

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

BAZI YENİ ORGANİK BİLEŞİKLERİN TİROSİNAZ VE ALFA AMİLAZ İNHİBİSYON
POTANSİYELLERİNİN *İN VİTRO* VE *İN SİLİKO* OLARAK İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra KURNAZ

ŞUBAT 2021
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI YENİ ORGANİK BİLEŞİKLERİN TİROSİNAZ VE ALFA AMİLAZ İNHİBİSYON
POTANSİYELLERİNİN *İN VİTRO* VE *İN SİLİKO* OLARAK İNCELENMESİ**

Büşra KURNAZ

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

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07 / 01 / 2021

Tezin Savunma Tarihi : 04 / 02 / 2021

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Trabzon 2021

İthaf

*Hayatım boyunca aldığım tüm kararlarda her daim arkamda duran, bana olan inançlarını
hiç kaybetmeyen, sonsuz özveride bulunan ve emek vermiş olan sevgili aileme...*

ÖNSÖZ

Yüksek lisansım boyunca bilgisini, desteğini ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen, bu çalışma için desteklenen projenin planlanıp hayata geçirilmesini sağlayan, tüm eleştirileri ve önerileri ile tez çalışmama yön veren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK'a,

Tez çalışmalarım için gerekli olan moleküllerin sentezini gerçekleştiren Sayın Prof. Dr. Neslihan DEMİRBAŞ'a, Dr. Serap BAŞOĞLU ÖZDEMİR'e ve tez çalışmamda moleküler modelleme çalışmalarını yapan Sayın Prof. Dr. Safiye SAĞ ERDEM'e ve İlke DEMİR'e,

Bilgi birikimlerinden ve tecrübelerinden faydalandığım, tez çalışmalarımda bana her zaman desteğini sağlayan ve yol gösteren sevgili Öğr. Gör. Dr. Fulya ÖZ TUNCAY'a ve Dr. Ümmühan ÇAKMAK'a,

İhtiyaç duyduğumda bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan sayın Doç. Dr. Yakup KOLCUOĞLU'na, Öğr. Gör. Dr. Çiğdem AYNA'ya ve lisansüstü eğitimim süresince ders almış olduğum başta Dr. Öğr. Üyesi İnci Selin DOĞAN'a ve tüm hocalarıma,

Yüksek lisans derslerimin bir kısmını South Bohemia Üniversitesi/Çekya'da almam için imkan sunarak akademik gelişimimde çok önemli katkı sağlayan KTÜ Erasmus Koordinatörlüğü'ne ve South Bohemia Üniversitesi Kimya Bölümü'ndeki başta Sayın Doç. Dr. Jan STERBA olmak üzere tüm hocalarıma,

Yüksek lisansım boyunca her anımda desteğini esirgemeyen, tezin yazımı sırasında faydalı önerileri ile katkıda bulunan sevgili doktora öğrencisi Melek KAYA'ya ve güler yüzü ile yanımda olan yüksek lisans öğrencisi Kader TEKİNTAŞ'a,

Tez sürecim dahil olmak üzere tüm bu süre zarfında beni anlayışla karşılayan, sıkıntılı zamanlarımda her daim yanımda olan canım kuzenim Gizem ATILA'ya, sevgili ev arkadaşım Hilal DÖNMEZ'e, yakın arkadaşlarım olan sevgili Büşra TEPER'e, Ebru KURTKAN'a ve tüm arkadaşlarıma,

Tez çalışmamı, TÜBİTAK-117Z199 kodlu proje ile destekleyen, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na,

Son olarak; bugünlere gelmemde büyük katkıları olan, her zaman desteğini, ilgisini ve sevgisini hissettiğim aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Büşra KURNAZ

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bazı Yeni Organik Bileşiklerin Tirosinaz ve Alfa Amilaz İnhibisyon Potansiyellerinin *İn vitro* ve *İn siliko* Olarak İncelenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/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. 04/02/2021

Büşra KURNAZ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XII
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Enzim İnhibisyonu	3
1.2.1. Enzim İnhibisyonunun Farmasötik Önemi.....	4
1.3. İnhibitör Olarak Kullanılan Küçük Moleküller ve Hedef Enzimleri	4
1.4. Piperazin/Triazol/Florokinolon Halkası İçeren Moleküllerin Yapısı ve Biyolojik Aktiviteleri	5
1.5. İlaç Keşfinde Yeni Yaklaşımlar	10
1.5.1. Moleküler Modelleme	10
1.5.2. ADME Özellikleri	11
1.6. Tirosinaz	12
1.6.1. Tirosinazın Yapısı, Fonksiyonu ve Kataliz Mekanizması	12
1.6.2. Klinik Açısından Tirosinaz Enzim İnhibisyonunun Önemi	15
1.7. Alfa Amilaz	18
1.7.1. Alfa Amilazın Yapısı, Fonksiyonu ve Kataliz Mekanizması	19
1.7.2. Klinik Açısından Alfa Amilaz Enzim İnhibisyonunun Önemi	21
1.8. Çalışmanın Amacı ve Önemi	23
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	24

2.1.	Kimyasallar, Çözeltiler ve Gereçler	24
2.1.1.	Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler	24
2.1.2.	Kullanılan Cihazlar ve Markaları	24
2.1.3.	Enzim Aktivitesi Tayininde ve İnhibisyonun Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	24
2.1.3.1.	Tirosinaz Enzimi ile İlgili Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler	24
2.1.3.2.	Alfa Amilaz Enzimi ile İlgili Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler	25
2.1.4.	Çalışmada Kullanılan Yeni Sentezlenmiş Organik Moleküller	26
2.2.	Tirosinaz Aktivitesi Tayini	27
2.2.1.	Tirosinaz Aktivitesinin Optimizasyonu	29
2.2.2.	Tirosinaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	29
2.2.3.	Tirosinaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	29
2.2.4.	Tirosinaz Konsantrasyonunun Aktivite Üzerine Etkisi	29
2.2.5.	Substrat Konsantrasyonunun Tirosinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	29
2.2.6.	Organik Moleküllerin Tirosinaz İnhibisyon Potansiyellerinin İncelenmesi	30
2.3.	Alfa Amilaz Aktivitesi Tayini	31
2.3.1.	Alfa Amilaz Aktivitesinin Optimizasyonu	31
2.3.2.	Alfa Amilaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	31
2.3.3.	Alfa Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	32
2.3.4.	Alfa Amilaz Konsantrasyonunun Aktivite Üzerine Etkisi	32
2.3.5.	Substrat Konsantrasyonunun Alfa Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	32
2.3.6.	Organik Moleküllerin Alfa Amilaz İnhibisyon Potansiyellerinin İncelenmesi	32
2.4.	İstatistikî Analiz	33
2.5.	İn Siliko Çalışmalar.	34
2.5.1.	ADME Çalışmaları	34
2.5.2.	Moleküler Modelleme Çalışmaları	34
3.	BULGULAR	36
3.1.	Tirosinaz Aktivitesinin Optimizasyonu	36

3.1.1.	Tirosinaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	36
3.1.2.	Tirosinaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	37
3.1.3.	Tirosinaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi	37
3.1.4.	Tirosinaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	38
3.2.	Tirosinaz İnhibisyon Çalışmaları	39
3.3.	Alfa Amilaz Aktivitesinin Optimizasyonu	44
3.3.1.	Alfa Amilaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	44
3.3.2.	Alfa Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	45
3.3.3.	Alfa Amilaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi	46
3.3.4.	Alfa Amilaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	46
3.4.	Alfa Amilaz İnhibisyon Çalışmaları	47
3.5.	İn Siliko Çalışmalar	52
3.5.1.	ADME Çalışmaları	52
3.5.2.	Moleküler Modelleme Çalışmaları	53
4.	SONUÇ VE TARTIŞMA	61
5.	ÖNERİLER	69
6.	KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ		



Yüksek Lisans

ÖZET

BAZI YENİ ORGANİK BİLEŞİKLERİN TİROSİNAZ VE ALFA AMİLAZ İNHİBİSYON POTANSİYELLERİNİN *İN VİTRO* VE *İN SİLİKO* OLARAK İNCELENMESİ

Büşra KURNAZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

2021, 85 Sayfa

Bu çalışmada, yeni sentezlenmiş, piperazin, 1,2,4-triazol ve/veya florokinolon yapısı içeren bazı bileşiklerin klinik öneme sahip tirozinaz ve α -amilaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine inhibisyon potansiyelleri incelenmiş ve ayrıca IC_{50} değerleri, inhibisyon türü ve K_i değerleri belirlenmiştir. Bu bileşiklerin enzimlerle etkileşimlerini ve bağlanma enerjilerini teorik olarak belirlemek amacıyla da moleküler modelleme programları kullanılmıştır. Ticari olarak temin edilen enzimler için optimum reaksiyon şartları belirlendikten sonra, kinetik çalışmalar yapılarak en düşük IC_{50} değerine sahip moleküller tirozinaz için 7. molekül, α -amilaz için ise 5. molekül olarak tespit edilmiştir. 7. molekül için inhibisyon mekanizması nonkompetitif olup, K_i değeri 477,86 μ M iken 5. molekül için inhibisyon mekanizması ankompetitif, K_i değeri ise 355,84 μ M olarak belirlenmiştir. Moleküler modelleme sonuçlarına göre, aktif bölge bağlanma enerjisi en düşük olan moleküller tirozinaz için 5. molekül, α -amilaz için ise 6. molekül olarak gözlenmiştir. Bununla birlikte *in vitro* çalışmalarla yüksek inhibisyon profili gösteren moleküllerin her iki enzim durumunda da *in siliko* çalışmalarda en etkili üç molekülden biri olduğu gözlenmiştir. Çalışılan tüm moleküllerin ayrıca ADME özellikleri de incelenmiş olup, her bir molekülün ilaç aday molekülü olarak yüksek bir potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda tirozinaz ve α -amilaz enzimleri için sırasıyla 7. ve 5. moleküllerin potansiyel birer inhibitör molekül olarak değerlendirilebileceği görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Enzim inhibisyonu, Moleküler modelleme, Piperazin, 1,2,4-triazol, Florokinolon, ADME

Master Thesis

SUMMARY

IN VITRO AND *IN SILICO* INVESTIGATION OF TYROSINASE AND ALPHA AMYLASE INHIBITION POTENTIALS OF SOME NEW ORGANIC COMPOUNDS

Büşra KURNAZ

Karadeniz Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Advisor: Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

2021, 85 Pages

In this study, the inhibition potential, IC_{50} values, inhibition type and K_i values of compounds containing some piperazine, 1,2,4-triazole and/or fluoroquinolone structures on clinically important tyrosinase and α -amylase enzymes were investigated. Theoretically, molecular modeling programs were used to determine the interaction of these compounds with enzymes and their binding energies. After determining the optimum reaction conditions for commercially available enzymes, kinetic studies were carried out and the molecules with the lowest IC_{50} value were determined as 7th molecule for tyrosinase and 5th molecule for α -amylase. The inhibition mechanism for the 7th molecule is noncompetitive, while the K_i value is 477.86 μ M, the inhibition mechanism for 5th molecule is uncompetitive and the K_i value was determined to be 355.84 μ M. According to molecular modeling results, molecules with the lowest active site binding energy were observed as 5th molecule for tyrosinase and 6th molecule for α -amylase. In addition, *in vitro* studies, it has been observed that molecules showing a high inhibition profile are one of the three most effective molecules *in silico* studies in both enzyme states. ADME properties of all studied molecules were also examined, and it was determined that each molecule has a high potential as a drug candidate molecule. As a result of the studies, it is predicted that the 7th molecule and 5th molecules, may be potential inhibitors for tyrosinase and α -amylase, respectively.

Key Words: Enzyme inhibition, Molecular modeling, Piperazine, 1,2,4-Triazole, Fluoroquinolone, ADME

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Piperazin halkası içeren bazı ilaçlar	7
Şekil 2. Florokinolon halkası içeren bazı ilaçlar	8
Şekil 3. 1,2,4-Triazol halkası içeren bazı ilaçlar	9
Şekil 4. A) Tirosinazın aktif bölgesi B) Aktif bölgenin temsili gösterimi C) <i>Agaricus Bisporus</i> tirosinazının kristal yapısı	13
Şekil 5. Monofenolaz ve difenolaz aktivitesi	14
Şekil 6. Melaninin biyosentetik yolu	15
Şekil 7. Çeşitli α -amilazların yapısal özellikleri A) İnsan tükürük amilazı B) Memeli (domuz pankreası) C) Bakteri (<i>Bacillus licheniformis</i>) D) Bitki (Arpa) amilazı	18
Şekil 8. İnsan ve domuz pankreatik α -amilazlarının üç boyutlu yapıları A) İnsan pankreatik α -amilazı B) Domuz Pankreatik α -amilazı	19
Şekil 9. Nişasta üzerindeki α -amilaz etkisi	20
Şekil 10. <i>Bacillus licheniformis</i> α -amilaz yapısı	21
Şekil 11. Tirosinaz aktivitesinin pH ile değişimi	36
Şekil 12. Tirosinaz aktivitesinin sıcaklık ile değişimi	37
Şekil 13. Tirosinaz aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi	38
Şekil 14. Substrat varlığında tirosinaz aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği	38
Şekil 15. 1. molekülün tirosinaz aktivitesi üzerine etkisi	39
Şekil 16. 2. molekülün tirosinaz aktivitesi üzerine etkisi	40
Şekil 17. 3. molekülün tirosinaz aktivitesi üzerine etkisi	40
Şekil 18. 4. molekülün tirosinaz aktivitesi üzerine etkisi	41
Şekil 19. 5. molekülün tirosinaz aktivitesi üzerine etkisi	41
Şekil 20. 6. molekülün tirosinaz aktivitesi üzerine etkisi	42
Şekil 21. 7. molekülün tirosinaz aktivitesi üzerine etkisi	42
Şekil 22. 8. molekülün tirosinaz aktivitesi üzerine etkisi	43
Şekil 23. 7. molekül varlığında tirosinaz inhibisyon türünün belirlenmesi	44
Şekil 24. Alfa amilaz aktivitesinin pH ile değişimi	45
Şekil 25. Alfa amilaz aktivitesinin sıcaklık ile değişimi	45

Şekil 26.	Alfa amilaz aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi	46
Şekil 27.	Substrat varlığında alfa amilaz aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği ...	47
Şekil 28.	1. molekülün alfa amilaz aktivitesi üzerine etkisi	48
Şekil 29.	2. molekülün alfa amilaz aktivitesi üzerine etkisi	48
Şekil 30.	3. molekülün alfa amilaz aktivitesi üzerine etkisi	49
Şekil 31.	4. molekülün alfa amilaz aktivitesi üzerine etkisi	49
Şekil 32.	5. molekülün alfa amilaz aktivitesi üzerine etkisi	50
Şekil 33.	6. molekülün alfa amilaz aktivitesi üzerine etkisi	50
Şekil 34.	5. molekül varlığında alfa amilaz inhibisyon türünün belirlenmesi	51
Şekil 35.	5. molekülün tirozinaz enzimi ile etkileşimi	54
Şekil 36.	6. molekülün tirozinaz enzimi ile etkileşimi	55
Şekil 37.	7. molekülün tirozinaz enzimi ile etkileşimi	55
Şekil 38.	8. molekülün tirozinaz enzimi ile etkileşimi	56
Şekil 39.	6. molekülün alfa amilaz enzimi ile etkileşimi	58
Şekil 40.	5. molekülün alfa amilaz enzimi ile etkileşimi	58
Şekil 41.	3. molekülün alfa amilaz enzimi ile etkileşimi	59

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Klinik olarak kullanılan enzim inhibitörleri	5
Tablo 2. Çalışmada kullanılan yeni sentezlenmiş organik moleküller	27
Tablo 3. Tirosinaz aktivitesi için standart reaksiyon karışımı	28
Tablo 4. Tirosinaz inhibisyon çalışması için hazırlanan reaksiyon karışımı	30
Tablo 5. Alfa amilaz aktivitesi için standart reaksiyon karışımı	31
Tablo 6. Alfa amilaz inhibisyon çalışması için hazırlanan reaksiyon karışımı	33
Tablo 7. Tirosinaz aktivitesinin optimizasyonu	39
Tablo 8. İnhibitör moleküllerinin tirosinaz aktivitesi üzerine etkisi	43
Tablo 9. 7. molekül varlığında tirosinaz inhibisyon türünün belirlenmesi ve K_i değeri	44
Tablo 10. Alfa amilaz aktivitesinin optimizasyonu	47
Tablo 11. İnhibitör moleküllerinin alfa amilaz aktivitesi üzerine etkisi	51
Tablo 12. 5. molekül varlığında alfa amilaz inhibisyon türünün belirlenmesi ve K_i değeri	52
Tablo 13. Sentezi gerçekleşmiş olan organik moleküllerin farmakokinetik özellikleri	53
Tablo 14. İnhibitör moleküllerinin tirosinaz enzime bağlanma enerjileri	54
Tablo 15. 5, 6, 7 ve 8 numaralı ligandların esnek doking sonucunda enzime en düşük enerji ile bağlanan konformasyonlarının tirosinaz enzimi ile yaptığı etkileşimler	56
Tablo 16. İnhibitör moleküllerinin alfa amilaz enzime bağlanma enerjileri	57
Tablo 17. 3, 5 ve 6 numaralı ligandların esnek doking sonucunda enzime en düşük enerji ile bağlanan konformasyonlarının alfa amilaz enzimi ile yaptığı etkileşimler	59

KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

°C	Celcius (sıcaklık birimi)
Dk.	Dakika
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
E.C.	Enzim kod numarası
g	Gram
I	İnhibitör
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
kcal	Kilokalori
kDa	Kilodalton
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _m	Maksimum hızın yarısına neden olan substrat konsantrasyonu
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
nm	Nanometre
S	Substrat
V	Enzimatik reaksiyon hızı
V _{maks}	Maksimum hız
ΔG	Gibbs serbest enerjisi
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikro

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimler, vücudumuzda gerçekleşen metabolik süreçlerdeki kimyasal reaksiyonların hızını arttıran çoğu protein yapılı biyolojik katalizörlerdir. Canlı bir organizma tarafından üretilen biyolojik madde veya biyolojik makromoleküller olarak da adlandırılmaktadırlar [1, 2].

Enzimler yaşam için gerekli olmakla birlikte, düzensiz enzim aktivitesi de hastalık durumlarına neden olabilir. Bazı durumlarda enzimleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar, bir hücre içinde anormal derecede yüksek enzim konsantrasyonlarına yol açabilir. Bunun yanı sıra, belirli mutasyonlar, katalitik olarak kritik rol oynayan amino asitlerde meydana gelen yapısal değişiklikler nedeniyle enzimin spesifik aktivitesinin artmasına sebep olabilir. Tüm bu durumlar birtakım patolojilere yol açabilir [3] ve bu yüzden enzimlerin biyolojik katalizör olma özellikleri onları genetik ya da patojenik orijinli hastalıklarla savaşmak için terapötik hedefler olarak mükemmel birer aday yapar [4]. Enzimlerin ilaç hedefi olarak çekiciliği yalnızca katalitik aktiviteye sahip olmalarından değil, aynı zamanda enzimlerin doğası gereği küçük molekül ağırlığına sahip olan ilaç benzeri moleküllerle inhibisyona yüksek derecede uygun olmalarından kaynaklanmaktadır. Küçük moleküllu ilaçlarla inhibisyona olan bu duyarlılık nedeniyle, enzimler günümüzde yeni ilaç keşfi ve tasarımı noktasında oldukça önemli bir hedeftir [3].

Klinik olarak kullanılmakta olan ilaçların çoğunluğu etkinliklerini şu iki yoldan birisiyle ortaya koymaktadır: (1) Vücuttaki agonist-antagonist etkileşmesini engellemek ya da (2) enfeksiyona veya hastalığa neden olan bakteriyel, mantar veya parazitik büyümeyle ilişkili ve kendi canlılığı için normal etkinliği gerekli olan bir enzimin aktivitesine engel olmaktır. Bu yüzden, hastalıkla veya enfeksiyonla ilişkilendirilip aktivitesinin engellenmesi gereken hedef enzimin belirlenmesinden, ilaçların pazara sunulmasına kadar bu tür inhibitörlerin dizayn edilmesi ve geliştirilmesi üzerine çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Enzimlerin inhibisyonu ile farmakolojik etkilerini ortaya çıkaran küçük moleküller, klinik kullanımda oral olarak verilen ilaçların neredeyse yarısını oluşturmaktadır [4]. Küresel ilaç geliştirme şirketleri bu konu hakkında kendilerini devamlı olarak geliştirmekte ve yenilemektedirler [5]. Bu tip küçük molekülleri geliştirme ve karakterize etme süreci (ilaç

tasarımı), mercek altına alınan enzim hakkında bilgi birikimini gerektirmektedir [4]. Bunun için öncelikle hedef enzim belirlenmeli ve enzim hakkındaki yapısal bilgiler yanında enzimin substratları, kinetiği ve mekanizması hakkındaki bilgiler inhibitörün doğru bir şekilde dizayn edilebilmesi için göz önünde bulundurulmalıdır. Daha sonra ilaç aday molekülünün *in vivo* olarak etkili olabilmesi için uygun absorplanma, dağılım, metabolizma ve istenmeyen yan etkilere sebep olmayacak şekilde etkinliğini göstereceği bölgede yeterli konsantrasyonda bulunması, hücre membranından geçebilmesi ve sistemik döngüde uygun bir zaman diliminde bozunmadan kalması gibi vücudun gereksinimlerine sahip olması gerekir [3, 6].

Birçok klinik durumda uygun dozda ilacın ağız yoluyla kullanılması istenmektedir. Tüm bu durumlar protein, gen veya terapötik temelli bazı doğal ürünler yerine küçük moleküllü ilaçların kullanılmasının daha uygun olacağını belirtmektedir. Bu gereksinimlere de bakıldığında en iyi uygunluk gösteren moleküller genellikle küçük molekül kütlesine sahip organik moleküllerdir ki yapıları genel olarak hidrofobik olmakla birlikte sınırlı sayıda ve spesifik olarak yönelmiş heteroatom ve hidrojen bağı sunucusu içermektedir [3, 7-9]. Bu nedenle yeni ilaç moleküllerinin belirlenebilmesi yukarıda bahsi geçen kriterleri yapısında bulunduran, küçük molekül kütleli organik bileşiklerin sentezini ve bunların ilaç olarak etkinliklerinin incelenmesini zorunlu kılmaktadır.

Akıllı ilaç tasarımı ile ilgili veriler uzun yıllar sadece ara metabolitlere odaklanıldığını göstermektedir. Fakat *in vivo* çalışmalarla kıyaslandığında teorik hesaplamalar ve basit bir enzim aktivite çalışması ile enzimin kinetiğinin önemi açıkça ortaya koyulabilmektedir. Bir enzimin inhibe olması sonucu ortamda biriken metabolitler göz ardı edilemez [10]. Öte yandan günümüzde klinik olarak kullanımda olan bazı enzim inhibitörlerinin hastalıkla ilişkilendirilen hedef enzimle birlikte benzer aktiviteye sahip olan diğer enzimlerin de inhibisyonuna ve hastalarda yan etki olarak farklı bazı rahatsızlıkların oluşmasına neden olabildiği bilinmektedir. Buna örnek olarak, diabet II tedavisinde α -glukozidaz inhibitörü olarak kullanılan akarboz, miglitol ve voglibozun alfa amilaz hedef enzimi yanında diğer bağırsak glukozidazlarını da inhibe edebildiği ve bunun sonucunda da şişkinlik, gaz hali ve diare gibi istenmeyen yan etkilere neden olabildiği söylenebilir. Bu yüzden araştırmaların sadece enzim inhibisyonu açısından değil aynı zamanda inhibisyon türünün belirlenebildiği kinetik çalışmalarla desteklenmesi, gözlenen yan etkileri minimize eden ya da ortadan kaldıran ve hedef enzime daha büyük ilgiyle bağlanan yeni inhibitör moleküllerinin araştırılması gerekmektedir [11-14]. Böylece *in vivo* çalışmalarla daha umut verici sonuçlar

alınabilecek çalışmalar yapılması beklenmektedir [10]. Diğer yandan bir ilacın, esas kullanım amacının yanında yan etki olarak diğer bir özel enzimin inhibisyonunu da sağlaması, belki de bu ilaca, yeni keşfedilmiş bir ilaç etkisi özelliği kazandırabilecektir. İlacın, minimum bile olsa, bu yeni keşfedilen role sahip olması, bu moleküllerin yapısal analoglarının tasarlanarak geliştirilmesine öncülük etmektedir.

1.2. Enzim İnhibisyonu

Enzim inhibisyonu, enzim inhibitörü olarak adlandırılan spesifik substrat veya bunun analogu ile bir enzimin etkisini azaltmak veya bloke etmek anlamına gelir. Modern zamanlarda, farmasötik bileşiklerin yanı sıra bazı doğal bileşikler, enzim inhibitörleri olarak pazarlanmakta ve bu inhibitörler, hücreler, bakteriler, virüsler ve insan vücudu içindeki enzim inhibisyonunda spesifik etkilerini sergilemektedirler [15].

Enzim inhibisyonu, enzimin aktif bölgesi ile kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler yapan organik kimyasal, inorganik metal veya biyosentetik herhangi bir bileşiğin varlığında etkilenen aktiviteyi inceleyen bir enzim-substrat reaksiyonu bilimidir. Tüm bu inhibitörlerin enzim reaksiyonunda etkileşimde bulunmak için aynı kuralı izledikleri iyi bilinmektedir [6].

Enzim inhibisyonu dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Dönüşümsüz inhibisyonda inhibitörlerin substrat ile yapısal bir ilişkisi yoktur ve inhibitörler enzimin aktif bölgesine kovalent olarak bağlanırlar. Bu türden inhibitörler, enzimden uzaklaştıramadıkları için enzimin kataliz yapma yeteneğini yok edecek şekilde enzimin aktivitesini inhibe ederler. Bu nedenle, geri döndürülemez inhibitörler bağlandıkları konumda enzim aktif bölgelerinin fonksiyonel gruplarını tanımlamak için kullanılırlar [16].

Dönüşümlü inhibisyonda ise inhibitörler enzime kovalent olmayan etkileşimler ile aktif bölgede veya aktif bölgenin dışında bağlanırlar. Dönüşümlü inhibisyon türünde mekanizmalar, enzim aktivitesine etkileri ve reaksiyon kinetiği açısından ele alındığında esasen üç farklı şekilde gerçekleşebilir. Bunlardan ilki yarışmalı inhibisyon türüdür. Yarışmalı inhibitörler, yapısal olarak substrat molekülünün kimyasal yapısına oldukça benzer, dolayısıyla enzimin aktif bölgesine dönüşümlü olacak şekilde ve substrat molekülü ile rekabet ederek bağlanabilir. Bu bağlanmanın sonucunda bir ürün elde edilemeyeceğinden dolayı enzimin aktivitesi yavaşlar veya durur. Bu durumda V_{maks} değeri değişmez fakat K_m değerinde artış gözlenir [17]. İkinci tür olan yarışmasız inhibisyonda (yarı yarışmalı ya da

ankompetitif inhibisyon), yarışmasız inhibitörler enzim yüzeyinde fakat aktif bölgenin dışında bulunan enzim-substrat kompleksine zayıf etkileşimlerle bağlanır. Bu bağlanma aktif bölgeden uzakta olmasına rağmen katalizi inaktive eden kompleks enzimin aktif ve allosterik bölgelerinde yapısal bozulmaya neden olur. Bu durumda hem V_{maks} hem de K_m değerlerinde bir azalmaya yol açar [17]. Son inhibisyon türü olan karışık inhibisyonda ise inhibitör molekülü enzime ya da enzim-substrat kompleksine aktif bölgenin dışında bağlanabilir. Bu durumda da V_{maks} değeri azalırken K_m değeri ise artar veya değişmez (nonkompetitif inhibisyon) [17].

1.2.1. Enzim İnhibisyonunun Farmasötik Önemi

İlaç hedefleri olarak düşünülebilecek biyolojik makromoleküller arasında enzimler, birçok hastalık sürecindeki etkinliklerinin öneminden ve küçük moleküler ağırlıklı ilaç benzeri moleküller tarafından inhibisyona iyi bir şekilde katkıda bulunduklarından dolayı üstün bir konuma sahiptirler. Şaşırtıcı olmayan bir şekilde enzim inhibitörleri günümüzde klinik olarak kullanılan ilaçların neredeyse yarısını temsil etmektedir. İnsan genomunun yakın zamanda yapılan araştırmaları genomun hastalıkla ilişkili, ilaçlanabilen hedefleri kodlayan kısmına enzimlerin hâkim olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, spesifik enzim inhibisyonunun öngörülebilir gelecek için farmasötik araştırmaların ana odak noktası olmaya devam edeceği düşünülmektedir. Küçük molekülü ilaçlarla inhibisyona olan bu duyarlılık nedeniyle enzimler, günümüzde büyük ilaç ve biyoteknoloji şirketlerinde yeni ilaç keşiflerinin ve tasarım çabalarının hedefi haline gelmiştir [3].

1.3. İnhibitör Olarak Kullanılan Küçük Moleküller ve Hedef Enzimleri

Enzim inhibitörleri, genellikle düşük moleküler ağırlıklı kimyasal bileşiklerdir. İlaç keşfinde, belirli enzimleri inhibe etmek için birkaç ilaç analogu seçilir veya tasarlanır. Bununla birlikte, birçok antitoksinin detoksifikasyonu veya azaltılmış toksik etkisi, esas olarak enzim inhibe edici etkileri sayesinde sağlanır. Bazı önemli klasik örnekler şunlardır: kanser kemoterapisinde metotreksat, malign hücrelerin DNA sentezini yarı seçici olarak inhibe eder; aspirin, proinflatuar prostaglandinlerin sentezini inhibe eder; sülfâ ilaçları, patojenik bakterilerin ve diğer pek çok ilacın büyümesi için gerekli olan folik asit sentezini

engeller. Siyanür, karbon monoksit ve poliklorlu bifenoller gibi yaşamı tehdit eden birçok zehir aslında birer enzim inhibitörleridir [16].

Enzimlerin gıda, tarım, kozmetik, deterjan, tekstil ve ilaç endüstrileri gibi çeşitli endüstrilerde kullanımı, azalan işlem süresi, düşük enerji girişi, maliyet etkinliği, toksik olmayan ve çevre dostu özelliklerine sahip olmaları nedeniyle, hızla artmaktadır [18]. Özellikle farmakoloji alanında enzim inhibitörleri ilaç moleküllerinin birer hedefi olarak geniş bir kullanım alanına sahip olmakta ve kullanımı hızla gelişmektedir [5]. Enzim inhibitörleri, enfeksiyöz, metabolik, kardiyovasküler, nörolojik hastalık ve kanser de dahil olmak üzere, esasen her tür insan hastalığı için ilaçların güçlendirilmesi konusuna dahil edilmiştir [19]. Bu durumun temel nedeni, enzimlerin birtakım hastalık süreçlerinde etkinliklerinin biliniyor olmasının yanı sıra enzim katalizinin yapısal dinamikleri nedeniyle enzimlerin küçük molekül kütesine sahip ilaç molekülleri tarafından inhibe olabilmelerinden kaynaklandığı bilinmektedir. Bundan dolayı ilaç moleküllerinin etkileşimde bulunacağı hedef moleküllerin en başında enzimler yer almaktadır [3]. Tablo 1’de klinik olarak kullanılmakta olan enzim inhibitör moleküllerinin ait oldukları enzim sınıfları ile birlikte ilişkilendirildikleri hastalıklar belirtilmektedir [20-24].

