

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

BAZI YENİ KALKON VE PİRAZOLİN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN
ANTİDİYABETİK ETKİSİNİN *IN VITRO* VE *IN SILICO* OLARAK
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma ÇOLAK

ŞUBAT - 2025
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI YENİ KALKON VE PİRAZOLİN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN
ANTİDİYABETİK ETKİSİNİN *IN VITRO* VE *IN SILICO* OLARAK
İNCELENMESİ**

Fatma ÇOLAK

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (KİMYA)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 28.01.2025

Tezin Savunma Tarihi : 26.02.2025

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Melike YILDIRIM AKATIN

Trabzon 2025

ÖNSÖZ

Akademik hayatım boyunca bilgi, destek ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen, bu çalışmanın hayata geçirilmesinde önemli katkılar sağlayan, değerli eleştiri ve önerileriyle tezimi yönlendiren danışmanım Sayın Prof. Dr. Melike YILDIRIM AKATIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarımda gerekli olan kalkan ve pirazolin türevi molekülleri temin ederek, sahip olduğu bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. Nuran KAHRİMAN'a teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca laboratuvarlarını kullanma imkânı sağlayan ve üzerimde emeği geçen, katkı sağlayan Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK ve Prof. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA'ya da teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: FYL-2023-10815). Tez çalışmama sağladıkları maddi destekten ötürü, KTÜ-BAP'a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm bu süreçte emeği geçen herkese, katkıları ve desteği için teşekkür ederim.

Fatma ÇOLAK

Trabzon, 2025

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bazı Yeni Kalkon ve Pirazolin Türevi Bileşiklerin Antidiyabetik Etkisinin *In vitro* ve *In silico* Olarak İncelenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Melike YILDIRIM AKATIN’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 26.02.2025

Fatma ÇOLAK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Enzim İnhibisyonu.....	1
1.2. Enzim İnhibisyonunun Farmasötik Önemi.....	5
1.3. Diabetes Mellitus(DM).....	6
1.3.1. Tip 1 Diyabet.....	6
1.3.2. Tip 2 Diyabet.....	7
1.3.3. Gestasyonel Diyabet (Gebelik Şekeri).....	7
1.4. α -Amilazlar, α -Glukozidazlar ve İnhibitörleri.....	8
1.5. ADME Özellikleri.....	10
1.6. Moleküler Modelleme.....	11
1.7. Kalkon ve PirazolinTürevleri.....	12
1.8. Çalışmanın Amacı ve Önemi.....	16
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	17
2.1. Kullanılan Materyaller.....	17
2.1.1. Cihazlar, Enzimler ve Bazı Kimyasallar.....	17
2.1.2. Çözeltiler.....	17
2.1.3. Organik Moleküller.....	19
2.2. Organik Moleküllerin α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	21
2.2.1. α -Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	21
2.2.2. Organik Moleküllerin α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi ..	22
2.3. Organik Moleküllerin α -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	22
2.3.1. α -Glukozidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	22

2.3.2. Organik Moleküllerin α -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	23
2.4. İnhibisyon Çeşidinin Belirlenmesi.....	23
2.5. ADME Özellikleri.....	24
2.6. Moleküler Modelleme Çalışmaları	24
2.7. İstatistiksel Analiz.....	24
3. BULGULAR	25
3.1. Sentezlenen Bileşiklerin Spektral Verilerinin Değerlendirilmesi.....	25
3.1.1. Sentezlenen Kalkon (K1-K3) Bileşiklerine Ait Verim, Erime Noktası, R_f Değerleri ile $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (APT) ve FT-IR Spektrumları ve Spektral Verileri	26
3.1.2. Sentezlenen 3,5-Disüstitüe Pirazolin (P1-P3) Bileşiklerine Ait Verim, Erime Noktası, R_f Değerleri ile $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (APT) ve FT-IR Spektrumları ve Spektral Verileri	32
3.2. Organik Moleküllerin α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi	39
3.3. Organik Moleküllerin α - Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi	44
3.4. ADME Özellikleri.....	48
3.5. Moleküler Modelleme Çalışmaları	48
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	57
5. ÖNERİLER	63
6. KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

BAZI YENİ KALKON VE PİRAZOLİN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN ANTİDİYABETİK
ETKİSİNİN *IN VITRO* VE *IN SILICO* OLARAK İNCELENMESİ

Fatma ÇOLAK

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Melike YILDIRIM AKATIN
2025, 71 Sayfa

Bu tez çalışması kapsamında, sentezlenen kalkon (**K1**, **K2** ve **K3**) ve pirazolin (**P1**, **P2** ve **P3**) türevi bileşiklerin α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* ve *in silico* yöntemlerle incelenmesi amaçlandı. Bu sayede, yeni potansiyel antidiyabetik ajanların geliştirilmesine katkıda bulunulması hedeflendi.

α -Amilaz enzimi için elde edilen sonuçlara istatistiksel olarak bakıldığında, **P2** molekülünün standart inhibitör olan akarboz ile aynı IC_{50} değerine sahip olduğu görüldü. Molekülün α -amilazı non-kompetitif yolla inhibe ettiği ve K_i değerinin 5,34 μ M olduğu belirlendi. Çalışılan pirazolin moleküllerinin hepsinin istatistiksel olarak birbirleriyle aynı ama akarbozdan daha iyi α -glukozidaz inhibisyonuna sebep olduğu belirlendi. Bunlar içinde en düşük IC_{50} değerine sahip olan **P2** molekülünün α -glukozidazı ise 1,14 μ M'lık K_i değeriyle non-kompetitif yolla inhibe ettiği tespit edildi.

P2 molekülünün hem α -amilaz hem de α -glukozidaz inhibisyonu için umut verici sonuçlar sunduğu ve antidiyabetik ajan olma potansiyelinin yüksek olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Antidiyabetik etki, Moleküler Modelleme, Kalkonlar, Pirazolinler

Master's Thesis

SUMMARY

IN VITRO AND *IN SILICO* INVESTIGATION OF ANTIDIABETIC EFFECTS OF
SOME NEW CHALCONE AND PYRAZOLINE DERIVATIVE COMPOUNDS

Fatma ÇOLAK

Karadeniz Technical University

Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Melike YILDIRIM AKATIN

2025, 71 Pages

In this study, the inhibitory effects of synthesized chalcone (**K1**, **K2**, and **K3**) and pyrazoline (**P1**, **P2**, and **P3**) derivatives on α -amylase and α -glucosidase enzymes were investigated using both *in vitro* and *in silico* methods. The aim was to contribute to the development of new potential antidiabetic agents.

Statistically, **P2** molecule was found to have the same IC_{50} value as acarbose, the standard inhibitor, for α -amylase. The molecule inhibited α -amylase non-competitively with a K_i value of 5.34 μ M. All of the pyrazoline molecules studied were found to inhibit α -glucosidase more effectively than acarbose. Among these, **P2** molecule with the lowest IC_{50} value was found to inhibit α -glucosidase non-competitively with a K_i value of 1.14 μ M.

P2 molecule showed promising results for both α -amylase and α -glucosidase inhibition, indicating a high potential as an antidiabetic agent.

Key Words: Antidiabetic effect, Molecular docking, Chalcones, Pyrazolines

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Asetilkolin esteraz reaksiyonu	2
Şekil 2.	Yarışmalı inhibisyon	3
Şekil 3.	Yarışmalı bir inhibisyon için Lineweaver - Burk grafiği.....	3
Şekil 4.	Yarışmasız (un-competitif) inhibisyon	4
Şekil 5.	Sadece ES kompleksine bağlanarak gerçekleşen yarışmasız bir inhibisyon (un-competitif) için Lineweaver - Burk grafiği	4
Şekil 6.	Yarışmasız (non-competitif) inhibisyon	5
Şekil 7.	Substratın enzime bağlı olmasından bağımsız olarak gerçekleşen yarışmasız inhibisyon (non-competitif) için Lineweaver - Burk grafiği	5
Şekil 8.	Kalkonların genel yapısı	12
Şekil 9.	Onaylanmış ve klinik olarak test edilmiş bazı kalkonların kimyasal yapıları	13
Şekil 10.	3,5-Disüstitüe pirazolin halka sistemi	13
Şekil 11.	Sentezlenen kalkon ve pirazolin bileşiklerinin yapıları	16
Şekil 12.	Kalkon bileşiklerine ait genel sentez denklemi	20
Şekil 13.	3,5-Disüstitüe-2- pirazolin bileşiklerine ait genel sentez denklemi	21
Şekil 14.	K1, K2 ve K3 Kodlu Kalkon Bileşikleri	25
Şekil 15.	P1, P2 ve P3 Kodlu Pirazolin Bileşikleri	26
Şekil 16.	K1 Kodlu bileşiğin ¹ H-NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃ , ppm).....	27
Şekil 17.	K1 Kodlu bileşiğin ¹³ C-NMR (APT) spektrumu (100 MHz, CDCl ₃ , ppm)	27
Şekil 18.	K1 Nolu bileşiğin FT-IR spektrumu (cm ⁻¹)	28
Şekil 19.	K2 Kodlu bileşiğin ¹ H-NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃ , ppm).....	29
Şekil 20.	K2 Kodlu bileşiğin ¹³ C-NMR (APT) spektrumu (100 MHz, CDCl ₃ , ppm)	29
Şekil 21.	K2 Kodlu bileşiğin FT-IR spektrumu (cm ⁻¹)	30
Şekil 22.	K3 Kodlu bileşiğin ¹ H-NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃ , ppm).....	31
Şekil 23.	K3 Kodlu bileşiğin ¹³ C-NMR (APT) spektrumu (100 MHz, CDCl ₃ , ppm)	31
Şekil 24.	K3 Kodlu bileşiğin FT-IR spektrumu(cm ⁻¹)	32
Şekil 25.	P1 Kodlu bileşiğin ¹ H-NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃ , ppm)	33
Şekil 26.	P1 Kodlu bileşiğin ¹³ C-NMR (APT) spektrumu (100 MHz, CDCl ₃ , ppm).....	34
Şekil 27.	P1 Kodlu bileşiğin FT-IR spektrumu(cm ⁻¹).....	34
Şekil 28.	P2 Kodlu bileşiğin ¹ H-NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃ , ppm).....	35
Şekil 29.	P2 Kodlu bileşiğin ¹³ C-NMR (APT) spektrumu (100 MHz, CDCl ₃ , ppm).....	36

Şekil 30. P2 Kodlu bileşiğin FT-IR spektrumu (cm^{-1}).....	36
Şekil 31. P3 Kodlu bileşiğin ^1H -NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3 , ppm)	37
Şekil 32. P3 Kodlu bileşiğin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu (100 MHz, CDCl_3 , ppm).....	38
Şekil 33. P3 Kodlu bileşiğin FT-IR spektrumu (cm^{-1}).....	38
Şekil 34. K1 molekülünün α -amilaz üzerindeki etkisi.....	39
Şekil 35. K2 molekülünün α -amilaz üzerindeki etkisi.....	39
Şekil 36. K3 molekülünün α -amilaz üzerindeki etkisi.....	40
Şekil 37. P1 molekülünün α -amilaz üzerindeki etkisi	40
Şekil 38. P2 molekülünün α -amilaz üzerindeki etkisi	40
Şekil 39. P3 molekülünün α -amilaz üzerindeki etkisi	41
Şekil 40. Akarbozun α -amilaz üzerindeki etkisi	41
Şekil 41. α -Amilazın P2 yokluğunda ve iki konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	43
Şekil 42. K1 molekülünün α -glukozidaz üzerindeki etkisi.....	44
Şekil 43. K2 molekülünün α -glukozidaz üzerindeki etkisi.....	44
Şekil 44. K3 molekülünün α -glukozidaz üzerindeki etkisi.....	45
Şekil 45. P1 molekülünün α -glukozidaz üzerindeki etkisi.....	45
Şekil 46. P2 molekülünün α -glukozidaz üzerindeki etkisi.....	45
Şekil 47. P3 molekülünün α -glukozidaz üzerindeki etkisi.....	46
Şekil 48. Akarbozun α -glukozidaz üzerindeki etkisi	46
Şekil 49. α -Glukozidazın P2 yokluğunda ve iki konsantrasyonunda Lineweaver - Burk grafiği	47
Şekil 50. K1 molekülünün α -amilazın aktif bölgesi ile etkileşimi.....	50
Şekil 51. P2 molekülünün α -amilazın aktif bölgesi ile etkileşimi	51
Şekil 52. P3 molekülünün α -amilazın aktif bölgesi ile etkileşimi	52
Şekil 53. P2 molekülünün α -glukozidazın aktif bölgesi ile etkileşimi	53
Şekil 54. P3 molekülünün α -glukozidazın aktif bölgesi ile etkileşimi	54

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Pirazolin içeren klinik olarak onaylanmış ilaçların bazıları.....	15
Tablo 2. Kullanılan cihazlar	17
Tablo 3. Kullanılan enzimler ve bazı kimyasal maddeler	17
Tablo 4. Kalkon ve pirazolin türevi moleküller	19
Tablo 5. α -Amilaz aktivitesi için standart reaksiyon karışımı	22
Tablo 6. α -Glukozidaz aktivitesi için standart reaksiyon karışımı.....	23
Tablo 7. Organik moleküllerin α -amilaz enzimine karşı IC_{50} değerleri.....	42
Tablo 8. P2 molekülü varlığında α -amilaz inhibisyon türünün ve K_i değerinin belirlenmesi.....	43
Tablo 9. Organik moleküllerin α -glukozidaz enzimine karşı IC_{50} değerleri.....	46
Tablo 10. P2 molekülü varlığında α -glukozidaz inhibisyon türünün ve K_i değerinin belirlenmesi.....	48
Tablo 11. Kalkon ve pirazolin türevi moleküllerin ADME özellikleri	48
Tablo 12. Organik moleküllerin α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin aktif bölgelerine bağlanma afiniteleri.....	49
Tablo 13. K1 , P2 ve P3 moleküllerinin α -amilazın aktif bölgesi ile etkileşimleri	55
Tablo 14. P2 ve P3 moleküllerinin α -glukozidazın aktif bölgesi ile etkileşimleri	56

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

$^{\circ}\text{C}$	Celcius (sıcaklık birimi)
g	Gram
IC_{50}	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
kcal	Kilokalori
kDa	Kilodalton
K_i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K_m	Michaelis Menten sabiti
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
nm	Nanometre
S	Substrat
U	Ünite
V	Enzimatik reaksiyon hızı
V_{maks}	Maksimum hız
ΔG	Gibbs serbest enerjisi

Semboller

α	Alfa
β	Beta
μ	Mikro

1. GENEL BİLGİLER

Enzimler, hücrel reaksiyonları başlatan, belirli substrat/substratları hedef ürünlere dönüştüren ve bu süreçte değişmeyen biyolojik katalizörler olarak işlev görmektedirler (Güner, 2007). Katalitik RNA molekülleri hariç enzimlerin tamamı protein yapısındadır ve molekül ağırlıkları diğer proteinlerde olduğu gibi 12 binden başlayıp 1 milyon Daltonun üzerine çıkabilir. Bazı enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için aminoasitler dışında kofaktör olarak isimlendirilen ilave kimyasal bileşiklere ihtiyacı vardır. Kofaktörler, bir veya daha fazla inorganik iyon (Fe^{2+} , Mg^{2+} veya Zn^{2+} gibi) veya koenzim olarak bilinen bir organik molekül olabilir. Koenzimlerin çoğu diyetle az miktarlarda alınması gereken organik moleküllerden yani vitaminlerden türemişlerdir. Bir metal iyonu veya koenzim, enzime kovalent bağlı olduğunda prostetik grup olarak adlandırılır. Bir kofaktörün bağlı olduğu enzimler holoenzim, böyle bir enzimin protein kısmı ise apoenzim veya apoprotein olarak isimlendirilir (Nelson vd., 2008).

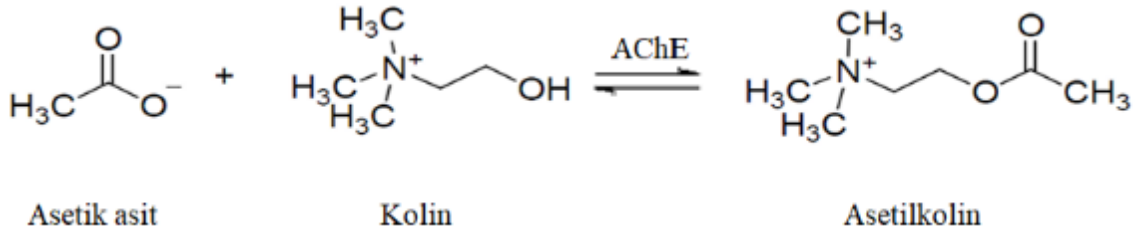
Enzimler, kimyasal reaksiyonları hızlandırma yeteneğine sahip katalizörlerdir. Bu, substrat moleküllerinin daha hızlı bir şekilde ürünlere dönüştürülmesini sağlar. Enzimler spesifik biyokatalizörler olup çoğu enzim yalnızca bir substrata veya aynı fonksiyonel gruba sahip olan bir substrat serisine karşı etkindir. Reaksiyonları katalizledikten sonra genellikle değişmeden kalır ve bir sonraki reaksiyonda tekrar kullanılabilirler (Nelson vd., 2008). Enzimler, canlı organizmalardaki tüm reaksiyonların ılımlı koşullarda (düşük sıcaklık, nötral veya nötrale yakın pH gibi) gerçekleşmesini sağlayan ve bu reaksiyonları koordine eden katalizörlerdir.

1.1. Enzim İnhibisyonu

Enzimlerin *in vitro* aynı zamanda *in vivo* olarak çalışma düzeyinin bazı maddeler veya bileşikler vasıtasıyla azaltılması ya da durdurulması enzim inhibisyonu olarak adlandırılır. Bunu yapan maddelere veya bileşiklere de inhibitör denir. İnhibitörlerin birçoğu düşük molekül ağırlığı olan bileşikler veya iyonlardır. Örneğin ilaçların ve toksik moleküllerin enzimleri inhibe etme olasılığı yüksektir (Keha & Küfrevioğlu, 2020). Enzim aktivitesinin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde bir kontrol mekanizmasıdır. Bunun yanında

çeşitli ilaçlar ve zehirli bileşikler etkilerini enzim inhibisyonu yaparak gerçekleştirir. Günümüzde yaygın olarak kullanılan pek çok ilaç da enzim inhibitörü olarak etki göstermektedir. İnhibisyon olayından aynı zamanda enzim etki mekanizmalarının incelenmesinde de faydalanılabilir (Smith & Simons, 2004).

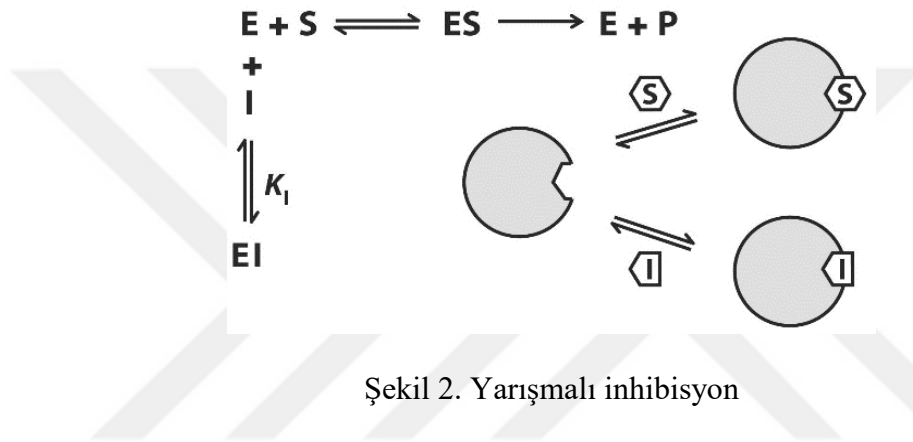
Enzim inhibisyonu dönüşümlü (tersinir) ve dönüşümsüz (tersinmez) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Dönüşümsüz inhibitörler, enzimin aktif bölgesindeki bazı fonksiyonel gruplarla kovalent bağ oluşturarak substratın bağlanmasını engellerler. Bu türden inhibitörler, enzim molekülünden uzaklaştırılamadığından enzimin kataliz yapma yeteneğini ortadan kaldırırlar. Bu özelliklerinden dolayı dönüşümsüz inhibitörler ister doğal ister sentetik olsun hemen hemen toksik maddelerdir ve hücre hasarına sebep olurlar. Örneğin, diizopropil florofosfat (DFP) ve sarin gibi organofosforlu bileşikler asetilkolin estera (AChE) adlı enzimin aktif bölgesinde bulunan spesifik bir serin birimine bağlanır ve aktiviteyi inhibe eder. AChE, dönüşümlü bir reaksiyon olan asetilkolinin, kolin ve asetik asitten sentezini katalizleyen bir enzimdir (Şekil 1). Asetilkolin oluşuktan sonra sinir sinyallerinin iletimi işlemlerine katılır. Dolayısıyla asetilkolin estera enziminin inhibisyonu ile sinir sinyallerinin taşınma işlemi durdurulmuş olur (Güner, 2007).



Şekil 1. Asetilkolin estera reaksiyonu

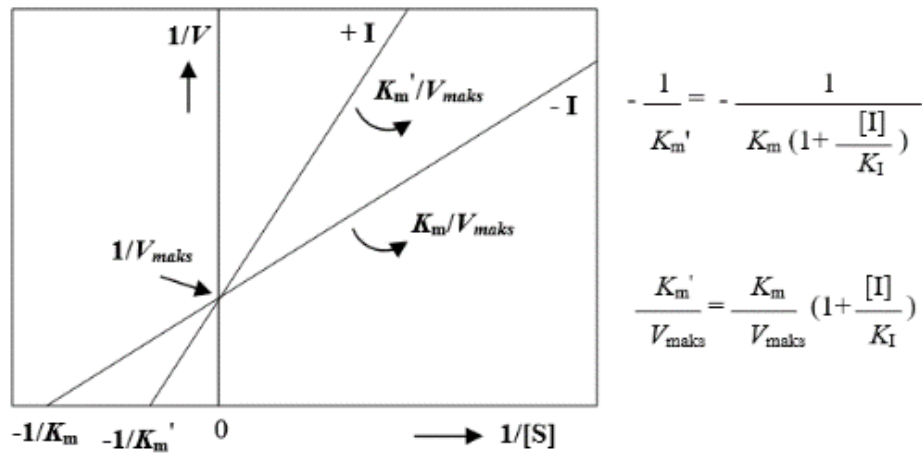
Dönüşümlü inhibitörler, enzime kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanır ve dolayısıyla enzim molekülünden uzaklaştırılabilirler. Dönüşümlü inhibisyon, mekanizmaları, enzim aktivitesine etkileri ve reaksiyon kinetiği açısından farklılıklar gösterir ve esasen üç farklı şekilde gerçekleşir. Bu inhibisyonlarda inhibitör molekülü ya enzim aktif bölgesine ya da aktif bölge dışındaki özel bölgelere bağlanır. Aktif bölgeye bağlanabilen inhibitörler yarışmalı (kompetitif) inhibitör olarak adlandırılır. Enzim aktivitesini aktif bölge dışındaki bölgelere bağlanarak engelleyen inhibitörler ise yarışmasız (un-competitif ve non-competitif) inhibitörlerdir.

Yarışmalı inhibitörlerin yapısı substrat molekülünün yapısını oldukça benzer. Dolayısıyla enzimin aktif bölgesine dönüşümlü olarak ve substratla yarışır gibi bağlanırlar. Böylece ya gerçek substrat ya da inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanır ve enzim-substrat (ES) veya enzim-inhibitör (EI) kompleksi oluşur. Substrat ve inhibitör enzime aynı anda bağlanmaz (Şekil 2). Dolayısıyla inhibitör madde enzime bağlandığında bir ürüne dönüşemeyeceğinden enzimin aktivitesi yavaşlar ve durur. Eğer ortamda inhibitöre oranla daha yüksek konsantrasyonlarda substrat varsa enzim aktivitesi tekrar substrat lehine döner (Nelson vd., 2008).



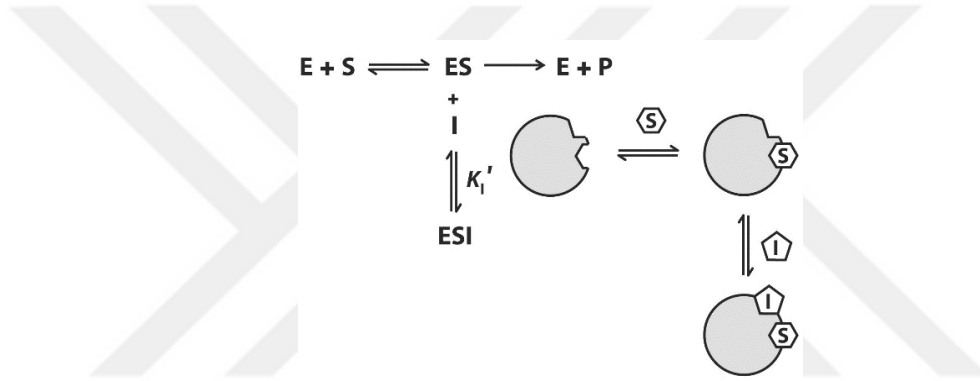
Şekil 2. Yarışmalı inhibisyon

Yarışmalı inhibisyonda, inhibitörün enzim aktif bölgesine bağlandığı denge işlemlerinde enzim-inhibitör kompleksinin oluşma ve bozulma işlemlerine ait hız sabitlerinin oranı inhibitör sabiti (K_i) ile belirlenir. Lineweaver - Burk grafiğinde inhibitör yokluğunda ve varlığında elde edilen doğruların aynı V_{maks} değerini vermesi (Şekil 3) yarışmalı inhibisyon olduğunu gösterir (Güner, 2007).



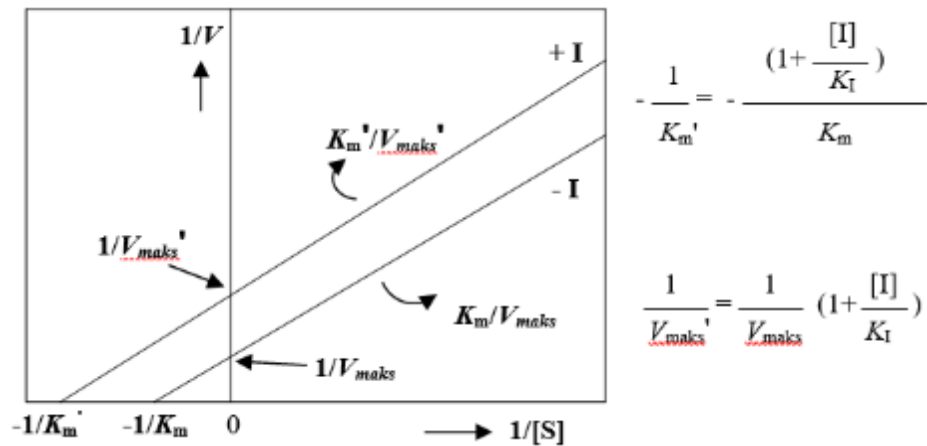
Şekil 3. Yarışmalı bir inhibisyon için Lineweaver - Burk grafiği

Yarışmasız inhibitörler, enzim yüzeyinde fakat aktif bölge dışında bir bölgeye dönüşümlü olarak ve büyük bir ilgiyle bağlanır. İki farklı şekilde gerçekleşebilen yarışmasız, inhibisyonda inhibitör molekülü ya sadece enzim substrat (ES) kompleksine bağlanabilir ya da substratın enzime bağlı olup olmadığından bağımsız olarak enzim türleri (E ve ES) ile etkileşebilir. İnhibitörün sadece ES ile etkileştiği inhibisyon türü yarışmasız (un-competitif) inhibisyonda olarak adlandırılır (Şekil 4). Bu inhibisyonda, inhibitör substratla hiçbir zaman yarışmaz ve substrat konsantrasyonunun artmasıyla inhibisyon ortadan kalkmaz. İnhibitörün bağlanmasıyla enzimin yapısında meydana gelecek değişimler sonucu enzim-substrat kompleksinde substrat molekülleri ürünlere dönüştürülemez (Nelson vd., 2008).



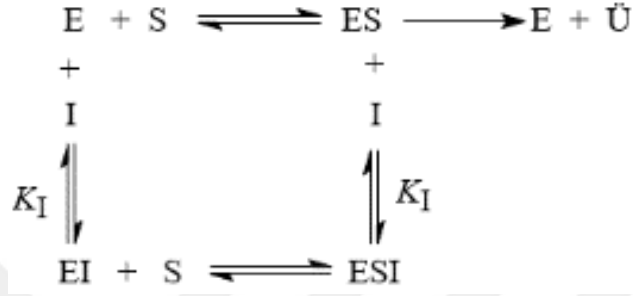
Şekil 4. Yarışmasız (un-competitif) inhibisyon

Un-competitif inhibisyonda, V_{maks} ve K_m değerlerinin her ikisi de değişir (Şekil 5).



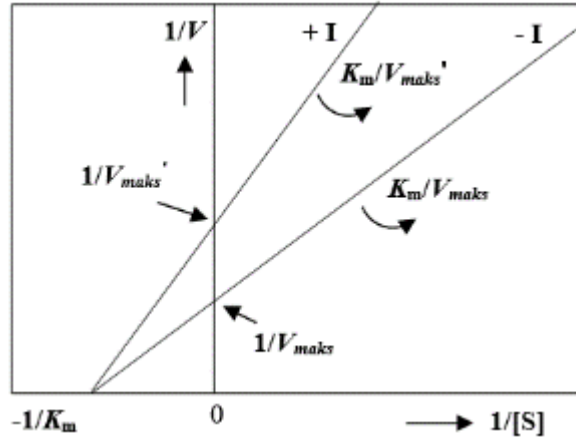
Şekil 5. Sadece ES kompleksine bağlanarak gerçekleşen yarışmasız bir inhibisyon (un-competitif) için Lineweaver - Burk grafiği

Diğer bir yarışmasız inhibisyon türü olan non-competitif inhibisyon enzimin substratı ile etkileşimine bağlı olmaksızın gerçekleşir. Bu türden inhibitörler serbest enzime ya da ES kompleksine bağlanabilir (Şekil 6). Böylece, inhibitör, enzime substrat bağlanmasını engellemez, ancak enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksi oluşturmak üzere ES kompleksine bağlanarak enzimatik reaksiyonu yavaşlatır (Keha & Küfrevioğlu, 2020).



