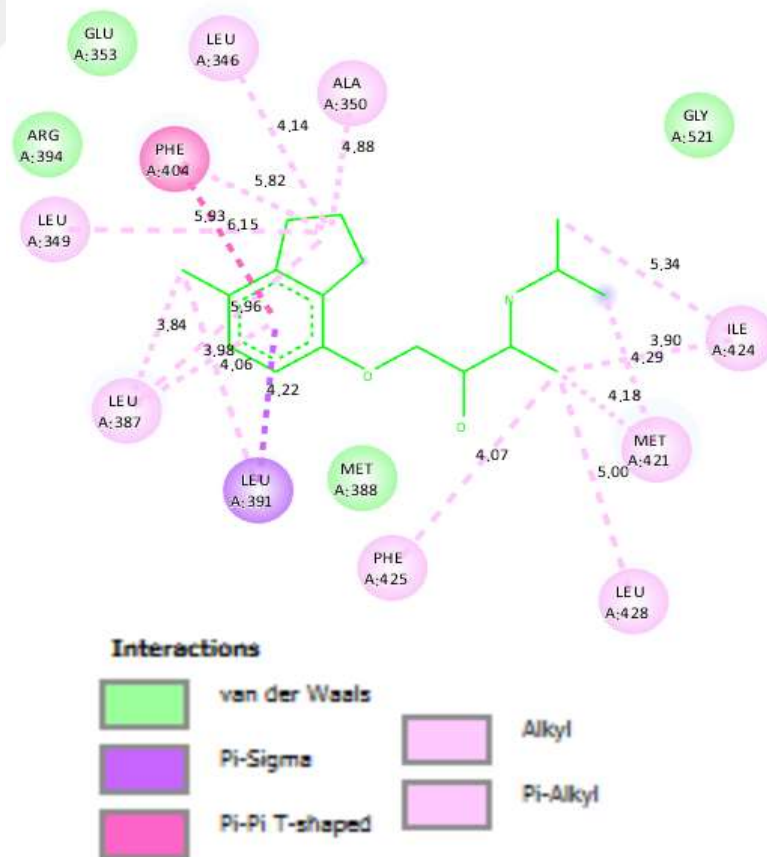
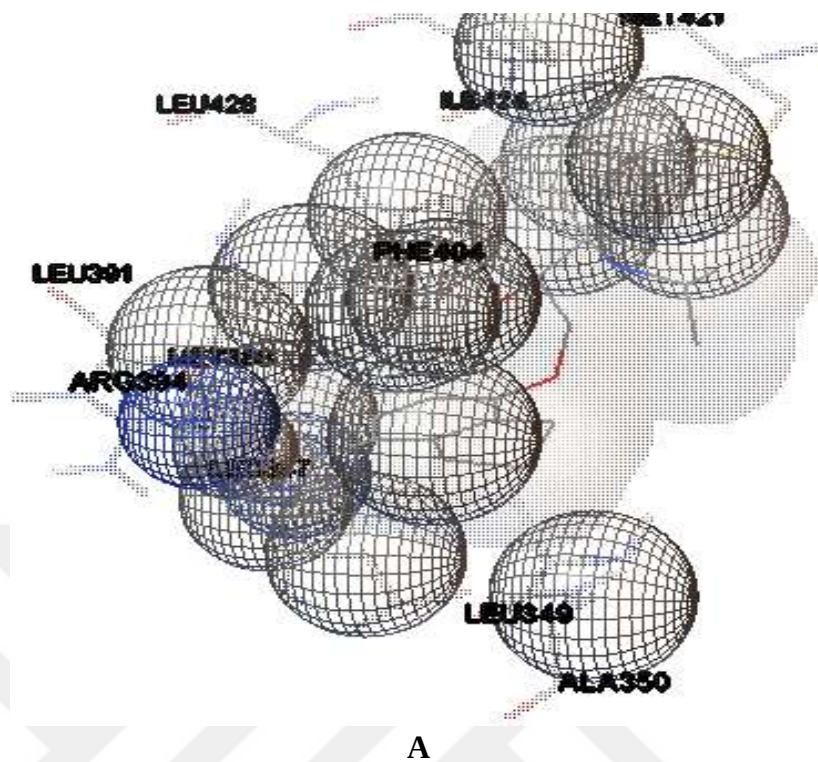
İlaçlar

5-Fluorouracil (74)



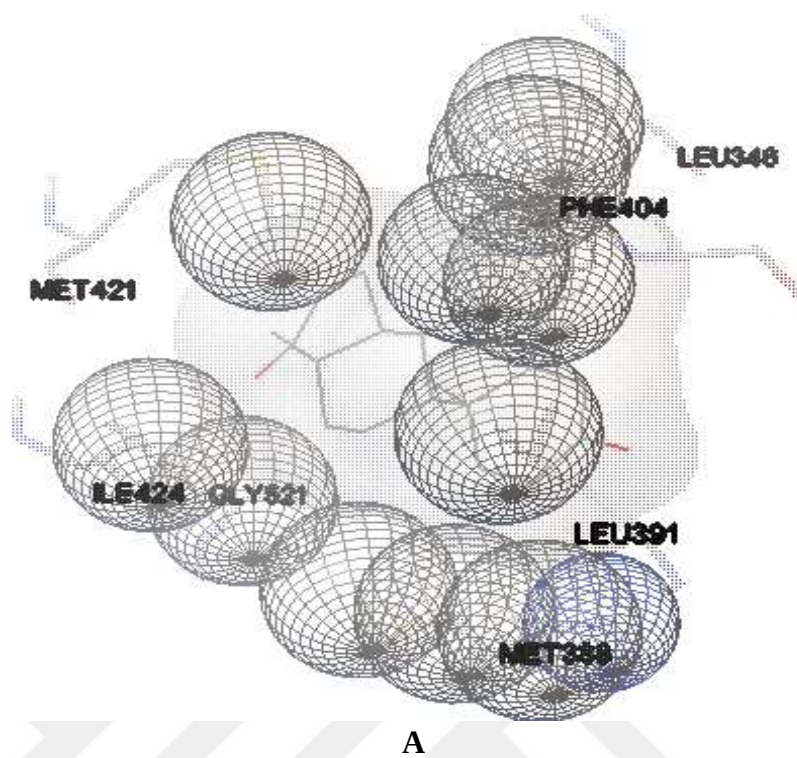
B

Pertuzumab (75)

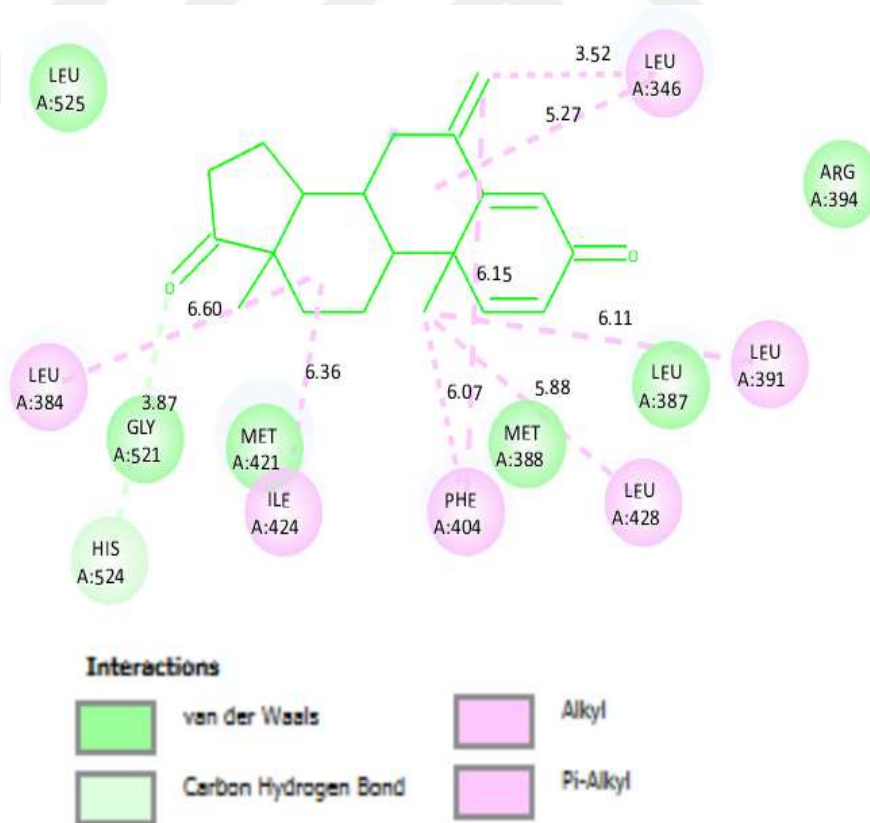


B

Exemestane (76)

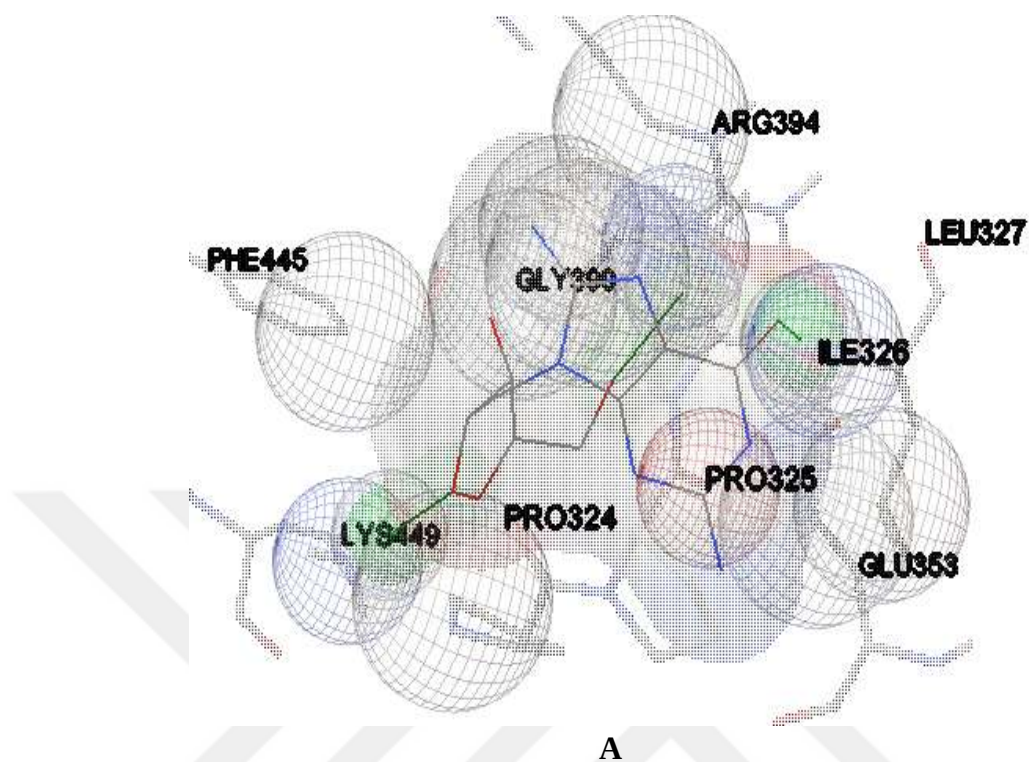


A

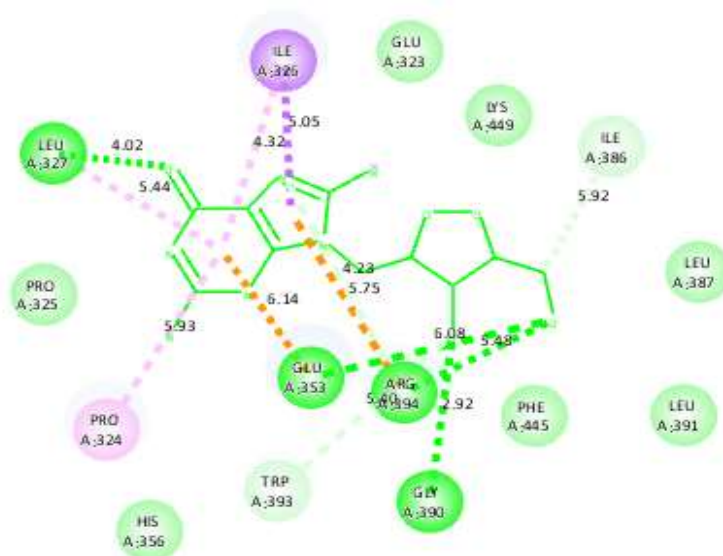


B

Trastuzumab (77)