Tablo 1. Klinik olarak kullanılan enzim inhibitörleri

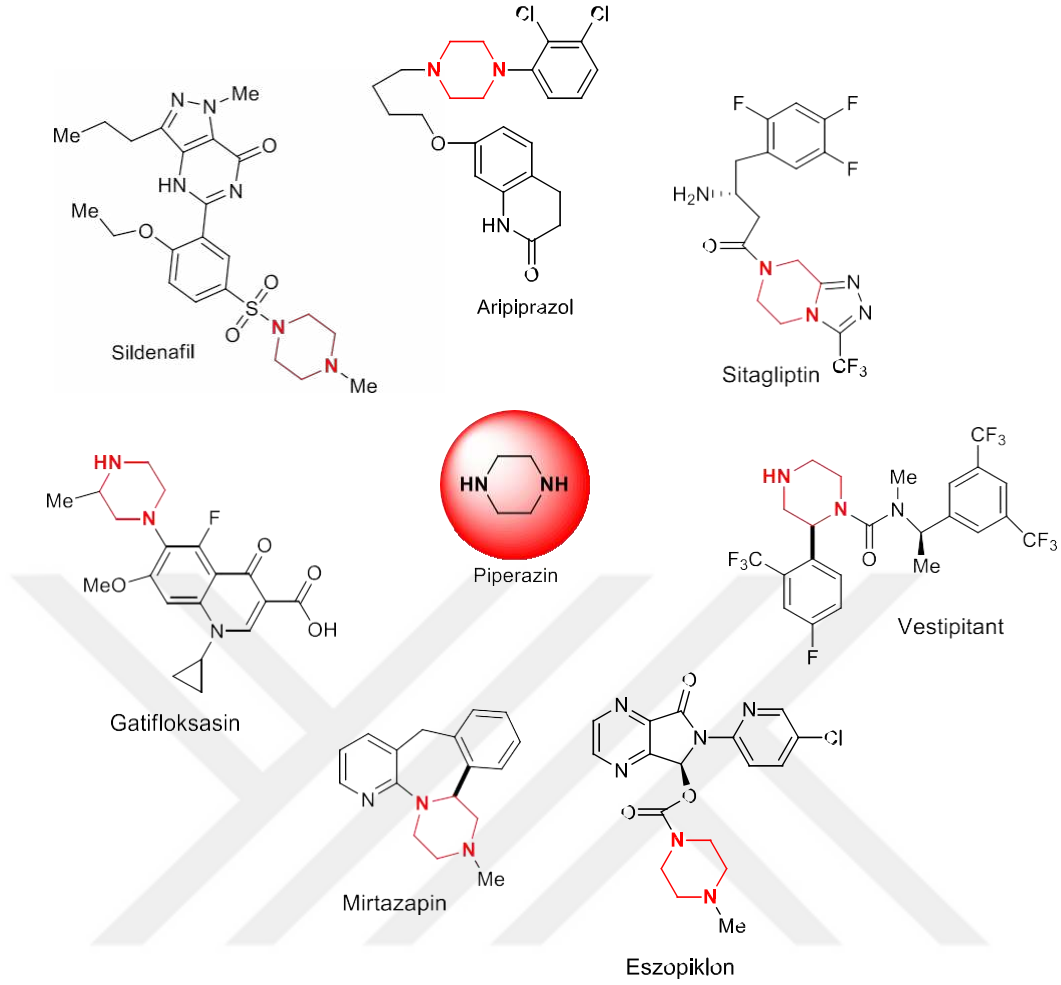
Enzim Sınıfı	Hedef Enzim	İnhibitör Bileşik	Klinik Kullanımı
Oksidoredüktazlar	Aldehit dehidrogenaz	Disülfiram	Karaciğer yetmezliği
Transferazlar	DNA polimeraz	Asiklovir	Suçiçeği
Hidrolazlar	Esteraz	Fizostigmin	Glokom
Liyazlar	Karbonik anhidraz	Asetazolamid	Epilepsi
İzomerazlar	Topoizomeraz	İrinotekan	Kolon kanseri
Ligazlar	Dihidropteroat sentaz	Asetazolamid	Hipertansiyon

1.4. Piperazin/Triazol/Florokinolon Halkası İçeren Moleküllerin Yapısı ve Biyolojik Aktiviteleri

Azot içeren heterosiklik yapılar, yüksek terapötik değerleri nedeniyle son on yılda araştırmacıların büyük ilgisini çekmiştir. İster doğal ister sentetik olsun, ilginç biyolojik özelliklere sahip oldukları için biyolojik süreçlerde de anahtar bileşenler olarak sıklıkla yer alırlar. Doğal ürünlerdeki azot içeren heterosikliklerin geniş dağılımının yanı sıra, canlı hücrelerdeki biyokimyasal süreçlerde önemli rol oynayan enzimlerin çoğunda da ana bileşen olarak aromatik heterosiklikler bulunur. Son zamanlarda, kural olarak farmakoforik

fragmanlar veya biyolojik olarak aktif doğal organik bileşikler olan azot içeren heterosikliklerin sentezi için yeni metotların geliştirilmesine büyük önem verilmiştir. Genel olarak yeni metotların geliştirilmesi eğilimi hem heterosikliklerin oluşumu için yeni şemaların yaratılmasından hem de istenen azotlu heterosikliklere belirli dönüşüm yollarını yapabilen benzersiz ve kolayca elde edilebilen başlangıç bileşiklerinin sentezinden kaynaklanabilir. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar biyolojik özelliklere sahip birçok bileşik sınıfına odaklanmıştır. Azot atomu içeren çok sayıda altı üyeli heterosiklik bileşik, potansiyel kemoterapötik ve farmakoterapötik ajanlar olarak ortaya çıkmıştır. Piperazin, triazol, florokinolon türevleri gibi azot içeren heterosiklikler, birtakım hastalıkların tedavisinde çeşitli biyolojik aktiviteler ve klinik uygulamalarda sergiledikleri başarılı sonuçlar nedeniyle organik kimyagerler tarafından en çok ele alınan yapı iskeletleri olarak bilinmektedir [25]. Bu yapılar, antimikrobiyal, antitüberküloz, antikanser, antiviral, antibakteriyel, antifungal, antidepresan, antidiyabetik antimalaryal ve antitümör aktivite dahil geniş bir biyolojik aktivite yelpazesi sunmaktadırlar [26-32].

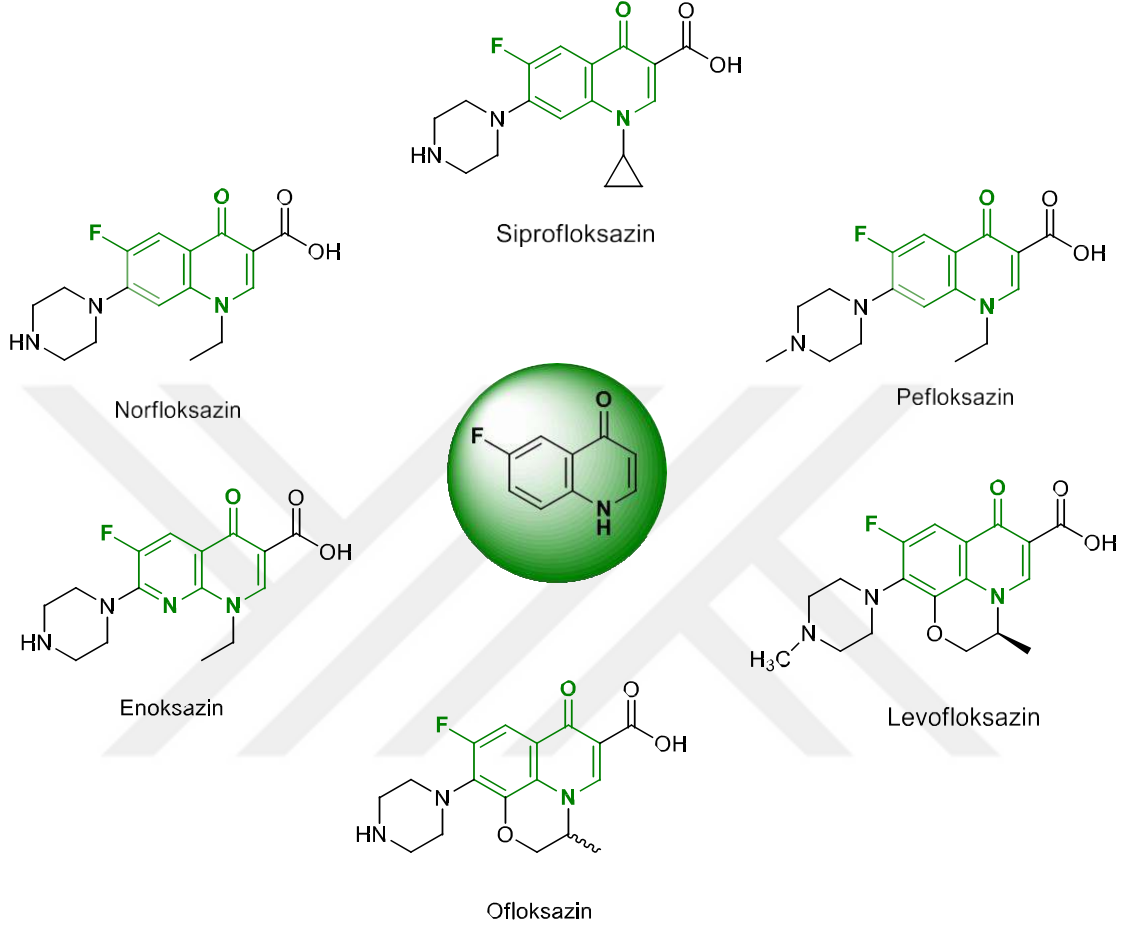
Piperazin, zıt pozisyonlarda iki azot atomu içeren altı üyeli bir halkadan oluşan organik bir bileşiktir. Piperazin halkası, ilaç tasarımı gibi biyolojik uygulamalarda deneyimlenen çok çeşitli başarılarla sahip, ilaç keşfi konusunda kapsamlı yapısal bir unsur olarak ele alınmaktadır. Ayrıca, tıbbi kimyada bir dizi farklı bilimsel amaç için etkili ve özel ligandlar olarak hareket eder ve bu nedenle de piperazin yapısı ayrıcalıklı çerçeve olarak kabul edilir. Tıbbi kimyada bu çerçevenin ana işlevi, birincil tasarıma dayalı bir koleksiyon oluşturma yolunu sağlamak ve onu farklı reseptörlere karşı taramaktır. Piperazin iskeleti bir çekirdek olarak kabul edilir ve çeşitli terapötik ilaçlarda bulunur (Şekil 1). Piperazin çekirdeği, uygun pKa'ları nedeniyle ilaç adaylarının farmakokinetik özelliklerinde gelişme gösteren iki birincil azot atomuna sahiptir. Bu azot bölgeleri, ilaç benzeri moleküllerin suda çözünürlüğünde esaslı bir artışa yol açar ve böylece biyoyararlanımda önemli bir rol oynar. İlaçların biyoyararlanımının yanı sıra etkililiğini arttırarak vücut sıvılarında etkili ilaç metabolizasyonu uyguladığı bilinmektedir [33].



Şekil 1. Piperazin halkası içeren bazı ilaçlar [34]

Kinolonlar, 1960'ların başında keşfedilmelerinden bu yana önemli bilimsel ve klinik çalışmaların merkezi haline gelmiştir. Kinolonların tercih edilme nedenleri arasında, yüksek potens, geniş bir aktivite spektrumu, iyi biyoyararlanım, oral ve intravenöz formülasyonlar, yüksek serum seviyeleri gibi ideal bir antibiyotikte bulunması gereken birçok özelliği potansiyel olarak barındırmaları yer almaktadır [35]. 1962 yılında nalidiksik asidin Leshner tarafından keşfi ve üriner sistem enfeksiyonlarında tedavi amaçlı kullanılmaya başlanması ile kinolonların birçok türevi elde edilerek çeşitli enfeksiyonlara karşı kullanımı artmıştır. 1980'lerde flor atomu içeren kinolonlar sentezlenmiş, siprofloksasin ve ofloksasin gibi sistemik olarak daha aktif ilaçlar piyasaya sürülmüştür. Bu 2. jenerasyon kinolonlar nalidiksik aside göre daha kuvvetli, daha geniş spektrumlu bileşiklerdir, oral yoldan daha iyi özelliklere sahiptirler ve daha iyi antibakteriyel aktivite göstermişlerdir [36]. Florokinolon

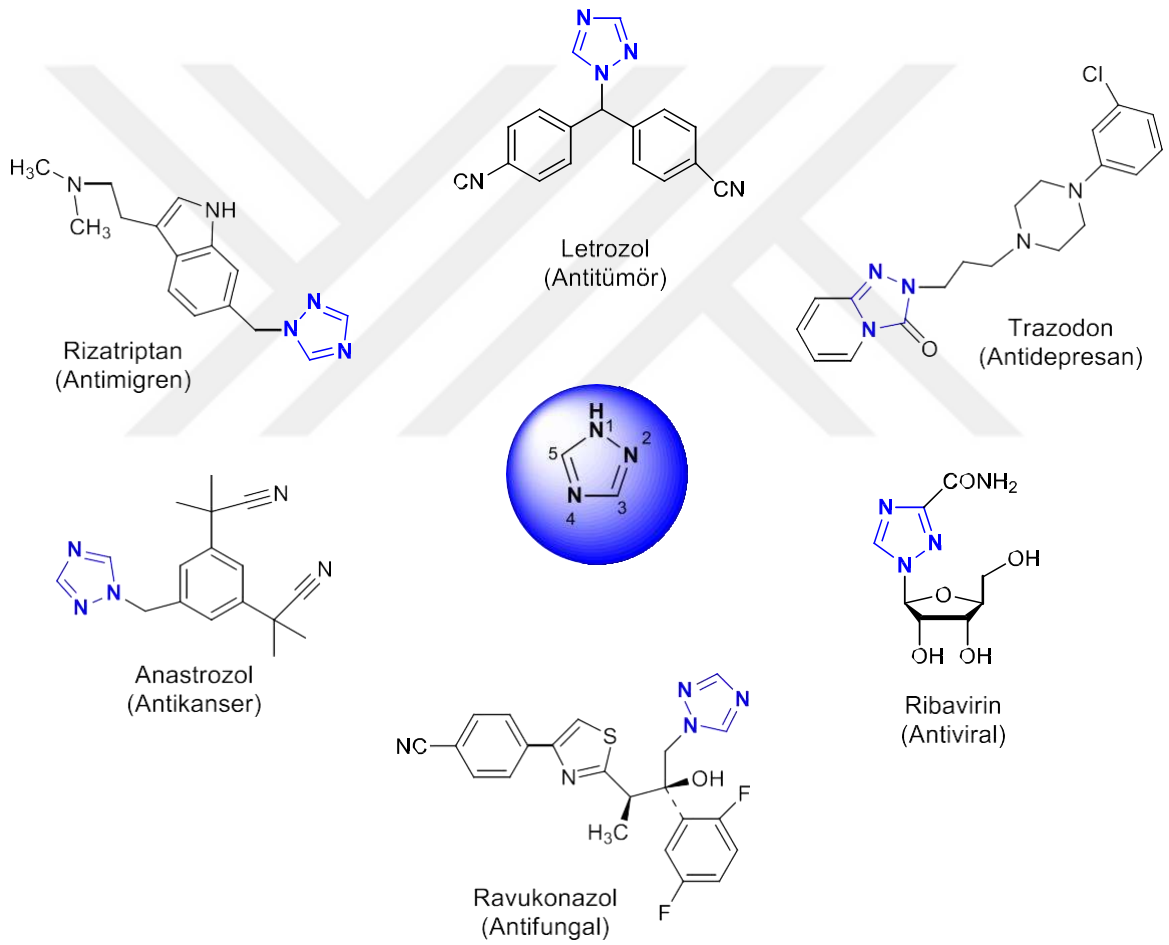
türevi ilaçlara örnek olarak norfloksazin, levofloksazin, enoksazin, pefloksazin, rosoksazin, ofloksazin ve siprofloksazin verilebilir (Şekil 2).



Şekil 2. Florokinolon halkası içeren bazı ilaçlar [36]

Piromidiazol olarak da adlandırılan triazoller, $C_2H_3N_3$ moleküler formülüne sahip beş üyeli bir halkada üç nitrojen ve iki karbon atomu içeren bir yapıdan oluşmaktadırlar. Triazoller, azot atomlarının konumuna bağlı olarak bir çift izomerik kimyasal bileşik 1,2,3 triazol ve 1,2,4-triazol olarak bulunmaktadır. Bu benzersiz yapılar elektron açısından zengin bir sisteme sahip olmaları nedeniyle hidrojen bağı alıcıları ve vericileri olarak çeşitli reseptörler ve enzimlerle uygun bir şekilde etkileşime girebilmeyi ve böylece geniş bir biyolojik aktivite yelpazesi sergilemeyi başarırlar. 1,2,4-triazoller, çok çeşitli aktiviteleri, düşük toksisiteleri ve güçlü farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmektedirler. Son zamanlarda organik kimyacılar 1,2,3-triazolden ziyade 1,2,4-triazol yapısını daha aktif bir şekilde kullanmaktadırlar. 1,2,4-triazol parçasına bağlı olarak

çözünürlüğü ve bimoleküler hedeflere bağlanma yeteneğini geliştirebilen çeşitli kovalent olmayan etkileşimler uygulayabilir. Ayrıca bu triazol türü oksazol, imidazol, tiyazol, pirazol gibi çeşitli işlevselliklerin bir biyoizosteri olarak kullanılabildiğinden, çoklu bağlanma bölgeleri nedeniyle birçok analogun sentezi için esneklik sağlar [27]. Günümüzde, 1,2,4-triazol bazlı bileşiklerin birçoğu bir dizi terapötik ilaca kapsamlı bir şekilde entegre edilmiştir ve klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır [37]. Triazol türevi ilaçlara örnek olarak, Triazolam, Alprazolam, Estazolam, İtrakonazol, Vorikonazol, Flukonazol, Rizatriptan, Anastrozol ve Letrozol verilebilir (Şekil 3).



Şekil 3. 1,2,4-Triazol halkası içeren bazı ilaçlar [29]

Sentetik organik kimya, medisinal kimyanın en önemli çalışma alanlarından biridir ve giderek vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir [38]. Direnç gelişimi ile mücadeleyi daha da geliştirebilmek adına yapılan çalışmalardan en önemlisi farklı farmakofor gruplarının tek bir hibrit molekülü halinde sentezlenmesidir. Biyolojik olarak aktif moleküllerin moleküler

hibridizasyonu, ilaç keşfi için güçlü bir araçtır ve kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara karşı potansiyel ilaç moleküllerini tanımlamak için yeni bir strateji olarak ortaya çıkmıştır. Hibrit ilaç molekülleri, çok işlevli olarak geleneksel tedavi yaklaşımlarından daha güçlü olabilecek bir kombinasyon tedavisi olarak hizmet edebilir [39]. Son yıllarda bu alanda yapılan çalışmalara bakıldığında, yeni antimikrobiyal bileşiklerin sentezi için genellikle etkinliği ve güvenilirliği bilinen bir ilaç model alınarak, onun analoglarının elde edildiği çalışmalara ağırlık verildiği görülmektedir ve satışa sunulan ilaçların yaklaşık üçte ikisi bilinen bir ilacın modifikasyonu veya optimizasyonu ile elde edilmektedir [40-42].

1.5. İlaç Keşfinde Yeni Yaklaşımlar

Günümüzde ilaç olabilecek yeni moleküllerin geliştirilmesi rastgele yapılarak şansa bırakılmamakta, sistematik ve rasyonel bir esasa dayandırılmaya çalışılmaktadır. Bu durumun nedeni olarak, son yıllardaki ilaç keşfi için yapılan çalışmalar dikkate alındığında zaman ve maliyet açısından birtakım zorlukların yaşandığı gösterilebilir. İlaç geliştirme süreci, keşif aşaması, klinik aşama ve klinik gelişim aşaması olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. Keşif aşaması olan ilk aşamada sentezi gerçekleştirilmiş olan moleküllerin *in siliko* olarak ADME özellikleri ele alınarak farmakolojik tarama testlerinin bir kısmı yapılmış olur. Ardından moleküllerin enzim ile olan etkileşimini öngörebilmek adına hesaplamalı yaklaşım programları kullanılır. Bu şekilde avantajlı yaklaşımlar sayesinde sentezi gerçekleştirilmiş olan birçok organik molekülün *in vitro/in vivo* aşamalarına geçilmeden önce özellikleri hakkında bilgi sahibi olunduğu söylenebilir [43].

1.5.1. Moleküler Modelleme

İlaç keşif alanında, sanal tarama, bilgisayar programları kullanılarak çok büyük bileşik kitaplıklarının otomatik olarak değerlendirilmesi şeklinde tanımlanır. İlaç adaylarını, yüksek verimli tarama robotları kullanarak günde binlerce farklı bileşiğin fiziksel değerlendirmesinden daha etkili bir şekilde üretme ve tarama özelliğine sahiptir ve böylece pahalı laboratuvar çalışması ihtiyacını azaltırken ilaç keşif oranını artırır. Moleküler docking ile yüz milyonlarca bileşiğe kadar çok büyük bir kimyasal alanı keşfetmek ve ardından biyolojik test için yalnızca en olası aktif bileşikler elde etmek mümkün

olduğundan sanal taramanın özü olarak nitelendirilir [44]. Docking uygulaması makromoleküler hedefe bakılmaksızın protein-protein etkileşimi, protein-DNA etkileşimi veya protein-ligand etkileşimi olsun oldukça faydalı bir tekniktir. Bu uygulama bir çift molekül arasındaki kovalent olmayan bağlanmanın modlarını ve afinitelerini tahmin etmeyi amaçlar. Çoğu zaman moleküller, bir makromolekülden (reseptör) ve küçük bir molekülden (ligand) oluşur [45]. En yaygın olarak kullanılan protein-ligand etkileşimi, yeni terapötik ajanların keşfi için oldukça uygundur. Bu etkileşimde, ligand protein molekülünün bağlanma bölgesine girer ve buradaki amino asit yan zincirleriyle kovalent olmayan (hidrofobik kuvvetler, van der Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimler vb.) bir bağlanma etkileşimi gerçekleştirir. Bağlanma bölgesi diye tabir edilen kısım aslında ligandın konformasyonu, oryantasyonu ve konumunun geometrik pozisyonunu ifade eder. Bağlanma etkileşiminin ardından protein-ligand kompleksinin serbest bağlanma enerjisinin (ΔG) en düşük olduğu konformasyon bulunur [46]. Moleküler docking uygulaması bu bilgiler doğrultusunda hedeflenen makromoleküller için uygun bileşiklerin tasarlanması evresinde yol gösterici bir profil sergilemektedir [45].

1.5.2. ADME Özellikleri

Sentezi gerçekleştirilmiş olan yeni hibrit bileşiklerin farmakokinetik özelliklerinin değerlendirilmesi ilacın geliştirilmesi aşamasında hayati bir öneme sahiptir [47, 48]. Yüksek verimli ADME taraması 2000 yılından bu yana küçük moleküllu ilaç adaylarının özelliklerini belirlemek amacıyla yaygın bir şekilde benimsenmiş olup, giderek gelişmekte olan bir alandır. İlaç adayı moleküllerin ADME özelliklerinin erken aşamalarda ele alınmasının, ilacın geliştirilmesi evresinde ilaç adaylarının sonraki eliminasyon oranlarını önemli ölçüde azaltmaya yardımcı olduğu endüstriyel çapta çeşitli verilerle kanıtlanmıştır [49]. Lipinski'nin beş kuralı (ROF), moleküllerin ilaç benzerliğini değerlendirmeye ve küçük moleküllu ilaç adaylarının insanlar için oral olarak aktif bir ilaç olma olasılıklarını belirlemeye yardımcı olur. Lipinski'nin kuralına uygun olarak seçilen mevcut bir oral ilaç, 500 Dalton'dan (<500) daha düşük bir molekül ağırlığına, 140'dan küçük (<140) topolojik polar yüzey alanına (TPSA), 10'dan küçük (<10) dönebilen bağ sayısına (n-ROTB), 5'ten düşük (<5) oktanol-su dağılım katsayısına (LogP), 5'ten küçük hidrojen bağı donörüne (<5) ve 10'dan küçük (<10) hidrojen bağı akseptörüne sahip olmalıdır. Bu kurala uyan muhtemel

ilaç adayları, klinik deneyler aşamasında daha düşük eliminasyon oranlarına sahip olma eğilimindedir [50].

1.6. Tirosinaz

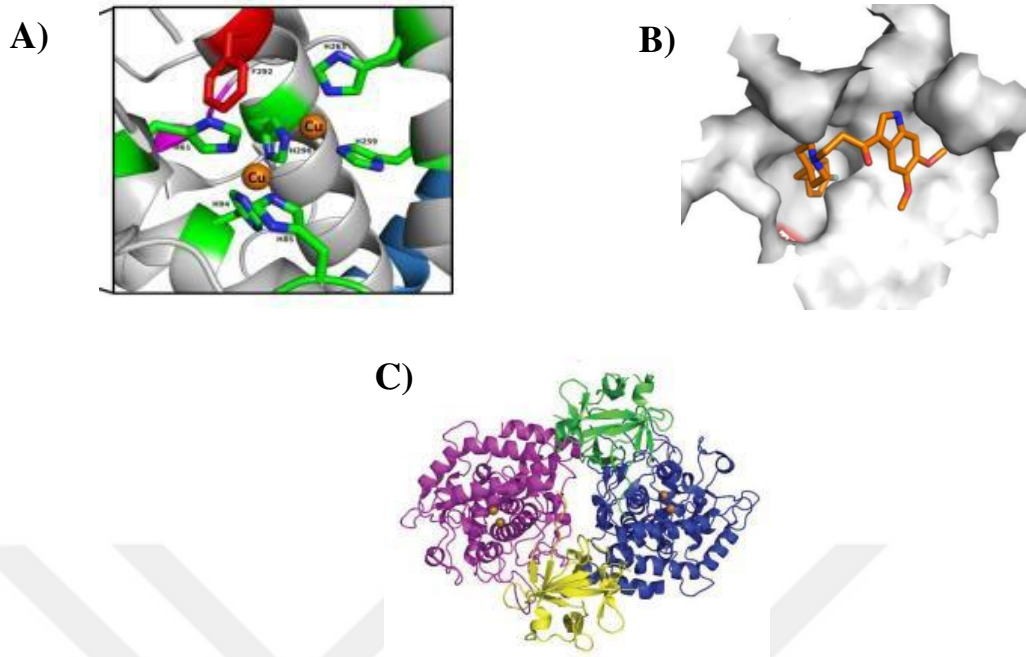
Tirosinaz (EC 1.14.18.1; polifenol oksidaz, monofenolaz veya *o*-difenolaz) oksidoredüktaz sınıfına ait, aktif bölgesinde iki bakır atomu içeren ve benzersiz redoks özellikleri gibi bir dizi ilginç özellik sergileyen bir metaloenzimdir. Ayrıca enzim üç oksidatif formda, deoksi-tirosinaz, oksitirosinaz ve met-tirosinaz, mevcut olabilir [51]. Ana işlevi fenolik substratlara katalitik oksijen ekleme görevini gerçekleştirmektir [52].

Tirosinaz, melanin pigmentinin biyosentezini sağlaması nedeniyle, memeliler de dahil olmak üzere bakteriler, mantarlar, böcekler ve bitkilerde yaygın bir şekilde bulunmaktadır [53, 54]. Tirosinazın kristal yapısı incelendiğinde bitkilerde bulunan tirosinaza kıyasla bakteri ve mantarlarda bulunan tirosinazın birçok benzerliğe sahip olduğu görülmüştür. Özellikle mantarlarda bulunan tirosinazın yapısal olarak memelilerdeki tirosinaza benzer olduğu tespit edilmiş ve bu durumda melanojenik çalışmalar için bir model olarak mantar tirosinazın araştırmacılar tarafından aktif bir şekilde kullanımını sağlamıştır.

Tirosinazın mantarlarda, bitkilerde ve bakterilerde birçok rolü vardır. Örneğin mantarlarda spor oluşumunda, mantarlardaki yaraların iyileşmesinde ve üreme organlarının farklılaşmasında rol alır. Bitkilerde ise bitki dokuları yaralandığında çeşitli fenolikleri okside ederek yaraların iyileşmesini sağlar. Bakterilerde ise konakçı bitki fenollerini detoksifiye ederek savunma sistemlerine katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir [51].

1.6.1. Tirosinazın Yapısı, Fonksiyonu ve Kataliz Mekanizması

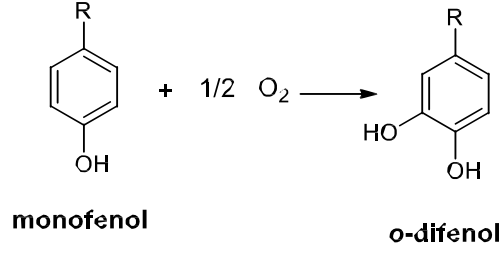
Bakır içeren proteinlerin spektroskopik ve yapısal özellikleri incelendiğinde tirosinazın tip üç sınıfına ait olan bir metaloprotein olduğu bilinmektedir. Yani dört sarmal bir demet üzerinde bulunan altı histidin kalıntısı, aktif bölgede ana kofaktör olarak görev yapan iki bakır atomunu koordine ettiği Şekil 4'te gösterilmektedir [53].



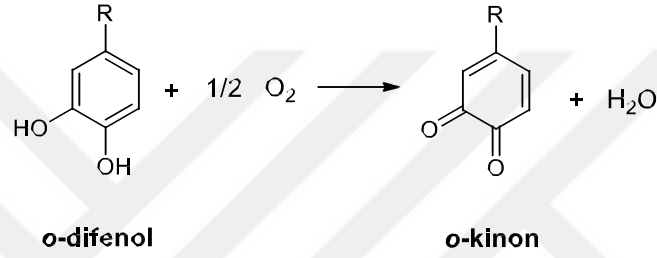
Şekil 4. A) Tirozinazın aktif bölgesi B) Aktif bölgenin temsili gösterimi [55] C) *Agaricus bisporus* tirozinazının kristal yapısı (PDB: 2Y9X) [52]

Tirosinaz, melanogenezin bir anahtar enzimi olarak monofenollerin *o*-difenollere (monofenolaz aktivitesi) hidroksilasyonunu ve *o*-difenollerin de *o*-kinonlara (difenolaz aktivitesi) oksidasyonunu katalize eder. Hidroksilasyon reaksiyonu için bir oksijen atomu monofenolün aromatik halkasına dahil edilir ve diğeri hidrojen vericisi olarak ortaya çıkan *o*-difenol ile suya indirgenir. Bu bakımdan tirosinaz, karışık fonksiyonlu oksidazdır [56]. Reaksiyon sonucunda oluşan *o*-kinonlar amino asitler, peptidler ve proteinler tarafından nükleofilik saldırıya uğrayabilen güçlü elektrofillerdir (Şekil 5) [57].

Monofenolaz aktivite (kresolaz)

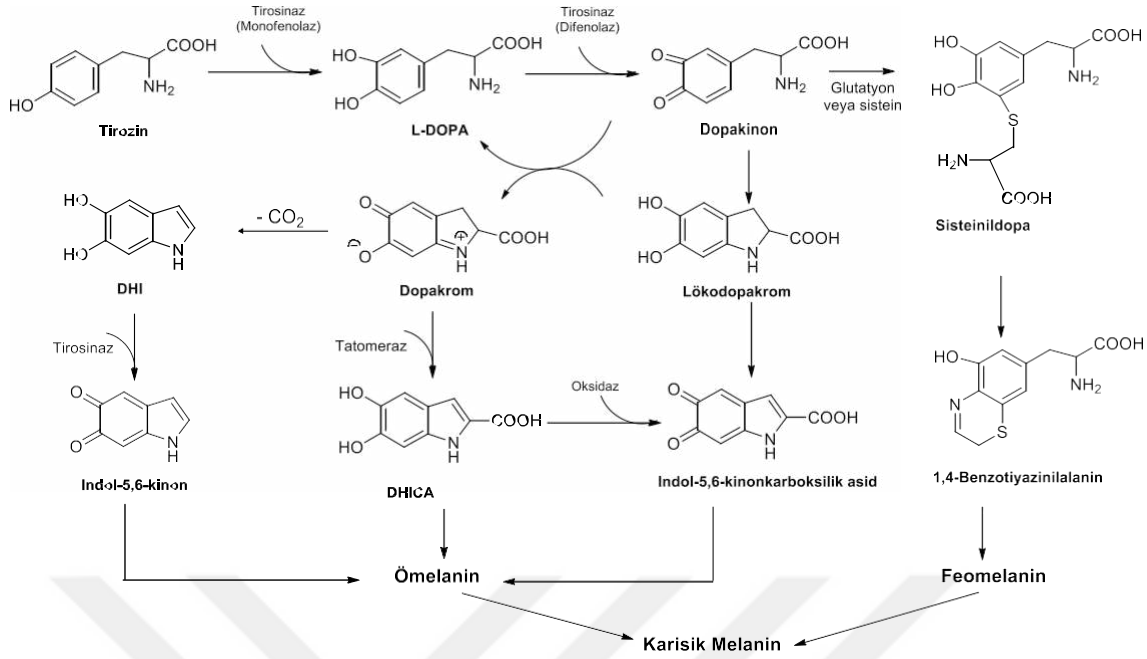


Difenolaz aktivite (katekolaz)



Şekil 5. Monofenolaz ve difenolaz aktivitesi [56]

Polifenol oksidazlar, monofenoller veya *o*-difenoller için özgülüklerine dayalı olarak monofenolik ve/veya *o*-difenolik aktiviteye sahip olarak geniş bir şekilde kategorize edilebilir ki bu da sırasıyla tirozinaz ve katekol oksidaz olarak adlandırılır. Tirozinaz hem monofenollerin hidroksilasyonunu hem de müteakip *o*-difenollerin oksidasyonunu katalize edebilirken, katekol oksidaz yalnızca *o*-difenollerin oksidasyonunu katalize edebilir. Bu işlemi aktif bölge içindeki bakır atomlarının koordinasyonu ile gerçekleştirir [58]. Kısaca özetlemek gerekirse monofenollerin hidroksilasyonu ile oluşan ara fenollerin okside olarak kinonlara dönüşmesini ve bu kinonların da polimerizasyonu ile heterojen bir polimer olan melaninin oluşmasını katalizler. Tüm bu süreç Raper-Mason yolu olarak adlandırılmaktadır (Şekil 6) [59].