Şekil 6. Yarışmasız (non-competitif) inhibisyon

Bu yolla gerçekleşen yarışmasız inhibisyonda V_{maks} değeri değişirken K_m değeri değişmez (Güner, 2007, Şekil 7).



$$\begin{aligned}
 -\frac{1}{V_{\text{maks}}'} &= -\frac{1}{V_{\text{maks}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \\
 \frac{K_m}{V_{\text{maks}}'} &= \frac{K_m}{V_{\text{maks}}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)
 \end{aligned}$$

Şekil 7. Substratın enzime bağlı olmasından bağımsız olarak gerçekleşen yarışmasız inhibisyon (non-competitif) için Lineweaver - Burk grafiği

1.2. Enzim İnhibisyonunun Farmasötik Önemi

Enzim inhibisyonu, farmakolojide önemli bir rol oynar çünkü birçok ilaç, enzimleri hedef alarak etki gösterir. Enzim inhibitörleri, biyolojik sistemlerde spesifik hücresel

reaksiyonları düzenleyerek veya durdurarak terapötik etki sağlayabilirler. Bu, özellikle enzimlerin aşırı aktif olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılabilir.

Örneğin, bir enzimin inhibisyonuna sebep olan bir ilaç, belirli bir biyokimyasal reaksiyonu engelleyerek hastalık semptomlarını hafifletebilir. Bu nedenle, enzim inhibitörleri, ilaç keşif sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, asetilkolin esterase (AChE) inhibitörlerinin Alzheimer hastalığı (AD), yaşlılık demansı, ataksi, miyastenia gravis ve Parkinson hastalığını iyileştirmede uygulamaları vardır. Glutasyon S- transferaz (GST) inhibitörleri, antikanser ve antiparazitik ilaç direnci problemlerinin üstesinden gelmek kullanılırlar. α -Glukozidaz aktivitesini inhibe eden bileşikler ise Tip 2 diyabet ve obezite problemlerinin tedavisinde kullanılmaktadır (Chauhan vd., 2012).

1.3. Diabetes Mellitus (DM)

Diyabet, insülin eksikliği ya da insülin etkisindeki defektler nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, sürekli tıbbi bakım gerektiren, kronik bir metabolizma hastalığıdır (Gül, 2015). Diyabet, her yıl dünya çapında bir milyondan fazla amputeden sorumludur, körlüğün ve böbrek yetmezliğinin en önemli nedenidir. Diyabetin; Tip 1 diyabet, Tip 2 diyabet, sekonder diyabet ve gestasyonel diyabet (gebelik diyabeti) olmak üzere 4 ana çeşidi vardır.

Tip 1 diyabet genellikle çocuklarda ve gençlerde görülmekle birlikte son yıllarda yetişkin yaşlarda saptanan Tip 1 diyabet olguları da artmaktadır. Erişkin yaşta (genellikle 30 yaşından sonra) görülen Tip 1 diyabet formu, erişkinde latent otoimmün diyabet (latent autoimmune diabetes in adult, LADA) olarak adlandırılmaktadır. Bunlarda, adacık otoantikorları pozitifdir. Tip 2 diyabet ise genellikle 30 yaşından sonra ortaya çıkmakla birlikte son yıllarda özellikle yaşam ve günlük aktivitelerdeki değişiklikler ve artan obezite sıklığı nedeniyle çocuk ve adölesan yaşlarında da görülmektedir (Yılmaz vd., 2019).

1.3.1. Tip 1 Diyabet

Tip 1 diyabet, tüm diyabet hastalarının %5-10'luk kısmını oluşturan, etiolojisinde genetik ve çevresel etkenlerin sorumlu olduğu, mutlak insülin yetmezliği ile sonuçlanan, otoimmünite ile ilişkili bir beta hücre yıkımı hastalığıdır (Kutlutürk, 2015). İnsülin,

vücuttaki hücrelere glukozun girişini sağlayan bir hormondur. Tip 1 diyabetli bireylerde, bağışıklık sistemi, insülin üretiminden sorumlu olan pankreasın beta hücrelerini hedef alarak yok eder. En sık görüldüğü yaş grubu 7–15 yaşlarıdır. Otoimmunitenin varlığına göre Tip 1a ve Tip 1b olarak ikiye ayrılmaktadır. Otoimmünite sonucu oluşan Tip 1a, olguların %90'ını oluştururken çocukluk yaş grubunda görülen otoimmun kaynaklı olmayan Tip 1b ise %10'luk kısmını oluşturmaktadır (Abacı vd., 2007). Tip 1 diyabetli bireyler genellikle ömür boyu insülin tedavisi alırlar. Bu ilaçlar, kan şekerini hedeflenen aralıklarda tutarak diyabetin uzun vadeli komplikasyonlarını azaltmaya yararlar.

1.3.2. Tip 2 Diyabet

Tip 2 diyabet, vücudun ürettiği insülinin etkili bir şekilde kullanılamadığı veya yeterli üretilmediği bir metabolik hastalıktır. Tip 2 diyabet genellikle yaş, obezite, genetik yatkınlık ve yaşam tarzı faktörleriyle ilişkilidir. Bu hastalıkta insülin direncinin gelişmesini takiben glukoz toleransında bir bozulmanın ve göreceli insülin eksikliğinin neden olduğu kan dolaşımındaki yüksek glukoz seviyeleri dikkat çekicidir. İnsülin direnci, kas hücrelerinin glukoz ve trigliseritleri alma ve saklama yeteneğini bozar. Böylelikle kanda dolaşan glukoz ve trigliserit seviyeleri artar. Bozulmuş glukoz seviyesi, kardiyovasküler hastalık için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilir (Çeliker, 2017).

Tip 2 diyabet genellikle yaşam tarzı değişiklikleri ve ilaç tedavisiyle yönetilebilir. Ancak, tedavinin etkinliği bireyden bireye değişebilir ve uzun vadeli sağlık yönetimi için düzenli izlemeler çok önemlidir. Tip 2 diyabetli birey sayısının 2030 yılına kadar 642 milyona çıkması beklenmektedir (Roglic, 2016).

1.3.3. Gestasyonel Diyabet (Gebelik Şekeri)

Gebelik ile ilişkili hiperglisemi, anne, fetüs ve yenidoğan için kötü sonuçlar doğurabilir (Geurtsen vd., 2019). Gebelik şekeri olan annelerden doğan yenidoğanların, erişkinlikte diyabet geliştirme riski daha yüksektir (Hollander vd., 2007). Erken doğum, gebelik haftasına göre büyük bebekler, makrosomi (doğum ağırlığı > 4,5 kg), sezaryen doğum ve preeklampsi gibi gebelik ile ilgili komplikasyonların artan sıklığı, öncelikle hamilelik sırasında hiperglisemiye bağlıdır. Gebelik şekeri, ailede diyabet öyküsü, obezite,

ileri anne yaşı, polikistik over sendromu, hareketsiz yaşam tarzı ve çevresel kirleticilere maruz kalma gibi çeşitli risk faktörlerinden etkilenebilir (Plows vd., 2018). Gebelik şekeri tanısı, açlık kan şekeri düzeylerini, 75 g oral glukoz yüklemenden sonraki kan şekeri düzeylerini ve diğer ilgili parametreleri değerlendirmeyi içeren belirli kriterlere dayanır (Chukwunyere vd., 2020).

Bu diyabet türleri yanında hibrit diyabet formları da mevcuttur. Bunlardan bazıları yavaş ilerleyen immün aracılı diyabet, ketozis eğilimli Tip 2 diyabet, beta hücre genetik bozuklukları, insülin fonksiyon genetik bozuklukları ve ilaç veya kimyasal madde indüklü diyabet olarak sıralanabilir (Antar vd., 2023).

1.4. α -Amilazlar, α -Glukozidazlar ve İnhibitörleri

α -Amilazlar (E.C. 3.2.1.1.), amiloz veya amilopektin zincirinin iç kısmında bulunan α -1,4 glikozidik bağlarını hidroliz ederek parçalar. Bunun sonucunda amilozdan maltotrioz ve maltoz, amilopektinden ise maltoz, glukoz ve limit dekstrinler oluşur (Brayer vd., 1995; Tiwari vd., 2015). α -Amilazların çoğu, aktiviteleri, yapısal bütünlükleri ve stabiliteyi için kalsiyum iyonlarına (Ca^{2+}) ihtiyaç duyan metaloenzimlerdir. Glikozit hidrolaz enzim grubunun 13. ailesine (GH-13) aittirler. Bu enzimler, katalitik bölge birimlerini içeren 8 (α/β) veya TIM varil yapısına sahiptir ve birincil yapılarında dört tane yüksek oranda korunmuş bölge içerirler (Svensson, 1994). Bu enzimler, dünya enzim üretiminin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. İnsan fizyolojisinde, hem tükürük hem de pankreasda ve ayrıca bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde (*Bacillus*) de bulunurlar (Tiwari vd., 2015).

α -glukozidazlar, mikroorganizmalar (bakteriler, küfler, mayalar), bitkiler ve hayvanlar dâhil olmak üzere doğada yaygın olarak bulunurlar. Bu enzimler, esas olarak maltooligosakkaritler gibi polisakkaritlerin indirgeyici olmayan ucundaki α -1,4-glikozidik bağların ekzohidrolizi ile glukozu serbest bırakan enzimlerdir (Zhai vd., 2022). İnsanlarda, ince bağırsağın fırçamsı kenarında ve lizozomlar gibi diğer hücresel bölmelerde yer alırlar (Almasi & Mohammadipanah, 2021). Birçok α -glukozidaz, özellikle glikozit hidrolaz (GH) ailesi 13'e ait olanlar, üç domainden oluşan ortak bir genel yapıya sahiptir: bir (β/α)8-varil kıvrımına sahip katalitik domain A, döngü açısından zengin bir domain B ve korunmuş bir domain C. Katalitik domain A tipik olarak domain B ve C arasında yer alır. Katalitik domaindeki tekrar eden (β/α)8-varil yapısı, farklı α -glukozidazlar arasında substrat bağlanması ve kataliz için korunmuş bir evrimsel köken ve ortak bir mekanizma

olduğunu düşündürmektedir. Ek domainlerin varlığı ise muhtemelen substrat özgüllüğüne ve düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (Zhai vd., 2022).

Günümüzde çok önemli hastalıklar, enzim inhibitörleri ile tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Bu hastalıkların en önemlilerinden bir tanesi kronik hiperglisemi ile karakterize edilen Diabetes Mellitus (DM)'dur. 20→yılında tahmini 422 milyon yetişkinin DM ile yaşadığı rapor edilmiştir. Bu sayının 2030 yılına kadar 642 milyona çıkacağı öngörülmektedir (Roglic, 2016).

Postprandiyal hiperglisemi, yemek yendikten sonra kan glukoz seviyesinin yüksek kaldığı bir durumdur ve diyabet ile diyabete bağlı retinopati, nöropati, kardiyovasküler hastalıklar gibi ikincil komplikasyonların yönetiminde dikkate alınması gereken çok önemli bir faktördür. Bu nedenle kan şekerinin belirli sınırlar içinde kontrol edilmesi gerekmektedir (Mcdougall & Stewart, 2005).

Gastrointestinal sistemde, kompleks karbohidratlar, çoklu parçalanma reaksiyonları ile ince bağırsakta emilebilen form olan monosakkaritlere parçalanırlar. Sindirim süreci, esas olarak pankreas ve tükürük bezleri tarafından üretilen α -amilazların (EC 3.2.1.1) salgılanmasıyla başlar. Bu enzim nişastanın daha kısa polisakkaritlere hidrolizini katalizler (Mandel & Breslin, 2012). Midenin asidik ortamı, tükürük amilazının enzimatik aktivitesini inhibe eder ve nişastanın daha fazla parçalanmasını engeller. Mide içeriğinin ince bağırsağa girmesiyle, kısmen hidrolize nişasta, pankreastan salgılanan ve α -1,4 bağlarını hedef alan α -amilazların etkisiyle daha küçük parçalara dönüşür (des Gachons & Breslin, 2016). Karbohidrat metabolizmasındaki son adım, enterositlerin lümen yüzeyinde bulunan ve ince bağırsakta salgılanan α -glukozidazlar (EC 3.2.1.20) aracılığıyla tamamlanır. α -glukozidazlar, disakkaritlerin (maltoz ve sakkaroz) hidrolitik olarak monosakkaritlere (glukoz ve fruktoz) parçalanmasını katalize eden anahtar enzimlerdir (Jongkees & Withers, 2014; Lombard vd., 2014). Yapılan çalışmalar, Tip 2 diyabet hastalarında α -glukozidazın 1,5 kat aşırı ekspres edildiğini ve böylelikle tokluk glukoz seviyelerindeki artışa katkıda bulunduğunu göstermiştir (Dyer vd., 2002).

Karbonhidrat sindiriminin son aşamalarını yavaşlatan ve sonuç olarak glukozun dolaşıma girişini önleyen α -amilaz ve α -glukozidaz inhibitörleri, hipergliseminin uygun bir profilaktik tedavisi olarak kabul edilir. Bu inhibitörler, genellikle hafif diyabet için bir monoterapi olarak veya şiddetli diyabet için diğer oral ilaçlar veya insülin ile kombinasyon halinde kullanılır (Gao vd., 2018).

Klinik uygulamada en çok kullanılan α -amilaz ve α -glukozidaz inhibitörleri akarboz, miglitol ve voglibozdur (Joshi vd., 2015). En sık reçete edilen ilaç olan akarboz aktinomisetler'den izole edilen bir psödo-karbohidrattır (Luo vd., 2001). Diğer mevcut inhibitörler arasındaki vogliboz mikrobiyal kaynaklı ve miglitol ise sentetik olarak 1-deoksinojirimisinden türetilen bir maddedir (Tan vd., 2018). Ancak, bu inhibitörler diyare, karın ağrısı ve gaz gibi hafif, kısa süreli ve doza bağlı gastrointestinal (GI) yan etkilere sebep olmaktadır (Hedrington & Davis, 2019). Bu nedenle, hastalığı yönetmek için, yan etkisi olmayan veya çok az olan doğal kaynaklı ürün veya sentetik kimyasal bileşiklerin alternatifleri çekici seçenekler olarak ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla, yeni α -amilaz ve α -glukozidaz inhibitörlerin araştırılması ve keşfedilmesi için sürekli bir çaba sarf edilmektedir (Chen vd., 2017; Abbas vd., 2019).

1.5. ADME Özellikleri

Farmasötik bileşiklerin emilim, dağılım, metabolizma ve eliminasyon (ADME) özelliklerinin tahminiyle ilgili araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır. ADME özellikleri belirlenmediğinde ilaç geliştirmenin son aşamalarındaki başarısızlıklar önemli derecede artmaktadır ve bu durum ilaç endüstrisindeki Ar-Ge maliyeti üzerinde büyük bir olumsuz etki yaratmaktadır. Moleküllerin ADME özelliklerini modelleme yeteneği, ilaç keşif sürecini kolaylaştırmaktadır. Günümüzde en yaygın kullanılan ADME modeli, Lipinski'nin 5 kuralıdır. Lipinski'nin 5 kuralı, ilaçlar ve ilaç olmayan bileşikler arasında ayrımı yapmak için yararlı bir araçtır.

Model, iki veya daha fazla kuralı karşılayan bileşikler için farmakolojik benzerliğe dayalı olarak yüksek başarı veya başarısızlık olasılığını öngörmektedir. Bir ilacın insan vücudundaki farmakokinetiği için önemli olan moleküler özelliklerin ana hatlarını çizen Lipinski'nin 5 kuralı, incelenen bileşiğin tanınmış ilaçlara benzerliğini karşılaştırmak için kullanılmaktadır. Lipinski'ye göre oral yoldan alınan aktif bir ilacın molekül ağırlığı (MW) ≤ 500 Da, $\text{LogP} \leq 5$ (veya $\text{MLogP} \leq 4,15$), hidrojen bağı akseptörlerinin sayısı ≤ 10 ve hidrojen bağı donörlerinin sayısı ≤ 5 olmalıdır. Ek olarak, tüm bileşiklerin 10'dan az dönebilen bağa ve 140'tan az A2 topolojik polar yüzey alanına (TPSA) sahip olması, bunların iyi oral biyoyararlılığını doğrulamaktadır. İlaç olarak etki gösteren bileşikler aynı zamanda %64,44 ile %97,69 arasında kayda değer bir emilim yüzdesi aralığı da gösterir.

Bu nedenle, bu kural ile uyumlu olan bileşikler, doğada ilaç benzeri olarak kabul edilir (Lipinski vd., 1997; Veber vd., 2002; Kerkour vd., 2024).

1.6. Moleküler Modelleme

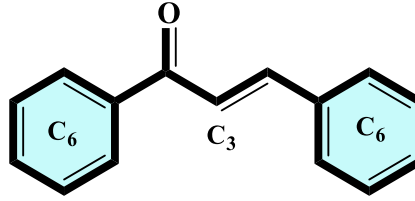
Moleküler modelleme çalışmaları, küçük bir molekül ile bir protein arasındaki atomik seviyedeki etkileşimi açıklamak için kullanılabilen ve hedef proteinlerin bağlanma bölgesindeki küçük moleküllerin davranışını karakterize etmenin yanı sıra temel biyokimyasal süreçlerin açıklanmasına da olanak tanımaktadır (McConkey vd., 2002). Modelleme işlemi iki temel adımı içerir. Bunlardan ilki ligand konformasyonunun proteinin ilgili bölgesi içindeki konumu ve yöneliminin tahminidir. İkinci basamakta ise bağlanma afinitesi belirlenir ve değerlendirilir (Meng vd., 2011).

Modelleme işlemleri öncesinde bağlanma yerinin konumunun bilinmesi, işlemin verimliliğini önemli ölçüde artırır. Çoğu durumda bağlanma bölgesi, ligandların buraya yerleştirilmesinden önce bilinir. Ayrıca, hedef proteinin benzer bir işlevi paylaşan bir protein ailesiyle veya diğer ligandlarla birlikte kristalize edilmiş proteinlerle karşılaştırılması yoluyla alanlar hakkında bilgi elde edilebilir. Bağlanma bölgeleri hakkında herhangi bir bilgi mevcut değilse, GRID (Goodford, 1978; Kastenholz vd., 2000), POCKET (Levitt, 1992), PASS (Brady & Stouten, 2000) ve MMC (Mezei, 2003) gibi kavite tespit programları veya çevrimiçi sunucular kullanılarak proteinler içindeki aktif bölgeler tespit edilebilir.

Moleküler modelleme teknikleri için hem ticari hem de ücretsiz şekilde ulaşılabilen çeşitli hesaplama araçları ve algoritmalar mevcuttur. Bu programlar ve araçlar, ilaç araştırmalarında ve akademik alanlarda kullanılmaktadır (Agu vd., 2023). Bunlar içinde sık kullanılan yerleştirme programlarından bazıları AutoDock Vina, Discovery Studio, Surflex, AutoDock GOLD, Glide, MCDock, MOE-Dock, FlexX, DOCK, LeDock, rDock, ICM, Cdcker, LigandFit, FRED ve UCSF Dock'dur. Bu programlar arasında AutoDock Vina, Glide ve AutoDock GOLD ise en çok tercih edilen seçenekler olarak belirlenmiştir (Potluri vd., 2021; Ghode & Jain, 2018; Tomar, 2018).

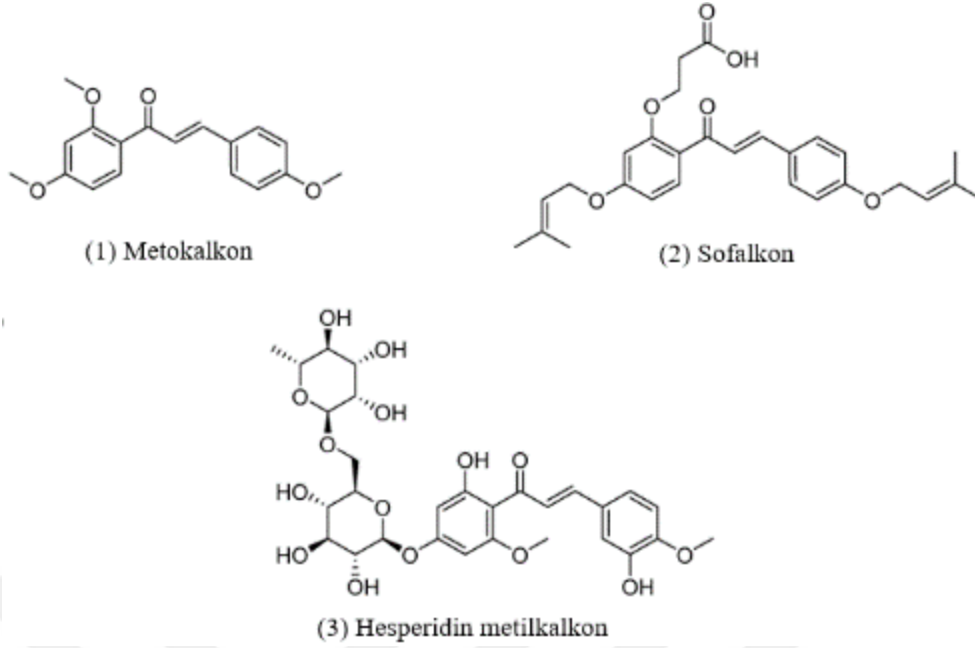
1.7. Kalkon ve Pirazolin Türevleri

Kalkonlar, iki aromatik halkanın α,β -doymamış karbonil sistemini içeren üç zincirli bir birimle birbirine bağlanması sonucu oluşan açık zincirli flavonoid sınıfı bileşiklerdir ($C_6-C_3-C_6$) (Şekil 8).



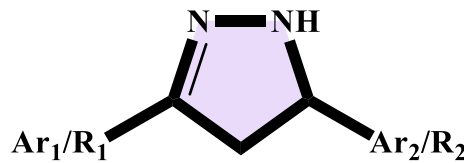
Şekil 8. Kalkonların genel yapısı

Son yıllarda yapılarında flor atomu ihtiva eden potansiyel ilaç adayı olabilecek kalkonlar oldukça yaygın hale gelmiştir. Kalkonlar, aynı zamanda insan kanserlerinin tedavisi için umut verici iyileştirici etki gösteren anti kanser ajanlarının bir sınıfıdır (Yıldız & Arı, 2023). Flor atomunun biyolojik olarak aktif bir molekülün yapısında yer almasının minimum sterik etkiye sebep olduğu ve enzimlerin aktif bölgeleri ve diğer biyolojik sistemlerle etkileşimi kolaylaştırdığı bildirilmektedir. α,β -Doymamış ketonlar olarak da adlandırılan kalkonlar doğal ürünlerin önemli bileşenleri olmalarının yanında sentetik türevlendirmeler için de çok önemli öncül bileşiklerdir (Burmaoğlu, 2017). Kalkonlar ve bunların sentetik türevleri antihipertansif, antidiyabetik, antiretroviral, antihistaminik, antiinflamatuvar, antioksidan, antitüberküloz, antifungal, antiülser ve antikanser gibi çok geniş farmakolojik özelliklere sahiptirler (Mahapata vd., 2015). Örneğin, metokalkon (1) koleretik ve diüretik olarak, sofalkon (2) antiülserik ve mukoprotektif olarak ve hesperidin metilkalkon (3) vasküler koruyucu olarak klinik onaylı olan ilaçlar arasındadır (Ouyang vd., 2021), (Şekil 9).



Şekil 9. Onaylanmış ve klinik olarak test edilmiş bazı kalkonların kimyasal yapıları

Kalkonlar sadece sergiledikleri biyolojik aktivitelerle değil aynı zamanda yeni bileşiklerin sentezinde de iyi bir öncül oldukları için önemlidirler. İçerdikleri α,β -doymamış karbonil birimi ve süstitüe aromatik halka sayesinde kimyasal olarak oldukça aktif olup 5, 6 ve 7 üyeli heterosiklik bileşiklerin sentezinde uygun ara ürünlerdir. Heterosiklik bileşikler, organik bileşiklerin en önemli kategorisidir. Tüm biyolojik süreçler esas olarak heterosiklik yapıya sahip organik moleküller tarafından düzenlenir. Bu bağlamda kalkon bileşiklerine hidrazin hidratın asit katalizli ortamda Michael katılması sonucu 3,5-disüstitüe-2-pirazolin bileşiklerinin sentezi gerçekleştirilmektedir. Pirazolin sınıfı bileşikler, halka yapısında üç karbon atomu, birbirine komşu iki azot atomu ve bir çifte bağ içeren beş üyeli heterosikliklerin bir sınıfıdır (Varghese vd., 2017; Ardiansah, 2018; Vincent vd., 2020), (Şekil 10). Bu bileşikler doğada alkaloid, vitamin, pigment, hayvan ve bitki hücre bileşenleri olarak değişik formlarda yaygın bir şekilde bulunmaktadır (Kahriman, 2020).

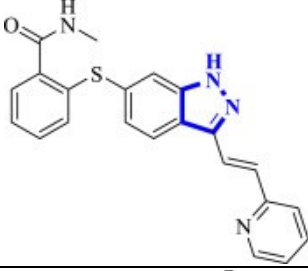
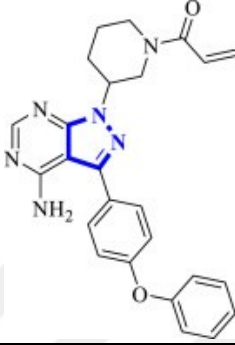
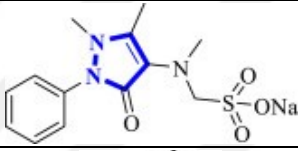
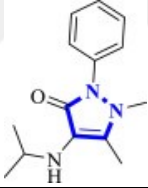
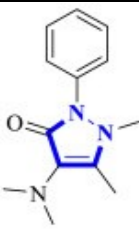
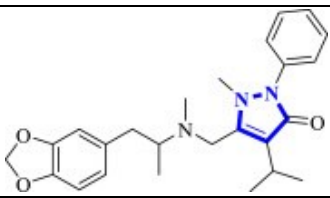
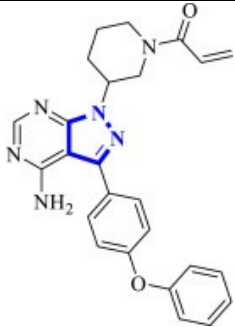


Şekil 10. 3,5-Disüstitüe pirazolin halka sistemi

İnsanlar üzerinde farmakolojik etkileri olan bu bileşikler, doğada nadir olmalarına rağmen alkaloit olarak ta sınıflandırılır. Tıbbi kimya alanında çok sayıda bilim insanı, bir dizi hastalığı tedavi etmek için pirazolin sistemi üzerinde kapsamlı çalışmalar gerçekleştirmektedir. Birçok pirazolin türevinin çeşitli pestisit, fungusit, antibakteriyal, antidiyabetik, antimalaryal, antitümör, antifungal, antidepresan, anti-Alzheimer, antitüberküloz, antikanser, anti-EGFR ve anti-Parkinson aktivite, monoanmin oksidaz inhibitörü ve böcek öldürücü olarak kullanıldığı bilinmektedir (Kahriman vd., 2017; Kahriman, 2020; Kumar vd., 2020; Saeed vd., 2024).

Fenazon / amidopiren / metampiron (analjezikler), azolid / tandearil (antiinflamatuvarlar), indoksakarb (insektisitler) ve anturan / allopurinol (ürikozürikler) molekülleri ilaç olarak kullanılan sayısız biyoaktif pirazolin sınıfı bileşiklerden sadece bir kaçıdır (Bardalai & Panneerselvam, 2012). Pirazolin yapısı içeren ve klinik olarak onaylanmış ilaçların bazılarının yapısı Tablo 1’de görülmektedir (Haider vd., 2022).

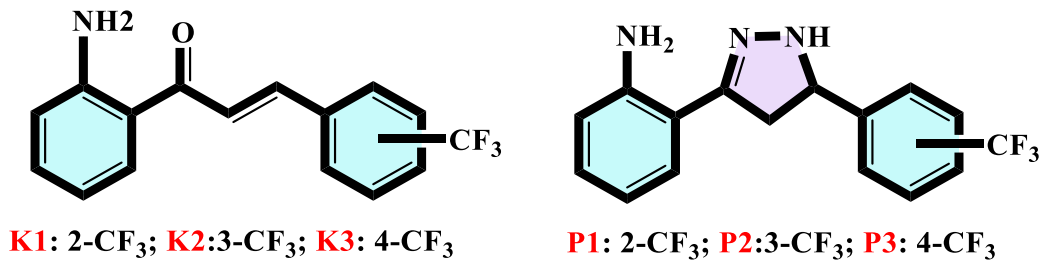
Tablo 1. Pirazolin içeren klinik olarak onaylanmış ilaçların bazıları

İlaç	Yapısı	Klinik endikasyonu
Aksitinib (Inlyta)		Aksitinib, şiddetli aplastik anemi ve dirençli aplastik anemi için antikanser ilacı olarak kullanılan bir tirozin kinaz inhibitörüdür.
Fenazon (Antipyrine)		Penazon, analjezik ve antipiretik olarak kullanılan, non-steroidal antiinflamatuvar bir ilaçtır.
Metampiron (Analgin)		Metampiron, ağrı kesici olarak ve ateşli durumlarda kullanılan bir ilaçtır.
Ramifenazon		Analjenik ve antipiretik olarak kullanılan bir ilaçtır.
Aminopiren (Pyramidon)		Analjenik, antiinflamatuvar ve antipiretik olarak kullanılan bir ilaçtır.
Famprofazon		Famprofazon ateş tedavisinde kullanılan nonsteroidal antiinflamatuvar bir ilaçtır.
Ibrutinib (Imbruvica)		Ibrutinib, tirozin kinaz inhibitörüdür. Kronik lenfositik lösemi ve lenfoma tedavisinde kullanılır.

1.8. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Yukarıda da bahsedildiği gibi daha önceki çalışmalarda kalkon türevlerinin antidiyabetik, antiinflamatuvar, hipolipidemik vb. olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteler gösterdiği tespit edilmiştir. Özellikle, sentetik ve doğal kalkonların (bitkilerden izole edilmiş) antidiyabetik aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalarla umut verici sonuçlar elde edilmiştir (Kahssay vd., 2021). Ayrıca yine antioksidan, antiinflamatuvar, antifungal, analjezik, antipiretik, antibakteriyel, antidiyabetik, antiviral ve antitümoral gibi biyolojik aktiviteleri olduğu bilinen pirazolinler son zamanlarda tıbbi kimyadaki en değerli heterosiklik yapılardan biri olarak kabul edilmektedir (Haider vd., 2022).