A



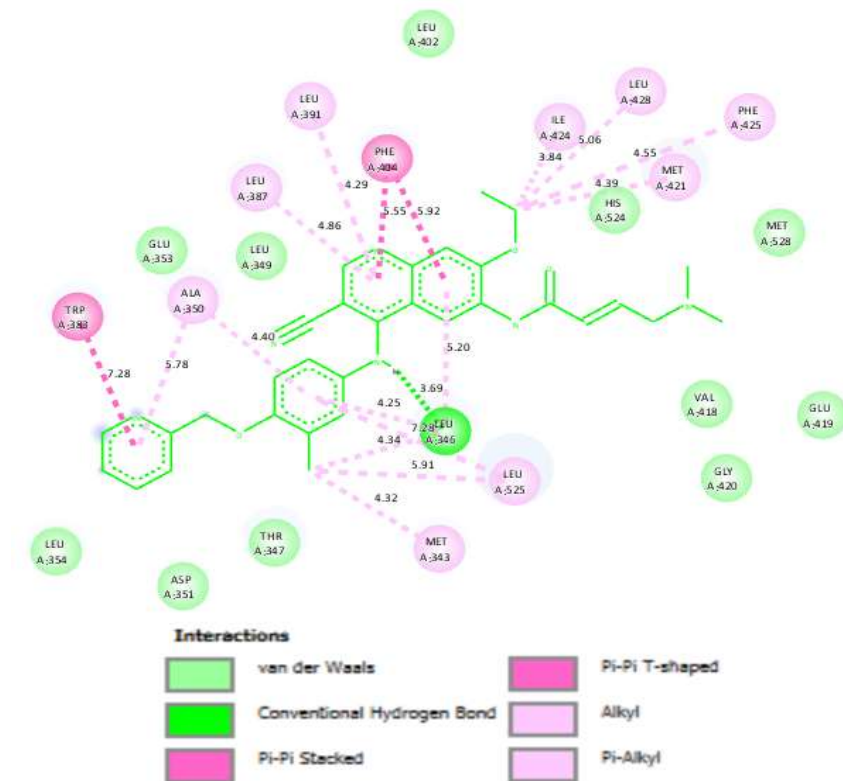
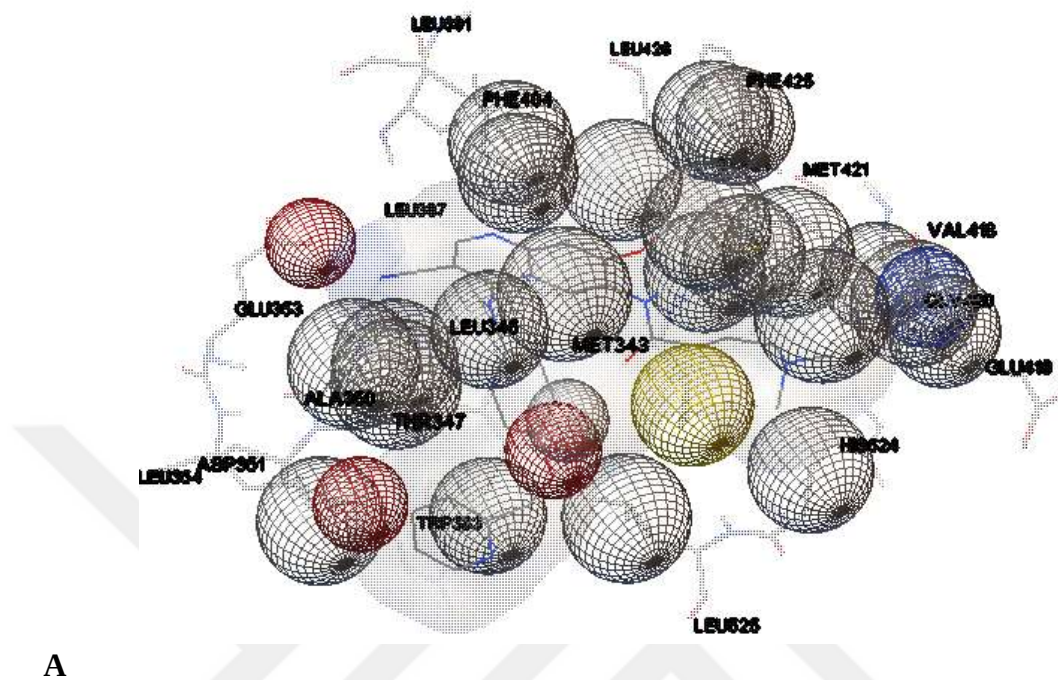
Interactions

	van der Waals		Pi-Anion
	Conventional Hydrogen Bond		Pi-Sigma
	Carbon Hydrogen Bond		Pi-Alkyl
	Pi-Cation		