Şekil 6. Melaninin biyosentetik yolu [57]

Melanin, ten renginden sorumlu pigmenttir. Doğada en yaygın bulunan pigmentlerden biridir. Melanin bakteriler, mantarlar, bitkiler ve hayvanlarda bulunabilir. Renkleri sarıdan siyaha değişir. Bu biyopolimerin sentez süreci dermis bazal tabakası içinde özel hücreler olan melanositlerde gerçekleşir. Melaninler daha sonra çevredeki keranositlere salgılanır. Melanositlerde sentezlenen pigmentin miktarı ve türü ve keranositlerdeki dağılımı insan derisinin ve saçının rengini belirler. Ayrıca memelilerde melanin pigmentinin biyosentetik yolu, ömelanin (melanin pigmentlerinin siyahtan kahverengiye çözünmeyen alt grupları) ve feomelaninlerin (sarıdan kırmızımsı kahverengiye, alkalide çözünür ve sülfür içeren alt grupların) sentezini içerir [60].

1.6.2. Klinik Açıdan Tirosinaz Enzim İnhibisyonunun Önemi

Melanin, yukarıda belirtilen özelliklerin yanı sıra, oksidanlara, ısıya, fagositoza karşı koruma sağlar [56]. Melaninin en önemli rollerinden birisi de UV güneş ışığını emerek ve reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırarak cildi ultraviyole (UV) hasarlara karşı korumaktır. İnsan derisi büyük bir örtü sistem organıdır ve üç katmana bölünmüştür; dış katman olan dış epidermis, altta yatan dermis ve son olarak, çoğunlukla dermisi alttaki bileşenlere bağlayan ve yağ asitlerinden oluşan hipodermis. Deri, vücudu etkileyebilecek çeşitli tehlikelere karşı

bir engeldir, vücut ısısının düzenlenmesine katkıda bulunur. Melanin pigmentlerinin biyosentezi olan melanogenez, cildin epidermisinde bulunan melanosit adı verilen hücrelerdeki organeller olan melanozomlarda gerçekleşir. Tüm bunlara ek olarak, melaninin fazla birikiminin; albinizm, melisma, derideki çiller, iltihap sonrası melonoderma ve yaşlanmayla ilgili noktalar gibi deride düzensiz hiperpigmentasyon problemlerine neden olduğu bilinmektedir. Melanin, tirozin amino asidinin tirosinaz enzimi varlığında bir dizi oksidatif reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır [61]. Bu nedenle de birçok tirosinaz inhibitörü tirosinaz aktivitesini, doğal olarak melanin oluşumunu inhibe ettiği için pigmentasyon problemlerine çözüm olarak aktif bir şekilde kullanılmaktadır [62]. Tirosinazın aynı zamanda dünyadaki en ölümcül kanserlerden biri olan cilt kanseri (melanom) ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Birkaç yıl önce, araştırmacılar melanin biyosentezi, melanom ilerlemesi ile direnci arasında ve antimelanom tedavisi olarak melanojenin modülasyonu arasında varsayılan bir bağlantı üzerinde çalışmaya başladılar [60, 63]. Normal melanositlerin aksine, melanom hücreleri sentezlenmiş melanini bitişik keratinositlere salmak yerine tutabilirler. Tutulmuş olan bu melanin; melanom hücrelerini radyoterapiye karşı bir kalkan görevi görür, bağışıklık hücrelerine karşı seçici olarak toksik olan melanojen ara maddeleri üretir ve kemoterapi etkilerine karşı koyan bir antioksidan olarak işlev görür [60, 64]. Tüm bu gerçekler hesaba katıldığında, tirosinazın terapötik bir hedef olarak potansiyeli inkar edilemez çünkü bu enzim melanomda aşırı ekspres edilir ve tümör gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilidir [65, 66].

Son çalışmalar tirosinazın sadece periferik dokulardaki melanin sentezinde yer almadığını, aynı zamanda beyin nöromelanin gelişiminde önemli bir role katkıda bulunan farelerin ve insanların substantia nigrasında (SN) yer aldığını doğruladı [55]. Tirosinaz, parkinson ve huntington hastalıkları gibi nörodejeneratif bozukluklarla ilişkilendirilmiştir. Parkinson hastalığı (PD), alzheimer hastalığından sonra ikinci en sık görülen merkezi sinir sisteminin progresif nörodejeneratif bir hastalığıdır [67]. Çok sayıda çalışma, melanom hastalarında parkinsonun ve parkinson hastalarında da melanomun birlikte görüldüğünü bildirmiştir ve insidans beklenenden anlamlı derecede yüksektir [68, 69]. Parkinsonizm en yaygın olarak melanositler olarak bilinen hücrelerde maligna tipi olan hastalarda gözlenmiştir. Üretilen melanin miktarı tirosinazı kodlayan genler tarafından belirlenir. Melanositler sırasıyla melanin ve nöromelanin içerir, ancak her iki pigment türünün sentezi tirozin ile başlar ve L-Dopa oluşumu ile ilerler. L-Dopa sentezinin ardından oluşan ürün dopakinon melanositlerde melanin sentezinde önemli bir rol oynar ve bu da Parkinson ile

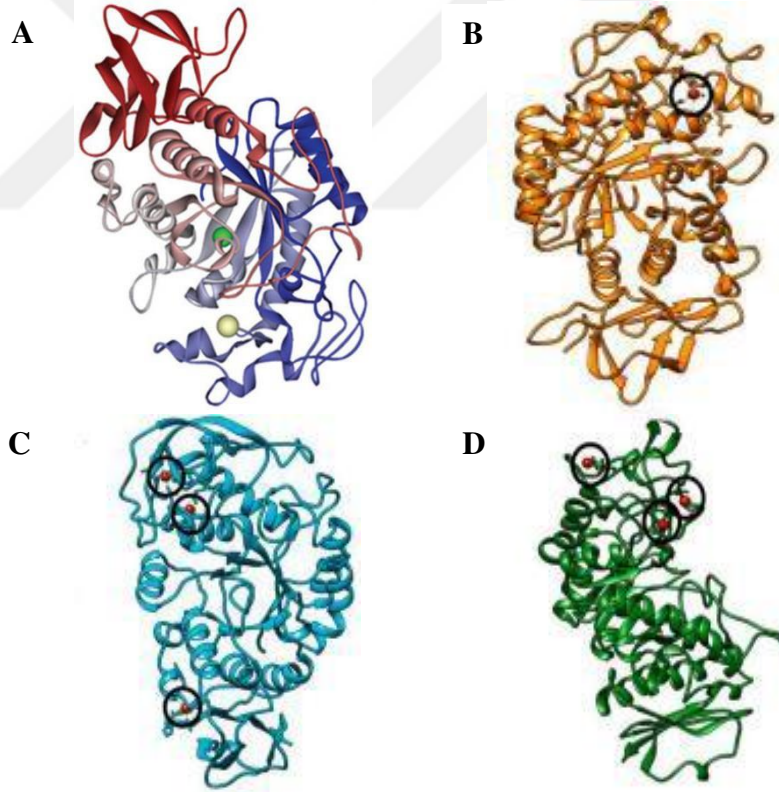
melanom arasında nöromelanin ile melanin yollarının temel bir bağlantı oluşturabileceğini düşündürür [67]. Ek olarak, aşırı dopakinon oluşumunun, nöron hasarına ve hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Genel melanojenезin hız sınırlayıcı aşamalarını katalize ettiğinden dolayı, anormal melanin sentezini kontrol etmek için tirosinaz, terapötik bir hedef olarak kabul edilmiştir. Melanogenezi kontrol etmek için anahtar durumda olan tirosinazı hedefleyen birçok yaklaşım bildirilmiştir ki bunlar arasında tirosinaz ekspresyonunun modülasyonu ve olgunlaşma, bozunma ve katalitik aktivitesinin doğrudan inhibisyonu yer alır. Tüm bu sebeplerden dolayıdır ki tirosinaz inhibitörleri tıp ve kozmetik gibi alanlarda önemli bir role sahiptir [70, 71] ve buna bağlı olarak tirosinaz inhibitörü olabilecek birçok organik molekül sentezlenmekte veya doğal ürünlerden izole edilmektedir. Geçtiğimiz birkaç on yıl içinde kozmetikler ve farmasötiklerde kullanım için tirosinaz inhibitörlerine yönelik talepler hızla artmıştır [72-74]. Tirosinaz inhibitörleri; yarışmalı inhibitörler, yarışmasız inhibitörler veya karışık inhibitör olarak sınıflandırılabilir. Örneğin, kojik asit cildi aydınlatan kozmetiklerin üretiminde yaygın olarak kullanılan bir tirosinaz inhibitörüdür ve aynı anda monofenolaz aktivitesinin yarışmalı inhibisyonunu ve difenolaz aktivitesinin karışık inhibisyonuna neden olur [59]. Literatüre bakıldığında, tirosinaz inhibitör adayı olarak birçok organik molekül sentezlenmiş veya doğal ürünlerden elde edilmiştir. Örneğin, Raza vd. (2020) fenil-piperazinil bütanamid bileşiklerini, Lolak vd. (2020) 1,3,5 triazin bileşiklerini, Vittorio vd. (2020) florobenzil piperazin bileşiklerini ve Mirmortavazi vd. (2019) pirimidin türevi bileşiklerini alternatif tirosinaz inhibitörü olarak sentezlemişler ve bu bileşiklerin inhibisyon çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir [75, 78]. Tian vd. (2019) *Broussonetia papyrifera*'nın kök kabuğundan elde ettikleri flavonoid türevi bileşikleri tirosinaz inhibisyonu açısından değerlendirmişlerdir [79]. Tehrani vd. (2019) yapmış oldukları çalışmada ftalimid-1,2,3-triazol hibrit bileşiklerinin tirosinaza karşı yarışmalı inhibisyon mekanizmasını ortaya koymuşlar ve bu bileşiklerin moleküler modelleme çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir [80]. Bir başka çalışmada ise Jung vd. (2019) (E)-benziliden-1-indanon türevi bileşikleri tirosinaz inhibisyon mekanizması açısından ele almışlar, inhibisyon türünü karışık inhibisyon olarak belirlemişler ve bu bileşikleri moleküler modelleme bakımından da değerlendirmişlerdir [81]. Yine bir başka çalışmada Irajı vd. (2020) vanilin-benziliden-hidrazin hibrit bileşiklerinin moleküler modelleme çalışmalarını gerçekleştirmişler ve bu bileşiklerin tirosinaza karşı yarışmasız inhibisyon türüne sahip olduklarını bulmuşlardır [82]. Pek çok tirosinaz inhibitörü olmasına rağmen hafif etkinlikleri ve yan etkilerinden dolayı, çoğunun klinik kullanım için elverişli olmadığı

belirtilmektedir [51, 53]. Bu yüzden araştırmacılar daha güçlü, yan etkisi olmayan ve etkili tirozinaz inhibisyonu sağlayan moleküllere yönelmektedir.

1.7. Alfa Amilaz

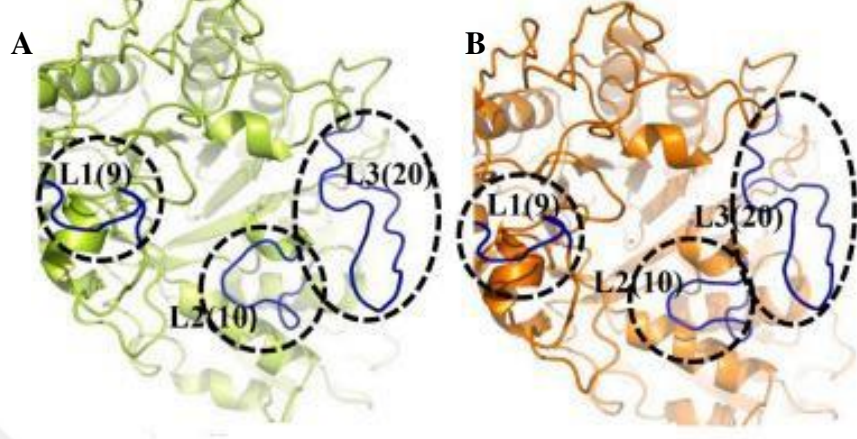
Amilazın, nişastanın şekerlere dönüşmesini katalizleyen, hücre dışı bir enzim olduğu bilinmektedir [83]. Amilaz, diastaz olarak 1833'te Anselme Payen tarafından keşfedilen, doğada mikroorganizma, hayvan ve bitkilerde yaygın olarak bulunan hidrolaz sınıfına ait bir enzimdir [84]. Amilaz, mekanik sindirim sürecini başlattığı için insan tükürüğünde bol miktarda bulunmaktadır (Şekil 7). Karbohidrat polimerinde parçalamış olduğu bölgeye bağlı

olarak α , β , γ amilaz olmak üzere üç farklı alt sınıfa ayrılır ve bu sınıflandırma bağlama türüne göre yapılır [85].



Şekil 7. Çeşitli α -Amilazların yapısal özellikleri. A) İnsan tükürük amilazı [85]. B) Memeli (domuz pankreası; PDB ID: 1PIF; GH13_24) C) Bakteri (Bacillus licheniformis; PDB ID: 1BLI; GH13_5) D) Bitki (Arpa; PDB ID: 1AMY; GH13_6) [84]

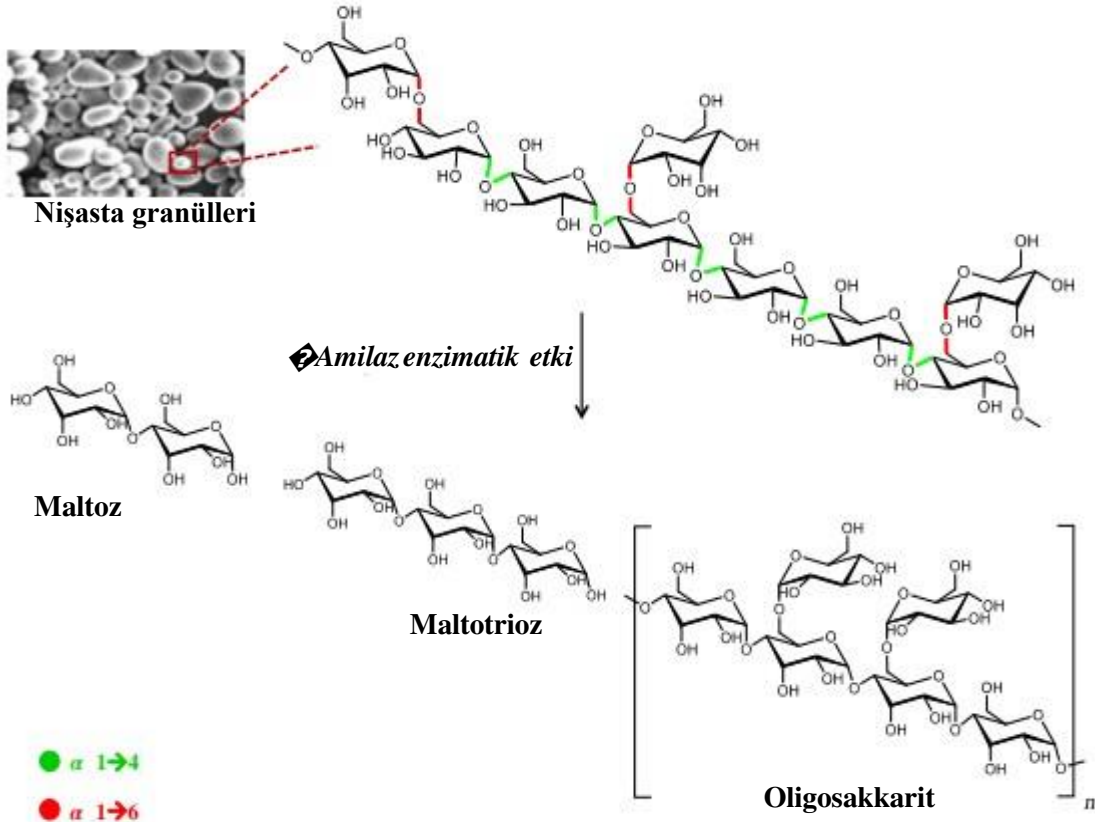
Ayrıca, insan pankreatik amilazı ile domuz pankreatik amilazının amino asit dizilerinin birbirine oldukça benzer olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Şekil 8).



Şekil 8. İnsan ve domuz pankreatik amilazının üç boyutlu yapıları A) İnsan pankreatik amilazı B) Domuz Pankreatik amilazı [84]

1.7.1. Alfa Amilazın Yapısı, Fonksiyonu ve Kataliz Mekanizması

Amilaz (EC 3.2.1.1), nişastadaki dahili α -1,4-glikozid bağlarının hidrolizini katalizleyen ve glukoz, maltoz, maltotrioz birimleri gibi düşük moleküler ağırlıklı ürünlerin oluşumunu sağlayan bir endoglikozidaz enzimidir. Nişasta, amiloz ve amilopektin olmak üzere iki tür polimerden oluşan bir polisakkarittir. Amiloz, nişasta molekülünün %20-25'ini oluşturan ve α -1,4-glikozidik bağı ile bağlanan glukoz birimlerinden oluşan doğrusal bir polimerdir. Amilopektin ise nişastanın %75-80'ini oluşturur ve glukoz birimlerinden oluşan doğrusal zincirlere α -1,6 bağı ile bağlı 15-45 kadar (nispeten daha kısa) glukoz birimi ihtiva eden yan zincirlerden oluşur (Şekil 9) [86].

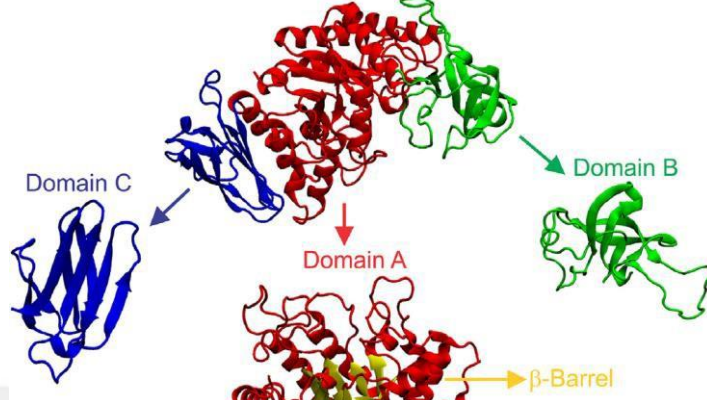


Şekil 9. Nişasta üzerindeki Amilaz etkisi [87]

Amilaz, karbohidrat aktif enzimlerin (CAZY) veri tabanındaki amino asit sekansına dayalı sınıflandırma sistemine göre glikozid hidrolaz sınıfı olan aile 13'e aittir (GH13). Amilaz aktivitesi, yapısal bütünlüğü ve stabilitesi için kalsiyum iyonuna (Ca^{+2}) ihtiyaç duyan bir metaloenzimdir [88]. Ayrıca diğer birçok glikozidazlar gibi aktif bölgesinde bulunan üç karboksilli asit yan zincirinin kataliz mekanizmasında etkili olduğu bilinmektedir

[89]. Amilazın yapısı genel olarak A, B ve C olarak adlandırılan üç domaine sahip, katlanmış bir polipeptit zincirinden oluşur (Şekil 10). En iyi korunmuş olan A alanı, $(\beta/\alpha)_8$ barrelden (TIM barrel) oluşan katalitik domainidir. Belli bir sınıra sahip, sekiz α -sarmalından oluşan ve içinde düzenlenmiş sekiz paralel β -sarmalı bulunan oldukça simetrik bir katlamadan oluşur. Kataliz ve substrat bağlanmasında rol alan α -amilaz ailesinin yüksek oranda korunmuş amino asit kalıntıları bu alanda yer almaktadır [90]. TIM barrelinin dışında kalan, üçüncü α -sarmal ile üçüncü β -sarmal arasında bulunan kısım alan B'yi oluşturmaktadır. Bu bölge düzensiz bir β -sarmal yapısına sahiptir ve α -amilaz ailesinin çeşitli üyeleri arasında yapı olarak önemli ölçüde değişkenlik gösterir. Ayrıca bu alanın, α -amilazlarda gözlenen substrat özgüllüğü farklılıklarında bir rol oynadığı varsayılmaktadır [91]. Alan C ise amilazlar arasında sıra ve uzunluk açısından değişkenlik gösteren C-

terminal bölümünü oluşturur ve nispeten korunmuş olan antiparalel bir β -sandviç yapısından oluşur. B ve C alanları, TIM barrelinin zıt taraflarında bulunur [92].



Şekil 10. *Bacillus licheniformis* Alfa Amilaz yapısı (PDB: 1BLI) [92]

1.7.2. Klinik Açıdan Alfa Amilaz Enzim İnhibisyonunun Önemi

Diyabet, glukoz moleküllerinin kan dolaşımında aşırı birikmesine neden olan, karbohidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklar ile karakterize edilen ve geçmişten bugüne bulaşıcı olmayan en yaygın sağlık sorunu olarak tanımlanmaktadır. Eğer hastalık iyi bir şekilde tedavi edilmez veya kontrol altına alınmaz ise kardiyovasküler hastalıklar, kronik böbrek yetmezliği (nefropati) ve körlüğe neden olan retina hasarı (retinopati) gibi sağlık problemlerini de beraberinde getirebileceği bilinmektedir. Yetişkin popülasyonda diyabet prevalansı şu anda dünyada %6,4 olarak kabul edilmektedir [93]. 2011 yılında 347 milyon bireyin küresel çapta bu hastalıktan etkilendiği, 2017 yılında 450 milyondan fazla diyabet vakalarının görüldüğü ve 2045 yılına kadar da bu rakamın 690 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir [94].

Tip-2 diyabet (T2D), kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve obezite ile ilişkili morbiditelerin yaygınlığındaki küresel artış ciddi derecede toplum sağlığını tehdit etmektedir. Hiperinsülinemi, hiperglisemi, dislipidemi ve bağırsak mikrobiyomunun bileşimindeki değişiklikler dahil olmak üzere obezite ve tip-2 diyabet problemleri ile birlikte kanserin ilerlemesine potansiyel olarak birden fazla faktör katkıda bulunmaktadır. Günümüzde hızlı tempolu yaşam tarzı, fiziksel hareketsizlik, düzensiz veya sağlıklı beslenmeler sonucunda obezite durumu ortaya çıkmaktadır. Obezitenin giderek ciddi bir

şekilde artışı aynı zamanda tip-2 diyabet insidansının artışını da önemli ölçüde etkilemektedir [95]. Kan şekerini belirli sınırlar içinde kontrol etmek için, diyabet hastaları şekerli yiyeceklerden kaçınırlar ve bunun yerine nişastalı yiyecekleri tercih ederler. Yüksek karbohidratlı diyetler diyabete önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır [96]. Nişasta sindirimi, yemekten sonraki kan şekeri seviyesinde büyük ölçüde belirleyicidir ve ayrıca glukoz metabolizmasını etkiler. Hipergliseminin karbohidrat metabolizmasının bozulmasına neden olan önemli bir faktör olduğu ileri sürülmüştür; bu nedenle, kan glukozundaki artışı geciktirmenin, insülin direncinin ve/veya tip 2 diyabetin hafifletilmesi için faydalı olduğu düşünülmektedir. Gastrointestinal sistemde nişasta esas olarak ince bağırsakta α -amilaz tarafından maltoz, maltotrioz ve amilodekstrin gibi indirgen şekerlere sindirilir. Daha sonra indirgen şekerler α -glukozidaz tarafından hidrolize edilerek glukoz üretilir. Bu nedenle, α -amilaz nişasta hidrolizinin anahtar enzimidir ve enzim aktivitesini kimyasal ve biyolojik bileşenlerle düzenlemek, hipergliseminin ve bunun sonucunda ortaya çıkan metabolizma bozukluğunun önlenmesi ve tedavisinde tavsiye edilir [97].

α -Amilaz diyabet tedavisinde oldukça önemli bir role sahiptir. Bu enzimin inhibisyonu ile ince bağırsakta glukoz salınımı ve emilimi geciktirilmektedir. Bağırsakta gerçekleşen bu olayda enzimlerin inhibitörleri tarafından karbohidrat sindiriminin geciktirilmesi ile hiperglisemi düzeyi azaltılmaktadır [95, 97].

Glukozidaz inhibitörleri, glukozidazların etki mekanizmalarının anlaşılmasında çok etkili birer araç olmasının yanı sıra, diyabet, viral enfeksiyonlar ve kanser metastazı gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde büyük oranda umut vericidirler [98]. Bundan dolayıdır ki α -amilaz, diyabet, obezite ve hipergliseminin tedavisinde uygun ilaç moleküllerinin dizayn edilmesinde hedef enzim olmuştur [99]. Genel olarak bakıldığında, ticari olarak temin edilebilen antidiyabetik ilaçların yemek sonrası hiperglisemiye azaltmaları nedeniyle birer α -amilaz inhibitörü olduğu bilinmektedir [100-102]. Potansiyel terapötik etkilerinden dolayı pankreatik alfa amilaz inhibisyonu için *Azadirachta indica*'dan saflaştırılan liminoidlerin de antidiyabetik ilaçlar olarak kullanıldıkları belirtilmiştir [103]. Ayrıca, *Stevia rebaudiana* bitkisinde bolca bulunan steviol glikozid ekstraktının asit hidrolizleriyle elde edilen tetrasiklik diterpenoit (bir başka adıyla izosteviol) triazol türevlerinin kanser tedavisinde antitümör ajan olarak kullanıldığı belirtilmiştir [104]. Bunlara ilave olarak disakkaritlerin, iminosakkaritlerin, karbasakkaritlerin ve tiyosakkaritlerin de glikozidazların inhibitörleri arasında olduğu bilinmekle birlikte halen yüksek spesifite ve etkinlik gösteren yeni inhibitör moleküllerinin dizaynının ve keşfinin bir ihtiyaç olduğu görülmektedir [105]. Bu nedenle,

Balba vd. (2011), alfa amilaz ve α -glukozidaz inhibisyonu için imidazol-tiyon ve 1,2,4-triazol-tiyol'un diaril türevlerini sentezlemişler ve bu moleküllerin inhibisyon potansiyellerini incelemişlerdir [105]. Perion vd. (2005) 1,4,5-trisubstituye 1,2,3-triazol bileşiği sentezlemişler ve glikozidaz inhibitörü olarak etkinliğini araştırmışlardır [98]. Anand vd. (2011) yaptıkları bir çalışmada triazol yapısı içeren bileşiklerin birçok hastalığın tedavisinde farmakofor önemini belirtmiş ve bunun için de triazol glikohibrit yapıların sentezini ve α -glukozidaz inhibisyon potansiyelini irdemiştir [106]. Ayrıca, Balan vd. (2015) yaptıkları bir çalışmada alfa amilaz ve α -glukozidaz inhibisyonu için yeni bir molekül olarak 2-allil amino 4-metilsülfanil butirik asidi sentezlediklerini ve adı geçen molekülün inhibisyon potansiyelini değerlendirmek üzere hem moleküler modelleme çalışmaları hem de enzim kinetiği çalışmaları yaptıklarını bildirmişlerdir [107]. Bundan önceki yıllarda yapılan bir çalışmada ise *Phaseolus vulgaris* ve *Alpina nigra* tohumlarından elde edilen farklı alfa amilaz inhibitörlerinin enzimin aktif bölgesine spesifik bağlanmasının moleküler temellerini moleküler modellemeyle ortaya koymuşlardır [102, 108].

1.8. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Çalışmanın kapsamında KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı araştırmacıları tarafından sentezi gerçekleştirilmiş olan piperazin, 1,2,4-triazol ve florokinolon yapısı içeren bazı yeni bileşiklerin klinik öneme sahip tirosinaz ve α -amilaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine inhibitör etkinliklerinin *in vitro* ve *in siliko* çalışmalar ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Böylece, bu enzimlerin yüksek aktiviteleri ile ilişkilendiren birtakım hastalıkların tedavisinde ilaç aday molekülü olarak yeni bazı moleküllerin literatüre kazandırılması mümkün olabilecektir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kimyasallar, Çözeltiler ve Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan enzim ve kimyasallar ve temin edildikleri ticari firmalar şu şekilde sıralanabilir: Tirosinaz (Mantardan), α -Amilaz (pankreatik), *L*-tirosin, 3-Metil-2-benzotiazolinon hidrazonhidroklorid hidrat (MBTH), DMF, DMSO, DNS (dinitrosalisilik asit), Fenol, Sodyum bisülfid, Disodyum hidrojen fosfat dihidrat, Sodyum asetat trihidrat, Sodyum hidroksit, Sodyum klorür, Sitrik asit monohidrat (Sigma), Sodyum-potasyum tartarat, Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat, Nişasta (Merck), D-(+)-Maltoz monohidrat, Kojik Asit (Biomedicals), Tris (Fluka), Akarboz (Alfa Aesar), Disodyum hidrojen fosfat (Applichem)'den temin edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları şu şekilde sıralanabilir: Distile su cihazı (Sartorius), Spektrofotometre (Perkin Elmer), Magnetik karıştırıcı (HS31), pH Metre (InoLab), Vorteks (Thermolyne), Buzdolabı (Profilo), Buz Makinesi (Hoshizaki), Farklı hacimlerde otomatik pipetler (Acura 825), Farklı Cam Malzemeler (Isolab), Isıtıcı (HS31).

2.1.3. Enzim Aktivitesi Tayininde ve İnhibisyonun Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

2.1.3.1. Tirosinaz Enzimi ile İlgili Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

- A Çözeltisi (0,1 M sitrik asit monohidrat): 5,253 g sitrik asit monohidratın saf su ile çözülüp hacminin 250 mL' ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
- B Çözeltisi (0,2 M disodyum hidrojen fosfat): 7,098 g Na_2HPO_4 'ün saf suyla çözülüp hacminin 250 mL' ye tamamlanması ile hazırlandı.

- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 3,0): 80,3 mL A çözeltisi ile 19,7 mL B çözeltisi karışımından 20,8 mL alınıp saf suyla hacminin 50 mL' ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 4,0): 62 mL A çözeltisi ile 38 mL B çözeltisi karışımından 18,1 mL alınıp saf suyla hacminin 50 mL' ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 5,0): 49 mL A çözeltisi ile 51 mL B çözeltisi karışımından 16,6 mL alınıp saf suyla hacminin 50 mL' ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 6,0): 37,4 mL A çözeltisi ile 62,6 mL B çözeltisi karışımından 15,3 mL alınıp saf suyla hacminin 50 mL' ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 7,0): 19 mL A çözeltisi ile 81 mL B çözeltisi karışımından 13,8 mL alınıp saf suyla hacminin 50 mL' ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
- L-Tirosin Çözeltisi (10 mM): 0,0181 g L-tirosin bir miktar saf suda çözüldü. Son hacim saf suyla 10 mL' ye tamamlandı.
- MBTH (10 mM): 0,0216 g MBTH bir miktar saf suda çözüldü. Saf suyla hacmi 10 mL' ye tamamlandı.
- Tirosinaz Çözeltisi (1mg/mL): Derişimi 18,61 mg/mL olan stoktan 53,7 µL alındı ve saf suyla hacmi 1 mL' ye tamamlandı.
- Kojik Asit Çözeltisi (100 mM, stok): 0,14 g kojik asit tartılıp Mcilvaine tamponunda (50 mM, pH 5,0) çözüldü ve son hacim tampon ile 10 mL' ye tamamlandı.

