

# مطالعه نظری برهمکنش بین بازدارنده های گلیکوزیل کومارین و آنزیم کربونیک آنهیدراز II و XII

مینا غیائی<sup>+</sup>، مینا سیفی

دانشکده فیزیک و شیمی، گروه شیمی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

**چکیده:** کربونیک آنهیدراز (CA) آنزیم دارای فلز روی می باشد که واکنش برگشت پذیر تبدیل گاز کربن دی اکسید به بی کربنات را کاتالیز می کند. این آنزیم برای سامانه های زیستی و از جمله بدن انسان بسیار مهم است. در این پژوهش به بررسی مکانیسم عملکرد بازدارنده کومارین و برخی از مشتق های قندی کومارین با آنزیم کربونیک آنهیدراز II و XII پرداخته شد. پایدارترین کنفورمر این بازدارنده ها برای محاسبه انتخاب شد و برهم کنش آن ها با این دو آنزیم بررسی شد. همه محاسبه ها با استفاده از نظریه تابعی چگالی DFT در سطح B3LYP با سری پایه \*6-31G و با استفاده از تابع مینسوتا M06 با سری پایه \*6-31+G انجام شده است. در ادامه کلیه متغیرهای ترمودینامیکی واکنش مانند  $\Delta G_{rxn}^\circ$  و  $\Delta H_{rxn}^\circ$ ،  $\Delta S_{rxn}^\circ$  محاسبه شدند. نتیجه ها نشان می دهد که واکنش بین این خانواده از بازدارنده ها و آنزیم کربونیک آنهیدراز از نوع مستقیم و اتصالی نمی باشد بلکه آنزیم با اثر فضایی، غیر فعال می شود.

**واژه های کلیدی:** کربونیک آنهیدراز؛ کومارین؛ مشتق های قندی کومارین؛ متغیرهای ترمودینامیکی؛ نظریه تابعی چگالی.

**KEYWORDS:** Carbonic Anhydrase; Sugar derivatives coumarin; Thermodynamic variables; Density Functional Theory (DFT).

## مقدمه

و خانواده سیگما (C)، اولین خانواده ژنتیکی، آلفا کربونیک آنهیدراز ها ( $\alpha$ -CA) هستند که در مهره داران، تک سلولی ها، جلبک ها و در سیتوپلاسم گیاهان سبز و در برخی از باکتری ها یافت شده اند [۱۲-۲]. همه گونه های کربونیک آنهیدرازها متالوآنزیم یا آنزیم های دارای فلز هستند. آلفا کربونیک آنهیدرازها ( $\alpha$ -CA) و بتا کربونیک آنهیدرازها ( $\beta$ -CA) و دلتا کربونیک آنهیدرازها ( $\delta$ -CA) از یون Zn(II) در جایگاه فعال خود استفاده می کنند [۱۵-۱۳]. جایگاه فعال<sup>۱</sup> همه ی این آنزیم ها یک ساختار هندسی همانند را نشان می دهد. سه باقی مانده ی هیستیدین<sup>۲</sup> و یک مولکول آب/یون

آنزیم ها، به عنوان کاتالیست سامانه های زیستی، ابزارهای مولکولی چشمگیری می باشند که الگوی واکنش های شیمیایی را تعیین می کنند. آنزیم ها باعث تسریع واکنش ها به مقدار یک میلیون برابر و یا حتی بیش تر می شوند. یک خانواده از آنزیم های زیستی خانواده کربونیک آنهیدراز (CA) می باشد. CA آب پوشی برگشت پذیر کربن دی اکسید به بی کربنات را کاتالیز می کند [۱]. پنج دسته مجزای ژنتیکی آنزیم کربونیک آنهیدراز در اندامها در سراسر درخت فیلوژنتیکی وجود دارد. آلفا ( $\alpha$ )، بتا ( $\beta$ )، گاما ( $\gamma$ )، دلتا ( $\delta$ )

\* عهده دار مکاتبات

+E-mail: ghiasi@alzahra.ac.ir

(۱) Active site

(۲) Histidine

بازدارندگی این دسته نوین از بازدارنده‌ها (مشتق‌های قندی کومارین) با شکل فعال آنزیم کربونیک آنهیدراز II و XII پرداخته می‌شود. در انجام این کار پژوهشی از روش‌های محاسبه مکانیک کوانتومی بهره گرفته شد.

### بخش نظری

در این کار پژوهشی تمامی ساختارها با نرم افزار گوس و یو ۲۰۰۵ میلادی رسم شده و کلیه محاسبه‌ها با استفاده از نرم افزار گوسین ۲۰۰۹ میلادی [۳۲] انجام شده است. روش نظریه تابعی چگالی بهترین و دلخواه‌ترین روش مکانیک کوانتومی برای این خانواده از ترکیب‌های مورد بررسی است [۳۳-۳۵]، مکانیسم برهمکنش آنزیم کربونیک آنهیدراز با بازدارنده‌ی جدید معرفی شده و مشتق‌های آن با محاسبه‌های نظریه تابعی چگالی با سری پایه  $6-31G^*$  در سطح  $B3LYP$  و سری پایه  $6-31+G^*$  در سطح  $M06$  در فاز گاز بررسی شده است. پس از بهینه شدن هر ساختار محاسبه فرکانس به منظور تأیید ساختار حالت پایه و محاسبه ویژگی‌های ترموشیمیایی انجام پذیرفت.

### محاسبه تابع‌های ترمودینامیکی

همه تابع‌های ترمودینامیکی گزارش شده در این کار با استفاده از محاسبه فرکانس در دمای ۲۹۸K و فشار ۱atm مطابق معادله‌های زیر استخراج شده اند. آنتالپی گونه  $X$   $H(X)$  در دمای  $T$  از معادله‌ی (۱) به دست می‌آید: [۳۸-۳۶]

$$H(X) = E_0 + ZPE + E_{trans} + E_{rot} + E_{vib} + RT \quad (1)$$

که  $E_0$  انرژی الکترونی نهایی محاسبه شده،  $ZPE$  مقدار انرژی نقطه صفر، و  $E_{trans}$ ،  $E_{rot}$ ،  $E_{vib}$  نشان‌دهنده‌ی سهم‌های انتقالی، چرخشی و ارتعاشی در آنتالپی می‌باشد و  $RT$  مقدار کار فشار - حجمی می‌باشد که برای تبدیل انرژی به آنتالپی، به آن افزوده می‌شود.

تغییر آنتالپی استاندارد واکنش ( $\Delta H^\circ_{rxn}$ ) براساس معادله‌ی (۲) محاسبه می‌شود:

$$\Delta H^\circ_r = [H^\circ_{product}] - [H^\circ_{reactant}] \quad (2)$$

به همین ترتیب، تغییر آنتروپی استاندارد واکنش براساس معادله‌ی (۳) محاسبه می‌شود:

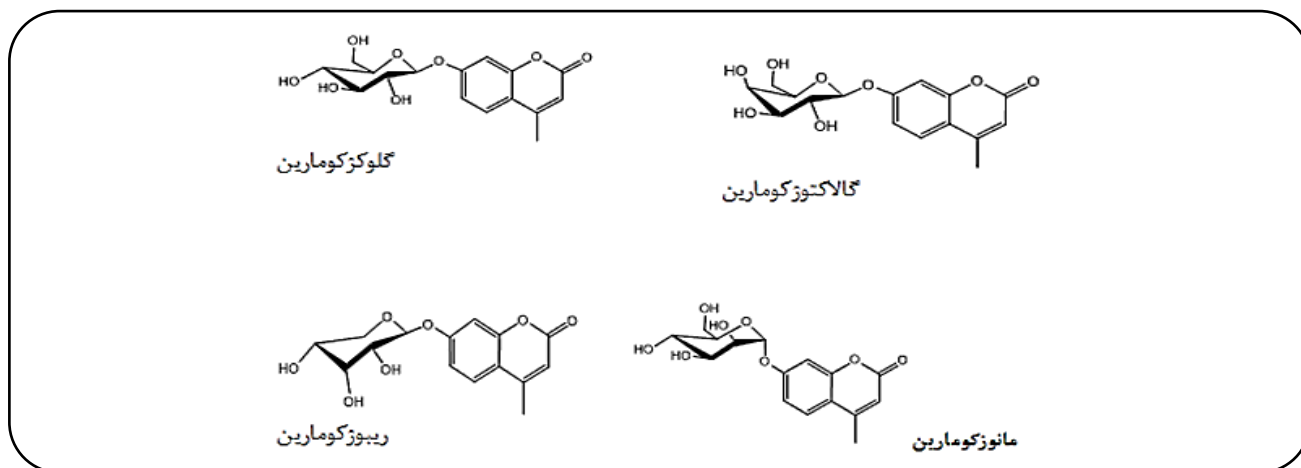
$$\Delta S^\circ_r = [S^\circ_{product}] - [S^\circ_{reactant}] \quad (3)$$