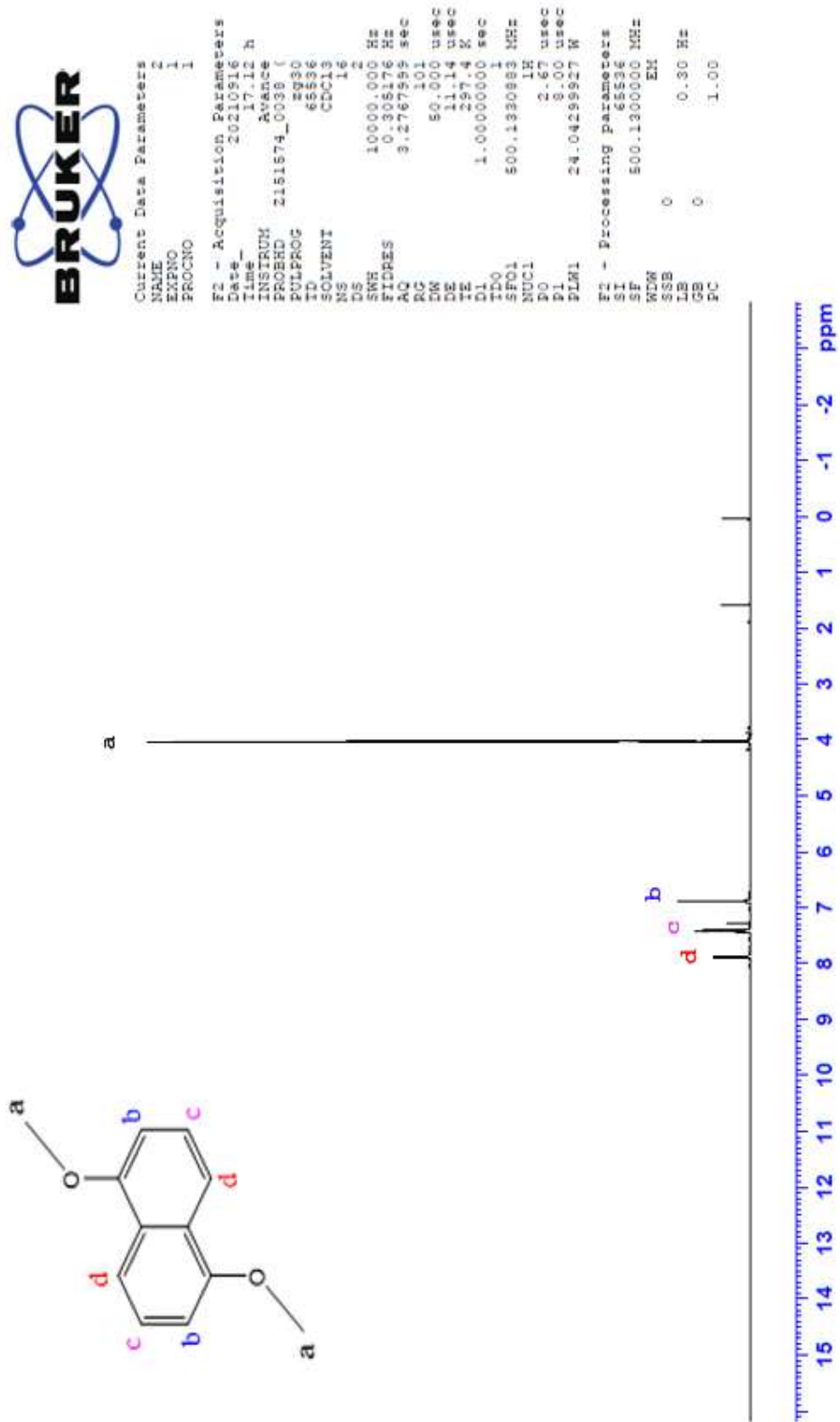
B

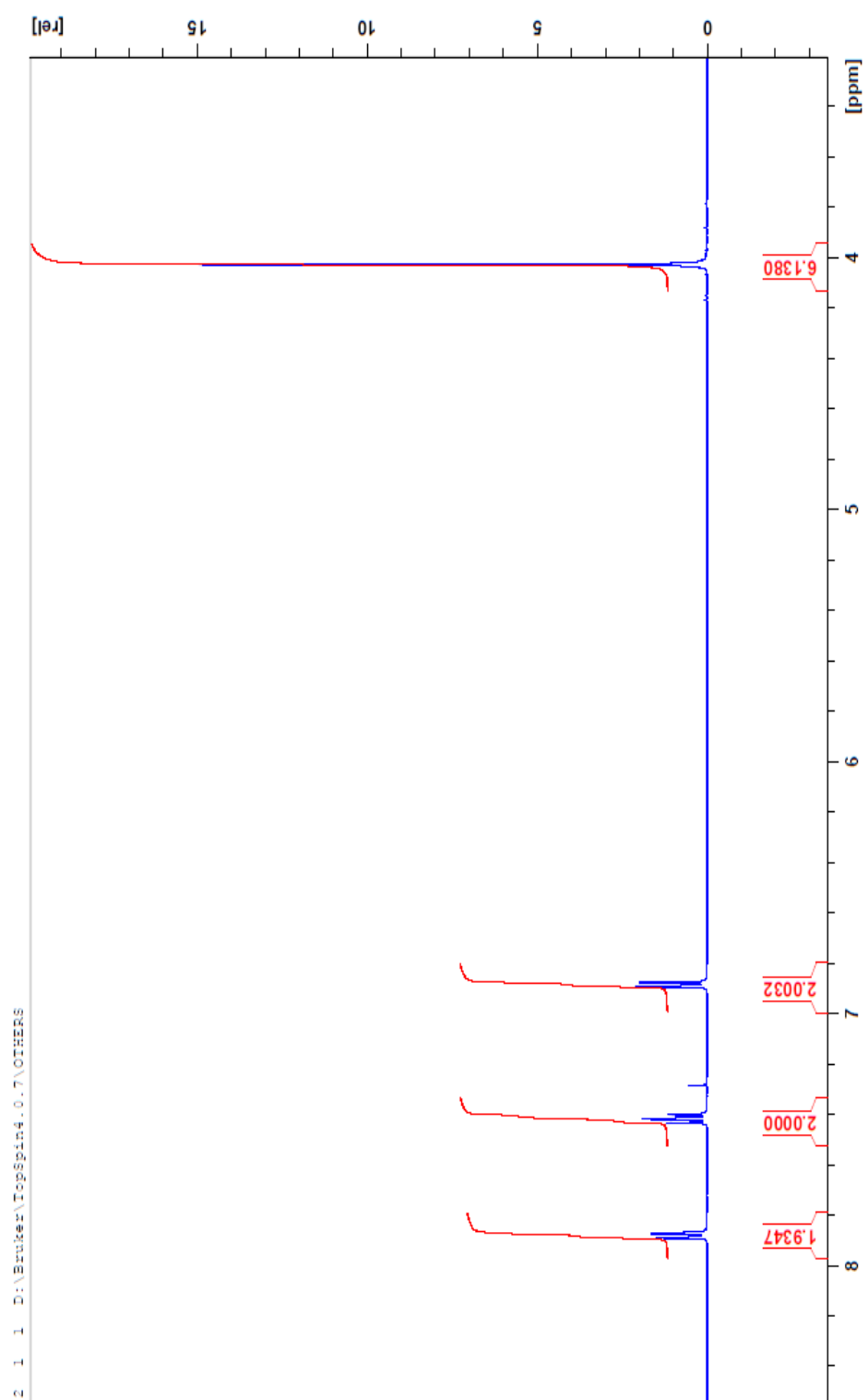
Decetaxel (78) Hata verdi

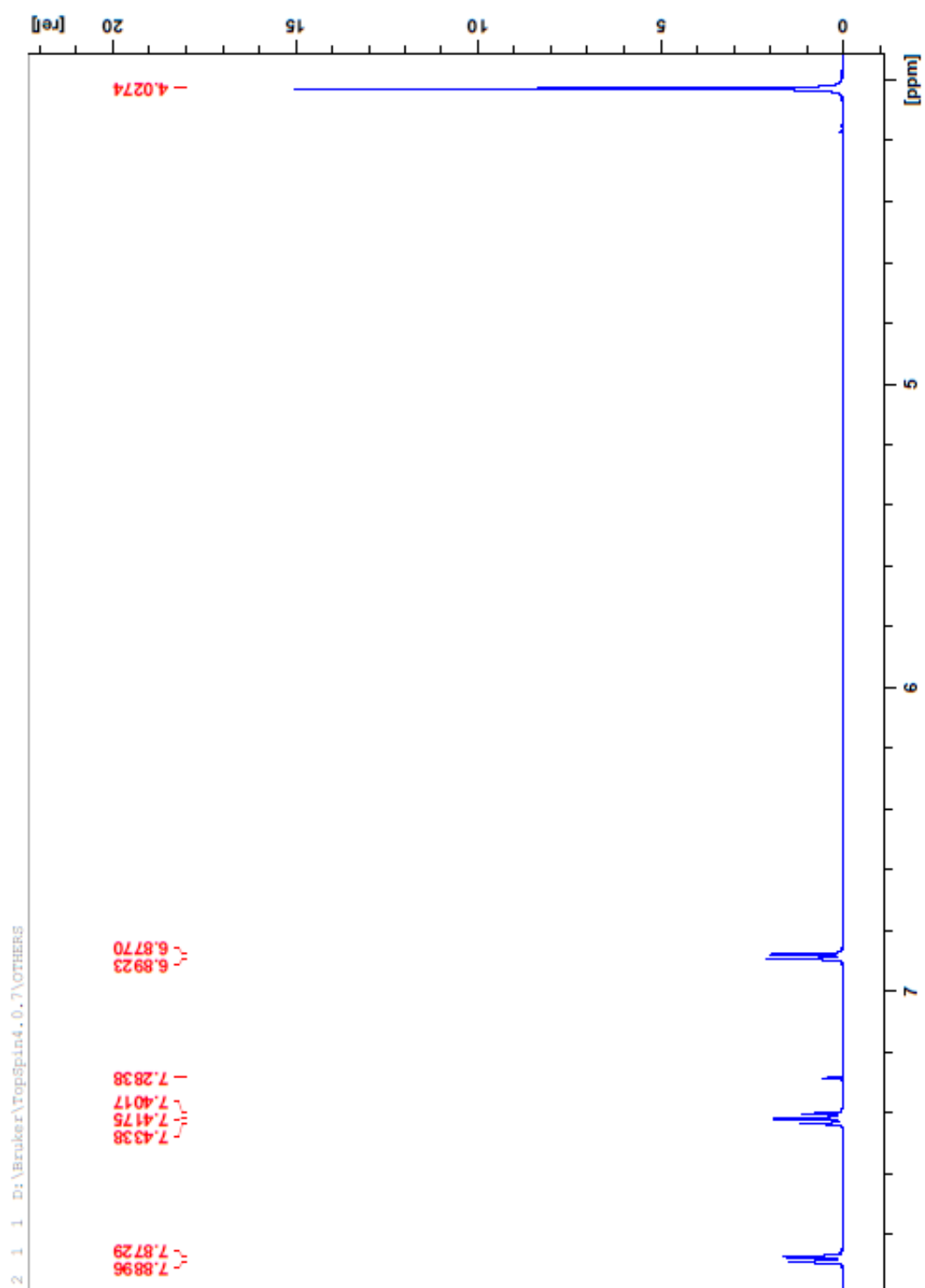
Neratinib (79)