Hem kalkon bileşiklerinin, hem de pirazolin bileşiklerinin oldukça biyoaktif bileşikler olmaları, bu bileşiklerin antidiyabetik özellikleri üzerine çalışmaların sınırlı olması ve diyabetin günümüzün en ciddi problemlerinden birisinin olması sebebiyle bu tez çalışmasında bazı aminofenil ve 2/3/4-triflorometilfenil sübstitüe kalkon ve pirazolin türevlerinin antidiyabetik özelliklerinin araştırılması hedeflendi. Bu bağlamda, KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nuran KAHRİMAN tarafından sentezlenen 3 adet kalkon (**K1**, **K2**, **K3**) ve 3 adet pirazolin (**P1**, **P2** ve **P3**) bileşiğinin α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerine inhibitör etkilerinin *in vitro* ve *in silico* olarak incelenmesi amaçlandı. Bu bileşiklerden **K2** ve **K3** literatürde mevcut bileşikler olmasına rağmen, bu bileşiklerin bu enzimlere karşı inhibitör özelliklerinin araştırılmasına dair herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır (Zhang vd., 2021). **K1**, **P1**, **P2** ve **P3** bileşikleri ise ilk defa bu çalışma kapsamında sentezlenen yeni bileşiklerdir (Şekil 11).



Şekil 11. Sentezlenen kalkon ve pirazolin bileşiklerinin yapıları

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Materyaller

2.1.1. Cihazlar, Enzimler ve Bazı Kimyasallar

Çalışmada, kullanılan cihazlar ile enzimler ve bazı kimyasal maddeler sırasıyla Tablo 2 ve 3'te verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka	Model
Spektrofotometre	Perkin Elmer	Lambda 25
Mikrotüpler İçin Termal Sallayıcı	Boeco	TS-100 Thermo Shaker
Saf Su Cihazı	Sartorius	Arium 611UV
pH Metre	InoLab	WTW pH 720
Buz Makinesi	Hoshizaki	FM-80EE
Vorteks	Thermolyne	Type 37600 Mixer
Buzdolabı	Profilo	BD4303ANFE
Terazi	Ohaus	Pioneer
Otomatik pipetler	Socorex	Acura 825

Tablo 3. Kullanılan enzimler ve bazı kimyasal maddeler

Enzimler/Kimyasallar	Markası/Kodu
α -Glucosidase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sigma-G5003
α -Amylase from porcine pancreas	Sigma-A3176
4-Nitrofenil α -D-glukopiranozid (pNPG)	Sigma- N1377
Akarboz	Sigma-PHR1253
Çözünür nişasta	Sigma- S9765

2.1.2. Çözeltiler

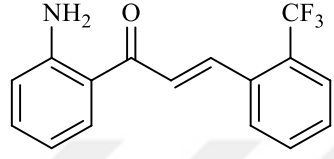
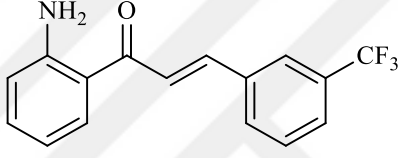
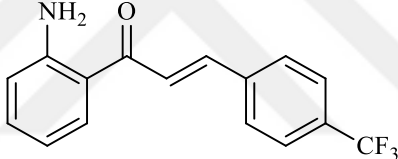
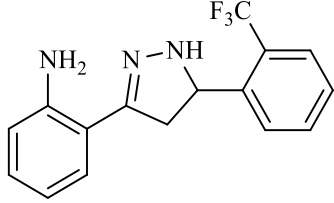
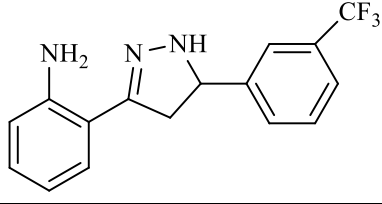
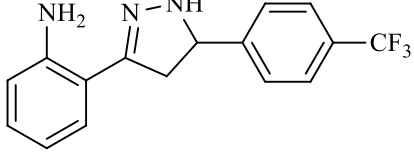
Yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltilerin, içerikleri ve hazırlanışları aşağıda verilmiş olup aksi belirtilmedikçe bütün çözeltiler saf su ile hazırlanmıştır.

- 6 mM Sodyum Klorür (NaCl) İçeren Fosfat Tamponu (20 mM, pH 7,0): 0,4175 g KH_2PO_4 , 0,3365 g K_2HPO_4 ve 0,0877 g NaCl yaklaşık 240 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 7,0'a ayarlandı ve hacmi 250 mL'ye tamamlandı.
- Stok α -Amilaz Çözeltisi (4,8 U/mL): 10 mg enzim 6 mM NaCl içeren fosfat tamponunda (20 mM, pH 7,0) çözüldükten hacmi yine aynı tamponla 25 mL'ye tamamlandı. Elde edilen enzim çözeltisi küçük porsiyonlar şeklinde ependorf tüplere ayrılarak 9 güne kadar -20°C 'de saklandı.
- Çalışma α -Amilaz Çözeltisi (1 U/mL): 208 μL stok enzim çözeltisi üzerine 792 μL 6 mM NaCl içeren fosfat tamponu (20 mM, pH 7,0) ilave edilerek hazırlandı.
- Nişasta Çözeltisi (%1): 0,5 g çözüner nişasta saf su ile bulamaç haline getirilerek önceden kaynamaya bırakılmış olan yaklaşık 40 mL saf suyun içine katıldı. Berraklaşana kadar kaynatılıp soğutulduktan sonra hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Çözelti A: 0,1035 g NaOH, 1 mL fenol çözeltisi (Sigma-P4557) ve 9,3 mL saf su iyice karıştırılıp 1,035 g sodyum bisüfit ilave edildi.
- Çözelti B: 1,32 g dinitrosalisilik asit (DNS) 177 mL saf su ile çözüldükten sonra 2,025 g NaOH ve 33,75 g Na-K tartarat ilave edilerek çözüldü.
- Dinitrosalisilik asit (DNS) çözeltisi: Çözelti A ve Çözelti B'nin karıştırılması ile hazırlandı.
- Fosfat Tamponu (100 mM, pH 6,8): 2,4335 g KH_2PO_4 ve 1,2392 g K_2HPO_4 yaklaşık 240 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 6,8'e ayarlandı ve hacmi 250 mL'ye tamamlandı.
- Stok α -Glukozidaz Çözeltisi (30,9 U/mL): 3,2 mg enzim 1,5 mL fosfat tamponunda (100 mM, pH 6,8) çözüldükten sonra küçük porsiyonlar şeklinde ependorf tüplere ayrılarak -20°C 'de saklandı.
- Çalışma α -Glukozidaz Çözeltisi (1 U/mL): 48,5 μL stok enzim çözeltisi üzerine 1451,5 μL fosfat tamponu (100 mM, pH 6,8) ilave edilerek hazırlandı.
- 4-Nitrofenil α -D-glukopiranozid (pNPG) çözeltisi (5 mM): 15,1 mg pNPG, fosfat tamponunda (100 mM, pH 6,8) çözüldükten sonra hacmi yine aynı tamponla 10 mL'ye tamamlandı.

2.1.3. Organik Moleküller

α -Glukozidaz ve α -amilaz aktiviteleri üzerindeki etkileri incelenen kalkon (**K1**, **K2** ve **K3**) ve pirazolin türevi (**P1**, **P2** ve **P3**) moleküller Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Kalkon ve pirazolin türevi moleküller

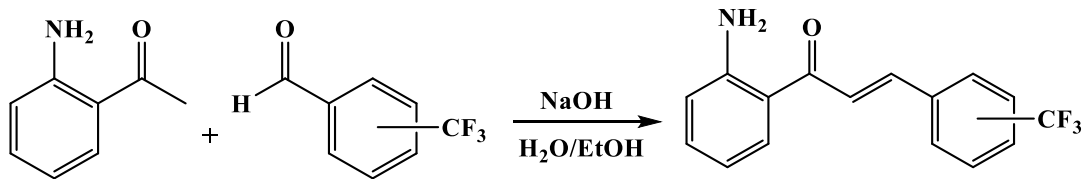
Kodu	Adlandırması	Açık Formülü	Molekül ağırlığı (g/mol)
K1	(<i>E</i>)-1-(2-aminophenyl)-3-(2-(trifluoromethyl)phenyl)prop-2-en-1-one		291,27
K2	(<i>E</i>)-1-(2-aminophenyl)-3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)prop-2-en-1-one		291,27
K3	(<i>E</i>)-1-(2-aminophenyl)-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)prop-2-en-1-one		291,27
P1	2-(5-(2-(trifluoromethyl)phenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)aniline		305,11
P2	2-(5-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)aniline		305,11
P3	2-(5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)aniline		305,11

- Sentezde Kullanılan Çözücüler, Kimyasallar ve Enstrümantasyon

Organik moleküllerin sentez çalışmalarında kullanılan; 2'-aminoasetofenon, 2/3/4-(triflorometil)benzaldehit ve hidrazin monohidrat Merck ve Sigma-Aldrich marka kimyasallardır. Sodyum hidroksit, etanol, Acros Organics; glasiyel asetik asit, hekzan, dietileter, kloroform ve etilasetat Isolab marka olup analitik saflıktaki kimyasallardır. Bileşiklerin yapı tayininde Bruker marka 400 MHz NMR ve Perkin-Elmer marka 1600 FT-IR ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) spektrofotometre cihazı kullanıldı. Elde edilen bileşiklerin erime noktaları Stuart marka SMP10 model erime noktası tayin cihazı kullanılarak belirlendi. Bileşiklerin saflaştırmalarında ise kolon kromatografisi (KK) ve ince tabaka kromatografisi (İTK) kullanıldı.

- Kalkon Türevi Bileşiklerin (K1, K2, K3) Sentezi

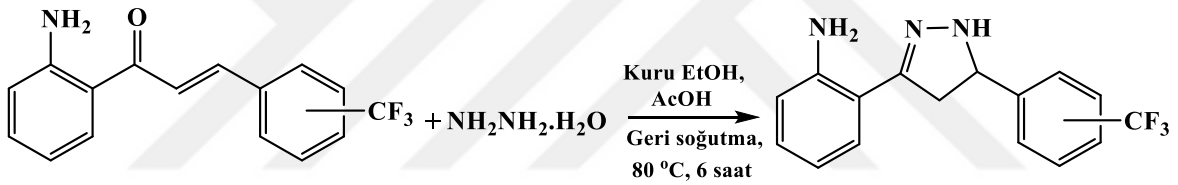
Kalkon türevi bileşiklerin (**K1**, **K2**, **K3**) sentezi için Claisen-Schmidt kondenzasyonu kullanıldı (Kahrman vd., 2017; Kahrman, 2020). Bir beher içerisine konulan su-etil alkol (1:2, 30 mL) çözücü karışımına NaOH (5 g, 12,5 mmol) ilave edilip oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak çözüldü. Hazırlanan NaOH çözeltisi üzerine etil alkoldeki (10 mL) 2'-aminoasetofenon (1,35 g, 10 mmol) ilave edilerek tamamen çözününceye kadar karıştırıldı. Çözelti üzerine etil alkoldeki (10 mL) 2/3/4-(triflorometil)benzaldehit (sırasıyla 1,35 mL / 1,38 mL / 1,39 mL, 10 mmol) 30 dakika boyunca damla damla ilave edildi. Reaksiyon oda sıcaklığında 12 saat devam ettirildi ve reaksiyon ilerleyişi İTK ile kontrol edildi. Tamamlanan reaksiyon karışımı üzerine su ilave edilerek çökenin tamamlanması sağlandı. Çöken katı maddenin olgunlaşması için karışım bir gece buzdolabında bekletildi. Daha sonra çöken kısım krozeden süzülüp ve soğuk su ile yıkandı. Elde edilen sarı renkli bileşikler liyofilizatörde kurutuldu. Bir miktar katı alınarak kloroform ile çözüldü ve İTK ile elde edilen maddelerin saflık kontrolü yapıldı. Bileşiklerin yapısı spektroskopik yöntemlerle ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), FT-IR) aydınlatıldı. Bileşiklere ait sentez denklemi Şekil 12'de verildi.



Şekil 12. Kalkon bileşiklerine ait genel sentez denklemi

- 3,5- Disüstitüe-2-Pirazolin Türevi Bileşiklerin (P1,P2, P3) Sentezi

3,5-Disüstitüe-2-pirazolin bileşiklerinin (**P1**, **P2**, **P3**) sentezi, kalkonlara asit katalizli ortamda hidrazin monohidratın Michael katılması reaksiyonu ile gerçekleştirildi (Kahriman vd., 2017; Kahriman, 2020). Pirazolin türevlerinin sentezi için kalkon bileşikleri (1,45 g, 5 mmol) ayrı ayrı 50 mL'lik yuvarlak dipli balonlara alındı ve üzerlerine 20 mL kuru etanol ilave edildi. Oluşan çözeltilere hidrazin monohidrat (0,5 mL, 10 mmol), 2 mL glasiyel asetik asit ilave edilerek reaksiyon karışımları 6 saat geri soğutucu altında 80 °C'de karıştırıldı. Reaksiyonların ilerleyişi İTK ile takip edilerek sonlandırıldı ve soğutulan reaksiyon içerikleri tuz içeren soğuk su üzerine dökülerek çöktürüldü. Oluşan beyaz katılar hava ile temas etmeyecek şekilde saf su ile yıkanıp, krozedden süzüldü ve liyofilizatörde kurutuldu. Bileşiklerin saflık kontrolü İTK ile yapıldı ve yapıları spektroskopik yöntemlerle (¹H-NMR, ¹³C-NMR (APT), FT-IR) aydınlatıldı. Bileşiklere ait sentez denklemi Şekil 13'te verildi.



Şekil 13. 3,5-Disüstitüe-2-pirazolin bileşiklerine ait genel sentez denklemi

2.2. Organik Moleküllerin α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

2.2.1. α -Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

α -Amilaz aktivitesi, küçük değişikliklerle birlikte kolorimetrik bir yöntem olan dinitrosalisilik asit (DNS) metoduna göre belirlendi. Bunun için Tablo 5'te görülen miktarlardaki çözeltiler bir araya getirilerek 37°C'de 10 dakikalık bir inkübasyon gerçekleştirildi. Ardından her bir deney tüpüne 500 μ L dinitrosalisilik asit (DNS) çözeltisi ilave edilerek kaynar su banyosunda 10 dakika bekletildi. Reaksiyon karışımları 500 μ L saf su ilave edilerek seyreltildi ve 540 nm'de absorbanlar okundu. Aynı yöntemle fakat enzim içermeyecek şekilde kör reaksiyon çözeltileri de hazırlandı. Bir ünite (U) α -amilaz aktivitesi, reaksiyon şartlarında 1 dakikada açığa çıkan 1 μ mol maltoz miktarı olarak hesaplandı (Miller, 1959; Arunachalam vd., 2024; Yildirim Akatin vd., 2024).

Tablo 5. α -Amilaz aktivitesi için standart reaksiyon karışımı

Çözeltiler	Kör (μ L)	Numune (μ L)
Nişasta Çözeltisi (%1)	50	50
6 mM NaCl İřeren Fosfat Tamponu (20 mM, pH 7,0)	450	430
α -Amilaz Çözeltisi (1 U/mL)	---	20

2.2.2. Organik Moleküllerin α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Organik moleküllerin (K1, K2, K3, P1, P2 ve P3) α -amilaz aktivitesi üzerine etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla öncelikle DMSO kullanılarak stok çözeltileri hazırlandı. Sonrasında her bir organik molekül için ayrı ayrı olacak şekilde, Tablo 5’de verilen standart reaksiyon karışımına farklı konsantrasyonlarda organik molekül çözeltileri ilave edildi ve “2.2.1. α -Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi” kısmında belirtildiğı gibi enzim aktivitesi tayini gerçekleştirildi. Bu esnada, DMSO, enzim aktivitesini olumsuz yönde etkileyebileceğı için reaksiyon karışımı hazırlanırken konsantrasyonunun %2’yi geçmemesine özellikle dikkat edildi (Copeland, 2005). Organik molekül ilave edilmeden elde edilen enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilip, her bir konsantrasyondaki organik molekül varlığında inhibisyon oranları hesaplandı. Sonrasında organik molekül konsantrasyonuna karşı %Bağıl Aktivite değerleri grafiğē geçirilip enzim aktivitesini %50 oranında inhibe eden madde konsantrasyonu yani IC_{50} değeri hesaplandı. Standart inhibitör olarak akarboz kullanıldı (Arunachallam vd., 2024; Yildirim Akatin vd., 2024).

2.3. Organik Moleküllerin α -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

2.3.1. α -Glukozidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

α -Glukozidaz aktivitesinin belirlenmesi için Tablo 6’daki reaksiyon karışımı hazırlandı ve 37°C’de 15 dakikalık bir inkübasyon gerçekleştirildi. Ardından her bir deney tüpüne 500 μ L 0,1 M Na_2CO_3 ilave edildi ve 405 nm’de absorbansalar okundu. Aynı yöntemle fakat enzim içermeyecek şekilde kör reaksiyon çözeltileri de hazırlandı. Bir ünite (U) α -glukozidaz aktivitesi, reaksiyon şartlarında 1 dakikada açığa çıkan 1 μ mol p-

nitrofenol miktarı olarak hesaplandı (Mohamed vd., 2012; Yildirim Akatin vd., 2024; Ertunga vd., 2024).

Tablo 6. α -Glukozidaz aktivitesi için standart reaksiyon karışımı

Çözeltiler	Kör (μ L)	Numune (μ L)
4-Nitrofenil α -D-glukopiranozid (pNPG) çözeltisi (5 mM)	45	45
Fosfat Tamponu (100 mM, pH 6,8)	705	690
α -Glukozidaz Çözeltisi (1 U/mL)	---	15

2.3.2. Organik Moleküllerin α -Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Organik moleküllerin (K1, K2, K3, P1, P2 ve P3) α -glukozidaz aktivitesi üzerine etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla öncelikle DMSO kullanılarak stok çözeltileri hazırlandı. Sonrasında her bir organik molekül için ayrı ayrı olacak şekilde, Tablo 6’da verilen standart reaksiyon karışımına farklı konsantrasyonlarda organik molekül çözeltileri ilave edildi ve “2.3.1. α -Glukozidaz Aktivitesinin Belirlenmesi” kısmında belirtildiği gibi enzim aktivitesi tayini gerçekleştirildi. Bu esnada yine α -amilaz çalışmalarında olduğu gibi, DMSO, enzim aktivitesini olumsuz yönde etkileyebileceği için reaksiyon karışımı hazırlanırken konsantrasyonunun %2’yi geçmemesine özellikle dikkat edildi (Copeland, 2005). Organik molekül ilave edilmeden elde edilen enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilip, her bir konsantrasyondaki organik molekül varlığında inhibisyon oranları hesaplandı. Sonrasında organik molekül konsantrasyonuna karşı %Bağıl Aktivite değerleri grafiğe geçirilip enzim aktivitesini %50 oranında inhibe eden madde konsantrasyonu yani IC_{50} değeri hesaplandı. Standart inhibitör olarak akarboz kullanıldı (Mohamed vd., 2012; Yildirim Akatin vd., 2024; Ertunga vd., 2024).

2.4. İnhibisyon Çeşidinin Belirlenmesi

Her bir enzimi en iyi inhibe eden yani en düşük IC_{50} değerine sahip olan organik molekülün inhibisyon çeşidini bulmak amacıyla organik molekülün farklı konsantrasyonları varlığında ve yokluğunda Lineweaver - Burk grafikleri çizildi. K_m ve V_{maks} değerlerindeki değişime göre inhibisyon çeşidi belirlendi. Ayrıca K_i değeri de matematiksel olarak hesaplandı (Güner, 2007).

2.5. ADME Özellikleri

Bu tez kapsamında inhibitör özellikleri çalışılan 6 farklı molekülün ve standart inhibitör olan akarbozun ADME özellikleri Molinspiration ve SwissADME internet araçları kullanılarak belirlendi (Kaczmarek vd., 2024).

2.6. Moleküler Modelleme Çalışmaları

Sentezlenen kalkon ve pirazolin türevi moleküllerin α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyonu açısından etkinliğini bulabilmek amacıyla teorik olarak moleküler modelleme hesaplamaları gerçekleştirildi.

Tez kapsamında kullanılan organik moleküllerin optimizasyon çalışmaları Spartan 18 V1.3.0 programı ile yapıldı. Optimizasyon metodu olarak “Conformer distribution with molecular mechanics/MMFF, equilibrium geometry at ground in gas with semi empirical/PM6 ve density functional/M06-2X/6-31G**” seçildi ve bileşikler için en uygun konformasyon belirlendi. Modellemede kullanılan α -amilaz (PDB ID: 2QV4, Human pancreatic alpha-amylase complexed with nitrite and acarbose) ve α -glukozidaz (PDB ID: 5NN8, Crystal structure of human lysosomal acid-alpha-glucosidase, GAA, in complex with acarbose) enzimlerinin kristal yapılarına Protein Veri Bankasından (PDB) ulaşıldı. Enzimler, Autodock Tools-1.5.6 programı ile moleküler modelleme için hazırlanırken su molekülleri, heteroatomlar ve birlikte kristalize olmuş ligandların tamamı uzaklaştırıldı (Kothari vd., 2024). Bileşiklerin enzim aktif bölgesi ile etkileşimleri ise Discovery Studio 4.5 Visualizer programı kullanılarak gösterildi (Macalino vd., 2015; Meng vd., 2011; Ayazoğlu Demir vd., 2019).

2.7. İstatistiksel Analiz

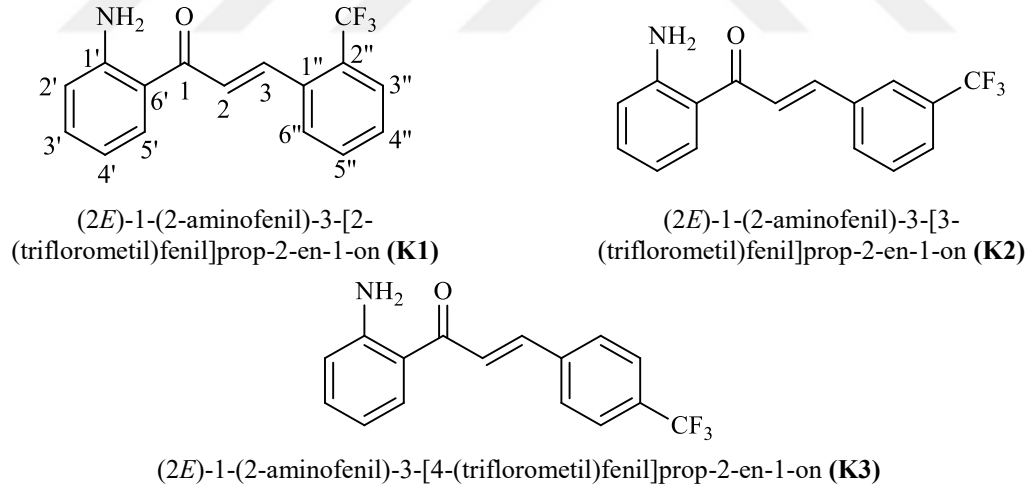
Bütün denemeler 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı ($n=3$, ortalama $\pm$ standart sapma). Elde edilen veriler SPSS kullanılarak tek yönlü varyans analizi Anova ve Duncan çoklu kıyaslama testi ile analiz edildi (version 26.0 software, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. BULGULAR

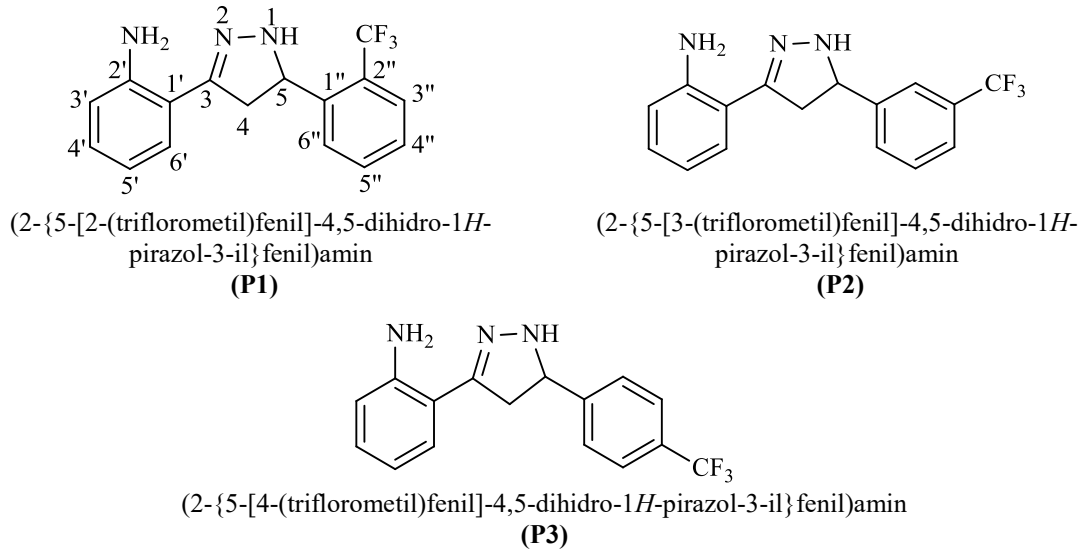
Bu tez kapsamında bir tanesi (**K1**) yeni olmak üzere 3 adet kalkon (**K1**, **K2** ve **K3**) ve tamamı yeni 3 adet pirazolin (**P1**, **P2** ve **P3**) türevi molekülün *in vitro* ve *in silico* şartlar altında α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerindeki inhibitör etkileri incelendi. Standart inhibitör olarak kullanılan akarboz ile karşılaştırma yapılarak moleküllerin antidiyabetik potansiyelleri ortaya koyuldu.

3.1. Sentezlenen Bileşiklerin Spektral Verilerinin Değerlendirilmesi

Sentezlenen kalkon (Şekil 14) ve pirazolin (Şekil 15) türevi bileşiklerin yapı tayini ^1H -NMR, ^{13}C -NMR (APT) ve FT-IR spektroskopik analiz yöntemleriyle yapıldı ve NMR verileri ACD NMR programı kullanılarak desteklendi (ACD/Labs Software, 2011). Sentezlenen bileşiklerinin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR (APT) spektrumları CDCl_3 'te alındı.



Şekil 14. **K1**, **K2** ve **K3** kodlu kalkon bileşikleri



Şekil 15. P1, P2 ve P3 Kodlu Pirazolin Bileşikler

3.1.1. Sentezlenen Kalkon (K1-K3) Bileşiklerine Ait Verim, Erime Noktası, R_f Değerleri ile $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (APT) ve FT-IR Spektrumları ve Spektral Verileri

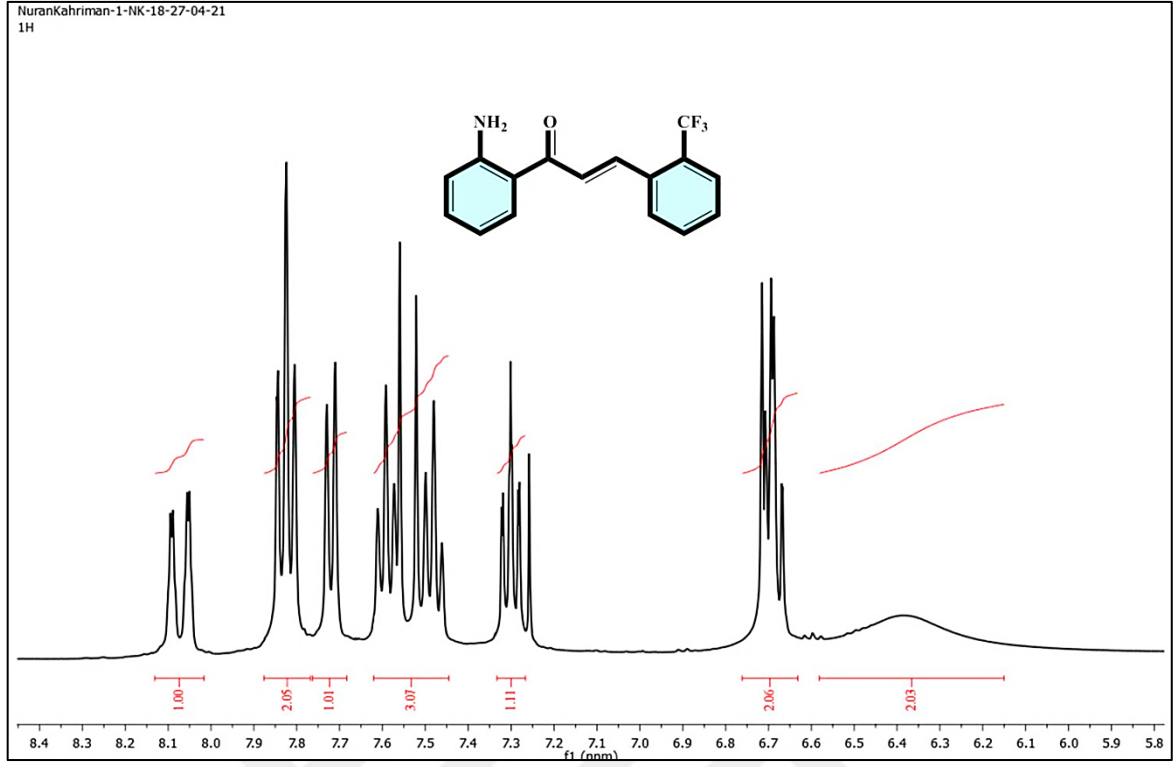
K1 Kodlu Bileşik: 2E)-1-(2-aminofenil)-3-[2-(triflorometil)fenil]prop-2-en-1-on bileşiğine ait spektral veriler, NMR ve FT-IR spektrumları Şekil 16-18'de verilmiştir.