هیدروکسید به صورت تتراهدرال به یون روی کوئوردینه شده‌اند [۱۶]. بیش‌ترین مطالعه‌ها روی آنزیم CAII که CAC هم نامیده می‌شود، انجام شده است [۱۹-۱۷]. علائم کمبود CAII شامل پوکی استخوان، دیابت و اختلال‌های مغزی می‌باشد [۱۹]. پیشرفت زیادی در پزشکی با مهار یا فعال کردن CA شده است [۱۵]. کربنیک آنهیدرازهای انسانی IX و XII دو پروتئین مرتبط با تومور هستند و در بسیاری از تومورها و فرآیندهای مرتبط با سرطان وجود دارند. [۱۶]. تنها با تومور مرتبط است اما CAXII در برخی انواع تومور ظهور پیدا می‌کند و در بسیاری از بافت‌های سالم هم دیده می‌شود. به خاطر ارتباط آن‌ها با شکل‌گیری و پیشرفت تومور، هر دوی این آنزیم‌ها به هدف‌های جالبی برای طراحی دارو و درمان جدید سرطان تبدیل شده‌اند [۱۶]. کربونیک آنهیدراز به وسیله تعداد گسترده‌ای از بازدارنده‌های متفاوت و اغلب آنیون‌های آن‌ها بازداشته می‌شود [۲۰]. برای نمونه سولفونامیدها، سولفامیدها، فل‌ها و پلی‌آمین‌ها از طریق اتصال به جایگاه فعال آنزیم یا جایگزینی مولکول آب و پرکردن حفره بخش فعال، آنزیم را غیرفعال می‌کنند اما این بازدارنده‌ها به صورت انتخابی عمل نمی‌کنند [۱۳، ۱۰، ۳، ۲]. این نوع بازدارنده‌ها به عنوان مهارکننده‌های قوی CAI و II عمل می‌کنند [۲۸-۳۳]. کومارین‌ها یک دسته نوین از مهارکننده‌های آنزیم کربنیک آنهیدراز را تشکیل می‌دهند. یک مولکول آب/یون هیدروکسید به عنوان یک نوکلئوفیل در تبدیل کربن دی اکسید به بیکربنات و پروتون عمل می‌کند. بازدارنده‌های CA به عنوان داروهای ضدگلوکوم، ضدتشنج، ضدچاقی و ضدتومور استفاده می‌شوند با این حال انتخاب‌پذیری نبودن این مهارکننده‌ها یک مشکل اصلی است و منجر به جست‌وجوهای نوین شده است. این کلاس نوین از بازدارنده‌های CA به شیوه‌ای بی‌سابقه عمل می‌کنند یعنی مانند سولفونامیدها/سولفامات/سولفامید به یون  $Zn^{2+}$  متصل نمی‌شوند. کومارین‌ها به عنوان مهارکننده‌های مؤثر همه‌ی ایزوآنزیم‌های CA، CAI-XV شناخته شده اند.

به تازگی، برخی از مشتق‌های قندی کومارین‌ها با فعالیت بازدارندگی قوی، مربوط به ایزوفرم‌های CAIX و CAXII، که از رشد تومورهای اولیه و متاستاز جلوگیری می‌کنند [۳۱، ۳۰]. شکل ۱ این مشتق‌ها را نشان می‌دهد.

تعداد زیادی از مشتق‌های کومارین رفتار انتخاب‌پذیری دارند و شایان ذکر است که بازدارنده‌هایی با انتخاب‌پذیری بالا برای hCAIX/XII کشف شد. از این میان مشتق‌های قندی کومارین رفتار بازدارندگی قوی در بازه نانومولار نشان داده و اثرات ضدتومور و ضدمتاستاز در سرطان پستان از آن دیده شده است [۱۶]. در این مطالعه به مطالعه نقش و مکانیسم

(1) Zero point energy



شکل ۱- برخی مشتق‌های قندی کومارین.

ساختار بهینه‌شده‌ی فرم غیرفعال آنزیم کربنیک آنهیدراز XII در دو سطح محاسباتی یاد شده به همراه ساختار پرتو ایکس ذکر شده در شکل ۴ نشان داده شده است. مقایسه برخی اطلاعات ساختاری این دو مولکول با اطلاعات X-ray در جدول ۱ ارائه شده است. میانگین فاصله‌ی یون روی و اتم نیتروژن در هیستیدین با استفاده از روش B3LYP و M06 بین ۱,۹۷ و ۲,۰۶ انگسترم است که با اطلاعات کریستالوگرافی پرتو ایکس (۲,۰۶ انگسترم) سازگار است. با توجه به نتیجه‌های انحراف استاندارد جدول ۱، دقت هر دو سطح محاسباتی بهم نزدیک است اما داده‌های سطح محاسبه‌ای B3LYP/6-31G\* انحراف استاندارد کم‌تری دارند، بنابراین مقدارهای نزدیک‌تری به تجربه را نشان می‌دهند [۳۹]. پس می‌توان به منظور صرفه جویی در زمان محاسبه‌های سنگین‌تر را با این سطح محاسبه‌ای انجام داد. برخی اطلاعات ساختاری شکل فعال و غیرفعال آنزیم در هر دو سطح محاسبه‌ای در جدول ۲ گزارش شده است.

#### بهینه‌سازی بازدارنده‌ها و ایزومرهای سیس و ترانس آن‌ها

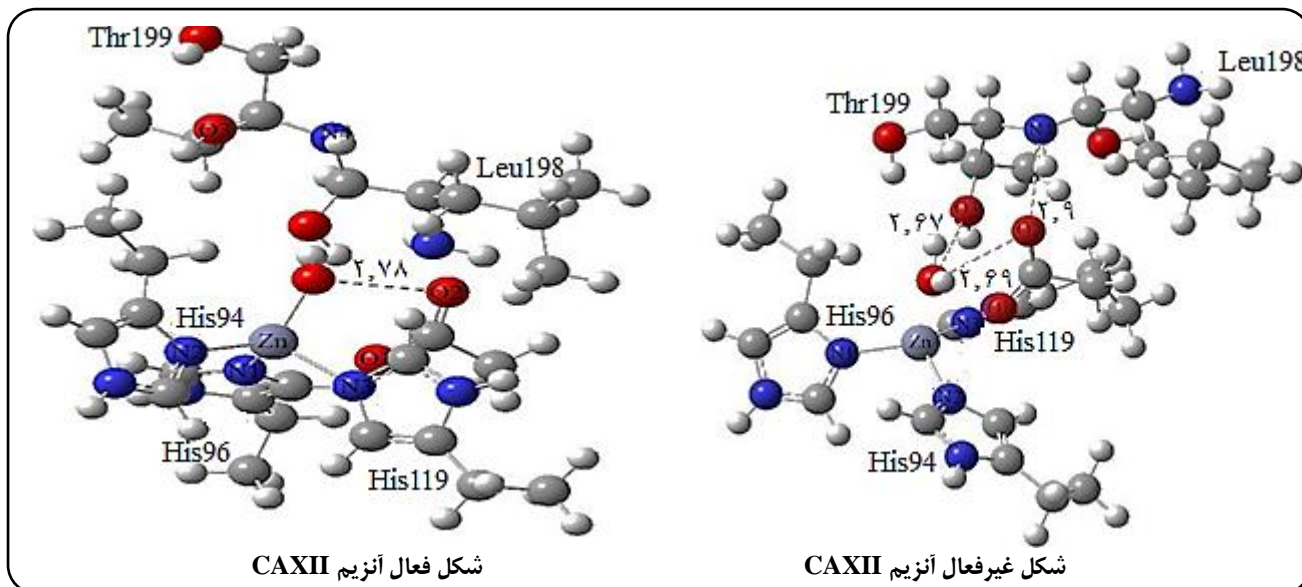
مهم‌ترین زاویه در قندها، زاویه دای هدرال در ناحیه و اطراف کربن آنومریک می‌باشد [۴۱ و ۴۰] شکل ۵ بنابراین برای همه بازدارنده‌ها شامل گالاکتوز، مانوز، گلوکز و ریبوز کومارین به منظور یافتن پایدارترین صورت‌بندی، اسکن دور زوایای دای هدرال ( $\varphi = \text{H}1'-\text{C}1'-\text{O}-\text{C}7$ )، ( $\theta = \text{C}5'-\text{C}6'-\text{O}6'-\text{H}$ ) و ( $\omega = \text{O}5'-\text{C}5'-\text{C}6'-\text{O}6'$ ) از ۳۶۰ تا ۳۶۰ با طول قدم‌های ۵ درجه انجام شد. با فرض به این که تنها ساختارهایی با اختلاف انرژی ۱۰ kcal/mol-۵ می‌توانند در دمای اتاق حضور داشته باشند، برای هر چهار بازدارنده یک صورت بندی پایدار یافت شد که برای بررسی برهم‌کنش با فرم فعال آنزیم مورد استفاده قرار گرفتند.

بر اساس رابطه ترمودینامیکی،  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  تغییر انرژی گیبس استاندارد واکنش ( $\Delta G^\circ_{\text{rxn}}$ ) محاسبه می‌شود که معیاری از پیشرفت و خودبه‌خودی بودن واکنش است.