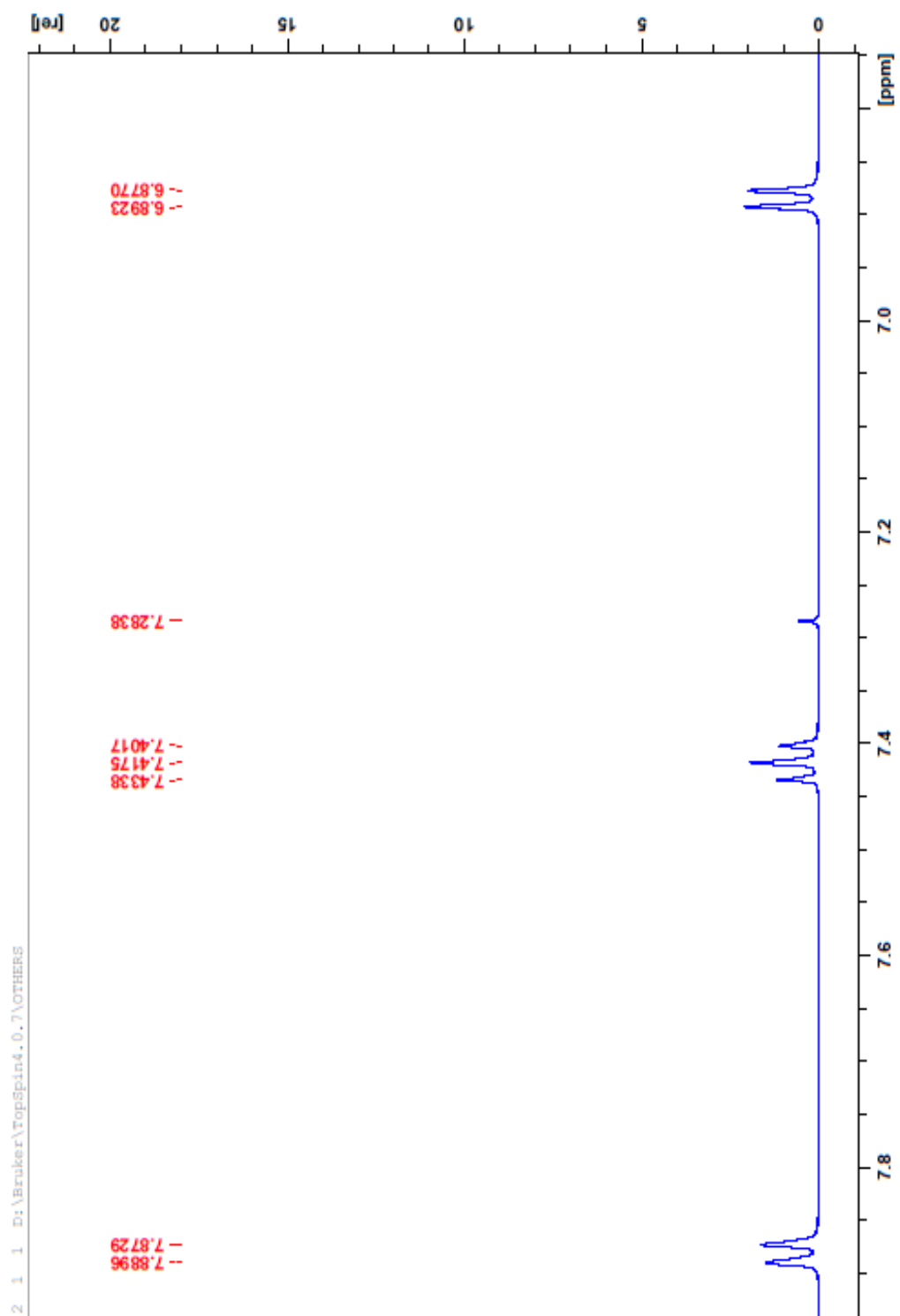


EK 6 48 Numaralı Molekül 1,5-dimetoksinaftalinin ¹H NMR Spektrumu

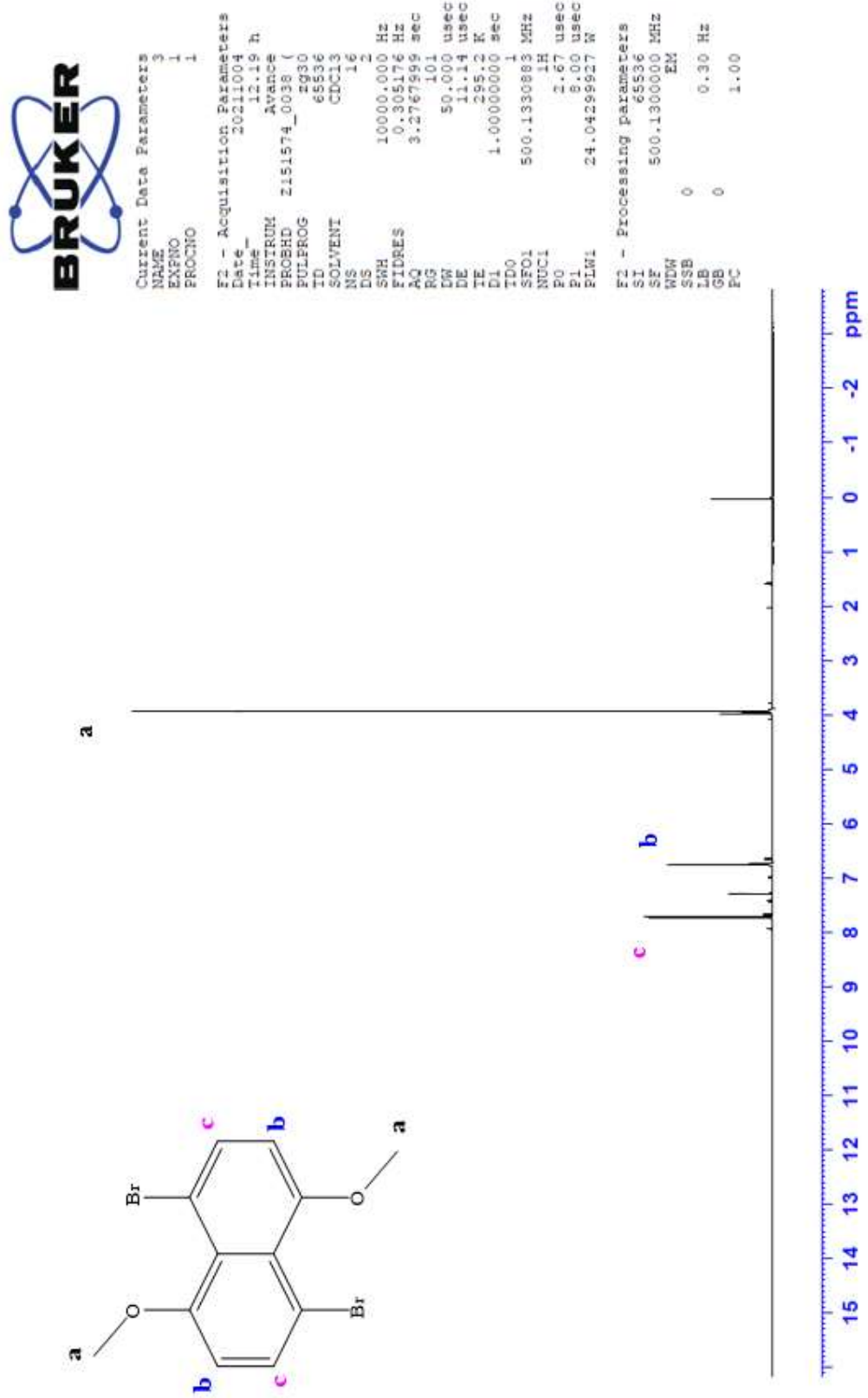


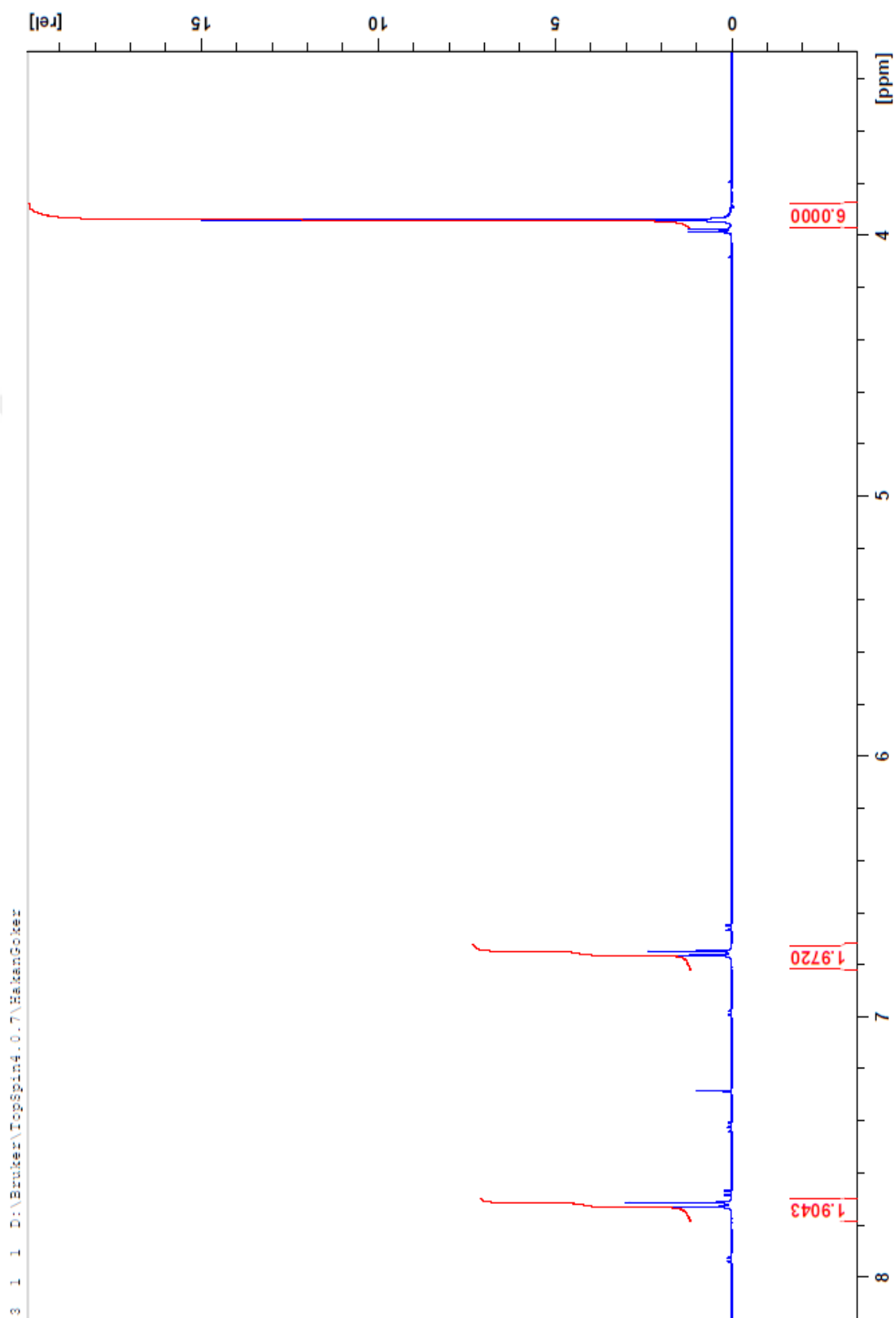


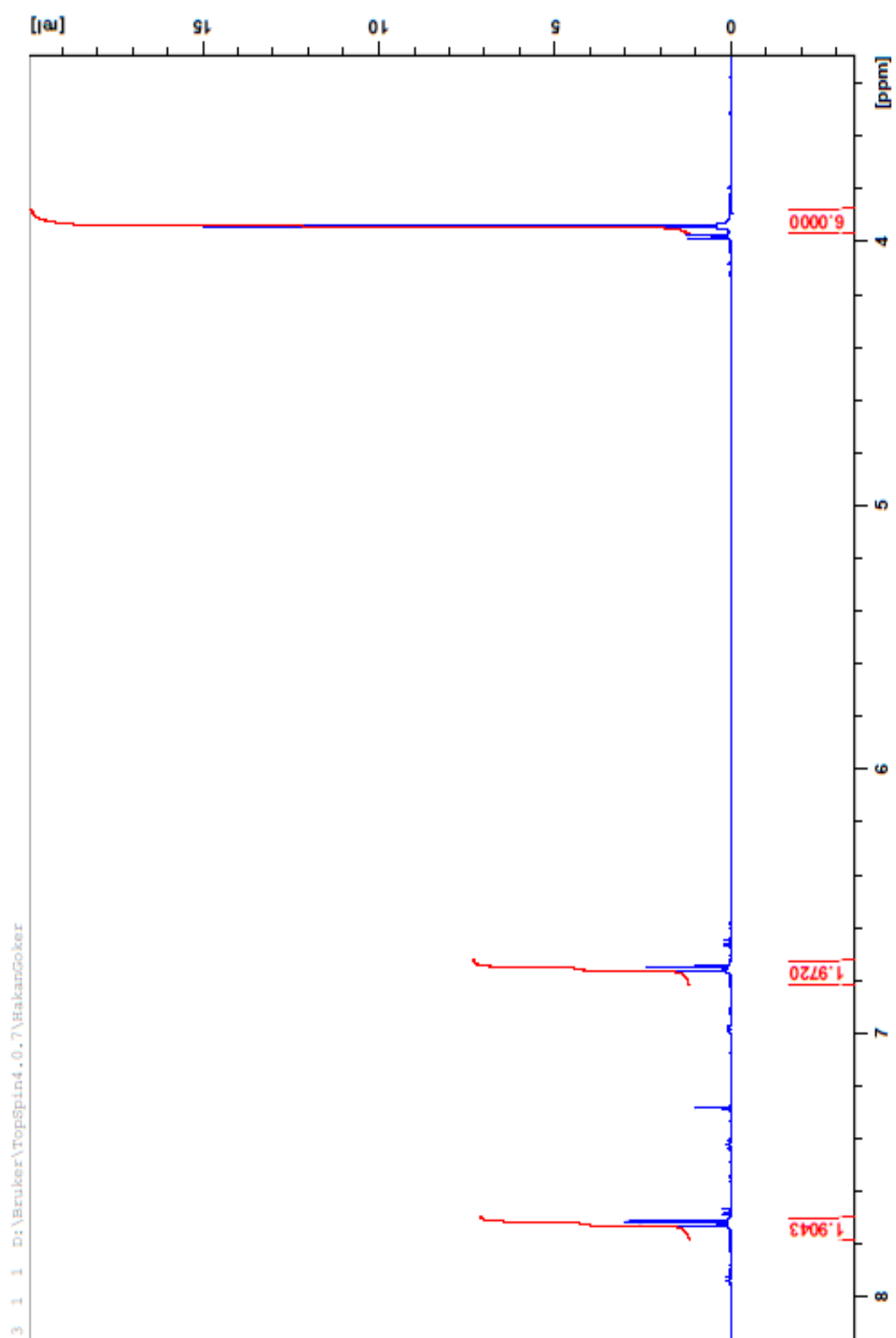


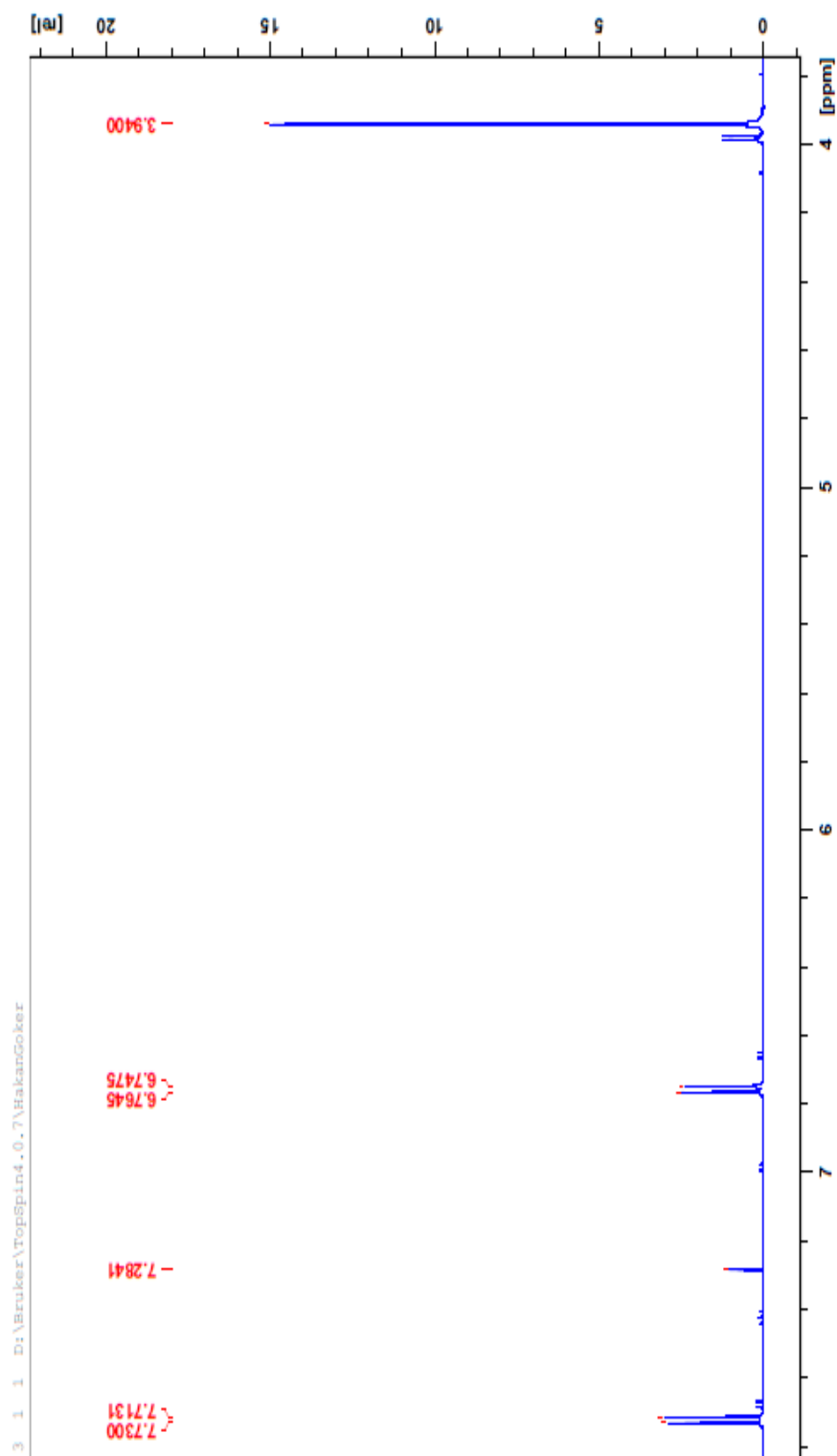