2.1.3.2. Alfa Amilaz Enzimi ile İlgili Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

- Asetat Tamponu (20 mM, pH 5,0): 0,304 g sodyum asetat trihidrat ve 0,018 g sodyum klorür yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N Asetik asit ile 5,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Sodyum fosfat tamponu (20 mM, pH 6,0): 0,0214 g disodyum hidrojen fosfat, 0,121 g sodyum dihidrojen fosfat ve 0,018 g sodyum klorür yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 6,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

- Sodyum fosfat tamponu (20 mM, pH 7,0): 0,1032 g disodyum hidrojen fosfat, 0,058 g sodyum dihidrojen fosfat ve 0,018 g sodyum klorür yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 7,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Sodyum fosfat tamponu (20 mM, pH 8,0): 0,166 g disodyum hidrojen fosfat, 0,0093 g sodyum dihidrojen fosfat ve 0,018 g sodyum klorür yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 8,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Tris-HCl tamponu (20 mM, pH 9,0): 0,12 g Trisve0,018 g sodyum klorür yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 9,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- α -Amilaz Çözeltisi (0,5 mg/mL, stok): 0,5 mg α -amilaz tartılıp, 1 mL 20 mM fosfat tamponunda (pH 7,0) çözüldü. Gerektiğinde taze olarak hazırlandı.
- %1'lik Nişasta Çözeltisi: 0,2 g nişasta tartılıp bir miktar tampon ile bulamaç haline getirildi ve bir miktar kaynayan tampon içerisine ilave edildi. Ardından karışıma son hacim 20 mL olacak şekilde tampon ilave edildi.
- Dinitrosalisilik asit (DNS) çözeltisi: Çözelti A; 22 mL %10'luk NaOH çözeltisi üzerine az miktarda suda çözünmüş 10 mL fenol ilave edilip 100 mL'ye tamamlandı. Çözelti B; 6,9 g sodyumbisülfid 69 mL Çözelti A'da çözüldü. Çözelti C; 300 mL %4,5 NaOH, 225 g Na-K tartarat ve 880 mL %1'lik 3,5-dinitrosalisilik asit karıştırıldı. Son olarak Çözelti B ve Çözelti C karıştırılarak DNS çözeltisi hazırlandı.
- Akarboz çözeltisi (1,7 mM, stok): 0,0110 g akarboz tartılıp sodyum fosfat tamponunda (20 mM, pH 7,0) çözüldü ve son hacim tampon ile 10 mL'ye tamamlandı.

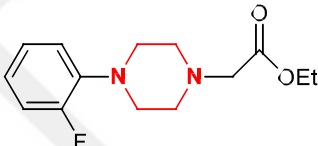
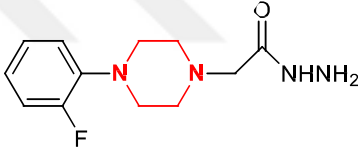
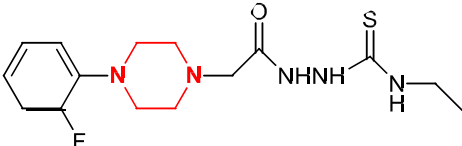
2.1.4. Çalışmada Kullanılan Yeni Sentezlenmiş Organik Moleküller

Bu çalışmada kullanılan moleküller KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Neslihan DEMİRBAŞ ve araştırma grubu tarafından tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Çalışmada kullanılan moleküller Tablo 2'de sunulmaktadır.

2.2. Tirosinaz Aktivitesi Tayini

Tablo 3'te verilen reaksiyon bileşenleri (enzim hariç) bir eppendorf tüp içerisinde vortekslenip karıştırıldıktan sonra bir spektrofotometre küvetine aktarıldı ve enzim ilavesinin ardından hemen 475 nm'de 3 dakika boyunca reaksiyon karışımı için absorbans ölçümü gerçekleştirildi [109]. Molar absorpsiyon katsayısı $3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak kullanılmıştır [110]. Bir ünite enzim aktivitesi, reaksiyon şartlarında 1 dakikada açığa çıkan 1 μmol ürün miktarı olarak verildi [111].

Tablo 2. Çalışmada kullanılan yeni sentezlenmiş organik moleküller

Bileşik Numarası	Bileşik Adı	Bileşik Formülü
1	Etil [4-(2-florofenil)piperazin-1-il]asetat	
2	2-[4-(2-Florofenil)piperazin-1-il]asetohidrazid	
3	N-Etil-2- {[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]asetil }hidrazinkarbotiyoamid	

Tablo 2'nin devamı

4	7-Kloro-1-etil-6-floro-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilli asid	
5	N-benzil-2- {[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]asetil}hidrazinkarboksamid	
6	4-Benzil-5- {[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]metil}-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on	
7	N-etil-2- {[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]asetil}hidrazinkarboksamid	
8	4-Etil-5- {[4-(2-florofenil)piperazin-1-il]metil}-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on	

Tablo 3. Tirosinaz aktivitesi için standart reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kontrol (µL)	Numune (µL)
McIlvaine Tamponu (50 mM, pH 5,0)	1015	979
MBTH (10 mM)	120	120
DMF	24	24
Tirosinaz çözeltisi (1 mg/mL)	--	36
L-tirosin (5mM)	41	41

2.2.1. Tirosinaz Aktivitesinin Optimizasyonu

2.2.2. Tirosinaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek amacıyla farklı pH'larda (50 mM, pH 3,0-7,0 aralığında) Mcilvaine tamponları kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen pH-%Bağıl Aktivite grafiğine göre tirosinaz için optimum pH değeri belirlendi [112].

2.2.3. Tirosinaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek amacıyla optimum pH değerinde, 10-50 °C sıcaklık aralığında 10 °C'lik artışlarla aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen Sıcaklık-%Bağıl Aktivite grafiğine göre tirosinaz için optimum sıcaklık değeri bulundu. Belirlenen optimum sıcaklık değeri, daha sonra yapılacak olan çalışmalarda reaksiyon sıcaklığı olarak kullanıldı.

2.2.4. Tirosinaz Konsantrasyonunun Aktivite Üzerine Etkisi

Bu denemede enzimin en iyi aktivite gösterdiği konsantrasyonu belirlemek amacıyla *L*-tirosin substratı varlığında, nihai enzim konsantrasyonu 10-100 µg/mL aralığında olacak şekilde aktivite tayini yapıldı. Optimum pH ve sıcaklık değerlerinde protein miktarına bağlı olarak enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlarla enzim konsantrasyonuna karşı aktivite grafiği çizilerek ileriki çalışmalarda kullanılacak etkin enzim konsantrasyonu belirlendi.

2.2.5. Substrat Konsantrasyonunun Tirosinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Tirosinaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek için, etkin enzim konsantrasyonunda (30 µg/mL) ve 0,01-1,25 mM arasında değişen *L*-tirosin konsantrasyonlarında reaksiyon karışımları hazırlandı, 25 °C ve pH 5,0' da enzim aktivitesi tayin edildi. Elde edilen veriler kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten

K_m ve V_{maks} değerleri hesaplandı. İnhibisyon çalışmaları buradan tespit edilen K_m değerindeki substrat konsantrasyonunda gerçekleştirildi.

2.2.6. Organik Moleküllerin Tirosinaz İnhibisyon Potansiyellerinin İncelenmesi

Sentezlenen organik moleküllerin DMSO içerisinde stok çözeltileri hazırlandı (organik çözücünün reaksiyon karışımındaki nihai konsantrasyonunu %1'i geçmeyecek şekilde ayarlandı). Bu stok çözeltilerden farklı konsantrasyonlardaki inhibitör ara çözeltileri hazırlandı. Tablo 4'te verilen miktarlarda, enzim ve inhibitör çözeltisi karıştırıldı ve optimum sıcaklıkta 10 dakika ön inkübasyon yapıldı. Ardından substrat çözeltisi ve diğer bileşenler her bir reaksiyon karışımına eklendi ve spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapıldı. İnhibitör varlığında yapılan aktivite çalışmaları sonucunda her bir organik molekül için inhibitör konsantrasyonları %Bağıl Aktiviteye karşı grafiğe geçirildi ve enzim için, denenen her bir inhibitör molekülüne ait IC_{50} değerleri belirlenmeye çalışıldı.

Tablo 4. Tirosinaz inhibisyon çalışması için hazırlanan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kontrol (μ L)	Numune (μ L)
McIlvaine Tamponu (50 mM, pH 5,0)	1003	967
MBTH (10 mM)	120	120
DMF	24	24
Tirosinaz çözeltisi (1 mg/mL)	--	36
İnhibitör çözeltisi	12	12
L-tirosin (5 mM)	41	41

Çalışılan inhibitör molekülleri arasında IC_{50} değeri en düşük olarak tespit edilen 7. molekül için tirosinaz inhibisyon türünü tespit edebilmek adına çalışmalar daha öncesinde belirlenmiş olan optimum şartlar altında yapıldı ve K_i değeri hesaplandı. Çalışmanın bu kısmında 7. molekülün yokluğunda ve iki farklı konsantrasyonunda (200 μ M ve 750 μ M) yukarıda belirtildiği şekilde aktivite tayini gerçekleştirildi. Elde edilen bulgulara dayalı olarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. İnhibitör yokluğunda ve inhibitör varlığında K_m ve V_{maks} değerleri bulunduktan sonra bu kinetik değerlerden yola çıkarak inhibisyon türü belirlendi. Ayrıca K_i değeri matematiksel olarak hesaplandı.

2.3. Alfa Amilaz Aktivitesi Tayini

Alfa amilaz aktivitesi, Taha ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan [113] uyarlanan bir yöntem ile belirlendi. Buna göre Tablo 5’te verilen reaksiyon bileşenlerinden α -amilaz çözeltisi, fosfat tamponu ve nişasta bir eppendorf tüp içerisinde 35 °C ’de 10 dakika inkübe edildi. Reaksiyona 100 μ L dinitrosalisilik asit (DNS) ilave edildi ve reaksiyon karışımı 5 dakika kaynatılarak reaksiyonun durdurulması sağlandı. Oda sıcaklığına kadar soğutulan reaksiyon karışımları 1000 μ L distile su ile seyreltildi ve 540 nm’de absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Molar absorpsiyon katsayısını belirlemek amacıyla standart maltoz grafiği çizildi ve değer 0,0071 (μ g/ml)⁻¹cm⁻¹ olarak hesaplandı. Bir ünite enzim aktivitesi, reaksiyon şartlarında 1 dakikada açığa çıkan 1 μ mol maltoz miktarı olarak hesaplandı [114].

Tablo 5. Alfa Amilaz aktivitesi için standart reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kontrol (μ L)	Numune (μ L)
Fosfat Tamponu (20 mM, pH 7,0)	80	40
Alfa Amilaz çözeltisi (102 μ g/mL)	--	40
Nişasta (%0,96)	40	40
DNS	100	100
Distile Su	1000	1000

2.3.1. Alfa Amilaz Aktivitesinin Optimizasyonu

2.3.2. Alfa Amilaz Aktivitesi Üzerine pH’nın Etkisi

Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek amacıyla farklı pH’larda tamponlar kullanılarak, aktivite tayinleri yapıldı. Çalışmada kullanılan tamponların hepsi 20 mM olup, pH 5,0 için asetat, pH 6,0-8,0 için fosfat, pH 9,0 için Tris-HCl tamponları hazırlandı. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen pH-%Bağıl Aktivite grafiğine göre alfa amilaz için optimum pH değeri belirlendi.

2.3.3. Alfa Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek amacıyla optimum pH değerinde, 20-40 °C sıcaklık aralığında 5 °C'lık artışlarla aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen Sıcaklık-%Bağıl Aktivite grafiğine göre alfa amilaz için optimum sıcaklık değeri bulundu. Belirlenen optimum sıcaklık değeri, daha sonra yapılacak olan çalışmalarda reaksiyon sıcaklığı olarak kullanıldı.

2.3.4. Alfa Amilaz Konsantrasyonunun Aktivite Üzerine Etkisi

Bu denemede enzimin en iyi aktivite gösterdiği konsantrasyonu belirlemek amacıyla nişasta substratı varlığında, nihai enzim konsantrasyonu 1-250 µg/mL aralığında olacak şekilde aktivite tayini yapıldı. Optimum pH ve sıcaklık değerlerinde protein miktarına bağlı olarak enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlarla enzim konsantrasyonuna karşı aktivite grafiği çizilerek ileriki çalışmalarda kullanılacak olan etkin enzim konsantrasyonu belirlendi.

2.3.5. Substrat Konsantrasyonunun Alfa Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Alfa amilaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek için, etkin enzim konsantrasyonunda (34 µg/mL) ve %0,05-1,4 arasında değişen konsantrasyonlarında reaksiyon karışımları hazırlandı, 35 °C ve pH 7,0'de enzim aktivitesi tayin edildi. Elde edilen sonuçlar kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten K_m ve V_{maks} değerleri hesaplandı. İnhibisyon çalışmaları buradan tespit edilen K_m değerindeki substrat konsantrasyonunda gerçekleştirildi.

2.3.6. Organik Moleküllerin Alfa Amilaz İnhibisyon Potansiyellerinin İncelenmesi

Sentezlenen organik moleküllerin DMSO içerisinde stok çözeltileri hazırlandı (organik çözücünün reaksiyon karışımındaki nihai konsantrasyonu %3'ü geçmeyecek şekilde ayarlandı). Bu stok çözeltilerden farklı konsantrasyonlardaki inhibitör ara çözeltileri hazırlandı. Tablo 6'da verilen miktarlarda, alfa amilaz çözeltisi ile inhibitör çözeltisi

kariştırıldı. Optimum sıcaklıkta 10 dakika ön inkübasyon yapıldı. Ardından substrat çözeltisi ve tampon her bir reaksiyon karişımına eklendi ve optimum sıcaklıkta 10 dakika inkübe edildi. Reaksiyona 100 µL dinitrosalisilik asit (DNS) ilave edildi ve reaksiyon karişımı 5 dakika kaynatılarak reaksiyonun durdurulması sağlandı. Oda sıcaklığına kadar soğutulan reaksiyon karişımları 1000 µL distile su ile seyreltildi ve 540 nm’de absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Her bir organik molekül için inhibitör konsantrasyonları %Bağıl Aktiviteye karşı grafiğe geçirildi ve her bir inhibitör molekülüne ait IC₅₀ değerleri belirlenmeye çalışıldı.

Tablo 6. Alfa Amilaz inhibisyon çalışması için hazırlanan reaksiyon karişımı

Reaktifler	Kontrol (µL)	Numune (µL)
Fosfat Tamponu (20 mM, pH 7,0)	76,4	36,4
Alfa Amilaz çözeltisi (102 µg/mL)	--	40
Nişasta (%0,96)	40	40
DNS	100	100
İnhibitör çözeltisi	3,6	3,6
Distile Su	1000	1000

Çalışılan inhibitör molekülleri arasında IC₅₀ değeri en düşük olarak tespit edilen 5. molekül için alfa amilazın inhibisyon türünü tespit edebilmek adına çalışmalar daha öncesinde belirlenmiş olan optimum şartlar altında yapıldı ve K_i değeri hesaplandı. Çalışmanın bu kısmında 5. molekülün yokluğunda ve iki farklı konsantrasyonunda (350 µM ve 750 µM) yukarıda belirtildiği şekilde aktivite tayini gerçekleştirildi. Elde edilen verilere dayalı olarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. İnhibitör yokluğunda ve inhibitör varlığında K_m ve V_{maks} değerleri bulunduktan sonra bu kinetik değerlerden yola çıkarak inhibisyon türü belirlendi. Ayrıca K_i değeri matematiksel olarak hesaplandı.

2.4. İstatistiki Analiz

Tüm İn vitro deneysel çalışmalar 3 tekrarlı yapıldı ve standart sapma değerleri Excel programı kullanılarak hesaplandı.

2.5. İn Siliko Çalışmalar

2.5.1. ADME Çalışmaları

ADME çalışmaları için öncelikle aşağıda verilen iki farklı web sitesine girilip belirli işlem basamakları seçildikten sonra moleküllerin çizimi gerçekleştirildi. Ardından moleküllerin ADME özellikleri Lipinski'nin beş kuralına uygun olacak şekilde hesaplanması için ilgili butona tıkladıktan sonra moleküle ait olan; moleküler hacim (MV), moleküler ağırlık (MW), dönen bağların sayısı (n-ROTB), bileşiğin su ve n-oktanol arasında dağılım katsayısının logaritması (miLog), TPSA vb. özellikler belirlendi. Bu özelliklerin bir kısmı birinci bir kısmı da ikinci web linki kullanılarak bulundu. Moleküllere ait bu özellikler belirlendikten sonra $\%ABS = 109 - (0.345 \times TPSA)$ formülü kullanılarak $\%ABS$ değeri hesaplandı [115]. Moleküllerin ADME özellikleri yanında ilaç benzerlik skoru da aşağıda belirtilen birinci link kullanılarak tespit edildi.

1. www.molsoft.com/mprop
2. www.molinspiration.com

2.5.2. Moleküler Modelleme Çalışmaları

İnhibitör özellikleri araştırılacak triazollerin florokinolon iskeleti taşıyan yeni türev hibrit bileşikler Spartan 16 kullanarak hazırlandı [116]. İlk önce her bir bileşiğin konformasyon taraması moleküler mekanik MMFF yöntemi ile yapılmış ve ardından en düşük enerjili 50 konformasyon, yarı deneysel PM6 yöntemi ile optimize edilmiştir [117]. PM6 yöntemi ile bulunan en kararlı konformasyon seçilerek dispersiyon etkisi katılmış hassas bir hibrit Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi yöntemi olan M06-2X/6-31G** ile optimize edilmiştir [118, 119].

Moleküler doking hesaplamaları için Scripps Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen açık lisanslı AutoDockVina ve Autodocktools programları kullanıldı [120, 121]. *Agaricusbisporus* mushroom tirozinaz için PDB banktan indirilen 2.78 Å çözünürlüğe sahip 2Y9X kodlu X-ray kristal yapısı kullanıldı [122]. Domuz (porcine) pankreatik alfa amilaz için ise PDB banktaki 1OSE kodlu 2.3 Å çözünürlüğe sahip X-ray Kristal yapısı kullanıldı [123]. Her iki enzim için de gerçekleştirilen doking denemelerinde protein ve ligand esnek

tutuldu. Seçilen uygun konformasyon yapıları ile kristal yapıya sahip olan enzimler aktif bölgede etkileştirilerek bağlanma enerjileri AutoDockVina programı ile teorik olarak hesaplandı.

Hem tirosinaz hem de alfa amilaz doking çalışmalarında her bir ligand için 10 esnek doking denemesi yapıldı. Her bir denemede bulunan 9 konformasyonun enzimin aktif bölgesine bağlanıp bağlanmadığı incelendi. Aktif bölgeye en iyi afinite ile bağlanan konformasyonların serbest bağlanma enerjileri (ΔG) tablosal olarak belirtildi. Enzimin aktif bölgesine en iyi bağlanan konformasyonların enzim-ligand etkileşimlerine DiscoveryStudio görüntüleme programında bakıldı [124].



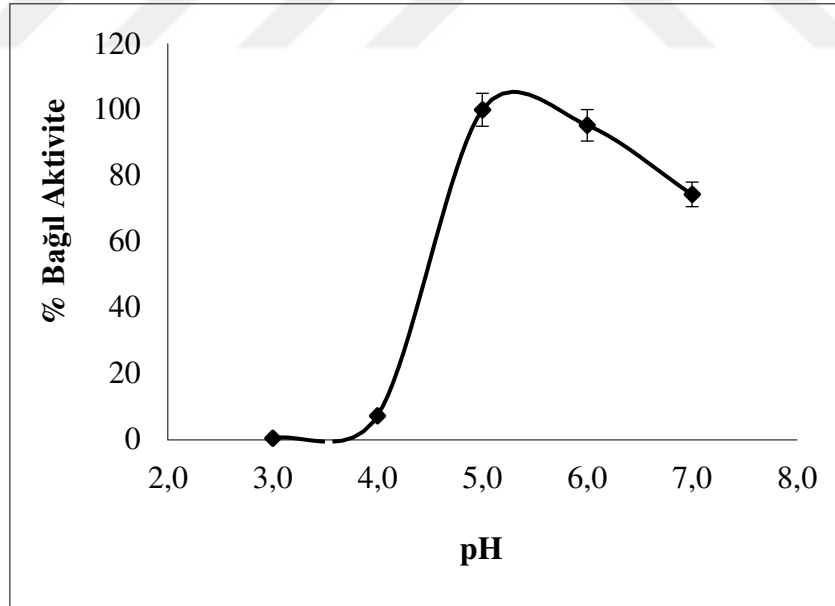
3. BULGULAR

3.1. Tirosinaz Aktivitesinin Optimizasyonu

Sentezlenen organik moleküllerin, tirosinaz aktivitesi üzerine inhibisyon potansiyellerini ortaya koymak amacıyla yapılan inhibisyon çalışmalarına başlamadan önce enzimin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

3.1.1. Tirosinaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

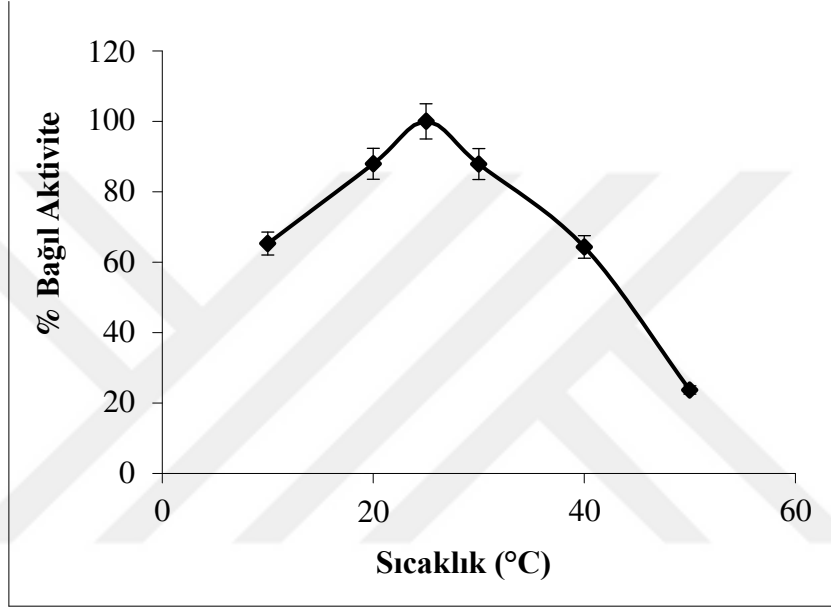
Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek amacıyla sabit sıcaklıkta, sabit substrat ve enzim konsantrasyonunda ve farklı pH'larda tamponlar kullanılarak, aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen bulgular kullanılarak çizilen pH-%Bağlı Aktivite grafiğine göre (Şekil 11) tirosinaz için optimum pH değeri 5,0 olarak belirlendi.



Şekil 11. Tirosinaz aktivitesinin pH ile değişimi

3.1.2. Tirosinaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

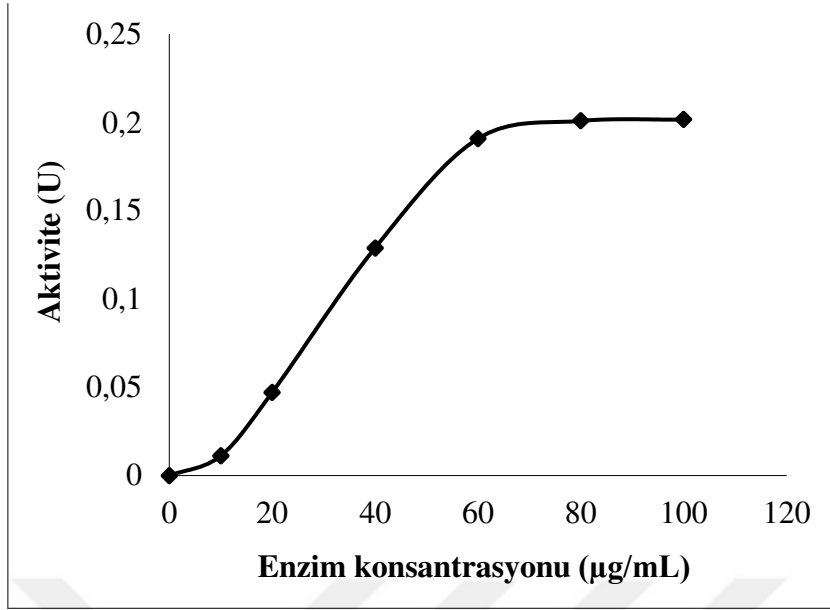
Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek amacıyla enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu ve pH sabit tutularak 10-50 °C sıcaklık aralığında aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen Sıcaklık-%Bağıl Aktivite grafiğine göre (Şekil 12) tirosinaz için optimum sıcaklık değeri 25 °C olarak belirlendi.



Şekil 12. Tirosinaz aktivitesinin sıcaklık ile değişimi

3.1.3. Tirosinaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

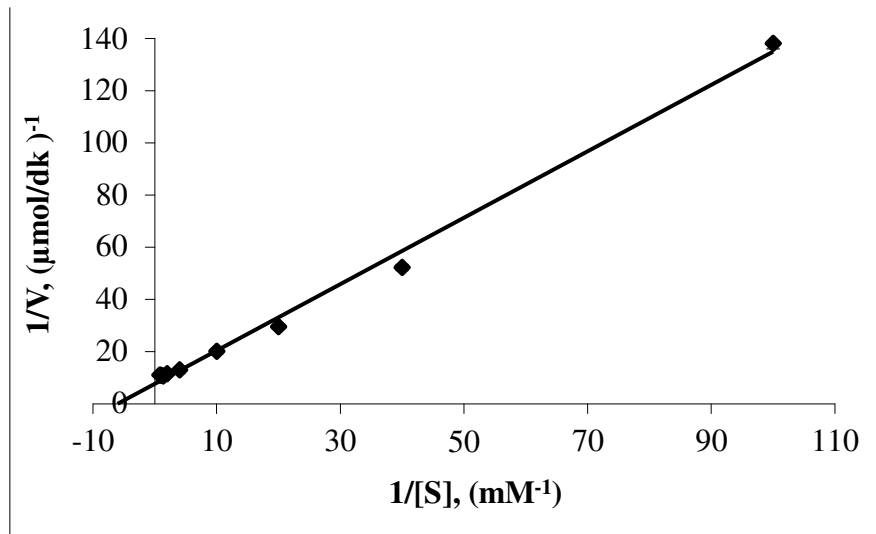
Tirosinaz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisini incelemek için substrat konsantrasyonu, pH ve reaksiyon sıcaklığı sabit tutularak reaksiyon karışımındaki nihai enzim konsantrasyonu (10-100 µg/mL) olacak şekilde aktivite tayini yapıldı. Optimum pH ve sıcaklık değerlerinde protein miktarına bağlı olarak enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlarla enzim konsantrasyonuna karşı aktivite grafiği çizildi (Şekil 13). Şekil 13'teki hiperbolik eğriye bağlı olarak ilk hız ölçümleri için uygun etkin enzim konsantrasyonu 30 µg/mL olarak belirlendi.



Şekil 13. Tirosinaz aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi

3.1.4. Tirosinaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Tirosinaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek için sabit enzim konsantrasyonu, sıcaklık ve pH değerinde ve 0,01-1,25 mM arasında değişen substrat konsantrasyonlarında reaksiyon karışımları hazırlandı ve enzim aktivitesi tayin edildi. Elde edilen bulgular kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 14). Bu grafikten yola çıkarak K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla, 0,17 mM ve 0,13 $\mu\text{mol/dk}$ olarak hesaplandı.



Şekil 14. Substrat varlığında tirosinaz aktivitesi için Lineweaver-Burk grafiği

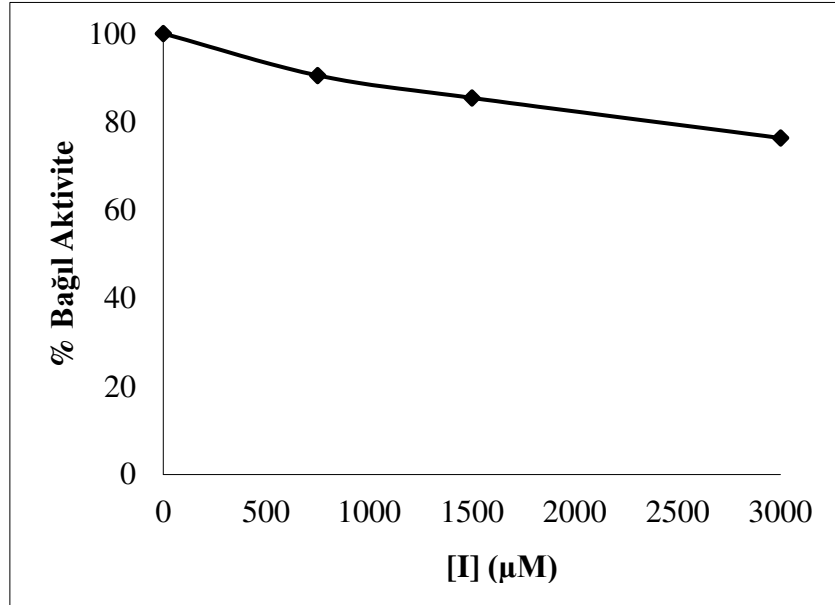
Tüm bu optimizasyon çalışmalarından elde edilen bulgular özet olarak Tablo 7’de sunulmaktadır.

Tablo 7. Tirosinaz Aktivitesinin Optimizasyonu

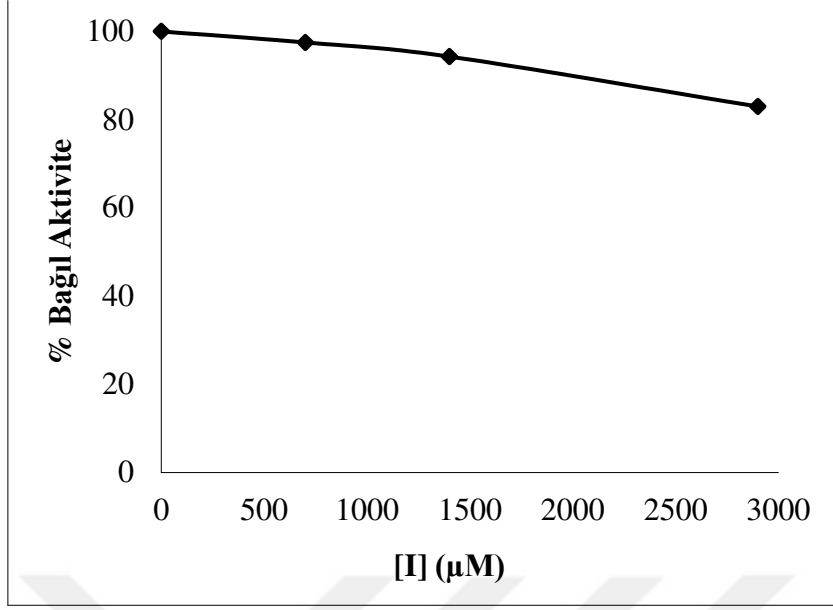
Opt. pH	Opt. sıcaklık	Enzim konsantrasyonu	K_m
5,0	25 °C	30 µg/mL	0,17 mM

3.2. Tirosinaz İnhibisyon Çalışmaları

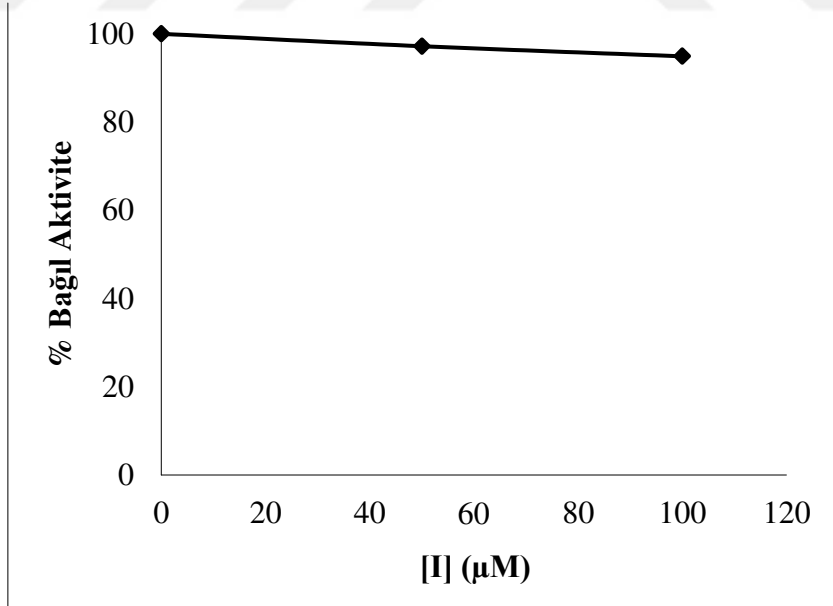
Çalışmanın bu kısmında yeni sentezlenmiş 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 numaralı inhibitör molekülleri ile çalışıldı. Çalışmada referans inhibitör molekül olarak kojik asit kullanıldı ve IC_{50} değeri 14,3 µM olarak bulundu. İnhibisyon çalışmaları 2.2.6 kısmında anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen bulgulara bağlı olarak her bir organik molekül için inhibitör konsantrasyonlarına karşı %Bağıl Aktivite grafiği çizildi ve aktivitenin %50 azaldığı inhibitör konsantrasyonu IC_{50} değeri olarak belirlendi (Şekil 15-22, Tablo 8). Yapılan bu çalışmalar sonucunda sadece 7. ve 8. inhibitör molekülleri için IC_{50} değeri belirlenebildi.