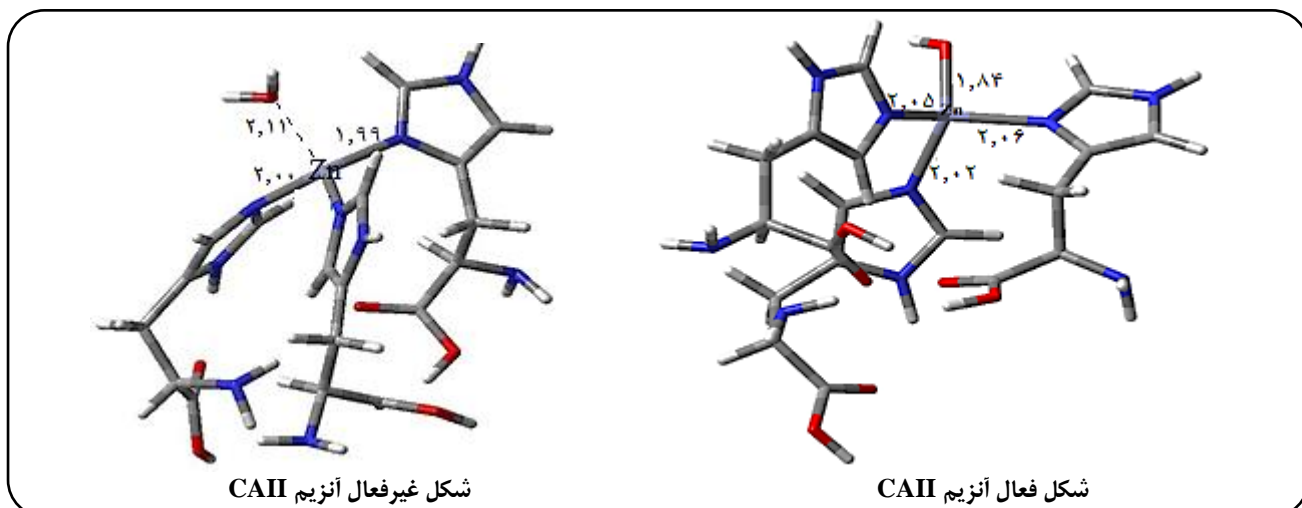
#### نتیجه‌ها و بحث

##### بهینه‌سازی ساختارهای هندسی آنزیم کربونیک آنهیدراز II و XII در دو شکل فعال و غیرفعال

ساختار فرم شکل آنزیم کربونیک آنهیدراز XII  $\text{E}(\text{OH}^-)$  و شکل غیرفعال آنزیم  $\text{E}(\text{OH}_2)$  همراه با اسید آمینه‌های اطراف آن شامل Leu198، Thr199، His96، His119 و His94 در دو سطح محاسباتی B3lyp/6-31G\* و M06/6-31+G\* در فاز گازی بهینه شد در شکل ۲ این ساختارها نشان داده شده است. برای بررسی مدل مورد نظر در این مطالعه از ساختار کریستالوگرافی با کد PDB، 1jcz استفاده شده است [۳۹]. شایان ذکر است که در کربنیک آنهیدراز XII فلز روی پنج کوئوردینه است و یکی از تفاوت‌های این آنزیم با آنزیم کربنیک آنهیدراز II در تعداد کوئوردینه‌ها می‌باشد. فلز روی در این آنزیم توسط سه اسید آمینه His96، His119 و His94 و یک مولکول استات و یک یون هیدروکسید (در شکل فعال) یا یک مولکول آب (در شکل غیرفعال) احاطه شده است [۳۹]. در ادامه ساختار فرم فعال و غیرفعال آنزیم کربونیک آنهیدراز II نیز در هر دو سطح محاسباتی ذکر شده، بهینه شد. شکل ۳ این ساختارها را نشان می‌دهد. برای این آنزیم‌ها محاسبه فرکانس انجام شد و نتیجه آن نقطه کمینه را بدون فرکانس موهومی نشان داد. برای به دست آوردن دقت دو سطح از داده‌های ساختار پرتو ایکس شکل غیرفعال آنزیم کربنیک آنهیدراز XII موجود در یک کار پژوهشی استفاده شد [۳۹].



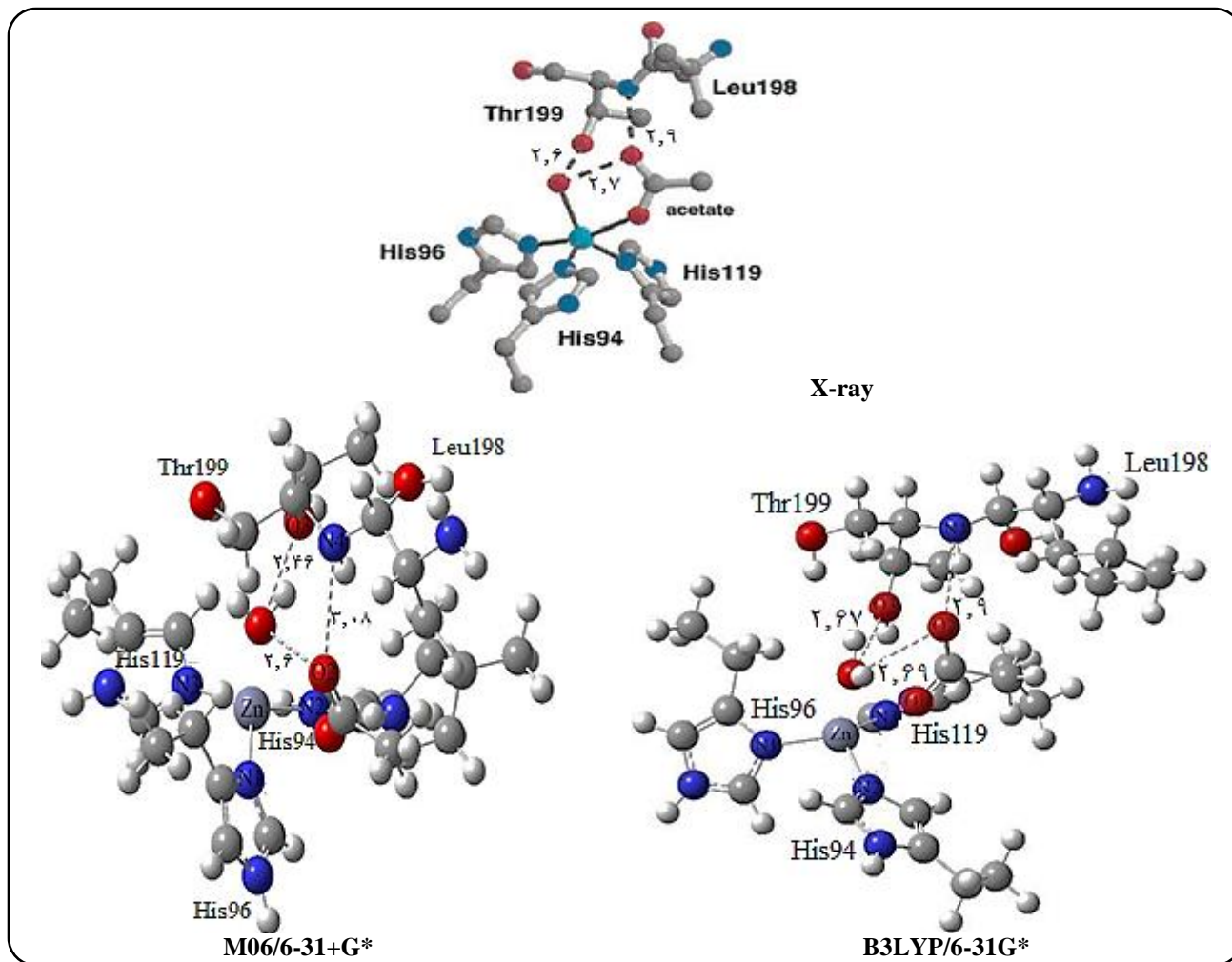
شکل ۲- ساختار بهینه شده‌ی شکل فعال و شکل غیرفعال آنزیم کربنیک آنهیدراز XII در سطح \*B3lyp/6-31G، فاصله ها برحسب Å می باشد.



شکل ۳- ساختار بهینه شده‌ی شکل فعال و شکل غیرفعال آنزیم کربنیک آنهیدراز II در سطح \*B3lyp/6-31G، فاصله ها برحسب Å می باشد.

جدول ۱- برخی اطلاعات ساختاری شکل غیرفعال آنزیم CAXII در دو سطح محاسباتی در مقایسه با اطلاعات ساختار پرتو ایکس.

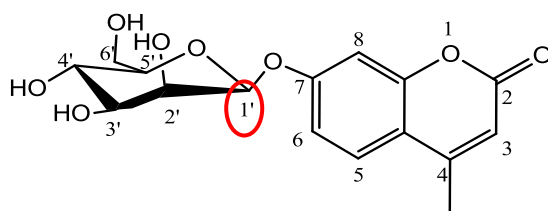
طول پیوندی (Å)	X-Ray	M06/6-31+G*	B3LYP/6-31G*
Zn-N1	۲/۱	۱/۹۷	۱/۹۸
Zn-N2	۲/۰	۱/۹۶	۱/۹۷
Zn-N3	۲/۱	۱/۹۷	۱/۹۸
Zn-OH2	۲/۱	۲/۰۵	۲/۰۸
Zn-O1	۲/۳	۲/۲۸	۲/۳۲
O2-N4	۲/۹	۳/۰۸	۲/۹
O2-OH2	۲/۷	۲/۶	۲/۶۹
OH2-O3	۲/۶	۲/۴۶	۲/۶۷
انحراف استاندارد		۰/۱۱۱	۰/۰۶۷