EK 7 49 Numaralı Molekül 1,5-dibromo-4,8-dimetoksinaftalinin ^1H NMR Spektrumu

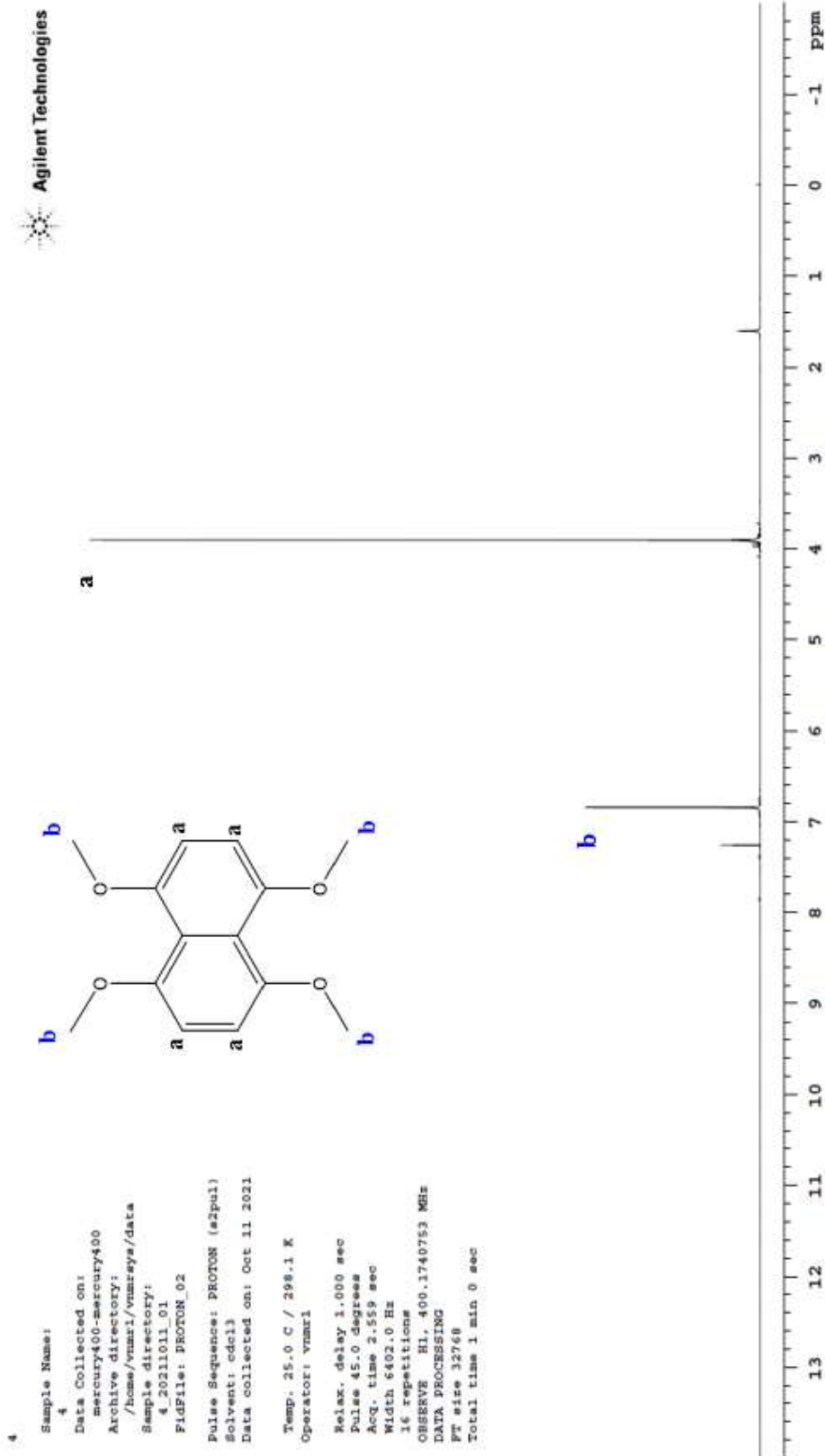


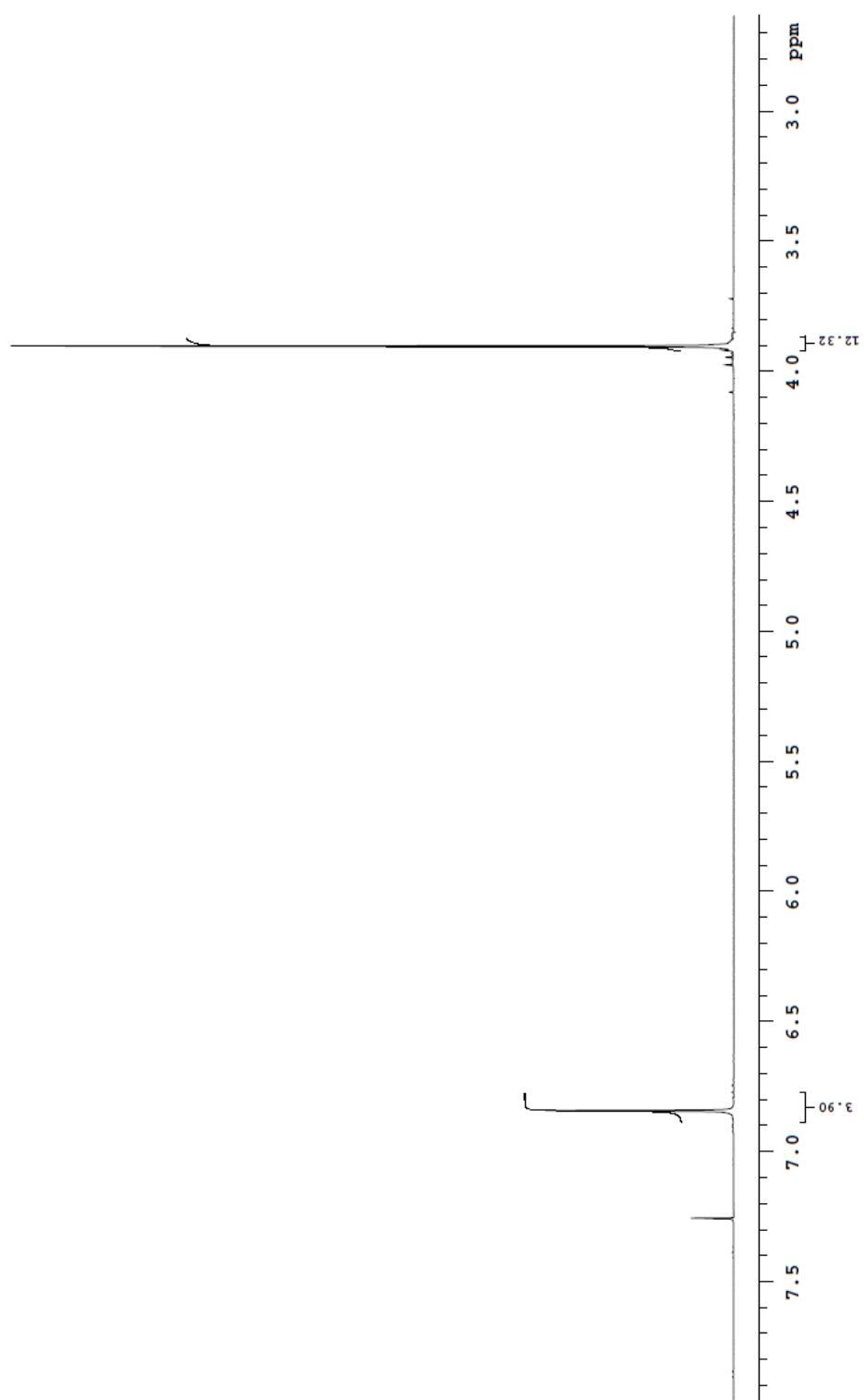


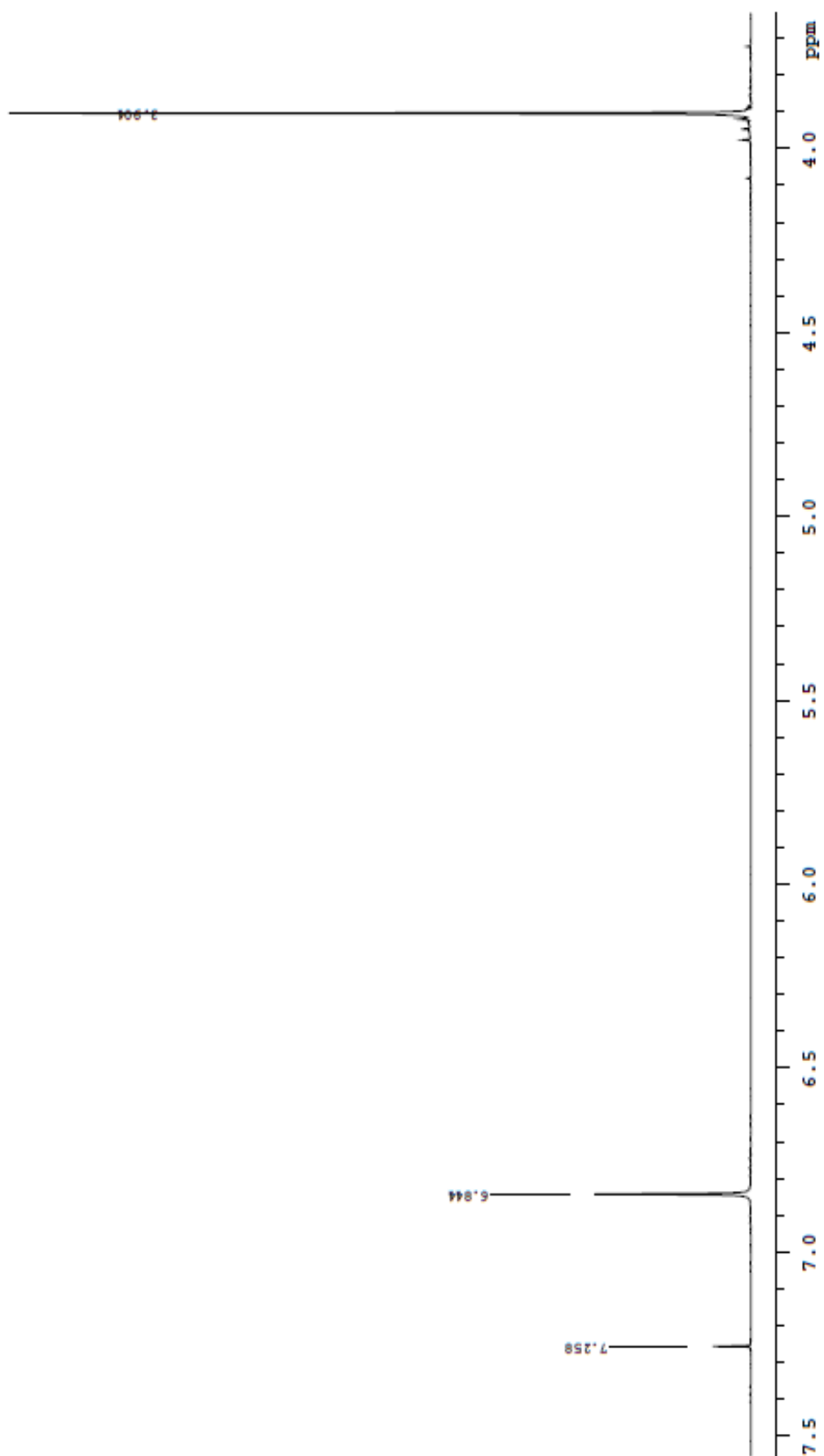




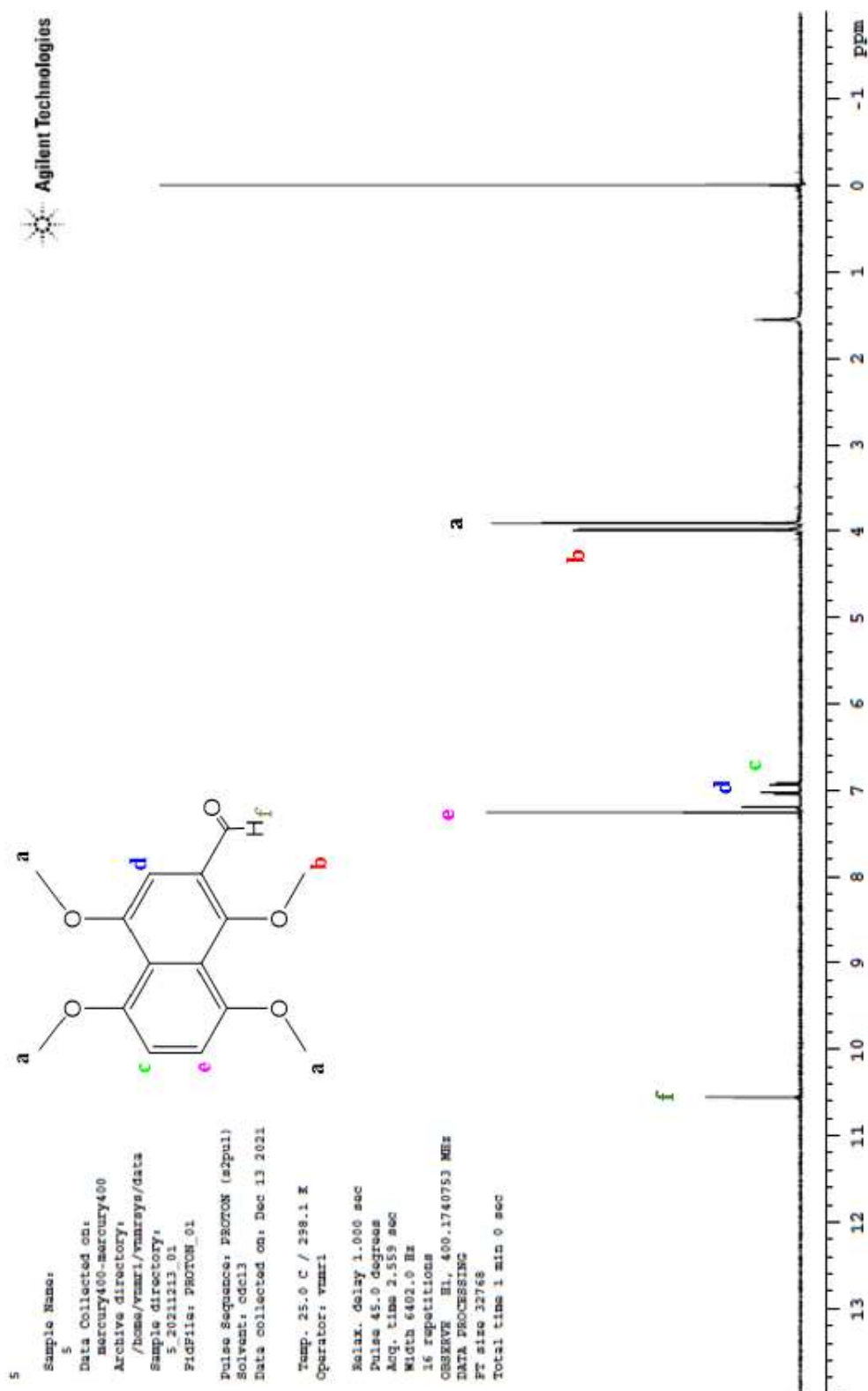
EK 8 50 Numaralı Molekül 1,4,5,8-tetrametoksinaftalinin ¹H NMR Spektrumu