Verim (%): 85; Erime noktası (°C): 104-106; R_f : 0.80 (Hekzan -Dietil eter: 1:2)

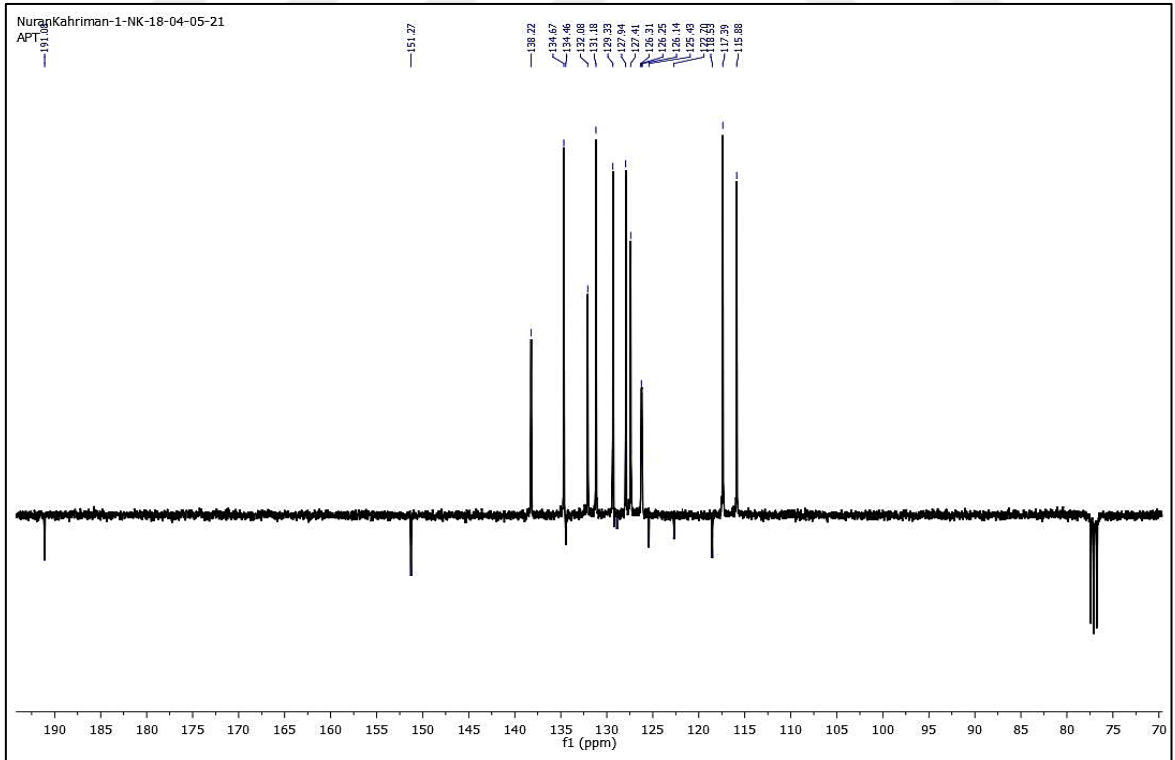
FT-IR (cm^{-1}): 3507, 3339, 1652, 1571, 747.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 7.54 (AB, J = 16.0 Hz, 1H, H-2); δ = 8.07 (AB, J = 16.0 Hz, 1H, H-3); δ = 6.70 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-3'); δ = 7.30 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H-4'); δ = 6.69 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H-5'); δ = 7.78 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H-6'); δ = 7.83 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-3''); δ = 7.59 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H-4''); δ = 7.48 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H-5''); δ = 7.81 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-6''); δ = 6.39 (bs, 2H, -NH₂).

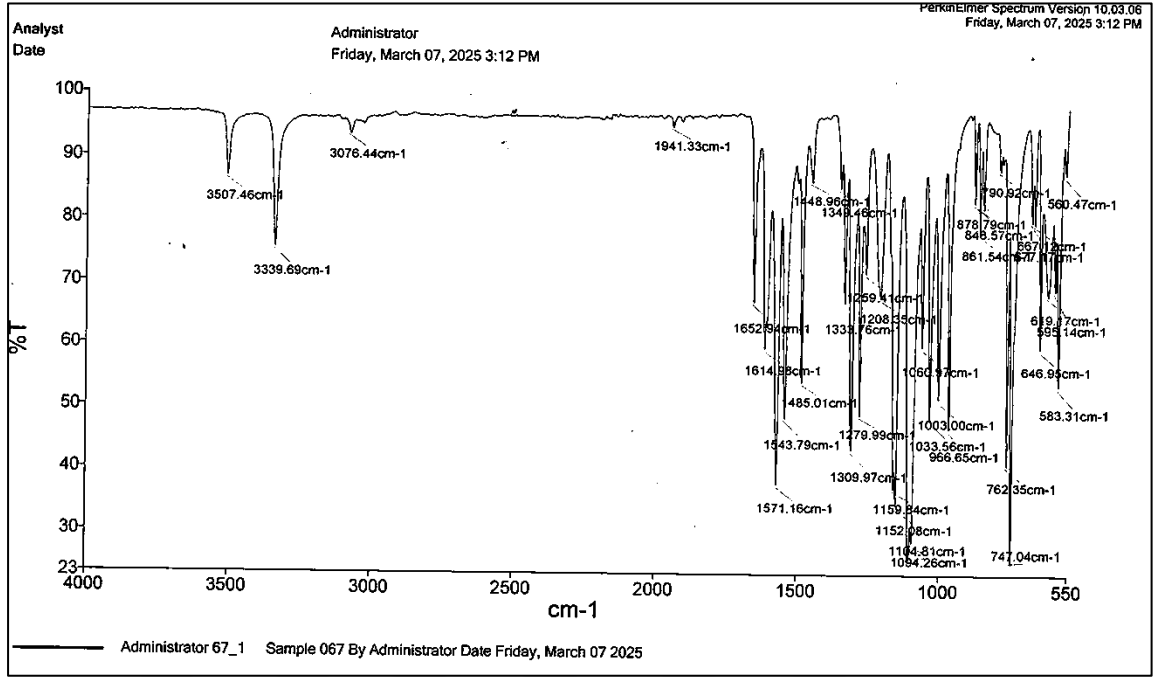
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , ppm): 191.08 (C-1), 127.41 (C-2), 138.22 (C-3), 118.53 (C-1'), 151.27 (C-2'), 115.88 (C-3'), 134.67 (C-4'), 117.39 (C-5'), 131.18 (C-6'), 134.47 (C-1''), 129.51, 129.19, 128.89, 128.57 (q, J = 32 Hz, C-2''), 126.31, 126.25, 126.19, 126.13 (q, J = 6 Hz, C-3''), 129.33 (C-4''), 132.08 (C-5''), 127.94 (C-6''), 128.16, 125.43, 122.70, 119.97 (q, J = 273 Hz, CF₃).



Şekil 16. **K1** Kodlu bileşiğin ^1H -NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3 , ppm)



Şekil 17. **K1** Kodlu bileşiğin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu (100 MHz, CDCl_3 , ppm)



Şekil 18. **K1** Nolu bileşiğin FT-IR spektrumu (cm^{-1})

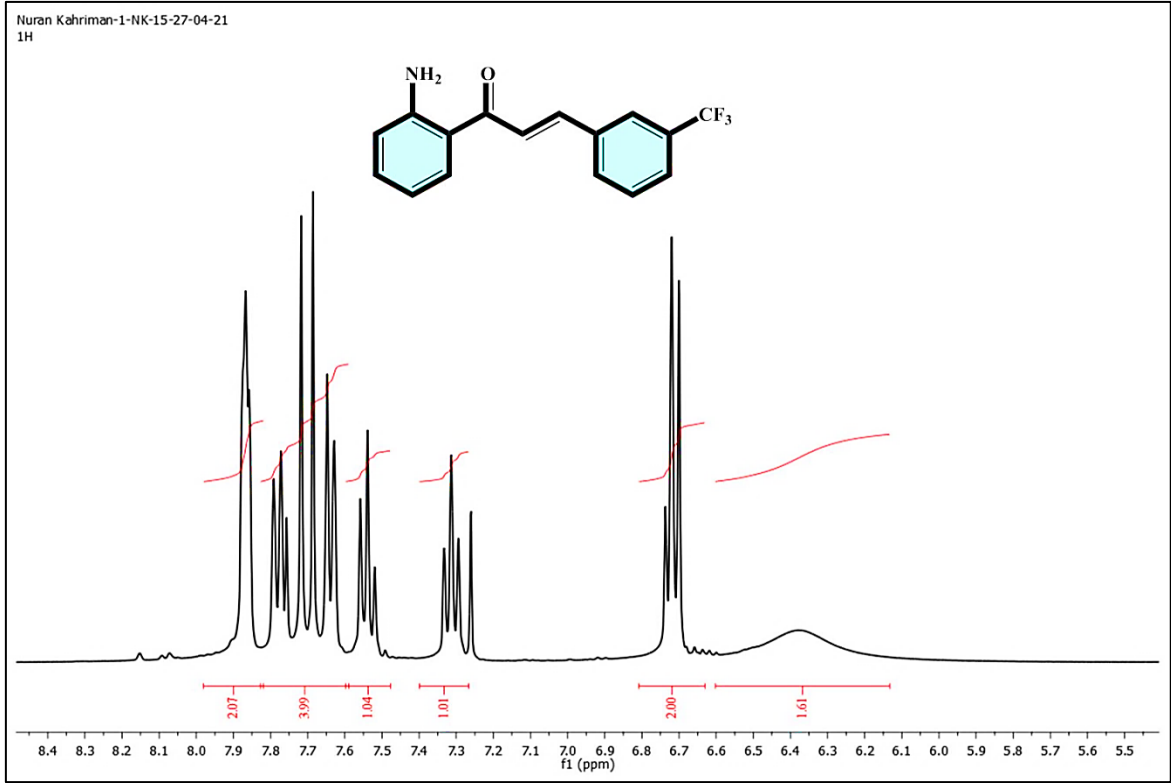
K2 Kodlu Bileşik: (2*E*)-1-(2-aminofenil)-3-[3-(triflorometil)fenil]prop-2-en-1-on bileşiğine ait spektral veriler, NMR ve FT-IR spektrumları Şekil 19-21’de verilmiştir.

Verim (%): 80; Erime noktası ($^{\circ}\text{C}$): 129-131; R_f : 0.75 (Hekzan -Dietyl eter:1:2)

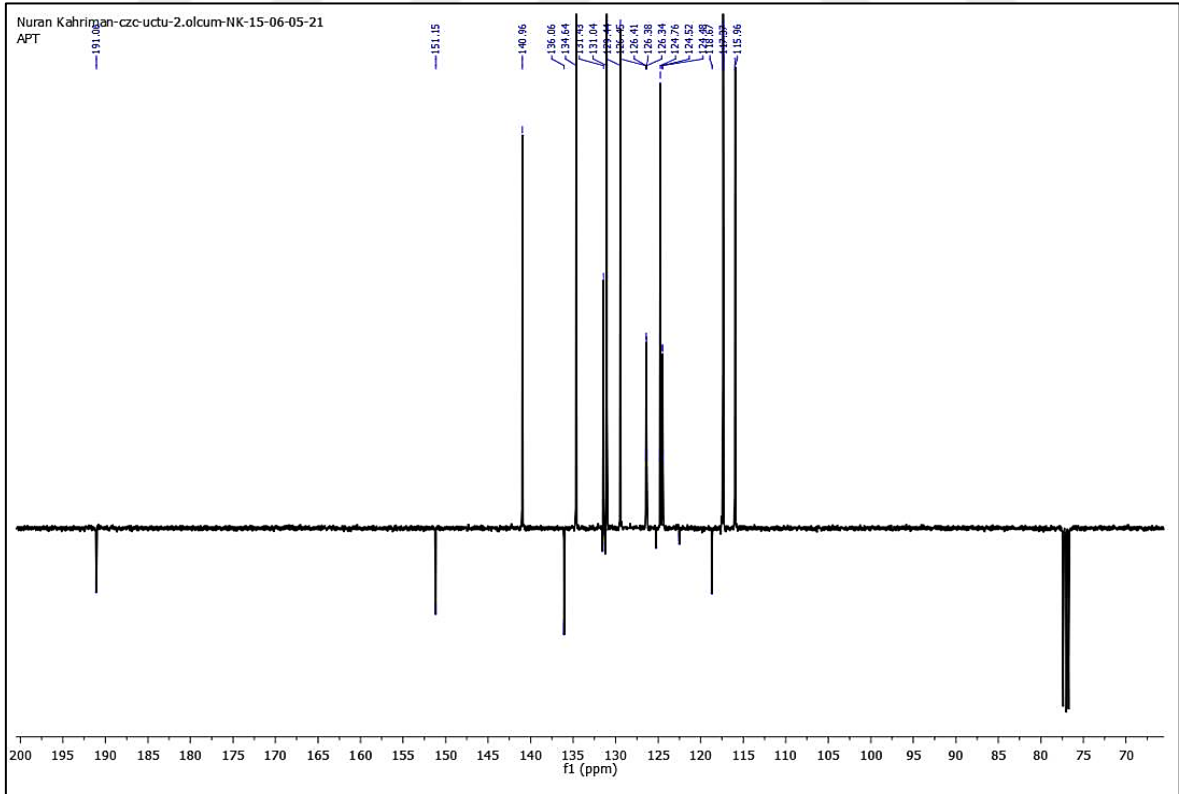
FT-IR (cm^{-1}): 3384, 3389, 1648, 15780, 745.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 7.67 (AB, J = 16.0 Hz, 1H, H-2); δ = 7.74 (AB, J = 16.0 Hz, 1H, H-3); δ = 6.71 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-3’); δ = 7.31 (t, J =8.0 Hz, 1H, H-4’); δ = 6.72 (t, J =8.0 Hz, 1H, H-5’); δ = 7.78 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-6’); δ = 7.87 (s, 1H, H-2’); δ = 7.86 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-4’); δ = 7.57 (t, J =8.0 Hz, 1H, H-5’); δ = 7.64 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-6’); δ = 6.38 (bs, 2H, - NH_2).

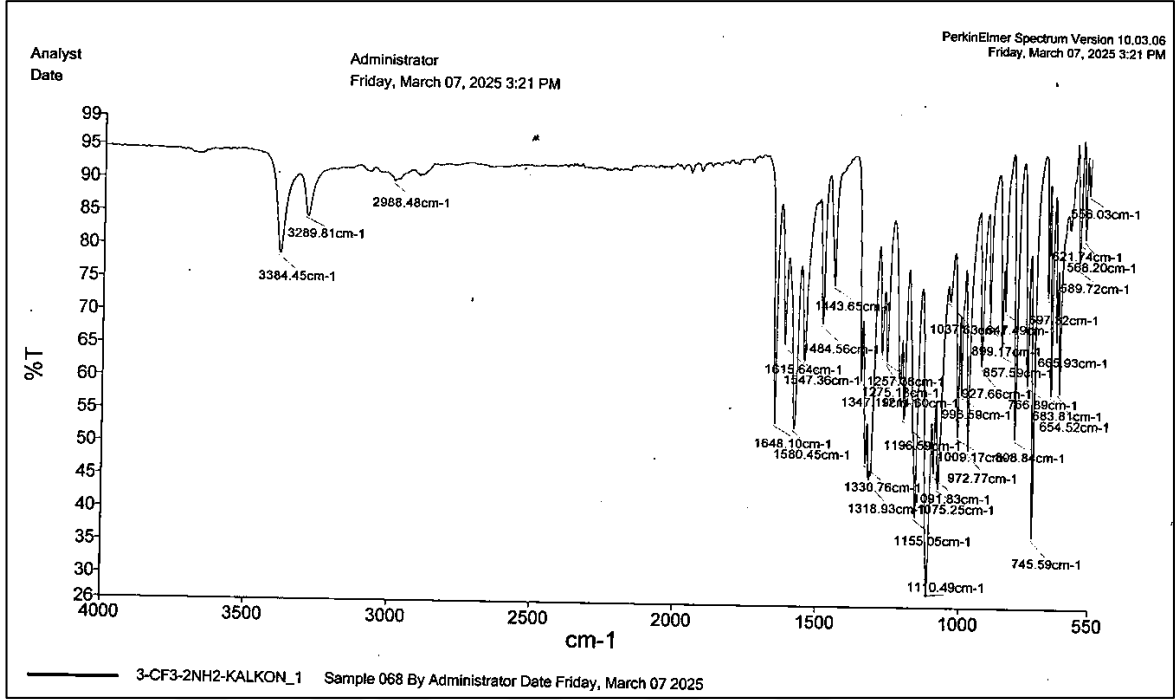
^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3 , ppm): 191.06 (C-1), 124.75 (C-2), 140.96 (C-3), 118.67 (C-1’), 151.15 (C-2’), 115.96 (C-3’), 134.64 (C-4’), 117.37 (C-5’) 131.04 (C-6’), 136.06 (C-1’), 124.58, 124.52, 124.48, 124.44 (q, J = 4 Hz, C-2’), 131.86, 131.54, 131.22, 130.90 (q, J = 32 Hz, C-3’), 126.45, 126.41, 126.38, 126.34 (q, J = 4 Hz, C-4’), 131.44 (C-5’), 129.44 (C-6’), 127.94, 125.23, 122.52, 119.81 (q, J = 271 Hz, CF_3).



Şekil 19. K2 Kodlu bileşiğin ^1H -NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3 , ppm)



Şekil 20. K2 Kodlu bileşiğin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu (100 MHz, CDCl_3 , ppm)



Şekil 21. K2 Kodlu bileşiğin FT-IR spektrumu (cm^{-1})

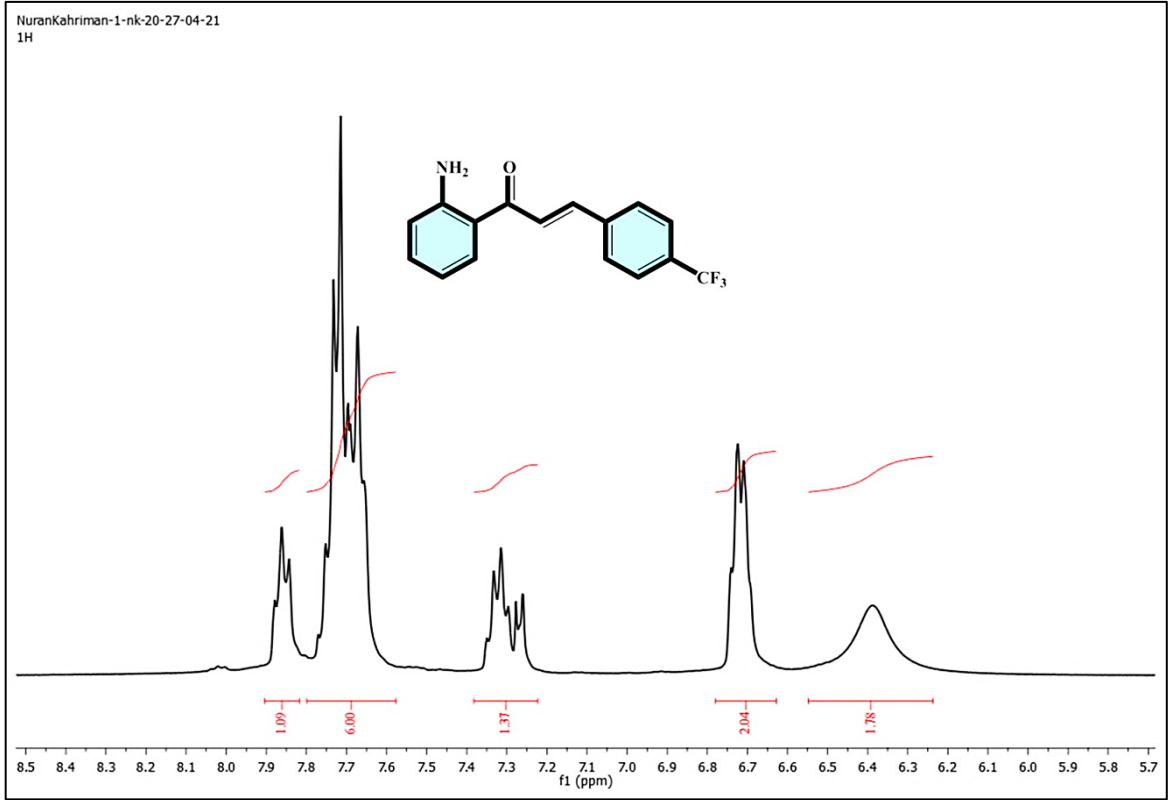
K3 Kodlu Bileşik: (2*E*)-1-(2-aminofenil)-3-[4-(triflorometil)fenil]prop-2-en-1-on bileşiğine ait veriler, NMR ve FT-IR spektrumları Şekil 22-24'de verilmiştir.

Verim (%): 81; Erime noktası($^{\circ}\text{C}$): 90-92; R_f :0.80 (Hekzan -Dietileter:1:2)

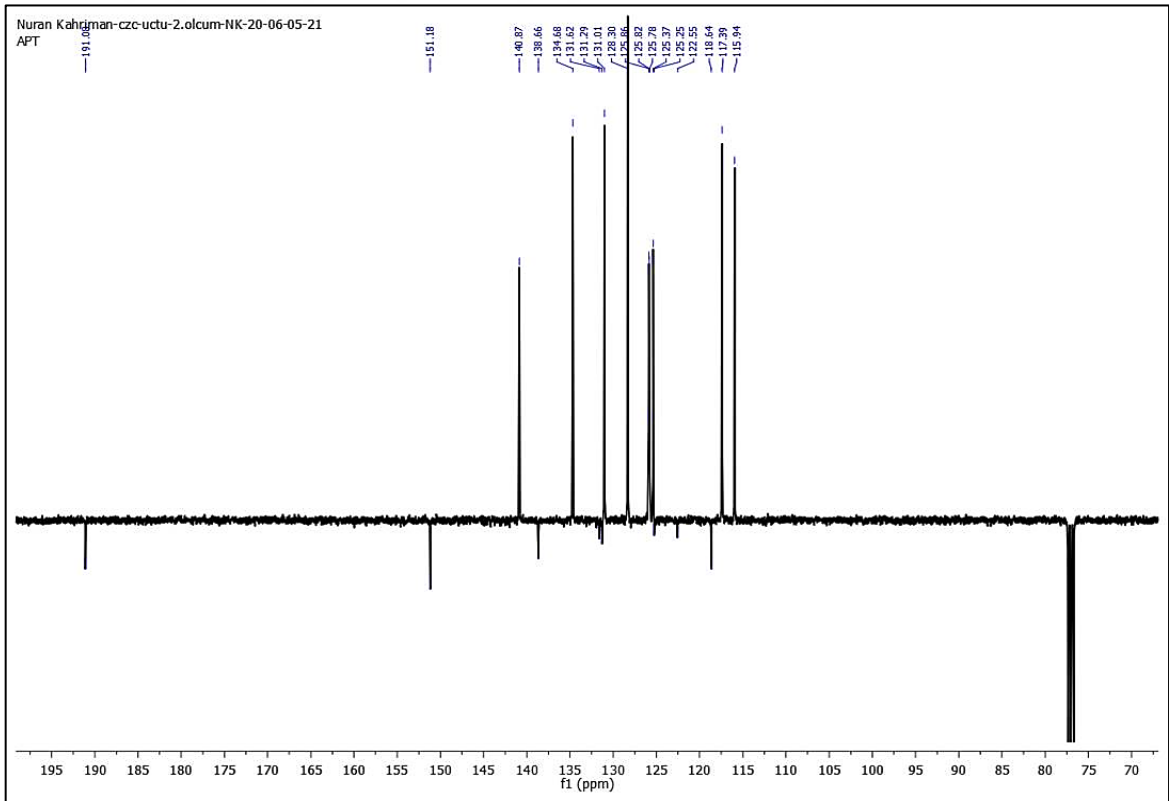
FT-IR (cm^{-1}): 3385, 3279, 1650, 1576, 746.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 7.75-7.66 (m, 6H, H-2/3/2"/3"/4"/5"/6"); δ = 6.71 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-3'); δ = 7.33 (t, J =8.0 Hz, 1H, H-4'); δ = 6.73 (t, J =8.0 Hz, 1H, H-5'); δ = 7.86 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-6'); δ = 6.89 (bs, 2H, -NH₂).

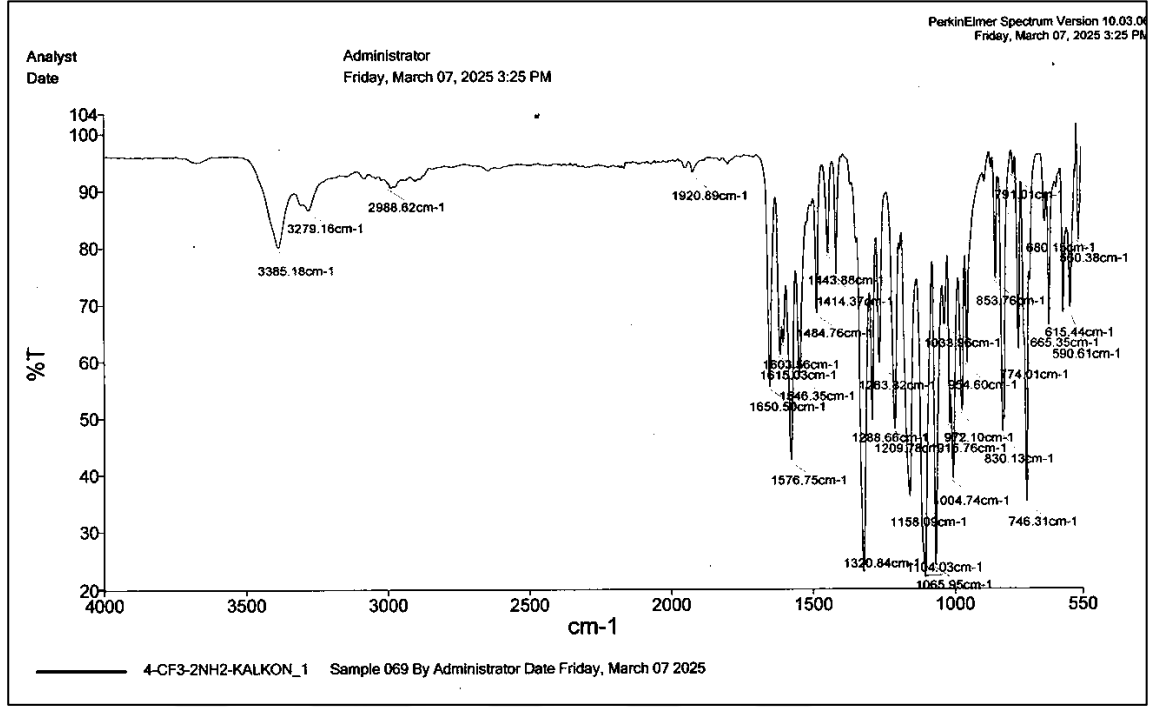
^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3 , ppm): 191.08 (C-1), 125.37 (C-2), 140.87 (C-3), 118.64 (C-1'), 151.18 (C-2'), 115.94 (C-3'), 134.68 (C-4'), 117.39 (C-5'), 131.01 (C-6'), 138.66 (C-1''), 128.30 (C-2''/6''), 125.90, 125.86, 125.82, 125.78 (q, J = 4 Hz, C-3"/5''), 131.94, 131.62, 131.29, 130.97 (q, J = 32 Hz, C-4''), 127.96, 125.25, 122.55, 119.84 (q, J = 271 Hz, CF₃).



Şekil 22. **K3** Kodlu bileşiğin ^1H -NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3 , ppm)



Şekil 23. **K3** Kodlu bileşiğin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu (100 MHz, CDCl_3 , ppm)



Şekil 24. K3 Kodlu bileşiğin FT-IR spektrumu (cm^{-1})

3.1.2. Sentezlenen 3,5-Disübstitüe Pirazolin (P1-P3) Bileşiklerine Ait Verim, Erime Noktası, R_f Değerleri ile ^1H -NMR, ^{13}C -NMR (APT) ve FT-IR Spektrumları ve Spektral Verileri

P1 Kodlu Bileşik: (2-{5-[2-(triflorometil)fenil]-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il}fenil)amin bileşiğine ait spektral veriler, NMR ve FT-IR spektrumları Şekil 25-27'de verilmiştir.

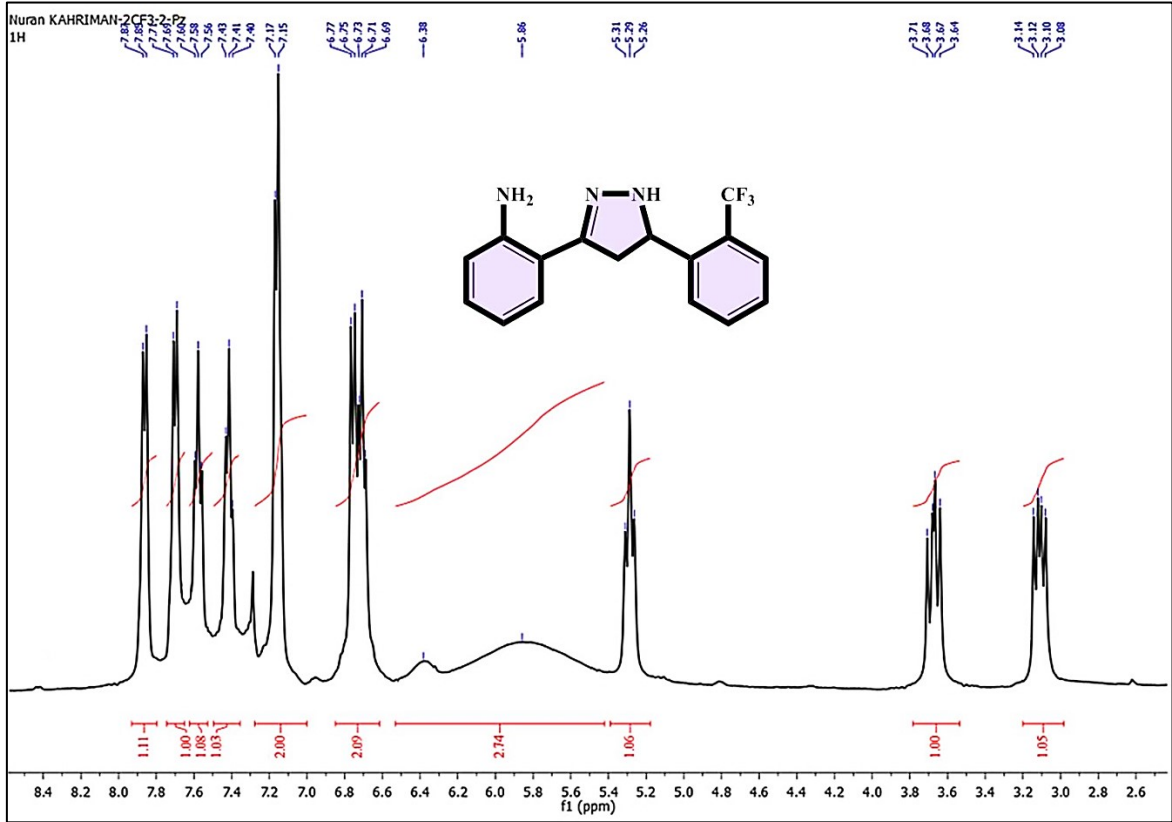
Verim (%): 63; Erime noktası($^{\circ}\text{C}$): 59-61; R_f :0.60 (Hekzan -Dietil eter:1:2)

FT-IR (cm^{-1}): 3461, 3325, 1611, 1496, 1452, 745.