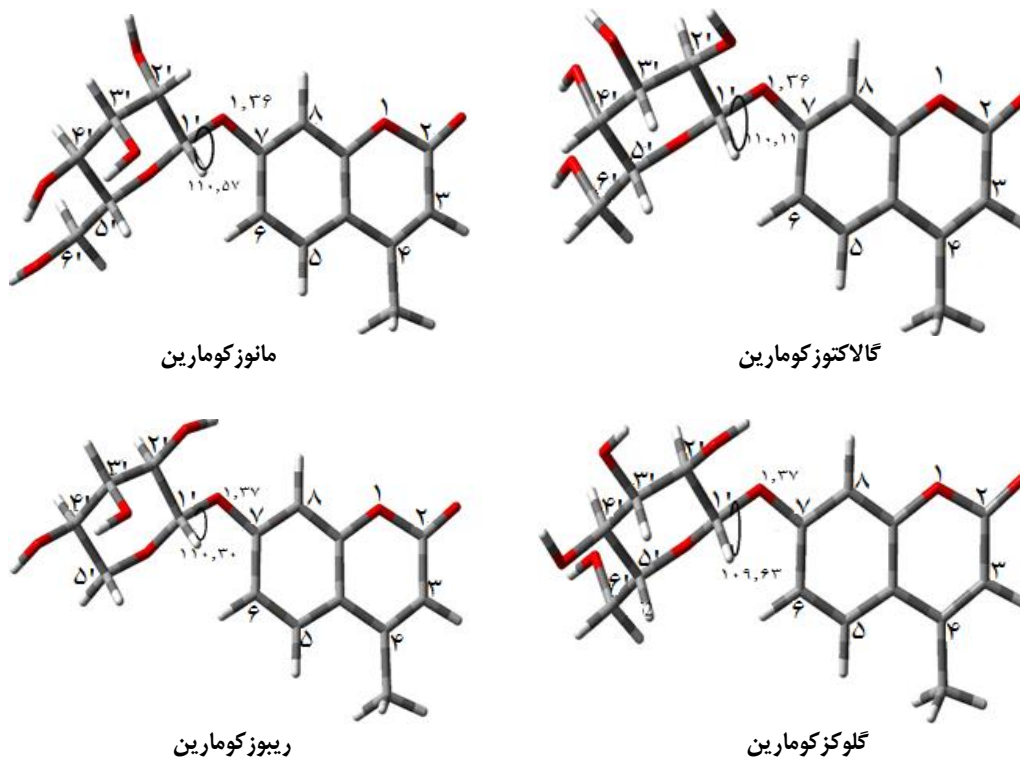
شکل ۴- ساختار X-Ray و ساختار بهینه شده‌ی شکل غیرفعال آنزیم کربنیک آنهیدراز XII، فاصله‌ها برحسب Å می باشد.

جدول ۲- برخی اطلاعات ساختاری شکل فعال آنزیم CAXII و CAII در دو سطح محاسباتی.

اتم‌های متصل شده	M06/6-31+G*		B3LYP/6-31G*	
	CAXII	CAII	CAXII	CAII
طول پیوندی (Å)				
Zn-N1	۲/۰۵	۲/۰۷	۲/۰۵	۲/۰۷
Zn-N2	۲/۰۳	۲/۰۱	۲/۰۳	۲/۰۲
Zn-N3	۲/۰۵	۲/۰۴	۲/۰۵	۲/۰۵
Zn-OH	۱/۸۴	۱/۸۵	۱/۸۵	۱/۸۴
زاویه پیوندی (°)				
C-N1-C	۱۰۶/۷۰	۱۰۶/۷۲	۱۰۶/۵۲	۱۰۶/۶۶
C-N2-C	۱۰۶/۵۲	۱۰۶/۱۷	۱۰۶/۳۷	۱۰۶/۰۴
C-N3-C	۱۰۷/۲۸	۱۰۷/۲۲	۱۰۷/۰۸	۱۰۷/۱۹
زاویه دو وجهی (°)				
N1-Zn-O-H	۱۲۴/۲۱	-۱۰۰/۵۹	۱۳۰/۳۶	-۹۹/۲۹
N2-Zn-O-H	۵/۲۶	۱۶/۲۰	۱۲/۰۱	۱۷/۲۴
N3-Zn-O-H	-۱۲۳/۴۰	۱۴۳/۹۰	-۱۱۴/۵۴	۱۴۲/۳۱



شکل ۵- موقعیت کربن آنومریک.



شکل ۶- ساختارهای بهینه شده‌ی چهار مشتق قندی کومارین در سطح \*B3lyp/6-31G.

فعال آنزیم قرار می‌گیرد و بر خلاف سایر بازدارنده‌هایی که تاکنون وجود داشتند با فلز روی هیچ برهم کنشی ندارد. در حضور یک مولکول آب که وظیفه هیدرولیز هر دو مولکول آنزیم و بازدارنده را بر عهده دارد، برهمکنش پیش رفته و در نهایت حلقه بازدارنده کومارین باز شده و دو ایزومر فضایی سیس و ترانس بازدارنده تولید می‌شود. در همین زمان گروه هیدروکسیل آنزیم به  $H_2O$  تبدیل می‌شود که موجب غیرفعال سازی آنزیم کربونیک آنهیدراز می‌گردد. نکته چشمگیر در این برهمکنش نزدیک شدن بازدارنده به آنزیم و اثر غیرفعال کنندگی بر روی آن تنها بر اساس اثر فضایی می‌باشد و در این برهمکنش بازدارنده هیچ گونه اتصالی را با مرکز فعال آنزیم برقرار نمی‌کند.

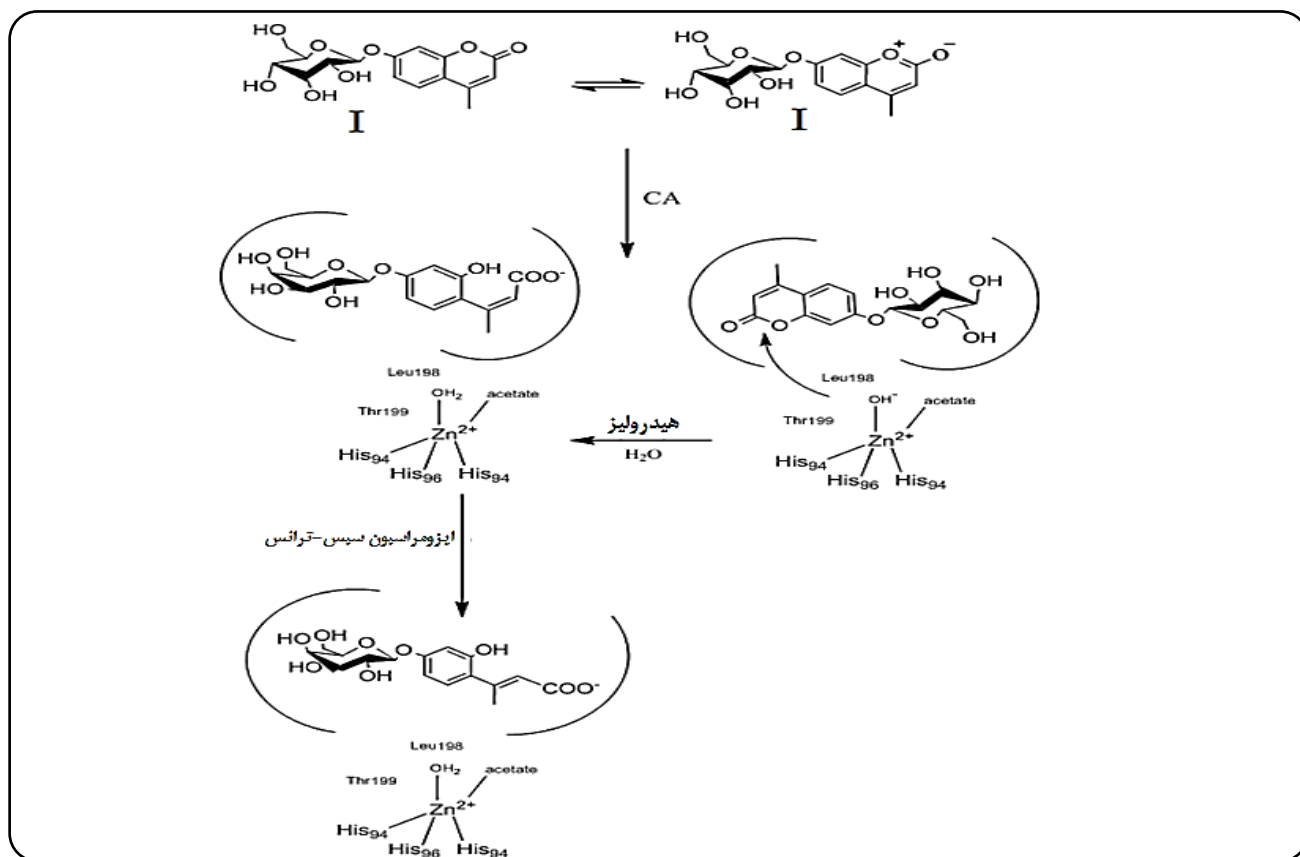
همه بازدارنده‌های مورد مطالعه شامل کومارین، مانوز کومارین، ریبوز کومارین، گلوکز کومارین، گالاکتوز کومارین و ایزومرهای سیس و ترانس آنها در دو سطح محاسباتی \*B3LYP/6-31G و \*M06/6-31+G بهینه شدند. پایدارترین ساختار این مشتق‌های قندی کومارین در سطح \*B3LYP/6-31G در شکل ۶ نشان داده شده است. برخی از اطلاعات ساختاری این مشتق‌های قندی کومارین در جدول ۳ آورده شده است.