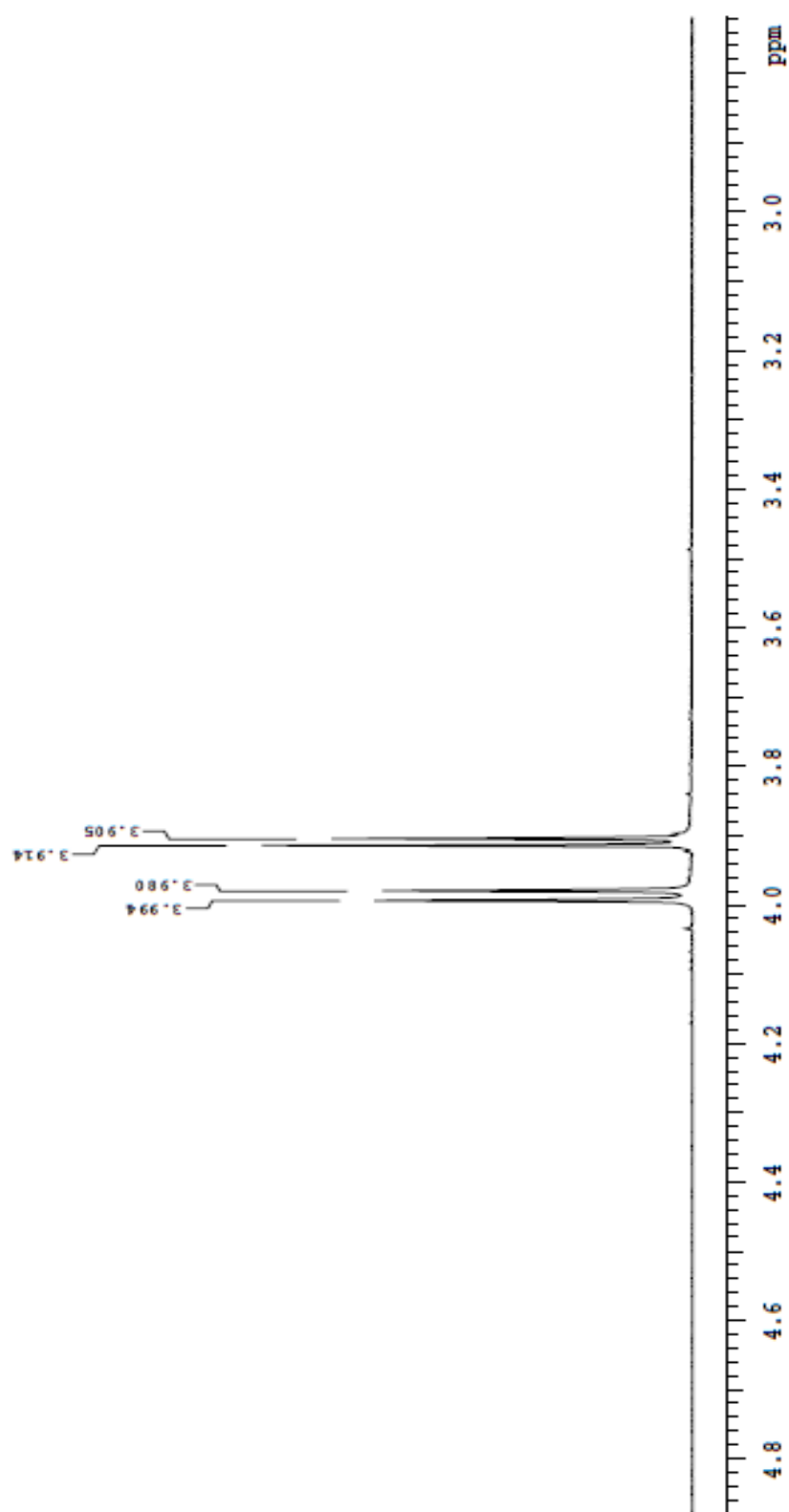


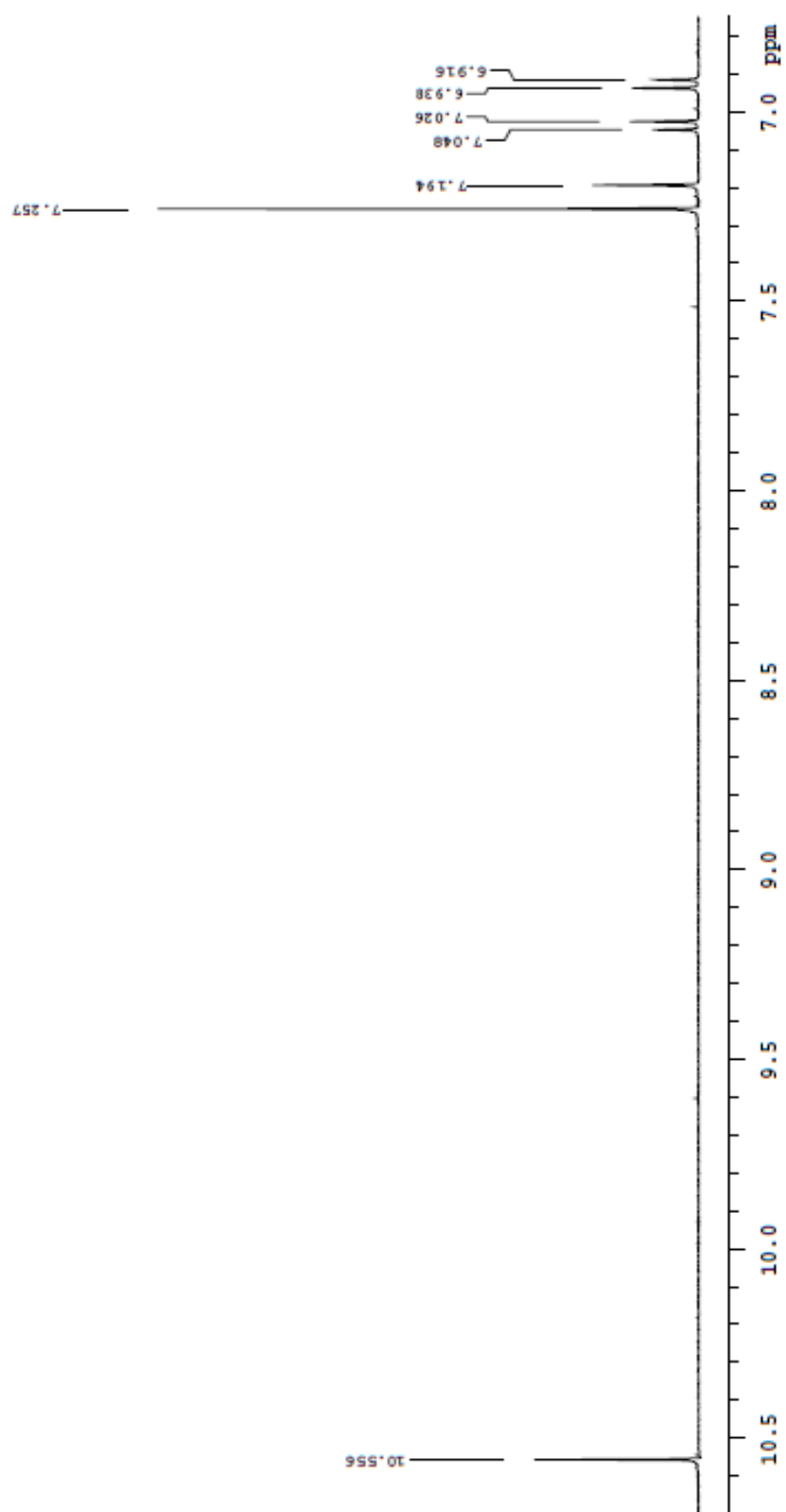




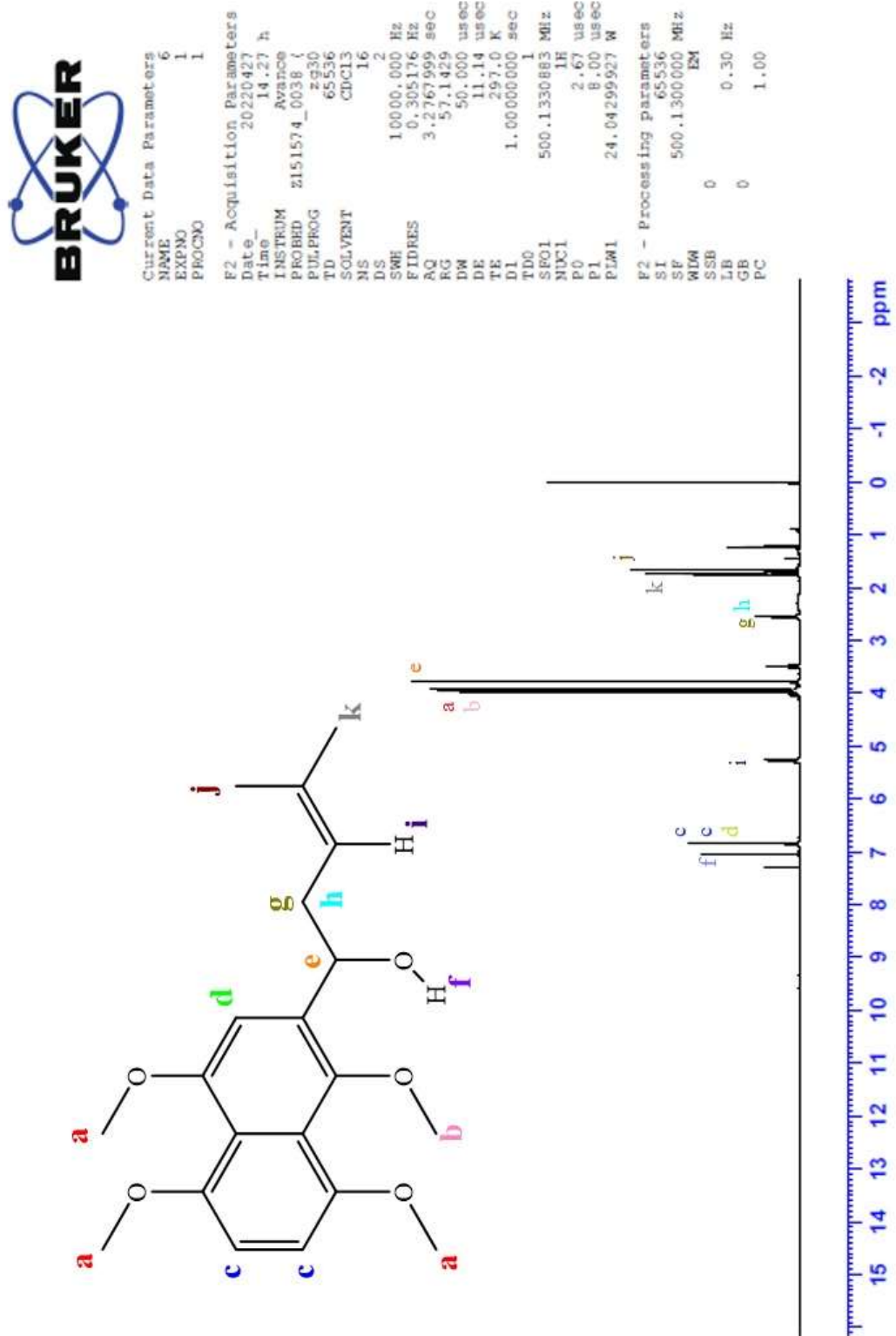
EK 9 38 Numaralı Molekül 1,4,5,8-Tetrametoksi-2-naftaldehitin ^1H NMR Spektrumu