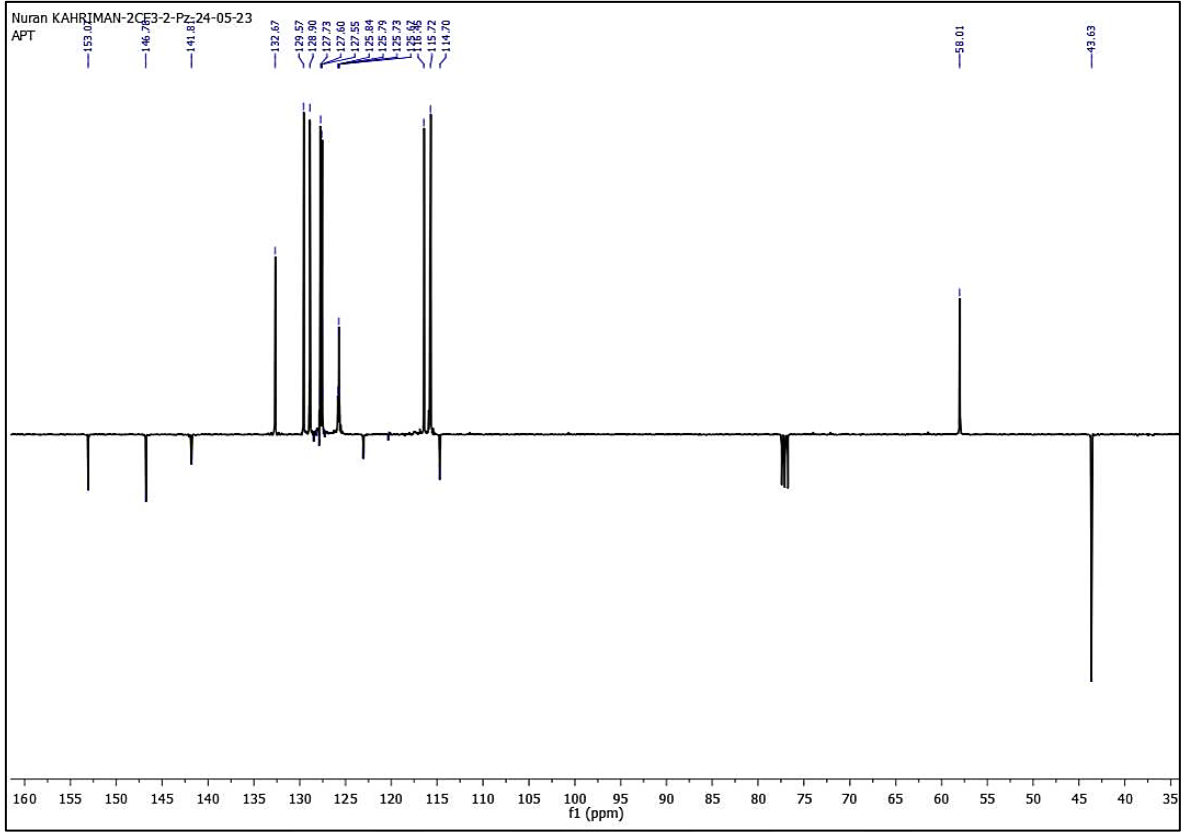
H-NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 6.38 (bs, H-1); δ = 3.14-3.08 (dd, J_{AB} = 16 Hz, J_{AX} = 8.0 Hz, 1H, H-4a); δ = 3.71-3.64 (dd, J_{BA} = 16.0 Hz, J_{BX} = 12.0 Hz, 1H, H-4b); δ = 5.29 (dd, $J_{5/4a}$ =8 Hz, $J_{5/4b}$ =12 Hz, 1H, H-5); δ = 6.76 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-3'); δ = 7.15 (t, J =8.0 Hz, 1H, H-4'); δ = 6.71 (t, J =8.0 Hz, 1H, H-5'); δ = 7.16 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-6'); δ = 7.70 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-3''); δ = 7.58 (t, J =8.0 Hz, 1H, H-4''); δ = 7.41 (t, J =8.0 Hz, 1H, H-5''); δ = 7.86 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-6''); δ = 5.86 (bs, 2H, -NH₂).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3 , ppm): 153.07 (C-3), 43.63 (C-4), 58.01 (C-5), 114.70 (C-1'), 146.78 (C-2'), 115.72 (C-3'), 128.90 (C-4'), 116.45 (C-5'), 127.73 (C-6'), 141.81 (C-1''), 128.18, 127.88, 127.60, 127.28 (q, J =30 Hz, C-2''), 125.84, 125.79, 125.73, 125.67 (q,

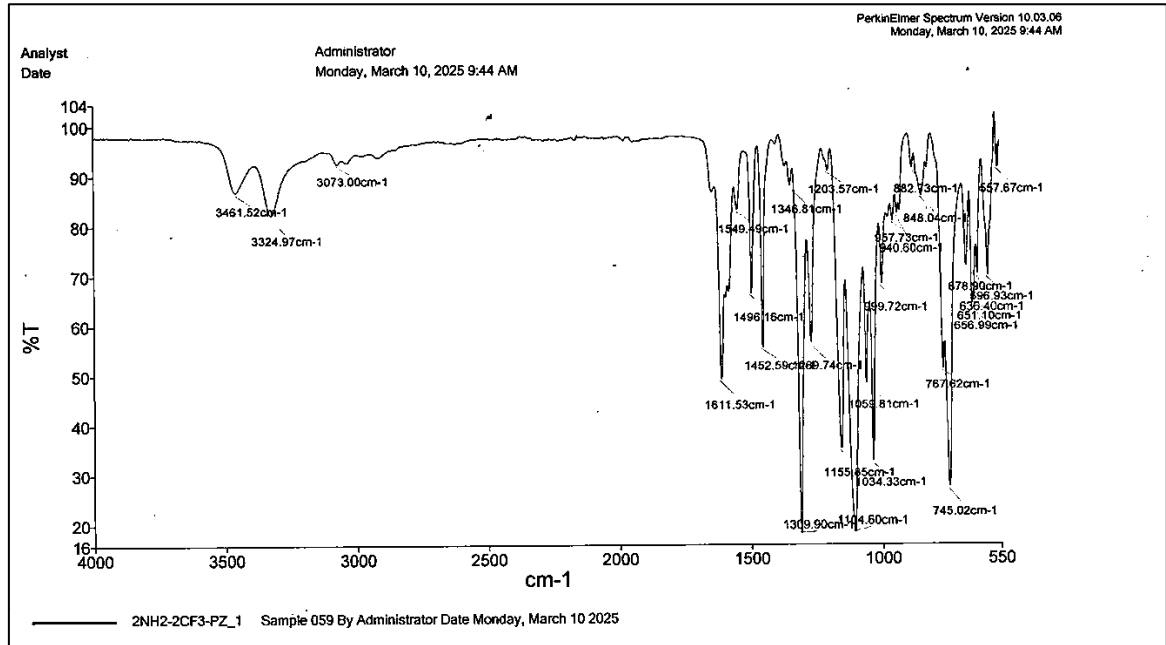
$J=6$ Hz, C-3"), 127.55 (H-4"), 132.67 (C-5"), 129.57 (C-6"), 128.50, 125.79, 123.05, 120.33 (q, $J=272$ Hz, CF_3).



Şekil 25. **P1** Kodlu bileşiğin ¹H-NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3 , ppm)



Şekil 26. P1 Kodlu bileşiğin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu (100 MHz, CDCl_3 , ppm)



Şekil 27. P1 Kodlu bileşiğin FT-IR spektrumu (cm^{-1})

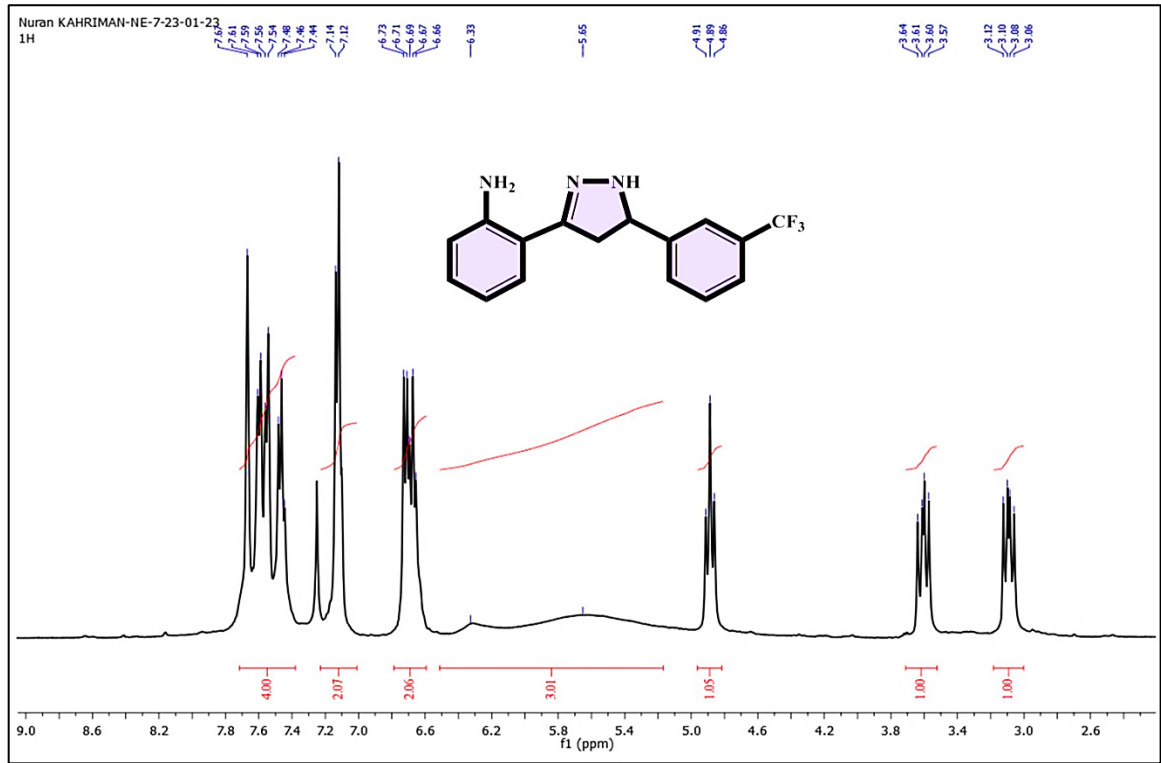
P2 Kodlu Bileşik: (2-{5-[3-(triflorometil)fenil]-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il}fenil)amin bileşiğine ait spektral veriler, NMR ve FT-IR spektrumları Şekil 28-30'da verilmiştir.

Verim (%): 57; Erime noktası(°C): Yağmsı; R_f :0.58 (Hekzan -Diethyl eter:1:2)

FT-IR (cm^{-1}): 3460, 3322, 1611, 1496, 1451, 747.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 6.33 (bs, H-1); δ = 3.12-3.06 (dd, J_{AB} = 16 Hz, J_{AX} = 8.0 Hz, 1H, H-4a); δ = 3.64-3.57 (dd, J_{BA} = 16.0 Hz, J_{BX} = 12.0 Hz, 1H, H-4b); δ = 4.89 (dd, $J_{5/4a}$ =8 Hz, $J_{5/4b}$ =12 Hz, 1H, H-5); δ = 6.72 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-3'); δ = 7.12 (t, J =8.0 Hz, 1H, H-4'); δ = 6.67 (t, J =8.0 Hz, 1H, H-5'); δ = 7.13 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-6'); δ = 7.67 (s, 1H, H-3''); δ = 7.60 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-4''); δ = 7.46 (t, J =8.0 Hz, 1H, H-5''); δ = 7.55 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-6''); δ = 5.65 (bs, 2H, $-\text{NH}_2$).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3 , ppm): 153.68 (C-3), 43.09 (C-4), 62.47 (C-5), 114.65 (C-1'), 146.77 (C-2'), 115.78 (C-3'), 129.38 (C-4'), 116.48 (C-5'), 128.90 (C-6'), 143.65 (C-1''), 124.64, 124.60, 124.56, 124.53 (q, J =4 Hz, C-2''), 131.55, 131.23, 130.91, 130.59 (q, J =32 Hz, C-3''), 123.63, 123.59, 123.55, 123.51 (q, J =4 Hz, H-4''), 129.64 (C-5''), 129.95 (C-6''), 128.14, 125.43, 122.72, 120.01 (q, J = 271 Hz, CF_3).



Şekil 28. P2 Kodlu bileşiğin ^1H -NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3 , ppm)

PerkinElmer Spectrum Version 10.03.06
Monday, March 10, 2025 9:39 AM

Analyst
Date

Administrator
Monday, March 10, 2025 9:39 AM

103
100
90
80
70
60
50
40
30
20

4000 3500 3000 2500 2000 1500 1000 550

cm-1

3459.98cm-1
3322.30cm-1
1611.70cm-1
1551.80cm-1
1496.86cm-1
1451.82cm-1
1324.07cm-1
1199.72cm-1
1156.00cm-1
1070.15cm-1
1000.80cm-1
996.09cm-1
966.23cm-1
923.03cm-1
899.47cm-1
866.23cm-1
828.73cm-1
799.87cm-1
747.58cm-1
684.03cm-1
600.03cm-1
554.04cm-1

%T

2NH2-3CF3-PZ_1 Sample 058 By Administrator Date Monday, March 10 2025

Şekil 30. **P2** Kodlu bileşiğin FT-IR spektrumu (cm^{-1})

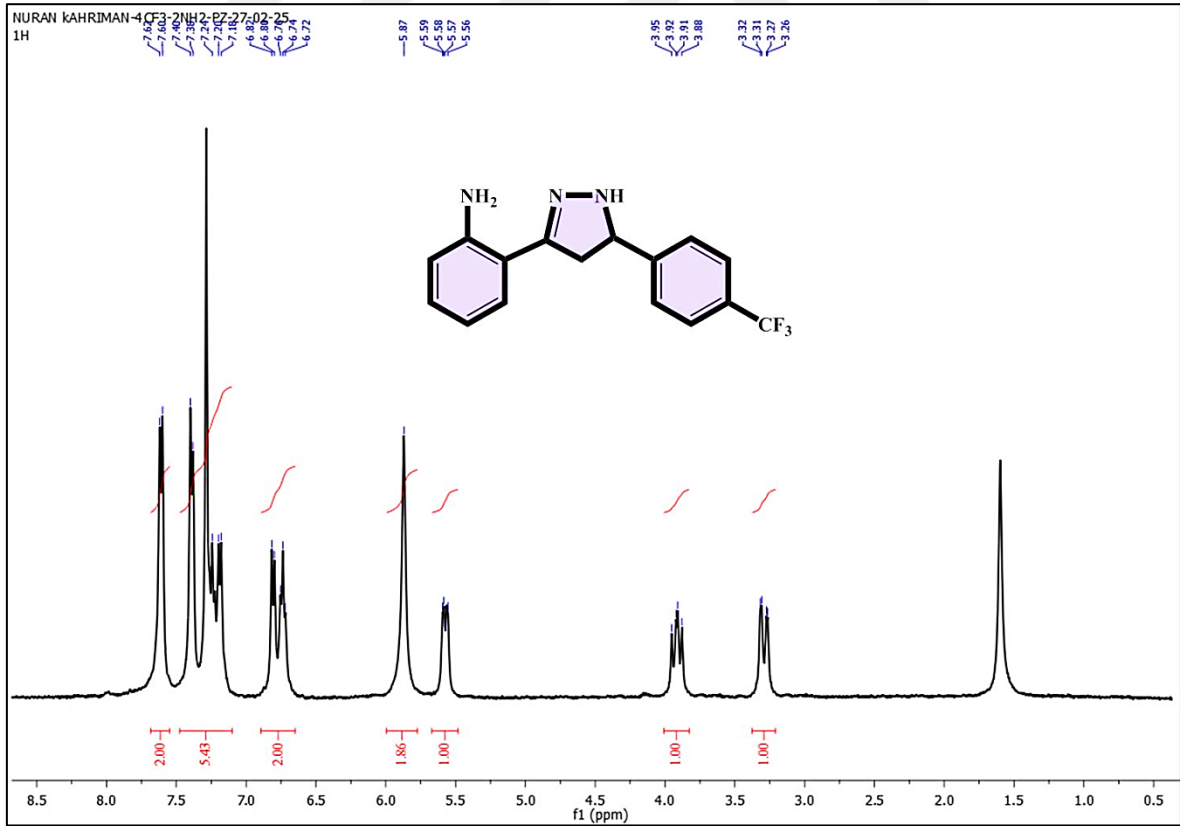
P3 Kodlu Bileşik: (2-{5-[4-(triflorometil)fenil]-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il}fenil)amin bileşiğine ait spektral veriler, NMR ve FT-IR spektrumları Şekil 31-33'de verilmiştir.

Verim (%): 66; Erime noktası(°C): 167-169; R_f :0.70 (Hekzan -Dietil eter:1:3)

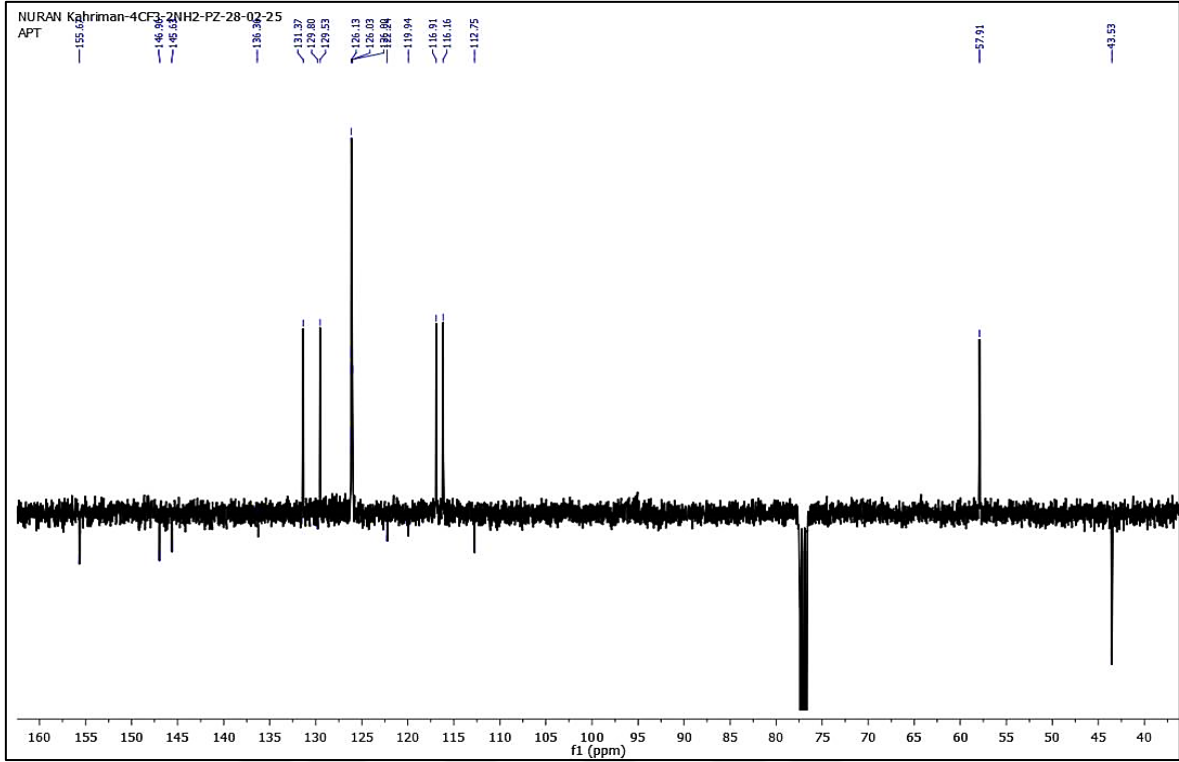
FT-IR (cm^{-1}): 3464, 3319, 1608, 1496, 1453, 754.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 6.06 (bs, H-1); δ = 3.32-3.26 (dd, J_{AB} = 16 Hz, J_{AX} = 4.0 Hz, 1H, H-4a); δ = 3.95-3.88 (dd, J_{BA} = 16.0 Hz, J_{BX} = 12.0 Hz, 1H, H-4b); δ = 5.58 (dd, $J_{5/4a}$ =4 Hz, $J_{5/4b}$ =12 Hz, 1H, H-5); δ = 6.81 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-3'); δ = 7.23 (t, J =8.0 Hz, 1H, H-4'); δ = 6.74 (t, J =8.0 Hz, 1H, H-5'); δ = 7.19 (d, J =8.0 Hz, 1H, H-6'); δ = 7.61 (d, J =8.0 Hz, 2H, H-2''/6''); δ = 7.39 (d, J =8.0 Hz, 2H, H-3''/5''); δ = 5.87 (bs, 2H, $-\text{NH}_2$).

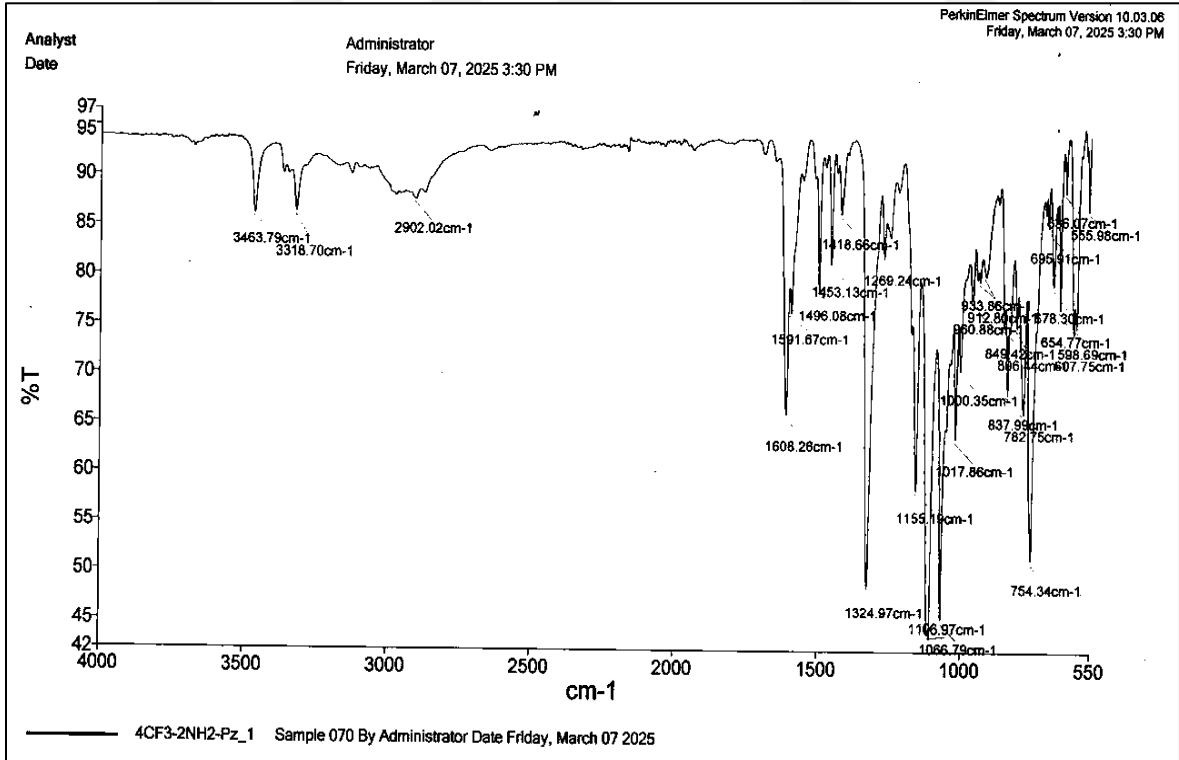
^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3 , ppm): 155.67 (C-3), 43.53 (C-4), 57.91 (C-5), 112.75 (C-1'), 146.96 (C-2'), 116.16 (C-3'), 131.37 (C-4'), 116.91 (C-5'), 129.53 (C-6'), 145.63 (C-1''), 126.14 (C-2''/6''), 126.07, 126.03, 126.00, 125.96 (q, J =4 Hz, C-3''/5''), 131.66, 131.34 (d, J =32 Hz, H-4''), 128.62, 125.89, 123.17, 120.44 (q, J = 273 Hz, CF_3).



Şekil 31. P3 Kodlu bileşiğin ^1H -NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3 , ppm)



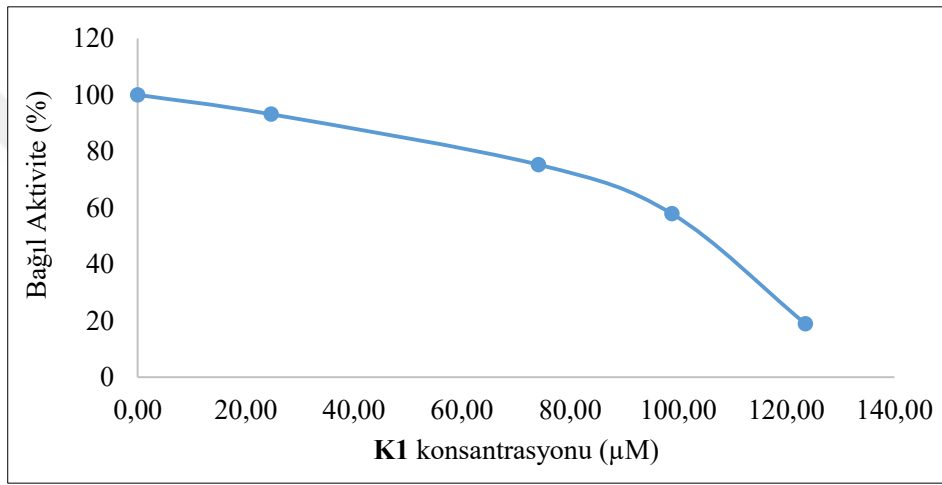
Şekil 32. P3 Kodlu bileşiğin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu (100 MHz, CDCl_3 , ppm)



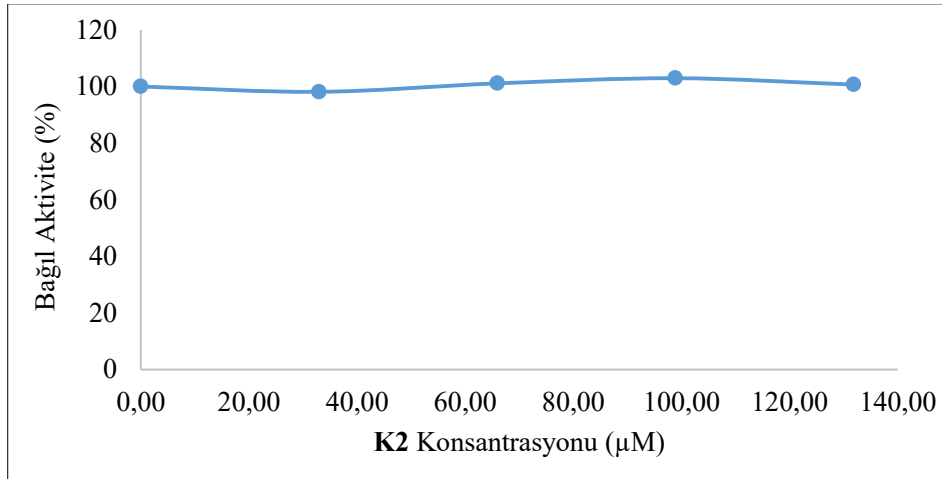
Şekil 33. P3 Kodlu bileşiğin FT-IR spektrumu (cm^{-1})

3.2. Organik Moleküllerin α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

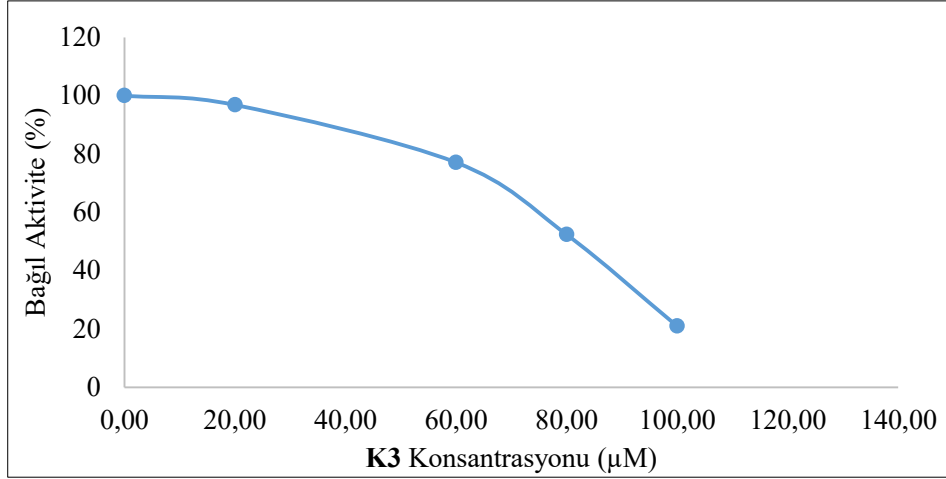
Yapılan inhibisyon çalışmaları sonucunda **K2** molekülü dışındaki diğer moleküllerin hepsinin α -amilaz inhibisyonuna sebep olduğu belirlendi. **K2** molekülü ise reaksiyon ortamındaki konsantrasyonu 130 μ M olana kadar herhangi bir inhibisyon göstermedi. Bu konsantrasyonun üzerine, molekülün reaksiyon ortamında çökmesinden dolayı çıkılamadı. Organik moleküllerin ve standart inhibitör olan akarbozun konsantrasyonlarına karşı elde edilen %Bağl Aktivite grafikleri Şekil 34-40'da gösterildi.