#### برهم کنش کلی آنزیم کربونیک آنهیدراز II و XII و بازدارنده‌ها

مکانیسم این برهم کنش در شکل ۷ نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل ۷ دیده می‌شود، بازدارنده در پاکت فضایی نزدیک به شکل

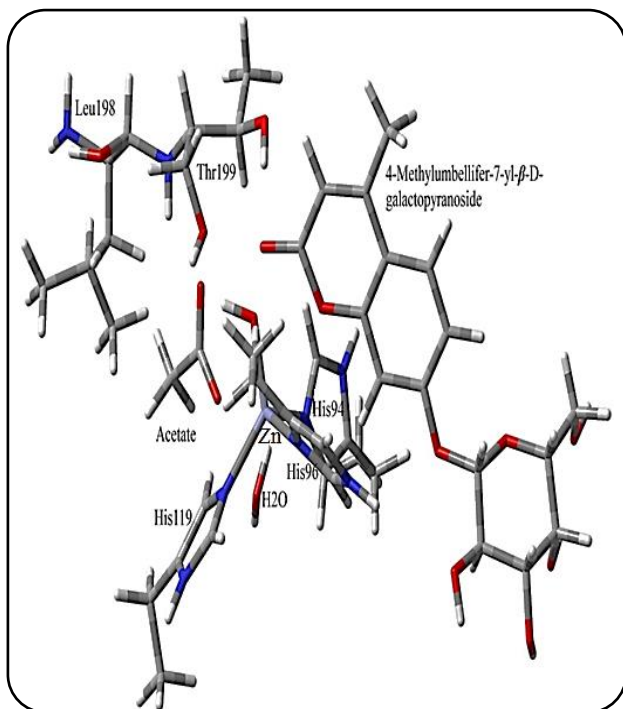
جدول ۳- برخی اطلاعات ساختاری مشتق‌های قندی کومارین در دو سطح محاسباتی.

اتم‌های متصل شده	مانوز کومارین		ریبوز کومارین		گلوکز کومارین		گالاکتوز کومارین	
	B3LYP	M06	B3LYP	M06	B3LYP	M06	B3LYP	M06
طول پیوندی C5'-C6'	۱/۵۲	۱/۵۱	-	-	۱/۵۲	۱/۵۱	۱/۵۲	۱/۵۱
C6'-O6'	۱/۴۳	۱/۴۲	-	-	۱/۴۱	۱/۴۱	۱/۴۲	۱/۴۱
C1'-O1'	۱/۴۰	۱/۳۹	۱/۳۷	۱/۳۹	۱/۴۱	۱/۳۹	۱/۳۹	۱/۳۹
C1'-O5'	۱/۴۲	۱/۴۰	۱/۴۱	۱/۴۰	۱/۴۱	۱/۳۹	۱/۴۲	۱/۴۱
C2-C3	۱/۴۵	۱/۴۵	۱/۴۵	۱/۴۵	۱/۴۵	۱/۴۵	۱/۴۵	۱/۴۵
زاویه پیوندی H1'-C1'-O1'	۱۱۰/۵۷	۱۱۰/۴۷	۱۱۰/۳۰	۱۱۰/۳۳	۱۰۹/۶۳	۱۰۹/۶۸	۱۱۰/۱۱	۱۱۰/۱۴
C4'-O4'-H	۱۰۶/۵۱	۱۰۸/۱۶	۱۰۸/۹۲	۱۰۸/۲۶	۱۰۵/۸۹	۱۰۷/۵۸	۱۰۷/۸۱	۱۰۹/۳۲
C1'-O5'-C5'	۱۱۲/۸۱	۱۱۲/۹۸	۱۱۲/۲۶	۱۱۲/۱۴	۱۱۳/۵۶	۱۱۲/۸۷	۱۱۳/۶۹	۱۱۲/۸۴
C5'-C6'-O6'	۱۰۷/۶۴	۱۰۷/۸۶	-	-	۱۰۹/۱۳	۱۰۸/۷۹	۱۰۹/۵۹	۱۰۹/۵۹
O5'-C1'-O1'	۱۰۸/۳۳	۱۰۷/۷۰	۱۰۸/۳۶	۱۰۸/۳۸	۱۰۹/۰۴	۱۰۹/۰۸	۱۰۷/۸۷	۱۰۸/۰۵
زاویه دو وجهی H1'-C1'-O1'-C7	۴۲/۸۳	۴۵/۲۰	۴۲/۳۹	۴۳/۵۰	۴۱/۷۱	۴۴/۰۴	۳۸/۶۵	۴۱/۳۹
C5'-C6'-O6'-H	۱۶۸/۶۹	۱۷۵/۸۷	-	-	-۱۶۸/۰۱	-۱۷۵/۹۹	-۱۷۵/۴۶	۱۷۰/۰۷
O5'-C5'-C6'-O6'	۱۷۸/۴۳	-۱۷۹/۵۳	-	-	-۶۵/۱۴	-۶۷/۳۵	-۶۹/۶۶	-۷۱/۰۴
O5'-C5'-C4'-O4'	-۱۷۰/۹۲	-۱۷۰/۴۷	-۱۷۳/۳۴	-۱۷۴/۶۰	-۱۷۵/۲۲	-۱۷۵/۶۰	۶۲/۹۱	۶۱/۸۳
O1'-C1'-O5'-C5'	۱۷۸/۴۲	-۱۷۹/۸۹	-۱۷۷/۴۴	-۱۷۸/۱۶	-۱۷۸/۰۷	۱۷۹/۰۲	-۱۷۷/۶۲	۱۷۹/۸۲



شکل ۷- نمایش کلی از برهم کنش دسته جدیدی از بازدارنده‌ها بر روی آنزیم کربونیک آنهیدراز.





شکل ۸- ساختار ترکیب شده‌ی مواد اولیه واکنش گالاکتوز کومارین و کربنیک آنهیدراز XII.

$$\Delta E = (E_{int.} + E_{ICA}) - (E_{ACA} + E_{inh}) \quad (۴)$$

از حدواسط ایزومر سیس یا ترانس، شکل غیر فعال آنزیم، شکل فعال آنزیم و مولکول بازدارنده اشاره دارند. طبق مطالعه‌های تجربی موجود [۳۱] مشتق‌های قندی کومارین در مهار آنزیم CAXII موفق‌تر عمل کرده و از قدرت بیشتری برای مهار این آنزیم برخوردارند. مثبت‌تر بودن مقدارهای اختلاف انرژی برای واکنش مهار CAII این واقعیت تجربی را تأیید می‌کند [۳۱]. برای بررسی نقش قند در مکانیزم مهار آنزیم، گلیکوزیل با اتم هیدروژن در مولکول کومارین جایگزین شده و همه محاسبه‌ها را با این مهار کننده نیز شد. بر اساس نتیجه‌های تجربی، کومارین (با ثابت بازدارندگی  $46800$  نانومتر) نمی‌تواند به عنوان یک مهارکننده مؤثر برای آنزیم CAXII عمل کند [۳۱]، در حالی که همه‌ی کومارین‌های گلیکوزیل شده مهار چشمگیری از این ایزوفرم با ثابت مهار در بازه  $184-85$  نانومتر داشته‌اند. همچنین تنها گلیکوزیل کومارین‌ها از رشد اولیه تومورهای سلول‌های سرطانی موش‌ها جلوگیری کرده‌اند. تفاوت انرژی ( $\Delta E_{rxn}$ ) و تمام داده‌های ترمودینامیکی واکنش، از جمله آنتالپی ( $\Delta H^\circ_{rxn}$ ) و انرژی گیبس ( $\Delta G^\circ_{rxn}$ ) برای پنج بازدارنده در دو سطح محاسبه‌ای  $B3LYP/6-31G^*$  و  $M06/6-31+G^*$

به منظور مطالعه واکنش نمایش داده شده در شکل ۷ ساختار بهینه شده شکل فعال آنزیم کربونیک آنهیدراز، بازدارنده و یک مولکول آب به عنوان مواد اولیه و یک بار ایزومر سیس بازدارنده همراه با فرم غیر فعال آنزیم و بار دیگر ایزومر ترانس بازدارنده همراه با شکل غیر فعال آنزیم به عنوان فرآورده‌های بهینه شدند و سپس محاسبه فرکانس به منظور استخراج اطلاعات ترمودینامیکی انجام شد. شایان ذکر است که این بهینه‌سازی‌ها برای هر دو آنزیم و برهم‌کنش آن‌ها با هر پنج بازدارنده انجام شد. پس از بهینه‌سازی مواد اولیه شامل بازدارنده، شکل فعال آنزیم و مولکول آب هر سه مولکول به یکدیگر نزدیک شده به طوری که برهم‌کنش‌های فضایی داشته باشند، در فاصله تقریبی  $2-3 \text{ \AA}$  و دوباره مجموعه این سه مولکول بهینه شد. شکل ۸ یک مجموعه از این مواد اولیه را به عنوان نمونه نشان می‌دهد. سرانجام فرآورده‌ها شامل ایزومر سیس و ترانس بازدارنده و فرم غیر فعال آنزیم بهینه شد. بنابراین با توجه به مکانیسم پیشنهاد شده در شکل ۷، پایدارترین سازنده‌ی گلیکوزیل-کومارین‌ها به عنوان بازدارنده مؤثر آنزیم، توسط یون هیدروکسید متصل به روی که به عنوان یک نوکلئوفیل قوی عمل می‌کند، تحت هیدرولیز قرار می‌گیرد افزون بر این در حضور مولکول آب، حدواسط سیس - ۲ - هیدروکسی سینامیک اسید تشکیل شده و شکل فعال آنزیم به شکل غیر فعال تبدیل می‌شود. در ادامه بازاریابی آنزیم رخ می‌دهد که منجر به تولید ایزومر ترانس ۲ - هیدروکسی سینامیک اسید می‌شود.