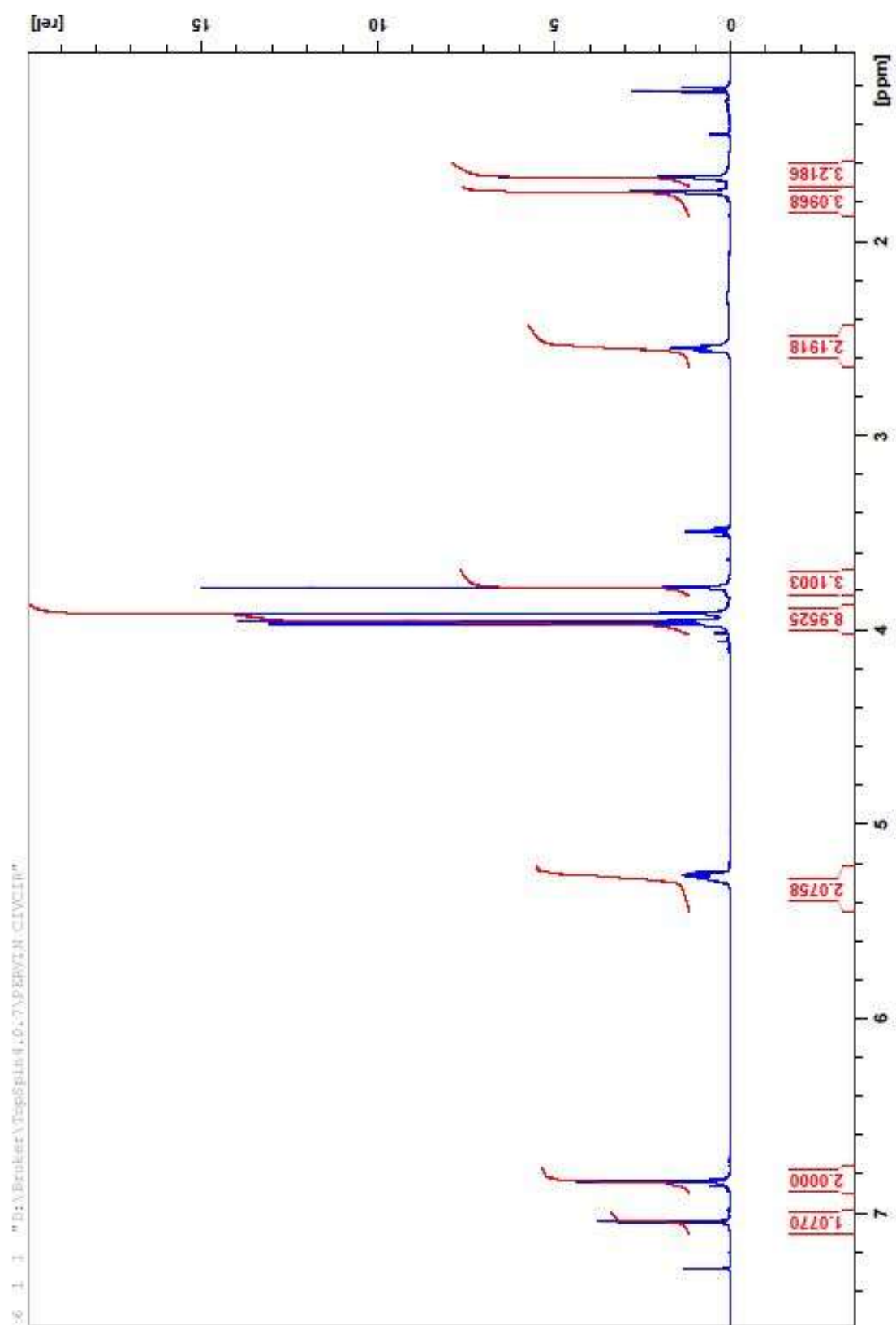


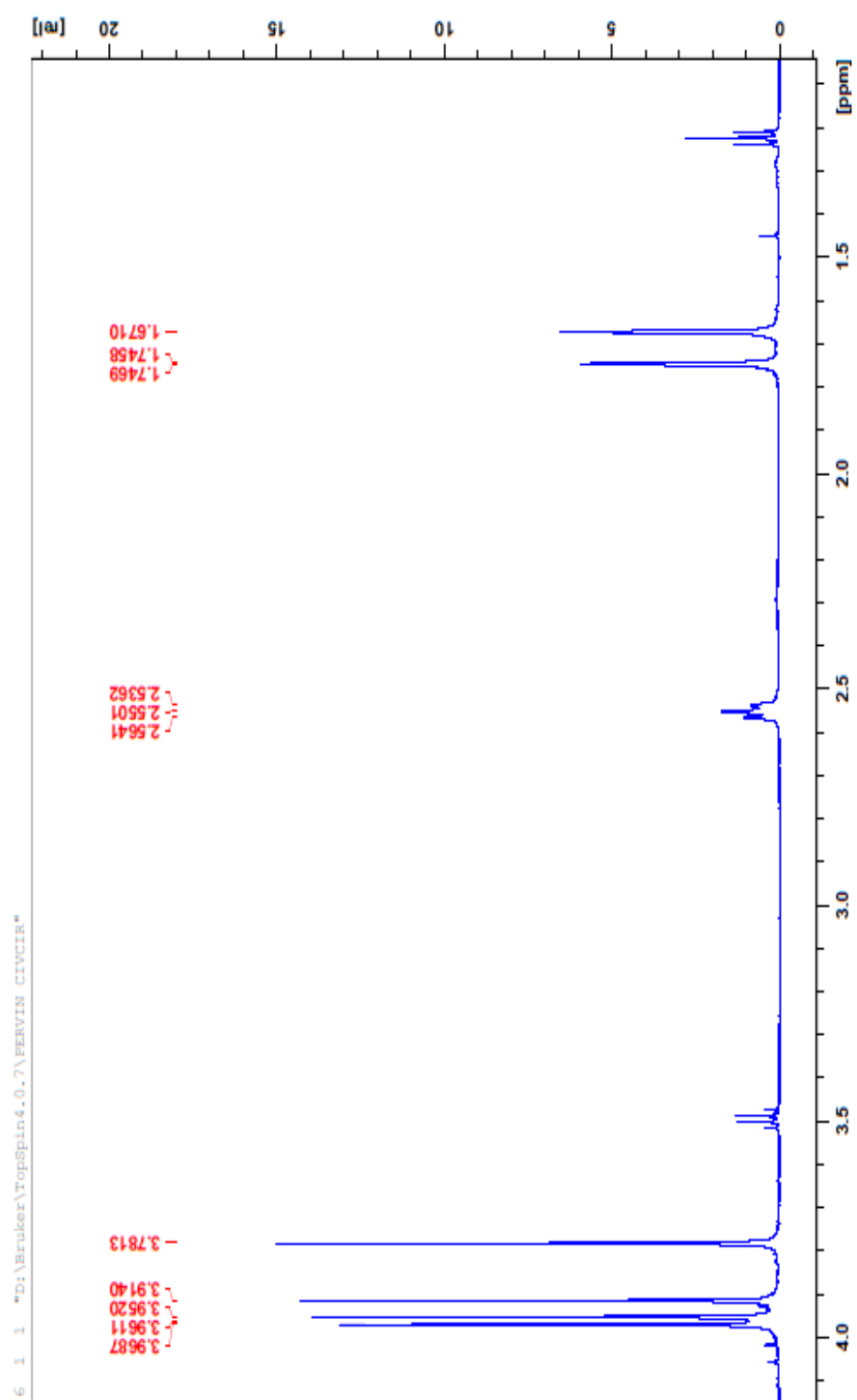


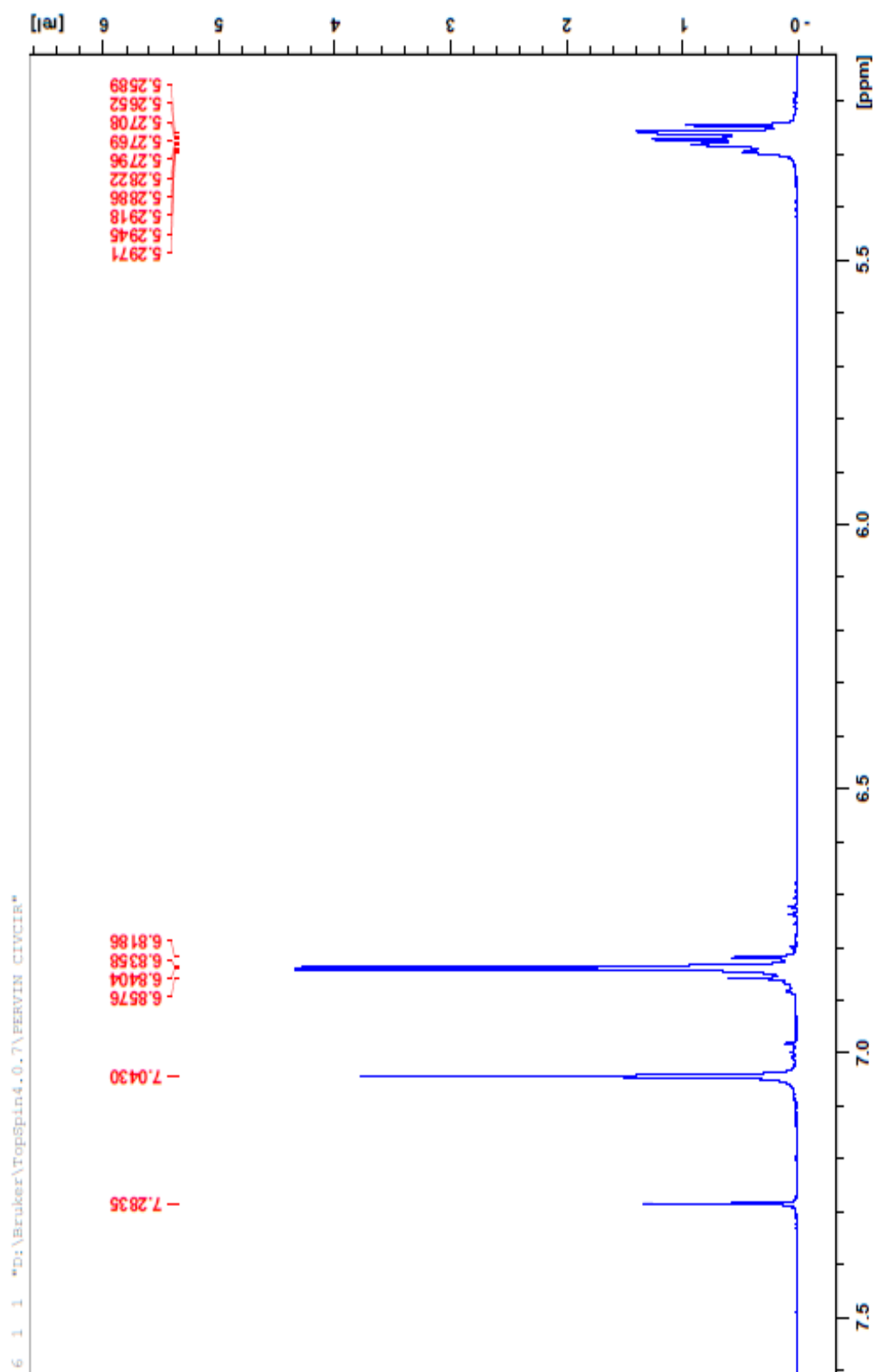


EK 10 51 Numaralı Molekül 4-metil-1-(1,4,5,8-tetrametoksi-2-naftalin-2-il) pent-3-en-1-olün ¹H NMR Spektrumu