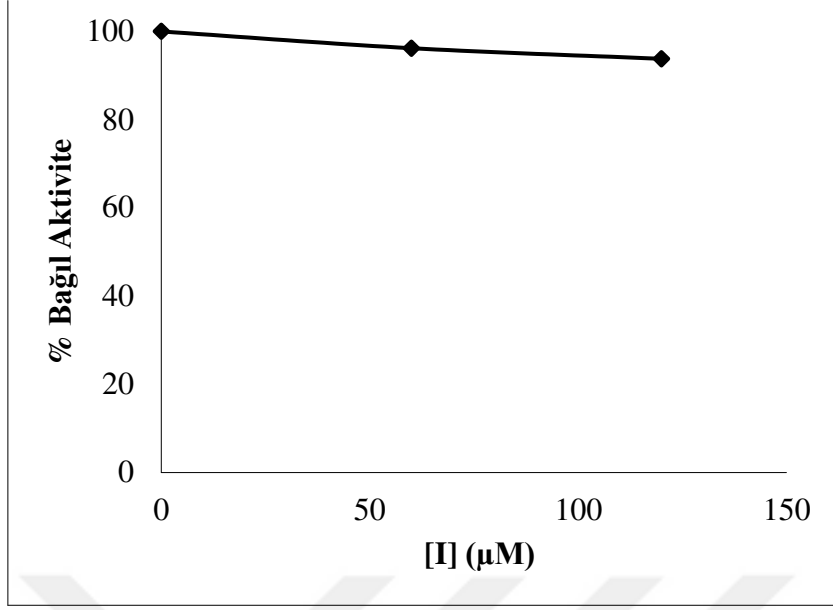
Şekil 15. 1. Molekülün tirosinaz aktivitesi üzerine etkisi



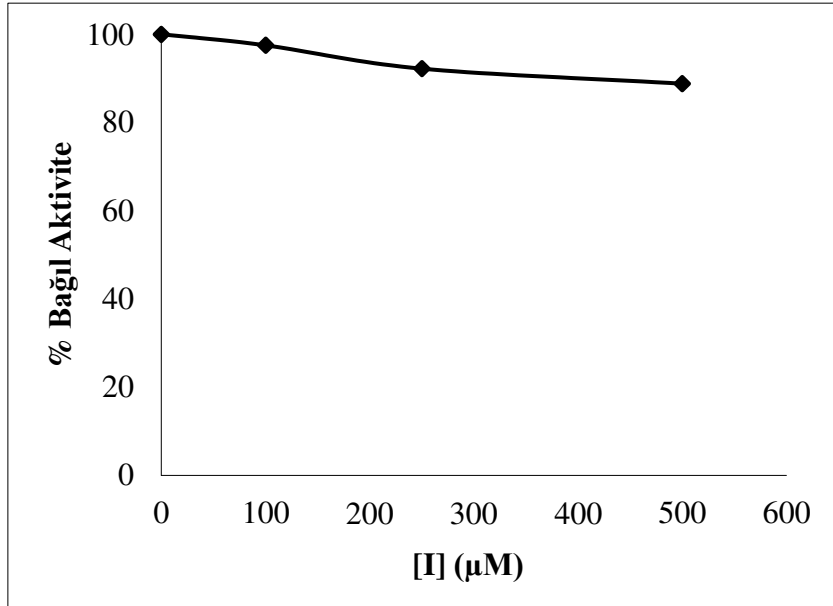
Şekil 16. 2. Molekülün tirosinaz aktivitesi üzerine etkisi



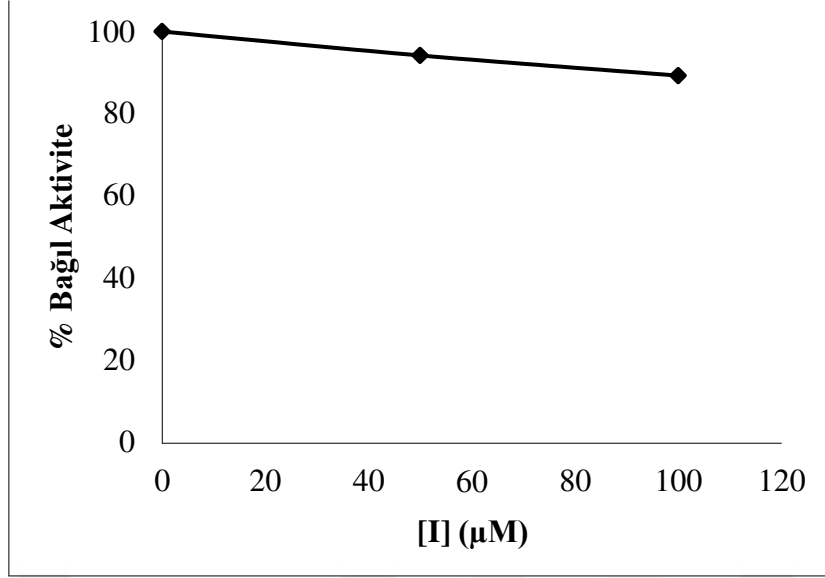
Şekil 17. 3. Molekülün tirosinaz aktivitesi üzerine etkisi



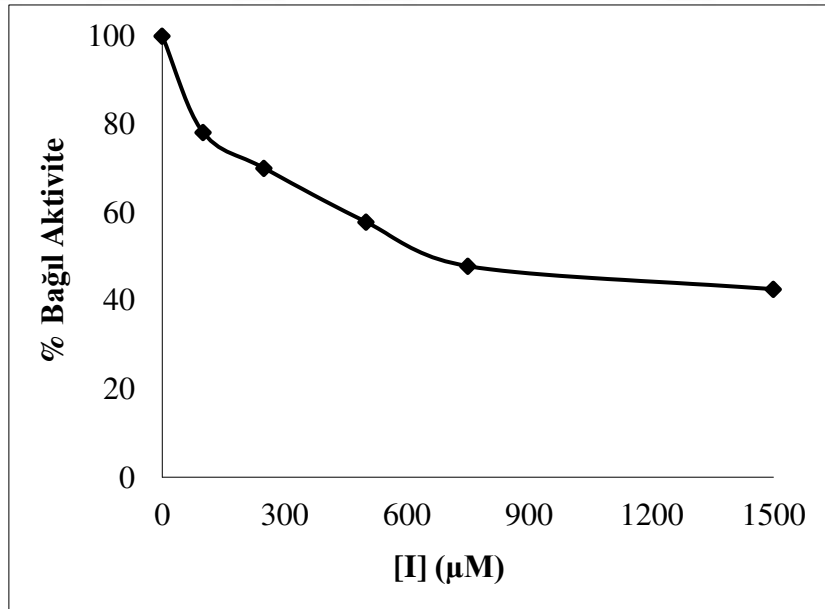
Şekil 18. 4. Molekülün tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi



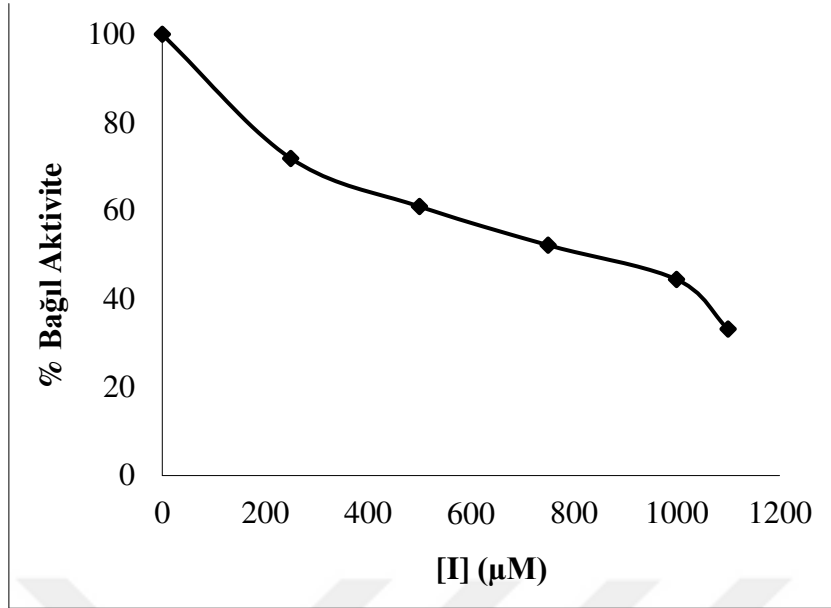
Şekil 19. 5. Molekülün tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 20. 6. Molekülün tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 21. 7. Molekülün tirozinaz aktivitesi üzerine etkisi

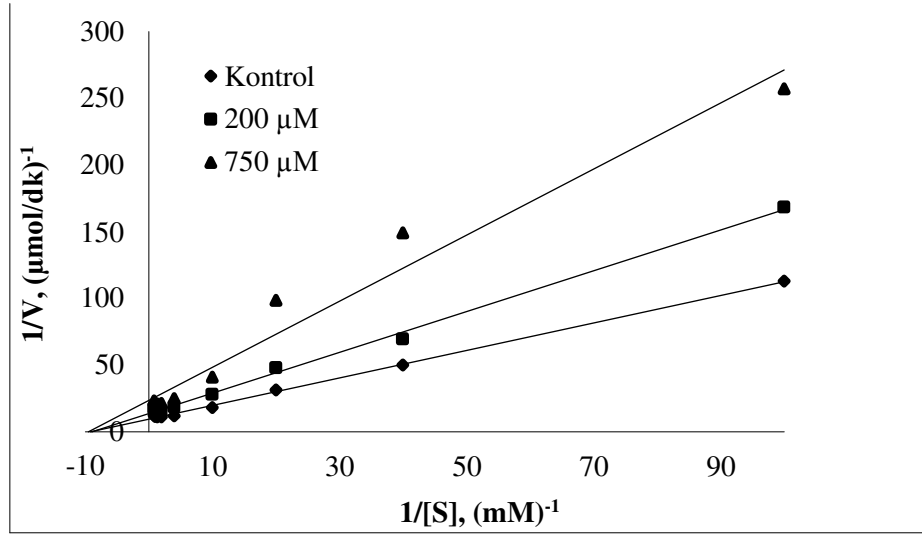


Şekil 22. 8. Molekülün tirosinaz aktivitesi üzerine etkisi

Tablo 8. İnhibitör Moleküllerinin Tirosinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

İnhibitörler	IC ₅₀ , µM	Maksimum İnhibisyon %, [I], µM
1	>3000	23,7 ± 0,3
2	>2900	17,02 ± 0,1
3	>100	5,1 ± 0,5
4	>120	6,2 ± 0,7
5	>500	11,2 ± 0,2
6	>100	10,7 ± 1,0
7	651,3 ± 13,2	57,4 ± 1,3
8	738,2 ± 18,6	66,8 ± 1,8
Kojik asit	14,3 ± 0,1	98,5 ± 0,1

Tirosinaz enzimi için çalışılan inhibitör molekülleri arasında Tablo 8’de belirtildiği üzere en düşük IC₅₀ değerine sahip olan 7. molekül olarak belirlendi. En etkili inhibisyonun gözlemlendiği bu molekül için inhibisyon türünün belirlenmesi ve K_i değerinin hesaplanması bölüm 2.2.6’da belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen bulgulardan yola çıkarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi, inhibitör varlığında ve yokluğunda K_m ve V_{maks} değerleri belirlendi (Şekil 23, Tablo 9). Tirosinaz enziminin 7. molekülün varlığında yarışmasız (nonkompetitif) bir şekilde inhibe olduğu gözlemlenirken K_i değeri ise 477,86 µM olarak hesaplandı.



Şekil 23. 7. molekül varlığında tirozinaz inhibisyon türünün belirlenmesi

Tablo 9. 7. molekül varlığında tirozinaz inhibisyon türünün belirlenmesi ve K_i değeri

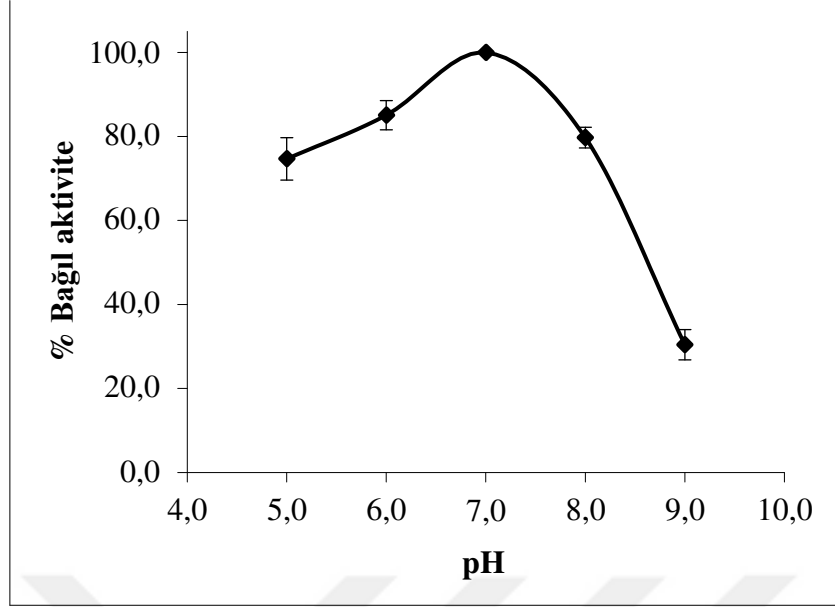
İnhibitör (μM)	K_m (mM)	V_{maks} ($\mu\text{mol/dk.}$)	İnhibisyon türü	Ortalama K_i (μM)
Kontrol	0,11	0,11	Yarışmasız (nonkompetitif)	477,86
200	0,11	0,07		
750	0,11	0,04		

3.3. Alfa Amilaz Aktivitesinin Optimizasyonu

Sentezlenen organik moleküllerin, alfa amilaz aktivitesi üzerine inhibisyon potansiyellerini ortaya koymak amacıyla yapılan inhibisyon çalışmalarına başlamadan önce enzimin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

3.3.1. Alfa Amilaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

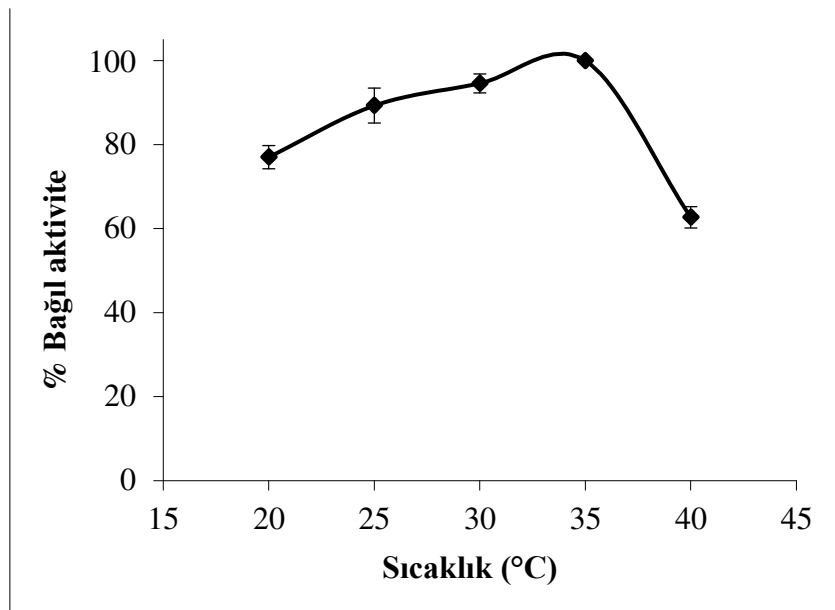
Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek amacıyla sabit sıcaklıkta, sabit substrat ve enzim konsantrasyonunda ve farklı pH'larda tamponlar kullanılarak, aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen pH-%Bağıl Aktivite grafiğine göre alfa amilaz için optimum pH değeri 7,0 olarak belirlendi (Şekil 24).



Şekil 24. Alfa amilaz aktivitesinin pH ile değişimi

3.3.2. Alfa Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

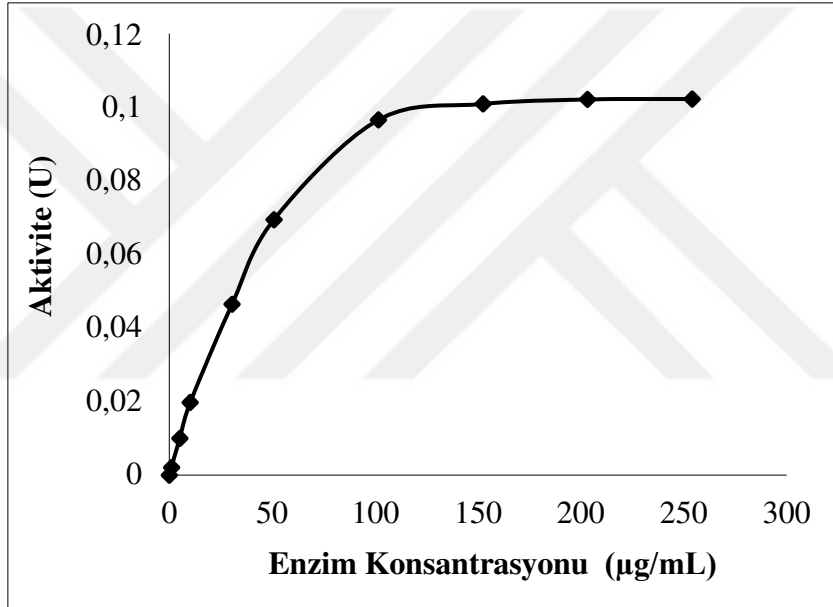
Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek amacıyla enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu ve pH sabit tutularak 20-40 °C sıcaklık aralığında aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen Sıcaklık-%Bağlı Aktivite grafiğine göre alfa amilaz için optimum sıcaklık değeri 35 °C olarak belirlendi (Şekil 25).



Şekil 25. Alfa amilaz aktivitesinin sıcaklık ile değişimi

3.3.3. Alfa Amilaz Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

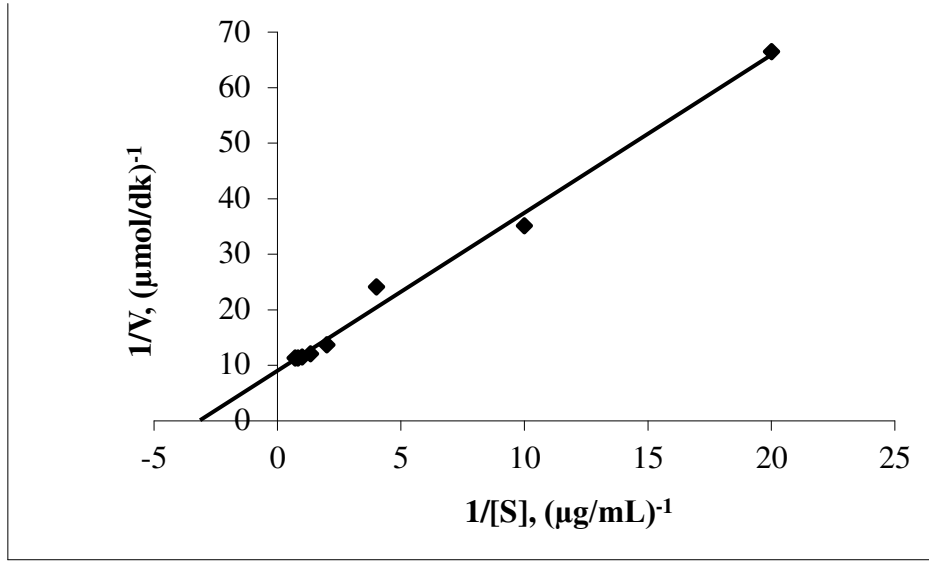
Alfa amilaz aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisini incelemek için substrat konsantrasyonu, pH ve reaksiyon sıcaklığı sabit tutularak reaksiyonkarışımındaki nihai enzim konsantrasyonu (1-250 $\mu\text{g/mL}$) olacak şekilde bir seri aktivite tayini yapıldı. Optimum pH ve sıcaklık değerlerinde protein miktarına bağlı olarak enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlarla enzim konsantrasyonuna karşı aktivite grafiği çizildi (Şekil 26). Şekil 26'daki hiperbolik eğriye bağlı olarak ilk hız ölçümleri için uygun etkin enzim konsantrasyonu 34 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi.



Şekil 26. Alfa amilaz aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi

3.3.4. Alfa Amilaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Alfa amilaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek için sabit enzim konsantrasyonu, sıcaklık ve pH değerinde ve %0,05-1,4 arasında değişen substrat (nişasta) konsantrasyonlarında reaksiyon karışımları hazırlanarak enzim aktivitesi tayin edildi. Elde edilen veriler kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 27). Bu grafikten yola çıkarak K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla, %0,32 ve 0,11 $\mu\text{mol/dk}$ olarak hesaplandı.



Şekil 27. Substrat varlığında alfa amilaz aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği

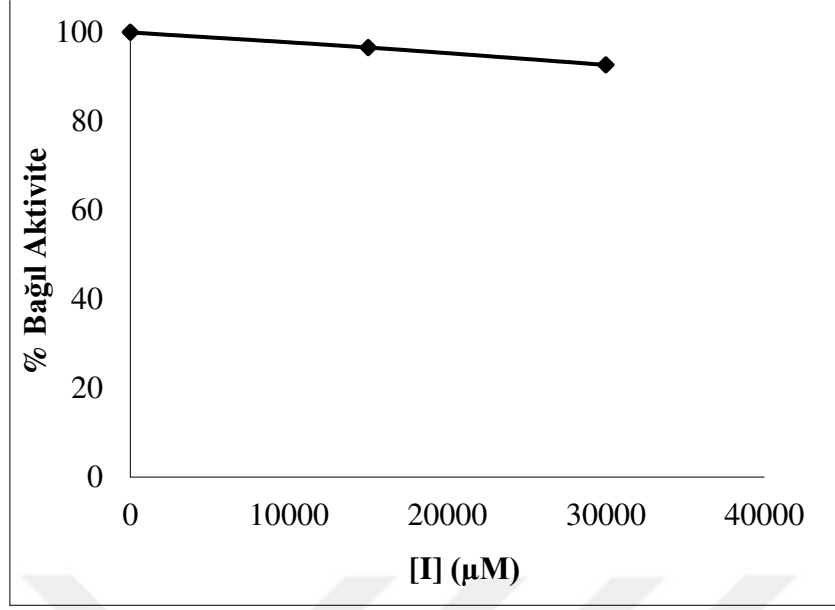
Tüm bu optimizasyon çalışmalarından elde edilen bulgular özet olarak Tablo 10’da sunulmaktadır.

Tablo 10. Alfa Amilaz Aktivitesinin Optimizasyonu

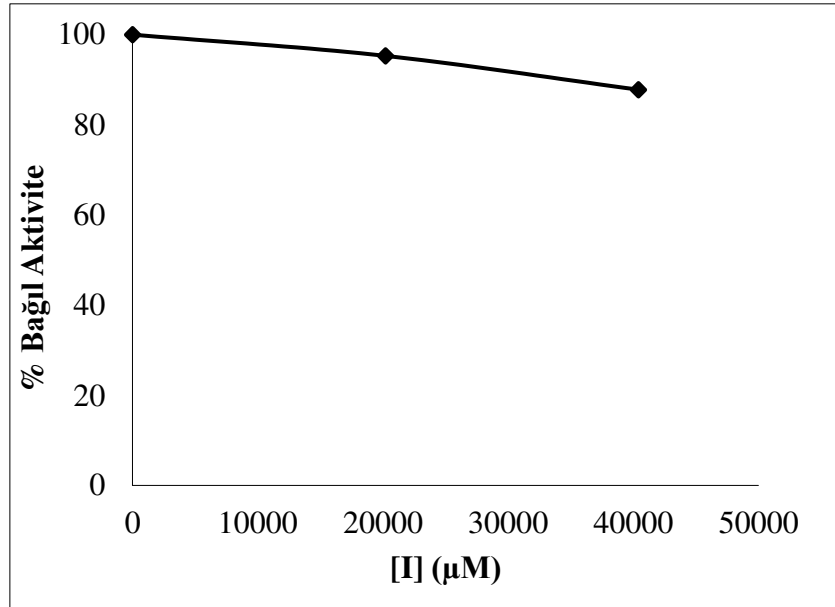
Opt. pH	Opt. sıcaklık	Enzim konsantrasyonu	K_m
7,0	35 °C	34 $\mu\text{g/mL}$	% 0,32

3.4. Alfa Amilaz İnhibisyon Çalışmaları

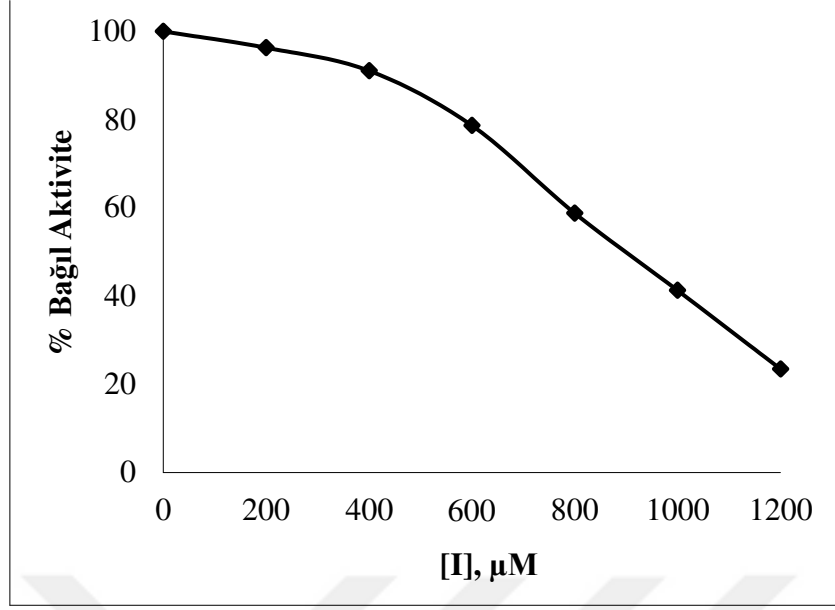
Çalışmanın bu kısmında yeni sentezlenmiş 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 numaralı inhibitör molekülleri ile çalışıldı. Çalışmada referans inhibitör molekül olarak akarboz kullanıldı ve IC_{50} değeri 6,9 μM olarak bulundu. İnhibisyon çalışmaları 2.3.6 kısmında anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen bulgulara bağlı olarak her bir organik molekül için inhibitör konsantrasyonlarına karşı %Bağıl Aktivite grafiği çizildi ve aktivitenin %50 azaldığı inhibitör konsantrasyonu IC_{50} değeri olarak belirlendi (Şekil 28-33, Tablo 11). Yapılan bu çalışmalar sonucunda sadece 3. ve 5. inhibitör molekülleri için IC_{50} değeri belirlenebildi.



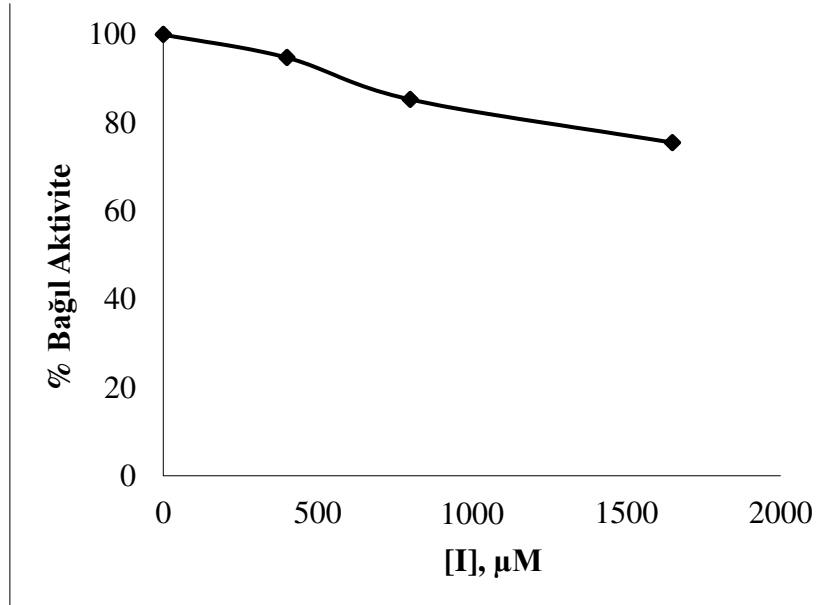
Şekil 28. 1. Molekülün alfa amilaz aktivitesi üzerine etkisi



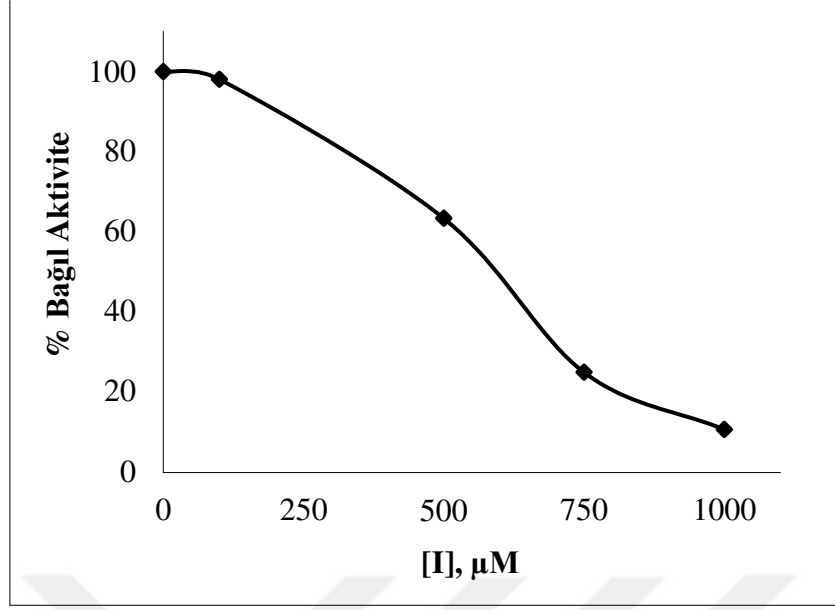
Şekil 29. 2. Molekülün alfa amilaz aktivitesi üzerine etkisi



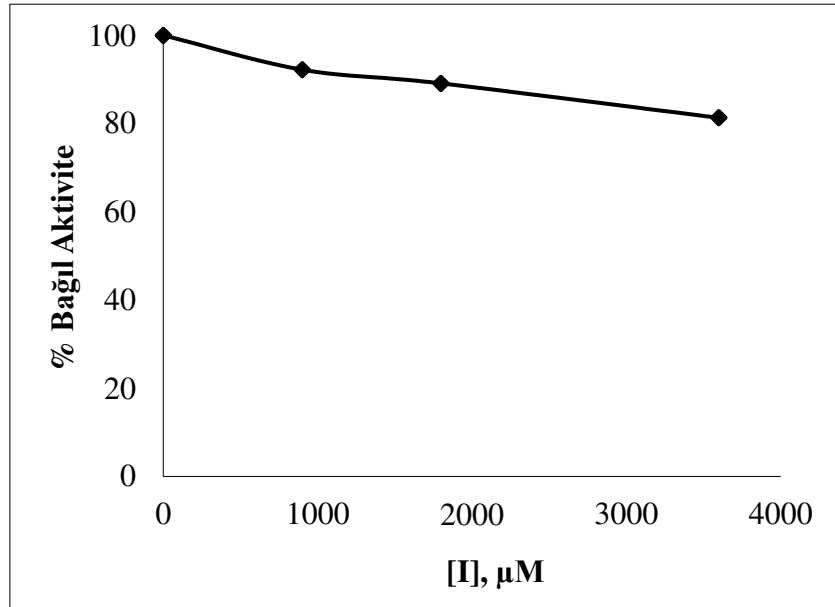
Şekil 30. 3. Molekülün alfa amilaz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 31. 4. Molekülün alfa amilaz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 32. 5. Molekülün alfa amilaz aktivitesi üzerine etkisi



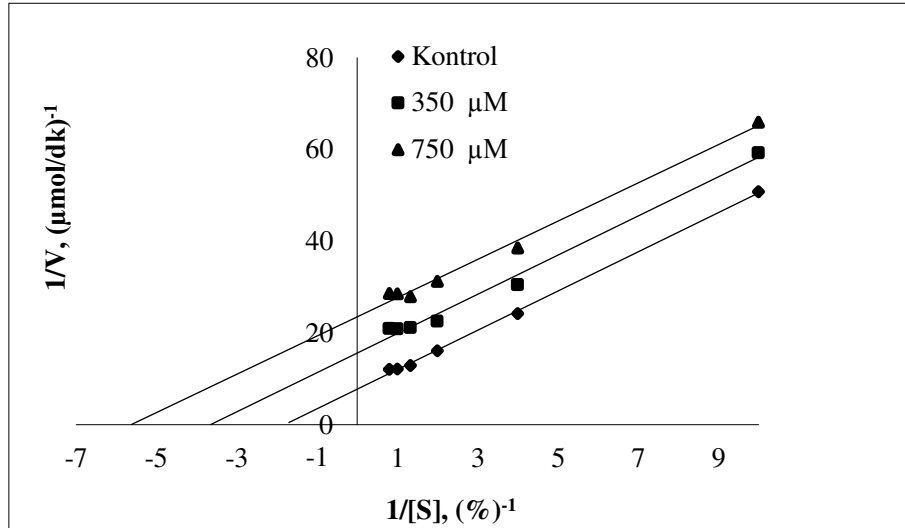
Şekil 33. 6. Molekülün alfa amilaz aktivitesi üzerine etkisi

Tablo 11. İnhibitör Moleküllerinin Alfa Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

İnhibitörler	IC ₅₀ , µM	Maksimum İnhibisyon %	[I], µM
1	>30000	7,3± 0,5	30000
2	>40400	12,2±0,9	40400
3	896,1 ± 7,7	76,5 ± 4,0	1200
4	>1650	24,5 ±1,4	1650
5	598,4 ± 3,3	90,1 ± 0,5	1000
6	>3600	18,7 ± 1,1	3600
7	T.E.	T.E.	T.E.
8	T.E.	T.E.	T.E.
Akarboz	6,9 ± 0,1	94,9 ± 0,7	50

T.E.: Tayin edilemedi.