نتیجه‌های محاسبه شده از چهار مهارکننده نشان می‌دهد که ایزومر سیس به ترتیب در حدود  $27.99$ ،  $50.04$ ،  $24.04$  و  $31.09$  کیلوکالری بر مول پایدارتر از ایزومر ترانس در گالاکتوز، مانوز، ریبوز و گلوکز کومارین است. این پایداری از یک پیوند هیدروژنی درون مولکولی بین اتم اکسیژن کربونیک و اتم هیدروژن هیدروکسیل در ایزومر سیس به دست می‌آید. تفاوت انرژی بین واکنش‌دهنده‌ها و فرآورده‌ها برای واکنش کلی بر اساس معادله (۴) محاسبه شد و به ترتیب حدود  $16.53$ ،  $105.43$ ،  $23.22$  و  $158.86$  کیلوکالری بر مول برای ایزومر سیس از گالاکتوز، مانوز، ریبوز، گلوکز کومارین در برهم‌کنش با آنزیم CAXII در فاز گازی بود. بر اساس نتیجه‌های تجربی، مانوز کومارین ضعیف‌ترین مهارکننده آنزیم CAXII است [۳۱]. مثبت‌ترین مقدار اختلاف انرژی متعلق به مشتق مانوز است که با داده‌های تجربی توافق خوبی دارد [۳۱]. اختلاف انرژی بین واکنش‌دهنده‌ها و محصولات برای واکنش مهار آنزیم CAII توسط این مشتق‌های قندی کومارین نیز بر اساس معادله (۴) محاسبه شد و به ترتیب حدود  $132.54$ ،  $20.06$ ،  $137.85$  و  $130.45$  کیلوکالری بر مول برای ایزومر سیس از مشتق‌های گالاکتوز، مانوز، ریبوز و گلوکز کومارین بود.



جدول ۴- داده های ترموشیمیایی برهمکنش بازدارنده ها و کربنیک آنهیدراز XII.

بازدارنده	ایزومر	B3LYP/6-31G*				M06/6-31+G*		
		$\Delta E_{rxn}^{tot}$	$\Delta H_{rxn}^{\circ}$	$\Delta G_{rxn}^{\circ}$	$\Delta S_{rxn}^{\circ}$	$\Delta E_{rxn}^{tot}$	$\Delta H_{rxn}^{\circ}$	$\Delta G_{rxn}^{\circ}$
گالاکتوز کومارین	سیس	۱۶/۵۳	۱۵/۹۵	۲۳/۷۵	-۲۶/۱۸	۶۵/۴۵	۶۴/۸۷	۷۲/۶۷
	ترانس	۴۴/۵۲	۴۳/۹۴	۴۷/۸۵	-۱۳/۱۲	۹۰/۷۴	۹۰/۱۶	۹۴/۰۶
گلوکز کومارین	سیس	۱۵/۸۶	۱۵/۲۸	۲۳/۰۵	-۲۶/۰۶	۶۷/۸۳	۶۷/۲۵	۷۴/۹۵
	ترانس	۴۶/۹۵	۴۶/۳۷	۵۰/۲۷	-۱۳/۰۸	۹۳/۶۲	۹۳/۰۴	۹۶/۹۴
ریبوز کومارین	سیس	۲۳/۲۲	۲۲/۶۴	۳۰/۴۱	-۲۶/۰۶	۷۴/۶۷	۷۴/۰۹	۸۱/۷۹
	ترانس	۴۷/۲۶	۴۶/۶۸	۵۰/۵۸	-۱۳/۰۸	۹۴/۵۶	۹۳/۹۸	۹۷/۸۸
مانوز کومارین	سیس	۱۰۵/۴۳	۱۰۴/۸۵	۱۱۲/۶۲	-۲۶/۰۷	۱۶۸/۶۱	۱۶۸/۰۳	۱۷۵/۷۳
	ترانس	۱۰۴/۹۳	۱۰۴/۳۵	۱۰۸/۲۵	-۱۳/۰۹	۱۷۰/۹۳	۱۷۰/۳۵	۱۷۴/۲۵
کومارین	سیس	۲۱/۲۹	۲۰/۷۱	۲۵/۷۴	-۱۶/۸۷	۷۲/۱	۷۱/۵۲	۷۶/۵۴
	ترانس	۴۳/۶۳	۴۳/۰۵	۴۶/۵۱	-۱۱/۶۱	۸۸/۸۵	۸۸/۲۷	۹۱/۷۲

جدول ۵- داده های ترموشیمیایی برهمکنش بازدارنده ها و کربنیک آنهیدراز II.

بازدارنده	ایزومر	B3LYP/6-31G*				M06/6-31+G*		
		$\Delta E_{rxn}^{tot}$	$\Delta H_{rxn}^{\circ}$	$\Delta G_{rxn}^{\circ}$	$\Delta S_{rxn}^{\circ}$	$\Delta E_{rxn}^{tot}$	$\Delta H_{rxn}^{\circ}$	$\Delta G_{rxn}^{\circ}$
گالاکتوز کومارین	سیس	۱۳۲/۵۴	۱۳۱/۹۶	۱۴۴/۷۵	-۴۲/۸۶	۱۲۶/۵۷	۱۲۵/۹۹	۱۳۸/۷۸
	ترانس	۱۶۰/۵۳	۱۵۹/۹۵	۱۶۸/۸۵	-۲۹/۸۵	۱۵۱/۳۶	۱۵۰/۷۳	۱۵۹/۶۳
گلوکز کومارین	سیس	۱۳۰/۴۵	۱۲۹/۸۷	۱۴۲/۶۵	-۴۲/۸۶	۱۲۸/۴۵	۱۲۷/۸۷	۱۴۰/۶۵
	ترانس	۱۶۱/۵۸	۱۶۱/۰	۱۶۹/۹	-۲۹/۸۵	۱۵۴/۲۴	۱۵۳/۶۶	۱۶۲/۵۶
ریبوز کومارین	سیس	۱۳۷/۸۵	۱۳۷/۲۷	۱۵۰/۰۵	-۴۲/۸۶	۱۳۵/۲۹	۱۳۴/۷۱	۱۴۷/۴۹
	ترانس	۱۶۱/۸۹	۱۶۱/۳۱	۱۷۰/۲۱	-۲۹/۸۵	۱۵۵/۱۸	۱۵۴/۶	۱۶۳/۵
مانوز کومارین	سیس	۲۲۰/۶	۲۱۹/۴۸	۲۳۲/۲۶	-۴۲/۸۶	۲۲۹/۲۳	۲۲۸/۶۵	۲۴۱/۴۳
	ترانس	۲۱۹/۴۹	۲۱۸/۹۱	۲۲۷/۸۱	-۲۹/۸۵	۲۳۱/۵۵	۲۳۰/۹۷	۲۳۹/۸۷
کومارین	سیس	۱۳۷/۳۱	۱۳۶/۷۳	۱۴۶/۷۵	-۳۳/۶۳	۱۳۲/۷۲	۱۳۲/۱۴	۱۴۲/۱۶
	ترانس	۱۵۹/۶۴	۱۵۹/۰۶	۱۶۷/۶۲	-۲۸/۷۳	۱۴۹/۴۷	۱۴۸/۸۹	۱۵۷/۳۹

نتیجه‌ها نشان می‌دهد که از بین این مشتق‌های گالاکتوز کومارین قوی‌ترین و مانوز کومارین ضعیف‌ترین بازدارنده است که با نتیجه‌های تجربی همخوانی دارد [۳۱]. شایان ذکر است که اختلاف انرژی محاسبه‌شده با روش M06/6-31+G\* بیش‌تر از روش B3LYP/6-31G\* است. بررسی پارامترهای ترمودینامیکی در فاز حلال، مقادیر منفی بیش‌تری را بر اثر تعاملات الکترواستاتیک حلال و حل‌شونده نشان می‌دهد. مقادیرهای آنتالپی محاسبه شده با هر دو روش

در جدول ۴ و ۵ به ترتیب برای آنزیم CAXII و آنزیم CAII ارایه شده است. لازم به ذکر است که مقادیر آنتروپی گزارش شده بر حسب J/K.mol و دیگر پارامترهای ترمودینامیکی بر حسب kcal/mol می‌باشند. با محاسبه توابع ترمودینامیکی واکنش و بررسی مقدار انرژی گیس واکنش، تمایل بازدارنده‌ها برای برهم‌کنش با آنزیم‌ها به صورت زیر است:

مانوز کومارین > ریبوز کومارین > گلوکز کومارین > گالاکتوز کومارین

جدول ۶ - تابع‌های ترموشیمیایی واکنش در حضور شش مولکول آب بر حسب kcal/mol.