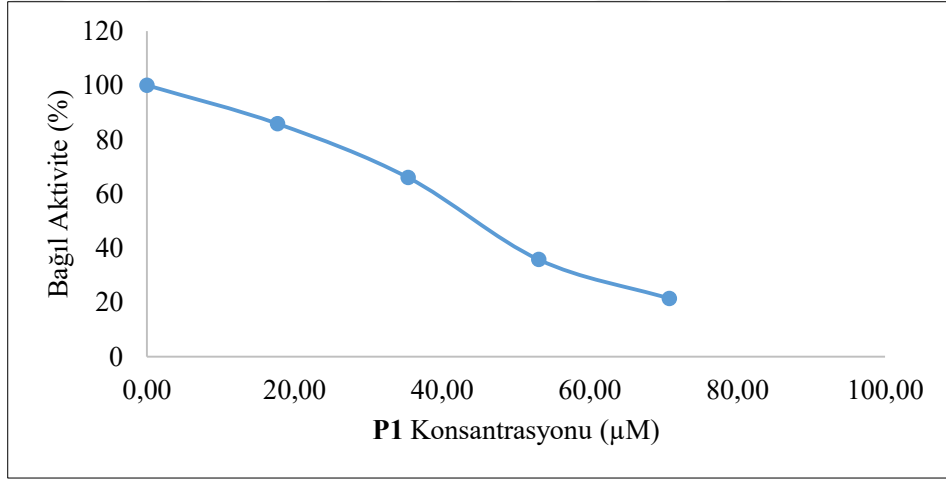
Şekil 34. **K1** molekülünün α -amilaz üzerindeki etkisi



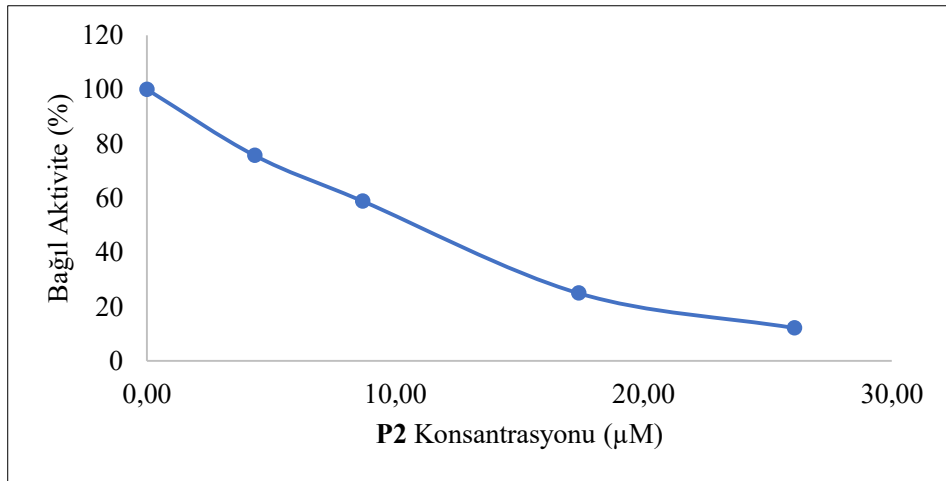
Şekil 35. **K2** molekülünün α -amilaz üzerindeki etkisi



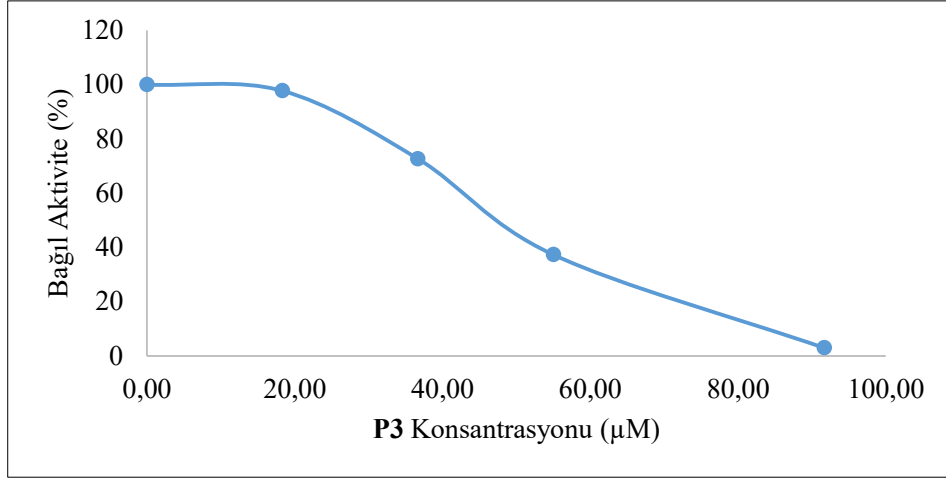
Şekil 36. **K3** molekülünün α -amilaz üzerindeki etkisi



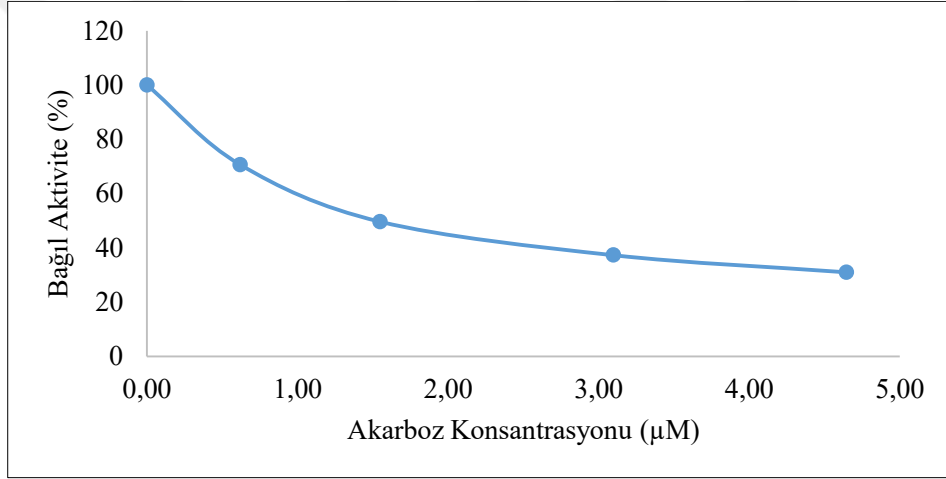
Şekil 37. **P1** molekülünün α -amilaz üzerindeki etkisi



Şekil 38. **P2** molekülünün α -amilaz üzerindeki etkisi



Şekil 39. P3 molekülünün α -amilaz üzerindeki etkisi



Şekil 40. Akarbozun α -amilaz üzerindeki etkisi

Çalışılan moleküllerin konsantrasyonlarına karşı elde edilen %Bağıl Aktivite grafiklerinden faydalanılarak α -amilaz aktivitesini %50 inhibe eden molekül konsantrasyonu yani IC_{50} değerleri hesaplandı.

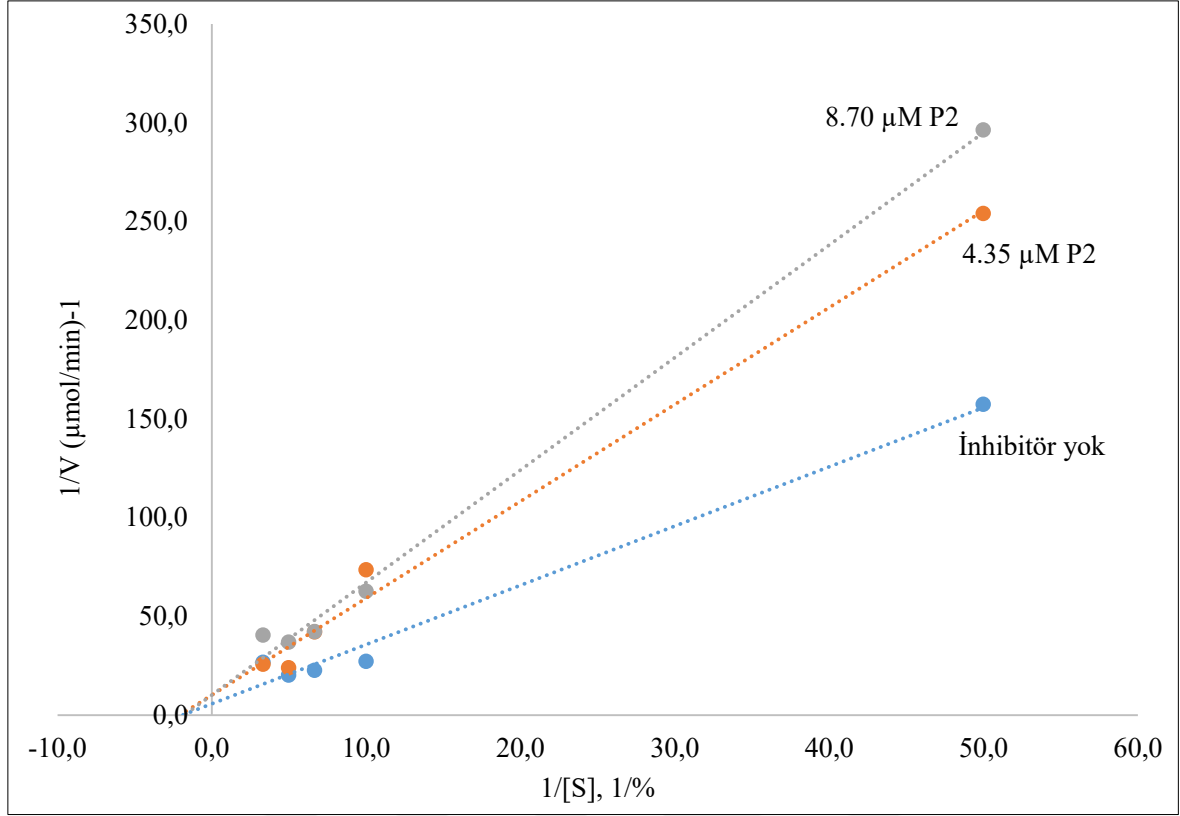
Tablo 7. Organik moleküllerin α -amilaz enzimine karşı IC_{50} değerleri

Organik Molekül	IC_{50} (μ M)*
K1	93,11 $\pm$ 6,18 ^D
K2	Belirlenemedi
K3	75,22 $\pm$ 8,34 ^C
P1	41,08 $\pm$ 2,49 ^B
P2	9,35 $\pm$ 1,16 ^A
P3	45,05 $\pm$ 3,64 ^B
Akarboz	1,65 $\pm$ 0,36 ^A

*Üst simgedeki farklı harfler istatistiksel olarak birbirinden önemli ölçüde farklı olan IC_{50} değerlerini (ortalama $\pm$ standart sapma) göstermektedir ($p < 0,05$).

Elde edilen veriler Tablo 7’de görülmektedir. İstatistiksel olarak bakıldığında, bir pirazolin türevi olan **P2** molekülünün standart inhibitör olan akarboz ile aynı IC_{50} değerine sahip olduğu görüldü. Diğer moleküller ise akarbozdan farklı ve ondan daha büyük IC_{50} değerlerine sahiptir.

Dolayısıyla **P2** molekülü, α -amilaz için potansiyel bir inhibitör madde olarak değerlendirilebilir. Bu nedenle bu molekülün enzimi hangi yolla inhibe ettiğini belirlemek amacıyla “2.4. İnhibisyon Çeşidinin Belirlenmesi” kısmında anlatıldığı gibi bir çalışma yapıldı. Bunun için inhibitör yokluğunda ve iki farklı inhibitör konsantrasyonunda (4,35 μ M ve 8,70 μ M) olacak şekilde farklı nişasta konsantrasyonlarında α -amilaz aktiviteleri belirlendi. Elde edilen enzim aktivite değerleri kullanılarak Lineweaver - Burk grafiği çizildi (Şekil 41).



Şekil 41. α -Amilazın **P2** yokluğunda ve iki konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği

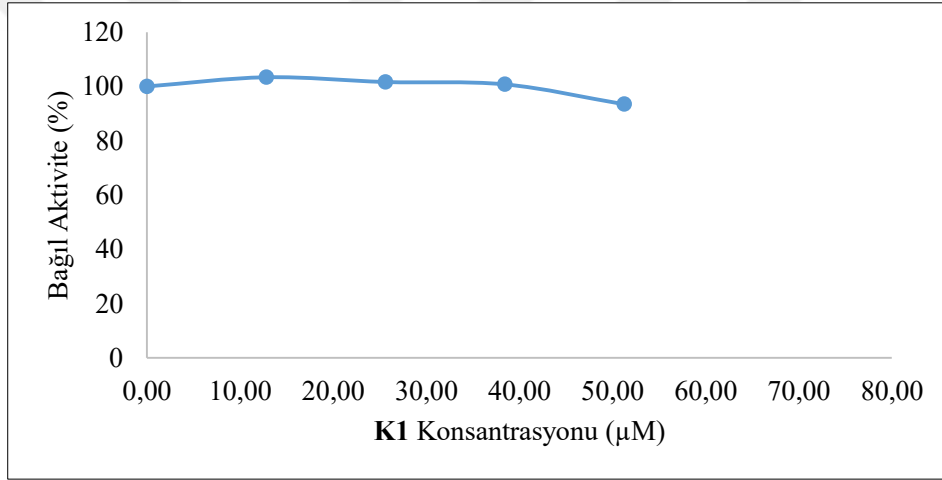
Şekil 41'den de görüldüğü gibi **P2** molekülü varlığında K_m değişmemekte V_{maks} ise azalmaktadır. Dolayısıyla molekülün α -amilazı non-kompetitif yolla inhibe ettiği görülmektedir. Molekülün inhibitör bağlanma sabiti yani K_i değeri Tablo 8'deki değerler kullanılarak hesaplandı ve 5,34 μM olarak belirlendi.

Tablo 8. **P2** molekülü varlığında α -amilaz inhibisyon türünün ve K_i değerinin belirlenmesi

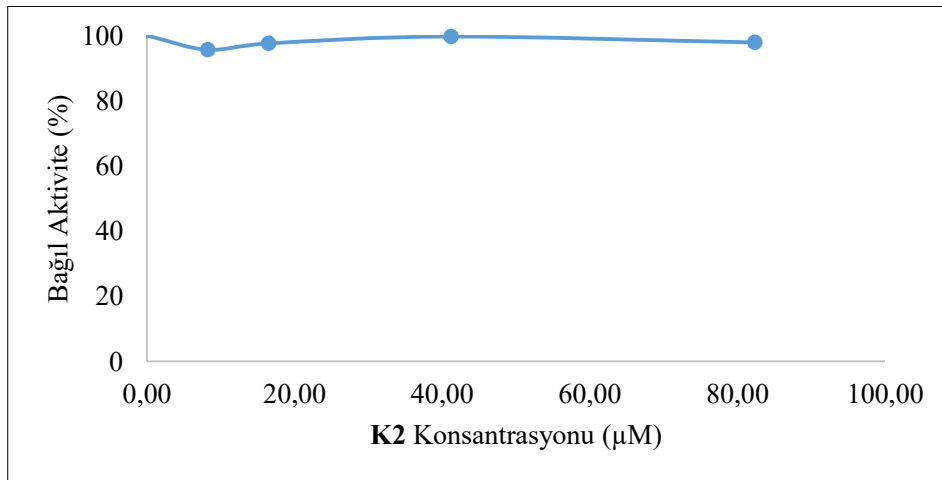
İnhibitör konsantrasyonu (μM)	K_m (%)	V_{maks} ($\mu\text{mol/dak}$)	İnhibisyon türü	Ortalama K_i (μM)
İnhibitörsüz	0,54	0,175	Non-kompetitif	5,34
4,35	0,52	0,098		
8,70	0,53	0,065		

3.3. Organik Moleküllerin α - Glukozidaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

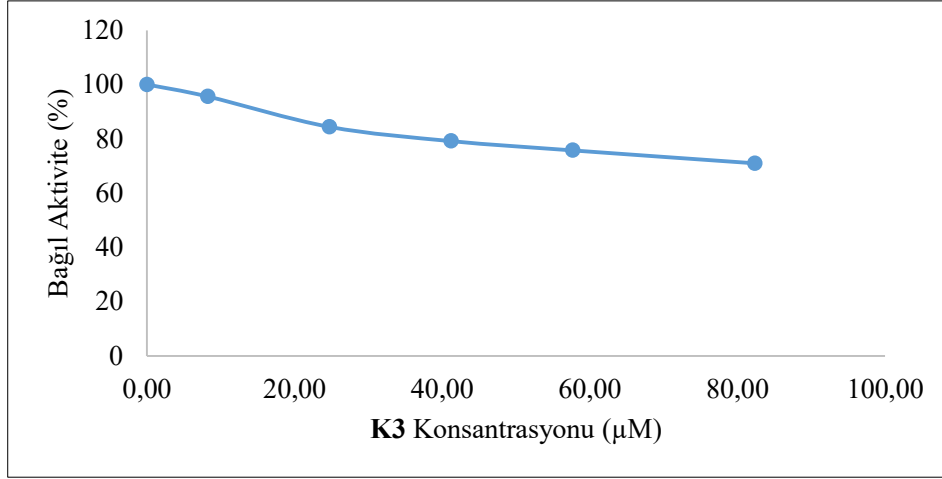
Yapılan α - glukozidaz inhibisyon çalışmaları sonucunda reaksiyon ortamında **K1**, **K2** ve **K3** molekülleri sırasıyla 50, 80 ve 85 μM 'a kadar çıkartıldıklarında yaklaşık olarak %7, %3 ve %22'lik inhibisyonlar elde edildi. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise reaksiyon ortamında çökelmeler meydana geldiği için çalışılamadı. Bu nedenle, bu moleküller için IC_{50} değerleri tespit edilemedi. **P1**, **P2** ve **P3** molekülleri ise α -glukozidaz aktivitesini önemli derecede inhibe etti ve her biri için IC_{50} değeri belirlendi. Organik moleküllerin ve standart inhibitör olan akarbozun konsantrasyonlarına karşı elde edilen %Bağıl Aktivite grafikleri Şekil 42-48'de gösterildi.



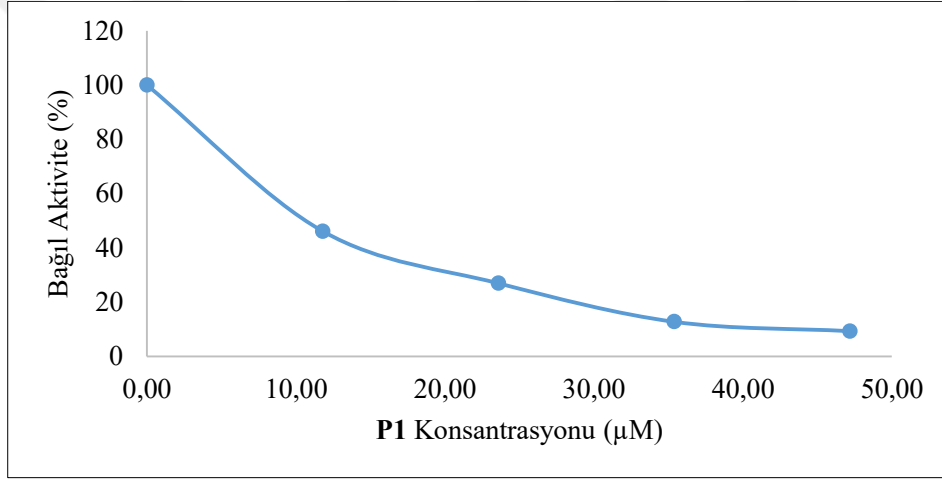
Şekil 42. **K1** molekülünün α -glukozidaz üzerindeki etkisi



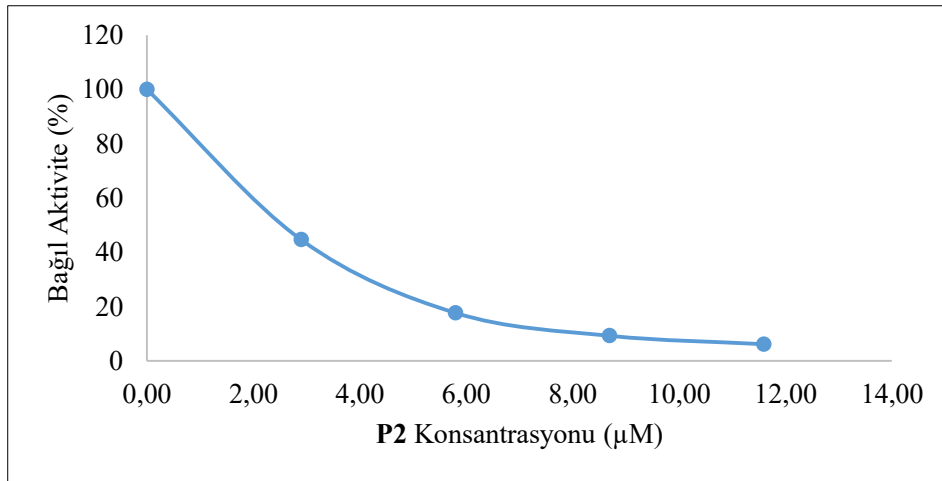
Şekil 43. **K2** molekülünün α -glukozidaz üzerindeki etkisi



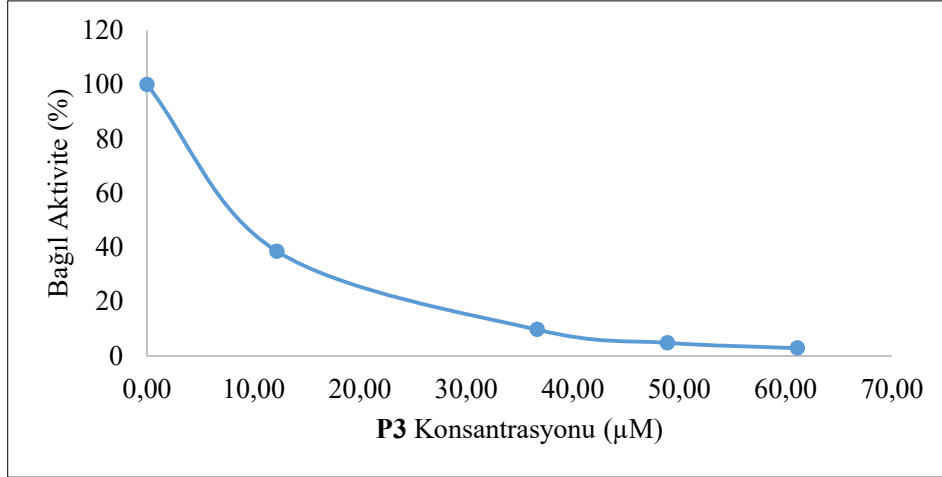
Şekil 44. **K3** molekülünün α -glukozidaz üzerindeki etkisi



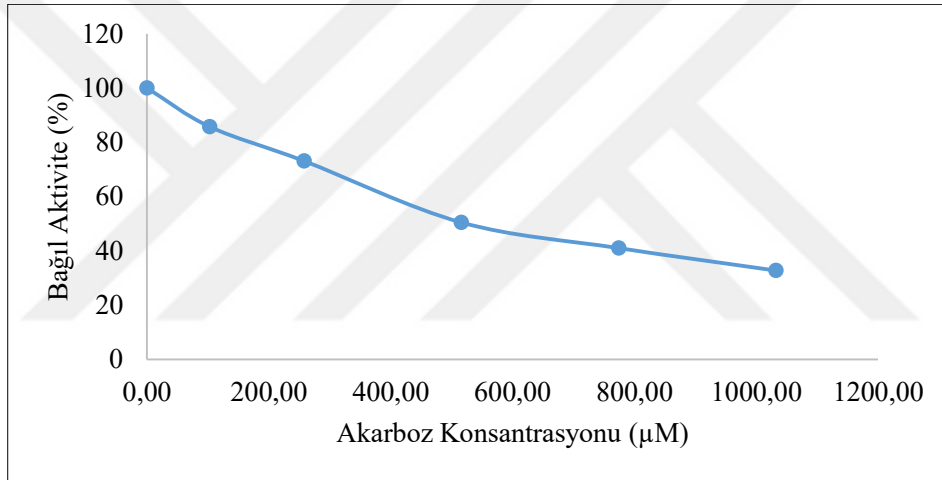
Şekil 45 **P1** molekülünün α -glukozidaz üzerindeki etkisi



Şekil 46. **P2** molekülünün α -glukozidaz üzerindeki etkisi



Şekil 47. **P3** molekülünün α -glukozidaz üzerindeki etkisi



Şekil 48. Akarbozun α -glukozidaz üzerindeki etkisi

Pirazolin türevleri olan **P1**, **P2** ve **P3** moleküllerinin konsantrasyonlarına karşı elde edilen %Bağlı Aktivite grafiklerinden faydalanılarak α -glukozidaz aktivitesini %50 inhibe eden molekül konsantrasyonu yani IC_{50} değerleri hesaplandı (Tablo 9).

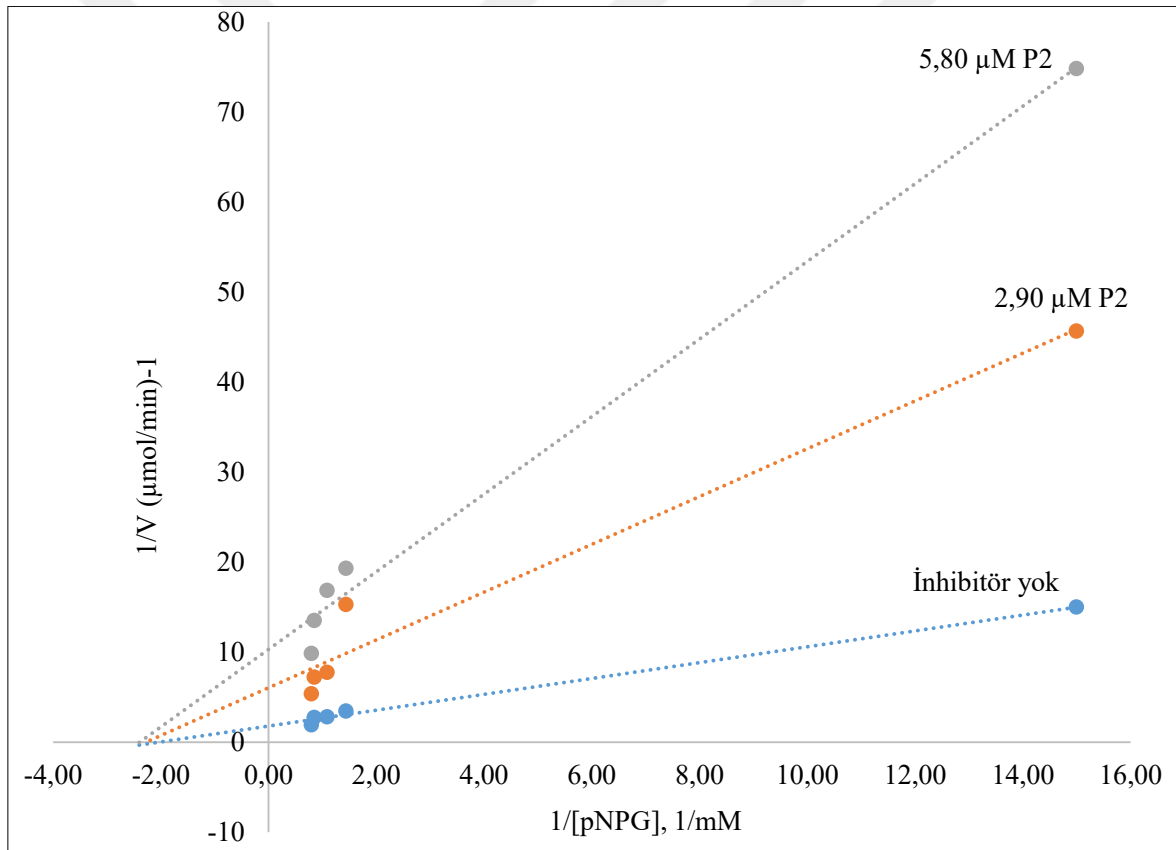
Tablo 9. Organik moleküllerin α -glukozidaz enzimine karşı IC_{50} değerleri

Organik Molekül	IC_{50} (μM)*
P1	$9,83 \pm 0,44^A$
P2	$2,10 \pm 0,28^A$
P3	$7,16 \pm 0,24^A$
Akarboz	$545,39 \pm 9,86^B$

*Üst simgedeki farklı harfler istatistiksel olarak birbirinden önemli ölçüde farklı olan IC_{50} değerlerini (ortalama $\pm$ standart sapma) göstermektedir ($p < 0,05$).

Tablo 6'daki veriler istatistiksel olarak incelendiğinde, pirazolin moleküllerinin hepsinin IC_{50} değerleri akarboz standardından düşük bulundu. Ancak bu moleküllerin IC_{50} değerleri arasında istatistiksel olarak bir farklılık görülmedi. Sonuç olarak moleküllerin tamamı akarbozdan daha iyi α -glukozidaz inhibisyonuna sebep olmaktadır.

Çalışmanın bundan sonraki aşamasında en düşük IC_{50} değerine sahip olan P2 molekülü kullanılarak inhibisyon çeşidi belirlendi. Bu amaçla “2.4. İnhibisyon Çeşidinin Belirlenmesi” kısmında anlatıldığı gibi inhibitör yokluğunda ve iki farklı inhibitör konsantrasyonunda ($2,90 \mu\text{M}$ ve $5,80 \mu\text{M}$) olacak şekilde farklı pNPG konsantrasyonlarında α -glukozidaz aktiviteleri belirlendi. Elde edilen enzim aktivite değerleri kullanılarak Lineweaver - Burk grafiği çizildi (Şekil 49).



Şekil 49. α -Glukozidazın **P2** yokluğunda ve iki konsantrasyonunda Lineweaver - Burk grafiği

Şekil 49'dan da görüldüğü gibi **P2** molekülü varlığında tıpkı α -amilazda olduğu gibi K_m değişmemekte V_{maks} ise azalmaktadır. Dolayısıyla molekülün α -glukozidazı da non-kompetitif yolla inhibe ettiği görülmektedir. Molekülün inhibitör bağlanma sabiti yani K_i değeri Tablo 10'daki değerler kullanılarak hesaplandı ve $1,14 \mu\text{M}$ olarak belirlendi.

Tablo 10. **P2** molekülü varlığında α -glukozidaz inhibisyon türünün ve K_i değerinin belirlenmesi

İnhibitör konsantrasyonu (μ M)	K_m (mM)	V_{maks} (μ mol/dak)	İnhibisyon türü	Ortalama K_i (μ M)
İnhibitörsüz	0,42	0,56	Non-kompetitif	1,14
2,90	0,42	0,16		
5,80	0,41	0,09		

3.4. ADME Özellikleri

Kalkon ve pirazolin türevi moleküller ile standart inhibitör olan akarbozun ADME özellikleri Molinspiration ve SwissADME internet araçları kullanılarak belirlendi. Yüzde absorpsiyon (%ABS) değeri TPSA kullanılarak $\%ABS = 109 - (0.345 \times TPSA)$ eşitliğine göre hesaplandı (Zhao vd., 2002). Elde edilen sonuçlar Tablo 11’de verildi.

Tablo 11. Kalkon ve pirazolin türevi moleküllerin ADME özellikleri

	% ABS	TPSA ($\text{\AA}^2$)	n- ROTB	MV	MW ≤ 500	miLogP ≤ 5	n-ON acceptors ≤ 10	n-OHNNH donors ≤ 5	nviolations ≤ 1
K1	94.13	43.09	4	244.44	291.27	3.91	2	2	0
K2	94.13	43.09	4	244.44	291.27	4.12	2	2	0
K3	94.13	43.09	4	244.44	291.27	4.14	2	2	0
P1	91.61	50.41	3	256.49	305.30	3.60	3	3	0
P2	91.61	50.41	3	256.49	305.30	3.62	3	3	0
P3	91.61	50.41	3	256.49	305.30	3.65	3	3	0
Akarboz	-4.51	329.00	13	548.95	645.61	-5.51	19	14	3

%ABS: Yüzde absorpsiyon, TPSA: Topolojik polar yüzeyi alanı, n-ROTB: döneabilen bağların sayısı, MV: molekül hacmi, MW: molekül ağırlığı, miLogP: bileşiğin n-oktanol ve su arasındaki dağılım katsayısının logaritması, n-ON acceptors: hidrojen bağı alıcıların sayısı n-OHNNH: hidrojen bağı vericilerinin sayısı, nviolations: “5 kural” dışında olan özellik sayısı

3.5. Moleküler Modelleme Çalışmaları

Sentezlenen kalkon ve pirazolin türevi moleküllerin α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyonu açısından etkinliğini bulabilmek için teorik olarak moleküler modelleme hesaplamaları gerçekleştirildi. Organik moleküllerin α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin aktif bölgelerine bağlanma afinitelerini gösteren bağlanma enerjileri Tablo 12’de görülmektedir.