Alfa amilaz enzimi için çalışılan inhibitör molekülleri arasında Tablo 11’de belirtildiği üzere en düşük IC₅₀ değerine sahip olan 5. molekül olarak belirlendi. En etkili inhibisyonun gözlemlendiği bu molekül için inhibisyon türünün belirlenmesi ve K_i değerinin hesaplanması bölüm 2.3.6’da belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen verilerden yola çıkarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. İnhibitör varlığında ve yokluğunda K_m ve V_{maks} değerleri belirlendi (Şekil 34, Tablo 12). Alfa amilaz enziminin 5. molekülün varlığında yarı-yarışmalı (ankompetitif) bir şekilde inhibe olduğu gözlemlenirken K_i değeri ise 355,84 µM olarak hesaplandı.



Şekil 34. 5. molekül varlığında alfa amilaz inhibisyon türünün belirlenmesi

Tablo 12. 5. molekül varlığında alfa amilaz inhibisyon türünün belirlenmesi ve K_i değeri

İnhibitör (μM)	K_m (%)	V_{maks} (μmol/dk.)	İnhibisyon türü	Ortalama K_i (μM)
Kontrol	0,55	0,13	Yarı-yarışmalı (ankompetitif)	355,84
350	0,27	0,06		
750	0,18	0,04		

3.5. İn Siliko Çalışmalar

3.5.1. ADME Çalışmaları

Moleküllerin ADME özelliklerini belirlemek adına yapılan çalışmalar bölüm 2.5.1.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Özellikleri incelenen bütün moleküllerin Lipinski'nin beş kuralına uygun olarak n-ON akseptör, nOHNH donör, MW, TPSA ve milog P özellikleri bakımından iyi birer ilaç aday molekülü potansiyeline sahip oldukları görülmektedir. Tirosinaz ve alfa amilaz inhibitörü olarak incelenen bütün moleküllerin %82,54-%97,69 aralığında değişkenlik gösteren oldukça iyi birer %Absorbsiyon (%ABS) özelliğine sahip olduğu da gözlemlendi (Tablo 13). Tüm bunlara ilave olarak yapılan *in vitro* denemelerde her bir enzim için etkili bulunan moleküllerin bu enzimlerin inhibisyonu ile gerçekleşecek bazı hastalıkların tedavi edilmesinde iyi birer ilaç aday molekül olabilme potansiyelleri, ADME çalışmasının sonuçlarıyla da desteklenmektedir.

Tablo 13. Sentezi gerçekleşmiş olan organik moleküllerin farmakokinetik zellikleri

Entry	% ABS	TPSA (Å ²)	n-ROTB	MV	MW	miLog <i>P</i>	n-ON acceptors	n-OHND donors	Nviolations
Rule	-	<140	≤10	-	≤500	≤5	<10	<5	≤1
1	97.69	32.78	5	249.04	266.32	2.29	4	0	0
2	87.75	61.60	3	230.38	252.29	-0.30	5	3	0
3	88.43	59.63	7	305.12	339.44	1.48	6	3	0
4	88.54	59.30	2	211.22	269.66	0.59	4	1	0
5	82.54	76.70	6	351.09	385.44	1.96	7	3	0
6	89.28	57.16	5	332.51	367.43	2.31	6	1	0
7	82.54	76.70	5	296.25	323.37	0.94	7	3	0
8	89.28	57.16	4	277.66	305.36	1.09	6	1	0
Akarboz	-1.80	321.16	9	544.93	645.61	-5.51	19	14	3
Kojik Asit	84.61	70.67	1	117.43	142.11	-0.89	4	2	0

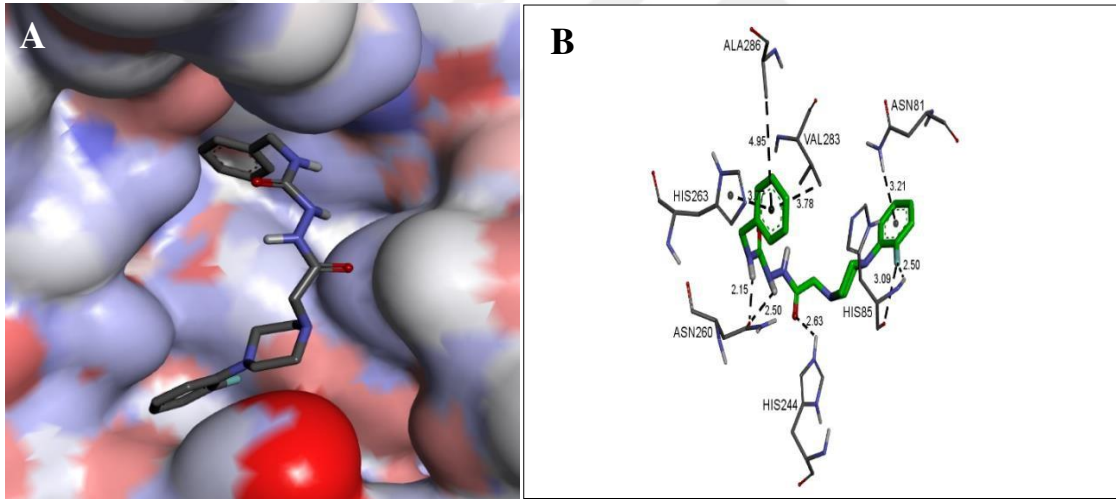
%ABS: Yüzde absorpsiyon, TPSA: Topolojik polar yüzeyi alanı, n-ROTB: dönen bağların sayısı, MV: Moleküler hacim, MW: Moleküler ağırlık, miLog: Bileşimin su ve n-oktanol arasında dağılım katsayısının logaritması, n-ON: Hidrojen bağı akseptörü sayısı, n-OHND: hidrojen bağı donörü sayısı

3.5.2. Moleküler Modelleme alışmaları

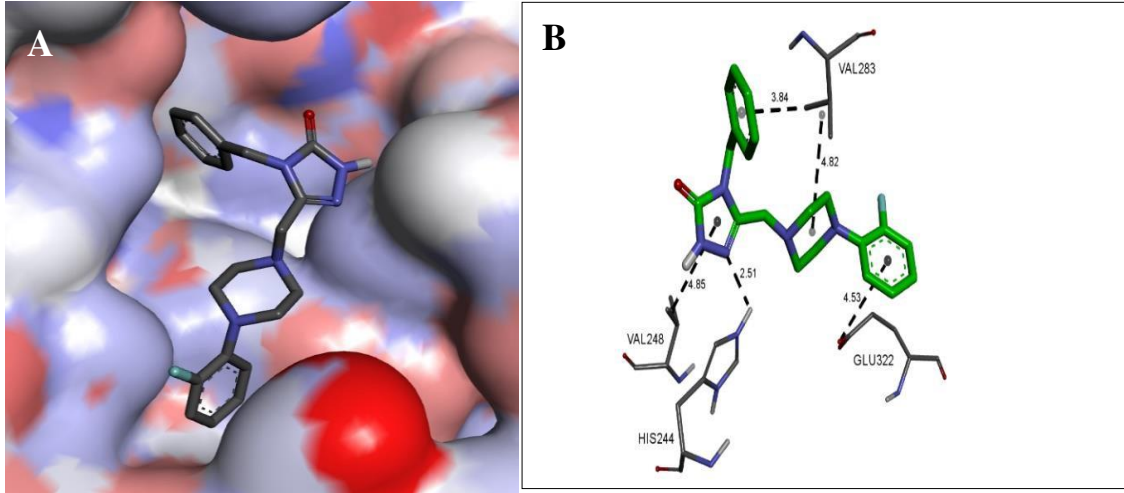
Sentezlenen tüm inhibitör molekülleri için moleküler modelleme çalışmaları bölüm 2.5.2.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Moleküler modelleme çalışmalarına başlamadan önce sentezi gerçekleştirilmiş olan inhibitör molekülleri Spartan 16 programı kullanılarak optimize edildi. Moleküler doking hesaplamaları için Scripps Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen açık lisanslı AutoDock Vina ve Autodock tools programları kullanıldı [120, 121]. İnibitr moleküllerin her bir enzimle aktif bölgede etkileştirilerek bağlanma enerjileri AutoDock Vina programı ile teorik olarak hesaplandı. Buna göre çalışılan moleküllerin tirosinaz durumunda hesaplanan bağlanma enerjileri -6.4 ile -8.6 kcal/mol aralığında iken alfa amilaz varlığında -7.3 ile -10.4 kcal/mol aralığında bulundu (Tablo 14 ve Tablo 16). Bu sonuçlara göre aktif bölgede bağlanma enerjisi en düşük olan moleküller her bir enzim durumunda inhibisyon potansiyeli açısından en etkin inhibitör molekül olarak belirlendi. Tirosinaz için en etkin inhibitör 5. molekül iken alfa amilaz için en etkin inhibitör 6. molekül olarak tespit edildi. *İn siliko* ve *in vitro* olarak potansiyel inhibitör olduğu belirlenen moleküllerin hedef enzimlerin aktif bölgelerindeki görüntüleri (şekil 35-41) ve aminoasitlerle yaptıkları etkileşimler aşağıda (Tablo 15 ve Tablo 17) sunulmaktadır.

Tablo 14. İnhibitör moleküllerinin tirosinaz enzimine bağlanma enerjileri

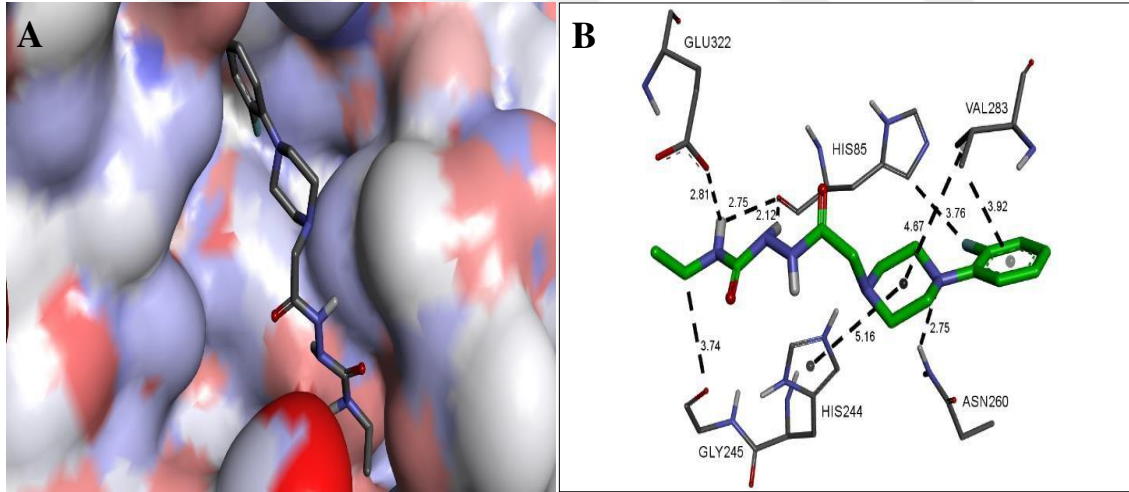
Bileşik no	ΔG kcal/mol
1	-6.4
2	-7.2
3	-7.3
4	-7.5
5	-8.6
6	-8.0
7	-7.9
8	-7.3



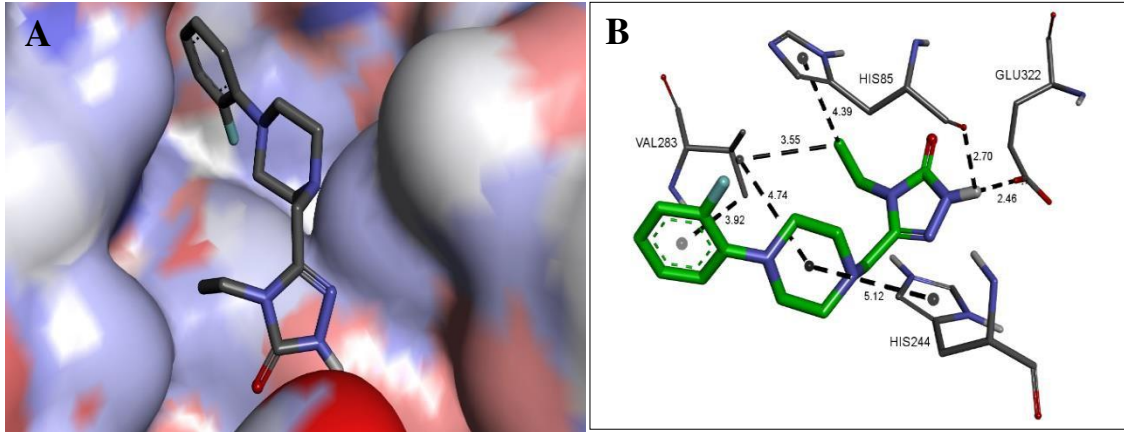
Şekil 35. 5. Molekülün tirosinaz enzimi ile etkileşimi. A) Genel görüntü B) Molekülün aktif bölgedeki mikro çevresi



Şekil 36. 6. Molekülün tirozinaz enzimi ile etkileşimi. A) Genel görüntü B) Molekülün aktif bölgedeki mikro çevresi



Şekil 37. 7. Molekülün tirozinaz enzimi ile etkileşimi. A) Genel görüntü B) Molekülün aktif bölgedeki mikro çevresi



Şekil 38. 8. Molekülün tirozinaz enzimi ile etkileşimi. A) Genel görüntü B) Molekülün aktif bölgedeki mikro çevresi

Tablo 15. 5, 6, 7 ve 8 numaralı ligandların esnek doking sonucunda enzime en düşük enerji ile bağlanan konformasyonlarının tirozinaz enzimi ile yaptığı etkileşimler

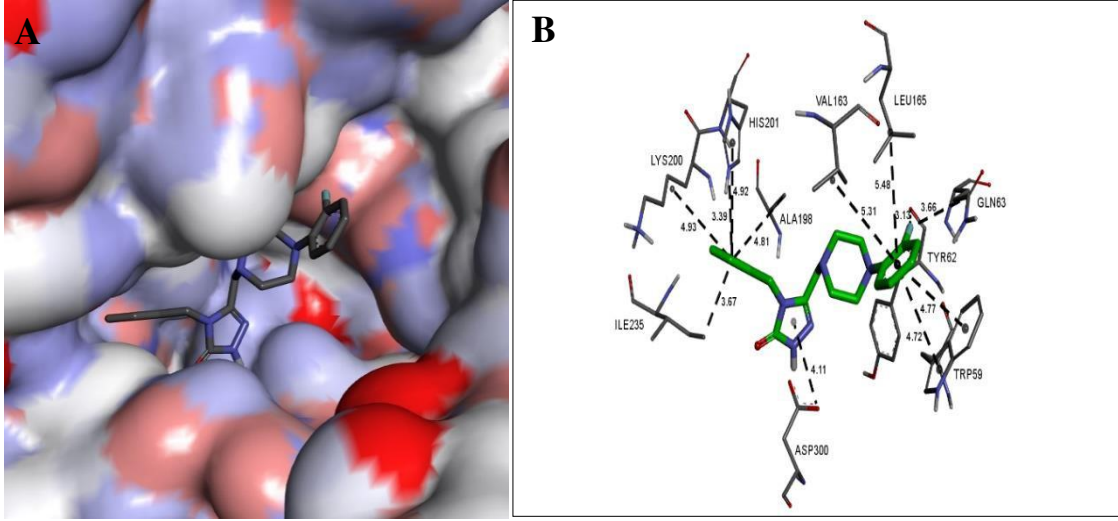
Bileşik	ΔG (kcal/mol)	Esnek Doking Etkileşimler
5	-8.6	His263...Ligand5 (π - π stacked =3.77)
		Ala286(C)...Ligand5 (π -alkil=4.95)
		Val283(C)...Ligand5 (π - σ =3.78)
		Asn260-C=O(O)...Ligand5-NH(H) (H Bağı=2.15)
		Asn260-C=O(O)...Ligand5-NH(H) (H Bağı=2.50)
		His244-NH(H)...Ligand5-C=O(O) (H bağı=2.63)
		His85-C=O(O)...Ligand5 (F) (Halojen etkileşimi=3.09)
		His85-NH(H)...Ligand5 (F) (Halojen etkileşimi=2.50)
6	-8.0	His244-NH(H)...Ligand6 (N) (H bağı=2.51)
		Val248(C)...Ligand6 (π -alkil=4.85)
		Val283(C)...Ligand6 (Alkil etkileşimi=4.82)
		Val283(C)...Ligand6 (π - σ =3.84)
		Glu322(O)...Ligand6 (π -anyon =4.53)

Tablo 15' in devamı

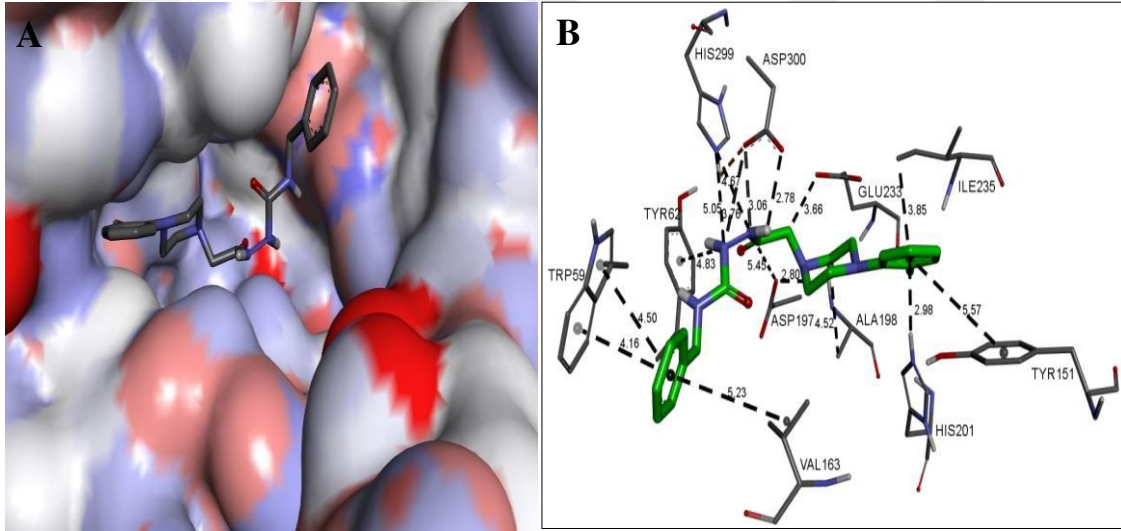
7	-7.9	Glu322(O)...Ligand7-NH(H) (H bağı=2.81)
		His85-C=O(O)...Ligand7-NH(H) (H bağı=2.75)
		His85-C=O(O)...Ligand7-NH(H) (H bağı=2.12)
		His85(C)...Ligand7 (F) (Karbon H bağı=3.76)
		Val283(C)...Ligand7 (Alkil etkileşimi=4.67)
		Val283(C)...Ligand7 (π - σ =3.92)
		Asn260-NH(H)...Ligand7 (N) (H Bağı=2.75)
		His244...Ligand7 (π -alkil=5.16)
8	-7.3	Gly245-C=O(O)...Ligand7 (C) (Karbon H bağı=3.74)
		Val283(C)...Ligand8 (Alkil etkileşimi=4.74)
		Val283(C)...Ligand8 (C) (Alkil etkileşimi=3.55)
		Val283(C)...Ligand8 (π - σ =3.92)
		His85-C=O(O)...Ligand8-NH(H) (H bağı=2.70)
		His85...Ligand8 (C) (π -alkil=4.39)
		Glu322(O)...Ligand8-NH(H) (H bağı=2.46)
		His244...Ligand8 (π -alkil=5.12)

Tablo 16. İnhibitör moleküllerinin alfa amilaz enzimine bağlanma enerjileri

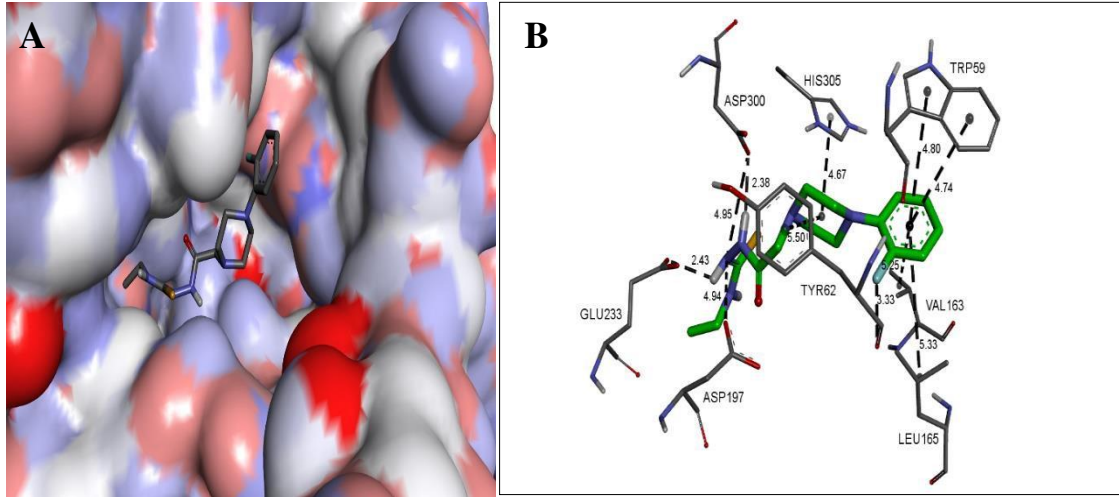
Bileşik no	ΔG kcal/mol
1	-7.3
2	-8.1
3	-8.5
4	-7.7
5	-10.0
6	-10.4
7	-9.1
8	-8.5



Şekil 39. 6. Molekülün alfa amilaz enzimi ile etkileşimi. A) Genel görüntü B) Molekülün aktif bölgedeki mikro çevresi



Şekil 40. 5. Molekülün alfa amilaz enzimi ile etkileşimi. A) Genel görüntü B) Molekülün aktif bölgedeki mikro çevresi



Şekil 41. 3. Molekülün alfa amilaz enzimi ile etkileşimi. A) Genel görüntü B) Molekülün aktif bölgedeki mikro çevresi

Tablo 17. 3, 5 ve 6 numaralı ligandların esnek doking sonucunda enzime en düşük enerji ile bağlanan konformasyonlarının alfa amilaz enzimi ile yaptığı etkileşimler

Bileşik	ΔG (kcal/mol)	Esnek Doking Etkileşimler
3	-8.5	Glu233(O)...Ligand3-NH(H) (Yük etkileşimi=2.43)
		Asp197(O)...Ligand3 (N) (Yük etkileşimi=4.94)
		Tyr62...Ligand3 (π -alkil=5.50)
		Leu165(C)...Ligand3 (π -alkil =5.33)
		Val163(C)...Ligand3 (π -alkil =5.25)
		Trp59...Ligand3 (π - π stacked=4.74)
		Trp59...Ligand3 (π - π stacked=4.80)
		His305...Ligand3 (π -alkil=4.67)
		Asp300(O)...Ligand3-NH(H) (H bağı=2.38)
		Asp300(O)...Ligand3 (N) (Yük etkileşimi=4.05)

Tablo 17' nin devamı

5	-10.0	Trp59...Ligand5 (π - π stacked=4.16)
		Trp59...Ligand5 (π - π stacked=4.50)
		Val163(C)...Ligand5 (π -alkil =5.23)
		Tyr62...Ligand5-NH(H) (π -katyon=4.83)
		Asp300(O)...Ligand5-NH(N) (Yük etkileşimi=3.06)
		Asp300(O)...Ligand5-NH(N) (Yük etkileşimi=3.76)
		Asp300(O)...Ligand5-NH(H) (Yük etkileşimi=2.78)
		His299-NH(N)...Ligand5-NH(N) (Pozitif-pozitif etkileşim=5.05)
		His299-NH(N)...Ligand5-NH(N) (Pozitif-pozitif etkileşim=4.67)
		Asp197(O)...Ligand5 (C) (Yük etkileşimi=5.45)
		Glu233(O)...Ligand5 (C) (Karbon H bağı=3.66)
		Ala198(C)...Ligand5 (π -alkil =4.52)
		His201-NH(N)...Ligand5 (π -katyon, π -donor H bağı=2.98)
		Tyr151...Ligand5 (π - π stacked=5.57)
		Ile235(C)...Ligand5 (π - σ =3.85)
6	-10.4	Ile235(C)...Ligand6 (π - σ =3.67)
		Lys200(C)...Ligand6 (π -alkil =4.93)
		His201-NH(N)...Ligand6 (π -katyon=3.99)
		His201...Ligand6 (π - π T-shaped =4.92)
		Ala198(C)...Ligand6 (π -alkil =4.81)
		Asp300(O)...Ligand6 (π -anyon=4.11)
		Val163(C)...Ligand6 (π -alkil =5.31)
		Leu165(C)...Ligand6 (π -alkil =5.48)
		Gln63(C)...Ligand6 (F) (Halojen etkileşimi=3.66)
		Tyr62-C=O(O)...Ligand6 (F) (Halojen etkileşimi=3.13)
		Trp59...Ligand6 (π - π stacked=4.72)
		Trp59...Ligand6 (π - π stacked=4.77)

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Biyolojik sistemler, küçük moleküllü terapötik ajanlar kullanarak müdahale edebileceğimiz sadece dört tip makromolekül sınıfını içerirler: proteinler, polisakkaritler, lipitler ve nükleik asitler. Polisakkaritler, lipitler ve nükleik asitlere karşı güçlü bileşiklerin elde edilememesinin yanı sıra bazı toksisite ve özgüllük çalışmalarının da olumsuz olarak sonuçlanması, kullanılmakta olan ilaçların büyük bir çoğunluğunun bir proteine bağlanarak proteinin aktivitesinde birtakım değişikliklere neden olması temeli önem kazanmaktadır. Farmasötik endüstrisi için mevcut fırsatları değerlendirmenin bir yolu, ticari olarak uygulanabilir bir ilaçta gerekli olan özellikleri incelemektir [125].

İlaç keşfi genellikle altı ana başlık altında ilaç ve hedefine odaklanır: enzimler, hücre yüzeyi reseptörleri, nükleer hormon reseptörleri, iyon kanalları, taşıyıcılar ve DNA. Bu başlıklar arasında en önemli sınıfı enzimler oluşturmaktadır. Enzimler, bir organizmanın varlığını sürdürebilmesi ve çoğalması için zorunlu olan güçlü biyolojik katalizörlerdir ve aktif bölgelerinde gerçekleşen katalitik olaylar son derece önemlidir. Enzim katalizi, bağlanma olayları, konformasyonel değişiklikler, bir veya daha fazla geçiş durumu veya reaksiyon ara maddesi ve ürün salınımı yoluyla ilerlemektedir ve bu adımların tümü tanımlanmış olan hız sabitleri ile gerçekleşmektedir. Hız sabitleri, ilaç tasarımında kullanılabilecek bir termodinamik profili tanımlamaya yardımcı olur ve bu durumda enzimleri diğer tüm sınıflardan ayıran oldukça önemli bir özelliktir. Bir enzim reaksiyonunun termodinamik profilinin en güçlü kullanımı, geçiş durumunu kinetik izotop etkileri yoluyla deşifre etmek ve bu bilgiye bağlı olarak güçlü inhibitörler tasarlamaktır [19].

Enzimler yaşam için gerekli olmakla birlikte, düzensiz enzim aktivitesi de hastalık durumlarına neden olabilir. Bazı durumlarda enzimleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar, bir hücre içinde anormal derecede yüksek enzim konsantrasyonlarına yol açabilir. Bunun yanı sıra, belirli mutasyonlar katalitik olarak kritik rol oynayan amino asitlerde meydana gelen yapısal değişiklikler nedeniyle enzimin spesifik aktivitesinin artmasına sebep olabilir. Tüm bu durumlar birtakım patolojilere yol açabilir ve bu yüzden insan enzimleri birçok hastalıkla mücadele noktasında farmakolojik müdahale için birer hedeftirler. Enzimlerin ilaç hedefi olarak çekiciliği yalnızca katalitik aktiviteye sahip olmalarından değil, aynı zamanda enzimlerin doğası gereği küçük molekül ağırlığına sahip olan ilaç benzeri moleküllerle inhibisyona yüksek derecede uygun olmalarından

kaynaklanmaktadır. Küçük molekülü ilaçlarla inhibisyona olan bu duyarlılık nedeniyle, enzimler günümüzde yeni ilaç keşfi ve tasarımı noktasında oldukça önemli bir hedeftir [3]. Enzimlerin inhibisyonu ile farmakolojik etkilerini ortaya çıkaran küçük moleküller, klinik kullanımda oral olarak verilen ilaçların neredeyse yarısını oluşturmaktadır [126]. Ayrıca enzim inhibitörü olarak değerlendirilen bu moleküllerin *in vitro* çalışmalarda IC_{50} parametreleri dikkate alınmaktadır [127]. *In vitro* olarak çalışılan moleküllerin *in vivo* çalışmalarında da etkili olabilmesi için moleküller absorbe edilmeli, dağıtılmalı, genel olarak hücre zarlarının moleküler hedeflerine ulaşmasına izin verilmeli ve belli bir süre sistemik dolaşımda tutulmalıdır [3].

Heterosiklik bileşikler doğada bol miktarda mevcuttur ve yaşam için büyük bir öneme sahiptirler. Çünkü bu bileşiklerin yapısal alt birimleri hormonlar, antibiyotikler, vitaminler gibi birçok doğal ürünün yanı sıra herbisitlerde, boyalarda ve farmasötik bileşiklerde bulunmaktadır [128]. Bu bileşikler, yapılarındaki heteroatomların vücutta bulunan reseptörler ile hidrojen bağları oluşturmaları ve böylelikle önemli derecede farmakolojik etkiler yaratmaları nedeniyle ilaç endüstrisinde önemli bir araştırma alanı hale gelmişlerdir. Özellikle yapılarında azot, kükürt ve oksijen atomlarını bulunduran bileşikler en güçlü biyolojik aktiviteleri göstermişlerdir [128, 129]. Bu bileşikler sahip oldukları heteroatomlarının halkanın içindeki konumuna bağlı olarak 1,2,4-triazol, 1,3,4-tiyadiazol ve 1,3,4-oksadiazol gibi izomerlerine sahiptirler. Günümüzde kullanılmakta olan birçok ilaçta 1,2,4-triazol ve 1,3,4-oksadiazol izomerleri bulunmaktadır [129, 130]. Literatür incelendiğinde bu izomer türlerinin başta anti-kanser olmak üzere anti-mikrobiyal, anti-inflamatuvar, analjezik, anti-tümör, anti-HIV, anti-bakteriyel, anti-depresan, anti-malaryal ve antihipertansif gibi oldukça geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahip oldukları belirtilmiştir [131, 145].

Antibiyotikler, 1928’lerde başlayan serüvenleri ile bazı ilaç sınıflarını oluşturduğu ve çok sayıda eşdeğerlerinin mevcut olduğu uzun bir geçmişe sahiptirler. Antibakteriyal, antimikrobiyal ve gram-pozitif ile gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu bir aktiviteye sahip olan florokinolonlar antibiyotik ticaretinde, anti-enfektif kemoterapi alanında ve *in vivo* kemoterapötik etkinlikleri nedeniyle büyük ilgi gören bileşiklerdir [146, 147]. Bunun yanı sıra florokinolonlar ideal bir antibiyotikte olması gereken iyi bir biyoyararlanıma, oral ve intravenöz formülasyonlara ve düşük yan etki seviyesi gibi özelliklerin çoğuna sahiptirler [148].