آنزیم	$\Delta E_{\text{rxn}}^{\text{tot}}$	$\Delta H_{\text{rxn}}^{\circ}$	$\Delta G_{\text{rxn}}^{\circ}$
CAII	-۲۸/۳۱	-۲۸/۸۹	-۱۹/۹۹
CAXII	-۴۷/۴۵	-۴۸/۰۳	-۴۰/۲۵

### نتیجه‌گیری

در این کار پژوهشی به منظور مطالعه نظری اثر بازدارندگی دسته جدیدی از بازدارنده‌های آنزیم کربونیک آنهیدراز یعنی کومارین و مشتق‌های قندی آن بر روی آنزیم کربونیک آنهیدراز XII و II از محاسبه‌های کوانتومی و از روش نظریه تابعی چگالی با سری پایه  $6-31+G^*$  و  $B3lyp/6-31G^*$  و تابع مینسوتا M06 با سری پایه  $6-31+G^*$  در فاز گاز و در حلال آب استفاده شد. نخست به منظور تأیید اعتبار محاسبه‌ها، پارامترهای ساختاری محاسبه شده برای CA XII با داده‌های کریستالوگرافی پرتو ایکس مقایسه شدند که توافق قابل پذیرشی را نشان دادند. در مرحله بعد مکانیسم مهار کربونیک آنهیدراز XII و II توسط کومارین و چهار مشتق گلیکوزیل کومارین به طور کامل از دیدگاه ترمودینامیکی بررسی شد. حضور یک مولکول آب برای انجام هیدرولیز در واکنش ضروری می‌باشد. با انجام این واکنش آنزیم کربونیک آنهیدراز غیرفعال شده و مولکول بازدارنده باز شده و منجر به تشکیل ایزومر سیس یا ترانس آن می‌شود. اختلاف انرژی در سطح واکنش دهنده‌ها و حدواسط و فراورده‌ها گرماگیر بودن واکنش را نشان می‌دهد. تمایل گلیکوزیل کومارین بیش‌تر از کومارین برای مهار ترمودینامیکی CA XII است، در حالی که برهم‌کنش این مشتق‌ها با CAII تمایل کم‌تری از کومارین نشان دادند که با مطالعه‌های تجربی پیشین همخوانی دارد [۳۱]. وجود قند در مولکول کومارین با مهار مؤثر ایزوفرم CAXII همراه بود. بنابراین گلیکوزیل کومارین به عنوان یک کلاس جدید از بازدارنده‌ها نامزد خوبی برای توسعه داروهای جدید ضد سرطان است. مهار تومور CAXII توسط این بازدارنده‌ها می‌تواند عارضه‌های جانبی کم‌تری نسبت به داروهای ضد سرطانی کلاسیک داشته باشد. با توجه به جذب میزان بالای انرژی در فاز گاز، اثر حلال با روش صریح برای گالاتوز که قوی‌ترین بازدارنده است انجام شد که نتیجه آن منفی‌تر شدن پارامترهای ترمودینامیکی بود. در نتیجه واکنش در دمای بدن قابل انجام است و به صورت خودبه‌خودی و

برای همه مهارکننده‌ها، نشان دهنده برهم‌کنش گرماگیر بین بازدارنده‌ها و جایگاه فعال هر دو آنزیم است. طبق مطالعه تجربی اخیر، کومارین به عنوان بازدارنده‌ی hCA XII بی‌اثر است، در حالی که کومارین‌های گلیکوزیل‌شده مهار چشمگیری از این ایزوفرم را با ثابت بازدارندگی در بازه ۵۴-۸،۵ نانومتر نشان می‌دهند [۳۱]. مقدارهای انرژی گیبس نشان می‌دهد که وجود گلیکوزیل قدرت کومارین را برای مهار CA II افزایش نمی‌دهد و حتی در برخی موردها مانند مانوز کومارین، قدرت آن را به طرز چشمگیری کاهش می‌دهد که با آزمایش‌های پیشین نیز سازگار است [۳۱]. باید توجه داشت که نتیجه‌هایی که تاکنون ذکر شد، برای فاز گاز و تنها در حضور یک مولکول آب به دست آمده است، بنابراین شاید در نظر گرفتن اثر حلال و تعداد بیش‌تر مولکول آب، نتیجه‌ها را به طور چشمگیری تغییر خواهد داد که در ادامه به بررسی آن پرداخته می‌شود.

### محاسبه‌های حلال

اثر حلال با روش پیوسته قطبشی (PCM) [۴۲] و نیز روش اثر حلال صریح بررسی شد. برای نمونه نتیجه‌های محاسبه روش پیوسته قطبشی نشان می‌دهد که شکل فعال و غیر فعال CA XII به ترتیب در حدود ۲۹،۴۳ و ۵۷،۰۵ کیلوکالری بر مول در حلال آب با  $B3LYP/6-31G^*$  پایدار می‌شود. محاسبه‌های تک نقطه نیز برای تأیید این نتیجه در سطح محاسباتی  $B3LYP/6-311+G^{**}$  و  $M06/6-311+G^{**}$  انجام شد. پایدارترین ساختار همه بازدارنده‌ها با مدل PCM در حلال آب بهینه شدند و همه بازدارنده‌ها حدود ۱۵ کیلوکالری بر مول پایداری را نشان دادند. برای بازدارنده‌ها نیز محاسبه‌های تک نقطه انجام شد. برای بررسی هر چه بهتر نقش حلال آب در مکانیسم مهار آنزیم، تمام محاسبات مشتق ایزومر سیس گالاتوز به عنوان موثرترین بازدارنده با استفاده از روش اثر حلال صریح تکرار شد. بدین منظور شش مولکول آب در نزدیکی موقعیت‌های دهنده یا گیرنده پیوند هیدروژنی قرار داده شد. همه تابع‌های ترمودینامیکی در جدول ۶ نشان داده شده‌است. همان‌گونه که نتیجه‌های محاسبه‌ها نشان می‌دهد با افزودن شش مولکول آب، کمپلکس‌های مورد مطالعه برای CAII و CAXII به ترتیب در حدود ۴۷،۴۵ و ۲۸،۳۱ کیلوکالری بر مول پایدار می‌شوند. مقدارهای منفی تابع‌های ترمودینامیکی برای واکنش در حضور مولکول‌های آب نشان می‌دهد که مهار آنزیم توسط گالاتوز کومارین گرماده است و به صورت خود به خودی در حضور حلال آب اتفاق می‌افتد.

CAXII به تقریب یک سوم و یا کمتر هستند، که این نتیجه با تجربه سازگار است [۳۸].

گرمازا انجام می‌شود. با توجه به مقادیرهای توابع ترموشیمیایی بازدارنده‌های مورد مطالعه برای آنزیم CAXII بهتر از آنزیم CAII عمل می‌کنند. چون مقادیرهای انرژی گیبس واکنش برای آنزیم CAII بسیار مثبت و بزرگ هستند، در حالی که در مورد آنزیم

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۱۱

## مراجع

- [1] Sahebamee H., Yaghmaei P., Abdolmaleki P., Foroumadi A. R., [Quantitative Structure - Activity Relationships Study of Carbonic Anhydrase Inhibitors Using Logistic Regression Model](#), *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*, **32**(2): 19-29 (2013).
- [2] Supuran C.T., [Carbonic Anhydrase Inhibition with Natural Products: Novel Chemotypes and Inhibition Mechanisms](#), *Molecular Diversity*, **15**(2): 305-316 (2011).
- [3] Supuran C.T., [Carbonic Anhydrases: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors and Activators](#), *Nature Reviews Drug Discovery*, **7**(2): 168-181 (2008).
- [4] Moya A., Tambutté S., Bertucci A., Tambutté E., Lotto S., Vullo D., Supuran C.T., Allemann D., Zoccola D., [Carbonic Anhydrase in the Scleractinian Coral Stylophora Pistillata Characterization, Localization, and Role in Biomineralization](#), *Journal of Biological Chemistry*, **283**(37): 25475-25484 (2008).
- [5] Elleuche S., Pöggeler S., [Carbonic Anhydrases in Fungi](#), *Microbiology*, **156**(1): 23-29 (2010).
- [6] Nishimori I., Onishi S., Takeuchi H., Supuran C.T., [The  \$\alpha\$  and  \$\beta\$  Classes Carbonic Anhydrases from Helicobacter Pylori as Novel Drug Targets](#), *Current pharmaceutical design*, **14**(7): 622-630 (2008).
- [7] Švastová E., Hulíková A., Rafajová M., Zat'ovičová M., Gibadulinová A., Casini A., Cecchi A., Scozzafava A., Supuran C.T., Pastorek J., Pastoreková S., [Hypoxia Activates the Capacity of Tumor-Associated Carbonic Anhydrase IX to Acidify Extracellular pH](#), *FEBS Letters*, **577**(3): 439-445 (2004).
- [8] Ebbesen P., Pettersen E.O., Gorr T.A., Jobst G., Williams K., Kieninger J., Wenger R.H., Pastorekova S., Dubois L., Lambin P., Wouters B.G., [Taking Advantage of Tumor Cell Adaptations to Hypoxia for Developing New Tumor Markers and Treatment Strategies](#), *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **24**(sup1): 1-39 (2009).
- [9] Supuran C.T., Scozzafava A., Casini A., [Carbonic Anhydrase Inhibitors](#), *Medicinal Research Reviews*, **23**(2): 146-189 (2003).
- [10] Supuran C.T., [Carbonic Anhydrases-An Overview](#), *Current Pharmaceutical Design*, **14**(7): 603-614 (2008).
- [11] Erdemir F., Celepci D.B., Aktaş A., Taslimi P., Gök Y., Karabıyık H., Gülçin I., [2-Hydroxyethyl Substituted NHC Precursors: Synthesis, Characterization, Crystal Structure and Carbonic Anhydrase, A-Glycosidase, Butyrylcholinesterase, and Acetylcholinesterase Inhibitory Properties](#), *Journal of Molecular Structure*, **1155**: 797-806 (2018).