Tablo 12. Organik moleküllerin α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin aktif bölgelerine bağlanma afiniteleri

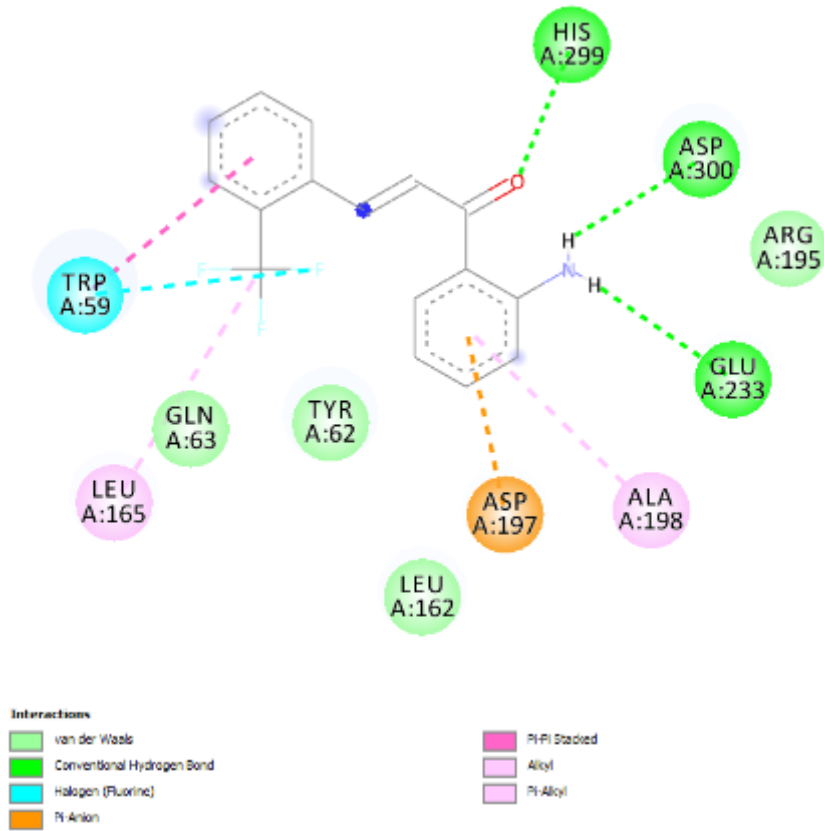
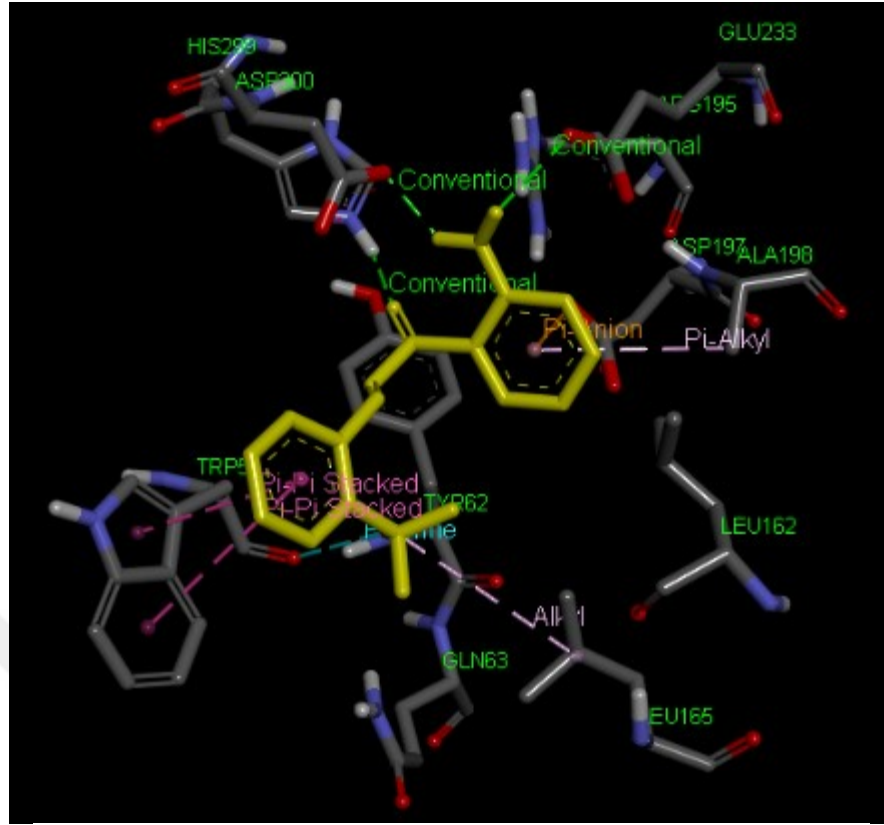
Organik molekül	α -Amilaza bağlanma enerjisi (ΔG , kcal/mol)	α -Glukozidaza bağlanma enerjisi (ΔG , kcal/mol)
K1	-9,0	-7,0
K2	-8,7	-7,6
K3	-8,5	-7,5
P1	-8,8	-7,6
P2	-8,2	-7,1
P3	-8,9	-8,0

Çalışılan kalkon ve pirazolin türevi moleküllerin hesaplanan teorik bağlanma enerjileri α -amilaz durumunda -8,2 ile -9,0 kcal/mol aralığında, α -glukozidaz varlığında ise -7,0 ile -8,0 kcal/mol aralığında olduğu tespit edildi. Bu sonuçlara göre teorik olarak en yüksek bağlanma enerjisini veren moleküllerin yani en etkili inhibitör moleküllerinin α -amilaz için **K1** ve **P3**, α -glukozidaz için **P3** olduğu belirlendi.

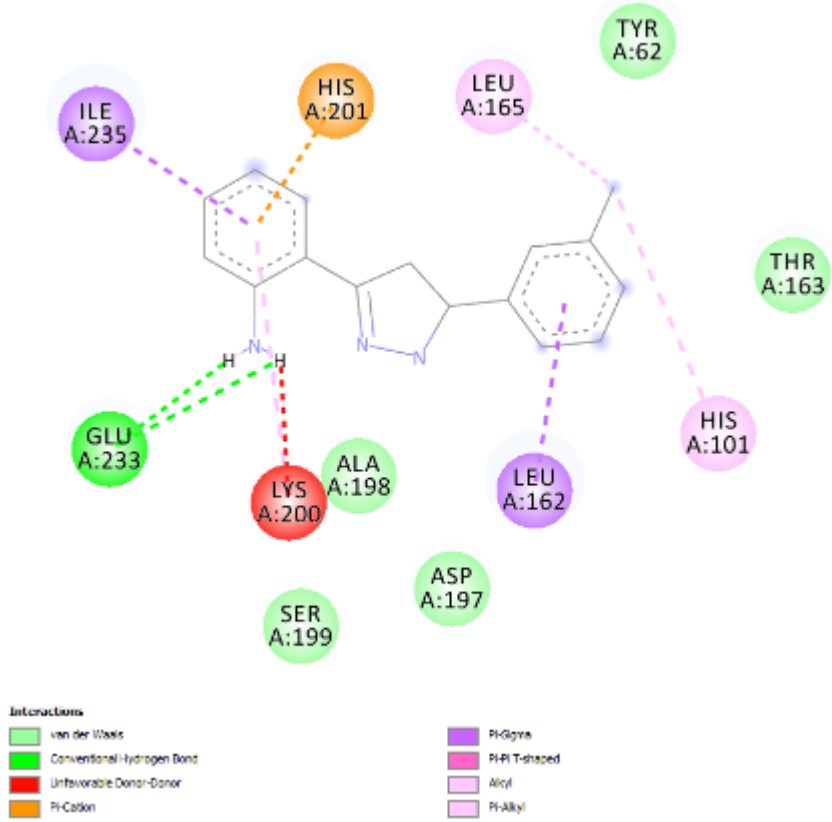
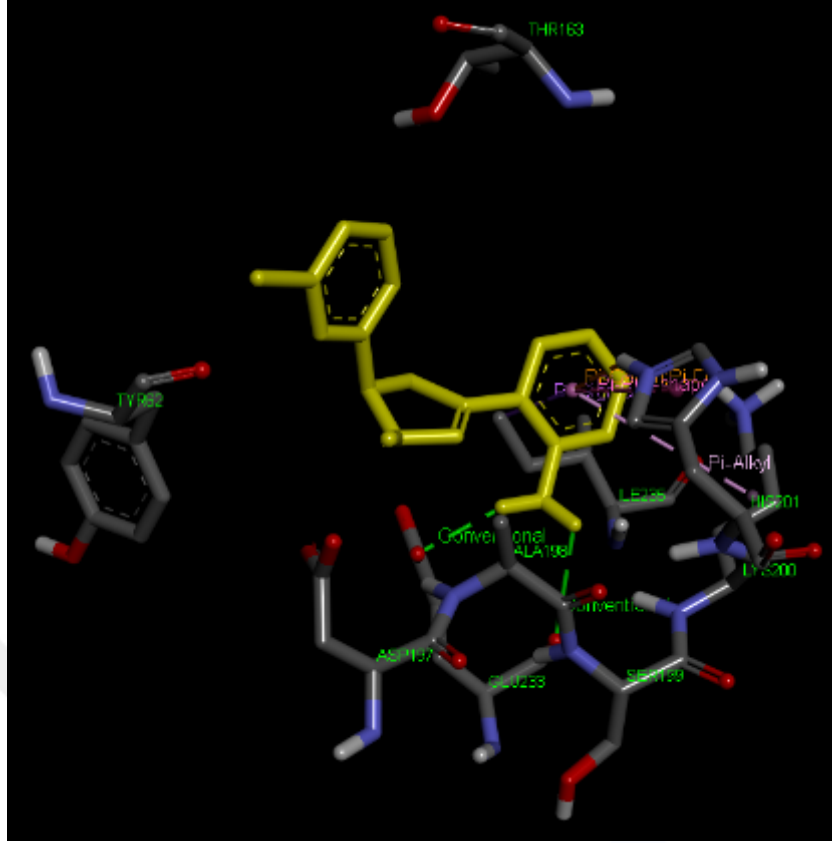
In vitro şartlarda α -amilaz için **K1** ve **P3** moleküllerin IC_{50} değerleri istatistiksel olarak akarbozdan farklı ve ondan daha büyük olarak bulunurken **P2** molekülünün istatistiksel olarak akarbozla aynı IC_{50} değerine sahip olan en etkili inhibitör olduğu tespit edildi. Dolayısıyla elde edilen *in vitro* ve *in silico* sonuçların α -amilaz için birbiri ile örtüşmediği belirlendi.

α -Glukozidaz varlığında ise *in vitro* şartlarda **P1**, **P2** ve **P3** moleküllerinin tamamı için istatistiksel olarak birbiriyle aynı olan ama akarbozdan farklı ve ondan küçük olan IC_{50} değerleri tespit edildi. *In silico* şartlarda en iyi bağlanma enerjisinin **P3** molekülü ile elde edilmesi *in vitro* ve *in silico* sonuçların α -glukozidaz için de örtüşmediğini gösterdi.

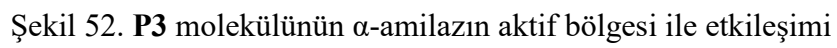
Potansiyel inhibitör olabileceği *in vitro* (α -amilaz ve α -glukozidaz için **P2**) ve *in silico* (α -amilaz için **K1** ile **P3** ve α -glukozidaz için **P3**) olarak belirlenen organik moleküllerin hedef enzimlerin aktif bölgelerindeki görüntüleri (Şekil 50-54) ve aminoasitlerle yaptıkları etkileşimler (Tablo 13 ve 14) aşağıda verildi.

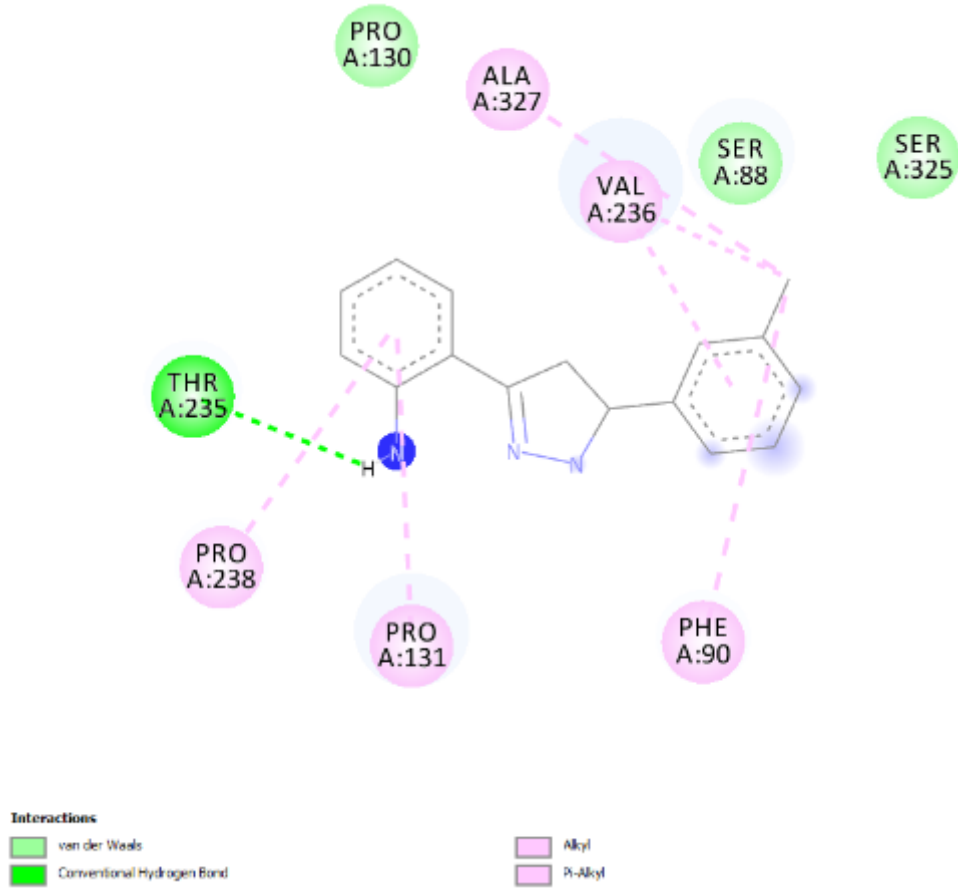
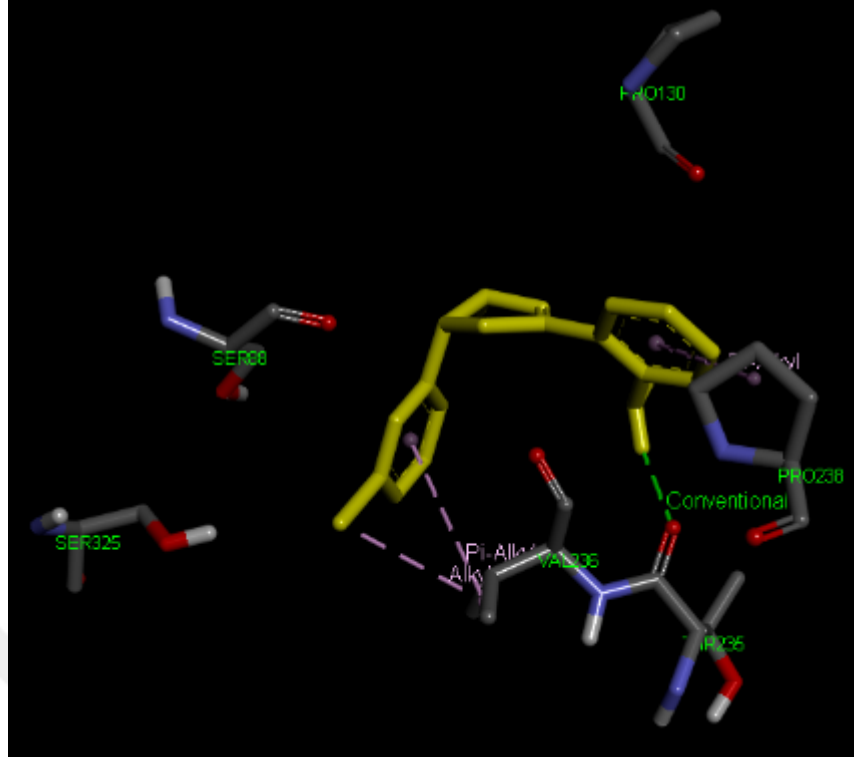


Şekil 50. **K1** molekülünün α -amilazın aktif bölgesi ile etkileşimi

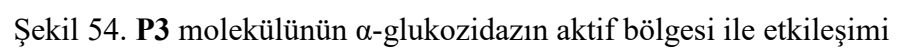


Şekil 51. **P2** molekülünün α -amilazın aktif bölgesi ile etkileşimi





Şekil 53. **P2** molekülünün α -glukozidazın aktif bölgesi ile etkileşimi



Tablo 13. **K1**, **P2** ve **P3** moleküllerinin α -amilazın aktif bölgesi ile etkileşimleri

Molekül	ΔG (kcal/mol)	Etkileşimin ayrıntısı	Etkileşim uzunluğu (Å)	Etkileşim kategorisi	Etkileşim tipi
K1	-9,0	A:HIS299:HE2 - :UNK1:O	2,04904	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
		:UNK1:H - A:ASP300:OD2	2,02338	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
		:UNK1:H - A:GLU233:OE2	2,7107	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
		A:TRP59:O - :UNK1:F	3,09591	Halogen	Halogen (Fluorine)
		A:ASP197:OD1 - :UNK1	3,41857	Electrostatic	Pi-Anion
		A:TRP59 - :UNK1	4,15099	Hydrophobic	Pi-Pi Stacked
		A:TRP59 - :UNK1	4,95426	Hydrophobic	Pi-Pi Stacked
		:UNK1:C - A:LEU165	4,8922	Hydrophobic	Alkyl
		:UNK1 - A:ALA198	4,63417	Hydrophobic	Pi-Alkyl
P2	-8,2	:UNK1:H - A:GLU233:O	2,88991	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
		:UNK1:H - A:GLU233:OE1	2,26213	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
		A:HIS201:HE2 - :UNK1	2,49096	Hydrogen Bond; Electrostatic	Pi-Cation;Pi-Donor Hydrogen Bond
		A:ILE235:CD1 - :UNK1	3,51674	Hydrophobic	Pi-Sigma
		A:HIS201 - :UNK1	4,45245	Hydrophobic	Pi-Pi T-shaped
		:UNK1 - A:LYS200	4,93361	Hydrophobic	Pi-Alkyl
P3	-8,9	A:HIS299:HE2 - :UNK1:F	2,28754	Hydrogen Bond; Halogen	Conventional Hydrogen Bond;Halogen (Fluorine)
		A:ASP197:OD1 - :UNK1:F	2,92858	Halogen	Halogen (Fluorine)
		A:ASP300:OD1 - :UNK1:F	3,01583	Halogen	Halogen (Fluorine)
		A:ASP300:OD1 - :UNK1:F	3,1198	Halogen	Halogen (Fluorine)
		A:ASP300:OD2 - :UNK1:F	3,13162	Halogen	Halogen (Fluorine)
		A:ASP300:OD2 - :UNK1:F	3,49245	Halogen	Halogen (Fluorine)
		A:TRP59 - :UNK1	3,91913	Hydrophobic	Pi-Pi Stacked
		A:TRP59 - :UNK1	3,80631	Hydrophobic	Pi-Pi Stacked
		A:TYR62 - :UNK1	5,10503	Hydrophobic	Pi-Pi Stacked
		A:TYR62 - :UNK1:C	3,9695	Hydrophobic	Pi-Alkyl
		A:HIS299 - :UNK1:C	5,34681	Hydrophobic	Pi-Alkyl

Tablo 14. **P2** ve **P3** moleküllerinin α -glukozidazın aktif bölgesi ile etkileşimleri

Molekül	ΔG (kcal/mol)	Etkileşimin ayrıntısı	Etkileşim uzunluğu (Å)	Etkileşim kategorisi	Etkileşim tipi
P2	-7,1	:UNK1:H - A:THR235:O	2,30588	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
		A:ALA327 - :UNK1:CL	4,2187	Hydrophobic	Alkyl
		:UNK1:CL - A:VAL236	3,73342	Hydrophobic	Alkyl
		A:PHE90 - :UNK1:CL	4,7875	Hydrophobic	Pi-Alkyl
		:UNK1 - A:PRO131	5,19531	Hydrophobic	Pi-Alkyl
		:UNK1 - A:PRO238	5,08008	Hydrophobic	Pi-Alkyl
		:UNK1 - A:VAL236	4,77541	Hydrophobic	Pi-Alkyl
P3	-8,0	A:ASP91:HN - :UNK1:F	2,47762	Hydrogen Bond;Halogen	Conventional Hydrogen Bond;Halogen (Fluorine)
		:UNK1:H - A:LYS96:O	2,70512	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
		A:ARG89:O - :UNK1:F	3,26012	Halogen	Halogen (Fluorine)
		A:GLN323:OE1 - :UNK1:F	3,13589	Halogen	Halogen (Fluorine)
		A:GLN323:OE1 - :UNK1:F	3,39571	Halogen	Halogen (Fluorine)
		A:GLN323:OE1 - :UNK1:F	3,44026	Halogen	Halogen (Fluorine)
		A:ASP91:OD1 - :UNK1	4,09292	Electrostatic	Pi-Anion
		A:ASP91:OD2 - :UNK1	3,30958	Electrostatic	Pi-Anion
		:UNK1:C - A:PRO125	4,64381	Hydrophobic	Alkyl
		:UNK1:C - A:VAL321	4,37341	Hydrophobic	Alkyl
		A:TRP273 - :UNK1:C	4,97449	Hydrophobic	Pi-Alkyl
		:UNK1 - A:ALA93	4,31934	Hydrophobic	Pi-Alkyl
		:UNK1 - A:PRO125	4,72167	Hydrophobic	Pi-Alkyl
		:UNK1 - A:VAL321	5,11631	Hydrophobic	Pi-Alkyl

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Günümüzde, insan yaşamı süresi ve yaşam kalitesi, tarihsel olarak benzeri görülmemiş seviyelere ulaşmıştır. Gelişmiş ülkelerdeki bu artış, büyük ölçüde sağlıklı beslenme, modern sağlık hizmetleri ve iyileşmiş yaşam koşullarıyla ilişkilendirilmektedir. Farmasötik ürünlerin geliştirilmesi ve etkin bir şekilde dağıtımı, insan sağlığını iyileştirmede kritik bir rol oynamaktadır (Hopkins & Groom, 2002). İlaç araştırmaları, ilacın konsantrasyonu ile etkisi arasındaki ilişkiyi anlamaya ve yan etkilerin en aza indirilmesine odaklanmaktadır (Van Der Graaf & Gabrielsson, 2009).

Araştırmacılar, terapötik moleküllerin çözünürlükleri ve proteinlerle etkileşim potansiyellerinin yanı sıra, bu ilaçların biyokimyasal mekanizmalarının anlaşılmasının önemini vurgulamaktadır (Gies & Landry, 2003). Günümüzde klinik uygulamalarda kullanılan ve biyolojik olarak oral yoldan alınabilen terapötik ilaçların bir kısmı enzim inhibitörleri olarak önemli bir yere sahiptir. Çoğu yeni keşfedilen ilaç adayı, spesifik enzim hedeflerinin inhibisyonuna dayanarak geliştirilmekte ve optimize edilmektedir (Ravichandran, 2013). Metabolik süreçler, enzimlerin katalitik aktivitelerine bağımlıdır ve bu enzimlerin hastalık süreçlerindeki yüksek spesifite, onları ilaç geliştirme için cazip hedefler haline getirmektedir (Miller & Wolfenden, 2002). Enzim inhibitörleri, enfeksiyon, metabolik, kardiyovasküler, nörolojik hastalıklar ve kanser gibi birçok patolojinin tedavisinde etkili birer araç olarak değerlendirilmektedir (Robertson, 2005).

İlaç keşfi alanındaki uzman görüşleri, mevcut uygulamaları ve gelecekteki yönelimleri, enzimlerin katalitik mekanizmalarının derinlemesine anlaşılmasının ve bu mekanizmalarla etkileşimde bulunan küçük moleküllü bileşiklerin optimize edilmesinin önemini ortaya koymaktadır. Terapötik ilaçlarla ilgili çalışan birçok araştırmacı, organik sentezle üretilen ve onaylı olan enzim inhibitörlerinin fizikokimyasal özelliklerine, molekül kütlesi, hidrojen bağ donör ve alıcı sayısı, apolar yüzey alanı gibi özelliklere odaklanmaktadır (Veber vd., 2002).

Günümüzdeki hastalıkların tedavi süreçlerinde enzim inhibitörü olma potansiyeli taşıyan küçük molekül ağırlıklı organik sentez moleküllerinin, hedeflenen enzimlerle genellikle zayıf etkileşimler yoluyla bağlandığı bildirilmektedir. Bu tür inhibitörler, enzim-substrat kompleksine, serbest enzime ya da hem enzime hem de substrata eş zamanlı olarak bağlanma kapasitesine sahiptir. Bağlanma mekanizmalarını anlamak için moleküllerin IC_{50}

değerleri ile denge ayrışma sabiti olan K_i ve bağlanma süreçlerine dair Gibbs serbest enerjisi hesaplamalarının yapılması önem taşımaktadır (Tehrani vd., 2019).

Diyabet, dünya çapında sıklığı sürekli artan bir sağlık problemidir ve körlük, kalp ve böbrek hastalıkları gibi ciddi ve tedavisi maliyetli komplikasyonlara neden olmaktadır. Kan şekeri kontrolü ve hiperglisemiye önleme yaklaşımları, diyabet tedavisinde merkezi bir öneme sahiptir. Günümüzde uygulanan tedavilerin hiçbirisi tek başına veya birlikte normal kan şekeri homeostazını yeniden oluşturmamaktadır. Ayrıca, diyabet tedavisinde kullanılan ilaçların kullanımında birçok sınırlama vardır; diyabet yönetimi için mevcut ilaçlar, hepatotoksisite, karın ağrısı, şişkinlik, ishal ve hipoglisemi gibi ciddi yan etkiler gösterebilirler. Ayrıca uzun süreli tedaviden sonra, bu ilaçlar için ilaç direncinin geliştiği bildirilmiştir. Bu nedenle, araştırmacılar potansiyel kaynaklardan ilaç adaylarının keşfine yönelik çalışmalara odaklanmıştır (Orhan vd., 2014).

Bu çalışma kapsamında, bazı kalkon ve pirazolin türevi moleküllerin (**K1**, **K2**, **K3**, **P1**, **P2** ve **P3**) α -amilaz ve α -glukozidaz gibi karbonhidrat sindirim enzimleri üzerindeki inhibitör etkileri *in vitro* ve ayrıca moleküler modelleme çalışmaları ile *in silico* olarak belirlendi. Karbonhidratların sindiriminde rol oynayan bu enzimlerin inhibisyonu, yemek sonrası kan şekeri artışını önemli ölçüde azaltabilir. Böylelikle, özellikle Tip 2 diyabet için yeni potansiyel ajanların bulunmasının önü açılabilir.

Sentez çalışmalarının ilk aşamasında elde edilen kalkon bileşiklerinin literatür taraması yapıldığında **K1** bileşiğinin yeni, **K2** ve **K3** bileşiklerinin ise literatürde mevcut olduğu belirlendi (Database: CAlplus, 2020). Kalkonların yapılarının aydınlatılmasında NMR (^1H , ^{13}C (APT)) ve FT-IR spektroskopik verileri kullanıldı. Ayrıca, NMR spektroskopisinden elde edilen veriler ACD NMR programı kullanılarak desteklendi. **K1**-**K3** kodlu bileşiklerin ^1H -NMR spektrumları incelendiğinde, kalkonlarda beklenen α,β -doymamış karbonil grubu protonlarının 7,54-7,75 ppm (H-2) ve 7,74-8,07 ppm (H-3) aralıklarında $J=16,0$ Hz'lik etkileşme sabitiyle sergiledikleri AB spin sistemi kalkon bileşiklerinin oluşumunu destekledi. Yine aynı bileşikler için ^{13}C -NMR spektrumlarında, 191,06 ve 191,08 ppm'lerde görülen karbonil grubuna (C-1) ait rezonans sinyalleri, 124,75-127,41 ppm aralığında C-2 ve 138,22-140,96 ppm aralığında da C-3 karbonlarına ait rezonans sinyallerinin varlığı da yapıları ayrıca destekler niteliktedir. Bu bileşiklerin FT-IR spektrumları incelendiğinde 3507-3384 cm^{-1} frekans aralığında asimetrik ve 3339-3279 cm^{-1} frekans aralığında simetrik $-\text{NH}_2$ gerilme titreşimlerine, 1653-1648 cm^{-1} frekans aralığında $\text{C}=\text{O}$, 1591-1576 cm^{-1} frekans aralığında $\text{C}=\text{C}$ gerilme titreşimlerine ve 747-745

cm^{-1} frekans aralığında ise C-F gerilme titreşimlerine ait pikler sentezlenen kalkonlardaki fonksiyonel grupları doğrulamaktadır.

Kalkonlar 5 üyeli heterohalkalı bileşiklerin sentezinde kullanılan oldukça etkin ara ürünlerdir. Yapılarında bulunan α,β -doymamış karbonil grubu halkalaşma reaksiyonlarında sorumlu yapıdır. Bu doğrultuda sentez çalışmalarının ikinci aşamasında **K1-K3** bileşiklerine hidrazin hidratın ayrı ayrı asit katalizli ortamda Michael katılması sonucu 3,5-disübstitüe-2-pirazolin bileşiklerinin (**P1-P3**) sentezleri gerçekleştirildi.