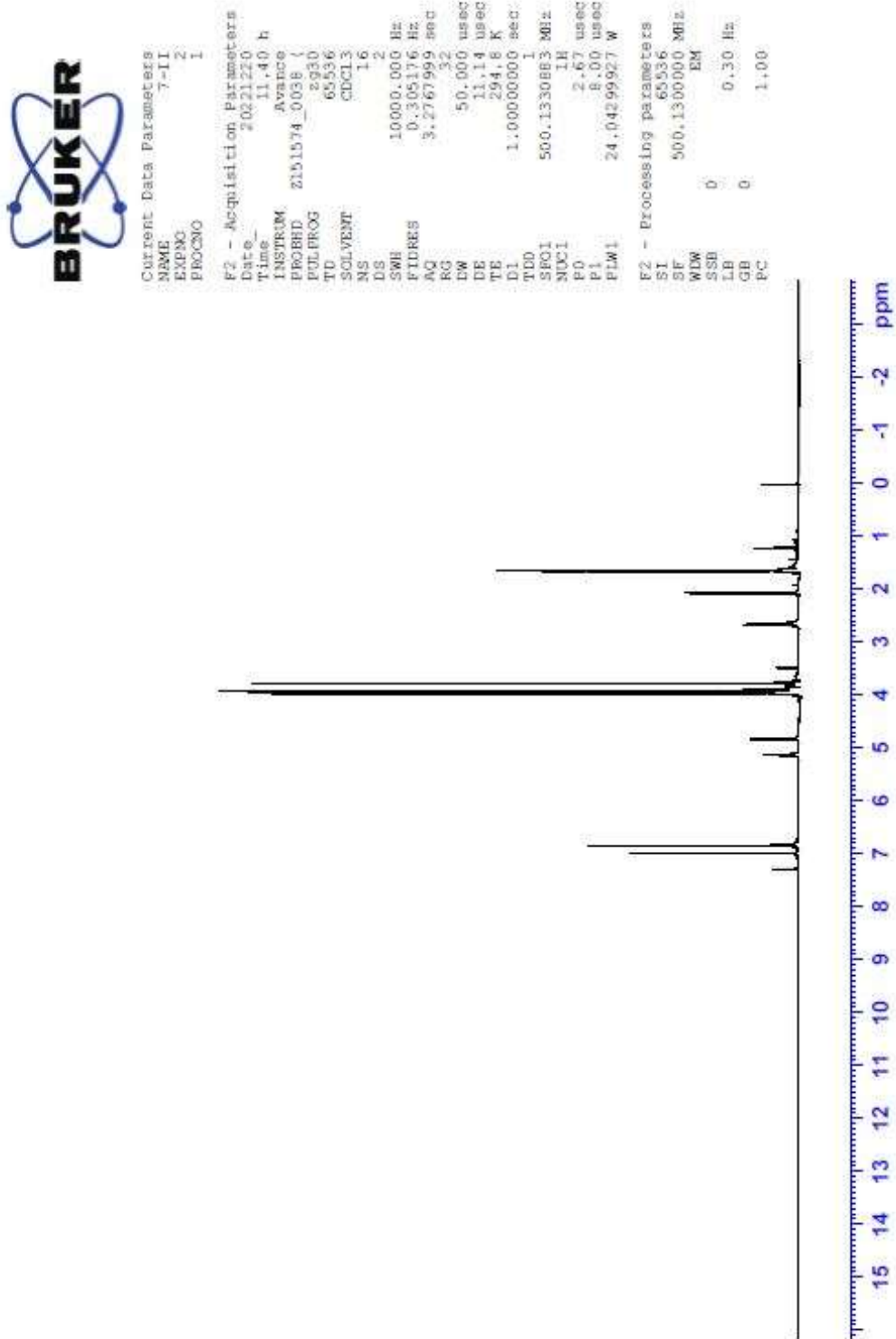


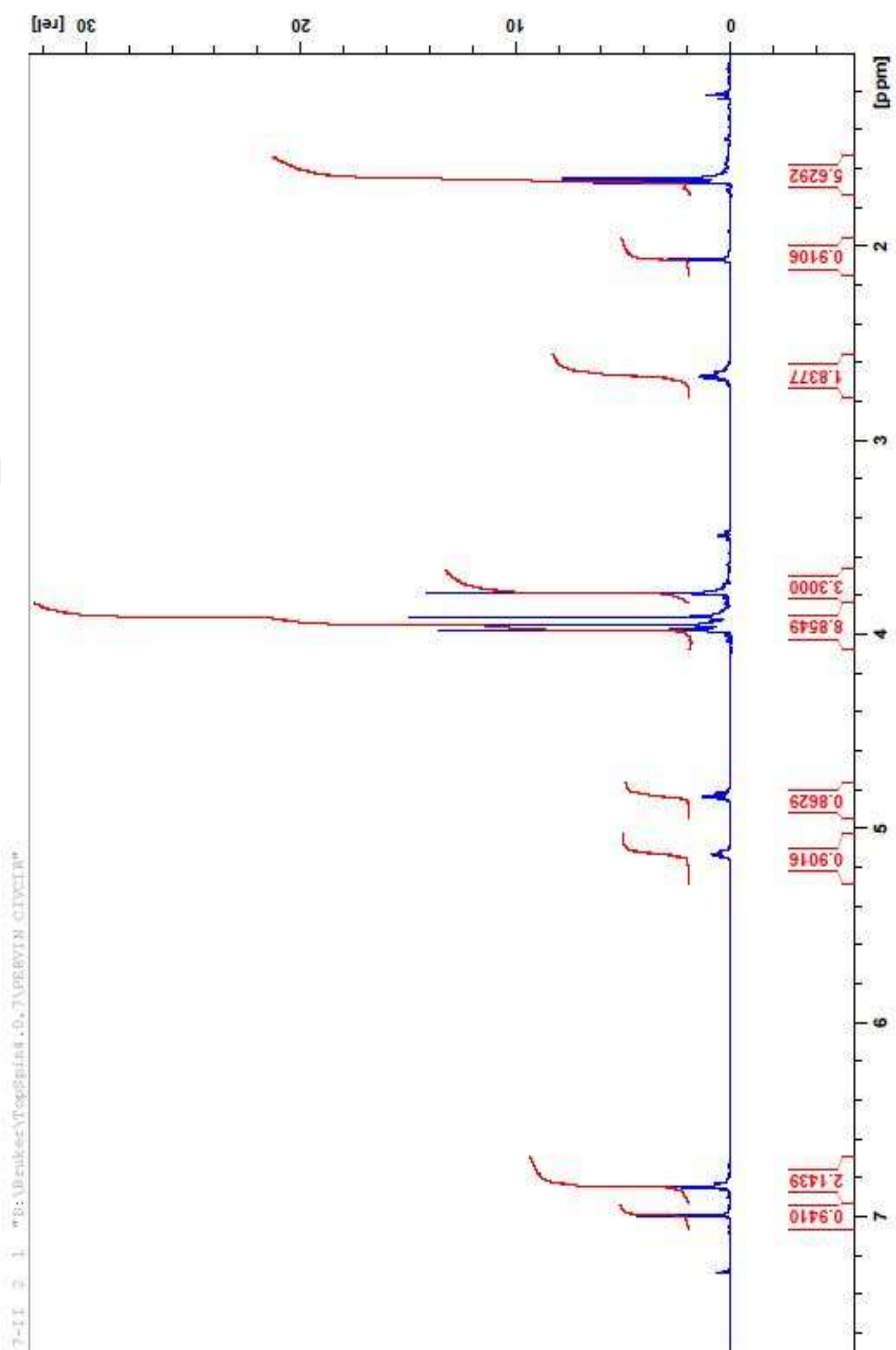


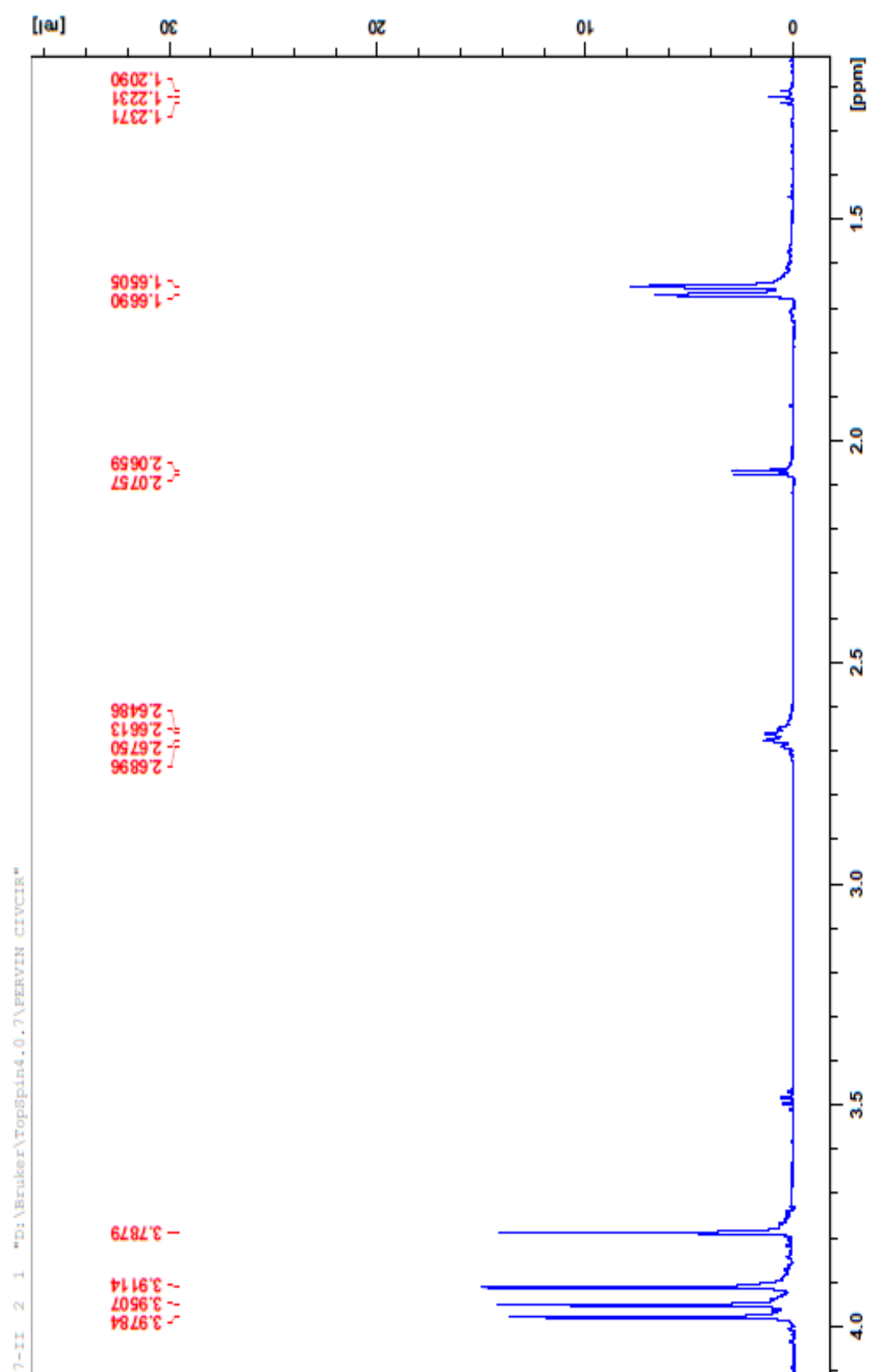


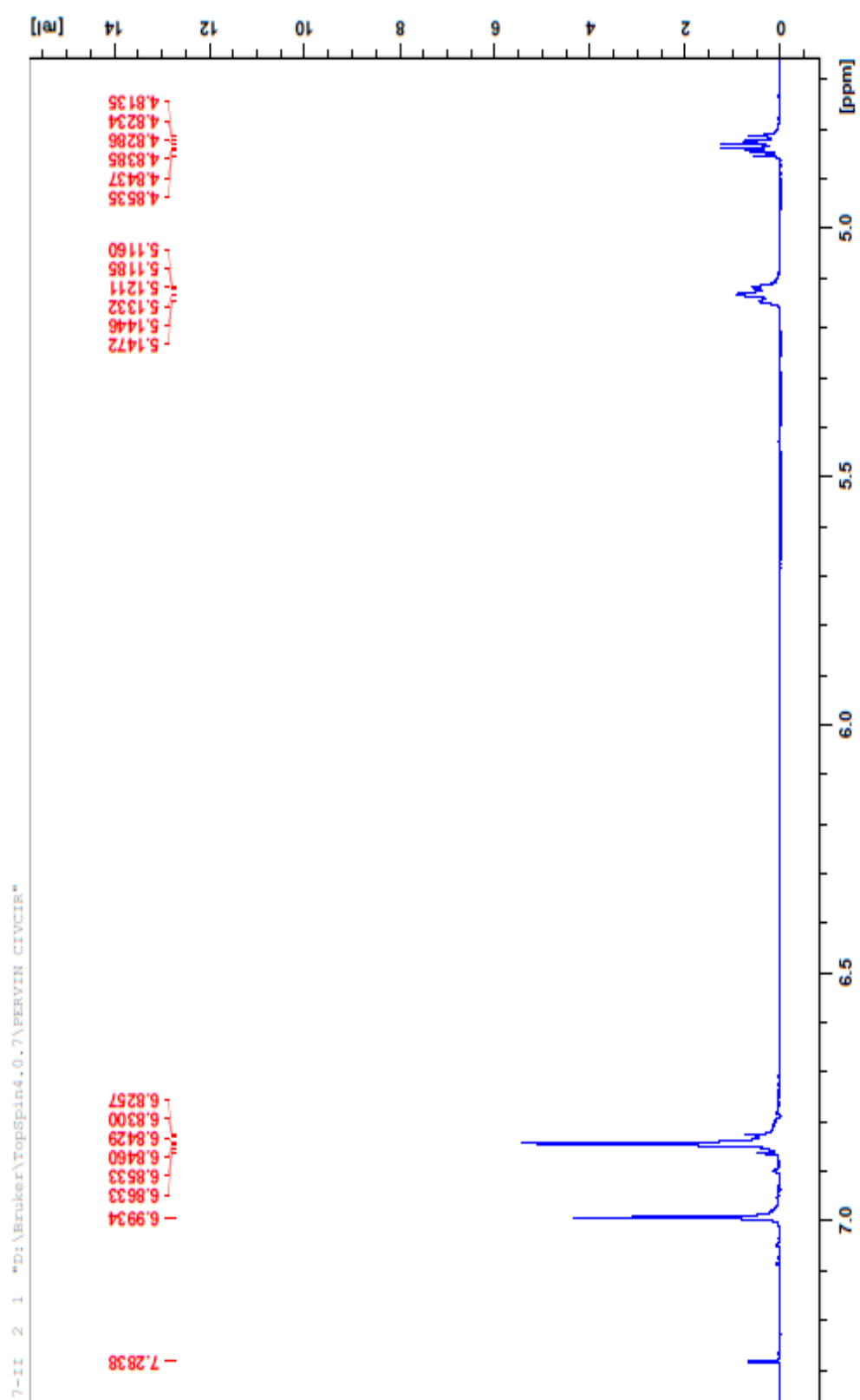


EK 11 52 Numaralı Molekül 4-metil-1-(1,4,5,8-tetrameoksinaftalin-2-il) pent-3-en-1-tiyolün ¹H NMR Spektrumu









EK 12 53 Numaralı Molekül benzil (4-metil-1-(1,4,5,8-tetrametoksinaftalin-2-il)pent-3-en-1-il) sülfanın ¹H NMR Spektrumu