Literatüre bakıldığında bakterilerin antibiyotiklere karşı zamanla direnç kazandığı ilginç bir gerçek olarak fark edilmiştir [149-151]. Direnç gelişimi ile mücadele edebilmek için birtakım yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bunlardan biri, iki farklı farmakofor grubu bir molekülde birleştirerek hibrit moleküllerinin sentezlenmesini sağlamaktır. Buna göre, her ilaç bileşeninin bağımsız olarak iki ayrı biyolojik hedefe odaklanması ve her iki hedef bölgede de eş zamanlı olarak bir birikimin gözlenmesi hedeflenmektedir [147]. Böylece hibrit bileşiklerinin daha geniş etki spektrumu, direnç gelişimine karşı yavaş eğilim ve etkin dozun azalması gibi avantajlara sahip oldukları kabul edilmektedir [152]. Son yıllarda piperazin ve triazol yapısı içeren hibrit bileşiklerinin sentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir [39, 40, 41, 42, 153-157].

Tüm bu bilgiler doğrultusunda bu çalışmada piperazin, florokinolon ve triazol yapısı içeren yeni organik moleküller; küçük molekül ağırlığına sahip, hidrojen bağı yapabilen, heteroatomlar içeren ve farmakofor grupları bulunduran organik bileşiklerdir. Sentezi gerçekleştirilmiş olan organik bileşiklerin biyokimyasal inhibisyon profilleri, klinik öneme sahip olan alfa amilaz ve tirozinaz enzimleri açısından değerlendirilmiş ve IC_{50} değerleri tespit edilmiştir. En etkili bulunan inhibitör moleküllerinin iki enzim için de inhibisyon türü ve K_i değerleri belirlenmiş ve moleküler modelleme çalışmalarıyla birlikte bu hibrit bileşiklerinin inhibisyon potansiyelleri teorik olarak da ele alınmıştır. Ayrıca bu moleküllerin ilaç olma potansiyelleri ADME özellikleri incelenerek *in silico* bir yöntemle ortaya konulmuştur.

Enzimlerdeki doğal ligand bağlanma bölgelerinin yapısı ve kimyası ilaç benzeri olan moleküller ile etkileşimleri açısından oldukça uygundur, bu da enzim aktivitesini özellikle ilaçların modülasyonuna karşı savunmasız hale getirir [127]. Bir inhibitör molekülünün enzimin aktif bölgesine bağlanması, aktif bölgede bir takım konformasyonel değişimlere neden olur ve bunun sonucunda da daha sıkı bir bağlanma işlemi gerçekleşmiş olur [3, 126, 158, 159]. Keza, farmakolojik aktivite açısından bakıldığında bir ilacın etkisini tam olarak gösterebilmesi için moleküler hedefine makul derecede bir kuvvetle bağlanması gerektiği bilinmektedir [125].

Çalışmada kullanılan organik moleküller katı halde bulundukları için reaksiyon ortamına eklenmeden önce organik bir çözücü olan DMSO ile çözelti haline getirildiler. Literatürde de belirtildiği üzere enzimler organik çözücüler varlığında inhibe olabilmektedir [3]. İnhibisyon çalışmalarını gerçekleştirirken de organik çözücünün reaksiyon karışımındaki konsantrasyonu (%v/v) inhibitör moleküllerinin etkinliklerine etkisi

bakımından dikkate alındı ve organik çözücülerden kaynaklanan olumsuz durumları tespit edebilmek adına kontrol çözeltileri hazırlandı [80]. DMSO'nun reaksiyon karışımındaki nihai konsantrasyonu %3'ü geçmeyecek şekilde ayarlandı. Literatüre bakıldığında biyokimyasal olarak gerçekleştirilen enzim inhibisyonu çalışmalarında organik çözücülerin konsantrasyonlarının %3'ün altında kullanılması gerektiği belirtilmiştir [112].

İnhibisyon çalışmalarında karşılaşılabilecek bir başka olumsuzluk da inhibitör bileşiklerin belirli bir organik çözücüde uygun bir konsantrasyonda çözeltileri hazırlansa bile reaksiyon karışımının tampon çözelti ihtiva eden sulu bir ortam olması sebebiyle zaman zaman reaksiyon karışımında çökmenin gözlemlenmesidir. Bundan dolayı da tirosinaz ve alfa amilaz enzimleri için yapılan inhibisyon çalışmalarında her bir organik molekül için denenen konsantrasyon aralığı farklı olmakla birlikte tek bir konsantrasyon aralığına bağlı kalınmamıştır (Şekil 15-22 ve Şekil 28-33).

Tirosinaz inhibisyon çalışmaları için literatür ile uyumlu olacak şekilde kojik asit referans inhibitör molekül olarak kullanıldı [160-163]. Çalışılan inhibitör molekülleri arasında 7. ve 8. moleküller için IC_{50} değeri tespit edildi (Tablo 8). Tablo 8'de belirtilen diğer moleküller için reaksiyon karışımlarında ulaşılabilen maksimum konsantrasyon değerlerinden daha yüksek konsantrasyon değerlerine inhibitör moleküllerinin çözünürlük problemlerinden dolayı çıkılamadı ve IC_{50} değerleri bu moleküller için belirlenemedi. IC_{50} değeri tespit edilen inhibitör moleküllerinden en düşük değere sahip olan 7. molekül için inhibisyon türünü belirleme çalışmaları yapıldı. Bu molekülün farklı konsantrasyonlarında reaksiyon karışımındaki varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda elde edilen K_m ve V_{maks} değerleri karşılaştırılarak yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon türüne sahip olduğu sonucuna varıldı. Ardından matematiksel olarak K_i değeri hesaplandı ve 477,86 μM olarak bulundu.

Akın vd. (2019) 2,4,5-trisüstitüe-1,2,4-triazol-3-on türevi ile yapmış oldukları tirosinaz inhibisyonu çalışmalarında 6 farklı molekül kullanmış olduklarını, bunların dördü için IC_{50} değerinin belirlenememiş olduğunu, en yüksek ve en düşük IC_{50} değerinin ise sırasıyla 25000 μM (25 mM) ve 5000 μM (5 mM) olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca en düşük IC_{50} değerine sahip olan molekül için tirosinaz inhibisyon mekanizmasını ortaya koymaya çalışmışlar ve bu molekül için inhibisyon türünü yarı-yarışmalı ve K_i değerini de 1710 μM (1.71 mM) olarak belirlemişlerdir [112]. Bir başka çalışmada Shao vd. (2018) hidroksipiridin türevi olan 6 farklı molekülün tirosinaz inhibisyonu için IC_{50} değerlerini en yüksek 22.87 μM ve en düşük 1.60 μM bulmuşlardır. Bundan sonra, en düşük IC_{50}

değerlerine sahip olan iki molekül için inhibisyon türünü karışık inhibisyon olarak belirtmişler ve K_i değerlerini 24.84 μM ile 18.07 μM olarak hesaplamışlardır [164]. Bu sonuçlara dayanarak, 7. molekül için inhibisyon potansiyeli, IC_{50} değerleri baz alındığında Akın vd. (2019)'nin çalışmış olduğu moleküllere kıyasla daha etkili fakat Shao vd. (2018)'ne kıyasla ise daha zayıf olduğu söylenebilir. Demir vd. (2018) 1,2,4 triazol türevleri ile yapmış oldukları tirozinaz inhibisyonu çalışmalarında 6 farklı molekül kullanmış olduklarını, bunların dördü için IC_{50} değerinin belirlenememiş olduğunu, en yüksek ve en düşük IC_{50} değerinin ise sırasıyla 580 μM ve 400 μM olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca en düşük IC_{50} değerine sahip olan triazol türevi molekül için tirozinaz inhibisyon mekanizmasını ortaya koymaya çalışmışlar ve bu molekül için inhibisyon türünü yarı-yarışmalı ve K_i değerini ise 370.7 μM olarak belirlemişlerdir [165]. Gawande vd. (2013)'nin pirazol ve tiazolidinon yapıları yeni heterosiklik hibrit bileşikler ile yapmış oldukları çalışmada ise en yüksek ve en düşük IC_{50} değerleri sırasıyla 194.02 μM ve 34.12 μM olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada birden fazla molekül için inhibisyon türünü belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmış, yarışmalı inhibisyon türüne sahip oldukları belirlenmiş ve K_i değerlerinin ise 29.08 μM -5.70 μM aralığında olduğu belirtilmiştir [166]. Buna ilave olarak, Channar vd. (2017) tarafından metil [2- (4-dimetilamino-benziliden)-hidrazono)-4-okso-tiyazolidin-5-iliden]asetat türevi 10 bileşik sentezlenmiş ve bu bileşiklerle gerçekleştirdikleri inhibisyon çalışmalarında IC_{50} değerlerinin 3.17-348.93 μM arasında değiştiği gözlenmiştir. Ardından en düşük IC_{50} değerine sahip molekül için inhibisyon türü yarışmasız olarak belirlenmiş ve K_i değeri 1.5 μM olarak hesaplanmıştır [167]. Yine başka bir çalışma olan Gheibi vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada ise benzoik asit ve piridin türevleri tirozinaz inhibisyonu açısından ele alınmış ve 3,54 mM-3,8 μM arasında değişen IC_{50} değerleri tespit edilmiştir [168].

Alfa amilaz inhibisyon çalışmaları için literatür ile uyumlu olacak şekilde referans inhibitör molekülü olarak akarboz kullanıldı [169-173]. Çalışılan inhibitör molekülleri arasında sadece 3. ve 5. molekül için IC_{50} değerleri belirlenebilmiştir (Tablo 11). Bu iki molekülden en düşük IC_{50} değerine sahip olan 5. molekül için inhibisyon türünü belirlemeye yönelik çalışmalar yapıldı. Bu molekülün farklı konsantrasyonlarında reaksiyon karışımındaki varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda elde edilen K_m ve V_{maks} değerleri karşılaştırılarak, inhibitörün aktif bölgede değil de aktif bölgenin dışında bir yerde yalnızca enzim-substrat kompleksine dönüşümlü olacak şekilde bağlanarak yarı-yarışmalı (ankompetitif) inhibisyon türüne sahip olduğu sonucuna varıldı. Ardından matematiksel olarak K_i değeri hesaplandı ve 355,84 μM olarak bulundu.

Martinez-Gonzalez vd. (2019)'nin çeşitli flavonoid bileşikleriyle yapmış oldukları pankreatik alfa amilaz inhibisyonu çalışmasında karışık inhibisyon gözlemlenmiş olup K_i değeri 1.89 mM olarak hesaplanmıştır [174]. Alqahtani ve arkadaşlarının (2019) *Nuxia oppositifolia*'dan izole ettikleri 3-oksolupenal ve katononik asidin alfa amilaz ve alfa glukozidaz üzerine inhibisyon etkilerinin incelendiği çalışmada bu iki bileşiğin IC_{50} değerlerinin sırasıyla 105.3-115.2 μ M ve 141.8-194.8 μ M olduğunu belirtmişlerdir [175]. Taha ve arkadaşları (2018) tarafından sentezlenen 18 adet indol türevi bileşiğin alfa amilaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi incelenmiş ve çalışmalarında enzimin etkinliğini %50 azaltan inhibitör konsantrasyonunun 2.03-2.63 μ M aralığında değiştiği tespit edilmiştir [113]. Cardullo ve arkadaşları (2019) anti diyabetik özelliklere sahip olan C-glukosidik ellagitanninler ve galloilleşmiş glukozlar ile alfa amilaz ve alfa glukozidaz enzimleri kullanarak yapmış oldukları inhibisyon çalışmalarında IC_{50} değerlerini sırasıyla 17.2-412.3 μ M ve 1.2-14.4 μ M olarak belirtmişlerdir. Bundan sonra alfa glukozidaz için inhibisyon türünü belirlemeye yönelik çalışmalar yapmışlar ve en etkili moleküller için inhibisyon türünün karışık inhibisyon olduğunu, K_i değerlerinin 0.52 μ M-2.32 μ M aralığında değiştiğini gözlemlemişlerdir [176]. Adegbeye vd. (2018) tarafından sentezlenen 2-Aril benzimidazol türevi 45 adet bileşik ile moleküllerin alfa amilaz inhibisyon etkinliği incelenen çalışmada, bileşiklerin IC_{50} değerlerinin 1.48-2.99 μ M aralığında bulunduğu belirtilmiştir [177]. Channar vd. (2017)'nin sentezlemiş oldukları 2,6-di(sübstitüye fenil)tiazolo [3,2-b]-1,2,4-triazol türevi moleküller ile yapmış oldukları alfa amilaz inhibisyonu çalışmalarında enzimin etkinliğini %50 azaltan molekül konsantrasyonu değerlerinin 1.1-9.6 μ M aralığında olduğunu belirtmişlerdir [178]. Yine bir başka çalışmada Taha ve arkadaşları (2019) tiazol esaslı karbohidrazid türevi 25 adet molekül ile alfa amilaz inhibisyonunun etkinliğini incelemişler ve IC_{50} değerlerinin 1.70-3.05 μ M aralığında değiştiğini gözlemlemişlerdir [179]. Ancak literatüre bakıldığında sunulan çalışmada kullanılan triazol ve piperazin yapısına sahip hibrit bileşiklerinin alfa amilaz ve tirozinaz aktivitesi üzerine yapılan çalışmalara neredeyse hiç rastlanmamıştır. Bu durumun, çalışmamızı özgün ve elde etmiş olduğumuz sonuçları değerli kıldığı düşünülmektedir.

Tirosinaz ve alfa amilaz için *in vitro* olarak yapılan enzim inhibisyonu çalışmalarının yanında sentezlenen ve bu çalışmada kullanılan moleküllerin her bir enzim için inhibisyon potansiyelleri *in siliko* olarak moleküler modelleme çalışmalarıyla desteklendi. Moleküler modelleme çalışmalarında inhibitör moleküllerinin enzimlerin aktif bölgelerine bağlanma enerjileri hesaplandı. Bağlanma enerjisi en düşük olan molekülün enzimin aktif bölgesine

bir takım zayıf etkileşimlerle daha güçlü bir şekilde bağlandığı ve böylece enzimin daha etkili bir şekilde inhibisyonuna neden olduğu bilinmektedir. Buna göre, tirosinaz durumunda en yüksek etkinliğe sahip olan moleküllerin sırasıyla 5., 6. ve 7. molekül (Tablo 14), alfa amilaz varlığında ise sırasıyla 6., 5. ve 7. molekülün olduğu tespit edildi (Tablo 16). Bu durum çalışmada kullanılan moleküller içerisinde bahsi geçen moleküllerin her iki enzim durumunda da etkili inhibitör moleküller olduğunu ve ayrıca *in vitro* biyokimyasal kinetik çalışmaların sonuçlarının çok büyük oranda *in siliko* çalışmaların sonuçlarıyla uyum içerisinde olduğunu göstermektedir. *In vitro* olarak çalışılan inhibitör molekülleri arasında tirosinaz için en düşük IC_{50} değerine sahip olan 7. molekülün inhibisyon türü yarışmasız olarak belirlendi. Bu sonuçtan da anlaşılabileceği üzere inhibitör molekülü enzime aktif bölgede değil de aktif bölgenin dışında bir yerde dönüşümlü olacak şekilde bağlanmaktadır. Fakat tirosinaz için yapılan moleküler modelleme çalışmalarında ise 7. molekülün en yüksek etkinliğe sahip olan üç molekül arasında (ΔG değerleri arasında büyük farklılıklar olmamakla birlikte) üçüncü sırada yer aldığı gözlemlendi. Bu durum, moleküler modelleme çalışmalarında inhibitör molekülünün hedef enzimin aktif bölgesinde yaptığı etkileşimlerin incelenmesi ve bu bölge için bağlanma enerjisinin hesaplanmasına atfedilebilir. Dolayısıyla *in vitro* çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular ile *in siliko* çalışmalar sonucu elde edilen bulguların farklılıklar göstermesi çalışmaların tabiatı gereğidir. Benzer yorumlar ve yaklaşımlar alfa amilaz enzimi için de yapılabilir.

In siliko olarak gerçekleştirilen bir diğer çalışma ise moleküllerin Lipinski'nin beş kuralına uygun olarak ADME özelliklerinin belirlenmesidir. Her bir inhibitör molekülü için gerçekleştirilmiş olan ADME çalışmalarında moleküllerin ilaç adayı olabilme potansiyelleri incelendi (Tablo 13). Lipinski'nin beş kuralına göre yeni tasarlanmış moleküllerin oral emilimi için, molekül ağırlığı (MW) ≤ 500 dalton, oktanol su dağılım katsayısı ($miLogP$) ≤ 5 , hidrojen bağı donör sayısı ($n-OH/NH$) ≤ 5 -hidrojen bağı alıcılarının sayısı ($n-ON$) ≤ 10 , dönebilir bağ sayısı ($n-ROTB$) ≤ 10 ve topolojik polar yüzey alanı ($TPSA$) $\leq 140 \text{ \AA}^2$ olmalıdır. Eğer inhibitör molekülünün ağırlığı 500 g/mol 'den küçük ise kolay difüzyon ve emilime sahip olduğunu, oktanol-su dağılım katsayısı 5'ten küçük ise iyi bir membran geçirgenliği gösterdiğini ve topolojik polar yüzey alanı $140 \text{ \AA}^2$ 'tan küçük ise molekülün taşınmasının daha kolay bir şekilde gerçekleştiği hakkında bilgi vermektedir [180]. İnhibitör molekülleri %ABS oranı açısından ele alındığında %82.54-%97.69 arasında değişmekte olan bir emilim sergilemektedir ve bu da anlamlı bir oral biyoyararlanım özelliğine sahip olduklarını

göstermektedir. Buna göre, bu çalışmada kullanılan sekiz adet inhibitör molekülünün belirtilen başlıklar altında incelendiğinde iyi birer ilaç adayı olabilecekleri gözlemlendi.

Sonuç olarak, *in vitro* ve *in silico* olarak gerçekleştirilen tüm çalışmaların bulguları dikkate alındığında 7. ve 5. molekülün sırasıyla tirozinaz ve alfa amilazın inhibisyonuna yönelik potansiyel birer inhibitör olarak değerlendirilebilecekleri ve bu enzimlerin inhibisyonu ile hastalık halinin ortadan kaldırılabilirliği etkili birer ilaç adayı molekülleri olabilecekleri söylenebilir. Şüphesiz ki bu ihtimali güçlendirmek, daha ileri düzeyde birtakım çalışmaların yapılmasını gerekli kılmaktadır.



5. ÖNERİLER

Yapılan deneysel ve teorik çalışmaların ardından elde edilen bulgular neticesinde varılan sonuçlar değerlendirildiğinde aşağıda sunulan önerilerin ileri bir çalışma olarak dikkate alınabileceği söylenebilir.

1. Enzimlerin aktif bölge yapıları ve topolojileri dikkate alınarak uygun konumda, uygun substitüye gruplar içeren piperazin-triazol yapısı içeren farklı yeni hibrit moleküller tasarlanabilir, sentezlenebilir ve bu moleküllerin inhibisyon profilleri incelenebilir.
2. Organik molekülleri, *in siliko* olarak, enzimlerle aktif bölge dışında farklı bölgelere bağlanmak üzere etkileştirip eşlik eden bağlanma enerjilerinin belirlenmesi yoluna gidilebilir.
3. Organik moleküllerin suda çözünür formları (tuzları) sentezlenerek deneysel çalışmalarda moleküllerin çözünürlük problemlerinden kaynaklanan olumsuzluklar bertaraf edilebilir ve inhibisyon profilleri yeniden ele alınabilir.
4. Elde edilen verilerin gerek *in vitro* hücre kültürü çalışmaları gerekse *in vivo* deneysel hayvan çalışmaları ile desteklenmesi durumunda inhibitörlerin klinik kullanımlarının gündeme gelebileceği öngörülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Ferrier, D.R., Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, R.A. Harvey editor, 6, 1108, 2014.
2. Gurung, N., Ray, S., Bose, S. ve Rai, V., A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, Medicine, and Beyond, Biomed Research International, (2013) 329121.
3. Copeland, R.A., Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery, New Jersey, 2005.
4. Lee, I. ve Berdis, A.J., Enzymes and Their Inhibition: Drug Development, Smith, H. J. ve Simons, C., New York: CRC Press, 2005.
5. Holdgate, G.A., Meek, T.D. ve Grimley, R.L., Mechanistic enzymology in drug discovery: a fresh perspective, Nature Reviews Drug Discovery, 17,2 (2018) 115-132.
6. Smith, H.J. ve Simons, C., Enzymes and Their Inhibition: Drug Development, New York: CRC Press, 2005.
7. Ajay, A., Walters, W.P. ve Murcko, M. A., Can we learn to distinguish between "drug-like" and "nondrug-like" molecules?, Journal of Medicinal Chemistry, 41,18 (1998) 3314-3324.
8. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. ve Feeney, P., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, Advanced Drug Delivery Reviews, 46,1-3 (2001) 3-26.
9. Veber, D.F., Johnsan, S.R., Cheng H.Y., Smith, B.R., Ward, K.W. ve Kopple, K.D., Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, Journal of Medicinal Chemistry, 45,12 (2002) 2615-2623.
10. Westley, A.M. ve Westley, J., Enzyme inhibition in open systems-Superiority of uncompetitive agents, Journal of Biological Chemistry, 271,10 (1996) 5347-5352.
11. Chiasson, J.L., Josse, R.G., Hunt, J.A., Palmason, C., Rodger, N.W., Ross, S.A., Ryan, E.A., Tan, M.H. ve Wolever, T.M., The efficacy of acarbose in the treatment of patients with noninsulin dependent diabetes mellitus. A multicenter controlled clinical trial, Annals of Internal Medicine, 121, 12 (1994) 928-935.
12. Scott, L.J. ve Spencer, C.M., Miglitol: a review of its therapeutic potential in type 2 diabetes mellitus, Drugs, 59,3 (2000) 529-541.
13. Krentz, A.J. ve Bailey, C.J., Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus, Drugs, 65,3 (2005) 385-411.

14. Williams, L.K., Li, C., Withers, S.G. ve Brayer, G.D., Order and disorder: differential structural impacts of myricetin and ethyl caffeate on human amylase, an antidiabetic target, Journal of Medicinal Chemistry, 55,22 (2012) 10177-10186.
15. Lu, C. ve Li, A.P., *Enzyme Inhibition In Drug Discovery And Development*, New Jersey, 2010.
16. Sharma, R., *Enzyme Inhibition And Bioapplications*, Smiljanic, T., Croatia, 2012.
17. Copeland, R.A., *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, Second Edition, New York, 2000.
18. Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. ve Mehta, P.K., Microbial enzymes: industrial progress in 21st century, 3 Biotech, 6,2 (2016) 174.
19. Robertson, J.G., Mechanistic Basis of Enzyme-Targeted Drugs, Biochemistry, 44,15 (2005) 5561-5571.
20. Petersen, E.N., The pharmacology and toxicology of disulfiram and its metabolites, Acta Psychiatrica Scandinavica, 86 (1992) 7-13.
21. Achari, A., Somers, D.O., Champness, J.N., Bryant, P.K., Rosemond, J. ve Stammers, D.K., Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase, Nature Structural Biology, 4,6 (1997) 490-497.
22. Sugimoto, H., Ogura, H., Arai, Y., Iimura, Y. ve Yamanishi, Y., Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor, Japanese Journal of Pharmacology, 89,1 (2002) 7-20.
23. Supuran, C.T., Carbonic anhydrase inhibitors in the treatment and prophylaxis of obesity, Expert Opinion on Therapeutic Patents, 13,10 (2003) 1545-1550.
24. Kaneda, T., Takeuchi, Y., Matsui, H., Shimizu, K., Urakawa, N. ve Nakajyo, S., Inhibitory mechanism of papaverine on carbachol-induced contraction in bovine trachea, Journal of Pharmacological Sciences, 98,3 (2005) 275-282.
25. Al-Ghorbani, M., Zabiulla, B.B.A., Mamatha, S.V. ve Khanum, S.A., Piperazine and morpholine: Synthetic preview and pharmaceutical applications, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 7,5 (2015) 281-301.
26. Halimehjani, A.Z. ve Badali, E., DABCO bond cleavage for the synthesis of piperazine derivatives, Royal Society of Chemistry, 9,62 (2019) 36386.
27. Zhang, J., Wang, S., Ba, Y. ve Xu, Z., 1,2,4-Triazole-quinoline/quinolone hybrids as potential anti-bacterial agents, European Journal of Medicinal Chemistry, 174 (2019) 1-8.

28. Walayat, K., Mohsin, N., Aslam, S. ve Ahmad, M., An insight into the therapeutic potential of piperazine-based anticancer agents, Turkish Journal of Chemistry, 43 (2019) 1-23.
29. Aggarwal, R. ve Sumran, G., An insight on medicinal attributes of 1,2,4-triazoles, European Journal of Medicinal Chemistry, 205 (2020) 112652.
30. Feng, L., Zheng, M., Zhao, F. ve Liu, D., 1,2,3- Triazole hybrids with anti- HIV- 1 activity, Arch Pharm, 353,9 (2020) 00163.
31. Rani, A., Singh, R., Singh, A., Maqbool, U., Kaur, G. ve Singh, J., CuAAC-ensembled 1,2,3-triazole-linked isosteres as pharmacophores in drug discovery: review, Royal Society of Chemistry, 10 (2020) 5610-5635.
32. Sumrra, S.H., Habiba, U., Zafar, W., Imran, M. ve Chohan, Z.H., A review on the efficacy and medicinal applications of metal-based triazole derivatives, Journal of Coordination Chemistry, 73,8 (2020) 1-40.
33. Rath, A.K., Syed, R., Shin, H. ve Patel, R.V., Piperazine derivatives for therapeutic use: a patent review (2010-present), Expert Opinion on Therapeutic Patents, 26,7 (2016) 777-797.
34. Dai, M., Ye, Z. ve Gettys, K.E., Recent Advances in Piperazine Synthesis, Synthesis, 49,12 (2017) 2589-2604.
35. Andersson, M.I. ve MacGowan, A.P., Development of the quinolones, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51,1 (2003) 1-11.
36. Pitman, S.K., Hoang, U.T.P., Wi, C.H., Alsheikh, M., Hiner, D.A. ve Percival, K.M., Revisiting Oral Fluoroquinolone and Multivalent Cation Drug-Drug Interactions: Are They Still Relevant?, Antibiotics, 8,3 (2019) 108.
37. El-Sebaey, S.A., Recent Advances in 1,2,4-Triazole Scaffolds as Antiviral Agents, ChemistrySelect, 5,37 (2020) 11654-11680.
38. Bekhit, A.A., El-Sayed, O.A., Aboulmagd, E. ve Park, J.Y., Tetrazolo[1,5-a]quinoline as a potential promising new scaffold for the synthesis of novel anti-inflammatory and antibacterial agents, European Journal of Medicinal Chemistry, 39,3 (2004) 249-255.
39. Mishra, C.B., Mongre, R.K., Kumari, S., Jeong, D.K. ve Tiwari, M., Novel Triazole-Piperazine Hybrid Molecules Induce Apoptosis via Activation of the Mitochondrial Pathway and Exhibit Antitumor Efficacy in Osteosarcoma Xenograft Nude Mice Model, ACS Chemical Biology, 12,3 (2017) 753-768.
40. Zhang, Y., Zhan, Y., Ma, Y., Hua, X., Wei, W., Zhang, X., Song, H., Li, Z. ve Wang, B., Synthesis, crystal structure and 3D-QSAR studies of antifungal (bis-)2,2,4-triazole Mannich bases containing furyl and substituted piperazine moieties, Chinese Chemical Letters, 29,3 (2018) 441-446.

41. Aouad, M.R., Soliman, M.A., Alharbi, M.O., Bardaweel, S.K., Sahu, P.K., Ali, A.A., Messali, M., Rezki, N. ve Al-Soud, Y.A., Design, Synthesis and Anticancer Screening of Novel Benzothiazole-Piperazine-1,2,3-Triazole Hybrids, Molecules, 23,11 (2018) 2788.
42. Deshmukh, T.R., Khare, S.P., Krishna, V.S., Sriram, D., Sangshetti, J.N., Khedkar, V.M. ve Shingate, B., Synthesis, bioevaluation and molecular docking study of new piperazine anda mide linked dimeric 1,2,3-triazoles, Synthetic Communications, 50,2 (2020) 271-288.
43. Malik, N.N., Drug discovery: past, present and future, Drug Discovery Today, 13,21-22 (2008) 909-912.
44. Hassan, N.M., Alhossary, A.A., Mu, Y. ve Kwoh, C.K., Protein-Ligand Blind Docking Using QuickVina-W With Inter-Process Spatio-Temporal Integration, Scientific Reports, 7 (2017) 15451.
45. Ballante, F. ve Marshall, G.R., An Automated Strategy for Binding-Pose Selection and Docking Assesment in Structure-Based Drug Design, Journal of Chemical Information and Modeling, 56,1 (2016) 54-72.
46. Issa, N.T., Badiavas, E.V. ve Schürer, S., Research Techniques Made Simple: Molecular Docking in Dermatology-A Foray into In Silico Drug Discovery, Journal of Investigative Dermatology, 139,12 (2019) 2400-2408.
47. Can, N.Ö., Osmaniye, D., Levent, S., Sağlık, B.N., Korkut, B., Atlı, Ö., Özkay, Y. ve Kaplancıklı, Z.A., Design, synthesis and biological assessment of new thiazolyldrazine derivatives as selective and reversible hMAO-A inhibitors, European Journal of Medicinal Chemistry, 144 (2018) 68-81.
48. Morcoss, M.M., Abdelhafez, E.M.N., Ibrahim, R.A., Abdel-Rahman, H.M., Abdel-Aziz, M. ve El-Ella, D.A.A., Design, synthesis, mechanistic studies and *in silico* ADME predictions of benzimidazole derivatives as novel antifungal agents, Bioorganic Chemistry, 101 (2020) 103956.
49. Shou, W.Z., Current status and future directions of high-throughput ADME screening in drug discovery, Journal of Pharmaceutical Analysis, 10,3 (2020) 201-208.
50. Kikiowo, B., Ogunleye, A.J., Inyang, O.K., Adelakun, N.S., Omotuyi, O.I., Metibemu, D.S., David, T.I., Oludoyi, O.O. ve Ijatuyi, T.T., Flavones scaffold of *Chromolaena odorata* as a potential xanthine oxidase inhibitor: Induced Fit Docking and ADME studies, BioImpacts, 10,4 (2020) 227-234.
51. Ullah, S., Son, S., Yun, H.Y., Kim, D.H., Chun, P. ve Moon, H.R., Tyrosinase inhibitors: a patent review (2011-2015), Expert Opinion on Therapeutic Patents, 26 (2016) 347-362.

52. McLarin, M., ve Leung, I. K., Substrate specificity of polyphenol oxidase, Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology, 55,3 (2020) 274-308.
53. Mendes, E., Perry, M. D. J. ve Francisco, A. P., Design and discovery of mushroom tyrosinase inhibitors and their therapeutic applications, Expert Opinion on Drug Discovery, 9 (2014) 533-554.
54. Zolghadri, S., Bahrami, A., Tareq, M., Khan, M.T.H., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F. ve Saboury, A. A., A comprehensive review on tyrosinase inhibitors, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 34,1 (2019) 279-309.
55. Pillaiyar, T., Namasivayam, V., Manickam, M. ve Jung, S.H., Inhibitors of Melanogenesis: An Updated Review, Journal Of Medicinal Chemistry, 61 (2018) 7395-7418.
56. Claus, H., ve Decker, H., Bacterial tyrosinases, Systematic and Applied Microbiology, 29 (2006) 3–14.
57. Kim, Y.J., ve Uyama, H., Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future, CMLS Cellular and Molecular Life Sciences, 62 (2005) 1707-1723.
58. Decker, H., Schweikardt, T. ve Tucek, F., The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered?, Angew Chem Int Ed Engl., 45,28 (2006) 4546-4550.
59. Cho, K., Ryu, C.S., Jeong, S. ve Kim, Y., Potential adverse effect of tyrosinase inhibitors on teleosts: A review, Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 228 (2019) 108655.
60. Buitrago, E., Hardre, R., Haudecoeur, R. ve Jamet, H., Are Human Tyrosinase and Related Proteins Suitable Targets for Melanoma Therapy?, Current topics in medicinal chemistry, 16 (2016) 3033-3047.
61. Kobayashi, S., UVB-induced skin damage and the protection/treatment - effects of a novel, hydrophilic gamma-tocopherol derivative, Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 126,9 (2006) 677-693.
62. Yoshimura, M., Watanabe, Y., Kasai, K., Yamakoshi, J. ve Koga, T., Inhibitory Effect of an Ellagic Acid-Rich Pomegranate Extract on Tyrosinase Activity and Ultraviolet-Induced Pigmentation, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 69,12 (2005) 2368-2373.
63. Riley, P.A, Melanogenesis: a Realistic Target for Antimelanoma Therapy?, European Journal of Cancer and Clinical Oncology, 27,9 (1991) 1172-1177.
64. Slominski, A.T. ve Carlson, J.A., Melanoma Resistance: A Bright Future for Academicians and a Challenge for Patient Advocates, Mayo Clinic Proceedings, 89,4 (2014) 429-433.