Yapılan literatür çalışmaları, sentezlenen 3 adet pirazolin türevinin yeni olduğunu gösterdi. Elde edilen pirazolin türevlerinin yapıları $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (APT) ve FT-IR spektral verileri kullanılarak aydınlatıldı. **P1-P3** bileşiklerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları incelendiğinde δ 3,09-3,29 ppm ($\text{C}_4\text{-H}_\text{A}$) ve δ 3,61-3,94 ppm ($\text{C}_4\text{-H}_\text{B}$) aralıklarında dubletin dubleti (dd) ve δ 4,89-5,58 ppm aralığında triplet (t) görünümlü kaynaşmış dubletin dubleti yarılmalara sırasıyla pirazolin halkasının geminal $-\text{CH}_2-$ ve $-\text{CH}-$ protonlarından spin-spin etkileşmelerinden kaynaklanmaktadır. Bu durum metin (H-5) ve diastereotopik metilen ($\text{H-4}_\text{A}/\text{4}_\text{B}$) protonlarının spesifik özelliğidir ve metilenin (C-4) özdeş olmayan H_A ve H_B protonları ile metinin (C-5) H_X protonu arasındaki geminal-vicinal etkileşmeyle ABX spin sistemini oluşturmuştur (Kahriman, 2020; Haşimoğlu, 2016). Yine pirazolin halkasının oluşmasıyla **P1**, **P2** ve **P3** bileşikleri için sırasıyla 6,38, 6,33 ve 6,06 ppm’deki $-\text{NH}$ (H-1) rezonans sinyalinin geniş singlet olarak ortaya çıkması ve halkalaşma sonucu kalkonlara özgü H-2 ve H-3 protonlarına ait rezonans sinyallerinin de kaybolması pirazolin oluşumunu destekler niteliktedir. Bileşiklerin $^{13}\text{C-NMR}$ (APT) spektrumları değerlendirildiğinde ise **P1**, **P2** ve **P3** bileşikleri için sırasıyla 153,07, 153,68 ve 155,67 ppm’de görünen kuaternerik rezonans sinyalleri halkalaşma sonucu oluşan C-3 karbonuna ait olup yine 43,09-43,63 ppm aralığındaki C-4 ($-\text{CH}_2$) ve 57,91-62,47 ppm aralığındaki C-5 ($-\text{CH}$) rezonans sinyalleri de pirazolin halkasının en belirgin kanıtları olup yapıları doğrular niteliktedir. Ayrıca çıkış bileşikleri olan kalkonların 191,06 ve 191,08 ppm’de rezonansa gelen karbonil karbonuna ait rezonans sinyalinin kaybolması da yapıyı destekleyen bir diğer spektral veridir. **P1**, **P2** ve **P3** bileşiklerinin FT-IR spektrumları incelendiğinde sırasıyla 3461, 3460 ve 3463 cm^{-1} ’de asimetric ve 3324, 3322 ve 3318 cm^{-1} ’de de simetric $-\text{NH}_2$ gerilmeleri keskin ikili band şeklinde titreşim verdi. Pirazolin oluşumunun en önemli kanıtı olan N-H, C=N ve C-N gerilme bantları ise sırasıyla 3324-3318, 1611-1608 ve 1209-1208 cm^{-1} aralıklarında beklenildiği şekilde görüldü.

Sentezlenen moleküllerin *in vitro* antidiyabetik etkileri istatistiksel olarak incelendiğinde, bir pirazolin türevi olan **P2** molekülünün α -amilazı non-kompetitif yolla inhibe ettiği ve standart inhibitör olan akarboz ile aynı IC_{50} değerine sahip olduğu görüldü. Dolayısıyla **P2** molekülü, α -amilaz için potansiyel bir inhibitör madde olarak değerlendirilebilir. α -Glukozidaz enzimi için pirazolin moleküllerinin hepsinin istatistiksel olarak birbirleriyle aynı hatta akarbozdan daha düşük IC_{50} değerlerine sahip olduğu bulundu. Pirazolinler içinde en düşük IC_{50} 'ye sahip olan **P2** molekülü varlığında tıpkı α -amilazda olduğu gibi K_m değişmemekte V_{maks} ise azalmaktadır. Dolayısıyla molekülün α -glukozidazı da non-kompetitif yolla inhibe ettiği görülmektedir. Molekülün inhibitör bağlanma sabiti 1,14 μ M olarak belirlendi.

Kalkon ve pirazolin türevi moleküllerin antidiyabetik etkisinin incelendiği çalışmaların sayısı çok yüksek değildir. Bu çalışmalardan bazılarında elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir.

Yapılan bir çalışmada, 1,3,5-triaril-2-pirazolinlerin (**2a-2q**) kapsamlı bir kütüphanesi tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Yeni sentezlenen bileşikler α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri açısından taranmış ve tamamının çeşitli oranlarda enzim inhibisyonuna sebep olduğu bulunmuştur. Sentezlenen pirazolinler arasında **2c**, **2k**, **2m** ve **2o** bileşikler, sırasıyla $212,52 \pm 1,31$, $237,26 \pm 1,28$, $138,35 \pm 1,32$ ve $114,57 \pm 1,35$ μ M'lik IC_{50} değerleriyle α -glukozidazı akarbozdan ($IC_{50} = 375,82 \pm 1,76$ μ M) daha iyi inhibe etmiştir. Bu nedenle, sırasıyla -Br, -N(C₂H₅)₂, 2-CF₃ ve 4-CF₃ taşıyan **2c**, **2k**, **2m** ve **2o** bileşiklerinin, gelecekte diyabet tedavisi için potansiyel ilaç adayları olarak önerilebileceği ifade edilmiştir (Mehmood vd., 2022).

Bir seri pirazolinil-açıl tiyoüre (**5a-j**) bileşiğinin α -amilaz inhibisyon potansiyeli, iyot-niştasta yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve **5c** hariç hepsinde orta derecede inhibisyon görülmüştür. Akarboz için IC_{50} değerinin 10,2 μ M olarak bulunduğu çalışmada, **5b** (IC_{50} 99,3 μ M), **5e** (IC_{50} 97,4 μ M) ve **5f** (IC_{50} 90,3 μ M) nispeten daha iyi inhibisyon göstermiştir. Diğer bileşiklerin ise 103 - 131 μ M aralığında IC_{50} değerlerine sahip daha düşük inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. (**5a-j**) serisinin α -glukozidaz inhibisyon potansiyeli incelendiğinde bütün bileşiklerin yüksek/orta derecede α -glukozidaz inhibisyon potansiyeli gösterdiği, akarbozla karşılaştırıldığında (IC_{50} 9,5 μ M) ise en yüksek inhibisyonun **5a** (IC_{50} 69,9 μ M) ve **5b** (IC_{50} 68,3 μ M) bileşikleriyle elde edildiği belirlenmiştir (Saeed vd., 2024).

Yine yeni sentezlenen bir seri pirazolin türevinin *in vitro* α -glukozidaz ve α -amilaz inhibisyon etkileri araştırılmış, **2c** ve **2f** dışındaki tüm bileşikler, akarboza ($IC_{50} = 72,57 \pm 3,16 \mu M$) kıyasla daha yüksek α -amilaz inhibisyonuna neden olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde, **2k** dışındaki tüm bileşikler, akarboza ($IC_{50} = 207,08 \pm 12,20 \mu M$) kıyasla α -glukozidaza karşı daha yüksek inhibitör aktivite göstermiştir. Moleküler modelleme çalışmalarından elde edilen veriler, inhibitör aktivite sonuçlarını desteklemiştir. Yapı-aktivite ilişkisi (SAR) çalışmaları, sırasıyla klor, flor, brom, nitro ve siyano gibi elektron çekici bir grupla 4. pozisyonda substitüe edilen **2a**, **2b**, **2c**, **2e** ve **2f** bileşiklerinin α -glukozidaza karşı daha güçlü inhibitör etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Aksine, metoksil gibi elektron verici grupla substitüe edilen **2i** bileşiği, inhibisyonda bir azalmaya neden olmuştur. Bu, elektronik faktörlerin inhibitör potansiyelini modüle etmede önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Uğraş vd., 2024).

Başka bir çalışmada ise bir dizi pirazol-kalkon türevi (**4a-4d**, **6a-6d** ve **8a-8b**) tasarlanmış, sentezlenmiş ve *in vitro* α -amilaz inhibitör aktiviteleri değerlendirilmiştir. Pirazol türevleri olan **4b**, **4d** ve **6a**, standart inhibitor akarbozdan daha güçlü enzim inhibisyonu göstermiştir. IC_{50} değerleri bu bileşikler için 29,7 - 32,8 μM arasında değişirken, akarboz için 37,5 μM 'dir. Morfolin grubuna sahip bileşik olan **6a**, 29,7 μM IC_{50} değeri ile α -amilaz enzimine karşı en yüksek inhibisyon aktivitesini göstermiştir. Bu grubun piperidin ile değiştirilmesi (**6b**), α -amilaz enzim aktivitesinin IC_{50} değerini 49 μM 'a düşürmüştür (Nidhar vd., 2022).

Bu bahsedilen çalışmaların sonuçları incelendiğinde çalışılan bileşiklerin hem α -amilaz hem de α -glukozidaz enzimlerini çoğunlukla akarbozdan çok daha az biçimde inhibe ettikleri görülmüştür. Bu tez kapsamında yapılan çalışmada ise α -amilaz için **P2** molekülü ve akarbozun istatistiksel olarak aynı IC_{50} değerine sahip olduğu belirlenmiştir. α -Glukozidaz için ise **P1**, **P2** ve **P3** moleküllerinin akarbozdan 55-250 kat arasında daha etkin inhibisyona sebep olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla **P2** molekülünün çok etkili bir *in vitro* antidiyabetik aktiviteye sahip olduğu rahatlıkla söylenebilir.

Kalkon ve pirazolin türevi moleküller ile standart inhibitör olan akarbozun ADME özellikleri Molinspiration ve SwissADME internet araçları kullanılarak belirlendi. Çalışılan organik moleküllerin hepsinin Lipinski'nin beş kuralına uygun oldukları ayrıca hepsinin 10'dan az dönebilen bağa, 140'tan az A2 topolojik polar yüzey alanına (TPSA) ve 91,61 ve 94,13 olmak üzere yüzde absorpsiyona sahip olması, bunların iyi derecede oral

biyoyararlılığı olabileceğini gösterdi. Bu sonuçlar moleküllerin tamamının iyi birer ilaç molekülü adayı olabileceğini gösterdi.

Moleküler modelleme çalışmaları, bileşiklerin tamamının hem α -amilaz hem de α -glukozidaz enziminin aktif bölgesine bağlandığını gösterdi. Ancak her iki enzim durumunda da *in vitro* ve *in silico* sonuçların birbiri ile örtüşmediği belirlendi. *In vitro* şartlarda en iyi α -amilaz inhibisyonunu **P2** gösterirken, *in silico* şartlarda **K1** ve **P3** molekülleri gösterdi. α -Glukozidaz varlığında da benzer bir durum açığa çıktı. *In vitro* şartlarda pirazolin moleküllerinin tamamı için istatistiksel olarak birbiriyle aynı ama akarbozdan küçük olan IC_{50} değerleri tespit edildi. Ancak, *in vitro* çalışmalarda **P2** molekülünün en düşük IC_{50} değerine sahip olduğu belirlendi.

Bilindiği üzere, *in vitro* ve *in silico* çalışmaların sonuçları tamamen uyuşmayabilir. Çünkü moleküler modelleme çalışmaları yapılırken inhibitör moleküllerin hedef enzim ile aktif bölgedeki etkileşimleri incelenmiştir. Ancak *in vitro* çalışmalar **P2** molekülünün her iki enzimi de non-kompetitif yolla inhibe ettiğini göstermiştir. Bu, **P2** molekülünün enzimin aktif bölge dışında bir bağlanma bölgesinde etkileşime girdiği anlamına gelir. Dolayısıyla *in vitro* ve *in silico* sonuçların örtüşmemesi açıklanabilir bir durumdur.

5. ÖNERİLER

Yukarıda açıklanan sonuçlar ışığında aşağıdaki önerilerin dikkate alınması ile çalışma daha ileri seviyeye taşınabilir.

1. Çalışılan bütün bileşikler içinde en iyi α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyonuna sebep olan bir pirazolin türevi olan **P2** bileşiğinin *in silico* ve *in vitro* çalışmalar ile birlikte yürütülecek bir proje kapsamında farklı türevleri sentezlenip daha etkin bir antidiyabetik ajan bulunması hedeflenebilir.
2. Bileşiklerin sudaki çözünürlüklerini artırmaya yönelik sentez çalışmaları yapılabilir.
3. *In vitro* ve *in silico* şartlarda etkili olan bileşik veya bileşiklerin *in vivo* ortamda antidiyabetik etkileri araştırılarak ilaç olma yolunda bir üst aşamaya geçilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Abacı, A., Böber, E., & Büyükgebiz, A. (2007). Tip 1 Diyabet. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Hastalıkları Bilim Dalı, 5, 1-10.
- Abbas, G., Al-Harrasi, A., Hussain, H., Hamaed, A., & Supuran, C. T. (2019). The management of diabetes mellitus-imperative role of natural products against dipeptidyl peptidase-4, α -glucosidase and sodium-dependent glucose Co-transporter 2 (SGLT2), *Bioorganic Chemistry*, 86, 305-315.
- ACD/Labs Software, Educatures Pack, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada, 2001.
- Agu, P.C., Afiukwa, C. A., Orji, O. U., Ezech, E. M., Ofoke, I. H., Ogbu, C. O., & Aja, P. M. (2023). Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Scientific Reports*, 13(1), 13398.
- Almasi, F., & Mohammadipanah, F. (2021). Prominent and emerging anti-diabetic molecular targets. *Journal of Drug Targeting*, 29(5), 491-506.
- Antar, S. A., Ashour, N. A., Sharaky, M., Khattab, M., Ashour, N. A., Zaid, R. T., Roh, E. J., Elkamhawy, A., & Al-Karmalawy, A. A. (2023). Diabetes mellitus: Classification, mediators, and complications; A gate to identify potential targets for the development of new effective treatments. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 168, 115-734.
- Ardiansah, B. (2018). Some Bioactivities of heterocyclic compounds containing pyrazoline moiety – A short review. *International Journal of ChemTech Research*, 11 (10), 22-26.
- Arunachallam, P., Kumaravel, V., & Gopal, S. R. (2024). Purification and biochemical characterization of α -amylase from *Aspergillus tamaraii* MTCC5152. *Preparative Biochemistry Biotechnology*, 54(3), 444-453.
- Ayazoglu Demir, E., Colak, A., Kalfa, A., Yasar, A., Bekircan, O., & Yildirim Akatin, M. (2019). Investigation of tyrosinase inhibition by some 1, 2, 4 triazole derivative compounds: *In vitro* and *in silico* mechanisms. *Turkish Journal of Biochemistry*, 44(4), 473-481.
- Bardalai, D., & Panneerselvam, P. (2012). Pyrazole and pyrazoline derivatives: potential anti-inflammatory and analgesic agents. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 2 (3), 1-81.
- Brady, G. P., & Jr. Stouten, P. F. (2000). Fast prediction and visualization of protein binding pockets with PASS. *Journal of Computational Aided Molecular Design*, 14(4), 383-401.

- Brayer, G.D. Luo, Y., & Withers, S.G. (1995). The structure of human pancreatic alphaamylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Science*, 4, 1730-1742.
- Burmaoğlu, S. (2017). Anti-kanser aktiviteye sahip bileşikler olarak flor-süstitüe kalkanlar. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 7(2), 417-422.
- Chauhan, P. S., Puri, N., & Sharma, P. (2012). Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications, *Applied Microbiology Biotechnology*, 93, 1817-1830.
- Chen, H., Xiong, L., & Wang, W. J. (2017). Reviews on α -glucosidase inhibitor from plant secondary metabolites, *China Journal of Chinese Materia Medica*, 42(15), 2915-2924.
- Chukwunyere, C. F., Awonuga, D. O., Adesina, O. F., & Udenze, I. C. (2020). Gestational diabetes: Comparison of random and fasting plasma glucose as modalities of screening. *Diabetes*, 8(1), 110-117.
- Copeland, R. A. (2005). Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists. *Methods of Biochemical Analysis*, 46, 1-265.
- Çeliker, M. (2017). *50 Yaş Üzeri Tip 2 Diyabetes Mellitus Tanısı Olmayanlar, Tip 2 Diyabetes Mellitus Tanısı Olup Komplikasyon Gelişmeyenler ve Tip 2 Diyabetes Mellitus Tanısı Olup Nefropati Komplikasyonu Gelişen Hastalarda Sarkopeni Karşılaştırması*. Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Adıyaman.
- Database: CAplus (2020). Chalcone compound useful in treatment of cancer and its preparation, Assignee: Shenyang Research Institute of Chemical Industry Co., Ltd. China, CN111171018 A 2020-05-19 | Language: Chinese.
- des Gachons, C. P., & Breslin, P. A. S. (2016). Salivary amylase: Digestion and metabolic syndrome, *Current Diabetes Reports*, 16, 1-7.
- Dyer, J., Wood, I. S., Palejwala, A. Ellis, A., & Shirazi-Beechey, S. P. (2002). Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 282, 241-248.
- Ertunga, N. S., Saka, E. T., Taskin-Tok, T., Bektas, K. I., & Yildirim Akatin, M. (2024). Synthesis, characterization, DNA interaction, molecular docking, and α -amylase and α -glucosidase inhibition studies of a water soluble Zn (II) phthalocyanine. *Dalton Transactions*, 53(27), 11354-11367.
- Gao, X., Cai, X., Yang, W., Chen, Y., Han, X., & Ji, L. (2018). Meta-analysis and critical review on the efficacy and safety of alpha-glucosidase inhibitors in Asian and non-Asian populations, *Journal of Diabetes Investigation*, 9(2), 321-331.

- Geurtsen, M. L., Van Soest, E. E., Voerman, E., Steegers, E. A., Jaddoe, V. W., & Gaillard, R. (2019). High maternal early-pregnancy blood glucose levels are associated with altered fetal growth and increased risk of adverse birth outcomes. *Diabetologia*, 62, 1880-1890.
- Ghode, P., & Jain, S. K. (2018). Structural requirements for some 3-amino-N-substituted-4-(substituted phenyl) butanamides as dipeptidyl peptidase-IV inhibitors using 3D-QSAR and molecular docking approaches. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79(6), 974-986.
- Gies, P., & Landry, Y. (2003). *Drug Targets: Molecular Mechanisms of Drug Action*. London: Elsevier.
- Goodfor, P. J. A. (1978). Computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of Medicinal Chemistry*, 28(7), 849-857.
- Gül, K. (2015). Tip 1 Diyabetes Mellitus'da İnsüline Ek Tedaviler Metformin. *Türkiye Endokrinoloji & Metabolizma Hastalıkları Kongresi, Kongre Kitabı*, s. 32-33. Antalya.
- Güner, S. (2007). *Biyokimya-I*. Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi Yayınları.
- Haider, K., Shafeeque, M., Yahya, S., & Yar, M. S. (2022). A comprehensive review on pyrazoline based heterocyclic hybrids as potent anticancer agents, *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 100042.
- Haşimoğlu, Z. (2016). *Yeni 3,5-Disubstitue Pirazolin Türevleri ve Bor Komplekslerinin Sentezi, Uv Absorpsiyon Özellikleri ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi*, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon.
- Hedrington, M. S., & Davis, S. N. (2019). Considerations when using alpha-glucosidase inhibitors in the treatment of type 2 diabetes, *Expert Opinion Pharmacotherapy*, 20, 2229-223.
- Hollander, M. H., Paarlberg, K. M., & Huisjes, A. J. (2007). Gestational diabetes: a review of the current literature and guidelines. *Obstetrical Gynecological Survey*, 62(2), 125-136.
- Hopkins, A.L., & Groom, C.R. (2002). The druggable genome, *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(9), 727-730.
- Jongkees, S. A. K., & Withers, S. G. (2014). Unusual enzymatic glycoside cleavage mechanisms, *Accounts of Chemical Research*, 47, 226-235.
- Joshi, S. R., Standl, E., Tong, N., Shah, P., Kalra, S., & Rathod, R. (2015). Therapeutic potential of α -glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: an evidence-based review, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 16(13), 1959-1981.

- Kaczmarek, K., Artym, J., Bojarska, J., Pacholczyk-Sienicka, B., Waśko, J., Jelemenska, I., & Zimecki, M. (2024). The Immunosuppressive properties of cyclo-D-Pro-Pro- β 3-HoPhe-Phe- tetrapeptide selected from stereochemical variants of cyclo-Pro-Pro- β 3-HoPhe-Phe- peptide. *Pharmaceutics*, 16(8), 1106.
- Kahriman, N. (2020). Yeni 3,5-disübstitüe-2-pirazolin türevlerinin sentezi ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi. *BAUN Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22(1), 34-47.
- Kahriman, N., Haşımoğlu, Z., Serdaroğlu, V., Beriş, F. Ş., Barut, B., & Yaylı, N. (2017). Synthesis of novel pyrazolines, their boron–fluorine complexes, and investigation of antibacterial, antioxidant, and enzyme inhibition activities. *Archiv der Pharmazie*, 350(2), 1600285.
- Kahssay, S. W., Hailu, G. S., & Desta, K. T. (2021). Design, synthesis, characterization and *in vivo* antidiabetic activity evaluation of some chalcone derivatives, *Drug Design, Development and Therapy*, 15, 3119-3129.
- Kastenholz, M. A., Pastor, M., Cruciani, G., Haaksma, E. E., & Fox. T. (2000). GRID/CPA: a new computational tool to design selective ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(16), 3033-3044.
- Keha, E., & Küfrevioğlu, İ. (2020). *Biyokimya* (11. Baskı), İstanbul, Aktif Yayınevi.
- Kerkour, R., Moumeni, O., El houda Rabhi, N., Mehri, M., Boubli, A., Chafai, N., & Chafaa, S. (2024). Synthesis, DFT investigation, ADME-T properties, molecular docking and molecular dynamics simulation of new α -aminophosphonate inhibitor targeting Mpro and RdRp enzymes in SARS-CoV-2. *Journal of Molecular Structure*, 1315, 138842.
- Kothari, M., Kannan, K., Sahadevan, R., & Sadhukhan, S. (2024). Novel molecular hybrids of EGCG and quinoxaline: Potent multi-targeting antidiabetic agents that inhibit α -glucosidase, α -amylase, and oxidative stress. *International Journal of Biological Macromolecules*, 263, 130175.
- Kumar, L., Lal, K., Yadav, P., Kumar, A., & Paul, A. K. (2020). Synthesis, characterization, α -glucosidase inhibition and molecular modeling studies of some pyrazoline-1H-1, 2, 3-triazole hybrids. *Journal of Molecular Structure*, 1216, 128253.
- Kutlutürk, F. (2015). Tip 1 Diyabetes Mellitus’da İnsüline Ek Tedaviler Metformin. *Türkiye Endokrinoloji ve metabolizma Hastalıkları Kongresi, Kongre Kitabı*, s. 38-41. Antalya.
- Levitt D. G., & Banaszak, L.J. (1992). POCKET: A computer graphics method for identifying and displaying protein cavities and their surrounding amino acids. *Journal of Molecular Graphics*, 10(4), 229-234.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy B.W., & Feeney, P.J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3-25.

- Lombard, V., Golaconda-Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013, *Nucleic Acids Research*, 42, 490-495.
- Luo, H., Wang, L.F., Imoto, T., & Hiji, Y. (2001). Inhibitory effect and mechanism of acarbose combined with gymnemic acid on maltose absorption in rat intestine, *World Journal of Gastroenterology*, 7, 9-15
- Macalino, S.J.Y., Gosu, V., & Hong, S. (2015). Role of computer-aided drug design in modern drug discovery, *Archives of Pharmacal Research*, 38, 1686-1701.
- Mahapata, D., Bharti, S., & Asati, V. (2015). Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 98, 69-114.
- Mandel, A. L., & Breslin, P. A. S. (2012). High endogenous salivary amylase activity is associated with improved glycemic homeostasis following starch ingestion in adults, *Journal of Nutrition*, 142, 853-858.
- McConkey B. J., Sobolev, V., & Edelman, M. (2002). The performance of current methods in ligand-protein docking. *Current Science*, 83, 845-855.
- Mcdougall, G. J., & Stewart, D. (2005). The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes, *Biofactors*, 23(4), 189-195.
- Mehmood, R., Sadiq, A., Alsantali, R. I., Mughal, E. U., Alsharif, M. A., Naeem, N., Javid, A., Al-Rooqi, M. M., Chaudhry, G., & Ahmed, S. A. (2022). Synthesis and evaluation of 1, 3, 5-triaryl-2-pyrazoline derivatives as potent dual inhibitors of urease and α -glucosidase together with their cytotoxic, molecular modeling and drug-likeness studies. *ACS Omega*, 7(4), 3775-3795.
- Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), 146-157.
- Mezei, M. (2003). A new method for mapping macromolecular topography. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 21(5), 463-472.
- Miller, B.G., & Wolfenden, R. (2002). Catalytic proficiency: The unusual case of OMP decarboxylase, *Annual Review of Biochemistry*, 71, 847-885.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mohamed, E. A. H., Siddiqui, M. J. A., Ang, L. F., Sadikun, A., Chan, S. H., Tan, S. C., Asmawi, M. Z., & Yam, M. F. (2012). Potent α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities of standardized 50% ethanolic extracts and sinensetin from *Orthosiphon stamineus* Benth as anti-diabetic mechanism, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 176.

- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Macmillan.
- Nidhar, M., Sonker, P., Sharma, V. P., Kumar, S., & Tewari, A. K. (2022). Design, synthesis and in-silico in vitro enzymatic inhibition assays of pyrazole-chalcone derivatives as dual inhibitors of α -amylase DPP-4 enzyme. *Chemical Papers*, 76(3), 1707-1720.
- Orhan, N., Hoçbaç, S., Orhan, D. D., Asian, M., & Ergun, F. (2014). Enzyme inhibitory and radical scavenging effects of some antidiabetic plants of Turkey. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 17(6), 426.
- Ouyang, Y., Li, J., Chen, X., Fu, X., Sun, S., & Wu, Q. (2021). Chalcone derivatives: role in anticancer therapy. *Biomolecules*, 11(6), 894.
- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M. & Vickers, M. H. (2018). The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3342.
- Potluri, H., Prasanth, D. S., & Atmakuri, L. R. (2021). *In vivo* antinociceptive effect of methanolic extract of *Ipomoea marginata* Desr. in rodents as well as in silico molecular docking of some phytoconstituents from the plant. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(4), 732–741.
- Ravichandran, R. (2013). Pharmacokinetic Study of Nanoparticulate Curcumin: Oral Formulation for Enhanced Bioavailability. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4, 291-299.
- Robertson, J.G. (2005) . Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. *Biochemistry*, 44(15), 5561-5571.
- Roglic, G. (2016). WHO Global report on diabetes: A summary. *International Journal of Noncommunicable Diseases*, 1(1), 3.
- Saeed, A., Ahmed, A., Haider, M. B., Ismail, H., Hayat, K., Shabir, G., & El-Seedi, H. R. (2024). Novel pyrazoline linked acyl thiourea pharmacophores as antimicrobial, urease, amylase and α -glucosidase inhibitors: design, synthesis, SAR and molecular docking studies. *RSC advances*, 14(2), 1018-1033.
- Smith, J., & Simons, C. (2004). *Enzymes and Their Inhibition Drg Development*. London: CRC Enzyme Inhibitors Series.
- Svensson, B. (1994). Protein engineering in the α -amylase family; catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Molecular Biology*, 25,141-157.
- Tan, K., Tesar, C., Wilton, R., Jedrzejczak, R. P., & Joachimiak, A. (2018). Interaction of antidiabetic a-glucosidase inhibitors and gut bacteria α -glucosidase. *Protein Science*, 27, 1498-1508.

- Tehrani, M.B., Emani, P., Rezaei, Z., Khoshneviszadeh, M., Ebrahimi, M., Edraki, N., Mahdavi, M., Larijani, B., Ranjbar, S., Foroumadi, A., & Khoshneviszadeh, M. (2019). Phthalimide-1,2,3-triazole hybrid compounds as tyrosinase inhibitors; synthesis, biological evaluation and molecular docking analysis, *Journal of Molecular Structure*, 1176, 86-93.
- Tiwari, S. P., Srivastava, R., Singh, C. S., Shukla, K., Singh, R. K., Singh, P., Singh, R., Singh, N. L., & Sharma, R. (2015). Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. *Journal of Global Biosciences*, 4(1), 1886-1901.
- Tomar, N. R. (2018). Molecular docking studies with rabies virus glycoprotein to design viral therapeutics. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(4), 486.
- Uğraş, Z., Tok, F., Çakir, C., Tuna, K., Tatar Yilmaz, G., Mutlu, D., Sicak, Y., Arslan, Ş., Öztürk, M., & Koçyiğit Kaymakçioğlu, B. (2024). Exploring 2-Pyrazoline derivatives as potent antidiabetic agents and cholinesterase inhibitors: Their synthesis and molecular docking studies. *Journal of Molecular Structure*, 13(15), 138-978.
- Van Der Graaf, P. H., & Gabrielsson, J. (2009). Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Reasoning in Drug Discovery and Early Development. *Future Medicinal Chemistry*, 1(8), 1371-1374.
- Varghese, B., Al-Busafi, S.N., Suliman, F.O., & Al-Kindy, S.M.Z. (2017). Unveiling a versatile heterocycle: pyrazoline a review. *RSC Advances*, 7, 46999-47016.
- Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal Medicinal Chemistry*, 45, 2615-23.
- Vincent, C., Krishnakumar, K., & Elias, G. (2020). Pharmacological potential of a resourceful heterocycle: Pyrazoline – A review. *American Journal of PharmTech Research*, 10 (3), 2249-3387.
- Yildirim Akatin, M., Ayaz, F. A., Boyraci, G. M., Er Kemal, M., Batan, N., & Colak, N. (2024). An evaluation of the antioxidant potential and in vitro enzyme inhibition profile of selected bryophytes from Northeast Anatolia (Türkiye). *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-13.
- Yıldız, Y., & Arı, F. (2023). Kalkon türevlerinin antikanser mekanizmaları. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(3), 1633-1646.
- Yılmaz, M., Kaya, A., Balcı, K., Karadeniz, Ş., Şahin, İ., Dağdelen, S., & Sargin, M. (2019). *Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi*. İstanbul: Armoni Nüans Baskı Sanatları.
- Zhai, X., Wu, K., Ji, R., Zhao, Y., Lu, J., Yu, Z., Xu, X., & Huang, J. (2022). Structure and function insight of the α -glucosidase QsGH13 from *Qipengyuania seohaensis* sp. SW-135. *Frontiers in Microbiology*, 13, 849585.

- Zhang, P., Yang, L., Chen, W., Liu, M., & Wu, H. (2021). Synthesis of [1, 4] thiazino [4, 3-a] indol-10-one derivatives through radical anti aza-michael addition of 2'-aminochalcones. *Organic Letters*, 23(15), 6094-6098.
- Zhao, Y. H., Abraham, M. H., Le, J., Hersey, A., Luscombe, C. N., Beck, G., Sherborne, B., & Cooper, I. (2002). Rate-limited steps of human oral absorption and QSAR studies. *Pharmaceutical Research*, 19, 1446-57.



ÖZGEÇMİŞ

Fatma ÇOLAK, ilköğretimini Zigana İlköğretim Okulu'nda bitirdikten sonra lise eğitimini 2015 yılında Erdoğan Lisesi'nde tamamladı. 20015-2016 Eğitim Öğretim yılında Giresun Üniversitesi Mühendislik Fakültesinde Gıda Mühendisliği bölümünde Lisans eğitimine başladı. 2019 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalında tezli yüksek lisans programına başladı.