- [12] Sarı Y., Aktaş A., Taslimi P., Gök Y., Gulçin I., [Novel N-Propylphthalimide- and 4-Vinylbenzyl-Substituted Benzimidazole Salts: Synthesis, Characterization, and Determination of Their Metal Chelating Effects and Inhibition Profiles Against Acetylcholinesterase and Carbonic Anhydrase Enzymes](#), *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **32**(1): e22009 (2018).
- [13] Xu Y., Feng L., Jeffrey P.D., Shi Y., Morel F.M., [Structure and Metal Exchange in the Cadmium Carbonic Anhydrase of Marine Diatoms](#), *Nature*, **452**(7183): 56-61 (2008).
- [14] Rowlett R.S., [Structure and Catalytic Mechanism of the  \$\beta\$ -Carbonic Anhydrases](#), *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1804**(2): 362-373 (2010).
- [15] Zimmerman S.A., Ferry J.G., Supuran C.T., [Inhibition of the Archaeal  \$\beta\$ -Class \(Cab\) and  \$\gamma\$ -Class \(Cam\) Carbonic Anhydrases](#), *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **7**(9): 901-908 (2007).
- [16] Monti S.M., Supuran C.T., De Simone G., [Anticancer Carbonic Anhydrase Inhibitors: a Patent Review \(2008–2013\)](#), *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **23**(6): 737-749 (2013).
- [17] Khalifah R.G., [The Carbon Dioxide Hydration Activity of Carbonic Anhydrase I. Stop-Flow Kinetic Studies on the Native Human Isoenzymes B and C](#), *Journal of Biological Chemistry*, **246**(8): 2561-2573 (1971).
- [18] Forsman C., Behravan G., Osterman A., Jonsson B.H., [Production of Active Human Carbonic Anhydrase II in E. Coli](#), *Acta Chemica Scandinavica*, **42**: 314-318 (1988).
- [19] Sly W.S., Hu P.Y., [Human Carbonic Anhydrases and Carbonic Anhydrase Deficiencies](#), *Annual Review of Biochemistry*, **64**(1): 375-401 (1995).
- [20] Venters R.A., Farmer II B.T., Fierke C.A., Spicer L.D., [Characterizing the Use of Perdeuteration in NMR Studies of Large Proteins: 13 C, 15 N and 1 H Assignments of Human Carbonic Anhydrase II](#), *Journal of Molecular Biology*, **264**(5): 1101-1116 (1996).
- [21] Supuran C.T., [Carbonic Anhydrase Inhibitors: an Editorial](#), *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **23**(6): 677-679 (2013).
- [22] Supuran C.T., Maresca A., Gregaň F., [Three New Aromatic Sulfonamide Inhibitors of Carbonic Anhydrases I, II, IV and XII](#), *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **28**(2): 289-293 (2013).
- [23] Supuran C.T., [Carbonic Anhydrase Inhibitors and Activators for Novel Therapeutic Applications](#), *Future Medicinal Chemistry*, **3**(9): 1165-1180 (2011).
- [24] Scozzafava A., Supuran C.T., Conway J., "Development of Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors", CRC Press, Florida, (2004).
- [25] (a) Thiry A., Dogne J., Masereel B., Supuran C.T., [Targeting Tumor-Associated Carbonic Anhydrase IX in Cancer Therapy](#), *Trends in Pharmacological Sciences*, **27**(11): 566-573 (2006).
- (b) Kumar R., Bua S., Ram S., Del Prete S., [Benzenesulfonamide Bearing Imidazothiadiazole and Thiazolotriazole Scaffolds as Potent Tumor Associated Human Carbonic Anhydrase IX and XII Inhibitors](#), *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **25**(3): 1286-1293 (2017).
- (c) Chandak N., Ceruso M., Supuran C.T., Sharma P.K., [Novel Sulfonamide Bearing Coumarin Scaffolds as Selective Inhibitors of Tumor Associated Carbonic Anhydrase Isoforms IX and XII](#), *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **24**(13): 2882–2886 (2016).

- [26] Ghiasi M., Kamalinahad S., Arabieh M., Zahedi M., [Carbonic Anhydrase Inhibitors: a Quantum Mechanical Study of Interaction Between Some Antiepileptic Drugs with Active Center of Carbonic Anhydrase Enzyme](#), *Computational and Theoretical Chemistry*, **992**: 59-69 (2012).
- [27] Ghiasi M., Kamalinahad S., [Conformational Analysis of Topiramate and Related Anion in the Solution and Interaction Between the Most Stable Conformer of Topiramate with Active Center of Carbonic Anhydrase Enzyme](#), *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **34**(2): 80-102 (2015).
- [28] Ghiasi M., Oskouie A., Saeidian H., [Dynamic Stereochemistry of Topiramate \(Anticonvulsant Drug\) in Solution: Theoretical Approaches and Experimental Validation](#), *Carbohydrate Research*, **348**: 47-54 (2012).
- [29] Temperini C., Innocenti A., Scozzafava A., Parkkila S., Supuran C.T., [The Coumarin-Binding Site in Carbonic Anhydrase Accommodates Structurally Diverse Inhibitors: the Antiepileptic Lacosamide as an Example and Lead Molecule for Novel Classes of Carbonic Anhydrase Inhibitors](#), *Journal of Medicinal Chemistry*, **53**(2): 850-854 (2009).
- [30] Bonneau A., Maresca A., Winum J.Y., Supuran C.T., [Metronidazole-Coumarin Conjugates and 3-Cyano-7-Hydroxy-Coumarin Act as Isoform-Selective Carbonic Anhydrase Inhibitors](#), *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **28**(2): 397-401 (2013).
- [31] Touisni N., Maresca A., McDonald P.C., Lou Y., Scozzafava A., Dedhar S., Winum J.Y., Supuran C.T., [Glycosyl Coumarin Carbonic Anhydrase IX and XII Inhibitors Strongly Attenuate the Growth of Primary Breast Tumors](#), *Journal of Medicinal Chemistry*, **54**(24): 8271-8277 (2011).
- [32] Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G.A., Nakatsuji H., Caricato M., Li X., Hratchian H.P., Izmaylov A.F., Bloino J., Zheng G., Sonnenberg J.L., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Montgomery J.A., Peralta J.E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J.J., Brothers E., Kudin K.N., Staroverov V.N., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A., Burant J.C., Iyengar S.S., Tomasi J., Cossi M., Rega N., Millam J.M., Klene M., Knox J.E., Cross J.B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R.E., Yazyev O., Austin A.J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J.W., Martin R.L., Morokuma K., Zakrzewski V.G., Voth G.A., Salvador P., Dannenberg J.J., Dapprich S., Daniels A.D., Farkas O., Foresman J.B., Ortiz J.V., Cioslowski J., Fox D.J., Gaussian, Inc., Wallingford CT. (2009).
- [33] Ghiasi M., Hemati S., Zahedi M., [Activation Modeling of  \$\beta\$ -and  \$\gamma\$ -Class of Carbonic Anhydrase with Amines and Amino Acids: Proton Transfer Process Within the Active Site from Thermodynamic Point of View](#), *Computational and Theoretical Chemistry*, **1109**: 42-57 (2017).
- [34] Ghiasi M., Taheri M., Zahedi M., [Thermodynamic Study of Proton Transfer in Carbonic Anhydrase/Activator Omplex:A Quantum Mechanical Approach](#), *Computational and Theoretical Chemistry*, **1022**: 121-129 (2013).

- [35] Ghiasi M., Kamalinahad S., Zahedi M., [Complexation of Nanoscale Enzyme Inhibitor with Carbonic Anhydrase Active Center: A Quantum Mechanical Approach](#), *Journal of Structural Chemistry*, 55(8): 1574–1586 (2014).
- [36] Navarrete M., Rangel C., Corchado J.C., Espinosa-Garcia J., [Trapping of the OH Radical by  \$\alpha\$ -Tocopherol: A Theoretical Study](#), *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(21): 4777-4784 (2005).
- [37] Chandra A.K., Uchimar T., [The OH Bond Dissociation Energies of Substituted Phenols and Proton Affinities of Substituted Phenoxide Ions: A DFT Study](#), *International Journal of Molecular Sciences*, 3(4): 407-422 (2002).
- [38] Zhang H.Y., Ji H.F., [S-H Proton Dissociation Enthalpies of Thiophenolic Cation Radicals: A DFT Study](#), *Journal of Molecular Structure: Theochem.*, 663(1-3): 167–174 (2003).
- [39] Whittington D.A., Waheed A., Ulmasov B., Shah G.N., Grubb J.H., Sly W.S., Christianson D.W., [Crystal Structure of the Dimeric Extracellular Domain of Human Carbonic Anhydrase XII, a Bitopic Membrane Protein Overexpressed in Certain Cancer Tumor Cells](#), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17): 9545-9550 (2001).
- [40] Tafazzoli M., Ghiasi M., [New Karplus Equations for  \$^2J\_{HH}\$ ,  \$^3J\_{HH}\$ ,  \$^2J\_{CH}\$ ,  \$^3J\_{CH}\$ ,  \$^3J\_{COCH}\$ ,  \$^3J\_{CSCH}\$  and  \$^3J\_{CCCH}\$  in Some Aldoheopyranoside Derivatives, as Determined Using NMR Spectroscopy and Density Functional Theory Calculations](#), *Carbohydrate Research*, 342(14): 2086-2096 (2007).
- [41] Tafazzoli M., Ghiasi M., [Conformational Study of Anomeric Center in Some Carbohydrate Derivatives](#), *Computational and Theoretical Chemistry*, 814(1-3): 127-130 (2007).
- [42] Barone V., Cossi M., Tomasi J., [Geometry Optimization of Molecular Structures in Solution by the Polarizable Continuum Model](#), *Journal of Computational Chemistry*, 19(4): 404–417 (1998).