65. Lai, X., Wichers, H.J., Soler-Lopez, M. ve Dijkstra, B.W., Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-related Proteins, Chemistry A European Journal, 24,1 (2017) 47-55.
66. Pinho, J.O., Matias, M. ve Gaspar, M.M., Emergent Nanotechnological Strategies for Systemic Chemotherapy against Melanoma, Nanomaterials, 9,10 (2019) 1455.
67. Bose, A., Petsko, G.A. ve Eliezer, D., Parkinson's Disease and Melanoma: Co-Occurrence and Mechanisms, Journal of Parkinson's Disease, 8 (2018) 385-398.
68. Olsen, J.H., Friis, S. ve Frederiksen, K., Malignant melanoma and other types of cancer preceding Parkinson disease, Epidemiology, 17,5 (2006) 582-587.
69. Gao, X., Simon, K.C., Han, J., Schwarzschild, M.A. ve Ascherio, A., Family history of melanoma and Parkinson disease risk, Neurology, 73,16 (2009) 1286-1291.
70. Xue, C., Zhang, L., Luo, W., Xie, X., Jiang, L. ve Xiao, T., 3D-QSAR and molecular docking studies of benzaldehyde thiosemicarbazone, benzaldehyde, benzoic acid, and their derivatives as phenoloxidase inhibitors, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 15,5 (2007) 2006-2015.
71. Xie, J., Dong, H., Yu, Y. ve Cao, S., Inhibitory effect of synthetic aromatic heterocycle thiosemicarbazone derivatives on mushroom tyrosinase: Insights from fluorescence, ¹H NMR titration and molecular docking studies, Food Chemistry, 190 (2016) 709-716.
72. Parvez, S., Kang, M., Chung, H.S. ve Bae, H., Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries, Phytother Res., 21,9 (2007) 805-816.
73. Chang, T.S., An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors, Int. Journal of Mol. Sci., 10,6 (2009) 2440-2475.
74. Loizzo, M.R., Tundis, R. ve Menichini, F., Natural and synthetic tyrosinase inhibitors as antibrowning agents: an update, Compr. Rev. Food Sci and Food Saf., 11,4 (2012) 378-398.
75. Mirmortazavi, S.S., Farvandi, M., Ghafouri, H., Mohammadi, A. ve Shourian, M., Evaluation of novel pyrimidine derivatives as a new class of mushroom tyrosinase inhibitor, Drug Design, Development and Therapy, 13 (2019) 2169–2178.
76. Lolak, N., Boga, M., Tuneg, M., Karakoc, G., Akocak, S. ve Supuran, C.T., Sulphonamides incorporating 1,3,5-triazine structural motifs show antioxidant, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and tyrosinase inhibitory profile, Journal of Enzyme Inhibitor And Medicinal Chemistry, 35,1 (2020) 424-431.
77. Raza, H., Abbasi, M.A., Rehman, A., Siddiqui, S.Z., Hassan, M., Snah, S.A.A., Shahid, M., Hong, H. ve Seo, S.Y., Design, synthesis and computational studies of N-(substitutedphenyl)-4-(4 phenyl-1-piperazinyl)butanamides as potent anti-

melanogenic and tyrosinase inhibitors, Journal of Molecular Structure, 1210 (2020) 127969.

78. Vittorio, S., Lelo, L., Mirabile, S., Gitto, R., Fais, A., Floris, S., Rapisarda, A., Paola, Germano, M.P. ve Luca, L., 4-Fluorobenzylpiperazine-containing derivatives as efficient inhibitors of mushroom tyrosinase, ChemMedChem, 15,18 (2020) 1757-1764.
79. Tian, J., Liu, T., Xue, J., Hong, W., Zhang, Y., Zhang D., Cui, C., Liu, M. ve Niu, S., Flavanoids derivatives from the root bark of *Broussonetia papyrifera* as a tyrosinase inhibitor, Industrial Crops & Products, 138 (2019) 111445.
80. Tehrani, M.B., Emani, P., Rezaei, Z., Khoshneviszadeh, M., Ebrahimi, M., Edraki, N., Mahdavi, M., Larijani, B., Ranjbar, S., Foroumadi, A. ve Khoshneviszadeh, M., Phthalimide 1,2,3-triazole hybrid compounds as tyrosinase inhibitors; synthesis, biological evaluation and molecular docking analysis, Journal of Molecular Structure, 1176 (2019) 86-93.
81. Jung, H.J., Noh, G.N., Park, Y., Kang, D., Chun, P., Chung, H.Y. ve Moon, H.R., In vitro and in silico insights into tyrosinase inhibitors with (E)-benzylidene-1-indanone derivatives, Computational and Structural Biotechnology Journal, 17 (2019) 1255-1264.
82. Iraj, A., Adelpour, T., Edraki, N., Khoshneviszadeh, M., Miri, R. ve Khoshneviszadeh, M., Synthesis, biological evaluation and molecular docking analysis of vaniline-benzylidenehydrazine hybrids as potent tyrosinase inhibitors, BMC Chemistry, 14 (2020) 28.
83. Cherry, H.M., Hossain Towhid, M. ve Anwar, M.N., Extracellular amylase from the isolate *Aspergillus fumigatus*, Pakistan Journal of biological sciences, 7,11 (2004) 1988-1992.
84. Rane, A.S., Joshi, R.S. ve Giri, A.P., Molecular determinant for specificity: Differential interaction of α -amylases with their proteinaceous inhibitors, BBA-General Subjects, 1864,12 (2020) 129703.
85. Gurung, N., Ray, S., Bose, S. ve Rai, V., A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond, BioMed Research International, 2013 (2013) 329121.
86. Mojsov, K., Microbial α -amylases and Their Industrial Applications: A Review, International Journal of Management IT and Engineering, 2,10 (2012) 583-609.
87. Visvanathan, R., Qader, M., Jayathilake, C., Jayawardana, B.C., Liyanage, R. ve Sivakanesan, R., Critical review on conventional spectroscopic α -amylase activity detection methods: merits, demerits, and future prospects, Journal of the Science of Food and Agriculture, 100,7 (2020) 2836-2847.

88. Sundarram, A. ve Murthy, T.P.K., α -Amylase Production and Applications: A Review, Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2,4 (2014) 166-175.
89. McCarter, J.D. ve Withers, S.G., Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-glucosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides, Journal of Biological Chemistry, 271 (1996) 6889-6894.
90. Sidar, A., Albuquerque, E.D., Voshol, G.P., Ram, A.F.J., Vijgenboom, E. ve Punt, P.J., Carbonhydrate Binding Modules: Diversity of Domain Architecture in Amylases and Cellulases From Filamentous Microorganisms, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8 (2020) 871.
91. Tiwari, S.P., Srivastava, R., Singh, C.S., Shukla, K., Singh, R.K., Singh, P., Singh, R., Singh, N.L. ve Sharma, R., Amylases: An Overview With Special Reference To Alpha Amylase, Journal of Global Biosciences, 4,1 (2015) 1886-1901.
92. Pinto, E.S.M., Dorn, M. ve Feltes, B.C., The tale of a versatile enzyme: Alpha-amylase evolution, structure, and potential biotechnological applications for the bioremediation of n-alkanes, Chemosphere, 250 (2020) 126202.
93. Naseri, R., Mozaffari, H.R., Ramezani, M. ve Sadeghi, M., Effect of diabetes mellitus type 2 on salivary glucose, immunoglobulin A, total protein, and amylase levels in adults: A systematic review and meta-analysis of case-control studies, Journal of Research in Medical Sciences, 23,1 (2018) 89.
94. Agarwal, P. ve Gupta, R., Alpha-amylase inhibition can treat diabetes mellitus, Research and Reviews Journal of Medical and Health Sciences, 5,4 (2016) 1-8.
95. Moreno-Valdespino, C.A., Luna-Vital, D., Camacho-Ruiz, R.M. ve Mojica, L., Bioactive proteins and phytochemicals from legumes: mechanisms of action preventing obesity and type-2 diabetes, Food Research International, 130 (2020) 108905.
96. Khan, A.R. ve Fiaz, H., Diabetes mellitus and dietary starch in perspective of blood glycaemic control, Journal of the Pakistan Medical Association, 70,7 (2020) 1232-1239.
97. Sun, L., Wang, Y. ve Miao, M., Inhibition of α -amylase by polyphenolic compounds: Substrate digestion binding interactions and nutritional intervention, Trends in Food Science & Technology, 104 (2020) 190-207.
98. Perion, R., Ferrieres, V., Garcia-Moreno, M.I., Mellet, C.O., Duval, R., Garcia Fernandez, J.M. ve Plusquellec, D., 1,2,3-Triazoles and related glycoconjugates as new glycosidase inhibitors, Tetrahedron, 61,38 (2005) 9118-9128.
99. Heidari, R., Zareae, S. ve Heidarizadeh, M., Extraction, Purification, and Inhibitory Effect of Alpha-Amylase Inhibitor from Wheat *Triticum aestivum* Var. *Zarrin*, Pakistan Journal of Nutrition, 4,2 (2005) 101-105.

100. Brayer, G.D., Luo, Y. ve Withers, S.G., The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes, Protein Science, 4,9 (1995) 1730-1742.
101. Tarling, C.A., Woods, K., Zhang, R., Brastianos, H.C., Brayer, G.D., Andersen, R.J., Withers, S.G., The search for novel human pancreatic α -amylase inhibitors: high-throughput screening of terrestrial and marine natural product extracts, Chem Bio Chem, 9,3 (2008) 433-438.
102. Ghosh, S. ve Rangan, L., Molecular docking and inhibition studies of α -amylase activity by labdane diterpenes from *Alpinia nigra* seeds, Medical Chemistry Research, 23 (2014) 4836-4852.
103. Ponnusamy, S., Haldar, S., Mulani, F., Zinjarde, S., Thulasiram, H. ve Kumar, A.R., Gedunin and Azadiradione: Human Pancreatic Alpha-Amylase Inhibiting Limonoids from Neem (*Azadirachta indica*) as Anti-Diabetic Agents, PLoS One, 10,10 (2015) 0140113.
104. Khaybullin, R.N., Zhang, M., Fu, J., Liang, X., Li, T., Katritzky, A.R., Okunieff, P. ve Qi, X., Design and Synthesis of Isosteviol Triazole Conjugates for Cancer Therapy, Molecules, 19,11 (2014) 18676-18689.
105. Balba, M., El-Hady, N.A., Taha, N., Rezki, N., ve El Ashry, El. S.H., İnhibition of α -glucosidase and α -amylase by diaryl derivatives of imidazole-thione and 1, 2, 4-triazole-thiol, European Journal of Medicinal Chemistry, 46,6 (2011) 2596-2601.
106. Anand, N., Jaiswal, N., Pandey, S.K., Srivastava, A.K. ve Tripathi, R.P., Application of click chemistry towards an efficient synthesis of 1,2,3-1H-triazolyl glycohybrids as enzyme inhibitors, Carbohydrate Research, 346,1 (2011) 16-25.
107. Balan, K., Perumal, P., Sundarabalaaji, N. ve Palvannan, T., Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of novel 2-allyl amino 4-methyl sulfanyl butyric acid as α -amylase and α -glucosidase inhibitor, Journal of Molecular Structure, 1081 (2015) 62-68.
108. Le Berre-Anton, V., Nahoum, V., Payan, F. ve Rouge, P., Molecular basis for the specific binding of different α -amylase inhibitors from *Phaseolus vulgaris* seeds to the active site of α -amylase, Plant Physiology and Biochemistry, 38,9 (2000) 657-665.
109. Espin, J.C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J. ve Garcia-Canovas, F., A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase, Analytical Biochemistry, 231,1 (1995) 237-246.
110. Jiménez, M., Chazarra, S., Escribano, J., Cabanes, J. ve García-Carmona, F., Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes, Journal of Agricultural Food Chemistry, 49,8 (2001) 4060-4063.

111. Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M. ve Saglam, N., Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*), Food Chemistry, 101,2 (2007) 778-785.
112. Akin, Ş., Ayazoglu-Demir, E., Colak, A., Kolcuoglu, Y., Yildirim, N. ve Bekircan, O., Synthesis, biological activities and molecular docking studies of some novel 2,4,5-trisubstituted-1,2,4-triazole-3-one derivatives as potent tyrosinase inhibitors, Journal of Molecular Structure, 1175 (2019) 280-286.
113. Taha, M., Baharudin, M.S., Ismail, N.H., Imran, S., Khan, M.N., Rahim, F., Selvaraj, M., Chigurupati, S., Nawaz, M., Qureshi, F. ve Vijayabalan, S., Synthesis, α -amylase inhibitory potential and molecular docking study of indole derivatives, Bioorganic Chemistry, 80 (2018) 36-42.
114. Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Faiz, O. ve Belduz., A. O., Cloning, expression and characterization of highly thermo- and pH-stable maltogenic amylase from a thermophilic bacterium *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4, Process Biochemistry, 45,6 (2010) 821-828.
115. Ghannay, S., Kadri, A. ve Aouadi, K., Synthesis, in vitro antimicrobial assessment, and computational investigation of pharmacokinetic and bioactivity properties of novel trifluoromethylated compounds using in silico ADME and toxicity prediction tools, Springer Link, 151 (2020) 267–280.
116. Spartan'16 Wavefunction, Inc. (2016), Irvine, CA, <http://wavefun.com>.
117. Stewart, J. J. P., Application of the pm6 method to modeling proteins, Journal of Molecular Modeling, 15,7 (2009) 765-805.
118. Zhao, Y., ve Truhlar, D.G., The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four-MO6 class functionals and 12-other functionals, Theor Chem Account, 120 (2007) 215-224.
119. Zhao, Y. ve Truhlar, D.G., Density functionals with broad applicability in chemistry., Accounts of chemical research, 41,2 (2008) 157-167.
120. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. ve Olson, A.J., Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, J. Computational Chemistry, 16 (2009) 2785-2791.
121. Trott, O. ve Olson, A.J., Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading, J Comput Chem, 31,2 (2010) 455–461.
122. Ismaya, W. T., Rozeboom, H. J., Weijn, A., Mes, J. J., Fusetti, F., Wichers, H. J. ve Dijkstra, B. W., Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone, Biochemistry, 50,24 (2011) 5477-5486.

123. Gilles, C., Astier, J. P., Marchis- Mouren, G., Cambillau, C. ve Payan, F., Crystal structure of pig pancreatic α - amylase isoenzyme II, in complex with the carbohydrate inhibitor acarbose, European journal of biochemistry, 238,2 (1996) 561-569.
124. Accelrys Software Inc., (2013) Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0, San Diego.
125. Hopkins, A.L. ve Groom, C.R., The druggable genome, Nature Reviews Drug Discovery, 1,9 (2002) 727-730.
126. Copeland, R.A., Harpel, M.R. ve Tummino, P.J., Targeting enzyme inhibitors in drug discovery, Expert Opinion on Therapeutic Targets, 11,7 (2007) 967-978.
127. Copeland, R. A., Pompliano, D. L. ve Meek, T. D., Erratum: Drug–target residence time and its implications for lead optimization, Nature Reviews Drug Discovery, 6,3 (2007) 252–252.
128. Kaur, P. ve Chawla, A., 1,2,4-Triazole: A Review of Pharmacological Activities, International Research Journal of Pharmacy, 8,7 (2017) 10–29.
129. Thakkar, S.S., Thakor, P., Doshi, H. ve Ray, A., 1,2,4-Triazole and 1,3,4-oxadiazole analogues: Synthesis, MO studies, in silico molecular docking studies, antimalarial as DHFR inhibitor and antimicrobial activities, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 25,15 (2017) 4064–4075.
130. Fischer J, Ganellin CR. ve Rotella D.P., Analogue-based drug discovery III, Germany, 2012.
131. Eswaran, S., Adhikari, A.V. ve Shetty, N.S., Synthesis and antimicrobial activities of novel quinoline derivatives carrying 1,2,4-triazole moiety, European Journal of Medicinal Chemistry, 44,11 (2009) 4637–4647.
132. Jordao, A.K., Ferreira, V.F., Lima, E.S., de Souza, M.C.B.V., Carlos, E.C.L., Castro, H.C., Geraldo, R.B., Rodrigues, C.R., Almeida, M.C.B. ve Cunha, A.C., Synthesis, antiplatelet and in silico evaluations of novel N-substituted-phenylamino-5-methyl-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazides, Bioorganic Medicinal Chemistry, 17,10 (2009) 3713-3719.
133. Cong, N., Nhan, H., Van Hung, L., Thang, T. ve Kuo, P.C., Synthesis and Antibacterial Activity of Analogs of 5-Arylidene-3-(4-methylcoumarin-7-yloxyacetylamino)-2-thioxo-1,3-thiazoli-din-4-one, Molecules, 19,9 (2014) 13577–13586.
134. Dalloul, H.M., Reaction of nitrilimines with pyruvaldehyde hydrazones: synthesis and antimicrobial evaluation of some new 1,2,4-triazole derivatives, Journal of Chemistry, (2015) 593738.

135. Yu, F., Jia, Y.L., Wang, H.F., Zheng, J., Cui, Y., Fang, X.Y. ve Chen, Q.X., Synthesis of Triazole Schiff's Base Derivatives and Their Inhibitory Kinetics on Tyrosinase Activity, PLoS One, 10,9 (2015) 0138578.
136. Xie, W., Zhang, J., Ma, X., Yang, W., Zhou, Y., Tang, X. ve Liu, F., Synthesis and Biological Evaluation of Kojic Acid Derivatives Containing 1,2,4-triazole as Potent Tyrosinase Inhibitors, Chemical Biology Drug Design, 86,5 (2015) 1087–1092.
137. Tien, C.N., Cam, D.T.T., Manh, H.B. ve Dang, D.N., Synthesis and antibacterial activity of some derivatives of 2-methylbenzimidazole containing 1,3,4-oxadiazole or 1,2,4-triazole heterocycle, Journal of Chemistry, (2016) 1507049.
138. Ayeleso, A., Joseph, J., Belay, Y., Kinfe, H., Mazibuko, S., Oguntibeju, O. ve Mukwevho, E., Hybrid compounds from thiosemicarbazone and triazole as antidiabetic agents and their antioxidant potentials, Biomedical Research, 28 (2017) 1-10.
139. Gomha, S.M., Abdelaziz, M.R., Kheder, N.A., Abdel-aziz, H.M., Alterary, S. ve Mabkhot, Y.N., A facile access and evaluation of some novel thiazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives incorporating thiazole moiety as potent anticancer agents, Chemistry Central Journal, 11,1, (2017) 105.
140. Zhang, S., Xu, Z., Gao, C., Ren, Q.C., Chang, L., Lv, Z.S. ve Feng, L.S., Triazole derivatives and their anti-tubercular activity, European Journal of Medicinal Chemistry, 138 (2017) 501–513.
141. El-Sherief, H.A.M., Youssif, B.G.M., Abbas Bukhari, S.N., Abdelazeem, A.H., Abdel-Aziz, M. ve Abdel-Rahman, H.M., Synthesis, anticancer activity and molecular modeling studies of 1,2,4-triazole derivatives as EGFR inhibitors, European Journal of Medicinal Chemistry, 156 (2018) 774–789.
142. Fan, Y.L., Ke, X. ve Liu, M., Coumarin-triazole Hybrids and Their Biological Activities, Journal of Heterocyclic Chemistry, 55,4 (2018)791–802.
143. Jin, R.Y., Zeng, C.Y., Liang, X.H., Sun, X.H., Liu, Y.F., Wang, Y.Y. ve Zhou, S., Design, synthesis, biological activities and DFT calculation of novel 1,2,4-triazole Schiff base derivatives, Bioorganic Chemistry, 80 (2018) 253–260.
144. Butt, A.R.S., Abbasi, M.A., Rehman, A., Siddiqui, S.Z., Hassan, M., Raza, H., Shah, S.A.A. ve Seo, S.Y., Synthesis and structure-activity relationship of elastase inhibiting novel ethylated thiazole-triazole acetamide hybrids: Mechanistic insights through kinetics and computational contemplations, Bioorganic Chemistry, 86 (2019) 197–209.
145. Djemoui, A., Naouri, A., Ouahrani, M.R., Djemoui, D., Lahcene, S., Lahrech, M.B., Boukenna, L., Albuquerque, H.M.T., Saher, L., Rocha, D.H.A., Monteiro, F.L., Helguero, L.A., Bachari, K., Talhi, O. ve Silva, A.M.S., A step-by-step synthesis of triazole-benzimidazole-chalcone hybrids: Anticancer activity in human cells⁺, Journal of Molecular Structure, 1204 (2019) 127487.

146. Chai, Y., Wan, Z.L., Wang, B., Guo, H.Y. ve Liu, M.L., Synthesis and in vitro antibacterial activity of 7-(4-alkoxyimino-3-amino-3-methylpiperidin-1-yl)fluoroquinolone derivatives, European Journal of Medicinal Chemistry, 44,10 (2009) 4063–4069.
147. Chugunova, E., Akylbekov, N., Bulatova, A., Gavrilov, N., Voloshina, A., Kulik, N., Zobov, V., Dorynin, A., Syakaev, V. ve Burilov, A., Synthesis and biological evaluation of novel structural hybrids of benzofuroxan derivatives and fluoroquinolones, European Journal of Medicinal Chemistry, 116 (2016) 165–172.
148. Mermer, A., Faiz, O., Demirbas, A., Demirbas, N., Alagumuthu, M. ve Arumugam, S., Piperazine-Azole-Fluoroquinolone Hybrids: Conventional and Microwave Irradiated Synthesis, Biological Activity Screening and Molecular Docking Studies, Bioorganic Chemistry, 85 (2019) 308-318.
149. Silverman, R.B., The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, Second Edition, Illinois, 2004.
150. Mallikarjuna, B.P., Sastry, B.S., Kumar, G.V.S., Rajendraprasad, Y., Chandrashekar, S. M. ve Sathisha, K., Synthesis of new 4-isopropylthiazole hydrazide analogs and some derived clubbed triazole, oxadiazole ring system- A novel class of potential antibacterial, antifungal and antitubercular agents, European Journal of Medicinal Chemistry, 44,11 (2009) 4739-4746.
151. Kumar, G.V.S., Prasad, Y.R., Mallikarjuna, B.P. ve Chanrashekar, S.M., Syntheses and pharmacological of clubbed isopropylthiazole derived triazolothiadiazoles, triazolothiadiazines and mannich bases as potential antimicrobial and antitubercular agents, European Journal of Medicinal Chemistry, 45,11 (2010) 5120-5129.
152. Polak, A., The past, present and future of antimycotic combination therapy, Mycoses, 42 (1999) 355-370.
153. Mermer, A., Demirci, S., Basoglu-Ozdemir, S., Demirbas, A., Ulker, S., Ayaz, F.A., Aksakal, F. ve Demirbas, N., Conventional and microwave irradiated synthesis, biological activity evaluation and molecular doking studies of highly substituted piperazine-azole hybrids, Chinese Chemical Letters, 28,5 (2017) 995-1005.
154. Yılmaz, F. ve Mentese, M., Design And Synthesis Of Some Piperazine Hybrid Molecules, Revue Roumaine de Chimie, 62,12 (2017) 941-946.
155. Wang, B.L., Zhang, Y., Liu, X.H., Zhang, L.Y., Zhan, Y.Z., Zhang, X., Wang, L.Z., Li, Y.H. ve Li, Z.M., Synthesis and biological activity of novel dimethylpyrazole and piperazine-containing (bis)1,2,4-triazole derivatives, Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 192,1 (2017) 34-41.
156. Gan, L.L., Zhang, H.Z. ve Zhou, C.H., Design, Synthesis and Relational Biological Evaluation of Novel Diphenylpiperazine 1,2,3-triazole Derivatives, Journal of Pharmaceutical Sciences, 80,6 (2018) 1045-1056.

157. Basoglu-Ozdemir, S., Demirbas, N., Demirbas, A., Ayaz, F.A. ve Colak, N., Microwave-Assisted Synthesis, Antioxidant, and Antimicrobial Evaluation of Piperazine-Azole-Fluoroquinolone Based 1,2,4-Triazole Derivatives, Journal of Heterocyclic Chemistry, 55,12 (2018) 2744-2759.
158. Williams, J.W. ve Morrison, J.F., The kinetics of reversible tight binding-inhibition, Methods in Enzymology, 63 (1979) 437-467.
159. Morrison, J.F. ve Walsh, C.T., The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors, Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol., 61 (1988) 201-301.
160. Larik, F. A., Saeed, A., Channar, P. A., Muqadar, U., Abbas, Q., Hassan, M., Seo, S. ve Bolte, M., Design, Synthesis, kinetic mechanism and molecular docking studies of novel 1-pentanoyl-3-arylthioureas as inhibitors of mushroom tyrosinase and free radical scavengers, European Journal of Medicinal Chemistry, 141 (2017) 273–281.
161. Pillaiyar, T., Manickam, M. ve Namasivayam, V., Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 32,1 (2017) 403–425.
162. Şöhretoğlu, D., Sari, S., Barut, B. ve Özel, A., Tyrosinase inhibition by some flavonoids: Inhibitory activity, mechanism by in vitro and in silico studies, Bioorganic Chemistry, 81 (2018) 168–174.
163. Ashooriha, M., Khoshneviszadeh, M., Khoshneviszadeh, M., Moradi, S.E., Rafiei, A., Kardan, M. ve Emami, S., 1,2,3-triazole-based kojic acid analogs as potent tyrosinase inhibitors: Design, synthesis and biological evaluation, Bioorganic Chemistry, 82 (2019) 414-422.
164. Shao, L.L., Wang, X.L., Chen, K., Dong, X.W., Kong, L.M., Zhao, D.Y., Hider, R. C. ve Zhou, T., Novel hydroxypyridinone derivatives containing an oxime ether moiety: Synthesis, inhibition on mushroom tyrosinase and application in anti-browning of fresh-cut apples, Food Chemistry, 242 (2018) 174–181.
165. Demir, E., Çolak, A., Kalfa, A., Yasar, A., Bekircan, O. ve Yildirim Akatin, M., Investigation of tyrosinase inhibition by some 1,2,4 triazole derivative compounds: in vitro and in silico mechanisms, Turkish Journal of Biochemistry, 44,4 (2018) 473-481.
166. Gawande, S.S., Warangkar, S.C., Bandgar, B.P. ve Khobragade, C.N., Synthesis of new heterocyclic hybrids based on pyrazole and thiazolidinone scaffolds as potent inhibitors of tyrosinase, Bioorganic Medicinal Chemistry, 21,10 (2013) 2772–2777.
167. Channar, P.A., Saeed, A., Larik, F.A., Rafiq, M., Ashraf, Z., Jabeen, F. ve Fattah, T.A., Synthesis, computational studies and enzyme inhibitory kinetics of substituted methyl[2-(4-dimethylamino-benzylidene)-hydrazono)-4-oxo-thiazolidin-5-ylidene]acetates as mushroom tyrosinase inhibitors, Bioorganic Medicinal Chemistry, 25,21 (2017) 5929-5938.

168. Gheibi, N., Taherkhani, N., Ahmadi, A., Haghbeen, K. ve Ilghari, D., Characterization of inhibitory effects of the potential therapeutic inhibitors, benzoic acid and pyridine derivatives, on the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase, Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 18,2 (2015) 122-129.
169. Kumar, P., Duhan, M., Kadyan, K., Sindhu, J., Kumar, S., ve Sharma, H., Synthesis of novel inhibitors of α -amylase based on the thiazolidine-4-one skeleton containing a pyrazole moiety and their configurational studies, MedChemComm, 8, 7 (2017) 1468–1476.
170. Larik, F.A., Saeed, A., Faisal, M., Channar, P.A., Azam, S.S., Ismail, H., Dilshad, E. ve Mirza, B., Synthesis, molecular docking and comparative efficacy of various alkyl/aryl thioureas as antibacterial, antifungal and α -amylase inhibitors, Computational Biology and Chemistry, 77 (2018) 193-198.
171. Figueiredo-González, M., Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Carrasco-Pancorbo, A., Cancho-Grande, B. ve Simal-Gándara, J., The involvement of phenolic-rich extracts from Galician autochthonous extra-virgin olive oils against the α -glucosidase and α -amylase inhibition, Food Research International, 116 (2018) 447-454.
172. Duhan, M., Singh, R., Devi, M., Sindhu, J., Bhatia, R., Kumar, A. ve Kumar, P., Synthesis, molecular docking and QSAR study of thiazole clubbed pyrazole hybrid as α -amylase inhibitor, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 27 (2019) 1-17.
173. Shahzad, D., Saeed, A., Larik, F.A., Channar, P.A., Abbas, Q., Alajmi, M.F., Arshad, M.I., Erben, M.F., Hassan, M., Raza, H., Seo, S. ve El-Seedi, H.R., Novel C-2 Symmetric Molecules as α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitors: Design, Synthesis, Kinetic Evaluation, Molecular Docking and Pharmacokinetics, Molecules, 24, 8 (2019) 1511.
174. Martinez-Gonzalez, A.I., Díaz-Sánchez, Á.G., de la Rosa, L.A., Bustos-Jaimes, I. ve Alvarez-Parrilla, E., Inhibition of α -amylase by flavonoids: Structure activity relationship (SAR), Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 206 (2019) 437–447.
175. Alqahtani, A.S., Hidayathulla, S., Rehman, M.T., ElGamal, A.A., Al-Massarani, S., Razmovski-Naumovski, V., Alqahtani, M.S., El Dib, R.A. ve AlAjmi, M.F., Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase Enzyme Inhibition and Antioxidant Potential of 3-Oxolupenal and Katonic Acid Isolated from Nuxia oppositifolia, Biomolecules, 10,1 (2019) 61.
176. Cardullo, N., Muccilli, V., Pulvirenti, L., Cornu, A., Pouységu, L., Deffieux, D., Quideau, S. ve Tringali, C., C-glucosidic ellagitannins and galloylated glucoses as potential functional food ingredients with anti-diabetic properties: a study of α -glucosidase and α -amylase inhibition, Food Chemistry, 313 (2019) 126099.

177. Adegboye, A.A., Khan, K.M., Salar, U., Aboaba, S.A., Kanwal, Chigurupati, S., Fatima, I., Taha, M., Wadood, A., Mohammad, J.I., Khan, H. ve Perveen, S., 2-Aryl benzimidazoles: Synthesis, In vitro α -amylase inhibitory activity, and molecular docking study, European Journal of Medicinal Chemistry, 150 (2018) 248–260.
178. Channar, P.A., Saeed, A., Larik, F.A., Rashid, S., Iqbal, Q., Rozi, M., Younis, S. ve Mahar, J., Design and synthesis of 2,6-di(substituted phenyl)thiazolo[3,2-b]-1,2,4-triazoles as α -glucosidase and α -amylase inhibitors, co-relative Pharmacokinetics and 3D QSAR and risk analysis, Biomedicine Pharmacotherapy, 94 (2017) 499–513.
179. Taha, M., Irshad, M., Imran, S., Rahim, F., Selvaraj, M., Almandil, N.B., Mosaddik, A., Chigurupati, S., Nawaz, F., Ismail, N.H. ve Ibrahim, M., Thiazole Based Carbohydrazide Derivatives as α -Amylase Inhibitor and Their Molecular Docking Study, Heteroatom Chemistry, 8, 2019, 1–8.
180. Bhutani, R., Pathak, D.P., Kapoor, G., Husain, A. ve Iqbal, M.A., Novel hybrids of benzothiazole-1,3,4-oxadiazole-4-thiazolidinone: Synthesis, *in silico* ADME study, molecular docking and *in vivo* anti-diabetic assessment, Bioorganic Chemistry, 83 (2019) 6-19.

ÖZGEÇMİŞ

2012 yılında Türkiye Petrolleri Anonim Ortaklığı Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü Kimya Öğretmenliği programında lisans eğitimine başladı. 5 yıllık olan bu programı 2017 yılında başarı ile tamamlayarak mezun oldu. 2017 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans programına başladı. 2018 yılında lisansüstü öğrenci olarak Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde biyokimya laboratuvarında kısmi zamanlı olarak araştırma görevlisi statüsünde görev yaptı. 2019 yılının bahar döneminde Erasmus'a gitti. Yüksek lisans derslerinin bir kısmını Çekya/South Bohemia Üniversitesi'nde aldı. Yabancı dili İngilizce'dir.